

Zur Kenntniss der Endprodukte der Pepsinverdauung.

Von

Dr. **Meinhard Pfaundler** aus Graz.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 32.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Juni 1900.)

Gelegentlich seiner Untersuchungen über den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweisspaltung konnte E. Zunz¹⁾ die überraschende Beobachtung machen, dass sehr bald nach Beginn der Verdauung ein erheblicher Theil des Eiweissstickstoffes in Form von die Biuretreaction nicht mehr gebenden Körpern abgespalten wird. In Versuchen mit Serumalbumin fand er beispielsweise einmal nach zweistündiger Verdauung 61,14 % , ein anderes Mal nach halbstündiger Verdauung 30,98 % , in Versuchen mit Casein nach vierstündiger Verdauung 50,67 % des Gesamtstickstoffes in solchen Körpern enthalten. Nach der Vermuthung von Zunz stellen sie die Hauptmasse der bei intensiver Pepsinverdauung gebildeten Endprodukte dar.

Die Eigenschaften dieser Körper betreffend ergibt sich aus den von Zunz mitgetheilten Analysen, dass sie zum Theile durch Phosphorwolframsäure fällbar sind und dass dieser fällbare Antheil bei lange fortgesetzter Verdauung beträchtlich zunimmt.

Nach Analogie mit der tryptischen Verdauung und mit anderen hydrolytischen Spaltungen des Eiweisses musste man zunächst wohl vermuthen, dass unter diesen nicht Biuret-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 132.

reaction gebenden Endprodukten namentlich die Aminosäuren und Ammoniak vertreten seien.

Ueber das Auftreten des Ammoniaks (bezw. äusserst leicht Ammoniak abspaltender Säureamide) hat bereits E. Zunz quantitative Versuche angestellt, welche die allmähliche Bildung solchen, durch Magnesia als Ammoniak abspaltbaren, Amidstickstoffes bei der Pepsinverdauung ausser Zweifel setzen, zugleich aber zeigen, dass seine Menge gegen jene der in Frage stehenden stickstoffhaltigen Endprodukte gering ist.

Betreffs des Auftretens von Aminosäuren und anderer nicht mehr Peptonnatur darbietender Verdauungsprodukte lagen vor Zunz nur vereinzelte, nicht quantitative Angaben anderer Autoren vor. So gibt Hoppe-Seyler¹⁾ auf Grund der Versuche seiner Schüler Lubavin²⁾ und Möhlenfeld³⁾ an, dass sich bei verlängerter Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit aus Peptonen langsam Leucin, Tyrosin und unbekannte Körper bilden, und Lawrow⁴⁾ glaubt aus einem seiner Versuche schliessen zu können, dass bei langdauernder, intensiver Verdauung einmal Substanzen entstehen, welchen die Biuretreaction und Fällbarkeit durch Ammonsulfat abgeht, die aber noch Millon'sche Reaction, Xanthoproteinreaction und Fällbarkeit durch Alcaloidreagentien zeigen, sodann aber auch krystallinische Spaltungsprodukte in nicht unbeträchtlicher Menge.

Diesen Beobachtungen steht die entschiedene Angabe Kühne's⁵⁾ gegenüber, wonach das in solchen Fällen gefundene Leucin und Tyrosin nicht aus Eiweiss durch Pepsinverdauung, sondern aus der Magenschleimhaut oder dem mit Glycerin bereiteten Rohenzyme bei der Auflösung in verdünnten Säuren entstehen. Ebenso erklärt Neumeister,⁶⁾

1) Physiologische Chemie, Bd. II, S. 228.

2) Hoppe-Seyler, med. chem. Untersuch., S. 452. Vergl. auch Winternitz, diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 464.

3) Pfüger's Archiv, Bd. V, S. 381.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 515, 517.

5) Verhandlungen des naturhistor. Vereins Heidelberg, 1876. Ref. Maly, Bd. VI.

6) Lehrbuch der physiol. Chemie, I. Aufl., S. 184.

dass die Magenverdauung mit der Bildung von Peptonen, die noch den allgemeinen Charakter von Proteinsubstanzen tragen», abschliesse.

