

Untersuchungen

über das

Casein.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

DOCTORS DER MEDICIN

verfasst und mit Genehmigung

Einer Hochverordneten Medicinischen Fakultät der Kaiserlichen Universität
zu Dorpat

zur öffentlichen Vertheidigung bestimmt

von

Renatus Kappeller.

Ordentliche Opponenten:

Prof. Dr. Hoffmann. — Prof. Dr. Vogel. — Prof. Dr. Schmidt.

Dorpat

Druck von C. Mattiesen

1874.

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet.

Der Verfasser.

Gedruckt mit Genehmigung der medicinischen Facultät.

Decan Boettcher.

Dorpat, den 25. April 1874.

N^o 99.

27493544



TARTU ÜLIKOOLI
RAAMATUKOGU

Obwohl sich mit den Untersuchungen über das Casein bewährte Physiologen und Chemiker beschäftigt haben, so machte ich mich, obschon Neuling auf diesem Gebiet, mit desto grösserer Zuversicht an die Untersuchung desselben, da sich einerseits noch immer, wie es schien, bedeutende Lücken in unserem Wissen über diesen wichtigen Stoff fanden, andererseits mir auch eine ganz neue Untersuchungsmethode, die mittelst der Diffusion, zu Gebote stand. Indem ich nun vorliegende Untersuchungen veröffentliche, komme ich dem tiefempfundenen Bedürfniss nach, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Alexander Schmidt, der mir dieses Thema zu meiner Inaugural-Dissertation freundlichst vorschlug, öffentlich meinen herzlichsten und wärmsten Dank auszusprechen, für die seltene Liebenswürdigkeit, mit der er mir

zu jeder Zeit mit Rath und That bei meinen Untersuchungen zur Seite stand, wie auch dafür, dass er mir mit der grössten Liberalität alle Hilfsmittel des physiologischen Cabinets zur Disposition stellte.

I.

Ueber das durch Säuren resp. durch Lab aus der Milch ausgeschiedene Casein.

Da bisher von den Autoren zwischen dem durch Säuren und dem durch Magenflüssigkeit ausgeschiedenen Casein kein Unterschied gemacht zu werden pflegte und dennoch beide Caseinarten von einander verschieden zu sein schienen, so stellten wir uns zuerst die Aufgabe, die Eigenthümlichkeiten derselben zu präcisiren.

Wie aus dem Fernern sich ergeben wird, kamen wir durch unsre Untersuchungen zu dem Schluss, diese beiden Arten des Casein für zwei verschiedene Modificationen desselben zu erklären. Es sei uns daher gestattet, das durch eine Säure resp. das durch Selbstsäuerung ausgeschiedene Casein aus der Milch als gefälltes, das durch Magenflüssigkeit ausgeschiedene als coagulirtes Casein zu bezeichnen, indem es sich hierbei um ein specifisches Eiweissferment, das das Casein in eine schwerlösliche Form überführt, und um keine Säurefällung handelt.

Die Untersuchungen wurden alle mit Kuhmilch angestellt, von einer Kuh, die vor etwa zwei Monaten gesetzt hatte.

Um das Casein zu den Versuchen mit gefälltem resp. coagulirtem Casein zu gewinnen, wurde folgende Methode

eingeschlagen. Es wurden 50 Ccm. Milch mit dem 10-fachen Volumen H_2O verdünnt und das Casein durch 17 Tropfen $\bar{A}^1)$ oder durch 10 Tropfen Milchsäure von 97% gefällt, oder es wurde statt künstlich angesäuerter Milch eine Portion spontan geronnener genommen und in dem 10fachen Volumen H_2O fein vertheilt. Nachdem das Casein sich auf dem Boden des Gefäßes gesammelt, wurde die drüberstehende Flüssigkeit abgegossen und darauf das Casein noch 4 Mal mit etwa 400 Ccm. H_2O decantirt, alsdann filtrirt, das Casein vom Filtrum abgeschabt und das H_2O durch Auspressen zwischen Filtrirpapier möglichst entfernt. Um durch Lab coagulirtes Casein zu erhalten, wurden ebenfalls 50 Ccm. Milch durch neutralisirte Labflüssigkeit coagulirt und darauf ebenso wie die andern Caseinarten behandelt.

Zu allen Versuchen mit Labflüssigkeit²⁾ wurde selbe auf folgende Art bereitet. Die Schleimhaut eines ganzen, frischen Kälbermagens wurde abgeschabt, in einem Mörser mit Glaspulver fein verrieben, darauf mit 100 Ccm. H_2O , das vorher mit 25 Tropfen HCl . angesäuert worden war — der Säuregrad entspricht etwa 0,05% HCl — infundirt und nach 24 Stunden abfiltrirt. Dieses saure Infus wurde nun bei etwa 10° ³⁾ aufbewahrt und zum jedesmaligen Gebrauch mit NH_4OH -Lösung neutralisirt. Denn es hatte sich

¹⁾ Alle Reagentien, bei denen es nicht besonders vermerkt, hatten eine Concentration von 25%.

²⁾ Maly, Jahresbericht über die Fortschritte der Thierchemie. Bd. II 1874. Dr. O. Hammarsten. Ueber die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente der Magenschleimhaut. S. 119.

³⁾ Alle Temperaturgrade sind nach Celsius angegeben.

gezeigt, dass die neutralisirt gestandene Labflüssigkeit schon nach etwa 24 Stunden Milch nicht mehr so energisch coagulirte, als vorher. Wurden etwa gleiche Volumina dieser Labflüssigkeit und frischer Milch gemischt und auf dem Dampfbade erwärmt, so trat stets bei 28 bis 34° Coagulation fast im Augenblick ein. Sobald es sich zeigte, dass die Labflüssigkeit erst bei höherer Temperatur, als die eben genannte, wirkte, wurde sie als unbrauchbar bei Seite gestellt.

Ein Mal wurde der Versuch gemacht, die fein verriebene Magenschleimhaut mit neutralem H_2O zu infundiren und die auf diese Weise gewonnene Labflüssigkeit zu den Versuchen zu verwenden. Dieselbe reagirte schwach sauer und coagulirte, obgleich sie nicht neutralisirt worden war, schwach sauer reagirende Milch erst bei 36° . Neutralisirt, übte sie auch selbst bei einer Temperatur von 50° keine Wirkung aus. Eine Erklärung für dies Verhalten giebt uns Hammarsten⁴⁾, er sagt: „Eine fortgesetzte Untersuchung lehrte, dass die Magenschleimhaut eines jeden bisher untersuchten Thieres einen in Wasser löslichen Stoff enthält, welcher selbst nicht Lab ist, aus dem aber bei Zusatz von einer Säure binnen Kurzem Lab gebildet wird. Hieraus erklärt es sich zur Genüge, warum angesäuertes Wasser eine fermentreichere Flüssigkeit als neutrales giebt.“ Es wurden daher mit solcher Labflüssigkeit ohne Ansäuerung keine Versuche gemacht.

Um nun wieder auf unsere Versuche mit den verschiedenen Caseinarten zurückzukommen, so wurde von

⁴⁾ l. c. S. 123.

dem ausgepressten Casein 0,5 Grm. abgewogen, diese Menge in 5 Ccm. H₂O vertheilt und auf seine Löslichkeit in 1 % NH₄OH-Lösung und 2 % \bar{A} geprüft. Andere Lösungsmittel wurden nicht angewendet.

Zur leichteren Uebersicht der durch diese Versuche erhaltenen Lösungsverhältnisse diene folgende Tabelle.

Tabelle I⁵⁾.

№ des Versuchs.	A		B		C		D	
	NH ₄ O.	\bar{A} .	NH ₄ O.	\bar{A} .	NH ₄ O.	\bar{A} .	NH ₄ O.	\bar{A} .
I.	1,3	8,0			0,9	7,0	4,2	110,0
II.	1,2	10,0			1,0	11,0	4,8	150,0
III.	1,0	8,0	1,2	8,0	1,0	7,0	9,0	150,0
IV.			1,1	7,0	0,9	8,0		
Durchschnitts- Zahl. . .	1,18	8,66	1,15	7,5	0,95	8,25	6,0	136,66

Die Zahlen dieser Tabelle ergeben also, dass das durch Lab ausgeschiedene Casein in 1 % NH₄OH-Lösung etwa 6 Mal, in 2 % \bar{A} etwa 17 Mal schwerer löslich war, als das durch eine Säure gefällte.

Auch das äussere Verhalten dieser Caseinarten war ein von einander abweichendes. Das durch Säure gefällte Casein, A und B, wohin ja wohl auch die Art C seinen Lösungsverhältnissen nach zu rechnen ist, war feinflockig und fiel langsam zu Boden, wogegen das durch Lab coagulirte sich zu grossen Klumpen von elastischer Consistenz

⁵⁾ A bedeutet das durch \bar{A} , B das durch Milchsäure, C das durch spontane Säuerung und D das durch Lab ausgeschiedene Casein. Die Zahlen geben die zur Lösung gebrauchten Ccm. 1 % NH₄OH-Lösung oder 2 % \bar{A} an. Zu jedem Versuch wurde Milch von derselben Melkung benutzt.

zusammengeballt hatte, rasch zu Boden fiel und sich in H₂O nicht mehr fein vertheilen liess. Auch Heintz ⁶⁾ macht auf diese Eigenthümlichkeiten aufmerksam. Dabei hatten A, B und C ein schneeweisses Aussehn, die Farbe von D spielte mehr ins Gelblich-graue.

Liess man die Arten A, C und D — mit B ist der Versuch unterlassen worden — ausgepresst einige Tage an der Luft stehn, so bekamen sie ein hornartiges Aussehn, hatten eine gelbliche Farbe und waren etwas durchscheinend, hart und spröde geworden, der Bruch hatte Aehnlichkeit mit dem des Glases. Wurden nun diese 3 Arten des Casein etwa 24 Stunden in H₂O stehn gelassen, so löste sich ein Theil desselben, denn verdünnte \bar{A} gab bei allen 3 Lösungen im Filtrat einen Niederschlag, ebenso \bar{A} und Ferrocyankalium deutliche Reaction, die am schwächsten bei D, am stärksten bei C war. Heintz ⁷⁾ giebt an, dass das coagulirte Casein in diesem Zustande in H₂O nur aufschwillt, sich jedoch nicht löst.

Brachte man ferner diese 3 Caseinarten — A, C und D — mit etwas H₂O zusammen, so dass sie einen dicken Brei bildeten und liess sie in diesem Zustande einige Wochen los bedeckt stehn, so bekamen sie den bekannten Käsegeruch und wurden von der Peripherie zum Centrum hin etwas durchsichtig und zerfliesslich, wobei sich zugleich leichte Schimmelbildung einstellte. Dieser Process, der ja täglich bei der Käsebereitung beobachtet werden kann, fand sich bei allen 3 Arten ziemlich zu

⁶⁾ Heintz. Lehrbuch der Zoochemie 1853. S. 688.

⁷⁾ l. c. S. 698.

gleicher Zeit ein. Es ist wohl mit der grössten Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass hier ein Uebergang des Casein in Fett stattfindet, womit auch Hoppe⁸⁾ und Kemmerich⁹⁾ übereinstimmen.

Bisher hatten wir unsere Lösungsversuche nur an Casein angestellt, das durch Säure aus stark verdünnter Milch gefällt worden war, andererseits bei der spontanen Gerinnung und der Coagulation durch Lab nur Milch von gewöhnlicher Concentration angewendet. Es liess sich daher der Einwand erheben, dass durch die verschiedene Concentration im Moment der Fällung auch jene verschiedenen Lösungsverhältnisse des ausgeschiedenen Casein bedingt sein könnten.

Um nun diesem Einwurf zu begegnen, wurden 50 Ccm. Milch durch 40 Tropfen \bar{A} gefällt — zur vollständigen Fällung des Casein war hier die doppelte Menge \bar{A} nöthig, als bei Fällung des Casein aus der verdünnten Milch — und darauf das Casein nach bekannter Art behandelt. 0,5 Grm. dieses Casein in 5 Ccm. H_2O vertheilt, bedurfte zur Lösung 0,7 Ccm. 1% NH_4OH -Lösung. Nach Zusatz von 7,0 Ccm. 2% \bar{A} (beide Zahlen entsprechen denen der Tab. I) quoll es zu einer gallertartigen Masse auf, die sich sehr schwer filtriren liess, im Filtrat fanden sich nur Spuren von Eiweiss¹⁰⁾. Nachdem die gallertähnliche Masse zwei

⁸⁾ Virchow Archiv Bd. XVII. F. Hoppe. Untersuchungen über die Bestandtheile der Milch und ihre nächsten Zersetzungen. S. 449.

⁹⁾ Pflüger Archiv Bd. II. Kemmerich. Beiträge zur physiol. Chemie der Milch. S. 409.

