

# Ueber das Verhalten des Paracaseïns zu dem Labenzyme.

Von

**Olof Hammarsten.**

(Der Redaction zugegangen am 1. April 1896.)

In einer, vor etwa zwei Jahren erschienenen Abhandlung<sup>1)</sup> hat R. Peters einige von ihm ausgeführte Untersuchungen über Lab und labähnliche Fermente mitgetheilt. In diesem Aufsätze bespricht er unter Anderem auch die Frage von der Anzahl der verschiedenen, in der Kuhmilch vorkommenden Eiweissstoffe, wie auch die Frage von dem chemischen Vorgange bei der Gerinnung des Caseïns mit Lab. In diesen beiden Fragen hat er eine von der gang und gäben Ansicht abweichende Meinung geäußert und er hat namentlich gegen meine, vor vielen Jahren ausgeführten Untersuchungen Einwände erhoben. Dies war für mich die Veranlassung, die hier unten mitzutheilenden Untersuchungen über diesen Gegenstand auszuführen.

Hinsichtlich der Anzahl der in der Milch vorkommenden Eiweissstoffe glaubt Peters zeigen zu können, dass in der Kuhmilch nur ein Eiweissstoff, nämlich das Caseïn oder Caseïnogen<sup>2)</sup> — wie er ihn nennt — vorhanden sei.

<sup>1)</sup> R. Peters, Untersuchungen über das Lab und die labähnlichen Fermente (von der med. Facultät der Universität Rostock preisgekürzte Schrift). Rostock 1894.

<sup>2)</sup> Dem Vorschlage, das in der Milch «Caseïnogen» zu nennen, kann ich nicht beitreten. Dieser Vorschlag hat nämlich nur dann einen Sinn, wenn man den Käse Caseïn nennt, ganz so, wie man das Umwandlungsproduct des Fibrinogens Fibrin nennt. Es ist aber nicht schwierig zu verstehen, zu welcher Verwirrung es führen muss, wenn einige Forscher unter dem Namen Caseïn den Käse und andere die Muttersubstanz desselben verstehen. Aus diesem Grunde ziehe ich die Namen Caseïn und Paracaseïn vor.

Ich finde es nicht nöthig, auf diese Frage des Näheren einzugehen, denn die sehr bedeutenden chemischen Unterschiede, die zwischen Casein und Lactalbumin bestehen, sind ja allgemein bekannt, und jeder Fachmann wird übrigens sogleich finden, dass die Beweisführung Peters' in diesem Punkte nicht bindend ist. Ich wende mich deshalb sogleich zu der zwischen Peters und mir bestehenden Differenz hinsichtlich der Einwirkung von Lab auf Paracasein.

Peters glaubt bewiesen zu haben, dass das Paracasein, wenn es in möglichst wenig Kalkwasser gelöst wird, nach Zusatz von Lab wieder gerinnt. Das neue Gerinnsel, in Kalkwasser gelöst, kann wiederum nach Labzusatz gerinnen, und diese Procedur konnte Peters sogar viermal hintereinander wiederholen. Jedesmal soll dabei eine Spaltung stattgefunden haben. In diesem Punkte besteht nun allerdings ein scharfer Widerspruch zwischen Peters und mir, denn ich habe stets als den wesentlichsten und wichtigsten Unterschied zwischen Casein und Paracasein die Unfähigkeit des letzteren mit Lab zu gerinnen bezeichnet. Diese Anschauung war auch, wenn ich nicht irre, bisher allgemein als richtig anerkannt worden.

Da nun Peters behauptet, diese Ansicht widerlegt zu haben, musste ich diese Frage von Neuem unter genauer Berücksichtigung der von Peters ausgeführten Versuche prüfen. Ich stiess indessen hierbei sogleich auf die Schwierigkeit, dass Peters eigentlich nur einen einzigen, etwas ausführlicher beschriebenen Versuch über die Einwirkung von Lab auf eine Lösung von Paracasein in Kalkwasser als Beispiel mitgetheilt hat, und in diesem Versuche fehlen fast alle nöthigen Detailangaben. Es finden sich also keine Angaben über den Gehalt der verwendeten Lösung an Paracasein, über die relativen Mengen der Paracaseinlösung und der Labflüssigkeit, über die Zeit, innerhalb welcher die Coagulation stattfand, und keine genauen Angaben über das Aussehen des Coagels. Es fehlen auch die nöthigen Angaben über die Beschaffenheit der verwendeten Labflüssigkeit. Peters hat zu allen seinen Versuchen eine «Labessenz» von Witte

in Rostock verwendet. Der Haltbarkeit wegen hatte diese Essenz eine saure Reaction; sie wurde aber immer vor dem Benutzen genau neutralisirt.

Die käuflichen Labflüssigkeiten enthalten regelmässig verschiedene Zusätze, die man im Interesse der Haltbarkeit gemacht hat. Einer der gewöhnlichsten dieser Zusätze dürfte wohl das Kochsalz sein, wenigstens habe ich dasselbe in keiner von mir untersuchten käuflichen Labflüssigkeit vermisst. Da nun ferner, wie ich seit vielen Jahren weiss, dass Kochsalz in hohem Grade die Fähigkeit hat, Paracaseinkalklösungen in der Wärme zu fällen, war es für mich von grossem Interesse, zu erfahren, ob die Witte'sche Labessenz Kochsalz enthielt oder nicht. Zu dem Ende habe ich auch von Herrn Witte in Rostock zwei Flaschen seiner Labessenz gekauft. Bei der Analyse dieser Labessenz fand ich für dieselbe im Durchschnitt folgende Zusammensetzung: feste Stoffe 14,33%; organische Stoffe 1,825%, Chloride, als NaCl berechnet, 11,58%; übrige lösliche Salze 0,795%; in Wasser unlösliche Salze 0,130%.

Die von Peters benutzte Labessenz war also reich an Salz, und hierin liegt ein wesentlicher Unterschied zwischen der von ihm befolgten Versuchsanordnung und der meinigen. Bei meinen älteren Versuchen hatte ich nämlich fast ganz salzfreie Lösungen von Lab verwendet<sup>1)</sup>. Von welcher grosser Bedeutung dieser Unterschied in der That ist, wird aus dem Folgenden deutlich hervorgehen. Hier will ich nur bemerken, dass ich in den hier unten besprochenen, neuen Untersuchungen des Vergleiches halber theils mit der salzhaltigen Witte'schen Labessenz und theils mit einer fast salzfreien Lablösung gearbeitet habe. Diese letztere wurde aus einem käuflichen, sehr kräftig wirkenden Präparate («Ostlöpeextract» von Barnekow in Malmö, Schweden) durch kräftige Dialyse

<sup>1)</sup> In den allermeisten Fällen verwendete ich ein Glycerinextract auf Kalbsmagen. Ein Tropfen dieses Extractes war genügend, um 100 chem. Milch bei 40° C. innerhalb einiger Minuten zur Gerinnung zu bringen. Vor dem Gebrauche wurde das Extract mit passenden Mengen Wasser verdünnt.

gewonnen. In einigen Fällen wurde die Lösung ganz einfach so stark mit Wasser verdünnt, dass die Wirkung des Salzes wegfiel. Diese salzfreien oder nur sehr kleine Mengen von Mineralstoffen enthaltenden Lablösungen, welche regelmässig weniger als 0,05% organischer Substanz enthielten, wirkten auf Milch im Allgemeinen viel kräftiger als die Witte'sche Labessenz.

