

Untersuchungen über die Bildung des Lachsprotamins.

Von
Dr. phil. F. Weiss.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Mai 1907.)

Seitdem die Verschiedenheiten in der Zusammensetzung der Eiweißkörper mehr und mehr bekannt geworden sind und seitdem man zuverlässige Methoden zur quantitativen Bestimmung einzelner Eiweißbausteine gefunden hat, sind den Stoffwechseluntersuchungen neue Ziele und Wege gewiesen. Während man früher das Eiweiß als Ganzes betrachtete, wird man jetzt vorwiegend bestrebt sein, das Schicksal der einzelnen, im Eiweiß verketteten und das Eiweiß bildenden Atomgruppen im Organismus zu untersuchen.

Eine solche Betrachtungsweise ist den früheren von Wakemann¹⁾ im hiesigen Institut ausgeführten Untersuchungen zugrunde gelegt worden und ist in gleicher Weise auch für meine Arbeiten maßgebend gewesen.

Wenn man die von Miescher²⁾ vor längerer Zeit untersuchten Vorgänge bei der Reifung der Testikeln im Licht der neueren Arbeiten über die komplexen und einfachen Eiweißkörper betrachtet, so ergeben sich Gesichtspunkte von allgemein biologischem Interesse, welche neuerdings von A. Kossel³⁾ erörtert worden sind. Es findet eine Umlagerung der Eiweißkörper im Organismus des Fisches statt, indem gleichzeitig ein Teil des typischen argininärmeren Eiweißes der Mus-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 335.

Berliner klin. Wochenschrift, 1904, Nr. 41.

²⁾ Die histochemischen u. physiologischen Arbeiten von F. Miescher Bd. II, S. 116.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 347.

keln schwindet und das argininreiche Spermprotein, das «Salmin», abgelagert wird.

Die einfachste Erklärung dieses Vorganges ist folgende: das Muskeleiweiß wird teilweise zersetzt, indem der Monoamidosäureanteil und ebenso die Lysingruppe größtenteils zerstört wird, während das Arginin erhalten bleibt. Letzteres bildet mit einer geringen Menge Monoamidosäuren das Salmin. Diese Auffassung ist nur dann möglich, wenn aus dem zerstörten Muskeleiweiß soviel Arginin hervorgehen kann, wie in dem neu gebildeten Protamin enthalten ist. Da keine Analysen der Eiweißkörper des Lachs fleisches vorlagen, zog A. Kossel eine von ihm selbst ausgeführte Analyse des Eiweißes aus dem Kaninchenmuskel zum Vergleich heran. Legt man diese Zahl der Berechnung zugrunde, so ergibt sich in der Tat, daß die Menge des im Stoffwechsel des Fisches zersetzten Muskeleiweißes genügt, um den Argininbedarf der wachsenden Testikel zu decken. Immerhin konnte dieser Nachweis noch nicht als ein endgültiger angesehen werden, solange die Untersuchungen nicht am Lachs fleische selbst ausgeführt waren. Ich habe diese Lücke auszufüllen gesucht, indem ich einerseits den ganzen Argininvorrat der Muskelsubstanz eines den Rhein aufwärts wandernden Lachses und zwar eines «Jakobssalmen», feststellte, andererseits den Prozentgehalt des Muskeleiweißes an Arginin bestimmte.

Auf diese Weise wurde eine sichere Grundlage für die von A. Kossel vorläufig gemachten Berechnungen gewonnen, welche dessen Schlußfolgerungen vollauf bestätigten.

Gleichzeitig mit den Bestimmungen des Arginins wurden solche des Histidins und Lysins ausgeführt.

Methode der Spaltung.

Die bei folgenden Spaltungen angewandte Untersuchungsmethode ist diejenige, die Kossel und Kutscher in ihrer Abhandlung «Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper», Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165 beschrieben haben. Sie besteht aus folgenden Operationen:

I. Zersetzung der Eiweißkörper durch Kochen mit Schwefelsäure.

II. Entfernung der Schwefelsäure gleichzeitig mit dem bei der Zersetzung gebildeten Huminstickstoff durch Baryt; Bestimmung des Huminstickstoffs; Bestimmung und Entfernung des Ammoniaks.

