

XIII.

**Quantitative Untersuchungen über das Tyrosin
als Spaltungsproduct der Eiweisskörper**

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin)

von

Dr. Felix Reach

(Wien.)

Die Zersetzungs-Producte der Eiweisskörper sind schon vielfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen, da ja das Studium der Eiweiss-Zersetzung wohl den vorzüglichsten Weg bildet, um in der Erkenntniss über die Constitution dieser Körper Fortschritte zu machen. Aber erst in letzterer Zeit ist man energischer darangegangen, zu messen, wieviel von jedem dieser Producte bei Zersetzung einer bestimmten Menge eines Eiweisskörpers geliefert wird; in früherer Zeit begnügte man sich meist damit, die Zersetzung des Eiweiss qualitativ zu studiren. Es liegen in Folge dessen über diese Fragen nur relativ wenig Zahlenangaben vor, die noch dazu einander theilweise widersprechen. Ich folgte daher gerne einer gütigen Anregung des Herrn Prof. E. Salkowski, zu untersuchen, welche Mengen von einem dieser Zersetzungs-Producte — dem Tyrosin — verschiedene Eiweisskörper liefern. Die Tyrosin-Gruppe, ein constanter Bestandtheil des Moleküls der echten Eiweisskörper und vermuthlich der einzige Träger der Millon'schen Reaction in demselben, fehlt einigen dem Eiweiss nahe verwandten Substanzen, so vor allem dem Leim; es scheint hierin der hauptsächlichste Unterschied in der Constitution zwischen den beiden genannten Substanzen und damit auch der Hauptgrund für die Minderwerthigkeit des Leims, dem Eiweiss gegenüber, für die Ernährung zu liegen¹. Abgesehen also von der Bedeutung der quantitativen Bestimmung der Zerfallsproducte des Eiweiss für die Frage nach der Constitution desselben im Allgemeinen,

scheint das oben präcisirte Thema auch aus diesen Gründen einer Untersuchung werth zu sein.

Ehe ich jedoch meine eigenen Versuche über diesen Gegenstand bespreche, soll über die bisherigen Angaben in der Literatur — soweit ich sie ausfindig machen konnte — berichtet werden. Dabei will ich bemerken, dass ich mich nicht auf die echten Eiweisskörper beschränke, sondern den Bericht auch auf eiweissähnliche Substanzen ausdehne.

Erlenmeyer und Schöffers² erhielten beim Kochen mit Schwefelsäure folgende Werthe für Tyrosin:

aus dem Nackenbande	0,25 pCt.
„ Blutfibrin	2,00 „
„ Fleischfibrin weniger als	1,00 „
„ Hühnereiweiss	1,00 „
„ Horn	3,6 „

Im Gegensatz zu diesen Autoren erhielten Zollikofer³ aus dem Nackenbande kein Tyrosin und Hinterberger⁴ aus Horn nur 1 pCt. Städeler⁵, der sich wie die bisher genannten Autoren der Schwefelsäure als Zersetzungsmittel bediente, fand für Hornsubstanz 4 pCt., ungefähr ebensoviel für thierischen Schleim. Die eigentlichen Protein-Stoffe sind nach ihm durchwegs ärmer an Tyrosin; dagegen lieferte ihm das aus Seide hergestellte Fibroin 5 pCt. Für denselben Stoff fand Weyl⁶ auf gleichem Wege ungefähr ebensoviel (5,2 pCt.).

Horbaczewski⁷ bediente sich der von Hlasiwetz und Habermann angegebenen Methode zur Eiweiss-Spaltung (Kochen mit Salzsäure und Zinnchlorür) und fand für Elastin aus dem Nackenbande in Uebereinstimmung mit Erlenmeyer und Schöffers ca. 0,25 pCt., für Horn 3—4 pCt., für menschliche Haare 3 pCt., und für die Cornea Spuren von Tyrosin. Schwarz⁸ untersuchte nach derselben Methode das Elastin der Aorta, das er mit dem des Nackenbandes für identisch hält, und fand 3,4 pCt. Tyrosingehalt. Ebenfalls durch Kochen mit Salzsäure und Zinnchlorür erhielten ferner Präschers⁹ aus Hämoglobin 1,5 pCt., E. Schulze¹⁰ aus Conglutin (aus Lupinensamen) 2,4 pCt., Siegfried aus derselben Substanz¹¹ nur Spuren, aus Reticulin¹² (aus Darmschleimhaut dargestellt) gar kein Tyrosin, und Hedin¹³ aus Horn weniger, als 1 pCt. dieses Körpers.

