

# JONGSTE VORDERINGEN IN DE STUDIE DER EIWITSTOFFEN.

DOOR

R. S. TJADEN MODDERMAN.

---

De uiterst gecompliceerde samenstelling der eiwit-lichamen en de groote moeilijkheid ze zuiver af te scheiden zijn de bekende redenen, die haar studie langen tijd weinig deden vorderen. Vele scheikundigen, te recht begrijpend dat op het overige ruime gebied der koolverbindingen veel meer kans was op bevredigende uitkomsten, hadden 't onderzoek der eiwitstoffen laten varen en grootendeels aan de physiologen overgelaten, die wel gedwongen waren de genoemde stoffen, wegens haar overwegend belang voor het leven, telkens weer in den kring hunner onderzoekingen op te nemen.

In den laatsten tijd, nu door de reusachtige vorderingen der chemie betere inzichten verkregen zijn over het wezen der koolverbindingen en men over veel verbeterde methoden en hulpmiddelen beschikt, is daarin evenwel verandering gekomen en worden de eiwitlichamen, ook door eigenlijke scheikundigen, meer dan vroeger in studie genomen.

Op veelbelovende wijze geschiedt dit te Berlijn in het laboratorium van prof. E. FISCHER, wel bekend door zijn klassieke onderzoekingen in de suikergroep. In de door hem en zijne leerlingen reeds eenige jaren voortgezette studie worden de eiwitstoffen, anders dan tot dusver, niet zoozeer direct onderhanden genomen, als veeleer langs een omweg benaderd.

Jaren-lang was het hoofddoel van 't onderzoek de verhouding der eiwitstoffen tot reagentia na te gaan en op grond daarvan hare talrijke wijzigingen in groepen en soorten te verdeelen. Daarna was men tevens er al meer en meer toe overgegaan om de eiwitlichamen door inwerking van zuren, alkaliën, enz. te ontleden, ten einde uit

de aldus verkregen producten te besluiten tot de brokstukken, tot de steenen zoo men wil, waaruit het eiwit-molecule is opgebouwd. Wat hierbij veel moeite kostte, was de verkregen verbindingen behoorlijk te scheiden en in zuiveren staat te verkrijgen. FISCHER heeft daarin groote verbeteringen gebracht, niet het minst door zijn ontdekking, dat men amino-zuren als esters kan scheiden door gefractioneerde distillatie in het luchtledige.

Genoemde zuren toch, die een of meermalen de groep  $\text{NH}_2$  bevatten (in de zuren waarnaar zij heeten, worden de overeenkomstige plaatsen door waterstof ingenomen), nemen onder die ontledingsproducten een zeer voorname plaats in. Sommige daarvan, zoo b.v. het amino-azijnzuur, 't eerst verkregen uit lijmgevende stoffen, van daar en om den zoeten smaak gewoonlijk glyocol (lijmsuiker) of ook wel glycine genoemd, zijn reeds lang bekend. Zoo ook leucine, het tot de aromatische groep behorende tyrosine, het zwavelhoudende cystine en nog eenige anderen. Wat hierbij opmerking verdient is, dat men de genoemde en andere amino-zuren niet alleen door ontleding uit eiwitlichamen verkreeg, maar ze bovendien veelvuldig in het plantaardig en dierlijk lichaam aantrof, waar ze ongetwijfeld ook ontledingsproducten van eiwitstoffen zijn. In de planten kunnen ze omgekeerd weer tot opbouw van eiwit dienen, wat meer bepaald voor asparagine- en glutamine-zuur is aangetoond, die bij de ontkieming van vele zaden uit eiwit ontstaan en het jonge plantje in staat stellen om dit opnieuw te vormen.

De toepassing van de bovengenoemde scheidingsmanier leidde FISCHER onmiddellijk tot de ontdekking van twee nieuwe ontledingsproducten:  $\alpha$ -proline d. i.  $\alpha$ -pyrrolidinecarboxylzuur en de oxy-verbinding daarvan, welke de iminegroep (NH) bevatten, 't geen eveneens met het vooral door KOSSEL bestudeerde arginine het geval is<sup>1</sup>. Voorts toonde hij aan dat sommige aminozuren, z.a. alanine, (aminopropionzuur) phenylalanine en serine (amino-oxypropionzuur) standvastige splitsingsproducten der eiwitstoffen zijn en slaagde hij er in, de mono-

<sup>1</sup>) Dit lichaam, dat guanidine- $\alpha$ -amino-n-valeriaanzuur is en behalve twee groepen  $\text{NH}_2$ , ook twee groepen NH bevat, zou volgens KOSSEL het meest algemeen voorkomende van alle splitsingsproducten der eiwitlichamen zijn. Van de protaminen uit de spermatozoën van zalm, steur en andere visschen, maakt het 58—84%, der splitsingproducten uit, in de meer gecompliceerde eiwitstoffen neemt de hoeveelheid daarvan af, terwijl die van andere aminozuren, vooral de mono-, toenemen. KOSSEL beschouwt zelfs het arginine als de kern van het eiwit-molecule, om welke de overige groepen zich zouden scharen.

aminozuren uit verschillende eiwitstoffen althans bij benadering kwantitatief te bepalen.

