

Über den Gehalt des Darminhaltes einiger Säugetiere an freien Aminosäuren.

Von
Emil Abderhalden.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 14. August 1911.)

Bei den bisherigen Untersuchungen über das Vorkommen von Aminosäuren im Darminhalt wurde das Hauptgewicht auf ihren qualitativen Nachweis gelegt. Meist wurden ganz bestimmte Fragestellungen verfolgt und mit einzelnen Tieren, speziell Hunden, gearbeitet. Stets ließen sich Aminosäuren feststellen. Eine große Zahl der im Eiweiß vorhandenen Aminosäuren konnte einwandfrei nachgewiesen werden. Uns interessierte die Frage, in welchen Mengenverhältnissen sich die Aminosäuren im Darminhalt vorfinden. Wir verzichteten zunächst auf die Darstellung der reinen Aminosäuren und versuchten aus dem Inhalt des Darmes einer großen Anzahl von Individuen der gleichen Art alle krystallisierbaren Aminosäuren zu isolieren. Um zu einwandfreien Werten zu gelangen, mußten alle Methoden ausgeschaltet werden, die eine sekundäre Spaltung von Peptonen resp. Polypeptiden herbeiführen konnten. Vor allem aber mußte vermieden werden, daß nicht nach dem Tode der Tiere der Darminhalt der Fermentwirkung ausgesetzt war.

Unser Versuchsplan war folgender. Den frisch getöteten Tieren wurde sofort der Darm entnommen und seines Inhaltes entledigt. Diesen brachten wir direkt in einen Emailletopf, der mit Wasser gefüllt war. Nun wurde sofort aufgekocht. In manchen Fällen trugen wir den Darminhalt auch direkt in kochendes Wasser ein. Zwischen der Entnahme des Darm-inhaltes resp. der Tötung des Tieres und dem Aufkochen vergingen höchstens 2 Stunden. In den meisten Fällen konnte

die Fermentwirkung noch rascher unterbrochen werden. Wir gaben ferner zum Darminhalt sofort bei der Entnahme reichliche Mengen von Chloroform und Toluol, um die Fäulnisprozesse hintanzuhalten. Die großen Mengen dieser Zusätze dürften die Fermentwirkung auch stark gehemmt haben. Um während des Aufkochens eine Hydrolyse durch etwa vorhandene Säuren (Salzsäure) zu verhindern, prüften wir von Zeit zu Zeit die Reaktion und neutralisierten mit Soda resp. Essigsäure. Nun wurde durch ein Koliertuch filtriert. Den Filtrerrückstand kochten wir wiederum mit reichlich Wasser aus und filtrierten vom Ungelösten ab. Das Auskochen wurde solange wiederholt, bis eine Probe des Filtrates beim Eindampfen keinen Rückstand mehr hinterließ oder die Bestimmung des Stickstoffgehaltes ein negatives Resultat gab. Die vereinigten Filtrate wurden nunmehr unter stark vermindertem Druck bei ca. 40° des Wasserbades zur Trockene verdampft. Die Rückstände, die bei der Verarbeitung des Darminhaltes verschiedener Individuen der gleichen Tierart erhalten worden waren, wurden vereinigt und in Wasser gelöst. Zur Trennung der komplizierter gebauten Abbaustufen von den einfacheren benützten wir Phosphorwolframsäure. Es wurde mit einer 10%igen Lösung gefällt. Die Methode hat den Nachteil, daß alle sogenannten Diaminosäuren und auch einige Monoaminosäuren mitgefällt werden. Wir setzten die Phosphorwolframsäure zu der ca. 1% feste Substanz enthaltenden Lösung. Sobald eine Probe keine Fällung mehr gab, wurde filtriert. Den Rückstand preßten wir scharf ab, dann wurde er in Wasser suspendiert und in einer Flasche energisch geschüttelt. Dann wurde wieder filtriert. Dieser Prozeß wurde solange wiederholt, bis das Waschwasser farblos blieb und beim Verdampfen einer Probe sich kein Rückstand mehr ergab. Die gesamten Waschwässer wurden vereinigt, d. h. in mehreren Portionen, denn die Gesamtflüssigkeit belief sich bei den einzelnen Versuchen auf über 100 Liter. Nun wurde der Überschuß an Phosphorwolframsäure mit Baryt entfernt. Den überschüssigen Baryt fällten wir mit Schwefelsäure. Nachdem wir uns überzeugt hatten, daß die Lösung weder Schwefelsäure noch Baryt enthielt, verdampften wir die

