

Beiträge zur Kenntnis des Caseinogens der Eselimilch

von

Dr. C. Storch,

*Professor am k. und k. Militär-Thierarznei-Institut und der thierärztlichen Hochschule
in Wien.*

(Vorgelegt in der Sitzung am 17. April 1902.)

Die Milch der Eselin unterscheidet sich durch Consistenz, Farbe, Geschmack, chemische Reaction, Relation der Bestandtheile und wesentlich durch die Verschiedenheit des Caseinogens von der Kuhmilch.

Bevor ich auf die Besprechung der Eigenschaften des Caseinogens der Eselinmilch eingehe, müssen hier die wichtigsten Unterschiede beider Milcharten hervorgehoben werden, und zwar deshalb, weil sich das Caseinogen der Eselinmilch nicht auf die Art und Weise wie das Kuhcaseinogen darstellen lässt und weil daran möglicherweise die verschiedene Zusammensetzung beider Milchsorten die Schuld trägt.

Die Eselinmilch ist dünnflüssig, weiß von Farbe und von auffallend süßem Geschmack. Das specifische Gewicht schwankt nach meinen Untersuchungen bei Trockenfütterung in dem Gemische einer ganzen Melkung zwischen 1·029 bis 1·037. Die chemische Reaction der Eselinmilch ist gegen Lackmus immer stark alkalisch, während die Kuhmilch meist amphotер, oft auch nur alkalisch oder neutral reagiert. Gegen Phenolphthalein zeigt die Eselinmilch stets saure Reaction wie die Kuhmilch.

Die Relation zwischen Alkaliescenz und Acidität beider Milchsorten ist jedoch eine verschiedene. Wird zur Bestimmung des sauren Antheils $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge und als

Indicator Phenolphthalein verwendet, so müssen zu 10 cm^3 Eselinmilch $0\cdot7 \text{ cm}^3$ Lauge zugesetzt werden, damit sich die Flüssigkeit deutlich roth färbt. Bei der Kuhmilch sind hiezu $2\cdot1 \text{ cm}^3$ Lauge nötig.

Für die Bestimmung des alkalischen Antheils diente $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure, wobei als Indicator blaues Lacmoidpapier benutzt wurde. Hiernach muss man auf 10 cm^3 Eselinmilch $3\cdot5 \text{ cm}^3$ Säure einwirken lassen, bis sich das Lacmoidpapier deutlich röthet. Die Kuhmilch braucht dazu 4 cm^3 Säure. Somit reagieren 100 cm^3 Eselinmilch für blaues Lacmoid ebenso alkalisch wie 35 cm^3 $\frac{1}{10}$ -Normalnatronlauge und für Phenolphthalein ebenso sauer wie 7 cm^3 $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure. Von der Kuhmilch hingegen sind 100 cm^3 ebenso alkalisch wie 40 cm^3 $\frac{1}{10}$ -Lauge und ebenso sauer wie 21 cm^3 $\frac{1}{10}$ -Normalsäure. Die Alkalescenz der Eselinmilch verhält sich daher zur Acidität nahezu wie 5:1 und bei der Kuhmilch nahezu wie 2:1.

Dieses verschiedene Verhalten des alkalischen und sauren Antheils beider Milchsorten erklärt sich aus der geänderten Relation der alkalisch reagierenden und der sauer reagierenden Phosphate, wie dies von Soxhlet für die Kuhmilch festgestellt wurde. In der Eselinmilch prävalieren die alkalischen einfachsauren oder secundären Phosphate gegenüber den sauren primären oder doppeltsauren. In der Kuhmilch ist das Gemenge beider Phosphate ein solches, dass der Gehalt der doppeltsauren (primären) Phosphate an Phosphorsäure oft nahezu 50% der Gesammtphosphorsäure beträgt. Deshalb reagiert diese Milch meist amphotter.

Zur leichteren Übersicht der Zusammensetzung beider Milchsorten seien hier die auf 1000 cm^3 Milch berechneten Zahlen (im Durchschnitt) nach den Analysen von König nebeneinander gestellt:

		Trocken-				
	Wasser	rückstand	Eiweiß	Fett	Zucker	Salze
Kuhmilch . . .	871·7	118	35·5	36·9	48·8	7
Eselmilch . . .	900	100	21	13	63	3

Die Eselinmilch enthält somit verhältnismäßig viel weniger Gesamteiweiß, Fett und Salze und mehr Wasser und Zucker.

Der Fettgehalt schwankt nach den Untersuchungen, die von Rossmeisl in meinem Laboratorium ausgeführt worden sind, in der fünften Lactationswoche und bei Trockenfütterung zwischen 0·1% bis 1·5% (Zeitschr. für Fleisch- und Milchhygiene). Die von König angegebene Durchschnittszahl ist daher nach unseren sehr genauen Bestimmungen eine viel zu hohe.

Der Gehalt der Eselinmilch an Gesamteiweiß und auch die Relation zwischen Caseinogen und Lactalbumin sind sehr schwankend. Der Unterschied macht sich besonders geltend, wenn es sich um die Milch trächtiger Thiere handelt. Von dem Gesamteiweiß der Milch einer nicht trächtigen Eselin aus der dritten bis fünften Lactationswoche entfielen 0·9% auf das Caseogen und 1% auf das Lactalbumin. Nach Prof. Ellenberger (Arch. für Anat. und Physiol., 1899) bewegt sich der Eiweißgehalt der Milch trächtiger Eselinnen zwischen 1 und 1·5%. Hievon entfallen $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ auf Casein. In der dritten Woche nach der Geburt stieg das Gesamteiweiß auf nahezu 2% mit 1·1% Casein. In der letzten Woche vor der Geburt betrug der Eiweißgehalt sogar 6·4% mit 4% Casein. Der Caseingehalt der Milch nicht trächtiger Eselinnen schwankte nach Ellenberger zwischen 0·8 und 1·5%.

