

Zur Spaltung des Nahrungseiweißes im Darm.

II. Mitteilung.

Von

Otto Cohnheim.

(Aus dem physiologischen Institut zu Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. März 1907.)

Vor einiger Zeit habe ich Versuche¹⁾ veröffentlicht, nach denen durch die kombinierte Wirkung des Pepsins und Erepsins Eiweißkörper weiter als durch Trypsin oder Pepsin und Trypsin zerlegt werden können, nämlich so vollständig wie durch siedende Säuren. Die Versuche ließen Einwendungen zu, und ich habe sie mit vervollkommneter Methodik wiederholt.

Die Frage nach der vollständigen oder nur partiellen Umwandlung des Nahrungseiweißes vor der Resorption ist ja von großer biologischer Bedeutung. Wirklich beantwortet kann sie nur durch das Tierexperiment werden, aber zunächst galt es, die Vorfrage zu erledigen, ob denn auf dem Wege der normalen Resorption überhaupt die Möglichkeit einer kompletten Eiweißspaltung vorliegt. Die Versuche von E. Fischer und Abderhalden²⁾ schienen die Frage eher zu verneinen, und die Stoffwechselversuche von Henriques und Hansen,³⁾ Ab-

¹⁾ O. Cohnheim, Diese Zeitschrift, Bd. LXIX, S. 64 (1906).

²⁾ E. Fischer und E. Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 81; Bd. XL, S. 215 (1903). — E. Abderhalden, *ibid.*, Bd. XLI, S. 17 (1905). — E. Abderhalden und B. Reinbold, *ibid.*, Bd. XLIV, S. 284 (1905); Bd. XLVI, S. 159 (1905). — E. Fischer und E. Abderhalden, *ibid.*, Bd. XLVI, S. 52 (1905).

³⁾ V. Henriques und C. Hansen, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 417 (1905); Bd. XLVIII, S. 383 (1906); Bd. XLIX, S. 113 (1906).

Abderhalden und Rona¹⁾ und Lüthje²⁾ machten die vollständige Eiweißspaltung im Darm auch nicht wahrscheinlicher. So schienen mir neue Versuche nötig: ich habe gegen das vorige Mal sowohl die Gewinnung der Spaltungsprodukte, wie die chemische Untersuchung geändert.

An sich wäre es das Ideal, reine Fermente auf chemisch bekannte Körper einwirken zu lassen: aber dies Ideal ist unerfüllbar. Chemisch bekannt sind nur die synthetischen Peptide Emil Fischers und einige von ihm durch Abbau gewonnene Dipeptide. Von hier bis zu dem komplizierten und völlig aufgelösten Gemenge, das die Pepsinverdauung liefert, führt noch keine Brücke. Für eine künftige Eiweißchemie werden die Untersuchungen von E. Fischer und E. Abderhalden und ihren Mitarbeitern³⁾ über die Zerlegung der einzelnen Peptide durch Trypsin, Erepsin oder die autolytischen Fermente, von entscheidender Wichtigkeit sein. Für die Frage der wirklichen Verdauung sind sie zurzeit leider nur schwer verwertbar. Hier bleibt einstweilen nichts anderes übrig, als sich möglichst eng an die gegebenen, physiologischen Verhältnisse zu halten. Und da kann es für die Magenverdauung keine vollkommenerere Methode geben, als daß man das zu untersuchende Eiweiß einem Hunde zu fressen gibt und es aus einer Duodenalfistel auffängt. Etwas Trypsin habe ich in Form von Pankreassaft zugefügt: um Erepsin zu erhalten, mußte ich freilich zu Darmextrakten greifen. Denn ausreichende Mengen Darmsaft lassen sich nicht erhalten: selbst Pawlow und Boldireff⁴⁾ hatten immer nur wenige Kubikzentimeter zur Verfügung. Übrigens scheint es mir fraglich:

¹⁾ E. Abderhalden und P. Rona. Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 528 (1904); Bd. XLIV, S. 198 (1905).

²⁾ H. Lüthje, Pflügers Archiv, Bd. CXIII, S. 547 (1906).

³⁾ E. Fischer und E. Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52 (1905). — E. Abderhalden und Y. Teruuchi, *ibid.*, Bd. XLIX, S. 1 und 21 (1906). — E. Abderhalden und A. Schittenhelm, *ibid.*, Bd. XLIX, S. 26 (1906). — E. Abderhalden und P. Rona, *ibid.*, Bd. XLIX, S. 31 (1906).

