

Über eine eigentümliche Veränderung der Milch durch Natron- resp. Kalilauge.

Von

Prof. Dr. **Friedrich Krüger**, in Tomsk.

(Der Redaktion zugegangen am 1. Dezember 1906.)

Durch ein Referat im «Biochem. Zentralblatt» (Bd. V, S. 302) wurde meine Aufmerksamkeit auf eine Mitteilung von Cl. Gautier und A. Morel¹⁾ gelenkt, die mich zu nachstehenden Zeilen veranlaßt.

In der genannten Mitteilung handelt es sich um eine Farbenreaktion der Kuhmilch, die durch Zusatz von Kali- resp. Natronlauge zu derselben bedingt wird.

Gautier und Morel fanden, daß Kuhmilch auf Zusatz von $\frac{1}{5}$ Volumen 40%iger Natron- oder Kalilauge bei Zimmertemperatur sich in 24 Stunden schön kirschrot färbt. Die Reaktion tritt nur allmählich auf und zwar sowohl bei Anwendung von gekochter, als auch von roher Milch. Mit Ammoniak gelingt sie nicht; sie wird also nicht durch die Alkalinität als solche verursacht. Wie Kuhmilch verhält sich auch Eselsmilch und Frauenmilch.

Weiter behaupten Gautier und Morel, daß zum Zustandekommen der Reaktion die gleichzeitige Gegenwart eines Eiweißkörpers, wie Casein, und eines Kohlehydrates, wie Laktose, in stark alkalischer Lösung notwendig sei.

Veränderungen der Kuhmilch durch Kali- resp. Natronlauge, die im ganzen mit den von Gautier und Morel beschriebenen identisch sind, habe ich schon vor mehr als 12 Jahren in Dorpat beobachtet und über dieselben in der Dorpater Naturforschergesellschaft am 10. März 1894 und einige Jahre

¹⁾ Compt. Rend. de la Soc. de Biol., Bd. LX, S. 376.

später auch in der Naturforscher- und Ärztegesellschaft an der Universität Tomsk Mitteilung gemacht.¹⁾

Meine Beobachtungen sind jedoch den Fachgenossen offenbar unbekannt geblieben. Ich erlaube mir daher, dieselben in folgendem kurz wiederzugeben, indem ich gleichzeitig meinen damaligen Untersuchungen einige weitere, im vergangenen Jahre, zum Teil im Verein mit Herrn Dr. V. Schröppe, ausgeführte, anreihe.

1. Gleich nach Zusatz einer genügenden Menge Kali- resp. Natronlauge ändert sich das Aussehen der Kuhmilch ein wenig, indem sie gelblicher und zugleich dickflüssiger wird. Nach einiger Zeit beginnt das Gemisch sich in zwei Schichten zu teilen — eine obere feste, gelblichweiße, undurchsichtige und eine untere gelblichgrünliche, durchsichtige. Letztere verfärbt sich allmählich, indem sie zunächst rosenrot, allendlich dunkelrot, wie eine recht konzentrierte Blut- oder Hämoglobinlösung, wird. Die beschriebenen Veränderungen werden von einer deutlichen Ammoniakentwicklung begleitet, die sich durch den Geruch kundgibt.

2. Ich gebe nun einige Versuche wieder, die angestellt waren, um die unterste Grenze des Laugezusatzes zu bestimmen, bei dem die beschriebene Reaktion noch zustande gebracht wird. Die Versuche sind mit frischer Kuhmilch ausgeführt.

Versuch I.

NaHO	Nach 30 Stunden	Nach 44 Stunden
0,5 %	Gelblich	Gelblich
1,0 %	»	Rötlich
1,5 %	Rötlich	Schön rot
2,0 %	»	» »
4,0 %	»	Rot, jedoch weniger schön als in der vorhergehenden Probe.

¹⁾ Sitzungsber. d. Dorpater Naturforscherges., Bd. X, S. 432, 1894. (Durch ein Versehen ist ein Referat nicht zum Abdruck gekommen, sondern der Vortrag nur kurz erwähnt.) — Protokolle d. Naturforscher- und Ärztegesellschaft an d. Universität Tomsk für das Jahr 1897—1898, S. 18 (Russisch).

Versuch II.

