

Die Eiweißsynthese im tierischen Organismus.

Von

V. Henriques.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Königlichen tierärztlichen und landwirtschaftlichen Hochschule in Kopenhagen.)

(Der Redaktion zugegangen am 9. Januar 1908.)

Die Frage, ob der tierische Organismus instande ist, aus total abgebautem Eiweiß Eiweißstoff aufzubauen, ist der Gegenstand mehrerer Untersuchungen gewesen.¹⁾ Das Resultat, zu dem man hierdurch gelangte, ist in Kürze folgendes: Eiweißstoffe, die durch Kochen mit Mineralsäuren gespalten sind, vermögen nicht das Stickstoffgleichgewicht im tierischen Organismus herzustellen, können indes doch — wenngleich in geringem Grade — albuminstoffersparend wirken; dagegen vermögen Albuminstoffe, die durch eine Einwirkung von Trypsin + Erepsin gespalten sind, den Körper vor Stickstoffverlust zu schützen.

Während man davon ausgehen kann, daß die Hydrolyse der Proteinstoffe mit Hilfe von Mineralsäuren eine vollständige ist, stellt sich die Sache etwas anders, was die durch Fermente hervorgerufene Hydrolyse betrifft. Daß das Trypsin allein nicht instande ist, die völlige Spaltung der Proteinstoffe zu bewirken, daß der Vorgang im Gegenteil in einem früheren Zeitpunkt ins Stocken gerät, sodaß ein Rückstand von einer größeren oder geringeren Menge Polypeptiden entsteht, ist ganz sicher; selbst wenn man aber nach Abschluß der Trypsineinwirkung Erepsin zusetzt, hat man bisher doch nicht bestimmt behaupten können, daß die Spaltung eine vollständige gewesen sei. Auf zweifache Weise hat man die Frage zu lösen gesucht. Das eine Ver-

¹⁾ Siehe u. a. V. Henriques und C. Hansen, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII und XLIX, und E. Abderhalden und P. Rona, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, XLVII und LII.

fahren wurde von O. Cohnheim benutzt.¹⁾ Er fütterte einen Hund mit einer Duodenalfistel mit Fleisch; die der Fistel entströmende Menge Flüssigkeit teilte er in zwei Teile. Die eine Portion wurde 12 Stunden lang mit 33%iger H_2SO_4 gekocht, die andere stand 22 Stunden lang mit Erepsinlösung im Thermostaten digeriert. In beiden Portionen bestimmte Cohnheim die gebildete Argininmenge und fand nun völlige Übereinstimmung der Argininmenge der mit Säure behandelten Portion mit derjenigen der durch Erepsin verdauten. Hieraus schließt Cohnheim, daß Pepsinverdauung + 22stündige Einwirkung des Erepsins instande sei, eine vollständige Hydrolyse hervorzurufen.

Das andere Verfahren benutzten Abderhalden und Rona.²⁾ Der Proteinstoff (z. B. Fleisch) wurde zunächst 14 Tage unter Toluol bei 37° der Autolyse überlassen, dann wurde Pankreassaft zugesetzt und schließlich nach 4 Wochen noch Darmsaft. Die ganze Verdauung dauerte 3 Monate. Ein Teil der Verdauungsprodukte wurde darauf nach Fällung mit Phosphorwolframsäure auf Monoaminosäuren untersucht und die gefundenen Werte wurden mit denjenigen verglichen, die man bei vollständiger Hydrolyse von Fleisch mit rauchender Salzsäure erhält. Es ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung. Ferner wurde auch der Phosphorwolframsäurebodensatz näher untersucht und dessen einzelne Bestandteile isoliert. Die Verfasser ziehen aus ihren Untersuchungen den Schluß, daß die durch Trypsin + Erepsin hervorgerufene Hydrolyse praktisch gesehen, als vollständig zu betrachten sei.

Es ist klar, daß die hier genannten Verfahrensarten sehr beträchtliche Arbeit erfordern müssen; so führen Abderhalden und Rona an, daß die obengenannten Untersuchungen sich über 4—6 Wochen erstreckten; wenn hierzu kommt, daß es noch gar nicht bewiesen ist, daß die besprochenen Methoden brauchbar sind, um zu entscheiden, ob die Hydrolyse vollständig ist oder nicht, so ist es als ein sehr wichtiger Fort-

¹⁾ O. Cohnheim, Zur Spaltung des Nahrungseiweißes im Darm, II., Diese Zeitschrift, Bd. LI.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LII und LIV.

schrift zu betrachten, daß es S. P. L. Sørensen¹⁾ gelungen ist, eine bequeme und schnelle Methode zur Bestimmung des Grades der Hydrolyse auszuarbeiten. Was die näheren Verhältnisse dieser Methode betrifft, muß ich auf Sørensens unten genannte Abhandlung verweisen. Um eine Darstellung des Verfahrens zu geben, das ich bei den von mir ausgeführten Messungen anwandte, werde ich hier eine Auseinandersetzung wiedergeben, die Prof. Sørensen mir freundlichst anläßlich zweier Bestimmungen zustellte, welche er für mich ausgeführt hat. Zugleich benutze ich die Gelegenheit, um auch hier an diesem Orte dem Prof. Sørensen meinen besten Dank für die mir stets so bereitwillig geleistete Hilfe abzustatten.

