

Zur Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 27. Januar 1883.)

Die nächste Veranlassung zu diesen Untersuchungen war eine im Jahre 1880 erschienene, Arbeit von den Herren Prof. A. Danilewsky und Dr. P. Radenhausen¹⁾, durch welche die geehrten Verfasser beweisen wollen, dass derjenige Stoff, welcher bisher als Kuhmilchcasein beschrieben worden ist, kein einheitlicher Stoff sondern ein Gemenge zweier Stoffarten sei.

Mit Hülfe von einigen neuen Kriterien zur Unterscheidung der Eiweissstoffe, welche Prof. Danilewsky gefunden zu haben glaubt, suchen nämlich die Verfasser zu zeigen, dass das gewöhnliche Casein der Kuhmilch ein Gemenge sei von: a) Albumin, welches seinem Verhalten nach identisch mit Serumalbumin ist und von den Verfassern «Caseoalbumin» genannt wird, und b) von «Protalbstoffen». Mit diesem letzteren Namen bezeichnet Prof. Danilewsky diejenige Gruppe von Eiweissstoffen, welche von anderen Forschern Alkali-albuminate genannt werden, und welche bekanntlich je nach der Intensität der Alkalienwirkung mit etwas wechselnden Eigenschaften dargestellt werden können.

¹⁾ Untersuchungen über die Eiweissstoffe der Milch von Prof. Dr. A. Danilewsky und Dr. P. Radenhausen in «Forschungen auf dem Gebiete der Viehhaltung und ihrer Erzeugnisse», Heft 9. Bremen 1880.

Als verschiedene Arten von Protalbstoffen (Alkalialbuminaten) unterscheidet Prof. Danilewsky folgende: Protalbin, Protalbinin, Protalborangin und Protalbrosein. Die Protalbstoffe sollen in der Kuhmilch als Analogen des künstlich dargestellten Protalbins und Protalbinins vertreten sein, und sie werden von den Verfassern mit dem Namen «Caseoprotalbstoffe» belegt.

Was man bisher als einen einheitlichen Stoff unter dem Namen Casein beschrieben hat, soll also nach dieser neuen Anschauung ein Gemenge von Caseoalbumin (Serumalbumin) und mindestens 2 Protalbstoffen (Alkalialbuminaten) sein.

Ich unterschätze nun zwar nicht das Bestreben, in der Chemie der Eiweissstoffe zu differenziren; und ich will vielmehr gern zugeben, dass durch ein solches Bestreben unsere Kenntniss von diesen Stoffen unter Umständen sehr gefördert werden kann; aber ich weiss auch, dass es wohl kaum ein Gebiet der organischen Chemie giebt, wo es leichter ist, eine fast beliebig grosse Zahl von Modificationen oder Stoffen zu schaffen als auf dem Gebiete der Eiweissstoffe. Die allermeisten Eiweissstoffe sind ausserordentlich empfindlich gegen die Einwirkung von chemischen Agentien, und durch die verschiedenartigsten Eingriffe kann oft genug aus einem ursprünglich einheitlichen Stoffe eine grössere oder kleinere Zahl von anderen Eiweissstoffen dargestellt werden. Es ist deshalb auch äusserst wichtig, in jedem speciellen Falle genau zu prüfen, ob die isolirten Producte wirklich als präformirte Eiweissstoffe anzusehen sind, oder ob sie vielleicht nichts anderes als Producte der chemischen Eingriffe darstellen.

Die von den Verfassern zur Trennung und zum Nachweis von diesen 3 Bestandtheilen des Caseins, dem Caseoalbumin und den 2 Protalbstoffen, befolgte Methode besteht nun hauptsächlich darin, dass der gewöhnliche, noch feuchte Käsestoff mit Weingeist von 45—50% ausgekocht wird. Dabei bleibt ein Theil des Caseins (hauptsächlich Caseoalbumin) ungelöst zurück, während ein anderer Theil (Caseoprotalb-

stoffe) in Lösung geht und beim Erkalten der filtrirten Flüssigkeit in weissen Flocken sich ausscheidet. Nach meiner Ansicht ist nun diese Methode eine so eingreifende, dass ich sie nicht ohne Weiteres zur Lösung von solchen Fragen geeignet betrachten kann. Anderer Seits muss doch auch zugestanden werden, dass die Schwierigkeiten, welche der Isolirung des Caseïns aus der Milch nach den üblichen Methoden entgegenstehen, so bedeutende sind, dass eine Verunreinigung des Caseïns mit anderen Proteïnstoffen der Milch nicht leicht ausgeschlossen werden kann. Aus diesen Gründen schien es mir sehr wichtig zu sein, die Frage von der Reinheit des Caseïns und namentlich die Frage, ob dieser Eiweisskörper ein einheitlicher Stoff sei, von Neuem einer experimentellen Prüfung zu unterwerfen.

Nach der Ansicht von Danilewsky und Radenhausen soll das Caseïn ein Gemenge von Serumalbumin und Alkaliaalbuminaten sein. Für diejenigen, welche mit dem Studium der verschiedenen Eiweissstoffe etwas eingehender sich beschäftigt haben, klingt diese Angabe gewiss etwas sonderbar, und ich habe mir oft die Frage gemacht, ob ich doch nicht die geehrten Verfasser missverstanden habe. Da dies wohl möglich sein kann, und ich mich einer Entstellung ihrer Angaben nicht schuldig machen will, möge es mir erlaubt sein, die eigenen Worte der Verfasser hier wiederzugeben.

Seite 2 der Abhandlung sprechen sich die Verfasser folgendermassen aus:

«Das Casein ist, wie dieses A. Danilewsky zuerst nachgewiesen, kein einheitlicher Stoff, sondern ein Gemisch zweier Stoffarten: a) von Albumin, welches seinem Verhalten nach identisch mit Serumalbumin ist und von uns Caseoalbumin genannt wurde; b) von Protalbstoffen. Letztere sind in der Kuhmilch als Analogen des Protalbins und Protalbini (s. Anmerk.) vertreten und von uns mit dem Namen Caseoprotalbstoffe bezeichnet worden.» In einer Anmerkung findet man dann weiter, dass die künstlichen Protalbstoffe unter Abspaltung von Calciumphosphat und Schwefel aus

Albumin unter der Einwirkung von Alkalien entstehen; und es ist also für mich gar nicht zweifelhaft, dass die Protalbstoffe mit den allgemein bekannten Alkalialbuminaten identisch sind. Ich habe also den nun citirten Passus nicht anders verstehen können, als so, dass nach der Ansicht der Verfasser das gewöhnliche Casein ein Gemenge von Serumalbumin und Albuminaten ¹⁾(Caseoprotalbstoffen) darstellen soll.

Dieses Gemenge soll doch nicht immer dieselbe Zusammensetzung haben und es enthält eine mit der Darstellungsmethode wechselnde Menge der zwei Hauptbestandtheile, des Serumalbumins und der Alkalialbuminate. Nach dem Verfahren von Danilewsky und Radenhausen, welches darin besteht, dass man die verdünnte Milch mit sehr verdünnter Salzsäure fällt, den gewaschenen Niederschlag mit Hülfe von Ammoniak löst und die filtrirte Lösung wieder mit Salzsäure fällt, soll das Casein, «wie es sich als solches Ganzes in der Milch findet», d. h. als ein von Mineralstoffen ziemlich stark verunreinigtes Gemenge von Caseoalbumin und Caseoprotalbstoffen, gewonnen werden. Nach dem von mir gebrauchten Verfahren, welches in abwechselndem Ausfällen des Caseins mit verdünnter Essigsäure und Wiederauflösen mit Hülfe von sehr wenig Natronlauge besteht, sollen dagegen hauptsächlich nur Protalbstoffe erhalten werden. «Ja bei einer dreimaligen Fällung des Caseins aus essigsaurer Natronlösung mit Essigsäure kann man», sagen die Verfasser, «fast reine Protalbstoffe erhalten.» Es ist noch zu bemerken, dass ein nach meiner Methode dargestelltes Casein

¹⁾ Den unter der Einwirkung von Alkalien aus den nativen Eiweissstoffen entstehenden, Proteinstoffen hat man bekanntlich eine ganze Reihe von Namen, wie «Alkalialbuminat», «Lieberkühn'sches Eiweiss», «Protein», «Albuminose», «Albuminin» gegeben, wozu noch die Namen «Protalbin», «Protalbinin» etc. kommen. Da ich kein grosses Gewicht auf die Namen lege, wird es sich vielleicht ereignen, dass ich in diesem Aufsätze statt des neuen Namens Protalbstoffe aus alter Gewohnheit den gewöhnlichen Namen Alkalialbuminat brauche. Da hierdurch wohl kaum irgend ein Missverständniss entstehen kann, wird man hoffentlich mir dies entschuldigen.

frei von Mineralstoffen erhalten wird, oder gewöhnlichenfalls nur sehr unbedeutende Mengen von solchen enthält.

Die Verfasser geben der von ihnen befolgten Methode den Vorzug; wenn es aber richtig ist, dass nach ihrer Methode ein von Mineralstoffen stark verunreinigtes Gemenge von drei Eiweissstoffen erhalten wird, so muss ich gestehen, dass ich den Vorzug ihrer Methode nicht recht einsehen kann.

Mit dem Namen Casein hat man bisher, wie jeder Chemiker weiss, denjenigen Milchbestandtheil bezeichnen wollen, welcher mit Lab zu Käse gerinnt; und die Bemühungen sämtlicher Forscher, welche mit der Reindarstellung des Caseins aus der Milch sich beschäftigt haben, sind auch auf die Reindarstellung gerade dieses, bei der Käsebildung in Betracht kommenden Bestandtheils der Milch gerichtet worden. Nun ist es jedem Chemiker bekannt, dass das Serumalbumin nicht das Geringste mit der Käsebildung zu thun hat. Dieser Stoff, welcher ganz andere Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse als das Casein (in gewöhnlichem Sinne) hat, und welcher den gang und gäben Anschauungen gemäss zu einer ganz anderen Gruppe von Eiweissstoffen gehört, bleibt bekanntlich bei der Gerinnung der Milch in den Molken zurück; und bei der Käsebildung ist also nur das Casein (in gewöhnlichem Sinne), mag es ein einheitlicher Stoff oder ein Gemenge von zwei Protalbstoffen sein, betheilig. Wenn das Casein nicht mehr ein einheitlicher Stoff, sondern ein Gemenge sein soll, so muss es also wenigstens ein Gemenge von nur albuminatähnlichen Stoffen, von Protalbstoffen, sein; und wenn es daneben etwas Serumalbumin enthält, kann diese Substanz nur als eine Verunreinigung betrachtet werden.

Wenn irgend eine Darstellungsmethode ein von Serumalbumin verunreinigtes Casein liefert, muss man also eine solche Methode als eine unvollkommene oder unbrauchbare bezeichnen; und in dem Masse, wie die Verunreinigung mit Serumalbumin eine grössere ist, muss also die Methode als eine schlechtere betrachtet werden. Wenn es um die Darstellung des Caseins sich handelt, muss also, nach meiner

Ansicht, von zwei Methoden diejenige die weniger unvollkommene sein, welche die vom Serumalbumin am wenigsten verunreinigten Protalbstoffe liefert. Es hat doch gar keinen Sinn, von diesem Gesichtspunkte aus über den Werth unserer Methoden zu streiten, denn weder nach der einen noch nach der anderen erhält man — bei nicht gar zu nachlässiger Arbeit — ein von Serumalbumin verunreinigtes Casein.

Ich habe oben meine Befürchtungen dafür ausgesprochen, dass ich die Verfasser vielleicht nicht richtig verstanden habe, und ich kann mich fortwährend dieser Befürchtung nicht losmachen. Es ist mir nämlich ganz unverständlich, wie die Verfasser in dem 2. Mal mit Salzsäure ausgefällten Casein eine reichliche Menge von Serumalbumin oder, um die eigenen Worte der Verfasser zu brauchen, von einem «Albumin, welches seinem Verhalten nach identisch mit Serumalbumin ist», annehmen können. Das Serumalbumin ist ja eine in Wasser lösliche Eiweisssubstanz, welche weder durch Zusatz von Essigsäure noch von verdünnter Salzsäure gefällt wird. In dieser Hinsicht sind ja alle Forscher einig, und gerade auf diesem ungleichen Verhalten des Serumalbumins (Lactalbumins) und Caseins zu verdünnten Säuren gründet sich nicht nur die gewöhnliche Methode zur Reindarstellung des Caseins, sondern auch eine Methode zur gesonderten, quantitativen Bestimmung dieser zwei Stoffe. In Bezug auf diese quantitative Methode ist es auch allgemein bekannt, wie bei ihrer Anwendung die Menge des Caseins etwas zu niedrig gefunden wird, weil dabei ein Theil dieses Eiweissstoffs in Lösung bleibt. Dass aber bei diesem Verfahren auch ein Theil, und zwar ein nicht zu vernachlässigender Theil, des Serumalbumins mit ausgefällt werden sollte, muss wohl als etwas Neues und Unerwartetes betrachtet werden.

Wenn aber, wie die Verfasser gefunden zu haben glauben, selbst nach wiederholtem Ausfällen und Wiederauflösen wie auch nach gründlichem Auswaschen des Caseins dieser Stoff ein, seinem Verhalten nach mit dem Serumalbumin identisches, Albumin enthalten soll, so fordert gewiss

diese Angabe aus vielen Gesichtspunkten dringend zu einer eingehenden Prüfung auf.

Es fragt sich dabei zuerst, auf welche Gründe hin die Verfasser die Gegenwart von Serumalbumin in dem gewöhnlichen Casein annehmen zu können glauben.

