

# Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte.

Von

**Dr. Franz Alexander,**

II. Assistent der Universitäts-Ohrenklinik zu Strassburg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge. Nr. 10.)  
(Der Redaction zugegangen am 14. Juni 1898.)

Die vorliegende Untersuchung über die peptischen Spaltungsprodukte des Caseins schliesst sich unmittelbar den vor Kurzem erschienenen Arbeiten von E. P. Pick<sup>1)</sup> und F. Ueber<sup>2)</sup> an, welche die Produkte der Pepsinverdauung von Fibrin, krystallisirtem Eieralbumin, krystallisirtem Serumalbumin und von Globulin zum Gegenstande hatten. Diesen Eiweissstoffen gegenüber nimmt das Casein als Nucleoalbumin und vermöge seiner Eigenschaften, die es den Albuminaten nahe stellen, eine so abweichende Stellung ein, dass seine gesonderte Bearbeitung geboten erschien.

Die Zahl einschlägiger Untersuchungen, soweit sie die Gesammtheit der entstehenden Verdauungsprodukte näher in's Auge fassen, ist gering. Den sicheren Nachweis, dass bei der Pepsinverdauung des Caseins mehrere auffällig verschiedene Produkte nebeneinander auftreten, hat H. Thierfelder<sup>3)</sup> geführt.

Thierfelder stellte mit zwei verschiedenen Präparaten, nämlich Casein, das er selbst nach der Hammarsten'schen<sup>4)</sup> Methode dargestellt hatte, und Merck'schem Casein Verdauungs-

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXIV.

2) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXV.

3) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. X.

4) Verhandlungen der kgl. schwed. Akademie der Wissenschaften, Uppsala 1877.

versuche an. Er untersuchte die gewonnenen Produkte, sowie ein käufliches Weyf'sches Caseinpepton und vermochte, drei verschiedene Fractionen von Verdauungsprodukten zu isoliren, die eine durch Fällen mit Steinsalz, die zweite durch Fällen mit Steinsalz und Salzsäure, die dritte durch Fällen mit Phosphorwolframsäure: den durch Steinsalz allein fällbaren Antheil konnte er in drei durch ihre Lösungsverhältnisse differente Körper zerlegen. Einer, der in kaltem und heissem Wasser, sowie in salzhaltigem Wasser unlöslich war, entsprach Kühne's Dysalbumose, ein zweiter, in kaltem und heissem Wasser unlöslicher, dagegen in salzhaltigem Wasser löslicher, Kühne's Heteroalbumose, der dritte, unter allen Umständen lösliche, schien mit der Protoalbumose identisch zu sein. Der durch Salz und Säure fällbare Theil glich einer Deuteroalbumose. Den durch Phosphorwolframsäure isolirbaren Theil bezeichnet Thierfelder zunächst als Pepton, erwähnt jedoch im Hinblick auf das indessen von Kühne<sup>2)</sup> aufgefundene neue Trennungsvorgehen mit Ammonsulfat, dass die Lösungen dieser Peptone mit Ammonsulfat reichliche Niederschläge gaben. Somit war es keineswegs festgestellt, dass in den löslichen Verdauungsprodukten des Caseins Peptone im Sinne Kühne's vorhanden waren.

Ausserdem unterzogen Chittenden<sup>3)</sup> und seine Schüler die Spaltungsprodukte des Caseins bei der Pepsinverdauung einer Untersuchung: Chittenden bezeichnet dieselben als Caseosen und unterscheidet einen durch Sättigung mit NaCl fällbaren Antheil (Protocaseose), dessen Lösung sich beim Erhitzen trübt, beim Erkalten wieder aufhellt und durch Salpetersäure in der Kälte gefällt wird, einen durch salzgesättigte Essigsäure aus der Kochsalzlösung fällbaren Antheil, der sich beim Erhitzen nicht verändert, durch Salpetersäure nicht, wohl aber

1) Kühne u. Chittenden, Zeitschrift f. Biologie, Bd. XX, 1884, S. 11.

2) Zeitschrift f. Biologie, Bd. XXII, 1886.

3) Casein and its primary cleavage products. New-Haven 1887. Nach Maly's Jahresbericht, Bd. XVII, S. 16. (Das Original war mir nicht zugänglich.) Ebenda Bd. XX, S. 17, Caseosen, Caseindyspepton und Caseinpepton.

durch Kupfersulfat fällbar ist ( $\alpha$ -Deuterocaseose), endlich einen beim Erhitzen der mit Ammonsulfat gesättigten Flüssigkeit sich ausscheidenden Antheil ( $\beta$ -Deuterocaseose), in gereinigtem Zustande weder durch Ferrocyanwasserstoff, noch durch Salpetersäure oder durch Kupfersulfat fällbar. Echte, d. h. durch Ammonsulfat überhaupt nicht fällbare Peptone wurden auch bei tagelanger Verdauung nicht erhalten. Neben Protocaseose konnte von primären Albumosen eine geringe Menge von durch Diffusion fällbarer Heterocaseose nachgewiesen werden.

J. Sebelien<sup>1)</sup> verdaute Casein mit Pepsinsalzsäure, schied nach Abfiltriren des Nucleins die Albumosen mit Ammonsulfat ab und fällte das verdünnte Filtrat mit Gerbsäure. Durch Zerlegung dieses Niederschlages mit Baryt und Entfernen des Barytüberschusses erhielt er eine Lösung, die weder durch Salze, einschliesslich Ammonsulfat, noch durch Salpetersäure oder Ferrocyanwasserstoff fällbar war, wohl aber durch Alkohol, Phosphorwolframsäure und Gerbsäure. Er bezeichnet diesen Körper als Pepton.