⁴⁾ W. Boldireff, Arch. des Sciences biolog. de St. Pétersbourg, Bd. XI, S. 86, 1904.

ob die Anwendung von Darmsaft statt Darmextrakt ein Vorteil wäre. Da im Dünndarm dieselben Zellen resorbieren und Fermente bereiten, ist es durchaus möglich, daß während des Durchtritts durch die Epithelzellen noch eine Spaltung vor sich geht, die Fermente also gar nicht vollständig ins Lumen sezerniert zu werden brauchen. Tunlichst gereinigt habe ich die Darmextrakte.

Ich verfuhr demnach folgendermaßen:

Ich verfütterte geräuchertes Fleisch an Hunde mit Duodenalfisteln. Die dafür erforderliche Methodik hatte ich früher in Gemeinschaft mit Tobler¹⁾ ausgebildet: die chemische Untersuchung der aus einer Duodenalfistel gesammelten Massen hatte gelehrt, daß die Pepsinverdauung eine viel intensivere ist, als man es bisher auf Grund der Versuche in vitro und der Befunde im Magen hatte vermuten können. Den kunstvollen Mechanismus der Magenverdauung können wir eben nicht nachahmen. Selbstverständlich muß bei diesen Versuchen durch Einspritzungen von saurem Mageninhalt dafür gesorgt werden, daß die Pylorusreflexe erhalten sind und daß dem Organismus der Versuchstiere Wasser und Chlor zur Verfügung stehen. Unterläßt man die Einspritzungen, wie London²⁾ und seine Mitarbeiter dies getan haben, so schafft man unphysiologische Bedingungen und macht die Versuche unverwertbar.

Ich habe 2 Hunde mit Duodenalfisteln 5—6 cm unterhalb des Pylorus verwendet. Der eine wurde behandelt, wie es Tobler beschrieben hat, d. h. die gleiche Fistel diente zur Entleerung und zum Einführen mittels eines dünnen, abwärts gerichteten Katheters. Der andere hatte eine Duodenalfistel, aus der die verdauten Mengen herausspritzten, und eine zweite, einige Zentimeter abwärts gelegene, in die eingespritzt werden konnte. Einen Ballon habe ich nicht mehr eingeführt, da besonders darauf gerichtete Versuche zeigten, daß bei diesen beiden Hunden nichts an der Kanüle vorbeifloß, sondern der gesamte Duodenalinhalt sich nach außen entleerte. Verfüttert habe ich

¹⁾ L. Tobler, Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 185 (1905).

²⁾ E. London und A. Sulima, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 209 (1905). — E. London und W. Polowzowa, *ibid.*, Bd. XLIX, S. 328 (1906).

fett- und sehnenfreies gehacktes Rindfleisch, das einige Stunden gewässert und etwas abgepreßt wurde, also dasselbe Material, dessen sich Tobler bedient hatte. Die Hunde wurden zunächst einige Male im Gestell stehend gefüttert und das aus der Fistel Kommende aufgefangen und gefroren aufbewahrt. Bei dem eigentlichen Versuch stand der eine an 3 Tagen im ganzen 13 Stunden, der andere an 2 Tagen 10 Stunden. Sie erhielten das gewässerte Fleisch zu fressen und während des Versuches wurde in kleinen Abständen die bei den Versuchen erhaltene Flüssigkeit abwärts ins Duodenum eingespritzt. Das sich aus der Fistel Entleerende wurde in einem weiten Gefäß aufgefangen, das in einer Kältemischung stand, sodaß jede herauskommende Portion sofort gefror, und wurde zunächst gefroren aufbewahrt. Diese Masse bestand zum größten Teil natürlich aus Mageninhalt: er ist, wie Tobler beschrieben hat, dünnflüssig, nur mit etwas ungelöstem Fleisch gemengt. Außerdem aber entströmen, auf den Reiz der Einspritzungen hin, der Kanüle Pankreassaft und Galle. Die Fistel oberhalb der Mündung des D. choledochus und des D. Wirsingianus anzulegen, ist m. E. technisch kaum möglich, und den Eingriff der Unterbindung beider Gänge auszuführen,¹⁾ hatte ich in diesen Versuchen keine Veranlassung. Die Beimengung einer gewissen Menge von Pankreassaft war mir im Gegenteil lieb, da ich so dem natürlichen Zustande noch näher kam. Die Beimengung von Galle stört nicht: die Gallensäuren geben ja mit dem Eiweiß bei saurer Reaktion einen Niederschlag, fallen also bei der weiteren Behandlung doch zum größten Teile fort. Da die Albumosen einen wirksamen Reiz für den Erguß von Galle in den Darm darstellen, hat die Galle vielleicht auch noch irgend eine unterstützende Funktion bei der Eiweißverdauung. Am Schluß der Versuche bekamen die Hunde jedesmal zu saufen, doch wurde der Magen nie ganz leer. Verfüttert wurden 2—3 Pfund Fleisch. Schließlich wurden die einzelnen Eisblöcke aufgetaut und sofort zentrifugiert. Die Lösung läßt sich ganz gut filtrieren, sodaß ein völlig klares, gelbes Filtrat resultiert, doch