R. Cohn¹⁴ fand bei Zersetzung des Caseins mit Salzsäure 3,5 pCt. Tyrosin. Horn auf die gleiche Weise zersetzt, lieferte ihm 4,6 pCt. Tyrosin.

Schützenberger¹⁵ erhitzte Eiweisskörper durch mehrere Stunden mit Barytwasser und fand an Tyrosin unter den Zersetzungs-Producten

für Eier-Eiweiss	2,03 bis 2,4	pCt.
„ Casein	4,12	„
„ Hemiprotein	2,2	„
„ Blutfibrin	3,2 bis 3,5	„
„ Pflanzenfibrin	2	„
„ Wolle ¹⁶	3,2	„

Aus Rohseide erhielt Schützenberger im Vereine mit Bowegeois¹⁷ 10 pCt. Tyrosin. Es scheint jedoch, dass die Resultate auch bei dieser Methode innerhalb ziemlich weiter Grenzen schwanken. Bei einem Versuche, den Schützenberger als Beispiel genauer mittheilt, ergibt sich als Tyrosin-Ausbeute für Eier-Eiweiss 1,86 pCt. Der Zersetzung mittels Barytwasser bediente sich ferner noch E. Schulze¹⁰ bei der Untersuchung des Conglutins und fand in guter Uebereinstimmung mit seinen oben angeführten durch Säurezersetzung gewonnenen Resultaten 2,48 pCt.

Kühne¹⁸, dem wir die wesentlichsten Kenntnisse über die tryptische Verdauung verdanken, hat zuert die Menge Tyrosin bestimmt, die bei dieser Art der Eiweiss-Spaltung erhalten wird. Er fand in 3 Verdauungs-Versuchen mit Fibrin 3,86, 0,63 und 1 pCt. Tyrosin. K. erklärt die differirenden Resultate durch die verschiedenlange Versuchszeit, indem er annimmt, das Tyrosin werde durch die weitere Verdauung auch wieder zersetzt. Indessen wissen wir heute, dass Tyrosin wohl durch Fäulniss, nicht aber durch pankreatische Verdauung angegriffen wird. Fäulniss ist allerdings in den genannten Versuchen K.'s nicht vollständig ausgeschlossen. Biffi¹⁹, der wie ich unter der Leitung Salkowski's arbeitete, fand bei tryptischer Verdauung des Caseins ca. 4 pCt. Tyrosin. Salkowski²⁰ erhielt auf demselben Wege aus Atmidalbumose 1,7 pCt. Tyrosin. Versuche dieser Art hat auch Senator²¹ gemacht; er erhielt aus Eier-Eiweiss grössere Mengen Tyrosin, als die anderen Autoren.

Bei meinen eigenen Versuchen diente ebenfalls die pankreatische Verdauung zur Gewinnung des Tyrosin. Die Versuchsanordnung schliesst sich eng an die von Kühne, Biffi und Salkowski angewandte an. Das zur Verdauung dienende Pankreas-Pulver stellte ich genau in derselben Weise wie Biffi her, auf dessen Schilderung ich diesbezüglich verweise. Die zu verdauende Substanz, deren Trocken-Gewicht und Aschen-Gehalt bestimmt wurde, wurde mit 1—2 g Pankreas-Pulver in eine Stöpselflasche gebracht, reichlich Chloroform-Wasser und etwas Soda hinzugefügt, und dieses Gemenge durch längere Zeit (mehrere Tage bis Wochen) bei ca. 40° C. im Brutofen gehalten. Während dieser Zeit wurde das Gefäss wiederholt kräftig durchgeschüttelt. Nach Entfernung aus dem Brutofen wurde der ganze Inhalt der Flasche in eine emaillierte Eisenschale gebracht, mit Essigsäure neutralisirt, und unter Zusatz einiger weiterer Tropfen Essigsäure gekocht, wodurch das während der Verdauung in Lösung gegangene Eiweiss coagulirt wurde. Hierauf wurde durch gewogene Filter filtrirt. Die auf dem Filter bleibende unlösliche Substanz, die mithin aus dem gänzlich ungelöst gebliebenen, sowie aus dem während der Verdauung gelösten, aber noch coagulablen Eiweiss bestand — der Kürze halber soll sie in folgendem nur als „Verdauungs-Rückstand“ bezeichnet werden — wurde schliesslich auf dem Filter gewaschen, getrocknet und gewogen. Das Filtrat wurde mit dem Waschwasser vereinigt, bis zur Consistenz eines dünnen Syrups eingeeengt, das Tyrosin durch Crystallisation gewonnen, auf gewogenem Filter gesammelt, gewaschen, getrocknet und gewogen. Wiederholt wurde aus dem Filtrat das Leucin dargestellt und mikroskopisch untersucht; niemals konnte Beimengung von Tyrosin-Crystallen constatirt werden. Die genannten Filtrationen gingen, da es sich um Lösungen von Albumosen und Peptonen handelte, sehr langsam vor sich; trotz Anwendung der Luftpumpe dauerte manche Filtration mehrere Tage.