Chittenden und seine Schüler fanden die Caseosen phosphorfrei. Ueber die Frage, ob der Phosphor des Caseins in die Verdauungslösung übergeht, liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Die erste Angabe, dass auch phosphorhaltige Produkte des Caseins in die löslichen Verdauungsprodukte übergehen, findet sich bei Szontagh.<sup>2)</sup> Salkowski<sup>3)</sup> isolirte die löslichen Verdauungsprodukte des Caseins mittelst der Ammonsulfatmethode und erwähnt, dass er Albumosen und Peptone erhalten habe, ohne jedoch eine nähere Charakterisirung beider zu geben. Dagegen wies er auf den Phosphorgehalt der löslichen Verdauungsprodukte hin. In einer späteren<sup>4)</sup>, gemeinsam mit M. Hahn veröffentlichten Arbeit suchte Salkowski das Verhältniss des in den löslichen Verdauungsprodukten enthaltenen Phosphors zu dem in den unlöslichen enthaltenen

1) Chem. Centralblatt, 1890, S. 171.

2) Ung. Arch. f. Med. I., 1892.

3) Centralblatt f. d. med. Wissenschaften, 1893.

4) Pflüger's Archiv, Bd. LIX.

festzustellen und fand, dass je nach den Verdaunungsbedingungen 48 bis ca. 90% des Caseinphosphors<sup>1)</sup> in die löslichen Verdauungsprodukte übergehen. Auch v. Moraczewski,<sup>2)</sup> Krehl und Matthes<sup>3)</sup> überzeugten sich von dem Phosphorgehalt derselben.

Von vornherein sei erwähnt, dass meine Untersuchungen nicht das Schicksal der Phosphor enthaltenden Gruppe des Caseins zum Gegenstande hatten. Auch die nähere Charakterisierung der primären Albumosen lag zunächst nicht in meiner Absicht, da der Vergleich dieser, der Muttersubstanz noch sehr nahestehenden Produkte für die Auffindung von Beziehungen zu den übrigen Eiweisskörpern wenig Aussicht bot. Wohl aber liess sich hoffen, durch Benutzung des von Pick und Umber eingeschlagenen Weges zu einer Charakterisierung der dem Casein zukommenden secundären Albumosen und Peptone zu gelangen und damit Anhaltspunkte für die Beurteilung des Baues des Caseinmoleküls im Vergleich mit jenem des Fibrins, der Albumine und des Serumglobulins zu gewinnen.

### 1. Ist das Casein ein einheitlicher Körper?

Meine erste Aufgabe musste die Gewinnung von reinem Ausgangsmaterial sein. Der Versuch, dabei von käuflichen Caseinpräparaten auszugehen, scheiterte an deren unzuverlässiger Beschaffenheit. Ich habe mir daher stets reines Casein nach Hammarsten's bekannter<sup>4)</sup> Vorschrift dargestellt.

Die kleinen Abweichungen, die ich mir dieser Vorschrift gegenüber erlaubte, bezogen sich darauf, dass ich zum Lösen statt Sodaauslösung sehr verdünnte Natronlauge verwandte, ferner, dass ich die erhaltenen Lösungen jedes Mal in Spitzgläser brachte, um die sich oben sammelnde Fettschicht, die bei der 1. und 2. Auflösung ziemlich reichlich aufzutreten pflegte, leichter abheben zu können, und dass ich endlich das Verreiben mit Alkohol am Schluss der Darstellung möglichst rasch vornahm.

Das so erhaltene Casein stellte ein feines weisses Pulver

1) Ebenda, S. 237.

2) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XX.

3) Archiv f. experim. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. XXXVI, S. 439.

4) a. a. O.

dar, das auf Platinblech keine sichtbare Asche hinterliess und auch im Uebrigen vollkommen den von Hammarsten gestellten Anforderungen entsprach. Mit einer neutralen, ganz klaren Lösung dieses Caseins wurden die wichtigsten Eiweissreactionen angestellt. Unter denselben ist der ausserordentlich starke Ausfall der Millon'schen, der äusserst schwache der Molisch'schen Reaction und das fast völlige Ausbleiben der Reaction auf durch Alkali abspaltbaren Schwefel hervorzuheben; die Probe nach Adamkiewicz fiel schwach, aber doch deutlich positiv aus.

Die Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff ist, hat wiederholt Erörterungen erfahren. Die Antwort, soweit dieselbe bei einem nicht krystallisirenden Stoffe eine abschliessende sein kann, ist bei der zuverlässigsten Untersuchung<sup>1)</sup> bejahend ausgefallen. Bei dieser Prüfung ist bisher der Versuch, das Casein durch Fractionirung mit Salz in etwaige Gemengtheile zu zerlegen, nicht systematisch durchgeführt worden. Ich habe diesen Versuch angestellt, und es ergab sich — der Versuch wurde wegen seines auffälligen Ergebnisses siebzehn Mal mit acht verschiedenen Präparaten ausgeführt —, wenn ich je 2 ccm. einer neutralen Caseinlösung mit wechselnden Mengen Ammonsulfat aussalzte und auf 10 ccm. auffüllte, hierbei Folgendes:<sup>2)</sup>

Caseinlösung	Wasser	Gesätt. Ammonsulfatlösung		Filtrat mit 0,2 ccm. Ammonsulfat versetzt nach 24 Stunden	Bemerkungen
2	7,4	0,6	klar	—	
2	7,2	0,8	klar	—	
2	7,0	1,0	klar	—	
2	6,8	1,2	schwache Opalescenz	—	Untere Grenze der Opalescenz
2	6,6	1,4	ebenso	Opalescenz	
2	6,4	1,6	ebenso	etwas geringere Opalescenz	
2	6,2	1,8	ebenso	} noch immer deutliche Opalescenz	
2	6,0	2,0	ebenso		
2	5,8	2,2	Trübung	stärkere Opalescenz	Beginn der Trübung

1) Hammarsten, Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. III.

