

Über die Spaltung der Gelatine.

Von

P. A. Levene.

(Zweite Mitteilung.)

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des pathologischen Instituts
der New-Yorker Staatskrankenhäuser.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. Dezember 1903.)

Bekanntlich unterscheidet sich die Gelatine von anderen Eiweißkörpern dadurch, daß sie gegen die Einwirkung der proteolytischen Enzyme sehr widerstandsfähig ist. Durch diese Enzyme und hauptsächlich durch Trypsin werden Eiweißkörper gewöhnlich in Albumosen, Peptone und schließlich in Mono- und Diaminosäuren zersetzt. Bei der Gelatine sollte der enzymatische Abbau auf solche Weise vor sich gehen, daß nur Albumosen und Peptone dabei entstünden. Zwar hat jüngst Reich-Herzberger in Thierfelders Laboratorium auch dabei das Vorkommen von Leucin bewiesen, aber nur in ganz geringer Ausbeute. Gerade wegen dieser Resistenzfähigkeit schien die Gelatine ein gut geeignetes Material für die Untersuchung der primären Abbauprodukte zu bieten. Auf Grund der gegenwärtigen Kenntnisse über die Albumosen ist man berechtigt, anzunehmen, daß sie eine einfachere Zusammensetzung als die natürlichen Eiweißkörper haben.

Peptone sollten also die einfachsten und auch die resistenzfähigsten Teile des Proteinmoleküls vorstellen. Um die Natur dieser Bestandteile kennen zu lernen, habe ich schon vor zwei Jahren das Studium der Verdauung der Gelatine unternommen. Unterdessen sind die grundlegenden Arbeiten von E. Fischer über Peptide erschienen. Fischer hat die wichtige Beobachtung gemacht, daß die von ihm synthetisch dargestellten Polypeptide eine verschiedene Resistenzfähigkeit gegen Pankreatin

besitzen. Die Polypeptide, welche ein Produkt der Kondensation von Glykokoll und Alanin darstellen, werden durch das Enzym nicht angegriffen, im Gegenteil, diejenigen, welche im Moleküle auch Leucin enthalten, geben das letztere bei Einwirkung von Pankreatin leicht ab. Nun wurde auch in Fischers Laboratorium festgestellt, daß das Gelatinemolekül sehr reich an Glykokoll ist. Es schien ganz natürlich, zu erwarten, daß die eiweißartigen Endprodukte der Verdauung der Gelatine auch hauptsächlich aus Glykokoll beständen. Die Resultate unserer Analysen der verschiedenen Gelatosen schienen diese Annahme zu unterstützen. Es stellte sich nämlich heraus, daß die Gelatosen einen höheren Gehalt an Glykokoll besaßen, als die Gelatine. Nun aber ergab die Analyse eines Peptons ganz überraschende Resultate: es enthielt wieder nur so viel Glykokoll, wie die ursprüngliche Albumose. Diesen Befund machte ich zur Zeit, als ich meine erste Mitteilung über die Verdauung der Gelatine machte. Er war aber meinen Erwartungen so widersprechend, daß ich ihn nicht ohne weiteres Nachprüfen veröffentlichen wollte. Ein zweiter Versuch wurde unternommen, in welchem die Gelatine zehn Monate der Verdauung überlassen wurde. Das aus diesem Verdauungsprodukt erhaltene Pepton enthielt auch nicht mehr Glykokoll, wie die ursprüngliche Gelatine, also nicht so viel wie die Gelatosen. Um für diesen Befund eine Aufklärung zu finden, schien es notwendig, eingehender zu untersuchen, ob sich bei langdauernder Einwirkung von Trypsin noch andere Produkte außer Leucin bilden. Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag, welcher das Pepton enthielt, wurde dann auf die Darstellung der Monoaminosäuren verarbeitet, und dabei stellte es sich heraus, daß die gelöste Substanz hauptsächlich aus Glykokoll bestand; die anderen Säuren, obwohl vorhanden, konnten nur in ganz geringen Mengen gewonnen werden, sodaß nur das Leucin mit Sicherheit identifiziert werden konnte. Die Ursache des niederen Glykokollgehaltes des Peptons ist also klargestellt.

Außer den Amidosäuren bildet sich bei der tryptischen Verdauung der Gelatine auch reichlich Ammoniak, wie es Dz. L. B. Stookey festgestellt hat.

Darstellung des Peptons.

