

# Zur Kenntniss der Spaltung von Eiweisskörpern.

## I. Mittheilung.

Von

**H. Steudel.**

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Juni 1902.)

Bisher hat man zur Gewinnung der Hexonbasen durch Aufspaltung der Eiweisskörper nur siedende Mineralsäuren, Salzsäure, Schwefelsäure und Jodwasserstoffsäure<sup>1)</sup> benutzt; in seiner Wirkung ganz analog erwies sich, wie Kutscher<sup>2)</sup> gefunden hat, das Trypsin und das bei der Selbstverdauung der Hefe auftretende Ferment,<sup>3)</sup> dem sich das Erepsin neuerdings anreicht. Auch vom Pepsin war durch Untersuchungen Hoppe-Seyler's<sup>4)</sup> festgestellt, dass es entgegen der Ansicht Kühne's,<sup>5)</sup> der nur einen Abbau bis zum Pepton annahm, das Eiweiss in weitgehender Weise bis zur Bildung reichlicher Mengen Amidosäuren aufspaltete, und Hirschler<sup>6)</sup> konnte in Kossel's Laboratorium die rasche Zunahme der durch Phos-

1 Kossel u. Kutscher, Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165.

2 Kutscher, Ueber das Antipepton. Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 195, Bd. XXVI, S. 110, Bd. XXVIII, S. 88.

3 Kutscher, Chemische Untersuchungen über die Selbstgährung der Hefe. Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 59.

4 Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie, Bd. II, S. 228.

5 Kühne, Verhandlungen des naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg. N. F., Bd. I, Heft 3.

6 Hirschler, Beiträge zur Analyse der N-haltigen Substanzen des Thierkörpers. Diese Zeitschr., Bd. XI, S. 30.

phorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen bei der Pepsinverdauung nachweisen. Den Mechanismus der bei Säure- resp. Fermentwirkung stattfindenden Reaction stellte man sich im Allgemeinen als eine Hydratation vor, und es lag der Gedanke nahe, einmal durch Einwirkung von überhitztem Wasser allein zu versuchen, ob man hierbei auch zu denselben basischen Endprodukten kommen würde. Die bisherigen Untersucher, Lubavin<sup>1)</sup>, Neumeister<sup>2)</sup> und Salkowski<sup>3)</sup> haben sich fast ausschliesslich mit den bei dieser Methode entstehenden primären Spaltungsprodukten beschäftigt, und nur Neumeister<sup>4)</sup> gibt an, dass man durch Behandlung von Eiweiss mit gespannten Wasserdämpfen ausser Tyrosin und Leucin auch Asparaginsäure fände. Gerade das Vorkommen dieser letzteren Säure liess die Entstehung der Hexonbasen durchaus möglich erscheinen.

Es wurden also 50 g Casein resp. 50 g feinste Handelsgelatine in etwa 1½ l. Wasser quellen gelassen und dann so lange im Drucktopf bei 150° erhitzt, bis die Biuretreaction verschwunden war; hierzu war 8—9 stündiges Erhitzen während 8 Tagen nöthig. Nachdem dann das Ammoniak aus der entstandenen dunkelbraunen Lösung durch Kochen mit Magnesia entfernt war, wurde die Flüssigkeit mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure eine Isolirung der Basen nach der Kossel'schen Methode versucht. Ich habe aber regelmässig nur geringe Mengen einer schmierigen Fällung erhalten, aus denen sich nicht einmal das so äusserst leicht zugängliche Arginin gewinnen liess; dagegen konnte nach Entfernung der Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure mittelst Baryts aus den Filtraten Asparaginsäure mit Leichtigkeit isolirt und in Gestalt ihres Kupfersalzes identificirt werden.

1) Lubavin. Ueber die künstliche Pepsinverdauung des Caseins und die Einwirkung von Wasser auf Eiweisssubstanzen. Hoppe-Seyler's med.-chem. Untersuchungen. S. 463.

