

Beiträge zur Eiweißbestimmung und zur Pepsinverdauung des Eiweißes.

Von
F. Westhauser.

(Mitteilung aus dem Laboratorium der landwirtsch. Versuchsstation Hohenheim.)
(Der Redaktion zugegangen am 26. April 1911.)

Gelegentlich einer Untersuchung von Schafkot für Ausnützungsversuche waren bei der Bestimmung des Eiweißstickstoffes Unterschiede aufgetreten, je nachdem man den Eiweißstickstoff nach Stutzer-Barnstein durch Fällung mit Kupfersulfat und Natronlauge bestimmte oder in der Weise ermittelte, daß man in einem wässerigen Auszuge nach Fällung mit Tanninlösung den Amidstickstoff feststellte, worauf sich durch Abzug vom Gesamtstickstoffgehalte gleichfalls der Eiweißstickstoff ergeben sollte. Auf diese Unterschiede sei zunächst hingewiesen.

Vier Schafkote a, b, c, d zeigten bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach Kjeldahl folgenden Gehalt:

a) 0,33 b) 0,48 c) 0,41 d) 0,47% Stickstoff.

Wurde in diesen Koten die Bestimmung des Eiweißstickstoffes nach Stutzer-Barnstein mit Kupfersulfat und Natronlauge vorgenommen, so erhielt man beziehungsweise folgende Zahlen:

a) 0,33 b) 0,45 c) 0,41 d) 0,43% Eiweißstickstoff.

Verfuhr man hingegen in der Weise, daß man die Kote aus schwefelsaurer Lösung durch 10%ige Tanninlösung fällte und in einem aliquoten Anteil der abfiltrierten Lösung den (Amid-) Stickstoff unter Eindampfen nach Kjeldahl bestimmte, so ergab sich ein Gehalt von

a) 0,09 b) 0,09 c) 0,11 d) 0,10% Amidstickstoff.

Bringt man diesen von dem nach Kjeldahl erhaltenen Gesamtstickstoff in Abzug, so erhält man den Eiweißgehalt nach der Tanninmethode, demnach:

$$a) 0,33 - 0,09 = 0,24 \% \text{ Eiweißstickstoff}$$

$$b) 0,48 - 0,09 = 0,39 \%$$

$$c) 0,41 - 0,11 = 0,30 \%$$

$$d) 0,47 - 0,10 = 0,37 \%$$

In diesem Falle ist der Gehalt an Eiweißstickstoff im Kot ein geringerer, er liegt im Durchschnitt 0,1% niedriger als nach der Stutzer-Barnsteinschen Methode. Sind diese Differenzen absolut genommen auch gering, so betragen sie doch $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{5}$ des Gesamtwertes und ihre Regelmäßigkeit zeigt, daß sie sehr wohl durch eine bestimmte Ursache bedingt sein können. Die folgenden Untersuchungen sind unternommen worden, um nach dem Grund dieser Abweichungen zu suchen.

Die Versuche bestehen zunächst in einer Nachprüfung der Trennung von Eiweißstickstoff und Amidstickstoff durch Ausfällung des Eiweißes nach Stutzer-Barnstein und durch Tannin. Des weiteren wurde die Ausfällung des Eiweißes nach beiden Methoden bei Gegenwart gewisser Fremdstoffe untersucht. Daran schließt sich die vergleichsweise Anwendung der beiden Methoden auf die Pepsinverdauung des Eiweißes unter Hinzuziehung einer dritten Methode als Vergleichsmethode, der Ausfällung mit phosphorwolframsaurem Natrium.

A. Trennung von Eiweiß- und Amidstickstoff.

Zu diesem Zwecke wurde eine Lösung hergestellt, welche gleiche Teile Albumin und Asparagin enthielt und zwar kamen auf 1000 ccm-Lösung je 5 g Substanz. Zur Analyse wurden 100 ccm davon verwendet; dieselbe ergab:

a) an Gesamtstickstoff nach der Kjeldahlmethode:

$$1. \text{ Bestimmung } 0,1521 \text{ g N}$$

$$2. \quad \quad \quad 0,1515 \text{ g N,}$$

b) an Eiweißstickstoff nach Stutzer-Barnstein:

$$1. \text{ Bestimmung } 0,0601 \text{ g}$$

$$2. \quad \quad \quad 0,0598 \text{ g}$$

c) an Eiweißstickstoff in dem durch Tanninlösung erhaltenen Niederschlage:

1. Bestimmung 0,0589 g
2. „ „ 0,0589 „

d) an Amidstickstoff im Filtrate der Tanninfällung (unter Eindampfen nach Kjeldahl bestimmt):

1. Bestimmung 0,0941 g
 2. „ „ 0,0964 „
- Summe c + d: 1. 0,1530 g
2. 0,1553 „

Ein Vergleich von b) und c) zeigt, daß beide Methoden bezüglich der Trennung von Eiweiß- und Amidstickstoff, in Form von Asparagin, gleichwertig gearbeitet haben.

