

# Beitrag zur Kenntnis der Labwirkung auf Casein.

Von

**M. van Herwerden.**

---

(Aus dem physiologischen Laboratorium in Utrecht.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Mai 1907.)

---

Seit der klassischen Arbeit von Hammarsten<sup>1)</sup> im Jahre 1877 war der Weg geöffnet zu Untersuchungen, welche eine genauere Kenntnis der durch Einwirkung von Lab auf Casein gebildeten Spaltungsprodukte herbeiführen konnten. Nachdem Hammarsten das Casein in reinem Zustande isoliert hatte, nachdem er auf die Bedeutung der löslichen Kalksalze beim Koagulationsprozesse hingewiesen hatte, mangelte es nicht an Versuchen, die Änderungen des Caseins unter dem Einflusse des Labenzymys kennen zu lernen. Dennoch gab es so wenig tatsächliche Angaben zur Beantwortung der schon im Jahre 1877 von Hammarsten gestellten Frage: Verursacht Labwirkung eine hydrolytische Spaltung des Caseins?, daß dieser Forscher<sup>2)</sup> 22 Jahre später die Worte schrieb: »... und auch hier könnte man daran denken, daß das sogenannte Molken-eiweiß nur ein Rest von in Lösung gebliebenem und verändertem Casein, bzw. Paracasein ist... Es ist also recht wohl denkbar, daß es sich bei der Caseingerinnung nicht um eine hydrolytische Spaltung, sondern um eine intramolekuläre Umlagerung oder um irgend welche andere, noch unbekannte Umwandlung des Caseins handelt«. <sup>2)</sup>

Es ist bekannt, daß bei der Käsebildung zwei Prozesse scharf von einander zu trennen sind, die chemische Änderung des Caseins, vom Lab hervorgerufen, und die Fällung eines (oder mehrerer) der Spaltungsprodukte durch die anwesenden Kalksalze. Den ersten Prozeß sehen wir auch ohne Gegenwart

---

<sup>1)</sup> Nova Acta reg. societ. scient. Upsalensis 1877.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 114.

eines Kalksalzes im reinen, mit Lab behandelten Casein zustande kommen. Lundberg<sup>1)</sup> zeigte uns, daß beim zweiten Prozesse Kalksalze von Strontium- und Baryumsalzen vertreten werden können, eine Beobachtung, welche später von andern Untersuchern bestätigt wurde.

Der als Kalksalz gefällte, unter dem Namen Paracasein bekannte Eiweißkörper ist noch sehr ungenügend untersucht worden. Trotzdem ist es möglich, diese Substanz (welche, wie wir sehen werden, kein einheitlicher Körper ist) durch bestimmte Eigenschaften von dem noch nicht durch Lab verwandelten Casein zu unterscheiden.

So hat schon Hammarsten<sup>2)</sup> hingewiesen auf die Unfähigkeit des Paracaseins, mit Lab, bei Gegenwart einer Quantität Calciumsalzes, welche bei Körpertemperatur noch keine Fällung verursacht, von neuem Käse zu bilden.

Laqueur<sup>3)</sup> erwähnt die Tatsache, daß für Paracaseinalkali die Fällungsgrenze gegenüber Ammoniumsulfat niedriger liegt als für die Alkaliverbindung des Caseins. Im Gegensatz mit Laqueurs Auffassung, der auf Grund von chemischen und physikalischen Untersuchungen das Paracasein als Spaltungsprodukt des Caseins betrachtet, hatte früher Loewenhardt<sup>4)</sup> zwischen diesen beiden Substanzen nur einen Unterschied physikalischer Natur gesehen. Das Paracasein sei einfach eine Modifikation, welche sich in anderem kolloidalen Zustande befinde und von verschiedenen Reagenzien früher gefällt werde, unter welchen vor allem Calciumchlorid genannt werden muß.

Als Resultat seiner Elementaranalyse des Paracaseins gibt Rose-Schulze an<sup>5)</sup>: C 53,94<sup>0/0</sup>, H 7,14<sup>0/0</sup>, N 15,14<sup>0/0</sup>, S 1,01<sup>0/0</sup>, O 22,77<sup>0/0</sup> + Phosphor (Prozentzahl nicht erwähnt).

In Paracasein, dargestellt durch wiederholte Lösung in Alkali und Fällung mit Salzsäure, fand v. Basch<sup>6)</sup>: N 15,5<sup>0/0</sup>,

---

1) Vide Fuld, Ergebnisse der Physiol. Biochem., Bd. I, 1902, S. 497.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 103.

3) Hofmeisters Beiträge, Bd. VII, 1906, S. 273.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XLI, 1904, S. 177.

5) Vide Raudnitz, Ergebn. der Physiol. Biochem., Bd. II, 1903, S. 244.

6) Ibid., S. 243.



P 1,3%. Neben dem Käse wird von verschiedenen Autoren ein in Lösung gebliebenes Produkt, das sogenannte Molken-eiweiß, beschrieben. Hammarsten gab schon in seiner erst-erwähnten Arbeit einige Eigenschaften dieser Substanz an, u. a. kann sie weder gefällt werden von Sublimat, Ferrocyanwasserstoff, Bleizucker, noch durch Kochen mit verdünnter Essigsäure, dagegen gibt sie eine sehr deutliche Fällung mit Tanninessigsäure.

Die erste, etwas genauere Untersuchung verdanken wir Köster,<sup>1)</sup> der nach Abfiltrieren des Käses (aus reinem nach Hammarsten bereiteten Casein dargestellt) das Filtrat bis zum Kochen erhitzte, um Spuren von in Lösung gebliebenem Käse zu entfernen. Nach Eindampfen des neuen Filtrates wurde das Molken-eiweiß mit 96%igem Alkohol gefällt. Durch Lösen in Wasser und nachträgliche Fällung mit Alkohol wurde das Präparat von den letzten Käseresten gereinigt. Diese Substanz gab nach dem Referat von Hammarsten (die ursprüngliche Mitteilung war mir nicht zugänglich) alle »Peptonreaktionen«, unterschied sich aber vom »Pepton« durch den auffallend niedrigen Stickstoffgehalt (13,1—13,9%). Auch aus dem mit Lab ohne Zufügen von Calciumchlorid behandelten Casein hat Köster diese Substanz isolieren können, nachdem er das Paracasein durch Essigsäure gefällt hatte.

Eine neue Eigenschaft dieses wenig scharf definierten Körpers hat uns Müller<sup>2)</sup> gezeigt, nämlich daß er erst bei 58%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt wird, eine Eigenschaft, welche uns die Verschiebung der Fällungsgrenze nach der Einwirkung des Labenzym auf das Caseinalkali deutlich macht. Während die letztere Lösung schon bei 36%iger Sättigung vollkommen gefällt wird, findet man, sobald durch den Einfluß des Labenzym die neue Fraktion hinzu kommt, daß erst bei 58%iger Sättigung im Filtrate keine Eiweißkörper mehr nachzuweisen sind.

