

# Über die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure und Pankreasfermente.

Von

**Emil Fischer und Emil Abderhalden.**

(Aus dem I. chemischen Institute der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. November 1903.)

Bei der Verdauung des Caseins durch sog. Pankreatin entsteht, wie wir vor kurzem<sup>1)</sup> gezeigt haben, ein polypeptidartiger Stoff, der bei der totalen Hydrolyse durch Säuren reichliche Mengen von  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure liefert. Dagegen war diese Aminosäure selbst in der Verdauungsflüssigkeit mit den bisher bekannten Methoden nicht nachweisbar, wenn wir auf die Veresterungsmethode verzichteten, bei der die Wirkung der Säure eine sekundäre Zersetzung hervorrufen konnte. Wir mußten es deshalb unentschieden lassen, ob  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure durch enzymatische Spaltung der Proteinstoffe gebildet wird. Seitdem ist eine Mitteilung von Salaskin und Kowalevsky<sup>2)</sup> über die Wirkung von Hundemagensaft auf Hämoglobin erschienen. Sie fanden dabei eine kleine Menge  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure; da sie aber die Estermethode benutzten, so ist ihr Resultat nicht einwandfrei.

Entsprechend dem früher mitgeteilten Arbeitsplan haben wir deshalb die Frage nochmals geprüft an dem Verhalten des Caseins gegen Pepsinsalzsäure und Pankreatin. Die erstere erzeugt bei längerer Einwirkung bereits freie  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure, die wir aus der Verdauungsflüssigkeit ohne Veresterung

<sup>1)</sup> Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente. Diese Zeitschr., Bd. XXXIX, H. 1, S. 81, 1903.

<sup>2)</sup> Über die Wirkung des reinen Hundemagensaftes auf das Hämoglobin resp. Globin. Diese Zeitschr., Bd. XXXVIII, H. 5 u. 6, S. 567, 1903.

und ohne irgend welche Behandlung mit warmen Säuren isolieren könnten. Erheblich größer wird die Menge der zyklischen Aminosäure, wenn man auf die Behandlung mit Pepsinsalzsäure noch eine längere Verdauung durch Pankreatin folgen läßt. Ähnlich liegen die Verhältnisse für das Phenylalanin. Aber auch bei mehrmonatlicher kombinierter Wirkung von Pepsinsalzsäure und von Pankreatin fand sich in der Verdauungsflüssigkeit noch immer der polypeptidartige Stoff, von dem in der ersten Abhandlung ausführlich die Rede gewesen ist; nur ist seine Menge entsprechend der weiter fortgeschrittenen Hydrolyse geringer als bei der bloßen Verdauung durch Pankreatin.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich erstens, daß die  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure ebenso wie die gewöhnlichen Aminosäuren als Bestandteil des Proteinmoleküls betrachtet werden darf, und zweitens, daß bei der kombinierten Wirkung von Pepsinsalzsäure und von Pankreatin eine stärkere Hydrolyse eintritt als beim Pankreatin allein.

Für die Beurteilung der natürlichen Verdauung ist damit ein neuer Gesichtspunkt gewonnen. Wir sind allerdings weit davon entfernt, die Resultate, welche in vitro erhalten wurden, unmittelbar auf die Vorgänge im lebenden Organismus übertragen zu wollen. Physiologische Fragen können in letzter Linie immer nur durch das physiologische Experiment entschieden werden, und das gilt selbstverständlich auch für die Fragen nach der hydrolytischen Spaltung der Proteinstoffe im Verdauungstraktus. Aber die rein chemischen Beobachtungen dürfen beim Studium der Lebensvorgänge als Anhaltspunkte dienen, und so wird man in Zukunft wohl auch den Versuch machen, unter den Produkten der Magen-Darmverdauung die  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure, das Phenylalanin, und endlich den polypeptidartigen Stoff, der so resistent gegen Enzyme ist, zu finden.

#### Experimenteller Teil.

Für die nachfolgenden Versuche diente das käufliche Casem. pur., welches nach den Angaben von Hammarsten dargestellt ist. Wir heben das besonders hervor, weil bei anderen

unreineren Präparaten die Wirkung der Fermente sehr viel langsamer erfolgt, und das Resultat des Versuches sich wesentlich anders gestaltet.

1 kg Casein wurde in 710,3° iger Salzsäure suspendiert, mit 50 g Pepsin (Grübler) versetzt und 14 Tage unter öfterem Umschütteln bei 37° aufbewahrt. Durch Zusatz von Toluol war die Entwicklung von Fäulnisbakterien ausgeschlossen. Der größere Teil des Caseins ging in Lösung, und gleichzeitig fiel eine nicht unbeträchtliche Menge von Tyrosin aus. Von der filtrierten Verdauungsflüssigkeit blieb die eine Hälfte noch 8 Wochen im Brutraum stehen. Die andere Hälfte wurde dagegen mit Ammoniak alkalisch gemacht, und mit 20 g Pankreatin (von der Fabrik Rhenania) versetzt. Um die Wirkung des Fermentes zu unterstützen, wurde die Flüssigkeit während drei Wochen mechanisch dauernd gerührt, und blieb dann noch weitere fünf Wochen ohne Rührung bei der gleichen Temperatur (37°) stehen. Auch hier erfolgte eine reichliche Abscheidung von Tyrosin und Leucin.

