Ueber Parachymosin, ein neues Labferment.

Von

Ivar Bang, Christiania.

(Mit 1 Textfigur.)

Schon in seinen ersten, grundlegenden Untersuchungen über das Labferment hat Hammarsten nachgewiesen, dass dies Ferment im Gegensatz zu Pepsin durch eine 24—48stündige Digestion bei Körpertemperatur mit Magensaft vollständig destruiert wird.

Diese Observation ist auch von allen späteren Forschern bestätigt worden (Pekelharing's etwas abweichende Beobachtung wird später erwähnt).

Thunberg, einer der Assistenten Hammarsten's, der, von dieser Thatsache ausgehend, ein von Lab freies Pepsin darzustellen versuchte, beobachtete hierbei die ganz merkwürdige Erscheinung, dass, wenn er eine Mischung beider Fermenten (das gewöhnliche Pepsin des Handels) bei Körpertemperatur in saurer Lösung digerirte, konnte er zwar das Chymosin nicht nachweisen, als er die Lösung mit Alkali neutralisirte; wenn er aber die Lösung anstatt Alkali mit Kalk neutralisirte, konnte er Tage und Wochen digeriren, ohne dass das Lab hierdurch destruiert wurde.

Diese Beobachtung wurde von Thunberg nicht weiter verfolgt. Da ich aber der Meinung war, dass diese Sache sehr wohl eine genauere Untersuchung verdiente, habe ich eine solche unternommen, worüber ich hier berichten will.

Zuerst einige Worte über meine Arbeitsmethode. Ich ging von den gewöhnlichen Pepsinpräparaten — *pepsinum siccum* — aus, einem schwedischen und einem dänischen Präparate, welche beide eine starke Labwirkung hatten. Weiter benutzte ich eine sehr wirksame schwedische Lablösung (Barnekow's Löpe), und endlich bereitete ich mir selbst Lablösungen durch Extraction aus Kalb- und Schweinemagen.

Um dieselben Versuchsbedingungen immer zu haben, wurden zu jedem Versuch 10 ccm frisch gemolkene Milch zu 1 ccm Fermentlösung benutzt. (Wenn man weniger Fermentlösung brauchte, wurde

die Probe mit Wasser zu 1 ccm Gesamtvolum versetzt.) Es wurde auch dafür gesorgt, dass die Fermentlösungen denselben Salzgehalt hatten.

Die Reagenzgläser mit den 10 ccm Milch wurden in einem Wasserbade, dessen Temperatur genau auf $37,5^{\circ}$ C. angestellt war, niedergesenkt. Wenn die Milch die Temperatur des Wasserbades bekommen hatte, wurde die Fermentlösung zugesetzt.

Die Observationszeit jedes Versuches war gewöhnlich eine Stunde.

Meine ersten Untersuchungen gingen darüber aus, die Richtigkeit der Beobachtung Thunberg's zu controliren.

Versuch I.

Von einer filtrirten 2 % igen Pepsinlösung in 0,4 % HCl, nahm ich eine Probe, die ich mit Alkali ($n/10$) neutralisirte, aus. 1 ccm davon coagulirte 10 ccm Milch augenblicklich. Danach wurde die Hauptlösung in den Digestionsapparat bei 39° C. eingestellt. Nach einer Digestion von 24 Stunden coagulirte eine ausgenommene Probe nach Neutralisation mit Alkali die Milch fast augenblicklich. Nach einer Digestion von 48 Stunden coagulirt die Probe Milch auf 1 Minute. Die Digestion wurde fortgesetzt. Nach 72 Stunden war die Coagulationszeit der Fermentlösung nach Neutralisation mit Alkali 2 Minuten. Endlich nach 96 Stunden konnte ich constatiren, dass die Labwirkung verschwunden war, als ich mit Alkali neutralisirte. Benutzte ich aber CaCO_3 zur Neutralisation (Wasser und NaCl wurden entsprechend der Alkalimenge hinzugefügt), coagulirten die Lösungen Milch ganz momentan. Den nächsten Tag (also nach einer Digestion von 5 Tagen) coagulirte die Fermentlösung die Milch innerhalb 1 Minute, wenn ich mit CaCO_3 neutralisirte. Nach 6 Tagen ebenso. Nach 7 Minuten war die Coagulationszeit 4 Minuten. Endlich nach 9 Tagen war die Labwirkung weg, wenn ich mit dem kohlensauren Kalk auch das Wasser und NaCl hinzufügte. Wurde nur kohlensaurer Kalk zugesetzt, coagulirte die neutralisirte Lösung Milch in 2,5 Minuten. Nach einer Digestion von 11 Tagen war das Lab vollständig zerstört.

Der Versuch hat also Thunberg's Beobachtung völlig bestätigt, insoweit man die Pepsinlösung beinahe zwei Wochen digeriren konnte, ehe die Labwirkung verschwand, wenn man mit kohlensaurem Kalk neutralisirte. Weiter geht aber die überraschende Thatsache hervor, dass man auch 96 Stunden digeriren musste, um die Labwirkung zu vernichten, wenn man mit Alkali neutralisirte.

Dies steht aber im Widerspruch zu allen früheren Observationen, dass man nur 24—48 Stunden digeriren braucht, um das Lab vollständig zu zerstören.

Diese neue Thatsache forderte desshalb dringend seine Bestätigung durch wiederholte Versuche. Es wurden auch mehrere solche angestellt. Ich halte es für überflüssig, alle diese zu referiren, da

sie alle immer zu demselben Resultate führten. Desshalb werde ich nur noch einen Versuch referiren.

Versuch II.