gesamte Flüssigkeit in einer großen Schale, bis Krystallisation auftrat. Von Zeit zu Zeit wurde immer wieder geprüft, ob die Lösung frei von Schwefelsäure und Baryt war. Diese Kontrolle erwies sich als sehr zweckmäßig, denn wiederholt konnten in der sehr verdünnten Lösung weder Baryt noch Schwefelsäure nachgewiesen werden, während die konzentriertere Lösung doch Spuren von der einen oder anderen Verbindung aufwies. Wir vermieden so die Einwirkung konzentrierterer Lösungen von Baryt und Schwefelsäure. In den meisten Fällen erwies sich die Lösung dauernd frei von Baryt und Schwefelsäure.

Zeigte sich die erste Krystallisation, dann wurde die Lösung abgekühlt und nunmehr filtriert. Das Filtrat wurde weiter eingengt. So wurden durch fraktionierte Krystallisation so viel krystallinische Substanzen als möglich abgeschieden. Schließlich verblieb eine große Menge eines nicht weiter krystallisierenden Sirups. Es wurde versucht, aus ihm durch Alkohol bestimmte Substanzen, z. B. Prolin zu isolieren. Das Resultat war kein befriedigendes, weil sich sehr verschiedenartige Substanzen mitlösten. Dagegen gelang es, durch vorsichtigen Zusatz von Alkohol zu der heißen, wässrigen Lösung noch eine größere Menge krystallinischer Aminosäuren abzutrennen. Es unterliegt keinem Zweifel, daß der Sirup neben Polypeptiden noch Aminosäuren enthält. Wir konnten durch Anwendung der Estermethode aus einem aliquoten Teil noch ganz erhebliche Mengen von Aminosäureester gewinnen. Wir verzichteten vorläufig auf eine Aufarbeitung des gesamten Materiales mit Hilfe der Estermethode, weil wir hoffen, aus dem Sirup noch Polypeptide darstellen zu können. Unsere Resultate beziehen sich somit zunächst nur auf diejenigen Aminosäuren, die sich ohne jedes Hilfsmittel durch direkte Krystallisation abscheiden ließen. Dazu kommen noch diejenigen Mengen von Aminosäuren, die wir als Ester aus einem aliquoten Teil isolierten.

Bei jeder einzelnen Untersuchung haben wir den Stickstoffgehalt des Darminhaltes und denjenigen des Filtrates bestimmt. Ferner haben wir die gesamten Krystallmassen gut gemischt und in einer Probe den Stickstoffgehalt festgestellt. Es seien im folgenden die einzelnen Versuche angeführt.

1. Hunde.

Mitarbeitet von Trosin.

Wir gingen vom Darminhalt von 106 Hunden aus. Zum Auskochen verwendeten wir die 20fache Menge Wasser. Das Auskochen wurde dreimal wiederholt. Die folgende Tabelle orientiert über den Stickstoffgehalt des Darminhaltes und des Filtrates.