III. Fällung des Histidins und Arginins als Silberverbindungen.

IV. Quantitative Bestimmung des Histidins.

V. Quantitative Bestimmung des Arginins.

VI. Quantitative Bestimmung des Lysins.

Da diese Bestimmungen in ihrer Ausführung im Laufe der Zeit eine Reihe kleiner Änderungen und Verbesserungen (Trennung des Histidins und Arginins als Silberverbindungen durch Baryumcarbonat,¹⁾ Wägung der Pikrolonate des Arginins und Histidins²⁾) erfahren haben, halte ich es für zweckmäßig, in folgendem nochmals eine ausführliche Beschreibung des Analysengangs zu geben, wie er jetzt im hiesigen Laboratorium gewöhnlich ausgeführt wird.

I. Zersetzung der Eiweißkörper mittels Schwefelsäure.

Das zu untersuchende Eiweiß wird mit einer Mischung der dreifachen Menge seines Gewichts konzentrierter Schwefelsäure und der sechsfachen Menge seines Gewichts Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Spaltungsflüssigkeit wird mit Wasser verdünnt, filtriert, zum Liter aufgefüllt und zur Feststellung des Gesamtstickstoffs in 10 ccm derselben der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

II. Entfernung der Schwefelsäure und des Huminstickstoffs. Bestimmung des Ammoniaks.

Die unter I gewonnene schwefelsaure Lösung wird zum Sieden erhitzt und zwecks Abstumpfung der zur Spaltung in Verwendung gebrachten Schwefelsäure nach und nach bis zur schwach sauren Reaktion mit einer kochend heißen konzentrierten Ätzbarytlösung versetzt. Der entstandene Niederschlag

¹⁾ A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 318.

²⁾ H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 219; Bd. XLIV, S. 157.

von schwefelsaurem Baryt, von dem auch stickstoffhaltige Körper, die sog. Huminstoffe, mit niedergerissen und festgehalten werden, wird abgesaugt, dreimal mit Wasser ausgekocht, dreimal abgenutscht und solange mit kochendem Wasser ausgewaschen, bis die abtropfende Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure keine Fällung mehr gibt.

Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und durch Eindampfen auf 1 l gebracht. Alsdann wird in 10 ccm der Flüssigkeit nach Kjeldahl der Stickstoff bestimmt. Zieht man die so gefundene Stickstoffmenge von dem Gesamtstickstoff ab, so erhält man den im Barytniederschlag zurückgebliebenen «Huminstickstoff I».

Die gesamte Flüssigkeit versetzt man nun mit verdünnter Ätzbarytlösung bis zur eben neutralen Reaktion, dann mit ungefähr 5 g Baryumcarbonat, das zuvor in der Reibschale fein zerrieben und mit Wasser zu einem dünnen Brei aufgeschwemmt war.

Das bei der Spaltung gebildete Ammoniak wird beim Erhitzen der Flüssigkeit dadurch in Freiheit gesetzt und kann durch Destillation mit Wasserdampf übergetrieben und durch Auffangen in Normalsäure zur Titration gebracht werden.

Die auf diese Weise behandelte Flüssigkeit wird filtriert, das auf dem Filter bleibende Gemisch von Baryumcarbonat und -sulfat dreimal mit Wasser ausgekocht und mit heißem Wasser nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt, mit Schwefelsäure angesäuert, stark eingedampft, nötigenfalls nochmals filtriert und zum Liter aufgefüllt. In 10 ccm der Flüssigkeit wird dann der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Aus dieser Bestimmung erfährt man unter Berücksichtigung des gefundenen Ammoniaks die Menge des im alkalischen Barytniederschlag verbliebenen «Huminstickstoff II».

III. Fällung von Histidin und Arginin als Silberverbindungen.

Die unter II erhaltene schwefelsaure Flüssigkeit wird in einen geräumigen Kolben gebracht und kalt mit kochend heißer Silbersulfatlösung versetzt. Das Hinzufügen dieser Lösung geschieht allmählich unter zeitweisem kräftigem Umschwenken

solange, bis die Menge des zugesetzten Silbers ausreicht. Wann letzteres der Fall ist, kann, wie folgt, ermittelt werden. In ein Uhrglas auf schwarzer Unterlage gibt man Barytwasser. Wird durch einen mittels Glasstab zugefügten Tropfen obiger Flüssigkeit im Barytwasser ein rein weißer oder hellgelber Niederschlag erzeugt, so genügt die Menge des zugesetzten Silbersulfats nicht. Diese reicht aus, wenn durch die Tropfenprobe im Barytwasser ein braungelber Niederschlag entsteht.

