

Untersuchungen über die Plasteinbildung.

Von

V. Henriques und I. K. Gjaldbäk.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der königl. tierärztlichen und landwirtschaftlichen Hochschule, Kopenhagen).

(Der Redaktion zugegangen am 22. März 1911.)

Im Jahre 1886 teilte A. Danilewski mit, daß Lab-extrakt durch Zusatz einer konzentrierten Lösung peptischer Spaltungsprodukte von Proteinstoffen eine Koagulation der Lösung unter gleichzeitigem Fällen eines Stoffes erzeugt. Der Prozeß rührt von einer Fermentwirkung her, indem der Lab-extrakt durch Erwärmung bis auf 100° die Fähigkeit verliert, die Koagulation und das Fällen hervorzubringen. Danilewski faßte die Koagulation als Ausdruck einer Synthese des Protein-stoffes aus den proteolytischen Spaltungsprodukten auf. Da-nilewskis Resultate wurden später von W. Okunew¹⁾ be-stätigt, der das Verhalten näher untersuchte und dem Ferment Chymosin die koagulierende Wirkung zuschrieb.

Später ist der Prozeß wiederholt untersucht worden.

Der dabei fällende Stoff wurde von W. Sawjalow²⁾ Plastein genannt und der Prozeß die Plasteinbildung.

Bei nachfolgenden Untersuchungen hat es sich gezeigt, daß die koagulierende Wirkungsfähigkeit nicht allein dem Lab-ferment zufällt, sondern auch den Pepsinpräparaten und in-folge A. Nürnberg³⁾ verschiedenen tierischen Organextrakten

¹⁾ W. Okunew. Dissertation. S. 1. Petersburg 1895.

²⁾ W. Sawjalow. Pflügers Archiv. Bd. LXXXV; Diese Zeit-schrift, Bd. LIV.

³⁾ A. Nürnberg. Hofmeisters Beiträge. Bd. IV.

wie Leber-, Pancreas-, Dünndarm-, Dickdarm-, Nieren- und Muskelextrakt.

D. Kurajeff¹⁾ untersuchte das Verhalten des Papayotin-Fermentes und zeigte, daß auch dieses Koagulation und Fällungen erzeugt; der gefällte Stoff, den er Koagulose nennt, scheint vom Plastein verschieden zu sein.

Als geeignetes Material für Plasteinfällung werden namentlich die peptischen Spaltungsprodukte der Proteinstoffe bezeichnet, doch soll ferner das Fälligen auch in tryptischen Spaltungsprodukten und in Säuren- und Alkalispaltungsprodukten der Proteinstoffe möglich sein (D. Lawrow²⁾).

Die Reaktion der angewandten Mischung muß nach dem verwendeten fermenthaltigen Stoff abgepaßt werden. Während also die Reaktion für den Labextrakt sauer sein soll — Optimum ca. 0,5% HCl — muß sie bei Verwendung von Pancreassaft oder Papayotin schwach alkalisch sein.

Der Prozeß verläuft in konzentrierter Lösung unter Gelatinieren der Lösung: bei Verwendung einer weniger konzentrierten Lösung entsteht ein Fälligen ohne Gelatinieren.

In den Materialien, die als Substrat für die Plasteinfällung verwendet werden — besonders geeignet hierzu ist eine konzentrierte Lösung von Witte-Pepton — sind verschiedene Spaltungsprodukte von Proteinen vorhanden; ob sie alle an dem Prozeß teilnehmen oder ob nur eine besondere chemische Gruppe notwendig ist, läßt sich auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nicht bestimmt sagen. Nach W. Sawjalow scheint hervorzugehen, daß alle Albumosenfraktionen gegenwärtig sein müssen. Sawjalow stellte von einer Witte-Peptonlösung verschiedene Fraktionen her. Die Fraktionen gaben einzeln kein oder nur geringes Fälligen und nur wenn alle Fraktionen zusammengemischt waren, entstand reichliche Fällung.

Von anderen Untersuchungen müssen die von D. Lawrow angestellten hervorgehoben werden: in seinen ersten Untersuchungen führt er an, daß nur die mit Ammoniumsulfat fäll-

¹⁾ D. Kurajeff, Hofmeisters Beiträge, Bd. I, II und III.

²⁾ D. Lawrow, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, LI, LIII, LVI.

baren Stoffe Bedeutung für die Plasteinbildung haben: später gibt Lawrow an, daß die Plasteinbildung außer in Albumosenlösungen auch in Lösungen von polypeptidartigen Stoffen vorkommt.

H. Bayer¹⁾ hat vom Witte-Pepton einen Stoff dargestellt und zwar durch Fällen einer 10 %igen Lösung von Witte-Pepton mit gleichem Volumen 96 %igen Alkohols, danach Fällen des Filtrates mit Aceton und nach Eindampfen des Filtrates weiteres Fällen mit 80 %igem Alkohol. Der auf diese Weise dargestellte Stoff gibt reichliche Plasteinbildung.

Kurajeff erwähnt den Unterschied zwischen der Papayotin- und der Chymosinwirkung, indem das Papayotin großes Fällen in sekundären Albumosen erzeugt und nur geringes Fällen in den primären Albumosen, während für das Chymosin das Entgegengesetzte der Fall ist.

Aus dem hier Angeführten ist zu ersehen, daß sich die verschiedenen Verfasser nicht ganz darin einigen, welche Stoffe für die Plasteinbildung notwendig sind.

Das gebildete Plastein ist unlöslich in Wasser, aber löslich in Säuren und Alkalien; es gibt mit Ausnahme des erwähnten Plasteins Bayer nach Waschen mit Wasser die verschiedenen Reaktionen der Proteinstoffe.

Die elementare Zusammensetzung des Plasteins zeigt einen Kohlenstoffinhalt von 57—60 % und einen Stickstoffinhalt von 13—14,6 %. Die elementare Zusammensetzung des Plasteins scheint dieselbe zu sein, auch wenn es aus verschiedenen Proteinstoffen dargestellt ist.

L. Rosenfeld²⁾ hat die hydrolytischen Spaltungsprodukte des Caseinplasteins untersucht und Arginin-, Histidin-, Lysin-, Tyrosin-, Leucin-, Glutaminsäure, Phenylalanin und Pyrrolidincarbonsäure nachgewiesen.

W. Sawjalow hat auf verschiedene Weise zu zeigen versucht, daß die Plasteinfällung als eine Synthese aufzufassen ist.

Bei Bestimmung der Molekülzahl des Plasteins nach dessen Säurekapazität, indem das Plastein als eine Säure aufzufassen

¹⁾ H. Bayer. Hofmeisters Beiträge. Bd. IV.

²⁾ L. Rosenfeld. Hofmeisters Beiträge. Bd. IX.

ist, findet Sawjalow eine Molekülzahl von ungefähr 6000, während die der Albumosen nur halb so groß ist. Dieses Verhalten deutet auf eine Synthese, doch muß man die mangelhaften Kenntnisse erinnern, die wir von den Albumosen haben; jedenfalls ist es wahrscheinlich, daß sie aus Mischungen von Stoffen bestehen, und die Möglichkeit der Gegenwart von Stoffen mit einer Molekülzahl von ungefähr 6000 ist nicht ausgeschlossen, selbst wenn die Mischung eine Molekülzahl von ungefähr 3000 zeigt. Ferner kommt Sawjalow zu dem Resultat, daß der Prozeß eine Synthese ist, da alle Albumosenfraktionen gegenwärtig sein müssen, um das Plastein zu bilden, während die einzelnen Fraktionen je für sich kein Plastein bilden, und zeigt in Übereinstimmung hiermit, daß der Prozeß im ganzen wesentlich wie eine bimolekulare Reaktion verläuft, wo also 2 Moleküle teilnehmen müssen.

W. Okunew hat nachgewiesen, daß eine Pepsinlösung und eine Lösung einer Albumosenmischung nach Trocknen zu konstantem Gewicht mehr wiegt, als wenn die Lösungen zusammengemischt und erst nach der Plasteinbildung zu konstantem Gewicht eingetrocknet werden. Dies stimmt ganz damit überein, daß eine eventuelle Synthese durch Anhydridbildung vor sich gegangen ist.

Schließlich machen wir noch darauf aufmerksam, daß von der letzteren Zeit Untersuchungen über Synthese von Spaltungsprodukten von Casein durch Pepsin vorliegen (Robertson, Journ. Biol. Chem. Bd. III, 1907); ferner hat Taylor gemeint, eine ähnliche Synthese durch Verwendung von Salmin-sulfat und Pankreatinpräparaten nachweisen zu können.

Da die Frage, inwiefern die Plasteinbildung auf einer Synthese beruht oder nicht, von großem physiologischen Interesse ist, haben wir die unten mitgeteilten Versuche angestellt.

