

Über die Gerinnung der Milch.

Von

Dr. A. S. Loevenhart.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Johns Hopkins Universität,
Baltimore Md.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. Januar 1904.)

Milch gerinnt unter den folgenden Bedingungen:

1. Beim Stehen erfolgt spontane Gerinnung mit der Bildung einer sauren Molke.
2. Abgestandene und sauer gewordene Milch koaguliert beim Erhitzen.
3. Frische Milch gerinnt beim Zusatz von Säuren.
4. Frische Milch gerinnt beim Erhitzen auf 110° — 130° in einer geschlossenen Röhre.
5. Frische Milch gerinnt beim Erhitzen mit CaCl_2 .
6. Unter geeigneten Bedingungen verursacht Lab die Gerinnung der Milch.
7. Zusatz sehr kleiner Mengen von Lab ändern die Konsistenz der Milch nicht. Solche Milch gerinnt jedoch beim Kochen.
8. Milch gerinnt häufig während eines Gewitters. Über den Grund dieser Erscheinung ist man sich noch nicht klar geworden.
9. Elektrolyse bringt die Milch zum Gerinnen.

In 1, 3, 4, 8 und 9 ist die Gerinnung auf Rechnung einer Säure zu setzen, die das Casein aus seiner Calciumverbindung befreit.

Die Wirkung von Salzen auf Milch. Hammarsten¹⁾ war der erste, der die Wirkung der Kalksalze auf die Lab-

¹⁾ Malys Jahresberichte 1872, 1874, 1877.

gerinnung der Milch hervorhob. Nach ihm verläuft die Labgerinnung in zwei Phasen. Die erste Phase besteht in der Spaltung des Caseins durch Lab mit der Bildung von wenig Molkeneiweiß und einer Substanz, die dem ursprünglichen Casein sehr ähnlich ist. Diese letztere wird in der zweiten Phase durch die Kalksalze gefällt, während das Lab sich passiv verhält.

Arthus und Pagès¹⁾ bestätigten die zweiphasische Natur der Labgewinnung. Die beiden letzteren Autoren konnten dies in eklatanter Weise zeigen, indem sie gelabte Milch mit einer kleinen Menge von Kaliumoxalat behandelten. Während nun bei 40° keine Gerinnung eintrat, erfolgte sie sofort auf Zusatz einer kleinen Menge CaCl₂. Weiterhin sind die Calciumsalze imstande, die Gerinnung herbeizuführen, nachdem das Lab durch Erhitzen zerstört wurde. Damit ist erwiesen, daß die beiden Faktoren Lab und Calciumsalze in ihrer Wirkung völlig voneinander unabhängig sind. Ringer²⁾ versetzte Milch mit wechselnden Mengen CaCl₂ und beobachtete, daß beim Erwärmen Gerinnung eintrat. Je geringer die Menge des zugesetzten CaCl₂ war, desto höher mußte erhitzt werden, um Gerinnung zu erzielen. Die Wiederholung der Versuche Ringers führte zu einigen sehr interessanten Resultaten. Werden 5 ccm Milch mit 0,2 ccm $\frac{n}{1}$ CaCl₂ behandelt und auf 60° erhitzt, so tritt innerhalb zwei Minuten vollständige Gerinnung ein mit Auspressung einer klaren Molke nach einiger Zeit. Die Beziehung zwischen der Temperatur und der Menge CaCl₂, die nötig sind, um zur Gerinnung zu führen, erhellt aus der beigegebenen Tabelle.

Menge der Milch ccm	Temperatur	CaCl ₂ ccm
5,0	60°	0,2 $\frac{n}{1}$
5,0	80°	0,1 $\frac{n}{1}$
5,0	100°	0,2 $\frac{n}{5}$

Größere Mengen von CaCl₂ verzögern den Eintritt der Gerinnung oder verhindern sie. Das Optimum ist 0,2 ccm $\frac{n}{1}$ CaCl₂ auf 5,0 ccm Milch, wie die folgende Tabelle zeigt. Die Temperatur war 60°.

¹⁾ Archives de Physiologie 1890, S. 331.

²⁾ Journal of Physiology 1890, Bd. 11, S. 464.

Milch ccm	$n/1$ CaCl_2 ccm	Wasser ccm	Resultat
5,0	0,1	0,9	Flocken in 5 Minuten
5,0	0,2	0,8	Völlige Fällung in 2 Minuten
5,0	0,3	0,7	Gerinnung in 2 Minuten
5,0	0,5	0,5	Flocken in 5 Minuten
5,0	1,0	0,0	Keine Gerinnung nach 45 Minuten.

Die beschriebene Wirkung des CaCl_2 ist allen löslichen Calciumsalzen, die zur Untersuchung kamen, gemeinsam. Untersucht wurden, wenn auch nicht quantitativ, die Calciumsalze von Brom, Jod, der Salpeter-, Ameisen-, Essig-, Milch-, Salicyl- und Phtalsäure. Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß Zusatz von CaCl_2 Milch auch bei 40° koaguliert. In den darauf bezüglichen Versuchen wurden die Korken, Reagensröhrchen und Reagentien gekocht, um jede mögliche Verunreinigung mit Lab auszuschließen. Zu 5,0 ccm Milch wurden 0,2 ccm $n/1$ CaCl_2 und einige Tropfen Toluol zugesetzt, um den Einfluß von Bakterien zu eliminieren. Diese Mischung wurde bei 40° aufbewahrt. Nach 120 Stunden hatte sich ein grobflockiges Präzipitat abgesetzt, das die überstehende Flüssigkeit ziemlich klar ließ. Dieser Versuch läßt die Wichtigkeit des Zeitfaktors in unserer Arbeit klar hervortreten. Um zu sehen, ob vielleicht das Resultat durch einen Gehalt der Milch an Lab beeinflusst wäre, wurden die Versuche mit gekochter Milch wiederholt. Die Gerinnung erfolgte innerhalb von 60—120 Stunden. Der Umstand, daß hierbei die gekochte Milch früher koaguliert als die frische, beweist, daß Lab nicht in frischer Milch vorkommt. Da CaCl_2 die Wirkung kleiner Mengen Lab bedeutend beschleunigt, so hätten sich selbst Spuren von Lab bei der eingehaltenen Versuchsanordnung der Entdeckung nicht entziehen sollen. Kontrollen, die an Stelle von CaCl_2 Wasser oder NaCl enthielten, blieben 10 Tage ungeronnen.

Die beschriebene Wirkung der Calciumsalze auf Milch ist nicht nur diesen eigentümlich. Einen ähnlichen Einfluß haben die Salze von Lithium, Beryllium, Magnesium, Strontium,

Baryum, sowie die Oxydulsalze von Eisen, Kobalt, Nickel und Mangan. Die Salze sind in der Reihenfolge der wachsenden Intensität ihrer Wirkung angeführt: Calcium steht zwischen Baryum und Eisen. Die Schwierigkeiten, eine genügend reine und neutrale Lösung von Berylliumchlorid herzustellen, verhinderte seine genaue Placierung. Es ist jedoch zweifellos, daß es in die Reihe der angeführten Salze gehört. Außer den Chloriden der Elemente wurden in einigen Fällen die Nitrate und Sulfate in den Bereich der Untersuchung gezogen, ohne daß sich jedoch auffallende Unterschiede bemerkbar machten. LiCl hat nur einen schwachen Einfluß auf die Gerinnung der Milch. $MgCl_2$, $SrCl_2$, $BaCl_2$ zeigen einen regelmäßigen Anstieg ihrer Aktivität, sind jedoch alle schwächer als $CaCl_2$, während $FeCl_2$, $CoCl_2$, $NiCl_2$ und $MnCl_2$ stärker sind als $CaCl_2$. Die Differenz zwischen der Wirksamkeit der letzteren vier Salze ist nicht genügend, um sie genau nach ihrer Aktivität anzuordnen. Auch hier stellte es sich heraus, daß ein Optimum für die zugesetzte Menge der Salze existiert, das für $MnCl_2$ bestimmt wurde. Die Temperatur war 40° .

	Milch ccm	$n/1$ $MnCl_2$ ccm	Wasser ccm	Zeit, in der die Gerinnung erfolgte
1.	5.0	0.1	0.3	4 Minuten
2.	5.0	0.2	0.2	1 $\frac{1}{4}$ »
3.	5.0	0.3	0.1	2 »
4.	5.0	0.4	0.0	7 »

Wurden 2,0 ccm $n/1$ $MnCl_2$ zu 5,0 ccm Milch zugesetzt, so trat selbst nach mehrtägigem Stehen im Brutschrank bei 40° keine Gerinnung ein. In 2 war das Gerinnsel so fest, daß das Röhrchen nach $1\frac{1}{4}$ Min. umgekehrt werden konnte. 0,2 $n/1$ stellte sich auch für $NiCl_2$ als das Optimum heraus. Daß 0,2 ccm $n/1$ von $CaCl_2$, $MnCl_2$ und $NiCl_2$ das Optimum ausmachten, dürfte wohl mehr als eine zufällige Koinzidenz sein. Alle die angeführten Experimente wurden mit unverdünnter Milch angestellt und es bedarf der Erwähnung, daß verdünnte Milch sich etwas verschieden verhält. So koaguliert $n/1$ $NiCl_2$ unverdünnte Milch

nicht bei Zimmertemperatur (21°), wohl aber Milch, die mit 4 Teilen Wasser verdünnt war. Auch die Reaktion der Mischung ist nicht gleichgültig für die Koagulation mittels der gegebenen Salze. So wird deren Wirksamkeit durch Alkalinität der Mischung wesentlich gefördert, wie der folgende Versuch in etwas roher Weise zeigt.

