Über die Magensaft-Proteolyse.

III. Mitteilung. Über das Verhalten der Peptonkörper gegenüber Proteasen verschiedener Herkunft.

Von

Tameji Hirooka.

(廣岡爲次)

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen
Fakultät der Kaiserlichen Tohoku-Universität, Sendai.*

Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

In Bezug auf die enzymologische Einstellung gegenüber Caseino- oder Gelatopepton hat zuerst Itzioka (1937)¹⁾ und dann Mori (1938)²⁾ beobachtet, dass das Pepton, das durch die wiederholte Einwirkung der Mazeration der Magenschleimhaut dargestellt wurde, weiter durch den Kaninchen-Pankreassaft oder Trypsin-Grübler hydrolysiert werden kann, während das Trypton, unter dem man die Abbauprodukte der Peptidnatur durch den Pankreassaft oder durch das Trypsin versteht, weiter nicht durch dies Enzym oder durch Pepsin-Salzsäure angegriffen wird, jedoch durch den Darmsaft und die Lebermazeration bei pH 7, 8, wie es auch von Chen et al. (1940)³⁾ in den Versuchen mit den durch Pankreassaft dargestellten Caseino- und Gelatotrypton bestätigt wurde.

In diesem Zusammenhang kam das Magensaft-Pepton aber sehr selten in Betracht und es wäre vom Standpunkt der Verdauungsphysiologie sehr wünschenswert, einmal das enzymologische Studium mit dem Magensaft-Pepton in Angriff zu nehmen, das man besonders durch Einwirkung des frischen Magensaftes auf Eiweissstoffe bereitete, indem man das Verhalten des Peptons, welches durch die Mazeration der Magenschleimhaut dargestellt wurde, auch anderseits vergleichend studierte.

Dazu taucht noch eine neue Frage auf, ob das Magensaft-Pepton auch durch die Gewebeenzyme besonders durch die von der Ereptase befreite katheptische Peptonase bei schwach saurer Reaktion angreifbar ist, da es Utzino und Sakai (1941)⁴⁾ gelungen ist, die katheptische

Peptonase von der ereptischen Wirkung zu trennen. Ferner wäre es auch von grossem Interesse, das Verhalten des Mucinopeptons gegenüber Proteasen an den Tag zu bringen, da Verf. in der vorigen Mitteilung über das biologische Verhalten des Mucins bzw. des Mucinopeptons auf die starke Toxität derselben hingewiesen hat.

In Hinsicht der Peptonspaltung haben Waldschmidt-Leitz und Simons (1926)⁵⁾ die Spaltung des Caseino-Peptons durch die Erep-sinlösung und darauf Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser (1927)⁶⁾ die Hydrolyse des Teleopeptons aus Fleisch durch den Hundedarmsaft festgestellt, nachdem die Peptonspaltung (Peptonum ex albumine, Merck) früher von Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter (1925 u. 1926)⁷⁾ verneint worden war.

Neuerdings hat Matsuo (1941)⁸⁾ die Spaltung des Peptons durch den Hundedarmsaft beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit hat Verf. sich weiter unter Leitung von Prop. S. Utzino mit dem Studium der enzymologischen Einstellung gegenüber Magensaft-Peptonkörpern beschäftigt und die Ergebnisse hier zusammengestellt.

Wie aus der Darstellungsweise dieser Peptonkörper zu ersehen ist, die durch die maximale Spaltung des Proteins nach der wiederholten Pepsin-Salzsäure-Digestion gewonnen wurden, zeigte das Pepsin-Pepton einen starken Widerstand gegenüber der weiteren Wirkung des Magensaftes wie auch der Mazeration des Magenschleimhautbreis und es wurde in keinem Falle dadurch gespalten, während Casein im Kontrollversuch deutlich durch diesen Magensaft angegriffen wurde (Tabelle 1 u. 2).

Versuchsteil.

Tabelle 1.

Wirkung des Magensaftes (Hund) und der Magenschleimhautmazeration (Kaninchen) auf Caseinopepton und Casein.

Caseinopepton: Nach maximaler Einwirkung des Magensaftes auf Casein (Hammarsten) bei pH 2,0 wurde das Digestat nach Neutralisieren mit Natronlauge auf dem Wasserbade unter 40°C mittels Föns eingengt dann durch Aceton gefällt und gestrocknet. Die Analysenzahlen des Caseinopeptons sind schon angegeben (Hirooka, 1942 I. u. II. Mitteilung).

Der Magensaft wurde aus der Magenfistel des Hundes nach der Scheinfütterung mit Fleisch-Reis-Mahlzeit gesammelt.

