

II.

Beiträge zur Lehre von der Labgerinnung.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

Von Dr. R. Benjamin.

Trotz der vielen Untersuchungen, welche über den Vorgang der Labgerinnung angestellt worden sind, und der Leichtigkeit, mit welcher das Material, Lab, Milch, bezw. Casein, beschafft werden kann, harren einige Punkte immer noch der definitiven Klärung. Ja es fehlt auch nicht an Untersuchungen, die zu Ergebnissen geführt haben, welche in vielen Einzelheiten von den allgemein geltenden Anschauungen abweichen. Zu diesen gehört eine in Rostock (Februar 1894) von Richard Peters verfasste, „Untersuchungen über das Lab und die labähnlichen Fermente“ betitelte Preisschrift, mit deren Nachprüfung mich u. A. mein hochverehrter Lehrer, Herr Prof. E. Salkowski, betraute.

Was zunächst die Anordnung meiner Versuche betrifft, so war dieselbe folgende: Ich benutzte ein 22 cm breites, 17 cm hohes Wasserbad, in welches kleine Kölbchen mit Klammern oder mit Kupferdrähten befestigt, eintauchten. Diese Kölbchen wurden jedesmal mit 20 ccm der zu labenden Flüssigkeit angefüllt, nur in einigen Ausnahmefällen wurden in derselben Weise Reagensgläser benutzt, wenn es sich um ganz geringe Quantitäten handelte. Als Optimum der Temperatur hatte sich eine solche von 40° erwiesen, welche an einem in das Wasserbad hineinreichenden Thermometer jederzeit abgelesen werden konnte. Es wurden im äussersten Falle Temperaturschwankungen von $\frac{1}{2}^{\circ}$ bemerkt, welche für die Gerinnung ohne Belang waren. Wenn die betreffende Flüssigkeit sich einige Zeit im Wasserbade befand, so dass sie die oben erwähnte Temperatur hatte, wurde sie mit Lab versetzt. Und zwar wurde zur Herstellung einer Lablösung ein „Reines Naturlab in Pulverform“ aus der chemischen Fabrik von Dr. Heinrich Byk, vorm. Dr. Moritz Blumenthal benutzt; Anfangs wurde das gewöhnliche käufliche, später ein

stärkeres Präparat benutzt, hiervon eine Lösung von 0,1 : 100,0 (bezw. 50,0) Aqu. dest. hergestellt, und von solchen Lösungen 1, bzw. mehrere ccm mit der Pipette zugesetzt. In Fällen, in denen Gerinnung nicht eingetreten war, wurde, um unter allen Umständen die günstigsten Bedingungen herbeizuführen, 0,1 Labpulver in ganz wenig Wasser gelöst, direct hinzugesetzt.

Nun ist es noch nöthig, kurz der Terminologie Erwähnung zu thun:

Das durch Säurefällung aus der Milch gewonnene Produkt nennt:

Hammarsten, Salkowski u. A.: Casein.

Halliburton, Peters: Caseinogen.

Das durch Labgerinnung aus der Milch gewonnene Produkt nennt:

Hammarsten: Käse, Paracasein.

Peters: Casein.

Von der von fast allen Autoren bestätigten Annahme ausgehend, dass es sich bei den beiden verschiedenen Prozessen nicht um die Gewinnung des nämlichen Körpers, sondern zweier nur einander sehr ähnlichen handelt, wollen wir im Folgenden da, wo es nöthig sein sollte, um Missverständnisse zu vermeiden, die von Salkowski öfters gebrauchten eindeutigen Bezeichnungen „Säurecasein, Labcasein“ festhalten.

Nach diesen zum Verständniss des Folgenden unumgänglich notwendigen, einleitenden Erörterungen wollen wir zu den Versuchen selbst übergehen.

Was zunächst die genuine Kuhmilch betrifft, so zeigte sich, dass dieselbe, wie bekannt, am schnellsten bei saurer, langsamer bei neutraler, am langsamsten bei alkalischer Reaction gerinnt. Die Fermentmenge und die Gerinnungsdauer verhalten sich umgekehrt proportional; wird das Lab über eine gewisse Menge hinaus der Milch zugesetzt, so wird die Gerinnung nicht mehr beschleunigt, allerdings auch nicht verlangsamt, was zu beachten ist.

Zum Vergleich ungekochter und gekochter Milch wurde das stärkere (st.) Lab, in einer Lösung von 0,1 : 100 benutzt, 1 ccm Lablösung zu 20 ccm Milch hinzugesetzt. Die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung betrug in Minuten:

Versuch I.

	a	b
Ungekochte Milch	4	4
Gekochte Milch ¹⁾	10	12.

Versuch II.

	a	b
Ungekochte Milch; 0,1 ccm Lab (st.) direct hineingeworfen	$\frac{1}{2}$ Min.	$\frac{1}{3}$ Min.
Gekochte - 0,1 - - - - -	2	3 -

Versuch III²⁾.

	Gerinnungszeit
Gekochte Milch	14 Minuten
Selbststerilisirte ³⁾ Milch	gerann nicht.

Versuch IV.

Milch	Gerinnungszeit
genuin	3 Minuten
gekocht	8 -
Mischung: 1:1 Wasser nach $\frac{3}{4}$ Stdn. nicht geronnen.	

Versuch V.

Mischung: 1 Vol Milch, 1 Vol. Wasser	
Mischung: 1 - - 1 - Chloroformwasser.	
Beide Proben waren nach 45 Minuten nicht geronnen.	