¹⁰⁾ Es wurde bei allen diesen Versuchen, wo es fraglich schien, ob das Casein in Lösung übergegangen, nach dem Filtriren die Flüssigkeit mit \bar{A} und Ferrocyankalium geprüft.

Stunden gestanden, war diese Beschaffenheit fast ganz geschwunden, das Filtriren ging leichter vor sich, im Filtrat fand sich mehr gelöstes Eiweiss, als vorher.

Ferner wurden 40 Ccm. Milch mit 100 Ccm. H_2O verdünnt, dazu 40 Ccm. neutralisirte Labflüssigkeit zugesetzt und dann erwärmt; die Reaction der Mischung war amphoter¹¹⁾. Schon bei 35° trat Coagulation ein, die Reaction hatte sich unterdessen nicht geändert. Nachdem nun das Casein wieder nach der bekannten Weise behandelt worden, hatte 0,5 Grm. desselben in 5 Ccm. H_2O vertheilt von 1% NH_4OH -Lösung 9,0 Ccm., von 2% \bar{A} 70,0 Ccm. zur Lösung nöthig. Es war also ebenso schwer löslich, wie das bei gewöhnlicher Concentration der Milch coagulirte Casein.

Um nun auch einen Vergleich zwischen der in gewöhnlicher und der in verdünnter Concentration spontan geronnenen Milch machen zu können, wurden 50 Ccm. Milch von gewöhnlicher Concentration und andere 50 Ccm.

¹¹⁾ In neuerer Zeit ist darauf aufmerksam gemacht worden, dass frische Milch nie neutral reagire, sondern dass sie zu gleicher Zeit sowohl alkalische, wie auch saure Reaction besitze; diese Reaction wird amphoter genannt (s. Maly l. c. F. Soxhlet. Zur physiol. Chemie der Milch. S. 112).

Anfangs wurde bei vorliegenden Untersuchungen darauf nicht geachtet, da, um diese Reaction festzustellen, feinere Reagentien, als gewöhnliches Reagenspapier nöthig sein sollten. Doch zeigte es sich, dass das von uns angewendete Lakmuspapier so empfindlich war, dass es jedes Mal gelang, die amphotere Reaction festzustellen. Während der ganzen spätern Zeit der Untersuchungen fand sich nur 2 Mal die Reaction frischer Milch sauer.

Da früher für gewöhnlich wohl die Milch nur mit dem blauen Lakmuspapier geprüft worden ist, so lässt es sich erklären, warum Berzelius (s. Virchow Archiv l. c. S. 432) die saure Reaction der Milch für die vorherrschende erklärt. Es ist daher nothwendig, ausgenommen wenn die Reaction der Milch stark sauer ist, stets beide Arten Reagenspapier zur Feststellung der Reaction anzuwenden.

derselben Milch mit 250 Ccm. H_2O verdünnt zum Säuern gestellt. Das aus diesen beiden Milchmengen gewonnene Casein wurde wieder in bekannter Weise behandelt. 0,5 Grm. des aus der verdünnten Milch erhaltenen Casein wurde in 5 Ccm. H_2O vertheilt, es bedurfte zur Lösung 1,4 Ccm. 1% NH_4O Lösung und 10,0 Ccm. 2% \bar{A} . Genau dieselben Zahlen ergaben sich beim Lösen des aus gewöhnlicher Milch gewonnenen Casein. Diese Zahlen stimmen mit denen der Tabelle I überein.

Ferner ging die Untersuchung dahin, den Einfluss der Wärme bei der Fällung auf die Löslichkeit des ausgeschiedenen Casein zu prüfen.

Es wurden zu dem Zweck 3 Versuche angestellt. Erstens wurden 50 Ccm. Milch und 250 Ccm. H_2O getrennt auf 50° erwärmt, dann gemischt und das Casein durch \bar{A} gefällt. Ferner wurden zwei andere Portionen Milch und H_2O ebenfalls getrennt erwärmt, die Fällung des Casein aber schon bei 30° vorgenommen. Darauf wurde das gewonnene Casein nach der bekannten Weise behandelt, 0,5 Grm. desselben in 5 Ccm. H_2O vertheilt und gelöst. Die erhaltenen Lösungsverhältnisse giebt folgende Tabelle.

Tabelle II.

N ^o des Versuchs.	Temperatur- grad.	1% NH_4O - lösung.	2% \bar{A} .
I.	50	2,0	40,0
II.	30	3,5	30,0
III.	30	2,5	45,0
Durchschnitts- Zahl . . .	—	2,66	38,33

Vergleicht man diese Zahlen mit denjenigen der Tabelle I, so ergibt sich aus diesen Versuchen mit vollkommener Bestimmtheit, dass das bei gewöhnlicher Temperatur durch Säure gefällte Casein leichter löslich ist, als das bei einer Temperatur von $30-50^\circ$ gewonnene.

Ein weiterer Versuch bestätigte dies Verhalten ebenfalls. Es hatte frische Milch 2 Tage bei etwa 14° gestanden, unterdessen war ihre Reaction stark sauer geworden. Diese Milch auf 65° erwärmt, gerann — bei einer andern Portion Milch, die 3 Tage alt war, im Uebrigen sich ebenso verhielt, trat schon bei 50° Gerinnung ein — obwohl sie in der Kälte vollkommen dünnflüssig gewesen war. Die Verhältnisse, die hier obwalteten, waren ganz analoge, wie die bei den eben angeführten Versuchen. Dort wurde Säure zu der frischen Milch hinzugefügt, hier hatte sie sich spontan entwickelt, wahrscheinlich wohl Milchsäure¹²⁾, entstanden aus dem Milchsäure der Milch. Doch genügte die Menge Säure zum Gerinnen in der Kälte nicht, die Milch musste erst auf 65° erwärmt werden, um dieses zu bewerkstelligen. Auch Scherer und Hoppe¹³⁾ stimmen mit dieser Ansicht überein. Die Gerinnsel bildeten eine zähe, zusammenhängende Masse, in H_2O liessen sie sich sehr schwer vertheilen und fielen sehr rasch zu Boden. Dies Verhalten widerspricht den übrigen durch eine Säure gefällten Caseinarten vollkommen. Darauf wurde dies Casein nach der gewöhnlichen Art behandelt. 0,5 Grm. desselben in 5 Ccm. H_2O ver-

¹²⁾ Maly, l. c. F. Soxhlet, Zur physiolog. Chemie der Milch. S. 114.

¹³⁾ Virchow Archiv l. c. S. 419.

theilt, hatte 2,5 Ccm. 1 % NH₄O₂-Lösung und 40,0 Ccm. 2 % A zur Lösung nöthig. Diese Zahlen stimmen mit denen in Tabelle II angegebenen vollkommen und fallen für die Richtigkeit unserer Annahme bedeutend ins Gewicht.

Es geht also aus den Befunden dieses Abschnitts hervor, 1) dass das durch Säuren gefällte und das durch Lab coagulierte Casein für zwei verschiedene Modificationen dieses Eiweisskörpers gehalten werden müssen, da die Unterschiede in der Löslichkeit beider so gross sind. Schon Heintz¹⁴⁾ nimmt nach seinen Versuchen mit ziemlicher Gewissheit diese beiden Modificationen des Casein an. 2) Ergaben die Untersuchungen, dass beide Modificationen des Casein beim Trocknen an der Luft in Wasser löslich werden und 3) dass Wärme bei der Fällung den Einfluss ausübt, das Casein schwerer löslich zu machen. Dies Letztere hat wohl auch für das durch Lab coagulierte Casein Gültigkeit.

¹⁴⁾ l. c. S. 685 ff., S. 697 und 698.

II.

A. Ueber die in der Magenflüssigkeit enthaltenen Fermente.

Bisher wurde von den Physiologen in dem Magensekret nur ein Ferment, das Pepsin, angenommen, das auf die Eiweissstoffe die spezifische Wirkung ausübt, dieselben zu verdauen. Die gelöst in den Magen gelangenden Alkalialbuminate sollten dabei durch die im Magen vorhandene freie Säure gefällt und dann von ihm gelöst und verdaut werden. Als Belege für das eben Gesagte mögen die Aussprüche einiger Autoren dienen.

Heintz¹⁵⁾ sagt, nachdem er die Darstellungsweise des Pepsin angegeben: „Wird das Pepsin zu Caseinlösungen hinzugefügt, so coagulirt es diese Proteinsubstanz. Daher das Gerinnen der Milch im Magen. Erst später löst es das Casein wieder auf.“

C. Ludwig¹⁶⁾ sagt über den künstlichen Labsaft: „Eigenthümlich ist sein Verhalten gegen die in Wasser und verdünnten Säuren löslichen oder unlöslichen Eiweiss-

¹⁵⁾ l. c. S. 824.

¹⁶⁾ Lehrbuch der Physiologie des Menschen. Aufl. II. Bd. II. 1861. S. 626 und 627.

körper. Die unlöslichen Eiweissstoffe löst er auf, die in alkalischer Lösung befindlichen schlägt er nieder, um sie dann wieder zu lösen.“

Kühne¹⁷⁾ führt an: „Schon die Versuche von F. Simon lehrten, dass die Käsebildung durch Lab bei Temperaturen von 37—43° C. immer gleichzeitig mit der Säuerung erfolgt, so dass die Caseinausscheidung mit Recht der secundären Wirkung der entstandenen Milchsäure zugeschrieben werden konnte.“

W. Wundt¹⁸⁾ sagt bei Besprechung der Verdauung der Eiweisskörper: „Gelöstes Casein wird immer zuerst gefällt und dann verdaut.“

L. Hermann¹⁹⁾ spricht Aehnliches aus, er sagt: „Alkalbuminatlösungen werden durch Säure des Magensaftes vor der Auflösung gefällt, z. B. Casein der Milch. Die Milch gerinnt auch durch neutralisirten Magensaft, weil dieser den Milchzucker schnell in Milchsäure verwandelt, wodurch saure Reaction entsteht.“

Ferner wird aber das Pepsin als ein chemisches Ferment²⁰⁾ bezeichnet, d. h. als ein solches, das während seiner specifischen Wirkung keine Veränderung erleidet. Es erscheint a priori sehr unwahrscheinlich, dass ein Ferment, ein Körper, von dem wir bisher wissen, dass er immer nur eine specifische Wirkung hat, zwei ganz entgegengesetzte Wirkungen besitzen soll, indem er einerseits die Eiweisskörper coagulire, andererseits löse.

¹⁷⁾ Lehrbuch der physiol. Chemie. S. 567.

¹⁸⁾ Lehrbuch der Physiologie des Menschen. Aufl. III. 1873. S. 207.

¹⁹⁾ Grundriss der Physiologie des Menschen. Aufl. IV. 1872. S. 103.

²⁰⁾ Kühne l. c. S. 40.

Hammarsten gelang es nun in neuster Zeit aus der Magenschleimhaut zwei Körper zu isoliren, von denen der eine die Wirkung des Pepsin besass, der andere nur auf das Casein eine coagulirende Wirkung ausübte, diesen letzteren nannte er „Lab“. Ausserdem kam er im weiteren Verlauf seiner Untersuchungen dazu, noch ein drittes Ferment, das nur auf den Milchzucker einwirkte, annehmen zu müssen. Er fasst seine Resultate in folgenden Worten zusammen²¹⁾: „Die Magenschleimhaut enthält — abgesehen von dem Pepsin — 2 Fermente, das Lab und das milchsäurebildende Ferment. Von diesen beiden hat nur jenes eine specifische Wirkung auf das Casein, während dieses nur auf den Milchzucker wirkt.“

Da uns im Verlauf unserer Untersuchungen manches diese Verhältnisse berührende aufsties, so suchten wir durch einige eigene Versuche über dieselben uns Licht zu schaffen.

So fand es sich, dass eine genügende Menge der zu den Versuchen gebrauchten Magenflüssigkeit mit frischer Milch gemischt und auf dem Dampfbade erwärmt, die Milch selbst bei einer Temperatur von 66° nicht coagulirte, obwohl sie zwei Tage zuvor frische Milch noch bei 30° im Moment coagulirt hatte. Das saure Infus hatte während dieser Zeit bei etwa 10° gestanden und wurde wie gewöhnlich zum Versuch neutralisirt.

Da man nun weiss, dass das Pepsin lange seine Wirksamkeit behält, so war es doch sehr auffallend, dass die coagulirende Wirkung desselben auf Casein so schnell

²¹⁾ l. c. S. 125.

geschwunden, die verdauende aber noch vorhanden war, wie es der folgende Versuch lehrt.

Es wurde in diese Magenflüssigkeit, ohne sie vorher zu neutralisiren, eine Fibrinflocke gebracht und sie bei 35° stehn gelassen. Nach einigen Minuten war die Flocke durchscheinend geworden und stark aufgequollen, 20 Minuten darauf war sie schon verschwunden, sie war verdaut.

