

# Zur Kenntnis der Bestandteile des Emmentaler Käses.

## III. Mitteilung.

### Versuche zur Bestimmung der stickstoffhaltigen Käse- Bestandteile.

Von

**E. Winterstein und W. Bissegger.**

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. Januar 1906.)

In den beiden ersten Mitteilungen<sup>1)</sup> wurde gezeigt, daß die mit Hilfe von Lab aus der Milch abgeschiedenen Eiweißstoffe bei der Käsereifung eine Reihe krystallinischer Spaltungsprodukte (Basen und Aminosäuren) liefern. Mittlerweile ist es auch gelungen, unter diesen Produkten das Vorhandensein von Isoleucin und Oxypyrrolidincarbonensäure nachzuweisen und das Auftreten von Serin wahrscheinlich zu machen. Mit Ausnahme des Arginins entstehen also bei der Käsereifung aus dem Paracasein unter Mitwirkung von Bakterien und vielleicht auch der im Lab<sup>2)</sup> und in der Milch vorhandenen Fermente (Galactase) die nämlichen Spaltungsprodukte, wie sie aus dem Casein durch Säuren oder Fermente erhalten worden sind. Dabei treten aber auch krystallinische Spaltungsprodukte wie Tetra- und Pentamethyldiamin, vielleicht auch zuweilen Phenyläthylamin als Produkte sekundärer Prozesse auf. Diese letztgenannten basischen Stoffe entstehen wahrscheinlich aus den zugehörigen Aminosäuren unter Kohlensäureabspaltung.

<sup>1)</sup> Beiträge zur Kenntnis der Bestandteile des Emmentaler Käses. E. Winterstein und J. Thöni, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 28. E. Winterstein, II. Mitteilung, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 485.

<sup>2)</sup> L. van Slyke und B. Hart, American chemical Journal, Vol. XXX, 1. O. Jensen, Studien über die Enzyme im Käse. Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. VI, S. 734.

Nach A. Ellinger,<sup>1)</sup> Langstein,<sup>2)</sup> Lawrow<sup>3)</sup> und Emerson<sup>4)</sup> können Bakterien beziehungsweise Fermente solche Abspaltungen von Kohlensäure bewerkstelligen. Die meisten Schwierigkeiten bietet die Aufarbeitung der sogenannten Lysinfraktion, die neben dem Lysin stets beträchtliche Mengen Ammoniak und anorganische Salze enthält. Es ist jedoch in einigen Fällen gelungen, mit Hilfe von Platindoppelsalzen das Lysin von den anderen organischen Basen möglichst vollständig zu trennen. Bei diesen Trennungsversuchen erhielten wir in allen Fällen ein im Wasser leicht lösliches, durch Alkohol fällbares nicht einheitliches Platindoppelsalz, dessen Platin- und Stickstoffgehalt auf ein Gemisch von Ornithin und Tetramethyldiamin hindeutet. Das aus dem Platindoppelsalz wiedergewonnene Chlorhydrat gab die dem Tetramethyldiamin zukommenden Reaktionen: leider besitzen wir keine charakteristischen Reaktionen für das Ornithin.<sup>5)</sup> Bedenkt man, daß das Arginin in den untersuchten Käsen nicht aufgefunden werden konnte, und berücksichtigt man ferner obigen Befund, so ist man wohl zur Annahme berechtigt, daß das Arginin weiter in seine Spaltungstücke zerlegt wird. Die Annahme, daß das Arginin aus dem Verband des Paracaseinmoleküls durch die Bakterien nicht losgelöst wird, erscheint nicht sehr plausibel. In der Zusammenfassung der II. Mitteilung<sup>6)</sup> sind die bisher aus Emmentaler Käse isolierten Produkte aufgezählt worden. Infolge eines Versehens bei der Korrektur ist in dieser Zusammenfassung

<sup>1)</sup> Zur Kenntnis des Ornithins und des Lysins. Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 334.

<sup>2)</sup> Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung. Hofmeister's Beiträge z. chem. Physiol. und Pathologie, Bd. I, S. 507.

<sup>3)</sup> Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweißkörper. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 312.

<sup>4)</sup> Über das Auftreten von Oxyphenyläthylamin bei Pankreasverdauung und über fermentative CO<sub>2</sub>-Abspaltung. Hofmeister's Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathologie, Bd. I, S. 501.

<sup>5)</sup> Es dürfte wohl gelingen, das Ornithin mit Hilfe von Phenylisocyanat oder Benzoylchlorid von den andern Basen zu trennen, andererseits soll versucht werden, das Tetramethyldiamin mit Hilfe von Sublimat zur Abscheidung zu bringen.

<sup>6)</sup> loc. cit.

das Phenylalanin, welches in beträchtlicher Menge im reifen Käse vorhanden ist, nicht mit aufgezählt worden. Es sei hier nun nochmals erwähnt, daß das Tyrosin zuweilen in ganz geringen Mengen, zuweilen gar nicht unter den Spaltungsprodukten des Käses aufgefunden werden konnte. Bei der Untersuchung eines normalen Käses von prima Qualität, welcher mit Hilfe von Freudenreich'schen Reinkulturen fabriziert wurde, konnte aus 500 g entfetteter Käsemasse kein Tyrosin aus dem wässerigen Extrakt durch Krystallisation zur Abscheidung gebracht werden. Da nun nach den vorliegenden Beobachtungen<sup>1)</sup> das Tyrosin durch proteolytische Fermente sehr rasch in der ersten Zeit der Einwirkung aus Casein abgespalten wird, so muß man sich die Frage vorlegen, ob dies auch hier unter Mitwirkung dieser Lebewesen geschieht und das Tyrosin weiter, vielleicht unter Kohlensäureabspaltung, in Oxyphenyläthylamin verwandelt wird. Bis jetzt konnte diese Base allerdings nicht nachgewiesen werden.<sup>2)</sup>

In einigen Fällen war es allerdings gelungen, (aus einem sehr alten Käse) kleine Mengen Tyrosin durch Auskrystallisieren aus dem wässerigen Extrakt zu erhalten, F. Benecke und E. Schulze<sup>3)</sup> isolierten das Tyrosin mit Hilfe von Mercurinitrat. Bei einem Versuche, bei welchem wir 100 g entfetteter Käsemasse anwendeten und den von den Eiweißstoffen mit Hilfe von Bleiessig befreiten Extrakt mit Mercurinitrat unter Zusatz von Soda fällten, konnten wir auch aus dieser Fällung kein Tyrosin gewinnen.

Nachdem die aus Casein darstellbaren Aminosäuren als Bestandteile des Käses nachgewiesen waren, versuchten wir nun das Mengenverhältnis der vorhandenen Aminosäuren festzustellen. Am leichtesten gelingt mit Hilfe der Estermethode die Trennung der  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure (Prolin) und des Phenylalanins, auch das Leucin läßt sich ziemlich quantitativ

<sup>1)</sup> E. Fischer und E. Abderhalden, Über die Verdauung einiger Eiweißstoffe durch Pankreasfermente. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 85.

<sup>2)</sup> Slyke und Hart fanden diese Base in Cheddarkäse. American chemical Journal, Vol. XXX, N. 1, S. 8.

<sup>3)</sup> Untersuchungen über die Emmentaler Käse und über einige andere schweizerische Käsesorten. Landw. Jahrb. 1887, S. 317.

abscheiden, wenn man das mit Hilfe von Alkohol vom Prolin befreite Aminosäurengemisch mit Kupferhydroxyd sättigt und das eingetrocknete Kupfersalzgemisch mit Methylalkohol erschöpft: aus dem dabei verbleibenden Kupfersalz wurde eine Aminosäure erhalten, deren elementare Zusammensetzung auf Leucin stimmte. Wir erhielten aus 4 Kilo entfetteter Käsemasse 13 g  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure und 12 g Phenylalanin. Wir erwähnen hier diese Zahlen, weil ein Vergleich mit den von E. Fischer und E. Abderhalden<sup>1)</sup> bei der Verdauung des Caseins mit Pankreatin bzw. Pepsinsalzsäure erhaltenen Ergebnissen angezeigt erscheint. Die genannten Forscher erhielten bei ca. 8 Monate lang dauernder Verdauung mit Pankreatin aus 200 g Casein-Natron einen durch Phosphorwolframsäure fällbaren polypeptidartigen Stoff, welcher bei der Hydrolyse mit Säure Phenylalanin und Prolin lieferte; die von dem Phosphorwolframsäureniederschlag getrennte Flüssigkeit enthielt aber weder Phenylalanin noch Prolin. Bei der kombinierten Wirkung von Pepsinsalzsäure und von Pankreatin trat eine stärkere Hydrolyse ein als beim Pankreatin allein, aber auch bei der Pepsin-Pankreatin-Verdauung trat ein polypeptidartiger Stoff auf, welcher die gewöhnlichen Monoaminosäuren enthielt. Die Verdauungsflüssigkeit enthielt daneben Phenylalanin und Prolin, doch war die Menge im Vergleich zu derjenigen, die aus Casein durch Zersetzung mit Säure erhalten wurde (3,5%<sup>2)</sup> bzw. 3,2%<sup>3)</sup>) nur gering. Sie erhielten aus 250 g Casein bei dieser kombinierten Verdauung 1,8 g  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure und 1,3 g Phenylalanin.<sup>4)</sup>

Auch im Käse findet sich ein durch Bleiessig bzw. Phosphor-

<sup>1)</sup> E. Fischer und E. Abderhalden, Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 81.

Dieselben. Über die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure und Pankreasfermente. Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 215.

<sup>2)</sup> E. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151.

<sup>3)</sup> E. Fischer und E. Abderhalden, loc. cit. S. 88.

<sup>4)</sup> Es ist uns allerdings aufgefallen, daß die Menge dieser beiden aus dem Filtrat und aus dem Polypeptid erhaltenen Aminosäuren sich nicht mit derjenigen deckte, welche aus Casein durch Säurespaltung erhalten werden konnte.

wolframsäure fällbarer polypeptidartiger Stoff, welcher bei der Hydrolyse neben Aminosäuren auch Basen liefert. (Vergleiche hierüber II. Mitteilung.<sup>1)</sup>) Die Quantität dieser Substanz ist, wie aus den unten aufgeführten Analysen hervorgeht, nicht unbedeutend, daneben findet sich relativ viel freie  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure und Phenylalanin vor. Wie oben angegeben, wurde aus 4 Kilo entfetteter, luftrockner Käsemasse 13 g  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure und 12 g Phenylalanin erhalten. Die 4 Kilo Käsemasse enthalten soviel Spaltungsprodukte, als aus ca. 500 g Casein erhalten werden können.<sup>2)</sup> Nach E. Fischer<sup>3)</sup> beträgt der Gehalt des Caseins an Prolin 3,2%, derjenige an Phenylalanin 3,5%. Wir erhielten also ungefähr so viel von diesen beiden Produkten, als dem zersetzten Casein entspricht. Da wir mit unseren Einrichtungen nur ein Vacuum von etwa 6—8 mm erzielen können, sind die Verluste wohl auch etwas größer als bei der minimalen Tension, bei welcher der genannte Autor arbeitete. Auf Grund dieses Ergebnisses darf man wohl behaupten, daß die Spaltung des Paracaseins bei der Käsureifung durch Bakterien eine weitgehendere ist, als die Hydrolyse des Caseins durch die kombinierte Pepsin-Pankreatin-Verdauung, wenn man nicht die wenig wahrscheinliche Annahme machen will, daß die Bakterien aus dem gesamten Paracasein das Phenylalanin und das Prolin abspalten und dabei einen tyrosinreichen im Wasser unlöslichen Eiweißkomplex hinterlassen, welcher relativ arm an den beiden genannten Aminosäuren ist. Diese Frage soll durch eine nähere Untersuchung der im Käse vorhandenen Eiweißkörper und des frischen Paracaseins noch weiter aufgeklärt werden. Diese Untersuchung möchten wir uns gern vorbehalten.

Nach diesen einleitenden Bemerkungen über die Käsebestandteile gehen wir nun dazu über, die Methoden zu beschreiben, deren wir uns bei der quantitativen Bestimmung der einzelnen stickstoffhaltigen Körper bedienen.

Für die Beurteilung der Qualität eines Käses und vom

<sup>1)</sup> E. Winterstein, loc. cit.

<sup>2)</sup> Diese Zahl ergibt sich aus der Menge des Aminosäurestickstoffs. Siehe die Tabelle.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151 und Bd. XXXIX, S. 88.

physiologisch-chemischen Standpunkte aus dürften die bei der quantitativen Untersuchung gewonnenen Ergebnisse wohl einiges Interesse beanspruchen. Der zur Untersuchung verwendete Käse war auf der Molkereischule Rütli bei Bern mit Hilfe von 2 I Freudenreich'schen Reinkulturen und unter Anwendung von Blumenthal'schem Labpulver fabriziert worden. Die hierzu verwendete Milch war auf Grund der Gärprobe und des Säuregehaltes als eine normale erkannt worden. Nach sechsmonatlicher Reifung wurden uns 52 kg von diesem Käselaub zur Untersuchung übersandt. Ungefähr  $\frac{2}{3}$  davon wurde sofort verarbeitet. Der Rest wurde, um die Veränderung, welche die stickstoffhaltigen Stoffe bei der länger andauernden Reifung erleiden, feststellen zu können, an den Schnittflächen mit einem Überzug von einem Teil Wachs und einem Teil Paraffin versehen<sup>1)</sup> und noch weitere 5 Monate im gleichen Käsekeller unter gleichen Bedingungen der Nachreife überlassen. Da wir nicht nur eine quantitative Bestimmung der stickstoffhaltigen Stoffe beabsichtigten, sondern auch nochmals die Basen und Aminosäuren eines mit aller Sorgfalt fabrizierten Käses, und vor allen Dingen die Eiweißsubstanzen des Käses eingehender untersuchen wollten, nahmen wir größere Quantitäten davon in Arbeit. Der frische Käse wurde mit einem Tuch abgerieben, die Rinde mit Hilfe eines Messers abgeschabt und der Käseteig in faustgroße Stücke zerschnitten: diese wurden auf Pergamentpapier ausgebreitet und bei etwa 25° an der Luft getrocknet, darauf wurden die harten Stücke auf einer Reibe zerrieben, sodann im Perkolator mit Petroläther und dann im Thörner'schen Apparat bei 30° mit Äther möglichst vollständig entfettet.

Ein Teil des frischen Reibseils wurde im Vacuumexsikkator über Schwefelsäure aufbewahrt, bis keine Gewichtsabnahme mehr stattfand, sodann wurde noch kurze Zeit bei 95° getrocknet, wobei ein nur minimaler Gewichtsverlust eintrat. Der auf diese Weise ermittelte Wassergehalt betrug im Mittel 31,11%. In dem Trockenrückstand wurde das Fett durch Extraktion mit

<sup>1)</sup> Es sei uns gestattet, Herrn G. Köstler, Assistenten der Molkereischule Rütli, unsern besten Dank für seine Mühe, die er bei Beaufsichtigung dieses Reifungsvorganges hatte, auszudrücken.

wasserfreiem Äther im Soxhlet-Apparat oder nach Gottlieb-Bondzyński durch Kochen mit Salzsäure und Extraktion der Lösung mit einem Gemisch von Petroläther und Äther ermittelt. Die beiden Methoden geben nicht ganz übereinstimmende Zahlen, da bei der Extraktion des Käses mit Äther neben Fett noch andere Stoffe in Lösung gehen: andererseits ist aber eine vollständige Extraktion des Fettes mit Äther nicht zu erreichen. Der Fettgehalt des untersuchten Käses betrug 47,61 %.

Die bei der Extraktion mit Äther verbliebene weiße Masse wurde zunächst an der Luft und sodann einige Zeit bei einer 30° nicht übersteigenden Temperatur getrocknet, auf einer Mühle fein zerrieben und nun, um sie lufttrocken zu machen, längere Zeit in dünnen Schichten liegen gelassen. Dieses Pulver verwendeten wir für die Bestimmung der einzelnen Stickstoffverbindungen, bzw. die Verteilung des Stickstoffs auf die verschiedenen Stickstoffverbindungen: das Ammoniak, die organischen Basen, die Aminosäuren, die Purinkörper, die Peptone bzw. Polypeptide und die anderen Eiweißkörper; ferner wurde noch die im wässrigen Auszuge enthaltene Stickstoffmenge und die Quantität der in dem wässrigen Extrakt enthaltenen organischen Substanzen ermittelt. Die quantitative Bestimmung und Abscheidung der nicht krystallinischen Spaltungsprodukte gibt aber bei Anwendung der verschiedenen Fällungs- und Trennungsmittel leider keine sehr gut übereinstimmenden Resultate. Auch die scheinbar so einfache Ermittlung der wasserlöslichen Substanz lieferte, je nach den Versuchsbedingungen, Zahlen, die innerhalb mehrerer Prozente schwankten.<sup>1)</sup> Diese Differenzen, welche sich bei den Bestimmungen der Eiweißsubstanzen und der Quantität der wasserlöslichen Substanz herausstellten, sind auf die leichte Veränderlichkeit und das sonderbare Verhalten der vom Casein abgeleiteten Eiweißkörper zurückzuführen. Auch das Casein selbst ist ja bekanntlich eine sehr veränderliche Eiweißsubstanz. Von den vielen in dieser Hinsicht gemachten An-

<sup>1)</sup> Schon St. Bondzyński hat konstatiert, daß die Menge des Stickstoffs im wässrigen Auszug je nach den Versuchsbedingungen eine verschiedene ist. Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 1894 S. 189.

gaben seien folgende zitiert: K. Storch<sup>1)</sup> will eine Spaltung des Caseins mit Natriumsulfat, Magnesiumsulfat und Natriumchlorid erreicht haben. Nach A. Béchamp<sup>2)</sup> ist das Casein bis zu 0,24 pro Mille löslich in Wasser, was andere Forscher mit einer Spaltung des Caseins durch das Wasser in Zusammenhang bringen wollen. Wir haben verschiedene käufliche Caseine und auch einige aus Kuhmilch oder Kuhcolostrum nach Hammarsten hergestellte Caseinpräparate kurze Zeit mit kochsalzhaltigem Wasser bei 28° digeriert und konnten meistens in dem vom Ungelösten getrennten Filtrat auf Zusatz von Essigsäure und Aufkochen eine Fällung einer amorphen Substanz erhalten, welche phosphorhaltig war und die charakteristischen Eiweißreaktionen gab: beim Behandeln von einem frischen aus Kuhmilch selbst hergestellten Casein mit Kochsalzlösung erhielten wir im Filtrat auf Zusatz von Essigsäure nur eine schwache Trübung. Aus einem käuflichen, nach Hammarsten dargestellten Caseinpräparat, konnten wir durch Behandeln mit kaltem Wasser ungefähr 4% Eiweißsubstanz in Lösung bringen. Nach Lubawin<sup>3)</sup> wird das Casein durch kochendes Wasser unter Abspaltung von Phosphorsäure allmählich in einen in Alkalien löslichen Eiweißkörper gespalten. Halliburton<sup>4)</sup> beobachtete eine Veränderung des Caseins beim Erhitzen mit Wasser auf 75°. Laqueur und Sackur<sup>5)</sup> fanden, daß das trockene Casein beim Erwärmen auf 94—100° in einen in Alkali löslichen und einen in Alkali nur quellbaren Eiweißkörper zerfällt. Diese beiden Eiweißkörper zeigen auch noch in anderen Eigenschaften Differenzen. Wir beobachteten ferner, daß beim Destillieren von reinem, frisch hergestelltem, in Wasser suspendiertem Casein, unter Zusatz von sorgfältig ausgewaschenem Baryumcarbonat, Ammoniak ausgetrieben wird; ersetzt man das abdestillierte Wasser durch die gleiche Wassermenge, so wird bei fortge-

<sup>1)</sup> Monatshefte für Chemie, Bd. XVIII, S. 244, Bd. XX, S. 837, Bd. XXIII, S. 712.