Wir haben uns namentlich auf die von S. P. L. Sörensen¹⁾ ausgearbeitete formoltitrimetrische Methode gestützt; diese beruht wie bekannt auf einer Titrierung der freien Carboxylgruppen nach Neutralisation der Aminogruppen mit Formol.

¹⁾ S. P. L. Sörensen. Enzymstudien. Bioch. Zeitschrift. Bd. VII.

Die Methode, die unter anderem gute Resultate durch Messen proteolytischer Spaltungen gegeben hat, hat den Vorteil vor anderen Methoden, daß man den Umfang der vor sich gehenden Spaltungen direkt mißt.

Man nimmt an, daß die Proteinstoffe durch ein Verbinden einer Reihe Aminosäuren durch Anhydridbildungen zwischen den Carboxyl- und Aminogruppen aufgebaut sind. Bei der proteolytischen Spaltung lösen sich diese Bindungen, und falls in einer Mischung der proteolytischen Spaltungsprodukte eine Regeneration des Proteinstoffes vor sich geht, muß es dadurch geschehen, daß zwischen den Amino- und Carboxylgruppen unter Anhydridbildung Bindungen entstehen, und diese Veränderung wird man dann durch Formoltitrierung messen können.

In einigen unserer Versuche haben wir außer Formoltitrierung Gerbsäurefällungen vorgenommen.

Die meisten unserer Versuche sind mit Witte-Pepton gemacht, das zusammen mit einem der Fermente Chymosin (Chr. Hansen, Kopenhagen) oder Pepsin (Langebek und Petersen) in einer passend verdünnten Salzsäure gelöst wurde: durch einige orientierende Versuche bestimmten wir, welche Mischungsverhältnisse Optimum für die Plasteinbildung gab.

Ein wesentlicher Faktor bei der Plasteinbildung ist außer der Konzentration der Witte-Peptonlösung und der Fermentmenge zugleich die Wasserstoffionenkonzentration, was aus den untenstehenden Beispielen ersichtlich ist.

a) Eine Mischung bestehend aus 40 g Witte-Pepton + 100 ccm $1/20$ -n-Salzsäure + 1 g Chymosin war nach 4tägigem Stehen im Thermostaten bei 37° von derselben Konsistenz wie bei der Zubereitung, auch war nur eine ganz geringe Fällung entstanden.

b) Eine Mischung von 40 g Witte-Pepton + 100 ccm $1/10$ -n-Salzsäure + 1 g Chymosin war nach 4tägigem Stehen im Thermostaten bei 37° noch flüssig, aber mehr dickflüssig; auch war eine Fällung in der Mischung entstanden.

c) Eine Mischung von 40 g Witte-Pepton + 100 ccm $1/5$ -n-Salzsäure + 1 g Chymosin war nach 1tägigem Stehen im Thermostaten bei 37° zu einer festen Gallerte erstarrt.

Es zeigt sich also, daß 40 g Witte-Pepton + 1 g Chymosin + 100 ccm $\frac{1}{5}$ -n-Salzsäure die stärkste Plasteinbildung gibt, weshalb wir zu unseren Versuchen eine Salzsäure von der Stärke $\frac{1}{5}$ -n und zu 100 ccm, hiervon 40 g Witte-Pepton + Ferment verwendet haben.

Die Zubereitung der Mischungen geschieht, indem man das Ferment in Salzsäure löst; mit dieser Lösung wurde das Witte-Pepton in einem Mörser zerrieben, und die Mischung danach durch Jakonett koliert, um mögliche Klumpen¹⁾ zu entfernen. Um das Wachsen von Bakterien zu verhindern, wurde Toluol zugefügt und die Mischung — nach Entnahme einer Probe zur näheren Untersuchung — in verstopften Flaschen entweder in den Thermostaten bei 37°, oder Zimmertemperatur, oder in einzelnen Fällen bei niedriger Temperatur von ca. 5° gestellt. Mit passendem Zwischenraum werden ca. 12 g dem Inhalt der Flaschen entnommen und in einem Porzellanmörser mit 200 ccm ausgekochtem, destilliertem Wasser verrieben. Hierauf wurde die verriebene Masse in einen Kolben übergeführt, dieser zugestopft und geschüttelt, um die flockige Fällung zu verteilen: danach wurden genommen:

1. 10 ccm zur Bestimmung des Totalstickstoffes nach Kjeldahl.

2. 50 ccm zur Formoltitrierung.

Die Formoltitrierung wird in der vorhandenen verriebenen Masse ohne Neutralisierung ausgeführt. Als Kontrolle wurden 50 ccm ausgekochtes, destilliertes Wasser verwendet, wozu eine passende Menge Tropäolin 00, Bismarkbraun und geschlemmtes Baryumsulfat gefügt war. In allen Fällen wurde zu stark roter Farbe mit Phenolphthalein als Indikator titriert. Die in den Tabellen angeführten Zahlen sind für 100 mg Stick-

¹⁾ Bei den zuletzt vorgenommenen Versuchen wurde, um eine klarere Lösung zu erhalten, ein etwas anderes Verfahren benutzt, indem wir das Witte-Pepton in einer größeren Menge Wasser gelöst haben, danach zu 100° erwärmt und dann die Flüssigkeit filtriert, um einen Teil unlöslichen Stoff zu entfernen. Hierauf wird das Filtrat auf dem Wasserbade zu einer Konzentration von ca. 30% eingedampft und dann die notwendige Menge Salzsäure zugefügt.

stoff berechnet und geben die verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter $\frac{1}{5}$ -NaOH an.

3. 40 ccm werden in einem 100-ccm-Meßkolben zur Gerbsäurefällung abpipettiert; die freie Salzsäure wird mit $\frac{1}{5}$ -NaOH neutralisiert und nach Zusatz von 4 ccm 1-n-Natriumacetatlösung, die mit Essigsäure Lackmus gegenüber neutralisiert war, wird mit 20 ccm 10%iger Gerbsäurelösung gefällt. Mit destilliertem Wasser wird zu 100 ccm verdünnt und nach kräftigem Schütteln und 24stündigem Stehen filtriert. In 50 ccm des Filtrates wurde der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt; hierbei findet sich, wenn die Größe des Bodensatzes außer Betracht gelassen wird, die durch Gerbsäure nicht fällbare Menge Stickstoff in 20 ccm der verriebenen Masse.

Die in den Tabellen aufgeführten Zahlen bezeichnen die durch Gerbsäure nicht fällbare Menge Stickstoff (mg N) pro 100 mg N.

Mit Rücksicht auf die Genauigkeit obengenannter Bestimmungen muß gesagt werden, daß während sich die kürzlich zubereiteten Mischungen leicht mit Wasser zu einer gleichartigen Mischung zerreiben ließen, so war es oft mit Schwierigkeiten verbunden, die Mischung zu zerreiben, die zu einer festen Gallerte koagulierte war; eine solche Mischung gab eine Zerreibung, die einige kleine Körner enthielt, dem Aussehen nach wie koagulierte Hühnereiweiß. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffes in der Zerreibung einer flüssigen Mischung ergab übereinstimmende Zahlen. Bei Bestimmung des Gesamt-N in einer Zerreibung einer koagulierten Mischung war es dagegen schwierig, völlig übereinstimmende Zahlen zu erhalten, doch war der Unterschied als Regel weniger als 0,2 mg N. Es wurden immer 2 Bestimmungen vom Gesamt-N vorgenommen; war der Unterschied größer als 0,2 mg, wurde Durchschnittszahl von 4 Bestimmungen genommen. Wir werden hiernach in jedem Fall mit einer Genauigkeit von 0,2 mg N bei den Gesamtstickstoffbestimmungen rechnen können.

Mit Rücksicht auf die Formoltitrierungen ist der Umschlag gut gewesen, wenn zu stark roter Farbe titriert wurde; der Umschlag war deutlich auf 0,1 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH. In Über-

einstimmung hiermit haben wir bei Formoltitrierung mehrerer Portionen derselben Verreibung oft genau denselben Titer gefunden und niemals einen größeren Unterschied als 0,1 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH. Da der Stickstoffinhalt in der zur Formoltitrierung verwendeten Menge zwischen 140 und 150 mg Stickstoff enthielt und die in den Versuchen aufgeführten Zahlen für 100 mg Stickstoff ausgerechnet sind, ist der mögliche Fehler mit ca. 1,5 dividiert, und es kann mit einer Genauigkeit der aufgeführten Zahlen von 0,1 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH gerechnet werden, was 0,28 mg N entspricht. Die oben erwähnten möglichen Fehler in den Bestimmungen des Gesamtstickstoffes erhalten hier keine Bedeutung.

Tabelle I.

80 g Witte-Pepton + 200 ccm $\frac{1}{5}$ -n-Salzsäure + 2 g Chymosin.

	Formoltitrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	5,4	Flüssig
Nach 1 tägigem Stehen bei 37°	5,2	Unbewegliche Gallerte
2	5,2	„ „
3	5,1	„ „
4	5,2	„ „
5	5,2	„ „
6	5,1	„ „
10	5,1	„ „
20	5,1	„ „

Bei den in Tabellen I und II aufgeführten Versuchen ist das Ferment Chymosin verwendet worden. Schon nach 24 stündigem Stehen bei 37° ist die Mischung zu einer beinahe unbeweglichen Gallerte erstarrt, die eine flockige Fällung einschließt. Die Konsistenz scheint sich durch das lange Stehen bei 37° nicht zu verändern. Die Formoltitrierungen zeigen in beiden Versuchen nur ein geringes Sinken. In Tabelle I kann das Sinken als 0,3 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH gerechnet werden; wird diese Zahl mit 2,8 multipliziert, so findet man das Sinken in

Tabelle II.

80 g Witte-Pepton + 200 ccm $\frac{1}{5}$ -n-Salzsäure + 2 g Chymosin.

	Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	5.4	22.6	Flüssig
Nach 1 tägigem Stehen bei 37°	5.3	20.5	Unbewegliche Gallerte
» 2 » » » »	5.3	20.9	Desgl.
» 3 » » » »	5.4	20.9	»
» 4 » » » »	5.2	20.3	»
» 5 » » » »	5.2	19.8	»
» 6 » » » »	5.2	—	»
» 10 » » » »	5.2	19.8	»

formoltitrierbarem Stickstoff, also 0,84 mg n pro 100 mg N, d. h. 0,84^o/. Auf Tabelle II läßt sich ein Sinken durch Formol-
titrierung von 0,2 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH, also 0,56^o/o berechnen. Betreffend die Gerbsäurefällung auf Tabelle II, so ist der mit Gerbsäure nicht fällbare Stickstoff mit 2,8^o/o abgenommen.

Tabelle III.

120 g Witte-Pepton + 300 ccm $\frac{1}{5}$ -n-Salzsäure + 3 g Pepsin.

	Formoltitrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	5.6	Flüssig
Nach 1tägigem Stehen bei 37°	5.4	Unbewegliche Gallerte
» 2 » » » »	5.3	»
» 3 » » » »	5.5	»
» 4 » » » »	5.4	»
» 5 » » » »	5.4	»
» 6 » » » »	5.4	»
» 10 » » » »	5.3	»

Tabelle IV.

120 g Witte-Pepton + 300 ccm $\frac{1}{5}$ -n-Salzsäure + 3 g Pepsin.

	Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich nach Mischung bestimmt	5.7	20.1	Flüssig
Sogleich nach Erhitzung zu 37°	5.7	—	„
Nach 1stündig. Stehen bei 37°	5.5	19.5	„
2 „ „ „	5.6	18.9	Mehr dickflüssig
3 „ „ „	5.6	19.0	Noch mehr
4 „ „ „	5.5	18.7	Dünne Gallerte
5 „ „ „	5.5	18.6	Gallerte
6 „ „ „	5.4	18.6	„
1tägigem	5.5	18.5	Unbewegl. Gallerte
2 „ „ „	5.4	17.9	„

Bei den in Tabellen III und IV aufgeführten Versuchen ist wie unter I und II Witte-Pepton verwendet, aber statt Chymosin ist hier Pepsin gebraucht worden. Die Versuche zeigen dasselbe wie bei den Chymosinwirkungen; nach 24stündigem Verlauf sind die Mischungen zu einer Gallerte koaguliert, die ganz der oben erwähnten gleicht. Hier ist auch ein geringes Sinken in dem formoltitrierbaren Stickstoff zu finden: Auf Tabelle III 0,84% und auf Tabelle IV ebenfalls 0,84%. Die Gerbsäurefällung zeigt auch hier ein Sinken im nicht fällbaren N, das auf Tabelle IV 2,2% beträgt.

Bei dem auf Tabelle V verzeichneten Versuche ist Witte-Pepton und Pepsin in demselben Verhalten wie bei den Versuchen auf Tabellen III und IV verwendet, aber die Mischung ist bei Zimmertemperatur hingestellt. Die Mischung koagulierte nach 24stündigem Verlauf, aber erst nach 48 Stunden erreichte sie eine ähnliche Festigkeit wie bei 37°. Die Formoltitrierung zeigt nach der Plasteinbildung ein Sinken von 0,56%; die Gerbsäurefällung ein solches von 1,8%.

Tabelle V.

120 g Witte-Pepton + 300 ccm $\frac{1}{5}$ -n-Salzsäure + 3 g Pepsin.

		Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt		5.6	21.8	Flüssig
Nach 1 tägigem	Stehen bei Zimmer- tem- peratur	5.5	20.8	Gallerte
2 »		5.5	20.9	»
3 »		5.3	—	Unbewegl. Gallerte
4 »		5.4	19.8	»
5 »		5.4	20.2	»
9 »		5.3	—	»
7 wöchigem		5.4	20.0	»

Tabelle VI.

120 g Witte-Pepton + 300 ccm $\frac{1}{5}$ -n-Salzsäure + 3 g Pepsin.

		Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt		5.6	21.1	Flüssig
Nach 1 tägigem Stehen bei 5°		5.5	21.4	Mehr dickflüssig
3 »		5.6	21.0	Dünne Gallerte
5 »		5.5	21.3	Gallerte
6 »		5.4	—	
7 »		5.5	21.3	
Wird nun bei 37° gestellt				
Nach 1 tägigem Stehen bei 37°		5.4	19.4	Unbewegl. Gallerte

Bei den auf Tabellen VI und VII aufgeführten Versuchen ist dasselbe Mischungsverhältnis wie bei den 3 vorgehenden Versuchen verwendet; aber die Mischungen wurden erst einige Tage bei niedriger Temperatur, ca. 5°, gehalten und danach bei 37° in den Thermostaten gestellt. Man sieht hier, daß die Koagulation selbst bei dieser niedrigen Temperatur nach 5 Tagen

Tabelle VII.

120 g Witte-Pepton + 300 ccm $\frac{1}{5}$ -n-Salzsäure + 3 g Pepsin.

	Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	5.6	—	Flüssig
Nach 1 tägigem Stehen bei 5°	5.5	21.4	
2	5.5	20.9	Mehr dickflüssig
3	5.6	20.7	Dünne Gallerte
5	5.5	20.3	Gallerte
8	5.4	20.0	
Wird nun bei 37° gestellt			
Nach 1 tägigem Stehen bei 37°	5.4	19.5	Unbewegl. Gallerte
2	5.4	19.8	

eintritt. Die Formoltitrierung hält sich beim Versuch VI sozusagen konstant, während die Gerbsäurefällungen auf Tabelle VII ein gleichmäßiges, nicht besonders großes Sinken in nicht fällbarem Stickstoff zeigt. Nach 1 bis 2 tägigem Stehen bei 37° und beim Versuch VII nach 8 tägigem Stehen bei 5° ist dasselbe Verhalten wie bei den früher aufgeführten Versuchen zu sehen, nämlich ein Sinken in formoltitrierbarem Stickstoff, das in beiden Versuchen 0,56% beträgt, und ein Sinken in dem durch Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoff; dies beträgt beim Versuch auf Tabelle VI 1,7% und beim Versuch auf Tabelle VII 1,6%.

Bei den auf Tabellen VIII und IX aufgeführten Versuchen ist die Pepsinmenge variiert. Mit geringerer Menge Pepsin — Tabelle VIII — dauert die Koagulation länger, mit größerer Menge Pepsin — Tabelle IX — ist die Koagulation schon im Laufe von 3 Stunden beendet. Übrigens ist hier ein gleiches Sinken der Zahlen wie bei den früher erwähnten Versuchen zu finden.

Bei Formoltitrirung ein Sinken von 0,56^o/_o auf Tabelle VIII
und 0,56^o/_o auf Tabelle IX.

Bei Gerbsäurefällung ein Sinken von 2,8^o/_o auf Tabelle VIII
und 1,5^o/_o auf Tabelle IX.

Tabelle VIII.

120 g Witte-Pepton + 300 ccm ¹/₅-n-Salzsäure + ¹/₂ g Pepsin.

	Formol- titrirung: ccm ¹ / ₅ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	5,4	21,6	Flüssig
Nach 1 tägigem Stehen bei 37°	5,4	20,1	Gallerte
2	5,3	19,9	Unbewegl. Gallerte
3	5,2	19,7	
4	5,3	19,4	
5	5,2	19,5	
9	5,2	18,8	
7 wöchigem	5,3	18,8	

Tabelle IX.

120 g Witte-Pepton + 300 ccm ¹/₅-n-Salzsäure + 6 g Pepsin.

	Formol- titrirung: ccm ¹ / ₅ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	5,8	22,4	Flüssig
Nach 3 stündig. Stehen bei 37°	5,7	21,0	Unbewegl. Gallerte
1 tägigem	5,7	20,8	
2	5,7	21,2	
3	5,6	20,9	
4	5,7	20,9	
5	5,6		
9	5,6		

Tabelle X.

