

# **Untersuchungen über die Plasteinbildung.**

## **II. Mitteilung.**

Von

**V. Henriques und J. K. Gjaldbæk.**

(Der Redaktion zugegangen am 13. September 1912.)

In einem früheren Aufsatz<sup>1)</sup> berichteten wir über die Ergebnisse einiger Versuche über die Plasteinbildung durch Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf konzentrierte Lösungen peptischer Spaltungsprodukte, wobei wir als Untersuchungsmethoden die Sörensensche Formoltitrierung und die Gerbsäurefällung benutzten; wir geben hier kurz die von uns gefundenen Verhältnisse an.

Wird eine konzentrierte Lösung eines peptischen Spaltungsprodukts mit Pepsinsalzsäure im Thermostaten angebracht, finden gleichzeitig mit der Plasteinbildung 1. eine Abnahme des formoltitierbaren Stickstoffs und 2. eine Vermehrung des mit Gerbsäure fällbaren Stickstoffs statt. Die Größe der vorkommenden Veränderungen hängt von der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials ab, indem der am stärksten abgebaute Stoff die größten Ausschläge in den erwähnten Richtungen ergibt.

Wir werden nun im folgenden über einige neue Versuche über die Plasteinbildung berichten. Wie man ersehen wird, hielten wir uns bei der Entscheidung der Frage «Synthese» ausschließlich an die Formoltitrierung und unternahmen keine Gerbsäurefällungen; dagegen wurde das Verhalten des Ammoniaks während der Plasteinbildung berücksichtigt.

Die Untersuchungsmethode war dieselbe wie bei unseren früheren Untersuchungen über die Plasteinbildung, indem die konzentrierte Lösung des Spaltungsprodukts + Ferment im Verhältnis 1 : 20 mit ausgekochtem, destilliertem Wasser gemischt wurde;

<sup>1)</sup> V. Henriques und J. K. Gjaldbæk, Diese Zeitschrift, Bd. 71.

in der so zubereiteten Mischung wurde die Formoltitrierung ohne vorhergehende Neutralisation gegenüber Lackmuspapier (zur Vermeidung von Neutralisationsfehlern) unternommen und das Ammoniak durch Destillation im Vakuum mit Baryumhydroxyd, das in Methylalkohol gelöst war, bestimmt. Die gefundenen Werte wurden nach dem Stickstoffgehalt der Mischung reduziert, so daß sie 100 mg N entsprachen; der Stickstoffgehalt der Menge der Mischung (50 ccm), in welcher die Formoltitrierung und die Ammoniakbestimmungen stattfanden, schwankte um ca. 135 mg N. Die Formoltitrierung ist angegeben in Kubikzentimetern  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH, und in ihr ist — was die salzsauren Mischungen betrifft — die enthaltene freie Säure mit einbegriffen; das Ammoniak ist in Milligramm N angegeben. Schließlich wurde der Stickstoffgehalt des beim Prozesse gebildeten Plasteins bestimmt, indem Stickstoffbestimmungen 1. in 10 ccm der aufgeschlammten Versuchsmischung und 2. in 10 ccm von deren Filtrat unternommen wurden.

#### Das Verhalten peptischer Spaltungsprodukte gegenüber Pepsin.

Die Plasteinbildung durch Einwirkung der Pepsinsalzsäure auf peptische Spaltungsprodukte haben wir bereits früher untersucht;<sup>1)</sup> aus unseren früheren Untersuchungen ging hervor, daß Witte-Pepton, das 14% formoltitierbaren Stickstoffs enthält, Ausschlag in der Richtung einer Synthese ergab, die 0,65% formoltitierbarem N entsprach, während peptische Spaltungsprodukte von Witte-Pepton, Casein und Hühner-eiweiß (bis zu einem Gehalt von ca. 20% formoltitierbaren Stickstoffs verdaut) Ausschläge von 1,12—1,96% formoltitierbarem N ergaben. Ein pepsinverdautes Plasteinpräparat (bis zu einem Gehalt von 27% formoltitierbaren Stickstoffs verdaut) ergab einen Ausschlag von 2,36% formoltitierbarem N.

Da man indessen bei andauernder Pepsinverdauung<sup>2)</sup> einen bedeutend größeren Spaltungsgrad erreichen kann als 27%, und da eben die am stärksten abgebauten Stoffe die

<sup>1)</sup> a. a. O.

<sup>2)</sup> V. Henriques und J. K. Gjaldbæk, Diese Zeitschrift, Bd. 75.



größten Ausschläge ergaben, unternahmen wir einige Versuche mit stärker gespaltenen Stoffen. Ferner haben wir von anderen verdauten Proteinen Edestin, Gelatine und Rindfleisch herangezogen.

Wir verzeichnen unten den Spaltungsgrad, Ammoniakgehalt und das Verhältnis zwischen dem 1. und 4. Stadium bei der Formoltitrierung:  $1 - (4 \div k)$  für die angewandten Stoffe.

