

Beitrag zur Kenntniss der Eiweisskörper der Kuhmilch¹⁾.

Von

John Sebelien.

Assistent am landwirthschaftlichen Versuchslaboratorium zu Kopenhagen.

(Der Redaktion zugegangen am 16. März 1885.)

Während unsere Kenntniss vom Casein in mancher Beziehung ganz befriedigend ist, haben wir nur sehr mangelhafte Nachrichten von den anderen Eiweissbestandtheilen der Milch. Die mangelhaften Methoden zu deren Darstellung und Trennung, sowie die unvollständige Kenntniss von ihren Eigenschaften haben oft dazu geführt, eine Menge neue Stoffe als selbstständige, native Milchbestandtheile aufzustellen, während sie thatsächlich entweder nur unvollständig ausgefällte Reste von Casein und Albumin sind, so wie Hammarsten²⁾ es für das «Lactoprotein» bewiesen hat, oder auch Umwandlungsprodukte sind, gebildet durch Einwirkung der chemischen Reagentien oder dergleichen, so wie es z. B. der Fall ist mit den von Danilewsky & Radenhausen³⁾ als «Caseoalbumin- und Caseoprotalbinsstoffe» aufgeführten Körper. In der letzten Zeit ist von Duclaux⁴⁾ die entgegengesetzte Ansicht ausgesprochen, indem er die Existenz aller anderen Eiweisskörper in der Milch als das Casein läugnet. Vom Casein aber nimmt er drei Modificationen an: eine feste, eine aufgequollene und eine gelöste Modification, die sich

1) Nach dem dänischen Original im «Oversigt af det kgl. danske Vidensk. Selskabs Forhandlinger 1885».

2) Nordisk medicinsk Arkiv 1876, Bd. VIII, Nr. 10.

3) Forschungen auf dem Gebiete der Viehhaltung, H. 9, 1880. — Auch Hammarsten in Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. VII.

4) Comptes rendus, T. XCVIII, 1884.

von einander mittelst Filtriren durch Filtrirpapier, bezw. Thonzellen trennen lassen, aber die übrigen leicht in einander übergeführt werden können.

Aus dem Nachfolgenden wird hervorgehen, dass in der Milch wenigstens zwei, von dem Casein verschiedene Eiweisskörper zugegen sind, wenn auch der eine von diesen nur in äusserst geringer Menge.

Laktoglobulin.

Hammarsten¹⁾ sprach die Vermuthung aus, dass die Milch ein durch Magnesiumsulfat fällbares Globulin enthält, welches mit dem genannten Salze ausgefällt werden kann, nachdem man zuerst alles Casein mittelst Kochsalz entfernt hat. Früher hat Engling²⁾ angegeben, dass die verdünnten Molken aus dem Colostrum der Gebirgsschläge, nach längerem Einleiten von Kohlensäure weisse Flocken ausscheiden, welche sich in 5procentiger Kochsalzlösung wieder lösen, und die er daher als Globulin betrachtet. Da die Frage jedoch nach diesen ziemlich unzureichenden Angaben nicht als abgemacht zu betrachten ist, habe ich sie nach Aufforderung von Herrn Prof. Hammarsten zur näheren Untersuchung aufgenommen.

Zur Entfernung des Caseins habe ich ausser Sättigung der Milch mit Kochsalz in Substanz auch die Coagulation mittelst Lab benutzt. In beiden Fällen ist es leicht, die Gegenwart eines Globulins nachzuweisen; jedoch muss man beobachten, dass wenn man eine Verkäsung der Milch mittelst Lab vornimmt, in den Molken ausser dem Lactalbumin und dem Molkenprotein immer ein kleiner Rest von unausgefälltem Casein (oder Käsemasse) bleibt, welchen man zu beseitigen hat, um nicht die Reactionen zu stören.

Als Regel wird man sich zur Fällung mit Kochsalz halten. Wenn die Milch sauer reagirt, wird sie mit Natronlauge genau neutralisirt (bis amphotere Reaction), worauf man gewöhnliches pulverisirtes Tischsalz unter Umrühren bis zur vollständigen Sättigung in die Milch hineinbringt. Wenn

¹⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie 1883, Bd. VII, S. 250.

²⁾ Forschungen auf dem Gebiete d. Viehhaltung, I Bd., 2. H., S. 96.

dieser Punkt erreicht ist, filtrirt man. Da das Casein als vollständig fällbar für Kochsalz anzusehen ist, während das Globulin nur unvollständig hiervon gefällt wird, wird die letztere Substanz in dem erhaltenen Filtrate nachzuweisen sein. Beim Erwärmen der Flüssigkeit erhält man constant bei 35° C. eine flockige Fällung, die nebst einem eiweissartigen Körper, dessen Natur ich nicht zu bestimmen im Stande bin (wahrscheinlich ein kleiner Rest von Casein), hauptsächlich aus phosphorsaurem Kalk besteht. Nach dem Abfiltriren dieser Fällung sättigt man das klare Filtrat mit pulverisirtem Magnesiumsulfat, wobei man wieder eine deutliche flockige Fällung erhält. Nur ein einziges Mal erhielt ich hier keine Fällung; jedoch ist die Ursache hiervon wahrscheinlich in dem Umstande zu suchen, dass die bei diesem Versuche benutzte abgerahmte Milch etwas sauer reagirte, und die vorherige Neutralisation nicht vorgenommen wurde.

Um den in genannter Weise ausgeschiedenen Körper näher zu untersuchen, wurde er zuerst einem Reinigungsprocess unterworfen. In dieser Absicht wurde er auf einem Filter gesammelt, durch Pressen zwischen Filtrirpapier von der Mutterlauge befreit, darauf nebst dem Filter in wenig Wasser aufgeweicht und die filtrirte Lösung abermals mit Magnesiumsulfat gesättigt. Nach einer solchen Reinigung wird man den Körper «rein» finden, d. h. frei von übrigen Eiweisskörpern (Lactalbumin); wird nämlich die Lösung des 2mal gefällten Körpers abermals mit Magnesiumsulfat gesättigt, so lässt sich im Filtrate mittelst den gewöhnlichen Reagentien kein Eiweisskörper mehr nachweisen.