Als Material zu meinen Versuchen diente mir Blutfibrin, coagulirtes Eier-Eiweiss, das lösliche Eiweiss des Fleisches in coagulirtem Zustande, und Fleischfibrin. Das Blutfibrin war in gewöhnlicher Weise dargestellt und gewaschen, und wurde theils in frischem Zustande, theils in Chloroformwasser conservirt in

Anwendung gezogen. In diesem letzteren Falle wurde es vor Beginn des Versuches mit verdünnter Salzsäure solange gekocht, bis es in Folge der Quellung eine gelatinöse, glasig aussehende Substanz geworden war, dann wurde es auf dem Leinwandfilter gewaschen bis das abfliessende Wasser nicht mehr sauer reagirte. Zur Herstellung des Eier-Eiweisses wurde das Weisse mehrerer Eier mit Wasser auf etwa das fünffache Volumen verdünnt und gut durchgeschüttelt, hierauf wurde durch Leinwand colirt, und dabei die Anfangs trüb durch das Filter durchlaufende Flüssigkeit noch einmal auf dasselbe aufgegossen, das Filtrat wurde durch Kochen unter Essigsäurezusatz coagulirt, abermals durch Leinwand filtrirt, das Coagulum auf dem Filter gewaschen, und bis zur Verwendung in Chloroformwasser aufbewahrt. Das Casein wurde in derselben Weise dargestellt wie von Biffi, auf dessen Beschreibung ich daher wieder verweise. Zur Herstellung der Eiweisskörper des Fleisches diente feingeschabtes, mageres Rindfleisch. Dasselbe wurde durch mehrere Stunden bei Zimmer-Temperatur im Wasser belassen, aus der dann durch Leinwand filtrirten und abgepressten Flüssigkeit das Eiweiss durch Erhitzen auscoagulirt, gewaschen und ebenfalls in Chloroformwasser aufbewahrt. Zur Darstellung des Fleischfibrins wurde das mehrmals in der angegebenen Weise mit Wasser extrahirte Fleisch noch einige Male mit absolutem Alkohol und mit Aether behandelt.

Es zeigte sich nun, dass sich die verschiedenen Eiweisskörper gegenüber der künstlichen Verdauung mit Pankreaspulver sehr verschieden verhalten. Während Casein und Fibrin rasch verdaut wurden, leisteten die übrigen angewandten Substanzen der Verdauung einen beträchtlichen Widerstand, so dass beispielsweise vom Eier-Eiweiss in einem Versuche selbst nach achtwöchentlicher Digestion im Brustschrank noch ein grosser Theil unverändert zurückblieb. Ich war ursprünglich geneigt, diese schlechte Verdauung der Beschaffenheit des Pankreaspulvers zuzuschreiben, und führte daher eine Anzahl bereits angefangener Versuche nicht zu Ende. Dies und der langsame Fortgang der künstlichen Verdauung bei einem Theile der in Untersuchung gezogenen Substanzen ist der Grund, warum diese viel Zeit und Mühe kostenden Versuche zu viel weniger Resultaten führten

und auf weniger Substanzen beschränkt blieben, als ursprünglich in meiner Absicht lag.