Nach diesem Versuch ist es doch sehr wahrscheinlich, dass das Pepsin und das Lab 2 verschiedene Fermente sind, denn sobald es nur ein Ferment wäre, müssten doch beide demselben zugeschriebenen specifischen Eigenschaften zu gleicher Zeit schwinden, und nicht die eine vollkommen verloren gegangen, die andere aber sehr energisch vorhanden sein.

Um nun diesen wichtigen Versuch nochmals wiederholen zu können, wurde das saure Infus längere Zeit bei 10°, ferner eine Portion neutralisirter und eine andere stark alkalisch gemachter Magenflüssigkeit bei gewöhnlicher Zimmertemperatur stehn gelassen und darauf auf ihre Wirksamkeit auf Casein geprüft. Es zeigte sich, dass die Labwirkung auf Casein allerdings nicht mehr so energisch, jedoch noch immer ziemlich bedeutend war. Daher wurde nach Angabe von Hammarsten²²⁾ das saure Infus 72 Stunden bei 35° stehn gelassen und hierauf auf seine Wirksamkeit auf Casein untersucht. Frische Milch wurde, selbst bis über 60° mit dieser Magenflüssigkeit erwärmt, nicht mehr coagulirt. Es war also auf diese Weise gelungen, die coagulirende Wirksamkeit des Ferments auf Casein zu zerstören.

²²⁾ l. c. S. 122.

Es wurde nun in 2 Portionen dieser sauren Magenflüssigkeit von je 20 Ccm. einerseits eine ungekochte, andererseits eine vorher stark gekochte Fibrinflocke gebracht und bei 35° stehn gelassen. Die ungekochte Flocke war in 35 Minuten vollständig verdaut, von der gekochten, zugleich auch grössern, war nach 2 Stunden nur noch ein kleiner Rest vorhanden. Auch nach 24 Stunden, während welcher die Magenflüssigkeit bei genannter Temperatur gestanden, fand sich noch immer der Rest vor. Es wurden nun 8 Ccm. H₂O, mit einem Tropfen HCl angesäuert, hinzugefügt. Die Verdauung war im Augenblick vollendet. Es ist dies ein bekanntes Verhalten der Pepsinlösungen, auf welches Kühne²³⁾ ebenfalls aufmerksam macht. Dieser Versuch ergab also ganz dasselbe, wie der vorige. Die coagulirende Wirkung auf Casein war vernichtet, trotzdem die verdauende vorhanden.

Ferner wurden Versuche mit der Magenflüssigkeit und Milchzuckerlösungen gemacht. Der zu diesen Versuchen benutzte Milchzucker enthielt nur Spuren von phosphorsaurem Kalk, er sah weiss aus, ohne ins Gelbliche zu spielen. Die Lösung war ganz klar, basisch-essigsäures Blei gab keine Fällung. Es schienen also von der Bereitung her dem Milchzucker keine Extractivstoffe anzuhängen. Da jedoch die Resultate der später anzuführenden Versuche dieser Annahme widersprachen, so wurde zur Sicherheit eine Portion des Milchzuckers in möglichst wenig Wasser gelöst, durch die 30fache Menge 96 % Alkohol gefällt, filtrirt und der Rückstand im Vacuum

²³⁾ l. c. S. 38.

über Schwefelsäure getrocknet. Darauf wurde der so gewonnene Milchzucker nochmals auf dieselbe Weise gereinigt; er sah nun schneeweiss aus.

Die Versuche wurden sowohl mit dem gereinigten, wie ungereinigten Milchzucker angestellt. Es wurden zuerst gleiche Theile ungereinigter, saturirter Milchzuckerlösung, einerseits mit spontan unwirksam gewordener, andererseits mit wirksamer Magenflüssigkeit, nachdem dieselben neutralisirt worden waren, gemischt. Die Reaction der Gesamttflüssigkeiten war neutral; sie wurden bei 35° fortgestellt. Nach 24 Stunden reagirte die mit unwirksamer Magenflüssigkeit zusammengebrachte Milchzuckerlösung neutral, die andere deutlich sauer; nach Verlauf von 72 Stunden reagirten beide sauer, die erstere jedoch bedeutend schwächer. Zur Controle wurde eine saturirte, ferner eine zur Hälfte mit H₂O verdünnte Milchzuckerlösung, so wie eine neutralisirte Lablösung ungemischt unter dieselben Bedingungen gebracht, eine andere Portion der Milchzucker-, sowie eine der neutralisirten Lablösung dagegen bei Zimmertemperatur stehn gelassen. Selbst nach Verlauf von 6 Tagen war die Reaction dieser 5 Lösungen eine neutrale.

Eine saturirte Lösung des durch Alkohol-fällung gereinigten Milchzuckers hingegen, mit einer gleichen Menge neutralisirter, wirksamer Magenflüssigkeit gemischt und 48 Stunden bei 35° stehn gelassen, blieb neutral.

Dieser Befund widerspricht den Angaben Hammarstens²⁴⁾, denen zu Folge reines „Lab“ keinen Einfluss auf Milchzucker hat, wohl aber das saure Infus, durch

ein in demselben enthaltenes spezifisches milchsäurebildendes Ferment. Es wurde dieser Versuch daher wiederholt. Es zeigte sich, dass die Mischung nach 48 Stunden neutral reagirte, erst nach 72 Stunden trat leicht saure Reaction ein und selbst nach 6 Tagen, welche die Mischung bei 35° gestanden hatte, war sie wohl merklich, jedoch nicht stark sauer.

Dieser Unterschied im Verhalten der beiden Milchzuckerlösungen gegen neutralisirte Magenflüssigkeit würde wohl dafür sprechen, dass in dem ursprünglichen, nicht gereinigten Milchzucker noch Spuren von Stoffen aus der Milch, wahrscheinlich von Extractivstoffen, vorhanden gewesen sind, die den Uebergang des Milchzuckers in Milchsäure beschleunigt haben. Für diese Annahme fallen noch die Befunde derjenigen Versuche bedeutend ins Gewicht, bei denen dem Gemenge von Milchzucker- und Lablösung oder auch der Lablösung allein das durch die Diffusion der Milch gewonnene Diffusat hinzugefügt wurde. Nachdem diese Mischungen 24 Stunden bei 35° gestanden hatten, war die Reaction derselben schon stark, bei den Milchzucker- und Lablösungen nach Verlauf dieser Zeit erst eben merklich sauer. Hier waren ja mit dem Diffusat nicht allein Milchzucker, sondern auch die Extractivstoffe der Milch hinzugefügt worden und daher wohl die energichere Säureentwicklung.

Ferner wurden darüber Versuche angestellt, ob die Reaction der Milch während der Coagulation des Casein durch Lab sich verändere. F. Simon hatte nemlich gefunden, dass das Casein der Milch durch Lab erst dann ausgeschieden wird, wenn die Reaction der Milch aus

²⁴⁾ l. c. S. 122.

der neutralen in die saure übergegangen war. Er machte daher die Ausscheidung des Casein durch Lab von der aus dem Milchzucker entstehenden Säure abhängig. Selmi hatte jedoch gefunden, dass die Ausscheidung des Casein durch Lab auch bei neutraler Reaction stattfindet, er erklärte sie daher von der Säurebildung für vollkommen unabhängig.

Durch diese entgegengesetzten Befunde genannter Forscher angeregt, wiederholte Heintz ²⁵⁾ die Versuche beider und fand, dass beide im Recht waren. Die Ursache dieses Widerspruchs war der, dass Simon und Selmi bei verschiedenen Temperaturen ihre Versuche angestellt hatten. Simon hatte bei etwa 40° experimentirt, bei dieser Temperatur trat jedoch die Ausscheidung des Casein erst nach mehren Stunden ein. Unterdessen hatte sich durch den Einfluss der Magenflüssigkeit Säure aus dem Milchzucker gebildet und diese das Casein gefällt. Selmi hatte seine Versuche dagegen bei etwa 56° angestellt und gefunden, dass das Casein schon nach wenigen Minuten ausgeschieden wurde, ohne dass dabei die Reaction der drüberstehenden Flüssigkeit in eine saure übergegangen wäre, die Ausscheidung musste daher unabhängig von der Säure zu Stande gekommen sein. Diesen letzten Befund hält Kühne ²⁶⁾ für unbedeutend, „weil bei den Versuchen nur partielle Ausscheidung des Casein erzielt wurde, die aber durch die geringsten Säurespuren bei so hoher Temperatur immer erfolgt, und dann unter Zurückschlagen in die alkalische Reaction“.

²⁵⁾ l. c. S. 688 und 689.

²⁶⁾ l. c. S. 567.

Dieselbe Streitfrage bestand auch noch jüngst zwischen Soxhlet ²⁷⁾ und Heintz ²⁸⁾. Hammarsten ²⁹⁾ fand, dass das Lab bei allen drei Reactionen wirke, bei der alkalischen am spätesten, bei der sauren am raschesten.

Da wir im Verlauf unserer Untersuchungen beim Coaguliren der Milch durch Lab stets gefunden hatten, dass die Reaction der digerirten Flüssigkeit vor und nach der Coagulation dieselbe geblieben war, so wurde folgender Versuch gemacht. Es wurde eine Portion frischer, schwach sauer reagirender Milch durch etwas NHOlösung schwach alkalisch gemacht und gleiche Theile der Lablösung und der Milch erwärmt. Die Coagulation trat bei einer Temperatur von 42° ein. Die Reaction der Flüssigkeit wurde mehrmals geprüft, sie war stets deutlich alkalisch. Eine andere Portion dieser Milch wurde, ohne vorher alkalisch gemacht worden zu sein, durch neutralisirte Lablösung nicht bei 42°, sondern schon bei 27° coagulirt. Es fand also bei diesen beiden Portionen Milch von schwach saurer und schwach alkalischer Reaction ein Unterschied der Coagulationstemperatur von 15° statt.

Ein zweiter Versuch wurde folgendermassen angestellt. Es wurden drei Portionen zu je 5 Ccm. amphoter reagirender Milch abgemessen. Die erste Portion wurde durch Milchsäure schwach angesäuert, die zweite unverändert gelassen und die dritte durch NHOlösung schwach

²⁷⁾ l. c. S. 114.

²⁸⁾ Maly, l. c. W. Heintz, Ueber die Ursache der Coagulation des Milchcaseins durch Lab und über die sogenannte amphotere Reaction. S. 117 und 118.

²⁹⁾ l. c. S. 122.

alkalisch gemacht. Alsdann wurde jede Portion mit 5 Ccm. neutralisirter Lablösung auf dem Dampfbade erwärmt. Bei № 1 trat die Coagulation schon bei 20°, bei № 2 bei 28° und bei № 3 bei 37° ein. Die Reaction hatte sich nach dem Coaguliren bei keiner Portion geändert.

Aus diesem Versuch geht also hervor, dass die Coagulation des Casein durch Lab unabhängig von Säure erfolgt. Bei № 1 war es fraglich, ob das Casein gefällt oder coagulirt worden war, da diese Mischung von vornherein sauer reagirte. Sollte ersteres der Fall gewesen sein, so musste nach unseren frühern Befunden das ausgeschiedene Casein ein leicht lösliches sein, es durfte das Casein aus 5 Ccm. Milch alsdann höchstens etwa 2 Ccm. 1% NHOlösung zur Lösung erfordern, da nach Gorup-Besanez aus dieser Milchmenge etwa 0,24 Grm. Casein gewonnen wird. Die Lösungsverhältnisse waren jedoch folgende: № 1 und № 3 erforderten je 8,75 Ccm., № 2 7,5 Ccm. 1% NHOlösung. Hiernach konnte nicht einmal das Casein aus № 1 durch Säure gefällt worden sein.

Wie ersichtlich, trifft uns der oben erwähnte Einwand Kühnes, den er gegen Heintz erhebt, keineswegs, da wir einerseits mit einer so energisch wirkenden Fermentlösung arbeiteten, dass der gewünschte Effect auch selbst bei alkalisch reagirender Milch schon bei 37° eintrat, andererseits sich kein Mal saure Reaction nachweisen liess, trotz häufigen Prüfens der Flüssigkeit mit sehr empfindlichem Lakmuspapier.

Da bekanntlich alle Fermente durch Einwirkung höherer Temperaturen zerstört werden, so wurde eine Portion sauren Infuses einige Minuten gekocht, darauf neu-

tralisirt und nun ein Gerinnungsversuch mit Milch gemacht. Die Milch selbst bis 70° mit dieser Lablösung erhitzt, blieb flüssig, das Lab war also durch das Kochen zerstört worden.