Ich ging diesmal von einer 1 % igen Pepsinlösung in 0,4 % HCl aus. Eine mit Alkali ($\frac{n}{10}$) neutralisirte Probe coagulirte die Milch augenblicklich. Nach einer Digestionszeit von 48 Stunden war die Coagulationszeit 2 Minuten. Nach 72 Stunden war die Coagulationszeit 34 Minuten, und nach 96 Stunden war die Labwirkung weg, wenn ich mit Alkali neutralisirte. Nach einer Digestion von 5 Tagen war die Coagulationszeit nach Neutralisation mit kohlensaurem Kalk 15 Minuten, und nach 6 Tagen war jede Labwirkung verschwunden.

Der Versuch hat also — wie auch die übrigen — meine erste Beobachtung bestätigt.

Da das in den Pepsinpräparaten vorkommende Lab sich so eigenthümlich verhielt, wurden auch Digestionsversuche mit reinen Lablösungen angestellt, um besonders die Kalkwirkung zu untersuchen.

Aus der Barnekow'schen Lablösung sowie aus Extracten von Kalbsmagen stellte ich mir 0,4 % ige HCl-Lösungen her, deren Wirkung auf Milch mindestens zwei Mal so gross wie die der Pepsinlösungen war.

Mit diesen wurden Digestionsversuche angestellt. Es zeigte sich dann, dass alles Lab hier immer nach einer Digestionszeit von 24—48 Stunden zerstört war, gleichgültig ob man mit Alkali oder kohlensaurem Kalk neutralisirte.

Wir sehen aus diesen Versuchen, dass das in den Pepsinpräparaten vorkommende Lab sich gegenüber dem gewöhnlichen Lab in seinem Verhältniss zur Digestion mit Magensaft sehr ungleich verhält. Der Unterschied ist zweifach. Erstens muss man das Pepsin-Lab viel länger als das gewöhnliche digeriren, um die Labwirkung zu vernichten, wenn man wie gewöhnlich mit Alkali neutralisirt. Und zweitens kommt dann für das Pepsin-Lab eine Periode, wo man zwar keine Labwirkung nach Neutralisation mit Alkali findet, nach Neutralisation mit kohlensaurem Kalk aber sehr deutliche, ja sogar starke Labwirkung demonstrieren kann, während das gewöhnliche Lab keine solche Periode gibt.

Dieser Unterschied ist so bedeutend, dass man berechtigt ist, darüber zu zweifeln, ob nicht hier zwei verschiedene Fermente vorliegen.

Es hat sich auch in der That herausgestellt, dass das Pepsin-Lab ein von dem gewöhnlichen verschiedenes Labferment ist.

Dies neue Labferment bezeichne ich mit dem Namen Parachymosin.

Das Parachymosin zeigt sich als ein vom gewöhnlichen Chymosin verschiedenes Lab — die Verschiedenheit der Fermente bei Digestion mit Magensaft ausgenommen — durch vier charakteristische Reactionen, nämlich durch sein Verhalten: bei Verdünnung, zum Chlorcalcium, beim Erhitzen und gegen Alkali.

Das Verhalten des Parachymosins bei Verdünnung.

Bekanntlich hat Hammarsten für das gewöhnliche Chymosin das Gesetz aufgestellt, dass die Coagulationszeit einer Lablösung mit der Menge Ferment, die Lösung enthält, indirect proportional ist. Coagulirt z. B. 1 ccm einer Lablösung 10 ccm Milch in 5 Minuten, braucht 1 ccm der Lablösung, mit dem gleichen Volum Wasser verdünnt, und welche die Hälfte Menge Ferment enthält, die doppelte Zeit, also 10 Minuten. Verdünnt man die Lablösung mit drei Volumen Wasser — die Lösung enthält dann ein Viertel der ursprünglichen Fermentmenge — ist die Coagulationszeit 20 Minuten u. s. w.

Das Parachymosin verhält sich ganz anders.

Geht man von einer concentrirten Lösung aus und verdünnt diese, wird man im Anfang bemerken, dass die Coagulationszeit etwas kürzer ist, als es das Gesetz verlangt. Verdünnt man aber weiter, sieht man bald, dass die Coagulationszeit viel länger wird, als man es erwartet, und bald kommt man zu einem Punkte, wo die Labwirkung ganz verschwunden ist.

Ein Beispiel wird dies illustriren.

Versuch III.

2 % ige Pepsinlösung in 0,4 % HCl mit Alkali neutralisirt.

Fermentlösung			Wasser			Coagulationszeit	
1 ccm	+	—	ccm	+	10 ccm Milch	0,20 Minute	
$\frac{1}{2}$ "	+	$\frac{1}{2}$ "	"	+	10 " "	0,30 "	
$\frac{1}{4}$ "	+	$\frac{3}{4}$ "	"	+	10 " "	0,40 "	
$\frac{1}{8}$ "	+	$\frac{7}{8}$ "	"	+	10 " "	1,30 Minuten	
$\frac{1}{16}$ "	+	$\frac{15}{16}$ "	"	+	10 " "	3,30 "	
$\frac{1}{32}$ "	+	$\frac{31}{32}$ "	"	+	10 " "	7,00 "	
$\frac{1}{64}$ "	+	$\frac{63}{64}$ "	"	+	10 " "	25,00 "	
$\frac{1}{128}$ "	+	$\frac{127}{128}$ "	"	+	10 " "	Keine in 1 Stunde.	

Von ähnlichen Versuchen habe ich eine ganze Reihe ausgeführt. Alle diese zu referiren halte ich für überflüssig.

Zwei Parallelversuche mit einer Pepsinlösung und Barnekow's Lablösung sind jedoch ganz illustirend.

