

(Aus dem Laboratorium von Prof. Soxhlet in München.)

Ueber Fick's Theorie der Labwirkung und Blutgerinnung.

Von

Dr. **P. Walther,**

Privatdocent der Kaiserlichen Medizinischen Akademie in St. Petersburg.

Im 45. Bande dieser Zeitschrift entwickelt A. Fick unter dem Titel „Ueber die Wirkungsart der Gerinnungsfermente“ eine neue Theorie der Fermentwirkung, welche für die Coagulation der Milch durch Lab und für die Blutgerinnung Geltung haben soll. Die bisherige Anschauung über die Wirkung der ungesättigten hydrolytischen Fermente, nach welcher ein Molekül des Fermentes mit einem Molekül des umzusetzenden Körpers in Wechselwirkung trete, wobei die gebildete Verbindung durch Wasser zersetzt, das Fermentmolekül wieder hergestellt und gleichzeitig Hydratationsprodukte des umzusetzenden Körpers entstehen, — passe nicht auf die Fibringerinnung und die Gerinnung durch Lab; letztere Gerinnungserscheinungen machten eine Ausnahme von anderen Fermentwirkungen, insofern bei diesen „der irgendwo durch Fermentmoleküle angeregte Process sich von Molekül zu Molekül der umzusetzenden Substanz fortpflanze, ohne dass von Neuem Fermentmoleküle mitzuwirken brauchen“.

Fick glaubt bewiesen zu haben, dass „nicht jedes Caseinmolekül mit einem Fermentmolekül in Berührung zu kommen brauche, um zu gerinnen“, und dass, was er für die Caseingerinnung gefunden habe, „ohne Zweifel auch für die Blutgerinnung gelten müsse“.

Die beigebrachten Beweise bestehen in Folgendem:

1) Die Milchgerinnung durch Labferment erfolge sozusagen „blitzartig“ durch die ganze Masse. Bei der Käseerzeugung nehme der Senne eine kleine Hand voll Käselab, fabre damit eingemalt in dem Kessel, der mehr als einen halben Cubikmeter Milch enthält, herum und in wenigen Minuten sei die ungeheure Masse

durch und durch geronnen. Kein Mensch werde daran denken, dass die kleine zähe Masse sich so gleichmässig vertheilt habe, dass jedes Caseinmolekül mit einem Fermentmolekül in Berührung gekommen wäre.

2) Fick überschichtete in einem kleinen Reagenzglase einige Tropfen Labmagen-Glycerin-Auszug mit Milch von 40° C. und stellte dann das Reagenzglas in ein Wasserbad von gleicher Temperatur; nach kaum einer Minute war regelmässig die ganze Milch bis obenhin geronnen.

Die von Fick als „allgemein bekannte Thatsache“ angegebene Art der Milchgerinnung in der Praxis der Käsefabrikation existirt aber ganz bestimmt nicht.

Herr Prof. Soxhlet, gewiss ein genauer Kenner der milch-wirtschaftlichen Praxis, ermächtigte mich, von folgenden Angaben, welche er mir über diesen Gegenstand machte, hier Gebrauch zu machen:

A) Ist es eine unbestrittene Erfahrungssache und eine Hauptregel im Käseerbetriebe, dass die Labflüssigkeit möglichst innig und gleichmässig mit der Milch gemischt werden muss, wenn ein homogenes Coagulum, ein „gleichmässiger Bruch“ erzielt werden soll, was für eine gleichmässige Reifung des Käses unerlässlich ist.

B) Bei der Darstellung keiner einzigen Käsesorte findet die Gerinnung „blitzschnell“ oder „in wenigen Minuten“ statt; bei der Bereitung des Emmenthaler Käses dauert die Gerinnung durchschnittlich 30 Minuten, bei französischen Weichkäsen (Brie und Camembert) 3 bis 5 Stunden; das Minimum der Gerinnungszeit ist im Allgemeinen 20 Minuten.

Den Ueberschichtungs-Versuchen Fick's stelle ich die folgenden, von mir ausgeführten entgegen:

Nachdem ich mich zunächst an gefärbten Glycerinlösungen überzeugt hatte, dass trotz aller angewandten Vorsicht es nicht möglich war, nach Fick einige Tropfen dieser Flüssigkeit in einem Reagenzglase mit Milch zu überschichten, ohne dass eine mehr oder minder weitgehende Mischung beider Flüssigkeiten stattfindet, wählte ich andere Versuchsanordnungen, welche den beabsichtigten Zweck in vollkommenerer Weise erreichen liessen.