NaHO	Nach 24 Stunden	Nach 48 Stunden	Nach 60 Stunden
0,5%	Unverändert	Unverändert	Schwach rötlich
1,0%	Schwach rötlich	Rosenrot	Schön rot
2,0%	Rötlich	Hellrot	» »
4,0%	»	»	Gelbrot
6,0%	Weniger schön als in den vorhergehenden Proben		»

Versuch III.

NaHO	Nach 5 Stunden	Nach 8 Stunden	Nach 24 Stunden
0,5%	Unverändert	Gelb	Gelbbraun
1,0%	Rosenrot	Blutrot	Dunkel blutrot
2,0%	»	»	» »
4,0%	Rötlich gelb	Bräunlichrot, der rötliche Ton mit zunehmender Laugekonzentration abnehmend	Rotbraun, der rote Ton mit zunehmender Laugekonzentration abnehmend.
6,0%			
8,0%			

Fasse ich das Ergebnis dieser drei Versuche, die übrigens nicht unter ganz gleichen Bedingungen ausgeführt sind — bei Versuch I stand das Gemisch bei 20° C., bei Versuch II bei 13—14° C. und bei Versuch III bei 25—27° C. — zusammen, so ergibt sich als unterste Grenze zum Zustandekommen der Reaktion ein Gehalt von etwa 1% NaHO. Am schönsten erscheint die Färbung in den Proben, die 1—2% NaHO enthalten.

Schwankungen in dieser Beziehung werden natürlich vorkommen und das darf schon aus dem Grunde nicht wunderlich erscheinen, weil die Milch in ihrer Zusammensetzung variiert. Ich verweise nur auf den Fettgehalt derselben, der an sich schon imstande wäre, die quantitative Natronwirkung zu beeinflussen, denn je mehr Fett dieselbe enthält, um so mehr Lauge

würde zur Verseifung verbraucht und somit in bezug auf die uns interessierende Reaktion inaktiv werden.

3. Die Geschwindigkeit, mit der die Reaktion erfolgt, wird von der Temperatur beeinflusst. Innerhalb der Grenzen von 1—50° C. tritt die Rotfärbung der Milch um so schneller ein, je höher die Temperatur ist, selbstredend unter sonst gleichen Bedingungen. Ein Beispiel sei hier angeführt.

Der Milch waren 2^o/_o NaHO zugesetzt.

Bei 50° C. wurde das Gemisch sehr schnell anfangs braunrot, später deutlicher rot.

Bei 40—42° C. war das Gemisch nach anderthalb Stunden bereits blutrot.

Bei 30—32° C. war es nach 2 Stunden deutlich rosenrot, nach 3 Stunden schön blutrot.

Bei 20—22° C. hatte die Milch nach 12 Stunden eine hell rosenrote Farbe, war nach 24 Stunden hell blutrot, nach 34 Stunden schön blutrot.

Bei 13—14° C. zeigte sie erst nach 24 Stunden eine eben merkliche rosenrote Färbung, war nach 30 Stunden deutlich rosenrot und nach 48 Stunden erst hell blutrot.

Bei 1—2° C. fing das Gemisch erst nach 72 Stunden an, sich rötlich zu färben.

Bei Temperaturen, die etwas unter 0° liegen, bleibt Milch, der 2^o/_o NaHO hinzugesetzt sind, viele Tage hindurch unverändert. Bringt man das Gemisch darauf wieder auf höhere Temperaturen (20—25° C.), so verhält es sich wie ein frisches Milch-Natronlaugegemisch, d. h. es färbt sich allmählich blutrot.

Beim Kochen der mit Natronlauge versetzten Milch geht die Farbe von gelb über gelbbraun in dunkelbraun über. Eine nachträgliche Rotfärbung beim Stehenlassen bei 20—25° C. habe ich nicht mit Sicherheit konstatieren können.

4. Von den von mir untersuchten Milcharten gaben die beschriebene Reaktion, außer Kuhmilch, Hundemilch und Frauenmilch, während Stutenmilch, mit 2^o/_o NaHO versetzt, nach 48 Stunden bei Zimmertemperatur noch keine Spur von Rot-

färbung zeigte. Wie die Stutenmilch verhielt sich auch Frauencolostrum, das einen Tag vor der Geburt des Kindes entnommen war.

5. Durch vorheriges Kochen oder Gefrierenlassen der Milch wird die Reaktion nicht beeinträchtigt; ebenso wenig durch Dialysieren der Milch. (Ich hatte die Milch 48 Stunden hindurch gegen fließendes Wasser dialysiert.)