Von Professor Henriques lagen zwei Präparate Aminosäuren vor:

A, die Etikette gezeichnet: Pankreas-Erepsin verdaut 6 Stunden mit 20%haltiger Schwefelsäure im Wasserbad.

B, die Etikette gezeichnet: Pankreas-Erepsin verdaut 17 Stunden mit 25%haltiger Schwefelsäure im Wasserbad.

Die Untersuchung sollte entscheiden, ob die Hydrolyse der beiden vorliegenden Präparate mittels der Erwärmung mit der verdünnten Schwefelsäure völlig vollzogen sei, oder ob noch Peptidbindungen rückständig seien, die sich durch Eindampfung mit konzentrierter Salzsäure lösen ließen. Unter der Voraussetzung, daß die völlig hydrolysierten Spaltungsprodukte sich nicht bei Eindampfung mit Salzsäure verändern, wird eine solche Behandlung außer einer Lösung möglicherweise vorhandener Peptidbindungen nur eine Änderung des Salzsäuregehalts der Flüssigkeit zur Folge haben, und die Frage läßt sich deshalb mittels einer Formoltitrierung und einer Chlorbestimmung für Lösungen der vorgelegten Stoffe vor und nach der Eindampfung mit konzentrierter Salzsäure beantworten.

Beide Proben wurden auf gleiche Weise behandelt. 5 g wurden in 120 ccm $\frac{n}{10}$ -Salzsäure gelöst und die Lösung 1 Stunde im Wasserbade erwärmt, um möglicherweise vorhandene Kohlensäure zu entfernen; da sich in den Präparaten ein wenig Schwefelsäure vorfand, wurden

¹⁾ S. P. L. Sørensen, Enzymstudien, Biochem. Zeitschrift, Bd VII.

2 ccm 2-n-Baryumchloridlösung zugesetzt, worauf die Lösung filtriert und bis auf gewöhnliche Temperatur abgekühlt wurde; entnommene Proben zeigten nun Überschuß von Baryumchlorid.

Mit der Lösung aus A wurden zwei 50 ccm-Meßkolben A_1 und A_2 genau bis zum Zeichen gefüllt; in gleicher Weise erhält man B_1 und B_2 .

Zu A_1 und B_1 wurden 3 Tropfen Toluol zugesetzt, worauf man sie gut schüttelte, den Überschuß von Toluol abfiltrierte und sie darauf einstweilen hinstellte.

A_2 und B_2 wurden in Schalen gegossen und die Kolben wurden je mit 50 ccm konzentrierter Salzsäure ausgespült, die man darauf der Hauptportion zusetzte; danach dampfte man im Wasserbade A_2 und B_2 fast bis zum möglichsten ein, kühlte sie ab, übergieß sie mit 50 ccm konzentrierter Salzsäure — wodurch alles gelöst wurde — dampfte wieder möglichst gut ein, löste sie in 50 ccm Wasser und dampfte sie wieder ein wie vorher. Die Rückstände wurden in 25 ccm Wasser gelöst und durch kleine Filter in die 50 ccm-Meßkolben filtriert; die Schalen und die Filter wurden mit 2×10 ccm Wasser ausgewaschen und zuletzt füllte man mit Wasser bis zum Zeichen an, indem stets ausgekochtes, kohlenstoffsaurefreies Wasser zur Anwendung kam.

Nach dem Filtrieren von A_2 war ein schwarzer Rückstand im Filter geblieben, während B_2 keinen sichtbaren Rückstand gegeben hatte; die filtrierten Lösungen waren sehr dunkel. In den beiden Filtraten wurde der Totalstickstoff bestimmt: das Filter aus A_2 enthielt 0,35 mg N, das Filter aus B_2 0,10 mg N.

Es lagen nun also 4 Lösungen, jede von 50 ccm vor:

A_1 : die ursprüngliche Lösung, braungelb von Farbe; 5 ccm enthielten 24,05 mg N.

A_2 : die der Lösung A_1 entsprechende, mit Salzsäure eingedampfte Lösung, tief dunkelbraun; 5 ccm enthielten 24,05 mg N.

B_1 : die ursprüngliche Lösung, braungelb von Farbe; 5 ccm enthielten 26,40 mg N.

B_2 : die der Lösung B_1 entsprechende, mit Salzsäure eingedampfte Lösung, tief dunkelbraun; 5 ccm enthielten 26,60 mg N.

Chlorbestimmungen.

A_1 : 10 ccm verbrauchten 15,20 ccm n_{10} -Silbernitratlösung

A_2 : 10 » » 36,40 » »

Die Differenz des Chlorgehalts (= der Differenz der freien Salzsäure) = 21,20 ccm n_{10} = 10,60 ccm n_5 für 10 ccm Lösung. In der zur Formoltitrierung angewandten Menge (7,5 ccm, siehe unten) beträgt die Differenz der freien Salzsäure also 7,95 ccm n_5 .

B_1 : 10 ccm verbrauchten 15,55 ccm n_{10} -Silbernitratlösung

B_2 : 10 » » 38,20 » »

Die Differenz des Chlorgehalts (= der Differenz der freien Salzsäure) = 22,65 ccm n_{10} = 11,325 ccm n_5 für 10 ccm Lösung. Die

der zur Formoltitrierung angewandten Menge (7,5 ccm, siehe unten) entsprechende Differenz des Gehalts an freier Salzsäure beträgt also 8,49 ccm $n/5$.