Da somit die Frage, worum es sich bei den in so grosser Menge auftretenden, nicht Biuretreaction gebenden Körpern von Zunz handele, offen stand, unternahm ich es auf Anregung von Professor Hofmeister, weiteres Material zu ihrer Beantwortung beizuschaffen.

Da in einigen Vorversuchen die Menge des den fraglichen Produkten angehörenden Stickstoffes wesentlich kleiner gefunden wurde, als nach den Angaben von Zunz hätte erwartet werden können, das Auftreten derselben in grösseren Mengen somit an gewisse Bedingungen geknüpft zu sein schien, ergab sich als nächste Aufgabe, diese Bedingungen genauer zu studiren. Als weitere Aufgabe erschien die Entscheidung der Frage, ob die in Rede stehenden Endprodukte den Erfahrungen Hoppe-Seyler's und Lawrow's entsprechend ganz oder doch zum Theile aus einfachen Aminosäuren oder sonstigen krystallinischen Produkten bestehen, oder aber aus complicirteren Substanzen, welche dann nothwendig ihrem chemischen Charakter nach ihren Platz zwischen den «Peptonen» und den Aminosäuren finden müssten.

Aus äusseren Gründen habe ich diese Aufgaben nur in ihren Hauptzügen zu lösen vermocht, die vielversprechende Weiterführung der Untersuchungen aber anderen Händen überlassen müssen.

Ueber das quantitative Auftreten der der Biuretreaction entbehrenden Endprodukte der Pepsinverdauung.

Wie schon aus dem Gesagten hervorgeht, bezeichne ich «als Endprodukte der Pepsinverdauung» nicht mit Kühne und Neumeister die «Peptone» allein, sondern auch die nebenher entstehenden, keine Biuretreaction mehr gebenden Stoffe. Schon aus dem Widerstreite der Meinungen über die Existenz der letzteren geht hervor, dass sie offenbar in sehr wechselnder Menge erhalten werden. Bei näherer Untersuchung ergab sich, dass — wie schon Zunz vermuthungsweise ge-

äussert hat — namentlich die ursprüngliche Concentration des Verdauungsgemisches an Eiweiss von entscheidendem Einflusse ist. Wenig concentrirte Lösungen ergeben eine sehr viel bessere Ausbeute an den in Rede stehenden Substanzen.

Da, wie die Erfahrungen von Zunz lehren, die Menge der bei Pepsinverdauung auftretenden Peptone im Ganzen eine geringe ist und bei länger fortgesetzter Verdauung noch abnimmt, kann der Stickstoffgehalt des nicht aussalzbaren Antheiles des Gemisches als annäherndes Maass für die Menge der darin enthaltenen, nicht Biuretreaction gebenden Körper angesehen werden. In diesem Sinne illustriert folgende Versuchsreihe die eben gemachte Angabe:

Serumeiweissverdauung: Dauer: 3 mal 24 Stunden; Temperatur 35—44° C.;
0.6% H_2SO_4 ; 0.04% Pepsin-Grübler.

Anfänglicher Eiweissgehalt des Verdauungsgemenges:	Durch Zinksulfat in saurer Lösung nicht aussalzbarer Stickstoff in Procenten des Gesamtstickstoffes zu Ende des Versuches:
0.43 %	62.9 %
0.88 %	48.1 %
1.75 %	38.8 %
3.50 %	23.0 %

Nebst der Eiweissconcentration sind natürlich auch noch andere Umstände, namentlich die Qualität des angewandten Fermentpräparates und die Dauer der Digestion, auf die Menge der gebildeten Endprodukte von Einfluss. Bei monatelanger Verdauung können die Albumosen, wie ich fand, überhaupt bis auf Spuren verschwinden und nur geringe Mengen Pepton neben den der Biuretreaction entbehrenden Produkten zurückbleiben.

Methodisches.