<sup>2)</sup> Bull. soc. chim., Bd. XI, S. 152.

<sup>3)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. XII, S. 1021.

<sup>4)</sup> Journ. of Physiolog., Bd. XI, S. 448.

<sup>5)</sup> Hofmeister's Beiträge zur chem. Physiologie und Pathologie, Bd. III, S. 193.



setztem Erhitzen wieder Ammoniak gebildet. Das Erhitzen des Gemisches wurde in einem Kupferkessel in einem mit einer Chlorcalciumlösung gefüllten Wasserbade vorgenommen, wobei die Temperatur des Gemisches nicht über  $100^{\circ}$  anstieg; um das Austreiben des Ammoniaks zu beschleunigen, wurde ein mit Schwefelsäure gewaschener Luftstrom durchgeblasen. Es sei ferner darauf hingewiesen, daß beim Kochen von Casein mit 60 volumprozentigem Alkohol immer neue Mengen in Lösung gehen. Diese zuerst von Danilewsky und Radenhausen<sup>1)</sup> gemachten Beobachtungen konnten wir bei einigen Caseinpräparaten bestätigen.

Da der Käse neben Kochsalz und unlöslichen Phosphaten auch noch andere Salze enthält, welche ohne Zweifel einen Einfluß auf die Löslichkeit der verschiedenen Formen des Caseins haben, seien noch folgende Stellen zitiert: Das Casein soll sich in Fluoriden und Acetaten leicht lösen. Nach Arthus<sup>2)</sup> soll eine 0,01%ige Lösung von NaFl 0,98—1,35% Casein auflösen. Auch in Kochsalzlösung soll sich nach dem genannten Forscher<sup>3)</sup> und auch nach Hammarsten's<sup>4)</sup> Untersuchungen das Casein auflösen. van Slyke und Hart<sup>5)</sup> geben an, daß sich Paracasein bei  $60^{\circ}$  in 5%iger Kochsalzlösung vollständig auflöst. Nach Limburg<sup>6)</sup> löst sich Casein allmählich in gesättigter Kaliumnitratlösung.

Wenn man annimmt, daß das Paracasein sich in dieser Beziehung ähnlich wie das Casein verhält, so erklären sich die Schwierigkeiten, welche sich bei der Bestimmung der Eiweißsubstanzen des Käses ergaben. Diese Beobachtungen lassen der Vermutung Raum, daß das Casein kein einheitlicher Körper ist, eine Ansicht, die auch Cohnheim<sup>7)</sup> in seinem Buche zum Ausdruck bringt. Die in manchen Fällen konstatierten Differenzen

<sup>1)</sup> Petersen, Forschungen auf dem Gebiete der Viehhaltung, Bd. IX.

<sup>2)</sup> Rech. sur quelques subst. albumin Par. Th. 1893.

<sup>3)</sup> loc. cit.

<sup>4)</sup> Zur Kenntnis des Caseins. Upsala 1877.

<sup>5)</sup> New-York agric. experim. stat. Nr. 214.

<sup>6)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 455.

<sup>7)</sup> Chemie der Eiweißkörper. Zweite Auflage, S. 196.

bei der Bestimmung der Basen und Eiweißsubstanzen hängen ferner damit zusammen, daß gewisse Fällungsmittel reine Substanzen wohl quantitativ abscheiden, die Anwesenheit von andern organischen Verbindungen das Auftreten einer Fällung entweder vollständig verhindert, oder aber bewirkt, daß die Ausfällung nur unvollständig erfolgt; aber auch der umgekehrte Fall ist wiederholt beobachtet worden. Ferner muß berücksichtigt werden, daß die Löslichkeit einzelner Verbindungen in Wasser durch Beimengungen ganz außerordentlich beeinflusst wird. Von diesen in der physiologischen Chemie gemachten Beobachtungen erwähnen wir nur diejenigen, welche in unserem Laboratorium immer wieder gemacht wurden. Phenylalanin gibt mit Phosphorwolframsäure bei Gegenwart von Schwefelsäure eine krystallinische Fällung; diese Fällung tritt bei Gegenwart von Leucin nicht auf. Reines Arginin gibt mit Mercurinitrat keine Fällung; aus wässerigen Extrakten von Keimpflanzen wird Arginin jedoch durch Mercurinitrat gefällt. Leucin ist relativ schwer löslich in Wasser, bei Gegenwart anderer Aminosäuren krystallisiert es jedoch nur unvollständig aus. Wir extrahierten das vollständig trockne in oben angegebener Weise präparierte Pulver mit absolutem Alkohol in der Wärme, wobei beträchtliche Mengen von Aminosäuren in Lösung gingen, während, wie bekannt, außer der  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonensäure die anderen Aminosäuren in reinem Zustande sich in Alkohol kaum auflösen.

Im folgenden beschreiben wir nun die bei der quantitativen Untersuchung angewendeten Methoden und teilen die dabei erhaltenen Ergebnisse mit. Sämtliche Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl ausgeführt. Als Titerflüssigkeiten benützten wir ungefähr  $\frac{1}{2}$  normale Salzsäure und ca.  $\frac{1}{5}$  normale Natronlauge unter Anwendung von Methylorange als Indikator. Der Gehalt der Säure wurde mit Silbernitrat bestimmt und das Chlorsilber im Gooch'schen Tiegel gesammelt. Behufs Kontrolle wurden mehrere Stickstoffbestimmungen von reinem Asparagin ausgeführt, wobei im Mittel 0,15% weniger als die der Theorie entsprechende Menge gefunden wurden.

### 1. Feuchtigkeits- und Aschenbestimmung.

5 g Substanz wurden in flachen Wägegläschen bei 100 bis 104° getrocknet, bis die Differenzen zweier Wägungen nicht mehr als 0,5 mg betragen, was nach Verlauf von 3 Stunden gewöhnlich der Fall war.

Der Trockenrückstand wurde in Platinschälchen in einer Muffel verbrannt. Eine Kontrollbestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes im Platinschiffchen bei 95° im Wasserstoffstrom ergab einen etwas geringeren Wassergehalt. Auch beim Trocknen im Wasserstoffstrom bei 95° entweicht neben dem Wasser auch ein Teil des Ammoniaks und wohl auch Spuren anderer flüchtiger Substanzen. Da die Differenzen bei diesen beiden Wasserbestimmungen nur unbedeutend sind, so genügt wohl die rascher durchzuführende Trockenbestimmung im Trockenschrank bei 100°, wobei wir bei den Umrechnungen das entweichende Ammoniak als Feuchtigkeit in Rechnung setzten.

### 2. Bestimmung des Ammoniaks.

F. Benecke und E. Schulze<sup>1)</sup> bestimmten das Ammoniak durch Fällen des wässerigen Käseextraktes mit Phosphorwolframsäure und Destillieren des in diesem Niederschlage enthaltenen Ammoniaks mit Magnesia. Andere ermittelten den Ammoniakgehalt durch Destillieren des wässerigen Auszuges mit Baryumcarbonat. Auf Grund der oben beim Casein gemachten Beobachtungen schien es zweifelhaft, ob man nach diesen Verfahren nur das schon vorhandene Ammoniak erhält. Wir fanden, daß beim Destillieren eines aus 5 g Substanz hergestellten wässerigen Auszuges mit Baryumcarbonat immer neue Mengen Ammoniak übergehen, wenn man das verdunstete Wasser wieder ersetzt. Bei der ersten Destillation fanden wir 0,28, bei der zweiten 0,14, bei der dritten 0,09, bei der vierten 0,06, bei der fünften 0,09<sup>0/0</sup>. F. Benecke und E. Schulze<sup>2)</sup> beobachteten schon früher, daß beim erneuten Destillieren von Käsemasse oder des

---

<sup>1)</sup> Untersuchungen über den Emmenthaler Käse und über einige andere schweizerische Käsesorten. Landw. Jahrb. 1887.