Formoltitrierung.¹⁾

Zu 25 ccm jeder der 4 Lösungen wurden 4 ccm 2-n-Baryumchloridlösung und darauf während guten Schüttelns 20 ccm $n/5$ -Silbernitratlösung zugesetzt, und es wurde bis 50,2 ccm verdünnt, worauf man die Lösungen filtrierte und die Filtrate, die jetzt gelb mit schwachbräunlichem Anstrich waren, zur Titrierung anwandte. Die Titrierung wurde mit Phenolphthalein als Indikator ausgeführt und es wurde eine Kontrollösung angewandt, die aus 30 ccm mit 5 Tropfen Tropäolin ó und 20 Tropfen Bismarckbraun gefärbten Wassers bestand. Von den Filtraten wurden zu jeder Titrierung 15 ccm genommen, was 7,5 ccm von A_1 , A_2 , B_1 und B_2 entsprach, und es wurden jedesmal vorher 2,5 ccm $n/1$ -Natriumhydroxydlösung zugesetzt.

A_1 verbrauchte 1,15 ccm $n/5$ -Baryt; vorher zugesetzt 2,5 ccm $n/1$ -Natriumhydroxydlösung = 13,65 ccm $n/5$ im ganzen.

A_2 verbrauchte 8,60 ccm $n/5$ -Baryt; vorher zugesetzt 2,5 ccm $n/1$ -Natriumhydroxydlösung = 21,10 ccm $n/5$ im ganzen. Nach Abzug des oben bestimmten Mehrgehalts an freier Salzsäure (7,95 ccm $n/5$) bekommt man also 13,15 ccm $n/5$.

B_1 verbrauchte 4,05 ccm $n/5$ -Baryt; vorher zugesetzt 2,5 ccm $n/1$ -Natriumhydroxydlösung = 16,55 ccm $n/5$ im ganzen.

B_2 verbrauchte 11,95 ccm $n/5$ -Baryt; vorher zugesetzt 2,5 ccm $n/1$ -Natriumhydroxydlösung = 24,45 ccm $n/5$ im ganzen. Nach Abzug des oben genannten Mehrgehalts an freier Salzsäure (8,49 ccm $n/5$) bekommt man also 15,96 ccm $n/5$.

Das durch Entfärbung mit Silbernitrat vor der Formoltitrierung gefällte und abfiltrierte Silberchlorid wurde 3mal mit einer $n/5$ -Baryumchloridlösung ausgewaschen; im Filter und im Bodensatze wurde der Stickstoff auf einmal bestimmt.

Das Filtrat aus A_1	enthielt	1,00 mg N	(0,83%	des Totalstickstoffes)
» » » A_2	»	2,00 »	(1,66%	» »)
» » » B_1	»	1,30 »	(0,98%	» »)
» » » B_2	»	2,30 »	(1,73%	» »)

Aus diesen Bestimmungen geht hervor, daß durch die Eindampfung mit Salzsäure keine Hydrolyse erfolgt ist, indem die Formoltitrierung (unter erforderlicher Berücksichtigung des Mehrgehalts an Salzsäure) keinen größeren, sondern im Gegenteil einen etwas geringeren Gehalt an Karboxylgruppen in den

¹⁾ Siehe S. P. L. Sörensen und H. Jessen-Hansen, Über die Ausführung der Formoltitrierung in stark farbigen Flüssigkeiten, Biochemische Zeitschrift, Bd. VII, S. 407, 1907.

mit Salzsäure behandelten Proben (A_2 und B_2) als in den ursprünglichen Lösungen (A_1 und B_1) ergeben hat.

A_1 : 13,65 ccm $n/5$ -Baryt	} Differenz 0,5 ccm $n/5$ -Baryt, 1,4 mg N = 3,88% des gesamten Stickstoffgehalts von A_1 oder A_2 entsprechend.
A_2 : 13,15	
B_1 : 16,55	} Differenz 0,59 ccm $n/5$ -Baryt, 1,65 mg N = 4,15% des Stickstoffgehalts von B_1 oder B_2 entsprechend.
B_2 : 15,96	

Wenngleich die gefundenen Differenzen nur klein sind (sie entsprechen nur ca. 4% des gesamten Stickstoffgehalts der betreffenden Flüssigkeiten), glauben wir doch nicht, daß diese Differenzen Zufälligkeiten zu verdanken sind. Sicherlich rühren sie davon her, daß bei der Eindampfung mit Salzsäure nicht nur keine Lösung von Peptidbindungen stattgefunden hat, sondern im Gegenteil eine geringe weitergehende sekundäre Spaltung. Nicht nur deutet die dunklere Farbe von A_2 und B_2 in dieser Richtung, sondern auch die Stickstoffbestimmung für die durch die Entfärbung mit Silbernitrat im Verein mit dem Silberchlorid gefällten dunkelfarbigem Spaltungsprodukte zeigt mit sicheren, wenn auch kleinen Zahlen, daß eine solche sekundäre Spaltung stattgefunden hat. Da hierdurch wahrscheinlich Ammoniak abgespalten wird unter Bildung nichtstickstoffhaltiger Verbindungen, deren einige sich wahrscheinlich während der Eindampfung verflüchtigen können, lassen sich die obengenannten kleinen Differenzen auf sehr natürliche Weise erklären.

Es darf also als bewiesen betrachtet werden, daß bei der Eindampfung mit Salzsäure keine Hydrolyse stattgefunden hat, und hieraus folgt wieder, daß die angewandten Präparate, sowohl A als B völlig hydrolysiert waren.