Dieser Versuch wurde alsdann mit einer zweiten Portion Magenflüssigkeit, welche Milch bei 30° coagulirte, wiederholt. Auch durch ihn wurde constatirt, dass sowohl die coagulirende, wie verdauende Wirksamkeit der Magenflüssigkeit durch das Kochen verloren gegangen war. Denn Milch wurde durch diese Flüssigkeit nicht mehr coagulirt und eine ungekochte Fibrinflocke selbst im Verlauf von 48 Stunden, die sie bei 35° gestanden, bis auf das Aufquellen unverändert gelassen, obwohl nach 24stündigem Stehen 12 Ccm. angesäuerten Wassers hinzugefügt worden waren.

Ferner wurden 20 Ccm. einer mit wenig Wasser aus einer Magenschleimhaut extrahirten Labflüssigkeit neutralisirt, durch 300 Ccm. 96% Alkohol gefällt und 48 Stunden so stehn gelassen. Darauf wurde der Alkohol vom Niederschlage abfiltrirt, der Rückstand auf dem Filtrum im Vacuum getrocknet, dann fein verrieben, eine halbe Stunde mit 15 Ccm. H₂O extrahirt und filtrirt. Eine Portion der so dargestellten Fermentlösung, deren Reaction neutral war, mit einer gleichen Menge amphoter reagirender Milch zusammengebracht, coagulirte das Casein derselben zwischen 29° und 32°. Die Reaction dieser Fermentlösung wurde mehrmals geprüft, dieselbe war selbst nach 20 Tagen noch neutral.

Durch diesen Versuch wurde also bewiesen, dass der die Gerinnung des Casein zu wege bringende Stoff aus der Magenflüssigkeit durch Alkohol sich fallen lässt, was vom Pepsin schon bekannt ist.

Ferner machten wir den Versuch, das Lab nach der v. Wittich'schen Methode³⁰⁾ durch Glycerin zu extrahieren. Zu diesem Zweck wurde die Schleimhaut eines Kälbermagens abgeschabt, verrieben, 24 Stunden mit 100 Ccm. Glycerin extrahirt und dann durch Leinwand geschlagen. Die hierbei gewonnene Flüssigkeit war äusserst zähflüssig, ihre Menge betrug 60 Ccm. Diese wurden nun 48 Stunden unter 500 Ccm. 96% Alkohol stehn gelassen, darauf der Alkohol vom Niederschlage abfiltrirt, der Rückstand auf dem Filtrum im Vacuum getrocknet, verrieben und mit 32 Ccm. H₂O, das durch 8 Tropfen HCl angesäuert worden, 20 Stunden extrahirt. Darauf wurde die Flüssigkeit filtrirt und mit dem Filtrat, nachdem es neutralisirt worden, ein Gerinnungsversuch mit amphoter reagirender Milch gemacht, sie gerann momentan bei 36°. Ausserdem wurde in je 10 Ccm. des sauren Filtrats erstens eine gekochte, zweitens eine ungekochte Fibrinflocke gebracht und beide bei 35° stehn gelassen. Die gekochte wurde in 3, die ungekochte in 1½ Stunden verdaut. Es ergibt sich also hieraus, dass sowohl das Pepsin, wie das Lab durch Glycerin extrahirbar sind.

Durch unsere Untersuchungen über die Magenflüssigkeit kommen wir zu folgenden Schlüssen. 1) Es finden sich in der Magenflüssigkeit aller Wahrscheinlichkeit nach 2 Fermente, das Pepsin und das Lab. Denn die andere Möglichkeit, dass in derselben nur ein Ferment enthalten ist, das einerseits Eiweissstoffe verdaue, andererseits Casein coagulire, durch den Einfluss der Wärme beim Stehn aber chemisch der-

³⁰⁾ Wittich, Ueber eine neue Methode zur Darstellung künstlicher Verdauungsflüssigkeiten. Pflüger Archiv Bd. II. S. 193.

art verändert werde, dass es seine zweite Wirksamkeit verliere, ohne die erste einzubüssen, lässt sich augenblicklich nicht widerlegen, hat aber sehr wenig für sich. Für zwei Fermente sprechen nicht nur Hammarstens Untersuchungen, der beide isolirt dargestellt hat, sondern auch die Unwahrscheinlichkeit, dass ein Ferment zwei vollkommen entgegengesetzte Eigenschaften besitzen soll, sowie endlich unsere eigenen Versuche mit Magenflüssigkeit, die ihre coagulirende Wirkung auf Casein verloren hatte. 2) Das Lab zeigt in jeder Beziehung das Verhalten eines Ferments. 3) Durch den Einfluss der Magenflüssigkeit wird in einer Milchzuckerlösung saure Reaction hervorgebracht. Dass Heintz³¹⁾ zu einem entgegengesetzten Resultat kommt, liegt daran, dass er seine Versuche zu kurze Zeit fortsetzte, nemlich nur 4—6 Stunden. 4) Die Coagulation der Milch durch Lab tritt bei allen 3 Reactionen ein, nur bedarf es zu dem Zweck, je alkalischer die Mischung, einer desto höhern Temperatur. 5) Die Coagulation der Milch durch Lab kommt nicht durch den Einfluss einer Säure, sondern durch eine directe fermentative Einwirkung des Lab auf den Eiweisskörper zu Stande. 6) Sowohl das Pepsin, wie das Lab sind durch Glycerin extrahirbar.

Somit haben wir in keinem Punkt Ursache, den Behauptungen Hammarstens entgegen zu treten, vielmehr können wir sie, so viel obige 6 Punkte ergeben, nur bestätigen.

³¹⁾ Maly, l. c. S. 118.

B. Ueber das in der Milch enthaltene Ferment.

Da die Lösungsverhältnisse des durch Säure gefällten und des aus der spontangeronnenen Milch gewonnenen Casein uns vermuthen liessen, dass dieses letztere ebenfalls ein durch eine Säure gefälltes Casein sei, indem wohl mittelst eines Ferments der Milchzucker in Milchsäure umgesetzt worden war, so wurden Versuche gemacht, dieses Ferment aus der frischen Milch zu gewinnen. Auch Hoppe³²⁾ hatte schon aus seinen Versuchen den Schluss gezogen, „dass die Milch wahrscheinlich das Ferment, welches die Milchsäuregährung des Milchzuckers veranlasst, fertig gebildet enthält.“

Es wurden daher 2 Portionen von je 20 Ccm. frischer Milch abgemessen, die eine erst 3 Stunden bei 35° stehn gelassen, um dadurch möglicherweise dem Ferment Zeit zur Entwicklung zu geben, und dann durch das 15fache Volumen 96 % Alkohol gefällt, die zweite wurde dagegen sofort unter dieselbe Menge Alkohol gebracht. Nachdem beide Milchportionen 8 Tage so gestanden hatten, wurde der Alkohol abfiltrirt, der Rückstand getrocknet, zerrieben, 1/2 Stunde mit 20 Ccm. H₂O extrahirt und filtrirt. Die Reaction des Filtrats war schwach sauer. Vor dem Versuch wurden beide Filtrate neutralisirt.

Es wurden nun gleiche Theile dieser das präsumirte Ferment enthaltenden Flüssigkeiten mit saturirten Milchzuckerlösungen, ausserdem noch eine Milchzuckerlösung mit H₂O in demselben Verhältniss gemischt. Diese 3 Mi-

schungen, deren Reaction neutral war, wurden bei 35° stehn gelassen. Nach Verlauf von 48 Stunden war die Reaction der beiden Mischungen, die das präsumirte Ferment enthielten, schwach sauer. Diese Reaction war bei derjenigen, die die Fermentlösung aus gewärmter Milch enthielt, schon 24 Stunden früher eingetreten. Es schien also das Wärmen der Milch vor dem Fällen durch Alkohol das Ferment zur stärkeren Entwicklung gebracht zu haben. Von Tag zu Tag wurde nun die saure Reaction stärker. Die mit H₂O verdünnte Milchzuckerlösung blieb, wie schon oben erwähnt, stets neutral.

Die Reaction der neutralisirten Fermentlösungen blieb 8 Tage hindurch neutral, erst nach Verlauf dieser Zeit stellte sich bei der aus ungewärmter Milch gewonnenen Lösung schwachsaure Reaction ein, die zweite reagirte selbst noch nach 23 Tagen neutral, obwohl sie sich sehr wirksam gezeigt hatte. Die Gegenwart des aus der Milch stammenden Milchzuckers in der Fermentlösung erklärt das Entstehen der sauren Reaction in der vorher neutralisirten Lösung. Auch bei den noch später dargestellten Fermentlösungen stellte sich schliesslich stets saure Reaction ein, am schwächsten und langsamsten bei der durch Glycerin extrahirten.*

Aus diesen Versuchen folgt, dass in der Milch ein säurebildendes Ferment enthalten sein muss, das den Milchzucker in Milchsäure umsetzt und durch diese wohl das Casein bei der Spontangerinnung fällt. Sollte die letzte Annahme richtig sein, so musste es ja möglich sein, die Menge Säure, die sich bei der Spontangerinnung entwickelt, zu bestimmen und durch Hinzufügen derselben

³²⁾ Virchow Archiv. l. c. S. 429.

zu frischer Milch das Casein aus derselben vollständig zu fällen.

Es wurde daher eine Portion amphoter reagirender Milch bei Zimmertemperatur zum Säuern, eine zweite Portion derselben Milch in Eiswasser gestellt. Nachdem die Milch spontan geronnen, wurde das Serum abfiltrirt und die in 20 Ccm. desselben enthaltene Säure durch 0,5 % NHO-lösung neutralisirt, es bedurfte dazu 3,4 Ccm. 3,4 Ccm. dieser NHO-lösung wurden darauf mit 0,5 % Milchsäure³³⁾ neutralisirt, dazu waren 17,0 Ccm. nöthig. Nun wurden 20 Ccm. der in Eiswasser gestandenen Milch, ihre Reaction war noch amphoter, mit 17,0 Ccm. der 0,5 % Milchsäure gefällt. Die Fällung war deutlich, doch blieb ein grosser Theil ungefällt; um sie zu vervollständigen mussten noch 5 Ccm. der Säure hinzugefügt werden.

Nun war aber folgender Umstand zu berücksichtigen. Die Milch war bei 20° spontan geronnen, die Temperatur der aus dem Eiswasser genommenen Milch betrug aber nur 8°. Es wurden daher andere 20 Ccm. der Milch auf 20° erwärmt und nun durch 17 Ccm. Säure gefällt, die Fällung war nun fast vollständig. Ein zweiter Versuch gab genau dasselbe Resultat.

Zu diesen beiden Versuchen hatte die spontan geronnene Milch 24 Stunden bei 20° gestanden; sobald sie gegallert war, wurde sie zu den Versuchen benutzt. Nun wurde noch ein dritter Versuch angestellt, zu diesem aber Milch genommen, welche statt 24 Stunden 36 Stunden bei 20° ge-

³³⁾ Um diese darzustellen, wurde 0,25 Ccm. concentrirter Milchsäure, deren sp. Gewicht 1,24 betrug und 3% H₂O enthielt, mit 60 Ccm. H₂O gemischt.

standen hatte. Um in diesem Fall 20 Ccm. Serum zu neutralisiren, waren 4,6 Ccm. 0,5 % NHO-lösung nöthig. Es entsprachen also dies Mal der entwickelten Säure nicht 17 Ccm., sondern 23 Ccm. 0,5 % Milchsäure. Wurden diese nun zu 20 Ccm. der in Eiswasser gestandenen Milch, nachdem sie auf 20° erwärmt worden, hinzugefügt, so trat vollständige Fällung ein. Es hatte sich dadurch, dass die Milch 12 Stunden länger, als zu den beiden vorigen Versuchen bei 20°, gestanden hatte, eine grössere Menge Säure gebildet.

Wir sehen hieraus, dass unsere Annahme in Bezug auf die Spontangerinnung richtig war. Eine vollständige Fällung durften wir durch die Säuremenge, die sich in 24 Stunden entwickelt hatte, wohl kaum erwarten, da bei der Spontangerinnung die Temperatur von 20° 24 Stunden auf die Milch eingewirkt hatte, wir aber diese Temperatur bei unsern Versuchen nur wenige Minuten auf die Milch einwirken lassen konnten. Wir hatten aber gefunden, dass die Temperatur bei der Fällung eine Rolle spielte. Andererseits konnte es auch möglich sein, dass die Fällung des Casein bei der spontanen Gerinnung in 24 Stunden nicht vollkommen erfolgt war.

