

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

Ultramikroskopische Beobachtungen über das Verhalten der Kaseinsuspension in der frischen Milch und bei der Gerinnung.

Von

Prof. Dr. **Alois Kreidl** und Dr. **Alfred Neumann**.

In einer vorläufigen Mitteilung in der Wien. Klin. Wochenschrift 1908 Nr. VII¹⁾ wurde auf das Vorkommen ultramikroskopisch sichtbarer Partikelchen in der Milch verschiedener Tiersorten aufmerksam gemacht. Die damals kurz mitgeteilten Beobachtungen wurden seither erweitert und ergänzt und sollen im Folgenden ausführlich dargelegt werden. Die Untersuchung der Milchproben geschah mit dem von Karl Reichert in Wien konstruierten Spiegelkondensor. Als Lichtquelle diente eine Nernst-Projektionslampe mit drei gekreuzten Fäden, die eine Lichtstärke von ca. 500 N.K. ergab. Die Präparate wurden einfach durch Ausbreiten zwischen Deckglas und Objektträger möglichst dünn angefertigt und sogleich angesehen. Die Linsenkombination bestand aus einem Reichert'schen Objektiv 8a + und einem Zeiss'schen Kompensationsokular No. 12 entsprechend einer ungefähr tausendfachen linearen Vergrößerung.

Die damals untersuchten Tiermilcharten (Kuh, Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen) zeigten im grossen und ganzen alle dasselbe Verhalten. Neben den Fetttröpfchen, die schon im gewöhnlichen mikroskopischen Bild als hell glänzende Kügelchen erscheinen, sieht man im Dunkelfeld die Plasmaräume dicht erfüllt von einer grossen Zahl kleinster Teilchen, die sich in lebhafter molekularer Bewegung befinden. Der Befund ist jedesmal bei den betreffenden oben genannten und seither bei weiteren vier Spezies, beim Elefanten, der Ziege, dem Pferd und der Ratte, erhoben worden

1) Siehe auch die Mitteilung im Anzeiger der Akademie der Wissenschaften in Wien vom 13. Februar 1908.

und kann daher als ein regelmässiges Verhalten bezeichnet werden. Diese Teilchen stellen also ein zweites Formelement der betreffenden Milcharten dar. Affen- und Eselsmilch stand uns leider nicht zur Verfügung.

Von diesem ultramikroskopischen Bild der Tiermilch unterscheidet sich das der Frauenmilch durch das vollständige oder fast vollständige Fehlen der genannten Partikelchen. Während dort durch die mehr oder weniger massenhafte Anhäufung von lichtreflektierenden Teilchen das Plasma grauweissglänzend erscheint, ist es bei der Frauenmilch normalerweise schwarz. Man sieht darin nur die Fettkügelchen, diese nur von verschiedener Grösse, die grösseren sofort durch den lebhaften Glanz als solche zu erkennen, die kleinsten für den Ungeübten schwer zu unterscheiden von den Ultrateilchen der Tiermilch. Bei den verschiedenen Tiermilcharten leuchten nur die grösseren Fetttropfen aus der weissglänzenden Masse hervor, während die kleineren sich der Beobachtung entziehen; man hat den Eindruck als ob sie in einem Brei stecken würden. In der Frauenmilch dagegen sieht man sie alle frei und von einer gewissen Grösse abwärts in lebhafter Molekularbewegung und dadurch schwer zu unterscheiden von Teilchen der gleichen Grössenordnung und anderer Provenienz. Besonders schwierig wird die Entscheidung, wenn neben diesen kleinsten Fetttropfchen im Plasma der Frauenmilch selbst Teilchen erscheinen, die nach den später zu schildernden Untersuchungen mit den in der Tiermilch vorkommenden identisch sein dürften. Immer aber unterscheidet sich das Bild der Frauenmilch von dem der Tiermilch durch das Aussehen des Plasmas. Auch eventuell vorhandene Ultrateilchen können an dem schwarzen Ton desselben nichts ändern, da sie niemals in so grosser Menge auftreten, um genug Licht zu reflektieren. Es muss also bei der ultramikroskopischen Untersuchung der Milch ein schwarz erscheinendes Plasma als charakteristisch für Frauenmilch bezeichnet werden.

Über das zeitliche Auftreten der Ultrateilchen im Brustdrüsensekret der Tiere stehen noch nicht viele Beobachtungen zur Verfügung, jedenfalls nicht so viele, dass eine erschöpfende Darstellung möglich wäre. Das eine lässt sich schon jetzt sagen, dass die Zeit des Erscheinens derselben bei verschiedenen Tieren nicht gleich ist. Bei manchen kann man die Teilchen schon im Colostrum sehen, so bei der Ziege, beim Kaninchen und beim Hund. Das Ziegencolostrum zeigt dieselben schon zwei Wochen vor dem Wurf. Bei der Katze dagegen

treten dieselben erst 24—36 Stunden nach dem Wurf auf. Bei manchen Tieren, z. B. bei der Ziege, der Kuh und anderen, dürfen nur primigravide zu dieser Untersuchung herangezogen werden, weil man sonst nicht sicher ist, ob nicht der Charakter des neuen Colostrums durch die alte Milch beeinflusst wird. Bemerkenswert ist, dass sich das Sekret verschiedener Drüsen bei demselben Tiere oft verschieden verhält. So liess sich bei einer Katze nach dem Wurf aus einer Brustdrüse Milch mit Teilchen, aus anderen Colostrum ohne solche ausdrücken. Ein gleiches Verhalten zeigte eine Kuh, bei welcher sich aus einem Euter Colostrum mit Teilchen entleeren liess, während sie in dem Sekret des anderen nicht auffindbar waren.