Ganz in der vom Prof. Sörensen angegebenen Weise wurden die in untenstehender Tabelle angeführten Zahlen gefunden. Was die Genauigkeit der Methode betrifft, so ist es bei einiger Übung möglich, sehr schön übereinstimmende Doppelanalysen zu erhalten; einige der unten gefundenen Zahlen sind die Mittel solcher Doppelbestimmungen. Nr. 29 wurde 3 mal von zwei Personen ausgeführt und ergab: 6,4 — 6,84 — 6,4.

Nr.		Peptidgebun- dener Stick- stoff in ‰ des Gesamt- stickstoffs
1	Witte-Pepton	44,1
2	Witte-Pepton, 8 Tage im Thermostaten mit 30‰ H ₂ SO ₄	24,0
3	Witte-Pepton, 3 Tage mit Pankreatin verdaut, dann 6 Stunden im Wasserbade mit 20‰ H ₂ SO ₄ gekocht .	1,88
4	Witte-Pepton, 6 Stunden im Wasserbade mit 20‰ H ₂ SO ₄ gekocht	16,0
5	Witte-Pepton, 10 Stunden im Wasserbade mit 20‰ H ₂ SO ₄ gekocht	10,7
6	Witte-Pepton, 6 Stunden im Wasserbade mit 30‰ H ₂ SO ₄ gekocht	8,97
7	Spaltungsprodukte von Proteinen durch Selbstver- dauung von Pankreas (Rind) + Darmschleimhaut (Hund), also Trypsin + Erepsin, ca. 5 Monate im Thermostaten	0,59
8	Derselbe Stoff (Nr. 7), 6 Stunden mit 20‰ H ₂ SO ₄ im Wasserbade gekocht	÷ 3,88
9	Derselbe Stoff (Nr. 7), 17 Stunden mit 25‰ H ₂ SO ₄ im Wasserbade gekocht	÷ 4,15
10	Spaltungsprodukte von Proteinen durch Selbstver- dauung von Pankreas (Rind) + Darmschleimhaut (Hund), ca. 1 Jahr im Thermostaten	÷ 3,76
11	Alkoholextrakt aus Spaltungsprodukten von Pro- teinen durch Selbstverdauung von Pankreas (Rind) + Darmschleimhaut (Hund)	11,75
12	Derselbe Stoff wie Nr. 11, 6 Stunden mit 20‰ H ₂ SO ₄ im Wasserbade gekocht	÷ 1,63
13	Witte-Pepton, 9 Tage mit Pankreatin verdaut . . .	20,8
14	Edestin, 8 Tage mit Pankreatin verdaut	20,8
15	Edestin, in den Thermostaten mit Pankreatin gestellt, 6./11. 07. Nach einem Monat 6./12, wurde gefunden .	13,95
16	17./12. wurde Erepsin zugesetzt. 18./12. wurde ge- funden	10,1
17	30./12. wurde gefunden	10,80
	Witte-Pepton, in den Thermostaten mit Pankreatin gestellt, 9./11. 07.	
18	29./11. gab die Titrierung	18,76
19	9./12.	16,22

Fortsetzung.

Nr.		Peptidgebun- dener Stick- stoff in % des Gesamt- stickstoffes
	Dann wurde (9./12.) Erepsinlösung zugesetzt	
20	12./12. wurde gefunden	14,08
	21./12. wieder Erepsinlösung zugesetzt	
21	31./12. wurde gefunden	8,8
	Witte-Pepton wurde 3./12. mit Pankreatin in den Thermostaten gestellt	
22	7./12. wurde gefunden	29,0
23	16./12.	18,75
	17./12. Erepsinlösung zugesetzt	
24	18./12. wurde gefunden	16,65
25	27./12.	15,1
	Witte-Pepton wurde 12./12. mit Pankreatin in den Thermostaten gestellt	
26	16./12. wurde gefunden	21,7
27	20./12.	20,1
	21./12. Erepsin zugesetzt	
28	27./12. wurde gefunden	16,40
	Kalbfleisch + Wasser in den Thermostaten gestellt 26./9. 18./10. wurde Pankreatin zugesetzt. 28./10. und 6./11. wieder Pankreatin zugesetzt. 9./11. nur schwache Biuretreaktion. Erepsinlösung zugesetzt	
29	23./11. wurde gefunden	6,55
	26./11. noch einmal Erepsinlösung zugesetzt	
30	13./12. wurde gefunden	4,57
31	16./12.	3,76
	23./11. wurde Kalbfleisch $\frac{1}{4}$ - Wasser in den Thermo- staten gestellt. 27./11. Pankreatin	
32	11./12. wurde gefunden	18,45
	11./12. wieder Pankreatin zugesetzt	
33	18./12. gefunden	14,82
	18./12. Erepsinlösung	
34	19./12. wurde gefunden	12,9
35	30./12.	8,45

Aus den angeführten Analysen geht erstens hervor, daß die Einwirkung von 20%iger H_2SO_4 auf Witte-Pepton 10 Stunden hindurch (bei 100°) nicht imstande ist, das Pepton völlig zu spalten, indem noch 10,7% peptidgebundener Stickstoff zurückbleiben. Der gewonnene Stoff zeigte auch deutliche Biuret- und Tryptophanreaktion. Die 6stündige Einwirkung von 30%iger H_2SO_4 im siedenden Wasserbade wirkte etwas stärker, indem die Spaltung hier nur 8,97% hinterließ. Biuret- und Tryptophanreaktion fand sich auch hier.