2) Die Anordnung der Versuche schliesst sich ganz der von E. P. Pick ausführlich beschriebenen an.

Casein- lösung	Wasser	Gesätt. Ammon- sulfat- lösung		Filtrat mit 0,2 cem. Ammonsulfat versetzt nach 24 Stunden.	Bemerkungen
2	5,6	2,4	starke Trübung	—	
2	5,4	2,6	Fällung	—	
2	5,2	2,8	zunehmende Fällung	—	
2	5,0	3,0		starke Opalescenz	
2	4,8	3,2	Fällung, die nicht mehr	Opalescenz	
2	4,6	3,4		nach längerem Stehen Opalescenz	
2	4,4	3,6	sichtbar	klar	Obere Grenze der Fällung
2	4,2	3,8	zunimmt	klar	
2	4,0	4,0		klar	

Auf weiteren Zusatz von Ammonsulfat entstand keine Trübung mehr.

Man erhält also zunächst eine sich fast über den Zusatz eines ganzen Cubikcentimeters (1,2—2,0) erstreckende und nicht zunehmende Opalescenz, der von einem Salzgehalt von 2,2 cem. ab plötzlich eine starke Trübung und starke Fällung folgt. Demgemäss lag der Verdacht nahe, dass es sich um zwei verschiedene Körper handle; denn bei der fractionirten Salzfallung einheitlicher Eiweissstoffe sind bei dieser allmählichen Zunahme des Salzgehaltes derartig unregelmässige Steigerungen der Ausfällung nicht zu beobachten.

Der Beginn der Trübung bei 1,2 cem. gesättigter Ammonsulfatlösung in 10 cem. Gesamtlüssigkeit entspricht nach von Dr. O. Loew im hiesigen Laboratorium ausgeführten Versuchen der unteren Fällungsgrenze des Lieberkühn'schen Alkalialbuminats. In diesem Fall ist aber die Ausfällung des Albuminates bei 2,2 cem. zu Ende, während im obigen Versuch bei dieser Salzconcentration erst die Hauptmenge des Caseins zu fallen beginnt. Dieses Verhalten spricht eher gegen als für die Einheitlichkeit des nach Hammarsten gewonnenen Caseins. Nach Analogie der bei Fractionirung anderer Eiweisskörper gewonnenen Erfahrungen wäre der Schluss nahe liegend, dass es der Hauptmenge nach aus einem von 2,2—3,6 cem. Ammonsulfat fallenden Eiweissstoff — dem reinen Casein — und daneben aus einer geringen Menge eines von 1,2—2,2 cem. abscheidbaren albuminatähnlichen Körpers bestände. Ein abschliessendes Urtheil über diesen Punkt habe ich bisher nicht gewonnen, da es mir nicht gelang, den albuminatähnlichen Körper (so will ich ihn der Kürze wegen nennen) in Mengen zu isoliren, die seine Charakterisirung ermöglicht hätten.

Für die nachstehend mitgetheilten Ergebnisse der Verdauungsversuche ist diese Unsicherheit in Betreff der Einheitlichkeit des Caseins insofern von Bedeutung, als eine Beurtheilung derselben in quantitativer Richtung geboten ist. Die Menge des albuminatähnlichen Körpers ist jedenfalls dem eigentlichen Casein gegenüber eine sehr geringe. Dort, wo bestimmte Verdauungsprodukte in reichlicher Menge und gewisse Reactionen sehr prägnant auftreten, können sie nur auf das Casein als solches bezogen werden. Betreffs der in sehr kleinen Mengen auftretenden Produkte und verschwindend schwacher Reactionen muss es aber dahingestellt bleiben, ob sie nicht von dem albuminatähnlichen Stoff herrühren. In dieser Richtung ist schon in Betreff der oben angeführten Reactionen des Caseins zweifelhaft, ob nicht die so minimal auftretende Kohlehydratreaction und eventuell auch die Schwärzung mit Bleioxyd in alkalischer Lösung auf die albuminatähnliche Beimengung zu beziehen ist.

Zu Vorversuchen wurden übrigens, da die eigenhändige Darstellung des Caseins sehr zeitraubend ist, auch Handelspräparate, und zwar solche von Schering und den Höchster Farbwerken in Anwendung gebracht.

## II. Trennung der Verdauungsprodukte des Caseins.

Als Verdauungsflüssigkeit diente 0,4% ige Salzsäure, versetzt mit Pepsinum purissimum von Grübler, welches sich als frei von anderen Beimengungen, speciell Albumosen, und als sehr wirksam erwiesen hatte. Es wurde darauf geachtet, dass die Verdauungsflüssigkeit nie mehr wie 2% Trockensubstanz enthielt; die Verdauung ging in einem Brütraum, dessen Temperatur permanent auf ca. 40° gehalten wurde, rasch vor sich; um jedes der verschiedenen Spaltungsprodukte in hinreichender Menge zu erhalten, wurde die Digestion in den einzelnen Versuchen verschieden lange Zeit ausgedehnt. Nach Unterbrechung der Verdauung wurde mit Ammoniak genau neutralisirt (bei manchen käuflichen Präparaten, wie sie zu Vorversuchen verwendet wurden, wurde zur Abscheidung des Neutralisationspräcipitates, das dem reinen Casein fehlt, kurz aufgeköcht und filtrirt) und auf weniger als die Hälfte eingeeengt, da bei der späteren Zufügung der zur Ausfällung der einzelnen Fractionen erforderlichen Ammonsulfatlösung sonst die Flüssigkeitsmengen zu gross würden. Nach dem Einengen war meist noch eine Wiederherstellung der neutralen Reaction nöthig, da die Flüssigkeit beim Erhitzen leicht wieder sauren Charakter annimmt.