Die grosse Zahl der Ultrateilchen in der Milch der oben genannten neun Tierarten, der Umstand, dass man sie jederzeit in derselben findet und, wenn man ein bisschen Übung im Sehen ultramikroskopischer Bilder hat, auch leichte charakteristische Unterschiede im Aussehen derselben bei verschiedenen Spezies erkennen kann (die Teilchen in der Milch der kleineren Tiere, z. B. der Katze, scheinen stärker lichtbrechend zu sein wie die der Kuh), machten es schon von vornherein wahrscheinlich, dass es sich nicht um einen zufälligen Bestandteil der Milch, sondern um einen zum Wesen derselben gehörigen handeln könne. Ein Hinweis darauf lag auch darin, dass sich die Frauenmilch in so schroffem Gegensatz zu der Tiermilch befindet, ein Hinweis, dass es ein Körper sein muss, der in der Frauenmilch nicht oder in anderer Form oder Menge vorhanden sei.

Wenn es sich darum handelt, die Frage zu beantworten, um welchen von den in der normalen Milch vorkommenden wichtigsten Bestandteilen, Eiweiss, Fett, Salze oder Kohlehydrate, es sich bei diesem ultramikroskopisch sichtbaren Element handelt, so können nur die ersten drei in Betracht kommen, da die Kohlehydrate in der Milch gelöst sind.

Im Dunkelfeld sieht man ja nur dasjenige sich von der Umgebung abheben, was ein von diesem abweichendes Lichtbrechungsvermögen hat. Man kann also niemals Bestandteile von wirklichen, sondern nur kolloidalen Lösungen sehen.

Auch die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um Fett handeln könne, war nicht gross. Auch ohne chemische Untersuchung liess sich dagegen der Unterschied im ultramikroskopischen Bild der Frauen- und Tiermilch anführen. Der Fettgehalt der Kuhmilch ist

kleiner als der der Frauenmilch. In letzterer aber ist das Plasma frei von Teilchen, in ersterer voll von ihnen. Die Ätherausschüttelung gab diesem Raisonnement recht, indem sie zeigte, dass die Teilchen in Äther nicht löslich sind. Es ergab sich dabei sogar das auffallende Verhalten, dass nach dem Schütteln anscheinend mehr Teilchen zu sehen sind, und dass sie auch stärker lichtbrechend erscheinen. In keinem Fall jedoch liess sich eine Verminderung oder ein Verschwinden derselben konstatieren, und damit kam die Frage, ob die Teilchen Butterfett darstellen, nicht weiter in betracht. Es konnte sich also nur um Eiweisskörper oder Salze, speziell suspendierte Kalksalze handeln. Für diese Möglichkeit sprach auch die bekannte Tatsache, dass der Gehalt an letzteren bei der Tiermilch unverhältnismässig grösser ist als bei der Frauenmilch.

Zur Entscheidung der Frage: Eiweiss oder Salze, wurde der Versuch gemacht, die Teilchen zu verdauen. Es wurde zu frischer Kuhmilch eine geringe Menge Pankreon zugesetzt und die Probe für 6 Stunden in den Brutschrank gestellt. Beim Herausnehmen zeigte sich die Milch vollkommen verändert. Sie hatte die weisse Farbe verloren, sah bräunlich durchscheinend aus, und die mikroskopische Prüfung ergab das vollkommene Fehlen der Ultrateilchen. Ebenso fiel der Versuch, die Milch mit Pepsin zu verdauen, aus.

Hier wurde die Milch ganz schwach angesäuert und dann eine kleine Menge möglichst reinen Pepsins zugesetzt.

Diese beiden Versuche entscheiden einwandfrei in dem Sinne, dass die im Dunkelfeld sichtbaren Teilchen der Milch Eiweiss oder dessen Verbindungen darstellen; es war aber nicht daraus zu schliessen, welcher von den in der Milch vorkommenden Eiweisskörpern durch die Dunkelfeldbeleuchtung dem Auge sichtbar gemacht wird.

Ob es das Kasein, das Laktalbumin, das Laktoglobulin oder ein anderer Eiweisskörper der Milch sei, das liess sich zunächst aus bekannten Erfahrungen und neuen zu diesem Zweck angestellten Versuchen schliessen, während die sichere Entscheidung nur durch die chemische Untersuchung der rein dargestellten Partikelchen zu treffen ist. Mit grosser Wahrscheinlichkeit sprach der folgende Umstand dafür, dass die Ultrateilchen der Milch suspendiertes Kasein sind. Wenn man Kuhmilch zur Gerinnung bringt, so entsteht ein festes Coagulum, der Käse, und ein flüssiger Anteil, die Molke. Nun

weiss man, dass das Coagulum, speziell wenn es durch wiederholtes Lösen in Alkali und Fällen durch Säure von anderen Stoffen befreit ist, als wichtigsten Bestandteil das Kasein enthält. Dabei ist es zunächst für die vorliegende Frage gleichgültig, ob es sich um den Eiweisskörper selbst oder um eine Verbindung desselben mit anorganischer Substanz handelt. Untersucht man die Molke ultramikroskopisch, so sind darin keine Ultrateilchen zu finden; man kann also annehmen, dass, wenn sie nicht zur Auflösung gelangt sind, sie in dem Coagulum stecken und dem Kasein entsprechen, aus welchem es zusammengesetzt ist. Nun kann man unter dem Mikroskop sehen, dass von einer Auflösung der Teilchen durch die Vorgänge, welche zur Gerinnung führen, nicht die Rede sein kann. Setzt man nämlich auf zwei diagonal gegenüberliegende Ecken eines Deckgläschens einerseits einen Tropfen Kuhmilch, andererseits einen Tropfen einer sehr verdünnten Säure, legt das so beschickte Deckgläschen auf den Objektträger und verfolgt die Erscheinungen an der Grenze der sich begegnenden Flüssigkeiten in Dunkelfeldbeleuchtung, so sieht man, dass die Ultrateilchen unter dem Einfluss der Säure eine der Agglutination der Bakterien vergleichbare Verklebung eingehen. Wenn die so gebildeten Häufchen eine gewisse Grösse erreicht haben, senken sie sich auf den Boden des Präparats. Der so angestellte Versuch, durch den man imstande ist, die Milchgerinnung schon im mikroskopischen Stadium zu verfolgen, zeigt, dass von einer Auflösung der Teilchen bei der Gerinnung nicht die Rede sein kann, und dass man also berechtigt ist, anzunehmen, dass sie in das Gerinnsel übergegangen sind, also Kasein darstellen. Zu denselben Schlussfolgerungen berechtigen auch die entsprechenden Beobachtungen bei der Labgerinnung. Versetzt man eine Probe Kuhmilch mit Lab und zwar in solcher Menge, dass es nicht zu rasch zur Fällung kommt, und untersucht in regelmässigen Intervallen die Milch im Dunkelfeld, so kann man den gleichen Vorgang des Konfluierens der Teilchen bis zur schliesslichen Bildung von grösseren Flöckchen verfolgen. Diese Versuche, speziell der mit Lab, sprechen aber auch direkt für die ausgesprochene Vermutung, indem sie Reaktionen darstellen, welche für Kasein charakteristisch sind.