Behufs der Isolirung des Serumalbumins verfahren die Verfasser auf folgende Weise. Das bis zur Trocknung fertige, also gut ausgewaschene aber noch feuchte, Casein erhitzen sie mit 45—50procentigem Weingeist zum Kochen, filtriren die Lösung durch einen Heisswasser-Trichter und erhalten so eine Trennung des Albumintheils, welcher noch mit Protalbstoffen gemengt auf dem Filter zurückbleibt, und der Protalbstoffe, welche sich beim Erkalten des heissen Weingeistes in schneeweissen leichten Flocken ausscheiden. Sobald die Protalbstofflösung durchfiltrirt ist, heben sie den Niederschlag sogleich vom Filter ab und zerreiben ihn möglichst fein in Wasser. Durch langsamen und vorsichtigen Zusatz von verdünntem Ammoniak bringen sie ihn wieder in Lösung, fällen von Neuem mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure, waschen alle Säure gut aus und entfernen die Protalbstoffe wie oben durch Auskochen mit 50procentigem Weingeist. Diese Operationen wiederholten sie so oft, bis eine kleine Probe des frisch gefällten und gut gewaschenen Caseoalbumins an heissen 50%igen Weingeist nichts mehr abgibt.

Der auf diese Weise, durch wiederholtes Auskochen mit Weingeist erhaltene Stoff soll nun ein Albumin darstellen, welches seinem Verhalten nach mit dem Serumalbumin identisch sein soll. Ich muss nun gestehen, dass es mir ganz unverständlich ist, wie die Herren Verfasser zu einem solchen Schlusse haben gelangen können. Jedermann weiss, dass gerade diejenigen Eigenschaften, welche das Serumalbumin zum Unterschied von anderen Eiweisskörpern charakterisiren, bei dem obigen Verfahren zur Reinigung der Substanz verloren gehen müssen; und das Caseoalbumin muss also einen sehr veränderten, coagulirten Eiweissstoff darstellen. Auch den Verfassern selbst scheint dieses Verhalten nicht entgangen zu

sein, denn sie sprechen sich — S. 6 ihrer Abhandlung — folgendermassen über diesen Gegenstand aus. «Aus dem durch Hitze und Weingeist coagulirten Albumin¹⁾ lassen sich die Protalbstoffe nur durch mehrfaches Auskochen mit Weingeist vollständig entfernen».

Wenn aber das Caseoalbumin ein geronnener Eiweissstoff ist, wie ist es dann möglich zu sagen, welcher Art die Muttersubstanz dieses Eiweissstoffes vor der Gerinnung gewesen sei, wie soll man das geronnene Serumalbumin sicher von anderen in der Hitze schwer oder unlöslich gewordenen Eiweissstoffen unterscheiden können? Ich weiss dies in der That nicht, und die von den Verfassern mitgetheilten Reaktionen des Caseoalbumins scheinen mir keine neue Anhaltspunkte hierzu zu geben. Das Caseoalbumin soll nämlich nach den Verfassern durch Folgendes charakterisirt sein.

Das Caseoalbumin enthält 1,14 % Asche, bestehend aus Calcium und Phosphorsäure (es wird doch nur eine Bestimmung mitgetheilt). Das Caseoprotalbin (es ist nur ein Präparat analysirt worden, aber die Bestimmung war eine doppelte, soll nur 1,11–1,14 % Schwefel enthalten, während das Caseoalbumin (nur 1 Analyse) 1,23 % Schwefel enthalten soll. Der Mehrgehalt an Schwefel (0,1 %) in dem Caseoalbumin gegenüber dem Caseoprotalbin soll sich dadurch kund geben, dass das Caseoalbumin beim Sieden mit Natronlauge von 2% Schwefelalkali giebt und dementsprechend bei Zusatz von Bleiacetat eine Färbung von Schwefelblei hervorruft. In Wasser ist das Caseoalbumin nicht löslich; aber es löst sich leicht in verdünnten Alkalien. In sehr verdünnter Säure (nicht über 0,1%) wie auch in Kalkwasser löst es sich langsamer als Caseoprotalbin, und zwar mit ziemlicher Opalescenz, auf. Das Caseoalbumin reagirt äusserst schwach sauer auf Lackmus und vermag bei gewöhnlicher Temperatur keine Säure zu sättigen.

Mir will es nun nicht klar werden, warum ein Stoff von solchen Eigenschaften gerade ein verändertes Serum-

¹⁾ Die Auszeichnung dieser Worte rührt von mir her.

albumin und nicht ebenso gut irgend ein anderer, durch die gleichzeitige Einwirkung des Weingeistes und des Siedens bis zur Unkenntlichkeit veränderter Eiweisskörper sein soll. Haben wir einmal einen nativen Eiweisskörper durch chemische Eingriffe, namentlich durch Erhitzen zum Sieden, in den geronnenen oder halbgeronnenen Zustand übergeführt, so wird es wohl in den meisten Fällen unmöglich sein, über die Muttersubstanz des geronnenen Stoffes etwas Bestimmtes auszusagen.

Wenn es also nach meiner Ansicht nicht möglich ist, die Identität des Casealbumins mit coagulirtem Serumalbumin zu beweisen, so scheint es mir im Gegentheil weniger schwierig zu sein, den Beweis dafür zu liefern, dass das Casealbumin kein mit dem Serumalbumin, sei es dem vollständig oder dem unvollständig geronnenen, identischer Stoff sein kann. Einen solchen, wenn auch nicht ganz bindenden Beweis haben die Verfasser selbst in einem anderen Abschnitt ihrer Abhandlung, welcher von dem Molkeneiweiss handelt, geliefert.

In diesem Abschnitte glauben die Verfasser durch besondere Versuche beweisen zu können, dass das Molken-eiweiss kein einheitlicher Stoff, sondern ein Gemenge von mehreren Stoffen sei. Das Molkeneiweiss soll nämlich nach Ihnen aus folgenden Proteinstoffen bestehen: «Orroprotein»; gelöstes «Stromaalbumin»; «Lakto-synto-Protalbstoffe» und wahrscheinlich drei verschiedene Glieder dieser Gruppe, «Laktosyntogen», «echtes Pepton» und «Pseudopepton». Ich unterlasse es Anderen zu erforschen, welche von diesen vielen Stoffen nur künstliche Erzeugnisse und welche präformirte Milchbestandtheile sind; aber unter diesen Stoffen findet sich wenigstens einer, welcher unzweifelhaft ein präformirter Milchbestandtheil ist, und dieser ist das gelöste Stromaalbumin. So weit ich aus der Abhandlung erschen kann, ist nämlich dieses nichts Anderes als das gewöhnliche Serumalbumin (Lactalbumin), und dementsprechend ist auch das durch Auskochen mit 50 procentigem Weingeist gereinigte Stromaalbumin nichts Weiteres als geronnenes Serumalbumin (Lactalbumin). Wie

das geronnene, gewöhnliche Serumalbumin ist nämlich das geronnene Lactalbumin (Stromaalbumin) in sehr verdünnten Säuren und Alkalien unlöslich. Wenn das Caseoalbumin in Wasser unlöslich und in sehr verdünnten Säuren oder Alkalien langsam zu einer opalisirenden Flüssigkeit löslich sein soll, so ist damit also auch bewiesen, dass das Caseoalbumin weder ein typisches noch ein vollständig geronnenes Serumalbumin sein kann. Dieses letztgenannte ist nämlich unlöslich in verdünnten Säuren und Alkalien.

Das Caseoalbumin könnte also höchstens ein nur unvollständig geronnenes Serumalbumin sein. Dass es aber überhaupt gar kein Serumalbumin ist, geht am sichersten daraus hervor, dass das zur Darstellung von Caseoalbumin benutzte Casein, bei nicht gar zu nachlässiger Bereitung, von Anfang an gar kein Serumalbumin enthält oder enthalten kann.

Diejenige Gruppe von Eiweissstoffen, welche den Namen «Albumine» erhalten hat, und als deren am besten studirte Repräsentant das Serumalbumin allgemein betrachtet wird, unterscheidet sich wesentlich von den Albuminaten und Globulinen u. A. durch ihr Verhalten zu Neutralsalzen, wie $MgSO_4$ oder $NaCl$.

Wie das Serumglobulin kann auch das Casein durch $MgSO_4$ vollständig ausgefällt werden, während das gewöhnliche Serumalbumin und das Milchalbumin (Lactalbumin) dabei in Lösung bleiben. Dieses Verhalten ist eine so sicher gestellte Thatsache, dass auf ihr bekanntlich sogar eine Methode zur quantitativen Analyse der Milch in gewissen Fällen von Hoppe-Seyler und Tolmatscheff gegründet worden ist.

Wenn das gewöhnliche Casein, bevor es noch durch Kochen mit 45–50 procentigem Weingeist zerstört oder wenigstens verändert worden ist, etwas Serumalbumin enthält, muss also diese Verunreinigung mit Hülfe von dem genannten Salze leicht nachzuweisen sein. Zu dem Ende ist es nur nöthig, das Casein mit Hülfe von Kalkwasser, in Wasser fein vertheiltem Calciumcarbonat oder irgend einem höchst verdünnten Alkali in Wasser zu einer neutral oder amphoter reagirenden Flüssigkeit zu lösen, und diese Lösung

dann mit $MgSO_4$ in Substanz zu sättigen. Ich habe diesen Versuch zu wiederholten Malen gemacht, und zwar nicht nur mit dem nach meiner Methode, sondern auch mit dem nach dem Verfahren von Danilewsky und Radenhausen dargestellten Casein; aber noch habe ich nie die Spur einer Verunreinigung mit Serumalbumin nachweisen können. Nach absichtlicher Verunreinigung des Caseins mit Serum- oder Milchalbumin konnte ich dagegen diese Verunreinigung mit Hülfe von dem nun genannten Verfahren sehr leicht nachweisen, und ich ziehe also schon hieraus den Schluss, dass das mit genügender Sorgfalt dargestellte, genügend ausgewaschene Casein gar kein Serumalbumin enthält.

Es ist doch möglich, dass nicht Alle den nun angeführten Beweis für die Abwesenheit von Serumalbumin in dem Casein als einen völlig bindenden ansehen werden. Es sind nämlich in der letzten Zeit von Burckhardt¹⁾ Einwände gegen die zur Trennung von Serumglobulin und Serumalbumin viel gebrauchte $MgSO_4$ -Methode erhoben worden. Nach diesem Forscher soll nämlich mit diesem Salze nicht nur das Globulin sondern auch ein Theil des Serumalbumins ausgefällt werden, eine Annahme, welche nur unter der Voraussetzung gültig sein könnte, dass neben dem Globulin und dem gewöhnlichen Serumalbumin noch eine 3^{te}, bisher überschene, mit $MgSO_4$ vollständig fällbare Eiweisssubstanz in dem Blutserum enthalten sei. Es ist hier nicht der Ort auf diese Frage des Näheren einzugehen, und ich werde in einem anderen Aufsätze auf Grundlage mehrerer neuen Versuche den Werth dieser Einwände beleuchten; wenn aber auch Jemand die Ansichten Burckhardt's ohne Weiteres umfassen wollte, kann dies auf die uns beschäftigende Frage doch keinen wesentlichen Einfluss ausüben.

Der Theil des Paraglobulins, welcher, nach möglichst vollständiger Ausfällung dieses Stoffes auf anderen Wegen,

¹⁾ A. E. Burckhardt. Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums. Separatabzug aus Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. Leipzig 1882.

in dem Serum zurückbleibt und durch $MgSO_4$ leicht ausgefällt wird, kann nicht durch $NaCl$ ausgefällt werden. Ebenso weiss Jedermann, dass nachdem das Blutserum mit $NaCl$ möglichst vollständig gefällt worden ist, durch Zusatz von Magnesiumsulfat noch eine sehr reichliche Fällung erhalten wird. Derjenige, durch $MgSO_4$ fällbare Bestandtheil des Blutserums, welcher von Burckhardt als ein Theil des Serumalbumins betrachtet wird, ist also durch $NaCl$ nicht fällbar, und dieses Verhalten giebt uns ein Mittel in die Hände, das Casein auch auf die Gegenwart von einem solchen «Serumalbumin» zu prüfen. Man hat zu dem Ende nur nöthig, die neutralen Caseinlösungen bei Zimmertemperatur statt mit $MgSO_4$ mit überschüssigem $NaCl$ zu fällen. Diesen Versuch habe ich schon vor 10 Jahren zum ersten Male angestellt und seitdem bei mehreren Gelegenheiten wiederholt. Das Resultat ist ohne Ausnahme stets dasselbe gewesen. In dem nach vollständiger Sättigung der Caseinlösung mit $NaCl$ abfiltrirten Filtrate kann nicht nur keine Fällung von Eiweis mit $MgSO_4$ erhalten werden, sondern es ist nicht möglich in ihm mit irgend einem der bekannten Reagentien eine Spur von Eiweiss nachzuweisen. Dass diese Behauptung ohne Ausnahme wenigstens für das nach meiner Methode dargestellte Casein volle Gültigkeit hat, ist ganz sicher. Mit dem nach Danilewsky's und Radenhausens Methode dargestellten Casein habe ich denselben Versuch nur einige Male angestellt; aber das Resultat war in diesen Fällen dasselbe.

Durch diese Versuche ist es also bewiesen, dass das gewöhnliche, nach meiner Methode dargestellte Casein ohne Ausnahme, und das nach Danilewsky's und Radenhausens Methode dargestellte Präparat wahrscheinlich wohl immer ganz frei von Serumalbumin ist. Damit kann also auch die Behauptung der geehrten Verfasser, dass das gewöhnliche Casein ein Gemenge von Serumalbumin und Protalbstoffen sei, insoweit als eine irrige zurückgewiesen werden, als die völlige Abwesenheit von Serumalbumin in dem Casein leicht zu demonstrieren ist.

Wenn aber der von Danilewsky und Radenhausen Casealbumin genannte Stoff kein Serumalbumin sein kann, so macht man sich natürlich gern die Frage, welcher Art diese Substanz sei. Es dürfte nicht leicht sein, auf diese Frage eine ganz entscheidende Antwort zu geben, aber selbstverständlich muss es sich hier vor Allem darum handeln zu zeigen, ob dieser Stoff überhaupt ein präformirter Milchbestandtheil oder nur ein Product der chemischen Eingriffe sei.