Wie oben bemerkt, hat Peters eigentlich nur einen Versuch<sup>1)</sup> über die Einwirkung des Labfermentes auf eine Lösung von Paracasein in Kalkwasser mitgetheilt. In diesem Versuche berichtet er auch über die Darstellungsweise des Paracaseins. Aus einem, mit einem Liter Wasser verdünnten Liter Milch wurde das Paracasein durch Lab ausgefällt, das Gerinnsel abfiltrirt und mehrfach gewaschen. Darauf wurde es in einer schwachen Sodalösung aufgelöst und filtrirt. Das Filtrat wurde mit verdünnter Essigsäure gefällt, und dieses Verfahren wurde im Ganzen dreimal wiederholt. Zuletzt wurde die Substanz in möglichst wenig Kalkwasser gelöst. Nach Zusatz von Lab gab dann diese Lösung «eine starke Fällung» (und also kein Gerinnsel wie die Milch oder eine Caseinlösung von passender Concentration).

Peters hat also zu seinen Versuchen, wie es scheint, nicht das mit Alkohol und Aether gereinigte, trockene Paracasein, sondern nur die feuchte Masse benutzt. Meine ersten Versuche stellte ich dagegen mit trockenem, mit Alkohol und Aether gereinigtem Paracasein dar, und diese Versuche gaben bei Anwendung von salzfreiem Lab ohne Ausnahme negative Resultate. Das so gereinigte Paracasein ist indessen ziemlich schwerlöslich, und ich konnte mit demselben (ohne Anwendung von einem zu vermeidenden Ueberschusse des Lösungsmittels) keine Lösungen von stärkerer Concentration erhalten. Die mit solchem Paracasein erhaltenen negativen Resultate waren also wenig beweiskräftig, und aus diesem Grunde habe ich

<sup>1)</sup> Strenge genommen ist dies nicht ganz richtig, denn es kommen hierzu die noch unvollständiger beschriebenen Versuche 20 und 21. Jener ist aber eigentlich nur ein Controllversuch über die Wirkung der Wärme allein und dieser ist ein Versuch mit gekochtem Paracasein.

auch später nur mit dem feuchten, mit Alkohol und Aether nicht behandelten Paracasein gearbeitet. Hierdurch werden auch unsere Versuche völlig vergleichbar.

Bei der Darstellung des Paracaseins nach dem von Peters geübten Verfahren stösst man indessen auf die Schwierigkeit, dass der aus der Milch mit Lab ausgefällte, kalkreiche Käse in sehr verdünnter Sodalösung nicht leicht löslich ist. Ein Ueberschuss an Soda ist aber strenge zu vermeiden, indem nämlich sowohl das Casein wie das Paracasein gegen die Einwirkung von selbst sehr kleinen Alkalimengen empfindlich ist. Aus diesem Grunde wagte ich auch nicht, den Käse durch Zusatz von Sodalösung vollständig aufzulösen, sondern verfuhr stets so, dass der grösste Theil des sehr fein zerriebenen Käses ungelöst zurückblieb. Der Verlust an Material, den man hierdurch erleidet, ist bei einem so wohlfeilen Rohmaterial wie der Milch natürlich ohne Belang.

Da ich aber fortwährend gewisse Bedenken gegen die Anwendung von Soda als Lösungsmittel für das Paracasein trug, stand ich allmählig von dem Gebrauche von diesem Lösungsmittel ab und wandte statt deren ammoniakhaltiges Wasser, welches von mehreren Forschern als geeignetes Lösungsmittel bei der Caseindarstellung empfohlen worden ist, an. In den meisten Versuchen habe ich desshalb auch den aus der Milch durch Labzusatz gewonnenen, sehr fein zerriebenen und mit Wasser genau gewaschenen Käse mit Wasser, welches 0,02—0,04%  $\text{NH}_3$  enthielt, behandelt, und zwar so, dass stets eine bedeutende Menge des Käses ungelöst zurückblieb. In dieser Weise erleidet man zwar recht grosse Verluste an Material; man kann aber andererseits auch ganz sicher sein, dass keine Veränderung des Paracaseins durch Alkalieinwirkung stattgefunden hat. Aus dem nach der Behandlung des Käses mit ammoniakhaltigem Wasser erhaltenen Filtrate schlägt man das Paracasein mit Essigsäure nieder, und wenn es einmal in dieser Weise von den grossen Kalksalzmengen des Käses befreit worden ist, lässt es sich dann leicht weiter reinigen durch wiederholtes Auflösen in Ammoniakwasser und Ausfällen mit Essigsäure.

Das Paracasein ist eine, wie wir weiter unten finden werden, in der Wärme allmählig sich verändernde Substanz, und man kann deshalb auch nicht ohne Weiteres die Möglichkeit ausschliessen, dass das unter verschiedenen äusseren Bedingungen entstandene Paracasein etwas verschiedene Eigenschaften haben könne. Es wäre möglich, dass ein durch kräftige Labwirkung im Laufe von ein paar Minuten gebildetes Paracasein andere Eigenschaften als ein durch schwache Labwirkung erst nach längerer Zeit ausgeschiedenes Präparat haben könnte, und vor Allem wäre es möglich, dass das bei Gegenwart von Kalksalzen gebildete Paracasein in gewissen Hinsichten anders als das bei Abwesenheit von solchen Salzen entstandene Paracasein sich verhielte.

Aus diesem Grunde habe ich auch das bei Abwesenheit von Kalksalzen gebildete Paracasein hinsichtlich dessen Verhalten zu Lab geprüft. Es dürfte wohl allgemein bekannt sein, dass eine neutrale Lösung von Caseinalkali mit Lab kein Gerinnsel gibt, dass aber trotzdem die Bildung von Paracasein aus dem Casein auch in diesem Falle sehr leicht und rasch von Statten geht. Von diesem Verhalten ausgehend, habe ich auch Paracasein aus Caseinalkali durch Einwirkung von Lab dargestellt. Ich verfuhr dabei in folgender Weise. Ich löste reines Casein in Wasser mit Hilfe von so wenig Alkali, dass die Lösung neutral oder, richtiger, äusserst schwach sauer reagirte. Diese filtrirte Lösung wurde dann in zwei Theile getheilt, von denen der eine mit einer kräftigen Lablösung und der andere mit ebensoviel Wasser versetzt wurde. Dann wurde bei Körpertemperatur einige Zeit, höchstens zwei Stunden, digerirt. Nach dem Erkalten wurden dann beide mit Essigsäure gefällt und darauf wie gewöhnlich bei der Darstellung des Caseins (bezw. des Paracaseins) verfahren. Die ohne Labzusatz digerirte Probe diente selbstverständlich nur als Controlle. Da nämlich sämtliche mit so gewonnenem Paracasein und salzfreiem Lab ausgeführten Versuche ein negatives Ergebniss gaben, war es nothwendig, zu prüfen, ob nicht etwa das Erwärmen allein das Casein derart verändert hätte, dass es mit Lab nicht gerinnen konnte, in

welchem Falle das negative Resultat der Paracaseinversuche nicht beweiskräftig wäre. Diese Controlversuche zeigten nun, dass das bei Körperwärme während der genannten Zeit ohne Lab digerirte Casein seine Eigenschaften nicht merkbar verändert hatte. Dieses Casein, in Wasser durch Zusatz von  $\text{CaCO}_3$  gelöst und mit löslichem Kalksalz versetzt, gerann mit Lab ganz so wie gewöhnliches Casein.

Das zu meinen Versuchen verwendete Paracasein ist also theils aus der Milch direct und theils aus einer Lösung von Caseinalkali, in beiden Fällen durch Einwirkung von Lab bei  $38-40^\circ \text{C}$ , dargestellt worden.

Für die Gerinnung des Caseins mit Lab ist bekanntlich die Gegenwart von Kalksalz in geeigneter Form ein unerlässliches Bedingniss. Das Kalksalz ist zwar nicht nothwendig für die Bildung des Paracaseins; für die Ausfällung des letzteren, d. h. also für die Coagulation, ist es aber nothwendig. Wenn man die Fähigkeit des Labfermentes, das Paracasein zu fällen, studiren will, muss also auch das Letztere in einer geeigneten, kalkhaltigen Lösung sich vorfinden.