Bevor ich zur Mittheilung der einzelnen Versuche übergehe, muss ich noch einige Worte über die Art der Berechnung des in Procenten ausgedrückten Endwerthes sagen. Das Pankreaspulver, das nur wenig Verdauungs-Rückstand liefert und, wie Salkowski²⁰ gezeigt hat, auch nur verschwindend geringe Mengen Tyrosin, wurde bei der Berechnung überhaupt vernachlässigt, vielmehr der ganze Verdauungs-Rückstand als unverdauter Rest von dem Gewichten der betreffenden Eiweiss-Substanz abgezogen, und das Tyrosin in Procente der verdauten Substanz umgerechnet. Von der ursprünglichen Substanz wurde, wie bereits erwähnt, der Aschengehalt bestimmt; da dieser stets sehr gering war, und der Verdauungs-Rückstand zum grössten Theil aus unveränderter Substanz bestand, war ich wohl berechtigt, für denselben den gleichen Aschengehalt anzunehmen, wie für die ursprüngliche Substanz, und mittels des für diesen gefundenen Werthes das Endresultat auf aschefreie Substanz zu beziehen.

Ich gebe nun die auf die einzelnen Versuche bezüglichen Daten:

I. 81,312 g frisches Fibrin mit 22,35 pCt. Trocken-Substanz und 0,61 pCt. (der Trocken-Substanz) Aschengehalt ergaben einen Verdauungs-Rückstand von 1,560 g (trocken); die verdaute Substanz wog somit trocken und aschefrei 16,494 g. Die Tyrosin-Ausbeute betrug 0,197 g oder 1,19 pCt.

II. 78,261 g frisches Fibrin mit ebenfalls 22,35 pCt. Trocken-Substanz und mit 0,55 pCt. Aschengewicht ergaben einen Verdauungs-Rückstand von 1,095 g. Verdaute Substanz 16,313 g, Tyrosin-Ausbeute 0,623 g oder 3,82 pCt.

III. 200,18 g conservirtes gequollenes Fibrin mit 9,21 pCt. Trocken-Substanz und 0,93 pCt. Aschengehalt; Verdauungs-Rückstand 2,996 g, verdaute Substanz 15,298 g, Tyrosin-Ausbeute 0,4409 g oder 2,88 pCt.

IV. 128,80 g conservirtes gequollenes Fibrin mit 8,681 pCt. Trocken-Substanz und 1,08 pCt. Aschengewicht; Verdauungs-Rückstand 1,501 g, verdaute Substanz 9,576 g, Tyrosin-Ausbeute 0,186 g oder 1,94 pCt.

V. 55,759 g coagulirtes Eier-Eiweiss mit 17,69 pCt.

Trocken-Substanz und 1,51 pCt. Aschengehalt; Verdauungs-Rückstand 0,798 g, verdaute Substanz 8,930 g Tyrosin-Ausbeute 0,0233 oder 0,26 pCt.

VI. 54,522 g gleiches Eier-Eiweiss, Verdauungs-Rückstand 1,376 g, verdaute Substanz 8,146 g, Tyrosin-Ausbeute 0,0477 g oder 0,58 pCt.

VII. 33,658 g coagulirtes Eier-Eiweiss mit 20,39 pCt. Trocken-Substanz; Aschenbestimmung verloren gegangen, für die Berechnung der gleiche Aschengehalt angenommen, wie für die beiden letzten Versuche gefunden (1,51 pCt.); Verdauungs-Rückstand 1,092 g, verdaute Substanz 6,687 g, Tyrosin-Ausbeute 0,0081 g oder 0,12 pCt.

VIII. Lösliches Eiweiss des Fleisches (coagulirt) im Gewichte von 35,267 g, Trocken-Substanz 31,4 pCt. Aschengewicht 0,53 pCt.; Verdauungs-Rückstand 1,520 g, verdaute Substanz 9,490 g, Tyrosin-Ausbeute 0,1004 g oder 1,06 pCt.

IX. 33,20 g Fleischeiweiss (wie vorhin) mit 30,36 pCt. Trocken-Substanz und 0,54 pCt. Aschengewicht. Verdauungs-Rückstand 2,18 g, verdaute Substanz 7,857 g, Tyrosin-Ausbeute 0,0878 g oder 1,12 pCt.

X. 30,00 g Fleischfibrin (lufttrocken) mit 89,55 pCt. Trocken-Substanz und 0,306 pCt. Aschengehalt; Verdauungs-Rückstand 4,20 g, verdaute Substanz 22,599 g, Tyrosin-Ausbeute 0,3090 g oder 1,37 pCt.

XI. 11,783 g Casein (lufttrocken) mit 88,43 pCt. Trocken-Substanz und 0,96 pCt. Aschengewicht. Die Verdauungs-Lösung ergab beim Kochen unter Essigsäure-Zusatz nur einen minimalen Niederschlag, der nicht gewogen wurde. Gewicht der trockenen aschefreien Substanz 10,320 g. Tyrosin-Ausbeute 0,4700 g oder 4,55 pCt.

