

Über die spontane Ausscheidung einer Caseinverbindung aus Milch.

Von

Dr. Luigi Preti, aus Pavia.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. September 1907.)

In einer jahrelang durch Chloroformzusatz konservierten Milch hatte sich ohne Änderung der Reaktion der Milch eine reichliche weiße Ausscheidung am Boden der Flasche gebildet, die von vornherein als Casein angesehen werden mußte, da die über dem Niederschlag stehende gelbliche klare Flüssigkeit nur noch eine sehr geringe Trübung auf Essigsäurezusatz zeigte. Da die Reaktion der Milch sich, wie gesagt, nicht verändert hatte, so lag es am nächsten, diese Erscheinung als auf einem, wenn auch sehr geringen, Gehalt der Milch an Labferment beruhend anzusehen. Dieses konnte aber nur dann als bewiesen angesehen werden, wenn es gelang, nachzuweisen, daß das ausgeschiedene Casein in der Tat Paracasein und nicht gewöhnliches Casein war. Auf Veranlassung von Prof. E. Salkowski übernahm ich die Aufgabe, die Entscheidung hierüber durch genauere Untersuchung des Niederschlages herbeizuführen. Vorher aber erschien es notwendig, die Angaben über Unterschiede zwischen Casein und Paracasein oder, wie man auch vielfach sagt, zwischen Säurecasein und Labcasein einer Nachprüfung zu unterziehen. Dies erschien um so notwendiger, als kürzlich Loewenhardt¹⁾ die Frage nach dem Unterschied der beiden Caseine in einer ganz abweichenden Weise beantwortet hat. L. sagt l. c. S. 185:

«Aus all den Angaben scheint hervorzugehen, daß bis jetzt zwischen Casein und Paracasein keine anderen Unterschiede gefunden wurden, als solche, die einfach auf einer Verschiedenheit in der Größe der Lösungsaggregate beruhen, d. h.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 177.

das Paracasein existiert in Lösungen mit höherem kolloidalen Zustand, und also weiter entfernt vom Bereich der wahren Lösungen als das Casein. Auf diese Weise ließe sich erklären, warum Paracasein von allen Fällungsmitteln der Kolloide leichter ausgefällt wird als Casein. In bezug auf einige chemisch einfachere Kolloide wurde demonstriert, daß dieselbe Substanz in verschiedenem kolloiden Zustande existieren kann und daß ihre Lösungsaggregate unter verschiedenen Bedingungen variieren können. Diese Tatsachen lassen es als sehr möglich erscheinen, daß Casein und Paracasein chemisch dieselben Substanzen sind und daß die beobachteten Verschiedenheiten darauf beruhen, daß das Paracasein im Zustande eines höheren Grades der Assoziation sich befindet als Casein.»

Meine Versuche hinsichtlich der Unterschiede von Casein und Paracasein führten nun zu folgenden Ergebnissen. Zunächst muß ich erwähnen, daß die zu meinen Versuchen dienenden Präparate von Casein und Paracasein nicht durch Lösen in Alkali und Wiederfällen durch Essigsäure gereinigt worden sind. Dieses mußte vermieden werden, da ich ja die spontane Abscheidung aus der Milch auch nicht in Alkali lösen und nicht wieder ausfällen konnte. Das durfte nicht geschehen, da die Eigenschaften des Niederschlages dadurch möglicherweise verändert worden wären. Ich habe das Casein und Paracasein jedesmal aus derselben Kuhmilch dargestellt und zwar für jeden Versuch neu. Die Milch wurde mit dem anderthalbfachen Volumen Wasser verdünnt und in zwei gleiche Teile geteilt. Der eine Teil wurde vorsichtig mit verdünnter Essigsäure versetzt, bis das Casein flockig ausfiel, dem anderen Teil wurde auf je 100 ccm 5 ccm einer 0,1%igen Labpulverlösung zugesetzt und die Mischung für einige Stunden in den Thermostaten (39°) gestellt, das Koagulum zerkleinert. Beide Niederschläge wurden filtriert, vom Filter genommen, mit Wasser angerührt, wieder filtriert, dies mehrmals wiederholt, mit Alkohol und Äther gewaschen. Mit beiden Präparaten wurden vergleichende Untersuchungen ausgeführt in bezug auf folgende Punkte:

1. Calciumgehalt,
2. Phosphorgehalt,

3. Löslichkeit in einer Suspension von Calciumcarbonat.

4. Verhalten zu Lab.

I. Da die Veraschung des Caseins bekanntlich sehr schwierig erfolgt, so wurde statt dessen genau abgewogene, bei 110° getrocknete Quantitäten — zwischen 0,5—1 g — mit Salpetermischung geschmolzen, die Schmelze in Wasser gelöst, mit Salpetersäure angesäuert, erhitzt, mit oxalsaurem Ammon versetzt usw. Um die Ausscheidung von phosphorsaurer Ammonmagnesia zu verhüten, wurde schließlich mit Essigsäure angesäuert. Es ergab sich:

Tabelle I.

