

Studien über Leberautolyse.

Von

Emil Abderhalden und **O. Prym** (Bonn).

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1907.)

Bei der Untersuchung des Abbaues von Proteinen durch Pankreassaft¹⁾ hat es sich herausgestellt, daß die einzelnen Aminosäuren nicht gleich rasch und vollständig zur Abspaltung gelangen. Einzelne, wie z. B. Tyrosin und Tryptophan, sind schon nach kurzer Zeit quantitativ in freiem Zustande in der Verdauungsflüssigkeit vorhanden und andere, wie Glutaminsäure, Asparaginsäure, Leucin, Valin, Alanin usw., werden ganz allmählich frei und offenbar nicht vollständig, und wieder andere, wie Prolin, Phenylalanin, sind in der Verdauungsflüssigkeit überhaupt nicht oder doch nur in Spuren nachweisbar. Es interessierte uns, ob bei der Autolyse ein analoger allmählicher Abbau zu verfolgen ist, und ob überhaupt die Aufspaltung der Proteine eine quantitative ist. Um diese Frage zu entscheiden, verglichen wir die bei der Autolyse von Pferdeleber entstehenden Mengen an Monoaminosäuren nach verschieden langer Dauer der Autolyse miteinander und ferner mit den aus derselben Leber durch Hydrolyse mit starker Salzsäure abscheidbaren Mengen an Monoaminosäuren. Zu ihrer Gewinnung verwendeten wir die Estermethode. Sie gibt bekanntlich keine quantitativen Re-

¹⁾ Vgl. Emil Abderhalden und Béla Reinbold, Die Monoaminosäuren des «Edestins» aus Sonnenblumensamen und dessen Verhalten gegen Pankreassaft, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 284, 1905, und Der Abbau des Edestins aus Baumwollsamensamen durch Pankreassaft, Ebenda, Bd. XLVI, S. 159, 1905. — Emil Abderhalden und Carl Vögtlin, Studien über den Abbau des Caseins durch Pankreassaft, Ebenda, Bd. LIII, S. 315, 1907.

sultate, wohl aber, wie wir nach einer großen Erfahrung wissen, vergleichbare Werte, sofern sie ganz gleichmäßig durchgeführt wird. Wir gingen so vor, daß wir Pferdeleber fein zerhackten und dann in zwei oder mehrere Portionen teilten. Die eine wurde zur Autolyse angesetzt, die andere zunächst möglichst auf dem Wasserbade getrocknet, dann mit viel Alkohol ausgekocht und schließlich das wieder getrocknete Produkt im Soxhlet mit Äther solange extrahiert, bis dieser keinen Rückstand mehr hinterließ. Einen Teil der einige Zeit an der Luft ausgebreiteten Substanz behielten wir zur Bestimmung des Wasser-, Asche- und Stickstoffgehaltes zurück, den Rest hydrolysierten wir durch Kochen mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure (spez. Gew. 1,19) am Rückflußkühler. Die Hydrolysenflüssigkeit wurde filtriert, unter vermindertem Druck zum Sirup eingedampft und der Rückstand in der gewohnten Weise mit Alkohol und Salzsäure verestert. Die Veresterung wurde wiederholt und die Ester dann mit der auf den Chlorgehalt berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit gesetzt. Wir destillierten dann die vom ausgeschiedenen Kochsalz abfiltrierte alkoholische Lösung der Ester unter vermindertem Druck und zwar in verschiedenen Fraktionen. Die Destillate übergossen wir mit wässriger Salzsäure und verdampften sie zur Trockene. Die so gewonnenen salzsauren Salze der Aminosäuren trockneten wir über Kalk und Schwefelsäure und bestimmten dann die Ausbeute. Aus den salzsauren Salzen stellten wir durch Kochen mit Bleioxyd die freien Aminosäuren selbst dar. Die einzelnen Aminosäuren haben wir nicht bestimmt. Wir können vorläufig nur die Gesamtausbeuten an Monoaminosäuren in den einzelnen, entsprechenden Fraktionen untereinander vergleichen. In ganz analoger Weise verarbeiteten wir auch die zur Autolyse angesetzten Portionen. Die Autolysenflüssigkeit wurde nach dem Neutralisieren mit Soda unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft und der Rückstand zunächst mit Alkohol und dann mit Äther behandelt. Das entfettete Produkt wurde dann auf dem Wasserbad getrocknet, eine Probe zur Wasser-, Asche- und Stickstoffbestimmung zurückbehalten und der Rest mit Alkohol und Salzsäure verestert. Im übrigen verfahren

wir dann genau so, wie es bei der Hydrolyse mit rauchender Salzsäure eben angedeutet worden ist.