Zweitens sieht man, daß die Trypsinwirkung in keinem Falle weniger als 13,95% ungespalten ließ. Der Übersicht wegen stelle ich hier die verschiedenen Resultate der Trypsinwirkung zusammen.

Es waren noch peptingebunden:

Nach 4 Tagen	29%	des Totalstickstoffes	(Witte-Pepton, Tabelle Nr. 22)	
„ 4	21,7%	„	(„ 26
„ 8	20,1%	„	(„ 27
„ 9	20,8%	„	(„ 13
„ 13	18,75%	„	(„ 23
„ 20	18,76%	„	(„ 18
„ 30	16,22%	„	(„ 19
„ 14	18,45%	„	(Fleisch	„ 32)
„ 21	14,82%	„	(„ 33)
„ 8	20,80%	„	(Edestin	„ 14)
„ 30	13,95%	„	(„ 15)

Obschon diese Zahlen sich nicht direkt miteinander vergleichen lassen, da es sich um verschiedenartige Lösungen handelt, geben sie doch eine Vorstellung von dem Fortschreiten des Prozesses und zeigen u. a., wie lange es dauert, bis die Trypsinwirkung ihren Abschluß erreicht; ob die Wirkung nach Verlauf eines Monats so weit gelangt ist, wie sie überhaupt gelangen kann, läßt sich übrigens nach den angeführten Zahlen nicht entscheiden.

Was endlich drittens die Erepsinwirkung betrifft, so erweist es sich, daß auch diese sehr langsam vorgeht und bei weitem nicht — wie von O. Cohnheim angenommen — in 24 Stunden beendet wird. Betrachten wir z. B. die oben in der Tabelle (Nr. 29, 30 und 31) gefundenen Bestimmungen für

Verdauung von Fleisch, erst mit Pankreatin und darauf mit Erepsin, so sehen wir, daß der Prozeß 33 Tage nach Anfang der Verdauung (und 14 Tage nach dem Zusetzen von Erepsin) nur so weit gelangt ist, daß noch 6,55% des Stickstoffes peptidgebunden sind. Nach furtherem Zusatz von Erepsin zeigt es sich, daß der Prozeß sogar 2 Monate nach Anfang der Verdauung (37 Tage nach der ersten Erepsinzusetzung) noch nicht beendigt ist: um diesen Zeitpunkt findet man ca. 4% Stickstoff peptidgebunden.

Daß Trypsin- | Erepsin wirklich imstande sind, im Verlaufe langer Zeit die Proteinstoffe völlig zu spalten, geht aus den Analysen Nr. 7 und Nr. 10 hervor.

Die langsame Spaltung durch Einwirkung von Erepsin findet man wieder in den Versuchen mit Witte-Pepton. In einem Versuche mit Edestin (Nr. 16 und 17) erweist es sich, daß die Wirkung aufgehört hatte, indem die Spaltung den 18. 12. durch 10,1% und 12 Tage später durch 10,8% ausgedrückt ist.

Daß die angewandten Erepsinlösungen gut wirkten, davon überzeugte ich mich, indem ich eine geringe Menge der Erepsinlösung zu einer Caseinlösung zusetzte und die Mischung sowohl sogleich als auch 20 Stunden später nach dem Stehen im Thermostaten formoltitrierte. (Siehe S. P. L. Sørensen l. c. Tab. S. 92—93.)

Fragt man nun, ob es wirklich jemals gelungen ist, Tiere durch völlig gespaltete Proteinstoffe im Stickstoffgleichgewichte zu erhalten, so bietet die Frage einige Schwierigkeit dar. Daß Loewi,¹⁾ der zu seinen Versuchen nur selbstverdaute Pankreasdrüse benutzte, mit Stoffen arbeitete, die noch etwas von der totalen Spaltung entfernt waren, steht außer allem Zweifel. Was die von C. Hansen und mir ausgeführten Versuche betrifft, so war auch unser ursprünglicher pankreas-erepsinverdauter Stoff bei weitem nicht völlig gespalten; aus der oben angeführten Analyse Nr. 11 geht hervor, daß sogar der mit Alkohol ausgezogene Stoff 11,75% des Stickstoffes als peptidgebunden enthielt.

¹⁾ Loewi, Archiv f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XLVIII, 1902.

Diejenigen Untersucher, die mit der Spaltung wahrscheinlich am weitesten gelangt sind — wie weit, läßt sich nicht sagen — sind Abderhalden und Rona, die durch Einwirkung von Trypsin und später von Erepsin auf Fleisch soweit gelangt sein können, daß sie in dem von ihnen angewandten Präparate nur wenige Prozent Stickstoff in peptidgebundener Form hatten.

Stoffwechselversuche.

Viele der oben analysierten Stoffe wurden zu Fütterungsversuchen angewandt. Ich werde mich aber damit begnügen, einzelne dieser Versuche zu besprechen,¹⁾ um u. a. zu zeigen, daß sich das Stickstoffgleichgewicht auch erzielen läßt, wenn man als einzige Stickstoffquelle Proteinstoffe anwendet, die durch Trypsin + Erepsin vollständig gespalten worden waren und darauf 6 Stunden lang mit 20%iger Schwefelsäure bis 100° erhitzt wurden.

