

Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper der Kuhmilch

(II. Mittheilung)

von

Dr. **Karl Storch**,

*a. o. Professor am k. und k. Militär-Thierarznei-Institute und
der thierärztlichen Hochschule in Wien.*

Aus dem physiologischen Laboratorium des k. und k. Militär-Thierarznei-
Institutes und der thierärztlichen Hochschule in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 8. Juni 1899.)

Die in diesen Sitzungsberichten (mathem.-naturw. Classe, Bd. CVI, Abth. III, Mai 1897) von mir veröffentlichten Untersuchungen über die Eiweisskörper der Kuhmilch haben das Ergebniss gehabt, dass das Caseinogen durch Sättigung der Kuhmilch mit Natriumsulfat, Magnesiumsulfat und Chlornatrium nicht im unveränderten Zustande sich aussalzen lässt, wenn jedes dieser Salze für sich angewendet wird, sondern dass es in zwei phosphorhaltige Substanzen gespalten wird.

Um die Natur dieser von mir vorläufig mit *a* und *b* bezeichneten Eiweisssubstanzen näher kennen zu lernen, war es nothwendig, dieselben rein darzustellen, sie der Elementaranalyse zu unterziehen und ihr chemisches Verhalten zu prüfen. Zu dem Behufe wurden folgende Untersuchungen vorgenommen.

A. Untersuchung der Substanz *a*.

1. Reindarstellung.

Um eine für die Untersuchungen hinreichende Menge der Substanzen *a* und *b* zu erhalten, wurden 500 cm^3 frische Vollmilch mit der dreifachen Menge concentrirter Natriumsulfat-

lösung und mit etwas Hühnereiweiss vermenget und bei 100° C. zur Coagulation gebracht. Die von dem ausgeschiedenen Albumen, Lactalbumin (und Sebelien's Lactoglobulin) und Fett durch Filtration befreite Molke wurde mit concentrirter Glaubersalzlösung, welcher Essigsäure zugesetzt worden war, vorsichtig neutralisirt und dann mit überschüssigem krystallisirten Natriumsulfat so lange gerührt, bis die Substanz *a* vollständig ausgesalzen war. Es ist hiezu ein grösserer Zeitaufwand nothwendig, wie in der ersten Mittheilung angeführt worden ist.

In das klare Filtrat der Substanz *a* wurde festes Magnesiumsulfat im Überschuss eingetragen. Nach halbstündigem Rühren schied sich die Substanz *b* aus.

Die auf dem Filter gesammelte Substanz *a* wurde mit concentrirter Natriumsulfatlösung gewaschen, in Wasser gelöst, die Lösung filtrirt und auf den Dialysator gebracht. Das Diffusat wurde zuerst nach vier Stunden, dann täglich gewechselt. Um die Fäulniss zu hindern, wurde der Substanz von Zeit zu Zeit pulverisirtes Thymol zugesetzt. Nach viertägigem Dialysiren trübt sich die Flüssigkeit milchig, und nach 9—10 Tagen hat sich in dem inneren Gefässe eine mehrere Millimeter hohe Schichte eines feinen weissen Niederschlages auf dem Boden angesammelt. Der Niederschlag wurde wiederholt aufgerührt, und trotzdem enthielt die Flüssigkeit noch nach 16tägigem Dialysiren Sulfate, und es gelang nicht, auch durch länger fortgesetztes Dialysiren die schwefelsauren Salze vollständig zu entfernen. Die äussere Flüssigkeit enthält trotz täglichen Wechsels noch bis zum zehnten Tage nachweisbare Mengen von schwefelsauren Salzen.

Wird die milchige Flüssigkeit, welche sich aus der Lösung der Substanz *a* am vierten Tage der Dialyse gebildet hat, tropfenweise mit sehr verdünnter Essigsäure versetzt, so entsteht ein sehr feiner Niederschlag, welcher sich in überschüssiger Essigsäure wieder löst, und trägt man in die milchige Flüssigkeit Natriumsulfat ein, so scheidet sich die Substanz *a* in Form von grossen Flocken aus. Aber die ausgeschiedene Substanz *a* löst sich nicht mehr vollständig in verdünnter Natriumsulfatlösung auf.