Den sicheren Beweis dafür, dass die Teilchen Kasein sind, bringt ein Versuch, der im wesentlichen der Reindarstellung des Kaseins nach der Hammarsten'schen Methode entspricht. Dabei braucht nur eine gewisse Vorsicht angewendet zu werden. Wenn man durch

Zusatz von Säure zur Milch ein Coagulum erzeugt, dasselbe reinigt und durch Zusatz von Alkali wieder löst und durch wiederholte Ausführung dieses Vorganges und Entfernung des Fettes schliesslich zum reinen Kasein gelangt, so hat man schon nach der Hammarsten-schen Vorschrift ein Zuviel von Alkali zu vermeiden. Geht man nun in der Weise vor, dass man zur Milch eine bestimmte Menge Säure zusetzt, die eben zur Fällung genügt, das Coagulum aber nicht mit der angewendeten Säuremenge äquivalenten Alkaliquantität, sondern ungefähr mit der Hälfte derselben zur Auflösung bringt, so erhält man eine milchige Flüssigkeit, in der man die Teilchen wieder erkennen kann. Durch neuerliches Füllen mit Säure und vorsichtiges Auflösen des Coagulums mit wenig Alkali kommt man nach endlicher Entfernung des Fettes zu einem Coagulum, welches nur aus den Ultrateilchen der Milch besteht.

Es bedarf wohl kaum eines strikteren Beweises für die Kaseinatur der in der Kuhmilch vorkommenden Ultrateilchen, als dass man sie bei der Reindarstellung des Kaseins bis in das Endprodukt verfolgen kann, und man kann also sagen, dass die in der Kuhmilch bei Dunkelfeldbeleuchtung sichtbaren Partikelchen in feinsten Suspension befindliches Kasein seien. Man wird wohl kaum fehlgehen, wenn man auch die Ultrateilchen der anderen Tiermilcharten als Kasein anspricht. Diese festgestellte Tatsache bildet die definitive Entscheidung der eigentlich bis jetzt immer noch offenen Frage über die Art des Lösungszustandes des Kaseins in der Milch. Schon seit Schübler¹⁾ hatte man angenommen, dass das Kasein sich in feinsten Verteilung, nicht in wirklicher Lösung befinde, und Quevenne²⁾ glaubte die Teilchen in der Eselsmilch auch gesehen zu haben. Nach den vorliegenden Beobachtungen mit dem Ultramikroskop an den genannten Tiermilcharten ist das allerdings kaum glaublich, da die Grösse der Kaseinteilchen unter der Auflösungsgrenze jener Instrumente steht, mit denen Quevenne gearbeitet hat; es müsste denn sein, dass die Kaseinteilchen der Eselsmilch, über die wir keine Erfahrung besitzen, grösser sind als die von uns bisher gesehenen. Wahrscheinlich hat Quevenne die feinsten Fetttröpfchen, die eben noch sichtbar waren, für Kaseinteilchen gehalten. Trotzdem hatte man manchen Anhaltspunkt

1) Schübler, Deutsch. Arch. f. Physiol. 1818 Nr. 4.

2) Quevenne, zit. nach Raudnitz in Asher-Spiro.

dafür, dass das Fett nicht das einzige korpuskuläre Element in der Milch sein könne. Schon Schübler hatte die bestimmte Meinung ausgesprochen, dass die weisse Farbe der Kuhmilch durch den Käsestoff bedingt sei, und andere (Quevenne, Joly-Filhol) hatten sich ihm angeschlossen. Fuld¹⁾ spricht sich direkt dafür aus, dass das Kasein in der Milch nicht gelöst, sondern nur suspendiert sei, und zwar entschieden grobkörnig und hält den Versuch Salkowski's, Milch durch mehrere Jahre über Chloroform stehen zu lassen, wobei eine Anreicherung der unteren Schichten an Kasein erfolgt — entsprechend dem spezifischen Gewicht desselben — für den einwandfreiesten Beweis des bloss suspendierten Verteilungszustandes dieser Substanz. Raudnitz²⁾ führt als Beweis für diese Annahme an, dass entrahmte Kuhmilch mit etwa 0,2 % Fett beinahe ebenso weiss sei wie Vollmilch, woraus er schliesst, dass die weisse Farbe zum mindesten nicht ausschliesslich durch Reflexion an den Fettkügelchen entsteht.

Wir möchten hier einen Versuch erwähnen, der in der gleichen Weise zu deuten ist. Wenn man zu einer bestimmten Menge, z. B. 3 cm, Kuhmilch einige Tropfen einer 1 %igen Osmiumsäure hinzufügt, so wird die Milch grau, setzt man aber die gleiche Menge Osmium zu derselben Quantität von Frauenmilch, so färbt sich diese schwarzbraun. Es deutet also auch dieser Versuch darauf hin, dass in der Kuhmilch eine Ursache mehr für die weisse Farbe besteht als in der Frauenmilch.