Die Gelatine wurde in der zehnfachen Menge 0.5%iger Lösung von Natronkarbonat aufgelöst und nach Zugabe von 1 g Trypsin (purissimum Grübler) per Liter mit Toluol stehen gelassen. Nach mehreren Monaten wurde die Lösung eingengt, und die noch in ganz kleiner Menge vorhandenen Albumosen mit schwefelsaurem Ammoniak entfernt. Das Filtrat wurde von Schwefelsäure und Ammoniak in üblicher Weise befreit und das Pepton aus der angesäuerten Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt. Dieser Niederschlag konnte noch andere basische Produkte enthalten, hauptsächlich die sogenannten Hexonbasen. Um diese zu entfernen, wurde er mit kochendem Wasser wiederholt behandelt, bis die heißen Auszüge beim Abkühlen keinen Niederschlag mehr bildeten. Die Phosphorwolframsäureverbindungen der Hexonbasen sind in kochendem Wasser löslich. Der Rückstand stellte beim Abkühlen eine harte steinartige Masse vor. Diese wurde in kleinen Teilen mit Ammoniak verrieben und so in Lösung gebracht. Die Schwefelsäure und die Phosphorwolframsäure wurden dann in bekannter Weise entfernt und das Ammoniak verjagt. Die konzentrierte Lösung wurde in absoluten Alkohol eingetragen, der Alkohol dekantiert und der Niederschlag wiederholt mit absolutem Alkohol und dann mit Äther extrahiert. Der Alkohol schien noch einen nicht geringen Teil des Peptons in Lösung zu halten. Dieser kam aber nicht zur Untersuchung. Das im Alkohol unlösliche Pepton stellte ein weißes sehr hygroskopisches Pulver dar. Es wurde im Vacuum über Schwefelsäure und dann im Luftbad bei 120° C. getrocknet.

Bei der Analyse ergab das Präparat die folgenden Zahlen:

Das Präparat enthielt 1,01% Asche.

0,2360 g der Substanzen gaben bei Verbrennung 0,3975 g CO₂ und 0,1425 g H₂O.

0,2312 g der Substanz gaben bei p. 760 mm und t° — 17° C.

35,00 ccm Stickstoff (über 50% Kalilauge).

Glutinpepton

	von Siegfried	von Levene
C	46,76%	45,96%
H	6,23%	6,71%
N	17,32%	17,93%

Um die möglicherweise noch vorhandenen Spuren von Albumosen zu entfernen, wurde der Alkoholniederschlag wieder in Wasser aufgelöst, mit schwefelsaurem Ammon gesättigt und die Albumosen abfiltriert. Das Filtrat wurde von Schwefelsäure und Ammoniak auf übliche Weise befreit und die konzentrierte Lösung des Peptons wieder in absoluten Alkohol eingetragen.

45 g dieses Peptons wurden mit 150 ccm konzentrierter Salzsäure 5 Stunden gekocht und die Lösung nach E. Fischers Verfahren verestert. Die Ausbeute an salzsaurem Glykokoll-ester betrug 13,5 g, also 17,4% an Glykokoll.

Ein zweiter Versuch wurde auf ähnliche Weise angestellt. 31,5 g der Substanz gaben 7,175 g des salzsauren Glykokoll-esters, sie enthielt also 15,34% Glykokoll.

Der Gehalt der Gelatine an Glykokoll betrug 16,5%, der der Gelatosen reichte bis etwa 20%.

Es ist also ersichtlich, daß das Pepton eine geringere Ausbeute an Glykokoll lieferte als die Albumosen.

Die bei der tryptischen Verdauung der Gelatine entstehenden Aminosäuren.

Um diese zu erhalten, wurden 1500 g Gelatine in 15 l einer Lösung von 0,5% Natriumkarbonat und 0,2% Trypsinum purissimum Grübler aufgenommen und zehn Monate der Verdauung überlassen. Die Lösung wurde dann konzentriert, mit Schwefelsäure angesäuert und die Albumosen, Peptone und Basen durch Phosphorwolframsäure entfernt. (Nur 6 l von den 15 wurden zum Versuche gebraucht.) Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde auf übliche Weise von der Säure befreit, zur Trockene eingedampft und nach Fischers Verfahren mit Salzsäure und absolutem Alkohol verestert. Es schied sich erst Kochsalz aus, welches man leicht abfiltrieren konnte. Nach dreimaligem Verestern erstarrte die Lösung durch die Ausscheidung von salzsaurem Glykokollester. In vacuo über Schwefelsäure getrocknet, betrug der Ester 40 g. — Zweimal aus absolutem Alkohol umkristallisiert, besaß er den Schmelzpunkt von 144° C.

Das Filtrat vom Glykokollester wurde nach Fischers Verfahren bei 14 mm Druck von Salzsäure befreit und fraktioniert.

Es gelang, dabei die folgenden Fraktionen zu erhalten:

60—85° C.	8,5 g
85—100° >	1,5 >
100—130° >	11,5 >
130—150° >	11,5 >

Die ersten zwei Fraktionen wurden durch Kochen mit Wasser, die anderen mit Barythydrat verseift.

Beim Eindunsten der ersten Fraktion erhielt man einen Niederschlag, der, aus Wasser umkristallisiert, bei der Analyse die folgenden Zahlen ergab:

0,1131 g der Substanz gaben bei Verbrennung 0,2055 g CO₂ und 0,0975 g H₂O, also C — 49,63% und H — 9,49%.

Er bestand also wahrscheinlich aus den niederen Aminosäuren.

Die zweite Fraktion bestand hauptsächlich aus Leucin.

0,0928 g der Substanz gaben 0,1860 g CO₂ und 0,0875 g H₂O.