Werden zu 5,0 ccm Milch 0,3 ccm $n/1$ NaOH und 1,0 ccm $n/1$ CaCl_2 zugesetzt, so scheidet sich bei Zimmertemperatur ein dichtes flockiges Präzipitat aus. Werden nur 0,1 $n/1$ NaOH zugefügt, so gerinnt die Milch nicht mehr bei Zimmertemperatur, sondern erst beim Erhitzen. Werden 5,0 Milch mit 0,1 $n/1$ NaOH gekocht, dann abgekühlt, so bewirkt Zusatz von 1,0 $n/1$ CaCl_2 Gerinnung. Wird jedoch vor dem Zusatz des CaCl_2 neutralisiert, so tritt die Gerinnung nicht ein. Werden 100,0 ccm Milch in ein gleiches Volumen 30% iger Essigsäure langsam eingegossen, so erzeugt ein Zusatz von CaCl_2 zu dieser Mischung Gerinnung bei Zimmertemperatur. Versuchte man jedoch das Koagulum von der Zentrifuge mit Wasser zu waschen, so wurde es gelatinös. Erneuter Zusatz von CaCl_2 führte wiederum zur Gerinnung.

Paracasein: Nach Hammarsten besteht die Wirkung des Lab auf Milch in einer Spaltung des Caseins in Molkenweiß und Paracasein. Paracasein ist eine dem Casein sehr ähnliche Substanz und unterscheidet sich anscheinend von letzterem nur dadurch, daß es von Calciumsalzen schon bei gewöhnlicher Temperatur koaguliert wird, während Casein erst bei höheren Temperaturen ausfällt. Es wurde jedoch gezeigt, daß CaCl_2 bei $35-40^{\circ}$ imstande ist, Milch zu koagulieren, nur daß es dazu einer viel längeren Zeit bedarf. Demnach scheint in bezug auf CaCl_2 nur ein quantitativer Unterschied zwischen Casein und Paracasein zu bestehen. Diese Tatsache forderte zu einem Vergleich im Verhalten der Casein und Paracasein fällenden Mittel im allgemeinen gegenüber auf. Die Fällbarkeit der beiden Körper mit Salzen, Säuren und Alkohol wurde unter gleichen Bedingungen verglichen. Die Paracaseinlösungen wurden so hergestellt, daß dreifach verdünnte Milch mit einer kleinen Menge einer 0,1% igen Lablösung (Parke, Davis & Co.) behandelt

wurde. Nach einiger Zeit war die Labwirkung beendet, dann wurde das Gemisch mit einem gleichen Volumen Wasser verdünnt, genügend gekocht, um das Lab zu zerstören, und abgekühlt. Die Caseinlösung wurde genau ebenso hergestellt, nur daß die Lablösung vor dem Zusatz gekocht wurde. Auf diese Weise schien es besser möglich, zu vergleichbaren Resultaten zu gelangen, als wenn die isolierten Eiweißkörper zur Verwendung gekommen wären. Wenn nicht besonders erwähnt, so wurden zu allen Vergleichen solche Lösungen verwendet. Die Paracaseinlösung wird mit CaCl_2 leicht bei Zimmertemperatur gefällt, die Caseinlösung nicht. Es stellte sich heraus, daß alle jene oben erwähnten Salze, die Caseinlösungen (Milch) bei höheren Temperaturen koagulierten, auch fähig waren, Paracaseinlösungen zu fällen, und zwar genügten hierzu kleinere Mengen und niederere Temperaturen. Umgekehrt sind alle Salze, die Paracaseine bei Zimmertemperatur fällen, auch imstande, Caseine zu fällen, nur daß es größerer Mengen der Salze und höherer Temperaturen bedarf. Die Reihenfolge, in welcher die Salze gemäß ihrer Aktivität stehen, ist dieselbe, wie sie oben gegeben wurde.¹⁾ Daraus läßt sich schließen, daß die Fällung von Casein und Paracasein von derselben Eigenschaft der verschiedenen Salze und der fraglichen Eiweißkörper abhängig ist. In allen Versuchen konnte nur ein quantitativer Unterschied zwischen der Fällung des Casein und der des Paracaseins festgestellt werden.

Die Metalle zerfallen bezüglich der Wirksamkeit ihrer Salze auf Casein und Paracasein in drei Gruppen; 1. solche, die weder Casein noch Paracasein fällen; 2. solche, die Paracasein bei Zimmertemperatur rasch fällen, Casein jedoch nur bei höheren Temperaturen; 3. solche, die beide rasch bei Zimmertemperatur fällen. Zur ersten Gruppe gehören die stärksten Metalle wie Natrium, Kalium und auch Ammonium, zur zweiten Magnesium, Calcium, Strontium, Baryum, sowie Mangan-, Ferro-, Kobalto- und Nikelo-Salze. Die anderen Schwermetalle sowie Ferrisalze bilden die dritte Gruppe. Die

¹⁾ Lundberg-Malys Jahresbericht (1876) S. 11 zeigte, daß Magnesium-, sowie Strontium- und Baryumsalze Paracasein als Käse fällen.

einzelnen Gruppen sind nicht scharf von einander getrennt, sondern gehen allmählich ineinander über. So vermittelt Lithium den Übergang von der ersten zur zweiten Gruppe, da es Casein und Paracasein nur mit Schwierigkeit und nur, wenn in relativ großen Mengen angewandt, fällt. Osborne¹⁾ teilt die Salze des Caseins in zwei Klassen. Die Charakteristika der Klasse a. zu der das Mg-, Ca-, Sr- und Ba-Salz des Caseins gehört, sind: 1. Sie werden aus ihren Lösungen von irgend einer fein zerteilten Substanz gefällt und sind unfähig, ein Tonfilter zu passieren. 2. Ihre Lösungen sind ziemlich opaleszent. 3. Beim Erwärmen der Lösungen auf 35—40° stellt sich eine Trübung ein, die beim Abkühlen wieder verschwindet. 4. Beim längeren Erhitzen bilden die Lösungen Häutchen. 5. Die Lösungen reagieren mit Lab. Die zweite Klasse b umfaßt die NH₄-, Na- und K-Salze des Caseins. Alle eben angeführten Eigenschaften der Klasse a gehen ihnen ab. Alle Salze haben gemeinschaftlich die Fällbarkeit durch Säuren, Alkohol, Halb-sättigung mit Ammoniumsulfat und Sättigung mit Magnesiumsulfat. Das Lithiumsalz steht zwischen beiden Klassen, es neigt sich jedoch zur Klasse b. Eine deutliche Analogie zwischen Osbornes und unseren Beobachtungen ist augenscheinlich.

Um die Fällbarkeit des Caseins und Paracaseins durch die gewöhnliche Methode der Aussalzung zu untersuchen, wurden 25,0 ccm Milch mit demselben Volumen Wasser verdünnt und 5,0 ccm 0,1 0/0ige Lablösung zugesetzt. Nach Beendigung der Labwirkung (erste Phase) war die Paracaseinlösung fertig. Die Caseinlösung wurde ebenso zubereitet, nur daß gekochte Lablösung zugesetzt wurde. Zu jedem Versuch wurde 1,0 ccm dieser Lösungen verwendet. 0,2 ccm einer neutralen gesättigten Ammoniumsulfatlösung genügte, um bei Zimmertemperatur das Paracasein zu fällen, während Casein nicht gefällt wurde. Mit größeren Mengen von Ammoniumsulfat änderte sich das Verhalten. So folgte auf Zusatz von 0,6 ccm unmittelbar eine Ausfällung des Caseins in großen Flocken, während die Fällung des Paracaseins einige Minuten in Anspruch nahm. Auch hier also existiert ein Optimum der Salzkonzentration für die Fällung dieser Eiweiß-

¹⁾ Journal of Physiology, Bd. 27, 1901, S. 398.

körper. Analoge Versuche wurden mit neutralem absoluten Alkohol angestellt. 0,2—0,5 ccm Alkohol fällten das Paracasein, nicht aber das Casein. Zusatz von 1,0 ccm Alkohol fällt weder das eine noch das andere und es bedurfte eines Zusatzes von 2,5 ccm Alkohol, um eine Fällung zu erzielen. Bei dieser Konzentration wurde sowohl Casein als auch Paracasein gefällt. Auch für Alkohol ließ sich demnach ein Optimum der Konzentration für die Fällung konstatieren. Mit denselben Lösungen von Casein und Paracasein wurde ihre Fällbarkeit durch Essigsäure und Salzsäure bestimmt, sowie der Einfluß der Elektrolyten auf die Säurefällung. Daß Elektrolyten die Säurefällung des Caseins ungünstig beeinflussen, ist bekannt. Eine $n/10$ Essig- oder Salzsäure wurde benützt. In den Versuchen wurde jedesmal 1,0 ccm der Casein- oder Paracaseinlösung mit 10,0 ccm Wasser oder einer annähernd 2 ccm $n/1$ KCl-Lösung versetzt und dann die Säure tropfenweise zugefügt, bis sich ein deutliches Koagulum bildete.