Für die Trennung der durch Salz fällbaren Verdauungsprodukte wurde Ammonsulfat in der von E. P. Pick angenommenen Versuchsanordnung benutzt. Von der Wiedergabe der mir vorliegenden zahlreichen Versuchstabellen sehe ich ab, indem ich in Betreff von Einzelheiten der Ausführung auf Pick's Mittheilung verweise.

Es ergab sich bei neutraler Reaction und Anwendung von gesättigtem Ammonsulfat zunächst eine I. Fraction, welche bei einem Gehalt von 2,6 cem. gesättigter Ammonsulfatlösung in 10 cem. Gesamttlüssigkeit auszufallen begann, bei 4,4 cem. völlig abgeschieden war. Diese Fraction, deren nähere Charakterisirung weiter unten folgt, wurde durch Versetzen von 10 Volumen der Verdauungsflüssigkeit mit 9 Volumen Ammonsulfatlösung ausgefällt. Hierbei schied sich ein flockiger Niederschlag ab, der nach kurzer Zeit als eine bräunliche Kruste auf der Oberfläche schwamm. Da es rathsam ist, einen Tag oder wenigstens mehrere Stunden absitzen zu lassen, um absolut klare Filtrate zu erhalten, so wurde erst nach dieser Zeit abfiltrirt, und mit dem Filtrat die fractionirte Fällung fortgesetzt.

Für die zunächst zu erhaltende II. Fraction wurden als untere Fällungsgrenze 5,2 cem., als obere 7,2 cem. Ammonsulfatlösung in 10 cem. Gesamttlüssigkeit ermittelt. Demgemäss ist bei einem Gehalte von 7,5 Volumtheilen Ammonsulfat auf 10 Theile Gesamtlösung die Abscheidung von Fraction II sicher erreicht.

Es wurde daher 1 Volumen der ursprünglichen neutralisirten Verdauungslösung mit 3 Volumen Ammonsulfatlösung ausgefällt und das Filtrat weiterer Prüfung unterworfen. Dabei ergab sich die Anwesenheit einer weiteren III. Fraction, deren untere Fällungsgrenze bei 8,2 lag, deren obere aber dem Sättigungspunkte so nahe war, über 9,5 cem., dass sie nicht mehr scharf bestimmt werden konnte.

Da nun nach Kühne's<sup>1)</sup> Untersuchungen Ammonsulfat in neutraler Lösung nicht sämtliche Albumosen abzuschneiden vermag, so wurde versucht, ob sich nicht aus dem salz-

1) Zeitschr. f. Biologie. N. F., Bd. XI, 1892.



gesättigten Filtrat bei Aenderung der Reaction eine weitere Fraction isoliren liesse. Eine vorläufige Prüfung in dem salzgesättigten Filtrat ergab thatsächlich auf tropfenweisen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure eine Trübung, und es wurde daher ermittelt, welcher Säuregrad erforderlich ist, eine IV. Fraction vollkommen abzuschneiden; es gelangte eine ammoniumsulfatgesättigte Schwefelsäure zur Verwendung, von der 10 ccm. im Stande waren, 8,4 ccm.  $\frac{1}{5}$  normale Natronlauge zu neutralisiren; dieselbe war also annähernd gleich der von Pick und Umber verwendeten gewählt, um sicherere Vergleichsergebnisse zu ermöglichen. Es ergab sich hierbei Folgendes:

Salzgesättigtes Filtrat	Salzgesättigte Säure		Filtrat mit 0,4 ccm. Ammonsulfat geprüft
2	0,1	klar	Trübung
2	0,2	klar	Trübung
2	0,4	Opalescenz	stärkere Trübung
2	0,6	Trübung	stärkere Trübung
2	0,8	starke Trübung	etwas schwächere Trübung
2	1,0	starke Trübung	klar
2	1,2	etwas geringere Trübung	klar
2	1,4	schwache Trübung	klar
2	1,6	} stetig abnehmende Trübung	klar
2	2,0		klar
2	2,5		klar
2	3,0		klar
2	3,5		—
2	5	} schwache Opalescenz	—
2	6		—
2	8		klar

Demgemäss wurde das salzgesättigte Filtrat mit dem halben Volumen der salzgesättigten Schwefelsäure versetzt: hierbei trat zuerst eine milchige Trübung auf und erst nach 8 bis 12 Stunden begann sich ein flockiger Niederschlag abzusetzen. Diese IV. Fraction wurde stets erst am anderen Tage abfiltrirt. Das Filtrat trübte sich weder bei wechselndem Zusatz von Säure noch bei Zusatz von Ammoniak und Ammoniumcar-

bonat, gab aber noch eine deutliche Biuretreaction. Es war daher die Existenz von Verdauungsprodukten peptonartigen Charakters anzunehmen. Zur Isolirung derselben wurde mit einer ammoniumsulfatgesättigten Lugol'schen Lösung gefällt: es schied sich ein reichlicher, flockiger, braunrother Niederschlag ab; derselbe wurde abfiltrirt, und das Filtrat mit derselben Lugol'schen Lösung auf Vollständigkeit der Ausfällung geprüft. Auf dem Filter wurde der Niederschlag mit 95%igem Alkohol übergossen: hierbei ging der grösste Theil in Lösung, nur ein geringer, überdies sehr ammoniumsulfatreicher Rest blieb ungelöst zurück.