Peters löst das Paracasein (wie das Casein) in möglichst wenig Kalkwasser, setzt Lab ohne Weiteres hinzu und erhält nun (wie es scheint regelmässig) eine Fällung. Dass dies ihm so leicht und ohne Weiteres gelungen ist, habe ich sehr auffallend gefunden. Man ist bekanntlich allgemein der Ansicht, dass die Gegenwart von löslichen Kalksalzen ein Bedingniss der Caseingerinnung mit Lab ist; und eine Lösung von reinem Casein in möglichst wenig Kalkwasser gerinnt auch mit einer reinen Lösung von Lab nicht. Die Bedeutung der löslichen Erdalkalisalze liegt auch, wie es scheint, darin, dass diese Salze die Löslichkeit des gebildeten Käses vermindern und also die Ausfällung desselben bewirken. Unter solchen Umständen muss man es sonderbar finden, dass es Peters gelungen ist, Lösungen sowohl des Caseins wie des Paracaseins in Kalkwasser ohne Zusatz von löslichem Kalksalz nur durch Zusatz von Labessenz allein regelmässig und ohne Schwierigkeit zum Gerinnen zu bringen.

Mir ist dies nicht gelungen. Alle meine Versuche, eine Lösung von Paracasein in Kalkwasser durch Zusatz von

salzfreien Lablösungen zum Gerinnen zu bringen, führten zu negativen Resultaten, d. h. eine Gerinnung fand in keinem Falle statt.

Man könnte hier vielleicht einwenden, dass ich nicht mit genügender Vorsicht gearbeitet und vielleicht ein wenig zu viel Kalkwasser zugesetzt hätte, da nämlich das Kalkwasser ebensowohl wie die Alkalien die Labgerinnung verhindern kann. Ich muss deshalb die Art und Weise, wie ich meine Paracaseïnkalklösungen bereitet habe, hier etwas ausführlicher angeben.

Zuerst versuchte ich, das Paracaseïn in Wasser mit Hilfe von reinem Calciumcarbonat in derselben Weise wie das Caseïn zu lösen. Dies ist nun in der That auch möglich, denn das Paracaseïn ist ebensowohl wie das Caseïn eine Säure; das Paracaseïn löst sich aber unter diesen Umständen viel schwerer und in nicht so reichlicher Menge wie das Caseïn, und aus diesem Grunde konnte ich nach diesem Verfahren keine hinreichend concentrirten Paracaseïnkalklösungen gewinnen. Ich stand deshalb allmählig von diesem Verfahren ab.

Folgendes Verfahren führte dagegen zu guten Resultaten. Das sehr genau ausgewaschene (mit Wasser wiederholt sehr fein zerriebene) Paracaseïn löste ich mit Hilfe von Kalkwasser, wobei ich darauf achtete, dass nie Kalkwasser im Ueberschuss vorhanden war, sondern stets ein Theil des Paracaseïns ungelöst zurückblieb. Die sehr stark milchig opalisirende Flüssigkeit behandelte ich dann mit einem Kohlensäurestrom, bis sie sehr schwach sauer reagirte. In einzelnen Fällen konnte ich dabei nicht verhindern, dass das Paracaseïn auszufallen anfing. In diesen Fällen hörte ich sogleich mit der Kohlensäuredurchleitung auf und leitete unmittelbar darauf einen raschen Luftstrom hindurch, wodurch ich das Paracaseïn wieder in Lösung bringen konnte. Auch in den Fällen, wo eine beginnende Ausfällung des Paracaseïns infolge der Kohlensäuredurchleitung nicht zu sehen war, leitete ich ebenfalls einen Luftstrom durch die Flüssigkeit, um die überschüssige Kohlensäure zu entfernen. Die so gewonnenen Lösungen von Paracaseïnkalk können selbstverständlich kein überschüssiges

die Gerinnung hemmendes Kalkhydrat enthalten. Derartige Lösungen ähneln sehr der fettarmen Milch. Beim Erwärmen auf Körpertemperatur nehmen sie ganz das Aussehen der Vollmilch an, ohne zu gerinnen oder einen Niederschlag zu geben.

In diesem Zusammenhange will ich die Aufmerksamkeit darauf lenken, dass das in verschiedener Weise dargestellte Paracasein nicht ganz dieselben Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnisse zeigt und namentlich durch eine verschiedene Empfindlichkeit der Paracaseinkalklösung gegen die Kohlensäurebehandlung sich kund gibt. So habe ich gefunden, dass das bei Abwesenheit von Kalksalzen durch Labwirkung erzeugte Paracasein eine geringere Löslichkeit, bezw. eine grössere Fällbarkeit durch Kohlensäure als das direct aus der Milch gewonnene Paracasein hat. Es ist mir auch nur mit der allergrössten Vorsicht gelungen, nach dem obigen Verfahren hinreichend concentrirte Lösungen in Kalkwasser (mit Kohlensäurebehandlung) von solchem Paracasein darzustellen, das aus kalkfreier Lösung von Caseinalkali durch Labwirkung erhalten war. In den meisten Fällen konnte ich nicht verhindern, dass beim Behandeln der Paracaseinkalklösung mit Kohlensäure eine Fällung entstand, die dann bei Luftdurchleitung nicht wieder sich löste.

Von grosser Bedeutung für die Labgerinnung ist bekanntlich auch die Concentration der Lösung. Durch Verdünnung mit Wasser kann die Gerinnung der Milch, bezw. einer Caseinlösung, verzögert und bei hinreichend starker Verdünnung sogar gänzlich verhindert werden. Die Nichtgerinnbarkeit einer Paracaseinlösung bei Labzusatz könnte also in einem speciellen Falle vielleicht einfach daher rühren, dass die Lösung zu verdünnt war; und diese Fehlerquelle musste also auch vermieden werden. Ueber die Concentration der von Peters benutzten Lösungen findet man in seinem Aufsätze keine Angaben und ein Vergleich zwischen unseren Versuchen ist also in diesem Punkte nicht möglich. Hauptsache ist es jedoch hierbei, nicht zu verdünnte Lösungen zu verwenden; und da die Milch ebensowohl wie eine Caseinkalklösung fest

und reichlich bei einem Gehalte von etwa 3% Casein gerinnt, habe ich, obwohl ich auch mit verdünnteren Lösungen gearbeitet habe, vor allem diejenigen Versuche als beweisend betrachtet, in welchen der Gehalt an Paracasein zwischen 2,6 und 3,5% schwankte.

Es ist allerdings wahr, dass eine stärker verdünnte Milch oder Caseinlösung, die, wegen der Verdünnung, mit Lab nicht gerinnt, durch Zusatz von einer etwas grösseren Menge eines löslichen Kalksalzes zum Gerinnen gebracht werden kann. Da aber die löslichen Kalksalze sehr leicht auch bei Abwesenheit von Lab die Paracaseinlösungen bei Körperwärme coaguliren, wollte ich nicht gern mit verdünnteren Lösungen arbeiten.

Zur Bestimmung der Concentration der von mir verwendeten Casein- bzw. Paracaseinlösungen wurde eine abgemessene Menge, gewöhnlich 10 ccm., in einer Platinschale auf dem Wasserbade eingetrocknet, dann bei 110° C. zur Gewichtsconstanz erhitzt, der Rückstand gewogen und eingäschert. Die Asche wurde dann mit Ammoniumcarbonatlösung behandelt, um etwa entstandenen Kalk in Carbonat umzuwandeln, und zuletzt gewogen. Die für die Asche erhaltenen Zahlen können bekanntlich aus dem Grunde nicht ganz exact werden, weil aus dem Phosphor des Caseins, bzw. Paracaseins, etwas Phosphorsäure entsteht, die in der Asche als Phosphat vorkommt. Für die hier vorliegenden Untersuchungen dürfte dieser Fehler indessen ohne Belang sein und ich habe es deshalb auch nicht als nothwendig erachtet, meine Versuche mit Rücksicht auf die Aschenanalyse noch mehr zu compliciren.

