

De Amino-zuren en de Visch

door Dr. Sc. et Pharm. A. DE CLERCQ.

De studie der amino-zuren, hunne betrekkingen met de protiden en de voeding wordt met den dag belangrijker. Men onderscheidt onder de amino-zuren, die de afbraakprodukten zijn der eiwitten, deze die onontbeerlijk zijn voor de menschelijke voeding, en deze, waaraan tot hertoe geen speciale voedingseigenschappen toegekend werden.

Volgens Max Lafont (1) zijn volgende amino-zuren bepaald onontbeerlijk : thréonine, leucine, isoleucine, cysteine, lysine, phenylalanine, tryptophaan, histidine.

Voor valine verkeert men nog in twijfel.

Maar tot op heden werd de minimale dagelijksche onontbeerlijke dosis voor het menschelijk organisme niet vastgesteld.

De onontbeerlijkheid van deze 8 amino-zuren werd experimenteel vastgesteld door voedingsproeven met dieren.

Men kan voedingsproeven uitvoeren met gezuiverde eiwitstoffen zooals gelatine, zein, ovalbumine, serum albumine, serum globuline, caseine, enz., waarvan de samenstelling bepaald werd, en waarvan men zeker is, dat zekere amino-zuren erin ontbreken. Men weet b.v. dat zein geen tryptophaan noch lysine bevat (2).

In plaats van gezuiverde eiwitstoffen kunnen protiden hydrolysaten aangewend worden, waarvan een of meer amino-zuren verwijderd worden. Abderhalden, in 1913 (3), legde een reeks proeven aan met een caseine-hydrolysaat bevrijd van tyrosine.

Een derde methode kan toegepast worden. Men wendt zich tot gezuiverde mengsels van amino-zuren. Soms is men verplicht, synthetische amino-zuren te gebruiken, daar zekere natuurlijke produkten uit hydrolysaten bereid, moeilijk in volledig zuiveren toestand kunnen bekomen worden.

(1) Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim. Vol. XXVI. 1938, 5-6.

(2) Chemistry of the proteins. Lloyd and Shore, Blackiston, Philadelphia, 1938.

(3) Z. Physiol. 83, 1913, 444.

Dit geldt b.v. voor leucine dat gewoonlijk verontreinigd wordt door valine en methionine.

De dieren welke ondervoed worden aan een bepaald aminozuur, uit de reeks der onontbeerlijke, vertoonen niet alleen een vertraging in den groei of een groeistilstand met noodlottigen afloop, maar geven aanduidingen omtrent de physiologische rol, door de onderzochte aminozuren vervuld.

Tryptophaan heeft naar alle waarschijnlijkheid een invloed op de snelheid van het metabolisme, en beïnvloedt de vorming van hemoglobine.

Voor lysine, buiten een uitgesproken invloed op den groei van het organisme, schijnt geen ander werking te bestaan, alhoewel de ϵ positie van de aminogroep in de molekuul, bijdraagt tot de colloïdale eigenschappen van de protiden. Het zijn namelijk de ϵ aminogroepen, die hoofdzakelijk de vrije aminogroepen van de eiwitmolekuul uitmaken.

Er dient opgemerkt te worden dat de l-zuren, welke uitsluitend voorkomen in de natuurlijke produkten, in het algemeen werkzamer zijn dan de d-zuren.

Histidine, zou een purinevormer zijn volgens verschillende auteurs en ook een sterken invloed uitoefenen op de maagsekretie, zoodat zekere onderzoekers de corresponderende base, histamine, beschouwen als de maaghormoon.

Threonine en cystine bezitten groeibevorderende eigenschappen en zijn de oerstoffen van gluthathion, taurine, insuline en keratine.

Taurine verbonden met cholinezuur speelt een belangrijke rol in de verteering der lipiden (taurocholinezuur).

Phenylalanine staat in betrekking met thyroxine en met tyrosine, dat op zijn beurt adrenaline kan vormen, wiens physiologische belangrijkheid vast staat.