Als weiteren Beweis dafür führt Raudnitz an, dass die Milch viel durchscheinender wird, wenn man sie mit so viel Säure versetzt, dass das ausfallende Kasein wieder in Lösung geht, durchscheinender als eine gleiche Probe mit Wasser versetzt. Vieth³⁾ sah dasselbe bei Alkalizusatz. Trotzdem erklärt Raudnitz, dass wir über den Zustand des Käsestoffes in der Milch nicht genügend orientiert sind und erwartet von weiteren Untersuchungen Aufklärung.

Tatsächlich wurde die Frage bis in die letzte Zeit studiert, und es seien hier nur die Arbeiten von Berninzone⁴⁾ und von Rose-

1) E. Fuld, Über die Labgerinnung der Milch. Asher-Spiro, Ergebn. d. Physiol. Bd. 1 S. 481. 1902.

2) Raudnitz, Bestandteile, Eigenschaften und Veränderungen der Milch. Asher-Spiro, Ergebn. d. Physiol. Bd. 2 S. 1. 1903.

3) Vieth, Milchzeitung 1890. Zit. nach Raudnitz.

4) Berninzone, Thermische Erscheinungen bei der Gerinnung der Milch. Atti della società Ligustica t. 11. 1900. Zit. nach Maly's Jahresbericht.

mann¹⁾ erwähnt. Berninzone stellte zur Entscheidung der Frage, ob die Koagulation der Milch im Sinne von Duclaux ein rein physikalischer Vorgang sei, eine Reihe von Versuchen an, aus denen unter anderen hervorgeht, dass sich das Kasein in der Milch nicht im Zustand der Lösung befindet, sondern nur suspendiert ist.

Rosemann will ebenfalls die Frage entscheiden, ob der Käsestoff in der Milch gequollen oder gelöst ist. Er bediente sich zu diesem Zweck der Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung, die durch Kochsalzzusatz in Wasser, Milch und dem Tonzellenfiltrat derselben hervorgerufen wird. Dabei ging er von folgendem Gedankengang aus. Wenn der Käsestoff nicht gelöst ist, so muss er einen bestimmten Raum einnehmen, zu welchem das Kochsalz nicht gelangen kann; es ist also der Raum, in welchem sich das Kochsalz verteilen kann, kleiner als in der gleichen Quantität Wasser. Die Kochsalzlösung wird also in dem Fall, wenn sich das Kasein in feinsten Suspension befindet, konzentrierter sein. Tatsächlich war die Gefrierpunktserniedrigung bei Lösung in Wasser kleiner als bei Lösung in Milch.

Solche Erwägungen hatten also schon längst die Form des Lösungszustandes des Kaseins als eines kolloidalen wahrscheinlich gemacht. Die Untersuchungen im Ultramikroskop erheben die Vermutung zur Sicherheit. Sie zeigt aber auch deutlich einen Unterschied in dem Lösungszustand des Frauenkaseins und dem Kasein der untersuchten Tierarten, speziell der Kuh, der in dieser Deutlichkeit und Schärfe bisher nicht erkannt werden konnte. Eine Reihe bekannter physikalischer und chemischer Erscheinungen werden durch die Feststellung, dass wir in der Kuhmilch das Kasein in ungelöster Form erkennen können, ihre Erklärung finden, andererseits manche Hypothese gestützt werden.

Es wurde bereits erwähnt, dass die weisse Farbe der Milch seit Schübler auf die Reflexion des Lichtes an den Kaseinpartikelchen zurückgeführt wird. Tatsächlich hat derselbe Umstand, der uns im Ultramikroskop die Teilchen zur Wahrnehmung bringt, nämlich die Reflexion resp. Beugung der Lichtstrahlen durch die Partikel, den Hauptanteil an der Entstehung der weissen Farbe der Milch. Ist die Milch im Deckglaspräparat in etwas dickerer Schicht, oder sind

1) Rosemann, Über den Zustand des Kaseins in der Milch. Deutsche med. Wochenschr. 1903 Nr. 5.

die Teilchen sehr dicht, wie dies bei der Milch der kleineren Tiere den Eindruck macht, so sieht man zunächst nur eine weisse Fläche, keine distinkten Punkte, ausser den Fetttropfen, und wir haben dann ähnliche Verhältnisse wie beim makroskopischen Anblick der Milch. Lösen wir aber das Kasein durch Natronlauge, so wird die Milch makroskopisch durchscheinender, im Dunkelfeldpräparat sind die Teilchen verschwunden, das Bild ist dem der Frauenmilch sehr ähnlich. Die Farbe der Frauenmilch ist also wie die der mit Lauge versetzten Kuhmilch ausschliesslich auf das von den Fetttropfen reflektierte Licht zu beziehen, was man schon daran erkennen kann, dass die Frauenmilch im Gegensatz zu der Kuhmilch nach der Abrahmung ihre weisse Farbe verliert und opaleszent wird. Der Vergleich zwischen Kuh- und Frauenmilch im Dunkelfeld lässt manche Verschiedenheiten im chemischen Verhalten der beiden verstehen, von denen noch gesprochen werden wird.

Wir werden auch den Unterschied verstehen, den Alkali- und Erdalkalikasein usw. hinsichtlich der Tonzellenfiltration bieten. David Fraser-Harris¹⁾ fand, dass Kaseinalkalilösungen oder die durch Zusatz von Alkali in der Milch entstehende Kaseinverbindung die Tonzelle passiere, während dies Kaseinkalklösungen und der natürliche Käsestoff nicht tun. Wir werden diese Tatsache begreiflich finden, wenn wir das Bild der Milch vor und nach Zusatz von Natronlauge ultramikroskopisch vergleichen. Wie schon erwähnt, verschwinden im letzteren Fall die Kaseinteilchen, was auf einen höheren Lösungsgrad derselben schliessen lässt, der die leichtere Passierbarkeit durch Tonfilter erklärt.