B. Abscheidung des Eiweißes bei Gegenwart von Fremdstoffen.

Um den Einfluß weiterer Faktoren auf die Brauchbarkeit dieser Bestimmungen zu prüfen, wurden zunächst einige Gemische hergestellt, welche neben den beiden Stickstoffverbindungen noch Kohlenhydrate enthielten. Ein Gemenge von Stärke 10 g, Zucker 22 g, Albumin 5 g, Asparagin 5 g zu 1000 ccm Wasser gelöst, konnte wegen gelatinöser Beschaffenheit der Lösung keine Verarbeitung finden, da sich nach der Fällung zu große Schwierigkeiten bei dem Abfiltrieren des Niederschlages ergaben. Dagegen gelang diese in genügender Weise, als man an Stelle der Stärke Dextrin setzte, sodaß die Lösung folgende Zusammensetzung erhielt:

Dextrin	25 g	}	zu 1000 ccm Wasser gelöst.
Zucker	22 „		
Asparagin	5 „		
Albumin	5 „		

Für jede Analyse wurden 100 ccm dieser Lösung verwendet.

Es wurden erhalten nach Kjeldahl:

- I. 0,1493 g Gesamtstickstoff in 100 ccm
- II. 0,1491 „ „

nach Stutzer-Barnstein:

I. 0,0600 g Eiweißstickstoff in 100 ccm

II. 0,0603 »

nach der Tanninmethode:

0,0601 g Eiweißstickstoff in 100 ccm.

Also auch hier ergab sich kein Unterschied in dem Untersuchungsergebnis nach beiden Methoden.

Bei der Herstellung dieser Lösung hatte man sich von dem Gesichtspunkte leiten lassen, dieselbe der Zusammensetzung nach möglichst ähnlich einem wässerigen Pflanzenauszuge zu gestalten, welcher an der Versuchstation für Fütterungszwecke zur Verwendung kam. Derselbe diente dazu, vergleichsweise die Verwertung des Eiweiß- und Amidstickstoffs durch das Tier festzustellen. Eine genaue Abscheidung des Eiweißes war daher besonders wünschenswert.

Dieser Pflanzenauszug war in der Weise bereitet worden, daß man das zerkleinerte Material — im vorliegenden Falle Rübenschnitzel — mit Wasser bei 100° extrahierte. Nachdem dies mehrmals geschehen war, wurden die erhaltenen Lösungen bis zu Sirupkonsistenz eingeeengt und in dieser Beschaffenheit der übrigen Futtermenge beigemischt. Da derartig beschaffene Flüssigkeiten wohl auch anderwärts zur Untersuchung gelangen, erschien eine Heranziehung dieses Materials zu den vorliegenden Prüfungen zweckmäßig zu sein. Der verwendete Sirup enthielt 0,342% Gesamtstickstoff. Derselbe wurde nach beiden Methoden untersucht, und zwar wurde der jeweiligen Analysenmenge noch eine bestimmte Menge Eiweißstickstoff zugefügt in der Weise, daß in 100 ccm Albuminlösung, welcher 0,1233 g Stickstoff entsprach, die betreffende Sirupmenge aufgelöst wurde. Da die vorhandene Menge an Amidstickstoff in diesem Falle eine äußerst geringe war, wurde sie nicht getrennt in Berechnung gezogen, sondern man begnügte sich, die Summe der im Filtrat und im Niederschlag gefundenen Menge mit derjenigen zu vergleichen, welche sich aus der angewendeten Extrakt- und Albuminmenge der Berechnung nach ergab.