Zahl der Hunde	Menge des Darminhaltes in g	Stickstoffgehalt des Darminhaltes in g	Stickstoffgehalt des Filtrates in g
3	110	1,5328	1,3976
4	170	3,0471	2,7927
4	355	5,6200	5,3806
4	128	2,5359	2,3005
4	154	2,2465	1,9025
1	64	0,8520	0,6929
4	214	3,2315	2,9086
3	181	2,4394	2,1518
2	73	1,1092	0,9989
4	304	3,1554	2,8475
1	22	0,3633	0,3632
3	65	0,8373	0,7051
2	128	1,6105	1,3910
3	195	2,5699	2,1866
7	292	1,8820	1,7782
6	159	2,6001	2,3766
13	852	8,8297	8,3853
3	90	1,3659	1,2201
4	150	2,8875	2,0814
5	177	3,1534	2,8147
19	478	5,1923	4,9283
3	66	1,1912	1,1300
2	213	1,2231	1,2178
2	105	1,5017	1,3857
Summa		60,9887	50,3396

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß der Darminhalt zum allergrößten Teil aus stickstoffhaltigen Substanzen bestand, die durch Hitze nicht mehr koagulierbar waren. Gleichzeitig ersieht man aus den Mengen, die der Darm enthielt, wie wenig Chymus der gesamte Darm in jedem einzelnen Momente enthält. Bei prall gefülltem Magen sind immer nur geringe Mengen des gesamten Chymus über den ganzen Darm verteilt. Diese Einrichtung ist einem raschen Abbau der einzelnen Nahrungsstoffe und ihrer Abbaustufen sehr förderlich. Der Chymus wird in dünner Schicht auf eine sehr große Oberfläche ausgebreitet.

Die Gesamtmenge der durch direkte Krystallisation gewonnenen Aminosäuren betrug $110 \text{ g} = 12,5 \text{ g N}$. Mit Hilfe der Estermethode konnten noch $1,2 \text{ g N}$ in Form von Estern isoliert werden. Ferner gelang es, aus dem Sirup durch Behandeln mit Alkohol noch $10 \text{ g Aminosäuren} = 1,1 \text{ g N}$ zu isolieren. Die Gesamtausbeute an Aminosäuren betrug somit in Stickstoffwerten ausgedrückt $14,8 \text{ g}$, d. h. rund 27% des Stickstoffgehaltes des Filtrates. Dieser Wert ist zum Teil zu hoch und zum Teil zu niedrig. Einmal können in den krystallinischen Produkten auch Polypeptide enthalten sein. Ferner ist das bis zur Gewichtskonstanz gewogene Gemisch im rohen Zustand gewogen worden. Beim Umkrystallisieren sank die Ausbeute auf 96 g reines Produkt und 6 g unreine, d. h. gefärbte Substanz, ferner blieb etwas Sirup übrig. Die angegebene Ausbeute ist insofern zu niedrig berechnet, als ohne Zweifel im Sirup noch Aminosäuren enthalten waren. Die Estermethode gibt stets nur Minimalzahlen. Dazu kommt noch, daß bei der angewandten Methode Lysin, Arginin, Histidin, Cystin dem Nachweis entgingen. Es kommt auf jeden einzelnen Hund etwas über $0,1 \text{ g}$ Stickstoff, in Form von Aminosäuren.

2. Schweine.

Mitbearbeitet von **Rudolf Salewski**.

Verarbeitet wurde der Darminhalt von 50 Schweinen. Er wurde mit der doppelten Menge Wasser dreimal ausgekocht.

Zahl der Tiere	Gewicht des Darminhaltes in g	Stickstoffgehalt des Darminhaltes in g	Stickstoffgehalt des Filtrates in g
9	6880	52,2044	24,0865
18	5900	—	22,2085
12	5550	36,8298	31,2275
11	4640	35,6095	23,1028
Summa			100,6253

Auch hier war ein ganz erheblicher Teil des Gesamtstickstoffs des Darminhaltes in Form nicht koagulierbarer Produkte vorhanden. Die Ausbeute an krystallisierbaren Aminosäuren betrug 145 g = 15,1 g N. Dazu kommen noch 1,5 g Stickstoff, die bei der Veresterung des Sirups und der Infreisetzung der Ester in den Äther übergingen. Es wurden somit von den rund 100 g Stickstoff des Filtrates 16,6 g in Form von Aminosäuren nachgewiesen. Die Menge des Sirups war eine sehr große. Für die Bewertung der Zahlen gilt das gleiche, was bei den Versuchen an Hunden gesagt wurde. Es dürften wohl annähernd $\frac{1}{5}$ des nichtkoagulablen Stickstoffs in Form von Aminosäuren vorhanden gewesen sein.