Trifft dies zu, so kühlt man die Flüssigkeit gut ab, sättigt sie mit gepulvertem Ätzbaryt, d. h. man fügt solange von dieser Substanz zu, bis diese auch nach längerem Umschwenken ungelöst am Boden des Gefäßes liegen bleibt, läßt den entstandenen Niederschlag absitzen und nutschts ihn alsdann ab. Dann reibt man denselben samt Filter in einer Reibschale unter Zuhilfenahme von mittels Säure gereinigtem Seesand mit Barytwasser bestens an, saugt ihn nochmals ab, wäscht ihn mit barythaltigem Wasser gründlich aus und schwemmt ihn schließlich samt Filter in schwefelsäurehaltigem Wasser bis zur sauren Reaktion auf.

Der Niederschlag wird nach IV und V, die abgenutschte Flüssigkeit nach VI behandelt.

IV. Bestimmung des Histidins.

Der in III erhaltene, mit schwefelsäurehaltigem Wasser unter Zuhilfenahme von Sand fein zerriebene und aufgeschwemmte Niederschlag wird mittels Schwefelwasserstoff zerlegt; die Flüssigkeit wird nach beendetem Einleiten zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs gekocht, der Schwefelsilber und Baryumsulfat enthaltende Niederschlag abgenutschts, wiederholt ausgekocht und bis zum Ausbleiben der Phosphorwolframsäurereaktion sorgfältig heiß gewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und durch Eindampfen auf 1 l gebracht. Alsdann wird in 20 ccm nach Kjeldahl die Menge des Stickstoffs der durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen bestimmt.

Die Flüssigkeit wird nun mit Barytwasser genau neutralisiert, gelöstes Baryumnitrat zugesetzt, solange noch die Entstehung eines Niederschlags zu beobachten ist, filtriert und

der Niederschlag bestens ausgewaschen. Das Filtrat wird durch Eindampfen auf 300 ccm gebracht und in einem Kochkolben nach Ansäuern mit Salpetersäure mit einem kleinen Überschuß, d. h. solange mit einer konzentrierten Lösung von Silbernitrat versetzt, bis eine Tropfenprobe in Barytwasser einen braungelben Niederschlag erzeugt.

Ist dies erreicht, so wird mit Barytwasser nochmals schwach sauer oder eben neutral gemacht, aufgeschwemmtes Baryumcarbonat zugesetzt, die Flüssigkeit zunächst im Wasserbad angewärmt, dann auf dem Drahtnetz zum einmaligen Aufkochen erhitzt und zum Absetzen und Erkalten beiseite gestellt.

Der Histidinsilber haltende Niederschlag wird nun abfiltriert und kalt mit schwach barythaltigem Wasser (5—6 Tropfen einer 5%igen Ätzbarytlösung auf 100 ccm Wasser) bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion sorgfältig ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und zur Argininbestimmung reserviert.

Der argininfreie Niederschlag wird im Kolben mit schwefelsäurehaltigem Wasser zur sauern Reaktion erhitzt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Flüssigkeit zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs gekocht, das Schwefelsilber abfiltriert, wiederholt ausgekocht und mit siedendem Wasser bis zum Verschwinden der Phosphorwolframsäurereaktion völlig erschöpft. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und durch Eindampfen auf 250 ccm gebracht; alsdann wird in 25—50 ccm der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Aus dem durch diese Bestimmung gefundenen N-Werte wird das Histidin berechnet.

Der Rest der Flüssigkeit wird mittels Ätzbaryt heiß von der überschüssigen Schwefelsäure, durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, eingedampft und vom abgeschiedenen Baryumcarbonat und -sulfat abfiltriert. Filtrat und Waschwasser des wiederholt heiß gewaschenen Niederschlags werden vereinigt, nochmals eingedampft, nötigenfalls durch wenige Tropfen verdünnter Schwefelsäure von den letzten Spuren Baryt befreit und auf etwa 10 ccm gebracht.