Versuch VI.

Milch	Gerinnungszeit
genuin	10 Minuten
Mischung: 1:1 Wasser	nicht geronnen
Mischung: 1:1 Chloroformwasser	nicht geronnen.

Versuch VII.

Genuine Milch	Gerinnung in 9 Min.
1 Vol. Milch, 1 Vol. Wasser	nicht geronnen
1 - - 1 - Chloroformwasser	nicht geronnen
Sterilisirte Milch	nicht geronnen.

Versuch VIII.

Milch	Gerinnungszeit
genuin	11 Minuten
1 Vol. Wasser	
1 - Chloroformwasser	nach 60 Minuten
sterilisiert	nicht geronnen.

¹⁾ Zum Sieden erhitzt, 30 Minuten im Sieden erhalten, schnell abgekühlt.

²⁾ Zu diesem und den folgenden Versuchen bis No. X incl. wurde die Lösung aus dem stärkeren Labpräparat verwendet.

³⁾ $\frac{3}{4}$ Stunden in strömendem Dampf erhitzt.

Dieselben Versuche wurden fortgesetzt, nur wurde jetzt die Labmenge gesteigert.

Versuch IX.

	Labmenge	Gerinnungszeit
Genuine Milch, unverdünnt	1 ccm	6 Minuten
1 Vol. genuine Milch, 1 Vol. Wasser	2 -	12 -
1 - - - 1 - Chloroformwasser	3 -	25 -

Versuch X.

	Labmenge	Gerinnungszeit
Genuine Milch	ohne Lab	unverändert
- - -	2 ccm	6 Minuten
Chloroformmilch ¹⁾	2 -	11 -

Aehnliche Resultate ergaben die Versuche, bei denen schwächere Lablösung angewandt wurde.

Versuch XI.

	Labmenge	Gerinnungszeit
Genuine Milch	3 ccm	4 Minuten
Gekochte Milch	3 -	nach 30 - nicht
Chloroformmilch	3 -	20 -
Sterilisierte Milch	3 -	nach 30 - nicht.

Versuch XII.

	Labmenge	Gerinnungszeit
Genuine Milch	3 ccm	5 Minuten
Gekochte Milch	3 -	nach 1 Stunde nicht
Chloroformmilch	3 -	8 Minuten
Sterilisierte Milch	3 -	nach 1 Stunde nicht.

Versuch XIII.

	Labmenge	Gerinnungszeit
Genuine Milch	3 ccm	8 Minuten
Käufliche sterilisierte Milch	3 -	nach 1 Stunde nicht
Selbststerilisierte Milch	3 -	- 1 -

Chloroformmilch 3 - 20 Minuten.

Zu den nächsten Versuchen verwandte ich wieder das stärkere (st.) Lab.

¹⁾ Die Chloroformmilch war dadurch hergestellt worden, dass Milch mit Chloroform geschüttelt war.

Versuch XIV.

	Labmenge	Gerinnungszeit
Gekochte Milch	4 ccm	nicht geronnen
Chloroformmilch	4 -	8 Minuten
Gekochte Milch	8 -	nicht geronnen
Selbststerilisirte Milch	8 -	- -
Käufliche sterilisirte Milch	8 -	- -

Versuch XV.

	Labmenge	Gerinnungszeit
Genuine Milch	4 ccm	7 Minuten
Chloroformmilch	4 -	9 -

Nun wurde 0,1 Labpulver (stärkeres Präparat), in wenig Wasser gelöst, direct hineingeworfen.

Versuch XVI.

Gekochte Milch	Gerinnung nach 5 Minuten
Selbststerilisirte Milch	nach 1 Stunde keine Gerinnung
Käufliche sterilisirte Milch	- 1 - -

Aus den bis jetzt angeführten Versuchen folgt also:

Am schnellsten gerinnt die Milch, wie bekannt, bei saurer Reaction, langsamer bei neutraler; allzu alkalische Beschaffenheit der Milch hebt die Gerinnung ganz auf.

Etwas langsamer, allerdings nicht viel, gerinnt die Chloroformmilch.

Wieder langsamer als diese gerinnt die mit Wasser verdünnte. Das Wasser verzögert die Gerinnung mit Zunahme der Verdünnung, bei einer starken tritt Coagulation nicht mehr ein.

Langsamer wiederum als die mit Wasser verdünnte, lässt die mit Chloroformwasser verdünnte Milch Coagulation eintreten.

Was die gekochte Milch anbetrifft, so ist die Angabe von Eugling¹⁾), gekochte Milch könne durch Lab überhaupt nicht coagulirt werden, und die von Schaffer²⁾, die gekochte Milch könne nur in Gegenwart von Säuren, mindestens Kohlensäure, zur Gerinnung gebracht werden, unrichtig. Sie gerinnt, wie oben gezeigt, bei Zusatz von 0,1 Labpulver direct, in 5 Minuten.

¹⁾ Eugling, Studien über das Casein in der Kuhmilch und die Lab-fermentwirkung, Landwirthschaftliche Versuchsstation. 31. S. 391—405. Cit. nach Maly's Jahresber. XV. S. 181.

²⁾ Schaffer, Ueber das Casein und die Wirkung des Labferments in der Kuhmilch. Maly's Jahresber. 1887. XVII. S. 158.

Was schliesslich die sterilisierte Milch betrifft, so war weder die von uns selbst sterilisierte, noch die im Handel befindliche auf irgend eine Weise zur Coagulation zu bringen.