Zur Isolirung der etwa entstandenen Aminosäuren und der keine Biuretreaction mehr darbietenden Produkte war die vorgängige Entfernung der Albumosen und Peptone nothwendig. Die Albumosen konnten durch Aussalzung mit Ammonsulfat (Kühne) oder mit Zinksulfat (Baumann und Bömer) abgetrennt werden. Ich wählte nach dem Vorgange von

Zunz das zweitgenannte Verfahren, da das Zinksulfat einer nachträglichen Entfernung besser zugänglich ist, als das Ammonsulfat.

Zur Beseitigung der Peptone habe ich verschiedene Verfahren angewandt. Zunächst benutzte ich die Ausfällung mit Jod nach E. P. Pick, wobei ich so verfuhr, dass ich die nach Abscheidung der Albumosen erhaltene saure, mit Zinksulfat gesättigte Flüssigkeit mit einer Lösung von Jod in Jodzinklösung völlig ausfällte. Dieses Verfahren erfordert die nachträgliche Entfernung von Jod, Zink, Schwefelsäure und eventuell von Chlor, wenn die Verdauung mit Salzsäure vorgenommen worden war. Durch successive Behandlung mit Aether, Chloroform, Bleioxyd, Silbersulfat, Schwefelwasserstoff und Barythydrat, bezw. Baryumcarbonat lässt sich dies erreichen. Ob mit den sich abscheidenden Peptonperjodiden nicht auch Antheile von unbekanntem Endprodukten gefällt werden, ist freilich nicht festgestellt. Die Erfahrung, dass bei der Aussalzung der Albumosen aus den Verdauungsgemischen und bei der Entfernung der Peptone durch Jod grosse Verluste an den nicht die Biuretreaction gebenden Körpern unvermeidlich sind, führte zu Versuchen, letztere auf andere Weise zu isoliren. Aber es bewährte sich weder die zu diesem Behufe angewandte Tanninfällung der höheren Verdauungsprodukte, noch die Fractionirung des in toto benzoylirten Gemenges.

Ich habe daher in einem anderen Versuche nach Aussalzung der Albumosen mit Zinksulfat aus dem Filtrate zunächst das Zink und die Hauptmasse der Schwefelsäure entfernt, dann die Peptone mit einer 10%igen Lösung krystallinischer Phosphorwolframsäure gefällt. Hierbei können allerdings, wie aus den Angaben von Zunz hervorgeht, auch andere, nicht mehr Biuretreaction gebende Körper mit ausfallen.

Einen wesentlichen Vortheil bietet für die Verarbeitung der Verdauungslösungen das Ansetzen der Digestionsmasse mit Schwefelsäure anstatt mit Salzsäure. Kann man die Verdauung überdies so lange währen lassen, dass die Albumosen ganz oder fast ganz verschwinden, was die Behandlung mit Zinksulfat erspart, so ist eine weitere, wichtige Vereinfachung gegeben. Denn hauptsächlich die wiederholte Erzeugung voluminöser und nicht genügend auswaschbarer Niederschläge ist die

Ursache der ausserordentlich hohen Verluste, die man bei der Verarbeitung erleidet, und der Schwierigkeit, zu ausreichenden Mengen isolirter Produkte zu gelangen.

Die von mir ausgeführten Versuche beziehen sich auf die Verdauungsprodukte des Serumalbumins und auf jene des Fibrins.

Endprodukte der Verdauung von Serumalbumin.

Das benützte Serumalbumin war aus Pferdeblutserum nach Aussalzen des Globulins und Fibringlobulins mit einem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung durch Coagulation des Filtrates und Auswaschen des Niederschlages gewonnen. Der Eiweissniederschlag wurde sodann in einem grossen Volumen 1%iger Schwefelsäure vertheilt und die Flüssigkeit mit 3%₀₀ Grübler'schen Pepsins versetzt. Nach mehr als sechsmonatlichem Stehen bei 35—40° C. wurde der spärliche Rest der Albumosen durch Aussalzen mit Zinksulfat entfernt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff und Barythydrat von Zink und der Hauptmasse der Schwefelsäure befreit. Das jetzt nur noch Peptone und Endprodukte enthaltende Filtrat wurde mit Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt. Hierbei ging 59,7% des Gesamtstickstoffes in das Filtrat, 39,7% in den Niederschlag. Letzterer enthielt nebst den nach Zerlegung mit Barythydrat als Baryumverbindungen durch Alkohol fällbaren Peptonen reichlich Ammoniak, daneben Spuren basischer, krystallinische Phosphorwolframate liefernder Substanzen.