Versuch V.

Fermentlösung	Wasser			10 ccm Milch	Coagulationszeit	
					Pepsinlösung	Barnekow's Lab
1 ccm	+	— ccm	+		2,30 Minuten	4,0 Minuten
$\frac{1}{2}$ "	+	$\frac{1}{2}$ "	+	10 "	7,30 "	8,30 "
$\frac{1}{4}$ "	+	$\frac{3}{4}$ "	+	10 "	40 "	17 "
$\frac{1}{8}$ "	+	$\frac{7}{8}$ "	+	10 "	keine	38,30 "

Obwohl also die Pepsinlösung anfänglich die Hälfte Zeit der Lablösung zur Coagulation der Milch braucht, ist schon das Verhältniss nach zweimaliger Verdünnung das entgegengesetzte, die

Fig. 1. Die Verdünnungcurve des Parachymosins und Chymosins.

Pepsinlösung coagulirt die Milch in 40 Minuten, die Lablösung nur in 17 Minuten.

Es bleibt noch übrig zu untersuchen, ob die Verdünnung mit Wasser an und für sich eine schädliche Wirkung auf das Parachymosin ausübt, oder ob dies Ferment nur in einer gewissen Concentration wirken kann und darüber nicht — allerdings eine ganz ungewöhnliche Eigenschaft eines Fermentes.

Um dies zu untersuchen, stellte ich derartige Verdünnungsversuche an, dass ich nicht die Pepsinlösung, sondern die Milch mit der entsprechenden Menge Wasser verdünnte und setzte hierzu verschiedene Bruchtheile eines Kubikcentimeters der Pepsinlösung. Auch diese Versuche zeigten dasselbe wie die vorhergehenden.

Mit der Verdünnung nimmt also die Wirkung des Parachymosins

viel mehr an Intensität ab, als was man nach Hammersten's Gesetz erwarten sollte, und sehr bald hört die milchcoagulirende Wirkung überhaupt auf. In diesen Fällen habe ich sogar nach 24 Stunden die Milch flüssig gefunden.

Das Verhalten des Parachymosins zum Chlorkalcium.

Bekanntlich übt ein Zusatz von Chlorkalcium eine beschleunigende Wirkung auf die Coagulationszeit des Chymosins. Die Wirkung des CaCl_2 auf Parachymosin ist nun von gleicher Art und Weise, und der Unterschied ist nur ein quantitativer. Aber dieser quantitative Unterschied ist so bedeutend, dass er sehr wohl als ein charakteristischer Unterschied hervorgehoben zu werden verdient.

Erstens übt ein so geringer Zusatz von CaCl_2 , dass er überhaupt ohne Wirkung auf das Chymosin wäre, auf das Parachymosin eine bedeutende Herabsetzung der Coagulationszeit aus, und zweitens hat ein grösserer Zusatz von CaCl_2 , der auch auf das Chymosin wirkt, auf das Parachymosin eine viel grössere Wirkung.

Versuch VI.

Eine neutralisirte Pepsinlösung wurde so weit verdünnt, dass man keine Coagulation in einer Stunde bekam. Diese Lösung wurde mit CaCl_2 bis 0,2 % versetzt — in der Milch-Fermentlösung bekommt man also 0,02 % CaCl_2 — und jetzt coagulirt die Lösung Milch in 5 Minuten.

Eine Chymosinlösung mit derselben Menge CaCl_2 versetzt, coagulirt die Milch in derselben wie ohne CaCl_2 .

Versuch VII.

a) Barnekow's Lablösung wurde so weit verdünnt, dass die Coagulationszeit 38,5 Minuten war. Nun wurde CaCl_2 bis 0,2 % zugesetzt, und die Coagulationszeit ist 40 Minuten.

b) Ein neutralisirtes Extract aus Kalbsmagen coagulirt die Milch in 13 Minuten, nach dem Zusatz von 0,2 % CaCl_2 ist die Coagulationszeit 12 Minuten.

Versuch VIII.

Eine neutralisirte Pepsinlösung wurde so weit mit Wasser verdünnt, dass eine Probe mit 0,2 % CaCl_2 versetzt in 25 Minuten die Milch coagulirt. Eine andere Probe wurde mit CaCl_2 zu 2 % — die Milch-Fermentlösung enthält dann 0,2 % CaCl_2 — versetzt, und nun ist die Coagulationszeit 5 Minuten.

Eine solche Beschleunigung kann man nicht bei einer Chymosinlösung observiren.

Das Verhältniss des Parachymosins zu CaCl_2 erklärt uns, warum wir bei den Digestionsversuchen mit Pepsin nach Neutralisation und

CaCO_3 die Labwirkung wieder bekommen konnten, lange nachdem die Labwirkung nach Neutralisation mit Alkali verschwunden war. In diesen Fällen konnte ich auch nach Neutralisation mit Alkali durch Zusatz von CaCl_2 wieder die Labwirkung bekommen.

Der dritte Unterschied zwischen Parachymosin und Chymosin ist:

Das Verhalten beim Erhitzen.

Wie die meisten Fermente ist auch das Chymosin sehr empfindlich gegen Einwirkung höherer Temperaturen. Ein kurzes Erhitzen auf 70°C. ist ausreichend, um selbst sehr concentrirte Lösungen vollständig zu zerstören. Dies bei neutraler Reaction. In saurer Lösung ist das Ferment noch weniger widerstandsfähig.

Ganz anders verhält sich das Parachymosin.

Das Parachymosin ist nämlich sehr widerstandsfähig gegen Erhitzung. Auch ein Erhitzen auf 70°C. , sogar in 10 Minuten, schadet verhältnissmässig wenig der Labwirkung. Dagegen wird das Ferment durch eine Erhitzung auf 75°C. in 10 Minuten vollständig destruiert.