Die Untersuchungsergebnisse sind die folgenden:

Nach Stutzer-Barnstein:

1. 2,273 g Extrakt + 100 ccm Albuminlösung:

durch Analyse gefunden:	berechnet:
0,0060 g N im Filtrat	im Extrakt 0,0078 g N
0,1251 » N » Niederschlag	» Albumin 0,1233 » N
<hr/> 0,1311 g N	<hr/> 0,1311 g N

2. 2,562 g Extrakt + 100 ccm Albuminlösung
gefunden:

berechnet:	
0,0060 g N im Filtrat	im Extrakt 0,0088 g N
0,1254 » N » Niederschlag	» Albumin 0,1233 » N
<hr/> 0,1314 g N	<hr/> 0,1321 g N

II. Durch Tanninfällung wurde erhalten:

3. 2,014 g Extrakt + 100 ccm Albuminlösung
gefunden:

berechnet:	
0,0060 g im Filtrat	im Extrakt 0,0063 g
0,1246 » » Niederschlag	» Albumin 0,1233 »
<hr/> 0,1306 g	<hr/> 0,1296 g

4. 3,339 g Extrakt + 100 ccm Albuminlösung
gefunden:

berechnet:	
0,0083 g im Filtrat	im Extrakt 0,0097 g
0,1271 » » Niederschlag	» Albumin 0,1233 »
<hr/> 0,1354 g	<hr/> 0,1330 g

Es stimmen also die an Gesamtstickstoff gefundenen Mengen mit den berechneten gut überein, dasselbe ist in genügender Weise der Fall bei den in den vier Einzelversuchen zur Abscheidung gelangten Mengen an Eiweißstickstoff.

Die bisherigen Versuche zeigen, daß die Trennung von Eiweiß- und Amid- (Asparagin-) Stickstoff nach beiden Methoden in gleicher Weise erfolgte, ebenso erfolgte die gleiche Abscheidung von Eiweißstickstoff auch bei Gegenwart von Fremdkörpern, insbesondere von Kohlenhydraten.

Die nachfolgenden Versuche beabsichtigen nachzusehen, ob anderwärts Bedingungen eintreten können, unter welchen diese beiden analytischen Methoden zu einem verschiedenen Ergebnis führen. Nach einigen Vorversuchen wurden solche bei dem Abbau des Eiweißstickstoffs durch das Pepsinferment

gefunden. Die Unterschiede traten besonders deutlich hervor, wenn der Salzsäuregehalt der Reaktionsflüssigkeit ein geringer war, sodaß 0,25 g HCl auf 400 ccm Lösung kamen.

C. Abscheidung von Eiweißstickstoff, welcher der Einwirkung des Pepsinfermentes ausgesetzt war.

Diese Versuche sind in der Weise durchgeführt, daß in einem 500 ccm fassenden, mit Marke versehenen, tarierten Kolben 1 g Pepsin in Wasser unter Zufügen von 25 ccm einer 1%igen Salzsäurelösung aufgelöst wurde. Darauf wurden 100 ccm einer 1%igen Albuminlösung und soviel destilliertes Wasser zugefügt, daß die Flüssigkeitsmenge 400 g wog. Diese Lösung blieb während 90 Minuten der Einwirkung bei 37° in einem gut regulierten Wasserbade unter wiederholtem Umschütteln überlassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Kolben herausgenommen, durch Erhitzen auf 100° das Pepsinferment abgetötet; nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit Natronlauge neutralisiert und zur Marke aufgefüllt. Zur Analyse kamen hiervon 200 ccm, welche vergleichsweise nach Stutzer-Barnstein einerseits und andererseits durch 10%ige Tanninlösung aus schwefelsaurer Lösung gefällt wurden. Um einen weiteren Vergleich ziehen zu können, wurde die Ausfällung auch noch mit phosphorwolframsaurem Natrium vorgenommen, nach der in Königs «Handbuch der Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe» (1906, S. 213) enthaltenen Angabe; hierbei kamen jedoch nur 100 ccm der Reaktionslösung zur Anwendung. Es wurden stets zwei Parallelversuche angesetzt; bei den Resultaten ist das Verhältnis der ausgefällten Substanz zur Menge des angewandten Eiweißstickstoffs angegeben.

Die Ergebnisse sind die folgenden:

I. Vergleich der Methode nach Stutzer-Barnstein mit der Tanninfällung.

a) Methode nach Stutzer-Barnstein:

100 ccm Albuminlösung, welche für jeden einzelnen Versuch verwendet wurden, enthielten nach Stutzer-Barnstein:

0,2004 g N = 1,252 g Eiweiß.