	Spaltungsgrad (formol- titrier- barer N in % des Total-N)	Am- moniak- N in % des Total-N	$1 - (4 \div k)$	Ange- wandt in Ver- such
Pepsin-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> verdautes Hühnereiweiß	38,0	7,5	1—3,0	I
» » » Casein	38,5	8,8	1—3,3	II
» » » mageres Rindfleisch	34,4	4,9	1—2,5	III
» » » Witte-Pepton	37,0	5,7	1—3,0	IV
» HCl » Witte-Pepton	34,6	5,1	1—2,8	V
» » » Edestin	32,2	8,8	1—2,8	VI
» » » mageres Rindfleisch	34,6	6,2	1—2,5	VII
» » » Gelatine	24,5	1,3	1—3,1	

Bei der Zubereitung der bei den Versuchen benutzten Mischungen verfahren wir in folgender Weise: Wenn bei der Pepsinverdauung Schwefelsäure angewandt wurde, wurde die Säure mit Baryumhydroxyd aus den schwefelsauren Flüssigkeiten entfernt; wurde Salzsäure angewandt, wurde mit 1-n-NaOH neutralisiert, wonach die Flüssigkeit filtriert wurde. Das neutral reagierende Filtrat wurde bis auf 100 ccm (mit N-Gehalt von 7 g) eingedampft; es wurden 20 ccm 1-n-HCl, 20 ccm 5%iger Pepsinlösung und Toluol hinzugesetzt. Sofort nach der Zusammenmischung wurden Untersuchungsproben entnommen, und der Rest wurde bei 37° in den Thermostaten gestellt.

Bei den Versuchen I, II und III wurden peptische Spaltungsprodukte von Hühnereiweiß, Casein und Rindfleisch mit einem Gehalt von 38, 38,5 und 34,4% formoltitrierbarem N angewandt.

Tabelle I.

Ca. 30%ige Lösung von Pepsin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-verdaulichem  
Hühnereiweiß + Pepsin-HCl.

	Formol- titrierung pro 100 mg N ccm $\frac{1}{5}$ -n- NaOH	Am- moniak-N in % des Total-N	Plastein-N in % des Total-N	Physikalische Änderungen
Sogleich . . . . .	15,1	7,6	0	Klare Lösung.
1 Stunde bei 37° . .	14,9	—	2,6	Deutliche Aus- fällung.
20 Stunden bei 37° .	14,2	—	17,9	
2tägliches Stehen bei 37°	14,4	—	18,1	} Große Ausfällung, aber keine Gela- tinierung.
4 „ „ „ 37°	14,2	—	18,7	
11 „ „ „ 37°	13,7	—	23,6	
Zusatz von 1 g Pepsin				
Sogleich nach Zusatz .	13,7	—	—	
14 tägliches Stehen bei 37°	13,7	7,5	24,9	

Tabelle II.

Ca. 30%ige Lösung von Pepsin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-verdaulichem Casein  
+ Pepsin-HCl.

	Formol- titrierung pro 100 mg N ccm $\frac{1}{5}$ -n- NaOH	Am- moniak-N in % des Total-N	Plastein-N in % des Total-N	Physikalische Änderungen
Sogleich . . . . .	15,3	8,2	0	Klare Lösung.
1 Stunde bei 37° . .	15,1	—	0,8	Sichtbare Aus- fällung.
20 Stunden bei 37° . .	14,8	—	9,8	
2tägliches Stehen bei 37°	14,6	—	13,3	} Große Ausfällung, aber keine Gela- tinierung.
4 „ „ „ 37°	14,5	—	—	
11 „ „ „ 37°	14,3	—	15,4	
Zusatz von 1 g Pepsin				
Sogleich nach Zusatz .	14,3	—	—	
14 tägliches Stehen bei 37°	14,4	8,1	—	



Tabelle III.

Pepsin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-verdautes Rindfleisch in 30%iger Lösung  
+ Pepsin-HCl.

	Formol- titrierung pro 100 mg N ccm $\frac{1}{5}$ -n- NaOH	Am- moniak-N in % des Total-N	Plastein-N in % des Total-N	Physikalische Änderung
Sogleich . . . . .	14,1	4,7	—	Klare Lösung.
1 Stunde bei 37° . .	13,8	—	2,0	Deutliche Aus- fällung.
20 Stunden bei 37° . .	13,6	—	10,5	
2 tägliches Stehen bei 37°	13,8	—	10,5	Große Ausfällung, aber keine Gela- tinierung.
4 » » » 37°	13,5	—	12,6	
11 » » » 37°	13,4	—	15,1	
Zusatz von 1 g Pepsin				
Sogleich nach Zusatz .	13,4	—	—	
14 tägliches Stehen bei 37°	13,5	4,9	15,3	

Wie man sieht, ist die Plasteinbildung in allen Fällen sichtbar nach 1 Stunde, und im Laufe dieser Zeit wurden bezw. 2,6, 0,8 und 2,0% des Stickstoffgehalts der Mischungen als Plastein ausgefällt; gleichzeitig beobachtet man auch eine Abnahme des formoltitrierbaren N. Bei längerem Stehen im Thermostaten schreitet der Prozeß weiter fort, und wenn er erst angehalten hat, scheint ein neuer Zusatz von Pepsin ohne Wirkung zu sein.

Bei den Versuchen I und II hörte die Abnahme des formoltitrierbaren N erst nach 11 Tagen auf; bei dem Versuch III dagegen erreichte die Abnahme des formoltitrierbaren N ihr Maximum bereits nach 1 Tage; die Ausfällung von Plastein hört in diesem Falle nicht gleichzeitg mit der Erreichung des genannten Maximums auf, was darauf deutet, daß die Synthese und die Fällung zwei verschiedene und ungleich schnell verlaufende Stadien des Prozesses oder vielleicht zwei parallele, aber voneinander unabhängige Prozesse sind. Bei Beendigung der Versuche waren bezw. 24,9, 15,4 und 15,3%

des Total-N der Mischung als Plastein ausgefällt. Bei keinem Versuch trat Gelatinierung ein, aber die Fällung war, wie aus den angeführten Zahlen ersichtlich, recht bedeutend.