Der Caseinogenengehalt der Eselinmilch ist also nicht nur absolut, sondern auch relativ kleiner als in der Kuhmilch.

Eine Eigenthümlichkeit der Eselinmilch, welche schon lange bekannt ist und die auch Prof. Ellenberger (l. c.) erwähnt, ist die, dass sie spontan sehr schwer gerinnt. Während der Sommermonate hält sich die Eselinmilch oft 5 bis 6 Tage, ohne zu gerinnen, im Winter noch länger. Ihre Reaction gegen Lackmus bleibt dabei stark alkalisch. Der Übergang der alkalischen Reaction in die saure ist aber dann ein sehr rascher. Die Gerinnung erfolgt meist in Form eines sehr feinen Niederschlages, der sich beim Aufschütteln mit der Flüssigkeit innig mischt und der Milch das Aussehen einer frischen Milch verleiht. Einigemale sah ich die Eselinmilch schon in 3 bis 4 Tagen bei Zimmertemperatur in offenen Gefäßen gerinnen. In einem solchen Grade steril, beziehungsweise haltbar, wie vielfach behauptet wird, ist die Eselinmilch also keineswegs.

Das Labenzym, in Form des neutralreagierenden Glycerin-extractes der Schleimhaut des Kälbermagens der Eselinmilch zugesetzt, bringt eine äußerst feinflockige Gerinnung hervor. Dies mag der Hauptgrund sein für die überaus leichte Verdaulichkeit der Eselinmilch, welche schon die Ärzte des griechischen und römischen Alterthums rühmen und welche die Veranlassung dazu ist, dass man in der neuesten Zeit die Eselinmilch vielfach als bestes Surrogat der Frauenmilch in die Heilkunde einzuführen bestrebt ist. Die Menge des gereinigten und getrockneten Niederschlages (Paracaseins der Autoren) betrug pro 1 cm^3 Milch 0·01 g, während bei analoger Behandlung der Kuhmilch pro 1 cm^3 0·03 g erhalten wird. In beiden Fällen wurden zu je 20 cm^3 Milch je zwei Tropfen Glycerinlabextract hinzugefügt und das damit beschickte Proberöhrchen in dem Thermostaten bei 38° C . belassen.

In wässriger Lösung des mit Soda und Salpeter verbrannten Niederschlages (Paracaseins) konnte sowohl mit der Molybdänlösung, als auch mit der Magnesiamischung die Phosphorsäure nachgewiesen werden.

Die Bildung eines feinflockigen Niederschlages auf Zusatz von Glycerinlabextract ist in der Eselinmilch niemals ausgeblichen.

Gegen die Siedehitze verhält sich die frische, unveränderte Milch der Eselin nicht immer constant. Die Milch derselben nicht trächtigen Eselin gerann mitunter bei stark alkalischer Reaction, eine Beobachtung, welche auch Ellenberger erwähnt. Ob die Eselinmilch beim Kochen gerinnt oder nicht gerinnt, das hängt hauptsächlich von dem Albumingehalt ab. Ist der Albumingehalt ein hoher, das Caseinogen übersteigender, so gerinnt die Milch vollständig, wobei wahrscheinlich das Caseinogen vom Albumin mitgerissen wird. Ist der Albumingehalt ein sehr niedriger, so gerinnt nur das Albumin allein. Eine solche Gerinnung ist an der Milch äußerlich nicht wahrnehmbar, ebensowenig wie an einer frischen abgekochten Kuhmilch. Dass der vermehrte Albumingehalt die Ursache zur Gerinnung der Milch beim Kochen abgibt, lässt sich durch künstliche Zusätze von Albumin zur Kuhmilch erhärten. Übersteigt der Albumingehalt ein gewisses Maß, so gerinnt die

Kuhmilch so vollständig beim Kochen, dass man beim Filtrieren ein klares Filtrat erhält (meine Versuche in den Sitzungsberichten der kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, mathem.-naturw. Classe, Bd. CVI, Abth. III). Bekanntlich gründet sich auf den Ausfall des Lactalbumins durch das Sieden der Nachweis gekochter Milch von der ungekochten.

Darstellung des Caseinogens der Eselinmilch.

Das Caseinogen ist bekanntlich eine sehr veränderliche, insbesondere leicht spaltbare Eiweißsubstanz. Wie ich schon früher (l. c.) dargethan zu haben glaube, beeinflussen nicht nur gewisse Säuren, sondern auch einige Salze, wozu auch die Mittelsalze zu rechnen sind, mehr oder weniger diesen Körper. Es ist daher fraglich, ob die auf verschiedene Art gewonnenen sogenannten Caseine immer vollkommen identische Stoffe sind. Handelt es sich um das Caseinogen verschiedener Provenienz, so kommt dieser Umstand besonders in Betracht.

Für die Gewinnung und Reindarstellung der Caseinogene verschiedener Thiergattungen sind nicht immer die gleichen Methoden brauchbar, und es ist daher der Zweifel gerechtfertigt, ob man es immer mit den völlig analogen Stoffen zu thun hat. Aus der Pferdemilch z. B. kann man das Caseinogen weder mittels Essigsäure, noch mit Natriumchlorid oder Magnesiumsulfat darstellen. Nach Sebelien salzt Natriumchlorid aus der Kuhmilch das Casein und das Magnesiumsulfat auch das Lactoglobulin aus, während Hoppe-Seyler und Tolmatscheff mit Magnesiumsulfat aus derselben Milch unverändertes Casein allein erhalten haben. Das ausgesalzene Casein ist an Basen gebunden.