Einen ebenfalls überzeugenden Beweis für das Hinzukommen einer neuen Substanz nach der Labwirkung hat Schmidt

---

<sup>1)</sup> Upsala Läkare förening Forhandlingar, Bd. XI. Vide Ref. Hammarsten, Jahresber. f. Tierchemie, Bd. XI, 1881.

<sup>2)</sup> Arch. f. Hygiene, Bd. XLIV, 1902.

Nielsen<sup>1)</sup> neuerdings gegeben. Nachdem dieser Untersucher gezeigt hatte, daß Casein und Paracasein beide durch rohes kalkhaltiges Kochsalz vollkommen gefällt werden, vermochte er nachzuweisen, daß nur nach Zusatz des Labenzym das Filtrat dieser Fällung noch einen deutlichen Niederschlag mit von Natriumchlorid gesättigter Essigsäure gab. In einer späteren Publikation zeigte derselbe Forscher,<sup>2)</sup> daß die Bildung des Molkeneiweißes ganz unabhängig ist von der Bereitungsweise des Caseins und deswegen nicht als Beimischung, sondern als Spaltungsprodukt betrachtet werden muß.

Die Stelle, welche dies Molkeneiweiß, das sich nach den Mitteilungen der verschiedenen Autoren mehr durch negative als durch positive Eigenschaften unterscheidet, im System der Eiweißkörper einnimmt, ist nur äußerst mangelhaft angedeutet.

Außer dem Molkeneiweiß sollte eine Spur der Paracasein-calciumverbindung in Lösung bleiben. Die Beobachtung, daß ein Teil des Paracaseins löslich sei im Überschuß von Calciumchlorid, führte zur Annahme, daß die in der Lösung nebst dem Molkeneiweiß befindliche Substanz, welche in Gegensatz zum ersteren beim Erhitzen koagulierte, identisch sei mit dem Paracasein. Es wurde die Möglichkeit übersehen, daß nebst dem Paracasein und dem Molkeneiweiß noch ein anderer Körper sich unter dem Einflusse des Labenzym entwickeln könnte. Erst Petry<sup>3)</sup> hat neulich die Genese einer mit Paracasein verwandten Substanz beschrieben, welche wohl von verdünnter Essigsäure, aber nicht von Calciumchlorid gefällt wird.

Meine Untersuchung führte, unabhängig von Petry, zu demselben Resultat. Aus dem Folgenden wird sich ergeben, daß es diese Substanz ist, welche neben dem Molkeneiweiß in der Lösung nachgewiesen werden kann.

Während Petry das Molkeneiweiß als eine sekundäre Albumose betrachtet, hat er daneben durch Labwirkung schon nach 24 Stunden in bedeutender Quantität eine primäre Albumose gefunden, welche er, was die Beziehung zu Ammonium-

---

<sup>1)</sup> Festschrift f. Hammarsten, 1906, S. 15.

<sup>2)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. IX, Heft 8—11, 1907, S. 322.

<sup>3)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. VIII, 1906, S. 339.



sulfat betrifft, in Übereinstimmung bringt mit den Caseinen, die Alexander<sup>1)</sup> bei peptischer Spaltung von Casein gefunden hat.

Ich beabsichtigte, mit meiner eigenen Untersuchung einige mit einander in Widerspruch stehende Befunde der verschiedenen Untersucher zu prüfen und einen klaren Einblick in die Natur der Spaltungsprodukte zu bekommen, welche sich nach kurzer oder langdauernder Einwirkung des Labenzym bei schwach saurer oder neutraler Reaktion entwickeln. Schon hier bemerke ich, daß meine Erwartung, isolierte Spaltungsprodukte zu erlangen, deren Elementaranalyse zu genauerer Kenntnis derselben beitragen würde, eingeschränkt wurde durch die Beobachtung, daß die Enzymwirkung kontinuierlich fortschreitet, in der Weise, daß aus den Spaltungsprodukten wieder andere von geändertem Bau gebildet werden. Bei der Beschreibung meiner Untersuchungsmethoden werde ich diese Tatsache näher hervorheben.

Das von mir benutzte Casein wurde ausschließlich aus frischer abgerahmter Milch nach der Hammarstenschen Methode bereitet. Soweit dies nicht in loco erwähnt ist, wurden die verschiedenen Versuche angestellt mit einer 3- bis 5%igen Caseinlösung in verdünnter Natronlauge bei schwach saurer Reaktion. Bei längerem Verbleiben auf Körpertemperatur wurde Thymol der Lösung zugesetzt.

Als Enzym bediente ich mich sowohl des Labs («Kaasstremsel van Hasselt») als des Pepsins, nach der Methode von Pikelharing<sup>2)</sup> aus der Magenschleimhaut des Schweins bereitet. Dieses letztere Enzym wurde nach Lösung in 0,2%iger Salzsäure und nachträglicher Neutralisation mit sehr verdünnter Natronlauge der auf 38° bis 40° erwärmten Caseinlösung zugesetzt. Es stellte sich heraus, daß die Wirkung dieser beiden Substanzen qualitativ vollkommen identisch war; auch bei langdauernder Einwirkung des neutralisierten Pepsins waren die Spaltungsprodukte dieselben, welche auch vom Handelslab hervorgerufen wurden.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, 1898, S. 411.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 283.

Ich gebe eine kurze Beschreibung der von mir verwendeten Methode beim Versuche, die Spaltungsprodukte zu trennen, welche durch den Einfluß von Lab oder Pepsin auf Casein entstehen.

Zuerst wurde der Einfluß von neutralisiertem Pepsin bei sehr kurz dauernder Einwirkung auf Casein nach Hinzufügung von Calciumchlorid geprüft. Es wurde Vorsorge getroffen, die Enzymwirkung, welche innerhalb 1 bis 2 Minuten Koagulation verursacht hatte, durch Abkühlen und schnelles Filtrieren so bald wie möglich zu hemmen. Durch ein zuvor vorbereitetes Saugfilter aus zusammengepreßter Papierpappe wurde innerhalb einiger Minuten ein klares Filtrat erlangt, das fraktioniert gefällt wurde durch 30- und 60%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat. Die ganze Behandlung war in weniger als 10 Minuten abgelaufen. Das bei 30%iger Sättigung gebildete Präzipitat kam nach 24stündiger Dialyse gegen Aqua destillata nicht zur Lösung, wohl aber nach Zusatz von Alkali bei neutraler Reaktion. Verdünnte Essigsäure verursachte eine Fällung, Calciumchlorid aber nicht. Bei qualitativer Untersuchung ergab sich diese Fraktion als phosphorhaltig (Neumannsche Methode). Die bei 60%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällte Fraktion löste sich im Gegensatz zur erstgenannten im Dialysator vollkommen, ohne zu diffundieren. Diese Fraktion konnte weder von Essigsäure, noch von Calciumchlorid gefällt werden; sie zeigte übrigens die meisten Eiweißreaktionen. Charakteristisch ist aber das Ausbleiben einer Fällung mit Ferrocyanwasserstoff, während sich mit Tanninessigsäure ein Niederschlag bildet, welcher bei Erwärmung verschwindet und bei Abkühlung zurückkehrt. Mit Natriumchlorid und Essigsäure (Reaktion von Heynsius) bildet sich eine geringe Fällung, die bei Erwärmung fortbesteht.