#### a) Pepsinverdauung:

Zum Nachweis der  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure wurde die Hälfte der filtrierten Verdauungsflüssigkeit (entsprechend 250 g Casein) unter stark vermindertem Druck eingedampft, mit Alkohol gefällt, das alkoholische Filtrat abermals eingedampft, und die Fällung mit Alkohol noch vier- bis fünfmal wiederholt. In der zuletzt verbleibenden alkoholischen Lösung war die Pyrrolidinkarbonsäure neben Tryptophan und anderen Stoffen enthalten. Da die direkte Isolierung mit dem Kupfersalz mißlang, so wurde erst der Alkohol verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, und das Tryptophan in bekannter Weise mit einer Auflösung von Quecksilbersulfat in 5° iger Schwefelsäure gefällt. Aus dem Filtrat mußte das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff, und dann die Schwefelsäure mit Baryt genau ausgefällt werden. Beim Einengen der Lösung trat jetzt der charakteristische Geruch des Pyrrolidins auf. Zur Isolierung der Karbonsäure wurde das Kupfersalz dargestellt und nach Verdampfen des Wassers mit Alkohol ausgelaugt. Der in Al-

kohol lösliche Teil der Kupfersalze gab beim Zerlegen mit Schwefelwasserstoff 0,15 g aktive  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure vom Schmelzpunkt 205° (korr.).

Die andere Hälfte des Verdauungsgemisches wurde ganz genau, wie früher beschrieben (l. c.), mit Phosphorwolframsäure gefällt. Aus dem Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung konnten nach erfolgter Veresterung alle gewöhnlichen Monoaminosäuren isoliert werden. Phenylalanin und  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure waren vorhanden, jedoch in sehr geringer Menge.

Der zerlegte Phosphorwolframsäureniederschlag hinterließ ein Polypeptid, das dem früher beschriebenen völlig gleich und bei der totalen Hydrolyse und Veresterung dieselben Monoaminosäuren lieferte.

#### b) Pepsin-Pankreatin-Verdauung.

Die Hälfte der Verdauungsflüssigkeit (wieder 250 g Casein entsprechend) wurde ganz analog behandelt, wie das Pepsinverdauungsgemisch. Es konnten direkt 1,2 g reiner aktiver  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure aus dem Kupfersalz isoliert werden.

0,1894 g des Kupfersalzes gaben 0,0951 g H<sub>2</sub>O und 0,2844 g CO<sub>2</sub>.  
 = 5,62% H<sub>2</sub>O     40,95% CO<sub>2</sub>.  
 Berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cu     5,49% H<sub>2</sub>O     41,16% CO<sub>2</sub>.

Schmelzpunkt 206° (korr.).

Die andere Hälfte wurde, wie beschrieben, mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung gab bei der Veresterung 1,8 g  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure und 1,3 g Phenylalanin.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag hinterließ nach der Zerlegung mit Baryt wieder einen polypeptidartigen Körper, in welchem bei der totalen Hydrolyse und Veresterung alle früher gefundenen Monoaminosäuren nachzuweisen waren.

#### c) Pankreatin-Verdauung.

Versuche, aus einem Pankreatinverdauungsgemisch auf die oben beschriebene Weise die  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure zu isolieren, hatten nur insofern Erfolg, als der Geruch des Pyrrolidins deutlich zur Wahrnehmung kam, während die Säure ebenso wenig wie deren Kupfersalz isoliert werden konnte.

### Eigenschaften des isolierten Polypeptides.

Das Polypeptid fällt mit Alkohol in weißen, groben Flocken, die nach Entfernung des Alkohols alsbald zerfließen. Bei wiederholter Fällung aus wässriger Lösung mit Alkohol wird es zunächst teigig und schließlich hart. Rotes Lakmuspapier wird durch dasselbe stark gebläut. Die alkalische Reaktion nimmt aber mit dem Umfällen allmählich ab. Es muß unentschieden bleiben, ob dieselbe dem Polypeptid selbst zukommt, oder aber, was wahrscheinlicher ist, beigemengten Diaminosäuren. Auf Curcumapapier und Phenolphthalein wirkt das Polypeptid nicht ein.

Versetzt man die alkalische Lösung des Polypeptids mit sehr wenig verdünnter Kupfersulfatlösung, so tritt zunächst eine schwache rötlich-violette Färbung ein, die aber bei weiterem Zusatz von Kupfersalz rasch in Blau umschlägt. Ähnlich verhalten sich mehrere künstliche Polypeptide, während die Peptone unter den gleichen Bedingungen eine sehr starke rot-violette Biuretfärbung zeigen.

Die wässrige Lösung des Polypeptids gibt mit Tannin eine Fällung. Mit Platinchlorid und Alkohol fällt eine leicht gelblich gefärbte, flockige Verbindung, welche bei weiterem Zusatz von Alkohol körnig wird. Die Verbindung löst sich sehr leicht in Wasser. Das auf gleiche Weise dargestellte Goldsalz wird aus der wässrigen Lösung mit Alkohol nicht gefällt.

Mit Eisenchlorid tritt auch nach Zusatz von Ammonsulfat keine Fällung ein. Ebenso wenig wird das Polypeptid durch Chromsäure, Ferrocyankalium und Essigsäure gefällt. Quecksilberchlorid gibt einen dicken, weißen Niederschlag, der beim Kochen mit viel Wasser nicht ganz verschwindet.