6. Wie Milch färbt sich auch Milchserum, das ich durch Filtrieren gesäuerter Kuhmilch gewonnen hatte, durch Natronlaugezusatz allmählich rot, doch ist die Intensität der Färbung eine geringere. Mit Äther entfettete Milch jedoch gibt die Reaktion nicht, sondern färbt sich mit der Zeit nur braun.

7. Bei vorsichtigem Zusatz von Essigsäure zur filtrierten roten Milch beobachtet man einen recht plötzlichen Farbumschlag von rot in gelb oder gelbbraun. Bemerkenswert ist hierbei, daß im Moment des Farbumschlags die Reaktion der Flüssigkeit noch deutlich alkalisch ist (geprüft mit Lackmus). Bei weiterem Zusatz von Säure ändert sich zunächst nichts, die Farbe bleibt unverändert und es bildet sich trotz saurer Reaktion noch kein bleibender Niederschlag. Erst bei größerem Säureüberschuß beginnt ein käsiger fleischfarbener Niederschlag auszufallen.

Die über dem Niederschlag abstehende Flüssigkeit ist gelb bis bräunlichgelb gefärbt, welche Farbe wahrscheinlich von durch die Lauge zersetztem Milchzucker herrührt.

In noch feuchtem Zustande genommen löst sich der abfiltrierte Niederschlag in verdünnten Alkalilaugen sehr leicht mit schön roter Farbe. Auf Säurezusatz zu diesen Lösungen tritt wiederum der beschriebene Farbumschlag ein und erst bei bedeutendem Säureüberschuß erhält man eine Fällung.

Die nunmehr abstehende Flüssigkeit ist nicht gelb gefärbt, sondern wasserklar. Der Farbumschlag von rot in gelb hat also nichts mit der Gegenwart von zersetztem Milchzucker in der roten Lösung zu tun.

Es sei noch hinzugefügt, daß beim Neutralisieren sich regelmäßig ein eigentümlicher, süßlicher Geruch bemerkbar macht und daß durch Kochen der Lösungen die rote Farbe

derselben sich nicht wesentlich ändert, vielleicht nur einen Stich ins Bräunliche annimmt.

8. Um den Niederschlag möglichst frei von Beimengungen zu erhalten, verfuhr ich folgendermaßen: Die durch Natronlauge dunkel blutrot gefärbte Milch wurde filtriert und zum ganz klaren Filtrat Essigsäure hinzugesetzt, bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Alsdann wurde der Niederschlag auf der Zentrifuge möglichst schnell abgeschlagen und einmal mit dem 10—15fachen Volumen Wasser, wiederum auf der Zentrifuge, gewaschen, das Waschwasser abgegossen, der Niederschlag in Wasser aufgerührt, verdünnte Natronlauge bis zu seiner vollständigen Lösung hinzugefügt und das Ganze mit Wasser auf das ursprüngliche Volumen gebracht. Darauf wurde die ganze Prozedur des Fällens, Waschens, Lösens usw. noch zweimal wiederholt und der auf diese Weise allendlich gewonnene Niederschlag auf der Zentrifuge mit etwa dem 8000—10000fachen Volumen Wasser ausgewaschen.

Da ich den Eindruck gewonnen hatte, als ob der Niederschlag um so schwerer löslich ist, je länger er mit Wasser in Berührung war, versuchte ich so schnell wie möglich zu arbeiten und habe daher das einzelne Zentrifugieren nicht bis zum völlig klaren Abscheiden des Waschwassers fortgesetzt, denn die letzten Reste des fein zerriebenen Niederschlages setzen sich nur sehr schwer ab. Es muß darauf aufmerksam gemacht werden, daß die durch suspendierte Partikelchen des Niederschlages trübe Flüssigkeit stets sauer reagiert, man mag das Waschwasser wechseln, so oft man will. Es rührt das daher, daß der feuchte Niederschlag saure Reaktion besitzt. Will man sich also davon überzeugen, daß in das Waschwasser keine Säure mehr übergegangen ist, der Niederschlag somit frei von ihr ist, so muß man die trübe Waschflüssigkeit durch ein doppeltes Filter filtrieren und das Filtrat auf seine Reaktion untersuchen. Ich setzte das Waschen im allgemeinen solange fort, bis das Filtrat der Waschflüssigkeit weder Zuckerreaktion gab, noch sauer reagierte.