Als Fermentlösung bediente ich mich einer wässrigen Lösung trockenen Labpulvers, welches von Herrn Prof. Soxhlet nach dessen Verfahren (Milchzeitung 1877, 499) hergestellt war und

von welchem ein Theil genügte, eine Million Theile Milch bei 35° C. in 40 Minuten zur Gerinnung zu bringen. Die klar filtrirte Lösung wurde eventuell auf ein bestimmtes höheres specifisches Gewicht durch Zusatz von Rohrzucker gebracht.

Ein überall gleich weites U-Rohr von 32 mm Durchmesser und 220 mm Schenkellänge, ca. 400 ccm fassend, wurde in ein grosses, als Wasserbad dienendes Becherglas eingesetzt und mittelst Stativs fest eingespannt. Das Becherglas stand auf einem massiven Dreifuss, letzterer auf einem an die Wand angeschraubten Tischbrett. Hiemit waren alle Bedingungen thunlichst erfüllt, um Erschütterungen auszuschliessen. Zur Vermeidung von Flüssigkeitsströmungen, welche als Folge von Temperaturänderungen auftreten, und um gleichzeitig eine für die Labwirkung günstigere höhere Temperatur herstellen zu können, war das als Wasserbad dienende Becherglas mit einem Soxhlet'schen Temperatur-Regulator (unabhängig von Barometer- und Gasdruckschwankungen) versehen und die Temperatur auf $35,0^{\circ}$ C. erhalten. (Diff. weniger als $0,1^{\circ}$ C.)

In das U-Rohr wurden 300 ccm mittelst der Centrifuge fast vollständig entrahmter Milch gebracht, welche schon vorher auf 35° erwärmt war, und das Niveau des Wasserbades so regulirt, dass die beiden Schenkel nur 1 cm aus dem Wasser ragten, die Oberfläche der Milch aber einige Centimeter unter der Wasseroberfläche lag.

Die Verwendung möglichst entrahmter Milch hatte den Zweck, Bewegungen in der Flüssigkeit durch Rahmbildung, welche in der Wärme besonders rasch vor sich geht, zu verhindern; denn selbstredend befindet sich die Milch während der Aufrahmung nicht im Ruhezustande, sondern der Ortswechsel der aufsteigenden Fetttropfchen ist mit Flüssigkeitsbewegungen im Ganzen verbunden.

Nachdem die schon vorher auf 35° gebrachte Milch eine halbe Stunde im Wasserbade gestanden, wurde sie in dem einen Schenkel mit 2,5 ccm einer Lablösung überschichtet, welche so stark war, dass die 300 ccm Milch, mit genannter Fermentmenge gemischt, bei 35° C. in 15 Sekunden zur Gerinnung kamen. Die Ueberschichtung wurde in der Weise ausgeführt, dass ich die Fermentlösung aus einer Pipette ausfliessen liess, deren fein ausgezogene Spitze an die Gefässwandung angelegt war. Durch das durchsichtige Wasserbad konnte nun folgendes beobachtet werden:

Nach Verlauf einer Minute zeigte sich an der Berührungsfläche

von Lab und Milch deutlich ein Gerinnsel; nach und nach vergrösserte sich die Gerinnungsschicht; nach Verlauf von 3 Stunden machten sich in dem Schenkel, in welchem sich die Fermentlösung befand, Streifen von ausgetretenen Molken bemerkbar, die sich immer tiefer herabsenkten und nach 4 Stunden bis etwa auf die Hälfte des genannten Rohrschenkels herabreichten. In dem andern Schenkel war nach dieser Zeit absolut keine Veränderung zu bemerken und eine mittelst eines Glasröhrchens vorsichtig herausgehobene Probe erwies sich als völlig unveränderte Milch. Erst nach sieben Stunden war die Milch im zweiten Schenkel geronnen.

Bei einer dreimaligen Wiederholung des Versuches trat diese Gerinnung nach 5, 6 und bei Anwendung ganz frisch gemolkener und sofort centrifugirter Milch nach 8 Stunden ein.