Präparat	Säure	Lösung	Säure benötigt in ccm
1. Paracasein	Essigsäure	H ₂ O	0.2
2. »	»	KCl	0.6
3. Casein	»	H ₂ O	0.4
4. »	»	KCl	1.2
5. Paracasein	Salzsäure	H ₂ O	0.2
6. »	»	KCl	0.35
7. Casein	»	H ₂ O	0.25
8. »	»	KCl	0.4

Diese Tabelle zeigt, daß Paracasein weniger Säure zur Fällung verlangt, als Casein, außerdem, daß die Säurefällung beider Substanzen in demselben Grade von Elektrolyten verhindert wird. 1, 2, 3 und 4 lassen erkennen, daß die Anwesenheit des Salzes einen dreifach größeren Säurezusatz bedingt, um Casein und Paracasein zu fällen. Aus allen Versuchen erhellt, daß eine bedeutende Ähnlichkeit im Verhalten von Casein und Paracasein gegenüber Fällungsmitteln besteht und daß der einzige Unterschied zwischen ihnen in dieser Bezie-

hung ein quantitativer ist, wobei Paracasein geringerer Konzentrationen von Salzen, Alkohol und Säuren zur Ausfällung bedarf. Da die Alkoholfällung und Aussalzung physikalischer Natur und von der Komplexität der gelösten Substanz abhängig zu sein scheinen, so könnte man daraus schließen, daß Paracasein ein komplexerer Körper ist als Casein. Diese Zunahme der Komplexität beim Übergang des Caseins zum Paracasein könnte physikalischer oder chemischer oder gemischter Natur sein. In der Hoffnung, einiges Licht auf diese Frage zu werfen, wurden Analysen gemacht von Casein und Paracasein, die auf folgende Weise erhalten waren. Ein Liter frischer abgerahmter Milch wurde mit 200,0 ccm $\frac{1}{10}$ Ammoniumsulfat behandelt und vermittelst der Zentrifuge vom Rest des Fettes und vom Calciumoxalat befreit. Zu 500,0 ccm der Mischung wurden 0,05 g Lab in 25,0 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol zugefügt. Portion A. Zu Portion B wurde an Stelle der frischen gekochte Lablösung zugesetzt. Nach dreistündigem Stehen bei 37° wurden beide Portionen mit fünf Teilen Wasser verdünnt. Eine Probe von A wurde mit CaCl_2 bei Zimmertemperatur gefällt, eine Probe von B nicht, dieser Umstand bewies, daß das Lab eingewirkt hatte. A und B wurden nun kurz über der freien Flamme aufgeköcht, abgekühlt und jedes auf 5000,0 ccm verdünnt. Ihr Verhalten gegenüber CaCl_2 hatte sich nicht geändert. Beide Portionen wurden nun mit je 6,0 ccm 30%iger Essigsäure gefällt, das Präzipitat mit Wasser gewaschen und mit Alkohol, dann Äther getrocknet, ohne weiter gereinigt zu werden. Nach fünftägiger Extraktion im Soxhlet blieben 11,4 g von A und 12,6 g von B. Asche, Stickstoff und Phosphor von beiden wurden bestimmt.

	Asche	Stickstoff (Kjeldahl)	Phosphor
A	0,89%	14,82	0,772
B	0,87%	14,45	0,743

Da es aussichtslos erschien, auf diesem Wege über die Identität oder Verschiedenheit des Caseins und des Paracaseins Aufschluß zu erlangen, wurde von weiteren Analysen Abstand genommen.

Aus all den Angaben scheint hervorzugehen, daß bis jetzt zwischen Casein und Paracasein keine anderen Unterschiede ge-

funden wurden als solche, die einfach auf einer Verschiedenheit in der Größe der Lösungsaggregate beruhen; d. h. das Paracasein existiert in Lösung in einem höheren kolloidalen Zustand und also weiter entfernt vom Bereich der wahren Lösungen als das Casein. Auf diese Weise ließe sich erklären, warum Paracasein von allen Fällungsmitteln der Kolloide leichter ausgefällt wird als Casein. In bezug auf einige chemisch einfachere Kolloide wurde demonstriert,¹⁾ daß dieselbe Substanz in verschiedenem kolloidalen Zustande existieren kann und daß ihre Lösungsaggregate unter verschiedenen Bedingungen variieren können. Diese Tatsachen lassen es als sehr möglich erscheinen, daß Casein und Paracasein chemisch dieselbe Substanz sind, und daß die beobachteten Verschiedenheiten darauf beruhen, daß das Paracasein im Zustande eines höheren Grades der Assoziation sich befindet, als das Casein.

Der Einfluß der Decalcifikation auf die Milch. Läßt man auf 2,5 ccm Milch 1,0 $\frac{n}{10}$ Ammoniumoxalat bei Zimmertemperatur einwirken und fügt dann 1,0 ccm $\frac{n}{1}$ CaCl_2 zu, so scheidet sich sofort ein grobes Gerinnsel ab. Die Möglichkeit, daß hierbei etwa der entstehende Calciumoxalatniederschlag das Eiweiß mit sich reiße, wird dadurch widerlegt, daß bei etwas veränderter Versuchsanordnung die Reaktion ausbleibt. Setzt man nämlich zur Milch zuerst das CaCl_2 und dann das Ammoniumoxalat, so tritt keine Eiweißfällung ein. Das Resultat dieser Versuche ist ein sehr auffallendes. Es ist klar, daß das Ammoniumoxalat eine Änderung in der Milch setzen muß, welche dieselbe durch CaCl_2 fällbar macht. Andere caseinfällende Reagentien benehmen sich in der gleichen Weise. So können Natrium- und Kaliumfluorid oder zitronensaures Kalium die Stelle des Calciumoxalates einnehmen. Nur muß der calcium-

¹⁾ Siehe Paterno, Zeitschr. f. physikal. Chemie, Bd. 4, 1889, S. 457.
> Picton, Journ. Chem. Soc., Bd. 61, 1892, S. 137.
> Picton u. Linder, Journ. Chem. Soc., Bd. 61, 1892, S. 148;
Bd. 67, 1895, S. 63.
> Duclaux, Microbiologie, Paris, Bd. II, 1899, S. 255.
> Moore and Parker, American Journal of Physiology,
Bd. VII, 1902, S. 261.

fällende Körper zuerst zugegeben werden oder die Fällung bleibt aus. Werden geringere Mengen des Oxalates angewendet, so muß man ihm längere Zeit zur Einwirkung lassen, ehe das Calciumsalz zugesetzt wird, wie aus der beigegebenen Tabelle ersichtlich wird.

Es wurden jedesmal 2.5 Milch mit 0.5 n_{10} Ammoniumoxalat versetzt.

Zeit, die $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ einwirkte, bevor CaCl_2 zugefügt wurde, in Minuten	Resultat
$\frac{1}{2}$	Keine Koagulation
1	Keine Koagulation
$1\frac{1}{2}$	Kleine Flocken, unbedeutende Gerinnung
2	Kleine Flocken, bessere Gerinnung
3	Große Flocken, bedeutendes Koagulum
4	Noch komplettere Gerinnung, klarere Molke.

