

Zur Kenntnis der bei der Verdauung des Caseins auftretenden Produkte.

I. Mitteilung.

Von

W. Bissegger und **L. Stegmann.**

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Eidgenössischen Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. Oktober 1908.)

Winterstein¹⁾ hat nachgewiesen, daß in fehlerhaften, sogenannten geblähten Käsen sich zuweilen sekundäre Eiweißzersetzungserzeugnisse (Penta- und Tetramethyldiamin) vorfinden, daß aber im normalen Emmentaler Käse diese Produkte fehlen; dieser Befund ist dann von Bissegger²⁾ bei einer eingehenden Untersuchung eines mit Hilfe von Freudenberg'schen Reinkulturen hergestellten Emmentaler Käses bestätigt³⁾ worden. Solche sekundären Zersetzungserzeugnisse konnte der Genannte auch in einem Käse nicht auffinden, welcher 11 Monate im Käsekeller aufbewahrt worden war. Im Anschluß an dieses Ergebnis hat dann Bissegger gezeigt, daß auch bei langandauernder Verdauung von Casein mit Pankreatin und Pepsin bei Gegenwart von Antiseptika⁴⁾ (Toluol und Natriumfluorid) kein Tetra- und Pentamethyldiamin gebildet werden.⁴⁾ Bissegger

¹⁾ E. Winterstein und J. Töni, Beiträge zur Kenntnis der Bestandteile des Emmentaler Käses. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 28.

²⁾ Weitere Beiträge zur Kenntnis der stickstoffhaltigen Bestandteile, insbesondere der Eiweißkörper des Emmentaler Käses. Inaugural-Dissertation. Zürich 1907.

³⁾ Der Käse wurde auf der Molkereischule Rüti bei Bern hergestellt. Es sei uns gestattet, Herrn Direktor Peter und Herrn Dr. Koestler unseren verbindlichsten Dank für das uns bewiesene Entgegenkommen zum Ausdruck zu bringen.

⁴⁾ Man vergleiche die Literaturzusammenstellung über die Bildung sekundärer Eiweißspaltungsprodukte in der Dissertation von W. Bissegger. S. 9—14.

fand aber bei eingehender Untersuchung der sogenannten Lysinfraktion neben Polypeptiden und Lysin eine basische Substanz, welche in ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften wesentlich vom Lysin abweicht: Das Chlorhydrat der Base krystallisiert in großen, glasglänzenden, treppenförmigen Krystalldrusen, welche im Methylalkohol nahezu unlöslich sind. Charakteristisch ist ferner das in siedendem Wasser nahezu unlösliche Phosphorwolframat.

Wir sehen vorläufig davon ab, auf Grund der bei der Analyse erhaltenen Zahlen eine Formel aufzustellen, da wir bisher nur eine Elementaranalyse ausführen konnten. Da aber die Herstellung dieser Substanz sehr zeitraubend¹⁾ ist und dieselbe anscheinend nur unter ganz bestimmten, bis jetzt noch nicht sicher festgesetzten Versuchsbedingungen entsteht, möchten wir doch im folgenden eine vorläufige Mitteilung unserer über diesen Gegenstand schon vor langer Zeit erhaltenen Ergebnisse mitteilen. Die Untersuchungen werden von uns fortgeführt und wir hoffen dann zunächst festzustellen, ob diese basische Substanz ein neues eigentümliches Spaltungsprodukt des Caseins oder ein besonderes Polypeptid ist.

Wir machen zunächst Mitteilung über die Darstellung der Substanz.

Je 500 g käufliches Casein Merck, das nach den Angaben Hammarstens dargestellt war, wurden in 3,5 Liter 0,3 %iger Salzsäure suspendiert, mit 15 g Pepsin puriss. Gruebler (in Lamellen), 10 g käuflicher Milchsäure (so daß die Lösung 0,3 % davon enthielt), 4 g Fluornatrium versetzt und mit viel Toluol überschichtet, um die Entwicklung von Bakterien zu verhindern.²⁾ Nach viermonatlichem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die eine Flasche, die wir mit I bezeichnen wollen, geöffnet, der Inhalt mit Soda alkalisch gemacht, so daß eine 0,5 %ige Natriumcarbonatlösung entstand, und nun 20 g Pan-

¹⁾ Wir erhielten größere Mengen der in Rede stehenden Substanz erst bei ca. 9 Monate langem Verdauen.