2%ige Lösung vom Witte-Pepton in 5 Wochen mit Pepsin-Salzsäure verdaut. Zu ca. 30% eingedampft, indem so viel der Salzsäure neutralisiert wurde, daß die Lösung $\frac{1}{5}$ -n sauer war. Dann Zusatz von Pepsin:

	Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	10.0	46.1	Flüssig und klar
Nach 1tägigem Stehen bei 37°	9.5	40.7	} Flüssig. große Ausfällung.
2 » » » »	9.4	39.9	
3 » » » »	9.4	39.9	
6 » » » »	9.3	40.0	

Tabelle XI.

2%ige Lösung vom Witte-Pepton in 1 Woche mit Pepsin-Salzsäure verdaut. Zu ca. 30% eingedampft, indem so viel der Salzsäure neutralisiert wurde, daß die Lösung $\frac{1}{5}$ -n sauer war. Dann Zusatz von Pepsin.

	Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	8,5	42,7	Flüssig und klar
Nach 1tägigem Stehen bei 5°	8,3	41,4	Flüssig und opalisierend
Wird nun bei 37° gestellt			
Nach 1tägigem Stehen bei 37°	8,2	36,0	Flüssig, große Ausfällung
2 » » » »	8,1	35,6	Desgl.
4 » » » »	8,1	34,5	
8 » » » »	8,1	—	
11 » » » »	8,2	34,6	

Bei den in Tabellen X und XI aufgeführten Versuchen ist pepsinverdautes Witte-Pepton verwendet. Die Mischungen sind auf folgende Weise zubereitet: 60 g Witte-Pepton wurden

in 1500 ccm destilliertem Wasser gelöst; die Lösung 1 Stunde auf dem kochenden Wasserbad erwärmt und filtriert. Zu dem Filtrate fügte man nach Abkühlung 180 ccm 1-n-Salzsäure, 2 g Pepsin und destilliertes Wasser zu 3000 ccm. Nach 5wöchigem Stehen (bei Versuch XI nach 1wöchigem Stehen) bei 37° im Thermostaten wird die Lösung nach Zusatz von 150 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH zu 210 g eingedampft. Hierin wurden nach Abkühlung 1 $\frac{1}{2}$ g Pepsin gelöst und nach Zusatz von Toluol die erste Probe zur Untersuchung genommen. Der Rest wird in den Thermostaten (oder bei 5°) gestellt. Der hier zum Versuch über die Plasteinbildung verwendete Stoff ist also stärker abgebaut als gewöhnliches Witte-Pepton. Irgend eine Koagulation der Mischungen kam nicht vor, aber in beiden Fällen eine große Fällung. Die Formoltitrierungen und Gerbsäurefällungen zeigen eine ähnliche, jedoch größere Änderung als bei den früher erwähnten Versuchen. Auf Tabelle X ist das Sinken bei Formoltitrierung 1,96%, bei Gerbsäurefällung 6,1%; auf Tabelle XI ist das Sinken in formoltitrierbarem Stickstoff 1,12% und bei Gerbsäurefällung 8,1%.

Tabelle XII.

2%ige saure Caseinlösung in 5 Wochen mit Pepsinsalzsäure verdaut. Zu ca. 30% eingedampft, indem so viel Salzsäure neutralisiert wurde, daß die Lösung $\frac{1}{5}$ -n sauer war. Dann Zusatz von Pepsin.

	Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	9.7	43.2	Flüssig, nicht klar
Nach 1tägigem Stehen bei 37°	9.5	42.8	Flüssig, deutlich Ausfällung
2 » » » »	9.4	41.8	Desgl.
4 » » » »	9.3	41.0	»
7 » » » »	9.3	39.6	»
8 » » » »	9.4	—	»
18 » » » »	9.3	—	»
4wöchigen » » » »	9.3	40.0	»

Bei dem Versuch auf Tabelle XII ist pepsinverdautes Casein verwendet. Die Mischung wurde auf ähnliche Weise wie pepsinverdautes Witte-Pepton angefertigt. Der Versuch zeigt nach der Plasteinbildung ein Sinken bei Formoltitrierung von 1,12‰; bei Gerbsäurefällung ist das Sinken 3,2‰. Die Mischung koagulierte nicht.

Tabelle XIII.

Eine 10‰ige Lösung vom Witte-Pepton wurde mit gleichem Volumen 96‰igen Alkohols gefällt. Das Filtrat Alkohol abgedampft und zu ca. 30‰ eingedampft. Hierzu wurde so viel 1-n-Salzsäure gefügt, daß die Lösung $\frac{1}{5}$ -n sauer war, und nun Pepsin zugesetzt.

	Formol- titrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaCl pro 100 mg N	Gerbsäure- fällung: Nicht fällbar N (mg) pro 100 mg N	Physikalische Änderungen
Sogleich bestimmt	6,2	26,9	Flüssig und klar
Nach 1 tägigem Stehen bei 37°	5,9	23,3	Flüssig, große Ausfällung
3 » »	5,8	21,1	Desgl.
10 » »	5,8	—	

Beim Versuch auf Tabelle XIII ist ein Stoff verwendet, der durch Fällen einer 10‰igen Witte-Peptonlösung mit gleichem Volumen 96‰igen Alkohols dargestellt ist. Das Filtrat wird eingedampft und nach Zusatz von Salzsäure und Pepsin zur Plasteinbildung benutzt. Der Stoff enthält 78,3‰ peptidgebundenen Stickstoff¹⁾, eine Zahl, die nur ein wenig niedriger ist als die entsprechende Zahl für gewöhnliches Witte-Pepton, das ca. 81‰ peptidgebundenen N enthält. Bei Stehen im Thermostaten entstand eine starke Fällung, aber keine Koagulation. Die Zahlen zeigen bei Formoltitrierung ein Sinken von 1,12‰, bei Gerbsäurefällung ein solches von 5,8‰.

Aus den oben mitgeteilten Versuchsergebnissen ist zu ersehen, daß mit der Plasteinbildung gleichzeitig eine Änderung des formoltitierbaren Stickstoffs und des mit Gerbsäure fäll-

¹⁾ V. Henriques und I. K. Gjaldbæk. Diese Zeitschrift. Bd. LVII.

baren Stickstoffes vorgeht. Der formoltitrierbare Stickstoff nimmt bei der Plasteinbildung ab, während der mit Gerbsäure fällbare Stickstoff zunimmt. Der Übersichtlichkeit wegen sind nachfolgend die Änderungen bei den oben mitgeteilten Versuchen gesammelt aufgeführt und in % des Gesamtstickstoffes ausgerechnet.

Versuchsnummer	Sinken im formoltitrierbaren Stickstoff in % vom Gesamt-N	Sinken in dem mit Gerbsäure nicht fällbaren N in % vom Gesamt-N	Versuchsnummer	Sinken im formoltitrierbaren Stickstoff in % vom Gesamt-N	Sinken in dem mit Gerbsäure nicht fällbaren N in % vom Gesamt-N
I. Witte-Pepton	0.84	—	X. Pepsin-verdautes W.-Pepton	1.96	6.1
II. do.	0.56	2.8	XI. do.	1.12	8.1
III. do.	0.84	—	XII. Pepsin-verdautes Casein	1.12	3.2
IV. do.	0.84	2.2	XIII. Alkohol-verdautes U-Pepton	1.12	5.2
V. do.	0.56	1.8			
VI. do.	0.56	1.6			
VII. do.	0.56	1.7			
VIII. do.	0.56	2.8			
IX. do.	0.56	1.5			

In den ersten 9 Versuchen, wozu gewöhnliches Witte-Pepton verwendet wurde, ist das Sinken im formoltitrierbaren Stickstoff durchschnittlich 0,65%: in dem mit Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoff ist das Sinken durchschnittlich 2,1%. In den übrigen Versuchen ist der Ausschlag größer, nämlich für die Formoltitrierung von 1,12—1,96% und für die Gerbsäurefällung von 3,2—8,1%. In allen Versuchen zeigen also die Formoltitrierungen und Gerbsäurefällungen eine Veränderung in der Richtung einer Synthese. Die Versuchsergebnisse sprechen also dafür, daß die Plasteinbildung ein synthetischer Prozeß ist; indessen ist ein Verhalten, das zuerst in Betracht gezogen werden muß und zwar, daß bei der Plasteinbildung ein Stoff ausgefällt wird. Wir werden nachstehend diese Seite der Sache betrachten, sowohl was Gerbsäurefällung als Formoltitrierung betrifft.

Mit Rücksicht auf die Gerbsäurefällung könnte eine Vermehrung des mit Gerbsäure fällbaren Stickstoffes dadurch ent-

stehen, daß etwas von dem nicht fällbaren Stickstoff durch die Plasteinbildung ausgefällt wurde, z. B. durch einen Koagulationsprozeß, ohne daß der ausgefällte Stoff übrigens irgend eine wesentliche chemische Veränderung erlitt. Inwiefern eine solche Veränderung bei der Plasteinbildung vorgeht, läßt sich durch Hilfe der angestellten Versuche nicht bestimmen; ganz unwahrscheinlich ist es somit nicht, daß solche Koagulationsprozesse nebenbei und unabhängig eines gleichzeitig vorgehenden synthetischen Prozesses verlaufen können.