Das Filtrat der einzelnen Proben gab immer noch eine weitere Fällung mit Essigsäure, deren Menge mit den Bedingungen des Experiments variierte. Wird 1.0 ccm n_{10} Ammoniumoxalat zu 2.5 ccm Milch zugesetzt, so ist seine Wirkung in weniger als einer Minute eine vollständige. 400.0 ccm Milch wurden mit 160.0 ccm n_{10} NaFl versetzt und, nachdem diese Mischung 20 Min. bei Zimmertemperatur gestanden hatte, 80.0 ccm n_1 CaCl_2 zugefügt. Das entstandene grobe Koagulum wurde wiederholt mit Wasser gewaschen, dann mit Alkohol und Äther, um schließlich drei Tage lang im Soxhlet extrahiert zu werden. Die Ausbeute betrug 8.9 g eines Körpers, der 20.37% Asche enthielt. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 14.48% N, berechnet für das aschenfreie Material. Die ihres Calciums beraubte Milch gab auch eine Fällung mit Lösungen von SrCl_2 , BaCl_2 , MnCl_2 , FeCl_2 , CoCl_2 und NiCl_2 , während LiCl und MgCl_2 unwirksam blieben. Werden MnCl_2 oder NiCl_2 mit dem Oxalat gemischt und dann zur Milch gesetzt, so erfolgt keine Fällung. Die Gegenwart von NiCl_2 und MnCl_2 verzögert die Fällung des Calciums in der Milch, wie in wässriger Lösung. Es macht

also den Eindruck, daß das Ammoniumoxalat nur in Abwesenheit eines Metalles, das die Rolle des Calciums übernehmen könnte, auf die Milch einwirken kann. Der Zusatz von Ammoniumoxalat zur Milch hat eine doppelte Spaltung zur Folge mit der Bildung von Calciumoxalat und Ammoniumcaseinogen¹⁾. Eine ausreichende Erklärung für diese auffallenden Versuche kann noch nicht gegeben werden. Es scheint für die Fällung notwendig, daß das Casein ein Salz bildet mit einem einwertigen Metall, das dann von den Salzen der zweiten oben erwähnten Gruppe wie Ca, Sr etc. gefällt wird. Auch das Verhalten der Phosphate der Milch scheint für die Fällung nicht gleichgültig zu sein. Eine 3%ige für Lakmus neutrale Lösung eines reinen nach Hammarstens Methode dargestellten Caseins, die mit Hilfe von möglichst wenig Calciumhydroxyd dargestellt war, wurde mit n_{20} Phosphorsäure behandelt und zwar so, daß ein Teil Phosphorsäure auf 20 Teile Caseinlösung kam. Setzt man zu 1,0 ccm dieser Lösung 0,4 ccm n_{10} CaCl₂ und dann 0,4 ccm n_{10} Ammoniumoxalat, so stellt sich keine Fällung ein. Eine solche erfolgt jedoch prompt, wenn das Ammoniumoxalat zuerst zugesetzt wird. Wird die Menge der Phosphorsäure nicht richtig getroffen, so verläuft der Versuch resultatlos. Die Reaktion trat ausschließlich mit Lösungen ein, die Calciumphosphat enthielten.

Schon vor langer Zeit hat Hammarsten²⁾ auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Wirkung des Labs nur in einer Änderung der Verteilung der mineralischen Bestandteile der Milch bestehe. Er gab jedoch diese Ansicht wieder auf. De Jager³⁾ zog aus seinen Resultaten den Schluß, daß das Lab die Ersetzung des mit dem Casein verbundenen Calciums durch Natrium verursache.

Die von uns angeführten Experimente beweisen, daß die Koagulation auf diesem Wege herbeigeführt werden kann, wenn nach der Decalcification der Milch genügend Calciumsalz zur Verfügung steht. Es muß hier erwähnt werden, daß eine Ver-

¹⁾ Siehe Osborne, loc. cit.

²⁾ Malys Jahresbericht (1874), S. 135.

³⁾ Malys Jahresbericht (1897), S. 276.

dünnung der mit Ammoniumoxalat behandelten Milch das Eintreten der Fällung auf Zugabe von CaCl_2 verhindert. Wird dagegen Milch mit Lab behandelt und dann verdünnt, so verhindert die Verdünnung keineswegs die Fällbarkeit durch CaCl_2 .

Man ist deshalb nicht zu dem Schlusse berechtigt, daß eine decalcifizierende Substanz dieselben Veränderungen hervorruft wie das Lab. Diese Tatsachen können zur Aufklärung der Natur der Labwirkung beitragen.

Die Gerinnung, die beim Kochen abgestandener Milch beobachtet wird. Es ist eine alte Erfahrung, daß abgestandene Milch beim Kochen gerinnt. Solche Milch ist immer sehr sauer und die Azidität ist häufig nur um ein wenig geringer, als erforderlich wäre, um die Milch bei Zimmertemperatur gerinnen zu lassen. Da auf Zusatz von CaCl_2 bei Zimmertemperatur keine Gerinnung eintritt, so ist das Casein nicht in Paracasein übergegangen. Sorgfältige Neutralisation der Milch mit Natriumbikarbonat verhindert die Gerinnung beim Erhitzen. Denselben Erfolg hat auch der Zusatz einer kleinen Menge Ammoniumoxalat. Daraus folgt, daß die Säure allein nicht imstande ist, diese Hitzegerinnung zu verursachen, und weiterhin, daß in dem in der Milch enthaltenen Calciumsalz die unmittelbare Ursache dieser Gerinnung zu suchen ist. Setzt man zu frischer Milch eine kleine Menge Essigsäure, die unfähig ist, bei Zimmertemperatur eine Fällung hervorzurufen, und kocht, so koaguliert die Milch. Neutralisieren mit NaHCO_3 oder aber Zusatz von Ammoniumoxalat verhindern die Gerinnung solcher mit Essigsäure behandelten Milch beim Erhitzen. Die Gerinnung abgestandener Milch beim Kochen kann demnach völlig nachgeahmt werden vermitteltst eines Zusatzes von Essigsäure zu frischer Milch (0,5 ccm $\frac{n}{6}$ CH_3COOH auf 5,0 ccm Milch). In beiden Fällen ist die Gerinnung auf die Wirkung von Calciumsalzen auf das Casein zurückzuführen. Ringer hat darauf hingewiesen, daß, wie auch im ersten Teile dieser Arbeit gezeigt wurde, kleine Mengen von Calciumsalzen hinreichen, um frische Milch beim Erhitzen zu koagulieren. Auch genügen kleine Säuremengen, um den in der Milch enthaltenen Calciumsalzen die Fähigkeit zu verleihen, Milch beim Erhitzen zu koagulieren. Der Effekt des

Säurezusatzes kann so erklärt werden, daß in der Gegenwart von Säure eine kleinere Menge von Calciumsalzen genügt, die Gerinnung herbeizuführen, oder daß die Säure die Calciumsalze für den Koagulationsprozeß verfügbar macht. Die letztere Erklärung ist wahrscheinlich die richtige.

Hillmann¹⁾ legte besonderen Nachdruck auf das Verhältnis, das zwischen der Azidität der Milch und der Menge der darin enthaltenen löslichen Calciumsalze besteht. Und dieses Verhältnis ist tatsächlich sehr eklatant.

Da die in der frischen Milch enthaltenen Calciumsalze nicht in einem Zustand vorhanden sind, der ihnen die Fällung des Caseins beim Erhitzen gestattet, so konnte man darauf rechnen, daß sie auch nicht imstande seien, Paracasein zu koagulieren. Denn es wurde festgestellt, daß eine Lösung, die Casein beim Erhitzen nicht koaguliert, auch nicht fähig ist, Paracasein bei 40° zu koagulieren. Fügt man zu Milch eine Paracaseinlösung, so erfolgt keine Fällung, also enthält die Milch keine zur Fällung verwendbaren freien Calciumsalze. Die Zugabe einer sehr kleinen Menge CaCl_2 präzipitiert das zugesetzte Paracasein, woraus folgt, daß die Unfähigkeit der Calciumsalze der Milch, das Paracasein zu fällen, nicht auf die eine Fällung des Paracaseins verhindernde Gegenwart des Caseins zurückzuführen ist. Alle diese Tatsachen zeigen klar, daß bei der Labgerinnung der Milch dem Lab die Rolle zufällt, die Calciumsalze frei zu machen, da ohne diesen Schritt keine Gerinnung möglich wäre.

Die Metacaseinreaktion. Roberts²⁾ entdeckte im Jahre 1879, daß Pankreasextrakte eine eigentümliche Einwirkung auf Milch ausüben. Obgleich die Milch keine sichtbare Veränderung erkennen läßt, hat sie die Eigenschaft erworben, beim Kochen zu koagulieren. Roberts bezeichnete diese Reaktion als die Metacaseinreaktion und die koagulierte Substanz als Metacasein. Er sah in dem Metacasein das erste tryptische Verdauungsprodukt des Caseins. Später stellten Arthus und Pagès³⁾

¹⁾ Milchzeitung, Bd. 25 (1896), S. 86.

²⁾ Proceedings Royal Society, Bd. 29 (1879), S. 157; Bd. 32 (1881), S. 145.