²⁾ Es waren Flaschen mit Baryt vorgelegt worden; es entstand aber während der ganzen Verdauung keine Ausscheidung von Baryumcarbonat. Eine Kohlensäureentwicklung trat somit nicht ein.

kreatin und 5 g Trypsin zugesetzt. Nachdem beide Verdauungsflüssigkeiten 3 Monate bei gewöhnlicher Temperatur gestanden hatten, wurden in Flasche I 10 g Pankreatin, in Flasche II 7,5 g Pepsin zugesetzt und beide noch 6 Wochen im Trockenschrank bei 37° aufbewahrt. Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß vegetative Formen von Bakterien nicht vorhanden waren.

Die beiden Verdauungsflüssigkeiten, die ziemlich viel weißen Niederschlag enthielten, wurden filtriert, die Filterrückstände zum Auswaschen und Entfernen des Toluols mit Wasser ausgekocht, wobei bei I fast alles in Lösung ging, II aber einen erheblichen Rückstand (Pseudonuclein?) zeigte, der aber nicht weiter verarbeitet wurde. Die eingeeengten Waschwässer und die vom koagulierbaren Eiweiß befreiten sauren Filtrate wurden vereinigt und mit konzentrierter Gerbsäurelösung versetzt, bis nur noch eine schwache, allmählich auftretende Fällung entstand. Die von dem leicht filtrierbaren und durch Verreiben mit Wasser ausgewaschenen Niederschlag getrennte Lösung wurde unter Vermeidung eines Überschusses mit Bleiessig versetzt, von der Fällung abfiltriert, im Filtrate das Blei mit Schwefelsäure ausgefällt und das bleifreie Filtrat auf Wasserbädern in vielen Schalen eingeeengt. In der auf diese Weise von den Eiweißkörpern (Albumosen, Peptonen, Peptiden) befreiten Verdauungsflüssigkeit, die einen Gehalt an Schwefelsäure von 5% hatte, wurden die Basen mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Bei der Verdauungsflüssigkeit mit Pepsin entstand nun ein solch kleiner Niederschlag, daß die weitere Verarbeitung sich nicht lohnte. Die Flüssigkeit, die unter Anwendung von Pepsin-Pankreatin erhalten worden war, gab einen voluminösen, dicken Niederschlag mit Phosphorwolframsäure. Diese Fällung wurde nach längerem Stehen abfiltriert, mit Baryt zersetzt, das Ammoniak durch Luft ausgetrieben und der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ ausgefällt. Aus der mit Salpetersäure neutralisierten Basenlösung wurde das Histidin und Arginin gewonnen. Der das Arginin-nitrat enthaltende, hellgelbe Sirup erstarrte vollständig und wog getrocknet 14,345 g. Die vom Argininsilber getrennte

Flüssigkeit wurde mit Salzsäure vom Silber befreit und das noch alkalische Filtrat zur Abscheidung der noch vorhandenen Basen mit Sublimatlösung und Barythydrat versetzt. Den Endpunkt der Ausfällung zeigte das Auftreten des gelben Quecksilberoxydniederschlages an. Nach längerem Stehen wurde die Flüssigkeit vom weißen Niederschlag abfiltriert, in verdünnter Schwefelsäure suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Da beim Eindunsten des vom Quecksilbersulfidniederschlage getrennten Filtrates, das Salpetersäure und Salzsäure enthielt, sich Chlor entwickelte, wurde die Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag sofort abfiltriert, mit 5 %iger Schwefelsäure bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion ausgewaschen. Aus diesem Niederschlage wurden die Basen auf bekannte Weise abgeschieden. Die alkalische Basenlösung wurde mit Salzsäure neutralisiert und eingedunstet. Der hellgelbe Sirup erstarrte krystallinisch. Ganz gleich mußte mit dem Filtrate des Sublimatniederschlages verfahren werden. Es wurde mit Schwefelsäure neutralisiert und auf dem Wasserbade eingeengt. Als wir nun das Baryum mit Schwefelsäure entfernen wollten, trat sofort Chlorgeruch auf, sodaß auch hier schleunigst das Phosphorwolframat hergestellt wurde, aus welchem die Chloride der Basen auf die oben beschriebene Weise erhalten wurden. Sie zeigten schön krystallinischen Habitus.

Zu ihrer Reinigung wurde der trockene Rückstand mit etwas salzsäurehaltigem Methylalkohol ausgekocht. Es hinterließ ein weißer, krystallinischer Rückstand, während der Methylalkohol, der das Lysinchlorid aufnahm, nach dem Verdampfen einen gelben Sirup hinterließ, der trotz Impfens nicht erstarren wollte. Die weißen Krystalle waren aschenfrei. 1 g wurde auf Lysin geprüft. Die Probe wurde in ganz wenig Wasser gelöst und mit einer konzentrierten, alkoholischen Lösung von Platinchlorid versetzt. Nach einigem Stehen schieden sich farblose Blättchen aus, die sich als Baryumchlorid erwiesen. Lysinplatinchlorid schied sich trotz Anwendung aller Kunstgriffe, wie Versetzen mit Äther usw., nicht aus, nachdem aber die Krystalle vom Baryum mit Schwefelsäure befreit worden waren, wurde bei Wiederholung des eben erwähnten Versuches ohne

jede Schwierigkeit das Lysinplatinchlorid erhalten. Bei der Bestimmung des Plattingehaltes erhielten wir folgende Zahlen: 0,2467 g bei 80° und im Exsikkator getrocknetes Lysinplatinchlorid gaben 0,0858 g Platin. Der Plattingehalt beträgt demnach 34,77%. Aus der Formel $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot H_2PtCl_6$ berechnet sich ein Plattingehalt von 35,03%.