SKRAUP heeft onlangs uit caseïne een reeks nieuwe producten verkregen, tot de groep der diamino- en hydroxy-amino-zuren behoorend, met name diamino-glutaarzuur, diamino-adipinezuur, amino-oxycarbosteenzuur en dioxy-diamino-kurkzuur. Voorts nog casean- en caseïnezuur, drie-basisch en van nog onbekende structuur. Van casean- en diamino-glutaarzuur werd ongeveer 10% van 't gewicht der caseïne verkregen, van 't caseïnezuur nog iets meer.

Zoo komen er van deze ontledingsproducten nog steeds eenige bij; 't bekende aantal zal thans ruim twintig bedragen, ongerekend de verschillend isomerieën, waarin sommigen, z.a.-leucine, gelijktijdig optreden.

Het onderzoek geschiedt, gelijk gezegd is, niet alleen kwalitatief, maar tevens zoo goed mogelijk kwantitatief. Zoo verkreeg ABDERHALDEN uit serumglobuline: glyocol 3,52 pCt., alanine 2,22 pCt., leucine 18,7 pCt.,  $\alpha$ -proline 2,76 pCt., phenylalanine 3,84 pCt., glutaminezuur 2,20 pCt., asparaginezuur 2,54 pCt. en cystine 0,67 pCt. Uit dit voorbeeld is evenwel niet veel te besluiten met betrekking tot andere eiwitlichamen; want hoewel met eenige uitzonderingen dezelfde splitsingsproducten telkens weer optreden, bestaan er kwantitatief groote verschillen.

In de eiwitlichamen schijnt ook een stikstof-vrije groep, tot de koolhydraten behoorend, voortekomen,<sup>1</sup> doch dienaangaande heerscht nog veel onzekerheid. Terwijl sommigen zich die groep in zwakke binding aanwezig denken, zou zij volgens anderen tusschen de eigenlijke eiwit-moleculen slechts in innige menging voorkomen. Een brug als 't ware tusschen eiwit en suiker vormt het glucosamine, door F. MÜLLER uit mucine en eiwit afgezonderd.

De amino-verbindingen ontstaan door hydrolyse uit eiwitlichamen,

1) De redenen waarom men dit aanneemt zijn o. a., dat de eiwitstoffen met de koolhydraten een reactie (de zoogenoemde furfurol-reactie van MOLISCH) gemeen hebben, voorts dat bij de ontleding door zuren, enz. iets afgesplitst wordt, dat het koperproefvocht reduceert en een osazon geeft. Nog onlangs verkreeg E. HARRIES uit caseïne, in zwak alkalische oplossing, door behandeling met ozon een vocht, dat naar suiker rook en met phenylhydrazine op bekende wijze een geel, vlok-kig osazon gaf. Dit laatste, waarvan de constitutie nog niet is opgehelderd, bevat — behalve de vermoede suikerachtige stof — een phosphor-verbinding. Bijna alle phosphorus uit de gebezigde caseïne (0,85 pCt.) was daarin aanwezig.

d. i. bij de ontleding nemen twee splitsingsproducten resp. H en OH, uit het water-molecule op. Men verkrijgt ze niet alleen door inwerking van zuren, maar ook door die van fermenten in zwak alkalische oplossing. Van veel belang zou het zijn door middel van zachter inwerkende reagentia de ontleding van het eiwit-molecule op een vroegeren trap tot staan te brengen, m.a.w. lichamen af te zonderen, die tusschen eiwitstoffen en amino-verbindingen instaan. De daartoe gedane pogingen zijn evenwel tot nu toe vrijwel vruchteloos gebleven.