<sup>2)</sup> loc. cit.

wässerigen mit Gerbsäure von den Eiweißstoffen befreiten Extraktes mit Magnesia immer wieder Ammoniak ausgetrieben wird.<sup>1)</sup>

Besonders groß waren natürlich die Ammoniakmengen, wenn man das entfettete Käsepulver in wässriger Suspension direkt mit Baryumcarbonat oder Magnesia destillierte.<sup>2)</sup> Ob die beim Destillieren des wässerigen Auszuges mit Baryumcarbonat erhaltenen Ammoniakmengen durch Zersetzung der in der Lösung vorhandenen Eiweißsubstanzen gebildet werden, oder ob sie von anderen Stickstoffverbindungen, vielleicht Guanidin, herühren, soll noch entschieden werden. Wir fanden, daß beim Destillieren des Käses im Vacuum bei 40° und einem Druck von 8—10 mm vollständig übereinstimmende Resultate erhalten werden und daß bei erneuter Destillation keine Spur von Ammoniak mehr übergeht. Wir verfahren wie folgt: 5 g Substanz wurden mit Hilfe eines langen bis auf den Boden des Destillationsgefäßes reichenden Fülltrichter eingefüllt, sodann ein Löffel ausgewaschener Magnesia und 70 ccm Wasser hinzugefügt. Für die Destillation benützten wir einen Vacuumfraktionierkolben mit seitlichem, nach oben gebogenen Ansatz. Dieser Ansatz wurde mit einem Saugkolben verbunden, in welchem sich titrierte Schwefelsäure befand;<sup>3)</sup> durch die andere Öffnung des Kolbens ging eine in eine Kapillare ausgezogene Glasröhre, so daß ein ununterbrochener langsamer Luftstrom durch die Masse hindurchstreichen konnte. Die Luft wurde zuvor mit Schwefelsäure gewaschen. Um das Aufschäumen der Flüssigkeit zu verhüten, brachten wir in den Kolben eine kleine Menge filtrierten Butterfettes hinein: um ferner das Zurücksteigen der Titer-

<sup>1)</sup> Scala und Jacoangeli geben an, daß beim Destillieren von Casein in wässriger Suspension mit Magnesia kein Ammoniak erhalten wird. *Annali dell' Istituto d'Igienesperimentall. Roma 1892, S. 135.*

<sup>2)</sup> Nach Biedl und Winterberg wird sogar im Vacuum bei Überschuß von Kalk aus verschiedenen Stickstoffverbindungen Ammoniak abgespalten. *Wiener klin. Wochenschrift, 1901, Nr. 8.* Vergl. auch Nencki und Zaleski, *Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 193.* Daß gewisse Substanzen mit Kalkmilch Ammoniak schon in der Kälte abgeben, ist längst bekannt, z. B. beim Asparagin.

<sup>3)</sup> Bei diesen Bestimmungen benützten wir titrierte Schwefelsäure, da wir Verluste bei Anwendung von Salzsäure im Vacuum befürchteten.

flüssigkeit beim Unterbrechen des Vacuums zu verhindern, schalteten wir zwischen den Destillationskolben und den Saugkolben ein T-Rohr ein, welches mit einem Gummischlauch und Quetschhahn versehen war. Es wurde so lange destilliert, bis der Rückstand nahezu trocken war, was nach Verlauf von 2 Stunden meistens erreicht werden konnte. In einigen Fällen wurde das abdestillierte Wasser ersetzt und abermals zur Trockne eingedunstet, wobei in der Vorlage sich kein Ammoniak mit Hilfe des Neßler'schen Reagenses nachweisen ließ.<sup>1)</sup> Die Menge des in dieser Weise ermittelten Ammoniaks betrug in dem 6 Monate alten Käse 0,06<sup>o</sup>/<sub>o</sub>. Bei der Bestimmung des Ammoniaks durch Fällern mit Phosphorwolframsäure wurde 0,11<sup>o</sup>/<sub>o</sub> erhalten. In dem noch weitere 5 Monate nachgereiften Käse fanden wir durch Destillation im Vacuum 0,48<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, durch Fällern mit Phosphorwolframsäure 0,60<sup>o</sup>/<sub>o</sub>. Wie man sieht, weichen die Zahlen nicht weit von einander ab. Da die Bestimmung des Ammoniakgehaltes durch Destillation im Vacuum direkt mit der Substanz ausgeführt werden kann und völlig übereinstimmende Resultate liefert und zudem nur wenig Zeit in Anspruch nimmt, möchten wir die Ermittlung des Ammoniakgehaltes nach diesem Verfahren als geeignet empfehlen.

### 3. Bestimmung des Gesamt-Eiweißstickstoffs.

Da für die Beurteilung des Reifegrades des Käses eine möglichst genaue Bestimmung der Basenmenge und des auf die Aminosäuren entfallenden Stickstoffs angezeigt erscheint, mußten wir darauf bedacht sein, die Eiweißsubstanzen möglichst quantitativ zur Abscheidung zu bringen. Wir verglichen daher die Ergebnisse untereinander, welche mit den bekannten Eiweißfällungsmitteln unter verschiedenen Versuchsbedingungen erhalten wurden; wir benützten hierzu Kupferhydroxyd, Gerb-

<sup>1)</sup> Nencki und Zaleski haben eine Bestimmung des Ammoniaks im Blute angegeben; bei dieser Bestimmung, welche im Vacuum durchgeführt wird, erhält man sehr zuverlässige Resultate. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 193. Nach E. Zunz erhält man bei der Ammoniakbestimmung beim Kochen mit Magnesia in den peptischen Verdauungsflüssigkeiten der Eiweißkörper bedeutend mehr Ammoniak als bei der Bestimmung im Vacuum. Hofmeister's Beiträge, Bd. II, S. 479.

säure in alkoholischer Lösung bei Gegenwart von Essigsäure, ferner Bleiessig, Zinnchlorür in salzsaurer Lösung, Uranylacetat und endlich Trichloressigsäure. Mit Uranylacetat haben wir nur einen Versuch angestellt, da das käufliche sogenannte reine Präparat stets Ammoniak enthielt.

Manche dieser Eiweißfällungsmittel liefern bei Untersuchung der Milch,<sup>1)</sup> des Colostrums, der Pflanzensamen und Keimpflanzen brauchbare und übereinstimmende Resultate, aber bei der Untersuchung des Käses fanden wir zuweilen beträchtliche, 0,5% übersteigende Differenzen des Gesamt-Eiweißstickstoffs, je nach den Versuchsbedingungen. Vor allen Dingen scheint die Temperatur des zur Extraktion verwendeten Wassers, die Dauer der Digestion und die Wassermenge einen wesentlichen Einfluß auf das Analysenergebnis zu haben, wie sich aus den Bestimmungen der im Wasser löslichen organischen Substanz ergibt. Daß solche Differenzen auftreten können, mag nicht wundernehmen, wenn man bedenkt, daß im Käse neben dem im Wasser unlöslichen Paracasein und den wasserlöslichen krystallinischen Spaltungsprodukten auch die dazwischen liegenden Eiweißstoffe, die Albumosen (Prot-, Deutero-, Hetero-), ferner die verschiedenartigsten Peptone und Polypeptide auftreten können. Man darf ohne Zweifel auf Grund der in der Einleitung angegebenen Versuchsergebnisse behaupten, daß die Spaltung des Paracaseins bei der Käsereifung in mancher Beziehung komplizierter verläuft, als die Verdauung des Caseins durch proteolytische Fermente,<sup>2)</sup> denn bei der Käsereifung kommt nach Freudenreich<sup>3)</sup> vor allen Dingen die Mitwirkung der Bakterien in Betracht, wobei sich wohl auch die regulatorische Bildung proteolytischer Fermente geltend macht und wobei wohl auch gewisse Produkte von den Bakterien teilweise verbraucht bzw. in andere Substanzen umgewandelt werden. Wegen dieser

<sup>1)</sup> Vergl. aber hierüber J. Sebelien. Studien über die analytische Bestimmung der Eiweißkörper, mit besonderer Berücksichtigung der Milch. Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 135.

<sup>2)</sup> Zur weiteren Entscheidung dieser Versuche haben wir einige Verdauungsversuche mit proteolytischen Fermenten angestellt und wollen die Verdauungsflüssigkeit auf die sekundären Eiweißspaltungsprodukte untersuchen. — <sup>3)</sup> Zentralblatt f. Bakteriologie. Bd. VI, S. 332.

komplizierten Verhältnisse haben wir bei den quantitativen Bestimmungen eine Trennung der Albumosen und Peptone<sup>1)</sup> nicht versucht. Solche Versuche haben nur einen Wert, wenn durch qualitative Untersuchung die Eigenschaften einiger solcher Stoffe aufgeklärt sind. Außerdem hätten die erhaltenen Resultate keine große Bedeutung für die Praxis. Über die komplizierten Verhältnisse eines aus Casein mit Pepsinsalzsäure erhaltenen Verdauungsgemisches vergleiche man die neueren Arbeiten von E. Zunz:<sup>2)</sup> auch sei auf die Arbeiten von E. P. Pick<sup>3)</sup> und auf die interessanten Ergebnisse, welche K. Spiro<sup>4)</sup> bei seinen Untersuchungen über «Die Fällungen von Colloiden» erhalten hat, verwiesen. L. van Slyke und B. Hart haben auf etwas anderem Wege als wir die quantitative Untersuchung<sup>5)</sup> des Käses (Cheddarkäses) vorgenommen. Leider ist uns diese Arbeit bisher nicht zugänglich gewesen. Die genannten Forscher sagen aber in einer späteren Mitteilung folgendes:<sup>6)</sup> «it should be remembered, that our methods of separation are far from perfect». Wir können daher auch nicht behaupten, daß unsere Zahlen einwurfsfrei sind. Wir wollten mit den nun zu beschreibenden analytischen Ergebnissen nur einen Beitrag zu dieser Frage liefern und auf die großen Schwierigkeiten der quantitativen Untersuchung des Käses hinweisen.

Wir beschreiben nun im folgenden, wie wir bei der Fällung mit den genannten Reagentien verfahren, und teilen die dabei erhaltenen Resultate mit.

Mit Kupferhydroxyd. Die bei Fällung der Eiweißstoffe mit Kupferhydroxyd erhaltenen Stickstoffzahlen schwankten zwischen 11,3 und 12<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, je nachdem wir kürzere oder längere Zeit die Substanz mit Wasser in Berührung ließen, auch hatte

<sup>1)</sup> Über dieses Verhalten vergleiche man bei Thierfelder, Hoppe-Seylers Handbuch der physiol. und pathol. chem. Analyse, S. 320.