Um daher das Caseogen der Eselin auf seine Zusammensetzung und Eigenschaften mit dem Kuhcaseogen vergleichen zu können, war es nothwendig, die gleichen Methoden der Darstellung und Prüfung in Anwendung zu ziehen.

Für die Gewinnung des unveränderten, nicht an Basen gebundenen Caseinogens aus der Eselinmilch wurde von mir zunächst unter Beobachtung der Vorschrift Hammarsten's die verdünnte Essigsäure versucht.

Um einen Maßstab für die Menge der angewendeten Säure zu haben, die zur Fällung eines bestimmten Milchquantums erforderlich ist, benützte ich die $\frac{1}{10}$ -Normalessigsäure. Mit dieser Säure gelingt es nicht leicht, in der unvermischten Milch einen deutlichen Caseogenniederschlag hervorzurufen, ob die Säure bis zur Neutralisierung oder darüber weit hinaus der Milch zugesetzt wird.

Bis zur Erreichung der neutralen Grenze gegen blaues Lackmuspapier genügen für 50 cm^3 Milch circa 8 cm^3 Säure. Besser eignet sich für die Caseinogenausscheidung eine vierfach verwässerte Milch. Man muss bis zur vollständigen Fällung der Milch fast die doppelte Menge der $\frac{1}{10}$ -Normalsäure anwenden, als notwendig ist, um gegen blaues Lackmuspapier die neutrale Grenze zu erhalten.

Der auf diese Art gewonnene sehr feine Niederschlag ist sehr schwer durch Papierfilter von der stets trüb bleibenden Molke zu trennen. Ebenso schwierig ist es, den Niederschlag auf dem Filter mit Wasser zu waschen. Viel sicherer und schneller kommt man zum Ziele, wenn man die Milch früher einige Stunden hindurch dialysiert, wie dies Kobrak bei der Frauenmilch vorgeschlagen hat (Pflüger's Archiv, 1900). Das Dialysieren darf jedoch nicht zu lange fortgesetzt werden, weil sich sonst ein Theil des Caseogens von selbst ausscheiden würde. Die etwas dialysierte Milch wird rasch von der Essigsäure gefällt, und der Niederschlag lässt sich leicht von der klaren Molke trennen und auf dem Filter zur Entfernung der letzten Spuren der sauren Molke mit Wasser reinigen. Das Filtrieren geht schnell vorstatten.

Zur Gewinnung des Caseogens aus der Eselinmilch kann man auch einen anderen Weg einschlagen. Man kann nach Kobrak (l.c.) zuerst die Milch mit Essigsäure neutralisieren und dann erst bis zur vollständigen Ausscheidung des Caseinogens dialysieren. Der mit Essigsäure erhaltene Niederschlag wird in verdünnter Kalilauge gelöst, wieder mit Essigsäure gefällt, mit Wasser, Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen und getrocknet. Dieses Caseogen ist frei, es ist nicht an eine Base gebunden.

Einfluss der Mittelsalze auf das Caseinogen in der Eselinmilch.

Um den Einfluss der Mittelsalze auf das Caseinogen in der frischen Milch kennen zu lernen, wurde die gegen Lackmus alkalisch reagierende, als auch die gegen Lackmus vorsichtig mit Essigsäure neutralisierte Eselinmilch der Reihe nach mit krystallisiertem Natriumsulfat, Natriumchlorid (Steinsalz) und Magnesiumsulfat im Überschuss versetzt. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur und sodann auch bei bis auf 40° C. steigenden Temperaturen vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Versuche habe ich in einer kurzen vorläufigen Mittheilung im »Thierärztlichen Centralblatt«, Wien 1900, veröffentlicht.

In der frischen, d. i. gegen Lackmus alkalisch reagierenden Eselinmilch bringen die erwähnten Salze, wenn sie bei Zimmertemperatur einzeln in die Milch eingetragen werden, keine sichtbare Veränderung hervor. Die Milch fließt vollständig durch Papiersfilter durch. Eine Aussalzung der Eiweißsubstanzen wird durch diese Salze in der Eselinmilch nicht bewirkt. Nur auf das Magnesiumsulfat konnte manchmal eine theilweise Fällung beobachtet werden, wobei in den oberen Partieen des Gefäßes eine schwache Ausscheidung einer Eiweißsubstanz auftrat. Die Flüssigkeit filtrirt aber immer milchig trüb. Die Eselinmilch verhält sich somit den genannten Mittelsalzen gegenüber ganz verschieden als die Kuhmilch, in welch letzterer diese Salze stets einzeln deutliche Niederschläge hervorrufen. Basiert doch, wie schon erwähnt wurde, Sebelien auf die Aussalzung der Kuhmilch mit Natriumchlorid seine Caseindarstellung.

Die Resultate der Aussalzungsversuche fallen auch dann negativ aus, wenn die Milch früher vorsichtig neutralisiert worden ist. Ebensowenig kann man bei bis 40° C. steigenden Temperaturen deutliche Niederschläge erhalten. Die steigende Temperatur begünstigt zwar die Aussalzung, indem eine partielle Fällung zustande kommt; aber nach dem Abkühlen lösen sich die Niederschläge wieder auf.

Wird die frische Milch hingegen mit einem Gemische zweier Mittelsalze, z. B. mit Natriumchlorid und Magnesiumsulfat zugleich gesättigt, so erfolgt stets nach längerem

Röhren die Ausscheidung einer Eiweißsubstanz, von welcher beim Filtrieren eine wasserklare Flüssigkeit abfließt und welche nur Lactalbumin enthält.