Es ist bekannt, dass das Casein, wenn es wie in der Milch, in neutral oder amphoter reagirender Lösung sich befindet, ohne wesentliche Veränderung zum Sieden erhitzt werden kann; aber ebenso allgemein bekannt dürfte es auch sein, dass das mit Säuren ausgefällte, ausgewaschene Casein schon durch kurzdauerndes Aufkochen mit Wasser merkbar verändert wird. Ein solches Casein löst sich nämlich weder so leicht noch so klar auf wie dasselbe Casein vor dem Aufkochen, und es zeigt nicht in demselben Masse wie dieses die Fähigkeit grössere Mengen Calciumphosphat in Lösung zu halten.

Wenn also das Casein schon bei einmaligem Aufkochen mit Wasser verändert wird, ist es wohl an sich sehr wahrscheinlich, dass es nicht beim Sieden mit 45—50procentigem Weingeist unverändert bleiben soll. Dass nämlich die Gegenwart von Alkohol das Casein gegen die zerstörende Wirkung der Hitze schützen sollte, ist wohl kaum wahrscheinlich. Dass in der That das Casein durch Einwirkung von siedendem Weingeist wesentlich verändert wird, weiss ich auch seit lange aus eigener Erfahrung. Ich habe dies bei Gelegenheit meiner Versuche über die Käsebildung gefunden; und es kann Jedermann sich leicht von der verändernden Einwirkung nicht nur des Alkohols sondern auch des Weingeistes auf das Casein, wenn es damit gekocht wird, leicht überzeugen. Als Beleg für das nun Gesagte will ich nur die folgende Beobachtung mittheilen.

Ein nach dem Verfahren von Danilewsky und Radenhausen dargestelltes, also 2mal mit Salzsäure ge-

fälltes, noch feuchtes Casein theilte ich in 2 Theile, von denen der eine mit Weingeist von 50% nicht eine ganze Minute gekocht wurde. Diese Probe liess ich dann vollständig bei 0° C. à + 1° C. erkalten und filtrirte erst nach einigen Stunden das Caseingemenge ab. Das Filtrat blieb während mehrerer Tage ganz klar, und es hatten sich also die Protalbstoffe beim Erkalten möglichst vollständig wieder ausgeschieden. Die abfiltrirte Masse musste also jetzt wie früher nach der Ansicht von Danilewsky und Radenhausen ein Gemenge von Protalbstoffen und Caseoalbumin darstellen; und da keine nennenswerthe Menge von Protalbstoffen verloren gegangen war, musste also dieses Gemenge — wenn das Sieden mit Weingeist keine Veränderung bewirkt hatte — dieselbe Löslichkeit und überhaupt dieselben Eigenschaften wie das nicht gekochte Casein zeigen. Dem war aber, wie aus dem Folgenden hervorgeht, nicht so.

Die zwei Caseinportionen, die gekochte wie die mit Weingeist nicht erwärmte, wurde mit stärkstem Alkohol fein zerrieben und rasch gewaschen, um das Wasser, resp. den Weingeist, zu entfernen. Darauf wurde der Alkohol mit Aether verdrängt und das weisse Pulver durch Zerreiben in einer flachen Reibschale vom Aether befreit. Zuletzt wurden beide Caseine über Schwefelsäure bis zu constantem Gewicht getrocknet.

Es sollten nun diese zwei Caseinproben, die gekochte a) und die nicht gekochte b) auf ihr Verhalten zu Lab geprüft werden. Da ich aus eigener Erfahrung weiss, dass es ziemlich schwierig sein kann, einem theilweise veränderten Casein durch Auflösung in Kalkwasser und Zusatz von Phosphorsäure den zur Gerinnung mit Lab erforderlichen Gehalt an Calciumphosphat zu geben, ohne dass das Casein dabei ausgefällt wird, so wählte ich ein anderes Verfahren, welches im Allgemeinen leichter zum Ziele führt. Dieses Verfahren besteht darin, dass das vollständig über Schwefelsäure getrocknete Casein in einer Lösung von 0,5% Na_2HPO_4 gelöst wird, so dass eine Lösung von 4–6% Casein resultirt. Wenn diese Lösung dann allmählich und vorsichtig mit dem

gleichen Volumen einer CaCl_2 -Lösung von 0,44% CaCl_2 versetzt wird, erhält man eine Flüssigkeit, welche bei langsamem Erwärmen auf $30 - 40^\circ \text{C}$. ganz weiss wie Milch wird ohne zu gerinnen oder gefällt zu werden. Wenn diese Lösung, welche etwa so viel Casein wie die Milch (2—3%) enthält, und welche auch ungefähr denselben Gehalt an Calcium und Phosphorsäure hat, mit ein wenig Labferment versetzt wird, gerinnt sie fast sogleich zu einem festen Käse.

Auf diese Weise wollte ich nun mit den zwei oben genannten Caseinportionen verfahren. Beide waren über Schwefelsäure zu constantem Gewicht getrocknet und von beiden wurde in eine Natriumphosphatlösung von der oben genannten Stärke so viel eingetragen, dass Lösungen von genau 4% Casein daraus resultiren würden. Es zeigte sich nun aber schon bei dem Versuche, die beiden Caseinproben in der Salzlösung aufzulösen, ein bestimmter Unterschied zwischen ihnen. Die nicht gekochte Portion b) löste sich nämlich leicht und ohne Rückstand zu einer opalisirenden Flüssigkeit auf. Die mit Weingeist gekochte Probe a) konnte dagegen nicht vollständig gelöst werden und die Flüssigkeit enthielt in ziemlich reichlicher Menge einen flockigen Niederschlag, welcher aus sehr stark gequollenen Partikelchen zu bestehen schien und welcher die Filtration der Flüssigkeit äusserst schwierig machte. Die Filtration ging in der That so langsam von Statten, dass ich von ihr gänzlich Abstand nehmen musste.

Es blieb mir deshalb nur übrig von den beiden Flüssigkeiten zwei gleich grosse Portionen (auf je 5 cc.) abzumessen, welche bei Stubentemperatur allmählich mit den gleichen Volumen der obengenannten CaCl_2 -Lösung versetzt werden sollten. Mit der ungekochten Probe gelang dies nun wie gewöhnlich leicht, während in der gekochten Probe a) schon nach Zusatz von 1 cc. CaCl_2 -Lösung ein sich nicht wieder auflösender Niederschlag entstand. Nach Zusatz von noch 1 cc. CaCl_2 -Lösung trat in dieser Probe eine grobflockige Fällung auf, die indessen nach Zusatz von noch mehr CaCl_2 -Lösung nicht merkbar vermehrt wurde. Ich wollte nun mit

diesen zwei Lösungen die Gerinnungsprobe machen und setzte zu dem Ende beide in ein Wasserbad von 40° C. hinein. Die gekochte Probe a) gerann dabei ohne Labzusatz sehr bald zu einer sehr grobflockigen Masse. Die nicht gekochte Probe b) wurde dagegen wie gewöhnlich in eine milchweisse Flüssigkeit verwandelt, welche erst nach Zusatz von Lab gerann.

Eine Ausscheidung von Casein mit Calciumphosphat beim Erwärmen allein ohne Labzusatz, wie in der obigen Probe a), kann doch auch in anderen Caseinlösungen zu Stande kommen, wenn sie entweder zu viel Kalksalz im Verhältniss zu dem Casein enthalten, oder wenn man auf einmal eine grössere Menge CaCl_2 zusetzt und unmittelbar darauf erwärmt. Am sichersten ist es, die Caseinlösung zuerst auf Körpertemperatur zu erwärmen und nach Zusatz von je $\frac{1}{2}$ cc. CaCl_2 -Lösung wieder kurze Zeit im Wasserbade auf dieselbe Temperatur zu erwärmen. Auf diese Weise fährt man dann abwechselnd mit dem CaCl_2 -Zusatze und dem Erwärmen fort, bis die ganze Menge CaCl_2 -Lösung zugesetzt worden ist. Auf diese Weise gelang es mir nun in der That auch in der Probe a) eine massenhafte Gerinnung beim Erwärmen allein zu verhindern, und ich konnte also auch von dieser Probe eine milchweisse, erst bei Zusatz von Lab gerinnende Lösung erhalten. Dagegen konnte ich auch bei dieser Versuchsanordnung nicht das Auftreten der oben zuerst genannten, schon bei Zimmertemperatur erscheinenden Fällung verhindern.

Der Versuch zeigt also, dass während die nicht gekochte Controlprobe nur gewöhnliches Casein enthielt, die kurze Zeit mit siedendem Weingeist behandelte Probe neben reichlichen Mengen von unverändertem Casein noch einen anderen, schwerlöslicheren Stoff enthielt, welcher nicht in demselben Masse wie jenes die Fähigkeit, das Calciumphosphat in Lösung zu halten, zeigte.

Für das ungleiche Verhalten des ursprünglichen und des mit Weingeist gekochten Caseins gibt es, soweit ich finden kann, keine andere, einfachere Erklärung als die, dass das Casein durch die Einwirkung des siedenden Weingeistes

eine Veränderung erlitten habe. Diese Erklärung ist auch die nächstliegende aus dem Grunde, dass sämtliche native Eiweissstoffe durch das Sieden allein wesentlich verändert werden können. Wenn es um den Nachweis von präformirten, nativen Eiweissstoffen in einer Flüssigkeit sich handelt, werden auch wahrscheinlich nur wenige Chemiker einer Methode, welche in der Behandlung mit siedendem Weingeist besteht, ihr Vertrauen schenken können.

Auffallend könnte vielleicht der Umstand erscheinen, dass das nach der Methode von Danilewsky und Radenhausen dargestellte, also mit Salzsäure gefällte Casein, beim Sieden mit Weingeist verhältnissmässig viel Caseoalbumin gibt, während der nach meinem Verfahren dargestellte Stoff dagegen bei derselben Behandlung fast gar kein solches liefert. Dieses ungleiche Verhalten der zwei Caseine ist doch leicht zu erklären, und es rührt von dem ungleichen Gehalte der zwei Caseine an Calciumphosphat her. Das mit Essigsäure 3mal ausgefällte Casein enthält gewöhnlich nur sehr kleine Mengen von diesem Salze, während das mit Salzsäure ausgefällte Casein gewöhnlich reich an dieser Verunreinigung ist. Nun weiss man, dass salzfreie Eiweisslösungen oft von Alkohol nicht gefällt werden, während eine Verunreinigung mit Salzen, namentlich mit Erdphosphaten die Ausfällung wesentlich erleichtert; und schon aus diesem Grunde könnte man vermuthen, dass der ungleiche Gehalt an Calciumphosphat in den beiden Präparaten ihr ungleiches Verhalten beim Sieden mit Weingeist erklären könnte. Dass dem in der That auch so ist, geht aus einigen Versuchen von Danilewsky und Radenhausen hervor, wenn auch die Verfasser diesen Versuchen eine ganz andere Deutung geben.

Die Verfasser theilen in ihrer Abhandlung (S. 8) einige Versuche mit, durch welche sie die Möglichkeit einer Umwandlung von Caseoalbumin in Caseoprotalbstoffe und umgekehrt beweisen wollen. An die erstere Möglichkeit will ich selbstverständlich gar nicht zweifeln, denn es gibt gar keinen Grund, warum nicht das Caseoalbumin, wie so viele andere Eiweissstoffe, durch Natronlauge von 1% bei Zimmertempe-

ratur in Alkalialbuminat übergeführt werden sollte; aber für die zweite Möglichkeit kann ich in der Abhandlung keine genügende Beweise finden.

Um keiner Entstellung ihrer Angaben mich schuldig zu machen, führe ich hier wiederum die eigenen Worte der Verfasser an, Seite 8 der Abhandlung sagen sie Folgendes: «Löst man z. B. das oberste Glied der Protalbstoffgruppe in nicht zu überschüssigem Kalkwasser, setzt Alkohol hinzu und übersättigt mit verdünnter Phosphorsäure bis zur einartig sauren Reaction, so besteht der ausgefällte Körper nach dem Auswaschen zum grössten Theil oder gänzlich aus Albumin, welches unlöslich in 50% kochendem Weingeist ist und wieder Calcium und Phosphorsäure im Molekül enthält. Calcium und Phosphorsäure sind bei dieser Reaction unbedingt nothwendig, um wieder normales Albumin zu liefern...» «Die-selbe Umwandlung findet auch statt, wenn geradezu eine Lösung von Protalbin in Kalkwasser mit Phosphorsäure zerlegt wird.» Ich habe diese Angaben nicht anders verstehen können, als dass durch Auflösung von einem Protalbstoffe, dem Protalbin, in Kalkwasser und Zusatz von verdünnter Phosphorsäure aus diesem Protalbin echtes Caseoalbumin, welches in siedendem Weingeist von 50% unlöslich ist und Calciumphosphat enthält, wieder hergestellt werden können soll. Ich muss gestehen, dass die Erklärung, welche die Verfasser diesem Versuchsergebnisse geben, mir ganz unbegreiflich erscheint.

Unter den Merkmalen, welche von den Verfassern als Unterschiede zwischen Caseoalbumin und Caseoprotalbin aufgestellt worden sind, scheint wohl kaum irgend eines von grösserer Bedeutung als der ungleiche Schwefelgehalt zu sein. Die Caseoprotalbstoffe sollen nämlich schwefelärmer als das Caseoalbumin sein, und jene sollen auch nicht wie dieses beim Kochen mit Natronlauge von 2% Schwefelmetall geben. Auf dieses ungleiche Verhalten beim Kochen mit Alkali legen auch die Verfasser selbst ein so grosses Gewicht, dass sie es als ein Mittel die Caseoprotalbstoffe auf ihre Reinheit zu prüfen empfehlen. Sie sagen nämlich, S. 6 der Abhandlung

Folgendes: «Man unterlasse nicht die Protalbstoffe auf ihre Reinheit zu prüfen; sie dürfen, wie schon erwähnt, keine Asche enthalten, und mit 2% Natronlauge beim Kochen kein Schwefelmetall geben. Ist letzteres der Fall, so kann man sicher sein, dass noch Caseoalbumin zugegen ist.»