Diese Flüssigkeit dient zur genaueren Bestimmung des Histidins in Form des gut krystallisierenden und schwerlös-

lichen, von Steudel¹⁾ zuerst beschriebenen Pikrolonats. Nach Maßgabe der vorher ausgeführten Kjeldahlbestimmung kann man die Menge der zur Ausfällung erforderlichen Pikrolonsäure berechnen. Man fügt einen geringen Überschuß der in wenig heißem Alkohol gelösten Pikrolonsäure hinzu, saugt das entstandene Pikrolonat nach drei Tagen ab, wäscht es mit wenig Wasser aus, trocknet bei 100° und bringt es zur Wägung. Das Histidin ist nach der Formel $C_{10}H_8N_4O_5 \cdot C_6H_9N_3O_2$ aus dem Pikrolonat zu berechnen.

V. Bestimmung des Arginins.

Zu der vom Histidinsilber abfiltrierten Flüssigkeit gibt man bis zur völligen Sättigung gepulverten Ätzbaryt, saugt den entstandenen Niederschlag ab, reibt diesen unter Zuhilfenahme von Seesand samt Filter nochmals mit Barytwasser gut an und wäscht ihn damit bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion völlig aus. Dann wird der Niederschlag mit schwefelsäurehaltigem Wasser zur sauren Reaktion angerieben und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Flüssigkeit wird alsdann zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs gekocht, das Schwefelsilber abfiltriert, wiederholt ausgekocht und mit siedendem Wasser völlig erschöpft. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt, durch Eindampfen auf 500 ccm gebracht und in 25—50 ccm der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Aus dem gefundenen Stickstoffwerte wird das Arginin berechnet. Der Rest wird mittels Baryumhydroxyd heiß von der überschüssigen Schwefelsäure, durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, eingedampft, vom abgeschiedenen Baryt abfiltriert, das Filtrat mit dem Waschwasser des wiederholt heiß gewaschenen Niederschlags nochmals eingedampft, nötigenfalls mit wenigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure von den letzten Spuren Baryt befreit und auf 10 ccm gebracht. — In dieser eingeeengten Lösung wird das Arginin nach dem von Steudel²⁾ angegebenen Verfahren mittels der berechneten Menge Pikrolonsäure, die zuvor in wenig heißem Alkohol gelöst ist, gefällt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 219; Bd. XLIV, S. 157.

²⁾ l. c.

Die abgeschiedenen schwefelgelben Nadeln werden nach Ablauf einiger Tage auf dem Filter gesammelt, zunächst wiederholt mit der Mutterlauge, dann mit wenig Wasser gewaschen, bei 110° getrocknet und gewogen. Die Löslichkeit dieses Pikrolonats in Wasser ist sehr gering und beträgt nach Steudel 1 in 1124. Hieraus läßt sich der in der Mutterlauge verbliebene Rest des Pikrolonats leicht berechnen. Ebenso kann man die Reinheit des Pikrolonats durch die Schmelzpunktbestimmung¹⁾ leicht prüfen.

Diese gewichtsanalytische Methode gibt, verglichen mit den bei der Kjeldahlbestimmung gefundenen Werten, beim Arginin sehr gute, beim Histidin zufriedenstellende Resultate.

VI. Bestimmung des Lysins.

Das Filtrat von dem in III erhaltenen Niederschlage säuert man zur Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure an und befreit es durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Silber; dann kocht man den Schwefelsilber enthaltenden Barytniederschlag mehrmals aus und wäscht ihn mit siedendem Wasser gründlich nach. Filtrat und Waschwasser werden auf 500 ccm gebracht; dann versetzt man die Flüssigkeit, nachdem ihr Stickstoffgehalt zur Kontrolle, ob der Barytniederschlag völlig erschöpft ist, festgestellt wurde, mit Schwefelsäure bis zu 4 Volumprozent, fällt unter Vermeidung eines größeren Überschusses mit Phosphorwolframsäure, d. h. fügt solange von einer Lösung dieser Substanz zu, bis die vom gebildeten Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit auf weiteren Zusatz von Phosphorwolframsäure 10 Sekunden klar bleibt, und untersucht den Phosphorwolframsäureniederschlag auf seinen Lysin-gehalt nach der von Kossel und Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165 gegebenen Vorschrift.