Ook heeft men naar intermediaire producten gezocht op physiologischen weg, door na te gaan wat er in de spijsbuis van de eiwitlichamen uit ons voedsel wordt. Naar bekend is veranderen die eerst in albumosen en peptonen, die evenwel nog tot de eiwitstoffen behooren. Tusschen deze en de aminozuren heeft men nu het bestaan van tusschenproducten waarschijnlijk gemaakt; doch al vermoedt men dat zij tot de polypeptiden zullen behooren, de aard daarvan is nog weinig opgehelderd. Zoo onderzocht nog kort geleden ABDERHALDEN den inhoud van maag en twaalfvingerdarm van langen tijd met vleesch gevoederde honden. Uit de maag werden geene, uit het duodenum daarentegen wel aminozuren geïsoleerd, met name alanine, leucine, glutamine- en asparaginezuur. De hoeveelheid daarvan was evenwel steeds gering: misschien dat het meeste reeds geresorbeerd was. Uit den maag-inhoud werden, na verwijdering van nog coaguleerbaar eiwit, fracties verkregen door herhaald oplossen in methylalcohol en neerslaan met azijnzuur, die niet meer de bekende biureet-reactie gaven.<sup>1</sup> Hierin konden dus tusschenproducten schuilen, doch het gelukte helaas niet, daaruit bepaalde verbindingen af te scheiden.

Interessant is hierbij, gelijk ook uit proeven van ABDERHALDEN en RONA op muizen bleek, dat de afbraak der eiwitlichamen tot derivaten, waaruit deze in het dierlijk lichaam weer op nieuw worden opgebouwd, tamelijk ver gaat. Zij voederden namelijk genoemde dieren met caseïne en met caseïne dat gehydrolyseerd was, hetzij door trypsine, (ferment uit de alveeschklier) hetzij door zoutzuur. In het laatste geval verhongerden de muizen, doch zij die met het door ferment omgezette caseïne gevoederd werden, leefden even lang als de muizen

1) Violet-kleuring door bijtende potasch of soda en zeer verdunde oplossing van kopervitriool. De kleur is meer in 't blauw bij de meest gecompliceerde eiwitstoffen; in 't roode bij de meer eenvoudige, z. a. albumosen en peptonen. Wat de reactie niet meer geeft wordt niet meer tot de eiwitlichamen gerekend.

die zuivere caseïne ontvingen. En nu bestond het door ferment omgezet caseïne uit amino-zuren en verbindingen, overeenkomend met de hieronder te bespreken polypeptieden. Misschien dat het ook nog onbekende tusschenproducten bevatte, doch de biureet-reactie gaf het niet meer.

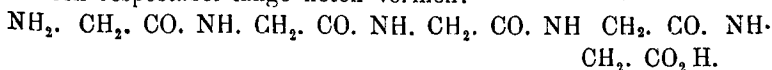
Gesteld dat nu alle ontledingsproducten der eiwitlichamen kwalitatief en kwantitatief volledig bekend waren, dan zou dit toch nog niet voldoende zijn om hun constitutie vast te stellen. Reeds voor veel eenvoudiger verbindingen geldt, dat analyse alleen den samenhang der atomen in het molecule niet zeker leeren kan; voor het hoogst samengesteld eiwit-molecule valt daaraan in 't geheel niet te denken. Toch zou het dwaasheid zijn, met het oog op onze tegenwoordige kennis der eiwitstoffen, hare synthese rechtstreeks te beproeven. Doch wat men doen kan is, dit later te verrichten werk voor te bereiden door twee, drie en geleidelijk meer splitsingproducten aan een te smeden, zoodat hunne betrekkelijk eenvoudige moleculen zich, onder afscheiding van enkele atomen, (veelal H en O H) ophoopen tot meer samengestelde. Deze bewerking, die naar men ziet het omgekeerde is van de hydrolyse, die bij de splitsing plaats vindt, doet dan lichamen ontstaan, waarvan men verwachten mag dat er onder zijn zullen, die in eigenschappen de eiwitlichamen naderbij komen.

Reeds een 20 jaar geleden was TH. CURTIUS aan soortgelijk werk begonnen en hij heeft dit in den laatsten tijd weer opgevat. Uitgaande van hippuurzuur, dat door hydrolyse benzoëzuur en glyocol geeft, slaagde hij er in, daarin nog meer van dit laatste op te hoopen, zoodat hij zelfs een zuur verkreeg, waarin zes „glyocol-resten”, ( $\text{NH CH}_2 \text{CO}$ ) aan de ééne zijde met het radikaal van het benzoëzuur ( $\text{C}_6 \text{H}_5 \text{CO}$ ), aan de andere zijde met hydroxyl (O H) tot een open keten verbonden zijn. Alhoewel hij nu tal van nieuwe lichamen verkregen heeft, die physiologisch belangrijk zijn en met ontledingsproducten der eiwitstoffen in verband staan, zijn het toch meerendeels benzoylverbindingen, van ondergeschikt belang voor de eiwit-synthese.