Ob der durch zwei Mittelsalze ($\text{ClNa} + \text{MgSO}_4$) ausgeschiedene Niederschlag Caseinogen ist oder ob er aus mehreren Eiweißsubstanzen besteht, wollen wir später erörtern. Löst man den Niederschlag in Wasser, so salzt jetzt Natriumchlorid allein eine Eiweißsubstanz (*a*) und im klaren Filtrate derselben ein zweites Mittelsalz (Magnesiumsulfat) wieder eine Eiweißsubstanz (*b*) aus. Beide Substanzen können durch die Dialyse von den beigemengten Salzen befreit und auf die Art rein dargestellt werden. Die ausgesalzene Menge der Substanz *b* ist stets eine sehr geringe und beträgt kaum den sechsten Theil gegenüber der Substanz *a*. Da sie sich mit dem überschüssigen feinkristallinischen Bittersalze innig vermischt, so nimmt die Dialyse eine sehr lange Zeit in Anspruch.

Welches sind die Ursachen, dass sich das Caseinogen aus der Kuhmilch durch einzelne Salze aussalzen lässt und aus der Eselinmilch nicht? Entweder enthält die Eselinmilch gewisse Stoffe gelöst, welche der Aussalzung des Caseinogens durch einzelne Mittelsalze (NaCl) hinderlich sind, oder das Caseinogen der Eselinmilch hat andere Eigenschaften als das der Kuhmilch. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die folgenden Versuche angestellt:

a) Die Eselinmilch wurde entfettet, sehr vorsichtig mit sehr verdünnter Essigsäure neutralisiert und auf den Dialysator gebracht. Viel besser eignen sich für diese Zwecke die Pergamentschlüche von Schleicher und Schüll, weil das für die partielle Dialyse einer geringen Milchmenge anzuwendende Wasserquantum beliebig gewählt werden kann. Es ist nämlich denkbar, dass die die Aussalzung hindernde Substanz krystalloide Natur besitzt und dass nach ihrer Entfernung aus der Milch dann die Aussalzung erfolgen muss. Nach 16- bis 20stündigem Dialysieren von 20 cm^2 Milch gegen 200 cm^3 destillierten Wassers und nachherigem Sättigen mit Natriumchlorid trat tatsächlich eine Aussalzung der Substanz *a* und im klaren Filtrate der Substanz *a* wieder mit Magnesiumsulfat der Substanz *b* ein. Nach länger andauerndem Dialysieren

schied sich das Caseogen aus der Milch von selbst aus. Zur Verhinderung der Zersetzung der Eiweißkörper durch die Fäulnis und zur Hintanhaltung der milchsauren Gährung wurde der Milch während des Dialysierens wiederholt Chloroform oder Thymol zugesetzt.

Im eingeengten Diffusat konnten Cl, Na, K, Ca, Mg, reichliche Mengen von Milchzucker und sowohl mittels Molybdänlösung, als auch nach Zusatz von ClNH_4 , NH_3 und Magnesiamischung Phosporsäure nachgewiesen werden.

Halten die krystalloiden Stoffe und unter denselben die Chloride, Phosphate und der Milchzucker das Caseinogen trotz der Sättigung der Milch mit Chlornatrium in Lösung, so muss die Aussalzung nach Entfernung derselben im Wege der Diffusion gelingen, und anderseits muss sie, wenn die gleichen Körper der dialysierten Milch wieder zurückgegeben werden, ausbleiben. Dies ist auch der Fall, denn wird die dialysierte Milch mit Chlornatrium gesättigt, so entsteht in ihr ein Caseogen-niederschlag, und wird ihr vor der Sättigung mit Chlornatrium das ganze bei 40° C . eingeengte Diffusat zugesetzt, so entsteht in ihr kein Niederschlag.

Die Versuche wurden in der Art durchgeführt, dass 20 cm^3 Milch gegen 200 cm^3 Wasser dialysiert wurden. Die Hälfte dieser Milch wurde ohneweiters im Überschusse mit krystallisiertem Chlornatrium versetzt. Die andere Hälfte wurde mit der Hälfte des eingeengten Diffusats innig gemischt und erst nach längerem Stehenlassen mit Chlornatrium saturiert. Zur Controle wurde auch die nicht dialysierte Milch durch Chlornatrium auszusalzen versucht.

An Stelle des Diffusats wurde eine künstliche Mischung, bestehend aus Milchzucker und alkalischen und sauren Phosphaten, unter Berücksichtigung der chemischen Reaction und der entsprechenden Relation der einzelnen Bestandtheile mit der dialysierten Milch vermengt. Die Aussalzung mit Chlornatrium blieb nach der Herstellung jener Verhältnisse, wie sie in der unveränderten Eselinmilch vorhanden sind, aus.

Aus all den Versuchen folgt, dass auf die Aussalzbarkeit der Eselinmilch mit Chlornatrium eine entsprechende Menge und Relation der Phosphate bestimmend ist.

Bei diesen Versuchen drängte sich unwillkürlich der Gedanke auf, zu versuchen, ob es nicht möglich ist, die Kuhmilch durch entsprechende Änderung ihrer Zusammensetzung in Hinsicht auf die Aussalzbarkeit durch die Mittelsalze der Eselinmilch ähnlich zu machen. Sind die Caseogene beider Milchsorten dieselben Stoffe und unterscheiden sich die Milchsorten nur durch eine verschiedene Relation der Bestandtheile, so müsste es gelingen, sie auch in Hinsicht auf das Verhalten zu den Mittelsalzen durch Gleichstellung der Bestandtheile gleich zu machen. Nach sehr zahlreichen Versuchen, welche ich diesbezüglich angestellt habe, ist es mir nie gelungen, es dahin zu bringen, dass die Kuhmilch durch Natriumchlorid nicht ausgesalzen wird. Der Unterschied der Kuhmilch von der Eselinmilch beruht eben, wie man anzunehmen berechtigt ist, nicht so sehr auf einem verschiedenen Mischungsverhältnisse der Bestandtheile, als vielmehr auf der Verschiedenheit ihrer Caseogene.