Prozentgehalt an Calcium.

Nr.	Casein	Paracasein
1	0,562	2,048
2	1,343	2,002
3	0,558	2,552
4	0,461	1,365
5	0,142	2,833

Aus der Tabelle geht hervor, daß der Calciumgehalt des Rohcaseins sehr wechselnd ist, vielleicht im Zusammenhange mit der willkürlich gewählten Quantität Essigsäure, stets aber geringer, meist erheblich geringer, als der des Labcaseins; nur in einem Falle, der verschiedene Milchproben betrifft, war der Unterschied gering. Im Mittel betrug der Calciumgehalt des Säurecaseins $0,613\%$, der des Labcaseins $2,16\%$. Der höhere Calciumgehalt des Labcaseins ist bereits bekannt.

II. Der Gehalt an Phosphor wurde in der üblichen Weise gleichfalls durch Schmelzen mit Soda und Salpeter bestimmt. Es wurden für Labcasein folgende Werte gefunden: $1,138\%$ — $1,528\%$ — $1,171\%$ — $1,402\%$ — $1,337\%$ —, im Mittel $1,315\%$.

Basch¹⁾ führt als P-Gehalt $1,37\%$ an, Lindemann²⁾

¹⁾ Prager, med. Wochenschr., 1896, Nr. 29.

²⁾ Virchows Archiv, Bd. CXLIX, S. 60 (1897).

1,368 % für ein noch etwas fetthaltiges Präparat. Der höhere Gehalt an Phosphor wird wohl allgemein auf den größeren Gehalt an Calciumphosphat bezogen.¹⁾ In der Tat konnte ich mich in einem nebenher angestellten Versuche überzeugen, daß mit verdünnter Salzsäure (ca. 10 % HCl) extrahiertes Labcasein den normalen P-Gehalt des Caseins aufwies. Von der gleichfalls beabsichtigten P-Bestimmung des Rohcaseins wurde Abstand genommen, da sie sich inzwischen als entbehrlich herausgestellt hatte.

III. Die Bestimmungen über die Löslichkeit in einer Suspension von Calciumcarbonat wurden so angestellt, daß ca. 2 g Casein mit etwa 150 g Wasser unter Zusatz von Calciumcarbonat (trockenes Präparat) längere Zeit in der Reibschale verrieben, dann filtriert wurde. Die Versuche wurden sowohl mit lufttrockenen als mit bei 100° getrockneten Präparaten angestellt. Die Filtrate zeigten bei Verwendung von lufttrockenen Präparaten sich schon äußerlich verschieden: Das Filtrat von Säurecasein war undurchsichtig, milchig, das von Labcasein fast ganz klar. Die Unterschiede waren nicht bemerkbar, wenn bei 110° getrocknete Präparate angewendet waren. Dem entspricht auch der Stickstoffgehalt und Calciumgehalt der Filtrate.

Tabelle II.

100 ccm des Filtrates enthalten:

	Casein		Paracasein	
	N	Ca	N	Ca
luft- trocken	0,1321	0,0171	0,0011	0,0044
	0,1562	0,020	Spur	Spur
	0,1433	0,0504	0,0039	0,0028
bei 110° getrocknet	0,0134	0,0096	Spur	0,008
	0,0020	0,0088	0,0067	0,009
	0,0078	0,0114	0,0179	0,0150
	0,008	0,0130	0,0151	0,0110

¹⁾ Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 6. Aufl., S. 521 (1907).

Darnach ist Labcasein kaum löslich in der Suspension von Calciumcarbonat und Wasser, Säurecasein merklich löslich, entsprechend den Angaben von Hammarsten. Die Löslichkeit des letzteren geht verloren durch Erhitzen auf 110° und beide Caseine verhalten sich alsdann ganz gleich. Feuchtes Labcasein scheint sich übrigens etwas mehr zu lösen.