2) Neumeister, R.: Ueber die nächste Einwirkung gespannter Wasserdämpfe auf Proteine u. s. w. Zeitschr. f. Biol. 26, S. 57. 36, S. 420.

3) Salkowski. Ueber die Einwirkung überhitzten Wassers auf Eiweiss. Zeitschrift für Biologie 34, S. 190. 37, S. 401.

4) Neumeister. Lehrbuch der physiologischen Chemie. 1. Aufl. S. 26.



Da nun bisher keine Versuche über das Verhalten von Histidin, Arginin und Lysin zu gespannten Wasserdämpfen vorliegen, so muss ich vorläufig die Frage unentschieden lassen, ob sich beim Kochen von Eiweiss mit Wasser bei 150° überhaupt die Basen bilden und dann weiter zerstört werden oder ob die Reaction gar nicht zur Bildung der betreffenden Basen führt. Ich denke jedoch die Versuche in nächster Zeit fortzusetzen und gleichzeitig den nicht unerheblichen Rest, der nach Entfernung der Asparaginsäure noch zurückbleibt, weiter aufzulösen.

Eine weitere Möglichkeit, sich über den Verlauf der Hydratation zu orientiren, schien mir in der Einwirkung siedenden Barytwassers auf Eiweiss zu liegen: hierbei hatte Drechsel<sup>1)</sup> die Entstehung von Lysin und Lysatinin beobachtet, und möglicher Weise konnte hier die intermediäre Bildung von Arginin durch den Nachweis von Ornithin, das Schulze und Winterstein<sup>2)</sup> aus Arginin durch Spaltung mit Barytwasser erhalten hatten, constatirt werden, zumal das Ornithin nach der Phenylecyanatmethode von Herzog<sup>3)</sup> jetzt leicht nachweisbar ist.

Die Versuchsanordnung war hier folgende:

500 g Casein wurden in eine heisse Lösung von 1 kg Aetzbaryt in 5—6 l. Wasser eingetragen und bis zum Verschwinden der Biuretreaction gekocht, eine Operation, die rund 60 Stunden<sup>4)</sup> verlangte. Dann wurde die klare, gelbe Reactionsflüssigkeit mit Schwefelsäure neutralisirt, bis auf 2 l. eingeeengt, der Rest des Baryts mit Schwefelsäure entfernt und weiter Schwefelsäure bis zu 5% der Flüssigkeit hinzugesetzt. Nun wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt, die nicht unerhebliche Fällung aus heissem Wasser umkrystallisirt, in bekannter

1) Drechsel, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abtheilung 1891, S. 248.

2) Schulze u. Winterstein, Bildung von Ornithin bei der Spaltung des Arginins. Diese Zeitschr. Bd. XXVI, S. 1.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 525.

4) E. Fischer gibt für die Spaltung von 200 g Casein in 1 l. 10% iger Natronlauge bis zum Verschwinden der Biuretreaction 65 Stunden Kochzeit an. Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 227.



Weise mit Baryt zerlegt und der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure entfernt. Nach dem Ansäuern mit Salpetersäure wurde so lange Silbernitrat zu der Flüssigkeit hinzugefügt, bis gegen Barytwasser nicht mehr ein weisser, sondern ein brauner Niederschlag von Silberoxyd fiel. Stumpfte ich nun die saure Reaction der Flüssigkeit mit Barytwasser ab, solange noch mit ammoniakalischer Silberlösung ein Niederschlag entstand, so erhielt ich eine voluminöse, weisse Fällung, die der Histidinfraction bei der Säurespaltung entsprach. Die Fällung wurde zur weiteren Untersuchung zurückgestellt und das Filtrat davon mit Aetzbaryt in Substanz gesättigt, doch fiel hierbei nur ganz wenig reducirtes Silber aus. Ein der Argininfraction entsprechender basischer Antheil war also bei der Barytspaltung nicht aufgetreten.