<sup>2)</sup> Weitere Untersuchungen über den Verlauf der peptischen Eiweißspaltung. Hofmeister's Beiträge, Bd. II, S. 435.

<sup>3)</sup> Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. Hofmeister's Beiträge, Bd. II, S. 481.

<sup>4)</sup> Hofmeister's Beiträge, Bd. IV, S. 300.

<sup>5)</sup> New-York. Agricultural Experiment. Station. Bulletin Nr. 215.

<sup>6)</sup> loc. cit. Bulletin Nr. 233, S. 93.

die Temperatur des zur Extraktion der löslichen Stoffe verwendeten Wassers und die Alaunmenge<sup>1)</sup> einen Einfluß auf das Analyseergebnis. Die niedrigsten Zahlen für Eiweißstickstoff erhielten wir, als wir nur kleine Mengen, einige Tropfen Alaun anwendeten. Nach A. Stutzer<sup>2)</sup> geht in den Kupferhydroxydniederschlag nur ein Teil der Peptone ein. Wir erhielten einigermaßen übereinstimmende Resultate in folgender Weise: 2 g Substanz wurden mit 100 ccm Wasser von 60—63° übergossen und kurze Zeit stehen gelassen: nun fügten wir 1—2 ccm gesättigter Alaunlösung und soviel Kupferhydroxyd hinzu, daß ein beträchtlicher Teil von letzterem ungelöst blieb. Die blaue Flüssigkeit wurde abfiltriert, der Rückstand einmal durch Dekantation mit etwa 30 ccm Wasser ausgewaschen, sodann auf ein aschenfreies Filter gebracht und so lange ausgewaschen, bis die Flüssigkeit farblos abfloß. Bei allen derartigen Bestimmungen wurde mit Hilfe eines guten Vacuums unter Anwendung von Platinkonussen jeweilen gut abgesogen.

Die blaue Flüssigkeit und sämtliche Waschwasser benützten wir zur Bestimmung der Basen, wobei wir die Flüssigkeit mit Schwefelsäure ansäuerten und auf 100 ccm eindunsteten. Dabei schied sich zuweilen eine weiße, amorphe Substanz in Flocken aus.<sup>3)</sup> Wir bestimmten in einigen Fällen darin den Stickstoff und fanden 0,3—0,5% Stickstoff, bezogen auf die aschen- und wasserfreie Ausgangssubstanz. Somit scheint nicht immer alles Eiweiß durch das Kupferhydroxyd gefällt zu werden, Es ist uns allerdings nicht gelungen, alle Ursachen dieser Erscheinung und die Schwankungen, welche sich bei der Eiweißbestimmung mit Kupferhydroxyd herausstellten, aufzuklären.

<sup>1)</sup> Wir machten die Beobachtung, daß der Kalialaun zuweilen Ammoniak enthält.

<sup>2)</sup> Zeitschrift f. analytische Chemie, Bd. XXXI, S. 505.

<sup>3)</sup> Es wurde konstatiert, daß diese Substanz eiweißartiger Natur war; sie gab einige Farbenreaktionen der Eiweißkörper. Daß bei dieser Eiweißbestimmung Leucinkupfer mitgefällt wird, wie St. Bondzýnsky annimmt, ist kaum zu befürchten, da Leucinkupfer sich bei Anwesenheit anderer Aminosäuren und Stickstoffverbindungen besonders in saurer Lösung nicht ausscheidet. Immerhin soll der mit Kupferhydroxyd erhaltene Niederschlag einmal darauf untersucht werden.



Verfahren wir aber in der beschriebenen Weise, so fanden diese Ausscheidungen nicht statt. Von den vielen bei dieser Eiweißbestimmung erhaltenen Zahlen seien folgende erwähnt, welche sich auf die fett- und aschenfreie Trockensubstanz des in oben beschriebener Weise präparierten Käsepulvers beziehen: 11,68<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 11,73<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 11,53<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Eiweißstickstoff.

Mit Gerbsäure. Wir verwendeten hierzu die Almén-sche Lösung. 4 g Gerbsäure werden in 190 ccm 50<sup>0</sup>/<sub>0</sub>igen Alkohols gelöst und 8 ccm 25<sup>0</sup>/<sub>0</sub>iger Essigsäure hinzugefügt. 2 g Substanz wurden mit 100 ccm Wasser übergossen, sodann mit 5 ccm obiger Lösung versetzt; nachdem der Niederschlag sich abgesetzt hatte, wurde die Flüssigkeit abfiltriert, der Rückstand einmal durch Dekantation und auf dem Filter dreimal mit Wasser ausgewaschen, möglichst trocken gesogen und dann nach Kjeldahl verbrannt. Die mit verschiedenen Portionen ausgeführten Bestimmungen gaben Resultate, die Schwankungen von weniger als 0,5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> N aufwiesen. Einzelne Zahlen, die wir mit Kupferhydroxyd erhielten, stimmten mit den hier erhaltenen recht gut überein, öfters aber fanden wir etwas kleinere Zahlen. Die Mengen der zugesetzten Gerbsäure haben auch einen Einfluß auf das Resultat.<sup>1)</sup> Die vollständige Ausfällung der Eiweißkörper durch Gerbsäure hängt aber auch mit dem Salzgehalt zusammen, bei Gegenwart von Kochsalz ist die Ausfällung vollständiger. Diese Bestimmung ist rasch durchführbar, der Rückstand leicht auszuwaschen und das Filtrat kann ebenso wie beim Kupferhydroxyd direkt für die Bestimmung des Basenstickstoffs verwendet werden. Doch bedarf es noch weiterer Versuche, um die verschiedenen beobachteten Differenzen aufzuklären.

Wir fanden folgende auf die aschen-, fett- und wasserfreie Substanz umgerechneten Zahlen: 11,47<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 11,87<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Eiweißstickstoff.

Mit Bleiessig. 2 g Substanz wurden, wie beim Kupferhydroxyd angegeben, mit Wasser behandelt und dann vorsichtig Bleiessiglösung hinzugefügt, bis keine Fällung mehr auftrat: da bekanntlich ein Überschuß von Bleiessig lösend auf den Bleiessigniederschlag wirkt, so ist ein Überschuß davon zu vermeiden. Wir hatten vielfach beobachtet, daß beim Ausfällen

<sup>1)</sup> Siehe Thierfelder, S. 326 und 324.

größerer Mengen — wie wir sie bei den qualitativen Untersuchungen verwendeten — bei Überschuß von Bleiessig Filtrate erhalten werden, welche beim Eindunsten eine klebrige Masse absetzen, welche die Eiweißreaktionen zeigte. Die erhaltenen Zahlen stimmen mit denjenigen ziemlich gut überein, die wir mit Kupferhydroxyd erhielten, und da der Bleiessig, wie gezeigt werden wird, auch die im Wasser leichtlöslichen Formen des Caseins ausfällt, so eignet er sich wohl für diese Zwecke; da aber das Ausfällen längere Zeit in Anspruch nimmt, weil man die Flüssigkeit erst absetzen lassen muß, ehe man neue Mengen Bleiessig zufließen läßt, und weil Bleiessig keinen weiteren Vorteil gegenüber Kupferhydroxyd als Fällungsmittel bietet, so haben wir keine große Anzahl Versuche damit angestellt. Außerdem eignet sich das Filtrat vom Bleiessigniederschlag nicht so gut für die Bestimmung des Basenstickstoffs, da der Niederschlag mit Phosphorwolframsäure durch das stets vorhandene Blei beträchtlich vermehrt wird.

Wir fanden: 11,63% und 11,67% Eiweißstickstoff.

Mit Uranylacetat. Wir teilen die erhaltenen Ergebnisse hier nicht mit, da dieselben mit Rücksicht auf die im käuflichen Präparat vorhandenen Beimengungen nicht einwurfsfrei erscheinen.

Mit Zinnchlorür. Wir benützten eine Zinnchlorürlösung,<sup>1)</sup> welche durch Auflösen von 30 g geraspelten Zinn mit reichlicher Menge von Salzsäure, Zugabe von etwas Platinchlorid, Eindampfen auf 130 ccm, darauffolgendes Verdünnen auf 1 l und Filtrieren hergestellt worden war. Die Lösung verwahrt man in gut verschließbaren Glasflaschen. 2 g Substanz wurden mit 50 ccm Wasser digeriert, 10 ccm Zinnchlorürlösung zugesetzt, über Nacht stehen gelassen und im übrigen verfahren, wie bei den vorhergehenden Bestimmungen angegeben. Einen Zusatz von Salzen machten wir bei der Ausfällung mit Zinnchlorür nicht.

Wir erhielten 11,53 und 11,28% Eiweißstickstoff, in anderen Fällen aber bedeutend weniger.

<sup>1)</sup> Siehe Vaubel, Die physik. und chemischen Methoden der quantitativen Bestimmungen organischer Verbindungen, Bd. I. S. 225.

Wir vermuten, daß durch die lang andauernde Einwirkung der im Fällungsmittel enthaltenen Salzsäure auf die wasserlöslichen Eiweißkörper einfachere, durch Zinnchlorür nicht mehr fällbare Abbauprodukte entstehen, wodurch sich die zuweilen gefundenen niederen Zahlen erklären lassen; ferner sollen durch dieses Reagens nur die echten Eiweißkörper gefällt werden. Dieses Fällungsmittel bietet also keinen Vorteil gegenüber den zuerst erwähnten.