Der auf diese Weise gereinigte Niederschlag löst sich nach vorhergehender Quellung in verdünnter Natronlauge ver-

hältnismäßig leicht. Die Farbe der Lösung ist eine rote, wie die des Milchfiltrates.

9. Behandelt man den mit Wasser ausgewaschenen Niederschlag mit Alkohol, so färbt er sich bedeutend dunkler und verwandelt sich zunächst in eine klebrige, elastische, knetbare Masse, die beim Durchkneten mit neuen Portionen Alkohol, wahrscheinlich infolge von Wasserentziehung, bald hart und bröckelig wird und sich dann leicht in einer Reibeschale zu einem feinen Pulver zerreiben läßt. Dieses Pulver wurde zu weiterer Reinigung mit Äther gewaschen und dann an der Luft getrocknet. Es ergibt sich ein hell ziegelrotes Pulver, das in verdünnter Kaliresp. Natronlauge löslich ist, jedoch bedeutend schwerer, als der Niederschlag vor der Behandlung mit Alkohol und Äther. Die Lösung ist von roter Farbe, jedoch mit einem Stich ins Braune.

Auch in ammoniakhaltigem Wasser ist sowohl der feuchte ausgewaschene Niederschlag, als auch der mit Alkohol und Äther behandelte löslich, während Ammoniak, statt NaHO oder KHO der Milch zugesetzt, eine Rotfärbung derselben nicht herbeizuführen vermag.

10. Bei der spektroskopischen Untersuchung des roten Milchfiltrates, sowie der alkalischen Lösungen des aus ihm gewonnenen und mit Wasser ausgewaschenen Niederschlages kann man, bei geeigneter Verdünnung, ein ziemlich breites, aber schwaches und undeutliches, namentlich zum violetten Ende hin sehr schlecht begrenztes Absorptionsband wahrnehmen. Dasselbe beginnt bei der Linie C und geht bis E und darüber hinaus. Es scheint seine größte Intensität etwa bei λ 555—556 zu haben. Seiner Lage nach entspricht dieses Band also dem Bande des reduzierten Hämoglobins. Durch Zusatz von Schwefelammon ändert sich weder die Farbe der Lösung, noch ihr spektroskopisches Bild.

11. Alle Versuche, den Farbstoff zu isolieren, sind bisher erfolglos geblieben.

12. Gautier und Morel sagen, daß zu dem Zustandekommen der Reaktion die gleichzeitige Gegenwart von einem Eiweißkörper (Casein) und einem Kohlehydrat (Laktose) in stark alkalischer Lösung notwendig sei.

Daß es sich hier um eine Wechselwirkung von Casein und Milchzucker unter dem Einflusse von Alkalilauge handle, war auch mir der nächstliegende Gedanke. Ich gab ihn jedoch bald auf und im Jahre 1898 sprach ich mich in der Tomsker Naturforscher- und Ärztegesellschaft schon dahin aus, daß die Rotfärbung der Milch nicht einzig und allein durch die Gegenwart von Casein und Laktose bedingt sein könne, sondern auch noch andere Bestandteile der Milch dabei in Frage kämen.

Zu dieser Überzeugung gelangte ich auf Grund folgender Beobachtungen und Versuche:

a) Sub 5. führte ich an, daß Milch, welche 48 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert war, sich Alkalilaugen gegenüber genau ebenso verhielt, wie frische Milch. Zur Dialyse benutzte ich Dialysierhülsen von Schleicher und Schüll.

Man könnte demnach annehmen, daß Milchzucker an der Rotfärbung der Milch durch Kali- oder Natronlauge keinen Anteil nimmt. Es stellte sich jedoch heraus, daß die dialysierte Milch noch große Mengen Zucker enthielt. Dieser Versuch ist somit nicht beweiskräftig. Auch durch länger fortgesetztes Dialysieren gelang es mir nicht, die Milch, ohne daß Fäulnis eintrat, vollständig vom Milchzucker zu befreien, woher ich die weiteren Versuche in dieser Richtung aufgab.

b) Aus einer größeren Reihe von Versuchen, die angestellt waren, um die Frage zu entscheiden, ob Natron- oder Kalilauge in einem Gemische von Casein und Milchzucker eine Veränderung hervorrufe, wie die, die wir an der Milch beobachten, will ich nur zwei anführen.