¹⁾ G. Lang, Biochem. Zeitschrift, Bd. II, S. 225 (1906).

gelingt die Trennung vom Ungelösten mittels der Zentrifuge natürlich viel schneller. Man erhält einen Niederschlag, der aus unverdaulichem Fleisch und durch die Galle niedergeschlagenem Eiweiß besteht und eine stark saure, hellgelbe, klare Lösung, die nur eine ganz unbedeutende Menge von koagulierbarem Eiweiß, dagegen natürlich massenhaft Pepton enthielt. Ich gewann so 2240 ccm mit 10,8 g Stickstoff in unkoagulierbarer Form.¹⁾

Diese Lösung enthielt die Verdauungsprodukte des Eiweißes, die durch die Pepsinverdauung entstehen, sie enthielt Magensaft, Pankreassaft, Galle und vermutlich Duodenalsaft, der sich ja auf den Säurereiz mit ergießen muß. Sie reagierte stark sauer, trotzdem daß sich dem Mageninhalt schon alkalische Sekrete beigemischt hatten: freie Salzsäure fehlte.²⁾ Die Lösung wurde nun zur weiteren Behandlung in 2 gleiche Hälften geteilt. Die eine wurde kurz aufgeköcht, durch Filtrieren von den Spuren koagulierbaren Eiweißes befreit; von dem Filtrat wurden 250 ccm (= 1,134 g Stickstoff) mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß die Lösung 33% enthielt, und 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht.

Die andere Hälfte dagegen wurde mit Erepsin verdaut, und es konnten so die Produkte der Säurespaltung mit denen der kombinierten Fermentspaltung verglichen werden. Die Erepsinlösung gewann ich durch Extraktion der Darmschleimhaut von 2 mittelgroßen Hunden in der früher beschriebenen Weise.³⁾ Die Schleimhaut wurde abgeschabt, mit Sand fein zerrieben, wiederholt mit Wasser extrahiert und die wässrige Lösung mit dem Anderthalbfachen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser aufgenommen, unter Zusatz von Toluol und Chloroform sulfatfrei dialysiert und die Lösung wieder filtriert. Bei diesem Filtrieren hat man zwar starke Fermentverluste, aber man wird fast das ganze Eiweiß los. Es resultiert eine Lösung, die sehr wenig koagulierbares Eiweiß und keine dialysierbaren

¹⁾ Alle Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl; stets Doppelbestimmungen.

²⁾ Vgl. L. Tobler, Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 185 (1905).

³⁾ O. Cohnheim, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 451 (1901).

Körper enthält. Sie ist reich an Erepsin, aber es konnte daneben auch Arginase¹⁾ vorhanden sein, und das wäre der weiteren Untersuchung hinderlich geworden. Ich setzte daher beide Erepsinlösungen mit kohlensaurem Arginin an, hielt sie 24 Stunden im Brutschrank, koagulierte zur Entfernung des Eiweißes und fällte das Arginin nach dem Silberbarytverfahren. Im Filtrat war aber keine Fällung mit Phosphorwolframsäure zu erhalten, die Lösungen waren also arginasefrei. Kossel und Dakin geben auch an, daß man in Extrakten der Darmschleimhaut regelmäßig Arginase findet, dagegen nur selten in gereinigten Erepsinlösungen. Vermutlich haftet die Arginase an den Eiweißkörpern, die bei der Dialyse unlöslich werden.

1120 ccm der Magenpeptonlösung wurden mit NaHCO_3 etwas überneutralisiert, Kohlensäure durchgeleitet,²⁾ die beiden Erepsinlösungen zugesetzt und die Lösung auf Körpertemperatur gebracht. So war die Pepsinwirkung abgeschnitten: sie hatte seit der Entleerung aus dem Körper nicht weiter gehen können, da die Lösung ja anfangs gefroren war, und nach dem Auftauen und kurzem Zentrifugieren sofort neutralisiert wurde. Ich glaube auch nicht, daß das Trypsin in der kurzen Zeit bei niedriger Temperatur in der Zentrifuge wesentlich geschädigt sein konnte. Vielmehr wirkten nun dieses und das Erepsin auf das Pepton. Schon nach 3 Stunden war die Biuretreaktion verschwunden. Da die Massen sich in 13 Stunden aus dem Pylorus entleert hatten, wäre die richtige Dauer der Verdauung auch 13 Stunden gewesen. Ich steigerte sie auf 22 Stunden, um den Mangel an Bewegung zu ersetzen. Nach dieser Zeit wurde die Lösung mit Essigsäure schwach angesäuert und zur Entfernung der kleinen Eiweißreste einmal kurz aufgeköcht.