Der in Alkohol nicht gelöste Theil — Fraction V — wurde mehrmals in Wasser aufgenommen und von Neuem mit Alkohol gefällt, um sämtliche alkohollöslichen Produkte zu beseitigen. Die Ausbeute war sehr gering. Proben der Fällung gaben eine deutliche, wenn auch schwache Biuretreaction.

Die Reinigung des in Alkohol leicht löslichen Theiles — Fraction VI — von Ammonsulfat gelang rasch mit Hilfe von starkem Alkohol, worin Ammonsulfat unlöslich ist. Die Befreiung von Jod wurde zuerst durch Fällern mit Bleiacetat versucht, doch gelang auf diesem Wege die totale Entfernung des Jods nicht. Dagegen erwies sich Silberacetat als geeigneter. (Fraction V war auf Grund dieser Erfahrung von vornherein mit *Argentum aceticum* behandelt worden.) Die alkoholische Lösung wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Silberacetat gefällt, das ausgeschiedene Jodsilber abfiltrirt, im Filtrat das überschüssige Silber mit Schwefelwasserstoff gefällt, und durch das Filtrat zur Verjagung des Schwefelwasserstoffs mehrere Stunden ein Luftstrom geleitet. Dann wurde zur Trockne eingedampft. Es resultirte am Schluss ein braunes Pulver, welches sich als absolut jodfrei erwies.

Nach diesem Verhalten ist anzunehmen, dass zwei Peptone, ähnlich wie sie Pick aus dem Witte-Pepton isolirt, vorhanden seien, jedoch in weitaus überwiegender Menge das in Alkohol leichter lösliche.

### III. Charakteristik der einzelnen Fractionen.

Es erübrigt nun noch, die einzelnen Fractionen näher zu charakterisiren. Um jede derselben in reichlicher Menge zu erhalten, war es erforderlich, ungleich grosse Quantitäten Casein verschieden lange zu verdauen, denn bereits nach zwölfstündiger Digestion ist die I. Fraction nur noch spärlich vorhanden, wemgleich sie auch nach 3 Tagen noch immer nicht ganz verschwunden ist. Die durch mehr Ammonsulfat fällbaren Fractionen waren noch nach neuntägiger Verdauung vorhanden. So schnell also die Hauptmenge der ersten Spaltungsprodukte verdaut wird, so langsam verschwindet ihr Rest. (Die orientirenden Vorversuche wurden mit den käuflichen Präparaten angestellt.)

Die Verdauungslüssigkeit wurde behufs Gewinnung der I. bis IV. Fraction genau wie oben behandelt. Jede Fraction wurde drei Mal gefällt, gewaschen, gelöst und nach dem vierten Fällen auf dem Filter getrocknet, sodann zu einem feinen Pulver verrieben und über Schwefelsäure getrocknet. Zur Anstellung der Reactionen wurde eine möglichst concentrirte Lösung hergestellt. Behufs Gewinnung von Fraction V und VI wurde in der schon beschriebenen Weise das Filtrat von Fraction IV mit ammoniumsulfatgesättigter Lugol'scher Lösung gefällt, und die Trennung der Peptone mit Alkohol durchgeführt.

Die charakteristischen Reactionen wurden theils mit concentrirten Lösungen, theils mit fester Substanz ausgeführt: absolute Beseitigung des Ammonsulfats wurde nicht angestrebt, einige Fractionen, wie die I. und VI., erwiesen sich übrigens als fast frei von Ammonsulfat, die meisten zeigten einen geringen Salzgehalt, der den Ausfall der Reactionen nicht beeinflusst haben dürfte. Nur die alkoholunlösliche Fraction V war stark ammoniumsulfathaltig; doch war es nicht möglich, dieselbe salzfrei zu machen, ohne sie ganz zu verlieren.

Nebenstehende Tabelle (Seite 422 u. 423) gibt eine Uebersicht über die Reactionen der einzelnen Fractionen.

Den angeführten Reactionen nach ist die I. Fraction zu den primären Albumosen zu zählen: sie trübt sich auf Zusatz von verdünnter Kupfersulfatlösung und auf Zusatz von Salpetersäure ohne Beifügung von Salz. Diese primäre Albumose

Reagens.	Fraction I.	Fraction II.	Fraction III.
95%iger Alkohol.	Fällung.	Fällung.	Fällung
Salpetersäure in der Kälte.	Trübung, die sich in der Hitze löst und beim Erkalten wiederkehrt.	Trübung erst auf Zusatz von Na Cl.	Trübung auf Sättigung mit Na Cl.
Gleiches Volumen ges. Na Cl-Lösung zu der mit Essigsäure angesäuerten Lösung gesetzt.	Starke Trübung, die sich in der Hitze löst und beim Erkalten wiederkehrt.	Wie Fraction I.	Negativ.
Verdünntes Kupfersulfat.	Geringe Trübung.	Negativ.	Negativ.
Essigsäure-Ferrocyankalium.	Deutliche Trübung.	Wie Fraction I.	Geringe Trübung.
Pikrinsäure.	Starke Fällung, die sich in der Hitze löst und beim Erkalten wiederkehrt.	Wie Fraction I.	Trübung, in der Hitze löslich, in der Kälte wiederkehrend.
Trichloressigsäure.	Fällung, die in der Hitze löslich ist und beim Erkalten wiederkehrt.	Wie Fraction I.	Mässige Trübung, in der Hitze löslich, beim Erkalten wiederkehrend.
Gerbsäure.	Niederschlag, der sich in der Hitze unter Abscheidung eines röthlichen Präcipitates etwas löst.	Wie Fraction I.	Etwas geringerer Ausfall wie bei I und II.
Jodquecksilberjodkalium.	Starke Fällung; Ueberschuss fast ganz löslich.	Wie Fraction I.	Wie Fraction I.
Millon's Reagens.	Tiefrother Niederschlag.	Wie Fraction I.	Wie Fraction I.
Xanthoprotein-reaction.	Gelbe Trübung, die auf Zusatz von Alkali orange wird.	Gelbfärbung ohne Trübung.	Wie Fraction II.
Probe nach Adamkiewicz.	Ganz schwacher rosafarbener Ring nach längerem Stehen.	Wie Fraction I.	Wie Fraction I.
Molisch's Reaction.	Negativ.	Negativ.	Ganz schwach violett bläulicher Ring.
Biuretreaction.	Positiv.	Positiv.	Positiv.
Reaction auf durch Alkali abspaltbaren Schwefel.	Negativ.	Eine Spur von Braunfärbung.	Negativ.
Phosphornachweis.	Schwach positiv.	Stark positiv.	Positiv.