Im Filtrat, das keine Biuretreaction mehr aufwies, wurde zunächst zur vorläufigen Orientirung die Stickstoffvertheilung nach dem Hausmann'schen¹⁾ Verfahren untersucht. Der Befund war folgender:

Leicht abspaltbarer Stickstoff (incl. Ammoniakresten)	10,4%
Schwer abspaltbarer, nach Säurezerkochen durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff (= Diaminostickstoff)	34,2%
Schwer abspaltbarer, nach Säurezerkochen durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Stickstoff (= Monaminostickstoff)	54,4%
	<hr/>
des Gesamtstickstoffes.	99,0%

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 595.

Die beträchtliche Menge der letzteren Stickstofffraction liess die Anwesenheit und Nachweisbarkeit von Aminosäuren erwarten. Es konnte jedoch auch bei Verwendung grosser Mengen Ausgangsmaterials weder direkt, noch nach Behandlung mit Alkohol oder Ueberführung in die Kupferverbindung Leucin oder Tyrosin zum Auskrystallisiren gebracht werden. Eben-
sowenig gelang es, asparaginsaures Kupfer oder salzsaure Glutaminsäure zu erhalten.

Die auf Aminosäuren ohne Erfolg untersuchten Portionen wurden hierauf vereinigt, von Kupfer befreit, ihre wässerige Lösung bei neutraler Reaction eingedampft und behufs Reinigung von anorganischen Salzen im Soxhlet'schen Apparate mit Alkohol extrahirt. Die in Alkohol übergehende Substanz gab keine Biuretreaction in wässriger Lösung, keine Fällung mit Metallchloriden, Pikrinsäure, Jodquecksilberkalium und anderen Alkaloidreagentien, fiel hingegen ganz oder theilweise aus Wasser durch schwefelsaures oder salpetersaures Quecksilberoxyd, aus Alkohol durch Aether und durch alkoholische Sublimatlösung. Kupferhydroxyd wurde von der wässrigen Lösung in grossen Mengen mit tiefblauer Farbe gelöst; die Millon'sche Reaction war schwach positiv, jene auf locker gebundenen Schwefel negativ. Beim Versuche der Benzoylirung nach Schotten-Baumann wurde ein bei alkalischer Reaction ausfallendes Reactionsprodukt erhalten. Beim Verbrennen trat Leucin-, später Horngeruch auf.

Die Hauptmasse der Substanz wurde behufs Reinigung aus alkoholischer Flüssigkeit mit alkoholischer Sublimatlösung gefällt, gewaschen, wieder in Wasser gelöst und aus diesem (unter merklichem Verluste) neuerdings durch Alkohol gefällt. Nach Wiederholung dieses Verfahrens stellte die Quecksilberverbindung eine unter dem Mikroskope gleichmässig feinkörnige Masse dar, die im Exsiccator ein weisses Pulver bildete, beim Stehen an der Luft zu einer bräunlichen Masse zusammensinterte.

Da gelegentlich der Bestimmung der Stickstoffvertheilung gefunden worden war, dass dieses aus dem Phosphorwolframsäurefiltrate gewonnene Produkt beim Zerkochen mit Salzsäure

einen durch Phosphorwolframsäure fällbaren Bestandtheil abspaltet, wurden einige Gramme der gereinigten Quecksilberverbindung mit Schwefelwasserstoff zersetzt und durch acht Stunden mit dem mehrfachen Volumen concentrirter Salzsäure gekocht. Die neutralisirte Flüssigkeit gab mit Phosphorwolframsäure in der That jetzt einen reichlichen, in der Wärme zum grössten Theile löslichen Niederschlag. Niederschlag und Filtrat wurden mit Barytwasser zersetzt.