3. Rinder.

Mitbearbeitet von H. Kastner.

Untersucht wurde der Darminhalt von 20 Rindern. Ihr Alter schwankte zwischen $\frac{1}{2}$ und 6 Jahren. Der Magen der Tiere war fast durchweg gut gefüllt. Der Mageninhalt ließ Heu, Häcksel und Kleie erkennen. Der Darminhalt wurde dreimal mit dem dreifachen Volumen Wasser ausgekocht.

Durch direkte Krystallisation wurden erhalten 225 g Aminosäuren = 26,7 g Stickstoff. Auch hier war somit mindestens $\frac{1}{5}$ des Stickstoffes des Filtrates in Form von Aminosäuren vorhanden. Hierzu ist noch zu bemerken, daß es unmöglich war, den Darminhalt der Tiere sorgfältig zu sammeln. Wir verzichteten, um möglichst rasch arbeiten zu können, auf eine vollständige Entleerung des Darmes. Hierbei sind sicher gerade

die der Darmwand anhaftenden weiter verdauten Partien zurückgelassen worden.

Zahl der Tiere	Gewicht des Darm-inhaltes in g	N-Gehalt des Inhaltes in g	N-Gehalt des Filtrates in g
2	5340	20,29	11,99
3	7350	23,52	17,98
3	7100	32,73	25,45
3	7000	31,57	26,93
3	6900	27,53	18,01
4	12350	47,54	25,63
2	6500	26,00	20,75
Summa		209,19	146,74

4. Pferde.

Wir verwendeten den Inhalt des Darmes von 10 Pferden. Auch hier kochten wir dreimal mit der dreifachen Menge Wasser aus. Bei den gewaltigen Mengen an Inhalt kann man sich leicht vorstellen, daß das Auskochen keine leichte Aufgabe war. Es galt vor allem, so rasch als möglich zu arbeiten, um die Fermentwirkung abzubrechen.

Zahl der Tiere	Menge des Darm-inhaltes in g	Stickstoffgehalt des Inhaltes in g	Stickstoffgehalt des Filtrates in g
2	8550	27,58	20,12
1	8450	30,59	24,34
1	6950	28,11	22,18
2	8670	32,54	25,22
2	10500	35,18	28,15
2	6800	25,12	20,05
Summa		179,12	140,06

Isoliert wurden durch direkte Krystallisation 180 g Aminosäuren = 19,5 g Stickstoff. Hier war somit etwa $\frac{1}{7}$ des Stickstoffgehaltes des Filtrates in Form von Aminosäurestickstoff vorhanden.