Die Menge der zugesetzten Lablösung war in den verschiedenen Versuchen natürlich eine wechselnde. In keinem Falle habe ich jedoch mehr als 1 ccm. auf je 10 ccm. Casein-, bzw. Paracaseinlösung zugesetzt, indem nämlich diese Menge, wie die Controllversuche mit Milch oder Caseinlösung zeigten, zu einer raschen Coagulation viel mehr als hinreichend war. Dass ich nie eine Controllprüfung der verwendeten Lablösung unterlassen habe, dürfte wohl kaum nöthig sein.

hier zu erwähnen. Die Versuchstemperatur schwankte in den verschiedenen Versuchen zwischen 35 und 40° C.

Nach diesen ziemlich ausführlichen Vorbemerkungen, die indessen für die Beurtheilung der Beweiskraft der Versuche nothwendig waren, kann ich ganz kurz über die Versuchsergebnisse selbst berichten, wobei ich als Beispiele nur wenige der von mir ausgeführten Versuche mittheilen werde.

Bei Versuchen mit salzfreien Lablösungen und Paracaseinkalklösungen habe ich in keinem einzigen Falle eine Coagulation beobachtet. Dasselbe gilt auch von den reinen Caseinkalklösungen, wobei ich besonders bemerke, dass es hier in beiden Fällen um solche Lösungen sich handelt, zu welchen kein Zusatz von löslichen Kalksalzen gemacht worden. Bei Anwendung von der Witte'schen Labessenz habe ich dagegen ebenso ausnahmslos eine Gerinnung oder eine Fällung erhalten, wenn nur die zugesetzte Labmenge nicht zu klein war.

Die von Peters in seinen Versuchen mit Paracaseinlösungen zugesetzten Labmengen sind mir leider unbekannt, und ein Vergleich zwischen unseren Versuchen bezüglich der Labmenge ist also nicht möglich. Es bleibt mir also hier nur übrig, meine Erfahrungen in dieser Hinsicht mitzutheilen, und diese sind folgende. Wenn die Menge der Witte'schen Labessenz weniger als 0,1 ccm. auf je 10 ccm. Paracaseinlösung betrug, blieb zwar in einigen Fällen die Gerinnung oder das Auftreten eines Niederschlages aus, wenn ich aber 0,2 ccm. oder mehr auf je 10 ccm. Lösung zusetzte, erhielt ich ohne Ausnahme ein positives Resultat. Bei Anwendung von salzfreier Lablösung waren dagegen die Resultate immer negativ, selbst wenn ich 0,5—1 ccm. Lablösung auf je 10 ccm. Paracaseinlösung zusetzte, und dies trotzdem die salzfreie Labflüssigkeit regelmässig viel kräftiger auf die Milch als die salzhaltige Labessenz wirkte. Die Ursache dieser ungleichen Wirkung der verschiedenen Lablösungen wird aus dem Folgenden klar hervorgehen.

Da indessen eine Caseinkalklösung, die kein lösliches Kalksalz enthält, mit einer reinen, salzfreien Lablösung keine Gerinnung gibt, könnte man eigentlich a priori erwarten, dass

eine Paracaseïnkalklösung unter denselben Verhältnissen in derselben Weise sich verhalten würde. Das Paracaseïn gibt, wie das Caseïn, in Wasser lösliche Kalkverbindungen und diese werden von einem löslichen Kalksalz gefällt. Es war also nothwendig, die Wirkung des Labs auf Paracaseïnkalklösungen auch bei Gegenwart von löslichem Kalksalz zu prüfen.

Man stösst indessen hierbei sogleich auf die Schwierigkeit, dass eine Paracaseïnkalklösung schon von sehr kleinen Mengen löslichem Kalksalz ohne Gegenwart von Lab gefällt wird, und zwar leichter bei Körperwärme als bei Zimmertemperatur, und man kann also leicht durch Zusatz von  $\text{CaCl}_2$ -Lösung eine Paracaseïnkalklösung darstellen, die zwar bei Zimmertemperatur nicht gefällt wird, die aber beim Erwärmen auf  $+ 37$  à  $40^\circ \text{C}$ . gerinnt. Dass hieraus leicht fehlerhafte Schlüsse gezogen werden können, liegt auf der Hand.

Aus diesem Grund verfuhr ich bei meinen Versuchen in folgender Weise. Zu genau abgemessenen Mengen Paracaseïnkalklösung setzte ich ebenfalls sehr genau abgemessene Mengen einer sehr verdünnten  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, von  $0,2$ — $0,5\%$   $\text{CaCl}_2$ , und prüfte dann das Verhalten dieser Gemenge sowohl bei Körper- wie bei Zimmertemperatur. Nachdem ich in dieser Weise diejenige  $\text{CaCl}_2$ -Menge ermittelt hatte, die zur Erzeugung eines sehr unbedeutenden Niederschlages, aber keiner Gerinnung beim Erwärmen, erforderlich war, habe ich mit einer solchen oder einer etwas kalkärmeren Lösung Versuche theils mit und theils ohne Lab angestellt. Um das Gesagte zu beleuchten, theile ich hier als Beispiel einen solchen Versuch mit.

Das Paracaseïn war aus der Milch direct durch Labzusatz gewonnen. Es war zweimal in ammoniakhaltigem Wasser gelöst und ebenso oft mit Essigsäure gefällt worden. Die Lösung in Kalkwasser erst mit Kohlensäure und dann mit einem Luftstrome behandelt, setzte nach der Filtration durch ein sehr dichtes Papier, beim Stehen keine Fällung oder Bodensatz ab. Sie enthielt  $2,663\%$  Paracaseïn und  $0,109\%$  Asche. Mit dieser Lösung wurde folgender Versuch ausgeführt:

- a) 10 ccm. Paracaseïn- + 1 ccm.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung von  $0,5\%$  =  $0,045\%$   $\text{CaCl}_2$  in der Mischung. Diese Probe gerann bei Zimmertemperatur innerhalb 2 Minuten.
- b) 10 ccm. P-Caseïnlösung + 1 ccm.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung von  $0,25\%$  =  $0,0227\%$   $\text{CaCl}_2$  in der Mischung. Diese Probe blieb bei Zimmer-

temperatur längere Zeit flüssig, gerann aber reichlich bei Körpertemperatur innerhalb 1 bis 2 Minuten.

c) 10 ccm. P-Caseinlösung + 0,5 ccm.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung von 0,25 %  
= 0,0119 %  $\text{CaCl}_2$  in der Mischung. Diese Probe gab bei Körpertemperatur nur eine geringe partielle Coagulation innerhalb 2 Minuten.

Von der ursprünglichen Paracaseinkalklösung wurde nun eine grössere Menge mit der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung von 0,25 % in dem Verhältnisse 1 ccm.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung auf 40 ccm. Paracaseinlösung vermischt, wobei das Gemenge also 0,006 %  $\text{CaCl}_2$  enthielt. Diese Lösung gerann bei Körpertemperatur nicht, sondern setzte erst nach mehreren Stunden einen sehr unbedeutenden Bodensatz ab. 10 ccm. dieser Lösung, mit 1 ccm. einer kräftigen Lablösung versetzt (von der Stärke, dass 10 ccm. Milch mit 1 ccm. derselben fast sogleich bei Körpertemperatur gerannen), coagulirten bei Zimmertemperatur im Laufe von 5 Stunden nicht. Nach dieser Zeit hatte diese Probe dasselbe Aussehen wie die Controllprobe ohne Lab. Sie hatte das Aussehen einer guten Vollmilch und sie hatte nur einen spärlichen Bodensatz abgesetzt, der weder grösser noch von anderem Aussehen als derjenigen der Controllprobe war.