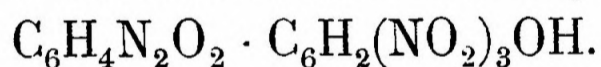
Dieses Verfahren sei hier nochmals kurz wiedergegeben: Nach 24stündigem Stehen wird der Phosphorwolframsäureniederschlag abgesaugt, vom Filter genommen, in der Reibschale mit 4volumprozentiger Schwefelsäure angerieben und mit dieser sorgfältig gewaschen. Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und auf ein bestimmtes Volumen gebracht; in dieser Flüssigkeit wird alsdann nach Kjeldahl der Stickstoffgehalt der durch Phosphorwolframsäure nicht gefällten Stoffe festgestellt.

¹⁾ Der Schmelzpunkt wurde in Übereinstimmung mit Steudel bei 225° gefunden.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird nun, nachdem er zuvor mit Wasser zu einem gleichmäßigen Brei angerieben, in kochendes Wasser eingetragen; diese heiße Flüssigkeit wird bis zur stark alkalischen Reaktion mit einer heißen, konzentrierten Ätzbarytlösung versetzt. Das unlösliche Barytsalz wird abgesaugt, mehrmals unter Zusatz von Ätzbaryt ausgekocht und bis zum Ausbleiben der Phosphorwolframsäurereaktion mit heißem Wasser gewaschen. Die alkalischen Filtrate werden sofort durch Einleiten von Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, zunächst auf freiem Feuer eingeengt, filtriert, dann fast zur Trockene eingedampft mit Wasser aufgenommen, vom kohlensauren Baryt abfiltriert und nochmals eingedampft.

Der in seinem Aussehen harzig erscheinende Rückstand wird nun mit einer geringen Menge alkoholischer Pikrinsäurelösung unter Zusatz von Alkohol angerührt. Zu dieser alkoholischen Lösung setzt man am besten in einer weißen Schale nach und nach jeweils in kleinsten Mengen solange eine konzentrierte alkoholische Lösung von Pikrinsäure, als die Bildung eines Niederschlages zu beobachten ist. Das ausgeschiedene Pikrat wird nach 24 Stunden abfiltriert, mit sehr wenig absolutem Alkohol gewaschen, in siedendem Wasser gelöst, die Lösung nötigenfalls filtriert und durch Eindampfen auf ein kleines Volumen gebracht. Beim Erkalten scheidet sich das Lysin-pikrat in nadelförmigen Krystallen ab, die auf gewogenem Filter gesammelt, mit wenig Alkohol gewaschen, getrocknet und gewogen werden.

Aus diesem Pikrat berechnet sich das Lysin nach der Formel



Die Mutterlaugen werden vereinigt, durch Erhitzen vom Alkohol befreit, mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalte von 4 Volumprozent angesäuert und durch Äther von der ausgeschiedenen Pikrinsäure befreit. Hierauf wird die durch Erwärmen ätherfrei gemachte Lösung nochmals mit Phosphorwolframsäure gefällt und der gebildete Niederschlag nach der oben geschilderten Methode auf Lysin verarbeitet.

Dieses Verfahren wird so lange wiederholt, als durch alkoholische Pikrinsäure noch Niederschläge von Lysin-pikrat erzielt werden. Bei vorsichtigem Zusatz von Pikrinsäure in den vorhergegangenen Fällungen, d. h. bei Vermeidung eines wieder lösend wirkenden Überschusses derselben, pflegt die Ausbeute von Lysin-pikrat aus dem dritten Phosphorwolframsäureniederschlag bereits so gering zu sein, daß sie vernachlässigt werden kann. •

Untersuchung des Muskeleiweißes vom Lachs.

600 g Lachsmuskeln wurden rein präpariert, mit Kohlensäure gefroren und mit der Schneidemaschine¹⁾ zerkleinert.

¹⁾ A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 5.

Das erhaltene Muskelpulver (350 g) wurde zweimal je 2 Stunden mit Ringerscher Lösung extrahiert, der Rückstand ausgepreßt und der Preßsaft bei einer 56° nicht übersteigenden Temperatur koaguliert. Es wurden 8 g Eiweiß erhalten, wovon 2,5 g bis 46°, 5,5 g zwischen 46 und 56° koaguliert war.