Das Caseoprotalbin enthält also weniger Schwefel als das Caseoalbumin, und wie in aller Welt ist es dann denkbar, dass nur durch Auflösen in Kalkwasser und Zusatz von Phosphorsäure mit oder ohne Zusatz von Alkohol aus dem schwefelärmeren Protalbin das schwefelreichere Caseoalbumin entstehen könne. Mir scheint eine solche Annahme ganz unmöglich zu sein; und es kann wohl Niemand daran zweifeln, dass die Verfasser in beiden Fällen dieselbe Substanz vor sich gehabt haben, das eine Mal ohne und das andere Mal mit einem Gehalte von Calciumphosphat. Ob dieses Calciumphosphat, wie die Verfasser annehmen, in dem Eiweissmolekül enthalten ist, ob das Eiweiss damit eine in Alkohol unlösliche salzartige Verbindung eingeht, oder ob es nur ein unlösliches Gemenge darstellt, darüber können die Versuche selbstverständlich keine sicheren Aufschlüsse geben, und es ist also nicht der Mühe werth darüber zu streiten. Das Einzige, was mit Sicherheit aus den Versuchen hervorgeht, ist, dass die sogenannten Protalbstoffe bei Abwesenheit von Calciumphosphat in siedendem Weingeist von 45—50% löslich, bei Gegenwart von diesem Salze dagegen unlöslich sind.

Erinnert man sich dieses Verhaltens, so ist es leicht ersichtlich, warum man mit siedendem Weingeist aus dem mit Essigsäure gefällten Casein fast nur Caseoprotalbstoffe erhält, während das mit Salzsäure gefällte Casein einen bedeutenden unlöslichen Rückstand von Caseoalbumin liefert. Jenes Casein enthält nämlich nur Spuren, dieses dagegen ziemlich bedeutende Mengen von Calciumphosphat. Man braucht auch nur ein reines Casein mit Calciumphosphat zu verunreinigen, um einen grösseren, in siedendem Weingeist unlöslichen Rückstand zu erhalten. Caseoprotalbin ist also nach meiner Ansicht nur ein Theil des Caseins, welcher wegen einer ungenügenden Menge von Calciumphosphat beim

Kochen mit Weingeist in Lösung übergeht. Das Caseoalbumin dagegen ist der in Folge des anwesenden Calciumphosphats unlöslich zurückbleibende Theil des Caseins. Dass das Casein bei dieser Procedur auch einer Veränderung unterliegt, habe ich oben gezeigt; in wie weit aber hauptsächlich der gelöste oder der ungelöste Theil des Caseins dieser Veränderung unterliegt, habe ich nicht zu ermitteln versucht.

Es bleibt hier noch übrig die Frage zu beantworten, warum das mit Salzsäure gefällte Casein reicher an Calciumphosphat als das mit Essigsäure gefällte ist. Der Grund hierzu liegt nicht, wenigstens nicht allein, darin, dass Danilewsky und Radenhausen nur 2mal mit Salzsäure fällen, während ich das Casein mindestens 3mal mit Essigsäure fälle; er liegt vielmehr darin, dass man bei Anwendung von Essigsäure das Casein bei stark saurer Reaction ausfällen kann. Das Casein löst sich zwar in überschüssiger Essigsäure auf, aber seine Löslichkeit in sehr verdünnter Salzsäure ist doch eine unvergleichlich weit grössere. Die Folge hiervon ist auch, dass man bei Ausfällung des Caseins mit Salzsäure nur äusserst wenig Säure zusetzen darf, weil das Casein schon in dem geringsten Ueberschusse von dieser Säure sogleich wieder aufgelöst wird. Bei Anwendung von Essigsäure dagegen kann man ohne Gefahr die Säure bis zu einer ziemlich stark sauren Reaction zusetzen, und dabei geht auch ein grösserer Theil der Mineralstoffe in Lösung über.

Wie aus dem Obigen ersichtlich sein dürfte, habe ich nicht die Richtigkeit der von Danilewsky und Radenhausen mitgetheilten Beobachtungen bestreiten wollen; ich bin nur bezüglich der Deutung von diesen Beobachtungen zu einer ganz anderen Ansicht gelangt. Während nämlich die geehrten Verfasser das Caseoalbumin und Caseoprotalbin als präformirte Milchbestandtheile betrachten, kann ich in den von ihnen mitgetheilten Beobachtungen keinen Beweis für eine solche Ansicht finden. Im Gegentheil spricht Alles dafür, dass diese Stoffe nur künstliche Erzeugnisse der chemischen Proceduren sind.

Durch das oben Gesagte ist es also erwiesen worden, dass das Casein im gewöhnlichen Sinne kein Gemenge von Serumalbumin und Alkalialbuminaten sein kann. Damit ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass es ein Gemenge von zwei oder mehreren anderen, näher verwandten albuminatähnlichen Eiweisskörpern sein konnte, und auch diese Möglichkeit muss hier in Erwägung gezogen werden.

Unter den von Radenhausen und Danilewsky mitgetheilten Beobachtungen ist es eine, welche einer besonderen Beachtung werth zu sein scheint, und diese Beobachtung betrifft den ungleichen Schwefelgehalt des mit Essigsäure und des mit Salzsäure gefällten Caseins. Die Verfasser haben nämlich gefunden, dass das zwei Mal mit Salzsäure gefällte Casein beim Kochen mit 1–2 procentiger Natronlauge unter Zusatz von Bleiacetat Schwefelmetall giebt, während das mit Essigsäure gefällte Casein bei derselben Behandlung nur Spuren von Schwefelmetall geben soll. Es könnte dieses ungleiche Verhalten der zwei Caseine sehr leicht zu der Annahme führen, dass das mit Salzsäure gefällte Casein ein Gemenge von zwei Eiweissstoffen mit einem ungleichen Gehalt an Schwefel sei, und aus diesem Grunde musste ich auch diese Beobachtung der Verfasser zum Gegenstand einer experimentellen Prüfung machen.

Zur Ausführung der genannten Probe auf Schwefel lösen die Verfasser eine kleine Probe der Eiweissstoffe in einigen cc. 1–2 % Natronlauge, setzen 2–4 Tropfen Bleiacetatlösung hinzu und erhitzen im Wasserbad längere Zeit bei Siedetemperatur ohne Umschütteln. Ich habe dasselbe Verfahren befolgt mit dem Unterschiede, dass ich die zu diesen Versuchen verwendeten Caseinproben zuerst immer über Schwefelsäure zu constantem Gewicht trocknete und dann durch Auflösen in Natronlauge von 0,1 %, Caseinlösungen von genau bekanntem Gehalte mir bereitete. Es wurden also mit einander nur solche Caseinlösungen verglichen, welche genau denselben Gehalt an Casein, gewöhnlich 2–3 %, hatten. Von diesen Lösungen wurden darauf genau abgemessene Mengen, gewöhnlich 5 cc., mit dem

gleichen Volumen Natronlauge von 2—8% Na_2O gemischt und darauf mit einigen Tropfen Bleiacetatlösung versetzt. Die mit einander beim Erwärmen zu vergleichenden Caseinlösungen hatten also im Allgemeinen einen Gehalt von 1—1 $\frac{1}{5}$ % Casein und 1—4% Na_2O .

Ich habe auf diese Weise eine grosse Zahl von Caseinpräparaten mit einander verglichen; aber bisher habe ich kein Casein gesehen, welches nicht eine ganz unzweifelhafte Schwefelreaktion (gelbe oder braungelbe Färbung) beim Kochen mit Alkali und Bleiacetat gab.

In Bezug auf das ungleiche Verhalten des mit Salzsäure und des mit Essigsäure dargestellten Caseins erhielt ich in mehreren Fällen dasselbe Resultat wie Danilewsky und Radenhausen, wenn auch der Unterschied oft ein so geringfügiger war, dass er ganz ohne Bedeutung zu sein schien. Selbst in einem Falle, wo ich ein mit Essigsäure zehn Mal gefälltes Casein a) mit einem nur zwei Mal mit Salzsäure gefällten b) verglich, konnte ich keinen anderen Unterschied zwischen beiden finden als den, dass die Probe b) etwas früher als a) gelbbraun zu werden anfangt, und nach einiger Zeit war gar kein bestimmter Unterschied in der Färbung zu sehen. In anderen Fällen war es weder mir noch Anderen möglich einen bestimmten Farbenunterschied zwischen den zwei Caseinproben zu erkennen, und eigentlich habe ich nur in zwei Versuchen eine wesentlich dunklere gelbbraune Färbung in der Lösung des mit Salzsäure gefällten Caseins beobachtet.

Die Angabe von Danilewsky und Radenhausen, dass das mit Salzsäure gefällte Casein eine reichlichere Menge von Schwefelalkali als das mit Essigsäure gefällte liefern soll, habe ich also in mehreren Fällen bestätigt gefunden. Wenn ich einen solchen Unterschied nicht in allen Fällen bestätigen konnte, und wenn ich ihn im Allgemeinen nur sehr unbedeutend fand, kann dies vielleicht daher rühren, dass ich in der Handhabung der Chlorwasserstoffsäuremethode nicht dieselbe Uebung wie die Verfasser besitze.

Jedenfalls steht es fest, dass das mit Chlorwasserstoffsäure gefällte Casein unter Umständen beim Kochen mit Natronlauge eine grössere Menge Schwefelalkali als das mit Essigsäure gefällte Casein geben kann; und es fragt sich also, ob nicht doch jenes Casein vielleicht als Verunreinigung eine zweite schwefelreichere Eiweisssubstanz enthalten könnte.

Dass diese zweite, hypothetische Eiweisssubstanz kein Serumalbumin sein kann, ist schon oben bewiesen worden; und es ist offenbar, dass eine solche, das Casein verunreinigende Substanz nur derjenigen Gruppe von Eiweissstoffen, welche von verdünnten Säuren gefällt werden, also nur der Globulin- oder Alkalialbuminatgruppe angehören könnte. Nun enthält das Blutplasma, resp. das Blutserum, eine reichliche Menge von Serunglobulin, und man kann deshalb fragen, ob nicht vielleicht auch in der Milch dieser Stoff vorkommen kann, in welchem Falle er bei der Ausfällung des Caseins mit einer Säure auch mit ausgefällt werden muss.

Wenn man sich vergegenwärtigt, dass wie im Blute so auch in den Transsudaten und im Harn die zwei Eiweissstoffe, Serumalbumin und Serunglobulin, neben einander vorkommen, so wird es — da das Lactalbumin allgemein als gewöhnliches Serumalbumin aufgefasst wird — an sich sehr wahrscheinlich, dass auch der zweite Eiweissstoff des Blutserums, das Globulin, welches in dem Rindsblutserum in noch grösserer Menge als das Serumalbumin vorkommen kann, in der Milch vorkommen soll.

Es giebt nun in der That auch eine Beobachtung, welche dem Vorkommen von Serunglobulin in der Milch das Wort redet, und diese Beobachtung ist folgende. Das Casein kann, wie ich wiederholt gesehen habe, aus neutral oder amphoter reagirender Lösung vollständig mit NaCl ausgefällt werden, selbst in dem Falle, dass die Lösung etwa denselben Gehalt an Calcium und Phosphorsäure wie die Milch hat. Man könnte deshalb auch meinen, dass Zusatz von NaCl zu der Milch ein, zur vollständigen Ausscheidung des Caseins aus dieser Flüssigkeit und zur Gewinnung von einem nur Lactalbumin enthaltenes Serum, geeignetes Mittel sein sollte,

dem ist aber nicht so. Wenn auch sämtliches Casein dadurch ausgefällt wird, enthält doch das Filtrat neben Lactalbumin noch eine, mit $MgSO_4$ fällbare Substanz, welche kein Serumalbumin ist.

Versetzt man die Milch mit überschüssigem $NaCl$ und filtrirt, so bleibt, wie zu erwarten war, das Filtrat nach Eintragen von noch mehr $NaCl$ vollkommen klar. Trägt man dann in dieses Filtrat $MgSO_4$ in Substanz hinein, so entsteht ein neuer, wenn auch sehr spärlicher Niederschlag, und die von diesem Niederschlage abfiltrirte Flüssigkeit enthält nun das Lactalbumin. Die Menge des mit $MgSO_4$ fällbaren Stoffes ist eine sehr unbedeutende, und wegen der Schwierigkeit, grössere Mengen von ihm zu gewinnen, habe ich ihn nicht zum Gegenstande eingehender Untersuchungen machen können. Nach einigen Reactionen zu urtheilen, scheint er doch ein Globulin zu sein.

Wenn also in der Milch neben dem Casein auch ein Globulin, vielleicht Serumglobulin, vorkommt, ist es möglich einige Anhaltspunkte zur Erklärung des ungleichen Verhaltens des mit Salzsäure und des mit Essigsäure gefällten Caseins zu gewinnen.

Das Serumglobulin wird, wie das Casein, von Säuren gefällt und wie dieses wird es auch, und zwar noch leichter, von überschüssiger Säure gelöst. Bei Anwendung von der Essigsäuremethode, wobei das Casein stets mit überschüssiger Essigsäure gefällt wird, kann selbstverständlich — vor Allem beim mehrmaligen Ausfällen — kein Paraglobulin in dem Casein als Verunreinigung eingehen, während dies beim Ausfällen des Casein mit Salzsäure vielleicht der Fall sein kann. Die Ausfällung des Caseins mit Salzsäure erfordert, wie oben gesagt, wegen der Leichtigkeit, mit welcher das Casein von überschüssiger Salzsäure gelöst wird, stets etwas Vorsicht, und es ist deshalb auch sehr wichtig, dass keine überschüssige Salzsäure zugesetzt wird. Die Verfasser sagen deshalb auch mit vollem Rechte, dass man beim Ausfällen des Caseins mit Salzsäure nach jedem Zusatz von Säure einige Zeit warten

soll, «um nicht die Coagulation bei Ueberschuss von Säure eintreten zu lassen».