Lässt man nach 16—21tägigem Dialysiren etwas von der über der ausgeschiedenen Substanz *a* stehenden, klaren Flüssigkeit auf erwärmtem Platinblech langsam abdunsten, so bleibt ein Rückstand zurück, welcher beim Erhitzen Kohle und nach starkem Glühen auch Asche zurücklässt. In der Mutterlauge der Substanz *a* ist also sowohl ein Theil der Substanz *a*, als auch des Natriumsulfates in Lösung geblieben.

Die Substanz *a* geht ohne Anwendung fäulniswidriger Mittel sehr rasch in Fäulniss über. Abgesehen von den Fäulnissgasen passiren Zersetzungsproducte die Pergamentmembran, und schliesslich tritt sogar Trübung im Diffusat ein (Mikroorganismen). Eine solche Erscheinung sah ich während der Sommermonate, wenn kein Chloroform oder Thymol zugesetzt wurde, schon nach 3—4 Tagen auftreten.

Nach 16—21tägigem Dialysiren wurde die ausgeschiedene Substanz *a* auf dem Filter gesammelt und so lange mit Wasser gewaschen, bis die ablaufende Flüssigkeit keine Sulfatreaction mehr aufwies, d. i. bis jede Spur der Mutterlauge beseitigt war.

Die zuerst auf dem Filter und dann im Exsiccator getrocknete Substanz *a* stellt eine weissliche körnige Masse von saurer Reaction dar. Wird eine kleine Portion derselben auf dem Platinblech bei steigender Hitze langsam erhitzt und dann geglüht, so bleibt eine kaum bemerkbare Spur eines Rückstandes zurück (Metaphosphorsäure).

2. Elementaranalyse.

Für die Zwecke der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmung wurden circa 2 g ausgeglühtes, basisch phosphorsaures Calcium [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] auf der Achatschale fein verrieben, ins Platinschiffchen gebracht und im Trockenkasten bei der constanten Temperatur von 110°C . durch $1\frac{1}{2}$ Stunden, d. i. so lange bis durch vorgenommene Wägungsproben kein Wasserverlust mehr zu constatiren war, getrocknet, im Exsiccator abgekühlt und dann genau gewogen. Auf schwarzem Glanzpapier wurden hierauf circa 0.3 g der trockenen und feingepulverten Substanz *a* mit dem Calciumphosphat innig gemischt, ins Schiffchen gethan, bis zum constantem Gewichte

bei 110° C. getrocknet und genau gewogen. Die durch Subtraction der beiden Gewichte berechnete Menge der Substanz *a*, welche zur Verbrennung verwendet wurde, betrug stets 0·25 bis 0·28 g.

Nun wurde zur Verbrennung geschritten. Die Verbrennung geschah in einer 84 *cm* langen Glasröhre in trockenem Sauerstoff. Vor dem Schiffchen befand sich eine circa 50 *cm* lange Kupferoxydschichte und vor dieser eine 13 *cm* lange, im trockenen Wasserstoffstrome frisch ausgeglühte Spirale aus Kupferblech. Bei der Verbrennung wurden alle bekannten Cautelen berücksichtigt.

Der Stickstoff wurde nach Dumas' Methode, der Schwefel und Phosphor in der bekannten Weise mittelst Schmelzen der Substanz *a* mit Ätzkali und Salpeter und Bestimmung von Schwefelsäure und Pyrophosphorsäure in der Schmelze bestimmt.

Es wurden überall Doppelanalysen ausgeführt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	C	H	N	S	P	O
Analyse 1	54·44	6·81	14·81	0·63	0·80	22·51
Analyse 2	54·42	6·80	14·82	0·64	0·78	22·54

3. Chemisches Verhalten.

1. Wird die Substanz *a* zwischen feuchtem violettem Lackmuspapier gepresst, so lässt sie rothe Flecke zurück, sie reagirt also sauer.