Magenschleimhaut-Mazeration: 1 Teil Schleimhautbrei des Kaninchens wurde mit der 3 fachen Volummenge Glycerin-Wasser gut zerrieben, koliert und unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt.

Versuchsansatz mit Magensaft: 25 ccm 1 %iger Caseinopepton oder Caseinlösung von verschiedenen pH-Werten + 2 ccm Magensaft + Toluol; digeriert bei 37°C.

Kontrollversuch: 2 ccm Magensaft + 25 ccm Pufferlösung von verschiedenen pH-Werten ohne Substrat + Toluol; digeriert bei 37°C.

Versuchsansatz mit Mucosa-Mazeration: 20 ccm 1 %iger Caseinopepton- oder Casein-Pufferlösung von verschiedenen pH-Werten + 2 ccm Magenschleimhautmazeration (Kaninchen) + Toluol; bei 37°C digeriert.

Kontrollversuch: 20 ccm Pufferlösung von verschiedenen pH-Werten + 2 ccm Magenschleimhautmazeration ohne Substrat + Toluol; digeriert bei 37°C.

Nach einer gewissen Digestionszeit wurde die Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat nach Sørensen formoltitriert. Die Kontrollwerte sind von denjenigen des Hauptversuchs abgezogen. Die korrigierten Werte der Aciditätszunahme finden sich in Tabelle angegeben.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)											
Substrate		Magensaft						Mucosa-Mazeration			
	pH	1,5	2	3	4	5	6	2	3	4	5
	Std.										
Caseino-pepton (Saft)	5	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—
	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0,1	0	0	0	0	1	0	0,1	0	0
Casein	5	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	—	—	—	—
	24	0,2	0,3	0,4	0,7	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1
	72	0,5	0,5	0,5	0,9	0,2	0,1	0,3	0,4	0,4	0,1
	120	0,7	0,5	0,6	1,0	0,2	0,1	0,3	0,5	0,4	0,1

Tabelle 2.

Wirkung des Magensaftes des Hundes oder der Magenschleimhautmazeration auf Caseino-, Mucino-, Fibrino-, und Gelatopepton.

Die Peptonkörper wurden nach der maximalen Einwirkung des Hundemagensaftes oder des Magenschleimhautbreis auf Eiweisskörper dargestellt, wie es schon in der vorigen Mitteilung beschrieben war. Die Magenschleimhautmazeration besteht aus 1 Teil Schleimhautbrei des Magens und 3 Volumteilen Glycerin-Wasser (1:1).

Versuchsansatz: 20 ccm 1 %iger Substratpufferlösung (pH 2) + 2 ccm Magensaft oder 2 ccm Magenschleimhautmazeration + Toluol; digeriert bei 37°C.

Kontrollversuch: 2 ccm Magensaft oder Magenschleimhautmazeration + 20 ccm Pufferlösung ohne Substrat + Toluol; digeriert bei 37°C. Formoltitration.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)								
Substrate		Caseino-pepton	Mucino-pepton	Mucino-pepton	Fibrino-pepton	Fibrino-pepton	Gelato-pepton	Witte-pepton
Enzyme	Std.	(Saft)	(Saft)	(Brei)	(Saft)	(Brei)	(Brei)	
Magensaft (Hund)	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0,1	0	0,1	0	0

Magen- Schleimhaut (Schwein)	24 72 120	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0,1	0 0 0	0 0 0	0 0 0
Magen- Schleimhaut (Hund)	24 72 120	0 0 0	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —
Magen- Schleimhaut (Kaninchen)	24 72 120	0 0 0	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —

Bei der Wirkung des frischen Pankreassaftes, der aus der am Hunde gelegten Pankreasfistel gewonnen und mit der von erepsinfreien Entero-kinase aktiviert wurde, trat eine deutliche Hydrolyse der versuchten Peptonkörper auf, und es wurde mit Sicherheit die Spaltbarkeit des Pepsin-Peptons durch den aktivierten Pankreassaft festgestellt (Tabelle 3). Ferner ergaben die Resultate, dass die Peptonkörper durch den

Tabelle 3.

*Wirkung des Pankreassaftes auf Caseino-, Mucino-, Fibrino-,
Gelato- und Witte-Pepton.*

Die Peptonkörper wie in Tabelle 1. Der Pankreassaft wurde aus der am Hunde angelegten Pankreasfistel nach der Fleisch-Reis-Nahrung gesammelt und beim Versuche mit der erepsinfreien Entero-kinase (Kawaharada) aktiviert.

Versuchsansatz: 18 ccm 1% iger Substratlösung + 2 ccm mit Entero-kinase (0,03 g) aktivierten Pankreassaftes, mit Pufferlösung auf 22 ccm gebracht (pH 7,8) + Toluol; digeriert bei 37°C.

