

Weiterer Beitrag zur Frage nach der Verwertung von tief abgebautem Eiweiß im tierischen Organismus.

XV. Mitteilung.

Von

Emil Abderhalden und Peter Rona.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule und der physiologisch-chemischen Abteilung des Urban-Krankenhauses, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. Juni 1910.)

Bei der Inangriffnahme der Fragestellung, ob der tierische Organismus imstande ist, mit den einfachsten Bausteinen der Proteine — den Aminosäuren — seinen Stickstoffstoffwechsel zu bestreiten, war in erster Linie der Beweis zu erbringen, daß die zur Verfütterung gelangten, durch Fermente abgebauten Proteine wirklich restlos bis zu Aminosäuren gespalten waren. Der eine von uns hat wiederholt darauf hingewiesen, daß das Fehlen der Biuretreaktion nicht als Beweis für eine vollständige Spaltung angesehen werden darf, ja es kann die Biuretreaktion fehlen und nur ein ganz geringer Teil von Aminosäuren abgespalten sein.¹⁾ Bei jedem einzelnen Versuche, die alle in dieser Zeitschrift veröffentlicht worden sind, ist das Verdauungsprodukt aus Casein resp. Fleisch eingehend auf seinen Gehalt an «Peptonen» resp. «Polypeptiden» geprüft worden. Dieser Teil der ganzen Untersuchung war mit der zeitraubendste und mühsamste. Um in jedem einzelnen Fall Garantie für eine einheitliche Durchführung der Prüfung auf etwa noch gebundene Aminosäuren zu haben, hat der eine von uns (Abderhalden) diesen Teil der Versuche stets selbst ausgeführt. In jedem Falle wurde zunächst mit Phosphorwolframsäure gefällt, und zwar verdünnten wir das Verdauungsgemisch mit Wasser, bis

¹⁾ Emil Abderhalden und O. Prym, Studien über Leberautolyse, Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 320, 1907.

sein Gehalt an festen Bestandteilen 1% betrug. Der Niederschlag wurde mit der hydraulischen Presse ausgepreßt. Nun verarbeiteten wir Filtrat und Niederschlag für sich. Das Filtrat wurde in zwei Hälften geteilt, nachdem die überschüssige Phosphorwolframsäure und danach der Überschuß an Baryt entfernt worden war. Die eine Hälfte verdampften wir zur Trockene. Der Rückstand wurde verestert. Wir bestimmten dann den Gehalt an destillierbaren Estern. Die andere Hälfte des Filtrates des Phosphorwolframsäureniederschlages dampften wir gleichfalls zur Trockene ein. Den Rückstand nahmen wir mit der fünffachen Menge rauchender Salzsäure auf und kochten 10 Stunden am Rückflußkühler. Schließlich veresterten wir auch hier und bestimmten die destillierbaren Ester unter gleichen Bedingungen wie zuvor. In vielen Fällen haben wir auch entsprechende Mengen des angewandten Proteins in der üblichen Weise der totalen Hydrolyse unterworfen und dann ebenfalls die destillierbaren Ester gewogen. Wir fanden ausnahmslos, daß annähernd dieselben Mengen an Monoaminosäureester erhalten wurden, gleichgültig, ob wir Proteine direkt mit rauchender Salzsäure resp. 25%iger Schwefelsäure hydrolysierten, oder ob wir mit Fermenten — Pepsin, Trypsin, Erepsin — abbauten. Endlich haben wir noch jedesmal den Phosphorwolframsäureniederschlag auf vorhandene Monoaminosäuren geprüft, nachdem wir ihn mit Baryt zerlegt und die organische Substanz schließlich mit rauchender Salzsäure gekocht hatten. Wir erhielten nur Spuren von Monoaminosäureester. Ferner war die Fällung mit Phosphorwolframsäure im Verdauungsgemisch eher geringer als im Hydrolysat, das wir durch 20stündiges Kochen von Protein mit 25%iger Schwefelsäure erhalten hatten.

Diese Resultate berechtigten zum Schlusse, daß die von uns verwendeten Präparate praktisch vollständig bis zu Aminosäuren abgebaut waren. Da in allen Versuchen, die im Institute des einen von uns ausgeführt worden sind, wenn nicht spezielle Fragen verfolgt wurden, stets geringe Stickstoffmengen verfüttert wurden, so daß die Tiere sich in der Nähe des Stickstoffminimums befanden, so würde selbst ein Gehalt von 5 bis 10% an Produkten, die noch Aminosäuren gebunden enthalten,

nichts ausgemacht haben, d. h. die Versuchstiere hätten ihren Stickstoff- resp. Eiweißstoffwechsel niemals aus diesen Produkten allein bestreiten können. Nach unseren reichen Erfahrungen ist es jedoch ganz ausgeschlossen, daß auch nur wenige Prozente an derartigen Produkten in unseren Präparaten vorhanden waren. Es sei auch noch auf den Versuch hingewiesen, bei dem es gelang, den Stickstoffstoffwechsel mit durch Schwefelsäure total abgebautem Eiweiß zu bestreiten.¹⁾