Es ist also leicht ersichtlich, warum das Serumglobulin, wenn solches in der Milch vorkommt, gerade bei Anwendung von der Salzsäuremethode in den Caseinniederschlag übergehen könnte, während es bei Ausfällung des Caseins mit Essigsäure in Lösung bleiben muss. Wenn aber das Casein von etwas Serumglobulin verunreinigt ist, muss es auch beim Kochen mit Natronlauge mehr Schwefelmetall als in reinem Zustande geben, denn das Serumglobulin enthält, wie ich gefunden habe, nicht unbedeutend mehr Schwefel als das Casein. Der Umstand, dass ich in Bezug auf das Verhalten beim Kochen mit Alkali so oft keinen nennenswerthen Unterschied zwischen den nach beiden Methoden dargestellten Caseinen beobachtet habe, könnte dabei, wie oben gesagt, vielleicht daher rühren, dass ich mit dem Salzsäurezusätze nicht ganz so vorsichtig wie die Verfasser gewesen bin.

Von der nun erwähnten Möglichkeit ausgehend habe ich mir auch die Aufgabe gestellt, das Casein auf eine Verunreinigung mit Serumglobulin direct zu prüfen. Ich ging dabei von der bekannten Eigenschaft des Serumglobulins, durch überschüssiges NaCl nur unvollständig gefällt zu werden, aus und prüfte demgemäss, wie schon oben gesagt, die möglichst neutralen Caseinlösungen auf ihre Fällbarkeit mit überschüssigem, feingepulvertem NaCl. Ueber das Ergebniss dieser Versuche habe ich schon oben berichtet. In den Lösungen des mit Essigsäure wie auch des mit Salzsäure gefällten Caseins habe ich ohne Ausnahme eine absolut vollständige Ausfällung mit NaCl erzeugen können. Das Filtrat enthielt nie Spuren von einem gelösten Eiweisskörper. Das mit Salzsäure gefällte Casein habe ich doch bisher nur wenige Male auf diese Weise untersucht, und da ich, wie gesagt, im Allgemeinen keinen grossen Unterschied zwischen dem mit Essigsäure und dem mit Salzsäure gefällten Casein beobachtet habe, wage ich es nicht, die völlige Abwesenheit von Serumglobulin in dem mit Salzsäure gefällten Casein unter allen Umständen zu behaupten.

Ich will also nicht die Möglichkeit in Abrede stellen, dass in dem mit Salzsäure dergestellten Casein unter Umständen noch eine zweite, globulin- oder albuminatähnliche, schwefelreichere Substanz enthalten sein könne, da aber eine solche Substanz nur als eine nicht constant vorkommende Verunreinigung angesehen werden muss, scheint mir diese Möglichkeit nicht zu Gunsten der Salzsäuremethode zu sprechen. Da die Fällung mit Essigsäure eine solche Verunreinigung vollständig ausschliesst, und da zudem nach der Essigsäuremethode ein von Mineralstoffen weit weniger verunreinigtes Casein erhalten wird, muss ich entgegen den Verfassern dieser Methode den Vorzug geben.

Mit Rücksicht auf diese Methode erlaube ich mir hier noch Folgendes zu bemerken:

Das Casein wird von freiem Alkali sehr leicht und rasch verändert, und ich habe deshalb auch stets sehr grosses Gewicht darauf gelegt, dass beim Wiederauflösen des Caseins in Wasser mit Hülfe von sehr verdünnter Natronlauge die Reaction nie eine alkalische wird. Ich habe dies schon bei einer früheren Gelegenheit¹⁾ als etwas sehr wichtiges hervorgehoben; aber ich finde es nothwendig auch jetzt die Aufmerksamkeit hierauf zu lenken.

In ihrer Abhandlung sagen nämlich die Herren Verfasser (S. 3) Folgendes: «Die Anwendung von verdünnter Natronlauge nach Hammarsten können wir nicht empfehlen, da das Casein, wie Hammarsten selbst angibt (zur Kenntniss des Caseins, S. 8), sehr empfindlich ist gegen die Einwirkung von Alkalien». S. 4 sagen sie weiter, «aus einer Lösung von Casein in essigsäurem Natrium oder sonst einem alkalisch reagirenden Alkalisalz fällt Essigsäure nicht wieder Casein, sondern hauptsächlich Protalbstoffe». Nun ist es offenbar, dass die verdünnte Natronlauge nur in dem Falle auf das Casein schädlich einwirken kann, wenn sie in so grosser Menge vorhanden ist, dass die Reaction eine bleibend

¹⁾ Zur Kenntniss des Caseins und der Wirkung des Labfermentes. Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsal. Vol. extra ord. editum Upsala 1877.

alkalische wird, oder wenn auf einmal so viel davon zugesetzt wird, dass die Reaction während einiger Zeit, bevor das Casein in genügender Menge sich gelöst hat, vorübergehend eine alkalische ist. Wenn dagegen das Casein, in Uebereinstimmung mit meinem Verfahren, nur in der Weise mit Hülfe von höchst verdünnter Natronlauge gelöst wird, dass die Lauge nur sehr allmählich, ohne dass die Flüssigkeit dabei je eine merkbare alkalische Reaction annimmt, zugesetzt wird, so ist es offenbar, dass von einer schädlichen Wirkung der Natronlauge nicht die Rede sein kann. Ich muss deshalb noch ein Mal bemerken, dass ich das Casein nur mit Hülfe von sehr stark verdünnter Natronlauge wieder auflöse, und dass ich nie auf einmal mehr davon zufüge, als was zum Auflösen des Caseins bei amphoterer oder saurer Reaction erforderlich ist. Dabei muss auch das Casein vorerst möglichst fein zerrieben sein, damit es sogleich von der Lauge gelöst werde.

Beobachtet man nicht diese Vorsichtsmassregeln und setzt man auf einmal etwas zu viel von der Natronlauge zu, so kann auch das Casein vielleicht recht bald einer Veränderung unterliegen, vor Allem, wenn man die schwach alkalische Caseinlösung bei Zimmertemperatur stehen lässt. Wenn nun die Herren Danilewsky und Radenhausen das Casein aus einer Lösung in «essigsauerm Natrium oder sonst einem alkalisch reagirenden ¹⁾ Alkalisalz» mit Essigsäure gefällt haben, so ist es auch zu befürchten, dass in ihren Versuchen das Casein eine theilweise Zersetzung unter Abspaltung von Schwefel erfahren habe. Der Umstand, dass die geehrten Verfasser aus dem mit Essigsäure gefällten Casein beim Kochen desselben mit Natronlauge fast kein Schwefelalkali erhielten, könnte deshalb auch vielleicht daher rühren, dass in ihren Versuchen durch Zusatz von etwas zu viel Alkali bei der Wiederauflösung des Caseins eine Abspaltung von etwas Schwefel stattgefunden hätte.

Bei sorgfältiger Arbeit dürfte es wohl gleichgültig sein, ob man das Casein mit Hülfe von verdünnter Natronlauge

¹⁾ Die Auszeichnung dieser Worte rührt von mir her.

oder Ammoniak wieder auflöst. Für den weniger Geübten dürfte dagegen die Anwendung von Ammoniak anzurathen sein, denn wahrscheinlich wirkt ein geringer Ueberschuss von Ammoniak auf das Casein weniger schädlich als ein entsprechender Ueberschuss von Natronlauge, und ich kann also die von Danilewsky und Radenhausen vorgeschlagene Anwendung von Ammoniak empfehlen. Dagegen kann ich nicht der von ihnen empfohlenen Salzsäure den Vorzug geben, denn ihre Anwendung erfordert viel mehr Vorsicht, die Menge der verunreinigenden Mineralstoffe wird grösser und eine Verunreinigung mit Globulinen, wenn solche vorhanden sind, kann nicht so sicher ausgeschlossen werden. Vielleicht würde es am besten sein, wenn man nach der alten Vorschrift mit Essigsäure fällt und zur Auflösung des Caseins Ammoniak verwendet.

In dem Vorigen habe ich bewiesen, dass das Casein — wenigstens das mit Essigsäure drei Mal gefällte — weder Serumalbumin noch Serunglobulin als Verunreinigung enthält. Will man trotzdem die Annahme machen, dass das Casein kein einheitlicher Stoff sei, so muss es wenigstens nur ein Gemenge von zwei oder mehreren, einander sehr ähnlichen, mit verdünnten Säuren fällbaren Stoffen sein. Trotz wiederholten Bemühungen ist es mir nun nicht gelungen, durch qualitative Methoden einen Wahrscheinlichkeitsbeweis für die nicht einheitliche Natur des Caseins zu liefern, und so blieb mir deshalb nur übrig, diesen Beweis wenn möglich durch eine etwaige ungleiche elementäre Zusammensetzung des auf verschiedene Weise dargestellten Caseins zu führen. Zu dem Ende habe ich eine ziemlich grosse Zahl von Caseinpräparaten verschiedener Darstellungen analysirt, und zwar mit Rücksicht auf nicht nur den Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoff- sondern auch den Schwefel- und Phosphorgehalt.

Zu diesen Analysen habe ich theils das nach der Methode von Danilewsky und Radenhausen zwei Mal mit Salzsäure gefällte und theils das 3—10 Mal abwechselnd mit Essigsäure gefällte und mit Hülfe von verdünnter Natron-

lauge wieder aufgelöste Casein verwendet. Bei der Darstellung von diesem Casein war es natürlich sehr wichtig, jede Zersetzung soweit möglich zu verhindern, und ich habe deshalb auch meine Caseinpräparate nur während der kalten Jahreszeit dargestellt. Um jede Abspaltung von Schwefel bei der Darstellung des Caseins zu verhindern, habe ich möglichst wenig Alkali zur Wiederauflösung des Caseinniederschlags verwendet. Da es auch denkbar ist, dass ein grösserer Ueberschuss von Essigsäure eine theilweise Veränderung des Caseins herbeiführen könnte, wurde auch ein solcher grösserer Ueberschuss sorgfältig vermieden. Ich musste deshalb auch davon Abstand nehmen, ein von Mineralstoffen ganz freies Casein zu gewinnen, und selbst das mit Essigsäure zehn Mal gefällte Casein enthielt noch gegen 0,1% Asche. Die Menge der Mineralstoffe schwankte in den anderen, mit Essigsäure dargestellten Caseinpräparaten zwischen 0,1 und 0,2%.

Nach den Untersuchungen von Danilewsky und Radenhausen wird aus dem Casein mit siedendem Weingeist ein Stoff (Caseoprotalbin) erhalten, welcher 1,13% Schwefel enthält, während der zurückbleibende, ungelöste Theil (Caseoalbumin) 1,23% Schwefel enthalten soll. Das gewöhnliche Casein muss also etwa 1,18% Schwefel enthalten. Da indessen von Danilewsky und Radenhausen von dem Caseoalbumin und Caseoprotalbin nur je ein Präparat auf den Gehalt an Schwefel untersucht worden ist, hielt ich es für wichtig, eine etwas grössere Zahl von Schwefelbestimmungen in dem Casein zu machen.

Ich bestimmte deshalb nach der gewöhnlichen Methode, durch Schmelzen mit Kali und Salpeter den Schwefelgehalt vier verschiedener Caseinpräparate, unter welchen sich auch eines befand, welches nach der Methode von D. und R. dargestellt worden war. Die Bestimmungen waren, wie ich glaubte, ganz tadellos ausgeführt worden, und wie erstaunt wurde ich deshalb nicht, da ich bei Ausrechnung der Analysen in den Präparaten nur 0,7—0,8% Schwefel erhielt. Diese niedrige Zahlen schienen mir um so weniger ver-

ständiglich zu sein, als ich mit einem nicht ganz schwefelfreien Kali gearbeitet hatte, und folglich auch diese Zahlen eigentlich als etwas zu hohe ansehen musste. Ich konnte mir dies nicht anders erklären, als durch die Annahme, dass die Analysen doch aus irgend einer mir unbekanntem Ursache mit sehr groben Fehlern behaftet waren. Ich verwarf deshalb auch diese vier Bestimmungen und ich fand es nicht einmal der Mühe werth, die Zahlenwerthe genau zu notiren.

Leider musste ich doch bald dies bereuen, denn bei einigen Nachforschungen in der Litteratur fand ich, dass meine Bestimmungen mit denen anderer Forscher nicht weniger gut, als die Zahlen von Danilewsky und Radenhausen stimmten. Bei Lehmann (Lehrbuch der physiologischen Chemie Bd. I, Leipzig 1853, S. 352) fand ich nämlich, dass verschiedene Forscher zwar einen etwas wechselnden Schwefelgehalt in dem Casein gefunden haben, dass aber in den meisten Fällen doch der Gehalt an Schwefel 0,8—0,9% betrug. Lehmann sagt auch: «Neueren Untersuchungen nach enthält gereinigtes Casein 0,85% Schwefel».

Wenn man sich erinnert, dass zu der Zeit, wo diese älteren Bestimmungen ausgeführt wurden, die Schwierigkeit, ganz schwefelfreie Reagentien zu erhalten, noch grösser als jetzt war, und dass alle die Schwierigkeiten, welche der Reinigung des Bariumsulfatniederschlags im Wege stehen, zu jener Zeit noch nicht bekannt waren, so ist es wohl sehr wahrscheinlich, dass diese älteren Analysen einen etwas zu hohen Schwefelgehalt des Caseins ergeben haben. Es schien mir deshalb nunmehr nicht ganz unwahrscheinlich zu sein, dass meine ersten Analysen doch einen verhältnissmässig richtigen Werth ergeben hatten, und es blieb mir nun noch mehr obliegend, neue Schwefelbestimmungen in dem Casein zu machen.