Es ist bei diesen Proben unbedingt nothwendig, dass die Lösungen eine ganz bestimmte Reaction haben. Welche diese Reaction sein soll, kommt ganz auf den Indicator an.

Bekanntlich ist die Säure des Magensaftes theilweise zum Eiweiss gebunden und nur theilweise ganz frei, obwohl die ganze Menge physiologisch wirksam ist. Einige Indicatoren geben nun die gesammte freie Säure — also auch die, welche an Eiweiss gebunden ist, an — andere dagegen nur die ganz freie Säure.

Bei den Erhitzungsversuchen muss nun die Parachymosinlösung jedenfalls keine freie Säure enthalten, und wahrscheinlich muss die an Eiweiss gebundene Säure nicht mit Alkali neutralisirt werden.

Ich habe nämlich gefunden, dass ich mit einem Indicator, einem Lacmoid, die Lösung neutralisiren konnte, während ich mit Lacmus als Indicator nur zu einer bestimmten sauren Reaction gehen konnte. Einige der Versuche mit Lacmus als Indicator sollen später referirt werden. Wir werden jetzt sehen, wie sich das Parachymosin verhält, wenn ich Lösungen mit Lacmoid neutralisirte.

Versuch IX.

Eine mit Lacmoid neutralisirte Pepsinlösung (die auch viele Albumosen enthielt) zeigte vor (A) und nach (B) einer Erhitzung von 10 Minuten zu 40°C. folgendes Verhalten:

Fermentlösung	Wasser				Coagulationszeit	
					A	B
1 ccm +	— ccm +	10 ccm Milch			0,20 Minute	1 Minute
$\frac{1}{2}$ „ +	$\frac{1}{2}$ „ +	10 „ „			0,30 „	2,30 Minuten
$\frac{1}{4}$ „ +	$\frac{3}{4}$ „ +	10 „ „			1,30 Minuten	6,30 „
$\frac{1}{8}$ „ +	$\frac{7}{8}$ „ +	10 „ „			2,30 „	19 „
$\frac{1}{16}$ „ +	$\frac{15}{16}$ „ +	10 „ „			7,30 „	keine
$\frac{1}{32}$ „ +	$\frac{31}{32}$ „ +	10 „ „			50 „	—

Erhitzte ich dagegen ein neutralisirtes Extract von Kalbsmagen oder Barnekow's Lablösung nur 1 Minute zu 70° C., so war jede Labwirkung verschwunden, obgleich die Lösungen so wirksam wie nur möglich waren.

Man konnte nun möglicher Weise die Einwendung machen, dass die übrigen Bestandtheile der Pepsinlösung eine conservirende Wirkung auf das Parachymosin resp. Chymosin, üben könnten. Um diese Einwendung zu beseitigen, machte ich folgende Versuche:

Versuch X.

20 ccm einer neutralisirten Pepsinlösung wurden in zwei Proben, jede à 10 ccm, getheilt. In der einen Probe setzte ich 2 ccm eines sehr wirksamen Kalbsmagenextractes (A), zur Controlprobe 2 ccm Wasser. Beide Proben wurden nun in zwei Theile getheilt, wovon der eine vor, der andere nach einer Erhitzung von 10 Minuten zu 40° C. untersucht wurde.

a) Vor Erhitzung.

Fermentlösung	Wasser				Coagulationszeit	
					A	B
1 ccm +	— ccm +	10 ccm Milch			— Minute	— Minute
$\frac{1}{2}$ „ +	$\frac{1}{2}$ „ +	10 „ „			— „	— „
$\frac{1}{4}$ „ +	$\frac{3}{4}$ „ +	10 „ „			— „	0,30 „
$\frac{1}{8}$ „ +	$\frac{7}{8}$ „ +	10 „ „			— „	1 „
$\frac{1}{16}$ „ +	$\frac{15}{16}$ „ +	10 „ „			1 „	2 Minuten
$\frac{1}{32}$ „ +	$\frac{31}{32}$ „ +	10 „ „			2,30 Minuten	3,30 „
$\frac{1}{64}$ „ +	$\frac{63}{64}$ „ +	10 „ „			5 „	8 „
$\frac{1}{128}$ „ +	$\frac{127}{128}$ „ +	10 „ „			10 „	keine

b) Nach der Erhitzung 10 Minuten zu 70° C.

Fermentlösung	Wasser				Coagulationszeit	
					A	B
1 ccm +	— ccm +	10 ccm Milch			1 Minute	1 Minute
$\frac{1}{2}$ „ +	$\frac{1}{2}$ „ +	10 „ „			4 Minuten	3 Minuten
$\frac{1}{4}$ „ +	$\frac{3}{4}$ „ +	10 „ „			13 „	12 „
$\frac{1}{8}$ „ +	$\frac{7}{8}$ „ +	10 „ „			keine	keine

Das Chymosin ist also gänzlich zerstört, das Parachymosin nur sehr wenig angegriffen.

Eine Mischung von Barnekow's Lablösung mit der Parachymosinlösung zeigte indessen bei Erhitzung, dass hier auch das Parachymosin mit dem Chymosin

zerstört wurde. Nun enthielt aber die Barnekow'sche Lablösung viel Kochsalz, welches vielleicht das Parachymosin auch zerstören konnte. Ein Versuch mit einer Mischung von dialysirter Barnekow'scher Lablösung bestätigte auch, dass dies der Fall war.