Da sich verschiedentlich in der Literatur Angaben finden, dass die Labwirkung durch die Anwesenheit fremder Substanzen gehindert wird, eben solche Angaben in der öfter schon erwähnten Preisschrift vorhanden sind, so prüfte ich auch diese Versuche nach und konnte sie bestätigen. Dazu benutzte ich, um die Versuche nicht zu sehr in die Länge zu ziehen, eine sehr starke Lablösung 0,1 (des stärkeren Präparats:) 50,0 Aqu. dest. Es handelte sich dabei um Milch, welcher 4 pCt. der fremden Substanzen hinzugefügt wurde. Um sicher zu sein, dass nicht etwa einmal die Hitze oder sonstige Umstände eine Gerinnung bewirken können, um also diesen Versuchsfehler auszuschalten, machte ich auch bei diesen Versuchen ebenso, wie bei allen früheren, stets einen Controlversuch mit unveränderter Milch.

Versuch XVII.

Bei Zusatz von 2 ccm Lablösung zeigte:

	Gerinnungszeit	
Genuine Milch	4	Minuten
Milch mit KNO_3	18	-
- - NH_4Cl	24	-
- - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	nicht geronnen	
Gekochte Milch	-	-

Versuch XVIII.

Bei Zusatz von ebenfalls 2 ccm Lablösung zeigte:

	Gerinnungszeit	
Genuine Milch	4	Minuten
Milch mit KNO_3	20	- (flockige Gerinnung)
- - NH_4Cl	27	-
- - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	nach 1 Stde.	nicht geronnen.

Es bestätigt sich also, dass die erwähnten Salze hemmend auf die Labgerinnung einwirken.

Schliesslich wurde untersucht, wie sich die Gerinnung bei der Anwesenheit von Kalkwasser verhält.

Versuch XIX.

	Lablösungen	Gerinnungszeit
Genuine Milch	1 ccm	4 Minuten
20 ccm Milch, 1 ccm Kalkwasser	1 -	5 -
20 - - 2 - -	1 -	5 -
20 - - 3 - -	1 -	6 -

Versuch XX.

	Lablösungen	Gerinnungszeit
20 ccm genuine Milch	2 ccm	2 Minuten
1 Vol. Milch, 1 Vol. H ₂ O	2 -	3 -
1 - - 1 - Kalkwasser	2 -	nach 1 Stde. nicht geronnen.

Dieser Versuch sollte dazu dienen, um dem Einwande zu begegnen, dass nur die Verdünnung als hinderndes Moment bei der Gerinnung bestände.

Versuch XXI.

	Lablösungen	Gerinnungszeit
20 ccm Milch, unverändert	1 ccm	5 Minuten
20 - - 1 ccm Kalkwasser	1 -	6 -
20 - - 2 - -	1 -	15 -
20 - - 3 - -	1 -	18 -

Versuch XXII.

	Lablösungen	Gerinnungszeit
Genuine Milch	2 ccm	3 Minuten
1 Vol. Milch, 1 Vol. H ₂ O	2 -	8 -
1 - - 1 - Kalkwasser	2 -	nach $\frac{3}{4}$ Stdn. nicht geronnen.

Die folgenden Versuche dienten dazu, zu untersuchen, wie sich die verschiedenen Labpräparate zu einander verhalten, mit welchen gearbeitet wurde, ausserdem, wie sich die Lablösungen an den verschiedenen Tagen verhalten.

st. = stärkeres Präparat,

schw. = schwächeres Präparat.

Versuch XXIII.

		Gerinnungszeit in Minuten		
		a	b	c
Genuine Milch, 1 ccm Lablösung, 3 Tage alt, schw.	12	9	8	
- - 1 - -	1 Tag	st.	5	4
- - 1 - -	frisch bereitet, schw.	14	11	12.

Versuch XXIV.

	Gerinnungszeit in Minuten	
	a	b
Genuine Milch, 1 ccm Lablösung, 2 Tage alt, st.	3	3
- - 1 - - 1 Tag - schw.	10	10.

Versuch XXV.

	Gerinnungszeit in Minuten	
	a	b
Genuine Milch, 1 ccm Lablösung, 3 Tage alt, st.	4	4½
- - 1 - - 2 - - schw.	14	13.

Ordnet man die Ergebnisse dieser Versuche in anderer Weise, indem die schwächeren Lösungen an den einzelnen Tagen einander gegenübergestellt werden, ebenso analog die stärkeren, so ergibt sich:

Schwächere Lösung	Gerinnungszeit in Minuten		
Frisch bereitet	14	11	12
1 Tag alt	10	10	
2 Tage alt	14	13	
3 - -	12	9	8.

Stärkere Lösung	Gerinnungszeit in Minuten		
1 Tag alt	5	4	4
2 Tage alt	3	3	
3 - -	4	4½	

Schon diese Versuche zeigen deutlich — es liessen sich die Resultate von Versuchen, welche bei anderer Gelegenheit gemacht wurden, leicht noch häufen — dass die frisch bereiteten Lablösungen nicht so wirksam sind, als diejenigen, welche 1 Tag alt sind, wie E. Salkowski in seinem Practicum der physiologischen Chem., S. 104, schon angiebt. Diese haben dann gewöhnlich die grösste Wirksamkeit, dieselbe nimmt dann wieder ab, bleibt aber erhalten bis zum 13. Tage, wenngleich sich gewöhnlich am 5. Tage ein übler Geruch einstellt.