Der im Versuche I angewandte N-haltige Stoff war durch Selbstverdauung von Pankreasdrüse (Rind) gewonnen, wozu Darmschleimhaut (Hund) zugesetzt wurde. Das Gemisch hatte 5 Monate im Thermostaten gestanden und zeigte bei Titrierung nach Sörensen, daß 0,59% N noch peptingebunden waren, die Spaltung war also sozusagen eine vollständige (siehe Nr. 7). Dieser Stoff wurde darauf 6 Stunden mit 20%iger H₂SO₄ im Wasserbade gekocht und zeigte bei der Titrierung ÷ 3,88% peptidgebundenen Stickstoff. Der Versuch legt nun dar, daß das Versuchstier sich nicht nur im N-Gleichgewicht befunden hat, sondern daß es sogar während der 11 Tage, wo es die Nahrung völlig verzehrte, 119,3 mg N (10,8 mg per Tag) im Körper ablagerte, eine Ablagerung, die als ziemlich bedeutend zu betrachten ist.

Versuch I.

Das Futter war vom 30./9. 07 bis 5./10. 07: Fett = 200 g, Cellulose = 30 g, Zucker = 10 g, Stärke = 10 g, Salze = 5 g. Vom 5./10.

¹⁾ Die Versuche wurden an Ratten angestellt; mit Bezug auf die Methodik siehe V. Henriques und C. Hansen, Über Eiweißsynthese im Tierkörper, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII.

bis 17. 10. war das Futter: Pankreas-Erepsin-verdauter Stoff 6 Stunden im Wasserbade mit 20%iger H_2SO_4 gekocht = 15 g. Cellulose = 6 g. Zucker = 5 g, Stärke = 5 g. Fett = 38 g. Salze = 3 g. Prozent-N = 2,38.

	g Ge- wicht	g Futter	mg N aufge- nommen	mg N im Urin	mg N in den Faeces	Total- N	N abgesetzt
30.9.07	124	—	—	—	—	—	—
1/10.	113	0	0	105	—	—	—
2.	113	5	0	86	—	—	—
3.	111	5	0	66	13,6	79,6	÷ 79,6
4.	109	5	0	60	19,1	79,1	÷ 79,1
5.	110	5	119	105	17,2	122,2	÷ 3,2
6.	110	5	119	87	23,0	110,0	+ 9,0
7.	110	5	119	86	13,4	99,4	+ 19,6
8.	110	5	119	83	22,2	105,2	+ 13,8
9.	111	5	119	88	12,3	100,3	+ 18,7
10.	110	5	119	93	25,6	118,6	+ 0,4
11.	111	5	119	96	15,8	111,8	+ 7,2
12.	111	5	119	82	17,0	99,0	+ 20,0
13.	112	5	119	85	20,0	105,0	+ 14,0
14.	111	5	119	98	20,0	118,0	+ 1,0
15.	111	5	119	84	16,2	100,2	+ 18,8
16.	108	1,7	40,5	63	14,2	77,2	÷ 36,7

In dem Versuche II wurde derselbe stickstoffhaltige Stoff angewandt wie im Versuch I. Das Ergebnis ist dasselbe: in 16 Tagen werden 239,1 mg N im Körper abgelagert (mithin 14,9 mg per Tag). Während der beiden letzten Tage wurde als Stickstoffquelle Gliadin benutzt, was die Stickstoffablagerung zum Aufhören bringt; der Körper verliert während der zwei Tage, wo das Tier das Futter frißt, im ganzen 18,9 mg N. Ich werde mich hier nicht näher auf dieses Verhalten einlassen, sondern nur bemerken, daß auch andere Versuche andeuten, daß das Stickstoffgleichgewicht sich wohl kaum (wenigstens sehr schwierig) weder durch Gliadin noch durch Zein erzielen läßt.

Versuch II.

Das Futter war vom 7./11. 07 bis 12./11. 07: Fett = 42 g, Cellulose = 6 g, Zucker = 12 g, Stärke = 15 g, Salze = 3 g. Dann 12./11. bis 28./11. war das Futter: Pankreas-Erepsin-verdauter Stoff, 6 Stunden mit 20%iger H_2SO_4 gekocht = 20 g, Cellulose = 8 g, Zucker = 7 g, Stärke = 6 g, Fett = 50 g, Salze = 4 g, Prozent-N = 2,60. Dann 28./11. bis 30./11. war das Futter: Gliadin = 15 g, Cellulose = 8 g, Zucker = 7 g, Stärke = 7 g, Fett = 60 g, Salze = 3 g, Prozent-N = 2,54.