Einfluss des Ammoniumsulfats auf die Eselinmilch.

Wroblewski wählte zur Fällung des Caseins aus der Frauenmilch Ammoniumsulfat. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst, dialysiert und mit Essigsäure gefällt. Da sich die Eselinmilch in vielfacher Hinsicht der Frauenmilch ähnlich verhält und die Ähnlichkeit möglicherweise durch die Übereinstimmung der Caseogene begründet ist, so habe auch ich mit diesem Salze an der Milch der Eselin Versuche angestellt. Die frische Eselinmilch wird durch krystallisiertes Ammonsulfat so vollständig gefällt, dass im Filtrate keine Eiweißkörper mehr nachweisbar sind. In Lösung der Milch zugesetzt, bewirkt das Ammonsulfat die Aussalzung einer Eiweißsubstanz, von welcher man nicht ohneweiters sagen kann, ob sie nur aus Casein besteht. Im Filtrate entsteht nach Sättigung mit demselben Salze wieder ein Niederschlag von Lactalbumin.

Einfluss des Magnesiumchlorids.

Von den Salzen habe ich schließlich noch das Magnesiumchlorid allein und dann in Combination mit Natrium-

sulfat zu den Aussalzungsversuchen verwendet. Die Versuche fielen stets negativ aus.

Einfluss des Coagulationsverfahrens auf die Eiweißkörper der Eselinmilch.

Zur Vervollständigung der Untersuchungen der Milch mit Mittelsalzen habe ich auch das von mir (l. c.) beschriebene Coagulationsverfahren hier anzuwenden versucht. Die Milch wurde mit etwas Hühnereiweiß, dann mit der dreifachen Menge Glaubersalzlösung versetzt, mit Essigsäure neutralisiert und auf dem Wasserbade zur Coagulation gebracht. Das Coagulationsfiltrat war milchig getrübt und filtrierte auf dem Heißwassertrichter sehr schlecht. Trotz häufigem Filterwechsel konnte ich das Filtrieren nicht zu Ende bringen. Ein reines Filtrat war trotz vielfacher Änderung der Zusätze nicht zu erzielen. Im Filtrate entstand nach Sättigung mit Chlornatrium kein Niederschlag, dagegen brachten zwei Salze einen solchen hervor. Das Filtrat dieses Niederschlags enthielt noch Lactalbumin in Lösung. Das Coagulationsverfahren eignet sich also nicht zur Trennung der coagulablen Eiweißkörper der Eselinmilch vom Caseogen.

Eigenschaften des Caseinogens der Eselinmilch.

Zur Prüfung auf seine Eigenschaften wurde das mit verdünnter Essigsäure gefällte, rein dargestellte Caseinogen verwendet. Von den mit Mittelsalzen erhaltenen und durch hinlängliche Dialyse von diesen Salzen völlig befreiten Eiweißkörpern kann man nicht von vornherein sagen, ob sie einheitliche Stoffe (Caseinogene) oder deren Spaltungsproducte sind.

1. Acidität des Caseinogens der Eselinmilch. Das Caseinogen der Eselinmilch besitzt wie das Kuhcaseogen den Charakter einer Säure. Es hat saure Reaction. Seine Acidität ist aber viel schwächer als die des Kuhcaseogens. Löst man nämlich gleiche Gewichtstheile von Kuh- und Eselincaseinogen in titriertter Kalilauge ($1/10$ -Normallauge), so benötigt man zur Herstellung einer neutralen Lösung viel weniger Lauge beim Eselcaseinogen als beim Kuhcaseogen, und zwar braucht

man für 0·3 g Eselcaseogen beiläufig 2 cm³ Lauge und für die gleiche Menge Kuhcaseogen 2·78 cm³ Lauge.

2. Einfluss des Labenzyms auf das Eselcaseinogen. Einige Centigramme Caseinogen wurden in sehr verdünnter Kalilauge bei neutraler Reaction gelöst und mit wenigen Tropfen Chlorcalciumlösung vermischt. Von dieser Lösung wurden circa 5 cm³ mit einem Tropfen neutralen Glycerinlabextractes versetzt und bei 38° C. in den Thermo-staten gestellt. In kurzer Zeit trat eine sehr feinflockige Gerinnung ein (Paracasein). In der aus dem gereinigten Coagulum, Ätzkali und Salpeter bereiteten Schmelze war Phosphorsäure leicht nachweisbar.

3. Einfluss des künstlichen Magensaftes. Die Untersuchungen der Eselinmilch durch Prof. Ellenberger und seine Schüler (l. c.) hatten das sehr bemerkenswerte Ergebnis, dass diese Milch mit künstlichem Magensaft kein Nuclein zurücklässt und dass somit in ihr kein Nucleoalbumin enthalten ist. Zu einem ähnlichen Resultate war schon viel früher Wroblewski (Maly's Jahresberichte über die Fortschritte der Thierchemie 1894) bei künstlichen Digestionsversuchen mit dem Frauencasein gelangt, nach dem Szontag schon 1891 (Maly's Berichte, 1892) erklärt hatte, dass die Frauenmilch kein Nuclein aufweist. Moraczewski bestätigte die Angabe Wroblewski's (Maly's Jahresbericht, 1894). Zu ganz entgegengesetzten Resultaten führten die Untersuchungen über das Frauencasein, welche Kobrak (Pflügers Archiv, 1900) veröffentlicht hat. Kobrak erhielt stets aus Lösungen des Frauencaseins, auf welche er hinlänglich lang Pepsinchlorwasserstoffsäure einwirken ließ, einen festen Rückstand von Pseudonuclein. Nur trat der Niederschlag von Pseudonuclein viel später auf als in den Lösungen des Kuhcaseins. Kobrak glaubt daher, dass Szontag und Wroblewski vielleicht nicht lange genug beobachtet haben.