Ich hatte so zwei Lösungen von ursprünglich gleicher Zusammensetzung, von denen die eine der Säurespaltung, die

¹⁾ A. Kossel und H. D. Dakin, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 321 (1904); Bd. XLII, S. 181 (1904).

²⁾ Eine mit Kohlensäure übersättigte Alkalilösung scheint ja das Optimum für die Wirkung der Darmfermente zu sein (N. P. Schierbeck, Skandin. Arch. f. Physiolog., Bd. III, S. 344 (1891).

andere dagegen nur der Einwirkung der Fermente unterworfen gewesen war. Die eine konnte, soweit wir wissen, nur die verschiedenen Aminosäuren enthalten, die andere dagegen vielleicht auch zusammenhängende Komplexe. Peptone oder Peptide. Eine Entscheidung ließ nur die quantitative Bestimmung von Spaltungsprodukten erwarten, und hier war die Auswahl beschränkt. Tyrosin und Tryptophan werden zu leicht losgelöst und die anderen Monoaminosäuren lassen sich nur durch E. Fischers Esterverfahren bestimmen: das aber arbeitet nicht ganz quantitativ und es erfordert die Einwirkung der starken Salzsäure, die sekundäre Spaltungen machen kann. So blieben die Basen, für die Kossel quantitative Bestimmungsmethoden geschaffen hat, und unter ihnen empfahl sich aus mehreren Gründen das Arginin. Einmal ist es in den Eiweißkörpern des Fleisches, Myosin und Leim, in relativ großer Menge enthalten:¹⁾ zweitens ist bisher in allen Eiweißkörpern, Peptonen und Kyrinen, Arginin nachgewiesen worden: es war also zu vermuten, daß auch ein Peptid, das etwa der Erepsinspaltung entgangen wäre, Arginin enthalte: drittens hat Kossel²⁾ gefunden, daß durch das Silberbarytverfahren, das ihm zur Darstellung des Arginins dient, auch viele Peptone niedergeschlagen werden. Etwa vorhandene derartige Körper hätten sich also in der Argininfraktion finden müssen. Endlich hat Steudel³⁾ in dem Pikrolonat eine Verbindung kennen gelernt, die leicht zur Identifizierung des Arginins dienen kann.

So habe ich denn in den beiden zu vergleichenden Lösungen das Arginin nach Kossel⁴⁾ bestimmt, wobei ich mich der lebenswürdigen Ratschläge Herrn Professor Kossels zu erfreuen hatte.

Die mit Erepsin verdaute Lösung, 1970 ccm mit 5,4 g N,

¹⁾ E. Hart, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 347 (1901).

²⁾ A. Kossel (und H. Pringle), Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 315 (1906).

³⁾ H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 219 (1902).

⁴⁾ A. Kossel und F. Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165 (1900). — A. Kossel (und H. Pringle), Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 318 (1906).