Reagens.	Fraction IV.	Fraction V. (alkoholunlöslich)	Fraction VI. (alkohollöslich.)
95% iger Alkohol.	Fällung bei Zusatz von Alkohol im Ueberschuss.	Fällung in grossem Ueberschuss.	Negativ.
Salpetersäure in der Kälte.	Negativ.	Negativ.	Negativ.
Gleiches Volumen ges. Na Cl-Lösung zu der mit $\text{CH}_3\text{COOH}$ angesäuerten Lösung gesetzt.	Negativ.	Negativ.	Negativ.
Verdünntes Kupfersulfat.	Negativ.	Negativ.	Negativ.
Essigsäure-Ferrocyankalium.	Negativ.	Negativ.	Negativ.
Pikrinsäure.	Wie Fraction III.	Negativ.	Negativ.
Trichloressigsäure.	Wie Fraction III.	Negativ.	Negativ.
Gerbsäure.	Geringe Trübung, die sich in der Hitze etwas aufhellt.	Geringe Trübung.	Geringe Trübung.
Jodquecksilberjodkalium.	Wie Fraction I.	Negativ.	Negativ.
Millon's Reagens.	Wie Fraction I.	Ganz schwache Orangefärbung.	Negativ.
Xanthoprotein-reaction.	Wie Fraction II.	Geringe Gelbfärbung.	Geringe Gelbfärbung.
Probe nach Adamkiewicz.	Wie Fraction I.	Wie Fraction I.	Wie Fraction I.
Molisch's Reaction.	Schwach positiv.	Negativ.	Negativ.
Biuretreaction.	Positiv.	Positiv.	Positiv.
Reaction auf durch Alkali abspaltbaren Schwefel.	Negativ.	Negativ.	Negativ.
Phosphornachweis.	Positiv.	Positiv.	Positiv.

wurde auf ihre Zusammensetzung aus Proto- und Heteroalbumose geprüft. Die wässrige Lösung wurde mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols versetzt und 5—13 Stunden unter Rückflusskühler gekocht: hierbei trat eine ganz geringe Trübung ein, die sich leicht abfiltriren liess, und die nach noch nicht veröffentlichten Untersuchungsergebnissen des hiesigen Laboratoriums auf einen, in diesem Fall minimalen, Gehalt an Heteroalbumose zu beziehen ist. Das klare alkoholische Filtrat wurde zur Trockne eingedampft, und der Rückstand in heissem Wasser gelöst: hierbei blieb eine geringe Menge einer harzig-schmierigen Masse ungelöst, die sich auf Zusatz von Alkali löste, um in Säure wieder auszufallen, und die einem Theil des von den Autoren als Dysalbumose bezeichneten Gemenges entsprechen dürfte. Durch Dialyse der I. Fraction konnte eine Abscheidung überhaupt nicht erzielt werden. Eine Protoalbumose bildete also bei Weitem den Hauptantheil der I. Fraction, wie auch Chittenden und Painter<sup>1)</sup> beobachteten.

Die Fractionen II, III, IV sind nach dem Ausfall ihrer Reactionen unzweifelhaft der Gruppe der Deuteroalbumosen zuzuzählen, ebenso Fraction V und VI den Peptonen.

Versucht man auf Grund der von Thierfelder und Chittenden gegebenen Daten festzustellen, welche der von diesen gefundenen Verdauungsprodukte mit den von mir isolirten Fractionen zusammenfallen, so ergibt sich beistehende Tabelle:

Fractionen.	Thierfelder.	Chittenden.
I. Gemenge der primären Albumosen.	Propepton I.	Proto und Heterodyscaseose.
II. Sec. Albumose A.	Propepton II.	a Deuterocaseose.
III. Sec. Albumose B.	Pepton.	b Deuterocaseose.
IV. Sec. Albumose C.		
V. Pepton A.		
VI. Pepton B.		

<sup>1)</sup> a. a. O.