Dit zijn de inlichtingen die de proefondervindelijke methodes geleverd hebben, omtrent de physiologische activiteit van de onontbeerlijke aminozuren.

Volgens de onderzoekingen, uitgevoerd door Kögl en Erxleben (4) zou het ontstaan van kankergezwellen in verband staan met het

(4) Z. Phys. Chem. 258, 57. 1939.

metabolisme van aminozuren. Beide auteurs hebben door hydrolyse van sarcoma en carcinoma, vastgesteld dat dergelijke weefsels, d-glutaminezuur bevatten; het draaiingsvermogen van het geïsoleerde glutaminezuur is verminderd.

Normaal voorkomend l-glutaminezuur heeft een $\alpha_D = 31,5^\circ$. De cijfers gevonden door Kögl en Erxleben zijn: $+ 21,8^\circ$; $+ 4,5^\circ$; $+ 11,5^\circ$; cijfers welke respectievelijk een % aan d-glutaminezuur laten berekenen van 15,5; 42,7; 31,7.

In een mededeeling (5) van het Research Institute, Royal Cancer Hospital (Free), Londen, door A. E. Chibnall, M. W. Rees, J. R. Tristram, E. F. Williams. E. Boyland wordt in 3 onderzochte kankerweefsels als $\alpha_D = 31$; $31,7^\circ$; $31,2^\circ$ opgegeven; cijfers welke zuivere l-glutaminezuur aanduiden.

De hydrolyse processen, welke aangewend worden, hebben gewoonlijk de racemisatie voor gevolg, zooals blijkt uit de onderzoekingen van Michael en Wing, voor aspartinezuur (6) en andere. Een overzicht der bibliographie over dit verschijnsel vindt men in de chemistry of the aminoacids and proteins van Schmidt (7).

Men kan zich bij de studie der aminozuren nog op een ander standpunt plaatsen, en zich afvragen welke de schadelijke minimale dosis is der verschillende aminozuren, zoowel onontbeerlijke als ontbeerlijke. Het zou wel interessant zijn na te gaan welke de gevolgen zijn van een massieve dosis van een aminozuur dat men in de dieet inschakelt van proefdieren. Kan een eentonig protidendieet, bestaande b.v. uit een protidenmengsel, waar alle tot hertoe gekende onontbeerlijke aminozuren aanwezig zijn, maar waar een bepaald aminozuur in overwegende hoeveelheid aanwezig is, geen morbiede verschijnselen verwekken?

Al deze gegevens en beschouwingen wijzen op het groot belang der grondige kennis die nog moet opgedaan worden, omtrent de verschillende aminozuren, die als afbraakprodukten in de protiden onzer voeding voorkomen.

Een dezer protiden heeft ons bijzonder belang, de vischprotide. Zij raakt de visch, de bewoner van den oceaan. Wat vinden wij

(5) Nature, n° 3636, 1939, 71.

(6) Americ. Chem. J. 7, 278, 1885.

(7) Chemistry of the aminoacids and proteins, Thomas Springfield, Illinois, 1938.

in de litteratuur omtrent het onderzoek der hydrolyseprodukten der spieren van zeedieren ?

De eerste onderzoekingen op dit gebied dagteekenen van 1909 en werden uitgevoerd door een reeks Japanners op Japansche vischen en krabsoorten (8) waaronder Suzuki, Okuda, Odaki, Yoneyama. In deze onderzoekingen werden de gehalten aan arginine, histidine, tryptophaan, leucine, alanine, tyrosine en taurine bepaald.

Groszfeld en König (9) hebben bewezen dat vischeieren vrije aminozuren bevatten, namelijk l-tyrosine en glycocol.

In verband met tyrosine vermelden wij dat O. Wille (10) aange-toond heeft dat het azijnzuur der marinaden tyrosine vrij maakt uit haringvleesch.

Jones, Moeller en Gersdorff (11) hebben sporen van vrije aminozuren in garnaalvleesch aangetroffen.