In einem in gleicher Weise ausgeführten Versuche konnte ich nach 5 stündigem Stehen durch vorsichtiges Neigen des U-Rohres von der geronnenen Parthie 260 ccm, allem Anscheine nach unveränderte Milch abgiessen, die indessen bei weiterem Stehen bei 35 ° in 20 Minuten gerann.

In allen diesen Versuchen, in welchen eine Vermischung der Milch durch die Anwendung eines U-Rohres und die weiter getroffenen Anordnungen thunlichst vermieden war, gerann die Milch weder „blitzartig“ noch „in einigen Minuten“, sondern erst nach vielen Stunden, trotz der Anwendung einer so grossen Fermentmenge, dass die Milch in 15 Sekunden geronnen wäre, wenn man sie mit der Fermentmenge gemischt hätte. Warum nach Verlauf von 5 bis 8 Stunden schliesslich doch noch Gerinnung eintrat, will ich noch besprechen.

Eine andere Versuchsanordnung war die folgende:

In ein 25 mm weites, unten zugeschmolzenes Glasrohr wurden 250 ccm, auf 35 ° C. erwärmte Milch gebracht und das Glasrohr in dem beschriebenen Wasserbade befestigt. In dem Glaszylinder wurde ein längeres, 5 mm weites Glasrohr centriscch fixirt, so dass es mit seiner fein ausgezogenen Spitze den Boden berührte. In dieses Glasrohr wurden 2,5 ccm einer Lablösung gebracht, welche ein höheres specifisches Gewicht — nämlich 1,045 — hatte als die Milch, und so stark war, dass die angewandte Fermentmenge, mit dem genannten Milchquantum gemischt, letzteres in 12 Sekunden zur Gerinnung brachte. Nach diesem Verfahren konnte ich in einer zuverlässigeren Weise, als es mir nach Fick's Angaben

möglich war, eine Ueberschichtung erzielen, bei welcher sich die Lablösung unter der Milch befand.

Die Milch war in der oberen Schicht nach 3, und in einem 2. Versuch nach 2 Stunden geronnen.

Schliesslich kamen noch Gerinnungsversuche bei gewöhnlicher Zimmer-Temperatur zur Ausführung. Die Caseingerinnung durch Lab geht in der Kälte ebenso vor sich wie in der Wärme — selbst bei 0° — nur bedeutend langsamer; oder um gleiche Gerinnungszeiten zu erhalten, sind bedeutend grössere Fermentmengen nöthig.

Zu diesen Versuchen wurden 5 Büretten von 11 mm Weite, welche mit Quetschhahnverschluss versehen waren, verwendet. Jede Bürette wurde mit 60 ccm frischer centrifugirter Magermilch beschickt und letztere nach Annahme der Zimmertemperatur mit 2,5 ccm Lablösung in der früher angegebenen Weise überschichtet. Die Fermentlösung hatte ein niedrigeres specifisches Gewicht als die Milch — 1,20 — und brachte die angegebene Milchmenge, wenn mit ihr gemischt, in 40 Minuten bei 17° C. zur Gerinnung. Die Temperatur des Raumes schwankte zwischen 17,0 und 18,3° C. Nach einer Stunde war etwa 1 ccm der oberen Milchschieht deutlich geronnen. Nach 24 Stunden konnten aus einer Bürette 48 ccm, nach 27 Stunden aus der zweiten 38 ccm ungeronnene Milch abgelassen werden; der Inhalt der 3. und 4. Bürette war nach 32 Stunden geronnen, während der Inhalt der 5., welche nur Milch allein enthielt, erst nach 48 Stunden geronnen war.

Aus allen diesen Versuchen ergibt sich also übereinstimmend, dass bei einer sorgfältig ausgeführten Ueberschichtung der Milch mit einer sehr kräftigen Labfermentlösung — oder bei Ueberschichtung der Lablösung mit Milch — keineswegs solche Erscheinungen auftreten, welche in irgend einer Weise zu den weitgehenden Schlüssen berechtigen, die Fick aus seinen Versuchen gefolgert hat. Dass auch unter den günstigsten Verhältnissen für die Erhaltung der schichtenweisen Flüssigkeitslagerung schliesslich doch eine Fermentwirkung durch die ganze Masse erfolgt, liegt in ganz anderen Verhältnissen, die viel klarer sind als die mysteriöse Fernwirkung, welche Fick dem Labfermente und — eigentlich ohne jede experimentelle Berechtigung — auch dem Gerinnungsfermente des Blutes zuschreibt.