Mit Trichloressigsäure. 2 g Substanz wurden mit 50 ccm Wasser behandelt und mit 12 ccm 40%iger Trichloressigsäure gefällt. Im übrigen verfahren wir wie oben.

Wir erhielten 11,61 und 11,53% Eiweißstickstoff.

Möglicherweise lassen sich die Eiweißstoffe vollständig quantitativ abscheiden, wenn man die Fällung derselben mit zwei Fällungsmitteln, z. B. Gerbsäure und Bleiessig, vornimmt und dabei so verfährt, daß man den mit dem ersten Fällungsmittel erhaltenen Niederschlag von der Flüssigkeit trennt und das Filtrat mit Bleiessig ausfällt. Bei den in unserem Laboratorium durchgeführten Untersuchungen pflanzlicher Objekte ist es uns stets gelungen, die Eiweißstoffe auf diese Weise vollständig anzufällen. Einige solche Versuche mit Käse sollen noch angestellt werden.

Mit Brücke'schem Reagens haben wir vorläufig keine Versuche angestellt, da durch dasselbe gewisse Basen (z. B. Tetramethyldiamin) gefällt werden können und weil wegen des Kaliumgehaltes dieses Reagens das Ausfällen der Basen mit Phosphorwolframsäure nicht so bequem ist, da man zuweilen feine, schwer zu filtrierende Niederschläge erhält.

#### 4. Bestimmung der durch Wasser in Lösung gehenden Eiweißsubstanzen.

Die durch Kochen koagulierbaren Eiweißsubstanzen. In der zweiten Mitteilung wurde ein Eiweißkörper<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Schon St. Bondzyński hat die Beobachtung gemacht, daß der wässrige Käseextrakt einen auf Zusatz von Säuren sich ausscheidenden Eiweißstoff enthält. loc. cit. S. 203. L. van Slyke und B. Hart bezeichnen einen solchen aus Cheddarkäse erhaltenen Eiweißkörper mit dem Namen Paranuclen. American Chemical Journal, Vol. XXIX, Nr. 4.

erwähnt, welcher aus dem Käse durch Behandeln mit Wasser und Erhitzen der filtrierten wässerigen Lösung unter Zusatz von Essigsäure erhalten worden war. Mit Rücksicht auf die auch von uns gemachten Beobachtungen über das Verhalten des Caseins zu Salzen muß man sich die Frage vorlegen, inwieweit dieser mit dem Namen Tyroalbumin belegte Eiweißstoff im Käse präformiert vorkommt, oder ob er erst durch Behandeln mit Wasser aus den unlöslichen Eiweißsubstanzen abgespalten wird. Zur Aufklärung dieser Frage bedarf es einer eingehenden Untersuchung der Eiweißstoffe des Käses. Es schien uns angezeigt, mit Rücksicht auf diese geplanten Untersuchungen einige Versuche auszuführen. Wir übergossen 10 bzw. 20 g Substanz mit 100 ccm Wasser, filtrierten vom Unlöslichen ab, wuschen den Rückstand zweimal durch Dekantation und dann auf dem Filter aus, sodaß ungefähr 200—250 ccm Flüssigkeit erhalten wurden. Die Lösung erhitzen wir unter Zusatz einiger Tropfen Eisessig zum Sieden, wobei in einigen Fällen die Ausscheidung der Eiweißsubstanz in dichten Flocken erfolgte, oft trat aber nur eine starke, milchige Trübung auf, welche wir durch Auflösen in verdünnter Lauge und auf erneuten Zusatz von Essigsäure und etwas Alkohol zur Ausflockung bringen konnten; dieses Ausflocken war allerdings in angegebener Weise nicht immer zu erreichen. Zuweilen gelang dies auch auf Zusatz von etwas Natriumacetat oder Kochsalz. In einigen Fällen konnten wir ein Zusammenballen trotz aller Bemühungen nicht erzielen. Der erhaltene Niederschlag wurde auf ein bei 100° getrocknetes Filter gesammelt, ausgewaschen und wieder bei 100° getrocknet. Im Rückstand bestimmten wir in einigen Fällen den Stickstoff, in anderen den Aschengehalt, der aber minimal war. Wir fanden 1,83, 2,17, 2,25% durch Kochen koagulierbare Substanz. Der Stickstoffgehalt betrug 0,22%, 0,28%, 0,22%, berechnet auf die wasser- und aschenfreie Ausgangssubstanz (Käsepulver).

Die Peptone und Polypeptide. Mit diesen beiden Sammelnamen wollen wir vorläufig diejenigen wasserlöslichen Eiweißstoffe bezeichnen, welche in den Bleiessigniederschlag eingehen, nachdem man aus dem wässerigen Käseextrakt die

koagulierbaren Eiweißstoffe so vollständig als möglich in der soeben beschriebenen Weise abgeschieden hat. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß in diesem Niederschlag auch Albumosen enthalten sein können. Wir erhielten recht brauchbare Resultate beim Arbeiten unter verschiedenen Versuchsbedingungen. 10 bzw. 20 g Substanz wurden mit 100 ccm Wasser von 60—65° unter Zusatz einiger Tropfen Eisessig kurze Zeit digeriert, die Flüssigkeit abfiltriert und der Rückstand ausgewaschen, sodaß etwa 200—250 ccm Flüssigkeit resultierten. In einigen Fällen benützten wir auch die bei der Bestimmung der koagulierbaren Eiweißstoffe erhaltenen Filtrate. Diese Flüssigkeiten versetzten wir mit 5 ccm Bleizucker<sup>1)</sup> und fällten mit Bleiessiglösung vollständig aus, wobei ein Überschuß aus den auf Seite 45 angegebenen Gründen sorgfältig vermieden wurde. Wir brauchten in der Regel auf 10 g Substanz 15—20 ccm der käuflichen Bleiessiglösung vom spezifischen Gewicht 1,25. Nach 12stündigem Stehen wurde abfiltriert, durch Dekantation und auf dem Filter unter starkem Absaugen ausgewaschen, sodaß etwa 350 ccm Flüssigkeit resultierten, welche wir zur Bestimmung der Hexonbasen benutzten. Im Niederschlag wurde der Stickstoff nach Kjeldahl ermittelt. Bei diesen Bestimmungen erhielten wir folgende Zahlen: 0,97%, 0,90%, 1,17% «Pepton»-Stickstoff.

Es sind also nicht unbedeutende Mengen Stickstoff im Bleiessigniederschlag enthalten; diesen Stickstoffquantitäten entsprechen etwa 6% löslicher Eiweißstoffe. Es ist aber auffällig und zurzeit noch unerklärbar, daß wir aus diesem Bleiessigniederschlag durch Zersetzen desselben mit Schwefelsäure und Fällen der Lösung mit Phosphorwolframsäure aus dieser letzten Fällung wesentlich geringere Mengen wasserlöslicher Eiweißstoffe erhielten, als man auf Grund der gefundenen Stickstoffzahlen erwarten sollte.<sup>2)</sup> Es macht den Eindruck, als ob

<sup>1)</sup> Bleizucker soll das Ausfällen gewisser Purinbasen verhindern, da aber die Quantität dieser Körper nur gering ist, so ist der Bleizuckerzusatz nicht unbedingt notwendig.

<sup>2)</sup> Nach E. Zunz, loc. cit. S. 472, treten schon zu Beginn der peptischen Verdauung Produkte auf, welche die Biuretreaktion nicht mehr

im Bleiessigniederschlag Stickstoffverbindungen vorhanden sind, welche durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar sind. Einen Beleg für diese Ansicht gibt folgender Versuch: Wir bereiteten einen wässerigen Auszug in der Kälte, filtrierten vom Rückstand ab und fällten den wässerigen Auszug mit Phosphorwolframsäure. Die Menge des in diesem Niederschlag enthaltenen Stickstoffs betrug in einem Falle 2,25%; in diesem Niederschlag sollten der Basen- inklusive Ammoniakstickstoff und der den wasserlöslichen Eiweißstoffen zukommende Stickstoff enthalten sein. Aus der am Ende angeführten Tabelle ist aber ersichtlich, daß die Summe dieser drei Stickstoffzahlen 2,65% beträgt. Wir gedenken daher, den Bleiessigniederschlag noch genauer zu untersuchen.

Mit dem Namen Caseoglutin bezeichnet Weidmann<sup>1)</sup> die durch verdünnten warmen Alkohol in Lösung zu bringende Substanz, welche von R. Röse und E. Schulze,<sup>2)</sup> später von F. Benecke und E. Schulze<sup>3)</sup> und von E. Winterstein<sup>4)</sup> näher untersucht worden ist. Diese Substanz zeigt nach Röse und Schulze gegenüber Lösungsmitteln ein wechselndes Verhalten; die beiden letztgenannten Autoren sprachen die Vermutung aus, daß das Caseoglutin vielleicht ursprünglich in Wasser löslich ist. Ob dieser Eiweißkörper, welcher auf Grund seines Verhaltens zu Alkohol vielleicht zu den Protalbumosen gezählt werden kann, einheitlich ist, ist durch diese Untersuchung nicht entschieden worden. Daß das Caseoglutin des Emmentaler Käses aber keine milchsaure Verbindung<sup>5)</sup> ist, geht auch aus folgenden

geben und nur zum geringen Teil durch Phosphorwolframsäure fällbar sind. Leider sagt Zunz nichts über das Verhalten dieser Substanzen zu Bleiessig.

<sup>1)</sup> U. Weidmann, Untersuchungen über die Zusammensetzung und den Reifungsprozeß des Emmentaler Käses. Landw. Jahrbücher, 1882, S. 594.