Da Prof. Ellenberger weder die Art und Weise der Darstellung des Eselcaseinogens, noch die Versuchsanordnung bei seinen Untersuchungen (Archiv für Anat. und Physiol., 1899) näher beschreibt, so schlug ich bei den von mir angestellten Digestionsversuchen das Verfahren Kobrak's ein.

Hiedurch wurde eine Controle nicht nur mit analoger Behandlung der Kuh-, sondern auch der Frauenmilch ermöglicht. $0\cdot5\text{ g}$ Eselincaseinogen wurden in einer Mischung aus 3 cm^3 $\frac{1}{10}$ -Normalkalilauge und 20 cm^3 Wasser gelöst. Von dieser neutralreagierenden klaren Lösung wurden 5 cm^3 mit ebensoviel $0\cdot25\%$ Salzsäure versetzt. Die entstandene Trübung löste sich beim Aufschütteln. Der sauren Caseogenlösung wurde 1 cm^3 Glycerinlabextract hinzugefügt und das Ganze in den Thermostaten (Temperatur 38° C.) gestellt. Die Flüssigkeit blieb circa 5 Stunden klar. Später fing sie an sich zu trüben. Schließlich sammelte sich langsam, zum Theile an der Oberfläche der Flüssigkeit, zum Theil am Boden des Proberöhrchens ein flockiges Coagulum an. Durch neuerlichen Zusatz von verdünnter Salzsäure löste sich der Niederschlag nicht.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde zu der Digestion statt des Glycerinlabextractes 10% Pepsinlösung verwendet. Auch hier schied sich ein Niederschlag (Pseudonuclein) aus. Der Niederschlag wurde verascht und Phosphorsäure nachgewiesen.

Zur Controle dieser Verdauungsversuche wurden in analoger Weise, wie es beim Eselincaseinogen geschehen ist, auch mit dem Kuhcaseinogen und, um ein Urtheil über die Verdauungsfähigkeit der angewendeten Präparate zu besitzen, schließlich mit dem Fibrin Verdauungsversuche vorgenommen.

Bei den erwähnten Verdauungsversuchen mit dem Eselcaseogen bleibt stets ein kleiner Rückstand von festem Pseudonuclein zurück. Der Rückstand ist immer bedeutend kleiner als von der gleichen Menge des Kuhcaseogens, und zu seiner Bildung ist immer eine viel längere Zeit nothwendig.

Aus den in der erwähnten Anordnung angestellten Verdauungsversuchen lässt sich somit der Schluss ziehen, dass das Eselcaseogen ebenso wie das Kuhcaseogen zur Gruppe der Nucleoalbumine zu rechnen ist. Ob und welche Resultate eine andere Versuchsanordnung bei den Digestionsversuchen zur Folge hat, darüber besitze ich, betreffend das Eselcaseinogen, kein eigenes Urtheil.

Löslichkeit und Verhalten in der Siedehitze. Das Eselcaseinogen ist in Wasser und den Lösungen der Neutral-

salze unlöslich. Es löst sich in Kali- und Natronlauge, in Lösungen der Carbonate der Alkalien, in Kalkwasser und in den Lösungen des secundären Natronphosphats bei neutraler Reaction. Aus diesen Lösungen wird es durch verdünnte Säuren, welche bis zur neutralen Reaction zugesetzt werden, wieder gefällt. Die neutralen Lösungen gerinnen nicht beim Kochen.

Elementare Zusammensetzung des Caseinogens der Eselin-milch.

Die quantitative elementare Analyse des Eselcaseinogens wurde von mir in analoger Weise wie bei der Analyse der Eiweißkörper der Kuhmilch (l. c.) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind aus der folgenden Nebeneinanderstellung der Zusammensetzung des Kuh- und Eselincaseinogens ersichtlich (in Prozenten):

	C	H	N	S	P	O
Eselincaseinogen	54	7·0	14·4	0·84	1·04	23·32
Kuhcaseinogen.....	53	6·4	15·7	0·80	0·85	22·65

Hienach ist das Eselincaseinogen reicher an C, H, S, P und O und ärmer an N als das Kuhcaseogen.

Fasst man die wichtigeren Ergebnisse der vorangehenden Untersuchungen zusammen, so ist Folgendes zur Charakterisierung des Eselincaseinogens anzuführen:

1. Das Eselincaseinogen ist mit verdünnter Essigsäure aus der Milch schwer fällbar; es ist mit Essigsäure leichter fällbar, wenn die Milch vorher theilweise dialysiert worden ist.

2. Das Eselincaseinogen ist durch einzelne Mittelsalze (NaCl , Na_2SO_4 , MgSO_4) aus der Milch nicht aussalzbar. Möglicherweise wird es aus der neutralisierten Milch durch zwei Mittelsalze zusammen ($\text{ClNa} + \text{MgSO}_4$) unverändert gefällt.

3. Das mit Essigsäure gefällte Eselincaseinogen hat den Charakter einer Säure von geringerer Acidität als das Kuh-caseogen.

4. Das Caseinogen der Eselinmilch wird aus der Milch und aus neutralen Lösungen durch das Labenzym in Form eines sehr feinen Coagulums (Paracaseins) zum Gerinnen gebracht.

5. Das Caseinogen der Eselinmilch lässt bei der Verdauung mit Pepsinsalzsäure einen festen Rückstand von Pseudonuclein zurück. Dieser Rückstand ist stets ein geringerer als der des Kuhcaseinogens.

6. Das Eselincaseinogen ist in denselben Lösungsmitteln wie das Kuhcaseogen löslich.

7. Das Eselincaseinogen ist reicher an Phosphor und Schwefel als das Kuhcaseinogen.

Eigenschaften und Zusammensetzung der Substanzen *a* und *b*.