Für C ₆ H ₁₂ NO ₂ berechnet	Gefunden
C — 54,96%	C — 54,63%
H — 9,92%	H — 10,47%

Die dritte und vierte Fraktion wurde vereinigt, der Phenylalaninanteil nach Fischers Verfahren getrennt und mit Salzsäure verseift. Die Ausbeute an Phenylalanin reichte zur Analyse nicht aus, die Kristalle konnten aber in Phenylacetaldehyd leicht umgewandelt werden.

Die wässrige Lösung von Glutaminsäure und Asparaginsäure mit Barythydrat verseift und von letzterem quantitativ befreit, wurde bei stark vermindertem Druck eingedampft und mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Es schied sich dabei beim Erkalten Glutaminsäure aus, aber wieder in ganz kleiner Quantität, sodaß man sie analysenrein nicht gewinnen konnte.

Die Ammoniakbildung bei der tryptischen Verdauung der Gelatine (von L. B. Stookey ausgeführt).

Diese Versuche wurden im Herbst 1902 ausgeführt, als die Endprodukte der tryptischen Verdauung der Gelatine noch unbekannt waren. Es war die Aufgabe der Versuche, zu erforschen, ob bei dem Übergang der Gelatine in primäre Gelatosen,

und dieser in sekundäre und schließlich in Pepton, eine steigende Bildung von Ammoniak von statten ging. Es erwies sich, daß bei der andauernden Verdauung die Menge der primären Gela-tosen allmählich abnahm, während die der sekundären und des Peptons stieg; dabei nahm die Bildung des Ammoniaks immer zu. Also auch in dieser Beziehung verhielt sich die Gelatine wie die echten Eiweißkörper.

Das Fraktionieren der Verdauungsprodukte wurde mit Zinksulfat ausgeführt. 100 g Gelatine wurden mit 1 Liter 0,5%iger Natronkarbonatlösung aufgenommen, mit Toluol ver-setzt, 24 Stunden stehen gelassen und dann filtriert; zu 200 ccm des Filtrates wurden 20 ccm einer konzentrierten Zinksulfat-lösung, welche 5% Schwefelsäure enthielt, zugefügt und die Lösung in Portionen von je 11 ccm verteilt. Zu diesen Portionen wurden dann steigende Mengen von einer kon-zentrierten Zinksulfatlösung zugefügt und über Nacht stehen gelassen. Sie wurden dann filtriert, und das Filtrat jeder Portion mit einem Kubikzentimeter Zinksulfatlösung wieder über Nacht stehen gelassen.

Die Resultate sind in folgender Tabelle angegeben.

Filtrat I	Konzentr. Zinksulfat- lösung		Filtrat II	Konzentr. Zinksulfat- lösung	
11 ccm	8 ccm	Trübung	19 ccm	1 cm	Niederschlag
11 »	9 »	Niederschlag	20 »	1 »	»
11 »	10 »	»	21 »	1 »	»
11 »	11 »	»	22 »	1 »	»
11 »	12 »	»	23 »	1 »	»
11 »	13 »	»	24 »	1 »	Trübung
11 »	14 »	»	25 »	1 »	Klar
11 »	15 »	»	26 »	1 »	Trübung
11 »	16 »	»	27 »	1 »	Niederschlag
11 »	17 »	»	28 »	1 »	»
11 »	18 »	»	29 »	1 »	»
11 »	19 »	»	30 »	1 »	»
11 »	20 »	»	31 »	1 »	»
11 »	21 »	»	32 »	1 »	Trübung
11 »	22 »	»	33 »	1 »	Klar
11 »	23 »	»	34 »	Zinksulfat bis zur Sättigung	Niederschlag

Aus dieser Tabelle ist es ersichtlich, daß schon nach 24 stündiger Verdauung drei verschiedene Fraktionen von Gelatosen zu erhalten sind.

Die Hauptmenge wurde der weiteren Verdauung überlassen, von Zeit zu Zeit 3 Portionen von je 20 ccm entnommen. Zu der ersten wurden 2 ccm der sauren und 28 ccm der neutralen Zinksulfatlösung zugefügt; die zweite Portion wurde in derselben Weise mit 46 ccm der Lösung behandelt, die dritte mit Zinksulfat gesättigt. Sie wurden alle über Nacht stehen gelassen und in den Filtraten eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl-Gunning ausgeführt. In einer vierten Portion aus 100 ccm wurde die Menge des Ammoniaks bestimmt.

Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle angegeben:

Dauer der Verdauung	Fraktion A N in % des Gesamt-N	Fraktion B N in % des Gesamt-N	Fraktion C N in % des Gesamt-N	Ammoniak N in % des Gesamt-N
15 Stunden	4.6	27.5	61.2	0.17
24 "	—	18.2	42.7	0.42
72 "	—	—	34.7	0.62
96 "	—	—	32.7	0.85
13 Tage	—	—	21.2	1.21
27 "	—	—	—	5.02
90 "	—	—	—	8.38

Literatur.

- E. Fischer, Levene und Adders, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV.
 E. Fischer und Bergel, Berichte der deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI.
 Levene und Stookey, American Journal of Physiology, Vol. III, p. 5.
 Levene, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII.
 Reich-Herzberger, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV.