

## **Fütterungsversuche mit durch Pankreatin, durch Pepsinsalzsäure plus Pankreatin und durch Säure hydrolysiertem Casein.**

Von

**Emil Abderhalden und Peter Rona.**

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1904.)

Trotz zahlreicher Untersuchungen über den Abbau der Eiweißkörper im Magen-Darmkanal ist die Frage, wie weit die Fermenthydrolyse normalerweise geht, noch ganz unentschieden. Entgegen der alten Anschauung Kühnes über die Spaltung der Eiweißkörper durch Pepsin und Trypsin ist man zur Zeit speziell fußend auf den Arbeiten von Lawrow,<sup>1)</sup> Cohnheim,<sup>2)</sup> Kutscher<sup>3)</sup> und seinen Mitarbeitern u. A. eher geneigt, eine tiefgehende Spaltung der Eiweißkörper im Darmkanal anzunehmen. Entscheidend für diese Frage kann nur das Tierexperiment sein, denn die Versuche *in vitro* weichen in ihren Bedingungen und ganz besonders in der Zeitdauer der Einwirkung der Fermente viel zu sehr von den normalen Verhältnissen ab. Kutscher und Seemann (l. c.), welche den Magen-Darminhalt von Hunden, welche wenige Stunden vor ihrer Tötung mit Fleisch gefüttert worden waren, untersuchten, schließen aus der Auffindung kristallinischer Eiweißspaltprodukte, daß das Trypsin in der

<sup>1)</sup> Lawrow, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 513, 1899, und Bd. XXXIII, S. 312, 1901.

<sup>2)</sup> O. Cohnheim, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 451, 1901.

<sup>3)</sup> Fr. Kutscher und J. Seemann, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, 1901/02, und Bd. XXXV, S. 432, 1902.

Kutscher und Lohmann, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 332, 1904.

Fr. Kutscher, Die Endprodukte der Trypsinverdauung, Habilitationsschrift, Straßburg, K. J. Trübner, 1899.

Norm einen wesentlichen Teil der Eiweißkörper im Dünndarm bis zur Bildung kristallinischer Produkte spaltet. Leider erfahren wir nichts über die quantitativen Verhältnisse. Daß aber das Auftreten von Aminosäuren keineswegs der Ausdruck einer tiefgehenden Spaltung zu sein braucht, beweist das frühzeitige Auftreten von Tyrosin und Leucin und auch anderer Aminosäuren bei der Pankreatinwirkung auf Eiweiß bei noch sehr starker Biuretreaktion.<sup>1)</sup> Aus dem großen Molekül können Tyrosin und Leucin und auch andere Verbindungen abgespalten sein, und doch noch komplizierte Komplexe vorhanden sein. Von dem einen von uns (E. Abderhalden)<sup>2)</sup> ausgeführte quantitative Versuche über die Eiweißspaltung im Magen-Darmkanal haben denn auch ergeben, daß die Annahme, daß normalerweise eine sehr weitgehende resp. totale Spaltung des Eiweißmoleküls stattfindet, noch gänzlich unbewiesen ist. Haben wir somit für eine normalerweise stattfindende totale Aufspaltung der Eiweißkörper und eine sich anschließende Totalsynthese keine sicheren Beweise, so ergeben sich doch Anhaltspunkte für die Annahme einer partiellen Synthese in dem Sinne, daß durch Abspaltung bestimmter Gruppen von Aminosäuren ein Kern restiert, aus dem möglicherweise durch Wiederanlagerung freier Aminosäuren für den Körper spezifische Eiweißkörper hervorgehen können. Daß das Nahrungseiweiß eine tiefgehende Änderung bei seiner Assimilation erleiden muß, das beweisen vergleichende quantitative Untersuchungen über den Aufbau verschiedener Eiweißkörper.<sup>2)</sup>

Im Anschluß an diese Überlegungen suchten wir die Frage zu entscheiden, ob der tierische Organismus überhaupt imstande ist, abgebautes Eiweiß zu verwerten, und wie weit dieser Abbau fortgeschritten sein darf. Die Frage nach der Eiweißsynthese im tierischen Organismus hat bereits durch O. Loewi,<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Emil Fischer und Emil Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 82, 1903.

<sup>2)</sup> Diese Versuche sollen demnächst veröffentlicht werden.