Die Darstellung des Caseins geschah genau so, wie es von Drechsel in seiner «Anleitung zur Darstellung physiologisch-chemischer Präparate» angegeben ist.

Versuch I. 0,5 g Casein wurden in 15 ccm Wasser aufgerührt und dann 5 ccm 10⁰/₀ige Natronlauge hinzugefügt. Das Casein löste sich darin vollständig. Zu dieser alkalischen Caseinlösung wurden 4⁰/₀ Milchzucker getan und das Gemisch bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 48 Stunden war es nur durch den zersetzten Milchzucker etwas gelblich gefärbt,

während eine mit Milch aufgestellte Kontrollprobe nach dieser Frist eine schön blutrote Farbe zeigte.

Versuch II. Es wurde eine Lösung hergestellt, die je 4% Casein und Milchzucker enthielt. Zu 8 ccm dieser Lösung wurden 2 ccm einer 20%igen Natronlauge getan; das Gemisch enthielt folglich 4% NaHO. Als Kontrolle dienten eine 4%ige Casein- und eine 4%ige Milchzuckerlösung mit dem gleichen Gehalt an NaHO. Von diesen Lösungen wurde je eine Probe bei Zimmertemperatur und bei 38—40° C. stehen gelassen.

Das Resultat dieses Versuches gibt folgende Tabelle wieder.

Nach	Caseinlösung	Zuckerlösung	Gemisch
A. Zimmertemperatur			
6 Stunden	Unverändert	Schwach gelblich	Schwach gelblich
24 »	»	Deutlich gelb	Schwach gelb
48 »	»	Gelb	Hell bräunlichgelb
B. Körpertemperatur.			
6 Stunden	Unverändert	Braun	Braun
24 »	»	Rotbraun	Rotbraun
48 »	»	»	»

Diese Ergebnisse sprechen dagegen, daß zum Gelingen der Reaktion Casein und Milchzucker allein genügen.

Es kann nicht unerwähnt bleiben, daß unter den Protokollen des Herrn Dr. V. Schröppe sich eines findet, dessen Resultat mit den angeführten nicht in Einklang steht — das Caseinmilchzuckergemisch färbte sich rot. Ich glaube das aber darauf zurückführen zu müssen, daß in diesem Falle das Casein nicht genügend rein war.

c) Die sub 6 mitgeteilte Beobachtung, daß sich, wie die Milch, auch das Milchserum durch Natron- oder Kalilauge rot färbt, deutet darauf hin, daß das Casein nicht eine *conditio sine qua non* für den Eintritt der Reaktion ist. Freilich färbt sich das Milchserum weniger intensiv rot, als die zugehörige Milch. Doch das kann dadurch erklärt werden, daß beim Aus-

scheiden des Caseins mechanisch ein Teil von Milchbestandteilen mitgerissen wird, die an dem Zustandekommen der Reaktion mitbeteiligt sind.

d) Die ebenfalls sub 6 erwähnte Beobachtung, daß mit Äther entfettete Milch durch Natronlauge nicht rot gefärbt wird, macht es wahrscheinlich, daß durch den Äther der Milch etwas entzogen wird, das bei der Farbenveränderung eine Rolle spielt.

e) Endlich führe ich noch einen Versuch an, in dem ich ein Gemisch von Eialbumin und Milchzucker der Natronlauge Wirkung aussetzte.

Zu einer 2%igen Eialbuminlösung wurden 4% Milchzucker getan und von diesem Gemisch eine Probe mit 2% und eine andere mit 3% NaOH bei Zimmertemperatur aufgestellt. Beide Proben färbten sich zunächst gelb und allendlich braun, infolge Zersetzung des Milchzuckers. Von einer Rotfärbung war jedoch nichts wahrzunehmen.

Alle diese Beobachtungen scheinen mir dafür zu sprechen, daß die beschriebene eigentümliche Farbenveränderung der Milch nicht durch das Zusammenwirken von einem Eiweißkörper (Casein, Albumin) und einem Kohlehydrat (Laktose) allein bedingt sein kann, sondern, falls diese überhaupt in Betracht kommen, gleichzeitig noch ein oder mehrere andere Bestandteile der Milch mit an ihr teilnehmen.