Um von den anhaftenden Resten von Magnesiumsulfat befreit zu werden, wurde der 2mal gefällte Körper in möglichst geringer Quantität Wasser gelöst und darauf der Dialyse unterworfen. Hierdurch wurde die Lösung mehr oder weniger trübe, klärte sich aber wieder vollständig bei Zusatz von etwas Kochsalzlösung.

Merkwürdig genug liess sich bei der Dialyse fast nie eine veritable Ausscheidung von Globulin erhalten, sondern nur eine starke Trübung der Flüssigkeit. Auch nicht durch

sehr vorsichtigen Zusatz von äusserst schwacher Essigsäure glückte es, einen deutlichen Niederschlag zu bilden. Da nun sowohl die Dialyse, wie die verdünnte Essigsäure sehr unvollkommene Fällungsmittel für das Globulin sind, so lässt sich das Ausbleiben der Niederschläge wohl in dieser Weise erklären. Geht man jedoch einen ähnlichen Umweg wie den von Hammarsten¹⁾, gelegentlich der Untersuchung vom Paraglobulin eingeschlagenen, so gelingt es leicht, die genannten Erscheinungen hervorzurufen.

Man sättigt zu diesem Zwecke die Lösung des mit Magnesiumsulfat 1 oder 2mal gefällten Körpers mit Kochsalz in Substanz, wodurch eine unvollständige Fällung des Globulins entsteht. Wird diese Fällung gesammelt und zwischen Filtrirpapier gepresst, darauf in Wasser gelöst und dialysirt, so scheidet das Globulin sich bei der Dialyse in deutlichen faserigen Flocken aus, die sich durch Eintropfen von etwas Kochsalzlösung wieder vollständig klar lösen. Diese klare Lösung wird jedoch durch grössere Mengen Wassers wieder getrübt und die Trübung wird durch eine Spur von Essigsäure vergrössert. Eine Lösung des in beschriebener Weise dargestellten Globulins wurde mit Kochsalz gesättigt, wonach das Filtrat von der hierdurch ausgeschiedenen Fällung noch mehr Fällung durch Sättigung mit Magnesiumsulfat ergab.

In dem genannten Verhalten zeigt sich eine schlagende Analogie des Lactoglobulins mit dem im Blute vorkommenden Paraglobulin.

Um die Eigenschaften des besprochenen Körpers näher zu untersuchen, habe ich seine Coagulationstemperatur in einer Lösung von 5—10% Kochsalz bestimmt. Es ergab sich hierbei immer eine starke Trübung bei ca. 72° C., die Flüssigkeit wurde vollständig milchweiss und undurchsichtig, aber die Coagulation trat erst bei 75—76° C. ein. Das Eintreten der Coagulation erkennt man deutlich daran, dass der Niederschlag sich bald und leicht sammelt, wogegen die Flüssigkeit ihr vollständig milchiges Aussehen selbst bei längerem Stehen behält, wenn man das Aufwärmen unterbricht, ehe die Coagu-

¹⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. VIII, S. 467.

lationstemperatur erreicht ist. Ich habe diese Versuche mehrere Male mit Präparaten verschiedener Darstellung wiederholt, aber immer die Coagulationstemperatur innerhalb des angegebenen Intervalls gefunden.

Auch das in oben beschriebener Weise mittelst Kochsalz unvollständig gefällte Globulin zeigte in 10% Kochsalzhaltiger Lösung bei 72° C. starke Trübung und bei 74° C. schied der Körper sich aus in coagulirtem Zustande.

Die gefundene Coagulationstemperatur stimmt durchaus mit den von Hammarsten¹⁾ bezüglich des Paraglobulins gefundenen Resultaten. Um die Identität zwischen diesen Körper und dem Lactoglobulin zu beweisen, wäre jedoch die Untersuchung von noch anderen Eigenschaften erforderlich, namentlich von dem optischen Drehungsvermögen, das für das Paraglobulin sowohl von Hammarsten, wie von Frédéricq zu ca. $\div 47^\circ$ bestimmt ist. Indessen ist es mir noch nicht gelungen, von dem Lactoglobulin (wovon man in beschriebener Weise nur wenige Milligramme per Liter Milch gewinnt) solchen Versuch anzustellen. Aus demselben Grunde konnte natürlich auch keine Rede davon sein, eine Elementaranalyse dieses Globulins vorzunehmen.

Betreffend die Menge des Lactoglobulins in der Milch ist es natürlich bis jetzt nicht möglich gewesen, eine quantitative Bestimmung davon vorzunehmen. Da ein Theil des Globulins mitgefällt wird, wenn man das Casein mit Kochsalz niederschlägt, so wird die Quantität, die im Filtrate hiervon mit Magnesiumsulfat gefällt werden kann, nur eine niedere Grenze der ganzen Menge sein können. Aber selbst für die Quantität, die man nach der beschriebenen Methode gewinnen kann, sehe ich mich nicht im Stande, genaue Zahlen anzugeben; doch scheint sie etwas wachsend zu sein, und namentlich etwas grösser im Colostrum zu sein.

Es bleibt noch übrig zu untersuchen, in wiefern der hier als Lactoglobulin bezeichnete Körper möglicherweise ein unausgefällter Rest unreinen Caseins sein kann. Bekanntlich

¹⁾ Pflüger's Archiv für Physiologie, Bd. XVIII, S. 64.

hat ja nämlich Hammarsten¹⁾ früher nachgewiesen, dass Casein, wenn es mit gewissen Blutserumbestandtheilen (Lecithin?) verunreinigt wird, mehrere Eigenschaften der Globuline annimmt. Mit Hinblick auf den Zusammenhang, den man gewöhnlich zwischen dem Blute und der Milch annimmt, und die Identität, die man gewöhnlich zwischen dem Albumin des Bluts und der Milch annimmt (cfr. unten), liegt die Annahme nahe, dass wahrscheinlich auch in der Milch solche Blutserumbestandtheile vorkommen, welche einen Theil des Caseins in solcher Weise verunreinigen können, dass es sich mit den Eigenschaften der Globuline zeigt. Ein solcher Einwand wird um so mehr natürlich, wenn man sich erinnert, dass die Milch nach Schmidt-Mülheim²⁾ wirklich eine nachweisbare Spur von Lecithin enthält, und dass dieser Körper höchstwahrscheinlich die wirksame Rolle bei der genannten Verunreinigung des Caseins spielt.