Wenn wir diese Resultate betrachten, ergibt sich, dass zwar die Parallel-Bestimmungen für bestimmte Eiweiss-Arten oft genug von einander abweichen, dass aber für verschiedene Eiweiss-Arten doch Unterschiede sehr deutlich hervortreten.

Für Fibrin differiren meine Resultate beinahe ebenso sehr, wie die oben citirten von Kühne, ob zwar Fäulniss in meinen Versuchen durch die Anwendung des Chloroformwassers ausgeschlossen war. Man wird wohl annehmen müssen, dass diese

Differenzen dadurch bedingt sind, dass die Zersetzung der Albumosen und Peptone in den verschiedenen Versuchen verschieden weit fortgeschritten war; daher dürften wohl die Maxima für die Tyrosin-Ausbeute am ehesten unter einander vergleichbar sein. Kühne fand bis zu 3,86 pCt. Tyrosin aus Fibrin, während das Maximum bei meinen Versuchen 3,82 pCt., also fast genau ebenso viel beträgt. Diesen Werthen sehr nahe liegt auch der von Schützenberger gefundene, während der Erlenmeyer's und Schöffers schon mehr zurückbleibt.

Am meisten differirend von diesen für Fibrin gefundenen Werthen sind unter meinen Resultaten die für Eier-Eiweis, welche durchweg niedriger sind, als 1 pCt. Die Werthe von Erlenmeyer und Schöffers, sowie von Schützenberger sind zwar höher, lassen aber ebenfalls deutlich den Unterschied von Fibrin hervortreten. Der von mir für Casein gefundene Werth stimmt mit dem von Biffi auf dem gleichen Wege, sowie mit dem von Schützenberger und von Cohn auf anderem Wege gefundenen leidlich gut überein. Man geht daher wohl nicht fehl, wenn man den Tyrosingehalt des Casein zu etwa 4,5 pCt. ansetzt. Für die Eiweisskörper des Fleisches sind meine Resultate — wenigstens soweit mir bekannt ist — die ersten. Die beiden gut übereinstimmenden Resultate für lösliches Fleisch-Eiweiss ergeben im Mittel 1,09 pCt. Der für Fleischfibrin in einem Versuche gefundene Werth liegt diesem Werthe sehr nahe.

Ich erfülle schliesslich nur eine angenehme Pflicht, indem ich Herrn Prof. Salkowski für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für die Unterstützung bei derselben meinen herzlichsten Dank ausspreche.

L i t e r a t u r a n g a b e n .

1. Escher, Vierteljahrsschrift der naturforsch. Gesellschaft zu Zürich 1876.
Lehmann, Sitzungsberichte der Münchener morphologisch-physiolog. Gesellschaft. 1885 u. A.
2. Erlenmeyer und Schöffers, Journal f. prakt. Chemie. Bd. 80.
3. Zollikofer, Annalen der Chemie und Pharm. Bd. 82.
4. Hinterberger, citirt nach Erlenmeyer u. Schöffers a. a. O.
5. Städeler, Annalen der Chem. u. Pharm. Bd. 111.
6. Weyl, Berichte d. deutschen chem. Gesellschaft. Bd. 21 S. 1529.
7. Horbaczewski, Sitzungsberichte der kaiserl. Academie d. Wissensch.
Wien, mathem.-naturwisch. Classe, II. Abtheilung, Bd. 80 u. 92.

8. Schwarz, Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. 18.
 9. Pröscher, *ibid.* Bd. 27.
 10. Schulze, *ididem*, Bd. 7.
 11. Siegrfid, Berichte d. deutschen chem. Gesellsch., Bd. 24.
 12. Derselbe, Jahresber. f. Thierchemie, Bd. 22.
 13. Hedin, *Ibid.*, Bd. 23.
 14. Cohn, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 22 u. 26.
 15. Schützenberger, Bulletins de la soc. chimique, Bd. 23, 24 u. 25.
 16. Derselbe, Comptes rendus de l'académie des sciences, Bd. 86.
 17. Schützenberger und Bourgeois, *ibid.* Bd. 81.
 18. Kühne, dieses Archiv, Bd. 39.
 19. Biffi, *Ibid.* Bd. 152.
 20. Salkowski, Zeitsch. f. Biologie, Bd. 34.
 21. Senator, dieses Archiv, Bd. 43.
-