Was die Formoltitrierung betrifft, so wird das ausgefällte Plastein nur teilweise bei der Formoltitrierung gelöst: es ist deshalb die Möglichkeit vorhanden, daß die Ausfällung selbst ein Sinken des formoltitierbaren Stickstoffes bewirken wird — also das, was die Versuche zeigen —, denn selbst wenn das ausgefällte Plastein annehmlich bei der Formoltitrierung reagiert, so ist nicht zu erwarten, daß es quantitativ reagiert. Bevor wir deshalb den Schluß zu ziehen berechtigt sind, daß das Sinken in formoltitierbarem Stickstoff von einem synthetischen Prozeß herrührt, müssen wir zeigen, daß die oben erwähnte Ausfällung entweder keine Bedeutung bekommt oder jedenfalls einen Fehler bewirkt, der geringer ist als die durch die Formoltitrierung gefundenen Ausschläge.

Wir suchten zuerst den Fehler dadurch zu vermeiden, daß wir zu der formoltitierenden Mischung soviel $\frac{1}{5}$ -NaOH fügten, daß das Plastein sich löste, hiernach Formol und zuletzt Zurücktitrierung mit $\frac{1}{5}$ -n-HCl. Da indessen hierbei in einzelnen Fällen unverhältnismäßig viel $\frac{1}{5}$ -NaOH erforderlich war und selten eine klare Lösung vorkommt, selbst wenn sich ein Teil des Plasteins löst, gaben wir dieses Verfahren auf und gingen zur Filtrierung der Mischung über und unternahmen die Formoltitrierung im Filtrat und im Plastein je für sich. Die Formoltitrierung im Plastein geschah auf die Weise, daß das Plastein in einer bestimmten Menge $\frac{1}{5}$ -NaOH gelöst und, nachdem Formol zugefügt war, zuletzt mit $\frac{1}{5}$ -n-HCl zurücktitriert wurde. Hierdurch erzielten wir die Formoltitrierung in klaren Lösungen zu vollführen und vermieden folglich den

erwähnten Versuchsfehler. Um nun den gesamten Formoltiter zu berechnen, bestimmten wir, wieviel vom Gesamt-N als Plastein ausgefällt war. Dies geschah teils durch Bestimmung des N-Inhaltes in 10 ccm der aufgeschlemmten Verdauungsflüssigkeit und teils in 10 ccm des Filtrates hiervon. Bevor wir die auf diese Weise gewonnenen Versuchsergebnisse erwähnen, bemerken wir, daß in einer wässerigen Aufschlemmung des ausgewaschenen Plasteins 92% davon bei der Formoltitrierung reagiert, was aus nachstehenden Versuchen hervorgeht.

1. 50 ccm einer Aufschlemmung des Plasteins in Wasser verbrauchten im aufgeschlemmten Zustand bei Formoltitrierung 4,6 ccm $\frac{1}{5}$ -NaOH.

2. Zu 50 ccm derselben Aufschlemmung wurden 6 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH gefügt; hierbei löste sich das Plastein; nach Zusatz von Formol zu dieser klaren Lösung sind zur Zurücktiterung 1,0 ccm $\frac{1}{5}$ -n-HCl erforderlich.

Hieraus ist zu ersehen, daß 92% des Plasteins im aufgeschlemmten Zustand bei Formoltitrierung reagiert.

Zum Verständnis der Tabelle XIV sollen folgende Bemerkungen dienen.

Die verwendeten Mischungen zu dem obengenannten Versuche waren, da sie in den Thermostaten gestellt wurden, klare Lösungen, die mit Wasser klar gemischt werden konnten. Die Konzentration von Stoff, Salzsäure und Pepsin war die gewöhnliche. Betreffend die pepsinverdauten Stoffe wurde die Pepsinverdauung der Stoffe in schwefelsaurer Flüssigkeit bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-\frac{1}{2} \cdot 1 \cdot 5}$ vorgenommen; bei 37° entfaltete das Pepsin nämlich seine Optimalwirkung durch diese Wasserstoffionenkonzentration.¹⁾ Nach Abschluß der Verdauung wurde filtriert und das Filtrat eingedampft, nachdem die Schwefelsäure mit Baryumhydroxyd entfernt war. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde kolorimetrisch mit Tropäolin 00 und Glycin-Salzsäure nach der von S. P. L. Sörensen¹⁾ ausgearbeiteten Methode gemessen, indem wir die Unannehmlichkeit, die die genuinen Proteinstoffe bei der Bestimmung verursachen, dadurch vermieden, daß wir zuerst

¹⁾ S. P. L. Sörensen, Enzymstudien, Biochem. Zeitschrift, Bd. XXII.

Tabelle XIV.

Der zur Plasteinbildung angewandte Stoff	Versuchsnummer	Die Bedingungen der Plasteinbildung	Formolfraktionierung pro 100 mg N Verbrauchte Anzahl cem 1/2-n-NaOH				Die Größe der Plasteinbildung in % des Total-N	Der berechnete Formolfraktionfilter des Bodensatzes	Physikalische Änderungen
			Saure Ausreibung	Neutrale Ausreibung	Filterat	Plastein			
Witte- Pepton	1	Sogleich 24 Stunden bei Zimmer- temperatur	6.0	5.2	—	—	13.4	—	Klare Lösung Gallerle
Witte- Pepton	2	Sogleich 24 Stunden bei 37°	5.7	5.2	—	—	—	—	Klare Lösung Gallerle
Pepsinver- dautes Witte- Pepton	3	Sogleich 72 Stunden bei 37°	8.9	7.3	—	—	—	—	Klare Lösung Große Ausfällung, aber noch flüssig
Pepsin- verdautes Gasein	4	Sogleich 48 Stunden bei 37°	11.2	8.1	—	—	—	—	Klare Lösung Gallerle
Pepsin- verdautes Hühnerweiß	5	Sogleich 48 Stunden bei 37°	11.2	8.2	—	—	—	—	Klare Lösung Gallerle
Pepsin- verdautes Plastein aus Witte-Pepton	6	Sogleich 72 Stunden bei 37°	13.0	9.7	—	—	—	—	Klare Lösung Große Ausfällung, aber noch flüssig
			12.0	8.7	10.2	5.8	27.6	9.0	

24 Stunden in ca. $\frac{1}{5}$ -n-Schwefelsäure verdauten; dann wurde die Wasserstoffionenkonzentration bestimmt und danach soviel normale Schwefelsäure zugefügt, daß die Mischung die günstigste Wasserstoffionenkonzentration hatte.

Die in Rubrik 1 aufgeführten Zahlen sind auf dieselbe Weise gewonnen wie die in den oben erwähnten Versuchen, also durch Formoltitrierung in einer sauren Zerreibung ohne Neutralisierung, wobei ein möglicher Neutralisationsfehler vermieden wird. Diese Bestimmungen sind vorgenommen, um als Vergleich mit den übrigen Zahlen zu dienen.

Die Zahlen in Rubrik 2 sind dadurch gewonnen, indem die Formoltitrierung in einer Ausreibung vorgenommen wurde, nachdem diese erst neutralisiert war. Daraus läßt sich sehen, daß hier ein ähnliches Sinken der Zahlen zu finden ist wie in Rubrik 1.

In den Rubriken 3 und 4 sind die Zahlen aufgeführt, die bei Titrierung der zur Bestimmung der Zahlen in Rubrik 2 verwendeten Flüssigkeit, beziehungsweise im Filtrat und im Plastein selbst gefunden wurden. Alle Zahlen geben die verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N an.

In Rubrik 5 ist aufgeführt, wieviel vom Gesamtstickstoff zu Plastein umgebildet wurde.

In Rubrik 6 ist der durch Berechnung der Zahlen in den Rubriken 3—4 und 5 gefundene Formoltiter angegeben.

Die Zahlen in den Rubriken 2 und 6 sollen also einander entsprechen, doch mit dem Unterschied, der dadurch entstehen wird, daß die Zahlen in Rubrik 2 mit einem Versuchsfehler behaftet sind, der davon herrührt, daß das Plastein bei der Formoltitrierung nicht vollständig gelöst gewesen ist.

Als Beispiel für die Berechnung der Zahlen in Rubrik 6 wird folgendes angeführt, das für Versuch I auf Tabelle XIV gilt.

In 100 mg N von der neutralen Ausreibung wurden bei Formoltitrierung 5,0 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH verbraucht.

In 100 mg vom Filtrate derselben Ausreibung wurden bei Formoltitrierung 5,2 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH verbraucht.