wurde mit Baryumcarbonat versetzt und zur Austreibung des Ammoniaks einige Stunden mäßig stark auf dem Wasserbade erwärmt. Es restierten 1510 ccm mit 5,19 g N, sodaß 2,8% des N auf Ammoniak kommen. Von den 1510 ccm wurden 1250 ccm mit 4,3 g N weiter verarbeitet. Sie wurden auf 4% Schwefelsäure gebracht und solange mit Phosphorwolframsäure versetzt, wie noch ein Niederschlag entstand; dann wurde scharf abgesaugt, der Niederschlag mit etwas Wasser, das Schwefel- und Phosphorwolframsäure enthielt, angerührt und nochmals scharf abgesaugt. Dann habe ich den Niederschlag, ohne ihn zu erwärmen, mit Barythydrat zerlegt, den überschüssigen Baryt mit Kohlensäure entfernt, die Niederschläge gut ausgekocht und dann zunächst bei schwach saurer Reaktion mit Silbernitrat gefällt.¹⁾ Der ziemlich reichliche Niederschlag bestand wohl aus etwas Chlorsilber — enthielt die ursprüngliche Flüssigkeit doch reichlich Kochsalz, von dem Reste in dem Phosphorwolframsäureniederschlag stecken mußten — und mußte im übrigen die Silberverbindungen von Stoffen enthalten, die nichts mit dem Eiweiß zu tun haben. Es kommen einmal Extraktivstoffe des Fleisches in Betracht und dann Nucleinsäure oder deren Spaltungsprodukte, die aus dem Fleisch und aus den Verdauungssäften stammen konnten. Die Stickstoffmenge betrug 0,194 g, das sind 4,5% des Stickstoffs. Das Filtrat von diesem Niederschlag sättigte ich mit Barythydrat, saugte ab, verrieb die Fällung nochmals mit gesättigter Barythydratlösung, saugte wieder ab und nahm den Niederschlag mit verdünnter Schwefelsäure auf. Zur Trennung des Arginins und Histidins neutralisierte ich dann, nach Kossels neuem Verfahren,²⁾ genau mit Barythydrat, setzte gepulvertes Baryumcarbonat zu und erwärmte eine halbe Stunde. Dadurch wird das Histidin gefällt. Im Filtrat, das nach Ausweis der Farbenreaktionen von Histidin, Tryptophan und Kreatinin frei war, mußte das Arginin enthalten sein, außerdem aber konnten Pep-

¹⁾ Fr. Kutscher und J. Seemann, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 437 (1902).

²⁾ A. Kossel (und H. Pringle), Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 318 (1906).

tone und verwandte Körper sich finden. Um das zu entscheiden, wurde es von Silber und Baryt befreit, eingeengt und mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung¹⁾ gefällt. Der Niederschlag konnte durch den Schmelzpunkt als reines Arginin identifiziert werden. In Lösung waren 0,525 g Stickstoff; also sind durch die kombinierte Fermentwirkung 12,0% des Stickstoffs als Arginin abgespalten worden. Dazu müßten wegen der Löslichkeit des phosphorwolframsauren Arginins noch 26 mg Stickstoff hinzugerechnet werden.²⁾ Dann wären es 12,5%. Und diese Abspaltung kann nur durch Fermente hervorgerufen worden sein. Denn ich habe streng darauf gehalten, die erforderlichen Erwärmungen nur bei neutraler Reaktion vorzunehmen; sobald saure oder alkalische Reaktion herrschte, habe ich Erwärmung vermieden.

Genau so wie hier geschildert, wurde die bei der Säureabspaltung erhaltene Lösung nach Entfernung der Schwefelsäure behandelt. Auf den Ammoniak- und Huminstickstoff kamen 4,2%. Die Argininfraktion enthielt 0,138 g N, was unter sinngemäßer Berücksichtigung der für die Bestimmungen entnommenen Mengen 12,5% ergibt. Bringt man die Korrektur für die Löslichkeit des phosphorwolframsauren Arginins an, so erhält man 13,0%.

Die Übereinstimmung ist eine vollkommene: es wird also durch die aufeinanderfolgende Wirkung der Verdauungsfermente aus den Eiweißkörpern des Fleisches ebensoviel Arginin abgespalten, wie durch die Säurespaltung. Ich füge hinzu, daß ich in der verdauten Lösung auch sonst nirgends etwas von einem Peptid gesehen habe. Ich habe das Filtrat von dem Phosphorwolframsäureniederschlag von der Schwefelsäure befreit, es stark eingeengt, wobei es zu einem Krystallbrei erstarrte, und ich habe nun in schwefelsäurefreier Lösung nochmals mit Phosphorwolframsäure gefällt. Es fielen auch 0,075 g Stickstoff, die offensichtlich aus den Phosphorwolframaten von Monoaminosäuren und Basen bestehen.

¹⁾ H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 219 (1902).

²⁾ W. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 196 (1899).

Daß sich andere Eiweißkörper ebenso verhalten, ist wohl sicher: gehört doch der Leim zu den schwerstverdaulichen Eiweißkörpern. Nicht in die Untersuchung einbezogen habe ich die Anteile des Fleisches, die ungelöst den Pylorus passieren. Über das Geschehen im lebenden Körper werde ich, nach Vollendung einiger Experimente, nächstens weiteres mitteilen. Ich glaube aber durch die vorliegende Untersuchung gezeigt zu haben, daß die Möglichkeiten einer kompletten Eiweißspaltung im Darmkanal jedenfalls gegeben sind, daß die Hinzufügung des Erepsins zu den anderen Fermenten die Vollständigkeit der Eiweißspaltung bewirkt.