Die Abnahme des formoltitrierbaren N beträgt bei Beendigung der Versuche bezw. 1,4, 1,0 und 0,6 ccm  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N. Die Zahlen entsprechen also 3,92, 2,8 und 1,68% formoltitrierbarem N.

Die Ammoniakmenge blieb bei allen drei Versuchen unverändert.

Das gebildete Plastein war bei allen drei Versuchen fast, wenn auch nicht vollständig löslich in schwachem NaOH und schwachem HCl.

Tabelle IV.

Ca. 30%ige Lösung von Pepsin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-verdautem Witte-Pepton + Pepsin-HCl.

	Formol- titrierung pro 100 mg N ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH	Am- moniak-N in % des Total-N	Plastein- N in % des Total-N	Physikalische Änderungen
Sogleich . . . . .	15,2	5,1	—	Klare Lösung.
2 Stunden bei 37° . .	15,2	—	0,3	Unklarheit.
1 tägliches Stehen bei 37°	15,0	—	7,2	} Große Aus- fällung, aber keine Gelatinierung.
2 „ „ „ 37°	14,7	—	11,1	
3 „ „ „ 37°	14,3	—	12,5	
8 „ „ „ 37°	14,3	5,0	13,6	

Tabelle V.

Ca. 30%ige Lösung von Pepsin-HCl-verdautem Witte-Pepton + Pepsin-HCl.

	Formol- titrierung pro 10 mg N ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH	Am- moniak-N in % des Total-N	Plastein- N in % des Total-N	Physikalische Änderungen
Sogleich . . . . .	13,5	4,4	—	Klare Lösung.
2 Stunden bei 37° . .	13,5	—	1,7	Ausfällung.
1 tägliches Stehen bei 37°	13,2	—	7,9	} Große Aus- fällung, aber keine Gelatinierung.
2 „ „ „ 37°	12,9	—	16,2	
3 „ „ „ 37°	12,8	—	18,8	
5 „ „ „ 37°	12,9	—	18,0	
8 „ „ „ 37°	12,7	4,5	18,7	



Tabelle VI.

Ca. 30%ige Lösung von Pepsin-HCl-verdaulichem Edestin + Pepsin-HCl.

	Formol- titrierung pro 100 mg N ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH	Am- moniak-N in % des Total-N	Plastein- N in % des Total-N	Physikalische Änderungen
Sogleich . . . . .	13,3	7,9	—	Klare Lösung. Ausfällung.
2 Stunden bei 37° . .	13,1	—	2,7	
1 tägliches Stehen bei 37°	12,6	—	11,5	} Große Aus- fällung, aber keine Gelatinierung.
2 „ „ „ 37°	12,4	—	12,1	
3 „ „ „ 37°	12,3	—	18,1	
5 „ „ „ 37°	12,4	—	18,1	
8 „ „ „ 37°	12,3	7,9	18,3	

Tabelle VII.

Ca. 30%ige Lösung von Pepsin-HCl-verdaulichem Rindfleisch + Pepsin-HCl.

	Formol- titrierung pro 100 mg N ccm $\frac{1}{5}$ -n-NaOH	Am- moniak-N in % des Total-N	Plastein- N in % des Total-N	Physikalische Änderungen
Sogleich . . . . .	14,6	5,1	—	Klare Lösung. Deutliche Aus- fällung
2 Stunden bei 37° . .	13,9	—	1,7	
1 tägliches Stehen bei 37°	13,6	—	14,0	} Große Aus- fällung, aber keine Gelatinierung.
2 „ „ „ 37°	13,6	—	18,1	
3 „ „ „ 37°	13,5	—	17,4	
5 „ „ „ 37°	13,4	(4,6)	18,5	
8 „ „ „ 37°	13,5	—	19,7	

Bei den Versuchen IV—VII wurden Pepsin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-verdautes Witte-Pepton, Pepsin-HCl-verdautes Witte-Pepton, Edestin und Rindfleisch mit einem Spaltungsgrad von bezw. 37,0, 34,6, 32,2 und 34,6% formoltitrierbarem N angewandt.

Die Versuchsergebnisse entsprechen in der Hauptsache denen der Versuche I—III; die Plasteinausfällung und die Abnahme des formoltitrierbaren N begannen bereits nach 2 Stunden, und die Prozesse setzten sich in jedem Falle einige Tage hindurch fort. Bei den Versuchen V, VI und VII hörte die Abnahme des formoltitrierbaren N vor der Plasteinaus-

fällung auf (vgl. Versuch III), was, wie erwähnt, darauf deutet, daß die Synthese und die Ausfällung zwei verschiedene und ungleich schnell verlaufende Stadien des Prozesses oder vielleicht zwei parallele, aber voneinander unabhängige Prozesse sind, indem die Synthese vor der Ausfällung stattfindet. Daß die Ausfällung und die Synthese nicht gleichzeitig stattfinden, sieht man deutlich aus dem Versuche VII. Hier fand im Laufe von 2 Stunden eine 1,96% formoltitrierbarem N entsprechende Synthese statt, während die Plasteinausfällung nur 1,7% des Total-N betrug; nach 1 Tage entsprach aber die Synthese 2,8%, während die Plasteinausfällung 14% betrug. Diese Zahlen zeigen, daß eine nicht unbedeutende Synthese ohne wesentliche Plasteinausfällung stattfinden kann. Bei keinem Versuch trat Gelatinierung ein, die Plasteinausfällung war aber recht bedeutend: 13,6–19,7% des Stickstoffgehalts der Mischungen. Das gebildete Plastein war bei allen Versuchen fast, aber nicht vollständig löslich in schwachem NaOH und schwachem HCl.

