

Weitere Mittheilungen über das Erepsin.

Von
Otto Cohnheim.

(Aus dem physiologischen Institut zu Heidelberg.)
(Der Redaction zugegangen am 3. März 1902.)

I. Die Spaltung des Eiweiss durch das Erepsin.

Das nächste Erforderniss zur Erweiterung unserer Kenntnisse über das von mir als Erepsin bezeichnete¹⁾ Ferment der Darmschleimhaut ist die Untersuchung der Spaltungsprodukte, in die es die Eiweisskörper, bezw. die Peptone zerlegt. Die Versuchsanordnung war gegeben: es musste ein Eiweisskörper erst durch Pepsin in Albumosen und Peptone zerlegt, und diese dann durch Erepsin weitergespalten werden. Da es weniger auf Reinheit und Einheitlichkeit des Ausgangsmaterials im chemischen Sinne, als darauf ankam, dass seine Spaltungsprodukte durch die Säure- oder die Trypsinspaltung bereits möglichst quantitativ bekannt waren, wählte ich das Syntonin aus Muskelfleisch, das Hart²⁾ kürzlich im hiesigen Institut der Spaltung durch siedende Schwefelsäure unterworfen hat.

Ich stellte das Syntonin aus 1 kg Rindfleisch genau nach den Angaben von Hart dar, indem ich das Fleisch von Fett und Sehnen befreite, fein zerkleinerte, gründlich mit fliessendem Wasser auswusch, mit verdünnter Salzsäure behandelte, die salzsaure Lösung durch Neutralisiren fällte, und diese Lösung und Fällung zweimal wiederholte. Ich erhielt so 348 g feuchtes Syntonin. Diese wurden in 0,4% iger Salzsäure gelöst und

1) O. Cohnheim, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 451. 1901.

2) E. Hart, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 347. 1901.

mit einer kleinen Menge Grübler'schen Pepsins 23 Tage im Brutschranke verdaut. Nach dieser Zeit fand sich ein geringfügiger Niederschlag, der abfiltrirt und mit einer neuen Menge von Salzsäure und Pepsin in weiteren 7 Tagen noch theilweise in Lösung gebracht wurde. Die vereinigten Lösungen gaben bei Halbsättigung mit Ammonsulfat nur eine geringe Opalescenz, bei Ganzsättigung einen spärlichen Niederschlag, dagegen die Biuretreaction, die Phosphorwolframfällung in reichlichster Weise: sie enthielten also überwiegend Peptone im Kühne'schen Sinne. Ob noch weitere, biuretfreie Spaltungsprodukte vorhanden waren, habe ich nicht untersucht. Von den 5820 ccm. wurden 4500 neutralisirt, mit doppeltkohlen-saurem Natron schwach alkalisch gemacht und mit etwa 600 ccm. einer sehr eiweissarmen, wirksamen, trypsinfreien Erepsinlösung aus Hundedarm, unter Zusatz von Toluol und Chloroform, der Bruttemperatur ausgesetzt. Bereits am vierten Tage war die Biuretreaction nur noch angedeutet. Doch wurde die Verdauung noch 10 Tage fortgesetzt. Dann wurde das Eiweiss durch Kochen bei schwach saurer Reaction entfernt und filtrirt. Das Filtrat zeigte bei genauester Ausführung keine Biuretreaction, dagegen eine ausgesprochene Millon'sche Reaction. 10 ccm. enthielten 16,1 mg N.

Von dieser Lösung wurden 4 l. zur weiteren Untersuchung verwendet, die also 6,44 g N enthielten.

Zunächst wurde das Ammoniak durch Destillation mit Magnesiummilch in dem ausgezeichneten Apparate von Nencki und Zaleski¹⁾ bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur bestimmt.

10 ccm. neutralisirten	0,8 ccm. 1% N SO ₄ H ₂
20	1,7

10 ccm. enthielten also 1,155 mg N = 7,2% des gesammten Stickstoffes. Hart hat bei der Spaltung mit Schwefelsäure und der Destillation mit Magnesiummilch, allerdings bei höherer Temperatur, 7,13% gefunden, also eine völlige Uebereinstimmung.

¹⁾ M. Nencki und J. Zaleski, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 193. 1901.

Alsdann wurde die gesammte Flüssigkeit mit Baryumcarbonat versetzt, theils bei Wasserbadtemperatur und theils im Nencki'schen Apparat das Ammoniak weggedampft, das Filtrat auf 5% Schwefelsäure gebracht und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die direkte Fällung mit Silber war wegen des hohen, von der Pepsinverdauung herrührenden Chlorgehalts der Lösung unthunlich.

A. Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag wurde mit Barythydrat zerlegt und der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt. Es resultirte eine Flüssigkeit, die 1,925 g N enthielt. Es sind das 29,9% des gesammten Stickstoffs. Hart hat im Syntonin für Arginin, Histidin und Lysin 18,8% des Stickstoffs, ausserdem noch 8,34% Huminstickstoff gefunden, der zum Theil aus dem Lysin stammt, also zusammen 27,14%. Die Phosphorwolframsäure fällt aber noch Cystin, einen Theil des Phenylalanins¹⁾ und vielleicht noch andere Körper; der höhere Werth, den ich gefunden habe, kann hierdurch vollständig erklärt werden. Die weitere Behandlung der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Körper habe ich genau nach den Angaben von Kossel und Kutscher²⁾ durchgeführt. Ich erhielt so das Arginin als Nitrat, das Histidin als Chlorhydrat; das Lysin wurde als Pikrat gewogen. Die Zahlen sind indessen nur für das Lysin von hinreichender Genauigkeit, da ich bei der Darstellung des Arginins und Histidins in Folge ungenügenden Auskochens des Schwefelsilberniederschlags einen nicht zu berechnenden Verlust hatte.

Für das Arginin erhielt ich 0,255 g N, d. i. 3,96% des gesammten Stickstoffs; diese Zahl ist erheblich niedriger als die von Hart gefundene von 10,29%. Indessen ist hier an das oben Gesagte zu erinnern. Ich habe 2,456 g pikrinsaures Lysin gefunden, das sind 2,84% des Gesamtstickstoffs gegen 3,98% von Hart.

1. E. Schulze und E. Winterstein, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 574. 1901.

2. A. Kossel und E. Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165. 1900.

B. Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung

Es wurde durch Barythydrat von der Schwefel- und Phosphorwolframsäure, durch Kohlensäure von dem grössten Theil des Baryts befreit und stark eingeengt. Beim Erkalten schied sich zunächst Tyrosin, weiterhin Leucin in charakteristischen Krystallen ab. Sie wurden durch mehrmalige fractionirte Krystallisation getrennt. Das Tyrosin gab eine äusserst intensive Millon'sche Reaction und enthielt, nach Kjeldahl bestimmt, 7,9% N statt der berechneten 7,7%. Das Leucin gab 10,73% N statt der berechneten 10,69%.

Nach den weiteren Monoaminosäuren wurde nicht gesucht.

Die Spaltung des Eiweisses durch das Erepsin ergab also Ammoniak, Leucin, Tyrosin, Lysin, Histidin und Arginin. In Bezug auf die Art der Spaltungsprodukte besteht also kein Unterschied zwischen ihr und der Säurespaltung, die ja ihrerseits volle Uebereinstimmung mit der Trypsinspaltung zeigt. Ob sie auch quantitativ gleich verläuft, kann ich nicht mit voller Bestimmtheit sagen, möchte es aber mit Rücksicht auf die leidliche Uebereinstimmung beim Lysin und die vollständige beim Ammoniak annehmen.

Die Uebereinstimmung der Ammoniakzahl ist von besonderem Interesse, denn sie zeigt einen erheblichen Unterschied der Erepsinwirkung von der Eiweisszersetzung bei der Salkowski'schen¹⁾ Autodigestion der Organe oder der Autolyse, wie sie von Jacoby²⁾ benannt worden ist. Bei ihr konnte Jacoby eine beträchtliche Abspaltung von Ammoniak nachweisen. Die Zerlegung des genossenen Nahrungseiweisses über die Aminosäuren hinaus geschieht also durch das Erepsin noch nicht, sondern erst im weiteren Verlaufe des Stoffwechsels.

Ich möchte bei dieser Gelegenheit mit einigen Worten auf die interessanten Befunde von Kutscher und Seemann³⁾ eingehen. Ich stimme mit ihnen darin überein, dass wahr-

1) E. Salkowski, Z. f. klin. Med. 1891. Suppl.

2) M. Jacoby, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 149. 1900.

3) F. Kutscher u. J. Seemann, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 528. 1902.

scheinlich alles Nahrungsweiss vor seiner Aufnahme vollständig in Aminosäuren zerlegt wird. Ob diese Zerlegung durch das Trypsin oder Erepsin geschieht, ist meines Erachtens einstweilen nicht zu entscheiden; denn dass sie mehr Leucin etc. im oberen Theile des Darmes gefunden haben als im unteren, kann auch durch die schnelle Wegresorption der gespaltenen Körper während des langsamen Vorrückens des noch unverdauten Speisebreies erklärt werden. Jedenfalls habe ich mit einer einzigen Ausnahme aus der Darmschleimhaut verdauender Hunde recht wirksames Erepsin darstellen können, während Fibrinflocken meist erst in Stunden gelöst werden, also nur wenig Trypsin vorhanden ist. Im Reagensglase ist die Wirkung von Erepsin auch constanter und kräftiger, als es gewöhnlich die Wirkung von Pankreasextracten zu sein pflegt. Ausserdem ist ja noch an die Möglichkeit zu denken, dass das, was wir heute Trypsinwirkung nennen, sich aus mehreren Factoren zusammensetzt. Freilich gewährt dies alles noch keine sichere Entscheidung darüber, welches Enzym im lebenden Organismus die grössere Rolle spielt.

Auf die weiteren Fragen nach der Form, in der die Eiweissstoffe resorbirt werden, und damit die biologische Bedeutung der Eiweisspaltung werde ich bald zurückkommen.