Kontrollversuch: 2 ccm mit Kinase aktivierten Pankreassaftes ohne Substrat mit Puffer auf 22 ccm gebracht (pH 7,8) + Toluol; digeriert bei 37°C. Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Pepton. Formoltitration. Die korrigierten Werte der Aciditätszunahme in Tabelle angegeben.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)								
Std.	Substrate	Caseino- pepton (Saft)	Gelato- pepton (Brei)	Mucino- pepton (Saft)	Mucino- pepton (Brei)	Fibrino- pepton (Saft)	Fibrino- pepton (Brei)	Witte- pepton
	24	0,8	0,5	0,7	0,3	0,2	0,7	0,9
	72	0,9	0,7	0,8	0,3	0,3	0,8	0,9
	120	0,9	0,7	0,8	0,4	0,3	0,8	1,0

frischen Darmsaft des Hundes ausserordentlich angegriffen wurden (Tabelle 4). Hier sei noch betont, dass die Aciditätszunahme bei der Darmsaftdigestion grösser als die bei der Pankreassaftdigestion war.

Tabelle 4.

*Wirkung des Hunde-Darmsaftes auf Caseino-,
Fibrino- und Gelatopepton.*

Der Darmsaft wurde aus der Thiry-Vella'schen Schlinge des Hundes nach der Reis-Fleisch-Nahrung gesammelt.

Versuchsansatz: 20 ccm 1 %iger Substratpufferlösung + 2 ccm Darmsaft + Toluol; digeriert bei 37°C. Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Pepton. Formoltitration.

Die korrigierten wurde der Aciditätszunahme in Tabelle angegeben.

An dieser Stelle sei mir gestattet, Herren Prof. Dr. Satake und a. o. Prof. Dr. Wada im physiologischen Institut für die Fistelanlegung den verbindlichsten Dank auszusprechen.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)						
Std. \ Substrate	Caseino- pepton (Saft)	Gelato- pepton (Brei)	Mucino- pepton (Saft)	Mucino- pepton (Brei)	Fibrino- pepton (Saft)	Fibrino- pepton (Brei)
24	1,1	0,5	1,0	0,4	0,5	1,1
72	1,4	0,8	1,3	0,6	0,6	1,4
120	1,5	0,9	1,4	0,6	0,6	1,5

Diese Beobachtung lässt an die Angabe von Itzioka (1937)¹⁾ und auch von Mori (1938)²⁾ erinnern, dass das Trypton, das nach wiederholter Einwirkung des Pankreassaftes auf Eiweisskörper durch Aceton ausgefällt wurde und jeder weiteren Pankreassaftwirkung widerstand, jedoch noch weiter durch den Darmsaft angegriffen werden konnte. Man möchte deshalb eine andere und wohl weitere Einstellung des Darmsaftes als die des Pankreassaftes annehmen.

Es taucht nun eine neue Frage auf, ob die Gewebepeptidase besonders die katheptische Peptonase (Kathopeptonase) das Magensaft-Pepton im engeren Sinne anzugreifen imstande ist, da die Unterscheidung der Kathopeptonase von Kathepsin Utzino und Sakai (1941)⁴⁾ im hiesigen Institut mit Erfolg gelungen ist und die Spaltung des Witte-Peptons durch dieses Enzym festgestellt wurde, nachdem Waldschmidt-Leitz et al. (1929)³⁾ die Spaltung des Peptons (ex alb. Merck) durch Kathepsin der Leber und der Milz (aktiviert oder nicht aktiviert) beobachtet hatten. Hier bediente Verf. sich zuerst der Leberereptase, die nach der Angabe von Utzino und Sakai durch das Alkaliverfahren von Katheptase befreit wurde. Die Ergebnisse ergaben, dass die Peptonkörper auch durch diese von der Katheptase befreite Ereptase bei schwach alkalischer Reaktion deutlich abgespalten werden konnten (Tabelle 5). Die Lebermazeration, die durch das Säureverfahren von

Tabelle 5.

*Wirkung der von Katheptase befreiten Ereptase auf Caseino-,
Mucino-, Fibrino- und Gelatopepton.*

Die Lebermazeration des Schweins wurde nach dem Alkali-Verfahren bei pH 9,0 (Utzino und Sakai, 1941⁴⁾) von Katheptase befreit, mit Aceton gefällt und getrocknet.

Die Peptonkörper ebenso wie in Tabelle 1 gebraucht.

Versuchsansatz: 20 ccm 1 %iger Substratpufferlösung (pH 7,4)+2 ccm Ereptaselösung (0,2 g)+Toluol; digeriert bei 37°C.