IV. Löst man Casein (Säurecasein) in Kalkwasser und zwar den Angaben von Courant¹⁾ folgend in dem Verhältnis von 0,3 Casein zu 10 ccm gesättigtem Kalkwasser, neutralisiert die Lösung unter andauerndem starken Rühren nahezu mit sehr verdünnter Phosphorsäure, so zeigt die Lösung bei Labzusatz nach kurzer Zeit Gerinnung. Lösungen von Labcasein sollen diese Gerinnung nicht zeigen. Bei Ausführung dieses Versuches stieß ich beim Labcasein auf eine Schwierigkeit, welche den Versuch vereitelte. Beim Zusatz von Phosphorsäure bildeten sich jedesmal Niederschläge, lange ehe neutrale Reaktion erreicht war. In dem alkalisch reagierenden Filtrat war durch Lab keine Gerinnung zu erhalten, doch ist dieses natürlich nicht beweisend, da die alkalische Reaktion an sich schon die Labgerinnung hindert. Vielleicht beruhte die Unmöglichkeit, den Gerinnungsversuch anzustellen, darauf, daß das Labcasein nicht gereinigt und sehr kalkreich war.

Endlich werden noch Unterschiede zwischen dem Filtrat von Säurecasein und Labcasein hinsichtlich des Gehalts an Calcium und Eiweißkörpern angegeben und zwar in dem Sinne, daß das Labcaseinfiltrat, wie erklärlich, ärmer ist an Calcium, dagegen reicher an Eiweißkörpern. Quantitative Angaben nach dieser Richtung scheinen nicht vorzuliegen, ich habe daher einige Versuche hierüber angestellt. Nachfolgende Tabelle III enthält den N-Gehalt und Calciumgehalt der betreffenden Filtrate bezogen auf 100 ccm Milch.

Der höhere Stickstoffgehalt des Filtrats bei der Labgerinnung wird von Hammarsten und seinen Schülern auf die Bildung eines Eiweißkörpers bei der Labgerinnung zurückgeführt.

¹⁾ Pflügers Archiv, Bd. L, S. 109, und Inaug.-Dissertation 1891, S. 28.

Nach E. Fuld¹⁾ bildet sich eine Albumose, eventuell außerdem noch ein Eiweißkörper.

Tabelle III.

Filtrat von Essigsäurefällung		Filtrat von Labfällung	
N	Ca	N	Ca
—	0,1014	—	0,0444
0,084	0,1037	0,224	0,0643
0,0957	0,1007	0,1526	0,0659
0,087	0,1099	0,205	0,0486

Danach hat sich also ergeben, daß das Paracasein sich von dem Casein unterscheidet:

1. Durch seinen größeren Gehalt an Calcium und Phosphor.
2. Durch geringere Löslichkeit in einer Suspension von Calciumcarbonat im Wasser.
3. Durch die Fällbarkeit der Lösung in Kalkwasser durch Phosphorsäure, wenigstens insoweit es sich um nicht weiter gereinigtes Labcasein handelt.
4. Durch den größeren Stickstoffgehalt und geringeren Calciumgehalt des Milchserums.

Nunmehr konnte ich an die Untersuchung des beim Stehen der mit Chloroform konservierten Milch gebildeten Niederschlags gehen.

Derselbe wurde abfiltriert und zunächst das Serum untersucht. Dieses war klar, etwas gelblich gefärbt, von neutraler Reaktion. Beim Ansäuern mit Essigsäure bildete sich eine geringe Trübung, die bei nachträglichem Erhitzen nur wenig zunahm, stärker bei Zusatz von konzentrierter Kochsalzlösung zu der heißen Mischung. Das von Eiweiß befreite Filtrat zeigte deutliche, aber nur schwache Biuretreaktion, enthält übrigens noch reichlich Zucker nach Ausweis der Trommerschen Probe. Die weitere Untersuchung des Filtrats ergab, daß dasselbe nicht weniger als 0,470 bzw. 0,480, im Mittel 0,475 N in

¹⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. IV, S. 489 (1907).

100 ccm enthielt. Dies würde auf Eiweiß umgerechnet 2,968 g ergeben. Da nun aber nur Spuren von Casein resp. Eiweiß und Albumose vorhanden waren, so muß der Stickstoff auf Spaltungsprodukte der Eiweißkörper durch autolytische Fermente der Milch bezogen werden. Der N-Gehalt des Filtrats konnte unter diesen Umständen zu irgend welchen Schlüssen bezüglich der Natur des spontan gebildeten Niederschlages natürlich nicht verwertet werden.