Die Abnahme des formoltitrierbaren N beträgt bezw. 0,9, 0,8, 1,0 und 1,2 ccm  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH, was (durch Multiplikation mit 2,8) in formoltitrierbaren N umgesetzt, 2,52, 2,24, 2,8 und 3,36% entspricht.

Die Ammoniakmenge blieb unverändert.

Bei Beendigung der Versuche IV–VII fand wie gewöhnlich eine Formoltitrierung in 50 ccm einer wässrigen Ausreibung der Versuchsmischungen statt; um aber zu versuchen, ob der Prozeß bei Verdünnung wieder zurückgeht, wurden zu anderen 50 ccm 5 ccm 1-n-HCl gesetzt; diese ca.  $\frac{1}{10}$ -n-Salzsäure (und pepsinhaltige) Flüssigkeiten wurden 1 Tag in den Thermostaten gestellt, und es wurden ihnen sodann 5 ccm n-NaOH hinzugesetzt, worauf eine Formoltitrierung stattfand. Das Ergebnis dieser Versuche war: Das Plastein löste sich nach und nach und war nach 1 Tage vollständig gelöst; gleichzeitig stieg der Formoltiter und erreichte eine Größe, die sehr annäherungsweise dem von der Versuchsmischung vor der Plasteinbildung aufgewiesenen Formoltiter entsprach. Wir führen hier die Zahlen an.



	Ver- such IV	Ver- such V	Ver- such VI	Ver- such VII
Formoltiter vor der Plasteinbildung pro 100 mg N	15,2	13,5	13,3	14,6
» nach » » » 100 » »	14,3	12,7	12,3	13,4
Formoltiter nach der Plasteinbildung pro 100 mg N und darauffolgender Verdünnung mit $\frac{1}{10}$ -N-HCl und 1 tägigem Stehen bei 37°	14,9	13,6	13,2	14,2

Aus obenstehendem geht hervor, daß man sowohl bewirken kann, daß der Prozeß in der einen Richtung verläuft wie in der anderen, je nach der Konzentration, und die Versuche stellen also die Wirkung der Pepsinsalzsäure auf Proteine und peptische Spaltungsprodukte als einen reversiblen Prozeß dar.

Von sonstigen pepsinverdauten Proteinen haben wir mit pepsinverdauter Gelatine Versuche angestellt; hier kam aber keine Plasteinbildung vor; die Flüssigkeit hält sich vollkommen klar, und der Formoltiter hielt sich konstant.

Vergleicht man die Ergebnisse der obenerwähnten Versuche mit den Ergebnissen unserer früheren Versuche mit weniger stark gespaltenen Proteinen, so sieht man, daß die Plasteinbildung am kräftigsten vonstatten geht bei Anwendung von nicht zu stark gespaltenen Proteinen; so findet bei Anwendung von Witte-Pepton eine vollständige Gelatinierung oder Koagulation statt, so daß die zu Anfang klare und flüssige Mischung erstarrt, indem gleichzeitig ein Stoff ausgefällt wird. Werden dagegen stärker gespaltene Proteine angewandt, so bleibt die Mischung flüssig, aber es wird ein Stoff ausgefällt. Die Menge des ausgefallten Stoffs schwankte nicht stark bei den Versuchen mit stark gespaltenen und weniger stark gespaltenen Proteinen; doch scheint die Ausfällung durchgehends am größten bei Anwendung von stark gespaltenen Proteinen.

Und nun das Plastein selbst. Das aus sehr stark gespaltenen Proteinen gebildete Plastein weicht dadurch von dem

aus weniger stark gebildeten ab, daß es in schwachem NaOH und schwachem HCl unvollständig löslich ist, was darauf deutet, daß das Plastein kein einfacher Stoff ist, sondern wahrscheinlich eine Mischung von Albumosen.

In betreff der Synthese bestätigen die Versuche deutlich die Ergebnisse unserer früheren Untersuchungen; die am stärksten abgebauten Stoffe geben die größte Synthese ab. Die größte Synthese fand sich bei Versuch I, wo die Veränderung an formoltitrierbarem Stickstoff ca. 4% der Totalstickstoffmenge betrug, was einer Veränderung von gut 10% des formoltitrierbaren Stickstoffs entspricht, indem der Stoff 38% davon enthielt.

Erinnert man sich nun, daß ca. 25% des Total-N hier als Plastein ausgefällt sind, und betrachtet man ferner das Plastein als das synthetisierte Produkt, so beträgt die Veränderung an formoltitrierbarem N ca. 40% der gesamten formoltrierbaren Stickstoffmenge der zur Plasteinbildung verbrauchten Stoffe. Wie später besprochen werden wird, ist das Plastein indessen aus den am kompliziertesten gebauten Verbindungen des Ausgangsmaterials gebildet, und somit muß die Veränderung an formoltitrierbarem N für die Verbindungen, aus denen das Plastein gebildet ist, einen größeren Wert als 40% betragen.

Damit eine Synthese stattfinden kann, müssen sich mindestens zwei Polypeptide bei Anhydridbildung zwischen einer Carboxyl- und einer Aminogruppe zusammenschließen, was eine Veränderung von 50% des formoltitrierbaren N (in % des formoltitrierbaren N) bewirken wird, insofern die Polypeptide aus lauter Monamino-säuren bestehen; enthalten sie zugleich Diamino-säuren (was ja der Fall ist), wird die Veränderung weniger als 50% betragen.