Von diesem Gemisch wurden 4,365 g in lufttrockenem Zustande entnommen und mit einer Mischung ihrer dreifachen Gewichtsmenge konzentrierter Schwefelsäure und der sechsfachen Gewichtsmenge Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die hierbei entstehende klare, braune Flüssigkeit wurde filtriert und nach der oben angegebenen Methode auf Hexonbasen verarbeitet.

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle I.

Verteilung des Stickstoffs unter den Spaltungsprodukten des Muskeleiweißes vom Lachs.

	Stickstoff in Grammen		Prozente des Gesamt- stickstoffs	
Gesamtstickstoff	0,672		100,00	
A. Basenstickstoff	0,1545		22,99	
a) im Arginin		0,0765		11,38
b) im Histidin		0,0380		5,65
c) im Lysin		0,0399		5,93
B. Stickstoff in unbekannter Form	0,4958		73,78	
a) im Barytniederschlag		0,1002		14,91
b) im Silberniederschlag		0,0418		6,22
c) im Filtrat der Phosphorwolfram- säurefällung		0,3537		52,63

Setzt man für das zur Spaltung gebrachte Muskeleiweiß einen N-Gehalt von 16%, so berechnen sich danach folgende Mengenverhältnisse für die Zersetzungsprodukte desselben:

Tabelle II.

	In Grammen	In Prozenten
Zersetztes Eiweiß	4,200	100
Arginin	0,238	5,666
Histidin	0,140	3,333
Lysin	0,208	4,952

Eine Prüfung des zur Spaltung gekommenen Eiweißes auf Histone ergab die Abwesenheit der letzteren. Wird dasselbe mit Pepsinsalzsäure verdaut, die entstandene Lösung mit Natronlauge neutralisiert, zur Klärung unter Erwärmen filtriert, gekühlt und mit Natriumpikratlösung versetzt, so löst sich der hierbei entstehende schwache Niederschlag leicht in sehr wenig Sodalösung auf.

Spaltung des Muskelfleisches vom Jakobs-Lachs.

250 g durch die Fleischmaschine gegangenen Fleisches (Rückenmuskel) werden mit einem Gemisch von 180 g Schwefelsäure und 180 g Wasser 14 Stunden im Paraffinbad am Rückflußkühler gekocht. Das sich hierbei in reichlichen Mengen abscheidende Öl wird mittels Scheidetrichter von der Spaltungsflüssigkeit getrennt und zusammen mit dem sich bei der Filtration der letzteren ergebenden Rückstand einer Stickstoffbestimmung unterworfen. Der gefundene Stickstoffwert betrug etwa 0,04 % des Gesamtstickstoffes der Spaltungsflüssigkeit, war somit so gering, daß er bei der Analysenberechnung vernachlässigt werden konnte.

Bei der Verarbeitung der Spaltungsflüssigkeit vom Fleisch ist eine kleine Abweichung von dem obigen Analysengange geboten, weil durch die Anwesenheit der sich bei der Fleischspaltung ergebenden reichlichen Menge Silber reduzierender Stoffe eine direkte Fällung der Basen mit Silbersulfat ausgeschlossen oder zum mindesten sehr erschwert ist. Es wurde deshalb nach Entfernung des Huminstickstoffs und des Ammoniaks aus der gesamten, mit 5 volumprozentiger Schwefelsäure angesäuerten Spaltungsflüssigkeit mittels Phosphorwolf-

ramsäure alles Fällbare ausgefällt, der Phosphorwolframsäure-niederschlag mittels Baryumhydroxyd zersetzt und erst das mittelst CO_2 vom überschüssigen Baryt befreite Filtrat nach der Kossel-Kutscherschen Methode weiter verarbeitet. Die Analyse geht auf diese Weise glatt und gut vonstatten. Nur bei der Isolierung des sonst sehr leicht quantitativ erhältlichen Lysins zeigt sich insofern eine kleine Abweichung von den Beobachtungen bei den Analysen der Protamine und des Muskel-eiweißes, als die erste und teilweise auch die zweite Fällung desselben als Pikrat wohl gut gelingt, daß dann aber in der Mutterlauge Schmierbildung eintritt, die die weitere Gewinnung von Lysin verhindert und so einen, wenn auch kleinen Verlust in der Ausbeute desselben zur Folge hat.

Folgende Tabellen geben die Resultate der Muskelfleisch-untersuchung:

Tabelle III.