Die schliesslich doch erfolgende Einwirkung des Ferments auf die entfernter liegenden Milchschiehten ist nur darauf zurück-

zuführen, dass nach längerer Zeit, auch bei möglichster Ausschliessung von Bewegungsvorgängen, Ferment in jene Schichten gelangt.

Sieht man auch von Flüssigkeitsströmungen ab, welche durch Temperaturdifferenzen in verschiedenen Schichten verursacht werden und absolut nie auszuschliessen sind, so lässt sich doch eine Bewegung der Flüssigkeit bei der Milchgerinnung durch Lab, aus folgenden Gründen nicht vermeiden:

Die Gerinnung unbewegter Milch durch das genannte Ferment erfolgt in der Weise, dass zunächst die ganze Masse zu einer Art Gallerte erstarrt; beim ruhigen Stehen der so geronnenen Masse zieht sich das Gerinnsel zusammen, wobei es die Form des Gefässes beibehält, und lässt Serum, d. i. Molkenflüssigkeit, austreten. Je länger die Masse steht, je höher die Temperatur und je grösser die einwirkende Fermentmenge, um so rascher der Verlauf dieses Scheidungsvorganges. Bei der Gerinnung fettreicher Vollmilch schwimmt das zusammengezogene Gerinnsel meistens in der Flüssigkeit, weil das leichtere Fett von dem Coagulum mit eingeschlossen wird; bei fettarmer oder Magermilch sinkt das Gerinnsel zu Boden. Das Austreten von Flüssigkeit und die Bildung eines sich contrahirenden Gerinnels muss nothwendiger Weise mit einer Bewegung der Flüssigkeitsschicht, in welcher dieser Process vor sich geht, verbunden sein; diese Bewegung kann auf die Ruhelage der zunächst liegenden Milchsicht nicht ohne jede Einwirkung bleiben, es muss vielmehr auch in dieser Bewegung — und damit Mischung mit der gerinnenden Schicht — eintreten, welche wieder Weiterschreiten der Gerinnung und damit Weitervordringen des Fermentes zur Folge haben muss.

Von noch grösserem Einfluss auf die Mischung beider Flüssigkeiten muss aber die Sonderung der Milch in ein specifisch schwereres Gerinnsel und in ein specifisch leichteres Serum sein; hier muss die Wirkung der Schwerkraft zur Geltung kommen: Das Gerinnsel muss herabsinken, das Serum muss aufsteigen, was ohne Mischung und Eindringen von Ferment in bis dahin fermentfreie Schichten gar nicht denkbar ist.

In meinen Versuchen, in welchen die Lablösung die untere, die Milch die obere Schicht bildete, trat die Gerinnung in der von der Labschicht entferntesten Milchparthie relativ am schnellsten ein, weil abgesehen davon, dass die Schichtenbildung nach dieser Versuchsanordnung am schwierigsten auszuführen ist, das Auf-

steigen des specifisch leichteren Milchserums für die Ueberführung von Ferment in fermentfreie Schichten zweifelsohne günstiger ist, als das Hinabsinken von Gerinnsel bei umgekehrter Reihenfolge; denn die aufsteigenden Molken enthalten das Labferment gelöst, die herabfallenden Gerinnsel das Ferment eingeschlossen.

Ebensowenig wie ein Diffusionsversuch mit zwei übereinander geschichteten Flüssigkeiten einen Sinn haben würde, in welchem die eine Flüssigkeit sich während des Versuches in einen specifisch schwereren, festen Körper und in eine specifisch leichtere Flüssigkeit trennen würde, welche letztere leichter ist als die überschichtete, ebensowenig kann der Milch-Lab-Uberschichtungsversuch als ein solcher betrachtet werden, bei welchem nur die Gesetze der Diffusion in Betracht kommen.

Der Verlauf der geschilderten Vorgänge braucht keineswegs als ein stürmischer angenommen zu werden, denn man muss bedenken, dass die Fermentmengen, welche für das Zustandekommen der Gerinnung nothwendig sind, ausserordentlich klein sind, und insbesondere nur einen minimalen Bruchtheil jener Mengen darstellen, welche in der überschichteten Flüssigkeit enthalten sind.