Meer rechtstreeks op dit doel aansturende zijn de proeven van EMIL FISCHER, die in den laatsten tijd met zijn leerlingen moleculen van amino-zuren tot meer samengestelde verdicht. De naam, dien hij aan deze condensatie-producten geeft, „polypeptieden”, herinnert aan die van de peptonen, waarmede zij werkelijk overeenkomst vertoonen en om wier nabootsing het allereerst te doen is.

De reactie, waarvan FISCHER zich in vele gevallen bediende, komt hierop neer, dat men een aminozuur aan de halogeen-verbinding van een zuurradicaal bindt (b. v. glyocol aan acetylchloride) en dan

op bekenden weg het halogeen door de amino-groep vervangt. Volgens deze, vaak naar omstandigheden gewijzigde methode, verkreeg hij di-peptieden, z.a. glycyl-glycine, alanyl-alanine, en leucyl-leucine, ophoopingten dus van twee gelijke amino-zuren, onder afscheiding van water. Voorts ook gemengde, z.a. glycyl-alanine, glycyl-tyrosine, enz. Door combinatie van drie en vier moleculen amino-zuur (waarvoor b.v. glycyl-glycine weer eerst aan chlooracetyl gebonden wordt) ontstonden tri- en tetrapeptieden. Zelfs werd van glyocol het pentapeptiede verkregen,  $C_{10}H_{17}, N_5O_6$ , waarin de kool- en stikstofatomen reeds een respectabel lange keten vormen:



Aangezien niet alleen van mono-aminozuren polypeptieden bereid zijn, doch ook van oxy- en diaminozuren, (waaronder het zwavelhoudende cystine) en niet alleen van eenvoudige (d. i. van een en hetzelfde aminozuur), doch ook van gemengde, zoo begrijpt men dat het geheele aantal, door FISCHER c. s. verkregen, reeds zeer groot is. En dit wordt nog verveelvuldigd door de talrijke isomeeren.

Wat nu de eigenschappen betreft, bij alle verschillen tusschen die der afzonderlijke leden, bestaat tusschen deze kunstproducten en de natuurlijke peptonen een onmiskenbare overeenkomst. Inzonderheid geldt dit voor de gemengde polypeptieden. De meer gecompliceerde geven de gewone reacties der peptonen: de biureet-kleuring, praecipitatie door phosphorwolframzuur en hydrolyse door het pankreasferment. Wel is waar zijn er ook verschillen in physische eigenschappen: zoo zijn vele polypeptieden moeilijk oplosbaar in water, vooral onder de eenvoudige en de optisch inactieve, doch onder de best met de peptonen vergelijkbare, de gemengde en optisch actieve, is die oplosbaarheid veel grooter. Velen zijn ook kristalliseerbaar, toch zijn er, vooral onder die met radicalen uit diamino- en oxyzuren, vele amorphe onder. FISCHER is dan ook van meening, dat met de kunstmatige bereiding der polypeptieden de belangrijkste stap gedaan is om tot de synthese der peptonen te geraken. Om uit te maken welke van de talrijke door kunst verkregen polypeptieden in het eiwitmolecule bestaan, in welke ketens de amino-zuren daarin aaneengeschakeld zijn, kan het verschillend gedrag tegenover het pancreasferment van eenige dienst zijn.

Gelijk er toch in de moleculen der eiwitlichamen deelen zijn, die het ferment weerstaan, of daardoor althans veel moeilijker worden aangetast dan andere, zoo vindt men ook dergelijke verschillen tusschen de synthetisch bereide polypeptieden. Zoo worden glycyl-

tyrosine en glycyl-leucine gemakkelijk door het ferment gehydrolyseerd en blijven glycyl-glycine en -alinine daarentegen onaangetast.

Mocht de door deze merkwaardige proeven gewekte verwachting vervuld worden en de synthese der peptonen waarlijk gelukken, dan is daarmede evenwel het grootsche doel der scheikundigen, om de meest samengestelde verbindingen der natuur in het laboratorium door kunst na te maken nog niet geheel bereikt. Want de peptonen, schoon nog tot de eiwitlichamen gerekend, zijn toch waarschijnlijk reeds splitsingsproducten van meer samengestelde, z. a. eiwit en caseïne.

In de laatst verschenen aflevering der „Berichte d. D. chem. Ges.“ (Jaarg. 38, bldz. 2696) vindt men nu een verhandeling van L. SPIEGEL, waarin hij meêdeelt, dat hij, naar hij gelooft, een manier gevonden heeft om uit peptonen eigenlijk eiwit te verkrijgen.