<sup>3)</sup> O. Loewi, Zentralblatt f. Physiologie, S. 590, 1902; Archiv für experiment. Path. u. Pharmak., Bd. XLVIII, S. 303, 1902.

Lesser<sup>1)</sup> und J. Henderson und A. L. Dean<sup>2)</sup> eine Bearbeitung erfahren. Während O. Loewi durch Verfütterung eines Verdauungsgemisches von Pankreasdrüsen Stickstoffgleichgewicht erreichen konnte, gelang dies Lesser bei Anwendung von mit Trypsin verdaulichem Fibrin nicht. J. Henderson und A. L. Dean dagegen kamen zu ähnlichen Resultaten wie O. Loewi.

Uns kam es bei unseren Versuchen in erster Linie darauf an, ein hydrolysiertes Eiweißprodukt von bekannter Zusammensetzung in einem Zustand zu erhalten, der es ermöglichte, Tiere längere Zeit damit zu füttern. Wir wählten Casein. Verwendet wurden folgende Präparate: 1. Casein, welches 2 Monate lang mit Pankreatin (Rhenania) verdaut worden war. Das Verdauungsgemisch gab schwache Biuretreaktion. Die allerdings keineswegs genaue Bestimmung der mit Phosphorwolframsäure fällbaren Produkte ergab etwa 15% an Polypeptiden.<sup>3)</sup> 2. Casein, welches 1 Monat mit Pepsinsalzsäure und 2 Monate mit Pankreatin (Rhenania) verdaut worden war. Das Verdauungsgemisch gab keine Biuretprobe mehr und enthielt etwa 8% an Polypeptid.<sup>4)</sup> 3. Casein, welches 10 Stunden mit 25%iger Schwefelsäure gekocht worden war. 4. Unverändertes Casein.

Die Hauptschwierigkeit bestand darin, Präparate zu erhalten, welche alle Abbauprodukte enthielten, und welche von den Versuchstieren gerne genommen wurden und keine Störungen verursachten. Dies erreichten wir, indem wir das Verdauungsgemisch nach der Verjagung des Ammoniaks im Vacuum mit Natriumkarbonat neutralisierten, hierauf die ganze

<sup>1)</sup> Lesser, Zeitschr. f. Biologie, Bd. XLV, N. F. Bd. XXVII, S. 497, 1904.

<sup>2)</sup> J. Henderson und A. L. Dean, American Journal of Physiology, Bd. IX, S. 386, 1903.

Vergl. auch: O. Loewi, Über Eiweißsynthese im Tierkörper, Bemerkungen zu der Arbeit von Ernst J. Lesser, Zeitschrift f. Biologie, Bd. XLVI, N. F. Bd. XXVIII, S. 110, 1904.

Ernst J. Lesser, Über Eiweißsynthese im Tierkörper, Erwiderung auf die Bemerkung von O. Loewi, Zeitschrift f. Biologie, Bd. XLVI, N. F. Bd. XXVIII, S. 113, 1904.

<sup>3)</sup> Emil Fischer und Emil Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 81, 1903.

<sup>4)</sup> Emil Fischer und Emil Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 215, 1903.

Flüssigkeit bei möglichst niedriger Temperatur (35—40°) bei etwa 20 mm Druck eindampften und den Rückstand im Vacuumexsikkator trockneten. Das so erhaltene Präparat wurde mit der gleichen Menge Rohrzucker gemischt und fein zerrieben. Die Versuchstiere nahmen dieses Präparat sehr gerne und zeigten keine krankhaften Erscheinungen.

Die folgenden Tabellen zeigen das Resultat dieser Versuche. Zu bemerken ist noch, daß jedes Tier pro Tag 1 g des mit Zucker vermengten Präparates erhielt. Dem Futter wurde eine geringe Menge kohlensaures Natrium beigemischt. Versuche, Fett in Form von Olivenöl zuzuführen, mußten aufgegeben werden, weil die Versuchstiere die Nahrung unberührt ließen.







## Fütterung von Mäusen mit Zucker allein.

Die Zahlen geben die Gewichte der Tiere in Grammen an.