Von derselben Paracaseinkalklösung (0,006 %  $\text{CaCl}_2$ ) wurden 10 ccm. mit 0,25 ccm. der Witte'schen Labessenz versetzt. Diese Probe gab bei Körpertemperatur innerhalb einiger Minuten eine reichliche, grobflockige Fällung, die allmählich sich zum Boden setzte und daselbst eine zähe zusammenhängende Masse bildete.

Ganz dasselbe Resultat wurde indessen ebenfalls mit der Witte'schen Labessenz erhalten, wenn dieselbe vorher auf 100° C. erhitzt worden war, um das Enzym zu zerstören. Eine ebenso reichliche Fällung von ganz derselben Beschaffenheit trat ebenfalls auf, wenn zu 10 ccm. der Paracaseinlösung 0,25 ccm. einer Kochsalzlösung von 10,6 %  $\text{NaCl}$  zugesetzt wurden. Diese Niederschläge traten erst beim Erwärmen der Lösung auf Körpertemperatur ein.

Nach dem Muster dieses Versuches habe ich eine grosse Anzahl von solchen ausgeführt, wobei die quantitativen Verhältnisse natürlich etwas wechselten. Diese Versuche wurden nicht nur mit aus der Milch dargestelltem Paracasein, sondern auch mit solchem, das aus einer Lösung von Caseinalkali gewonnen war, angestellt. Das Versuchsergebniss war immer dasselbe. Eine mit  $\text{CaCl}_2$  versetzte Paracaseinkalklösung, die nicht so viel Kalksalz enthielt, dass sie bei Körpertemperatur ohne irgend welchen anderen Zusatz gerann, habe ich nie nach Zusatz von salzfreier Lablösung gerinnen sehen. Dagegen gerann sie ohne Ausnahme nach einem genügenden Zusatze von salzhaltiger Labessenz, und es war dabei, wie in dem eben

mitgetheilten Versuche, gleichgiltig, ob das Enzym vorher durch Erhitzen zerstört worden war oder nicht. Die Lösung wurde stets ebenso reichlich von einer entsprechenden Menge Kochsalzlösung gefällt.

Diese Beobachtungen erklären auch die von Peters erhaltenen positiven Resultate. Die Fähigkeit des Kochsalzes, eine Paracaseïnkalklösung bei Körpertemperatur auszufällen, scheint ihm unbekannt gewesen zu sein. Auffallenderweise hat er auch nicht die Wirkung der gekochten Labessenz auf das Paracaseïn geprüft — wenigstens theilt er keine solchen Controllversuche mit — während er dagegen in seinen Versuchen mit anderen Eiweisskörpern auch die Wirkung von gekochtem Lab geprüft hat. Dass ein Neutralsalz (das NaCl) schon in sehr kleiner Menge eine Paracaseïnkalklösung bei Gegenwart von löslichem Kalksalz fällen kann, geht aus dem eben mitgetheilten Versuche deutlich hervor. Dass es eben dieselbe Wirkung auf eine Paracaseïnkalklösung bei Abwesenheit löslicher Kalksalze ausüben kann, zeigt der folgende Versuch, welcher ebenfalls ein Beweis dafür ist, dass der wirksame Bestandtheil der salzhaltigen Labessenz in diesen Fällen nicht das Enzym, sondern das Salz ist.

Das Paracaseïn war wie in den vorigen Versuchen dargestellt worden. Die Lösung enthielt 3,073 % Paracaseïn und 0,167 % Asche.

a) 10 ccm. Paracaseïnkalklösung mit 0,5 ccm. einer salzfreien, kräftig wirkenden Lablösung gerannen innerhalb 6 Stunden nicht. Die Flüssigkeit hatte das Aussehen guter Vollmilch.

Ein anderer Theil dieser Lösung, mit 0,0174 %  $\text{CaCl}_2$  versetzt, gab bei Körpertemperatur ohne Lab eine sehr geringfügige Fällung. Von dieser, mit  $\text{CaCl}_2$  versetzten Lösung wurde eine andere Portion, 10 ccm., mit 0,5 ccm. salzfreiem Lab versetzt. Die Probe gerann bei Körpertemperatur innerhalb 6 Stunden nicht. Nach dieser Zeit enthielt sie nur eine ebenso geringfügige Fällung wie die Controllprobe ohne Lab.

Zu sämmtlichen folgenden Proben wurde die ursprüngliche, mit  $\text{CaCl}_2$  nicht versetzte Paracaseïnkalklösung verwendet.

b) 10 ccm. Paracaseïnlösung + 0,5 ccm. Labessenz (Witte) gaben innerhalb 1 Minute bei Körpertemperatur, etwa 39° C., eine reichliche, grobflockige Fällung.

c) 10 ccm. P-Caseïnlösung + 0,5 ccm. NaCl-Lösung von 10,6 % gaben bei derselben Temperatur eine ebenso reichliche Fällung binnen 1 Minute.

- d) 10 ccm. P-Caseinlösung + 0,2 ccm. Labessenz. Nach etwa 2 Minuten trat bei derselben Temperatur eine reichliche, flockige Fällung auf.
- e) 10 ccm. P-Caseinlösung + 0,2 ccm. derselben Labessenz, gekocht, gaben ganz dasselbe Resultat.
- f) 10 ccm. P-Caseinlösung = 0,2 ccm. NaCl-Lösung von 10,6% verhielten sich in ganz derselben Weise.
- g) 10 ccm. P-Caseinlösung + 0,1 ccm. der Witte'schen Labessenz setzten bei der obengenannten Temperatur erst nach etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde einen ziemlich reichlichen, zähen Bodensatz ab.
- h) 10 ccm. P-Caseinlösung + 0,1 ccm. NaCl-Lösung von 10,6% gaben ganz dasselbe Resultat.

Die zwei nun mitgetheilten Versuche sind mit einem Paracasein angestellt worden, welches aus der Milch erhalten war. Der Vollständigkeit halber will ich auch einen Versuch mittheilen, zu welchem ein durch Digestion einer Caseinalkalilösung mit Lab während zwei Stunden bei 38–40° C. erhaltenes Paracasein verwendet wurde.

Die Paracaseinkalklösung enthielt 3,101% Paracasein und 0,216% Asche. Sie reagierte äusserst schwach alkalisch und wurde von Kohlensäure sehr leicht gefällt. Bei Körpertemperatur setzte sie nach einigen Stunden ohne irgend einen Zusatz einen sehr unbedeutenden Bodensatz ab, gerann aber nicht. Mit salzfreier Lablösung gerann sie nicht und gab keinen reichlicheren Bodensatz als die Controllprobe ohne Lab. Von einem löslichen Kalksalz wurde diese Lösung schon nach Zusatz von 0,004% ( $\text{Ca Cl}_2$ ) bei Körpertemperatur gefällt.

Diese Paracaseinlösung, die in keiner Weise durch Zusatz einer salzfreien Lablösung zum Gerinnen gebracht werden konnte, wurde von der Witte'schen Labessenz — 0,1 ccm. auf 10 ccm. Paracaseinlösung reichlich gefällt. Temp 38° C.

10 ccm. P-Caseinlösung + 0,1 ccm. NaCl-Lösung von 10,6% gaben bei derselben Temperatur fast sogleich eine reichliche, flockige Fällung.

10 ccm. P-Caseinlösung + 0,1 ccm. NaCl-Lösung von 5,3% = 0,052% NaCl in dem Gemenge — gaben bei derselben Temperatur nach einigen Minuten eine ziemlich reichliche, flockige Fällung.

Die nun als Beispiele mitgetheilten Versuche dürften zur Genüge zeigen, in welchem hohen Grade das NaCl die Fähigkeit hat, Lösungen von Paracaseinkalk sowohl bei Gegenwart wie bei Abwesenheit von löslichen Kalksalzen zu fällen.