Der Rückstand, aus welchem das Lysin extrahiert war, wurde noch einmal mit Methylalkohol ausgekocht: der in Methylalkohol unlösliche krystallinische Rückstand war in Wasser schwerlöslich geworden und ließ sich aus Wasser gut umkrystallisieren. Bei der qualitativen Untersuchung zeigte die Substanz folgendes Verhalten: Erhitzen im Glührohr: Verkohlung und Sublimat, das in Wasser gelöst, mit Neßlers Reagens Gelbfärbung gab. Quecksilberkaliumjodid: Keine Fällung. Auf Zusatz von Natronlauge (Neßlers Reagens) weiße Fällung. Kein Ammoniak!

Wismutkaliumjodid: Auf Zusatz von 1 Tropfen schwache Färbung, allmählich amorphe Ausscheidung.

Phosphormolybdänsäure: Starke, weiße Fällung, in großem Überschuß allmählich sich lösend. Löslich unter Zusatz von wenig Wasser beim Erwärmen, beim Erkalten krystallinisch sich ausscheidend (Nadeln), Jodlösung: Keine Reaktion.

Kaliumferricyanid: Keine Reaktion.

Phosphorwolframsäure: Starke, weiße Fällung, die in kleinem Überschuß unlöslich, in großem Überschuß nicht vollständig löslich ist. Beim Erwärmen löst sie sich nur sehr schwer. Der Niederschlag tritt auch in sehr starker Verdünnung auf.

Goldchloridlösung: In ziemlich konzentrierter Lösung keine Reaktion.

Das Chlorid krystallisiert aus Wasser in großen harten starkglänzenden Krystallen, die sich zu Drusen treppenförmig aneinanderreihen. Es gibt mit Phosphorwolframsäure einen feinen in kochendem Wasser nur sehr wenig löslichen Niederschlag. Das Chlorid enthielt 12,23% N und 19,5% Cl; es weicht also in seiner Zusammensetzung vom Lysinchlorid wesentlich ab. Dieses Präparat wurde nun mit Phosphorwolframsäure gefällt, mit Wasser ausgekocht, die Fällung wieder mit

Baryt in bekannter Weise zersetzt und die Flüssigkeit mit Salzsäure ganz schwach angesäuert, zur Krystallisation eingedunstet und mit Methylalkohol behandelt. Das nun erhaltene Chlorid konnte nach dieser Behandlung keine Spuren von Lysin mehr enthalten. Die Untersuchung ergab folgendes: N = 12,62 und 12,51 %, der Chlorgehalt betrug 20,54 %. Aus diesem Chlorid konnte ein in Nadeln krystallisierendes Platindoppelsalz dargestellt werden, welches einen Platiningehalt von 33,51 % und einen Stickstoffgehalt von 4,3 % aufwies. Das Chlorid ist optisch aktiv. Eine 9,3 % ige Lösung zeigte im Soleil-Ventzkeschen Apparat eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D = + 11,12^\circ$.

Wir haben seit einem Jahre verschiedene Verdauungsversuche unter veränderten Bedingungen angestellt, doch ist es uns bis jetzt nicht gelungen, dieses Produkt wieder zu fassen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß der beschriebene Körper ein Peptid ist, welches nur unter ganz bestimmten Versuchsbedingungen entsteht. Wir hoffen durch die im Gange befindliche Untersuchung näheren Aufschluß darüber zu erhalten.

Analytische Belege: 0,1904 g Substanz gaben 0,1621 g Trockensubstanz und diese lieferten 17,9 ccm Stickstoff bei 16° und 726 mm = 12,23 % N.

0,2013 g Substanz	gaben	0,1582 g AgCl	= 19,43 %.
0,1895 »	»	0,1464 »	= 19,62 %.
0,1963 »	»	22,3 ccm bei 15° und 725 mm	= 12,62 %,.
0,1082 »	»	0,0363 g Platin	= 33,55 % Pt.
0,3601 »	»	lieferten 14 ccm Stickstoff bei 16° und 725 mm = 4,3 % N.	