	g Ge- wicht	g Futter	mg N aufge- nommen	mg N im Urin	mg N in den Faeces	Total- N	N abgesetzt
7./11. 07	150	—	—	—	—	—	—
8.	139	0	0	76	—	—	—
9.	140	5	0	115	—	—	—
10.	137	5	0	31	23,7	54,7	÷ 54,7
11.	136	5	0	38	7,8	45,8	÷ 45,8
12.	139	5,5	143	85	14,7	99,7	+ 43,3
13.	140	5,5	143	80	22,4	102,4	+ 40,6
14.	138	5,5	143	118	16,2	134,2	+ 8,8
15.	142	5,5	143	117	11,0	128,0	+ 15,0
16.	141	5,5	143	151	15,9	166,9	÷ 23,9
17.	144	5,5	143	111	13,6	124,6	+ 18,4
18.	145	5,5	143	72	22,8	94,8	+ 48,2
19.	147	5,5	143	136	11,7	147,7	÷ 4,7
20.	150	5,5	143	70	15,8	85,8	+ 57,2
21.	150	5,5	143	171	21,9	192,9	÷ 49,9
22.	148	5,5	143	90	15,8	105,8	+ 37,2
23.	150	5,5	143	99	17,5	116,5	+ 26,5
24.	150	5,5	143	143	17,4	160,4	÷ 17,4
25.	149	5,5	143	112	25,0	137,0	+ 6,0
26.	150	5,5	143	115	18,9	133,9	+ 9,1
27.	151	5,5	143	101	17,3	118,3	+ 24,7
28.	151	5,5	139,7	126	25,0	151,0	÷ 11,3
29.	152	5,5	139,7	130	17,3	147,3	÷ 7,6

Versuch III.

Vom 13./11. 07 bis 20./11. 07 war das Futter: Fett = 42 g, Cellulose = 6 g, Zucker = 12 g, Stärke = 15 g, Salze = 3 g. — Vom 20./11. 07 bis 25./11. 07 war das Futter: Witte-Pepton, 3 Tage mit Trypsin verdaut, dann 6 Stunden mit 20%iger H_2SO_4 im Wasserbade gekocht = 25 g, Cellulose = 9 g, Zucker = 8 g, Stärke = 8 g, Fett = 60 g, Salze = 5 g, Prozent-N = 3,17.

	g Ge- wicht	g Futter	mg N aufge- nommen	mg N im Urin	mg N in den Faeces	Total- N	N abgesetzt
13./11. 07	167	—	—	—	—	—	—
14.	?	0	0	83	—	—	—
15.	144	0	0	84	—	—	—
16.	145	5,5	0	?	14,6	?	?
17.	144	5,5	0	42	13,5	55,5	÷ 55,5
18.	141	5,5	0	43	20,3	63,3	÷ 63,3
19.	143	5,5	0	34	7,7	41,7	÷ 41,7
20.	143	5,5	174,4	123	15,3	138,3	+ 36,1
21.	145	5,5	174,4	140	20,2	160,2	+ 14,2
22.	145	5,5	174,4	143	27,9	170,9	+ 3,5
23.	146	5,5	174,4	145	16,5	161,5	+ 12,9
24.	146	5,4	171,2	135	15,0	150,0	+ 21,0

In dem Versuche III kam ein Präparat zur Verwendung, welches dadurch hergestellt wurde, daß erst Witte-Pepton 3 Tage lang mit Pankreatin verdaut und die Verdauungsprodukte darauf 6 Stunden hindurch mit 20%iger H_2SO_4 im Wasserbade erhitzt wurden. Die Formoltitrierung ergab, daß der gewonnene Stoff 1,88% N (Nr. 3) enthielt, die sich noch abspalten ließen, d. h. das Witte-Pepton ist fast völlig gespalten worden. Nur 5 Tage fraß das Tier das Futter ganz auf, während dieser 5 Tage setzte es aber beträchtliche Mengen N im Körper ab, nämlich im ganzen 87,7 mg (mithin 17,54 mg per Tag).

Versuch IV.

Das Futter war vom 24./10. 07 bis 29./10. 07: Fett = 42 g, Cellulose = 6 g, Zucker = 12 g, Stärke = 15 g, Salze = 3 g. — Vom 29./10. bis 11./11. war das Futter: Pankreas-Erepsin-verdauter Stoff, 17 Stunden im Wasserbade mit 25%iger H_2SO_4 gekocht = 15 g, Cellulose = 5 g, Zucker = 5 g, Stärke = 5 g, Fett = 38 g, Salze = 3 g, Prozent-N = 2,54.

	g Ge- wicht	g Futter	mg N aufge- nommen	mg N im Urin	mg N in den Faeces	Total- N	N abgesetzt
24./10. 07	118	—	—	—	—	—	—
25.	104	0	0	91	—	—	—
26.	103	4,5	0	64	—	—	—
27.	100	4,5	0	49	10,6	59,6	÷ 59,6
28.	98	4,5	0	55	13,8	68,8	÷ 68,8
29.	99	4,5	114,3	109	15,3	124,3	÷ 10,0
30.	99	4,5	114,3	113	26	139,0	÷ 24,7
31.	99	4,5	114,3	117	32	149,0	÷ 34,7
1. 11.	99	4,5	114,3	111	19	130,0	÷ 15,7
2.	100	5	127	120	35,6	155,6	÷ 28,6
3.	100	5	127	108	40	148,0	÷ 21,0
4.	98	5	127	138	30,1	168,1	÷ 41,1
5.	99	5	127	122	14	136,0	÷ 9,0
6.	99	5	127	112	33,1	145,1	÷ 18,1
7.	99	5	127	111	40	150,0	÷ 23,0
8.	99	5	127	112	29,1	141,1	÷ 14,1
9.	100	5	127	112	34,6	146,6	÷ 19,6
10.	96	2,3	58,4	68	18,4	86,4	÷ 28,0

Dieser Versuch wurde angestellt, um zu erfahren, ob eine längere Einwirkung von 25%iger H_2SO_4 imstande sei, die Fähigkeit der (durch Trypsin-Erepsin) völlig gespaltenen Proteine, das Stickstoffgleichgewicht des Körpers zu erhalten, aufzuheben. Der angewandte stickstoffhaltige Stoff ist derselbe wie der in den Versuchen I und II benutzte, nur dauerte die Erwärmung mit Schwefelsäure nicht 6, sondern 17 Stunden. Die Formoltitrierung ergab : 4,15% noch abspaltbaren Stickstoffs. (Siehe

oben Nr. 9.) Das Resultat ist sehr charakteristisch, indem die lange Behandlung mit Säure die Fähigkeit des Stoffes, das Stickstoffgleichgewicht zuwegezubringen, gänzlich aufgehoben hat. Während der 12 Tage, wo das Futter ganz verzehrt wurde, betrug die gesamte Stickstoffabgabe 256,6 mg, was einem täglichen Verlust von 21,6 mg N entspricht.