Meine Untersuchungen haben also zu dem Ergebnisse geführt, dass eine Paracaseinkalklösung mit salzfreier Lablösung kein Gerinnsel gibt. Bei Anwendung von der Witte-

schen Labessenz blieb dagegen das Auftreten eines grobflockigen Niederschlages in keinem Falle aus, es sei denn, dass ich eine zu kleine Labmenge zugesetzt hatte. erinnert man sich ferner, dass diese Labessenz nach dem Erhitzen noch ihre Wirkung auf eine Paracaseïnkalklösung ausübt, dass sie reich an Salz ist und dass sie endlich durch eine Kochsalzlösung entsprechender Stärke ersetzt werden kann, so dürfte es wohl ohne Weiteres klar sein, dass die von Peters mit dieser Essenz in Paracaseïnkalklösungen erzeugten Niederschläge nicht als das Resultat einer Enzymwirkung, sondern vielmehr als das Resultat der paracaseïnfällenden Wirkung des Salzes anzusehen ist.

Dass das unter verschiedenartigen äusseren Bedingungen dargestellte Paracaseïn etwas abweichende Eigenschaften, wie eine etwas verschiedene Löslichkeit und Fällbarkeit, zeigen kann, habe ich schon oben angedeutet. In einer Beziehung verhält sich doch nach meiner Erfahrung alles Paracaseïn gleich, nämlich darin, dass es nicht wieder unter dem Einflusse des Labenzymes gerinnen kann. Diese Eigenschaft dürfte deshalb auch fortwährend, wie früher, als der wesentlichste Unterschied zwischen Caseïn und Paracaseïn anzusehen sein.

Die Wirkung des NaCl auf Paracaseïnkalklösungen ist in mehreren Hinsichten von Interesse und sie zeigt unter anderem, wie wichtig es ist, mit möglichst salzfreien Lablösungen zu arbeiten, wenn man die Einwirkung verschiedener Substanzen auf die Gerinnung studiren will. Von noch grösserem Interesse ist sie indessen in einer anderen Hinsicht. Man ist bekanntlich gegenwärtig allgemein der Ansicht, dass die Gegenwart eines löslichen Kalksalzes ein nothwendiges Bedingniss für die Gerinnung einer Caseïnkalklösung mit Lab ist. Nun habe ich aber in dem Vorstehenden gezeigt, dass eine Paracaseïnkalklösung schon von sehr kleinen NaCl-Mengen gefällt wird, selbst in dem Falle, dass kein lösliches Kalksalz zugegen ist; und es entsteht also die Frage, ob nicht eine Caseïnkalklösung auch ohne Zusatz von löslichem Kalksalz gerinnen kann, wenn man nur eine passende Menge NaCl

zusetzt. Dem ist in der That auch so, wie aus dem Folgenden hervorgehen wird.

In den oben mitgetheilten Versuchen mit salzhaltiger Labessenz konnte eine Einwirkung von löslichem Kalksalz nicht ganz ausgeschlossen werden, denn die Labessenz war kalkhaltig, und es war also, des Vergleiches halber, nothwendig, auch mit gewöhnlichem kalkhaltigem Kochsalz zu arbeiten. Bei den nun zu besprechenden Versuchen dagegen war es unbedingt nothwendig, mit einem möglichst kalkfreien Material zu arbeiten.

Das reine, kalkfreie NaCl habe ich selbst dargestellt und auf völlige Reinheit geprüft. Eine von löslichen Kalksalzen freie Lablösung stellte ich in folgender Weise dar. Die käufliche kochsalzhaltige Lablösung wurde mit Wasser etwas verdünnt und dann mit neutralem Kaliumoxalat im Ueberschuss gefällt. Nach 48 Stunden wurde durch ein dichtes Papier filtrirt und das ganz klare Filtrat, welches überschüssiges Oxalat enthielt, bei etwas über 0° C. einer energischen Dialyse bis zur vollständigen Entfernung des Oxalates unterworfen. Die während der Dialyse ein wenig trüb gewordene Lösung wurde ganz klar filtrirt und mit Milch geprüft. Sie wirkte noch sehr kräftig, wenn auch ihre Wirksamkeit infolge der anhaltenden Dialyse etwas abgeschwächt war.

Die Caseïnkalklösungen bereitete ich ohne Ausnahme aus reinem, mit Alkohol-Aether behandelten, lufttrocknem Caseïn, das ich immer, um einen Ueberschuss an Kalk und eine Beimengung von löslichem Kalksalz zu vermeiden, in Wasser unter Zerreiben mit reinem Calciumcarbonat löste. Die Lösung wurde filtrirt oder nöthigenfalls centrifugirt.

Als Beispiel der hierher gehörenden Versuche führe ich den folgenden an:

Die Caseïnkalklösung enthielt 3,393 % Caseïn und 0,137 % Asche. Die mit Oxalat entkalkte Lablösung enthielt 0,065 % feste Stoffe. 10 chem. Milch, mit 1 chem. dieser Lablösung versetzt, gerannen bei etwa 38—39° C. innerhalb 1 $\frac{1}{2}$  Minuten. Das Erwärmen der Versuchsproben geschah durch Einstellen derselben in ein Wasserbad, dessen Temperatur zwischen 38 und 40° C. schwankte. Die Zeitangaben über die Gerinnung, bezw. das Auftreten eines Niederschlages, beziehen sich auf die nach dem Einstellen der Proben in das warme Wasser verflossene Zeit.

a) 10 ccm. Caseinlösung + 1 ccm. Lablösung. Keine Gerinnung innerhalb 5 Stunden. Nach dieser Zeit trat allmählig in der milchähnlichen Flüssigkeit eine spärliche Fällung auf, die im Laufe der folgenden Nacht sich noch weiter vermehrte, während die obenstehende Flüssigkeit sich etwas geklärt hatte.

Dieselbe Caseinlösung, mit einer passenden Menge  $\text{CaCl}_2$ -Lösung versetzt, gerann beim Erwärmen ohne Labzusatz nicht. Mit Lab gerann sie beim Erwärmen zu einer festen Masse im Laufe von etwa 1 Minute.

b) 10 ccm. Caseinlösung + 1 ccm. Labflüssigkeit + 0,2 ccm. NaCl-Lösung von  $16\% = 0,286\%$  NaCl in dem Gemenge. Diese Probe wurde beim Erwärmen stark milchig weiss, gerann aber innerhalb 5 Stunden nicht. Nach dieser Zeit fing auch in dieser Probe eine geringfügige Fällung an aufzutreten, und am folgenden Morgen hatte diese Probe dasselbe Aussehen wie a.

c) 10 ccm. Caseinlösung + 1 ccm. Labflüssigkeit + 0,3 ccm. NaCl-Lösung von  $16,0\% = 0,425\%$  NaCl in dem Gemenge. Nach Zusatz des NaCl klärte sich die Probe ein wenig. In der Wärme wurde sie wieder mehr undurchsichtig und nach etwa 3 Minuten trat eine reichliche, grobflockige Fällung auf. Die Probe wurde bald darauf herausgenommen, wobei der Niederschlag ziemlich rasch wieder zu einer bläulich opalisirenden Flüssigkeit sich löste. Nach neuem Einsetzen der Röhre in warmes Wasser kam die Fällung wieder zum Vorschein, löste sich aber beim Erkalten wieder. Beim erneuerten Erwärmen trat die Fällung wieder auf, zwar nicht so reichlich wie früher, und verschwand wieder beim Erkalten. Nachdem in dieser Weise das Erwärmen und Erkaltenlassen einige Male wiederholt waren, trat bei Körpertemperatur kein Niederschlag mehr auf. Beim Erwärmen auf höhere Temperatur fand jedoch von Neuem eine reichliche, flockige Ausscheidung statt, die beim Einstellen der Röhre in kaltes Wasser sich bald wieder löste.

d) 10 ccm. Caseinlösung + 1 ccm. Labflüssigkeit + 0,4 ccm. NaCl von  $16\% = 0,561\%$  NaCl in dem Gemenge. Klärte sich etwas nach Zusatz von NaCl. In der Wärme wurde diese Probe wieder mehr undurchsichtig, aber nicht weiss. Nach etwa 3 Minuten trat eine reichliche, grobflockige Fällung auf, die bei Zimmertemperatur wieder zu einer bläulich weiss opalisirenden Flüssigkeit sich löste. Bei abwechselndem Erwärmen und Abkühlen verhielt sich diese Probe wie c.