Beck en Casper (12) hebben in 1928 de methode van Van Slijke toegepast op kabeljouw, rund, kalf, varken, schaap, paard en gansenvleesch, zonder noemenswaardige verschillen te vinden, wat de verdeeling der verschillende N soorten, zooals Van Slijke die opgeeft, betreft.

Scharpenak, Balaschowa en Perzowska (13) hebben in 1934 het gehalte aan tyrosine, cystine en tryptophaan in baars bepaald.

Tyrosine, tryptophaan en arginine bepalingen werden door Leontjew en Markowa (14) uitgevoerd op zeemossel en zeekrab.

Steudel en Takalashi (1937) (15) hebben uitgemaakt dat haringvleesch een dipeptide bevat taurine en geen cystin, zooals het N en S gehalte liet vermoeden.

Om in conserven, walvischvleesch te onderscheiden van rundvleesch werd door Poppe en Helmut (16) de aanduiding gegeven

(8) Journ. Agric. Tokyo 1912, 5,1.

(9) Biochem. Zeitschr. 1913, 54, 351.

(10) Zeit. Nahr. u. Gen. 1936.

(11) Journ. Biol. Chem. 1925, 65, 59-65.

(12) Z. Nahr. u. Gen. 1928, 56, 437-457.

(13) Problems. Nutr. 5, n^r 6, 57-63 (1934).

(14) Z. Nahr. u. 1936, 72, 447.

(15) Hoppe Seylers Z. 250, 25-30 (1937).

(16) Fleisch u. Milchhygiene 48, 208-211, 224-226, 1938.

zich te steunen op het hooger gehalte aan histidine van walvisch-vleesch.

Een nauwkeurige en volledige analyse van een kabeljauw-protide bereid door de Deutsche Eiweisz-Gesellschaft in Hamburg, werd in 1939 door Abderhalden E. (17) gepubliceerd.

Uit deze korte reeks onderzoeken kunnen wij besluiten dat nog veel moet gedaan worden, om onze kennis omtrent de gehalten aan de verschillende aminozuren in de verschillende vischsoorten te volledigen.

Het onderzoek van Abderhalden besluit tot de aanwezigheid van alle onontbeerlijke aminozuren in de kabeljauwprotide.

Hij geeft namelijk volgende cijfers voor 100 gr. droog eiwit : 0,6 cysteine + cystine ; 0,3 methionine ; 7,5 leucine ; 1,5 isoleucine ; 1,1 phenylalanine ; 8,5 lysine ; 4,8 histidine, 2,1 tryptophaan.

Om de chemische analyse der aminozuren, bekomen door hydrolyse van protiden uit te voeren, beschikken wij over algemeene methodes welke onvolledig zijn, en speciale doseeringsmethoden, hetzij gravimetrisch, hetzij colorimetrisch.

Onder de algemeene methoden is deze van Van Slijke (1911) eenvoudig. Zij is gesteund op de N bepaling volgens Kjeldahl der hydrolysaten en der gevormde neerslagen met phosphotungsteen-zuur. In een bijdrage (18) hebben De Clercq en Pinte de voorwaarden bepaald der volledige neerslag van aminozuren met phosphotungsteen-zuur. Deze methode geeft een benaderende bepaling en werd veel toegepast.

Dakin's butylalcohol extractie methode en Fischer's ester methode zijn technisch ingewikkeld en bieden zekere niet te onderschatten nadeelen.

De methode van Kossel en Kutscher beperkt zich tot de scheiding van histidine, arginine en lysine. Zij werd verbeterd door Vickery en Leavenworth.

In 1937 werd een methode beschreven door Przylecki en Kasprzyk (19).

(17) Dtsch. Fischerei Rundsch., 193-194.

(18) Pharmaceut. Tijdschr. XVI, 1938, n^o 7, 128-134.

(19) Biochem. Z. 289, 243-250.

Zij is gesteund op de oplosbaarheid der verschillende aminozuren in verschillende vetzuren met een bepaald watergehalte. Watervrije vetzuren lossen volgende aminozuren op: arginine, histidine, lysine en kleine hoeveelheden leucine en isoleucine.