Um nun auch zu constatiren, ob dies Ferment durch Glycerin extrahirbar ist, so wurden 50 Ccm. frischer Milch, nachdem sie 3 Stunden bei 35° gewärmt worden, durch 600 Ccm. 96 % Alkohol gefällt, nach 4 Tagen der Alkohol abfiltrirt, $\frac{2}{5}$ des noch feuchten Rückstandes auf dem Filtrum mit etwa 30 Ccm. Glycerin verrieben und 48 Stunden stehn gelassen. Darauf wurde diese Masse durch Leinwand geschlagen, abermals durch das 10fache

Volumen 96 % Alkohol gefällt und 48 Stunden stehn gelassen. Nachdem nun der Alkohol abfiltrirt, wurde der Rückstand im Vacuum getrocknet, zerrieben, mit 10 Ccm. H_2O $\frac{1}{2}$ Stunde extrahirt und filtrirt, das Filtrat reagirte neutral.

Das übriggebliebene, etwa 30 Ccm. Milch entsprechende Alkoholcoagulum wurde, wie angegeben, mit Wasser extrahirt. Die Fermentlösung reagirte schwach sauer, wurde darauf neutralisirt. Es wurden nun je 5 Ccm. saturirter Milchzuckerlösung 1) mit 5 Ccm. der gewöhnlichen Fermentlösung und 2) mit 5 Ccm. der durch Glycerin extrahirten Fermentlösung zusammengebracht und bei 35° stehn gelassen. Bei № 1 stellte sich die saure Reaction schon nach 24 Stunden ein, bei № 2 erst später. Nach Verlauf von 120 Stunden wurde die entwickelte Säure durch 0,5 % NH_4OH -Lösung bestimmt, № 1 bedurfte 0,68 Ccm., № 2 0,22 Ccm. derselben bis zur Neutralisation.

Es ist hiernach also das säurebildende Ferment der Milch durch Glycerin extrahirbar, es wirkt aber in dieser Form bedeutend schwächer, wie es gewöhnlich der Fall bei den durch Glycerin extrahirten Fermenten ist.

Da es nach den Versuchen des folgenden Abschnitts den Anschein hatte, dass die Gährungsfähigkeit des Milchzuckers durch Eindampfen aus einer Lösung auf dem Dampfbade, also etwa bei 80—90°, vermindert werde, wir aber in der gesammten Literatur darüber keine Angabe finden konnten, so wurden 5 Ccm. einer saturirten Milchzuckerlösung abgedampft und darauf wieder durch 5 Ccm. H_2O gelöst, die Lösung war strohgelb und reagirte neutral. Es wurden nun 5 Ccm. der Fermentlösung

1) mit 5 Ccm. saturirter Milchzuckerlösung und 2) mit den 5 Ccm. der zuerst eingedampften Milchzuckerlösung zusammengebracht und bei 35° stehn gelassen. Die Reaction beider Flüssigkeiten war neutral. Nach 24 Stunden reagirten beide sauer, nach 120 Stunden wurde die Säuremenge bestimmt, № 1 bedurfte 0,77 Ccm., № 2 0,70 Ccm. 0,5 % NH_4OH -Lösung bis zur Neutralisation. Der hier gefundene Unterschied von 0,07 Ccm. der NH_4OH -Lösung entspricht 0,35 Ccm. 0,5 % Milchsäure. Dieser Unterschied würde aber zu Gunsten unserer Annahme sprechen.

Fassen wir die Befunde dieses Abschnitts zusammen, so können wir folgende Schlüsse ziehen. 1) Die Milch enthält ein Ferment, das die Fähigkeit besitzt den Milchzucker in Milchsäure umzusetzen. 2) Dies säurebildende Ferment ist durch Glycerin extrahirbar. 3) Um eine energisch wirkende Fermentlösung zu erzielen, erscheint es vortheilhaft, die Milch vor dem Fällen durch Alkohol wenigstens 3 Stunden zu wärmen. 4) Die bei der Spontangerinnung der Milch entwickelte Säure genügt, um das Casein einer gleich grossen Quantität frischer Milch vollkommen zu fällen. 5) Das bei der Spontangerinnung ausgeschiedene Casein entspricht seinem chemischen Verhalten nach dem durch eine Säure gefällten Casein.

III.

Ueber das durch die Diffusion rein dargestellte Casein.

Die Voraussetzung, von der wir beim Anstellen unserer Untersuchungen mittelst der Diffusion ausgingen, war folgende. Es sollte das Casein vollständig von allen crystalloiden Bestandtheilen befreit werden, um dann dasselbe auf seine Reactionen zu prüfen. Es liess sich hoffen, dass dieses reine Casein ebenso neue Reactionen darbieten würde, wie das salzfreie Albumin.³⁴⁾

Wir bedienten uns zu dem Zweck derselben Methode, die Aronstein anwandte, nur stand uns nicht mehr das feine englische Pergamentpapier zu Gebot, sondern A. Schmidt hatte unterdessen eine neue Sendung englischen Pergamentpapiers aus der Fabrik des Herrn de la Rue erhalten³⁵⁾, das, wenn auch nicht so ausgezeichnet wie jenes, doch für unsere Untersuchungen zu genügen versprach. A. Schmidt hebt allerdings an dieser Stelle hervor, dass dieses Pergament das frühere wo möglich an Güte noch übertrifft, doch theilte er mir beim Beginn

³⁴⁾ Aronstein: Ueber Darstellung salzfreier Albuminlösungen mittelst der Diffusion. Pflüger Archiv. Bd. VIII. S. 75.

³⁵⁾ A. Schmidt, Pflüger Archiv. Bd. VIII. S. 94.

meiner Untersuchungen mit, dass sich dieses nach häufigerer Anwendung desselben als unrichtig herausgestellt hat.

Die Milch wurde gewöhnlich vor dem Gebrauch einige Stunden stehen gelassen, damit sich der Rahm an der Oberfläche ansammle, um so möglichst fettfreie Milch zur Diffusion zu verwenden. Die Dialysatoren wurden in einem Zimmer aufgestellt, in welchem die Temperatur durchschnittlich 18° betrug. Aufbewahrt wurden dagegen die gewonnenen Stoffe, wie Caseinlösungen, Diffusate u. s. w. in einem Zimmer, dessen Temperatur etwa 10° betrug, auch alle länger dauernden Prozesse, wie Filtriren u. s. w. wurden in demselben vorgenommen. Die Pergamentfläche der Dialysatoren betrug im Durchmesser 8,5 Cm., aufgebracht wurden von der zu diffundirenden Flüssigkeit auf jeden Dialysator 25 Ccm., das äussere Wasser betrug immer das 16 bis 20fache des Inhalts, dasselbe wurde 8 Mal täglich gewechselt. Die obere Oeffnung des Dialysators war mit einem durchbohrten Korken, in dem sich eine gebogene Glasröhre befand, geschlossen.

Um nun das Casein möglichst salz- und zuckerfrei zu erhalten, bedurfte es einer Diffusion von etwa 6 Tagen Dauer. Um dieses aber zu erreichen, durfte der Inhalt nicht während der ganzen Zeit auf demselben Dialysator bleiben, sondern musste nach Verlauf von 3 Tagen auf einen neuen übertragen werden, da sonst derselbe zerriss, was bei der Diffusion des Blutserum oder Hühnereiweiss kaum vorkommt. Doch hat das seinen Grund darin, dass bei der Diffusion der Milch die Menge des aufgenommenen Wassers bedeutend grösser ist, als bei der Diffusion

des Blutserum, folglich auch der auf die Membran ausgeübte Druck.

Die Verhältnisse bei der Diffusion der Milch liessen sich in keiner Weise regeln, bald war die Menge des hinzugetretenen Wassers eine sehr grosse, bis 200%, bald eine geringe, 25 bis 50% betragende, zuweilen auch selbst eine noch geringere. Die Unregelmässigkeit lässt sich nur auf die Verschiedenartigkeit des Pergamentpapiers beziehen, da im Uebrigen stets die gleichen Verhältnisse hergestellt wurden.

Anfangs wurde das Papier vor dem Aufbinden auf den Dialysator eine Stunde in destillirtem Wasser liegen gelassen, später dagegen nur einige Minuten, da davon möglicherweise die Zerreislichkeit abhängig sein konnte, doch fand sich dabei kein Unterschied. Nachdem dann das Papier trocken geworden, wurde der Dialysator frei aufgehängt und einige Ccm. H_2O in denselben gebracht, um ihn auf seine Brauchbarkeit zu prüfen, da dem blossen Auge leicht kleine Löchelchen entgangen sein konnten. Nur wenn nach etwa 10 Minuten die äussere Fläche der Membran vollkommen trocken geblieben war, wurde der Dialysator gebraucht.

Der vom Dialysator gewonnene Inhalt wurde durch ein fünffaches Filtrum filtrirt, dass erst mit verdünnter HCl und darauf 15 Mal mit destillirtem Wasser ausgewaschen worden war, um einerseits ja jede Spur von Salzen, die im Filtrirpapier enthalten, andererseits die HCl zu entfernen. Das Filtrat war meist stark opalisirend, nur einmal fast vollkommen wasserhell, es liess sich in diesem Fall in demselben weder Casein, noch Albumin nachwei-

sen. Alles zur Diffusion verwendete Wasser wurde in einem Gefäss aufgefangen und dann auf dem Dampfbade auf ein etwa der Hälfte der zur Diffusion verwendeten Milchmenge entsprechendes Volumen eingedampft, alsdann durch ein ebenso salzfrei gemachtes Filtrum filtrirt. Nach 6tägiger Diffusion schied sich das Casein in feinkörniger Gestalt auf dem Dialysator aus, es hatte ein schneeweisses Aussehn. Die Aschenanalyse³⁶⁾ desselben ergab noch Spuren phosphorsauren Kalks, der Kalk, so wie die löslichen Salze der Milch waren vollständig entfernt worden. Auch liess sich im Inhalt des Dialysators selbst schon nach 3tägiger Diffusion durch die Trommer'sche Probe keine Spur von Zucker nachweisen.

Wurde das Casein mit wenig NH_4OH -Lösung zusammengebracht, so ballte es sich zu einer gallertartigen Masse zusammen, die weder in NH_4OH -Lösung, noch in \bar{A} , noch in $NaCl$ -Lösung löslich war. Ebenso wenig löste es sich in dem eingeeengten Diffusat wieder auf. Schüttelte man das Casein einige Mal mit Aether, um die Fette zu entfernen, so wurde es ebenfalls zusammengeballt und löste sich dann in keinem der genannten Reagentien. Unter dem Mikroskop fanden sich in dieser mit Aether geschüttelten Flüssigkeit sehr feine Eiweisskörnchen, kein Fett.

Da es bei den spätern Versuchen von Interesse erschien, die Wärme beim Einengen des Diffusats zu vermeiden, so wurde zu dem Zweck folgender Weg eingeschlagen. Es wurden 40 Ccm. abgestandener Milch auf

³⁶⁾ Dieselbe wurde nach den von Hoppe-Seyler, Handbuch der chemischen Analyse 1870 S. 234 ff., angegebenen Methoden gemacht.

zwei Dialysatoren gebracht, deren Durchmesser 6,5 Cm. betrug. Jeder Dialysator wurde in ein kleines Gefäss gestellt, in dem sich 30 Ccm. H_2O befanden und 24 Stunden stehn gelassen, ohne das Wasser zu wechseln. Als dann wurde das Diffusat, dessen Gesamtmenge durchschnittlich 43 Ccm. betrug, über SO^3 im Vacuum auf 20 Ccm. eingeengt und wurde, nachdem es neutralisirt worden, da seine Reaction stets schwach sauer war, so zu den Versuchen benutzt.

Es geht also aus dem angeführten Verhalten des auf diese Weise gewonnenen Casein hervor, dass sich mit demselben keine Versuche anstellen liessen, weil es bei der Ausscheidung vollkommen unlöslich geworden. Der Grund für dies eigenthümliche Verhalten ist nach den mir freundlichst mitgetheilten Untersuchungen von A. Schmidt — dieselben kommen in nächster Zeit zur Veröffentlichung — die lange Dauer des Stehens auf dem Dialysator, alle Alkalialbuminate werden dadurch schwerer löslich.

Um mich selbst von diesem Verhalten zu überzeugen, stellte ich mir nach bekannter Methode aus angesäuertem Rinderblutserum fibrinoplastische Substanz dar. Die aus 100 Ccm. Blutserum gewonnene Masse wurde in 40 Ccm. H_2O vertheilt und durch 0,8 Ccm. einer 0,25 % NH_4OH -Lösung gelöst, darauf filtrirt. 10 Ccm. dieser in NH_4OH -Lösung gelösten fibrinoplastischen Substanz wurden auf einen Dialysator gebracht und 6 Tage auf demselben stehn gelassen. Das Wasser wurde 4 Mal täglich gewechselt. Beim Abnehmen fand sich die fibrinoplastische Substanz in sehr fein vertheiltem Zustande auf dem Dialysator ausgeschieden, da durch die Diffusion das zugesetzte Natron entfernt wor-

den war. Darauf wurden die Lösungsverhältnisse der ursprünglich auf den Dialysator gebrachten und der vom Dialysator gewonnenen fibrinoplastischen Substanz verglichen. Es stellte sich heraus, dass die vom Dialysator gewonnene Substanz, sowohl in sehr verdünnter NH_4OH -Lösung, wie in ebensolcher \bar{A} 6 Mal schwerer löslich war, als die ursprünglich auf den Dialysator gebrachte. Dieser Versuch bestätigte also vollkommen die bei dem Casein gemachte Erfahrung, nur dass letzteres in einen vollkommen unlöslichen Zustand übergegangen war.