Bei dem Schmelzen mit Alkali und Salpeter können leicht Verluste stattfinden und dadurch etwas zu niedrige Werthe erhalten werden. Um solche Verluste möglichst klein zu machen, muss das Casein mit ziemlich viel Soda und Salpeter vermischt werden, und die grosse Menge von

Alkalisalzen, welche hierdurch zuletzt in Lösung erhalten werden, erschwert die Bestimmung des ausgefallten Bariumsulfates, dessen Menge dadurch — selbst bei Anwendung von schwefelfreien Reagentien — leicht etwas zu hoch ausfällt. Dieser Umstand macht es auch schwierig, grössere Mengen Substanz in Arbeit zu nehmen, und doch ist dies, wenn es sich um schwefelärmere Substanzen handelt, ganz nothwendig.

Aus diesem Grunde veränderte ich das gewöhnliche Verfahren dahin, dass ich zuerst die Hauptmasse des Caseins im Wasserbade mit reiner verdünnter Salpetersäure zerstörte. Das Casein wurde in einem geräumigen Becherglase mit dem mehrfachen Volumen Salpetersäure (1,18 spec. Gew.) versetzt, das Becherglas mit einem grösseren Uhrglase bedeckt und im Wasserbade allmählich erwärmt. Das Casein löste sich dabei allmählich zu einer orangefarbigem Flüssigkeit auf. Nachdem das Casein bei gelindem Erwärmen gelöst worden ist, kann man ohne Gefahr das Erwärmen beim vollen Sieden des Wasserbades fortsetzen. Man fährt mit dem Erwärmen fort, bis nach wiederholten Zusätzen von neuer Salpetersäure die stark concentrirte, gelbe Flüssigkeit beim Erkalten zu einer Kristallmasse fast erstarrt. Hierzu war gewöhnlich ein 2-tägiges Erwärmen im Wasserbade erforderlich.

Der auf diese Weise erhaltene Rückstand, welcher neben reichlichen Mengen von Oxalsäure auch ein blassgelbes, kristallinisches Pulver (wie es scheint ein Gemenge von Nitrosäuren), mit dessen Untersuchung ich gegenwärtig beschäftigt bin, enthält, wird in dem Becherglase allmählich und sehr vorsichtig mit reinem, schwefelfreiem Natriumcarbonat¹⁾ im Ueberschuss versetzt und nach Zusatz von ein wenig Salpeter mit Wasser nach und nach in einen silbernen Tiegel über-

¹⁾ Da es mir noch nie gelungen ist, ein ganz schwefelfreies Carbonat im Handel zu finden, musste ich mir selbst ein solches bereiten. Käufliches, möglichst reines Bicarbonat wurde erst gewaschen, dann unkrystallisirt und endlich in einfaches Carbonat übergeführt. Aus der Lösung des letzteren wurde durch fractionirte Fällung mit Alkohol reines Carbonat gewonnen.

geführt. Nach dem Eintrocknen im Wasserbade wird im Luftbade vollständig getrocknet und darauf vorsichtig verbrannt. Die Verbrennung geht unter diesen Umständen sehr leicht und ruhig von Statten, und man erhält eine verhältnissmässig kleine Menge geschmolzener Masse, welche, in Wasser gelöst, darauf wie gewöhnlich behandelt wird.

Bei diesem Verfahren kann ziemlich leicht jeder Verlust vermieden werden, und es können grössere Mengen Substanz in Arbeit genommen werden, ohne dass dadurch die zuletzt erhaltene Lösung, aus welcher die Schwefelsäure gefällt werden soll, von grossen Mengen Alkalisalzen verunreinigt wird. Die Zerstörung des Caseins mit Salpetersäure im Wasserbade erfordert zwar viel Zeit, aber während dieser Zeit kann man sich mit anderen Arbeiten beschäftigen, und übrigens könnte man vielleicht mit Salpetersäure im zugeschmolzenen Rohr erhitzen. Nach dem nun beschriebenen Verfahren, welchem ich unbedingt vor dem älteren den Vorzug gebe, habe ich mehrere Schwefelbestimmungen in dem Casein ausgeführt. Ich lasse hier die analytischen Daten folgen. Sämmtliche Zahlen beziehen sich auf aschefreie Substanz.

Caseinpräparat 1. Casein 3 mal mit Essigsäure gefällt.

a) 2,400 gr. Casein lieferten 0,1081 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,619\%$ S.

b) 4,111 gr. Casein lieferten 0,2065 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,690\%$ S.

Caseinpräparat 2. Casein 8 mal mit Essigsäure gefällt.

2,190 gr. Casein lief. 0,1005 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,628\%$ S.

Caseinpräparat 3. Casein 6 mal mit Essigsäure gefällt.

2,002 gr. Casein lief. 0,0964 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,6595\%$ S.

Caseinpräparat 4. Casein 8 mal mit Essigsäure gefällt.

a) 4,15 gr. Casein lieferten 0,2307 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,7634\%$ S.

b) 2,6565 gr. Casein lieferten 0,1413 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,7305\%$ S.

Caseinpräparat 5. Casein 10 mal mit Essigsäure gefällt.

3,5476 gr. Casein lief. 0,200 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,7742\%$ S.

Caseinpräparat 6. Casein 3 mal mit Essigsäure gefällt.

a) 1,6473 gr. Casein lieferten 0,0875 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,730\%$ S.

b) 4,5146 gr. Casein lieferten 0,2548 gr. BaSO₄
0,775% S.

Caseinpräparat 7. Casein 2 mal mit Salzsäure gefällt.
2,4565 gr. Casein lief. 0,132 gr. BaSO₄ = 0,738% S.

Caseinpräparat 8. Casein 2 mal mit Salzsäure gefällt.
a) 1,5949 gr. Casein lieferten 0,090 gr. BaSO₄
0,775% S.
b) 3,7457 gr. Casein liefern 0,2115 gr. BaSO₄ =
0,774% S.

Das Ergebniss sämtlicher Analysen war also, tabellarisch zusammengestellt, folgendes:

Nr. 1.	Casein	3mal	mit Essigsäure gefällt	} a) 0,619 % S. b) 0,690 % S.
Nr. 2.	Casein	8mal	id.	
Nr. 3.	Casein	6mal	id.	0,6595 % S.
Nr. 4.	Casein	8mal	id.	} a) 0,7634 % S. b) 0,7305 % S.
Nr. 5.	Casein	10mal	id.	
Nr. 6.	Casein	3mal	id.	} a) 0,73 % S. b) 0,775 % S.
Nr. 7.	Casein	2mal	mit Salzsäure gefällt	
Nr. 8.	Casein	2mal	id.	} a) 0,775 % S. b) 0,774 % S.

Wie aus dieser tabellarischen Zusammenstellung zu ersehen ist, war also in meinen Bestimmungen der Schwefelgehalt des Caseins bedeutend niedriger als man auf Grund der von Danilewsky und Radenhausen mitgetheilten Analysen von Casealbumin und Caseoprotalbin zu erwarten hätte. Dass die von mir gefundenen niedrigen Zahlen wohl kaum von einem Fehler der Bestimmungen herrühren können, dürfte wohl aus den oben angeführten Doppelbestimmungen ersichtlich sein. In keiner von diesen beträgt nämlich die Differenz 0,1%. In der ersten Analyse ist die Differenz 0,071, in der zweiten (Nr. 4) 0,033, in der dritten (Nr. 6) 0,045 und in der vierten (Nr. 8) 0,001%, und dennoch wurde in diesen Doppelanalysen regelmässig etwa doppelt so viel Substanz zu der einen wie zu der anderen Bestimmung verwendet. Durch diese Doppelbestimmungen wird es

auch möglich, die Zuverlässigkeit des von mir befolgten Verfahrens zu beurtheilen.

Obwohl ich also gar keinen Grund zu der Annahme hatte, dass die von mir gefundenen niedrigen Zahlen in irgend einer Unvollkommenheit des von mir befolgten Verfahrens ihre Ursache hatten, schien es mir doch wichtig zu sein, auch einige Bestimmungen nach der alten Methode auszuführen. Dabei war es vor Allem, des Vergleiches halber, von Interesse, einige der schon nach dem modificirten Verfahren analysirten Caseinpräparate nach der gewöhnlichen Methode zu analysiren, und es wurden dazu die obigen Caseinpräparate 2, 4, 5 und 8 gewählt. Zu diesen Bestimmungen wurden absolut schwefelfreie Reagentien verwendet, und dem entsprechend erhielt ich auch etwas niedrigere Werthe als in den vier ersten, oben besprochenen, nach der alten Methode ausgeführten Analysen. In allen diesen neuen Bestimmungen erhielt ich auch etwas weniger Schwefel als nach der modificirten Methode, was anzudeuten scheint, dass bei dem Schmelzen doch kleine Verluste stattgefunden hatten. In ein paar Analysen erhielt ich sogar reichlich 0,1% Schwefel weniger nach dem gewöhnlichen als nach dem modificirten Verfahren; und ich muss deshalb auch dieses letztgenannte Verfahren als das genaueste von beiden betrachten. Unter solchen Umständen dürfte es auch ganz überflüssig sein, die weniger genauen, nach dem gewöhnlichen Verfahren gewonnenen analytischen Datas hier mitzutheilen.

Der Gehalt an Schwefel ist, wie die tabellarische Zusammenstellung zeigt, etwas kleiner in den drei ersten Caseinpräparaten als in den folgenden. Der Grund hierzu kann vielleicht darin liegen, dass diese Analysen die ersten waren, welche nach dem neuen Verfahren ausgeführt wurden, und dass ich in Folge dessen auch noch keine genügende Uebung gewonnen hatte. Ich glaube dies umsomehr, als die Verbrennung in diesen ersten Analysen nicht so ruhig und leicht wie in den folgenden von Statten ging. Für diese Annahme spricht auch der Umstand, dass auch bei der

qualitativen Probe auf Schwefel — Kochen mit Natronlauge unter Zusatz von Bleiacetat — kein wesentlicher Unterschied zwischen diesen und den anderen, auf dieselbe Weise untersuchten, Caseinproben wahrgenommen werden konnte.

In dem Vorigen habe ich gesagt, dass ich bei der qualitativen Schwefelprobe im Allgemeinen keinen wesentlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Caseinpräparaten, sei es dass sie nach dem Verfahren von Danilewsky und Radenhausen oder nach der Essigsäuremethode dargestellt worden sind, gefunden habe. Zu demselben Resultate haben auch die quantitativen Analysen geführt. Halten wir uns an die fünf letzten Analysen, welche wohl als gut gelungen angesehen werden können, so finden wir denselben Gehalt an Schwefel in dem 3., 8. oder 10. Mal mit Essigsäure wie in dem nur 2mal mit Salzsäure gefällten Casein. Von besonderem Interesse ist in dieser Hinsicht vielleicht ein Vergleich zwischen den Analysen 6 und 8. Das zu diesen Analysen verwendete Casein stammte aus derselben Milch; das eine Präparat war aber durch dreimaliges Fälln mit Essigsäure, das andere nach der Methode von Danilewsky und Radenhausen dargestellt worden. Der Schwefelgehalt war in beiden derselbe, und es zeigt sich also, dass, wenigstens bei vorsichtiger Arbeit, die Anwendung von Natronlauge zur Wiederauflösung des Casein keine stärkere Abspaltung von Schwefel als die Anwendung von Ammoniak bewirkt. Dies geht übrigens eben so schlagend aus den Analysen 4 und 5 hervor. Das 8. oder 10. Mal mit Essigsäure gefällte und mit Hilfe von verdünnter Natronlauge aufgelöste Casein hatte genau denselben Gehalt an Schwefel wie die zwei, nach der Methode von Danilewsky und Radenhausen dargestellten Caseinpräparate.

Nach den oft genannten zwei Verfassern sollte der schwefelärmere Theil des gewöhnlichen Caseins, die Caseoprotalbstoffe, 1,11—1,14% Schwefel enthalten, während der schwefelreichere Theil, das Caseoalbumin, 1,23% Schwefel enthalten soll. Nach meinen Bestimmungen enthält das Casein dagegen, gleichgültig ob es nach der einen oder der

anderen Methode dargestellt worden ist, nur etwa 0,7% Schwefel. Ich enthalte mich jeden Versuches diesen Widerspruch zu erklären; wenn man sich aber erinnert, dass die Herren Verfasser nur ein Präparat von jedem der zwei Caseinbestandtheile analysirt haben, so dürfte es wohl jedenfalls nicht erlaubt sein, aus der von ihnen gefundenen, unbedeutenden Differenz zwischen dem sogenannten Casealbumin und Caseoprotalbin, welche nur 0,1% Schwefel beträgt, den Schluss zu ziehen, dass das Casein ein Gemenge von zwei Stoffen von ungleichem Schwefelgehalte sei.

Wenn also die Schwefelbestimmungen der Annahme, dass das Casein ein Gemenge von zwei Eiweissstoffen sei, nicht das Wort reden, könnte man doch vielleicht hoffen, durch Bestimmung von den anderen Elementen diese Annahme einer Prüfung zugänglich machen zu können. Ich will deshalb auch hier einige Bestimmungen des Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehaltes mittheilen, welche theils von mir und theils unter meiner Leitung von anderen Personen ausgeführt worden sind. Die C- und H-Bestimmungen geschahen, wie gewöhnlich, im Platinschiffchen im Sauerstoffstrom. Die Stickstoffbestimmungen sind nach der Dumas'schen Methode ausgeführt worden. Sämmtliche Zahlen beziehen sich auch hier auf die aschefreie Substanz.

Caseinpräparat 1. Casein 3 mal mit Essigsäure gefällt.