Van de veronderstelling uitgaande dat deze lichamen de bouwsteenen zijn, waaruit de hoogere eiwitstoffen zijn opgebouwd en dat de band, die ze verbindt, *niet* — gelijk veelal aangenomen wordt — zuurstof is, maar dat ze samenhangen door koolstof-atomen, koos hij als agens voor de synthese formaldehyde, waarmede meermalen zoodanige binding verkregen is. Hij voegt genoemd aldehyde bij een met azijnzuur zwak aangezuurde oplossing van peptonen en laat het bij zomertemperatuur (in den winter verloopt het proces heel langzaam en waarschijnlijk ook anders) korten tijd staan.

Er zet zich een gering neerslag af dat, afgefiltreerd, in verdunde natronloog geheel of ten deele weer oplost en uit die oplossing weer neerslaat door zuren. Dit neerslag gedraagt zich dus als een alkali-albuminaat.

Het onderzoek van het filtraat leverde uitkomsten, eenigszins verschillend naar den aard van de gebezigde peptoon-praeparaten. Had hij ware peptoon genomen, in den zin van KÜHNE,<sup>1</sup> dan verkreeg hij, na halve verzadiging met ammoniumsulfaat, een aanzienlijk neerslag, (eigenschap van de in de noot genoemde primaire albumosen) dat na totale verzadiging nog toenam (secundaire).

Waren daarentegen voor de proef peptonen van den handel genomen (het eene praeparaat was van onbekenden oorsprong, het andere van WITTE te Rostock) die albumosen bevatten, dan ontstonden door uitzouten met ammoniumsulfaat veel vroeger neerslagen. Deze begonnen

<sup>1</sup>) KÜHNE verdeelde in 1885 dat wat tot dien tijd peptoon heette, in twee soorten: 1<sup>o</sup> albumosen (later weder door PICK onderverdeeld in primaire en secundaire) die door uitzouten, 't beste door ammonium- of zinksulfaat, uit de aangezuurde oplossing neerslaan en 2<sup>o</sup> ware peptonen, die zich niet laten uitzouten.

reeds, als het vocht voor 7,4 en resp. 15 pCt. met het zout verzadigd was en namen door meerdere bijvoeging gestadig toe tot 50 pCt. Het filtraat hiervan werd verdampt en liet alleen kristallen van ammoniumsulfaat achter.

In de contrôleproef (genomen met peptoon-oplossing alleen aangezuurd) bleef na halve verzadiging met genoemd zout daarentegen, behalve de kristallen, ook nog een bruinachtige kleverige massa achter.

De albumosen uit de handelspraeparaten waren dus door de werking van het formaldehyde gemakkelijker praecipiteerbaar geworden door ammoniumsulfaat, ongeveer even gemakkelijk als de „euglobinen”, door FULD en SPIRO uit het globuline van het bloedserum afgezonderd.

Zijn de proeven onberispelijk en geen andere uitlegging daarvan aannemelijk, wat nader onderzoek wel zal uitmaken, dan heeft SPIEGEL derhalve, met behulp van formaldehyde, albumosen veranderd in eiwitlichamen, in aard vergelijkbaar met de euglobinen en ware peptonen in albumosen<sup>1)</sup>, terwijl in beide gevallen tevens in geringe hoeveelheid een stof ontstond van 't karakter van alkali-albuminaat.

Naar men ziet kan dit nog bezwaarlijk een volledige eiwit-synthese uit peptonen heeten, al schijnt een veelbelovend begin gemaakt.

Overigens is in dezen een weinig scepsis aan te bevelen en zal men goed doen zijn oordeel op te schorten. Want op geen gebied der chemie staat men van ouds aan zoovele teleurstellingen bloot, als op dat van de eiwitstoffen.

Toch is in de laatste jaren onze kennis dezer hoogst belangrijke lichamen aanzienlijk vermeerderd en wettigen alleen reeds de medegedeelde uitkomsten van FISCHER en zijne leerlingen de hoop, dat — zij het dan ook nog niet in de naaste toekomst — toch ten lange leste het moeilijkste vraagstuk der chemie, de eiwit-synthese, door de volhardende pogingen der natuur-onderzoekers zal worden opgelost.

den Haag, Oct. 1905.

<sup>1)</sup> Dat in dit geval de eerst gevormde albumosen niet veranderd werden kan hieraan liggen, dat SPIEGEL opzettelijk weinig formaldehyde toevoegde, aangezien hij van een overmaat verdere werking op eventueel eerst gevormd eiwit vreesde.