Indessen muss man erinnern, dass ein in genannter Weise verunreinigtes und verändertes Casein nach einer einzigen Reinigung wieder seine ursprünglichen Eigenschaften annimmt, und es ist daher sehr wenig wahrscheinlich, dass unser Lactoglobulin, welches wiederholten Reinigungsprocessen unterworfen gewesen, noch so viel Unreinigkeit enthalten sollte, dass dies einen wesentlichen Einfluss haben konnte.

Die Aehnlichkeit des unreinen Caseins und der Globuline tritt besonders in den Löslichkeitsverhältnissen hervor; auch in anderer Beziehung verliert das Casein einige seiner wichtigsten Eigenschaften, so z. B. seine Fähigkeit mittelst Lab zu gerinnen. Dagegen ist, meines Wissens, nichts darüber bekannt, wie eine kochsalzhaltige Caseinlösung unter solchen Umständen sich in der Wärme verhält. Ich untersuchte desshalb ob es möglich wäre, eine Caseinlösung beim Erhitzen zu coaguliren in solcher Weise und unter solchen Umständen wie es bei dem als Lactoglobulin betrachteten Körper erwähnt wurde.

1) Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. Nov. acta reg. soc. sc. Ups. ser. III. vol. X.

2) Pflüger's Archiv, Bd. XXX, S. 379.

In dieser Absicht wurde reines Casein (nach Hammarsten's Methode durch 3mal wiederholtes Fällen mit Essigsäure dargestellt) mittelst wenig Alkali in Wasser zur amphoteren Reaction gelöst und darauf mit soviel Kochsalzlösung gemischt, dass die Lösung 5—10% Chlornatrium enthielt.

Bei einem Gehalte von 5% Salz hielt die Lösung sich vollständig klar beim Erwärmen bis 100° C. und vertrug das Kochen ohne eine Spur von Coagulation zu zeigen.

Bei einem Gehalte von 10% Kochsalz fing die Flüssigkeit bei 75° C. an zu opalisiren, wurde sehr stark milchig bei ca. 82°, aber liess sich übrigens bis 100° erwärmen, ohne dass eine Coagulation eintrat. Ganz im Gegentheil klärte die Flüssigkeit sich vollständig, wenn sie aus dem Wasserbade herausgenommen und abgekühlt wurde. Bei wiederholtem Erwärmen trat wieder eine starke Trübung ein, die vollständig aussah wie eine Coagulation, welche von der Oberfläche der Flüssigkeit anfangend, sich nach und nach weiter nach unten verbreitete. In dieser Weise konnte man mehrere Male, scheinbar ohne Schaden, die Lösung abwechselnd trüben und klären, aber eine Coagulation trat nie ein. Dagegen wurde bei diesem Versuche beobachtet, dass während der Abkühlung und Klärung der Lösung eine Menge schwere, durchsichtige, stärkekorähnliche Körper durch die Flüssigkeit schnell zum Boden fielen, um doch bei vollständiger Abkühlung wieder zu verschwinden.

Zur Controle wurde geprüft, ob eine Lösung von unreinem Casein sich in derselben Weise verhielt. Hierzu wurde ein Casein angewendet, welches dargestellt war durch Mischung einer reinen Caseinlösung mit Blutserum, welche durch Verdünnen mit 9 Vol. Wasser und etwas Essigsäure so gut wie frei von Paraglobulin war. Das beim Mischen gefällte sehr unreine Casein wurde mehrere Male durch Decantation gewaschen, darauf mittelst wenig Alkali in Wasser gelöst und dann zu den Coagulationsversuchen verwendet. Da das benutzte Serum der angegebenen Darstellungsweise gemäss noch etwas Paraglobulin enthielt (indem dies nur

unvollständig mittelst Magnesiumsulfat gefällt wird), so war es ja denkbar, dass auch das gefällte Casein noch eine Spur von Globulin enthalten konnte, und ein positives Resultat der Coagulationsversuche würde also kein Beweis sein, dass das Casein unter solchen Umständen wirklich zu coaguliren im Stande sei.

Indessen zeigte es sich, dass beim Erwärmen einer solchen Lösung, die theils 5%, theils 10% Kochsalz enthielt, schon bei verhältnissmässig niedriger Temperatur (40--50°C.) ein trübes Aussehen eintrat. Die 10% Kochsalz haltige Lösung wurde bei 65° C. stark milchig, aber übrigens liessen beide Lösungen sich zum Kochen erhitzen, ohne zu coaguliren. Beim Abkühlen klärten sich die Flüssigkeiten augenscheinlich mit Ausnahme des genannten trüben Aussehens, welches von einer ähnlichen körnigen Fällung herrührte, wie bei den Versuchen mit reinem Casein, aber es verschwand nicht wieder wie dort bei weiterem Abkühlen.

Dieses Verhalten bietet nichts Merkwürdiges, wenn man beachtet, dass sowohl das angewendete Kochsalz, wie namentlich das unreine Casein Kalk (und Phosphorsäure) enthielten. Beim Erhitzen einer Caseinlösung, welche Calciumphosphat enthält, wird bei einer gewissen Temperatur (die um so niedriger liegt, je mehr von dem Phosphate gegenwärtig ist) immer eine Trübung eintreten, bisweilen (bei hinreichender Menge von Calciumphosphat) sogar eine Fällung von Caseinkalkphosphat (Hammarsten), welche sich nicht immer wieder beim Abkühlen löst.