Die Tatsache, dass der Käsestoff der Milch der direkten Beobachtung durch das Auge schon im frischen, nicht geronnenen Zustand zugänglich ist, liess für das Wesen des Gerinnungsprozesses Aufklärungen erwarten. Wenigstens nach einer Richtung hin musste man Aufschluss erhalten können, nämlich betreffend die Frage, wie sich diese Teilchen unter dem Einfluss gerinnungsfördernder Mittel verhalten. Was mit ihnen chemisch geschieht und ob sie durch Lab oder Säure irgendwie eine Änderung ihrer Konstitution erfahren, das lässt das Ultramikroskop natürlich nicht erkennen, nicht einmal Formveränderungen oder Veränderungen ihrer Oberfläche. Dazu sind die Teilchen zu klein und die Auflösung der angewendeten Linsen-

1) David Fraser-Harris, Journ. of physiol. 1900 Nr. 25.

systeme zu gering. Wir können aber beobachten, dass die Teilchen der Kuhmilch unter dem Einfluss von Lab oder Säure zusammen-treten und zuerst kleine, dann grössere Verbände bilden, an denen die Zusammensetzung aus den Teilchen zu erkennen ist. In den Konglomeraten, die nach Erreichung einer gewissen Grösse zu Boden sinken, sind die Fetttropfchen deutlich zu sehen. Man kann also einen physikalischen Vorgang bei der Gerinnung der Milch, ein Zusammenkleben, eine Art Agglutination der Teilchen direkt sehen und damit sowohl die Ansicht von Duclaux¹⁾ bestätigen, der sich die Gerinnung als eine Zusammenballung kleinster Kaseinteilchen vorstellte, als auch die Richtigkeit der Versuche jener Autoren, deren Resultate auf die Bedeutung physikalischer Vorgänge bei der Gerinnung hinwiesen. Die betreffende Literatur ist zu gross, um ausführlich darüber berichten zu können, und es sei diesbezüglich auf die Sammelreferate von Raudnitz verwiesen²⁾. Hier mögen nur einige wichtige Arbeiten genannt werden. Berninzone³⁾ wird durch seine oben erwähnten Versuche zu dem Schluss veranlasst, dass die Gerinnung kein chemischer Prozess sei, sondern nur eine Veränderung des Zustandes physikalischer Isomerie, der die räumliche Verteilung und Distanz der physikalischen Moleküle betrifft, oder ein Phänomen molekularer Adhäsion, so wie es die Theorie von Duclaux will. Auch Reichel-Spiro⁴⁾ sind auf Grund ihrer Untersuchungen über den elektrischen Leitungswiderstand zu der Annahme gekommen, dass die Schwankungen der Leitfähigkeit, welche die Milch im Moment der Gerinnung durch Lab zeigt, ihre Ursache in mechanischen Vorgängen haben.

Soweit es sich also um die Tiermilcharten handelte, welche das Kasein in Form sichtbarer Teilchen enthalten, war die Entstehung der Gerinnsel bei Zusatz von Lab und Säure erklärt. Schwierigkeiten erwachsen erst bei der Frage, wie die Flocken geronnener Frauenmilch entstehen, die keine Ultrateilchen enthält oder, wenn dies auch in manchen Frauenmilchproben der Fall ist, in so geringer Menge, dass man annehmen muss, dass ausserdem noch nicht sichtbares Kasein vorhanden ist.

1) Zitiert nach Fuld. Asher-Spiro, *Ergebn. d. Physiol.* Bd. 1 S. 1.

2) *Monatsschr. f. Kinderheilk.*

3) *l. c.*

4) Reichel-Spiro, *Hofmeister's Beiträge* Bd. 8 S. 15.

Das Studium dieser Frage hängt natürlich mit der Frage zusammen, ob Frauenmilch überhaupt durch Lab zur Gerinnung gebracht werden kann. Die Gerinnbarkeit derselben auf Säurezusatz wird wohl allgemein zugegeben, wenn man auch hier Unterschiede gegenüber dem Verhalten der Kuhmilch gefunden hat und leicht finden kann. So sagt Raudnitz¹⁾, dass es zwar bei der spontanen Gerinnung der Frauenmilch zur Bildung grosser Flocken kommt, dass man in der Kälte jedoch durch Säurezusatz keine die Papierfilter nicht passierenden Coagula zu erzeugen vermag, und dass sich mikroskopisch feinste staubförmige Gerinnung zeigt. Wir können nach unseren Erfahrungen diese Behauptung im grossen und ganzen bestätigen. Wohl aber erhält man grobe Flocken in der Frauenmilch, wenn man nach dem Vorgang von Bianca Bienenfeld²⁾ zu 5 ccm zentrifugierter Frauenmilch 1 ccm $n/10$ Milchsäure hinzufügt, das Ganze eventuell auf das vierfache verdünnt, und auf 40° C. im Wasserbad erwärmt. Dagegen begegnet man in der Literatur Differenzen in den Angaben über die Fähigkeit der Frauenmilch, mit Lab Gerinnung einzugehen, sogar Zweifel, ob es überhaupt in der Frauenmilch Kasein gibt [Bechamp³⁾]. Der Umstand, dass durch Essigsäure in der Frauen- und Eselsmilch nur nach dem Dialysieren oder Erwärmen ein Coagulum ausfällt, und dass man bei Labzusatz auch die Azidität erhöhen muss, um schliesslich ein Gerinnsel zu erhalten, das leicht zu übersehen ist, veranlasste Bechamp zu der Annahme, dass die genannten Milcharten kein Kasein enthalten. Andere Autoren, so Petry⁴⁾ und in letzter Zeit Bienenfeld, sprechen der Frauenmilch die Fähigkeit ab, mit Lab zu gerinnen. Ersterer spricht von der Unwirksamkeit des Lab gegenüber der „bekanntlich ungerinnbaren Frauenmilch“. Bianca Bienenfeld kommt zu demselben Schluss auf Grund des folgenden Versuches. Sie hat den Stickstoffgehalt von Frauenmilchgerinnseln bestimmt, die sie durch Säurefällung erhielt. Dann hat sie drei Kontrollversuche mit Milchsäure und Lab

1) Raudnitz, l. c. S. 313.