Da diese nach Beendigung der Reaktion auf 500 ccm verdünnt wurden, so sind in 200 ccm Lösung, wie sie zur Analyse zur Verwendung kamen, $\frac{2}{5}$ hiervon enthalten, demnach
 $0,08014 \text{ g N} = 0,5008 \text{ g Eiweiß}$.

Hiervon wurden nach einer Einwirkung von 90 Minuten durch Fällung im Niederschlage gefunden:

I. Versuch:	II. Versuch:
0,02886 g N	0,02830 g N
dies beträgt 36,0%	35,3%
an fällbarem, d. i. Eiweiß-Stickstoff.	

Demnach 64,0%	64,7%
an nicht fällbarem Stickstoff, d. i. an Abbauprodukten.	

Das Filtrat des Kupferniederschlages wurde mit Tannin gefällt und ergab als Fällung noch:

I.	II.
0,02610 g N	0,02237 g N
= 32,6%	= 27,9%
des anfangs vorhanden gewesenen Stickstoffs.	

Die Summe dieser beiden Fällungen ergibt:

I.	II.
68,6	63,2% an fällbarem Stickstoff.

b) Fällung durch Tanninlösung:

In 100 ccm der verwendeten Albuminlösung wurden nach dieser Methode gefunden:

$0,2030 \text{ g N} = 1,269 \text{ g Eiweiß}$,
also in 200 ccm der Analysierungsflüssigkeit:
 $0,0812 \text{ g N} = 0,5076 \text{ g Eiweiß}$.

Hiervon wurden nach einer Einwirkung von 90 Minuten durch Tanninfällung im Niederschlage erhalten:

I.	II.
0,04963 g N	0,05129 g N
d. h. 61,1%	63,2% an fällbarem Stickstoff
38,9%	36,8% nichtfällbarem Stickstoff.

II. Vergleich der Methode nach Stutzer-Barnstein mit der Fällung durch phosphorwolframsaures Natrium.

a) Methode nach Stutzer-Barnstein:

In 100 ccm der verwendeten Albuminlösung wurden gefunden:

$$0,2012 \text{ g N} = 1,257 \text{ g Eiweiß.}$$

Demnach in 200 ccm der Lösung, welche zur Analyse kam:

$$0,08046 \text{ g N} = 0,5028 \text{ g Eiweiß.}$$

Davon wurden nach 90 Minuten dauernder Einwirkung durch Fällung im Niederschlage gefunden:

I.	II.
0,02711 g N	0,02739 g N
= 33,7%	= 34,0% an Eiweißstickstoff
= 66,3%	= 66,0% » nichtfällbarem Stickstoff.

Die Ausfällung des Filtrates mit phosphorwolframsaurem Natrium ergab im Niederschlage:

0,04932 g N	0,04652 g N
= 61,3%	= 57,8%

des anfangs vorhanden gewesenen Stickstoffs.

Die Summe dieser beiden Fällungen ergibt:

I.	II.
95,0	91,8% an fällbarem Stickstoff. \

b) Ausfällung mit phosphorwolframsaurem Natrium:

In 100 ccm der verwendeten Albuminlösung wurden nach dieser Methode gefunden:

$$0,2013 \text{ g N} = 1,310 \text{ g Eiweiß.}$$

Demnach sind in 200 ccm der Lösung, welche zur Analyse kam, enthalten:

$$0,08052 \text{ g N} = 0,5240 \text{ g Eiweiß.}$$

Nach einer Einwirkung von 90 Minuten wurde durch Fällung mit phosphorwolframsaurem Natrium erhalten:

I.	II.
0,07660 g N	0,07716 g N
= 91,7%	= 92,3% an fällbarem Stickstoff
= 8,3%	= 7,7% » nichtfällbarem Stickstoff.

III. Vergleich der Fällungen mit phosphorwolframsaurem Natrium und mit Tannin.

a) Fällung mit phosphorwolframsaurem Natrium:

In 100 ccm der verwendeten Albuminlösung wurden nach dieser Methode gefunden:

$$0,2069 \text{ g N} = 1,297 \text{ g Eiweiß,}$$

demnach sind in 200 ccm der zur Analyse kommenden Lösung vorhanden:

$$0,08274 \text{ g N} = 0,5188 \text{ g Eiweiß.}$$

Nach einer Einwirkung von 90 Minuten wurden im Niederschlage gefunden:

I.

$$0,07714 \text{ g N}$$

$$= 93,2\%$$

$$= 6,8\%$$

II.