Um diesen Uebelstand zu vermeiden, mussten wir also einen andern Weg einschlagen, von dem wir hoffen durften, in kürzerer Zeit reines Casein vermittelst der Diffusion zu gewinnen.

Da mit Sicherheit zu erwarten war, dass aus dem durch Säure gefällten Casein ein grosser Theil der crystalloiden Bestandtheile der Milch durch decantiren sich würde entfernen lassen, so wurde folgende Methode eingeschlagen.

400 Ccm. Milch, die 24 Stunden gestanden hatten, wurden nach Entfernung des Rahms mit 2000 Ccm. H_2O verdünnt und das Casein aus denselben durch eine genügende Menge \bar{A} gefällt. Nachdem dasselbe sich auf dem Boden des Gefässes gesammelt hatte, wurde es 6 Mal mit 2000 Ccm. Wasser decantirt und filtrirt. Das so dargestellte Casein wurde nun in 200 Ccm. H_2O vertheilt, durch tropfenweises Zusetzen von NH_4OH -Lösung unter Vermeiden eines Ueberschusses desselben gelöst und durch ein fünffaches Filtrum filtrirt, um die Fette zurückzuhalten.

Um diesen Zweck möglichst vollkommen zu erreichen, wurde die Caseinlösung ausserdem noch 3 Mal mit überschüssigem Aether geschüttelt — die Reactionen des Casein hatten sich dadurch in keiner Weise geändert — und nun nach Entfernung des Aethers für die Diffusion verwendet. Die Trommer'sche Probe ergab jedes Mal bei Untersuchung dieser Caseinlösung ein negatives Resultat, der Milchzucker war also schon durch das Decantiren vollständig entfernt worden.

Es wurden nun je 25 Ccm. der alkalischen Caseinlösung auf 2 Dialysatoren gebracht, das Wasser alle halbe Stunde gewechselt. Doch waren noch nicht 24 Stunden darüber vergangen, so riss die Membran, da sie durch die in der Lösung vorhandene NHO vollständig macerirt worden war. Es wurde daher fernerhin das Wasser 4 Stunden hindurch alle viertel Stunde gewechselt, dann der Inhalt herausgenommen, auf 2 neue Dialysatoren vertheilt und nun das Wasser alle halbe Stunde getauscht. Nach 24 Stunden wurde der Inhalt zu den Versuchen benutzt. Auf diese Weise wurde dem Zerreißen der Membran vorgebeugt und eine Caseinlösung gewonnen, die, wenn auch nicht vollkommen von allen anorganischen Bestandtheilen befreit, doch dieselben nur in unwägbaren Spuren enthielt. Constant fanden sich nur die unlöslichen Milchsalze, einige Mal phosphorsaures Natron und ein Mal auch schwefelsaure Salze. Die Reaction der vom Dialysator gewonnenen Caseinlösung war meist deutlich alkalisch, nur ein Mal vollkommen neutral, der grösste Theil des Natron war durch die Diffusion ausgeschieden worden.

Wurde die Lösung des reinen Casein mit überschüssigem Aether geschüttelt, so ballte sich das Casein zusammen. Durch lange dauernde Einwirkung einer Temperatur von 35°, so wie durch Kochen wurde sie nicht verändert. Wurde sie 24 Stunden und mehr bei 35° mit Lablösung digerirt, so trat leichte Trübung ein, doch kam es nie zur Gerinnung des Casein, wie es Hammarsten ³⁷⁾ bei seiner milchzuckerfreien Caseinlösung fand.

Da dies reine Casein durch Hinzufügen von Lablösung und Digeriren nicht coagulirt wurde, so war anzunehmen, dass im Diffusat der Milch ein Bestandtheil enthalten sei, der hinzugefügt, wieder die Gerinnung vermitteln würde. Oder es musste das Casein durch die Diffusion verändert worden sein.

Es wurden daher gleiche Theile der Caseinlösung, des neutralisirten, kalt eingeeengten Diffusats und neutralisirte Lablösung einige Zeit auf dem Dampfbade bei etwa 45° digerirt. Schon während der Digestion trat Trübung ein, die beim Stehn bei 35° immer stärker wurde und schliesslich in vollständige Gerinnung überging. Die Gerinnsel waren anfangs fein vertheilt, stellten aber nach etwa 30 Stunden feste, zähe Massen dar, die sich mit einem Glasstäbchen nur schwer zertheilen liessen. Die Reaction der Flüssigkeit war während des Erwärmens neutral, ging aber während des Stehns bei 35° in saure über. Alles Casein war aus dieser Lösung coagulirt worden, denn durch \bar{A} und Ferrocyankalium liess sich im Filtrat kein Eiweiss nachweisen. Zum Lösen dieses

³⁷⁾ l. c. S. 120.

geronnenen Casein, auf 5 Ccm. der Caseinlösung bezogen, bedurfte es 2,0 Ccm. 1% NHO₂-Lösung, in \bar{A} war es sehr schwer, in NaCl-Lösung gar nicht löslich.

Wurde eine Caseinlösung angewendet, aus welcher die Fette durch Schütteln mit Aether vor dem Aufbringen auf den Dialysator nicht entfernt worden waren, so erhielt man ganz dieselben Befunde, nur waren hier die Gerinnsel nicht festgeballt und zäh, sondern fein vertheilt, die Flüssigkeit hatte mehr das Ansehn einer Emulsion. Die Lösungsverhältnisse waren dieselben.

Fügte man der Mischung von Casein- und Lablösung anstatt des im Vacuum eingeengten heisses, d. h. auf dem Dampfbade eingeengtes, Diffusat hinzu, so stellte sich ebenfalls Gerinnung ein, doch waren alsdann noch Spuren des Casein nicht coagulirt worden, auch war das Casein in NHO₂-Lösung, sowie in \bar{A} etwas leichter löslich. Es schien also das heiss eingeengte Diffusat weniger energisch zu wirken, als das kalt eingeengte.

Hiernach war es also erwiesen, dass das Casein durch die Diffusion nicht verändert worden war, da es seine Eigenschaft, durch Lablösung coagulirt zu werden, nicht verloren hatte und dass im Diffusat ein Bestandtheil enthalten war, der die Coagulation des reinen Casein durch Lab vermittelte.

Die Bestandtheile des Diffusats sind aber der Milchsucker, die löslichen und unlöslichen Salze und die Extractivstoffe. Da nun Aronstein³⁸⁾ nachgewiesen hat, dass bei dem Albumin die Salze die vermittelnde Rolle

³⁸⁾ Pflüger Archiv Bd. VIII l. c. S. 85.

bei der Alkohol- und Hitzeagerinnung des Albumins übernehmen, so lag es nah, auch bei der Coagulation des reinen Casein, ihnen diese Eigenschaft zuzuschreiben. Es wurde daher eine Portion des Diffusats abgedampft, der Rückstand gegläht und mit kochendem Wasser die Asche extrahirt. Auf diese Art wurden die löslichen Salze der Milch gewonnen. Diese Lösung derselben wurde nun der mit Lablösung gemischten Caseinlösung, sowohl einer Fette enthaltenden, wie einer fettfreien hinzugefügt, alsdann die Mischungen 20 Min. bei 45—50° digerirt und darauf bei 35° längere Zeit stehn gelassen. Bei der Caseinlösung ohne Fette trat keine Veränderung ein, bei der die Fette enthaltenden, Opalescenz; Gerinnung stellte sich nicht ein, eben so wenig wenn statt der löslichen Salze des Diffusats einige Tropfen 25% NaCl-Lösung hinzugefügt wurden. Dieser Versuch wurde mehrmals wiederholt, jedes Mal mit demselben Resultat. Hiernach konnten also die löslichen Salze des Diffusats nicht der gesuchte Bestandtheil sein, der zur Gerinnung nothwendig war. Es wurden daher nun Versuche mit dem Milchsucker angestellt.

Bei den folgenden Versuchen haben alle Zahlen auf 5 Ccm. der vom Dialysator gewonnenen Caseinlösung Bezug. Diese wurden jedes Mal mit 5 Ccm. der neutralisirten Lablösung gemischt, dann auf dem Dampfbade 20 Min. bei 45—50°³⁹⁾ digerirt und darauf bei 35° längere Zeit stehn gelassen. Wo von dem eben angeführten

³⁹⁾ Diese Temperatur wurde auf den Rath von Heintz (Lehrbuch der Zoochemie S. 700) gewählt.

Verfahren abgewichen wurde, ist es speciell bemerkt. Die Reaction der Gesamtmflüssigkeiten war stets neutral oder schwach alkalisch, nach dem Erwärmen hatte sich nie saure Reaction eingestellt. Da beim Digeriren einige Ccm. H_2O verdunsteten, so wurde der Verlust durch ebenso viel Ccm. H_2O ersetzt, um stets den gleichen Concentrationsgrad zu haben. Ferner ist noch zu bemerken, dass überall wo in Folgendem die Lösungsverhältnisse in NH_4OH -Lösung und in \bar{A} angegeben werden, zu den Versuchen zwei getrennte Portionen genommen wurden, da nach der Coagulation des Casein, sich dieses nicht mehr genau in zwei Hälften theilen liess.

Wie erwähnt, wurden zu den folgenden Versuchen stets 5 Ccm. der reinen Caseinlösung genommen, um dadurch den Zahlen, die bei dem Lösen des ausgeschiedenen Casein in NH_4OH -Lösung resp. \bar{A} gewonnen wurden, wenigstens einen relativen Werth zu geben. Es liess sich nämlich die absolute Menge des in der reinen Caseinlösung enthaltenen Casein durch Rechnung nicht bestimmen, da die nach der Diffusion erhaltenen Caseinlösungen bald mehr, bald weniger durch das hinzugetretene Wasser diluirt worden waren, die Unterschiede betrugten höchstens 40%, und auch beim Decantiren des Casein sich nie ein Verlust vermeiden liess. Um jedem Missverständnisse vorzubeugen, sei noch erwähnt, dass die in diesem Abschnitt gegebenen Zahlen in keiner Beziehung zu denen des ersten stehn.

Um bei den Versuchen mit Milchzucker die ihm ursprünglich anhängenden Extractivstoffe ausschliessen zu können, wurde zu denselben nur der durch Alkohol gereinigte verwendet. Die bei diesen Versuchen angeführten

Ccm. der Milchzuckerlösungen beziehen sich auf eine saturirte Lösung, zu welcher Wasser von etwa 18° benutzt wurde.

Versuch I. Es wurde sowohl die fettfreie, wie die Fette enthaltende Caseinlösung mit Lab und 5 Ccm. Milchzuckerlösung gemischt. Während des Erwärmens auf $45-50^\circ$ trat bei der Fette enthaltenden Mischung Opalescenz ein. Nach Verlauf von 30 Stunden reagirten beide Mischungen stark sauer, alles Casein war geronnen. Dasselbe wurde darauf in 1% NH_4OH -Lösung gelöst, das aus der fettfreien Caseinlösung gewonnene Casein bedurfte dazu 1,1 Ccm., das aus der Fette enthaltenden 1,2 Ccm. derselben.

Da die Lösungsverhältnisse des Casein aus beiden Caseinlösungen hiernach dieselben waren, so wurde zu den folgenden Versuchen nur die fettfreie Caseinlösung genommen.

Versuch II. Es wurden 3 Portionen der Caseinlösung mit Lab gemischt und zu № 1 5 Ccm., zu № 2 2,5 Ccm. und zu № 3 1,25 Ccm. Milchzuckerlösung hinzugefügt. Was bei diesem und dem nächsten Versuch an 5 Ccm. der Milchzuckerlösung fehlte, wurde durch Wasser ersetzt. Nach Verlauf von 20 Stunden war bei allen 3 Portionen Gerinnung eingetreten, die Reaction war bei № 1 und 3 neutral, bei № 2 schwach sauer. Nach Verlauf von 44 Stunden war die Reaction bei allen 3 Portionen stark sauer geworden. Die Menge des geronnenen Casein schien sich dabei in den letzten 24 Stunden nicht vermehrt zu haben. Zur

Lösung bedurfte das Casein aus № 1 1,0 Ccm., aus № 2 1,2 Ccm. und aus № 3 1,2 Ccm. 1 % NHOlösung.