Es gelang uns nun, eine Beschleunigung der Labgerinnung herbeizuführen dadurch, dass man die Lablösung mit Chloroformwasser herstellt und auf diesem Wege in die Mischung kleine Mengen von Chloroform hineinbringt. Zu diesem Zwecke wurden die Lablösungen anstatt mit Wasser mit Chloroformwasser bereitet, davon je 1 ccm der Milch zugesetzt, und dann diese mit der durch Wasser hergestellten verglichen.

Versuch XXVI.

1. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab	4	3	3	2½	2½
20	- - 1 - Chloroform-Lab	3	2	2	1½	1½

2. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab	2½	2½	2½		
20	- - 1 - Chloroform-Lab	1½	1½	1½		

3. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab	2½		3		
20	- - 1 - Chloroform-Lab	1½		1		

4. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab	1½	1½	1½		
20	- - 1 - Chloroform-Lab	5½	6	5½		

5. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab	2½	2½	2½		
20	- - 1 - Chloroform-Lab	7	7	8		

6. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab		3			
20	- - 1 - Chloroform-Lab		8			

7. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab		4			
20	- - 1 - Chloroform-Lab		nicht geronnen.			

8. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab		6			
20	- - 1 - Chloroform-Lab		nicht geronnen.			

13. Tag.

		Gerinnungszeit in Minuten				
20 ccm	Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab	13	12	12½		
20	- - 1 - Chloroform-Lab		nicht geronnen.			

14. Tag.

20 ccm Milch, 1 ccm H ₂ O-Lab	} nicht geronnen.
20 - - 1 - Chloroform-Lab	

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die Gegenwart kleiner Quantitäten Chloroform in der Mischung die Gerinnung befördert, die mit Chloroformwasser hergestellten Lablösungen sich am 1.—3. Tage deutlich wirksamer erweisen, als die mit Wasser hergestellten. Vom 4. Tage an kehrt sich das Verhältniss um. Die mit Wasser hergestellte Lablösung bleibt bis zum 13. Tage wirksam, die mit Chloroformwasser hergestellten nur bis zum 6. Tage. Beide Lösungen sind vom 14. Tage an unwirksam.

Diese Erscheinung der Beförderung der Fermentation durch Antiseptica, spec. durch Chloroform, steht nicht allein da.

In einer von Dubs¹⁾ verfassten Arbeit heisst es: „1) Die künstliche Verdauung wird befördert durch die Anwesenheit von 0,23 pCt. und 0,36 pCt. Chloroform in der Verdauungsflüssigkeit. 2) Die künstliche Verdauung wird gehemmt, wenn die Verdauungsflüssigkeit mit Chloroform gesättigt ist.“

Es wird in derselben Arbeit darauf aufmerksam gemacht, dass durch verschiedene Substanzen die Thätigkeit der Fermente unter Umständen befördert oder gehindert werden könne. Für das organisierte Ferment der alkoholischen Gährung hatte, wie wir derselben Arbeit entnehmen, namentlich E. Biernacki²⁾ für eine Reihe von Körpern bewiesen, z. B. Sublimat, Jod, Brom, Arsenigsäure, Chromsäure, Salicylsäure, dass sie in gewissen Dosen die alkoholische Gährung befördern, in grösseren Dosen hemmen oder gar die Gährung aufheben.

Für die Enzyme wurde von Chittenden³⁾ nachgewiesen, dass gewisse Substanzen im Stande sind, je nach der zugesetzten Quantität die Wirkung zu erhöhen oder zu vermindern. So fand er namentlich, dass die Arsensäure und Arsenigsäure in kleinen Mengen in der Pepsinsalzsäure (Verdauungsflüssigkeit) die Verdauung befördern, in grösseren Gaben dieselbe hemmen, dass

¹⁾ Dubs, Der Einfluss des Chloroforms auf die künstliche Pepsinverdauung. Dieses Archiv. Bd. 134. 1893. S. 519.

²⁾ Maly, Jahresbericht über Thierchemie. 1887. S. 477 ff.

³⁾ Chittenden and S. E. Allen, Influence of various inorganic and alkaloid salts on the proteolytic action of Pepsin-Hydrochloric acid. Transactions Connecticut Academy. 7. Bericht in Maly, Jahresber. Bd. 15. S. 277.

sich ebenso die Chloride und das Kaliumbromid verhalten. In einer späteren Arbeit¹⁾) berichtet Chittenden, dass Paraldehyd und Thallinsulphat in grosser Verdünnung die eiweisslösende Kraft des Pepsins erhöhen, in grösseren Dosen aber hemmen.

Es wird späterer Beobachtungen bedürfen, um zu untersuchen, ob sich die erwähnten Substanzen der Labgerinnung gegenüber analog verhalten. Für das Chloroform scheint es uns nach unseren Versuchen erwiesen, dass es, in ganz kleinen Quantitäten zugesetzt, die Gerinnung befördert, in grösseren hemmt.

Ich komme nun zu dem zweiten Theil meiner Arbeit, welcher sich mit der Frage beschäftigt, unter welchen Bedingungen eine Lösung von Säurecasein zur Gerinnung gebracht werden kann. Peters hat hierüber sehr auffällige Angaben gemacht, um deren Prüfung es sich in erster Linie handelte.