Aus ersterem gewann ich nach Entfernung von etwas Ammoniak eine schwach alkalisch reagirende Lösung, welche mit Pikrinsäure eine leichte, mit essigsaurem Quecksilberoxyd und Sublimat eine dichte Trübung, mit ammoniakalischer Silberlösung einen flockigen, weissen Niederschlag lieferte. Beim Kochen mit Kupfercarbonat schien sich ein unlösliches, die Flüssigkeit milchig trübendes Kupfersalz zu bilden. Beim Verbrennen war sehr deutlich Horngeruch wahrnehmbar. Dieses Verhalten lässt kaum eine andere Deutung zu, als dass durch das Zerkochen mit Salzsäure eine Diaminosäure (vielleicht Histidin) entstanden war.

Das mit Baryt zerlegte Filtrat von dem Phosphorwolframsäureniederschlage wurde eingeengt und mit Alkohol extrahirt. In dem minimalen Rückstand liess sich weder Tyrosin noch eine der zweibasischen Aminosäuren nachweisen. Hingegen konnten aus dem Extracte durch Ueberführung in die Kupferverbindung neben anderen nicht identificirbaren organischen Kupferverbindungen mehrere Centigramme Leucinkupfer und aus diesem etwas Leucin mit allen charakteristischen Reactionen gewonnen werden.

Endprodukte der Verdauung des Fibrins.

Ein von der Fabrik Witte in Rostock geliefertes Verdauungsgemisch, durch mehrwöchentliche Digestion von ca. $\frac{1}{2}$ kg Fibrin mit Pepsinsalzsäure erhalten, wird durch totale Aussalzung mit Zinksulfat in saurer Lösung von den Albumosen, durch Fällung mit Jod (in Jodzinklösung) von den Peptonen befreit. Nach Entfernung der Salze und des Jods aus dem Filtrate wird — unter grossen Verlusten an stickstoffhaltiger

Substanz — eine Lösung erhalten, welche keine Biuretreaction mehr gibt und mit Phosphorwolframsäure nicht mehr fällt, hingegen noch deutlich positive Millon'sche Reaction aufweist, mit Kupfercarbonat gekocht grosse Mengen des Metalles löst und nach Zerkochung mit concentrirter Salzsäure auf Phosphorwolframsäurezusatz einen stickstoffhaltigen, in der Wärme löslichen, beim Erkalten theilweise krystallinischen Niederschlag liefert. Die Lösung fällt ferner mit essigsauerm und schwefelsauerm Quecksilberoxyd, nicht mit Bromwasser, und enthält keinen bleischwärenden Schwefel. Beim Verbrennen der eingedickten Masse tritt sehr deutlicher Geruch nach erhitztem Rohleucin auf. Der Nachweis von Leucin gelingt jedoch nicht. Der Versuch wird mit einer grösseren Menge Ausgangsmaterial (etwa 1 kg feuchten Fibrins entsprechend) wiederholt, mit dem einzigen Unterschiede, dass diesmal behufs Entfernung des Schwefelwasserstoffs gelegentlich der Ausfällung der Metalle mehrfach längere Zeit in nicht abgestumpfter schwefelsaurer Lösung gekocht wird. Aus der resultirenden, nicht Biuretreaction gebenden Lösung kann durch schwefelsaures Quecksilberoxyd eine Substanz (oder ein Gemenge von Substanzen) gefällt werden, welche wieder die oben angegebenen Reactionen gibt: doch ist die Ausbeute daran diesmal eine relativ weit geringere. Im Filtrate sind basische, durch Phosphorwolframsäure krystallinisch fällbare Substanzen nachweisbar. Durch fractionirte Aufnahme des eingedampften Filtrates in Methylalkohol und Kochen mit Kupferhydrat lässt sich ferner eine nicht ganz unbeträchtliche Menge von Leucinkupfer gewinnen, das durch die Löslichkeitsverhältnisse, die charakteristische Ausscheidung, Krystallform und den Kupfergehalt (berechnet 19,62%, gefunden 20,26%) als solches erkannt werden kann.