Endlich habe ich die Versuche derartig modificirt, dass ich Mischungen mit einer grossen Menge gekochter Parachymosinlösung (wo also das Ferment destruiert war) und sehr wenig Chymosinlösung und vice versa zu 70° C. erhitzte. Auch diese Resultate waren eine vollständige Bestätigung der Widerstandsfähigkeit des Parachymosins gegen Erhitzung.

In einer Erhitzung von 10 Minuten zu 70° C. haben wir also ein gutes Mittel, zu entscheiden, ob Parachymosin oder Chymosin vorliegen. Da aber eine Erhitzung von 10 Minuten dem Parachymosin deutlich schadet, so dass man in Lösungen mit wenig Ferment kaum eine nach der Erhitzung wirksame Lösung bekommen kann, habe ich untersucht, ob nicht eine kürzere Erhitzung genügt. In der That habe ich auch gefunden, dass eine Erhitzung von einer Minute zu 70° C. vollständig genügt, um das Chymosin zu zerstören. Und wie wenig das Parachymosin dadurch angegriffen wird, sieht man aus folgendem Versuch:

Versuch XI.

Eine neutralisirte Pepsinlösung wurde theils eine Minute (A) und theils 10 Minuten (B) zu 70° C. erhitzt, nach der Erhitzung verhalten sich die Verdünnungsversuche auf folgende Weise.

Fermentlösung		Wasser			Coagulationszeit	
					A	B
1 ccm	+	— ccm	+	10 ccm Milch	0,2 Minute	1 Minute
$\frac{1}{2}$ „	+	$\frac{1}{2}$ „	+	10 „ „	1 „	3 Minuten
$\frac{1}{4}$ „	+	$\frac{3}{4}$ „	+	10 „ „	2 Minuten	12 „
$\frac{1}{8}$ „	+	$\frac{7}{8}$ „	+	10 „ „	5 „	—
$\frac{1}{16}$ „	+	$\frac{15}{16}$ „	+	10 „ „	15 „	—
$\frac{1}{32}$ „	+	$\frac{31}{32}$ „	+	10 „ „	—	—

Versuch XII.

Eine neutralisirte Chymosinlösung coagulirt die Milch nach einer Verdünnung von 1:256 in 14 Minuten. Von der nicht verdünnten Lösung wurden zwei Proben ausgenommen, wovon die eine etwa 10 Minuten zu 70° C. erhitzt wurde. Jede Labwirkung war da zerstört. Zu jeder Probe — à 10 ccm — setzte ich 2 ccm derselben Pepsinlösung. Beide Proben wurden nun 1 Minute zu 70° C. erhitzt. Die eine Probe coagulirte Milch in 6 Minuten, die andere in 7 Minuten. Also war das ganze Chymosin durch die Erhitzung während 1 Minute zerstört.

In der Erhitzung während einer Minute zu 70° C. haben wir also ein gutes und zuverlässiges Mittel, zu entscheiden, ob das Parachymosin vorliegt. Haben wir eine Mischung beider Fermente vor uns, ist auch die Erhitzung ein gutes Verfahren zur Trennung der Fermente. Ein eben so gutes Mittel zur Trennung ist auch die Alkalibehandlung. Ehe wir zu dieser übergehen, dürfte ich hinzufügen, dass das Parachymosin nach Verdünnung mit Wasser weniger widerstandsfähig gegen Erhitzung ist als nach Verdünnung mit einer gekochten Fermentlösung. Diese enthält also Substanzen, die das Parachymosin gegen die Erhitzung schützen.

Arbeitet man mit einem Indicator, der den wahren Neutralitätspunkt angibt, kann man nicht zur neutralen Reaction gehen. In diesem Falle empfiehlt es sich, Proben mit verschiedenen Aciditätsgraden anzustellen. Im Allgemeinen kommt man am besten mit einem Aciditätsgrad von 0,05 % HCl zum Ziele.

Ebenso wie man durch eine kurze Erhitzung zu 70° C. das Parachymosin von dem Chymosin trennen kann, lässt sich auch in derselben Weise zeigen, dass Parachymosin und Pepsin verschiedene Fermente und nicht verschiedene Eigenschaften eines Fermentes sind. Durch die Erhitzung wird nämlich das Pepsin gänzlich zerstört, das Parachymosin nicht, und im Gegensatze durch eine sehr langdauernde Digestion in saurer Lösung bei Körpertemperatur kann man das Parachymosin zerstören, ohne dass das Pepsin hierdurch destruiert wird.

Gehen wir nun zu der letzten Reaction des Parachymosins über, nämlich:

Das Verhalten des Parachymosins gegen Alkali.

Wenn das Parachymosin gegen Erhitzung viel resistenter als das Chymosin ist, so ist das Entgegengesetzte der Fall, wenn man die Fermente mit Alkali behandelt. Hier ist das Chymosin viel mehr resistent als das Parachymosin.

Bekanntlich ist auch das Chymosin sehr empfindlich gegen Alkalieinwirkung; schon eine Alkalimenge von 0,025 % genügt, um das Chymosin nach einer Einwirkung von 24 Stunden gänzlich zu zerstören. Lässt man die Alkali kürzere Zeit einwirken, fordert es mehr Alkali zur Destruction. Natürlich ist es auch von grosser Bedeutung, ob man viel oder wenig Ferment in der Lösung hat.