Die Berechnung unserer Versuchsergebnisse ergibt also, daß die Veränderung an formoltitrierbarem N für die an der Plasteinbildung beteiligten Stoffe mehr als 40% betragen muß, während eine Synthese eine Veränderung erfordert, die naturgemäß mehr als 50% betragen kann, die aber, wenn sich nur 2 Moleküle an der Synthese beteiligen, jedenfalls weniger als



50% betragen muß. Diese Berechnung stimmt sehr gut überein mit den gefundenen Verhältnissen und befürwortet in hohem Grade das Stattfinden einer Synthese bei der Plasteinbildung.

Wie in unserer früheren Mitteilung über die Plasteinbildung berührt, gibt es bei der Plasteinbildung ein Verhältnis, von dem man annehmen könnte, daß es eine scheinbare Abnahme des formoltitierbaren N bewirkte, nämlich die Ausfällung des Plasteins, indem man vor der Plasteinbildung in einer vollkommen klaren Lösung, während und nach derselben aber in einer Flüssigkeit titriert, die das Plastein in aufgeschlammtem Zustand enthält, woraus man vermuten könnte, daß es während der Formoltitrierung nicht, oder jedenfalls nur unvollständig reagierte. Indessen tritt der größte Teil des Plasteins während der Formoltitrierung in Lösung, ein geringer Teil aber löst sich nicht. Um diesen eventuellen Fehler zu berücksichtigen, wurde nach Abschluß der Plasteinbildung in den verschiedenen Versuchen eine Aufschlammung (1 : 20) in ausgekochtem, destilliertem Wasser zubereitet; die Aufschlammung wurde gegenüber Lackmuspapier neutralisiert und der Formoltiter pro 100 mg N bestimmt. Ein anderer Teil der Aufschlammung wurde filtriert, und der 100 mg Filtrat-N und 100 mg Plastein-N (das Plastein wurde, so weit möglich, vor der Formoltitrierung in der notwendigen Menge  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH + destill. Wasser gelöst) entsprechende Formoltiter wurde gleichfalls bestimmt, worauf der tatsächliche Formoltiter der Aufschlammung aus dem Gehalt des Filtrats und Plasteins an formoltitierbarem N berechnet wurde, indem der Plastein-N in % des Total-N bekannt war.

Der Vollständigkeit halber führten wir auch in gegenwärtigen Versuchen diese Bestimmungen aus und geben unten die Ergebnisse wieder. Aus ihnen ist ersichtlich, daß der auf direktem Wege gefundene Formoltiter mit dem durch Berechnung aus dem Formoltiter im Plastein und Filtrat gefundenen gut übereinstimmt, weshalb wir hier — wie bei unseren früheren Versuchen — folgern müssen, daß es mit keinem etwas bedeutenden Fehler verbunden ist, daß der auf direktem Wege bestimmte Formoltiter in einer Flüssigkeit bestimmt

worden ist, die das Plastein in aufgeschlämmten Zustand enthält.

	Ver- such Nr.	Spal- tungs- grad des ange- wandten Proteins	Pla- stein-N in % des Total- N	Formoltitrierung pro 100 mg N = ccm $\frac{1}{10}$ -n-NaOH			Be- rech- neter Form- ol- titer
				In neu- traler Verrei- bung	In Fil- trat	In Pla- stein	
Pepsin-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -gespaltenes Hühnereiweiß	I	38,0	24,9	11,7	14,1	4,8	11,8
„ „ „ Casein	II	38,5	15,4	12,3	13,7	4,7	12,3
„ „ „ Rindfleisch	III	34,4	15,3	11,2	12,2	5,3	11,1
„ „ „ Witte-Pepton	IV	37,0	13,6	12,2	13,5	4,7	12,35
„ HCl „ Witte-Pepton	V	34,6	18,7	10,9	12,3	5,0	10,09
„ „ „ Edestin	VI	32,2	18,3	10,3	11,8	3,7	10,03
„ „ „ Rindfleisch	VII	34,6	19,7	11,1	12,6	4,8	11,1

Aus obenstehender Tabelle läßt sich der Gehalt des Plasteins an formoltitrierbarem N (die Zahlen der zweitletzten Kolumne mit 2,8 multipliziert) leicht berechnen; er schwankt in den verschiedenen Versuchen zwischen 10,4 und 14,8 %, was etwas größere Zahlen sind als diejenigen, die man bei Anwendung von Witte-Pepton erhält; dagegen ergibt aus pepsinverdauten Proteinen hergestelltes Plastein mit einem Spaltungsgrad von ca. 20% sozusagen dieselben Zahlen, wie Plastein aus den stärker gespaltenen Proteinen, die bei den oben angeführten Versuchen angewendet wurden. In betreff der in obenstehender Tabelle für den Spaltungsgrad des Plasteins angeführten Zahlen muß man sich jedoch erinnern, daß das Plastein in schwachem NaOH nicht ganz gelöst werden konnte, weshalb die gefundenen Werte möglicherweise etwas zu klein sind.

Aus der Tabelle geht ferner hervor, daß das Filtrat aus dem Plastein mehr formoltitrierbarem N enthält als das Ausgangsmaterial, woraus man schließen kann, daß das Plastein aus den am kompliziertesten gebauten Stoffen der Versuchsmischung gebildet ist.