<sup>2)</sup> Untersuchungen über den Emmentaler Käse und über einige andere schweizerische Käsesorten. loc. cit. 1887, S. 317.

<sup>3)</sup> Über einige Bestandteile des Emmentaler Käses. Landwirtschaftliche Versuchsstation, Bd. XXXI, S. 115.

<sup>4)</sup> loc. cit. II. Mitteilung.

<sup>5)</sup> Nach L. van Slyke und B. Hart soll das Paracasein ein Lactat sein, was aber nach O. Jensen schon deshalb nicht möglich ist, weil

von uns angestellten Versuchen hervor. Wir schüttelten Caseoglutin mit verdünnter Schwefelsäure und viel Äther, konnten aber in der ätherischen Schicht keine Milchsäure auffinden. Wir haben einige Versuche angestellt, um Aufschluß über die Quantitäten dieser Substanz zu gewinnen; daß die erhaltenen Resultate große Schwankungen aufweisen, mag nicht wundernehmen, wenn man bedenkt, daß aus dem Casein auch schon mit 60%igem Alkohol etwas in Lösung geht. Wir extrahierten 5 g Substanz vollständig mit Wasser, den Rückstand kochten wir mit 100 ccm 60%igem Alkohol dreimal aus, dunsteten die Lösungen auf dem Wasserbade ein, lösten die anhaftenden klebrigen Massen in wenig Lauge auf und fällten mit verdünnter Essigsäure aus. Die Fällung wurde auf ein bei 100° getrocknetes und gewogenes Filter gebracht, ausgewaschen und getrocknet.

Wir fanden 5,2, 9,6, 7,1, 9,1% «Caseoglutin». Als wir den Rückstand sodann noch achtmal mit je 50 ccm Alkohol auskochten, hinterließen alle diese Extrakte nach dem Eindunsten stets kleine Mengen Substanz, welche das Verhalten des Caseoglutins zeigten.

##### 5. Bestimmung des in den Phosphorwolframsäure-niederschlag eingehenden Stickstoffs.

Hierzu verwendeten wir die Filtrate vom Kupferhydroxyd-, vom Gerbsäure- und vom Bleiessigniederschlag. Die abweichenden Zahlen, die wir bei der Eiweißbestimmung erhielten, machten sich natürlich auch hier geltend. Wir fanden gut übereinstimmende Zahlen in den Filtraten vom Kupferhydroxyd, wenn wir die Ausfällung der Eiweißstoffe mit dem genannten Reagens vornahmen, wie angegeben. Das blau gefärbte Filtrat dunsteten wir entweder direkt oder auf Zusatz einiger Tropfen Schwefelsäure auf 50—100 ccm ein, fügten so viel konzentrierte Schwefelsäure hinzu, daß die Lösung 5% davon enthielt, fällten mit 10 ccm 25%iger Phosphorwolframsäure aus, ließen 24 Stunden stehen, filtrierten ab, wuschen den Niederschlag durch Dekantation

im Käse die hierzu erforderliche Menge von Milchsäure nicht vorhanden ist. loc. cit. Bulletin Nr. 234. O. Jensen, Landw. Jahrbücher der Schweiz, 1904.

einmal und auf dem Filter mit 5%iger Schwefelsäure aus, so daß etwa 150 ccm Flüssigkeit erhalten wurden. Es sei bemerkt, daß ein größerer Überschuß von Phosphorwolframsäure zu vermeiden ist, da die Fällung sich teilweise wieder auflöst. Auch darf man nicht, wie dies manchmal geschieht, mit phosphorwolframsäurehaltiger Schwefelsäure auswaschen; wir beobachteten nämlich, daß in solchen Fällen, bei einigem Stehen der Filtrate, krystallinische Fällungen auftraten, zuweilen aber trübte sich das Filtrat beim Eintropfen einer solchen Waschflüssigkeit, was wohl auf eine partielle Lösung der auf dem Filter befindlichen Fällung zurückgeführt werden darf. Die Fällung mit Phosphorwolframsäure wurde gut abgesogen und nach Kjeldahl verbrannt. Die Oxydation mit Schwefelsäure verläuft glatt und ohne Stoßen, wenn man ziemlich viel Kupferoxyd — wir verwendeten 1,5–2 g — hinzufügt. Siegfried<sup>1)</sup> hat für die Verbrennung solcher Niederschläge einen besonderen Apparat angegeben, um das lästige Stoßen zu vermeiden; bei einem reichlichen Zusatz von Kupferoxyd bedarf es weiter keiner besonderen Einrichtungen.

Wir fanden folgende Stickstoffmengen: 1,26, 1,36, 1,5, 1,60%. In diesen Zahlen ist auch der Ammoniakstickstoff enthalten. Es schien uns ferner noch der Mühe wert, den Stickstoff der sogenannten Lysinfraktion zu bestimmen. Zu diesem Zwecke benützten wir die von Kossel und Kutscher<sup>2)</sup> angegebenen Trennungsmethoden der Hexonbasen und bestimmten dabei auch den mit Silbersulfat und Baryt fällbaren Stickstoff, der hauptsächlich auf das Histidin entfällt, da das Arginin nicht aufgefunden werden konnte. Es können allerdings, wenn man die Basen nicht mit Phosphorwolframsäure von den Aminosäuren trennt, sondern die Fällung direkt mit Silbersulfat und Baryt vornimmt, in den Niederschlag auch kleine Mengen Aminosäuren eingehen;<sup>3)</sup> wir fanden aber in beiden Fällen nahezu übereinstimmende Werte. Diese Bestimmungen sollen mit etwas größeren Mengen Ausgangsmaterial wiederholt werden.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 1.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165.

<sup>3)</sup> F. Kutscher, Zur Kenntnis der Amidosäuren der Reihe  $C_nH_{2n+1}NO_2$ . Sitzungsberichte der Königl. Preuß. Akademie der Wissenschaften, Bd. XXVI, 1902.



Für die Stickstoffbestimmung der Lysinfraktion verwendeten wir das vom Bleiessigniederschlag bei der Bestimmung des Peptonstickstoffs erhaltene Filtrat, befreiten es mit Hilfe von Schwefelsäure vom Blei; erhitzen die vom Bleisulfat getrennte Lösung mit Baryt, um das Ammoniak auszutreiben, und fällten mit Silbersulfat<sup>1)</sup> und Baryt aus; der Silberniederschlag wurde gut ausgewaschen, die Fällung mit Schwefelwasserstoff zersetzt, in der vom Silbersulfid getrennten Flüssigkeit wurde der Stickstoff bestimmt. Das Filtrat vom Silberbarytniederschlag wurde mit Salzsäure neutralisiert, vom Chlorsilber abfiltriert, eingedunstet, das Baryum mit Schwefelsäure entfernt und das Filtrat vom Baryumsulfat mit Phosphorwolframsäure in 5%iger Lösung gefällt, die Fällung nach 24stündigem Stehen auf ein Filter gesammelt, mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen und unter Anwendung von viel Kupferoxyd wurde der Niederschlag nach Kjeldahl verbrannt.

Wir fanden 0,56% Stickstoff in der Lysinfraktion und 0,37% Stickstoff in der Silbersulfatbarytfällung. Diesen Stickstoff wollen wir als Stickstoff der Histidinfraktion bezeichnen.

Die Lysinfraktion schließt neben Basen einen in kochendem absoluten Alkohol löslichen leimartigen Körper ein, welcher die Millon'sche Reaktion sehr stark gibt. Dieser Befund wurde erst nach Abschluß des Manuskriptes der vorliegenden Arbeit gemacht.

## 6. Bestimmung der Purinkörper.

U. Weidmann<sup>2)</sup> und auch Benecke und Schulze<sup>3)</sup> konnten aus dem Käse keine Xanthinbasen isolieren. Das Ergebnis unserer quantitativen Bestimmung bestätigt die von den Genannten gemachten Angaben. Wir bestimmten die Alloxurkörper in dem mit ganz verdünnter kalter Salzsäure und in dem durch zweistündige Digestion in der Wärme mit 0,5%iger

---

<sup>1)</sup> Das käufliche Silbersulfat enthielt stets kleine Mengen von salpetriger Säure; das Präparat wurde daher längere Zeit mit konzentrierter Schwefelsäure gekocht und zur Trockne eingedunstet.

<sup>2)</sup> loc. cit.

<sup>3)</sup> loc. cit.

Schwefelsäure erhaltenen Extrakt unter Benützung der von M. Krüger und J. Schmid angegebenen Methode.<sup>1)</sup>

Wir nahmen je 20 g Substanz für diese Bestimmung, fällten die salzsäurehaltige oder die beim Digerieren mit Schwefelsäure in der Wärme erhaltene Lösung mit Bleiessig vollständig aus, filtrierten vom Bleiessigniederschlag ab, entfernten das in Lösung verbliebene Blei mit Schwefelsäure, neutralisierten das Filtrat mit Soda, dunsteten ein und fällten mit Kupfersulfat und Bisulfit aus, die Kupferoxydul fällung wurde mit heißem Wasser ausgewaschen, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das vom Kupfersulfid getrennte Filtrat, nachdem der Schwefelwasserstoff durch Kochen entfernt worden war, nochmals mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt: in der gut ausgewaschenen rotbraunen Fällung bestimmten wir den Stickstoff.

Wir fanden 0,03 und 0,02% Purinbasenstickstoff im salzsäurehaltigen und 0,03 und 0,03% N im schwefelsauren Auszug. Der Käse enthält somit nur minimale Mengen freier Purinkörper und keine echten Nucleinverbindungen.