Die erhaltenen Resultate zeigen, daß man aus dem Darminhalt große Mengen von Aminosäuren erhalten kann, ja er stellt ein vorzügliches Ausgangsmaterial für Aminosäuren dar. Sollte es glücken, einfache Methoden zu finden, die eine quantitative Trennung der einzelnen Aminosäuren gestatten, dann dürfte es sich lohnen, Aminosäuren aus Darminhalt im Großen darzustellen. Wir haben im ganzen über 650 g allerdings noch nicht gereinigte Aminosäuren erhalten. Daraus haben wir bis jetzt große Mengen von optisch recht reinem Leucin und Valin dargestellt. Zur Trennung dieser beiden Aminosäuren benützten wir in erster Linie das Kupfersalz dieser Aminosäuren. Es gelingt leicht, Leucinkupfer in ganz reinem Zustand abzuscheiden. Alles vorhandene Leucin läßt sich leider so nicht gewinnen, denn bald erhält man Krystallfraktionen, die Mischkrystalle von Leucin und Isoleucin enthalten, und dann folgen Beimengungen von Valin. Diese drei Aminosäuren trennten wir nach der Vorschrift von Levene mit Hilfe der Bleisalze. Diesmal hatten wir mehr Erfolg, als es früher der Fall war, indem wir Valin von $[\alpha]_{20}^D = + 27,2^\circ$ in 20%iger Salzsäure erhielten. Das Leucin drehte $[\alpha]_{20}^D = - 10,15^\circ$ in Wasser. Glutaminsäure konnten wir auch in großen Mengen nachweisen und auch Glykokoll. Die Reindarstellung der übrigen Aminosäuren bietet Schwierigkeiten. Asparaginsäure, Alanin sind sicher auch vorhanden und von uns auch identifiziert worden, jedoch konnten wir uns kein Bild über die Mengen machen, in denen sie vorhanden sind. Tyrosin fand sich in auffallend geringen Mengen.

Wir werden das erhaltene Aminosäuregemisch noch eingehend untersuchen und vor allem im Sirup auf Polypeptide fahnden. Interessanterweise gibt er keine Biuretreaktion. Wir konnten nicht einmal in allen Fällen im Filtrate des aufgekochten Darminhaltes Biuretreaktion nachweisen. Bei den Hunden war die Reaktion meist negativ und auch bei den übrigen Tieren fehlte sie oft.

Betrachtet man die gesamten Mengen der isolierten Aminosäuren, dann ist man überrascht, daß der Darminhalt solche Massen einfachster Abbauprodukte der Eiweißstoffe enthält.

Wenn man jedoch die erhaltenen Ausbeuten auf das einzelne Tier umrechnet, dann erhält man ein anderes Bild. Man könnte leicht zu dem Schluß kommen, daß der Abbau der Proteine bis zu Aminosäuren keineswegs die Regel ist. Bezieht man jedoch die erhaltenen Aminosäurestickstoffwerte auf den Stickstoffgehalt des Filtrates des Darminhaltes, dann ergibt sich, daß doch ein ganz erheblicher Teil des gesamten Stickstoffs auf die Aminosäuren entfällt. Diese werden nun fortgesetzt resorbiert und dem Nachweis entzogen. Produkte, die wir noch als Peptone abgetrennt haben, wären wahrscheinlich im nächsten Momente zu Aminosäuren abgebaut worden, und Aminosäuren, die wir isolieren konnten, wären sicher schon nach kurzer Zeit resorbiert gewesen. Die geringe Ausbeute an den Aminosäuren, die sehr frühzeitig abgespalten werden: Tyrosin und Tryptophan, spricht auch für eine rasche Resorption. Als Grund der geringen Ausbeute an den genannten Aminosäuren könnte man eventuell Fäulnisprozesse anführen. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß diesen der größte Teil der genannten Bausteine zum Opfer fällt. Das entstandene Phenol hätte zudem die Millonsche Reaktion verstärken müssen. Diese war jedoch auffallend gering. War das Tyrosin abgeschieden, dann wurde sie negativ.

Wir schließen aus unseren Untersuchungen, daß im Darminhalt stets beträchtliche Mengen von Aminosäuren vorkommen. Wir konnten bei Hunden, Schweinen, Rindern und Pferden bis zu $\frac{1}{3}$ des Stickstoffgehaltes des Filtrates des ausgekochten Darminhaltes in Form von Aminosäuren nachweisen. Dieser Wert ist ein Minimalwert, denn wir haben die mit Phosphorwolframsäure fällbaren Aminosäuren nicht bestimmt. Ferner verzichteten wir absichtlich auf jede Methode, die eine Spaltung komplizierterer Produkte im Gefolge haben konnte. Es sind nur diejenigen Aminosäuren bestimmt worden, die durch einfache Krystallisation abtrennbar waren.