Nach Soxhlet (Milchzeitung 1877, 531) sind die Gerinnungszeiten den Labfermentmengen, welche auf ein bestimmtes Milchquantum zur Einwirkung gelangen, umgekehrt proportional. In den U-Rohrversuchen wurden 300 ccm Milch und 2,5 ccm Lablösung verwendet; letztere war so stark, dass wenn sie mit der Milch gemischt wurde, diese in 15 Sekunden zur Gerinnung brachte.

Um die gleiche Milchmenge bei derselben Temperatur in 1 bis 8 Stunden gerinnen zu machen, wären anstatt der 2,5 ccm Lablösung erforderlich gewesen 0,0104 bis 0,0013 ccm, resp. der 240. bis 1920. Theil der überschichteten Menge.

Hiezu kommt weiter, dass die Labwirkung sehr stark durch eine höhere Acidität der Milch begünstigt wird. So fand F. Söldner in Soxhlet's Laboratorium, dass eine frische Milch, welche 7,0 ccm Viertel-Normal-Natronlauge zur Neutralisation brauchte (nach Soxhlet-Henkel 4 ccm 2% iger alkoholischer Phenophtaleinlösung auf 100 ccm Milch), nur ein Fünftel jener Labmenge nothwendig hatte, welche die gleiche Milch, die auf die Acidität 5,0 gebracht war, erforderte. (Landw. Versuchsstationen 35, „Die Salze der Milch etc.“) Nach Soxhlet-Henkel (noch nicht veröffentlichte Untersuchungen) entspricht die Aciditätszunahme bei

frischer Milch nach 7 bis 8 stündigem Stehen bei 35° C. 1 cem Viertel-Normal-Natronlauge¹⁾.

Wenn also in dem einen Versuch mit frischer Milch nach 8 Stunden die ganze Masse geronnen war, so brauchte in die nun sauer gewordene entfernteste Milchschieht nur $\frac{1}{5}$ jener Fermentmenge überzugehen, welche zur Coagulation der frischen Milch nothwendig war.

Die obere Hälfte der Milchschieht in einem Schenkel des U-Rohres entsprach ca. 50 cem, also $\frac{1}{6}$ der ganzen Menge, hätte demnach 0,42 cem Lablösung gebraucht, um in 15 Sekunden zu gerinnen; die genannte Milchschieht zeigte nach 7 Stunden noch nicht, wohl aber nach 8 Stunden Gerinnung; war nach dieser Zeit die früher genannte minimale Säurezunahme eingetreten, so war nunmehr nur $\frac{1}{5}$ der Labmenge wie für Milch vom ursprünglichen Säuregrad nöthig, nämlich 0,084 cem; da diese Menge die Gerinnung in 15 Sekunden bewirkte, so war für das Zustandekommen der Coagulation in 1 Stunde wiederum nur der 240. Theil der zuletzt genannten Menge erforderlich, d. i. 0,00035 cem oder der 7200. Theil der überschichteten Fermentlösung!

Das verwendete Labpulver mit der Wirkung von 1: einer Million enthielt 64% Asche, zumeist Kochsalz (siehe Söldner a. a. O.); 1 Theil der organischen Substanz dieses Pulvers genügte also, um 2,8 Millionen Theile frischer Milch von mittlerer Acidität bei 35° C. in 40 Minuten zur Gerinnung zu bringen. Hiernach berechnet sich, dass in obengenannten 0,00035 cem Fermentlösung 0,012 Milligramm von der organischen Substanz des Labpulvers enthalten war!

Das Hineingelangen eines so minimalen Theils der überschichteten Fermentlösung in das entfernteste $\frac{1}{6}$ der Milchschieht nach Verlauf von 7 Stunden, und unter Bedingungen, unter welchen eine Ruhelage der einzelnen Flüssigkeitsschiehten gar nicht möglich ist, bietet aber gewiss keinen ausreichenden Anlass, den Boden der chemischen Mechanik, auf welchem wir mit unsern Anschauungen gegenwärtig stehen, zu verlassen und eine neue Fermenttheorie zu construiren, die das Dunkel in der Lehre von den Fermentwirkungen noch mehr zu verdunkeln geeignet ist.

1) Etwa der 25. Theil der Säuremenge, welche sich bis zur freiwilligen Gerinnung der Milch bildet.