Hammarsten²⁾ sagt darüber: „Schlägt man aus der Milch oder aus einer Caseinlösung das Casein mit einer Säure nieder, wäscht den Niederschlag mit Wasser und löst ihn in einer möglichst geringen Menge Alkalis, so hat das Casein, selbst wenn man mit Phosphorsäure neutralisiert, die Eigenschaft, mit Lab zu gerinnen, verloren. In seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie giebt Hammarsten an, dass das Casein der Labwirkung wieder zugänglich gemacht werden kann durch Lösen in Kalkwasser und Neutralisiren der Lösung mit stark verdünnter Phosphorsäure. Hierdurch kann nach seiner Ansicht das Casein anscheinend in Lösung bleiben, ist jedoch wahrscheinlich wohl nur stark gequollen, wie in der Milch, und gleichzeitig enthält die Flüssigkeit reichliche Mengen Calciumphosphat, ohne dass irgend eine Fällung oder irgend welche suspendirte Partikelchen in ihr zu sehen sind. Eine Labgerinnung kann also nach Hammarsten nur bei Abwesenheit einer hinreichenden Menge

¹⁾ Chittenden, Influence of several new therapeutic agents on amylolytic and proteolytic action. Studies from the laboratory of physiological Chemistry of Yale University. 3. p. 60. Bericht in Maly, Jahresber. Bd. 20. S. 249 ff.

²⁾ Hammarsten, Ueber den chemischen Verlauf bei der Gerinnung des Caseins mit Lab. Maly's Jahresber. IV. S. 135.

von Kalksalzen eintreten. Noch eine andere Methode giebt Hammarsten an: Man kann Casein in Dinatriumphosphat lösen und zu dieser Lösung eine gewisse Menge Chlorcalcium hinzufügen.

Peters behauptet in seiner Arbeit, man bedürfe der Neutralisation mit Phosphorsäure, wodurch Hammarsten die Lösungen der Milch möglichst ähnlich habe machen wollen, nicht, sondern es genüge, das durch Säure gefällte Casein in Kalkwasser zu lösen, um eine für Lab gerinnbare Lösung zu erhalten.

Gleich im Beginn der Nachprüfung stiessen wir auf eine sehr wesentliche Differenz. Peters giebt an, dass es nicht gelinge, das Casein durch eine einmalige Ansäuerung der Milch vollständig auszufüllen. Macht man das Filtrat von dem Casein-niederschlag alkalisch und setzt wiederum Essigsäure hinzu, so fällt nach ihm wieder Casein aus u. s. w. Peters konnte dieses abwechselnde Alkalisiren und Ansäuern 4—5 mal und noch öfters wiederholen und erhielt immer noch einen Niederschlag. Den dann etwa noch in der Milchsäure bleibenden Rest von Eiweisskörpern betrachtet er gleichfalls als Casein, er leugnet somit die Gegenwart eines nicht durch Säure fällbaren Eiweisskörpers, des Lactalbumins in der Milch. Unsere Versuche lieferten durchaus entgegengesetzte Resultate. Verfährt man beim Zusatz von Essigsäure zu der verdünnten Milch vorsichtig, unter sorgfältiger Vermeidung eines jeden Ueberschusses, so erhält man aus dem alkalisierten Filtrat von Casein durch Essigsäurezusatz keine Spur von Fällung mehr, wohl aber durch Kochen. Wir müssen daher im stricten Gegensatz zu Peters behaupten, dass die bisherige Anschauung von der Gegenwart des durch Essigsäure fällbaren Caseins und eines nicht dadurch fällbaren Lactalbumins vollkommen richtig ist.

Versuch XXVII.

Es wurde aus einem, mit 2 Liter Wasser verdünnten Liter Milch das Casein durch Essigsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, das Filtrat durch sehr verdünnte Natronlauge wieder alkalisch gemacht; dann wieder mit verdünnter Essigsäure versetzt, es war aber absolut kein Niederschlag zu erzielen. Der Niederschlag wurde erst auf dem Filter, dann in der Reibschale gewaschen, darauf in einer schwachen Sodalösung aufgelöst,

abfiltrirt und das schwach opalisirende Filtrat wiederum mit Essigsäure versetzt. Dies wurde 3 mal gemacht. Alsdann hatte man eine von Fett und Milchzucker freie Substanz. Von dieser noch ganz feuchten Substanz wurden 16 g abgewogen, diese mit 100 ccm Wasser in der Reibschale verrieben, und mit Kalkwasser (10 ccm) gelöst. So erhielt man eine milchige Flüssigkeit. Mit dieser wurden verschiedene Versuche gemacht. Es wurden a) 20 ccm davon mit 2 ccm einer Lablösung (das stärkere Präparat 0,1 : 50,0) versetzt. b) in 20 ccm wurde 0,1 Lab. (in ganz wenig Wasser gelöst) direct hineingeworfen. c) ein Controlgläschchen ohne Lab beobachtet. Diese Proben wurden eine Stunde lang im Wasserbad bei 40° gelassen. Eine typische Gerinnung trat nicht ein. Dagegen zeigte sich in dem Glase a) eine leichte Aufhellung; in dem Glase b) eine starke Aufhellung; in beiden Gläschchen zeigte sich ein schwacher Bodensatz. Glas c) unverändert.

Bei einem zweiten Versuch derselben Art wurde beobachtet in:

Glas a) leichte Aufhellung, schwacher Bodensatz.

Glas b) starke Aufhellung, starker Bodensatz.

Glas c) unverändert.