In wiefern das in der Milch vorkommende Globulin ein besonderes Lactoglobulin ist, oder ob es identisch mit dem Paraglobulin ist, lässt sich noch nicht entscheiden. Nur so viel ist gewiss, dass es in den untersuchten Eigenschaften vollständig mit dem Paraglobulin übereinstimmt. Um aber diese Frage zu entscheiden, würde es nothwendig sein, auch andere Eigenschaften zu untersuchen, namentlich das optische Drehungsvermögen, sowie auch die elementare Zusammensetzung, welches mir bis jetzt wegen des geringen Materials jedoch nicht möglich gewesen ist.

Lactalbumin.

Ueber das Albumin der Milch finden wir nur sehr sparsame und lückenhafte Mittheilungen in der Litteratur. Soweit mir bekannt, beschränkt sich unser Wissen von diesem Körper darauf, dass sich in den Molken, nachdem das Casein aus der Milch (durch Essigsäure, Lab oder andere Mittel) ausgefällt ist, ein durch Erhitzen zum Kochen coagulirbarer Eiweisskörper befindet. Dieser Körper, der sich durch seine Fällungsweise den eigentlichen Albuminen angeschlossen, betrachtet man gewöhnlich mit dem im Blute vorkommenden Serumalbumin als identisch¹⁾.

In seiner früher besprochenen Arbeit gibt Engling²⁾ an, dass das Lactalbumin, sowohl der normalen Milch, wie des Colostrums, mit dem Serumalbumin identisch sei, und sich vom Ovalbumin der Eier durch seinen geringeren Schwefelgehalt unterscheidet. Doch finden sich keine genaueren Angaben weder über Darstellungsweise, noch über Analyse der Substanz angeführt. In einer späteren Abhandlung von demselben³⁾ finden wir Elementaranalysen von Albumin, welches theils aus sauren, theils aus süßen Molken durch Hitze coagulirt ist, woraus der Verfasser den Schluss zieht, dass ein beträchtlicher Unterschied zwischen dem Lactalbumin des Colostrums und der normalen Milch, bezüglich der elementaren Zusammensetzung besteht.

Menozzi und Musso⁴⁾ analysirten ebenfalls durch Hitze gewonnenes Eiweiss, welches aus sauren Molken coagulirt war, und schlossen aus ihren analytischen Durchschnittsergebnissen auf eine Identität des Lactalbumins und des Serumalbumins.

Sämmtliche besprochenen Präparate stellten aber kaum reines Lactalbumin dar; denn theils wird man durch directe Coagulation der Molken (es seien diese auf die eine oder andere Weise erhalten) die ungefüllten Reste von Casein oder

1) Hermann's Handbuch der Physiologie, V. Bd., 1. Th., S. 553.

2) Forschungen auf dem Gebiete der Viehhaltung, I. Bd., 2. H.

3) Jahresbericht über die Thätigkeit der landwirthschaftl.-chem. Versuchsstation des Landes Vorarlberg in Tisis, 1882:

4) Forschungen auf dem Gebiete der Viehhaltung, I. Bd., 3. H.

Käse im Coagulum mitbekommen, theils wird ein solches Coagulum sich nur schwierig von Milchzucker und namentlich von Fett befreien lassen, theils ist es ganz wahrscheinlich, wenn auch noch nicht bewiesen, dass das coagulierte Albumin ein vom nicht coagulierten Albumin auch bezüglich der elementaren Zusammensetzung wesentlich verschiedener Körper ist.

So lange man also das Lactalbumin nicht anders als im coagulierten Zustande erhalten kann, ist es nicht für nähere Untersuchung verwendbar. Es musste deshalb in löslicher Form rein dargestellt werden, oder jedenfalls so isolirt werden, dass seine Eigenschaften studirt werden konnten. Für diesen Zweck benutzte ich eine von Hammarsten¹⁾ für Darstellung des Serumalbumins angedeutete Methode. Er fand nämlich, dass, nachdem alles Paraglobulin aus dem Blutserum durch Sättigung mit Magnesiumsulfat bei 30° C. entfernt war, das Serumalbumin sich aus dem mit Salz gesättigten Filtrate bei gewöhnlicher Temperatur mittelst Essigsäure fällen liess, wonach es durch Lösen in Wasser, Neutralisiren und darauffolgende Dialyse gereinigt werden konnte.

Ich sättigte deshalb entweder die Milch direkt mit Magnesiumsulfat oder fällte zuerst das Casein mit Kochsalz, darauf das Globulin mit Magnesiumsulfat. Das in solcher Weise erhaltene, vollständig casein- und globulinfreie, aber mit Salz gesättigte Filtrat wurde alsdann mit Essigsäure gefällt, wodurch immer eine reichliche weisse Fällung entstand. Nach Hammarsten verträgt eine Serumalbuminlösung bis 1% Essigsäure ohne eine Veränderung zu erleiden²⁾: ich habe gewöhnlich $\frac{1}{4}$ % Essigsäure angewendet und eine vollständige Fällung damit erhalten. Bei Anwendung von 0,075—0,20% Säure erhielt ich dagegen immer mehr Fällung, wenn ich zum Filtrate mehr Säure zusetzte. Es scheint, als wenn die zum Hervorrufen des Niederschlages und dessen

¹⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. VIII. S. 496.

²⁾ Johansson hat gefunden, dass man ohne Gefahr sogar bis 2% Essigsäure in der mit Salz gesättigten Albuminlösung gehen kann (Upsala läkareförenings förhandlingar XX. 1885. p. 101. — Zeitschrift für physiologische Chemie, X.).

vollständigen Ausfällung nothwendige Säurequantität etwas abhängig ist von der Concentration der Lösung. Während ich nämlich bei der Behandlung von gewöhnlicher süsser Milch in beschriebener Weise immer eine (wenn auch unvollständige) Fällung mit 0,1 % Essigsäure bekam, so müsste ich bei einem Versuche mit Colostrum 0,2 % Essigsäure zusetzen, ehe der Niederschlag sich zu zeigen anfing, und bei einem Gehalte von 0,25 % Säure war die Fällung noch sehr unvollständig; nach Zusatz von 0,5 % Säure wurde dagegen nichts mehr gefällt. Uebrigens zeigten sich die Eigenschaften des Niederschlages ganz gleich, ob man zur Fällung mehr oder weniger Säure, innerhalb der angeführten Grenzen, benutzt hat.