Beginn des Versuches	Versuchstier	Anfangsgewicht des Tieres	Versuchstage					
			1	2	3	4	5	6
1. VI.	1	10,5	10,5	9,0	9,0	9,0	†	
1. VI.	2	12,5	12,0	11,0	11,0	11,0	11,0	†
1. VI.	3	11,5	11,0	10,0	9,5	9,5	9,5	†
2. II.	4	15,0	15,0	14,0	12,0	11,0	†	
2. II.	5	16,0	15,5	15,0	14,0	14,0	13,0	†
2. II.	6	15,0	15,5	15,0	14,0	13,0	†	
2. II.	7	15,0	14,0	13,0	12,0	†		
2. II.	8	14,5	14,0	13,0	12,5	†		

Aus den vorliegenden Tabellen ergibt sich zunächst eine Bestätigung der Versuche von N. Lunin,<sup>1)</sup> welcher fand, daß Mäuse mit Casein und kohlen-saurem Natron 16—30 Tage leben. Im wesentlichen ebensolange lebten die mit dem Pankreatin-Verdauungsgemisch ernährten Mäuse, während diejenigen Versuchstiere, welche ein mit Pepsinsalzsäure vorverdautes Pankreatinverdauungspräparat erhielten, viel frühzeitiger eingingen, aber doch bedeutend länger lebten als die Hungertiere. Den letzteren sehr nahe stehen diejenigen Mäuse, welche mit Säure aufgespaltenes Eiweiß erhielten. Der letztere Versuch macht es sehr wahrscheinlich, daß die durch Hydrolyse mit Säuren erhaltenen Spaltprodukte des Caseins nicht imstande sind, Eiweiß zu ersetzen. Gegen eine mögliche Totalsynthese von Eiweiß aus den einzelnen Spaltprodukten spricht dieser Versuch nicht, denn der Einwand liegt sehr nahe und hat auch seine Berechtigung, daß die Spaltung mit Säuren ein Eingriff ist, der sehr leicht zu weitergehenden Veränderungen führen kann. Der Umstand, daß das Pepsin-Pankreatin-Casein viel weniger zum Ersatz des ungespaltenen Caseins ausreichte als das Pankreatin-

<sup>1)</sup> N. Lunin, Über die Bedeutung der anorganischen Salze für die Ernährung des Tieres, Dissert. Dorpat, 1880, Diese Zeitschrift, Bd. V, S. 31, 1881.

Casein, legt die Vermutung nahe, daß dies die Folge des weitgehenderen Abbaus des Caseins durch die vereinte Wirkung von Pepsinsalzsäure und Pankreatin ist. Derartige Schlüsse sind jedoch bei solchen Fütterungsversuchen mit großer Vorsicht zu ziehen, weil uns die Erfahrung gelehrt hat, daß der Erfolg dieser Versuche sehr von der Beschaffenheit des Materials abhängt.

Die Versuche zeigen jedenfalls einwandfrei, daß es gelingt, mit einem Produkt, das zum größten Teil aus Aminosäuren besteht, das aber noch höhere, zum Teil nur eine äußerst schwache, zum Teil gar keine Biuretreaktion gebende Komplexe enthält, Mäuse längere Zeit am Leben zu erhalten. Die mit dem Pankreatinverdauungsgemisch ausgeführten Versuche zeigen gegenüber den mit unverändertem Casein angestellten Versuchen keinen Unterschied. Auch im Befinden der Tiere, ihrem Aussehen war keine Abweichung bemerkbar, während dagegen diejenigen Versuchstiere, welche mit Säure gespaltenes Casein erhielten, ganz wie Hungertiere sich verhielten. Inwieweit die nicht gänzlich aufgespaltenen, durch Phosphorwolframsäure fällbaren Produkte, «Polypeptide», bei diesen Versuchen in Betracht kommen, läßt sich nicht entscheiden, weil bei so kleinen Tieren die Mengen der nicht ganz aufgespaltenen Produkte sehr bald eine Rolle spielen können. Wir haben deshalb die Versuche auf andere Versuchstiere, zunächst auf Ratten, ausgedehnt und werden vor allem auch mit Hunden Versuche anstellen. Jedenfalls muß von derartigen Versuchen verlangt werden, daß stets genau ermittelt wird, bis zu welchen Stufen der Abbau der Verdauungsprodukte fortgeschritten ist. Die Angabe «biuretfrei» berechtigt, wie wiederholt betont, durchaus nicht zu dem Schlusse einer totalen Aufspaltung. Bemerken möchten wir noch ausdrücklich, daß die mitgeteilten Versuche nicht, wie Kassowitz<sup>1)</sup> glaubt, einer katabolischen Auffassung der Lebensprozesse entgegenstehen, im Gegenteil, sie erleichtern uns das Verständnis der Assimilation der verschiedenartigsten Nahrungseiweißkörper. Hervorheben möchten wir auch, daß die mitgeteilten Versuche keinerlei direkte Schlüsse auf die normalen Verdauungsvorgänge und die Art der zur Assimilation