Bei beiden Versuchen war das Resultat fast übereinstimmend, und es trat jedenfalls keine typische Gerinnung ein. An dieser Stelle mag überhaupt betont werden, dass als unbedingtes Postulat stets ein Controlversuch mit der zu labenden Flüssigkeit ohne Lab zu fordern ist, da man sonst nie beurtheilen kann, inwieweit etwa die Wärme verändernd wirkt. Solche Controlversuche sind aber nur an wenigen Stellen in der oben erwähnten Preisschrift angestellt worden. Ferner ist der Begriff der Gerinnung überhaupt ein weitgehender; unserer Meinung nach kann man von Gerinnung überhaupt nur sprechen, wenn entweder eine vollständige Coagulation eintritt oder wenigstens ein flockiger Niederschlag sichtbar ist. Wir konnten uns also bei dem vorhin besprochenen Versuch nur davon überzeugen, dass eine Aufhellung der Flüssigkeit durch das Lab eintrat, außerdem ein geringer, bzw. stärkerer Bodensatz. Letzterer wurde, nachdem die klare Flüssigkeit abgegossen war, vorsichtig mit Aqu. destill. gewaschen, sodann in wenig verdünnter Essigsäure gelöst und Reactionen damit angestellt; bei 3 gleichartigen Versuchen ergaben sich folgende Reactionen:

NaCl + Essigsäure	Trübung	Trübung	Trübung
Essigsäure + Ferrocyanalkalium	kein Niederschlag	kein Niederschlag	kein Niederschlag
Salzsäure + Phosphorwolframsäure	flockiger Niederschlag	flockiger Niederschlag	flockiger Niederschlag
Salpetersäure	Gelbfärbung	Gelbfärbung mit NaOH orange	Gelbfärbung mit NaOH orange
Biuretprobe	deutlich	deutlich	deutlich
Quecksilberchlorid	Niederschlag	Niederschlag	Niederschlag.

Zum Vergleiche stellte ich dieselben Reactionen mit einer Lablösung (0,1 : 50,0) an.

NaCl + Essigsäure	ganz schwache Trübung
Essigsäure + Ferrocyanikalium	starker Niederschlag
Salzsäure + Phosphorwolframsäure	geringer Niederschlag
Salpetersäure	negativ
Biuretprobe	negativ
Quecksilberchlorid	geringer Niederschlag.

Versuch XXVIII.

Es wurde aus einem Liter Milch, welche mit einem halben Liter Wasser verdünnt war, das Casein ausgefällt, abfiltrirt. Das Casein wurde alsdann mehrmals gewaschen, wie früher gereinigt und alsdann eine 4 prozentige Lösung hergestellt, indem 12 g Casein in 300 ccm Kalkwasser gelöst wurden. Es gelang nun bei zahlreichen Versuchen, trotz vorsichtigsten Arbeitens, nie, durch Lab, welches in Controlversuchen Milch in wenigen Minuten zum Gerinnen brachte, eine Coagulation zu erhalten.

Wir versuchten nun ganz vorsichtig, die Lösungen durch ganz verdünnte Phosphorsäure zu neutralisiren; aber auch so gelang die Gerinnung nicht. Dies ist überhaupt nicht möglich, wie Courant¹⁾ in einer im Laboratorium von Roehmann verfassten Arbeit, welche von Peters überhaupt nicht berücksichtigt worden ist, ausführlich nachgewiesen hat. Die Calciumcaseinverbindungen sind nach ihm bei Abwesenheit von Kalksalzen für Lab ungerinnbar. Diesen Satz können wir durchaus bestätigen.

Um ein Kalkwasser mit möglichst constantem Kalkgehalt zu erhalten, wählten wir das dort angegebene Verfahren. Es wurde reiner gebrannter Kalk in destillirtem Wasser verrieben und die Kalkmilch 24 Stunden stehen gelassen. Darauf filtrirte ich nach öfterem Umschütteln die Kalkmilch durch ein Faltenfilter und benutzte das Filtrat in der von Courant angegebenen Weise zur Lösung des Caseins. Dieses löst sich langsam, aber vollständig in Kalkwasser, am besten so, dass zu der genau abgewogenen Caseinmenge zuerst wenig Kalkwasser gesetzt wird, dann unter beständigem Verreiben in der Reibschale allmählich der Rest. So hat sich nach 1 Stunde das Ganze gelöst.

Wir prüften nun die dort gemachten Versuche nach, nur mit der un wesentlichen Aenderung, dass wir die doppelten Quantitäten nahmen. Die allzu kleinen Mengen erschweren das Ar-

¹⁾ Georg Courant, Ueber die Reaction der Kuh- und Frauenmilch. Inaug.-Diss. Breslau 1887.

beiten unnütz und liessen die Resultate weit weniger deutlich hervortreten.

Versuch XXIX.

0,6 g Casein, mit 4 ccm Kalkwasser verrieben, bildet einen gallertigen Brei, welcher mit Lab nicht gerinnt.

Versuch XXX.

Verreibt man 0,6 g Casein mit 8 ccm Kalkwasser, so bildet sich im Verlauf von mehreren Stunden eine undurchsichtige, milchweisse, vollständige Lösung von Dicalciumcasein, welche mit Lab ebenfalls nicht gerinnt.

Hieraus geht also der oben erwähnte, schon von Hammarsten in ähnlicher Form ausgesprochene Satz hervor: „Die Calciumcaseinverbindungen sind bei Abwesenheit von Kalksalzen für Lab ungerinnbar“.

Versuch XXXI.

Man erhält aber sofort eine vollkommene Gerinnung, wenn man 0,6 g Casein mit 8 ccm Kalkwasser verreibt und zu der Lösung 10 Tropfen einer 1 prozentigen Chlorcalciumlösung setzt. Diese Lösung ist für Phenolphthalein sauer.

Wir können nun mit Courant also schliessen, dass nur das für Phenolphthalein saure Dicalciumcasein für Lab gerinnbar ist, wenn neben demselben ein lösliches Kalksalz (z. B. Calciumchlorid, Calciumsulfat) vorhanden ist. Genau so, wie Courant angegeben hat, erhält man auch eine gerinnbare Lösung, wenn man zu der Lösung von Casein und Kalkwasser Normalschwefelsäure setzt.

Versuch XXXII.

Es wurden 0,6 g Casein mit 10 ccm Kalkwasser verrieben, alsdann 2,9 ccm $\frac{1}{10}$ Normalschwefelsäure hinzugefügt. Nach wenigen Minuten trat eine fast vollständige Gerinnung durch Lab ein.

Courant verweist dann weiterhin auf die analogen Verbindungen des Caseins mit Natrium, wie mit Calcium und giebt an, für Lab gerinnungsfähige Lösungen dadurch herzustellen, dass man Lösungen von Dinatriumcasein lösliche Kalksalze hinzufügt. — Dinatriumcasein verhält sich also analog wie Dicalciumcasein.

Ebenso wurde auch in den beiden ausserdem von Courant gewählten Versuchsanordnungen typische Gerinnung erhalten.

Versuch XXXIII.

0,6 g Casein werden in 3,0 ccm $\frac{1}{10}$ Normalnatriolaune und 7,0 Wasser gelöst und nach erfolgter Lösung 10 ccm 0,4 prozentiger Chlorcalciumlösung hinzugesetzt. Diese ist in derselben Weise gerinnungsfähig, wie die Lösung des folgenden Versuches.

Versuch XXXIV.

0,6 g Casein in 10 ccm 1,25 prozentigem Dinatriumphosphat gelöst und die Lösung mit 10 ccm 0,4 prozentiger Chlорcalciumlösung versetzt, giebt typische Gerinnung.

Schliesslich kommt Courant zu dem Schluss, den auch wir bestätigen müssen:

„Alle mit Lab gerinnenden Caseinlösungen reagiren ebenso wie die Milch für Lakmoid alkalisch, für Phenolphthalein sauer.“

Wir wollen hier nur die Frage streifen, ob es möglich ist, den Käse wiederum der Labgerinnung zugänglich zu machen. Diese Frage, über welche wir eigene Versuche nicht angestellt haben, wird, so viel wir wissen, von allen Autoren verneint. Besonders Hammarsten vertritt den Standpunkt, dass das Paracasein unter keinen Umständen der Labgerinnung wieder zugänglich zu machen ist. — Hammarsten¹⁾ sagt: ohne die Anwesenheit von Kalk kann eine Käsebildung mit Lab nicht zu Stande kommen, ferner: ohne Anwesenheit einer genügenden Menge von Kalk und Phosphorsäure ist kein normaler Käse zu erhalten. Schliesslich ist seiner Meinung nach der chemische Verlauf bei der Caseingerinnung derart, dass das Casein in eine Modification übergeführt wird, ausgezeichnet durch geringeres Lösungsvermögen für das Calciumphosphat und vor Allem durch die Eigenschaft, mit Lab nicht mehr gerinnen zu können.

Auch Ad. Meyer²⁾, welcher ebenfalls die Wiedergerinnbarmachung des Käses leugnet, ist der Meinung, dass das Unwirksamwerden des Labfermentes nach der stattgefundenen Ausfällung des Käses weniger daraus zu erklären ist, dass seine Thätigkeit als solche eine Schwächung erleidet, als dadurch, dass es zugleich mit dem Käsegerinnsel niedergerissen wird. — Schliesslich betont auch Roehmann³⁾, dass eine Käselösung, die durch Lab gerönne, nicht hergestellt werden kann.

¹⁾ Hammarsten, Ueber den chemischen Verlauf bei der Gerinnung des Caseins mit Lab.

²⁾ Meyer, Neue Beiträge zur Kenntniss der Wirkung des Labfermentes. Landwirthschaftl. Versuchsstat. 29. 247.

³⁾ Roehmann, Anleit. zum chem. Arbeit. f. Mediciner.

Nach Peters gelingt es dagegen, in Kalkwasser gelöstes Labcasein durch Lab auf's Neue zur Gerinnung zu bringen.

Weitere höchst auffällige Angaben macht Peters über die Fähigkeit des Labs, auch andere Eiweisskörper ausser dem Casein zur Gerinnung zu bringen. Peters suchte zunächst auf das Molkeneiweiss einzuwirken; seinen Versuch stellten wir ebenfalls an.

Versuch XXXV.

Es wurde $\frac{1}{2}$ Liter Milch durch Lab zur Gerinnung gebracht, der Niederschlag abfiltrirt und das Filtrat unter Zusatz von Essigsäure gekocht. Der zuletzt ausgeschiedene Eiweisskörper, das Laktalbumin, wurde nach dem Erkalten abfiltrirt, ausgewaschen, in verdünnter Sodalösung mehrfach gelöst, wiederum durch Säure ausgefällt und schliesslich in Kalkwasser gelöst.