Der ausgeschiedene Niederschlag, der eine gelatinöse Consistenz zeigte, wurde auf Filtern gesammelt und nach hinreichendem Abtropfen zwischen Filtrirpapier gepresst, um von Mutterlauge befreit zu werden. Es wurde dann der Niederschlag nebst Filter in wenig Wasser aufgeweicht, genau mit Natronlauge neutralisirt, und die so erhaltene Lösung gab, wenn sie nach dem Filtriren auf's Neue mit Magnesiumsulfat gesättigt wurde, nur selten weitere Fällung. Indessen wurden immer 1—2 Reinigungen des Lactalbumins vorgenommen, indem die erhaltene Lösung mit Magnesiumsulfat gesättigt wurde und darauf mit $\frac{1}{4}$ % Essigsäure gefällt wie oben. Bei dieser zweiten und dritten Fällung zeigte es sich, dass $\frac{1}{4}$ % Säure immer zur vollständigen Fällung hinreichte.

Es wurde endlich der Niederschlag in einer minimalen Menge Wasser gelöst und darauf einer kräftigen Dialyse in den von Kühne empfohlenen künstlichen Wursthäuten aus Pergamentpapier unterworfen. Zuerst wurde gegen Wasserleitungswasser, darauf gegen destillirtes Wasser dialysirt. Wenn die Flüssigkeit bei der Dialyse sehr verdünnt wurde, concentrirte ich sie bei 30—40° C. auf Uhrgläsern und setzte darauf wieder die Dialyse fort. Die so erhaltene, möglichst salzfreie Lösung von Lactalbumin wurde nun theils direkt zur Untersuchung benutzt, theils mit einem grossen Ueberschusse von starkem Alkohol gefällt, der Niederschlag rasch

filtrirt und gewaschen zuerst mit starkem Alkohol, darauf mit Aether. Nach gehörigem Pressen, Feinreiben und Trocknen der Fällung erhält man alsdann das Lactalbumin als ein feines, weisses Pulver, welches sich bei umsichtsvoller Arbeit als vollständig löslich in Wasser zeigt.

Eine Lösung von reinem Lactalbumin gab keine Spur von Niederschlag durch Sättigung mit Magnesiumsulfat bei 40°, auch nicht mit Natriumsulfat bei gewöhnlicher Temperatur, dagegen wohl, wenn man mit diesem Salze bei 30° sättigt. Ammoniumsulfat in Substanz fällt den Körper bei gewöhnlicher Temperatur. Eine Spur von Essigsäure rief keinen Niederschlag in der salzarmen Lösung bei gewöhnlicher Temperatur hervor; dagegen coagulirte sie reichlich beim Kochen mit einer Spur von Essigsäure.

Die Coagulationstemperatur wurde bestimmt sowohl für eine möglichst salzfreie Lösung durch Dialyse erhalten, wie für diese Lösung nach Zusatz von Kochsalz. Es zeigte sich hierbei eine Steigerung der Coagulationstemperatur mit steigendem Kochsalzgehalte. Die dialysirte Lösung enthielt 2—3% Albumin und ca. 0,06% Asche, und die Coagulation trat in diesem Falle bei ca. 72° C. ein, nachdem die Flüssigkeit schon bei ca. 62—67° C. stark opalisirend war.

1. Die Lösung enthielt 3,3% Lactalbumin und 0,065% Aschenbestandtheile. Sie wurde bei 67° C. opalisirend, coagulirte bei 72° C. Nach Zusatz von so viel Kochsalzlösung, dass die Mischung 0,5% Salz enthielt, trat die Opalescenz bei 70° C., die Coagulation bei 72° C. ein, und bei einem Kochsalzgehalte von 5% fanden sowohl die Opalescenz, wie die Coagulation sich erst bei 78° C. ein.
2. Die Lösung enthielt 2,2% Lactalbumin und 0,015% Aschenbestandtheile. Sie wurde in zwei Portionen getheilt, von denen die eine mit 2,5%, die andere mit 5% Kochsalz gemischt wurde. Beim Erhitzen fing erstere bei 70° zu opalisiren an, letztere bei 80°, während die Coagulation bei 80°, bezw. 84° stattfand.

Das Resultat lässt sich in folgender Zusammenstellung ersehen:

	salzfrei	0,5% Salz	2,5% Salz	5% Salz
1. { opalescirend . . .	67°	78°	—	—
{ coagulirend . . .	72°	78°	—	—
2. { opalescirend . . .	—	—	70°	80°
{ coagulirend . . .	—	—	80°	84°

Sämmtliche genannten Verhältnisse stimmen ganz mit dem überein, was **Starke**¹⁾ beim Untersuchen des Serumalbumins fand. Um desto mehr auffallend war das Resultat, welches ich beim Bestimmen des optischen Drehungsvermögens des Lactalbumins erhielt. Es wurde hierbei ein **Wild'sches** Polariskop benutzt und die Ablesungen geschahen bei Natriumlicht 5—10mal in jedem der drei Quadranten (indem der 4. Quadrant des Apparats ungenaue Resultate gab).

	Trocken- rückstand in 10 cem.	Hiervon Glühungs- rückstand.	Röhren- länge.	Durchschnittswerthe der Ablesungen in jedem der drei Quadranten.			$[\alpha]_D$
a.	0,220 gr.	0,0015 gr.	20 cm.	÷ 1,60°	÷ 1,56°	÷ 1,66°	÷ 36,6°
b.	0,332 «	0,0065 «	20 «	÷ 2,40°	÷ 2,40°	÷ 2,30°	÷ 36,4°
c.	0,423 «	0,012 «	10 «	÷ 1,57°	÷ 1,50°	÷ 1,48°	÷ 36,98°

a ist ein Lactalbumin aus Colostrum dargestellt, b und c rühren von normaler Milch her.