II. Einwirkung des Erepsins auf verschiedene Eiweisse.

Ich habe zunächst die Wirkung des Erepsins auf verschiedene Albumosen und Peptone studirt und gefunden, dass sie alle, wenn auch verschieden schnell, von trypsinfreien Erepsinlösungen bis zum Verschwinden der Biuretreaction zerlegt werden.

Ich habe zunächst eine Anzahl Kühne'scher Präparate verwendet. Pepsin-Pepton wird sehr schnell zerlegt, ebenso Protalbumose und Deuteroalbumose. Bei einem Antipeptonpräparat war dagegen nach 6 Tagen die Biuretreaction sehr abgeschwächt, aber noch vorhanden, und verschwand erst nach weiteren 16 Tagen ganz. Ebenso lange dauerte es bei einem Präparate von Heteroalbumose aus Myosin. Bei einem Präparate von Heteroalbumose, das ich mir nach der Angabe

von Pick aus Witte-Pepton darstellte, waren nach 4 Wochen noch Spuren der Biuretreaction wahrzunehmen. Das gesammte Witte-Pepton wird langsam, aber bei genügendem Stehen vollständig zerlegt. Bei diesen Versuchen konnte ich wiederholt die früher erwähnte Beobachtung machen, dass eine intensive Biuretreaction in 1–2 Tagen soweit zurückgeht, dass es einer sehr vorsichtigen Ausföhrung bedarf, um sie überhaupt zur Anschauung zu bringen, und sie durch Erwärmen z. B. sofort zerstört wird. Dieser kleine Rest aber verschwindet oft nur langsam.

Sodann habe ich eine Reihe anderer Eiweisskörper untersucht.

Nicht gespalten werden auch bei wochenlanger Einwirkung die Eiweisskörper des Pferdeplasmas und von menschlicher Ascitesflüssigkeit, sowohl im gelösten Zustande als nach vorheriger Coagulation. Nicht angegriffen wurde bei wochenlanger Einwirkung Vitellin, dasselbe Präparat, das von W. Erb¹⁾ beschrieben worden ist, sowie ein von Gröbler stammendes krystallinisches Eiweiss aus Kürbissamen. Ferner wurde ein Stück Rindfleisch von einer Erepsinlösung nicht verändert. Besonders interessant ist, dass das Erepsin die Eiweisskörper der Darmschleimhaut, die es producirt, in 6 Wochen nicht angreift, also wieder ein scharfer Gegensatz zu den eiweisslösenden Fermenten bei der Autodigestion der Organe. Nicht gelöst wurden auch Globin, das ich nach Schulz²⁾ aus Pferdehämoglobin dargestellt habe, und der Bence-Jones'sche Eiweisskörper. Der Letztere stammt von dem Falle von Magnus-Levy,³⁾ und die Nichtspaltbarkeit durch Erepsin ist ein weiterer Beweis dafür, dass dieser Körper Eiweiss ist und keine Albumose.

Ob ein Eiweisskörper gespalten wird oder nicht, stellte ich dadurch fest, dass ich nach seiner Entfernung durch Coaguliren das Filtrat mit Phosphorwolframsäure, oder durch

1) W. Erb, Zeitschr. f. Biol., Bd. 41, S. 1, 1901.

2) F. N. Schulz, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 449, 1898.

3) M. Magnus-Levy, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 200, 1900.

die Millon'sche Reaction auf Spaltungsprodukte prüfte: bei den negativ ausgefallenen Versuchen wurde die Wirksamkeit des Erepsins stets noch besonders bestimmt.

Dagegen wird das Casein der Kuhmilch leicht und schnell gespalten. Schon nach 3—4 Tagen erzeugt nach Entfernung des Caseins Phosphorwolframsäure eine beträchtliche Fällung. Aus dem Filtrat hiervon konnte ich Leucin und Tyrosin erhalten. In 2—3 Wochen wird Casein nahezu ganz zerlegt. Es ist jedenfalls bemerkenswerth, dass das nicht denaturirbare Casein auch in seinem sonstigen Aufbau derart von den eigentlichen Eiweissen abweicht. Physiologisch aber ist es interessant, dass das Nahrungseiweiss des Säuglings ohne Pepsin und Trypsin verdaulich erscheint.

Endlich habe ich 2 Eiweisskörper untersucht, die Herr Prof. Kossel mir gütigst überlassen hat. Zunächst ein Protamin, das Clupeinsulfat, das von Erepsin so schnell wie etwa Deuteroalbumose gespalten wird. 2 g Clupeinsulfat wurden mit 30 ccm. Wasser und 20 ccm. Erepsinlösung bei Bruttetemperatur gehalten. Nach 4 Tagen war die Biuretreaction verschwunden: aus dem Filtrate konnte ich Arginin darstellen.

Ebenso wird Histon aus der Thymusdrüse zerlegt, allerdings nur langsam und theilweise, während der grösste Theil noch als Histon vorhanden war. Es stimmt dieser Befund gut überein mit der auch sonst ja vorhandenen Zwischenstellung des Histons zwischen dem Protamin und den Eiweisskörpern im engeren Sinne.