Der Unterschied zwischen Parachymosin und Chymosin besteht nun darin, dass eine so kleine Alkalimenge, die nur von ganz wenig Bedeutung für das Chymosin wäre, vollständig genügt, um das Parachymosin zu zerstören. Im Allgemeinen kann man sagen, dass eine Alkalimenge von 0,01—0,02 % genügt, um das Parachymosin nach einer Einwirkung von nur einer Stunde zu zerstören. Es kommt hier jedoch viel darauf an, ob die Lösung reich an Albumosen ist oder nicht. Die Albumosen können sich bekanntlich auch mit Alkali verbinden, und dieses Alkali ist ohne grössere Wirkung auf das Parachymosin. Man demonstriert desshalb die verschiedene Wirkung des Alkali auf die beiden Labfermente dadurch, dass man die Proben mit Mischungen beider Fermenten anstellt.

Versuch XIII.

Eine neutralisirte Pepsinlösung und ein neutralisirtes Extract aus Kalbsmagen wurden jede in zwei Proben getheilt, wovon die eine Probe beider Lösungen gekocht wurde. Danach setzte ich zu 5 ccm ungekochter Parachymosinlösung 5 ccm gekochter Chymosinlösung (A) und weiter zu 5 ccm gekochter Parachymosinlösung 5 ccm ungekochter Chymosinlösung (B). Die Probe A coagulirt Milch in 6 Minuten, B in 5 Minuten. Zu den Lösungen A und B setzte ich nun 0,01 % Alkali bei und liess die Proben eine halbe Stunde stehen. Beide Proben wurden dann neutralisirt. Die Probe A hatte nun seine Wirkung auf Milch ganz verloren (nach 24 Stunden wurde die Milch flüssig gefunden). Die Probe B coagulirt Milch in 5 Minuten. Die Probe B wurde weiter eine halbe Stunde mit 0,01 % Alkali stehen gelassen, und nun war die Coagulationszeit 6,5 Minuten.

Andere Versuche der Einwirkung von Alkali auf Parachymosinlösungen sind insofern verschieden ausgefallen, als in einigen Fällen das Parachymosin ganz destruiert wurde, in anderen nur deutlich geschadet — nach einer Einwirkung von einer Stunde. Immer aber war die Alkaliwirkung viel grösser auf das Parachymosin als auf das Chymosin. Deswegen halte ich diese Reaction auch für einen charakteristischen Unterschied zwischen den Fermenten.

Durch diese fünf Reactionen — wahrscheinlich giebt es auch mehrere solche — meine ich bewiesen zu haben, dass das Parachymosin und Chymosin verschiedene Fermente sind. Besonders beweisend sind die zwei letzten Reactionen. Wenn man nämlich aus Mischungen beider Fermente beliebig das eine oder das andere Labferment zerstören kann — durch Erhitzung oder Alkalieinwirkung — steht es ganz fest, dass hier verschiedene Fermente vorliegen, da

Mischungen der Fermente ganz identische Versuchsbedingungen für beide geben.

Ebenso wie das Chymosin sein Vorstadium das Labzymogen hat, so ist es auch beim Parachymosin der Fall. Die neutralisirte Pepsinlösung enthält mehr Parachymosin als eine neutrale Pepsinlösung.

Woher hat das Parachymosin seinen Ursprung? Es liegen mehrere Möglichkeiten auf der Hand. Höchstwahrscheinlich enthalten die Pepsinpräparate eine grosse Flora Bakterien, und wir wissen, dass manche Bakterien die Milch coaguliren. In diesem Falle müssen die Bakterien, welche das Parachymosin produciren sollen, ziemlich constant in den Pepsinpräparaten vegetiren. Ich habe gefunden, dass sowohl ein schwedisches als ein dänisches Pepsinpräparat Parachymosin enthielten. Weiter hat Pekelharing¹⁾ beobachtet, dass englische, amerikanische und deutsche Pepsinpräparate Labwirkung besitzen, welche Labwirkung mit der Verdünnung der Fermentlösung verschwand. Offenbar liegt auch hier Parachymosin vor.

Weiter wäre es auch möglich, dass das Chymosin ins Parachymosin oder dessen Zymogen übergehen könnte, obwohl diese Möglichkeit nicht a priori besonders wahrscheinlich ist.

Auch wäre es denkbar, dass der Ventrikel sowohl Chymosin als Parachymosin enthält, jedoch das Parachymosin in so geringer Menge, dass es bis jetzt übersehen worden ist. Bei der Digestion wurde dann das Chymosin zerstört, und das Parachymosin blieb zurück. Ich habe aber sehr concentrirte Extracte aus Kalbsmagen digerirt, ohne dass ich das Parachymosin nachweisen konnte.

Endlich haben wir die Möglichkeit: Das Parachymosin kommt bei einigen Thieren, das Chymosin bei anderen vor.

Zuerst habe ich deshalb Fischmagen (vom Hecht) untersucht, denn hier konnte man a priori den grössten Unterschied vom Kalbsmagen erwarten. Das Labferment des Hechtes ist doch das gewöhnliche Chymosin (beim Hechte kommt nur das Labferment als Zymogen vor).

Ich ging dann zu Schweinemagen über. Die meisten Pepsinpräparate werden nämlich vom Schweinemagen dargestellt. Durch Salzsäureextraction des Fundustheiles bekam ich eine wirksame Lablösung, die nach Digestion mit Salzsäure einige Stunden noch wirksamer wurde.

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 22.

Wenn ich das neutralisirte Extract verdünnte, beobachtete ich dasselbe wie bei den Pepsinlösungen. Nach mehrmaliger Verdünnung kam ganz plötzlich ein Moment, wo die Labwirkung ganz aufhörte. Eine Lösung coagulirte z. B. nach 5 maliger Verdünnung Milch in 1 Minute. Nach 10 maliger Verdünnung war die Coagulationszeit 4,5 Minuten, nach 20 maliger Verdünnung 14,5 Minuten, nach 40-maliger Verdünnung keine Coagulation nach mehreren Stunden.