Nach den angestellten Versuchen würde also das specifice Drehungsvermögen des Lactalbumins ca. ÷ 37° betragen.

Da **Starke** (l. cit.) aber für Serumalbumin verschiedener Abstammung $[\alpha]_D$ zwischen ÷ 60° und ÷ 64° liegend fand, kam mir mein Resultat ziemlich auffallend vor. Die für gewöhnlich angenommene Identität zwischen dem Serumalbumin und dem Lactalbumin schien hierdurch nicht bestätigt zu werden. Es lässt sich nun zwar einwenden, dass das von mir untersuchte Lactalbumin von Kuhmilch herrührt, wogegen das von **Starke** untersuchte Serumalbumin theils aus Hydroceleflüssigkeit, theils aus Ascitesflüssigkeit, theils aus Pferdeblutserum, dagegen nicht aus Rindsblutserum dargestellt war; und es lässt sich ja denken, dass das Serumalbumin im Rindsblut mit dem im Pferdeblute nicht ganz identisch sei, namentlich, da nach **Frédéricq**²⁾ das Serumalbumin im Hundeblood ein bedeutend geringeres Drehungsvermögen als dasjenige von anderen Blutsorten besitzen soll. Indessen hat auch **Frédéricq**³⁾ Bestimmungen von $[\alpha]_D$ des

1) Upsala läkareförenings förhandlingar, Vol. XVI, p. 620; **Maly's** Jahresbericht 1881.

2) Archiv de biologie, Vol. II, 1881.

3) Ibid., Vol. I, 1880.

Serumalbumins in Rindsblutserum vorgenommen, und giebt er diese Grösse als zwischen $\div 55^\circ$ und $\div 56^\circ$ liegend an. Wenn man nun auch annimmt, dass die Präparate Frédéricq's stark von Paraglobulin verunreinigt gewesen sind, wozu die von ihm benutzte Darstellungsweise wohl berechtigt, so folgt doch hieraus, dass der Werth von $[\alpha]_D$ für das Serumalbumin in Rindsblutserum sich $\div 60^\circ$ nähern muss, weil das Paraglobulin mit seinem specifischen Drehungsvermögen von $\div 48^\circ$ das Drehungsvermögen des Serumalbumins nur verringern kann.

Eine wesentlichere Einwendung würde dagegen diese sein, dass das Lactalbumin in Folge seiner Darstellungsweise durch die wiederholte Ausfällung mittelst Säure möglicherweise eine Veränderung erleidet. Obgleich dies nicht wahrscheinlich ist, indem das Drehungsvermögen der Albuminkörper durch die Bildung von Acidalbumin eben vergrössert wird¹⁾, und die Acidalbuminate ausserdem in neutralen Salzlösungen nicht löslich sind, und deshalb bei der Neutralisirung der Flüssigkeit und dessen Sättigung mit Magnesiumsulfat ausgefällt werden würden, so schien es mir doch nothwendig, einen Controlversuch anzustellen und zwar um desto mehr, als das von Starke beschriebene Serumalbumin ohne Anwendung von Säure dargestellt war.

Ich stellte deshalb ein Lactalbumin dar, ganz analog mit dem Serumalbumin Starke's, wobei jede denkbare Veränderung mittelst Säure vermieden wurde. Nach dem Fällen der Milch mit Magnesiumsulfat wurde das Filtrat bei 40° C. mit fein gepulvertem Natriumsulfat gesättigt. Der hierdurch erhaltene Niederschlag wurde bei 40° C. abfiltrirt und in Wasser gelöst; diese Lösung wurde abermals mit Magnesiumsulfat gesättigt und wie oben behandelt. Die wässrige Lösung des in dieser Weise mittelst Natriumsulfat in der Wärme gefällten Lactalbumin wurde alsdann kräftig dialysirt und schien danach ganz dieselben Eigenschaften zu be-

1) Cfr. Hoppe-Seyler: Handbuch der physiologisch-chemischen Analyse, 5. Aufl., S. 269.

sitzen als wenn es durch Fällen mit Essigsäure aus der gesättigten Salzlösung erhalten war.

Die Bestimmung der Coagulationstemperatur ergab:

	salzfrei	0,5% Salz	5% Salz
opalescirend .	62°	67°	80°
coagulirend .	72°	77°	84°

Dieselbe Lösung wurde zur Bestimmung des specifischen Drehungsvermögens, mit folgendem Resultate benutzt:

Trockenrückstand in 10 ccm.	Hiervon Glühungsrückstand.	Röhrenlänge.	Durchschnittswerthe der Ablesungen in jedem der drei Quadranten.			$[\alpha]_D$
0,312 gr.	0,007 gr.	20 cm.	÷ 2,33°	÷ 2,35°	÷ 2,27°	÷ 38,0°

welches wohl hinreichend übereinstimmend mit den vorigen Bestimmungen ist, um zu zeigen, dass das Lactalbumin bei der Ausfällung mittelst Säure keine Veränderung erlitten hat.

Da noch die Möglichkeit denkbar war, es liesse sich der geringe Werth des specifischen Drehungsvermögens des Lactalbumins durch eine Verunreinigung mit dem rechtsdrehenden Milchzucker erklären, wurde die erhaltene Lösung durch Kochen mit Natron und ein wenig Kupfersulfat geprüft, aber selbst nach Stehen bis zum nächsten Tag zeigte sich keine Spur von Reduktion.

Zum ferneren Vergleich wurde noch eine reine Serumalbuminlösung aus Rindsblutserum nach der von Starke benutzten Methode unter ausschliesslicher Anwendung von Neutralsalz, dargestellt. Nach dem Entfernen der Salze mittelst Dialyse wurde das specifische Drehungsvermögen bestimmt (I). Die hierzu benutzte Lösung wurde darauf wieder mit Magnesiumsulfat gesättigt und mit 0,25% Essigsäure gefällt, worauf der Niederschlag abfiltrirt, gepresst, in Wasser gelöst, neutralisirt und durch Dialyse von Salz befreit wurde. Die Lösung wurde danach im Polariskop untersucht (II).