³⁾ Archiv de Physiol., Bd. (5) 2 (1890), S. 331.

die Beobachtung an, daß Lab bei Gegenwart von kleinen Mengen Ammoniumoxalat nicht zur Gerinnung der Milch bei 40° führt, während beim Kochen sich ein Koagulum bildet. Sie sahen in dieser Erscheinung den Beweis, daß Paracasein durch Erhitzen koagulierbar sei. Dieselben Verfasser fanden noch, daß beim Zusatz von sehr kleinen Mengen Lab zur Milch bei 40° keine Gerinnung eintritt, wohl aber beim Erhitzen. Edkins¹⁾ brachte den endgültigen Beweis, daß die Metacaseinreaktion Roberts auf Labwirkung beruhte, und daß dem Magen entstammendes Lab beim Gebrauch sehr kleiner Mengen ebenfalls zur Metacaseinreaktion führt. Er faßte das Hitzekoagulum als einen nahen Verwandten des normalen Labgerinnsels auf. In einem Versuch, in welchem gekochte Milch mit Lab versetzt worden war, ohne daß Gerinnung eingetreten wäre, fand es sich, daß Erhitzung auf 65° ein grobes Koagulum erzeugte. Dies gab den Anlaß, die Bedingungen, unter denen die sogenannte Metacaseinreaktion sich einstellt, etwas näher zu untersuchen. Es stellte sich bald heraus, daß die Metacaseinreaktion mittels dreier Methoden zu erhalten war, und zwar einmal, wie frühere Autoren nachgewiesen haben, vermittelt der Einwirkung sehr kleiner Labmengen, zum zweiten durch Änderung eines Teiles der Calciumsalze in dem Sinne, daß die Labwirkung nicht mehr imstande ist, sie zur Ausfällung des Paracaseins verfügbar zu machen, und drittens durch Verdünnung der Milch, womit eine Verdünnung der Calciumsalze verbunden ist. In den folgenden Versuchen wurde die Metacaseinreaktion als positiv angesehen, wenn sich beim Kochen über der freien Flamme große Flocken bildeten. Die Labwirkung ging bei 40° vor sich.

1. 10,0 ccm Milch + 1,0 ccm Lablösung. Die Metacaseinreaktion trat nach 5½ Min. ein, während die Milch noch vollständig flüssig war. Gerinnung trat nach 9 Min. ein. Demnach betrug die Zeit, die von dem Auftreten der Metacaseinreaktion an bis zur Gerinnung der Milch verfloß, 3½ Min.

2. 10,0 ccm Milch + 0,5 ccm Lablösung + 0,5 ccm Wasser. Metacaseinreaktion nach 8 Min., Gerinnung nach 13 Min. Zwischenzeit 5 Min.

¹⁾ Journal of Physiol., Bd. 12 (1891), S. 193.

3. 10,0 ccm Milch + 0,1 ccm Lablösung + 0,9 ccm Wasser. Metacaseinreaktion nach 40 Min., Gerinnung nach 90 Min. Zwischenzeit 50 Min.

Hieraus läßt sich erkennen, daß die Metacaseinreaktion ein Stadium einer jeden Labgerinnung der Milch repräsentiert. Die Zeit, die zwischen dem Auftreten der Metacaseinreaktion und der Gerinnung auftritt, variiert umgekehrt mit der Labmenge. Bei Anwendung großer Labmengen ist dieses Stadium so kurz, daß es nicht demonstriert werden kann. Werden dagegen sehr kleine Labmengen zugefügt, so kann es ins Unbestimmte verlängert werden. Zum Beispiel in einem Versuch, in welchem durch Zugabe von Toluol der Einfluß der Bakterien verhindert wurde, trat die Metacaseinreaktion nach 18 Stunden ein und die Milch war nach 48 Stunden noch ungeronnen.

Daß das Metacaseinstadium durch irgendwelches Medium, das einen Teil der Calciumsalze zur Präzipitation des Paracaseins unverfügbar macht, bedeutend verlängert werden kann, sollen die folgenden Versuche illustrieren:

1. 5,0 ccm Milch + 0,5 ccm Lablösung + 0,8 ccm Wasser. Metacaseinreaktion nach 5 Min., Gerinnung nach 10 Min., Zwischenzeit 5 Min.

2. 5,0 ccm Milch + 0,5 ccm Lablösung + 0,2 ccm $n/10$ Ammoniumoxalat + 0,6 ccm Wasser. Metacaseinreaktion nach 11 Min., Gerinnung nach 31 Min., Zwischenzeit 20 Min.

3. 5,0 ccm Milch + 0,5 ccm Lablösung + 0,4 ccm $n/10$ Ammoniumoxalat + 0,4 ccm Wasser. Metacaseinreaktion nach 28 Min., Gerinnung trat nicht ein.

4. 5,0 ccm Milch + 0,5 ccm Lablösung + 0,6 ccm $n/10$ Ammoniumoxalat + 0,2 ccm Wasser. Metacaseinreaktion nach 59 Min., keine Gerinnung.

5. 5,0 ccm Milch + 0,5 ccm Lablösung + 0,8 ccm $n/10$ Ammoniumoxalat. Metacaseinreaktion nach 90 Min., keine Gerinnung.

Kleine Ammoniumoxalattmengen verlängern also die Stadien der Gerinnung, wobei natürlicherweise das Stadium vom Auftreten der Metacaseinreaktion an bis zum Eintreten der Gerinnung bedeutender verlängert wird als das erste Stadium.

Eine Steigerung der Ammoniumoxalatdosis verhindert den Gerinnungsprozeß am Überschreiten des Metacaseinstadiums, so daß bei 40° eine Gerinnung der Milch überhaupt nicht mehr eintritt. Noch größere Oxalatdosen verhindern auch das Eintreten der Metacaseinreaktion. Daraus geht hervor, daß, um die Metacaseinreaktion auf diesem Wege zu erhalten, die Gegenwart von Calciumsalzen erforderlich ist.

Weiterhin läßt sich aus den Versuchen ableiten, daß sich während der Labwirkung eine allmähliche Veränderung der Calciumsalze in die für die Fällung des Caseins und Paracaseins geeignete Form vollzieht. Neulich hat Fuld¹⁾ der Vermutung Ausdruck verliehen, daß das Metacasein nicht ein Zwischenprodukt zwischen Casein und Paracasein sei, sondern eine Mischung dieser beiden. Das unveränderte Casein verhindere die Fällung des Paracaseins durch die Calciumsalze der Milch. Die Metacaseinreaktion finde in der Abnahme der hemmenden Wirkung des Caseins auf die Präzipitation des Paracaseins durch die Calciumsalze bei höheren Temperaturen ihre Begründung. Gegen die Annahme Fulds sprechen mehrere Tatsachen. Wird eine kleine Menge einer sehr schwachen Calciumchloridlösung zu einer Paracaseinlösung zugesetzt, so tritt keine Fällung ein. Dagegen erfolgt eine Koagulation beim Erwärmen, wobei die erforderliche Höhe der Temperatur von der Menge des zugesetzten CaCl_2 abhängt. Wird Milch mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und dann mit Lab behandelt, so läßt es sich leicht zeigen, daß zur Zeit oder selbst ehe das Metacaseinstadium erreicht ist, beinahe alles Casein in Paracasein umgewandelt ist. Auch beweisen alle die Bedingungen, unter denen die Metacaseinreaktion auftritt, ihre Abhängigkeit von den Calciumsalzen. Wir stimmen mit Fuld darin überein, daß wir das Metacasein nicht als ein Zwischenprodukt auffassen. Nach unserer Ansicht kann es zum Auftreten der Metacaseinreaktion kommen, wenn in einer Lösung neben Casein oder Paracasein verfügbare Calciumsalze vorhanden sind. In Paracaseinlösungen dürfen nur wenig verfüg-

¹⁾ Beiträge zur chem. Phys. und Pathol., Bd. 2 (1902), S. 169.

bare Calciumsalze anwesend sein, wenn sie nicht schon bei Zimmertemperatur koagulieren sollen. Das Metacaseinstadium tritt gewöhnlich ein, bevor eine zur Fällung des Paracaseins genügende Menge von Calciumsalzen frei wurde. Mit dem Fortschreiten der Labwirkung nimmt die Menge der freien Calciumsalze zu, während gleichzeitig die zur Metacaseinreaktion erforderliche Temperaturhöhe abnimmt.

Der Einfluß des Kochens auf die Milch. Die Verzögerung der Labgerinnung gekochter Milch wurde von jeher, in Übereinstimmung mit all den Tatsachen, auf eine Fixation des Calciums zurückgeführt. Das Verhalten gekochter Milch dem Lab gegenüber schwankt bedeutend mit verschiedenen Milchproben. Häufig bemerkt man nur eine Verlangsamung der Labwirkung und das Gerinnsel ist weniger derb als in der ungekochten Milch. Zu anderen Malen bleibt die Milch auf unbestimmte Zeit ungeronnen. In solchen Fällen erhält man stets ein Koagulum beim Erhitzen, d. h. eine Metacaseinreaktion. Diese Methode, zur Metacaseinreaktion zu gelangen, führt genau zu denselben Resultaten, wie der Zusatz von kleinen Ammoniumoxalattmengen zur Milch. Je länger die Milch gekocht wird, desto deutlicher ist der Effekt.