2) Bianca Bienenfeld, Das Verhalten der Frauenmilch zu Lab und Säure. Biochem. Zeitschr. Bd. 7 S. 3.

3) Bechamp, zit. nach Raudnitz.

4) Petry, Über die Einwirkung des Labfermentes auf das Kasein. Wiener klin. Wochenschr. 1906.

angestellt. Da diese nahezu die gleiche gefällte Eiweissmenge ergaben wie die Fällung mit Michsäure allein, so schliesst sie daraus, dass bei der Einwirkung von Säure und Lab nur eine Säurefällung und nicht eine Gerinnung durch Lab zustande kommt. Mit Lab allein erhielt sie keine Fällung.

Es war danach zunächst notwendig, die Angaben der früheren Autoren zu prüfen und durch eigene Erfahrungen zu ergänzen. Es liess sich dabei tatsächlich zunächst feststellen, dass Labzusatz zu frischer Frauenmilch anscheinend keine Gerinnung erzeugt. Wenn man aber — und dieser Vorgang wurde schon von früheren Autoren angegeben — die Azidität der Frauenmilch vorsichtig erhöht und dann Lab hinzufügt, so tritt prompt Labgerinnung ein. Der Vorgang, der dabei von uns eingehalten wurde, war folgender: Je 10 ccm frischer Frauenmilch (von einer Azidität, die bekanntlich ungefähr 4 ccm n_{10} Natronlauge auf 100 ccm Milch entspricht), wurden mit 0,2, 0,4 bis 2,4 ccm n_{10} Salz- oder Milchsäure versetzt. Jede Probe wurde dann in die Hälfte geteilt und die Hälften der einen Reihe als Kontrollproben zurückbehalten, zu der anderen Reihe von Proben je 1 ccm einer neutralisierten Lablösung (Witte oder Grübler'sches Präparat) hinzugefügt, welche eine Konzentration von 0,3—1,0:100 ccm destilliertes Wasser hatte. Wir verwendeten immer neutralisierte Lablösungen, um reinere Versuchsbedingungen zu erhalten. Es zeigte sich bei dieser Versuchsanordnung schon in der Kälte Gerinnung mit deutlicher grober Ausflockung in den mit Lab versetzten Proben, während die nur stärker saueren Kontrollproben keine Flockenbildung aufwiesen. Dabei liess sich ein Optimum der Labgerinnung in jenen Proben erkennen, deren Azidität ungefähr 0,8—1,0 ccm n_{10} Säurelösung entsprach, d. h. wo zu 10 ccm noch zirka 0,6 ccm Säurelösung hinzugefügt worden war. Hier dauerte es in der Kälte resp. bei Zimmertemperatur nur wenige Sekunden, bis die Gerinnung eintrat. Von da auf- und abwärts kam es zwar auch noch zur Labgerinnung, aber die Zeit, welche dazu nötig war, betrug entsprechend der Entfernung vom Optimum wenige bis mehrere Minuten (10—20). Schliesslich kam es in einigen Proben, und zwar den am meisten vom Optimum entfernten, makroskopisch gar nicht zur Gerinnung.

Nichtsdestoweniger schien uns der Nachweis einer reinen Fermentwirkung noch nicht erbracht, da es sich doch immer noch um die gerinnungsfördernde Einwirkung einer Verunreinigung des

käuflichen Labpulvers hätte handeln können. Deshalb wurde der Versuch gemacht, die auf das Säureoptimum gebrachte Frauenmilch durch eine gekochte Lablösung zur Gerinnung zu bringen. Dieser Versuch gelang prompt, besonders bei Verwendung konzentrierter Lablösung, und damit wäre die Beweiskraft der vorher angeführten Versuche hinfällig geworden. Das trifft jedoch nicht zu. Die Inaktivierung der Lablösung war nicht intensiv genug vorgenommen worden. Das einmalige Aufkochen besonders konzentrierter Lösungen des Fermentes genügt nicht, um dasselbe zu zerstören. Wenn wir eine verdünnte Lösung, etwa die 1 % neutralisierte, durch eine bis mehrere Stunden im Wasserbade kochten, so war dann mit derselben eine Labgerinnung auch der Frauenmilch nicht zu erzielen. Diese Tatsache ist bekannt. Nach Lörcher¹⁾ und Glässner²⁾ wird das Lab um so leichter zerstört, je verdünnter es ist, und nach Hammarsten wird einmaliges Aufkochen leichter überstanden als dauerndes Digerieren bei gelinder Hitze.

Damit war zunächst die Frage, ob Lab in Frauenmilch Ausflockung hervorrufen kann, entschieden, und es war zu untersuchen, wie es zur Flockenbildung komme — bei Säure- oder bei Labwirkung —, da wir das Kasein der Frauenmilch in einem anderen Zustand als in der Kuhmilch vermuten müssen und keine präformierten Käsestoffteilchen in derselben sehen können.

Untersuchungen, die mit dem Ultramikroskop zu diesem Zweck angestellt wurden, brachten diesbezüglich Aufklärung und zeigten, dass sich unter der Einwirkung von Lab oder Säure in dem Kasein der Frauenmilch eine Zustandsänderung vollzieht, welche die Frauenmilch der Kuhmilch ultramikroskopisch ähnlich macht. Die Versuche, die ersten Zeichen der Labgerinnung zu erkennen, mussten zwei Arten von Einwirkungen berücksichtigen; zwei Faktoren kamen dabei in Betracht, die Säurewirkung und der Einfluss des Lab. Denn ohne einen gewissen Grad von Azidität war ja in den vorerwähnten Versuchen eine Labwirkung nicht zu erzielen gewesen. Deshalb wurden Frauenmilchproben auf jene Azidität gebracht, welche an sich zwar nicht ausreichte, um die Milch zum Ausflocken zu bringen, die ihr aber die Fähigkeit geben, bei Zusatz von Lab zu gerinnen, d. h. es

1) Lörcher, Über Labwirkung. Pflüger's Arch. Bd. 69 S. 141.