	Trockenrückstand in 10 ccm.	Hieraus Glühungsrückstand.	Röhrenlänge.	Durchschnittswerthe der Ablesungen in jedem der drei Quadranten.			$[\alpha]_D$
I.	0,207 gr.	0,003 gr.	10 cm.	÷ 1,28°	÷ 1,24°	÷ 1,28°	÷ 62,6°
II.	0,2345 "	0,0015 "	10 "	÷ 1,41°	÷ 1,40°	÷ 1,40°	÷ 60,1°

Es kann somit keinem Zweifel länger unterliegen, dass das Lactalbumin wirklich ein bedeutend geringeres specifisches Drehungsvermögen als das Serumalbumin besitzt, und dass letzteres also ebensowenig wie die meisten übrigen Blutbestandtheile in die Milch unverändert übertritt, sondern in den Milchdrüsen eine wesentliche Umänderung erleidet.

Mit Hinsicht auf die Ansicht von Duclaux¹⁾, nach welcher sämtliche Eiweisskörper der Milch und namentlich das Lactalbumin nur als Caseinmodifikationen zu betrachten sind, indem sie nur durch verschiedene Löslichkeit und ähnliche physikalischen Eigenschaften von einander verschieden seien, mag es einige Berechtigung haben, das Casein und das Lactalbumin mit einander etwas zu vergleichen. Hat Duclaux Recht, so müssen die beiden genannten Körper nämlich die gleiche elementare Zusammensetzung haben.

Das zur Analyse verwendete Lactalbumin wurde mehrmals mit Alkohol ausgekocht, um von einem möglichen Gehalt von etwas Lecithin befreit zu werden.

0,3545 gr. Substanz hinterliess 0,004 gr. Asche, d. h.	1,13%
und gaben 0,6745 gr. CO ₂ , d. h. auf aschefreie Substanz berechnet	52,19% C,
nebst 0,2265 gr. H ₂ O, d. h.	7,18% H.
0,337 gr. Substanz gaben 43,3 ccm. N bei 4,50 C. und 750 mm. gemessen, d. h. in aschefreier Substanz	15,77% N
1,135 gr. Substanz gaben 0,141 gr. BaSO ₄ , d. h. 1,71% S oder in aschefreier Substanz	1,73% S.
nebst 0,0075 gr. Mg ₂ P ₂ O ₇ , d. h. 0,18% P.	

Wenn man ihm auch keine grössere Bedeutung beilegen wird, so ist es doch bemerkenswerth, dass der Kohlenstoffgehalt in reinem Casein im Mittelwerth 53% ist, nie aber so tief hinuntergeht, wie hier für Lactalbumin gefunden.

¹⁾ In einer Abhandlung: «Ueber die Eiweisskörper der Milch» in «Mittheilungen der amtlichen Lebensmittel-Untersuchungs-Anstalt zu Wiesbaden, 1884» kommt Pfeiffer zu einem ähnlichen Resultat wie Duclaux, indem er zwischen einem a-, b-, c- und d-Casein unterscheidet und sämtliche Eiweisskörper der Milch zu diesen Modificationen hinrechnet. Seine Resultate entbehren jedoch aller wissenschaftlichen Begründung und möchten durch das Vorliegende hinreichend entgegnet sein.

Grösseres Interesse bieten dagegen die Bestimmungen von Schwefel und Phosphor.¹⁾ Sie wurden nach der von Hammarsten¹⁾ angegebenen Methode ausgeführt durch Zersetzung der Substanz mit Salpetersäure, Eindampfen zur Trockne, Zusatz von Ueberschuss an reiner (d. h. schwefelsäurefreier) Soda und nach nochmaligem Eintrocknen Vollendung der Oxydation durch Erhitzen unter Zusatz von wenig Salpeter. In der oxydirten Masse wurde die Schwefelsäure als Baryumsalz bestimmt unter Beachtung aller Vorsichtsmassregeln, und im Filtrate vom Baryumsulfat wurde der Ueberschuss an Chlorbaryum durch Magnesiumsulfat gefällt, und im neuen Filtrat nach dessen Uebersättigung mit Ammoniak die Phosphorsäure als Magnesium-Ammoniumphosphat gefällt. Dieser Niederschlag wurde abermals in wenig Salpetersäure gelöst, mit Molybdänflüssigkeit nach gewöhnlichen Regeln gefällt und endlich der Phosphor als Magnesiumsalz bestimmt.

Da der geringe Gehalt an Schwefel (0,7—0,8%) im Casein keinem Zweifel länger unterliegen kann²⁾, findet sich hier ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Haupt-Eiweisskörpern der Milch. Man wird vielleicht einwenden, dass der Gehalt des Lactalbumins an Schwefel zu hoch gefunden sei, weil bei der Darstellung des Körpers fast ausschliesslich Sulfate angewendet sind, die bei der Dialyse nicht vollständig wieder entfernt wurden. Hierauf werden wir jedoch antworten, dass sowohl bei der analysirten Substanz, wie bei mehreren anderen Präparaten, die (stets alkalisch reagirende) Asche qualitativ untersucht wurde, wobei es sich ergab, dass sie nur eine sehr geringe Spur von Schwefelsäure enthielt, dagegen überwiegend aus Kalk und Phosphorsäure bestand. Selbst wenn wir aber annehmen, dass die ganze Aschenmenge nur aus Magnesiumsulfat bestände, so würde dies bewirken, dass der Schwefelgehalt des Lactalbumins auf 1,41% hinunterging, also noch ungefähr doppelt so hoch, wie im Casein.

¹⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. VII, S. 257 u. ff.

²⁾ Ebendaselbst, Bd. IX, S. 274.