Vergleich der verschiedenen Caseinogenderivate. Die folgenden Präparate kamen zur Verwendung: 1. Casein, zubereitet nach der Methode Hammarstens; 2. Paracasein, hergestellt durch Fällung der ungeronnenen, aber labveränderten Milch mit Essigsäure; 3. Käse, hergestellt nach der Methode Hammarstens; 4. Koagulum, erhalten beim Erhitzen von Milch, der $\frac{1}{25}$ ihres Volumens $\frac{n}{1}$ CaCl_2 zugesetzt war, auf 60° ; 5. Koagulum, erhalten durch Fällung der mit Natriumfluorid behandelten Milch mit CaCl_2 ; 6. Koagulum, erhalten durch Zusatz von $\frac{1}{5}$ ihres Volumens $\frac{n}{1}$ CaCl_2 zur Milch und dann $\frac{1}{25}$ ihres Volumens zu $\frac{n}{1}$ NaOH . Diese Präparate wurden mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und dann bei Zimmertemperatur getrocknet. Dann wurden 0,2 g von jedem mit 20,0 einer 0,02%igen Natriumkarbonatlösung angerieben und nach Absitzenlassen des unlöslichen Teiles die überstehende Flüssigkeit abgehoben. Zu 1,0 ccm der abgehobenen

Flüssigkeit wurde 0,05 ccm $n/1$ CaCl_2 zugegeben, zu einem anderen Teil Essigsäure mit dem verzeichneten Erfolg.

Präparat	Löslichkeit	CaCl_2	Essigsäure
1	Gut löslich	Trübe, keine Flocken	Flocken
2	» »	Flocken	»
3	Sehr wenig löslich	»	»
4	» » »	»	»
5	Unlöslich	—	
6	Sehr wenig löslich	Keine Flocken	Wenig Flocken

Dieselben Experimente wurden wiederholt, nur daß an Stelle des Natriumkarbonats $n/100$ Ammoniumoxalat zur Lösung verwendet wurde.

Präparat	Löslichkeit	CaCl_2	Essigsäure
1	Wenig löslich	Keine Flocken	Flocken
2	» »	Flocken	»
3	Leicht löslich	»	»
4, 5 und 6	» »	»	»

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß Käse (3) und das Calciumchloridhitzeokoagulum (4) sich gleichmäßig verhalten. Beide sind etwa im selben Grade löslich und ihre Filtrate werden vom Calciumchlorid bei Zimmertemperatur gefällt. Bis jetzt konnte kein essentieller Unterschied zwischen den beiden Präparaten gefunden werden. Und es erscheint sehr wahrscheinlich, daß das bei Zimmertemperatur von CaCl_2 gefällte Paracasein mit dem bei 60° von CaCl_2 gefällten Casein identisch ist.

Die Labgerinnung der Milch. Hammarsten¹⁾ führte ursprünglich drei mögliche Erklärungen der Labwirkung an. Die erste war, daß das Lab etwas zerstöre, das die Casein-calciumphosphatverbindung in Lösung hält. Er konnte jedoch keine Beweise für eine solche Annahme erhalten. Gemäß der

¹⁾ Malys Jahresbericht 1874, S. 174.

zweiten Möglichkeit verursacht das Lab eine Änderung in der Verteilung der mineralischen Bestandteile dergestalt, daß der Hauptanteil des Caseins von einem kleinen Teil des Calciumsalzes als Käse niedergeschlagen wird, während ein kleinerer Anteil zusammen mit der größeren Menge des Calciumsalzes in Lösung bleibt. Zu dieser Annahme führte die Tatsache, daß das Molkeneiweiß mehr Asche enthielt als Käse. Hammarsten verließ diese beiden Annahmen, da er davon überzeugt war, daß der Käse und das Casein nicht identisch seien. Zur Vergleichung benützte er ein Casein, das er durch Fällung mit Säure erhalten hatte, während sein Paracasein mit Calciumsalzen als Käse ausgefällt war. Da er demnach diese Substanzen (Casein und Paracasein) unter sehr ungleichen Bedingungen verglich, können seine Schlüsse nur auf das Casein und den Käse bezogen werden. Das Wesen der Labwirkung besteht in einer Überführung des Caseins in Paracasein und die Darstellung dieser Substanzen auf dieselbe Weise, entweder durch Fällung mit Säure oder mit Calciumchlorid, mit darauffolgender Vergleichung, scheint von Wichtigkeit. Die Gründe, die Hammarsten veranlaßten, den Käse und das Casein als zwei verschiedene Körper anzusehen, beruhten zunächst auf ihren ungleichen Löslichkeitsverhältnissen, weiterhin auf der ungleich geringeren Fähigkeit des Käses, Calciumphosphat in Lösung zu halten, und drittens ganz besonders darauf, daß Casein unter geeigneten Bedingungen durch Lab koaguliert wird, während Käse dies niemals tut. Da aber Calciumsalze zur Labgerinnung des Caseins absolut notwendig sind und da sie imstande sind, Käse- (oder Paracasein-)Lösungen sogar in der Abwesenheit von Lab zu koagulieren, so erscheint diese Unterscheidung als hinfällig, und die verwirrende Angabe, die beinahe in alle Lehrbücher Eingang gefunden hat, sollte verbessert werden.

Die Tatsachen können viel exakter dahin ausgedrückt werden, daß Käselösungen (3) bei Zimmertemperatur und unabhängig von Lab mit Calciumsalzen gefällt werden, während Caseinlösungen dies nicht tun.

Die dritte Möglichkeit, die Hammarsten als die richtige Erklärung der Labwirkung ausspricht, besteht in der hydro-

lytischen Spaltung des Caseins in Paracasein und Molkeeiweiß, von denen das erstere durch das Calciumphosphat der Milch als Gerinnsel niedergeschlagen wird. Die für die Spaltung beigebrachten Beweise sind wenig überzeugend. So beobachtete Hammarsten Gerinnung der in einer geschlossenen Röhre erhitzten Milch. Diese Gerinnung hielt er für identisch mit der Labgerinnung und da die Wirkung anderer Enzyme auf diese Weise nachgeahmt werden kann, so faßte er den Vorgang als diesen letzteren Fällen analog auf und sah darin eine Stütze seiner Spaltungstheorie. Cazeneuve und Haddon¹⁾ haben seither den Beweis erbracht, daß diese Gerinnung auf Rechnung der bei der Zersetzung der Laktose entstehenden Säuren zu setzen ist. Der Umstand, der am meisten zugunsten einer Hydrolyse in die Waagschale fällt, ist der, daß es nie gelang, von einer gegebenen Menge Casein quantitativ dieselbe Menge Paracasein zu erhalten. Jedoch auch hier spricht der große Wechsel an der Ausbeute des Paracaseins, die unter verschiedenen Bedingungen erhalten wird, gegen eine Spaltung des Caseins. Hillmann²⁾ war in stande, durch Steigerung der Calciumsalze die Ausbeute an Paracasein zu steigern. Weiterhin stellte er fest, daß die Mengen des entstehenden Paracaseins auf verschiedene Weise geändert werden können, wie durch Verdünnung etc.

Angesichts der Resultate Hillmanns hat Hammarsten³⁾ kürzlich sich dahin geäußert, daß der definitive Nachweis für die wahrscheinliche Annahme, daß das Wesen der Labwirkung in einer hydrolytischen Spaltung beruhe, noch nicht erbracht sei. Er weist darauf hin, daß das Lab möglicherweise nur zu einer Umlagerung des Caseins führe. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde darauf hingewiesen, daß die Unterschiede, welche zwischen Casein und Paracasein gefunden wurden, rein physikalischer Natur seien und nur darauf hindeuten, daß die beiden Eiweißkörper sich in der Größe ihrer Lösungsaggregate unterscheiden. Ihr Verhalten ist qualitativ genommen identisch,

¹⁾ Compt. rend., Bd. 120, S. 1272 (1895).

²⁾ Milchzeitung, Bd. 25, 1897, S. 86; Bd. 26, 1897, S. 602.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, 1899, S. 114.

quantitativ findet sich die Differenz, daß Paracasein nach allen Methoden der Fällung kolloidaler Substanzen leichter niedergeschlagen wird. Diese Methode der Untersuchung derselben Substanz in verschiedenem kolloidalem Zustand verspricht sehr interessante Resultate und weist auf die Möglichkeit hin, daß viele der Eiweißfraktionen, die mittels solcher Methoden wie fraktionierter Aussalzen erhalten wurden, nur dieselbe Substanz in verschiedenem kolloidalen Zustande repräsentieren. Es muß jedoch erwähnt werden, daß die Unterschiede zwischen Paracasein und Casein nach ihrer Ausfällung mittels gewisser Methoden erhalten bleiben, und daß die Lösungen der so gefällten Substanzen wiederum dieselben Unterschiede aufweisen.