2. Übergiesst man eine kleine Probe der Substanz *a* im Reagenscylinder mit Wasser, schüttelt länger und filtrirt, so lassen sich im Filtrate kaum Spuren eines Eiweisskörpers nachweisen, die Substanz *a* ist also in Wasser fast unlöslich.

3. Die Substanz *a* wird leicht durch Alkalien in Lösung gebracht; setzt man nur so wenig Alkali hinzu, dass die Substanz eben gelöst wird, so erhält man eine neutral reagierende Lösung, welche beim Kochen nicht gerinnt.

4. Setzt man zu den Lösungen der Substanz *a* Essigsäure bis zur sauren Reaction zu, so tritt Fällung ein.

5. Die Substanz *a* wird auch durch Neutralsalze, wie Globulin, in Lösung gebracht; bringt man die Substanz durch

Natriumsulfat in Lösung und kocht diese Lösung, so tritt Gerinnung ein.

6. Die Substanz löst sich in concentrirter Salzsäure, beim Verdünnen mit Wasser tritt wieder ein Niederschlag auf.

7. Wird die Substanz mit möglichst wenig Alkali gelöst, mit zwei Tropfen Glycerin-Labextract und mit einigen Tropfen Chlorcalciumlösung versetzt, so tritt beim Erwärmen auf 44° C. Labgerinnung ein.

8. Die Lösungen der Substanz *a* geben die allen Albuminstoffen gemeinsamen Reactionen.

9. Die Substanz ist in concentrirter Natriumsulfat-, Magnesiumsulfat- und Chlornatriumlösung unlöslich.

10. Mit möglichst wenig Kalkwasser geht die Substanz *a* in Lösung, die Reaction ist neutral. Ebenso verhält sie sich gegenüber der Sodalösung.

11. Die Substanz ist in der Lösung des phosphorsauren Natrons (Na_2HPO_4) löslich.

12. Die neutralen Lösungen der Substanz *a* werden durch Alkohol gefällt.

13. In verdünnter Salzsäure (0·8%) bleibt die Substanz *a* ungelöst. Auch im Filtrat der lange Zeit mit 0·8% Salzsäure geschüttelten Substanz ist kein Eiweiss nachzuweisen.

14. In concentrirter Lösung von Natrium- und Magnesiumsulfat ist die Substanz *a* unlöslich.

B. Untersuchung der Substanz *b*.

1. Reindarstellung.

Nach dem Ausfällen der Substanz *a* mit Natriumsulfat wurde aus dem Filtrate die Substanz *b* durch Sättigung mit Magnesiumsulfat ausgesalzen, der Niederschlag auf dem Filter mit concentrirter Bittersalzlösung gewaschen, hierauf in wenig Wasser gelöst und dann in derselben Weise wie die Substanz *a* unter öfterem Zusatze von Thymol dialysirt.

Die Dialyse nahm vier Wochen, also fast die doppelte Zeit im Vergleiche zur Substanz *a*, in Anspruch. Erst dann war in dem täglich gewechselten Diffusatwasser keine Spur von Schwefelsäure, beziehungsweise Magnesia nachzuweisen. Die

Lösung selbst blieb während der ersten 14 Tage der Dialyse vollkommen klar. Erst nachdem weder im inneren, noch im äusseren Gefässe Magnesiumsulfat mehr nachzuweisen war, sammelte sich eine geringe Menge eines feinen Niederschlages auf der Pergamentmembran an.

Der Niederschlag wurde durch Filtration von dem gelöst verbliebenen Theile getrennt, getrocknet und für sich aufbewahrt, das Filtrat wurde auf dem Wasserbade bei 40° C. bis zur Trockne abgedunstet. Es blieb ein Rückstand, dessen Menge annähernd viermal mehr als die des durch die Dialyse erhaltenen Niederschlages betrug, zurück. Ob dieser Körper mit der in Lösung gebliebenen Substanz identisch ist oder eine dritte Substanz darstellt, sollen spätere Untersuchungen darthuen.