2) Glässner, Über die Profermente der Magenschleimhaut. Hofmeister's Beiträge Bd. 1 S. 1.

wurden zu 5 ccm frischer Frauenmilch 0,2—0,3 n/10 Milch- oder Salzsäure hinzugefügt und durch 10—15 Minuten im Wasserbad auf 40° C. erwärmt. In regelmässigen Zwischenräumen angefertigte Präparate liessen im Ultramikroskop eine Veränderung nicht erkennen. Wurde aber zu der frischen nicht angesäuerten Milch neutrale Lablösung zugesetzt und die Probe durch 10—15 Minuten bei 40° C. gehalten, so liessen sich nach dieser Zeit leicht in dem sonst schwarz erscheinenden Plasma reichlichst Ultrateilchen erkennen. Zu diesem Ausfallen von Teilchen kam es aber früher, wenn unter sonst gleichen Verhältnissen die Azidität erhöht wurde, um so rascher, je mehr man sich dem oben genannten Säure-Optimum näherte, schliesslich so rasch, dass der Ablauf der Flockenbildung nicht mehr verfolgt werden konnte. Während nämlich der Prozess in der nicht angesäuerten, nur mit Lab versetzten Frauenmilch beim Ausfallen der Teilchen stehen blieb, konnte man den Einfluss des Säurezusatzes nicht nur daran erkennen, dass die Teilchen rascher erschienen, z. B. nach fünf Minuten oder schon nach einer Minute, sondern vor allem in dem allmählichen Zusammentreten der gebildeten Teilchen zu kleinen, dann grösseren Verbänden, die schliesslich auf den Boden des Präparates fielen. Zur selben Zeit war in den Proben, welchen die Präparate entstammten, ebenfalls Ausflockung eingetreten. Es liess sich also der Prozess der Flockenbildung ebenso wie in der Kuhmilch verfolgen, nur dass bei dieser die Labwirkung förmlich in einem späteren Zeitpunkt einsetzt, da die Teilchenbildung bereits vollzogen ist.

Diese Veränderungen, die wir unter dem Einfluss von Lab und Säure beobachten können, sind unbedingt auf den Einfluss des Lab zu beziehen, einerseits weil wir ihren Beginn schon ohne Säurezusatz in dem Auftreten von Ultrateilchen erkennen und andererseits dieselben Säuremengen ohne Lab keine Veränderung des Bildes hervorrufen. Andererseits ist es ganz sicher, dass die Labwirkung ohne Säurezuführung über die Bildung von Teilchen nicht hinausgeht, ja sie leistet nicht einmal das, wenn man die Milch so weit durch Alkalizusatz neutralisiert, dass sie blaues Lakmuspapier nicht mehr rötet. Dann kommt es auch nicht mehr zum Ausfallen von Ultrateilchen.

Nach diesen Beobachtungen war zu erwarten, dass auch bei der Säurefällung ähnliche Vorgänge sich abspielen, und dass man dieselben würde verfolgen können, wenn man die Fällung sich nicht zu rasch vollziehen lässt. Man hat es natürlich in der Hand, den

Prozess zu verzögern, wenn man nicht das Optimum der Säuregerinnung zur Beobachtung wählt, sondern einen Säuregrad, der in der Frauenmilch die Ausflockung erst nach Minuten erfolgen lässt, oder noch besser, wenn man die Milch nur so weit ansäuert, dass es eben noch nicht zur Bildung von makroskopisch sichtbaren Flocken kommt. Man erreicht dies durch Zusatz von 0,7—0,8 ccm $\frac{n}{10}$ Milchsäure zu 5 ccm Frauenmilch und Erwärmen auf 40° C. durch einige Minuten. Ebenso wie bei der Labung kommt es auch hier zunächst zum Ausfallen von Teilchen, die später bei Erhöhung der Azidität sich zu kleinen und grösseren Häufchen vereinigen und niedersinken. Also wieder derselbe Vorgang wie bei der Gerinnung der Kuhmilch. Hinzuzufügen wäre hier noch die Beobachtung, dass das Ausfallen von Teilchen in der Frauenmilch bei um so niedrigeren Säuregraden erfolgt, je höheren Temperaturen man die Milch aussetzt, so dass auch normale, nicht angesäuerte Frauenmilch Teilchen zeigt, wenn man sie kocht. Doch scheint es fraglich, ob diese Teilchen alle der gleichen Provenienz sind.

Diese Entstehung der Ultrateilchen in der Frauenmilch unter dem Einfluss von Lab und Säure und durch Säure allein in den entsprechenden Verhältnissen drängt die Frage auf, warum in der Kuhmilch die Kaseinteilchen schon präformiert sind, während sie in der Frauenmilch, soll diese gerinnen, erst gebildet werden müssen, mit anderen Worten, warum in der Kuhmilch im Gegensatz zur Frauenmilch das Kasein schon ausgefallen resp. weniger gut gelöst ist. Zwei Faktoren konnten dafür verantwortlich gemacht werden und scheinen geeignet, den mikroskopischen Unterschied im Bild der beiden Milcharten zu erklären. Es wäre möglich, dass in der Kuhmilch das Kasein schon ohne jeden Zusatz sichtbar ist, weil es in zu grosser Menge enthalten ist, als dass es in Lösung bleiben könnte; es wäre aber auch möglich, dass die Azidität der Kuhmilch, die relativ um vieles grösser ist als die der Frauenmilch, die Schuld daran trägt. Der Umstand nun, dass in der Frauenmilch Teilchen ausfallen, sobald man ihre Azidität auf die Höhe der in der Kuhmilch vorhandenen bringt und im Wasserbad auf 40° C. erwärmt, lässt die zweite Vermutung als die richtigere erscheinen.