Duclaux¹⁾ stellte die Behauptung auf, daß Milch ein System sei, in welchem Casein in drei verschiedenen Formen, die untereinander im Gleichgewicht stehen, enthalten sei. Das Equilibrium kann nun in mannigfacher Weise aufgehoben werden, wie durch Zusatz gewisser Mineralsalze, Fermente etc. Die Gerinnung ist nach ihm ein Prozeß molekularer Mechanik. Fuld²⁾ gelangte neulich zu ähnlichen Schlüssen, wie aus dem folgenden Zitat ersichtlich wird: Es ist also die Milchgerinnung nur ein spezieller Fall des auch sonst beschriebenen Phänomens der wechselseitigen Suspendierung und Ausfällung kolloidaler Substanzen. Gelegentlich der Beschreibung der Gerinnung abgestandener Milch beim Erhitzen wurde darauf hingewiesen, daß die Calciumsalze der Milch nicht zur Fällung des Caseins beim Erhitzen noch zur Koagulation des Paracaseins bei 40° verfügbar sind. Es wurde gezeigt, daß Säuren die Calciumsalze der Milch zu diesem Zwecke frei machen. Es ist demnach wohl selbstverständlich, daß bei der Labgerinnung die Calciumsalze ebenfalls verfügbar gemacht werden müssen. Eugling³⁾ zog aus seinen Versuchen den Schluß, daß Zusatz von Säure als auch von Lab zur Milch Calciumsalze frei mache. Söldner⁴⁾ machte darauf aufmerksam, daß die Gründe, auf denen Eugling

1) Compt. rend., Bd. 98, S. 373, 438, 526.

2) Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 2, 1902, S. 169.

3) Landwirtschaftl. Versuchsstation, Bd. 31, S. 391.

4) Landwirtschaftl. Versuchsstation, Bd. 35, 1888, S. 351.

seine Schlüsse basierte, nicht stichhaltig waren. Nichtsdestoweniger scheinen die Schlüsse an sich richtig zu sein. Nachdem der Beweis erbracht war, daß im Laufe einer jeden Labgerinnung der Milch ein Stadium existiert, in dem beim Erhitzen eine Koagulation eintritt, wurde der Versuch gemacht, über das Verhalten des Eiweißkörpers und der Calciumsalze in diesem Stadium eine Aufklärung zu erhalten. Zu diesem Zwecke ließen wir kleine Mengen Lab auf Milch einwirken, bis die Metacaseinreaktion prompt eintrat. Zunächst konnten wir die Beobachtungen von Arthus und Pagès¹⁾ bestätigen, die fanden, je länger das Lab einwirkte, desto niedriger wurde die Temperatur, die zum Eintritt der Metacaseinreaktion erforderlich war. Schließlich tritt die Gerinnung bei 40° ein. Dieser Vorgang beweist, daß die Labgerinnung nicht plötzlich eintritt, nachdem das Lab einige Zeit mit der Milch in Berührung war, sondern daß der Prozeß der Labgerinnung, wie der anderer Reaktionen, ein regelmäßig fortschreitender ist. War die Reaktion so weit gediehen, daß die Metacaseinreaktion prompt eintrat, so wurde die Milch, um das Lab zu zerstören, auf einen Punkt erhitzt, der etwas unter dem zum Eintritt der Metacaseinreaktion erforderlichen lag. Dann wurde abgekühlt und das Verhalten der Calciumsalze auf folgende Weise bestimmt: 20,0 ccm Milch wurden bei 40° mit 0,5 ccm Lablösung behandelt. Die Milch wurde dann in zwei Portionen geteilt. In der einen erfolgte die Gerinnung in 18 Min. Eine Probe der anderen Portion gab die Metacaseinreaktion nach 8 Min. Sie wurde auf 1 Min. in ein auf 82° erhitztes Wasserbad gebracht und dann auf Zimmertemperatur abgekühlt. Ein Teil dieser Portion wurde im Wasserbade von 40° gehalten und blieb für unbestimmte Zeit unverändert. In einem anderen Teil wurde von neuem frische Lablösung zugesetzt, ohne daß jedoch Gerinnung eingetreten wäre. In einem dritten Teile wurde Calciumchlorid zugefügt und hier erfolgte prompt eine Fällung. Dieser Versuch scheint darauf hinzudeuten, daß im Metacaseinstadium das Casein in Paracasein übergeführt ist, während die Menge der freigemachten Calciumsalze noch nicht zur Fällung ausreicht. Die Befreiung

¹⁾ Arch. de physiol., 1890, S. 331.

der nötigen Mengen von Calciumsalzen geht in der Zeit vor sich, die sich zwischen das Metacaseinstadium, nachdem alles Casein in Paracasein übergeführt ist, und den Eintritt der Gerinnung einschiebt. Man muß jedoch mit der Erklärung dieser Versuche sehr vorsichtig sein. Denn einmal scheint das Lab in der Gegenwart von Milch der Hitze gegenüber mehr widerstandsfähig zu sein, so daß seine völlige Inaktivierung etwas zweifelhaft wird, und dann wissen wir, daß Hitze die Calciumsalze der Milch so fixiert, daß sie nicht mehr zur Fällung der Eiweißkörper verfügbar gemacht werden können. Um diesen Einwänden zu entgehen, wurde in der folgenden Weise vorgegangen. 15,0 ccm Milch wurden mit 0,3 ccm Lablösung bei 40° behandelt. In kurzen Zwischräumen wurden kleine Mengen herausgenommen und auf die Metacaseinreaktion untersucht. Zur gleichen Zeit wurde jedesmal 1,0 ccm in 3,0 ccm kochenden Wassers gegossen und gekocht. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde 0,1 ccm $\frac{n}{1}$ Calciumchloridlösung zugesetzt.

	Zeitdauer der Labwirkung in Minuten	Metacasein- reaktion	CaCl ₂ -Lösung
1.	10	negativ	negativ
2.	12	»	»
3.	14	»	»
4.	16	»	positiv
5.	18	positiv	»

Das Filtrat der CaCl₂-Fällung von 4 gab auf Zusatz von Essigsäure eine weitere Fällung. Die CaCl₂-Fällung von 5 war viel vollständiger. Somit ist im Metacaseinstadium, das mit unveränderter und unverdünnter Milch erhalten wurde, so ziemlich alles Casein in Paracasein übergeführt. Da das Metacaseinstadium durch Verdünnung der Milch in die Länge gezogen wird, so kann auf diese Weise das Verhalten der Eiweiße und der Calciumsalze mit größerer Leichtigkeit untersucht werden. 10,0 ccm Milch wurden mit 10,0 ccm Wasser verdünnt und mit 1,0 ccm Lablösung behandelt. In Zwischenräumen von

zwei Minuten wurden Proben von 3,0 ccm entnommen, über der freien Flamme gekocht und nach der Abkühlung mit 0,1 ccm n_{11} CaCl_2 versetzt. Die Zeit, die bis zum Eintreten der Koagulation bei 40° verstrich, wurde registriert.

Zeitdauer der Labwirkung in Minuten	Die zum Eintritt der Koagulation erforderliche Zeit in Minuten
2	Keine Gerinnung
4	
6	3
8	1
10	Metacaseinreaktion

Wird also mit ihrem gleichen Volumen mit Wasser verdünnte Milch verwendet, so ist so ziemlich alles Casein in Paracasein übergeführt, bevor eine zur Fällung genügende Menge von Calciumsalzen befreit oder verfügbar gemacht wurde.

Bei höheren Temperaturen bedarf es geringerer Mengen von Calciumsalz zur Fällung des Paracaseins als bei Zimmertemperatur, und diese Tatsache erklärt das Vorkommen der Metacaseinreaktion. Mit der Ansammlung der für die Fällung verfügbaren Calciumsalze tritt die Metacaseinreaktion bei immer niedrigeren Temperaturgraden ein, bis schließlich bei 40° Koagulation eintritt.

Eine der auffallendsten Erscheinungen der Labgerinnung ist die scheinbare Plötzlichkeit, mit der die Milch gerinnt, nachdem das Lab für einige Zeit mit ihr in Berührung war, ohne eine sichtbare Veränderung zu verursachen. Fuld will das damit erklären, daß das Casein die Fällung des Paracaseins durch die Calciumsalze verhindert. Er gelangte zu dieser Annahme durch die Beobachtung, daß Zusatz von frischer Milch zu einer Mischung von Milch und Lab, die in das Metacaseinstadium eingetreten war, die Metacaseinreaktion aufhebt. Arthus und Pagès fanden, daß Zusatz von frischer Milch zu einer Mischung von Milch und Lab die Gerinnung um die Zeit verzögert, die nötig ist, die zugesetzte Milch zur Gerinnung zu

bringen. Diese Beobachtungen können anscheinend damit erklärt werden, daß die zugesetzte Milch mittelst einer Verdünnung der verfügbaren Calciumsalze die Metacaseinreaktion verhindert und den Eintritt der Gerinnung verzögert. In ähnlicher Weise kann die Metacaseinreaktion durch Verdünnung der Mischung mit Wasser an Stelle der frischen Milch verhindert werden. Ebenso kann das Eintreten der Gerinnung auf diese Weise verzögert werden, nur mit dem Unterschied, daß die Calciumsalze der zugesetzten frischen Milch bald zur Gerinnung verfügbar werden, und so wird die Gerinnung nur um die Gerinnungszeit der zugesetzten Milch verzögert. Die von Fuld angeführten Experimente erschienen wenig überzeugend zugunsten seiner Ansicht, weswegen weitere Versuche nach dieser Richtung hin angestellt wurden.