Diese letzte Lösung versetzte ich mit CaCl_2 bis 0,2% und jetzt coagulirt sie Milch in 2 Minuten (die Milch-Fermentlösung enthält 0,02% CaCl_2).

Eine Lösung, die Milch in 3 Minuten coagulirte, wurde mit Alkali bis 0,01% versetzt. Nach einer halben Stunde war die Labwirkung ganz verschwunden. Als nun auch die Lösung sehr widerstandsfähig gegen Erhitzung und Digestion mit 0,3% HCl bei Körpertemperatur war, kann man nicht darüber zweifeln, dass Parachymosin hier vorliegt.

Der Schweinemagen enthält also Parachymosin. Da ich nun bei Untersuchungen mehrerer Schweinemagen immer das Parachymosin gefunden habe, ist es wahrscheinlich, dass das Parachymosin immer hier vorkommt und, da ich hier kein anderes Labferment gefunden habe, das gewöhnliche Labferment des Schweinemagens ist.

Wir haben früher gesehen, dass das Pepsin und das Parachymosin verschiedene Fermente sind. Wenn wir nun wissen, dass das Parachymosin das Labferment des Schweinemagens ist, kann unmöglich ein Pepsin aus Schweinemagen, welches auch Parachymosinwirkung besitzt, ein reines Pepsin sein. Pekelharing¹⁾ glaubt, das Pepsin des Schweinemagens als ein Nucleoproteid rein dargestellt zu haben. Dies Pepsin coagulirte auch Milch bei neutraler Reaction, die Labwirkung verschwand aber sehr bald, wenn er die Pepsinlösung verdünnte, und war also aller Wahrscheinlichkeit nach mit Parachymosin, dem Labfermente des Schweines, verunreinigt.

Dass das Kalb und das Schwein verschiedene Labfermente besitzen, hat in mehreren Beziehungen Anspruch auf Interesse, obwohl man nicht gut verstehen kann, warum die Thiere verschiedene Labfermente brauchen. Die Wirkung des Parachymosins auf die Milch ist nicht von derselben des Chymosins zu unterscheiden. Natürlich

1) l. c.

ist hierdurch nicht ausgeschlossen, dass die Coagula in der That verschiedener Natur ist. Möglicherweise hat man auch mit anderen Functionen des Labfermentes hier zu thun. Nach russischen Autoren hat das Lab auch eine andere Bedeutung als die Milch coagulirende, indem es nämlich die Albumosen in Eiweiss regenerirt. — Da nun das Schwein und das Rind verschiedene Nahrung haben, könnte vielleicht diese ein anderes Ferment fordern. Wir wissen ja, dass das Pepsin bei verschiedenen Thierspecies etwas verschieden ist.

Wenn dies richtig wäre, könnte man vermuthen, dass bei Thierspecies, welche eine ähnliche Nahrung wie das Schwein haben, der Ventrikel ein parachymosinähnliches Labferment producirt.

Ein solches Verhältniss finden wir beim Menschen. Gehen wir also zur Untersuchung des Labfermentes des Menschen über.

Im Ganzen habe ich Magensaft von 7 Individuen untersucht. Ich werde die Fälle jeden für sich referiren.

I. Magensaft von einem normalen Individuum. Probemahlzeit: Bouillon mit Liebig's Fleischextract. Acidität 0,25 % HCl. Der Magensaft wurde — wie auch der der übrigen — auf die Reactionen des Parachymosins untersucht.

a) Die Verdünnungsprobe. Der neutralisirte Magensaft coagulirte Milch augenblicklich. Der mit einem Volum Wasser verdünnte Magensaft coagulirt Milch in 3,5 Minuten. Mit drei Volumen Wasser verdünnt bekommt man keine Coagulation in einer Stunde.

b) Die Chlorcalciumprobe. Die letzte Lösung, welche also Milch in einer Stunde nicht coagulirt, wurde mit CaCl_2 bis 0,2 % versetzt. Die Coagulationszeit ist 10 Minuten.

c) Erhitzungsversuche. Indicator-Lacmus. Die Proben wurden eine Minute zu 70 ° C. bei wechselnder Acidität erhitzt. 1. Acidität = 0,25 % HCl keine Coagulation. 2. Acidität = 0,10 % HCl keine Coagulation. 3. Acidität = 0,05 %. Die Lösung coagulirt Milch augenblicklich. Nach Verdünnung mit einem Volum Wasser ist die Coagulationszeit = 3,5 Minuten und nach Verdünnung mit drei Volumen Wasser bekam ich keine Coagulation in einer Stunde. 4. Acidität = 0,02 %. Die Coagulationszeit = 11 Minuten. 5. Acidität = 0. Keine Coagulation in einer Stunde.

d) Die neutralisirte Lösung wurde mit Alkali bis 0,01 % versetzt. Nach einer halben Stunde war die Coagulationszeit = 12 Minuten.

e) Die saure Lösung (Acidität nur 0,25 % HCl) wurde bei Körpertemperatur in 5 Tagen digerirt. Die Coagulationszeit war dann 7 Minuten (nach Neutralisation mit $\frac{n}{10}$ Alkali).

Hiermit ist also bewiesen, dass dieser Magensaft Parachymosin enthält.

Zum Ueberfluss kann ich hinzufügen, dass ich Erhitzungsversuche mit Mischungen von Barnekow's¹⁾ Lablösung und diesem Magensaft (Acidität der Gesamtlösung = 0,05 % HCl) angestellt habe. Das Chymosin wurde ganz zerstört, das Parachymosin bleibt unverändert.