In 100 mg N vom Plastein, das vom Nutschefilter abgesaugt und mit ein wenig Wasser ausgewaschen wurde, ist bei Formoltitrierung 3,55 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH verbraucht worden.

Im Filtrate sind 86,6% vom Stickstoffinhalt der Ausreibung vorhanden.

Im Plastein fanden sich 13,4% vom Stickstoffinhalt der Ausreibung.

Folglich ist der berechnete Formoltiter

$$5,2 \cdot 0,866 + 3,55 \cdot 0,134 = 5,0 \text{ ccm } \frac{1}{5}\text{-n-NaOH.}$$

Hier ist also kein Unterschied der Zahlen in den Rubriken 2 und 6, zu finden.

Eine Berechnung des Fehlers, womit die Zahl in Rubrik 2 behaftet sein sollte, zeigt sich auch geringer zu sein, als der Versuchsfehler bei der Titrierung selbst.

Da 8% des Plasteins in wässriger Aufschlemmung nicht reagiert, so ist der berechnete Fehler für die Zahl in der Rubrik 2: $3,55 \cdot 0,08 \cdot 0,134 = 0,04 \text{ ccm } \frac{1}{5}\text{-NaOH.}$

Der Fehler hat also bei Verwendung gewöhnlichen Wittepeptons keine Bedeutung.

Wird der Fehler auf dieselbe Weise bei den Versuchen 5 und 6 berechnet, so ist er

$$\text{in Versuch 5: } 4,7 \cdot 0,285 \cdot 0,08 = 0,11$$

$$6: 5,8 \cdot 0,276 \cdot 0,08 = 0,13.$$

Bei Versuch 2, 3 und 4 ist der Fehler wie bei Versuch 1 geringer als der Versuchsfehler bei der Titrierung selbst. Aus diesen Zahlen ist zu ersehen, daß der Fehler, der dadurch eingeführt wurde, daß das Plastein bei der Formoltitrierung nicht vollständig gelöst war, in den 4 ersten Versuchen auf Tabelle XIV keine Bedeutung hat. Bei den Versuchen 5 und 6 dagegen ist dieses Verhältnis nur von geringer Bedeutung. Die Zahlen in Rubrik 6 beweisen ebenfalls dieses Verhalten.

Nachstehend ist das Sinken in formoltitierbarem Stickstoff angegeben, das bei der Plasteinbildung stattgefunden hat. Es ist nach den Zahlen in Rubrik 1 ausgerechnet; bei Versuch 5 und 6 ist eine Korrektur von $\div 0,1 \text{ ccm } \frac{1}{5}\text{-n-NaOH}$ eingeführt.

Versuch I	ein Sinken im formoltitierbaren Stickstoff von	0.56%
II	»	0.56%
III	»	1.12%
IV	»	1.12%
V	»	1.96%
VI	»	2.36%

Daraus ist zu ersehen, daß der Ausschlag am größten ist in den Fällen, wo pepsinverdaute Stoffe verwendet sind (Versuche III, IV, V und VI), und namentlich bei Versuch VI, wo ein Stoff verwendet wurde, der durch Pepsinverdauung eines Plasteinpräparates gewöhnlichen Witte-Peptons gewonnen war, findet sich ein bedeutendes Sinken in formoltitrierbarem Stickstoff.

Vergleicht man in dem Stoff, von welchem man ausging, die Mengen des formoltitrierbaren Stickstoffes mit denen in dem Plastein und Filtrat, so ist zu ersehen, daß in jedem Fall das Plastein weniger und das Filtrat mehr formoltitrierbaren Stickstoff enthält als der ursprüngliche Stoff. Dies sagt wieder, daß namentlich zur Plasteinbildung die kompliziertest gebauten Stoffe verwendet werden.

Tabelle XV.

Zur Plasteinbildung wurde eine klare Lösung von Witte-Pepton angewandt.

Versuchsbedingungen	Aktive Pepsinlösung				Inaktive Pepsinlösung	
	Formoltitrierung in äquivalenten Mengen von			Physikalische Änderungen	Formoltitrierung: ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH	Physikalische Änderungen
	Ausreibung	Filtrat	Plastein			
Sogleich	10.4	—	—	Klare Lösg.	10.4	Klare Lösg.
24 Stunden bei 5°	10.4	—	—	do.	10.45	do.
24 „ 37°	10.15	—	—	Gallerte	10.45	do.
72 „ 37°	—	8.65	1.35	do.	—	—
1½ „ 60°	10.2	9.35	0.9	do.	—	—
24 „ 60°	10.0	—	—	do.	10.35	do.
24 „ 70°	9.9	8.8	1.25	do.	—	—

Die in Tabelle XV aufgeführten Versuche, wo zur Plasteinbildung eine klare Witte-Peptonlösung verwendet wurde, sind bei verschiedenen Temperaturen angestellt worden. Zugleich wurde hier ein Kontrollversuch mit einer inaktivierten Pepsinlösung vorgenommen. Die Versuche wurden auf eine etwas andere Weise ausgeführt als bei den oben aufgeführten Ver-

suchen. In eine Reihe 200 ccm-Meßkolben wurden 15 ccm einer salzsauren Witte-Peptonlösung $\frac{1}{5}$ 5 ccm einer salzsauren 1%igen Pepsinlösung gebracht; diese war in einigen Fällen erst durch eine Stunde Erwärmung auf dem siedenden Wasserbade inaktiviert worden. Bei zwei der Proben wurde sofort Formoltitrierung vorgenommen, indem der Inhalt der Kolben mit ausgekochtem destilliertem Wasser zu 200 ccm gemischt und in 50 ccm hiervon titriert wurde. Die übrigen Kolben werden bei verschiedenen Temperaturen hingestellt und nach der in den Tabellen aufgeführten Zeit zur näheren Untersuchung durch Formoltitrierung herausgenommen, indem der Inhalt mit ausgekochtem Wasser zu 200 ccm gemischt wird. Die Zahlen in Rubrik 1 sind durch Titrierung in einer solchen Aufschlemmung gewonnen und das Plastein ist hier in aufgeschlemmtem Zustand gegenwärtig gewesen. Die Zahlen in den Rubriken 2 und 3 geben den Formoltiter in äquivalenten Mengen des Filtrates und Plasteins an und wurden auf folgende Weise gewonnen: der Inhalt des Kolbens wird mit gekochtem, destilliertem Wasser zu 200 ccm gemischt und die Mischung filtriert; das abfiltrierte Plastein wird mit Wasser ausgewaschen und Filtrat und Waschwasser mit ausgekochtem Wasser zu 300 ccm verdünnt; in 75 ccm dieser Mischung wurde dann die Formoltitrierung vorgenommen (siehe die Zahlen in Rubrik 2). Das ausgewaschene Plastein wurde auf dem Filter in 10 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH gelöst, und der Filter mit 40 ccm Wasser ausgewaschen; in dieser hierbei gewonnenen Lösung des Plasteins wurde durch Zurücktitrierung mit $\frac{1}{5}$ -n-HCl formoltitriert. Da der hierdurch gewonnene Formoltiter vom Plastein in 200 ccm herrührt, wurde die Titerzahl mit 4 dividiert (siehe die Zahlen in Rubrik 3).

Die Zahlen in Rubrik 2 + die in Rubrik 3 sollen also denen in Rubrik 1 entsprechen. Daraus ist zu sehen, daß auch hier bei der Plasteinbildung ein Sinken in formoltitierbarem Stickstoff vorgegangen ist, sei es, daß man mit den durch direkte Titrierung in der Aufschlemmung gewonnenen Zahlen rechnet oder mit Zahlen, gewonnen durch Titrierung je im Filtrate und Plastein für sich. Bei 5° ist nach Verlauf von

24 Stunden keine meßbare Veränderung des formoltitrierbaren Stickstoffes vor sich gegangen (vgl. die Tabellen VI und VII), doch konnte die noch flüssige Mischung mit Wasser nicht klar gemischt werden. Bei 37° findet sich nach 24 Stunden wie gewöhnlich Plasteinbildung und Sinken in formoltitrierbarem Stickstoff. Bei 60° und 70° sind die Lösungen nach 1½ Stunden koaguliert und gleichzeitig ist ein Sinken in formoltitrierbarem Stickstoff zu bemerken. Mit Rücksicht auf die Versuche bei diesen Temperaturen soll erwähnt werden, daß die Witte-Pepton- und Pepsinlösung, je für sich zu der angegebenen Temperatur, bevor die Mischung stattfand, erwärmt wurden. Es ist hieraus zu sehen, daß die Plasteinbildung selbst bei 70° verläuft und wie es nach den hierüber angestellten, übrigens nur wenigen Versuchen scheint, sogar schneller als bei 37°. Wir fügen der Vollständigkeit wegen hinzu, daß sich die Koagulation schon nach 1 Stunde eingestellt hatte, und daß die Mischung schon nach ½ Stunde dickflüssiger geworden war und Plastein ausgeschieden hatte.