#### IV. Vergleich der peptischen Spaltungsprodukte des Caseins mit jenen anderer Eiweißkörper.

Die Erwartung, dass das Casein als Nucleinkörper bei der Pepsinverdauung einen schwer angreifbaren phosphorhaltigen Rückstand in erheblicher Menge liefern würde, erfüllte sich nicht. Wie Salkowski,<sup>1)</sup> so sah auch ich das Casein, wenn nur ein gut verdauliches Präparat vorlag, bei richtiger Versuchsanordnung rasch bis auf geringe Reste verschwinden. Ich suchte mich dann über den Verbleib des Phosphors in den einzelnen Verdauungsprodukten zu orientiren. Der Phosphorgehalt wurde durch Schmelzen mit Sodasalpeter, Lösen der Schmelze in Wasser, Ansäuern mit Salpetersäure, Fällen mit molybdänsaurem Ammon und Erwärmen auf ca. 50° nachgewiesen: es zeigten alle Fractionen eine positive Reaction, jedoch war ganz auffällig, dass stets die zweite, der Deuteroalbumose A entsprechende, Fraction eine auffallend starke Reaction bot. Die Frage nach der Bindung des Phosphors überschreitet den Rahmen der vorliegenden Untersuchung. Doch sei bemerkt, dass die von mir gefundene Verbreitung der Phosphorreaction keinesfalls zu dem Schlusse berechtigt, dass die gebildeten Spaltungsprodukte sämmtlich phosphorhaltig sind. Eine solche Annahme dürfte für die secundäre Albumose A gestattet sein, bedürfte aber auch da eines besonderen Beweises.

Die physikalische Beschaffenheit der Albumosen, sowie die angewandte Methode der fractionirten Salzfällung lassen bei allen Schlussfolgerungen aus dem reactionellen Verhalten Vorsicht geboten erscheinen. Einerseits sind die in einzelnen Fractionen fällbaren Albumosen in der betreffenden Salzlösung nicht so absolut unlöslich, dass nicht Spuren der Fällung entgehen und die später gefällten Fractionen verunreinigen könnten, andererseits haften die Albumosen als colloide Körper flockigen Niederschlägen leicht an, und so gehen kleine Mengen schwer fällbarer Albumosen immer in die Zusammensetzung der leichter fällbaren Fractionen ein: durch wiederholtes Lösen und Füllen einer Fraction lassen sich zwar diese Beimengungen vermindern, sie ganz zu beseitigen, gelingt jedoch ausserordentlich schwer. Wenn daher eine Fraction bei Untersuchung

<sup>1)</sup> a. a. O.

mit einer erfahrungsgemäss sehr empfindlichen Reaction, z. B. Millon, Molisch, Adamkiewicz, nur ein sehr schwach positives Ergebniss liefert, das bei einer anderen Fraction sehr deutlich auftritt, so kann der Verdacht, dass es sich nur um eine geringfügige Beimengung der letzteren Fraction handelt, nicht von der Hand gewiesen werden. Aus diesem Grunde kann meines Erachtens sehr schwach positiv ausfallenden Proben an sich nicht viel Gewicht beigelegt werden, wohingegen das negative Ergebniss, natürlich nur bei empfindlichen Reactionen, umso mehr ins Gewicht fällt.

Diese Erwägungen machen es schwer, in Betreff des Verbleibs des Phosphors in dem Verdauungsgemenge eine ganz bestimmte Meinung auszusprechen. Ich habe mich auch bei der nachfolgenden Besprechung der Reactionsverschiedenheiten der einzelnen Fractionen von denselben Gesichtspunkten leiten lassen.

In Betreff des nachstehend durchgeführten Vergleichs der Caseinalbumosen mit den Verdauungsprodukten anderer Eiweisskörper verweise ich auf die von Ueber<sup>1)</sup> mitgetheilte Uebersicht.

Das Gemenge von primären Albumosen des Caseins stimmt in seinen Fällungsgrenzen (2,6—4,4) genau mit der gleichen Fraction aus Fibrin (nach E. P. Pick<sup>2)</sup>) überein. Es ist dadurch ausgezeichnet, dass es durch Dialyse sowohl wie durch die viel empfindlichere fractionirte Alkoholfällung nur ganz geringe Mengen einer Substanz vom Verhalten einer Heteroalbumose zu isoliren gestattet. Daher kommt dem Casein derjenige Complex, welcher bei anderen Eiweisskörpern die reichliche Bildung von Heteroalbumose bedingt, nur in spärlicher Menge zu. Die Hauptmenge der primären Albumosen des Caseins stellte nach erfolgter Reinigung eine Protoalbumose dar, welche beachtenswerther Weise keinen durch Alkali abspaltbaren Schwefel und bei Prüfung mit den Furfurolreactionen nur Spuren von Kohlehydrat erkennen liess. Es sei darauf hingewiesen, dass nach Ueber die Heteroalbumose z. B. des Eieralbumins die furfurolbildende Gruppe viel reichlicher enthält, als die entsprechende Protoalbumose.

Von den secundären Albumosen des Caseins ist beachtenswerther Weise die Fraction II (secundäre Albumose A) der

---

1) a. a. O.

2) a. a. O.



Menge nach bei Weitem die mächtigste, dementsprechend ist sie auch bei Thierfelder und Chittenden als besonderes Verdauungsprodukt unterschieden worden. In dieser Beziehung steht das Casein dem Serumglobulin am nächsten, da von den bisher untersuchten Eiweisskörpern bloss das Serumglobulin diese Fraction reichlich liefert. Die Analogie zwischen Globulin und Casein in diesem Punkte tritt besonders noch in den Fällungsgrenzen (Globulin 5,6—7,2, Casein 5,2—7,2) hervor, während die entsprechenden secundären Albumosen des Fibrins, krystallisirten Eieralbumins und krystallisirten Serumalbumins durch eine obere Fällungsgrenze bei 6,2 ccm. charakterisirt sind.

Die Lösung dieser Albumose schwärzte sich im Gegensatz zu den übrigen Fractionen, wenn auch nur schwach, beim Kochen mit alkalischer Bleioxydlösung, wie denn auch Pick und Umber für die von ihnen untersuchten schwefelreicheren Eiweisskörper gerade bei dieser Fraction die deutlichste Schwefelabspaltung gesehen hatten.