Verteilung des Stickstoffs unter den Spaltungsprodukten des Muskelfleisches vom Jakobs-Lachs.

	Stickstoff in Grammen		Prozente des Gesamt- stickstoffs	
Gesamtstickstoff	8,75		100	
A. Basenstickstoff	1,9797		22,625	
a) im Arginin		0,7221		8,252
b) im Histidin		0,1412		1,613
c) im Lysin		0,6655		7,606
d) im Ammoniak		0,4508		5,152
B. Stickstoff in unbekannter Form	6,4966		74,246	
a) im Barytniederschlag		1,2544		14,366
b) im Silberniederschlag		0,1402		1,600
c) im Filtrat des Lysinpikrats		0,1964		2,244
d) im Filtrat der Phosphorwolfram- säurefällung		4,9056		56,064

Tabelle IV.

Stickstoff der Basen bezogen auf 100 Teile feuchten Fleisches			Menge der Basen bezogen auf 100 Teile feuchten Fleisches		
im Arginin	im Histidin	im Lysin	Arginin	Histidin	Lysin
0,2888	0,0564	0,2662	0,898	0,208	1,380

Schlußfolgerungen.

Für die Verwertung der analytischen Daten greife ich auf das von A. Kossel angeführte Beispiel¹⁾ zurück. Ein Lachs, dessen Gewicht zur Laichzeit 9 kg beträgt, enthält in seinen Testikeln etwa 27 g Protamin mit 22,8 g Arginin. Da das Muskeleiweiß nach Tabelle II 5,67 % Arginin enthält, so müßten bei einem derartigen männlichen Lachs 402 g Eiweiß während der Periode der Testikelbildung zersetzt werden, um diese Argininmenge zu liefern. Nun berechnet Miescher den Eiweißverlust aus den Muskeln eines weiblichen Lachses vom Endgewicht 8208 g auf 554,6 g. Für einen Fisch vom Endgewicht 9000 g würde hiernach dieser Eiweißverlust auf ca. 600 g zu schätzen sein. Die zersetzte Eiweißmenge würde also genügen, um den Argininbedarf der wachsenden Testikel zu decken, selbst unter der Annahme, daß die Eiweißzersetzung beim männlichen Lachse während des Aufenthalts im Rhein nur $\frac{2}{3}$ der aus den Muskeln des weiblichen Tieres auswandernden Eiweißmenge beträgt.

Aus Tabelle III und IV ist eine Bestätigung dieser Schlußfolgerung zu entnehmen. Nach meinen Analysen am Jakobs-Salm besitzt ein 9600 g schwerer Lachs mit einem Rumpfmuskel von ca. 6762 g (c. f. Miescher, l. c. 139) zur Zeit der Einwanderung in den Rhein in seinem Rumpfmuskelfleisch einen Vorrat von 60 g Arginin (daneben 14,1 g Histidin und 93 g Lysin). Zur Laichzeit wird das Körpergewicht des Tieres annähernd auf 9 kg reduziert sein und nun ist nach obiger Annahme etwa 22,8 g Arginin in Form des Salmis in seinen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 347.

Testikeln vorhanden. Er braucht von dem Argininvorrat des Rumpfmuskels also nur 38% zum Aufbau der Testikel zu entnehmen. Nimmt man an, daß das Arginin annähernd gleichmäßig in den eiweißartigen Bestandteilen des Muskels verteilt ist, daß somit soviel Eiweiß zersetzt wird, wie dieser Argininmenge entspricht, so brauchte das Tier 38% seines Rumpfmuskeleiweißes, um den Argininbedarf der Testikel zu decken. Nun konsumiert aber nach Miescher ein weiblicher Lachs 54,74% des im Rumpfmuskel vorhandenen Eiweißes; also auch diese Betrachtung führt zu dem Schluß, daß die Protaminbildung im Testikel des Lachses sich durch eine Umformung oder «Reduktion» (nicht im chemischen, sondern im biologischen Sinn des Wortes) des Muskeleiweißes erklären läßt.

Herrn Professor Dr. Kossel spreche ich für die Überlassung des Themas, für die Erlaubnis, die Bearbeitung desselben in seinem Laboratorium vornehmen zu dürfen, sowie für die vielen freundlichen Anregungen und Ratschläge meinen verbindlichsten Dank aus.