Bei der von mir ausgeführten Analyse lieferten
0,3932 gr. Casein 0,2537 gr. H₂O = 7,16% H.
0,7655 gr. CO₂ = 53,09% C.

Caseinpräparat 2. Casein 3 mal mit Essigsäure gefällt, von mir analysirt.

0,3717 gr. Casein lief. 0,2393 gr. H₂O = 7,15% H.
0,7220 gr. CO₂ = 52,97% C.

Caseinpräparat 3. Casein 3 mal mit Essigsäure gefällt, von Hrn. Kandidat Köster analysirt.

0,3542 gr. Casein lief. 0,2279 gr. H₂O = 7,14% H.
0,6893 gr. CO₂ = 53,07% C.
0,2827 gr. Casein lieferten 36,5 cc. N-Gas bei + 5° C.
und 757 mm. Hg = 15,72% N.

Caseinpräparat 4. Casein 3 mal mit Essigsäure gefällt, von Hrn. Kandidat Köster analysirt.

0,3066 gr. Casein lieferten 39,5 cc. N-Gas bei + 6° C.
und 763 mm. Hg = 15,64% N.

Caseinpräparat 5. Casein nach der Methode von Danilewsky und Radenhausen dargestellt, von Herrn Kandidat Köster analysirt.

0,3171 gr. Casein lief. 0,2014 gr. H₂O = 7,06% H.
0,615 gr. CO₂ = 52,89% C.

0,3147 gr. Casein lieferten 40 cc. N-Gas bei + 2° C.
und 758 mm. Hg = 15,69% N.

Caseinpräparat 6. Casein 3 mal mit Essigsäure gefällt, von Hrn. Apotheker Kayser analysirt.

0,3022 gr. Casein lief. 0,1905 gr. H₂O = 7,00% H.
0,5855 gr. CO₂ = 52,83% C.

0,295 gr. Casein lieferten 37,6 cc. N-Gas bei + 6° C.
und 762 mm. Hg = 15,56% N.

Caseinpräparat 7. Dasselbe Casein 6 mal mit Essigsäure gefällt, von Herrn Apotheker Kayser analysirt.

0,336 gr. Casein lief. 0,2081 gr. H₂O = 6,88% H.
0,6500 gr. CO₂ = 52,78% C.

0,290 gr. Casein lieferten 36,25 cc. N-Gas bei + 5° C.
und 779 mm. Hg = 15,67% N.

Caseinpräparat 8. Casein 8 mal mit Essigsäure gefällt, von mir analysirt.

0,3121 gr. Casein lief. 0,1963 gr. H₂O = 6,98% H.
0,6080 gr. CO₂ = 53,08% C.

0,3452 gr. Casein lieferten 43,7 cc. N-Gas bei + 8° C.
und 774 mm. Hg = 15,57% N.

Caseinpräparat 9. Das Casein wurde aus einer, vorher durch Filtration von den Fettkügelchen befreiten Milch durch 3 maliges Fällen mit Essigsäure dargestellt und von mir analysirt.

0,2903 gr. Casein lieferten 37,7 cc. N-Gas bei + 6° C.
und 755,2 mm. Hg = 15,73% N.

Das Ergebniss sämtlicher Analysen ist, tabellarisch zusammengestellt, folgendes:

	C	H	N
Nr. 1. Casein 3 mal mit \overline{A} gefällt	53,09%	7,16%	—
Nr. 2. « 3 mal « \overline{A} «	52,97%	7,15%	—
Nr. 3. « 3 mal « \overline{A} «	53,07%	7,14%	15,72%
Nr. 4. « 3 mal « \overline{A} «	—	—	15,64%
Nr. 5. « 2 mal « \overline{HCl} «	52,89%	7,06%	15,69%
Nr. 6. « 3 mal « \overline{A} «	52,83%	7,00%	15,56%
Nr. 7. « 6 mal « \overline{A} «	52,78%	6,88%	15,67%
Nr. 8. « 8 mal « \overline{A} «	53,08%	6,98%	15,57%
Nr. 9. Casein aus filtrirter Milch 3 mal mit \overline{A} gefällt	—	—	15,73%
Mittel	52,96%	7,05%	15,65%

Aus dieser Zusammenstellung ersieht man also, dass auch in Bezug auf den Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehalt kein merkbarer Unterschied zwischen den auf verschiedene Weise dargestellten Caseinpräparaten besteht. Die grössten Differenzen, welche überhaupt in diesen Analysen vorkommen, betragen nämlich für den Kohlenstoff 0,31 %, für den Wasserstoff 0,28 % und für den Stickstoff 0,17 %, und sie liegen also innerhalb der Grenzen für die unvermeidlichen analytischen Fehler. Sie können also unter keinen Umständen als ein Ausdruck für eine ungleiche Zusammensetzung der verschiedenen Präparate aufgefasst werden.

Es blieb mir also zuletzt nur übrig, das Casein auch in Bezug auf den Phosphorgehalt zu untersuchen, und eine solche Untersuchung schien mir übrigens von einem besonderen Interesse zu sein.

Das Casein liefert bekanntlich bei der Pepsinverdauung einen ungelösten, phosphorhaltigen Rückstand, welcher als Nuclein aufgefasst wird, und es ist deshalb gewiss von Interesse zu ermitteln, ob das Casein wirklich ein Nucleoalbumin ist oder ob es nur ein Gemenge von Nuclein und Eiweiss darstellt.

Nach der, wenn ich nicht irre, gewöhnlichen Annahme wird das Casein als das in dem Milchserum aufgelöste oder fein vertheilte, stark gequollene Protoplasma der Zellen der Milchdrüse aufgefasst. Es liegt deshalb auch die Annahme nahe, dass in dem Milchserum neben dem Casein auch fein vertheiltes Nuclein suspendirt sei, und allem Anscheine nach musste dieses Nuclein bei dem Ausfällen des Casein aus der Milch mit einer Säure mit niedergeschlagen werden. Wie dieses Nuclein bei dem Wiederauflösen des Caseins sich verhalten würde, ist natürlich nicht möglich ohne Weiteres zu sagen. Es könnte vielleicht in der Caseinlösung in ungelöstem gequollenem Zustande sich befinden, in welchem Falle es bei der Filtration wie die Fettkügelchen von dem Filtrum zurückgehalten werden musste; aber es könnte auch vielleicht wirklich gelöst werden und in das Filtrat übergehen. Selbst in dem letztgenannten Falle — wenn also das Casein von

mitniedergeschlagenem Nuclein verunreinigt werden musste, würde doch allem Anscheine nach der Phosphorgehalt des Caseins schwerlich constant werden können. Er musste vielmehr in den auf verschiedene Weise dargestellten Caseinpräparaten bedeutende Schwankungen zeigen.

Aus diesem Grunde fand ich es von besonderem Interesse, den Phosphorgehalt des Caseins zu bestimmen. In Anbetracht der Möglichkeit, dass die Milch vielleicht etwas Nuclein in dem Milchserum suspendirt enthalten könne, schien es mir dabei sehr wichtig zu sein, nicht nur das nach der Essigsäuremethode wie nach der Methode von Radenhausen und Danilewsky erhaltene, sondern auch das aus der vorher filtrirten Milch dargestellte Casein auf den Gehalt an Phosphor zu untersuchen.

Wenn die ganz frische Kuhmilch mit 3—4 Vol. destillirtem Wasser verdünnt wird, kann sie oft ziemlich leicht und rasch durch ein dichtes Filtrum so vollständig von den Fettkügelchen und etwaigen anderen feinen Partikelehen befreit werden, dass in dem Filtrate mit dem Mikroskope gar keine Kügelchen oder Körnchen zu sehen sind. Bisweilen waren in dem Filtrate einzelne Fettkügelchen der kleinsten Sorte zu sehen; aber durch wiederholtes Filtriren durch ein sehr dichtes Papier, welches ich zum Filtriren des Blutes gewöhnlich benutze, konnte ich ein von mit dem Mikroskope sichtbaren festen Partikelchen ganz freies Filtrat erhalten. Ich bemerke hier auch, dass ich die Filtrate, bevor sie der entscheidenden mikroskopischen Untersuchung unterworfen wurden, stets über Schwefelsäure stark concentrirt hatte.

In vielen Fällen ging die Filtration bei diesen Versuchen so leicht und rasch von Statten, dass ich bei Anwendung von vielen Filtren im Laufe einer Nacht (bei etwa 0° C.) mehrere Liter Filtrat erhalten konnte. In anderen, selteneren Fällen ging dagegen die Filtration bei derselben Verdünnung der Milch und bei Anwendung von demselben Papiere so langsam, dass ich den Versuch aufgeben musste. Den Grund dieses etwas wechselnden Verhaltens habe ich nicht zum Gegenstande weiterer Nachforschungen gemacht.

Die Filtrate waren, selbst wenn die Entfernung der Fettkügelchen ganz vollständig gelungen war, nie farblos, sondern sie hatten stets ein mehr weniger weisses, milchähnliches Aussehen, während sie gleichzeitig ganz durchsichtig waren. Nachdem ich sie über Schwefelsäure stark concentrirt hatte, waren sie noch milchähnlicher, erwiesen sich aber im durchfallenden Lichte als ganz durchsichtig. Es beweist dies die Richtigkeit meiner vor etwa 10 Jahren ausgesprochenen Behauptung, dass die weisse Farbe der Milch nicht von dem Milchfette allein sondern auch von dem Casein und dem Calciumphosphate herrührt.

Aus den, wie oben angegeben, erhaltenen Filtraten wurde das Casein mit Essigsäure gefällt und dann wie gewöhnlich behandelt.

Die Bestimmung des Phosphorgehaltes in dem Casein geschah fast in allen Fällen durch Verbrennen mit Salpeter und Soda. Nur in der Analyse Nr. 5 wurde, wie bei der Schwefelbestimmung, das Casein zuerst im Wasserbade mit Salpetersäure behandelt. Zu den unten mitzutheilenden Analysen bemerke ich noch, dass in den Doppelanalysen die mit a) bezeichnete Bestimmung durch Ausfällung der Phosphorsäure mit Molybdänflüssigkeit, Auflösung des Niederschlages in Ammoniak, Fällung mit Magnesiamixtur und Wägung des Niederschlages als Pyrophosphat ausgeführt wurde. In b) wurde die Phosphorsäure aus dem gehörig vorbereiteten Filtrate direct mit Magnesiamixtur gefällt, der Niederschlag wie gewöhnlich behandelt und als Pyrophosphat gewogen. Die Zahlen beziehen sich wie in den vorigen Tabellen auf aschefreie Substanz.

Caseinpräparat 1. Casein 3mal mit Essigsäure gefällt

a) 0,6605 gr. Casein lieferten 0,0205 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,867% P.

b) 0,6285 gr. Casein lieferten 0,0188 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,835% P.

Caseinpräparat 2. Dasselbe Casein 8mal mit Essigsäure gefällt.

a) 0,6495 gr. Casein lieferten 0,0194 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,834% P.

b) 0,9673 gr. Casein lieferten 0,0294 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,848% P.

Caseinpräparat 3. Casein aus Milchfiltrat 3mal mit Essigsäure gefällt.
0,8398 gr. Casein lieferten 0,025 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,831% P.

Caseinpräparat 4. Casein aus Milchfiltrat 3mal mit Essigsäure gefällt.
a) 0,8376 gr. Casein lieferten 0,0251 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,835% P.
b) 0,8533 gr. Casein lieferten 0,027 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,883% P.

Caseinpräparat 5. Casein 10mal mit Essigsäure gefällt.
2,730 gr. Casein lieferten 0,0835 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,855% P.

Caseinpräparat 6. Casein nach Danilewsky und Radenhausen
mit HCl dargestellt.
0,9378 gr. Casein lieferten 0,0302 gr. $Mg_2 P_2 O_7$
0,843% P.

Die tabellarische Zusammenstellung der analytischen
Data ergibt Folgendes:

Nr. 1.	Casein 3mal mit A gefällt	(a) 0,867% P. b) 0,835% P.
Nr. 2.	« 8mal « A	(a) 0,834% P. b) 0,848% P.
Nr. 3.	Casein aus Milchfiltrat 3mal mit A gefällt	0,831% P.
Nr. 4.	« « 3mal « A	(a) 0,875% P. b) 0,883% P.
Nr. 5.	Casein 10mal mit A gefällt	0,855% P.
Nr. 6.	Casein nach D. u. R. mit Salzsäure gefällt	0,843% P.

Mittel 0,847% P.

Der Gehalt an Phosphor ist also in den verschiedenen Präparaten ganz derselbe gewesen, und die Analysen stimmen so gut unter einander überein, dass es kaum möglich ist daran zu zweifeln, dass der Phosphor wirklich in dem Eiweissmolecul enthalten ist. Wenn der Phosphor nur von einer Verunreinigung eines Eiweissstoffes mit Nuclein herührt, ist es kaum denkbar, dass ein 10 mal mit Essigsäure gefälltes und 9mal in Wasser mit Hülfe von Natronlauge aufgelöstes Casein denselben Gehalt an Phosphor wie das 3mal mit Essigsäure oder nur 2mal mit Salzsäure gefällte und mit Hülfe von Ammoniak wieder aufgelöste Casein enthalten sollte. Ebenso wenig lässt sich mit einer solchen Annahme der Umstand vereinbaren, dass das aus der filtrirten Milch dargestellte Casein genau denselben Gehalt an Phosphor wie das aus dem unfiltrirten dargestellten Präparat enthält.

In den nun mitgetheilten Analysen, welche der von Danilewsky und Radenhausen gemachten Annahme, dass das Casein ein Gemenge sein soll, zuwider sind, sehe ich also einen Beweis für die Ansicht, dass das Casein ein phosphorhaltiger Proteinkörper, ein Nucleoalbumin ist.