Controllproben mit NaCl allein, in denselben Mengen wie in c und d, ohne Lab gaben beim Erwärmen keine Fällung.

e) 10 ccm. Caseinlösung + 1 ccm. Labflüssigkeit + 0,6 ccm. NaCl von  $16\% = 0,828\%$  NaCl in dem Gemenge. Diese Probe verhielt sich wie die zwei vorigen, gab aber eine weniger reichliche Fällung, die

auch bei Zimmertemperatur sich noch leichter wieder löste. Bei neuem Erwärmen (Körpertemperatur) erschien die Probe während einiger Secunden getrübt und sie enthielt vielleicht eine geringe Fällung. Nach etwas mehr als einer Minute war diese jedoch vollständig verschwunden, und die Probe stellte nur eine etwas stärker als bei Zimmertemperatur opalisirende Lösung dar.

10 ccm. Caseinlösung + 1 ccm. Labflüssigkeit + 0,8 ccm. NaCl von 16% = 1,085% NaCl in dem Gemenge. Beim Erwärmen wurde die ziemlich klare Flüssigkeit vorübergehend etwas stärker trübe; ein deutlicher Niederschlag war indessen nicht zu sehen. Nach noch einer Minute war die Probe völlig durchsichtig, mit bläulich weisser Opalescenz, und sie gerann nicht.

10 ccm. Caseinlösung + 1 ccm. Lab + 1 ccm. NaCl-Lösung von 16% = 1,33% NaCl in dem Gemenge. Keine Trübung beim Erwärmen. Die Flüssigkeit war durchsichtig, etwas opalisirend.

Dieser Versuch, den ich nur unter anderen als Beispiel anführe, zeigt also, dass eine Caseinkalklösung, die wegen Mangels an löslichem Kalksalz mit Lab nicht gerinnt, eine reichliche Ausscheidung von Paracaseinkalk geben kann, wenn man eine passende Menge von kalkfreiem Kochsalz zusetzt. Diese Wirkung des Kochsalzes kommt indessen nur innerhalb ziemlich enger Grenzen zur Geltung und sie hängt übrigens auch von der Concentration der Caseinlösung ab. Ist die Caseinkalklösung zu verdünnt, so kommt diese Wirkung des Chlornatriums nicht zum Vorschein. Von grosser Bedeutung ist ferner die Temperatur, indem nämlich der Niederschlag zwar bei Körperwärme oder einer höheren Temperatur entsteht, bei Zimmertemperatur dagegen wieder verschwindet. Bemerkenswerth ist es hierbei, dass sogar die reichliche Fällung, die beim Erhitzen einer solchen mit Kochsalz und Lab behandelten Lösung zum Sieden entsteht, beim Erkalten zum grossen Theil und bisweilen sogar vollständig wieder gelöst werden kann. Durch Erhöhung der Temperatur auf etwa 50° C. oder etwas darüber kann man übrigens mit NaCl eine Ausscheidung von Paracaseinkalk in solchen Lösungen bewirken, die wegen zu starker Verdünnung keine Fällung bei Körpertemperatur geben. Dies ist mir wenigstens bei einem Gehalte von nur 1,5% Casein in der Lösung gelungen. Die entsprechenden, mit NaCl ohne Lab versetzten Casein-

kalklösungen gerannen (wie gewöhnlich) sogar beim Erhitzen zum Sieden nicht.

Fragt man, ob es möglich ist, eine Caseïnkalklösung auch bei Abwesenheit von löslichem Kalksalz mit Lab zur Gerinnung zu bringen, so muss also diese Frage, der von Soxhlet und Söldner<sup>1)</sup> herrührenden gewöhnlichen Ansicht entgegen, bejahend beantwortet werden. Ein solches Verhalten war auch a priori zu erwarten. Ich hatte nämlich schon vor vielen Jahren bewiesen, dass die chemische Umsetzung des Caseïns, also die Paracaseïnbildung, ebensowohl in einer kalkfreien wie in einer kalkhaltigen Lösung von Statten geht, und die wesentlichste Bedeutung der löslichen Kalksalze liegt, wie es scheint, darin, dass sie die Ausfällung des Paracaseïnkalkes bewirken. Die Frage war also auch eigentlich nur die, ob es nicht doch vielleicht auch andere Salze gebe, die eine ähnliche Wirkung haben. Die obigen Versuche zeigen, dass das NaCl ein derartiges Salz ist, und wahrscheinlich gibt es deren noch viele andere. Inwieweit dies der Fall ist, habe ich nicht näher geprüft.

Wenn man aber in einer Caseïnkalklösung, auch ohne Zusatz von löslichem Kalksalz, mit Lab und kalkfreiem Kochsalz eine Gerinnung erzeugen kann, so muss man doch zugeben, dass es hierbei nicht um eine typische Gerinnung sich handelt. Bei der typischen Gerinnung der Milch oder einer Caseïncalciumphosphatlösung gesteht nämlich das Gemenge, wenn man mit nicht zu verdünnten Lösungen arbeitet, zu einem festen Gerinnsel, das sich dann zusammenziehen und ein mehr oder weniger klares Serum auspressen kann. In den oben mitgetheilten Versuchen fand dagegen nie eine solche feste Gerinnung statt, trotzdem die Caseïnkalklösungen ebenso concentrirt wie die natürlichen Caseïnlösungen in der Milch waren; es trat nur eine reichliche, sehr grobflockige Fällung auf, die allmählig zu einer zähen Masse sich zusammenballte. Bemerkenswerth ist es deshalb auch, dass Peters in seinen Versuchen mit salzhaltigem Lab und Paracaseïn.

<sup>1)</sup> Söldner, die Salze der Milch etc. Die landwirthsch. Versuchstationen, Bd. 35.

wie es scheint, nicht eine typische Gerinnung beobachtet hat. Er spricht wenigstens in seinem Aufsätze nur von einer starken Fällung und von dem Ausfällen durch Lab. In allen meinen Versuchen mit salzhaltigem Lab (Wittes Labessenz) und Paracaseinkalklösungen erhielt ich ebenfalls nur eine starke Fällung, die nach einiger Zeit eine zähe, mehr oder weniger durchsichtige Masse auf dem Boden des Gefässes bildete.