Dialysiert man die Eselinmilch ein wenig, so lässt sich aus derselben, wie schon früher erwähnt wurde, durch Chlornatrium allein die Substanz *a* und aus dem Filtrate mit Magnesiumsulfat wieder die Eiweißsubstanz *b* aussalzen. Ebenso lässt sich, wenn man die Eselinmilch mit Chlornatrium und Bittersalz zusammen aussalzt und den Niederschlag in Wasser suspendiert, aus der Flüssigkeit mit Chlornatrium allein die Eiweißsubstanz *a* und aus deren Filtrate mit Bittersalz die Substanz *b* ausfällen. Wie ist das zu erklären und was sind die beiden Proteïnsubstanzen *a* und *b*? Es ist zweierlei denkbar: Entweder die beiden Substanzen sind nebeneinander in der Milch gelöst oder sie sind zu einer Substanz, und zwar dem Caseinogen verbunden und werden durch eines der Mittelsalze (NaCl) gespalten, wie wir dies seinerzeit (l. c.) beim Kuhcaseogen auseinandergesetzt haben. Die Möglichkeit, dass die Substanz *a* durch unvollständige Fällung sich ausgeschieden hat und mit der Substanz *b* identisch ist, ist von vornher ausgeschlossen, weil beide Substanzen, wie sich bald zeigen wird, verschieden zusammengesetzt sind und auch verschiedene Eigenschaften aufweisen.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Proteïnsubstanzen *a* und *b* Spaltungsproducte sind oder nicht, war es nothwendig, sie erst rein darzustellen und dann ihre elementare Zusammensetzung und ihre Eigenschaften zu studieren.

Die Reindarstellung geschah mit Hilfe der Dialyse unter Berücksichtigung aller nothwendigen Cautelen.

Die Substanz *a* enthält $0\cdot86\%$ Phosphor und $1\cdot01\%$ Schwefel. Die vollständige Analyse konnte vorläufig wegen

Mangel an Material nicht vollständig durchgeführt werden. Sie ist ärmer an P und S als das Eselincaseinogen. Die Abweichungen im Phosphor- und Schwefelgehalte der Caseinogene und der Substanzen *a* der Eselin- und der Kuhmilch sind aus der folgenden Nebeneinanderstellung ersichtlich:

	P	S
Eselincaseinogen	1·04%	0·84%
Kuhcaseinogen.....	0·85	0·80
Substanz <i>a</i> aus der Eselinmilch	0·86	0·78
Substanz <i>a</i> aus der Kuhmilch	0·78	0·64

Die Ergebnisse der Analyse der Substanz *a* aus der Kuhmilch finden sich in meiner Arbeit: Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper der Kuhmilch, II. Mittheilung (Sitzungsberichte der kaiserl. Akad. der Wissensch. in Wien, mathem.-naturw. Cl., Bd. CVIII, 1899) angeführt.

Die Eiweißsubstanz *a* (Casein Sebelien) reagiert schwach sauer; sie ist in Wasser und den Lösungen der Neutralsalze unlöslich, sie ist löslich in den Lösungen der Alkalien, der Carbonate der Alkalien und in Kalkwasser bei neutraler Reaction. Die Lösungen gerinnen bei neutraler Reaction nicht beim Kochen. Sie wird bei neutraler Reaction unter Zusatz von CaCl_2 aus ihrer Lösung durch neutrales Glycerinlabextract zum Gerinnen gebracht. Sie lässt bei der Verdauung mit künstlichem Magensaft eine Spur von festem Rückstand zurück.

Die phosphor- und schwefelhaltige Eiweißsubstanz *a* ist demnach dem Caseinogen in ihren Eigenschaften sehr ähnlich und sie ist somit ebenso wie die analoge Substanz der Kuhmilch ein Nucleoalbumin.

Eigenschaften und Zusammensetzung der Substanz *b*.

Die Eiweißsubstanz *b* löst sich leicht in Wasser und in Lösungen der Neutralsalze (NaCl , Na_2SO_4 , MgSO_4) und in Lösungen der Alkalien, der Carbonate der Alkalien, in Kalkwasser und in den Lösungen des Natriumphosphats. Sie ist unlöslich in den Lösungen zweier Neutralsalze ($\text{CINa} + \text{MgSO}_4$). In wässriger Lösung auf 80° erhitzt, gerinnt sie.

Sie enthält $1 \cdot 26\%$ Phosphor und $2 \cdot 9\%$ Schwefel und ist also an diesen Bestandtheilen viel reicher als das Caseogen und die Substanz *a*. Zur vollständigen Analyse besaß ich nicht die genügende Menge an Material. Es ist dies aus dem geringen Caseogengehalte der Eselmilch und aus dem sehr geringen Bruchtheile der Substanz *b*, welche man bei der Reindarstellung erhält, erklärlich. Betreffend den Phosphor- und Schwefelgehalt der Caseogene und der Substanzen *a* und *b* der Kuh- und Eselinmilch seien hier die entsprechenden Prozentzahlen angeführt:

	P	S
Caseogen der Kuhmilch	0·85	0·80
Substanz <i>a</i> der Kuhmilch	0·80	0·63
Substanz <i>b</i> der Kuhmilch	2·08	1·60
Caseogen der Eselinmilch	1·04	0·84
Substanz <i>a</i>	0·86	0·78
Substanz <i>b</i>	1·26	2·9

Die Zahlen für die Eiweißsubstanzen aus der Kuhmilch sind aus meiner früher citierten Arbeit entnommen.