Nachdem nun Silber und Baryt mit Salz- resp. Schwefelsäure aus der Flüssigkeit wieder herausgeschafft waren, wurde der Rest der Basen wieder mit Phosphorwolframsäure gefällt. Aus dieser Fällung liess sich nun nach Kossel's Angaben mit alkoholischer Pikrinsäure leicht eine grössere Quantität eines Pikrates gewinnen, das bei der Analyse Zahlen lieferte, die auf Lysinpikrat stimmten: doch handelte es sich in unserem Falle, wie dies sich bei dem längeren Kochen mit Barytwasser wohl voraussehen liess, um optisch inactives Lysin: denn nachdem ich das Pikrat in das Chlorid übergeführt hatte, beeinflusste eine 3%ige Lösung desselben die Ebene des polarisirten Lichtes im 4. dm.-Rohr nicht im Mindesten.

Bei der weiteren Auflösung des nach Entfernung des Lysins noch verbleibenden Restes mit Hülfe der Phenylecyanatmethode bin ich unerwarteter Weise auf Schwierigkeiten gestossen. Es verblieb mir nur noch ein äusserst geringer Rest, der mir vor der Hand keine zuverlässigen Aussagen über Vorkommen oder Fehlen von Ornithin gestattet. Durch Spaltung argininreicherer Eiweisskörper als Casein hoffe ich jedoch in Kürze zu einem unzweideutigen Resultate zu kommen.

Auch die Auflösung des der Histidinfraction entsprechenden Antheils ging nicht glatt von Statten, doch glaube ich mit einiger Sicherheit sagen zu können, dass Histidin nicht in der

Fällung vorhanden ist; hier kann ebenfalls nur die Beschaffung grösserer Substanzmengen weiteren Aufschluss geben.

Die bei Weitem grösste Menge der Basen bestand also aus Lysin, die Basen der Harnstoffgruppe waren entweder nicht gebildet oder weiter zersetzt. Ein ähnliches Resultat hatte Kutscher<sup>1)</sup> bei der Selbstverdauung der Thymusdrüse erhalten, auch hier hatte sich unter der Fermenteinwirkung aus den Eiweisskörpern der Thymus neben Ammoniak nur Lysin gebildet. Möglicher Weise konnte nun ja zwischen Fermentwirkung und Einwirkung siedenden Barytwassers eine gewisse Analogie bestehen, die sich leicht noch dadurch würde nachweisen lassen, wenn man bei Barytwirkung unter den Spaltungsprodukten der Thymusnucleinsäure auch das von Kutscher bei der Autodigestion gefundene Thymin finden würde.

Zu dem Ende habe ich 500 g sauber präparirte und zerkleinerte Thymusdrüsen in gleicher Weise wie oben das Casein behandelt. Die Auflösung der Reactionsflüssigkeit schloss sich eng an das von Kutscher benutzte Verfahren an und lieferte mir zwar Lysin, aber aus der Fraction, die das Thymin enthalten sollte, krystallisirte nur Tyrosin heraus, das mikroskopisch vollkommen gleichmässig aussah und auch nach seinem Stickstoffgehalt keine Verunreinigungen enthalten konnte. So scheint also das gleichzeitige Vorkommen von Lysin sowohl bei der Autodigestion der Thymus, wie bei der Barytspaltung mehr ein Beweis für seine grosse Widerstandskraft gegen chemische Eingriffe zu sein, als dass man daraus auf Analogien von Ferment- und Barytwirkung schliessen könnte.

Auf eine weitere Discussion über die Fragen des Reactionsmechanismus bei der Aufspaltung der Eiweisskörper möchte ich nicht eher eingehen, bis ich nicht durch weiteren Ausbau der im Vorstehenden mitgetheilten Versuche breitere experimentelle Grundlagen gewonnen habe.

<sup>1)</sup> Kutscher, Das proteolytische Enzym der Thymus. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 114.