Diese beiden Versuche, namentlich der zweite ergeben also, dass der von uns gesuchte bei der Gerinnung des reinen Casein durch Lab mitwirkende Bestandtheil des Diffusats der Milchzucker ist.

Versuch III. Es wurden wieder 3 Portionen Caseinlösung mit Lablösung gemischt. Zu № 1 1,0 Ccm., zu № 2 0,5 Ccm. und zu № 3 0,25 Ccm. Milchzuckerlösung hinzugefügt. Während № 2 und 3 auf dem Dampfbade gewärmt wurden, trat bei ihnen Trübung ein, die Reaction war unterdessen neutral geblieben. Bei der Mischung № 1, die etwa eine Stunde bei gewöhnlicher Zimmertemperatur gestanden hatte, hatte sich flockige Gerinnung eingestellt, auch hier war die Reaction neutral geblieben. Ohne die Mischung № 1 auf dem Dampfbade zu wärmen, wurde sie nebst № 2 und 3 bei 35° fortgestellt. Nach Verlauf von 18 Stunden war die Reaction bei allen 3 Portionen sauer, bei № 2 und 3 jedoch schwächer, als bei № 1. Die Gerinnung war überall vollständig. Nach Verlauf von 44 Stunden war die Reaction bei № 1 stark sauer, bei № 2 weniger stark und bei № 3 am schwächsten sauer. Zur Lösung bedurfte das geronnene aus № 1 1,2 Ccm., aus № 2 1,0 Ccm. und aus № 3 Casein 0,9 Ccm. 1 % NHOlösung.

Dieser letzte Versuch scheint es zu beweisen, dass sich aus dem Milchzucker eine Säure, wohl Milchsäure entwickelt. Denn je weniger von der Milchzuckerlösung hinzugefügt wurde, desto schwächer war die saure Reaction. Auch scheint die Löslichkeit des geronnenen Ca-

sein von der Menge des hinzugesetzten Milchzuckers abhängig zu sein, wie es die ganze Reihe der gefundenen Zahlen darthut.

Ferner wurden Versuche mit dem Diffusat angestellt.

Versuch IV. Es wurden 20 Ccm. frischen Diffusats, die aus 40 Ccm. Milch gewonnen worden waren, getheilt. 10 Ccm. wurden im Vacuum eingeengt, die 10 übrigen auf dem Dampfbade abgedampft. Nachdem dieses geschehen, wurden beide Rückstände wiederum in je 10 Ccm. H₂O gelöst. Der kalt eingeengte löste sich leichter. Diese Lösung (I) war ganz klar. Der durch Abdampfen gewonnene Rückstand löste sich schwerer, diese Lösung (II) war trübe, flockig und dunkelstrohfarben, sie wurde daher filtrirt. Da beide Lösungen deutlich sauer reagirten, so wurden sie zum Versuch neutralisirt. Von diesen Lösungen wurden nun zur Casein- und Lablösung je 5 Ccm. hinzugefügt. Während des Erwärmens auf 45—50° zeigte sich keine Trübung. Nach Verlauf von 21 Stunden war die Reaction bei beiden Mischungen sauer geworden, bei der, welche das kalt eingeengte Diffusat enthielt, war schon Gerinnung eingetreten, bei der andern trat sie erst einige Stunden später ein. Zur Lösung des Casein aus der Mischung mit I waren 2,5 Ccm. 1 % NHOlösung und 40,0 Ccm. 2 % \bar{A} nöthig, zur Lösung des Casein aus der Mischung mit II bedurfte es 2,0 Ccm. 1 % NHOlösung und 37,0 Ccm. 2 % \bar{A} . Auch dieser Versuch sprach für die energischere Wirksamkeit des kalt eingeengten Diffusats.

Versuch V. Kalt eingeengtes Diffusat, das erst vor

2 Tagen gewonnen worden war, hatte sich in dieser Zeit, obwohl es bei 10° gestanden, getrübt, es wurde daher vor dem Versuch filtrirt und darauf neutralisirt. Nachdem 5 Ccm. dieses Diffusats mit der Casein- und Lablösung gemischt worden, wurde die Mischung gewärmt. Schon nach Verlauf von 3 Minuten trat flockige Gerinnung ein, die Mischung wurde daher nicht weiter auf dem Dampfbade erwärmt, sondern bei 35° fortgesetzt. Auch war in dieser Zeit die neutrale Reaction durch das Erwärmen in eine schwach alkalische übergegangen⁴⁰⁾. Nach Verlauf von 20 Stunden war die Reaction der Mischung deutlich sauer geworden, die Gerinnung vollständig eingetreten. Zur Lösung bedurfte das Casein 1,0 Ccm. 1% NH₄O₂-Lösung.

Dieser Versuch wurde mit Versuch II gleichzeitig an gestellt. Dort war nach Verlauf von 20 Stunden die Reaction der Mischungen schwach sauer resp. neutral, hier dagegen stärker sauer. Erklären lässt sich dieser Unterschied der Reaction leicht, wenn man die Extractivstoffe des Diffusats berücksichtigt, die bei Versuch V zugegen, bei Versuch II ausgeschlossen waren.

Versuch VI. Das zu diesem Versuch angewendete kalt eingeengte Diffusat war aus Milch gewonnen, die vor dem Aufbringen auf den Dialysator stark sauer reagirte und deren Casein durch blosses Erwärmen bis auf 50° schon gefällt wurde. Als der Dialysator nach 24 Stunden abgenommen wurde, war die Milch in demselben spontan geronnen. 5 Ccm. dieses Diffusats, nachdem sie neutra-

lisirt worden, wurden mit der Casein- und Lablösung gemischt. Nachdem diese Mischung kurze Zeit bei Zimmer-temperatur gestanden, trat flockige Gerinnung ein, dieselbe wurde durch momentanes Erwärmen bis auf 45° noch vervollständigt. Die Reaction war vor dem Erwärmen neutral, nach demselben schwach alkalisch. Das coagulierte Casein wurde darauf sofort durch 1% NH₄O₂-Lösung gelöst, es bedurfte dazu 0,8 Ccm. derselben. Dass in diesem Fall weniger NH₄O₂-Lösung zur Lösung nöthig war, wurde wohl durch die schwach alkalische Reaction bedingt. In den übrigen Fällen reagirte ja die Flüssigkeit, in der das Casein sich befand, stark oder wenigstens deutlich sauer, es musste daher ein Theil der NH₄O₂-Lösung zur Neutralisation der Säure verbraucht werden.

Versuch VII. Zu diesem Versuch wurden 5 Ccm. kalt eingeengten Diffusats frisch benutzt, nachdem es vorher neutralisirt worden war. Schon während des Erwärmens trat ziemlich starke Trübung ein, die Reaction war vor und nach demselben schwach alkalisch. Nach 24 Stunden war sie deutlich sauer und das Casein coagulirt; dasselbe brauchte 2,5 Ccm. 1% NH₄O₂-Lösung zur Lösung.

Versuch VIII. Es wurde zu diesem Versuch Diffusat aus dem filtrirten Serum spontan geronnener Milch angewendet. Es wurden 40 Ccm. Serum 24 Stunden auf den Dialysatoren in 60 Ccm. Diffusionswasser stehen gelassen, darauf das gewonnene Diffusat auf 20 Ccm. im Vacuum eingeengt. Von diesem Diffusat wurden nun 5 Ccm. der Casein- und Lablösung hinzugefügt, nachdem dasselbe erst neutralisirt worden war. Schon nachdem

⁴⁰⁾ Anf diese Eigenthümlichkeit komme ich noch später zurück.

die Mischung 15 Min. bei Zimmertemperatur gestanden, trat flockige Gerinnung ein. Sie wurde daher nicht weiter auf dem Dampfbade digerirt, sondern bei 35° fortgestellt. Nach Verlauf von 3 Stunden war vollständige Gerinnung eingetreten, nach 7 Stunden war die Reaction noch neutral. Nach 20 Stunden war sie stark sauer, zur Lösung des geronnenen Casein bedurfte es 2,7 Ccm. 1 % NH_4OH -Lösung.

Die Versuche II, III, V, VI, VII und VIII waren mit ein und derselben Caseinlösung angestellt worden. Sie zeichnete sich dadurch aus, dass sie bei der Abnahme vom Dialysator nur ganz schwach alkalisch reagirte. Um nun die Befunde dieser Versuche sicherzustellen, war es nothwendig, dieselben mit einer andern Lösung des reinen Casein zu wiederholen. Es wurde daher eine neue Caseinlösung auf den Dialysator gebracht und dieselbe 27 Stunden diffundiren gelassen, um möglichst das NaO zu entfernen. Das Resultat war über Erwarten gut, die Lösung reagirte neutral.

Da es demnach möglich ist, alles überschüssige NaO aus dem Casein mittelst Diffusion zu entfernen, und dennoch das Casein gelöst bleibt, so geht daraus hervor, dass das NaO , das die Aschenanalyse in dieser neutralreagirenden Lösung des reinen Casein ergeben hatte, in diesem Fall an das Casein chemisch gebunden war, also letzteres hier die Rolle einer Säure spielt. Weiter folgt daraus, dass die Diffusion nicht allein mechanisch wirkt, sondern auch im Stande ist, eine chemische Verbindung wieder zu lösen.

Die Erscheinung, dass eine neutrale Caseinlösung beim Erwärmen schwach alkalisch, oder eine schwach

alkalische, alsdann stärker alkalisch reagirte, stiess mir im Lauf der Untersuchungen sehr oft auf. Auch Kühne⁴¹⁾ und Soxhlet⁴²⁾ machen darauf aufmerksam, dass diese Eigenthümlichkeit sehr vielen Eiweisslösungen eigen ist, in denen das Eiweiss durch ein Alkali gelöst enthalten ist. Eine Erklärung würde vielleicht darin liegen, dass durch das Erwärmen ein Theil des Casein coagulirt wird, — beim Erwärmen wurde sehr oft Trübung beobachtet — wodurch aber das die Lösung des Casein bewirkende Alkali frei werden muss.

Die nun folgenden Versuche wurden nur mit der schon erwähnten, neutralreagirenden Lösung des reinen Casein angestellt.

Versuch IX. Es wurden 3 Portionen der Casein- und Lablösung hergestellt und zu № 1 5 Ccm. des frischen, kalt eingeeengten Diffusats (cf. Vers. VII), zu № 2 5 Ccm. des Diffusats aus Milchserum (cf. Vers. VIII) und zu № 3 5 Ccm. des Diffusats, das aus der auf dem Dialysator spontan geronnenen Milch gewonnen war (cf. Vers. VI), hinzugefügt. Diese Lösungen waren kaum gemischt, so stellte sich bei № 2 und 3 Gerinnung ein, bei № 1 war dies nicht der Fall, diese Mischung wurde daher erst bei 45—50° erwärmt und darauf mit den beiden andern bei 35° fortgestellt. Nach 6 Stunden hatte sich auch bei № 1 etwas Coagulation eingestellt, die Reaction war bei allen 3 Mischungen neutral. Nach 20 Stunden war die Reaction überall sauer, die Gerinnung vollständig. Zur Lösung

⁴¹⁾ l. c. S. 561.

⁴²⁾ l. c. S. 113.

bedurfte das Casein aus № 1 1,9 Ccm., das aus № 2 2,4 Ccm. und das aus № 3 2,3 Ccm. 1 % NHOlösung.

Versuch X. Es wurden zu Mischungen von Casein-, Lab- und 5 Ccm. saturirter Milchzuckerlösung 1) die in Wasser löslichen Salze aus 5 Ccm. Diffusat und 2) 10 Tropfen 25 % NaClLösung hinzugefügt. Diese Mischungen wurden auf dem Dampfbade gewärmt und bei 35° stehn gelassen. Nach 20 Stunden war die Reaction sauer geworden, die Gerinnung vollkommen eingetreten. Zur Lösung brauchte das Casein aus № 1 1,4 Ccm., das aus № 2 1,5 Ccm. 1 % NHOlösung.

Versuch XI. Schliesslich wurde noch ein Versuch mit der Fermentlösung aus der Milch gemacht, sie wurde zu demselben erst neutralisirt. Zu 2 Portionen von je 5 Ccm. Casein- und Fermentlösung wurden 1) 5 Ccm. saturirter Milchzuckerlösung und 2) 5 Ccm. H₂O hinzugefügt. Ohne diese Mischungen auf dem Dampfbade zu digeriren, wurden sie bei 35° fortgestellt. Nach 16 Stunden war die Reaction bei beiden sauer geworden, bei № 1 war sie stärker sauer. Nach 40 Stunden war bei beiden Mischungen Gerinnung eingetreten, auch jetzt erschien die Reaction bei № 1 stärker sauer, als bei № 2. Zur Lösung bedurfte das Casein aus № 1 1,1 Ccm., das aus № 2 1,6 Ccm. 1 % NHOlösung.