Na hydrolyse worden het zuur of de base verwijderd, daar de aminozuren als vrije basen met het vetzuur moeten behandeld worden.

De methode van Vickery en Leavenworth (20) kan toegepast worden om histidine, arginine en lysine te bepalen. Leucine en isoleucine zal men door verschil bepalen (Kjeldahl).

Arginine kan ook eventueel gravimetrisch bepaald worden onder vorm van flavianaat (21). Histidine laat zich colometrisch bepalen (22). Lysine levert een onoplosbaar picraat (23). De overblijvende aminozuren worden met azijnzuur 99, à 99,5 % behandeld.

Volgende zuren gaan in oplossing: glyocol, alanine, aminoboterzuur, valine, leucine, phenylalanine, proline, oxyproline, asparagine, glutamine: het zijn de neutrale aminozuren en de amiden.

De amidostikstof kan bepaald worden en geeft de som asparagine + glutamine. Het Reineckezout slaat quantitatief proline en oxyproline neer (24). Proline kan bepaald worden als goudzout (25).

De resterende aminozuren worden nu behandeld met absoluten alcohol; glyocol gaat alleen in oplossing en kan colorimetrisch bepaald worden (26).

Koperacetaat slaat leucine, isoleucine, asparagine en glutamine neer. Door de amidestikstof kennen wij de som asparagine + glutamine. Door verschil berekent men de som leucine + isoleucine.

Met phosphotungsteen-zuur worden alanine en phenylalanine neergeslagen, welke afzonderlijk door de specifieke methodes van

(20) J. Biol. Chem. 83, 1929, 523.

(21) J. Biol. Chem. 68,225 - 72, 403 - 75, 115.

(22) Hoppe Seylers Z. 240, 199-207, 1936.

(23) Z. Phys. chem. 26, 586. Zeitschr. Biol. 57, 3555.

(24) Z. Phys. Chem. 170, 294 en 310.

(25) Bull. Soc. Chim. Biol. Paris. 19, 1126-1128 (1937).

(26) Hoppe Seylers Z. 205, 251-258 (1932).

Fromageot en Heitz (27) en deze van Kapffler en Adler kunnen bepaald worden (28).

Het tweede overschot der aminozuren wordt behandeld met NaOH bij Ph 6. Cystine, asparagine en glutaminezuur gaan in oplossing, tyrosine blijft onopgelost. Na uitdamping van de oplossing tot droog worden de resterende aminozuren met een oplossing azijnzuur die 20 % natriumacetaat bevat behandeld; de zure aminozuren gaan in oplossing. Cystine blijft onopgelost.

Cystine (29) en tyrosine (30 en 31) kunnen colometrisch bepaald worden. Glutaminezuur wordt bepaald volgens de techniek van Foreman (32).

De schema van deze methode hebben wij in extenso medegedeeld, omdat wij ons voornemen al hare bijzonderheden te controleren en ze dienstig te maken tot een grondig onderzoek van de vischprotiden. Het blijkt van het grootste belang, gezien de rol die de aminozuren vervullen, zooveel mogelijk alle analytische gegevens te verzamelen en te controleren, omdat het broodnoodig is voor verdere ontwikkeling onze kennis van de physiologische werkzaamheid der aminozuren, deze, gemakkelijk te kunnen identificeren en quantitatief te bepalen.

In dit domein hebben wij een eerste punt kritisch bestudeerd: de colorimetrische bepaling van arginine in protiden hydrolysaten.

Volgens Krebs en medewerkers (33) is arginine een schakel in de vorming van het ureum. Ornithine geeft met CO₂ en NH₃ citrulline dat verder met NH₃, arginine vormt. Arginine wordt ontbonden door een ferment arginase, in ureum en ornithine.

Hunter beweert dat arginine de stof is die aanleiding geeft tot de vorming van creatine in het organisme (34).

Arginine neemt in de reeks der aminozuren een afzonderlijke plaats in. Alhoewel niet gerangschikt bij de onontbeerlijke amino-

(27) Mikrochem. Acta 3.52-67 (1938).