Der Umstand, dass eine Caseinkalklösung bei Abwesenheit von löslichem Kalksalz und Gegenwart von Chlornatrium nur eine reichliche, grobflockige Fällung gibt, beweist indessen nicht, dass die löslichen Kalksalze ein nothwendiges Bedingniss für eine typische Caseingerinnung mit Lab sind. Man kann nämlich unter gewissen Bedingungen mit NaCl allein, ohne Gegenwart von löslichem Kalksalz, eine typische Labgerinnung erzeugen und zwar, wenn man die Versuche nicht mit Caseinkalklösung, sondern mit dialysirter Milch anstellt. Wenn man durch energische Dialyse aus der Milch die löslichen Salze entfernt, so gerinnt bekanntlich eine solche Milch nicht mit Lab. Durch Zusatz von kalkfreiem Kochsalz und, mit Oxalat entkalkter und darauf dialysirter Lablösung habe ich dagegen regelmässig die dialysirte Milch zur Gerinnung bringen können, und sie gerann hierbei wie gewöhnliche Milch zu einem festen, typischen Gerinnsel. Im Gegensatz zu der in einer Caseinkalklösung mit kalkfreiem Lab und Chlornatrium erzeugten Fällung löste sich dieses Gerinnsel nicht beim Erkalten wieder auf, sondern es verhielt sich auch in dieser Hinsicht wie gewöhnlicher Käse. Diese Versuche widerlegen also die seit der Arbeit von Soxhlet und Söldner gang und gäbe Ansicht von der Unentbehrlichkeit der löslichen Kalksalze für die Käsebildung, indem sie zeigen, dass die löslichen Kalksalze wenigstens unter gewissen Umständen für diesen Vorgang nicht unbedingt nothwendig sind. Diese Versuche sprechen ferner nicht zu Gunsten der von denselben Forschern ausgesprochenen Ansicht, derzufolge — meiner Anschauung entgegen — das Calciumphosphat der Milch ohne Bedeutung für die Käsebildung sein soll. Wenn das Casein, wie Söldner annimmt, in der Milch nur als Caseinkalk vorkommt, so ist

es etwas schwierig zu verstehen, warum die dialysirte Milch zu Lab und Kochsalz ganz anders als eine Caseïnkalklösung derselben Concentration sich verhält. Auf diese Frage will ich jedoch hier nicht des näheren eingehen, denn die hierher gehörenden Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

Die in dem Vorigen wiederholt besprochene Fähigkeit des Kochsalzes, den Paracaseïnkalk beim Erwärmen auszufällen, liefert uns auch ein besonders für gewisse Fälle werthvolles Mittel in die Hände zur Entscheidung der Frage, ob in einer wegen Mangels an löslichem Kalksalz nicht geronnenen Caseïnkalklösung die Labwirkung stattgefunden hat oder nicht. Versetzt man eine mit Hilfe von  $\text{CaCO}_3$  bereitete Caseïnkalklösung mit etwa 0,5% reinem  $\text{NaCl}$  und erwärmt, so tritt sogar beim Sieden keine Fällung auf. Behandelt man dagegen in derselben Weise eine andere Portion derselben Lösung, die vorher einige Minuten mit kräftiger Lablösung digerirt worden ist, so entsteht ein reichlicher, flockiger Niederschlag, der beim Einstellen der Röhre in kaltes Wasser ziemlich rasch sich wieder löst. Wenn die Caseïnkalklösung von Anfang an zu wenig concentrirt war, kann zwar die Fällung bei Körpertemperatur ausbleiben, kommt dann aber bei etwas höherer Temperatur zum Vorschein. Als Beispiel kann ich anführen, dass eine Caseïnkalklösung, die nur 1,7% Caseïn enthielt, beim Zusatz von  $\text{NaCl}$  nach der Labwirkung und Erwärmen auf  $+40^\circ \text{C}$ . gar nicht gefällt wurde. Beim Erwärmen auf  $+50^\circ \text{C}$ . trat dagegen die charakteristische, beim Abkühlen sich wieder lösende Fällung auf. Diese Probe hat mir auch Aufklärung über folgendes Verhalten gegeben.

Beim Durchlesen der hier oben S. 115—120 als Beispiele mitgetheilten Versuche wird man mehrmals die Angabe finden, dass eine Caseïnkalklösung, die mit salzfreiem Lab im Laufe von mehreren Stunden nicht gerann, nach einiger Zeit, wie z. B. nach 5 oder 6 Stunden eine spärliche Fällung abzusetzen anfang, die dann allmählig sich vermehrte. Hier waren zwei Fälle denkbar. Entweder war schon nach kurzer Zeit Paracaseïn gebildet worden, welches indessen wegen Mangels an löslichen Salzen in Lösung blieb und durch das stundenlang

anhaltende Erwärmen allmählig derart sich veränderte, dass es zum Theil sich ausschied, oder es kam in diesen Fällen die paracaseinbildende Wirkung des Labfermentes erst allmählig und nach längerer Zeit zur Geltung. Gegen diese letztere Möglichkeit sprach entschieden die kräftige, oft fast augenblickliche Wirkung der benutzten Lablösung auf Milch, wie auch die Erfahrung, dass das Labferment sogar in kalkfreien Lösungen von Caseinalkali mit grosser Geschwindigkeit wirkt. Für die erstere Möglichkeit sprach dagegen der Umstand, dass das Paracasein ein Körper ist, der, wie schon die Versuche mit Na-Cl bei Körpertemperatur zeigen, durch Erwärmen leicht verändert wird; hatten doch schon die Versuche mit Paracasein aus Caseinalkali gelehrt, dass dieses, einem zweistündigen Erwärmen bei Körpertemperatur ausgesetzte Paracasein schwerlöslicher als die aus der Milch direct durch kurzdauerndes Erwärmen dargestellten Paracaseinpräparate war.

Die Richtigkeit dieser Annahme liess sich auch durch die oben angedeutete Versuchsanordnung leicht zeigen. Nahm ich von einer, mit Lab innerhalb mehrerer Stunden nicht gerinnenden Caseinkalklösung etwa 3—4 Minuten nach dem Labzusatz eine Probe von 10 cbcm., erhitzte sie zum Sieden (um das Lab zu zerstören), liess darauf erkalten und setzte die passende Menge reiner Kochsalzlösung hinzu, so trat beim Erwärmen auf Körpertemperatur sogleich die gewöhnliche Paracaseinkalkfällung auf, die beim Abkühlen sich wieder löste. Eine gleich grosse Probe der mit Lab nicht behandelten Caseinkalklösung, mit ebenso viel Kochsalz versetzt, konnte dagegen, wie gewöhnlich, sogar zum Sieden erhitzt werden, ohne sich zu trüben<sup>1)</sup>.

Die Paracaseinbildung hatte also schon nach wenigen Minuten stattgefunden und der in einer solchen Lösung erst nach vielen Stunden in der Wärme allmählig auftretende Niederschlag rührt also allem Anscheine nach daher, dass das ge-

<sup>1)</sup> Die Paracaseinbildung macht sich auch in vielen Fällen schon ohne Salzzusatz dadurch kund, dass die mit Lab behandelte Lösung beim Sieden zum Theil gerinnt. Dies gilt jedoch nur für nicht zu verdünnte Lösungen; die verdünnteren Lösungen gerinnen beim Sieden gar nicht.

bildete Paracasein allmählig weiter verändert wird. Dass dem so ist, geht ferner daraus hervor, dass, wie die oben mitgetheilten Versuche zeigen, ähnliche Niederschläge auch in den mit Lab digerirten Paracaseinlösungen auftreten. Dass die Erwärmung und nicht die Gegenwart des Labfermentes hierbei das Wesentliche ist, folgt daraus, dass ich dieselbe langsame Ausscheidung auch in solchen Paracaseinkalklösungen beobachtet habe, die ohne Gegenwart von Lab bei Körpertemperatur digerirt wurden.

Welcher Art der hierbei stattfindende Vorgang ist, habe ich nicht weiter erforscht. Ich habe nur die Aufmerksamkeit auf dieses Verhalten lenken wollen, denn es zeigt, dass Versuche mit Lab, die über mehrere Stunden sich erstrecken, nicht zu klaren, unzweideutigen Resultaten, wohl aber zu fehlerhaften Schlüssen führen können. Glücklicherweise sind aber solche Fehler leicht zu vermeiden, denn bei Verwendung einer kräftigen Lablösung ist die Paracaseinbildung regelmässig, selbst bei Abwesenheit von Kalksalzen, in einigen Minuten beendet, und die Darstellung einer kräftigen Lablösung ist bekanntlich eine sehr leichte Sache.

---