Die erhaltenen Resultate gestatten, die Eingangs gestellten Fragen vorläufig in folgender Weise zu beantworten. Die Frage, ob die der Biuretreaction entbehrenden Endprodukte der Pepsinverdauung ganz oder zum Theil einfache Aminosäuren

sind, kann auf Grund des Serumalbuminversuches nur verneint werden. Denn wenn Leucin und Tyrosin überhaupt Endprodukte der Pepsinverdauung darstellen, so wäre in diesem Versuche, bei sechsmonatlicher Dauer der Digestion, die ja nahezu zum Verschwinden der Albumosen geführt hatte, sicher das Auftreten derselben in beträchtlichen Mengen zu erwarten gewesen. Dass sie nicht gefunden wurden — während der Nachweis des Leucins unter den durch Salzsäure erhaltenen Spaltungsprodukten des Verdauungsrestes ohne Schwierigkeit gelang —, spricht ganz entschieden gegen ihre Bildung bei der Pepsinverdauung. Freilich lässt sich bei den Schwierigkeiten, die sich dem Nachweise der Asparagin- und Glutaminsäure, sowie auch der Diaminosäuren entgegenstellen, dieser Schluss nur mit gewisser Wahrscheinlichkeit auf die übrigen aus Eiweiss erhältlichen Aminosäuren ausdehnen.

Bemerkt muss weiter werden, dass dem Nachweise von Leucin in dem zweiten Fibrinverdauungsversuche keine Beweiskraft gegenüber dem negativen Resultate des Serumalbuminversuches zukommt. Denn einmal ist mir über die Art, wie die Pepsinlösung in diesem Falle fabrikmässig bereitet wurde (ob aus Magenschleimhaut direkt oder aus gereinigtem Pepsin), nichts bekannt,¹⁾ sodann aber besteht der Verdacht, dass das längere Eindampfen der freie Schwefelsäure enthaltenden Lösungen zu einer Spaltung complicirter gebauter, leicht zersetzlicher Endprodukte unter Leucinbildung geführt hat.

In Betreff der Frage nach dem Auftreten solcher Endprodukte, welche sonach nicht den Charakter von einfachen Aminosäuren aufweisen, ist das Ergebniss aller Versuche übereinstimmend positiv. Danach führt die fortgesetzte Pepsinverdauung von Eiweiss zur Bildung von Endprodukten, welche im Moleküle mehr als einen Kohlenstoffkern — bei dem Produkte aus Serumalbumin zum Mindesten den Leucin- und einen Diaminokern — enthalten. Diese Substanzen geben keine Biuretreaction und sind durch

¹⁾ Wie im hiesigen Laboratorium von E. P. Pick gezeigt wurde, enthält das käufliche, durch wenig intensive Verdauung erhaltene Wittepepton kleine Mengen Leucin.

Phosphorwolframsäure nicht fällbar; sie stellen eine Stufe zwischen den einfachst gebauten Peptonen und den Aminosäuren dar.

Eine nähere Charakterisirung dieser interessanten Körpergruppe, welche für die Aufklärung des Aufbaues der Eiweisskörper von entscheidender Wichtigkeit sein dürfte, ist bereits im hiesigen Institute von anderer Seite in Angriff genommen.

Die Peptone betreffend füge ich als Nebenbefund meiner Versuche noch an, dass sowohl aus dem Jodniederschlage im Fibrinversuche, als auch aus einem bei späterer Gelegenheit aus der peptischen Lösung des Serumalbumins gewonnenen Tanninniederschlage nebst den von E. P. Pick¹⁾ beschriebenen wasser- und alkohollöslichen Peptonen «A» und «B» ein ätherlösliches Pepton gewonnen wurde. Dasselbe zeichnete sich durch eine ungewöhnlich intensive, rein rothe Biuretreaction aus, gab die Reactionen auf den aromatischen Kern des Eiweisses nur schwach, jene auf Kohlehydratkörner überhaupt nicht. Phosphorwolframsäure erzeugte einen in der Wärme unlöslichen Niederschlag. Mit Quecksilber-, Kupfer- und Eisensalzen entstanden unlösliche Verbindungen, mit Platinchlorid bei langsamem Eindunsten Sphärolithen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 270.