Die Substanz *b* unterscheidet sich hiedurch wesentlich von der Substanz *a*, indem sie dieser gegenüber auch in der von Mittelsalzen befreiten Flüssigkeit grösstentheils gelöst bleibt.

Auf Platinblech erhitzt, lässt der ausgefallene Theil und der in Lösung gebliebene kaum einen bemerkbaren Rückstand zurück (Metaphosphorsäure).

2. Elementaranalyse.

Die Elementaranalyse wurde nur bei dem in Lösung gebliebenen Theile ausgeführt. Die des ausgefallenen Antheils soll erst vorgenommen werden, bis eine genügende Menge Material gesammelt worden ist.

Die Analysen wurden genau so durchgeführt wie bei der Substanz *a*. Die Resultate derselben sind aus der nachfolgenden Tabelle zu ersehen.

	C	H	N	S	P	O
Analyse 1	49·15	5·90	14·10	1·57	2·08	27·14
» 2	49·10	5·92	14·16	1·60	2·09	27·13

3. Chemisches Verhalten der Substanz *b*.

Die im Dialysator nicht ausgefallene Substanz *b* zeigt das folgende chemische Verhalten:

1. Das Dialysat der Substanz *b* reagirt schwach sauer, ebenso reagirt die durch Abdunstung dieses Dialysates bei

niederer Temperatur erhaltene Substanz in wässriger Lösung sauer.

2. Die Lösung in Wasser gerinnt beim Kochen nicht.

3. Die wässrige Lösung trübt sich nach reichlichem Zusatz von Essigsäure.

4. Durch wenig Alkali bleibt die Substanz in Lösung; die Lösung ist neutral.

5. Die Substanz ist in Lösungen der Neutralsalze (auch in concentrirten) löslich; diese Lösungen gerinnen beim Kochen.

6. Aus einer mit Alkali bereiteten, neutralen Lösung wird die Substanz mit Essigsäure gefällt; in überschüssiger Essigsäure löst sich der Niederschlag nicht.

7. Die Substanz löst sich in überschüssiger Salzsäure und Salpetersäure und in Eisessig.

8. Ihre neutralen Lösungen werden durch Alkohol gefällt.

9. Ihre alkalische Lösung reducirt Kupfersulfat nicht.

10. In concentrirter Natriumsulfat- und Magnesiumsulfatlösung (combinirt) ist die Substanz *b* unlöslich.

11. Verdünnte Salzsäure (0.8%) spaltet die Substanz *b* in einen darin löslichen und einen unlöslichen Theil. Wird der gelöste Theil von dem ungelösten durch Filtration getrennt und wird ihm Ammoniakflüssigkeit zugefügt, so scheidet er sich in Form einer Trübung aus. Eine Fällung ruft in der Flüssigkeit auch der Alkohol und im Überschuss eingetragenes Magnesiumsulfat hervor.

Der Niederschlag, welcher nach dem Behandeln der Substanz *b* mit verdünnter Salzsäure entsteht und auf dem Filter zurückbleibt, ist in Wasser, Alkohol und verdünnten Säuren unlöslich, in Alkalien dagegen löslich. Diese Lösung gibt die Biuret- und Millon'sche Reaction.

C. Schlussbemerkungen.

In der nebenstehenden Tabelle sind die arithmetischen Mittel der früher angeführten Resultate der Elementaranalysen der Substanzen *a* und *b* nebeneinandergestellt und ausserdem sind noch die Werthe der Elementaranalyse des Caseïns nach Hammarsten beigefügt.

	Substanz <i>a</i>	Substanz <i>b</i>	Casein
C	54·43	49·125	53·0
H	6·805	5·91	7·0
N	14·815	14·13	15·7
S	0·635	1·585	0·8
P	0·79	2·085	0·85
O	22·525	27·135	22·65

Sowohl die Substanz *a*, als die Substanz *b* unterscheidet sich im Kohlenstoffgehalt von dem ursprünglichen Casein. Die Substanz *a* hat einen höheren, die Substanz *b* einen niedrigeren Kohlenstoffgehalt.