In 2,5 ccm einer 3%igen neutralen Paracaseinlösung (gewonnen durch Fällung labveränderter aber ungeronnener Milch mit Essigsäure) wurden 2,5 ccm frische Milch zugefügt und dann 0,1 ccm $\frac{1}{10}$ Calciumchloridlösung. In ähnlicher Weise wurden zu 2,5 ccm Paracaseinlösung 2,5 ccm Wasser und 0,1 ccm $\frac{1}{10}$ CaCl_2 zugesetzt. Die Mischungen wurden zentrifugiert und es machte den Eindruck, als ob die Fällung in der Milchmischung eher größer gewesen wäre als in der Wassermischung. Damit ist bewiesen, daß Milch die Fällung des Paracaseins durch Calciumsalze nicht verzögert. Wird zu schwachen Paracaseinlösungen (erhalten durch Labwirkung auf verdünnte Milch mit darauffolgender Zerstörung des Labs durch Kochen) Milch und dann Calciumchlorid zugefügt, so macht sich eine deutliche Inhibition der Calciumchloridfällung bemerkbar. Fulds Ansicht von dem hemmenden Einfluß des Caseins auf die Gerinnung ist demnach nicht grundlos und diese Tatsache muß in Erwägung gezogen werden, obwohl die Hemmung nicht bedeutend genug erscheint, um die Erscheinungen, die Fuld ihr zuschreibt, zu erklären.

Wir möchten noch eine Beobachtung erwähnen. 50,0 Milch wurden mit 100,0 ccm Wasser verdünnt und in zwei gleiche Teile A und B geteilt. A wurde mit 10,0 ccm Lablösung versetzt, während zu B 10,0 ccm derselben, aber vorher gekochten, Lablösung zugegeben wurden. Nach einstündigem Stehen bei

40° gab eine Probe von A eine gute Metacaseinreaktion und wurde von CaCl_2 völlig bei Zimmertemperatur gefällt, nachdem das Lab durch fünffache Verdünnung und Erhitzen zerstört worden war. Demnach war alles Casein umgewandelt. Die analogen Versuche mit Proben von B verliefen natürlicherweise resultatlos. A und B wurden nun auf 90 Min. ins Wasserbad von 90° gestellt. Nach dieser Zeit gab weder A noch B die Metacaseinreaktion, auch wurden sie bei Zimmertemperatur von Calciumchlorid nicht gefällt, dagegen beim Erhitzen. Dies schien anzudeuten, daß das Paracasein von A in Casein umgewandelt worden war. Wurden jedoch A und B jetzt mit frischer Lablösung behandelt, so blieb A unverändert, während B eine ausgezeichnete Metacaseinreaktion gab und auf Zusatz von CaCl_2 prompt koagulierte. Das Paracasein wird also durch prolongiertes Erhitzen auf 90° derart modifiziert, daß Calciumchlorid es nur noch beim Erhitzen zu fällen vermag. Darin verhält es sich dann wie Casein, von dem es sich jedoch dadurch unterscheidet, daß es auf Labwirkung nicht mit der Bildung von Paracasein reagiert. Casein erleidet keine solchen Änderungen.

Zusammenfassung der Resultate.

Die Schlüsse, die sich aus unserer Arbeit ergeben, sollen im folgenden kurz zusammengefaßt werden:

1. In bezug auf die Wirkung ihrer Salze auf Casein und Paracasein lassen sich die Metalle in drei Gruppen fassen. Die Salze der ersten Gruppe fällen weder Casein noch Paracasein; die der zweiten fällen das Paracasein rasch aus seinen Lösungen bei Zimmertemperatur, das Casein nur nach längerem Stehen bei 40° oder bei höherem Erhitzen; die der dritten koagulieren beide Körper prompt bei Zimmertemperatur. Zur ersten Gruppe gehören die stärksten Metalle, Natrium, Kalium und auch Ammonium. Zweifellos würden auch Rubidium und Caesium in diese Gruppe fallen. Die Glieder der zweiten Gruppe sind Lithium-, Beryllium-, Magnesium-, Calcium-, Strontium-, Baryum-, Mangano-, Ferro-, Kobalto- und Nickel-Salze. Der

dritten Gruppe fallen alle die anderen Schwermetalle mit Einschluß von Ferri-Eisen zu. Mit dem Fortschreiten von den stärkeren zu den schwächeren Metallen macht sich eine Steigerung der fällenden Wirkung ihrer Salze auf Casein und in genau derselben Weise auf Paracasein geltend.

2. Die Fällung des Paracaseins durch alle Fällungsmittel kolloidaler Substanzen, wie Säuren, Salze und Alkohol, vollzieht sich mit größerer Leichtigkeit als die des Caseins. Hieraus wird geschlossen, daß das Paracasein in seinen Lösungen in größeren Lösungsaggregaten existiert als das Casein.

3. Es ist kein Beweis vorhanden, daß Paracasein und Casein verschiedene Körper sind, da alle gefundenen Unterschiede zwischen beiden physikalischer Natur sind, die leicht mittels der Hypothese erklärt werden könnten, daß sie beide Modifikationen einer und derselben Substanz sind.

4. Es wurde gezeigt, daß gründlich decalcifizierte Milch durch Salze der folgenden Metalle gefällt wird: Calcium, Strontium, Baryum, sowie Mangan-, Ferro-, Kobalto- und Nickel-Salze. Diese Tatsachen scheinen für die Theorie zu sprechen, nach der die Gerinnung der Milch zum großen Teil von einer Änderung im Arrangement ihrer mineralischen Bestandteile abhängt, ohne daß jedoch diese Theorie imstande wäre, den Prozeß der Gerinnung vollständig zu erklären.

5. Die Gerinnung abgestandener Milch beim Erhitzen ist indirekt verursacht durch die in solcher Milch produzierte Säure; die direkte Ursache der Gerinnung ist in den Calciumsalzen zu suchen. Die Erscheinung kann vollständig nachgeahmt werden, wenn man Milch mit zur Fällung des Caseins nicht ausreichenden Mengen Essigsäure versetzt. Zusatz von Ammoniumoxalat verhindert die Gerinnung in beiden Fällen. Diese Experimente deuten darauf hin, daß die in der Milch vorhandenen Calciumsalze sich nicht in einer zur Fällung des Caseins oder Paracaseins geeigneten Form befinden. Daraus folgt dann, daß die Calciumsalze während der Labwirkung für die Fällung verfügbar gemacht werden müssen.

6. Die Metacaseinreaktion Roberts wurde in Erwägung gezogen und ihre direkte Abhängigkeit von der Anwesenheit

der Calciumsalze nachgewiesen. Drei allgemeine Methoden führen zur Metacaseinreaktion. 1. die Verwendung sehr kleiner Labmengen; 2. partielle Entfernung der Calciumsalze durch Kochen der Milch oder durch Zusatz von calciumfällenden Substanzen; 3. Verdünnung der Milch und damit Verdünnung ihrer Calciumsalze. Es wurde gezeigt, daß während der Labwirkung die Calciumsalze sehr allmählich für die Fällung verfügbar gemacht werden. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß die Metacaseinreaktion ein Stadium repräsentiert, das bei jeder Labgerinnung der Milch vorkommt und daß die Zeit, die zwischen dem Auftreten der Metacaseinreaktion und dem Eintritt der Gerinnung verläuft, im umgekehrten Verhältnis zu der verwendeten Labmenge steht.

7. Die Untersuchung der Labwirkung auf unverdünnte und verdünnte Milch zeigte, daß die Umwandlung von Casein in Paracasein etwas schneller vor sich geht als die Befreiung der Calciumsalze und daß sich diese Umwandlung mit dem Eintritt der Metacaseinreaktion vollzogen hat. Die Zeit, die zwischen dem Auftreten der Metacaseinreaktion und dem Eintritt der Gerinnung verläuft, wird dazu benützt, die Calciumsalze verfügbar zu machen. In dem Maße, in dem die Calciumsalze sich ansammeln, fällt die zur Herbeiführung der Metacaseinreaktion notwendige Temperatur, bis die Gerinnung bei 40° plötzlich eintritt.

Anm. Die Arbeit von H. Conradi (Münchner med. Wochenschrift 1901, S. 175) war mir leider entgangen, bevor meine Arbeit zum Druck abgesandt wurde. Conradi arbeitete über den Einfluß erhöhter Temperatur auf das Casein der Milch mit besonderer Berücksichtigung des Einflusses von CaCl_2 auf die Koagulation. In der Hauptsache stimmen meine Resultate mit seinen überein.