Die secundäre Albumose B, die beim Fibrin, krystallisirten Eieralbumin und krystallisirten Serumalbumin die Hauptmenge der secundären Albumosen darstellt, tritt beim Casein in weit hinter A zurückstehender Menge auf: sie und die stets spärlich auftretende secundäre Albumose C sind die einzigen Fractionen, die eine geringe Molisch'sche Reaction darbieten.

Das durch Alkohol fällbare Pepton (Caseinpepton A) war, wie oben erwähnt, nur in so kleinen Mengen erhältlich, dass es vom Ammonsulfat gar nicht getrennt werden konnte. Ja es besteht bei mir berechtigter Zweifel, ob die geringen Mengen Biuretreaction gebender Substanz, die bei der Fällung mit Alkohol zugleich mit dem Ammonsulfat niedergeschlagen werden, nicht überhaupt als Beimengung seitens einer anderen Fraction aufgefasst werden müssen.

Dieses Ergebniss ist für das Casein besonders charakteristisch. Es hängt anscheinend mit dem geringen Gehalt desselben an Kohlehydrat zusammen. Denn bei den aus anderen Eiweisskörpern bisher ganz analog gewonnenen fällbaren Peptonen war die Kohlehydratreaction ganz besonders schön erhältlich.

Das äusserst spärliche Auftreten von Heteroalbumose und Pepton A einerseits, der schwache Ausfall der Furfurolreactionen beim nativen Casein andererseits legen die Deutung nahe, dass der am Casein so unansehnlich vertretene Heteroalbumosen-complex zugleich der Träger der im Kern der Eiweisskörper enthaltenen Kohlehydratgruppe<sup>1)</sup> ist.

Das alkohollösliche Pepton B unterschied sich kaum in Verhalten und Reactionen von dem von Pick aus Witte-Pepton erhaltenen. Es löst sich in 95%igem Alkohol und dürfte dem von J. Sebelien<sup>2)</sup> durch Gerbsäurefällung dargestellten, durch Ammonsulfat nicht mehr fällbaren Caseinpepton entsprechen. Die Angabe Chittenden's,<sup>3)</sup> dass aus Casein keine echten, d. i. durch Ammonsulfat nicht mehr fällbaren Peptone entstehen, dürfte darin ihre Erklärung finden, dass die Bildung dieses letzten Spaltungsproduktes in erheblicherer Menge ziemlich spät erfolgt.

Während die Albumosen eine äusserst intensive Millon'sche Reaction zeigten, war dieselbe bei den Peptonen negativ. Es drängt dies zu der Annahme, dass eine ausgedehntere Abspaltung der Oxyphenylgruppe beim Uebergang von den Albumosen zu den Peptonen statt hat. Der schwache Ausfall der Adamkiewicz'schen Reaction bei dem starken der Millon'schen steht mit der Annahme Hofmeister's<sup>4)</sup> im Einklang, dass die Probe von Adamkiewicz auf einer gleichzeitigen Anwesenheit der Oxyphenyl- und Kohlehydratgruppe beruhe.

Wie Umber bereits hervorgehoben hat, ist der Abbau der Eiweissstoffe mit Pepsin und Salzsäure ein geeignetes Verfahren, die grossen Complexe, aus denen sich das Eiweissmolekül zusammensetzt, voneinander zu lösen und so einen Einblick in den Bau desselben zu vermitteln, der bei weiterer Spaltung in die als Endprodukte aufzufassenden Amido- und

1) Ueber die Natur des in den meisten Eiweisskörpern, speciell in dem als Pepton A abspaltbaren Complex, enthaltenen Kohlehydrates soll aus dem hiesigen Institut binnen Kurzem Näheres berichtet werden.

2) Chem. Centralblatt 1890, 1, 171.

3) a. a. O.

4) Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXIV.

Diamidosäuren nicht zu gewinnen ist. Von diesem Gesichtspunkte aus muss dem Casein wegen des Zurücktretens des Heteroalbumosencomplexes und des kohlehydrathaltigen Peptons A ein wesentlich anderes Gefüge zugesprochen werden, als den bisher in gleicher Richtung untersuchten Eiweisskörpern: Fibrin, Globulin, krystallisirtes Serumglobulin und krystallisirtes Eieralbumin.

Die Eingangs erwähnten Beobachtungen über die fractionirte Fällung des Caseins mit Ammonsulfat haben die Vermuthung nahegelegt, dass selbst das reinste bisher darstellbare Casein mit einer kleinen Menge eines albuminatähnlichen Eiweisskörpers verunreinigt ist. Es bleibt noch die Möglichkeit offen, dass ein von dieser Beimengung freies Casein sich als völlig frei von dem Heteroalbumosencomplex und der Kohlehydratgruppe erweist. Ich muss mir vorbehalten, diese Frage nach der Beschaffung ausreichenden Ausgangsmaterials neuerlich in Angriff zu nehmen.

Wie sich auch die Antwort auf diese Frage gestalten mag, an der Thatsache, dass die Structur des Caseins von der anderer Eiweisskörper schon in den Grundzügen wesentlich abweicht, wird sie nichts ändern. Diese Thatsache ist aber für die Beurtheilung der Bildung des Caseins einerseits, seiner Verwendung im Thierkörper andererseits von massgebender Bedeutung. Ich kann eine Erörterung der von diesem Gesichtspunkte ausgehenden Vorstellungsreihen umso eher unterlassen, als eine Prüfung derselben auf experimentellem Wege durchaus im Bereiche der Möglichkeit liegt.