Nun hat Sörensen eine Methode angegeben, die nach seinen Erfahrungen es gestattet, die Frage, ob in einem Gemisch von Abbauprodukten aus Eiweiß neben Aminosäuren noch «Polypeptide» vorhanden sind, scharf zu entscheiden. Wir haben, um unsere auf dem oben erwähnten Wege erhaltenen Befunde zu kontrollieren, eine Anzahl von zu unseren Versuchen verwendeten Präparaten mit Hilfe der Formoltitrierung untersucht. Die erhaltenen Resultate führen zum Schlusse, daß unsere Verdauungsprodukte ausnahmslos **vollständig** abgebaut waren. Die Präparate A, A₁ und C, 1—6, waren durch Verdauung von Fleisch gewonnen worden und dienten zu Stoffwechselversuchen. Die einzelnen Werte zeigen, zu welcher ähnlichen Präparaten man bei ganz gleichartiger Durchführung der Versuche in allen Einzelheiten gelangt. Die Präparate 7 und 8 (Rindfleisch) sind von den Farbwerken Meister Lucius & Brüning, Höchst a. M., dargestellt worden. Auch diese sind vollständig abgebaut.

Experimenteller Teil.

Die Bestimmung erfolgte ganz genau nach den Vorschriften von Sörensen. Vgl. Biochem. Zeitschrift, Bd. VII, S. 407 (1908) [S. P. L. Sörensen und H. Jessen Hansen, Über die Ausführung der Formoltitrierung in stark farbigen Flüssigkeiten] und diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 406 (1908) [V. Henriques, Die Eiweißsynthese im tierischen Organismus].

5 g Substanz wurden in 120 ccm ¹/₁₀-n-Salzsäure gelöst, 1 Stunde auf dem Wasserbad erwärmt, dann 2 ccm 2-n-Baryumchloridlösung zugesetzt. Nun wurde filtriert. Nach dem Ab-

¹⁾ Vgl. Mittel. XIII (Emil Abderhalden und Fidel Glamser), Diese Zeitschrift, Bd. LXV, S. 285, 1910).

kühlen wurden zwei Portionen zu je 50 ccm (A und B) genau abgemessen. Portion B wird nun in einer geräumigen Porzellschale mit 50 ccm konzentrierter Salzsäure (D. 1,19) möglichst stark eingedampft, dann noch einmal mit 50 ccm Salzsäure versetzt, wieder möglichst stark eingedampft, der fast trockene Rückstand mit 50 ccm Wasser versetzt, wie vorher eingedampft, schließlich der Rückstand in 25 ccm kohlensäurefreiem Wasser gelöst, in einen 50-ccm-Meßkolben filtriert und mit kohlensäurefreiem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. — Die Formoltitrierung wird in je 25 ccm von A und B ausgeführt, nachdem diese durch Behandlung mit 4 ccm 2-n-BaCl₂-Lösung und 20 ccm $\frac{1}{3}$ -n-Silbernitratlösung entfärbt worden waren. Die auf 50,2 ccm aufgefüllten Lösungen wurden filtriert, zur Titration je 20 ccm (gleich 10 ccm der ursprünglichen Lösung) abgenommen (Indikator Phenolphthalein). Die Differenz der freien Salzsäure in beiden Proben wurde aus der Differenz des Chlorgehaltes ermittelt und in Rechnung gezogen.

	Verbraucht auf 10 ccm	
	vor der HCl-Wirkung	nach der HCl-Wirkung
	ccm $\frac{1}{5}$ -n-Lauge	
Präparat A	16,70	16,80
" A ₁	17,78	17,50
" C	17,00	16,45
1.	18,50	17,90
2.	18,90	18,00
3.	18,45	18,35
4.	18,83	18,40
5.	18,60	17,90
6.	17,48	17,30
7.	18,55	17,70
8.	18,70	18,15

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, ergab die Formoltitration vor und nach der Salzsäurebehandlung im Präparat A, dann in Nr. 3, 6, 7 praktisch identische Werte. In den anderen Fällen war die verbrauchte Laugenmenge nach der Säure-

wirkung stets geringer als vor derselben. Dies ist nach Sörensen¹⁾ auf die sekundäre Spaltung bei der Eindampfung mit Salzsäure zurückzuführen, wobei flüchtige Säuren sich der Formoltitrierung entziehen. Diese Differenzen entsprechen in den Präparaten A₁, C, 1, 2, 4, 5 und 8 beziehungsweise 4,7, 8,9, 9,1, 10,6, 8,7, 9,7, 7,6% N auf den gesamten Stickstoffgehalt der betreffenden Flüssigkeit berechnet.

Nachtrag bei der Korrektur.