$$0,07604 \text{ g N}$$

$$= 91,9\% \text{ an fällbarem Stickstoff}$$

$$= 8,1\% \text{ » nichtfällbarem Stickstoff.}$$

(Eine Fällung des Filtrates durch Tannin ergab keinen Niederschlag.)

b) Fällung mit Tanninlösung:

In 100 ccm der verwendeten Albuminlösung wurden gefunden:

$$0,2040 \text{ g N} = 1,275 \text{ g Eiweiß.}$$

In 200 ccm der zur Analyse kommenden Lösung sind demnach enthalten:

$$0,0816 \text{ g N} = 0,5100 \text{ g Eiweiß.}$$

Nach einer Einwirkung von 90 Minuten wurden im Niederschlage gefunden:

I.

—

II.

$$0,05086 \text{ g N}$$

$$= 62,3\% \text{ an fällbarem Stickstoff}$$

$$= 37,7\% \text{ » nichtfällbarem Stickstoff.}$$

Eine Fällung des Filtrates mit phosphorwolframsaurem Natrium ergab:

I.

$$0,01984 \text{ g N}$$

$$= 16,19\%$$

II.

$$0,02236 \text{ g N}$$

$$= 18,25\%$$

der anfangs vorhandenen Stickstoffmenge.

Die Summe dieser beiden Fällungen ergibt:

80,6% an fällbarem Stickstoff.

Das für die mit Pepsin angestellten Versuche verwendete Eiweiß hatte einen Stickstoffgehalt von 12,12%, das Pepsin, von Merck-Darmstadt bezogen, einen solchen von 0,54% Stickstoff = 3,38% Eiweiß, beide nach Kjeldahl bestimmt. In dem verwendeten Tannin waren nur sehr geringe Spuren an Stickstoff nachzuweisen. Erwähnt möge noch werden, daß die Albuminlösungen für jede Untersuchung frisch bereitet wurden. Nach etwa 3stündigem Stehen kamen sie durch ein gröberes Filter filtriert zur Anwendung.

Die Versuche auf S. 368—372 zeigen, daß unter Einwirkung des Pepsins auf Eiweiß an fällbarem Stickstoff erhalten wurde:

Nach Stutzer-Barnstein: 36,0, 35,3, 33,7, 34,0%.

Mittel 34,8%.

Durch Tanninfällung: 61,1, 63,2, 62,3%.

Mittel 62,2%.

Durch Fällung mit phosphorwolframsauren Natrium: 91,7, 92,3, 93,2, 91,9%.

Mittel 92,3%.

Demnach an nicht fällbarem Stickstoff beziehungsweise: 65,2, 37,8, 7,7%.

Da, soviel bekannt ist, nach Stutzer-Barnstein reiner Eiweißstickstoff gefällt wird, andererseits durch phosphorwolframsaures Natrium auch Albumosen, Peptone und organische Basen ausgefällt werden, so erhalten wir in der Niederschlagsmenge des Tannin, dessen Wert in der Mitte liegt, Abbauprodukte des Eiweißes, welche zwischen Reineiweiß und den durch phosphorwolframsaures Natrium ausfällbaren Produkten liegen. Wir haben also in der Anwendung der Tanninmethode einen Weg, den Abbau des Eiweißes noch weiter zu verfolgen.

Wollte man dies Ergebnis auf die eingangs erwähnten Kotanalysen übertragen, indem man annimmt, daß sich bei der Verdauung im Körper ähnliche Spaltungsprodukte gebildet haben, so ist dies nicht ohne weiteres statthaft, da die Zeit der Verdauung im Tierkörper natürlich eine weitaus längere

ist, also ein viel vollständigerer Abbau angenommen werden kann. Es müssen demnach in diesem Falle noch andere Faktoren in Betracht kommen.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß die Methode nach Stutzer-Barnstein und die Fällung mit Tanninlösung im allgemeinen zu dem gleichen Ergebnis führen bei der Abscheidung des Eiweißes und bei Trennung von Eiweiß- und Amid- (Asparagin-) Stickstoff, daß man aber verschiedene Resultate erhält, wenn man sie auf die durch Pepsin hervorgerufenen Spaltungsprodukte des Eiweißes anwenden will. Hierbei ist Bedingung, daß der Gehalt an Salzsäure die auf S. 368 angegebene Konzentration nicht übersteigt. — Ähnliche Unterschiede ergaben sich, wie eingangs der Arbeit erwähnt, unter Umständen auch bei Kotanalysen.