Der Wasserstoffgehalt ist durchgängig niedriger als der des Caseins, ebenso der Stickstoffgehalt, besonders bei der Substanz *b*.

Der Schwefelgehalt der Substanz *a* ist etwas geringer als der des Caseins, dagegen der der Substanz *b* nahezu doppelt so gross.

Der Phosphorgehalt ist bei der Substanz *a* etwas geringer, dagegen in der Substanz *b* nahezu $2\frac{1}{2}$ mal so gross als beim Casein.

Der Sauerstoffgehalt ist bei der Substanz *a* nur wenig niedriger als beim Casein, dagegen bei der Substanz *b* bedeutend grösser.

Die Substanz *a* ist durch ihre chemische Zusammensetzung, saure Reaction, Unlöslichkeit in Wasser und concentrirten Natriumsulfat-, Magnesiumsulfat- und Chlornatriumlösungen, ihre Löslichkeit in sehr wenig Alkali, Soda und Kalkwasser bei neutraler Reaction und dass solche Lösungen in der Siedehitze nicht gerinnen, charakterisirt. Sie ist ein Nucleoalbumin.

Die Substanz *b* ist nach ihrer Zusammensetzung und ihrem Verhalten gegen Wasser, Säuren, Alkalien und Neutralsalze, namentlich weil sie durch 0·8% ige Salzsäure in zwei Theile gespalten wird, von denen der in Lösung gebliebene durch überschüssiges Ammon und durch Alkohol gefällt wird und die Eigenschaften des Histons und der ungelöste die des Nucleins besitzt, ein Nucleohiston und somit zu den Nucleoproteiden zu rechnen.

Um die Substanzen *a* und *b* besser mit einander vergleichen zu können, sind ihre Eigenschaften und Zusammensetzung in nachfolgender Tabelle nebeneinandergestellt worden.

Die Substanz *a* ist, wie wir gesehen haben, ein Nucleoalbumin und die Substanz *b* ein Nucleohiston.

	Substanz <i>a</i>	Substanz <i>b</i>
1. In Wasser	unlöslich	löslich
2. Reaction	sauer	sauer
3. In verdünnten Salzlösungen	löslich	löslich
4. In concentrirten Salzlösungen	unlöslich	löslich
5. In concentrirter Natrium- und Magnesiumsulfatlösung (comb.)	unlöslich	unlöslich
6. In Alkalien, Kalkwasser, So- dalösung und Natriumphos- phatlösung	löslich	löslich
7. In concentrirter Salzsäure ..	löslich	löslich
8. In verd. 0·8 ^o / ₁₀ iger Salzsäure	unlöslich	gespalten in eine lösliche und eine unlösliche Substanz
9. Lösung in Wasser	—	gerinnt beim Kochen nicht
10. Lösung in wenig Alkali bei neutraler Reaction	gerinnt beim Kochen nicht	gerinnt beim Kochen nicht
11. Lösung in Neutralsalzen . . .	gerinnt beim Kochen	gerinnt beim Kochen
12. Neutralreagirende Lösung mit Cl ₂ Ca und Labextract ver- setzt	gerinnt	gerinnt nicht
13. Lösung mit Essigsäure bis zur sauren Reaction versetzt	wird gefällt	wird gefällt
14. Alkalische Lösung	reducirt CuSO ₄ nicht	reducirt CuSO ₄ nicht
15. Neutrale Lösung	durch Alkohol gefällt	durch Alkohol gefällt.

Vergleicht man die elementare Zusammensetzung der Substanzen *a* und *b* mit der des Caseïns (Hammarsten), so ergeben sich folgende Unterschiede:

	Substanz <i>a</i>	Substanz <i>b</i>
C-Gehaltetwas grösser	etwas kleiner
H- »etwas geringer	geringer
N- »etwas geringer	geringer
S- »etwas grösser	fast doppelt so gross
P- »etwas geringer	2 ¹ / ₂ mal so gross
O- »wenig geringer	bedeutend grösser.