Die wichtigste chemische Eigenschaft der Substanz *b* ist die folgende: Sie wird durch sehr verdünnte ($0 \cdot 8\%$) Salzsäure nur theilweise gelöst. Ein aliquoter Theil bleibt immer in der Flüssigkeit in Form einer schwachen Trübung ungelöst. Der gelöste Theil wird durch Alkohol und durch Ammoniakwasser kaum bemerkbar getrübt; er gibt aber die Eiweißproben. Der ungelöste Theil löst sich nicht bei weiterer Behandlung mit $0 \cdot 8\%$ Salzsäure, er löst sich aber in verdünnten Laugen.

Ihrem Phosphorreichtum und den chemischen Eigenschaften nach muss man die Substanz *b* zu den Nucleoproteiden, und zwar zu den Nucleohistonen verwandten Stoffen zählen. Die Trennung der Substanz *b* durch die verdünnte Salzsäure in einen löslichen und einen unlöslichen Theil ist im Sinne einer Spaltung aufzufassen.

Schlussbemerkungen.

Aus den bisherigen Untersuchungen ist es nicht ersichtlich, ob die Proteïnsubstanzen *a* und *b* in der Eselinmilch nebeneinander vorkommen oder ob sie durch Spaltung einer

einzigsten Eiweißsubstanz, nämlich des Caseinogens, entstanden sind. Wahrscheinlich sind sie durch Spaltung des Caseinogens mit einem der angewendeten Neutralsalze (Natriumsulfat, Natriumchlorid) entstanden. Dafür lässt sich aus der Analogie der Kuhmilch vorläufig nur ein Grund anführen: Wird nämlich die theilweise dialysierte Milch vorsichtig mit verdünnter Essigsäure versetzt, so entsteht in ihr ein Niederschlag; bei weiterem Zusatze der Essigsäure entsteht in ihr kein Niederschlag mehr. Wären die beiden Körper *a* und *b* in der Eselinmilch nebeneinander gelöst, so wäre es möglich, dass zuerst der Körper *a* und nach weiterem Zusatze der Säure der Körper *b* ausfällt, welch letzterer nach Analogie der Substanz *b* aus der Kuhmilch mehr Essigsäure zur Fällung benötigt. Dem jedoch gegenüber steht der Einwand frei, dass das mit Essigsäure aus der Eselinmilch gewonnene Caseinogen aus seinen neutralen Lösungen sich durch die Mittelsalze nicht mehr in zwei Eiweißsubstanzen spalten lässt. Es wäre schließlich auch denkbar, dass die Dialyse der Milch im Sinne einer Spaltung auf die Eiweißkörper wirkt.

Dafür, dass die beiden Eiweißkörper nicht nebeneinander, sondern zum Caseinogen vereinigt in der Eselinmilch enthalten sind, sprechen noch die folgenden Versuche:

1. Die frische, nicht dialysierte Milch wird gleichzeitig mit zwei Salzen (Natriumsulfat + Magnesiumsulfat) gefällt und der Niederschlag in Wasser gelöst. Aus dieser Lösung scheidet sich nach Zusatz von wenig Essigsäure eine Eiweißsubstanz aus. Im Filtrat, welches klar ist, ist keine weitere Eiweißsubstanz nachweisbar. Wird hingegen der mit zwei Salzen aus der frischen Milch erzeugte Niederschlag in Wasser gelöst, so erfolgt in der Lösung nach Sättigung mit einem Salze eine Eiweißausscheidung und im Filtrat nach Sättigung mit einem zweiten Salze wieder eine Eiweißausscheidung. Es können also in dem einen Falle nicht die beiden Substanzen und im anderen Falle durch ein Salz (Na_2SO_4 oder NaCl) nur eine Eiweißsubstanz ausgeschieden worden sein.

2. Die Substanz *a+b*, welche mit zwei Salzen aus der Eselinmilch erhalten wurde, wird mit der Substanz *b* zusammen in Wasser gelöst. Auf Essigsäurezusatz bildet sich in der Lösung

ein Niederschlag und im Filtrate des Niederschlages auf weiteren Zusatz von Essigsäure wieder ein Niederschlag.

3. Die Eiweißsubstanz *a* und die Eiweißsubstanz *b* werden zusammen in Wasser gelöst. Auf Essigsäure entsteht in der Lösung ein Niederschlag, und im Filtrate ist noch durch weiteren Essigsäurezusatz und auch beim Kochen eine Eiweißsubstanz nachweisbar.

Wären die beiden Substanzen in der Milch nebeneinander, so müssten sie sich durch die Essigsäure ebenso voneinander trennen lassen, wie im Versuche 3 oder wie sich die Substanz *b* mittels Essigsäure trennen lässt von dem mit zwei Salzen ausgefallten Körper.

Aus diesen Versuchen lässt sich somit der Schluss ziehen, dass 1. der Niederschlag, welchen man aus der Eselinmilch mit zwei Salzen erhält, nur aus einem Eiweißkörper, und zwar dem Caseinogen besteht; 2. dass das Caseinogen sich durch ein Salz in zwei Eiweißkörper spalten lässt.

Kobrak kommt bei den Untersuchungen des Frauencaseins zu einem ähnlichen Schlusse (l. c.), indem er gefunden hat, dass ein Theil des Frauencaseins sich in den Lösungen der Neutralsalze löst, während doch sonst das Caseinogen in den Lösungen der Neutralsalze unlöslich ist. Der in den concentrirten Lösungen der Neutralsalze lösliche Theil des Frauencaseins entspricht unserer Eiweißsubstanz *b*, der unlösliche unserer Eiweißsubstanz *a*.

Der Verfasser hat aus Mangel an Material das Studium über das Caseinogen der Eselinmilch noch nicht zum Abschluss bringen können und wird sich erlauben, seinerzeit darüber noch weiter zu berichten.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im October 1899 begonnen.