II. Magensaft vom normalen Individuum. Probemahlzeit wie Nr. I. Acidität = 0,29 %.

a) Verdünnungsversuche nach Neutralisation mit Alkali. 1. 1 ccm Magensaft + 10 ccm Milch. Coagulationszeit = 4 Minuten. 2. $\frac{1}{2}$ ccm Magensaft + $\frac{1}{2}$ ccm Wasser + 10 ccm Milch = 14,5 Minuten. 3. $\frac{1}{4}$ ccm Magensaft + $\frac{3}{4}$ Wasser + 10 ccm Milch. Keine Coagulation in einer Stunde.

b) Die letzte Lösung mit 0,2 % CaCl_2 versetzt — coagulirt Milch in 13 Minuten.

c) Erhitzungsversuch. 1. Acidität = 0,29 %. Keine Coagulation. 2. 0,15 % Acidität. Coagulation nach 18 Minuten. 3. Acidität = 0,10 %. Coagulation nach 9 Minuten.

d) Eine Probe mit 0,01 % Alkali versetzt verlor seine Labwirkung nach einer halben Stunde.

III. Magensaft vom normalen Individuum. Acidität 0,22 % HCl.

a) Die neutralisirte Lösung coagulirt Milch in 7 Minuten. 2. $\frac{1}{2}$ ccm + $\frac{1}{2}$ ccm Wasser + 10 ccm Milch. Coagulationszeit = 16 Minuten. 3. $\frac{1}{4}$ ccm + $\frac{3}{4}$ ccm Wasser + 10 ccm Milch. Coagulationszeit: keine in einer Stunde.

b) Die letzte Probelösung + 0,2 % CaCl_2 coagulirt Milch in 11 Minuten.

c) Erhitzungsversuche. 1. Acidität = 0,14 %, 0,12 %, 0,10 %. Keine Coagulation nach Erhitzung. 2. Acidität = 0,08 %, Coagulationszeit = 21 Minuten. 3. Acidität = 0,06 %. Nach 9 Minuten Gerinnung.

d) Nach Einwirkung von 0,01 % Alkali eine halbe Stunde ist die Coagulationszeit 58 Minuten.

¹⁾ Dialysirte Lösung.

IV. Magensaft des Menschen. Nur wenige Kubikcentimeter von schwach saurer Reaction. Coagulationszeit = 26 Minuten. Mit 0,2 % CaCl_2 versetzt Gerinnung nach 5 Minuten.

V. Wenige Kubikcentimeter eines Magensaftes des Menschen coagulirt Milch nach 30 Minuten, mit 0,2 % CaCl_2 versetzt Gerinnung nach 9 Minuten.

VI. Magensaft einer Chlorotica. Acidität = 0,25 % HCl .

a) Die neutralisirte Lösung coagulirt Milch in 4 Minuten.
2. $\frac{1}{2}$ ccm + $\frac{1}{2}$ ccm Wasser + 10 ccm Milch — Gerinnung nach 18 Minuten. 3. $\frac{1}{4}$ ccm + $\frac{3}{4}$ ccm Wasser. Keine Gerinnung in mehreren Stunden.

b) Die letzte Lösung mit 0,2 % CaCl_2 versetzt coagulirt Milch nach 19 Minuten.

c) Erhitzungsversuche. 1. Acidität = 0,12 %. Keine Gerinnung nach der Erhitzung. 2. Acidität 0,09 %. Gerinnung nach 18 Minuten. 3. Acidität 0,05 %. Coagulationszeit 7,5 Minuten. 4. Bei neutraler Reaction keine Coagulation.

VII. Magensaft vom normalen Individuum. Acidität = 0,20 %.

a) Nach Neutralisation mit Alkali ist die Coagulationszeit 7 Minuten. Nach Verdünnung mit dem gleichen Volum Wasser Gerinnung nach 40 Minuten.

b) Die letzte Probe + 0,2 % CaCl_2 coagulirt Milch nach 5 Minuten.

c) Erhitzungsversuche. 1. 0,10 % Acidität. Keine Gerinnung. 2. 0,08 % Coagulation nach 30 Minuten. 3. 0,05 % Gerinnung nach 18 Minuten. 4. 0,03 % Gerinnung in 7 Minuten. 5. 0,02 % Gerinnung nach 14 Minuten. 6. Acidität = 0. Keine Coagulation.

d) Alkaliversuch. Nach Einwirkung von 0,01 % Alkali eine halbe Stunde war die Gerinnungszeit 30 Minuten.

Wir haben hiermit gefunden, dass alle menschlichen Magensäfte, die untersucht worden sind, Parachymosin und nicht Chymosin enthalten. Obwohl die Untersuchungen wenig zahlreich sind, geben doch die constanten Befunde dieses Fermentes Grund zu schliessen, dass das Parachymosin das gewöhnliche Labferment des Menschen ist.

Der Mensch und das Schwein besitzen also ein Labferment, das Rind ein anderes.

Nach diesem sieht es so aus, als ob das Parachymosin mehr verbreitet vorkommt als das Chymosin. Wir wissen jedoch allzu wenig

über die Labfermente der meisten Thiere, als dass wir schon etwas Sicheres darüber aussprechen könnten. Eine vergleichende Untersuchung hierüber ist desshalb wünschenswerth, insbesondere über das Labferment der Carnivoren. Ebenso könnte vielleicht eine Untersuchung über die Wirkung des Parachymosins auf Albumosen lohnend sein.

Herrn Professor Hammarsten, auf dessen Laboratorium diese Untersuchungen ausgeführt sind, spreche ich meinen ergebensten Dank für seine Anregung und immer freundliches Interesse an meiner Arbeit aus.