Wir haben hiermit die Versuche über die Plasteinbildung selbst abgeschlossen und bemerken schließlich nur, daß wir uns natürlich davon überzeugt haben, daß weder eine Pepsinlösung, noch eine Witte-Peptonlösung beim Stehen im Thermostaten seinen Formoltiter verändert.

II.

In den oben angestellten Versuchen haben wir nachgewiesen, daß bei der Plasteinbildung wahrscheinlich ein synthetischer Prozeß vor sich geht. Wenn dies der Fall ist, muß man erwarten, daß das gebildete Plastein den genuinen Proteinstoffen näher steht als das Ausgangsmaterial. In der Einleitung ist erwähnt, wie die verschiedenen Verfasser gefunden haben, daß das Plastein die verschiedenen Reaktionen der Proteinstoffe gibt; dagegen wird indessen angeführt, daß dieses Verhalten möglicherweise davon herrührt, daß das Plastein sich von dem Stoff, von welchem man ausging, nicht vollständig auswaschen läßt, und in einem früheren, von Bayer dargestellten Plasteinpräparat vermißt man die Proteinstoffreaktionen.

Für die von uns vorgenommenen Untersuchungen über die chemische Natur des Plasteins diente zur Grundlage, daß, je komplizierter die Proteine gebaut sind, desto mehr peptidgebundenen Stickstoff müssen sie enthalten, oder was dasselbe ist — desto geringer formoltitrierbaren Stickstoff müssen sie haben. In einer früheren Abhandlung¹⁾ haben wir bei Anwendung der Formoltitrierung und Ammoniakbestimmung vor und nach der totalen Hydrolyse mit Säure eine Methode zur Bestimmung der Menge des peptidgebundenen Stickstoffes in den Proteinstoffen oder ihren Spaltungsprodukten angegeben. Diese Methode ist namentlich geeignet zu entscheiden, ob ein säuregespalteter oder fermentverdauter Proteinstoff ganz abgebaut ist oder nicht. Wenn es sich um die mehr kompliziert gebauten Proteine handelt, so erhält man eine Vorstellung von ihrem Bau durch Untersuchung der Prozentmenge ihres Gesamtstickstoffes, die formoltitriert werden kann, indem man von einer lackmusneutralen Lösung ausgeht. Auf diese Weise haben wir das Plastein untersucht und zum Vergleich dieselben Bestimmungen vorgenommen, teils in einigen Proteinstoffen und teils in einigen Spaltungsprodukten der Proteinstoffe.

Tabelle XVI.

Zur Formoltitrierung wurde eine lackmusneutrale Lösung angewandt von	Gehalt an formoltitrierbarem N in % des Total-N ausgedrückt
Edestin gelöst in gesättigter NaCl-Lösung . . .	2.8
Trockenes Hühnereiweiß	6.1
Alkalische Caseinlösung neutralisiert mit Salzsäure	11.9
Fibrinogen von Pferdeblut	7.1
Fibrinoglobulin » »	5.3
Serumglobulin » »	6.8
Serumalbumin » »	9.1
Witte-Pepton	14.4
Pepton Roche	36.4

Aus obenstehender Tabelle XVI ist zu ersehen, daß Hühnereiweiß nebst einigen Proteinstoffen von Blut 5—7% formol-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXVII.

Tabelle XVII.

Der zur Untersuchung vorliegende Stoff	Ver- suchs- num- mer	Formoltitrierung in 4 Stadien. Pro 100 mg N wurden verbraucht x ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH x =				Kontrolle. Pro 100 mg N x ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH x =	Gehalt an formoltitrier- barem N in des Total-N ausgedrückt
		1	2	3	4		
		Trockenes Hühnereiweiß	1	0,20	0,40		
Pepsinverdautes Hühner- eiweiß	2	3,50	4,22	7,34	7,59	0,09	$(7,59 \div 0,09)$ $\times 2,8 = 21,0$
Edestin gelöst in gesättigter NaCl-Lösung	3	0,53	0,59	0,99	1,07	0,04	$(1,07 \div 0,04)$ $\times 2,8 = 2,9$
Handelsgelatine	4	0,28	0,36	1,35	1,42	0,07	$(1,42 \div 0,07)$ $\times 2,8 = 3,8$
Casein	5	1,41	1,55	3,24	3,52	0,14	$(3,52 \div 0,14)$ $\times 2,8 = 9,5$
Pepsinverdautes Casein	6	3,26	3,83	7,38	7,52	0,08	$(7,52 \div 0,08)$ $\times 2,8 = 20,8$
Schwefelsäurespaltungs- produkt von Casein	7	2,64	3,74	24,83	25,49	0,22	$(25,49 \div 0,22)$ $\times 2,8 = 70,8$
Witte-Pepton	8	2,25	2,52	4,86	5,05	0,09	$(5,05 \div 0,09)$ $\times 2,8 = 13,9$
Witte-Pepton, abdestilliert Ammoniak	9	2,43	2,69	4,77	4,95	0,09	$(4,95 \div 0,09)$ $\times 2,8 = 13,6$
Pepsinverdautes Witte-Pepton	10	3,52	3,89	7,00	7,13	0,06	$(7,13 \div 0,06)$ $\times 2,8 = 19,8$
Plastein von Witte- Pepton	11	1,47	1,67	3,13	3,25	0,10	$(3,25 \div 0,1)$ $\times 2,8 = 8,8$
Filtrat von Plastein Nr. 11	12	2,50	2,73	5,38	5,57	0,10	$(5,57 \div 0,1)$ $\times 2,8 = 15,3$
Plastein von pepsin- verdaulichem Witte-Pepton	13	2,31	2,50	4,04	4,13	0,10	$(4,13 \div 0,1)$ $\times 2,8 = 11,3$
Filtrat von Plastein Nr. 13	14	3,09	3,51	7,53	7,73	0,10	$(7,73 \div 0,1)$ $\times 2,8 = 21,4$
Plastein von pepsin- verdaulichem Hühnereiweiß	15	2,53	2,88	4,37	4,71	0,11	$(4,71 \div 0,11)$ $\times 2,8 = 12,9$
Filtrat von Plastein Nr. 15	16	3,40	4,20	8,40	8,70	0,20	$(8,7 \div 0,2)$ $\times 2,8 = 23,8$
Plastein von pepsin- verdaulichem Casein	17	2,35	2,65	3,88	3,98	0,10	$(3,98 \div 0,1)$ $\times 2,8 = 10,9$
Filtrat von Plastein Nr. 17	18	3,22	3,81	8,30	8,48	0,08	$(8,48 \div 0,08)$ $\times 2,8 = 23,5$
Plastein von pepsin- verdaulichem Plastein von Witte-Pepton	19	2,88	3,14	4,49	4,74	0,13	$(4,74 \div 0,13)$ $\times 2,8 = 12,9$

Verhalten anders. Hier wird nämlich das 2. Stadium von schwach zu stark roter Farbe mit Phenolphthalein (ohne Formol) sehr lang im Vergleich mit dem 1. Stadium sein. Haben wir mit Salzen schwacher Säuren mit schwachen Basen zu tun, oder mit komplizierter gebauten Stoffen, die sowohl den Charakter schwacher Säuren als schwacher Basen haben, so werden wir also sowohl das erste wie zweite Stadium bei der Titrierung sehr lang finden. Betreffend Titrierung der Polypeptide liegt in der Literatur nur ein einzelnes Dipeptid untersucht vor, nämlich das Glycylglycin.¹⁾ Es zeigte sich hier, daß sowohl das 1. wie 2. Stadium sehr lang, während das 3. und 4. Stadium sehr kurz war.

Betrachten wir mit diesen Verhältnissen in mente Tabelle XVII, so finden wir, daß die verschiedenen genuinen Proteinstoffe einen ausgeprägten Unterschied von einander zeigen. Aus den Tabellen ist somit zu ersehen, daß zwischen Casein und Hühnereiweiß ein großer Unterschied besteht. Für das Casein fällt ungefähr die Hälfte des Gesamtformoltiters im 1. Stadium, während nur ca. $\frac{1}{10}$ des Gesamtformoltiters im 1. Stadium fällt, wenn es sich um Hühnereiweiß handelt. Das Edestin gleicht betreffend die Stadien dem Casein, enthält aber bedeutend geringeren formoltitierbaren Stickstoff als sowohl Casein wie Hühnereiweiß. Leim liegt ungefähr in der Mitte zwischen Casein und Hühnereiweiß, enthält aber weniger formoltitierbaren Stickstoff als die beiden. Besonders charakteristisch zu sehen ist die Verschiebung, die zwischen den Stadien bei der Pepsinverdauung vorgeht. In pepsinverdautem Hühnereiweiß fällt somit ungefähr die Hälfte des Gesamtformoltiters im 1. Stadium (in allgemeinem Hühnereiweiß nur $\frac{1}{10}$). Bei den übrigen in der Tabelle aufgeführten Bestimmungen der pepsinverdauten Stoffe findet sich ungefähr dasselbe Verhalten. Bei stärkerer Spaltung z. B. bei säuregespalteten Stoffen ist das Verhalten wieder verändert. In einem Schwefelsäurespaltungsprodukt von Casein (der Stoff enthielt 8% peptidgebundenen Stickstoff) fielen nur $\frac{1}{10}$ des Gesamtformoltiters im 1. Stadium.