<sup>1)</sup> Kassowitz, Allgemeine Biologie, Bd. III, S. 289, 1904.

gelangenden Eiweißspaltprodukte ergeben. Wir wagen auch nicht unsere Versuchsergebnisse als strikten Beweis einer stattgehabten Eiweißsynthese zu betrachten. Weitere Versuche werden diese Frage einwandfrei entscheiden. Vor allem werden wir versuchen, ein hydrolysiertes Eiweißpräparat, z. B. Fleisch, darzustellen, welches ermöglicht, die Versuchstiere längere Zeit am Leben zu erhalten und vor allem vor Gewichtsverlusten zu schützen.

### 1. Darstellung des mit Pankreatin verdauten Präparates.

2 kg Casein wurden in 15 l Wasser suspendiert, mit Toluol und 30 g Pankreatin (Rhenania) versetzt und im Brutraum mit einem Rührer in beständiger Bewegung gehalten. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Ammoniak während der ganzen Dauer des Versuches alkalisch erhalten. Nach einem Monat wurden nochmals 20 g Pankreatin zugegeben. Nach zwei Monaten wurde die Verdauung unterbrochen und das Gemisch direkt im Fraktionierkolben bei vermindertem Druck zur Entfernung des Ammoniaks eingengt. Hierauf wurde zum Gemisch soviel kohlensaures Natron zugefügt, bis dasselbe neutral reagierte, und nun die ganze Masse bei 35—40° unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Der Rückstand, welcher zunächst eine teigige Beschaffenheit hatte und hellgelb gefärbt war, wurde zur weiteren Trocknung mehrere Tage im Vacuumexsikkator gehalten. Das Produkt ließ sich jetzt leicht mit Zucker verreiben. Ein Teil der ursprünglichen Verdauungsflüssigkeit diente nach dem Abdampfen des Ammoniaks zur Bestimmung des Polypeptids,<sup>1)</sup> dessen Menge zu etwa 15% des angewandten Caseins gefunden wurde. Bei seiner Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure konnten unter Anwendung der Estermethode die bekannten Monoaminosäuren isoliert werden. Das Verdauungsgemisch selbst gab ganz schwache Biuretreaktion.

<sup>1)</sup> Emil Fischer und Emil Abderhalden, *k. c.*

## 2. Darstellung des mit Pepsinsalzsäure und mit Pankreatin verdauten Caseinpräparates.

1 kg Casein wurde in 7 l Wasser suspendiert und die Flüssigkeit nach Zusatz von 25 g Pepsin (Grübler) und von Toluol auf einen Gehalt von 0,3% Salzsäure gebracht. Nach einmonatlichem Stehen im Brutraum wurde das Verdauungsgemisch mit Ammoniak alkalisch gemacht und nun noch 2 Monate mit 30 g Pankreatin verdaut. Bei der Herstellung des trockenen Verdauungspräparates wurde in genau derselben Weise verfahren wie oben. Die Polypeptidbestimmung ergab einen Gehalt von etwa 8% des angewandten Caseins. Die Verdauungsflüssigkeit gab keine Spur einer Biuretreaktion.

## 3. Darstellung des mit Säure gespaltenen Präparates.

1 kg Casein wurde mit 25%iger Schwefelsäure 10 Stunden am Rückflußkühler erhitzt, und hierauf die Schwefelsäure mit Baryt quantitativ entfernt. Nach Neutralisation mit Soda wurde auch hier die Flüssigkeit bei 35—40° unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Auch dieses Präparat wurde mit der gleichen Menge Zucker und wenig Natriumkarbonat verrieben verfüttert.