Diese letztere Substanz stimmt, was ihre Eigenschaften betrifft, überein mit dem Molkeneiweiß der verschiedenen Autoren. Zum Vergleich mit andern Spaltungsprodukten des Caseins wünsche ich sie vorläufig Substanz C zu nennen. Spätere Versuche lehrten nur, daß sie auch schon teilweise in der bei 30%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat gebildeten Fraktion



gefunden wird, und erst von der oben erwähnten Substanz vollständig zu trennen ist durch ihre Unfähigkeit, von verdünnter Essigsäure gefällt zu werden.

Wenn man im Gegensatz zu dem äußerst schnellen Vorgang, bei welchem versucht wurde, jede Digestion auszuschließen, die Erwärmung auf Körpertemperatur während drei Stunden fortsetzt, ist es nicht möglich, eine merkbare Änderung in der Natur der Spaltungsprodukte hervorzurufen. Dasselbe gilt für die Einwirkung von Lab. Wird aber während sehr langer Zeit die Flüssigkeit dem Einflusse des Enzyms ausgesetzt, so kann, wie sich aus meinen späteren Versuchen ergeben wird, der Charakter der entwickelten Produkte sich wesentlich ändern.

Nach Einwirkung von Lab auf eine schwach sauer reagierende Natriumcaseinlösung ohne Zufügung von  $\text{CaCl}_2$  kann man, wie bekannt, das Paracasein durch verdünnte Essigsäure ausfällen, während das Molkeneiweiß in Lösung bleibt. Fügt man Essigsäure hinzu, bis das Filtrat nicht mehr mit Ferrocyanwasserstoff reagiert, so ist man berechtigt, anzunehmen, daß letzteres größtenteils (falls nicht vollkommen) von Paracasein befreit ist. Löst man jetzt diese Paracaseinfällung in verdünnter Natronlauge bei schwach saurer Reaktion, und fällt nachträglich mit einem Überschuß von Calciumchlorid, so stellt sich heraus, daß im Filtrat mit verdünnter Essigsäure noch ein feinflockiges Präzipitat gebildet wird. Auch die Substanz C, welche, wie gesagt, nicht von Essigsäure gefällt wird, ist im Filtrat nachzuweisen. Bei zwei- und dreimaliger Fällung mit Calciumchlorid können jedesmal im Filtrat dieselben Spaltungsprodukte gefunden werden. Daß der bei der primären Fällung mit Essigsäure erlangte Niederschlag kein einheitlicher Körper ist, ergab sich also aus der Tatsache, daß er neben einer mit Calciumchlorid fällbaren Substanz (Paracasein A) eine andere enthält, welche wohl von verdünnter Essigsäure, dagegen nicht von Calciumchlorid präzipitiert wird (Paracasein B).

Es gelang mir, in der oben beschriebenen Weise diese Produkte einigermaßen von einander zu trennen, obgleich wegen

der fortschreitenden Spaltung von einer wirklichen Isolation freilich nicht die Rede sein konnte. Die Voraussetzung, daß Paracasein B nichts anderes sein würde als ein im Überschuß von Calciumchlorid lösliches Paracasein A, kann durch die Beobachtung widerlegt werden, daß erstens das möglichst gereinigte Paracasein A nicht löslich ist im Überschuß von Calciumchlorid und zweitens Paracasein B in sehr konzentrierter Lösung absolut nicht von diesem Kalksalz gefällt werden kann. Wir haben also hier eine Substanz kennen gelernt, welche sich durch eine bestimmte Eigenschaft von dem in der Literatur bekannten Paracasein unterscheidet. Bemerkenswert ist nun die Tatsache, daß bei wiederholter Lösung des Paracaseins A in Natronlauge und nachträglicher Fällung mit Calciumchlorid sowohl dieses Paracasein B als die obenerwähnte Substanz C im Filtrate nachzuweisen sind, in einer Quantität, welche (wenn man den Verlust in Betracht zieht, der wegen der Schwerlöslichkeit der Calciumverbindung unvermeidlich ist) nicht merkbar abnimmt. Im Gegenteil sieht man nicht selten, daß in der zweiten Fraktion die Reaktion mit Tanninessigsäure beträchtlicher ist als in der ersteren. Weil hier von Verunreinigung nicht die Rede sein kann, möchte ich schließen, daß der Spaltungsprozeß, durch das Labenzym eingeleitet, auch nach der Präzipitation mit Essigsäure fortschreitet, ohne daß aber der Charakter der Spaltungsprodukte sich merkbar verändert. Ich konnte also den Ausspruch Petry's<sup>1)</sup> bestätigen: «Die Molkenweißbildung bleibt nicht im Momente der Paracaseinbildung stehen, sondern schreitet über diesen hinaus kontinuierlich weiter.»

In keiner dieser Fraktionen befanden sich primäre Albumosen, wie sie von Alexander<sup>2)</sup> bei peptischer Digestion des Caseins beschrieben sind.

Schreitet, wie ich es mir vorstelle, die Spaltung kontinuierlich fort, so wird das Präparat Paracasein A, welches wir durch dreimalige Fällung mit Calciumchlorid erhalten, nicht vollkommen befreit sein von Paracasein B und Substanz C. Auch wenn man möglichst rasch das Präzipitat der Calcium-

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. VIII, S. 343.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, 1898.



verbindung mit Alkohol behandelt, ergibt sich später, daß das vollkommen getrocknete Paracasein A bei nachträglichem Lösen in verdünnter Natronlauge wieder ein kleines Quantum der genannten Spaltungsprodukte eingeschlossen hält.

Nachdrücklich bemerke ich, daß dies nachgewiesen wurde ohne Zufügung von neuem Lab. Schmidt Nielsen<sup>1)</sup> hat nämlich in einer jüngst nach Abschluß meiner Arbeit erschienenen Publikation eine Spaltung des Paracaseins nach Zusatz von Lab beschrieben. Dieses Paracasein, das durch Essigsäurefällung nach Labwirkung auf Casein hergestellt wurde, und also eine Mischung sein muß von unserem Paracasein A und B, soll nach Schmidt Nielsen unter dem Einflusse einer dem Chymosin anhaftenden Protease weiter gespalten werden. Daß tatsächlich die Molkeiweißfraktion sich auf Kosten des Paracaseins vermehrt, wird aus meinen länger fortgesetzten Verdauungsproben hervorgehen.

In der Absicht, den Verlauf des Spaltungsprozesses bei langdauernder Labwirkung zu studieren, wurde eine 5%ige Caseinlösung bei sehr schwach saurer Reaktion, ohne Zusatz von Calciumchlorid, mit Lab auf Körpertemperatur erwärmt. Nach 48 Stunden hatte die ursprünglich schwach opaleszierende Flüssigkeit ein milchähnliches Aussehen. Zwei Tage später war ein Sediment nachzuweisen, das erst bei alkalischer Reaktion löslich war und nicht mehr gefällt wurde von Calciumchlorid, dagegen wohl von verdünnter Essigsäure. Außerdem befand sich im Filtrat eine Substanz, die, was die Reaktionen angeht, übereinstimmt mit Substanz C, in größerer Quantität, als sie bei momentaner Labwirkung zu erhalten war. Daneben hatte sich eine primäre Albumose gebildet, was zu erkennen war an der Fällung mit Natriumchlorid und Essigsäure (Reaktion von Heynsius) und Löslichkeit beim nachträglichen Erhitzen. Erwärmt man dieselbe Caseinlösung während vier Monaten auf Körpertemperatur, so hat die Fraktion der primären Albumose bedeutend zugenommen; auch Substanz C

---

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. IX, Heft 8—11, 1907.

ist in größerer Quantität gebildet, während das nur bei alkalischer Reaktion sich lösende Sediment allmählich an Umfang abgenommen hat. Aus dem Gemische von Substanz C und primärer Albumose kann man die letztere durch 40%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat vollkommen entfernen. Es gelingt dann, im Filtrate die Substanz C mit Tanninessigsäure nachzuweisen.

Die Überlegung, daß möglicherweise eine Verunreinigung des Handelslabs mit einem proteolytischen Nebenfermente die Ursache sein könnte von der Entwicklung einer primären Albumose bei langdauernder Labwirkung, führte mich zu dem folgenden Versuch: Eine ungefähr 5%ige Caseinlösung wurde mit Lab bei neutraler Reaktion gegenüber Lackmus während 14 Tagen auf Körpertemperatur erwärmt und gleichzeitig als Kontrollprobe Mettsche Röhrchen in aqua destillata mit einer gleichgroßen Labkonzentration gebracht. Was die ursprüngliche Caseinlösung betrifft, zeigte diese nach 14 Tagen nicht mehr eine neutrale, sondern eine amphotere Reaktion. Die bekannten Spaltungsprodukte hatten sich gebildet; auch primäre Albumose in geringer Menge. Diese letztere war ebenfalls deutlich nachzuweisen in der neutralen, wässrigen Lösung mit Mettschen Röhrchen, an welchen eine äußerst geringe Verdauung stattgefunden hatte. Das Handelslab ist also imstande, bei einer gegenüber Lackmus neutralen Reaktion bei langdauerndem Einfluß auf Hühnereiweiß proteolytisch zu wirken.

Zur Beantwortung der Frage, ob eine Caseinlösung, welche sich mit Phenolphthalein schwach rot färbt, einer Labwirkung zugänglich sei, wurde bei dieser Reaktion nach Zusatz von Calciumchlorid eine Caseinlösung mit Lab auf Körpertemperatur erwärmt. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß, sobald Calciumchlorid zugesetzt ist, die Reaktion wieder sauer gegenüber Phenolphthalein wird. Hat man die Flüssigkeit wieder neutralisiert, so trifft man sie regelmäßig nach 24 Stunden von neuem sauer gegenüber Phenolphthalein, oft noch alkalisch oder neutral gegenüber Lackmus. Bei diesem Versuch hatte sich nach einigen Tagen ein Sediment abgesetzt, das aber absolut den eigentümlichen Charakter des Käses vermissen



ließ. Auch die Substanz C war nachzuweisen, was aber, wie sich später ergeben wird, kein Beweis zu sein braucht, daß tatsächlich Labwirkung stattgefunden hat. Von primären Albumosen war nichts zu entdecken.

Setzt man zu Milch soviel Alkali hinzu, daß sie sich schwach rot färbt mit Phenolphthalein, so sieht man auch hier während der Labwirkung die Reaktion sich nach der sauern Seite verschieben, bis schließlich Koagulation stattfindet, während die Reaktion neutral oder noch schwach alkalisch ist Lackmus gegenüber. Bei Überschuß von Alkali bleibt die Koagulation vollkommen aus. — In den nächstfolgenden Seiten gebe ich eine kurze Beschreibung der unter dem Namen Paracasein A, Paracasein B und Substanz C erwähnten Spaltungsprodukte.

#### Paracasein A.

Wie gesagt ist diese Substanz kein rein dargestellter Körper. Nach Labbehandlung der Caseinlösung und nachträglicher einmaliger Fällung mit verdünnter Essigsäure und dreimaliger mit Calciumchlorid wurde eine Paracaseinkalkverbindung hergestellt, welche infolge der fortdauernden Spaltung noch kleine Quantitäten von Paracasein B und Substanz C eingeschlossen hält. Daß dies tatsächlich der Fall ist, geht, wie ich schon Seite 191 bemerkte, hervor aus der Beobachtung, daß nach Lösen des getrockneten Paracaseinkalkes A in Alkali bei neutraler Reaktion und weiterer Behandlung die beiden genannten Substanzen wieder hervortreten. Weil die Lösung des Paracaseinkalkes A als solche nicht gefällt wird von Tanninessigsäure, könnte man zu dem Schlusse neigen, daß die Substanz C abwesend sei. Daß dieser Schluß aber nicht berechtigt ist und daß nur der Überschuß von Paracasein die Tanninverbindung in Lösung hält, wird deutlich, wenn man eine Paracaseinalkalilösung zu einer verdünnten Lösung von Substanz C bringt, welche zuvor einwandfrei mit Tanninessigsäure reagierte. Nach Zusatz von diesem Paracasein bleibt nämlich eine Fällung vollkommen aus. Eine Analogie sehen wir bei der mit Lab versetzten Caseinlösung, welche keine Reaktion mit Tanninessigsäure gibt, obgleich sie Substanz C eingeschlossen hält.

Die genannte Verunreinigung unseres Paracaseinpräparates erklärt auch die verschiedenen Resultate der Elementaranalyse, welche ich aus diesem Grunde nicht fortgesetzt habe. Paracaseincalcium wird beim Erhitzen stark opaleszierend, bei Abkühlung wieder klar, eine Eigenschaft, welche allen Erdalkaliverbindungen des Caseins und des Paracaseins gemeinsam ist und nach Laqueur und Sackur<sup>1)</sup> der Präzipitation des Casein- (resp. Paracasein-)Hydrosols bei zunehmender Hydrolyse zu verdanken ist.

Die Alkaliverbindungen des Paracaseins opalescieren nicht beim Erhitzen, ebenso wenig wie diejenigen des reinen Caseins. Paracaseinkalk, bei neutraler Reaktion in Alkali gelöst, gibt die gewöhnlichen Eiweißreaktionen (ich verweise auf die Tabelle Seite 205). Es wird vollkommen ausgefällt von Magnesiumsulfat bei totaler Sättigung. Dasselbe gilt von kalkhaltigem Natriumchlorid.

Die Frage, ob Paracasein nicht gefällt wird von kalkfreiem Kochsalz, ist, wie sich versteht, nicht beim Versuche mit der Paracaseinkalkverbindung zu lösen. An einem Präparat, das aus einem Gemische von Paracasein A und B gebildet war und isoliert wurde durch wiederholte Fällung mit Essigsäure ohne Zusatz von Calciumchlorid, ergab sich aber, daß übereinstimmend mit der Schmidt-Nielsenschen<sup>2)</sup> Mitteilung kalkfreies Chlornatrium nicht hinreicht, diese Verbindung zu präzipitieren.

Die Fällungsgrenze gegenüber Ammoniumsulfat liegt für Paracasein A niedriger als für das Casein. In einer ungefähr 2<sup>o</sup>/<sub>o</sub>igen Caseinlösung verursacht 15<sup>o</sup>/<sub>o</sub>ige Sättigung mit Ammoniumsulfat nur Opalescenz, während nach der Labwirkung schon direkt eine geringe Fällung auftritt. Bei 30<sup>o</sup>/<sub>o</sub>iger Sättigung ist das Paracasein A vollkommen gefällt.

Ich halte es für wenig angezeigt, wie es in letzterer Zeit wiederholt geschah, diese Fällungsgrenze schärfer abzugrenzen. Bei meiner eigenen Untersuchung bemerkte ich nämlich, wie sehr die Konzentration der Lösung, die Temperatur, die Gegenwart von anderen Salzen und vielleicht noch andere mir un-

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. III, 1902, S. 193.

<sup>2)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. IX, Heft 8—11, S. 311.



bekannte Faktoren kleine Änderungen in diesem Verhältnis gesättigten Salzlösungen gegenüber herbeiführen können.

Das möglichst gereinigte Präparat Paracasein A ist phosphorhaltig. Quantitative Bestimmungen nach der Neumannschen Methode gaben, wie zu erwarten war, keine einheitlichen Resultate. Der Phosphorgehalt blieb in drei Bestimmungen unter dem Wert von 0,2%, während aus den Elementaranalysen des Caseins von Hammarsten, Laqueur-Sackur, Chittenden-Painter<sup>1)</sup> hervorgeht, daß diese letztere Substanz einen Phosphorgehalt von 0,8% hat.

Zusammenfassend möchte ich die folgenden Kennzeichen aufzählen, durch welche Paracasein A sich von Casein unterscheidet:

1. Lösliche Kalksalze, welche bei Casein erst im Überschuß angewendet, eine Fällung geben, verursachen in einer Lösung von Paracasein A sogleich einen käseartigen Niederschlag, welcher, was die Konsistenz betrifft, durchaus abweicht von dem feinflockigen Präzipitat der Caseinkalkverbindung.

2. Die Fällungsgrenze gegenüber Ammoniumsulfat liegt niedriger als diejenige des Caseins.

3. Der Phosphorgehalt des Paracaseins ist geringer. Auch ist noch die Möglichkeit zu erwägen, daß dieser Gehalt an Phosphor Verunreinigung mit anderen phosphorhaltigen Spaltungsprodukten zuzuschreiben ist, während das absolut reine Paracasein A phosphorfrei sein könnte.

#### Paracasein B.

Diese Substanz bekommt man durch Behandlung des Filtrates des mit Calciumchlorid gefällten Paracaseins A mit verdünnter Essigsäure. Der feinflockige Niederschlag ist auch nach wiederholtem Auswaschen mit destilliertem Wasser nicht vollkommen von Substanz C zu trennen. Auch hier ergab sich der Phosphorgehalt als ein inkonstanter, ebenso wie bei Paracasein A, weniger als 0,2%. Dieses Paracasein B, welches nicht eine Albumosereaktion zeigte, stimmt, was die meisten Eiweißreaktionen und sein Verhältnis gegenüber gesättigten

<sup>1)</sup> Vide Raudnitz, l. c. S. 232.

Salzlösungen betrifft, mit Paracasein A überein (ich verweise auf die Tabelle Seite 205), unterscheidet sich hauptsächlich von dieser letzteren Substanz durch seine Unfähigkeit, von Calciumchlorid gefällt zu werden. Ebenso wie Paracasein A ist Paracasein B in Wasser unlöslich. Es kommt mir vor, daß diese Substanz identisch ist mit dem von Petry beschriebenen Spaltungsprodukte des Caseins, welches wohl von verdünnter Essigsäure, nicht aber von Calciumchlorid präzipitiert wird. Die Mitteilung, daß Sublimat keine Fällung verursacht, konnte ich nicht bestätigen, dagegen vermißte ich die Schwefelbleireaktion, welche bei Paracasein A deutlich nachzuweisen ist. Die Gegenwart von Paracasein B unter den durch Labwirkung aus Casein entwickelten Spaltungsprodukten gibt uns Aufklärung über die Natur der Substanz, welche neben dem Molkeneiweiß bei der Käsebildung in der Lösung wiederholt beschrieben und als ein in Lösung gebliebener Teil des Käses betrachtet worden ist. Isolieren wir diese Substanz, welche in äußerst geringer Quantität gebildet wird, so ergibt sich, daß auch diese nicht von Calciumchlorid, wohl aber von verdünnter Essigsäure gefällt wird und ebenfalls wie das oben beschriebene Paracasein B phosphorhaltig ist (Seite 189).

### Substanz C.

Um diese Substanz möglichst gut zu isolieren, war es angezeigt, die Fällung mit verdünnter Essigsäure äußerst vorsichtig vorzunehmen, in der Weise, daß das Filtrat nicht mehr mit Ferrocyanwasserstoff reagierte, ein Kriterium, daß nicht ein Teil des Paracaseins sich wieder gelöst hatte oder ungenügend präzipitiert war. Nach 60%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat wurde die Substanz C gefällt, welche, wie gesagt, nur durch eine positive Eigenschaft (nämlich durch die Fällung mit Tanninessigsäure), daneben durch einzelne negative [Tabelle Seite 205], sich von dem oben erwähnten Eiweißkörper unterscheidet. Der abfiltrierte Niederschlag wurde zwischen Filtrierpapier ausgepreßt und nachträglich mit 85%igem Alkohol gekocht, wobei er sich löste und beim Abkühlen wieder auschied. Durch wiederholten Zusatz von frischem Alkohol ge-



lang es, diese Substanz größtenteils von Ammoniumsulfat zu reinigen.

Im Vergleich mit Paracasein A und B bildet die Substanz C nur eine äußerst geringe Fraktion der Spaltungsprodukte. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß sie im ersten Filtrat der Essigsäurefällung (vide Seite 191) in kleinerer Quantität auftritt als in den späteren Fraktionen nach Isolation des Paracaseins A und B. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Produkten ist die frisch bereitete Substanz C in Wasser löslich; nach langdauerndem Verbleiben unter Alkohol verliert sie diese Fähigkeit. Die Schwierigkeiten, welche bei der Aussalzung mit Ammoniumsulfat einer eventuellen Stickstoffbestimmung im Wege stehen, wären zu vermeiden durch Aussalzen mittels Sättigung mit Kaliumoxalat bei einer Temperatur von 33° und nachträglicher Entfernung des Oxalates durch Zusatz von Calciumchlorid zum siedenden Alkohol, in welchem die gefällte Substanz gelöst wird. Wegen der schon erwähnten Labilität der verschiedenen Spaltungsprodukte wurde eine Elementaranalyse aber vorläufig als wertlos betrachtet. Es stellte sich heraus, daß auch die Substanz C phosphorhaltig ist im Gegensatz zu der Behauptung von v. Basch,<sup>1)</sup> welcher das Molkenweiß, das in seinen übrigen Eigenschaften mit meiner Substanz C völlig identisch ist, phosphorfrei gefunden hat.

Die bereits von andern Untersuchern hervorgehobene Frage, ob das Casein als solches, bevor es der Labwirkung ausgesetzt wird, eine einheitliche Substanz sei, führte mich zu weiteren Versuchen. Es galt nämlich, festzustellen, ob vielleicht schon das nach Hammarsten bereitete Casein die oben erwähnte Substanz C entweder als Verunreinigung oder als abgespaltetes Fragment eingeschlossen hätte, die Substanz, welche sich nach momentaner Labwirkung in deutlich nachweisbarer Quantität in der Lösung vorfindet. Wenn man eine Lösung der Substanz C mit Casein zusammenmischt, so maskiert das Casein die bekannte Reaktion mit Tanninessigsäure; in ähnlicher Weise, als wir dies bei der Paracaseinalkalilösung

---

<sup>1)</sup> Vide Raudnitz, Ergebnisse der Physiol., Bd. II, 1903, S. 244.

beobachtet haben (Seite 194). In einer Lösung von Casein ist Substanz C also nicht zu erkennen. Nur wenn es gelingt, das Casein vollkommen mit verdünnter Essigsäure zu fällen, wäre es möglich, im Filtrate eine eventuell anwesende Substanz C zu finden. Ein kleiner Überschuß von Essigsäure, welcher einen Teil des Caseins in Lösung hält, würde imstande sein, die Fällung mit Tanninessigsäure zu verhindern, auch bei Gegenwart von Substanz C.

Tatsächlich gelang es, bei äußerst vorsichtiger Fällung mit Essigsäure im klaren Filtrate mit Tanninessigsäure eine deutliche Opalescenz zu erlangen, welche beim Erhitzen vollkommen verschwand und bei Abkühlung wiederkehrte. Es wurde die Möglichkeit erwogen, daß eine Spur des Caseins, welche der Präzipitation mit Essigsäure entgangen sein könnte, im klaren Filtrate die Reaktion mit Tanninessigsäure bewirkte. Es stellte sich aber heraus, daß in äußerst verdünnter Caseinlösung durch Tanninessigsäure keine beim Erhitzen verschwindende Opalescenz zu erzeugen war. Aus dieser Tatsache geht hervor, daß das nach Hammarsten bereitete, viermal gefällte Casein in schwach saurer oder neutraler Lösung nach Fällung mit verdünnter Essigsäure in minimaler Quantität eine Substanz einschließt, welche, was ihre Eigenschaften betrifft, übereinstimmt mit Substanz C.

Die bekannte Beobachtung, daß Casein bei 40%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat total gefällt wird, braucht diesen Befund nicht zu widerlegen, denn es ist sehr wohl möglich, daß die sehr geringfügige Menge von Substanz C bei der Fällung des Caseins mitgerissen wird (wie wir bemerkten, wird die Substanz C zwischen 20- und 60%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt). Tatsächlich sehen wir, daß im Filtrate der bei 40%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat präzipitierten Substanz jede Opalescenz mit Tanninessigsäure ausbleibt. Daß nicht die Gegenwart des Ammoniumsulfates als solche die Ausfällung der Tanninverbindung verhindert, geht genügend aus den Seite 189 beschriebenen Versuchen hervor.

Ebenso wenig gelang es, im Filtrate des nach Sättigung mit kalkhaltigem Kochsalz vollkommen gefällten Caseins noch



die Substanz C nachzuweisen. Auch in diesem letzteren Fall war wahrscheinlich die in äußerst geringer Menge anwesende Substanz bei der Fällung mitgerissen worden.

Zur Feststellung, ob hier eine Verunreinigung des Caseins vorlag, wurde dieser Eiweißkörper bis siebenmal mit verdünnter Essigsäure gefällt. Auch das siebenmal präzipitierte Casein, bei schwach saurer Reaktion in Alkali gelöst, zeigte wiederum denselben Befund.

Es liegt auf der Hand, anzunehmen, daß auch ohne Labwirkung in äußerst geringer Quantität eine leicht abspaltbare Substanz, die noch den Charakter eines Eiweißkörpers trägt, sich vom Caseinmolekül zu lösen vermag, ohne daß dies Molekül tief eingreifenden Veränderungen ausgesetzt zu sein braucht. Sobald das Labenzym seinen Einfluß auf das Caseinmolekül geltend macht, würde dieses Fragment in größerer Quantität abgetrennt werden.