Zu dieser Ansicht führen auch die qualitativen Versuche. Das Nuclein löst sich bekanntlich nicht in überschüssiger Essigsäure oder in verdünnter Salzsäure von 0,1—0,2% HCl auf, während das Casein besonders in der letztgenannten Säure sehr leicht löslich ist. Will man sich davon überzeugen, wie das Nuclein bei der Pepsinverdauung allmählich aus dem Casein entsteht, so ist es deshalb auch am besten, das reine, fettfreie Casein zuerst in Salzsäure von 0,1—0,2% HCl bei Körpertemperatur zu lösen, von etwa ungelöst gebliebenen grösseren Caseinklumpchen zu filtriren und das Filtrat mit etwas Glycerinpepsinlösung zu versetzen. Je nach der Wirksamkeit der sauren Pepsinlösung und der Menge des gelösten Caseins sieht man dabei nach kürzerer oder längerer Zeit — bei Gegenwart von wenig Pepsin und sehr viel Casein vielleicht erst nach ein paar Tagen — wie die erst dünnflüssige Caseinlösung etwas trübe und mehr dickflüssig wird. Nach einiger Zeit hat sie vielleicht das Aussehen eines dünnen Kleisters angenommen, und bei fortgesetzter Einwirkung des Magensaftes erhält man zuletzt einen sehr reichlichen grobflockigen Niederschlag.

Das aus dem Casein dargestellte Nuclein ist also nicht löslich in Magensaft; und wenn trotzdem von Anfang an kein Niederschlag in der Versuchsflüssigkeit enthalten war, kann dies nur entweder daher rühren, dass das Nuclein ein während der Verdauung entstandenes Spaltungsproduct des Caseins ist, oder auch daher, dass das ursprüngliche Casein die Fähigkeit besitzt, grössere Mengen Nuclein in Lösung zu halten, während die im Laufe der Verdauung entstandenen Peptone eine solche Fähigkeit nicht besitzen.

Nun kann man sich leicht davon überzeugen, dass ein Gemenge von Casein oder Alkalialbuminat mit nicht sehr wenig Nuclein ganz anders als das Casein sich verhält. Ein

solches, mit Hülfe von wenig Alkali in Wasser gelöstes Gemenge wird zwar von Salzsäure oder Essigsäure gefällt, aber der Niederschlag löst sich nicht wieder in derjenigen Menge Essigsäure oder Salzsäure auf, welche mit Leichtigkeit eine entsprechende Menge Casein löst. Es zeigt dies also, dass ein Gemenge von Casein oder Alkalialbuminat mit Nuclein etwas anders als das Casein sich verhält, und es beweist dies also auch, dass das Casein kein Gemenge von einem Eiweissstoffe und Nuclein ist.

Ganz beweisend ist der Versuch indessen nicht, denn ich habe auch gesehen, dass die Ausfällung des Nucleins, wenn es nur in sehr geringer Menge vorhanden ist, wenigstens theilweise durch reichliche Mengen Casein verhindert werden kann; und der wichtigste Beweis gegen die Annahme, dass das Casein ein Gemenge von Eiweiss und Nuclein sein sollte, liegt also nach meiner Ansicht in dem oben bewiesenen constanten Phosphorgehalte der verschiedenen Caseinpräparate.

Nach den in dem Vorigen mitgetheilten Elementaranalysen hat also das Casein folgende Zusammensetzung: **C** 52,96% ; **H** 7,05% ; **N** 15,65% ; **S** 0,716% ; **P** 0,847% und **O** 22,78%. Die gute Uebereinstimmung, welche die auf verschiedene Weise dargestellten Präparate unter sich gezeigt haben, sprechen gar nicht für die Ansicht, dass das Casein ein Gemenge sein sollte. Die von Danilewsky und Radenhausen für diese Ansicht angeführten Gründe können nicht als beweisend angesehen werden, und mir ist es weder durch qualitative Versuche noch durch die Elementaranalyse gelungen, irgend einen Wahrscheinlichkeitsbeweis für die nicht einheitliche Natur des Caseins zu liefern. Das Einzige, was gegen die einheitliche Natur des Caseins anscheinend sprechen könnte, ist das von Danilewsky und Radenhausen beobachtete ungleiche Verhalten des mit Essigsäure und des mit Salzsäure gefällten Caseins bei der qualitativen Schwefelprobe. Ich will, wie oben gesagt, auch nicht die Möglichkeit in Abrede stellen, dass das Casein, wenn es nach der Methode von Danilewsky und Radenhausen dargestellt wird, von einer anderen, schwefelreicheren Substanz, viel-

leicht Serunglobulin, verunreinigt werden kann; wenn aber dies der Fall sein würde, beweist es natürlich Nichts gegen die einheitliche Natur des reinen Caseins; es beweist vielmehr nur, dass die Methode eine unvollkommene ist. Das ungleiche Verhalten des mit Essigsäure und mit Salzsäure gefällten Caseins bei der Schwefelprobe könnte auch, wenn der Unterschied wie in den von Danilewsky und Radenhausen beobachteten Fällen etwas grösser ist, daher rühren, dass bei Anwendung von der Essigsäuremethode durch etwas unvorsichtigen Zusatz von Natronlauge bei der Wiederauflösung des Caseins ein Theil des Schwefels aus dem Casein sich abgespalten hätte. Als ein Beweis gegen die einheitliche Natur des reinen Casein kann ein solcher Unterschied jedenfalls nicht angesehen werden.

Nach den Angaben von Danilewsky und Radenhausen soll das Casein ein Gemenge von Protalbstoffen mit wechselnden Mengen Caseoalbumin sein. Dass in dem Casein, bei richtiger Darstellung desselben, kein Caseoalbumin, d. h. kein seinem Verhalten nach mit dem Serumalbumin identischer Stoff enthalten ist oder enthalten sein kann, habe ich oben bewiesen; und es ist nunmehr auch nicht schwer zu zeigen, dass das reine Casein kein Gemenge von nur Protalbstoffen darstellt. Die Protalbstoffe, d. h. die Alkalialbuminate, welche in dem Casein vorkommen sollen, können durch 3maliges Fällen mit Essigsäure fast rein erhalten werden. Allem Anscheine nach müssen sie deshalb auch durch 6-8-10maliges Fällen noch reiner und vielleicht ganz rein erhalten werden.

Das mit Essigsäure gefällte Casein sollte also der Hauptmasse nach oder fast ganz aus Alkalialbuminaten bestehen; dass aber diese Stoffe, vor Allem wenn sie aus Serum oder Eiweiss dargestellt und von anhängendem Lecithin befreit worden sind, frei von Phosphor sind, während das Casein nicht unbedeutende — und zwar, gleichgültig ob es 3, 8 oder 10mal gefällt wird, constante — Mengen Phosphor enthält, ist es unmöglich, das Casein mit den Alkalialbuminaten oder Protalbstoffen zu identifizieren. Das Casein ist eine Protein-

substanz ganz anderer Art als die Alkalialbuminate, und daher wird auch Danilewsky wohl kaum auf Zustimmung anderer Forscher rechnen können, wenn er behauptet¹⁾, dass aus gewöhnlichem Eieralbumin durch Einwirkung von Natronlauge von 2—3% bei Zimmertemperatur wahres Casein entstehen kann. Es ist offenbar, dass hier die gewöhnliche Verwechslung von Casein mit Alkalialbuminat vorliegt, und Niemand wird glauben, dass wahres phosphorhaltiges Casein aus dem Eieralbumin unter diesen Umständen entstehen kann.

Und wenn es, wie dies von Danilewsky angegeben wird, möglich sein würde, in einer calciumphosphathaltigen Alkalialbuminatlösung durch Labzusatz eine wahre Gerinnung zu erzeugen, würde ich hierin eine zwar ebenso unerwartete wie interessante Uebereinstimmung zwischen den zwei Stoffen aber noch keinen Beweis für ihre Identität sehen.

Ich habe doch aus der Abhandlung von Danilewsky noch nicht die Ueberzeugung gewinnen können, dass es ihm gelungen ist, eine wahre Gerinnung des Alkalialbuminates mit Lab zu bewirken. Danilewsky spricht sich nämlich Seite 460 seiner Abhandlung (etc.) folgendermassen aus. «En ajoutant à une solution protalbuque faiblement alcaline ou acide, un peu d'eau de chaux et quelques gouttes de solution de phosphate de sodium, puis quelques gouttes de solution de présure, la solution se coagule dans l'espace de 15 à 30 minutes à la température de 20 à 30° C.» Ich zweifle nun gar nicht an der Richtigkeit dieser Angaben, denn ich weiss aus eigener Erfahrung seit vielen Jahren, dass ein solches Versuchsergebniss leicht zu erhalten ist, aber es wundert mich sehr, dass Danilewsky der nothwendigen Controlprobe, ohne welche der Versuch ganz werthlos wird, mit keinem Worte Erwähnung gethan hat. Diese Controlprobe, welche in den von mir, Lundberg, Mörner und Köster²⁾ bei verschiedenen Gelegenheiten über diesen Gegenstand ausgeführten Unter-

¹⁾ Danilewsky: Étude sur la constitution chimique des substances albuminoïdes. Extrait des Archives des sciences physiques et naturelles. T. VII, n° 4-15, Avril 1882. Genève.

²⁾ Vergl. Upsala Läkareförenings förhandlingar, Bd. 9, 11, 12 u. 16.

suchungen nie unterlassen wurde, besteht darin, dass man einen anderen Theil derselben Versuchsflüssigkeit ohne Lab oder nach Zusatz von derselben Menge gekochten Fermentlösung bei derselben Temperatur erwärmt.

Macht man diese Controlprobe, so wird man finden, wie leicht eine calciumphosphathaltige Albuminatlösung, welche bei Zimmertemperatur flüssig bleibt, beim Erwärmen auch ohne Labzusatz gerinnt. Von grosser Bedeutung ist hierbei die Relation zwischen Albuminat, Calcium und Phosphorsäure. Bei unverändertem Gehalt an Alkalialbuminat kann man mit steigenden Mengen Calciumphosphat Lösungen von sehr ungleichem Verhalten darstellen. Man erhielt zuerst Lösungen, welche weder bei Zimmertemperatur noch bei Körpertemperatur gerinnen, dann kommen solche, welche nur bei Körpertemperatur, darauf solche welche bei Temperatur zwischen 20—40° C. und zuletzt solche, welche schon bei Zimmertemperatur gerinnen. Dasselbe gilt im Grossen und Ganzen auch von dem Casein, was denjenigen, welche mit Lösungen von reinem Casein und Calciumphosphat viel gearbeitet haben, gewiss nicht entgangen ist. Die Fähigkeit des Caseins wie des Alkalialbuminates Calciumphosphat in Lösung zu halten ist nämlich keine unbegrenzte und sie ist sehr von der Temperatur abhängig.

Auf Grund dieses Verhaltens ist auch nach den auf dem hiesigen Laboratorium gewonnenen Erfahrungen die Erforschung von dem Verhalten des Alkalialbuminates zu Lab bei Gegenwart von Calciumphosphat mit ganz besonderen Schwierigkeiten verknüpft; denn es handelt sich hierbei darum, die grösste Menge von Calcium und Phosphorsäure zu finden, mit welcher eine Albuminatlösung versetzt werden kann, ohne beim Erwärmen allein zu gerinnen. Diese Schwierigkeiten wachsen auch dadurch, dass diese Maximalmenge des Calciumphosphates auch mit einer Aenderung der Reaction eine andere wird. Bisher ist es auch weder mir noch irgend einem meiner Schüler gelungen, eine mit Lab gerinnende, calciumphosphathaltige Lösung von Albuminat darzustellen, welche nicht beim Erwärmen nach einiger Zeit

auch ohne Gegenwart von Lab gerann. Wir haben die Versuche auf verschiedene Weise modificirt. Wir haben das Alkalialbuminat in Kalkwasser gelöst und die Lösung mit Phosphorsäure neutralisirt; wir haben es auch erst in Natriumphosphat gelöst und dann die Lösung allmählich theils bei Zimmertemperatur und theils unter gelindem Erwärmen nach jedem Zusatz mit CaCl_2 -Lösung versetzt. Wir haben auch die Alkalialbuminatlösung zu frischer Milch gesetzt; aber unter keinen Umständen haben wir eine wahre Gerinnung des Alkalialbuminates mit Lab beobachten können. Aus der mit Albuminatlösung versetzten Milch konnte nach der beendeten Gerinnung derselben mit Lab das Albuminat aus den filtrirten Molken mit seinen ursprünglichen Eigenschaften wieder gewonnen werden.

Diese Versuche sind schon vor mehreren Jahren ausgeführt worden, aber ich habe auch einige neue mit dem nach Danilewsky's Verfahren aus Eiereiweiss dargestellten Protalbin (Alkalialbuminat) angestellt. Das Ergebniss blieb doch dasselbe. Ich konnte zwar beim Erwärmen mit Lab gerinnende Alkalialbuminatlösungen darstellen; aber diese Lösungen gerannen auch beim Erwärmen auf dieselbe Temperatur ohne Zusatz von Lab. Wie dieser Widerspruch zwischen den Versuchsergebnissen von Danilewsky und mir zu erklären ist, weiss ich nicht. Auffallend ist es doch, dass Danilewsky Nichts von einer Controlprobe sagt, und dass er bei dieser Gelegenheit die Fähigkeit der calciumphosphathaltigen Albuminatlösungen auch ohne Labzusatz zu gerinnen, mit keinem Worte berührt.

Aber selbst wenn es wirklich möglich ist, eine wahre Gerinnung des Alkalialbuminates mit Lab zu Stande zu bringen, kann es dennoch auf Grund der ganz abweichenden elementären Zusammensetzung von einer Identität des Caseins mit dem Alkalialbuminate nicht die Rede sein.

Nach meiner Ansicht muss das Casein unzweifelhaft zu den Nucleoalbuminen gerechnet werden, und dieser Stoff ist das am besten bekannte Glied dieser interessanten, in dem Thierkörper weit verbreiteten Gruppe von Proteinstoffen.