In der 2. Kolumne der Tabelle ist der Spaltungsgrad des Ausgangsmaterials vor der Plasteinbildung angegeben.



Ein Vergleich dieser Zahlen mit denen der Kolumne 4 (nach Multiplikation mit 2,8) gibt zugleich Aufschluß über die bei der Plasteinbildung stattgefundene Synthese; man muß sich aber erinnern, daß sowohl den Zahlen der 2. als denen der 4. Kolumne ein größerer oder kleinerer Neutralisationsfehler anhaftet, und der Umfang der bei der Plasteinbildung stattgefundenen Synthese darf somit nicht aus obenstehender Tabelle, sondern muß ausschließlich aus den Tabellen I—VI berechnet werden, wo den Zahlen keine Neutralisationsfehler anhaften.

### Das Verhalten peptischer Spaltungsprodukte gegenüber Trypsin.

Wir haben früher mitgeteilt, daß Witte-Pepton in 30%iger neutraler Lösung typische Plasteinbildung mit Trypsin ergibt, während gleichzeitig eine starke Proteolyse stattfindet. Da Witte-Pepton aber nur 14% formoltitrierbaren N enthält, während die peptischen, in den oben angeführten Versuchen mit Pepsin angewandten Spaltungsprodukte fast 40% formoltitrierbaren N enthielten, meinten wir, daß Versuche mit diesen stark gespaltenen Stoffen vielleicht über den Prozeß der Plasteinbildung durch Trypsineinwirkung Aufschluß geben könnten.

Von den oben erwähnten peptischen Spaltungsprodukten, deren Analyse S. 441 angeführt ist, verwandten wir folgende: I Hühnereiweiß, II Casein, III Rindfleisch, VIII Gelatine und ferner eine Mischung von IV und V Witte-Pepton.

Die Versuchsmischungen wurden durch Eindampfung der neutralen Lösungen (von einem Gehalt von 7 g N) zu 120 g hergestellt, zu denen 20 ccm 5%iger Pankreatinlösung gesetzt wurden.

Beim Versuch mit Gelatine entstand keine Plasteinbildung, bei den übrigen Versuchen typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Die Größe der Plasteinbildung betrug bei Beendigung der Versuche nach 15tägigem Stehen bei 37° 15,9, 6,2, 5,6 und 11,4% des Total-N bezw. für Hühnereiweiß, Casein, Rindfleisch und Witte-Pepton. Aus diesen Zahlen sieht man,

daß die Plasteinausfällung bei den Versuchen mit Trypsin nicht so groß war, wie bei den Pepsinversuchen. Pepsinverdautes Hühnereiweiß ergibt hier, wie bei den Pepsinversuchen, die größte Plasteinausfällung.

Bei allen Versuchen fand eine Proteolyse statt; sie betrug bei Beendigung der Versuche (nach 15 Tagen bei 37°) 1,9, 1,7, 2,7, 2,0 und 1,1 bezw. für Gelatine, Hühnereiweiß, Casein und Witte-Pepton; die Zahlen geben  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N an. Indessen wiesen die Zahlen des Versuchs mit pepsinverdaulichem Hühnereiweiß Verhältnisse auf, die darauf deuten, daß die Plasteinbildung, außer von einer Proteolyse, von einem synthetischen Prozeß begleitet wird. Tabelle VIII berichtet über diesen Versuch.

Tabelle VIII.

Ca. 30%ige Lösung von Pepsin- $H_2SO_4$ -verdaulichem Hühnereiweiß + Trypsin.

	Formol- titrierung pro 100 mg N ccm $\frac{1}{5}$ -n- NaOH	Am- moniak-N in % des Total-N	Plastein- N in % des Total-N	Bemerkungen
Sogleich . . . . .	13,5	5,5	—	Klare Lösung. Große Ausfällung, aber keine Gelatinierung; sichtbare Tyrosin- ausscheidung.
1 tägliches Stehen bei 37°	13,5	—	6,3	
3 „ „ „ 37°	13,7	—	14,6	
6 „ „ „ 37°	14,2	5,7	15,0	
15 „ „ „ 37°	15,2	5,8	15,9	

Aus dieser Tabelle sieht man, daß sich im Laufe des ersten Tages 6,3% Plastein bilden, während der Formoltiter sich konstant hält; im Laufe der folgenden 2 Tage bilden sich ferner 8,3% Plastein, während der Formoltiter um 0,2 ccm  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH steigt; im Laufe der folgenden 3 Tage bilden sich 0,4% Plastein, und der Formoltiter steigt um 0,5 ccm  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH, und im Laufe der letzten 9 Tage bilden sich 0,9% Plastein, während der Formoltiter um 1,0 ccm  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH steigt. Wir geben unten eine Übersicht über die Veränderung pro die in den verschiedenen Perioden der Analysen.



	Vermehrung des formol- titrierbaren N pro die	Ausscheidung des Plasteins pro die (durchschnittliche Zahlen)
1. Tag . . . . .	0	6,3 % des Total-N
2. und 3. Tag . .	0,1	4,15% „ „
4., 5. und 6. Tag	0,17	0,13% „ „
7.—15. Tag inkl.	0,11	0,10% „ „

Die Vermehrung des formoltitrierbaren N geschieht in sehr eigentümlicher Weise; während die Plasteinbildung auf der Maximalstufe steht, die sie im Laufe des ersten Tages erreicht, findet keine Vermehrung des formoltitrierbaren N statt; je nachdem die Plasteinbildung abnimmt, setzt die Vermehrung des formoltitrierbaren N ein, und erst wenn die Plasteinbildung sozusagen aufgehört hat, erreicht die Vermehrung des formoltitrierbaren N ihr Maximum, um sodann schließlich abzunehmen. Man muß aus diesem Verhältnis schließen, daß die Plasteinbildung während eines synthetischen Prozesses stattgefunden hat, der am ersten Tage eben der vom Trypsin gleichzeitig bewirkten Proteolyse entsprach; an den folgenden 2 Tagen war die Synthese noch merkbar; nun hatte aber die Proteolyse das Übergewicht.