Im Zusammenhang mit dieser Spaltung des Caseins ohne Zusatz von Lab könnte auch die Verschiebung der Reaktion nach der sauren Seite stehen, wenn man eine neutral gegenüber Lackmus oder schwach alkalisch gegenüber Phenolphthalein reagierende Lösung während einiger Zeit auf Körpertemperatur erwärmt. Sehr deutlich war die Zunahme der abgespaltenen, mit Tanninessigsäure reagierenden Fraktion in einer schwach sauren Caseinlösung, welche während vier Tagen im Brutschrank der Körpertemperatur ausgesetzt war. Sättigte man diese Lösung bis 40% mit Ammoniumsulfat, so zeigte das Filtrat, im Gegensatz mit dem Befunde beim frisch bereiteten, nicht der Körpertemperatur ausgesetzten Casein, noch eine Trübung mit Tanninessigsäure.

Nicht ohne Bedeutung war nun die Beantwortung der Frage, ob vielleicht ein dem Casein anhaftendes proteolytisches Enzym diese Abspaltung bewirken könnte. Slowtzoff<sup>1)</sup> hat neulich die Bemerkung gemacht, daß auch das gereinigte Casein von einem solchen Enzym begleitet wird. In bezug auf diese Frage habe ich die eine Hälfte einer 2%igen Caseinlösung

---

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. IX, 1907, S. 150.

gekocht und gleichzeitig mit der anderen Hälfte auf Körpertemperatur erwärmt, ohne Labzusatz, bei schwach saurer Reaktion. Beim Anfang des Versuches war die Reaktion mit Tanninessigsäure im Filtrate der Fällung mit verdünnter Essigsäure gleich stark in beiden Fraktionen. Nach viertägigem Verbleiben auf Körpertemperatur war deutlich nachzuweisen, daß in der ungekochten Caseinlösung ein größeres Quantum der Substanz C sich gebildet hatte als in der gekochten Hälfte. Diese Beobachtung spricht für die Auffassung, daß ein Enzym die Ursache der erwähnten Gleichgewichtsstörung sein könnte. Dieses Enzym würde dem soviel wie möglich gereinigten Casein noch anhaften und durch Kochen vernichtet werden.

Von den besprochenen, unter dem Einflusse des Labenzymen entwickelten Spaltungsprodukten des Caseins ist ohne Zweifel das Paracasein A am nächsten mit der Muttersubstanz verwandt, während in der absteigenden Reihe Substanz C bei kurzdauernder Labwirkung die untere Stelle einnimmt. Diese Substanz, welche nicht diffundiert durch Pergamentpapier, muß, wie die verschiedenen Eiweißreaktionen anzeigen, noch als Eiweißkörper betrachtet werden. Sie läßt die Eigenschaft der primären Albumosen vermessen, welche mit Essigsäure und Natriumchlorid eine beim Erwärmen verschwindende, bei Abkühlung wiederkehrende Fällung zeigen. Nach Fällung mit Tanninessigsäure aber löst sie sich in der Hitze wohl, eine Eigenschaft, welche auch «Wittes Pepton» (hier aber gleichzeitig mit andern Eigenschaften der primären Albumosen) zukommt. Das Ausbleiben einer Fällung mit Salpetersäure und mit Ferrocyanwasserstoff stimmt überein mit Eigenschaften der sekundären Albumosen; in Widerspruch mit den letzteren ist wieder die genannte Fällung mit Essigsäure und Natriumchlorid in der Kälte.

Substanz C paßt nicht hinein in das Schema der Caseosen, welche Alexander<sup>1)</sup> durch peptische Spaltung des Caseins erhielt.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, 1898, S. 411.



Sobald die Labwirkung bei Körpertemperatur längere Zeit fortgesetzt wird, entsteht eine primäre Albumose, deren Stelle im System der Eiweißkörper leichter zu bestimmen ist. Bei schwach saurer Reaktion gelingt es, nach Verlauf von 5 Tagen diese Albumose in der mit Lab behandelten Caseinlösung deutlich nachzuweisen.

Nach unserer Beobachtung, daß Lab bei neutraler Reaktion während langdauernder Einwirkung einen geringen proteolytischen Einfluß auf koaguliertes Eiweiß hat (vide S. 193), neigen wir zu der Annahme, die Entstehung der primären Albumose einem eiweißspaltenden Enzym zuzuschreiben, ohne aber mit Petry<sup>1)</sup> anzunehmen, daß dies ein für Casein spezifisches Agens sein sollte, das dem Labextrakt verbunden sei und anderes Eiweiß unangegriffen ließe. Bemerkenswert bleibt die Tatsache, daß die Spaltung während einer bestimmten Phase nach einem regelmäßigen Schema vor sich geht, d. h. in dem Sinne, daß der Charakter der entwickelten Eiweißkörper qualitativ ein konstanter bleibt, wie sehr auch die quantitativen Verhältnisse, in welchen man sie zu bestimmten Zeiten antrifft, sich verschieben. Ich will hier die Tatsache hervorheben, daß erst nach langdauernder Labwirkung eine Phase anfängt, in welcher eine primäre Albumose sich den ursprünglichen Spaltungsprodukten des Caseins zugesellt. Diese Phase fällt ungefähr mit derjenigen zusammen, in welcher auch die anderen Substanzen weitere Umwandlungen erfahren, was erkenntlich wird an dem Ausfallen eines Sedimentes. Dieses ist erst bei alkalischer Reaktion löslich und verliert allmählich die charakteristische Eigenschaft des anfangs dominierenden Spaltungsproduktes Paracasein A, nämlich die Fähigkeit, mit Calciumchlorid Käse zu bilden.

Die Frage, ob bei bleibender neutraler Reaktion primäre Albumosen durch Labwirkung auf Casein entstehen können, ist nicht zu lösen aus einer Caseinnatriumverbindung, welche neutral gegenüber Lackmus reagiert, weil diese während der Labwirkung innerhalb einzelner Tage die Reaktion in eine am-

---

<sup>1)</sup> l. c. S. 5.

photere verändert. Während der Spaltung werden also H-Ionen freigemacht.

Eine Verschiebung nach der sauren Richtung sehen wir ebenfalls in der Lösung, welche, ursprünglich schwach rot gefärbt mit Phenolphthalein, schon nach 48 Stunden sauer gegenüber diesem Indikator, neutral mit Lackmus reagiert. Primäre Albumosen habe ich in dieser Lösung nicht angetroffen. Auch hat das Sediment, welches sich, wie ich Seite 193 bemerkte, allmählich absetzte, nicht den typischen Charakter des Paracaseins. Daß aber freie H-Ionen zur Labwirkung nicht absolut notwendig sind, geht aus der Tatsache hervor, daß bei alkalischer Reaktion der Milch nach Labzusatz schließlich Koagulation eintreten kann, wenn man, wie gesagt, nur dafür sorgt, daß die Reaktion nicht bedeutend alkalisch wird gegenüber Phenolphthalein. Ein Überschuß von OH-Ionen schädigt also die Labwirkung. Daß diese späte Koagulation ( $1/2$  bis 1 Stunde, abhängig von dem Grade der Alkalität) nicht der Bildung von Milchsäure zuzuschreiben ist, beweist sowohl eine Kontrollprobe ohne Lab, wo die Koagulation ausbleibt, als auch die Tatsache, daß die Reaktion, obgleich sie verschoben wurde nach der sauren Seite, doch oft noch schwach alkalisch gegenüber Lackmus war.