(28) Biochem. Z. 264, 131 en 285, 123 en 296.

(29) Biochem. Z. 295, 377-390 (1938).

(30) C. R. Acad. Sci. Paris 204, 197-200 (1937).

(31) Science (N.-Y.) 1938, 11, 379.

(32) Biochem. J. 8. 463, 1914.

(33) Z. Phys. Chem. 210, 33, (1932).

(34) Creatine and Creatinine, London, New-York. 1928 door Hunter.

zuren hebben de voedingsproeven van Rose (35) aangetoond dat het organisme wel in staat is arginine op te bouwen maar niet in voldoende hoeveelheid. Bij voedingsproeven met jonge dieren heeft Rose bewezen dat de groei geremd wordt en zelfs tot stilstand wordt gebracht.

In een bijdrage die zal verschijnen in de Vlaamsche akademie geven wij de uitslagen van colorimetrische bepalingen van arginine in verschillende vischsoorten.

De gevolgde werkwijze is deze van Jorpes en Thorén (36).

Kapfhammer heeft dezelfde methode gevolgd voor de bepaling van arginine in het centrifuge slijm van afgeroomde melk (37).

De onderzochte vleesch- en vischsoorten kunnen op volgende wijze gerangschikt worden in dalende reeks wat hun arginine gehalte betreft: garnaal, rundvleesch, schaapvleesch, varkensvleesch en kabeljauw, schelvisch, haai, rog. Maximum bij garnaal: 0,084 % in droge ontvette stof, 0,029 voor rog in droge ontvette stof. Garnaal bevat driemaal meer arginine dan rog.

Deze cijfers bezitten geen absolute waarde daar de hydrolyse uitgevoerd werd met HCl en met andere zuren dient uitgevoerd te worden. Arginine wordt trouwens gemakkelijk omgezet tot ornithine.

Om de brutale inwerking van zuren te vermijden wordt de hydrolyse uitgevoerd met enzymen, met methylalcohol onder druk.

Het is noodzakelijk om juiste gegevens te bekomen de hydrolyse uit te voeren met verschillende hydrolyseerende middelen en in verschillende voorwaarden. Voor meerdere inlichtingen wordt naar het oorspronkelijke werk verzonden.

Na deze uiteenzetting van het vraagstuk der aminozuren in verband met de zeevisch, kunnen wij om meer nadruk te leggen op het belang van de vischprotide in het algemeen niet beter doen dan aanhalen hetzeden Ziegelmayer schrijft in zijn boek «Rohstoff-Fragen der Deutschen Volksvernährung» (1939 verlag van Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig), over het kabeljauw eiwit door de Deutschen Eiweisz Gesellschaft Hamburg bereid.

(35) W. Stepp Ernährungslehre 1939 pp. 55.

(36) Biochem J. 26, 1504, 1931.

(37) Die Ernährung 11. 223, 1939.

« Nach den Darlegungen von Abderhalden ist vom grössten
« Interesse dasz dieses Eiweisz Cystein aufweist. Ferner sind die
« beiden, vor einiger Zeit im Physiologischen Institut in Halle ent-
« deckten Animosaüren Norvalin und Norleucin zugegen, ein gleiches
« gilt von dem von J. J. Müller im Kasein entdeckten Methionin.
« Recht hoch ist der Gehalt an dem so wichtigen Tryptophan. Auch
« Arginin und Lysin sind in recht erheblichen Mengen zugegen.
« Dieses Eiweiszpulver enthält das lebenswichtige Jod. »

De physiologische activiteit der aminozuren, de belangrijke rol die zij vervullen in het voedingsproces, de ziekteverschijnselen die zij kunnen door hunne aan- of afwezigheid verwekken in het menschelijk lichaam, zijn zooveel argumenten die pleiten voor een doortastende studie van dezen groep organische stoffen. Wij mogen uit de studie der vischprotiden, nieuwe leerrijke gegevens verwachten.

*Laboratorium van Bromatologie
der Universiteit, Gent.*