Was das Ammoniak betrifft, zeigten alle Versuche eine geringe Steigerung, die jedoch nur 0,2—0,3% des Total-N betrug.

Ferner soll bemerkt werden, daß bei allen Versuchen eine sichtbare Tyrosinausscheidung stattfand.

### Versuche mit trypsinverdauten Proteinen.

Bei unseren Versuchen über die Plasteinbildung mit tryptischen Spaltungsprodukten bei Anwendung von Pepsin-HCl und Trypsin benutzten wir folgende Stoffe.

Stoffe	Formoltitrier- barer N	Ammoniak-N	1—(4 ÷ k)
Trypsinverdautes Hühnereiweiß	68,4	4,0	1—15,1
„ „ Casein	60,0	7,0	1— 6,1
„ „ Witte-Pepton	52,6	4,3	1— 5,5
„ „ Gelatine	33,6	2,4	1— 6,1
„ „ Casein	36,8	2,6	1— 6,7

Die Zubereitung der Versuchsmischungen geschah im wesentlichen wie bei der Anwendung der peptischen Spaltungsprodukte, da sich aber bei der starken Konzentration der Lösungen eine bedeutende Menge von Krystallen ausschied, wurden diese erst durch Kolierung und schwaches Pressen durch Jagonett entfernt, worauf sie in einem Mörser fein gerieben und sodann mit der abkolierten Lösung zu einem feinen Schlamm verrieben wurden, zu dem bezw. Pepsin-HCl oder Trypsin gesetzt wurde.

Beim Versuch mit Casein vom Spaltungsgrad 36,8 entstand sowohl bei Trypsin wie bei Pepsin eine unbedeutende Plasteinbildung; bei den übrigen Versuchen entstand keine merkbare Plasteinbildung.

Bei den Versuchen mit Pepsin hielt der Formoltiter sich konstant; bei den Versuchen mit Trypsin fand eine Steigerung statt, die bezw. 0,5, 0,5, 0,4, 0 und 1,2 ccm  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N betrug.

An Ammoniak fand in allen Versuchen eine Steigerung statt.

Diese mit trypsingespaltenen Proteinen angestellten Versuche gaben somit alle ein negatives Resultat. Fernere Versuche über eine etwaige Plasteinbildung tryptischer Spaltungsprodukte können doch möglicherweise ein positives Resultat ergeben. Die Schwierigkeit der Versuche mit tryptischen Spaltungsprodukten liegt darin, daß die schwach trypsingespaltenen Proteine einen Teil koagulablen Proteins und die stark gespaltenen bedeutende Mengen krystallinischer Produkte enthalten, die sich bei der Konzentrierung ausscheiden.

#### Versuche mit Säurespaltungsprodukten.

Es wurden mit Schwefelsäurespaltungsprodukten folgender Proteine Versuche angestellt: Hühnereiweiß, Casein, Rindfleisch und Witte-Pepton.

Die Spaltungsprodukte wurden durch kurzes Kochen der Proteine mit 25%igem  $H_2SO_4$  (1 Teil Protein und 10 Teile 25%igen  $H_2SO_4$ ) und darauf folgende Entfernung der Schwefelsäure mit Baryumhydroxyd hergestellt. Bei Anwendung dieser Spaltungsprodukte entstand eine typische Plasteinbildung ohne



Tabelle IX.

Versuche mit Säurespaltungsprodukten in ca. 30%iger Lösung.

An- gewandte Stoffe	Versuchsdauer	Versuche mit Pepsin-HCl		Versuche mit Trypsin		Bemerkungen
		a <sup>1)</sup>	b	a	b	
Säure- spaltungs- produkt von Hühner- eiweiß	Sogleich	18,4	0	17,2	—	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Bei den Trypsin- versuchen wurde etwas Tyrosin ausgeschieden.
	3 Stunden bei 37°	—	3,9	17,0	3,4	
	1tägiges Stehen bei 37°	18,5	—	17,4	—	
	2 > > > 37°	18,5	8,5	17,3	—	
	4 > > > 37°	18,6	10,7	17,6	9,0	
9 > > > 37°	18,3	11,4	18,0	—		
Säure- spaltungs- produkt von Witte- Pepton	Sogleich	14,4	—	13,0	—	desgl.
	3 Stunden bei 37°	14,3	7,5	13,0	6,1	
	1tägiges Stehen bei 37°	14,0	12,9	13,6	—	
	2 > > > 37°	Der Kolben im Thermo- staten gesprungen	—	13,7	6,2	
	4 > > > 37°	—	—	14,3	6,7	
9 > > > 37°	—	—	14,6	6,8		
Säure- spaltungs- produkt von Rind- fleisch	Sogleich	15,5	—	14,2	—	desgl.
	3 Stunden bei 37°	15,5	5,0	14,4	—	
	1tägiges Stehen bei 37°	15,5	10,3	15,0	4,0	
	2 > > > 37°	Der Kolben im Thermo- staten gesprungen	—	15,3	6,3	
	4 > > > 37°	—	—	15,9	6,2	
9 > > > 37°	—	—	16,4	9,6		
Säure- spaltungs- produkt von Casein	Sogleich	15,4	—	14,0	—	desgl.
	3 Stunden bei 37°	15,3	5,1	14,3	9,7	
	1tägiges Stehen bei 37°	15,1	—	15,1	8,8	
	2 > > > 37°	15,1	10,6	15,3	5,2	
	4 > > > 37°	15,1	11,9	15,9	—	
9 > > > 37°	15,0	13,9	16,6	5,1		
Säure- spaltungs- produkt von Hühner- eiweiß	Sogleich	18,7	—	16,7	—	desgl.
	1tägiges Stehen bei 37°	18,7	10,9	16,8	9,4	
	3 > > > 37°	—	10,6	17,6	—	
9 > > > 37°	18,6	14,1	18,0	10,5		