Versuch 1.

Frische Pferdeleber wurde mit Wasser gut abgespült, dann in kleine Stücke zerhackt und diese in fließendem Leitungswasser möglichst vom Blut befreit. Dann wurde das Ganze nach Abfließenlassen des Wassers in der Fleischhackmaschine zu einem Brei zerhackt. Diesen teilten wir in vier gleiche Portionen von je 950 g. Die eine diente, nachdem sie in der oben geschilderten Weise vorbereitet war, zur Hydrolyse mit rauchender Salzsäure und die drei anderen setzten wir mit 2 l Wasser und etwas Toluol zur Autolyse im Brutraum an. Schon am ersten Tag ließ sich eine deutliche Verflüssigung der ganzen Masse nachweisen. Während die filtrierte Autolysenflüssigkeit schon am ersten Tage deutliche Biuretreaktion gab, war diese am dritten Tage bereits nur noch angedeutet und am vierten Tag war sie verschwunden. Mit Ammonsulfat erhielten wir in den ersten 10 Tagen bei Gangesättigung deutliche Fällung.

Am 10. Tage wurde die eine Portion aufgeköcht und in der oben angeführten Weise auf Monoaminosäuren verarbeitet. Die zweite Portion verblieb 30 und die dritte 50 Tage im Brutraum.

Die folgende Übersicht gibt die erhaltenen Resultate wieder. Die Werte beziehen sich auf die freien Aminosäuren, und zwar haben wir ihre Mengen für jede einzelne Fraktion auf den berechneten Eiweißgehalt der angewandten Lebersubstanz ausgerechnet. Diesen bestimmten wir in der Art, daß wir den Stickstoffgehalt der Lebersubstanz für jede einzelne Portion ermittelten und dann durch Multiplikation mit 6,25 den Eiweißgehalt ausrechneten. Diese Berechnung ist allerdings nur eine ganz annähernde. Wir wählten diese Basis, weil wir so die am besten vergleichbaren Werte erhielten. Da die untereinander verglichenen Leberportionen von ein und derselben Leber stammten und der verwandte Leberbrei gut gemischt war, so können wir wohl annehmen, daß der bei der Berechnung des Eiweißes begangene Fehler überall derselbe war. Übrigens handelt es sich, wie die unten stehende Übersicht zeigt, nicht um kleine Unterschiede,

sondern um sehr große. Die einzelnen Fraktionen sind in folgender Weise abgegrenzt worden: Fraktion I bis 100° des Wasserbades bei 12 mm Druck; Fraktion II bis 105° des Ölbad und 0,5 mm Druck und Fraktion III bis 180° des Ölbad und 0,2 mm Druck.

Auf 100 g berechnetes Eiweiß ergeben sich:

| | 1. Hydrolyse mit rauchender Salzsäure g | 2. Autolyse nach 10 Tagen g | 3. Autolyse nach 30 Tagen g | 4. Autolyse nach 50 Tagen g |
|------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Fraktion I | 16,5 | 1,5 | 4,2 | 8,5 |
| » II | 12,0 | 1,75 | 3,1 | 6,2 |
| » III | 16,0 | 1,25 | 6,5 | 5,8 |
| Summa | 44,5 | 4,50 | 13,8 | 20,5 |

Versuch 2.

Verwendet wurde auch hier Pferdeleber. Die Einzelheiten der Durchführung des Versuches waren genau dieselben, wie bei dem vorherigen. Im ganzen wurden je 1000 g Leberbrei verarbeitet und zwar diente eine Portion zur Hydrolyse mit rauchender Salzsäure und drei wurden zur Autolyse angesetzt. Die Berechnung der Ausbeute ist in der gleichen Weise erfolgt, wie oben:

| | 1. Hydrolyse mit rauchender Salzsäure g | 2. Autolyse nach 15 Tagen g | 3. Autolyse nach 30 Tagen g | 4. Autolyse nach 45 Tagen g |
|------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Fraktion I | 18,5 | 0,85 | 3,5 | 8,1 |
| » II | 11,5 | 1,5 | 3,2 | 6,0 |
| » III | 12,5 | 1,5 | 6,1 | 14,0 |
| Summa | 42,5 | 3,85 | 12,8 | 28,1 |

Versuch 3.