Schließlich noch ein Wort über dasjenige, was man bei der jetzigen Kenntnis des aus Casein durch Labwirkung entwickelten Spaltungsproduktes von einer eventuellen Elementaranalyse zu erwarten hat. Wünschenswert wäre vor allem die Vernichtung des Enzyms in bestimmten Phasen der Labwirkung. Die Weise, auf welche sie von Köster ausgeführt wurde (nämlich Erwärmen der Lösung bis zur Kochhitze), leitet gewiß nicht zum erwünschten Ziel, da zu gleicher Zeit die zu untersuchenden Eiweißkörper ihre Zusammensetzung ändern können. Deswegen darf meiner Ansicht nach der Kösterschen Analyse des Molken-eiweißes, die einzige, welche mir aus der Literatur bekannt ist, kein großer Wert zugeschrieben werden.

Ebensowenig ist es nützlich, durch Zusatz von OH-Ionen die Labwirkung zu hemmen, da wir ja in Zusammenhang mit der bekannten Empfindlichkeit des Caseins gegen Alkali be-



rechtigt sind, auch bei den Spaltungsprodukten dieses Eiweißkörpers dieselbe Eigenschaft zu vermuten.

Solange es sich als unmöglich herausstellt, den durch das Enzym herbeigerufenen labilen Zustand in einem willkürlichen Moment in einen stabilen zu ändern, werden unsere Versuche, die Spaltungsprodukte des Caseins, befreit von Nebenmischungen, zu isolieren und quantitativ zu analysieren, keine befriedigenden Resultate haben.

#### Zusammenfassung.

Das Labenzym wirkt in solcher Weise auf das Caseinmolekül ein, daß aus diesem andere Moleküle mit sehr labilem Gleichgewicht entstehen. Diese zerfallen selber während der Enzymwirkung unaufhörlich in Moleküle von anderer Konstruktion. So werden aus dem ursprünglichen Hauptspaltungsprodukt, dem Paracasein A, immer Moleküle des Paracaseins B und der Substanz C gebildet, bis schließlich das Paracasein A selbst vollkommen verschwunden ist, während es bei kurzdauerndem Einflusse des Enzyms als Hauptprodukt betrachtet werden darf. Erst bei sehr langdauernder Labwirkung tritt neben den genannten Substanzen eine primäre Albumose hinzu. Dies ist der Anfang einer neuen Phase, charakterisiert durch weiteren Zerfall des Caseinmoleküls.

Weiter hat sich ergeben, daß das Casein kein stabiler Körper ist, sondern äußerst empfindlich ist für Gleichgewichtsstörung. Es hängt ihm eine sehr leicht abspaltbare Substanz an, welche vollkommen mit der obenerwähnten Substanz C übereinstimmt. Diese Abspaltung kann sich vollziehen, ohne daß irgend welches Enzym oder sonstiges Agens diesem Eiweißkörper zugesetzt wird. Daß diese Substanz keine Verunreinigung, sondern ein abgespaltenes Fragment des Caseinmoleküls ist, wird wahrscheinlich durch die Beobachtung, daß das siebenmal nach der Hammarstenschen Methode gefällte Casein diese Substanz noch enthält. Genügend beweisend für diese letztere Auffassung ist aber die Tatsache, daß eine Lösung dieses Caseinats ohne Labzusatz auf Körpertemperatur erwärmt, eine evidente Zunahme des erwähnten Spaltungsproduktes zeigt.

Tabelle.

	Casein	Para- casein A	Para- casein B	Sub- stanz C
Calciumchlorid . . . . .	+ (feinflockig)	+ (käsige)	—	—
Verdünnte Essigsäure . . . . .	+	+	+	—
Sublimat . . . . .	+	+	+	+
Zinksulfat . . . . .	+	+	+	+
Pikrinsäure . . . . .	+	+	+	+
Tanninessigsäure . . . . .	—	—	—	+
Salpetersäure . . . . .	+	+	+	—
Natriumchlorid und Essigsäure	+	+	+	+
Ferrocyanwasserstoffsäure . . . . .	+	+	+	—
Schwefelbleireaktion . . . . .	+	+	—	—
Reaktion Millon . . . . .	+	+	+	+
Reaktion Adamkiewicz . . . . .	+	+	+	+ (schwach)
Xanthoproteinreaktion . . . . .	+	+	+	+ (stark)
Biuretreaktion . . . . .	+	+	+	+ (stark)
Totale Sättigung mit kalkhal- tigem Natriumchlorid . . . . .	+	+	+	—
Totale Sättigung mit kalk- freiem Natriumchlorid . . . . .	—	—	—	—
Totale Sättigung mit Mag- nesiumsulfat . . . . .	+	+	+	nicht total
Totale Fällung mit Ammonium- sulfat bei einer Sättigung von	40%	30 %	20 bis 30%	60 %
Löslichkeit in Wasser . . . . .	—	—	—	+
Löslichkeit in siedendem 85%igen Alkohol . . . . .	wenig	wenig	+	+

Schließlich konnte ich vollständig den Ausspruch von Schmidt-Nielsen<sup>1)</sup> bestätigen, daß freie H-Ionen zur Koagulation der Milch oder einer kalkreichen Caseinatlösung nicht notwendig sind. Seine Behauptung, daß die Anzahl der OH-Ionen nicht so groß sein darf, daß eine Reaktion mit Phenolphthalein eintritt, möchte ich nach der Richtung hin einschränken, daß

<sup>1)</sup> Festschrift f. Hammarsten, S. 21.



nur eine bleibende Rotfärbung mit Phenolphthalein der Koagulation im Wege steht. In der mit Phenolphthalein sehr schwach rot gefärbten Milch sehen wir (wenn die Milch auf Körpertemperatur gehalten wird) die Reaktion sich nach der sauren Seite verschieben (Schwund der roten Farbe), bis schließlich die Milch durch Lab koagulieren kann, während die Reaktion noch schwach alkalisch, oder neutral gegenüber Lackmus ist. Nur wenn fortwährend durch Zusatz von kleinen Mengen Alkali die Reaktion auf dem ersten Niveau gehalten wird, oder wenn von Anfang an ein Überschuß von Alkali zugesetzt wird, bleibt auch bei langdauernder Labwirkung die Koagulation vollkommen aus.

---