<sup>1)</sup> a = Formoltitrierung pro 100 mg N ccm 1/5-n-NaOH; b = Plastein-N in Prozent des Total-N.

Gelatinierung. Die Formoltitrierung ergab bei Anwendung von Pepsin-HCl einen geringen Ausschlag für eine Synthese, bei Anwendung von Trypsin entstand dagegen eine Spaltung. Die Säurespaltungsprodukte wiesen also ähnliche Verhältnisse auf, wie die peptischen Spaltungsprodukte; die Ausschläge bei Anwendung von Pepsin schwanken aber doch zunächst um den Versuchsfehler, und bei der Anwendung von Trypsin kann man aus den Zahlen nichts darüber folgern, ob die Plasteinbildung hier, außer von einer Proteolyse, zugleich von einer Synthese begleitet wird, wie dies beim Versuch mit pepsingespaltenem Hühnereiweiß und Trypsin (Tabelle VIII) der Fall war.

Tabelle IX enthält eine Übersicht über die Versuchsergebnisse.

Bei den Versuchen mit Trypsin fand eine geringe Tyrosinausscheidung statt.

#### Versuche mit Alkalispaltingsprodukten.

Es wurden mit 2 Alkalispaltingsprodukten von Hühnereiweiß Versuche angestellt; die Spaltungsprodukte wurden durch 4wöchiges Stehenlassen einer 2%igen Lösung von Hühnereiweiß bzw. in  $\frac{1}{10}$ -n- und  $\frac{3}{10}$ -n-NaOH im Thermostaten hergestellt.

Die Versuchsmischungen wurden in gewöhnlicher Weise hergestellt, indem die Mischungen mit Salzsäure neutralisiert und vor dem Eindampfen filtriert wurden. Beim Eindampfen schieden sich NaCl-Krystalle aus, die durch Kolierung durch Jagonett entfernt wurden, und beim Zusatz von Salzsäure in den Versuchen mit Pepsin schied sich ein Teil alkaligespaltenen Albumins aus, das gleichfalls vor dem Zusatz von Ferment entfernt wurde.

Die angewandten Spaltungsprodukte enthielten bzw. 23,2 und 34,7% formoltitierbaren N, wovon 10,0—10,3% Ammoniak-N waren.  $1 - (4 \div k)$  betrug bzw. 1—3,7 und 1—4,3.

Bei Anwendung von Pepsin-HCl entstand eine typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Die Plasteinausfällung betrug im Laufe von 19 Tagen bzw. 6,7 und 8,6% des Total-N, und



gleichzeitig fand eine Vermehrung des formoltitrierbaren N statt, die pro 100 mg N bezw. 0,8 und 0,3 ccm  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH betrug.

Bei Anwendung von Trypsin entstand keine merkbare Plasteinbildung, wohl aber in beiden Fällen eine Vermehrung des formoltitrierbaren N, die 1,0 ccm  $\frac{1}{5}$ -n-NaOH pro 100 mg N entsprach, und gleichzeitig eine sichtbare Tyrosinausscheidung.

Das Ammoniak hielt sich sowohl bei den Versuchen mit Pepsin als bei denen mit Trypsin konstant.

Resumé.

	Mit Pepsin-HCl	Mit Trypsin
Peptische Spaltungsprodukte.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Typische Plasteinbildung mit oder ohne Gelatinierung.</li> <li>2. Deutlicher Ausschlag für Synthese.</li> <li>3. Der Prozeß geht bei Verdünnung wieder zurück.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung.</li> <li>2. Von einer Proteolyse und wahrscheinlich gleichzeitig von einer Synthese begleitet.</li> <li>3. Tyrosinausscheidung.</li> </ol>
Tryptische Spaltungsprodukte (stark gespalten).	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Keine Plasteinbildung.</li> <li>2. Proteolytische Spaltung.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Keine Plasteinbildung.</li> <li>2. Proteolytische Spaltung.</li> </ol>
Säure-spaltungsprodukte.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung.</li> <li>2. Wahrscheinlich Synthese.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung.</li> <li>2. Proteolytische Spaltung.</li> <li>3. Tyrosinausscheidung.</li> </ol>
Alkali-spaltungsprodukte.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung.</li> <li>2. Proteolytische Spaltung.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Keine Plasteinbildung.</li> <li>2. Proteolytische Spaltung.</li> <li>3. Tyrosinausscheidung.</li> </ol>

Das Ammoniak nimmt bei keinem der Versuche ab und kann somit nicht an der Synthese teilnehmen.