E. Winterstein<sup>2)</sup> konnte kleine Mengen Substanz abscheiden, welche die Murexidreaktion gaben.

### 7. Bestimmung der Aminosäuren.

Der auf die Aminosäuren entfallende Stickstoff läßt sich annähernd berechnen, wenn man vom Gesamtstickstoff die Summe des Basen- und Eiweißstickstoffs subtrahiert.

Zur Kontrolle bestimmten wir ferner noch den im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag vorhandenen Stickstoff, indem wir die Filtrate und Waschwasser im Oxydationskolben unter Zusatz von Schwefelsäure und 2 g Kupferoxyd eindampften und verbrannten. Die erhaltenen Resultate dürfen als befriedigend bezeichnet werden, wenn man bedenkt, daß im letzten Falle sich alle Versuchsfehler summieren.

Wir fanden 1,47%, 1,32%, 1,66% Aminosäurenstickstoff.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seyler's Lehrbuch, S. 435. Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 1.

<sup>2)</sup> loc. cit. II. Mitteilung.

### 8. Bestimmung des Stickstoffs im wässrigen Auszug.<sup>1)</sup>

Die Differenzen, welche sich bei der Eiweißstickstoffbestimmung herausstellten, traten natürlich auch hier auf, wenn man die schon früher erwähnte Veränderlichkeit der in Frage kommenden Eiweißkörper in Betracht zieht. Einigermaßen brauchbare und übereinstimmende Zahlen wurden wie folgt erhalten: 2 g Substanz wurden mit 100 ccm Wasser bei gewöhnlicher Temperatur digeriert, zweimal durch Dekantation ausgewaschen, abfiltriert, so daß ca. 200 ccm Flüssigkeit resultierten. Darin wurde der Stickstoff<sup>2)</sup> bestimmt mit folgenden Ergebnissen: 4,28<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 4,24<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

### 9. Bestimmung der in das wässrige Extrakt übergehenden organischen Substanzen.

2 g Substanz wurden wie oben mit Wasser behandelt, das wässrige Extrakt in einer Platinschale bei 100<sup>0</sup> getrocknet, bis die Gewichts Differenz nicht mehr als 1/2 mg betrug; der Trockenrückstand wurde sodann verascht und der gefundene Aschengehalt vom Trockenrückstand abgezogen, wobei die aus den Eiweißstoffen stammende Phosphorsäure und Schwefelsäure als Aschenbestandteile betrachtet wurden. Es wurden z. B. gefunden 24,79 und 27,25<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.<sup>3)</sup> Wurde die Extraktion in der Hitze vorgenommen, so fanden wir mehr wasserlösliche organische Substanz.

Am Ende geben wir noch eine Zusammenstellung der bei Untersuchung der beiden Käsepartien erhaltenen Zahlen. Wie aus dieser Zusammenstellung zu ersehen ist, weichen diese beiden untersuchten Proben, die 8 Monate alte von der 11 Monate

---

<sup>1)</sup> Vergleiche St. Bondzyński: Landwirtschaftliche Jahrbücher der Schweiz, 1904, S. 189. O. Jensen, Zentralblatt für Bakteriologie, Bd. VI, S. 842.

<sup>2)</sup> Es soll noch die Stickstoffmenge ermittelt werden, welche in den Gerbsäureniederschlag eingeht.

<sup>3)</sup> Vergleichbare Resultate bei der Bestimmung der stickstoffhaltigen Bestandteile wird man nur erhalten, wenn man stets unter ganz genau gleichen Versuchsbedingungen arbeitet.

alten, in bezug auf die Stickstoffverbindungen nur wenig von einander ab. Die Bildung der krystallinischen Spaltungsprodukte aus dem Paracasein erfolgt also zu Beginn des Reifungsvorganges rasch, in den späteren Stadien der Reifung entstehen nur unbedeutende Mengen solcher Stoffe; bei längerem Lagern scheinen die sekundären Vorgänge in Vordergrund zu treten, denn man findet eine beträchtliche Vermehrung des Ammoniakstickstoffs, ohne daß die Menge Basenstickstoff eine nennenswerte Änderung erleidet. Ferner erkennt man aus der Tabelle, daß die Menge des in den Bleiessig eingehenden Stickstoffs abgenommen hat, was wohl so zu deuten ist, daß die wasserlöslichen Peptone und Polypeptide weiter zersetzt worden sind.<sup>1)</sup> Diese Ergebnisse beziehen sich auf den in beschriebener Weise fabrizierten Käse, wobei zu berücksichtigen ist, daß das 11 Monate alte Stück nur einen kleinen Bruchteil des ganzen Käselaiibes repräsentiert und man nicht mit aller Sicherheit behaupten kann, daß der Prozeß der Zersetzung des Eiweißes in einem ganzen, intakten Käse ebenso verläuft, doch ist dies sehr wahrscheinlich und stimmt auch gut mit den von L. van Slyke und B. Hart gemachten Beobachtungen überein, wonach in der ersten Zeit der Reifung des Cheddarkäses viel mehr Kohlensäure gebildet wird als in den letzten Wochen, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß die in den ersten Tagen entwickelte Kohlensäure durch Gärung des Milchzuckers gebildet wird. Auf der Kohlensäureentwicklung beruht auch die Abnahme der Trockensubstanz, welche nach F. Benecke und E. Schulze 1,5% beträgt. Durch die Abnahme der Trockensubstanz ist vielleicht auch die kleine prozentuale Zunahme des Gesamtstickstoffs, die wir in dem 11 Monate alten Käse fanden, zu erklären. Durch quantitative Untersuchungen von altem Käse kann die vorhergehende Frage wohl der Lösung näher gebracht werden, wobei jedoch nicht nur allein das Alter, sondern auch die Qualität der verarbeiteten Milch, die Art der Fabrikation und die vorhandene Bakterienflora eine nicht zu unterschätzende Bedeutung hat.

---

<sup>1)</sup> Diese Deutung geben wir mit allem Vorbehalt, wegen der Schwierigkeit der Analysen.

Wir heben nochmals hervor, daß alle die aufgeführten Zahlen auf fett-, aschen- und wasserfreie Substanz berechnet worden sind.

Mit dieser dritten Mitteilung hoffen wir einen weiteren Beitrag zu der physiologisch-chemisch interessanten Frage über die Veränderung des Paracaseins unter Mitwirkung von Bakterien bei der Käsereifung erbracht zu haben. Wir gedenken nun noch einige quantitative Versuche anzustellen, um über das Schicksal des im Paracasein enthaltenen Phosphors Aufschluß zu erhalten. Nach Abschluß der Untersuchungen über die Eiweißkörper des Käses soll eine detaillierte Zusammenstellung aller bisher erhaltenen Resultate mit den zugehörigen analytischen Belegen und genauer Berücksichtigung der Literatur an anderer Stelle erfolgen.

|   | 8 Monate<br>alter Käse<br>% | 11 Monate<br>alter Käse<br>% <sup>1)</sup> |
|---|-----------------------------|--|
| Gesamtstickstoff . . . . .  | 14,48                       | 14,73                                      |
| Gesamteiweißstickstoff . . . . .  | 11,57                       | 11,57                                      |
| Stickstoff im koagulierbaren Eiweiß . . . . .   | 0,45                        | 0,28                                       |
| Peptonstickstoff . . . . .  | 1,04                        | 0,82                                       |
| Basenstickstoff <sup>2)</sup> . . . . .   | 1,13                        | 1,07                                       |
| Lysinstickstoff . . . . .   | 0,56                        | 0,47                                       |
| Ammoniakstickstoff . . . . .  | 0,06                        | 0,48                                       |
| Aminosäurenstickstoff . . . . .   | 1,50                        | 1,74                                       |
| Stickstoff in den Alloxurbasen . . . . .  | 0,03                        | 0,03                                       |
| Stickstoff im wässrigen Extrakt . . . . .   | 4,32                        | 4,28                                       |
| Stickstoff im Phosphorwolframsäurenieder-<br>schlag des wässrigen Extraktes . . . . . | —                           | 2,25                                       |
| Wasserlösliche organische Substanz . . . . .  | 22,76                       | 26,02                                      |

<sup>1)</sup> Obige Zahlen beziehen sich auf das in angegebener Weise aus dem frischen Käse dargestellte fettfreie Pulver, die Untersuchung auf den frischen Käse haben wir hier der Kürze halber nicht angeführt.

<sup>2)</sup> So bezeichnen wir den im Phosphorwolframsäureniederschlag enthaltenen Stickstoff, der neben den Basen (Lysin, Tetra-, Pentamethylen-diamin) auch noch andere Eiweißzersetzungsprodukte und Cholin einschließt.

Wir bemerken noch, daß wir bei dieser Zusammenstellung diejenigen Zahlen für den Eiweißstickstoff aufgeführt haben, welche sich aus dem Mittel vieler mit Hilfe von Kupferhydroxyd unter verschiedenen Bedingungen ausgeführten Bestimmungen berechneten und welche Zahlen mit denen mittels Almén'scher Lösung erhaltenen ungefähr übereinstimmen. Auffallend ist der Befund, daß der im wässerigen Auszug durch Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff kleiner ist als der den Basen, dem Ammoniak und den löslichen Eiweißstoffen zukommende Stickstoff. Man vergleiche hierüber das bei der Bestimmung des «Pepton»-Stickstoffs Gesagte.

#### Nachschrift.

Während der Drucklegung dieser Arbeit wurde im wässerigen Extrakt der in den Gerbsäureniederschlag eingehende Stickstoff bestimmt. Wir fanden 0,46 und 0,50% N. Das Filtrat vom Gerbsäureniederschlag wurde mit Bleiessig gefällt und im Niederschlag der Stickstoff bestimmt. Wir fanden 0,66 und 0,58% N.