¹⁾ V. Henriques und S. P. L. Sørensen. Diese Zeitschrift. Bd. LXIII.

Daraus ersieht man, daß das 1. Stadium im Verhalten zum Gesamtformoltiter durch die vorwärtsschreitende hydrolytische Spaltung der Proteinstoffe verändert wird und zwar so, daß das 1. Stadium erst steigt und schließlich abnimmt. Die Erklärung dieses eigentümlichen Verhaltens ist sicher in folgendem zu suchen: Bei der Pepsinverdauung wird eine große Menge Polypeptide gebildet, die sich, wie angenommen werden muß, bei der Formoltitrierung auf ähnliche Weise wie das Glycylglycin verhalten, d. h. ein sehr wesentlicher Teil des Gesamtformoltiters wird im 1. Stadium fallen. Nach und nach, wenn die Hydrolyse vorwärts schreitet, werden von den Polypeptiden einzelne Aminosäuren gebildet, und haben wir mit säuregespalteten Proteinen zu tun, die hauptsächlich aus einer Mischung verschiedener Aminosäuren bestehen, während die Menge der Polypeptide verhältnismäßig gering ist, wird die Formoltitrierung sich dem Verhalten nähern, das bei Formoltitrierung von Glycin vorhanden ist, d. h. das 1. Stadium rückt wieder zurück, um nur ein geringerer Teil des gesamten Formoltiters zu werden.

In bezug auf die näheren Einzelheiten betreffend die Bestimmung sei folgendes angeführt:

Die Formoltitrierung wird für die in Wasser löslichen Stoffe — samt für den in gesättigter Chlornatriumlösung löslichen Stoff, Edestin — in einer lackmusneutralen Lösung vorgenommen. Der Umschlag auf dem Lackmuspapier war nicht in allen Fällen gleich gut, weshalb die Lösung nach Neutralisation gegenüber Lackmuspapier weiter auf eine Wasserstoffionenkonzentration von $10 \div 7.07$ eingestellt wurden und zwar mit Hilfe der Sörensenschen Phosphatmischungen und Azolithmin als Indikator. Die mit Lackmuspapier neutralisierten Lösungen waren in der Regel ein wenig saurer als die Phosphatmischung der Wasserstoffionenkonzentration $10 \div 7.07$: aber 10 ccm schlugen am oftsten mit einem Tropfen ($= 0,03$ ccm) $1/5$ -n-NaOH um. Wir gingen von den kolorimetrisch neutralisierten Mischungen aus.

In bezug auf das Casein und die Plasteinpräparate, die in Wasser ja unlöslich sind, gingen wir von einer alkalischen

Lösung aus, die wir Lackmuspapier gegenüber neutralisierten. Das Casein verblieb in Lösung, während das Plastein ausgefällt wurde. Die Caseinlösung wurde außerdem kolorimetrisch mit Azolithmin und Phosphatmischung eingestellt. In den so neutralisierten Lösungen oder Mischungen wurde die Formoltitrierung in 4 Stadien auf gewöhnliche Weise vorgenommen, indem zu stark roter Farbe titriert wurde. Das Plastein wurde während des 2. Stadiums vollständig gelöst und bei dem nachfolgenden Zusatz von Formol nicht ausgefällt.

Bei der Neutralisation der alkalischen Lösungen des Caseins und der Plasteinpräparate bemerkte man gleichzeitig den Säurecharakter der betreffenden Stoffe, indem nämlich eine alkalische Lösung zur Neutralisation weniger Säure braucht, als Natron zugefügt ist, was aus nachstehender Übersicht hervorgeht.

	Gesamt-N in mg	Die enthaltene Anzahl ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH	Für Neu- tralisation gebraucht ccm $\frac{1}{5}$ -HCl	Bemerkungen
Casein. Tabelle XVII, Nr. 5	71.0	5.0	4.0	Kein Fällen
Plastein. » » » 11	101.5	5.0	4.35	
» » » » 13	104.0	5.0	4.60	Fällen
» » » » 15	87.0	5.0	4.70	
» » » » 17	98.0	5.0	4.40	
» » » » 19	78.0	5.0	3.50	
Casein. » XVI . . .	55.2	4.0	3.6	Kein Fällen

Das Casein, Tabelle XVII Nr. 5, wurde durch kolorimetrische Einstellung mit Azolithmin und der Phosphatmischung neutralisiert. Das Casein, Tabelle XVI, und die Plasteinpräparate wurden Lackmuspapier gegenüber neutralisiert. Als Vergleich soll angeführt werden, daß das Casein, Tabelle XVII Nr. 5, bei der Neutralisation Lackmuspapier gegenüber 4,3 ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH verbrauchte.

Die Zahl, die für gegenwärtige Untersuchung besonders Interesse verdient, ist indessen der Prozentsatz des formoltitierbaren Stickstoffes der Plasteinpräparate. Wie man auf

Tabelle XVII sieht, enthalten die Plasteinpräparate von 8,8% bis 12,9% formoltitrierbaren Stickstoff. Als Vergleich hierzu sei angeführt, daß Hühnereiweiß 5,6%, Casein 9,5% und Witte-Pepton 13,3% formoltitrierbaren Stickstoff enthält. Hieraus geht hervor, daß die Plasteinpräparate nicht so kompliziert gebaut sind wie die genuinen Proteinstoffe, wenn auch in einzelnen Fällen (Nr. 11) nicht viel daran fehlt. Es ist ferner zu sehen, daß die verschiedenen Plasteinpräparate verschiedene Mengen formoltitrierbaren Stickstoff enthalten und zwar so, daß, je stärker abgebaut der zur Plasteinbildung verwendete Stoff gewesen ist, desto mehr formoltitrierbaren Stickstoff enthält das gebildete Plastein. Hieraus ist ersichtlich, daß die verschiedenen Plasteinpräparate jedenfalls nicht identisch sind, wenn auch, wie verschiedene Verfasser gezeigt haben, ihre elementare Zusammensetzung nicht viel variiert.

Aus den Versuchen über die Plasteinbildung selbst wird ersichtlich, daß nicht bei allen Versuchen Gelatinierung eintrat; mitunter wurde ein Stoff ausgefällt, ohne daß die Mischung gelatinierte. Dies war namentlich bei den stark abgebauten Stoffen der Fall. Bei einigen Versuchen geht also Gelatinierung der Lösung + Ausfällen eines Stoffes vor sich; bei anderen Versuchen dagegen nur ein Ausfällen; es scheint somit die Möglichkeit vorhanden, daß die Synthese etwas für sich und unabhängig von der Gelatinierung ist. Diese, die besonders eintritt, wenn vorwiegend kompliziert gebaute Stoffe verwendet werden, braucht also garnicht der Ausdruck einer Synthese zu sein, kann aber, möglicherweise von einem einfachen Koagulationsprozeß herrühren.

Wir haben in oben mitgeteilten Untersuchungen lediglich die Wirkung des Pepsins auf konzentrierte Lösungen peptischer Spaltungsprodukte untersucht. Fügt man Pankreatin zu einer ca. 40%igen Lösung des Witte-Peptons, so erstarrt die Lösung nach eintägigem Stehen bei 37° zu einer festen Gallerte, und bei einer nachfolgenden Mischung mit Wasser sieht man, daß sich ein in Wasser unlösbarer Stoff gebildet hat. Während des Prozesses ist indessen eine stark proteolytische Spaltung vor sich gegangen; ob hier der gebildete unlösliche Stoff das

Resultat eines synthetischen Prozesses ist, bietet deshalb besondere Schwierigkeiten dar, nachzuweisen.

Resumé.

Fügt man einer passenden salzsauren und konzentrierten Lösung peptischer Spaltungsprodukte Pepsin hinzu, so geht ein synthetischer Prozeß vor sich, dessen Umfang sich teils durch Gerbsäurefällung und teils namentlich durch Formoltitrierung messen läßt. Der Prozeß verläuft zwischen 5° und 70°. Der synthetisierte Stoff und die davon gebildete Menge ist nach dem Ausgangsmaterial verschieden; je stärker gespalten dieses gewesen ist, desto weniger kompliziert ist der Bau des synthetisierten Stoffes, aber in desto größerer Menge wird er gebildet. Er wird von den kompliziertesten gebauten Stoffen in der Mischung gebildet und enthält in einzelnen Fällen nicht viel mehr formoltitierbaren Stickstoff als die genuinen Proteinstoffe.