Nach Abschluß dieser Untersuchung erschien eine Mitteilung von V. Henriques und J. K. Gjaldbæk «Über quantitative Bestimmung der im Proteine oder in dessen Abbauprodukten vorhandenen Peptidbindungen»,²⁾ in welcher die oben mitgeteilte Methode so modifiziert ist, daß die beiden Fehlerquellen derselben: eventuell mangelhafte Hydrolyse bei nur zweimaligem Abdampfen mit konzentrierter Salzsäure und die Verluste an flüchtigen Säuren beim Abdampfen vermieden werden. Es lag uns nun ob, auch nach diesem modifizierten Verfahren unsere Präparate zu prüfen, wobei wir uns wiederum streng an die Vorschriften von Henriques und Gjaldbæk hielten. Etwa 5 g des zu untersuchenden Präparates lösten wir in 100 ccm Wasser und bestimmten in 5 ccm der Lösung den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl. Nun wurden 25 ccm der Lösung nach möglichst genauer Neutralisierung gegen Lackmuspapier auf 200 ccm verdünnt. In 40 ccm dieser Lösung bestimmten wir dann das Ammoniak nach Krüger-Reich-Schittenhelm. Andere 40 ccm wurden zur Formoltitrierung benutzt. — 25 ccm der ursprünglichen Lösung wurden gleichzeitig 6 Stunden lang über freier Flamme mit 25 ccm konzentrierter Salzsäure gekocht, nachdem wir uns überzeugt hatten, daß ein längeres Kochen mit Salzsäure die Menge des Aminosäurestickstoffs nicht vermehrt;³⁾ dann wurde die dunkelbraune Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis zur Trockene ein-

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. VII, S. 419 (1908). — Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 411 (1908).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXVII, S. 8 (1910).

³⁾ Vgl. hierzu Henriques, l. c. S. 20, 21.

gedampft, der Rückstand mit Wasser in einen 100 ccm-Meßkolben gebracht, mit Silbernitrat entfärbt und bis 100,2 ccm aufgefüllt. 50 ccm vom Filtrat wurden nun in einem 100 ccm-Kolben nach genauer Neutralisierung gegen Lackmuspapier bis zur Marke verdünnt, 40 ccm zur Ammoniakbestimmung, 40 ccm zur Formoltitrierung verwandt.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	Gesamt-N (in mg)	A = Ammoniakstickstoff + Aminostickstoff, bestimmt durch Formoltitrierung. B = Ammoniakstickstoff, bestimmt durch Vakuumdestillation. C = A - B = Aminostickstoff. (Milligramm N.)					
		Sogleich bestimmt			6 Stund. mit 20%iger Salzsäure gekocht; darauf eingedampft		
		A	B	C	A	B	C
Präparat A	28,70	19,32	3,09	16,23	19,88	3,36	16,52
» A ₁	27,83	19,13	3,64	15,49	19,74	3,73	16,01
» C	31,22	20,86	3,64	17,22	21,70	4,34	17,36
» 1	25,06	21,28	3,64	17,64	21,45	3,92	17,53
» 2	24,44	17,36	2,88	14,48	17,64	3,10	14,54
» 3	29,73	21,00	3,55	17,45	21,84	3,78	18,06
» 4	32,98	21,98	3,72	18,26	22,12	3,83	18,29
» 5	30,71	20,44	3,73	16,71	20,86	3,78	17,08
» 6	33,32	21,00	3,58	17,42	21,56	4,20	17,36
» 7	32,20	21,84	3,81	18,03	22,12	3,90	18,22
» 8	35,28	24,92	3,64	21,28	25,20	3,78	21,42

Die nach der früheren Methode gewonnenen Resultate erfahren hiermit eine Bestätigung. Die geringen Vermehrungen des Aminosäurestickstoffes nach der Behandlung mit Salzsäure erreichen selbst in den ungünstigsten Fällen (Präparat A₁, 3, 5) nicht 0,56 mg N, eine Stickstoffmenge, die noch innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegt. In den meisten anderen Fällen sind die Differenzen zwischen den Werten für den Aminosäurestickstoff noch geringer.

Wir kommen somit zu dem Schlusse, daß die zu den Versuchen mit tief abgebauten Proteinen verwendeten Präparate

praktisch vollständig bis zu Aminosäuren abgebaut waren. Im Gegensatz zu Henriques und Gjaldbæk hat sich gezeigt, daß es leicht gelingt, durch kombinierte Verdauung von Proteinen und speziell von Fleisch mit Pepsinsalzsäure, Trypsin und Erepsin eine vollständige Hydrolyse herbeizuführen. Nach neueren Erfahrungen genügt schon eine Verdauung von 3 bis 4 Wochen. Wahrscheinlich werden geeignete Versuchsbedingungen einen noch rascheren Abbau ermöglichen. Über die Resultate dieser Versuche soll demnächst berichtet werden.