Wie diese Teilchenbildung, der erste Ausdruck der Gerinnung in der Frauenmilch zustande kommt, darüber lässt sich zurzeit sicheres nicht ermitteln. Nach dem aber, was man beim Fortschreiten des Gerinnungsprozesses im Ultramikroskop beobachten

kann, könnte man sich das folgende Bild machen. Das Labferment hat — neben anderen Eigenschaften, die sich in rein chemischen Wirkungen äussern mögen — die Fähigkeit, kleinste Kaseinpartikelchen zu verkleben. Diese Fähigkeit ist an die Gegenwart von Säure gebunden und hat für jeden Säuregrad eine bestimmte Grösse, so zwar, dass z. B. bei der Azidität der normalen Frauenmilch die Labwirkung über die Bildung von ultramikroskopisch grossen Teilchen nicht hinausgehen kann. Sollen die Teilchen grösser werden resp. Flocken bilden, so muss die Azidität grösser sein. In diesem Sinne könnte man sich auch vorstellen, dass die in der nicht angesäuerten Frauenmilch durch Lab entstandenen Ultrateilchen bereits der Beginn der Flockenbildung sind, von Flocken allerdings, die aus so kleinen Kaseinteilchen bestehen, dass man sie mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht sehen kann. Diese supponierten nicht sichtbaren Kaseinteilchen, würden also unter Mithilfe der in der frischen Frauenmilch vorhandenen Azidität durch das Lab zu den sichtbaren Ultrateilchen vereinigt, diese bei Gegenwart von höherer Azidität zu noch grösseren, mikroskopischen und bei weiterem Säurezusatz zu makroskopisch sichtbaren Teilchen, i. e. den Gerinnseln, verbunden.

In ähnlicher Weise kann man sich auch die Entstehung der Ausflockung der Frauenmilch durch die dazu geeigneten Säuremengen erklären. Auch hier lässt sich zuerst die Entstehung von Ultrateilchen beobachten, aus denen sich erst die Gerinnsel bilden. So lässt sich aber auch, wie bereits erwähnt, das Vorhandensein von Ultrateilchen in der unveränderten Kuhmilch verstehen.

Ausser durch Lab oder Säure kann man in der Frauenmilch Teilchen noch auf andere Art hervorrufen. Wir haben gesehen, dass die Kuhmilch beim Schütteln mit Äther eine grössere Zahl von Ultrateilchen zeigt als vorher. Schüttelt man nun Frauenmilch mit Äther, so zeigen sich auch hier diese Gebilde, anscheinend feiner und zarter als in der Kuhmilch, aber ganz deutlich. Es sieht das Gesichtsfeld wie mit einem Schleier bedeckt aus. Es genügt aber auch blosses Schütteln in der Eprouvette, nur muss man kräftig und länger schütteln, mindestens 2 Minuten. Durch noch länger dauerndes Schütteln kann es etwa nach fünf Minuten sogar zum Ausfallen von kleinen Flöckchen kommen.

Aus derselben Ursache zeigt offenbar auch eine längere Zeit zentrifugierte Frauenmilch Teilchenbildung. Es bildet dabei wahr-

scheinlich die Erschütterung das ausfällende Moment. Weiters konnten wir Teilchen in der Frauenmilch erzeugen, wenn wir eine Milchprobe mit Ammoniumsulfat sättigten und 15 Minuten bei 40 ° C. belassen, ebenso beim Durchleiten von CO₂.

Alle diese Versuche zeigen, dass sich das Kasein der Frauenmilch in einem sehr labilen Gleichgewichtszustand befindet, aus dem es durch verschiedene Agentien gebracht werden kann. Es darf daher nicht wundernehmen, wenn man in einzelnen frischen Frauenmilchproben eine wenn auch geringe Zahl von Ultrateilchen findet.

Ebenso wie in der Frauenmilch die Teilchen hervorgerufen werden können, so lassen sich die Teilchen der Kuhmilch, wie früher bereits erwähnt, zum Verschwinden bringen. Es genügt eine geringe Menge Alkali zur Kuhmilch hinzuzufügen; wieviel man dazu verwenden muss, das hängt von verschiedenen Umständen ab, zunächst von der Natur des Alkali. Man benötigt ungefähr 10mal soviel kohlensaures Natron als Kalilauge. Dann vollzieht sich die Lösung der Teilchen bei um so geringeren Alkalimengen, je höher die Temperatur ist, der man die Mischung aussetzt, und je länger man sie einwirken lässt. Und schliesslich muss eine Vollmilch mit mehr Alkali versetzt werden als eine verdünnte Milch. So werden z. B. in 100 ccm 50 %iger Vollmilch die Teilchen bei Zusatz von 2—3 ccm einer 1 %igen Natronlauge oder einer 10 %igen Sodalösung, wobei das Alkali 1 Stunde bei 70—80 ° C. einwirkt, vollkommen gelöst. Unverdünnte Vollmilch wird auch durch 5 ccm dieser Lösungen unter sonst gleichen Bedingungen nicht teilchenfrei gemacht.

Bei unseren Untersuchungen wurden wir durch Überlassung von Frauenmilch von seiten der beiden geburtshilflichen Kliniken (Hofrat Prof. Chrobak und Schauta), der niederösterreichischen Findelanstalt (Prim. Dr. Riether) und von verschiedenen Tiermilcharten von der geburtshilflichen Klinik des Tierarzneinstitutes in so liebenswürdiger Weise unterstützt, dass wir nicht unterlassen können, an dieser Stelle dafür bestens zu danken.