Hier haben wir 5 Portionen à 500 g zur Autolyse angesetzt und eine Portion zur Hydrolyse mit rauchender Salzsäure verwendet.

| | 1. Hydro- lyse mit rauchender Salz- säure g | 2. Auto- lyse nach 10 Tagen g | 2. Auto- lyse nach 20 Tagen g | 3. Auto- lyse nach 30 Tagen g | 4. Auto- lyse nach 40 Tagen g | 5. Auto- lyse nach 50 Tagen g |
|------------|---|---|---|---|---|---|
| Fraktion I | 16,5 | 0,75 | 1,5 | 3,5 | 7,1 | 9,5 |
| » II | 13,5 | 0,50 | 1,2 | 2,8 | 5,0 | 7,1 |
| » III | 15,8 | 0,60 | 2,8 | 3,8 | 8,1 | 12,5 |
| Summa | 45,8 | 1,85 | 5,5 | 10,1 | 20,2 | 29,1 |

Wenn wir den Gang der Autolyse bei den einzelnen Versuchen verfolgen, so ergibt sich ohne weiteres, daß der Abbau der Proteine ein ganz allmählicher ist. Nach dieser Richtung ist es beachtenswert, daß die Biuretreaktion auffallend früh sich nicht mehr nachweisen ließ, obwohl noch die Hauptmasse der Spaltprodukte unzweifelhaft aus komplizierten Produkten besteht. Jedenfalls wird man bei der Beurteilung des Eiweißabbaus durch Autolyse niemals sich auf den Ausfall der Biuretreaktion verlassen dürfen, auch darf nicht aus dem Auftreten einzelner Aminosäuren ein Urteil über den Umfang der Hydrolyse gefällt werden. Auch hier wird erst eine eingehende Analyse der vorhandenen Abbauprodukte ein entscheidendes Urteil gestatten. Wir können uns nicht darüber äußern, wie viel kompliziertere Produkte am 50. Tage der Autolyse noch vorhanden waren. Aus zwei Gründen vor allem ist eine direkte Vergleichung der bei der Autolyse gefundenen Aminosäuremengen mit den bei der Hydrolyse mit starker Salzsäure isolierten nicht statthaft. Einmal wäre es möglich, daß bei der Autolyse Prolin entstände. Dieses würde dann beim Auskochen der eingedampften Autolysenflüssigkeit mit Alkohol in Lösung gehen. Wir haben den alkoholischen Auszug bei den 3 der Autolyse unterworfenen Portionen des Versuches II jeweilen eingedampft und den Rückstand in

gewohnter Weise verestert, die Ester in Freiheit gesetzt und destilliert. Es zeigte sich, daß stets ganz geringe Mengen von Aminosäuren und zwar auch von Leucin etc. vorhanden waren. Prolin konnten wir mit Sicherheit nicht nachweisen. Wir werden diese Versuche wiederholen. Jedenfalls sind auf diese Weise offenbar keine erheblichen Mengen von Aminosäuren dem Nachweis entgangen. Bei einer Vergleichen der bei der Autolyse gefundenen Werte mit den bei der Säurehydrolyse isolierten muß ferner in Betracht gezogen werden, daß bei der Autolyse vielleicht Eiweißabbauprodukte sekundär verändert werden. Die bei der Autolyse auftretende große Ammoniakbildung ist zum Teil vielleicht nach dieser Richtung zu deuten. Wir wollen mit diesen Bemerkungen nur auf die Schwierigkeiten, die einer Vergleichen der bei der Autolyse gefundenen Monoaminosäuremengen mit den entsprechenden Werten der bei der Säurehydrolyse erhaltenen entgegenstehen, hinweisen. Klar und eindeutig ist vorläufig nur das Resultat, daß unter den gewählten Bedingungen der Eiweißabbau bei der Autolyse ziemlich langsam vor sich geht und selbst nach 50 Tagen offenbar noch ein nicht unbedeutlicher Teil der Abbauprodukte in komplizierteren Bindungen vorhanden ist. Weitere Untersuchungen müssen über deren Natur Aufklärung bringen und vor allen Dingen wird es unsere Aufgabe sein, nachzuweisen, ob der Abbau der Proteine bei der Autolyse auch qualitativ der Hydrolyse durch Pankreassaft ähnelt, d. h. ob auch hier ein Unterschied in der Raschheit der Abspaltung der einzelnen Aminosäuren sich findet. Ganz besonderen Wert müssen wir auf die Verfolgung des Verhaltens von Glykokoll, Prolin und Phenylalanin legen. Es wäre von großem Interesse, wenn auch beim autolytischen Eiweißabbau eine resistenter Gruppe sich nachweisen ließe, wie dies bei der Verfolgung des Abbaus vieler Proteine durch Pankreassaft der Fall war.¹⁾

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 81, 1903. — Über die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure und Pankreasfermente, Ebenda, Bd. XL, S. 215, 1903.