Versuch V.

Vom 3./12. 07 bis 7. 12. 07 war das Futter: Fett = 42 g, Cellulose = 6 g, Zucker = 12 g, Stärke = 15 g, Salze = 3 g. — Vom 7. 12. bis 20./12. war das Futter: Alkoholextrakt aus Pankreas-Erepsin-verdaulichem Stoff, 6 Stunden mit 20%igem H_2SO_4 im Wasserbade gekocht = 18 g, Cellulose = 8 g, Zucker = 7 g, Stärke = 6 g, Fett = 50 g, Salze = 1 g. Prozent-N = 2,40.

	g Ge- wicht	g Futter	mg N aufge- nommen	mg N im Urin	mg N in den Faeces	Total- N	N abgesetzt
3/12. 07	170	—	—	—	—	—	—
4.	162	0	0	76	—	—	—
5.	160	6,5	0	72	—	—	—
6.	157	6,5	0	59	17,5	76,5	÷ 76,5
7.	157	6,5	156	105	30,4	135,4	+ 20,6
8.	159	6,5	156	122	37,3	159,3	÷ 3,3
9.	159	6,5	156	137	32,1	169,1	÷ 13,1
10.	160	6,5	156	114	34,4	148,4	+ 7,6
11.	160	6,5	156	144	30,2	174,2	÷ 18,2
12.	162	6,5	156	121	27,5	148,5	+ 7,5
13.	164	6,5	156	120	23,4	143,4	+ 12,6
14.	162	6,5	156	154	36,4	190,4	÷ 34,4
15.	164	6,5	156	96	34,2	130,2	+ 25,8
16.	165	6,5	156	132	33,3	165,3	÷ 9,3
17.	166	6,5	156	125	27,4	152,4	+ 3,6
18.	167	6,5	156	115	25,0	140,0	+ 16,0
19.	167	6,5	156	112	28,3	140,3	+ 15,7

Der im Versuche V angewandte stickstoffhaltige Stoff wurde durch 6stündiges Kochen der in 96° Alkohol löslichen Bestandteile

pankreas-erepsinverdauten Stoffes im Wasserbade mit 20%iger H_2SO_4 hergestellt. Es erwies sich, daß der Stoff völlig gespalten war, indem die Formoltitrierung $\div 1,63\%$ noch polypeptidgebundenen Stickstoffs ergab. (Siehe Tab. Nr. 12.) Das Resultat des Versuches wird, daß das Versuchstier während der 13 Tage, wo es das Futter aufgefressen hat, im Körper im ganzen 31,1 mg N oder 2,4 mg per Tag abgelagert hat.

Aus den hier angeführten Versuchen geht hervor, daß Fütterung mit völlig gespaltenen Albuminstoffen als einzige Stickstoffquelle nicht allein imstande ist, das Stickstoffgleichgewicht im Körper herzustellen, sondern sogar eine reichliche Stickstoffablagerung bewirken kann. Ferner zeigen die Versuche, daß diejenigen Spaltungsprodukte, die durch eine intensive Trypsin + Erepsin-Einwirkung entstehen, die genannten Eigenschaften behalten, selbst wenn sie 6 Stunden lang im siedenden Wasserbade mit 20%iger Schwefelsäure erhitzt werden. Eine 17stündige Erhitzung entzieht aber den Spaltungsprodukten die Fähigkeit, den Körper im Stickstoffgleichgewichte zu erhalten. Was diesen Unterschied bewirkt, ist es noch nicht möglich zu sagen. Doch gibt es einen Umstand, der in dieser Beziehung vielleicht von großer Bedeutung ist, nämlich das Unterbleiben oder Eintreten der Tryptophanreaktion.¹⁾ Untersucht man die Spaltungsprodukte, die imstande sind, das Stickstoffgleichgewicht herzustellen, so zeigen sie sämtlich eine sehr ausgesprochene Reaktion auf Tryptophan, die dagegen in solchen Fällen, wo das N-Gleichgewicht sich nicht zuwegebringen ließ, gänzlich unterbleibt.²⁾ Die schonendste Weise, völlige Hydrolyse von Proteinstoffen hervorzurufen, besteht deshalb gewiß darin, erst mit Trypsin, darauf mit Erepsin zu verdauen und dann schließlich die gebildeten Spaltungsprodukte ca. 6 Stunden lang im Wasserbad mit 20%iger H_2SO_4 zu erwärmen.

¹⁾ Ausgeführt nach Hopkins und Cole, Proceed. Roy. Society, Bd. LXVIII.

²⁾ Über die Bedeutung des Tryptophans siehe Journ. of Physiol. Bd. XXXV, Abhandlung von Willcock und Hopkins.