Nun sind die Lösungsverhältnisse des Casein aus dem letzten Versuch anfangs auffallend, da wir bei den Versuchen mit Milchzucker und Lab gefunden hatten, dass je mehr von ersterem vorhanden war, desto schwerer löslich das geronnene Casein war.

Die Gerinnungsursachen sind aber auch in beiden Fällen vollkommen verschiedene. Bei Versuch XI ist das Casein nur durch die aus dem Milchzucker mittelst des säurebildenden Ferments entwickelte Milchsäure gefällt worden, wobei es klar ist, dass je weniger Säure sich in der Zeiteinheit bilden kann, desto langsamer die Fällung vor sich gehen muss und zugleich auch der Wärme desto mehr Zeit zur Einwirkung gegeben wird.

Bei den Versuchen mit Milchzucker und Lab dagegen handelt es sich um keine Säurefällung des reinen Casein, da wir ja auch bei neutraler Reaction Coagulation desselben eintreten sahen, sondern um die fermentative Wirkung des Lab, das hier seine Eigenschaft, Casein in eine schwerer lösliche Modification überzuführen, entfaltet; es wirkt nicht als säurebildendes Ferment, wie das der Milch, sondern als ein Eiweissferment. Der Milchzucker wird dabei nicht in Milchsäure verwandelt, (die saure Reaction der Mischung trat ja immer erst nach mehrstündigem Stehn bei 35° ein), sondern er wirkt vielleicht nur durch Contact, ebenso wie die Salze bei dem salzfreien Albumin, die auch chemisch dabei nicht verändert werden.

Noch sprechender für diese Ansicht sind die Versuche mit dem Diffusat, am überzeugendsten Versuch VIII, der mit dem Diffusat aus Milchserum angestellt wurde. Hier trat die Gerinnung schon in der Kälte ein, 3 Stunden später war dieselbe vollständig geworden und 4 Stunden, nachdem diese eingetreten, war die Reaction der darüberstehenden Flüssigkeit noch neutral.

Ferner geht aus den Versuchen hervor, dass nicht

der Milchzucker allein bei der Coagulation des reinen Casein durch Lab eine Rolle spielt, wenn ihm auch die Hauptrolle zugesprochen werden muss. Jedes Mal nemlich, wenn wir anstatt Milchzucker allein, das ganze Diffusat zur Casein- und Lablösung hinzufügten, bekamen wir ein schwerer lösliches Casein. Da, wie wir gesehn, die Salze ohne Einfluss bei dem Gerinnungsact sind, so mussten wir diesen Befund auf die im Diffusat enthaltenen Extractivstoffe der Milch beziehen. Dafür spricht sowohl die leichtere Löslichkeit des Casein, wenn anstatt des im Vacuum eingeengten Diffusats, das auf dem Dampfbade eingeengte zu den Versuchen benutzt wurde, als auch der Versuch X, bei dem sowohl Milchzucker, wie auch die löslichen Salze des Diffusats angewendet wurden. Es waren hier also nur die Extractivstoffe des Diffusats ausgeschlossen, und dennoch war das Casein in diesem Fall viel leichter löslich, als bei Zusatz des ganzen Diffusats.

Ausserdem scheint aus den Versuchen II und V hervorzugehn, dass die Extractivstoffe der Milch die Entwicklung der Säure durch Lab beschleunigen. Dies erscheint noch um so wahrscheinlicher, wenn man berücksichtigt, dass bei der Mischung von Lab mit dem nicht gereinigten Milchzucker, viel schneller saure Reaction eintrat, als bei der den gereinigten Milchzucker enthaltenden. Auch wird wahrscheinlich der Milchzucker durch Erwärmen auf 80—90° gährungsunfähiger. Dafür spricht, dass das im Vacuum eingeengte Diffusat energischer wirkte, als das auf dem Dampfbade eingeengte, so wie der S. 35 angeführte Versuch mit der Fermentlösung aus Milch und

den beiden Milchzuckerlösungen, der gewöhnlichen und der erst auf dem Dampfbade abgedampften

Um einen Vergleich zwischen der Löslichkeit des durch Säure aus reiner Caseinlösung gefällten und des durch Lab in der angegebenen Weise unter Mitwirkung des Milchzuckers oder Diffusats coagulirten Casein ziehen zu können, wurde das Casein aus 5 Ccm. reiner Lösung desselben durch \bar{A} gefällt. Dasselbe hatte von 1 % NHO-lösung 0,35 Ccm., von 2 % \bar{A} 5,0 Ccm. zur Lösung nöthig. Hieraus ersehen wir, dass auch das durch eine Säure gefällte reine Casein bedeutend leichter löslich ist, als das durch Lab coagulirte.

Um die Lösungsverhältnisse, die durch vorliegende Versuche gewonnen wurden, leichter übersichtlich zu machen, stellen wir sie in nachstehender Tabelle zusammen. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf 5 Ccm. der Caseinlösung, ausser den bei dem Milchzucker eingeklammerten, die sich auf eine saturirte Milchzuckerlösung beziehen.

Tabelle III.

Der die Fällung resp. Gerinnung vermittelnde Stoff.	Nummer des Versuchs.	1% NHO in Ccm.	2% A in Ccm.	Bemerkungen.
\bar{A} .	Vorversuch	0,35	5,0	
Kalt eingeengtes Diffusat . . .	Vorversuch	20,		
Kalt eingeengtes Diffusat . . .	IV	2,5	40,0	
Kalt eingeengtes Diffusat . . .	IV	2,0	37,0	Das Diffusat ist auf dem Dampfbade eingeengt worden.
Kalt eingeengtes Diffusat . . .	V	1,0		Das Diffusat hatte sich zersetzt.

Der die Fällung resp. Gerinnung vermittelnde Stoff.	Nummer des Versuchs.	1% NHO in Cem.	2% A in Cem.	Bemerkungen.
Kalt eingeeigtes Diffusat	VI	0,8		Diffusat aus spontan geronnener Milch, die Gerinnung trat in der Kälte ein, das Casein wurde sofort gelöst.
Kalt eingeeigtes Diffusat	VII	2,5		Das Diffusat wurde frisch angewendet.
Kalt eingeeigtes Diffusat	VIII	2,7		Das Diffusat war aus Milchserum gewonnen worden.
Kalt eingeeigtes Diffusat	IX	1,9		Das Diffusat wurde frisch angewendet.
Kalt eingeeigtes Diffusat	IX	2,4		Das Diffusat war aus Milchserum gewonnen worden.
Kalt eingeeigtes Diffusat	IX	2,3		Diffusat aus spontan geronnener Milch.
Milchzucker und lösliche Salze des Diffusats .	X	1,4		
Milchzucker und NaCl	X	1,5		
Milchzucker und Fermentlösung aus der Milch	XI	1,1		
Fermentlösung aus der Milch und Wasser .	XI	1,6		
Milchz. (5,0 Ccm.)	I	1,1		Fettfreie Caseinlösung.
„ (5,0 Ccm.)	I	1,2		Fetthaltige Caseinlösung.
„ (5,0 Ccm.)	II	1,0		
„ (2,5 Ccm.)	II	1,2		
„ (1,25 Ccm.)	II	1,2		
„ (1,0 Ccm.)	III	1,2		
„ (0,5 Ccm.)	III	1,0		
„ (0,25 Ccm.)	III	0,9		

Wie schon angeführt, hat Hammarsten ⁴³⁾ gefunden, dass sein rein dargestelltes „Lab“ auf eine milchzuckerfreie, aber Fette enthaltende Caseinlösung eine ebenso energisch coagulirende Wirkung ausübt, wie auf die ganze Milch. Dies fand nun bei unsern Versuchen mit der Lösung des reinen Casein nie statt, nur eine leichte Trübung stellte sich nach längerem Stehn der Mischung bei 35° ein. Eine Erklärung für diesen Widerspruch zu geben, dürfte schwer sein. Die Fette können diese Wirkung nicht zuwege gebracht haben, da wir ebenfalls mit Fette enthaltender Caseinlösung den Versuch angestellt haben, jedoch keine Coagulation des Casein constatiren konnten.

Aus den Befunden dieses Abschnitts kommen wir zu folgenden Schlüssen.

1) Es lässt sich mittelst der von uns eingeschlagenen Methode ein in Lösung befindliches, unverändertes Casein aus der Milch gewinnen.

2) Wird die Lösung des reinen Casein mit Lablösung und dem Diffusat der Milch zusammengebracht, so wird das reine Casein coagulirt.

3) Der bei der Coagulation des Casein durch Lab mitwirkende Bestandtheil des Diffusats ist der Milchzucker.

4) Das einerseits durch Säurefällung, andererseits durch Labeinwirkung coagulirte reine Casein stellt, ebenso wie das aus der ganzen Milch durch diese Mittel ausgeschiedene Casein, 2 verschiedene Eiweissmodificationen dar. Die Unterschiede bei der Lösung sind nur nicht so beträchtlich.

⁴³⁾ l. c. S. 120.

5) Das Lab wirkt fermentativ und zwar bei allen 3 Reactionen, am energischsten bei saurer. Es scheint als ein Eiweissferment zu wirken, welches das Eiweiss chemisch umwandelt, während das säurebildende Ferment aus der Milch das Casein nur fällt, es dabei aber chemisch nicht verändert.

RESUMÉ.

1) Die Wärme übt bei der Fällung des Casein den Einfluss aus, dasselbe schwerer löslich zu machen.

2) Jedes durch eine Säure gefällte Casein ist leichter löslich, als das durch Lablösung coagulirte Casein.

3) Das durch Säure gefällte und das durch Lablösung coagulirte Casein sind 2 verschiedene Modificationen des Casein.

4) Beide Modificationen des Casein sind an der Luft getrocknet in Wasser löslich. Das Casein verhält sich in dieser Hinsicht ebenso wie die fibrinoplastische Substanz⁴⁴⁾.

5) Das Pepsin und das Lab sind wahrscheinlich 2 verschiedene Fermente.

6) Jedenfalls ist der auf Casein wirksame Stoff durch Glycerin aus der Magenschleimhaut extrahirbar.

7) Dieser Stoff zeigt in jeder Beziehung das Verhalten eines Ferments und zwar eines solchen, das bei allen 3 Reactionen wirkt.

8) Die Magenflüssigkeit wandelt den Milchzucker in eine Säure, wohl Milchsäure um, vielleicht wie Hammarsten annimmt durch ein besonderes milchsäurebildendes Ferment.

9) Bei der durch Lab bewirkten Gerinnung des Casein handelt es sich nicht um eine Säurefällung, sondern um eine

⁴⁴⁾ Pflüger Archiv Bd. VI. A, Schmidt S. 432.

fermentative Umwandlung desselben; dies gilt sowohl für die reine Caseinlösung, wie für die ganze Milch; die Säure beschleunigt aber die Fermentation, so dass der Effect schon bei relativ niedern Temperaturen eintritt.

10) Wird die Lösung des reinen Casein mit Lablösung und dem Diffusat der Milch zusammengebracht, so wird das reine Casein coagulirt. Bei dieser fermentativen Coagulation wirken die Bestandtheile des Diffusats mit, unter anderen der Milchzucker.

11) Die Milch enthält ein Ferment, resp. entwickelt sich dieses in ihr, das die Fähigkeit besitzt, den Milchzucker in eine Säure, wohl Milchsäure zu verwandeln.

12) Dieses säurebildende Ferment ist durch Glycerin extrahirbar.

13) Bei der Spontangerinnung der Milch handelt es sich um eine Säurefällung des Casein, indem der in der Milch enthaltene Milchzucker die Quelle für die dazu nöthige Säure bildet.

THESEN.

- 1) Das Magensecret enthält zwei verschiedene Fermente, das Lab und das Pepsin; ersteres coagulirt Eiweissstoffe, letzteres löst dieselben.
- 2) Das Albumin der Milch bildet die Vorstufe des Casein.
- 3) Die künstliche Befruchtung ist für alle Säugethiere als möglich erwiesen.
- 4) Die hypodermatischen Injectionen von Sublimatlösungen nach Lewin als Kurverfahren gegen Syphilis sind aus praktischen Gründen zu verwerfen.
- 5) Gegen Urethroblennorrhoea chronica leisten Injectionen gewöhnlichen Wassers von Zimmertemperatur bei gleichzeitiger Beobachtung eines zweckentsprechenden Regimen vortreffliche Dienste.
- 6) Bei grösserer Zerstörung der Knochen des Fuss- oder des Handgelenks durch Caries ist in vielen Fällen die Amputation, nicht aber die partielle Resection zu machen.