Ein anderes Präparat von etwas geringerer Reinheit (mit 2,6% Asche) gab mir aus 0,757 gr. Substanz 0,103 gr. BaSO_4 , d. h. berechnet auf aschefreie Substanz 1,96% S, oder wenn sämtliche Asche als Magnesiumsulfat gerechnet wird, 1,58% S.

Durch seinen verhältnissmässig hohen Schwefelgehalt schliesst das Lactalbumin sich sowohl dem Serumalbumin, als dem Ovalbumin¹⁾ an, während es in dieser Beziehung vom Casein verschieden ist.

Der geringe Phosphorgehalt deutet ebenfalls auf einen Unterschied des Caseins hin, welches letztere 0,8% Phosphor enthält. Die eigentlichen Albumine (Serum- und Ovalbumin) werden gewöhnlich als phosphorfrei betrachtet. Es wird wohl auch am richtigsten sein, die im Lactalbumin bestimmte kleine Phosphormenge als von einer geringen Verunreinigung mit Phosphaten herrührend zu betrachten. Durch den ursprünglichen Gehalt der Milch an Calciumphosphat und durch die Schwierigkeit bei der Entfernung sämtlicher dieser Aschenbestandtheile, welche wir immer bei der Einäscherung des Körpers in sichtbarer Menge nachweisen konnten, wird diese Annahme in hohem Grade wahrscheinlich gemacht. Berechnen wir die ganze Aschenmenge im genannten reinen Präparat als $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$, so werden wir finden, dass 1,3% Asche, d. h. 13 mgr. 2,6 mgr. Phosphor enthalten sollen, während bei der Analyse 2,1 mgr. gefunden wurden. Dies stimmt darin überein, dass sich in der Asche nur eine geringe Spur von Schwefelsäure nachweisen liess.

Das ebenfalls oben berührte weniger reine Präparat gab bei der Analyse von 0,757 gr. Substanz 0,005 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, d. h. 1,4 mgr. P, oder 0,16% Phosphor. In diesem Falle würden die 2,6%, d. h. 20 mgr. Asche als $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ berechnet, 4 mgr. Phosphorsäure erfordern, also etwas mehr wie bei der Analyse gefunden; in diesem Falle zeigte sich aber auch die qualitative Reaction der Schwefelsäure in der Asche scheinbar stärker als oben.

1) Starke: L. cit.

Noch ist zu bemerken, dass nachdem sämtliche bekannte phosphorhaltige Eiweisskörper als Nucleoalbumine zu betrachten sind, wäre es zu erwarten, dass auch das Lactalbumin, falls es den Phosphor als wesentlichen Bestandtheil enthielt, sich als ein Nucleoalbumin verhalten würde. Indessen wurde eine schwach salzsaure Lactalbuminlösung während 24 Stunden bei 40° C. mit einem stark pepsinhaltigen Glycerinextract von Hühnermagen digerirt, ohne dass sich eine Ausscheidung von Nuclein wahrnehmen liess.

Wird die vorliegende Elementaranalyse mit den früheren von Musso und Menozzi und von Engling verglichen, dann findet man einen bedeutenden Unterschied.

	Musso und Menozzi.	Engling.		Sebelien.
		norm. Milch.	Colostrum.	
C	53,74	54,25	54,68—53,3	52,19
H	5,95	7,19	7,16— 7,5	7,18
N	15,52	14,76	15,43—15,2	15,77
S	1,55	1,33	1,18— 1,1	1,73

Leider sehe ich mich nicht im Stande, bis jetzt mehr als die eine vollständige Analyse von reinem Stoffe mitzutheilen (eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl's Methode mit einer weniger reinen Substanz ausgeführt ergab 15,66% N), aber die Bestimmungen sind mit der grössten Sorgfalt ausgeführt worden, so dass die Abweichungen von den früheren Analysen kaum in analytischen Fehlern zu suchen sind. Wie schon berührt, sind aber auch die früheren als Lactalbumin bezeichneten Körper mit dem jetzt beschriebenen nicht unmittelbar vergleichbar. Inwiefern die hohen Angaben vom Kohlenstoffgehalte und die niedrigen Angaben vom Stickstoff- und Schwefelgehalte der älteren (übrigens unter sich ziemlich differirenden) Analysen ausser von der Verunreinigung des aus den Molken direct coagulirten Albumins mit fremden Bestandtheilen, auch daher rühren mögen, dass das coagulirte Albumin wirklich eine andere elementare Zusammen-

setzung als das nicht coagulierte besitzt, vermag ich noch nicht abzumachen.

Die genannten drei fremden Forscher haben sich bei der Bestimmung vom Kohlen- und Wasserstoff der Verbrennung mit Bleichromat bedient, wogegen ich mit Kupferoxyd im Sauerstoffgasstrom verbrannte. Wäre indessen hierbei etwas schweflige Säure gebildet, welche in den Absorptionsröhren in meinem Versuche zurückgeblieben wäre, so würde die Abweichung meiner Analyse gerade in entgegengesetzter Richtung stattgefunden haben.

Den möglichen Unterschied bezüglich der elementaren Zusammensetzung zwischen dem Lactalbumin der normalen Milch und des Colostrums habe ich nicht untersucht, weil die Präparate sich in optischer Hinsicht gleich erwiesen; immerhin ist es ja deshalb nicht unmöglich, dass ein solcher Unterschied existiren kann¹⁾.

Zum Schluss erlaube ich mir noch Herrn Prof. Hammarsten meinen aufrichtigen Dank zu bringen, für die grosse Liberalität, womit er sein Laboratorium zu meiner Verfügung gestellt hat, sowie überhaupt für seine vielfache und freundliche Unterstützung und seinen erfahrenen Rath, der mir während meiner Arbeit zu Theil wurde.

¹⁾ In diesem Zusammenhange kann ich anführen, dass ich im Casein von Colostrum 15,70% N, 0,73% S und 0,72% P gefunden habe, also mit der Zusammensetzung des Caseins der normalen Milch ganz übereinstimmend.