Nach Zusatz von reichlichsten Labmengen entstand selbst unter günstigsten Bedingungen keine Eiweissfällung, wie sie Peters beobachtet haben will. Es trat nur gegenüber einer Controlprobe ohne Lab eine geringe Aufhellung ein. Auch sorgfältigste Neutralisation mit Phosphorsäure führte zu keinem Resultate, da stets schon vor vollständiger Neutralisation ein Niederschlag eintrat. Auf diesen Umstand macht schon Hammarsten aufmerksam.

Auch an dieser Stelle ist es nöthig, zu betonen, dass wir dauernde Controlversuche ohne Lab für unbedingtes Erforderniss halten.

Es war uns also nicht gelungen, das zuerst vom Lab nicht coagulirte Molkeneiweiss der Labgerinnung zugänglich zu machen. Das negative Resultat dieses Versuches war für uns weit weniger ermutigend, es auch mit Gerinnbarmachung anderer Stoffe thierischen und pflanzlichen Ursprungs zu versuchen, als für Peters das positive in dieser Hinsicht. Trotzdem machten wir uns daran; frühere Forscher vor Peters hatten bekanntlich die Einwirkung des Labs auf andere Eiweisskörper, als auf das Casein der Milch geleugnet. Diesem Zwecke waren die beiden nächsten Versuche gewidmet, welche genau nach der von Peters angegebenen Methode ausgeführt wurden.

Versuch XXXVI.

Das Weisse von 10 Hühnereiern wurde in einem Glase mit einer Scheere sorgfältig zerschnitten, colirt und durch langsamem Zusatz von Natronlauge zur Gallerie gebracht. Diese wird in bohnengrosse Stücke geschnitten und in 5 Liter Wasser bis zum nächsten Tage ausgewaschen, indem das Wasser

von Zeit zu Zeit umgerührt und öfter gewechselt wurde. Nachdem das Alkali möglichst entfernt war, wurden die Stückchen herausgenommen und in kochendes Wasser geschüttet, in welchem sie sich nach $\frac{3}{4}$ Stunden auflösten. Nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit filtrirt und das Eiweiss mit verdünnter Essigsäure ausgefällt; dieser Niederschlag wurde filtrirt und sorgfältig in einer Reibschale mit Kalkwasser verrieben. Die erhaltene Lösung wurde in vier Theile getheilt und in's Wasserbad gesetzt.

	Beschaffenheit des Lab	Gerinnung
1.	ohne Lab	keine Gerinnung
2.	neutrales Lab	keine Gerinnung
3.	gekochtes Lab	keine Gerinnung
4.	schwach saures Lab ¹⁾	deutlich flockige Fällung.

Das Ergebniss unter 4. kann aber nicht als beweisend angesehen werden, denn man erhielt dieselbe Fällung, wenn man dieselbe Tropfenanzahl einer Lösung mit demselben Säuregehalt ohne Lab zusetzte.

Um die Wirkung des Lab auch auf pflanzliche Eiweissstoffe zu prüfen, wurde der nächste Versuch angestellt.

Versuch XXXVII.

$\frac{1}{2}$ kg feinsten Weizenmehls wurde mit 4 Litern Wasser, die 1 pro mille Natronlauge enthalten, in Reibschalen vertheilt, verrieben und dann in 3 grosse Cylinder gegossen. Am nächsten Tage wurde die obere, aus einer hellgelben Flüssigkeit bestehende Schicht davon abgegossen filtrirt und mit verdünnter Essigsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde in Kalkwasser gelöst; darauf wurde die Lösung in 4 Theile getheilt und in ein Wasserbad von 40° gebracht.

	Lösung	Beschaffenheit des Lab	Fällung
1.	neutralisiert	ohne Lab	keine Fällung
2.	neutralisiert	gekochtes Lab	keine Fällung
3.	neutralisiert	ungekochtes Lab	deutliche Aufhellung
4.	alkalisch gelassen	ungekochtes Lab	keine Fällung.

Nun will ich nur noch kurz einige Versuche anführen, welche ich analog den mit Lab angestellten mit Papayotin (E. Merck in Darmstadt) ausführte. Ich stellte zu diesem Zwecke eine etwas concentrirtere Lösung des käuflichen Papayotins als die analoge Lablösung dar, da sich eine solche als nicht wirksam erwiesen hatte, von 0,2 : 40,0. Es wurden wieder jedesmal 20 ccm genuiner Milch benutzt. Das zusammenfassende Resultat der Versuche war folgendes.

¹⁾ 6 Tropfen Essigsäure auf 10 ccm Lablösung.

Versuch XXXVIII.

	papayotinlos	Gerinnungsdauer
20 ecm Milch	1 ecm	keine Gerinnung
20 - -	2 -	keine Gerinnung
20 - -	4 -	nach $\frac{1}{2}$ Stunde
20 - -	0,05 direct hineingeworfen	nach 2 Minuten.

Fassen wir die Ergebnisse des zweiten Theiles unserer Arbeit zusammen, so ergibt sich Folgendes:

1. Das Lab wirkt nur auf das Casein der Milch, sonst auf keine Eiweisskörper thierischen oder pflanzlichen Ursprungs.
2. Alle mit Lab gerinnenden Caseinlösungen reagiren ebenso wie die Milch für Lakmoid alkalisch, für Phenolphthalein sauer.
3. Eine Caseinlösung ist nur bei Anwesenheit von löslichen Kalksalzen (z. B. Calciumchlorid, Calciumsulfat) gerinnbar.

Bevor ich die Arbeit schliesse, erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Prof. Salkowski für die freundliche Unterstützung bei der Bearbeitung des von ihm gestellten Themas, sowie für die bei meinen Versuchen von ihm geübte Controle meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.