Die Untersuchung des durch Alkohol und Äther entfetteten Niederschlages ergab zunächst das unerwartete Resultat, daß derselbe sich zu einem sehr erheblichen Teil aus anorganischer Substanz bestehend erwies. 0,5148 g der bis zur Gewichtskonstanz bei 110° getrockneten Substanz wurde verascht bzw. verkohlt. Da die völlige Veraschung nicht gelang, wurde sie durch Aufstreuen von gepulvertem Ammoniumnitrat befördert. Die Asche wurde mit Ammoniumcarbonat übergossen, nach längerem Stehen zur Trockene gedampft und vorsichtig gelind geglüht. Der erhaltene Glührückstand wog 0,1654 g gleich 32,11 %. Die Substanz bestand also zu fast $\frac{1}{3}$ aus anorganischen Verbindungen. Die Asche, die etwas alkalisch reagierte, erwies sich sehr reich an Calcium und Phosphorsäure. In der getrockneten Substanz selbst wurde Calcium und Phosphorsäure, auch durch Schmelzen mit Soda und Salpeter, bestimmt. 0,7382 g gaben 0,1102 CaO = 10,7% Calcium.

0,7572 g gaben 0,1176 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ = 4,337% P. Eine nähere Betrachtung der beiden ermittelten Zahlen ergibt folgendes: Der Niederschlag besteht in 100 Teilen zu 67,89 organischer Substanz, als welche wohl kaum etwas anderes wie Casein angesehen werden kann.

Nimmt man mit Hammarsten den P-Gehalt des reinen aschefreien Casein zu 0,85% an, so würden die obigen 67,98 T. 0,578 P enthalten. Gefunden sind 4,337 P. Es sind somit 3,759 T. in Form von Phosphorsäure vorhanden, gebunden an Calcium. Nehmen wir nun selbst an, daß die Phosphorsäure als $\text{Ca}_3\text{P}_2\text{O}_8$ vorhanden war, so würde die Phosphorsäure 7,275 T. Calcium erfordern. Da nun in 100 T. des Niederschlages 10,700 T. Calcium gefunden sind, so folgt daraus, daß 3,425 T.

Calcium in anderer Form gebunden waren und zwar, da weitere anorganische Säuren in dem Niederschlag nicht vorhanden waren, augenscheinlich als Caseincalcium. Somit kommen wir zu dem Resultat, daß der Niederschlag, der sich spontan in der aufbewahrten Milch gebildet hat, überhaupt nicht Casein ist, wie vorausgesetzt wurde, sondern eine Calciumverbindung des Caseins. Dementsprechend stimmt sein sonstiges Verhalten auch weder mit Säurecasein, noch mit Labcasein überein.

Beim Verreiben mit Calciumcarbonat ging nur äußerst wenig in Lösung. 100 ccm des Filtrats enthielten nur 0,0028 N und 0,0038 Ca. Auch in Kalkwasser löste sich nur wenig. 100 ccm des Filtrats enthielten nur 0,07 N, was 0,446 g Casein entsprechen würde. Die Lösung mit sehr verdünnter Phosphorsäure nahezu neutralisiert gerann mit Lab nicht. Ob man indessen aus dieser Beobachtung irgend etwas für die Natur des Niederschlages ableiten kann, ist bei der geringen Konzentration der Lösung zweifelhaft.

Daß dem Niederschlag eine beträchtliche Quantität Calciumphosphat beigemischt ist, geht aus seinem Verhalten zu verdünnter Salzsäure (ca. 10% HCl) hervor. 2 g desselben wurden bei gelinder Wärme mit der verdünnten Salzsäure behandelt, es gingen 0,1217 g Ca in Lösung, somit mehr als die Hälfte des Calciumgehaltes. In einem Kontrollversuch mit Labcasein gingen aus 2 g nur 0,0396 Ca in Lösung.

Wir gelangen somit zu dem Schluß, daß der bei langer steriler Aufbewahrung der Milch allmählich gebildete Niederschlag ein Gemisch von Calciumphosphat und Calciumcaseinat ist, daß sich aber über die Natur, des darin enthaltenen Caseins — ob Säurecasein oder Labcasein — nichts aussagen läßt, daß wir also auch nicht entscheiden können, ob es sich bei der allmählichen Ausscheidung des Niederschlages um ein rein physikalisches Phänomen oder um Fermentwirkung handelt.