Kontrollversuch: 2 ccm Ereptaselösung (0,2 g) mit Pufferlösung ohne Substrat auf 22 ccm gebracht (pH 7,4)+Toluol; digeriert bei 37°C. Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Pepton. Formoltitration.

Die korrigierten Werte der Aciditätszunahme in Tabelle angegeben.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)						
Substrate Std.	Caseino- pepton (Saft)	Gelato- pepton (Brei)	Mucino- pepton (Saft)	Mucino- pepton (Brei)	Fibrino- pepton (Saft)	Fibrino- pepton (Brei)
24	0,4	0,2	0,9	0,3	0,4	0,4
72	0,5	0,3	1,4	0,4	0,4	0,7
120	0,8	0,4	1,6	0,5	0,6	0,9

Tabelle 6.

*Wirkung der von Ereptase befreiten Katheptase auf Caseino-,
Mucino-, Fibrino- und Gelatopepton.*

Die Lebermazeration des Schweins wurde von ihrer Ereptase-Wirkung nach dem Säure-Verfahren bei pH 4,0 (Utzino und Sakai, 1941⁴⁾) befreit, mit Aceton gefällt und getrocknet.

Die Peptonkörper wie in Tabelle 1 gebraucht.

Versuchsansatz: 16 ccm 2 %iger Substratpufferlösung (pH 4,5)+2 ccm Katheptaselösung (0,2 g), die mit 2 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung aktiviert wurde, oder+2 ccm Katheptaselösung mit 2 ccm Wasser ohne Cystein+Toluol; digeriert bei 37°C.

Kontrollversuch: 2 ccm Katheptaselösung mit 2 ccm 0,1 Mol-Cysteinlösung oder nur mit 2 ccm Wasser ohne Cystein+16 ccm Pufferlösung ohne Substrat+Toluol; digeriert bei 37°C.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)							
Substrate Std.		Caseino- pepton (Saft)	Gelato- pepton (Brei)	Mucino- pepton (Saft)	Mucino- pepton (Brei)	Fibrino- pepton (Saft)	Fibrino- pepton (Brei)
mit Cystein aktiviert	24	0,9	0,4	0,7	0,2	0,2	1,1
	72	1,3	0,6	0,9	0,3	0,2	1,4
	120	1,7	0,8	1,0	0,4	0,4	1,8
nicht aktiviert (Kontrolle)	24	0,3	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2
	72	0,5	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3
	120	0,8	0,3	0,5	0,3	0,2	0,5

Ereptase getrennt wurde, griff auch sehr stark diese Peptonkörper ein und diese Pepton-Hydrolyse wurde durch Zusatz von Cystein deutlich befördert (Tabelle 6).

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man sehr wahrscheinlich die Cysteinaktivierung der Peptonhydrolyse bei schwach saurer Reaktion annehmen und eine Kathopeptonase (katheptische Peptonase) im Sinne von Utzino und Sakai (1941)⁴⁾ bestätigen.

Falls man den Einfluss der Darstellungsweise des Peptons auf die Enzymwirkung vergleichend in Rücksicht zieht, wurde einmal das durch den Magensaft bewirkte Pepton wie Caseino- und Mucino-Pepton durch den Darmsaft stärker hydrolysiert als das durch Schleimhautmazeration des Magens abgebaute, das mittels der Mazeration dargestellte Fibrino-Pepton aber dadurch stärker als das Saft-Pepton angegriffen. Dasselbe Resultat wurde auch bei den Versuchen mit Gewebespeptonase erzielt. Die Frage über die Ursache dieses Unterschieds bleibt aber noch ungeklärt. Bei der vergleichenden Beobachtung scheinen die stärkste Hydrolyse des Caseino-Peptons (Saft), Mucino-Peptons (Saft) und auch des Fibrino-Peptons (Brei) fast im gleichen Grad sich zu vollziehen, während bei der Gewebesereptase-Wirkung nur die des Mucino-Peptons (Saft) im demselben Grad auftrat, die des anderen Peptons aber deutlich schwächer, also fast in der Hälfte der stärksten Hydrolyse des Mucino-Peptons. Bei der Kathopeptonase-Wirkung war die Spaltung des Caseino-Peptons (Saft) und des Fibrino-Peptons (Brei) am stärksten und fast im gleichen Grad wie die bei der Darmsaftwirkung, während die des Mucino-Peptons (Brei) und des Fibrino-Peptons (Saft) trotz der Cysteinaktivierung sehr niedrig standen. Hier sei aber erwähnt, dass diese Gewebespeptonase nach der Säure- oder Alkali-Behandlung zur Anwendung kam und die Beeinträchtigung ihrer Aktivität nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. In guter Übereinstimmung mit den oben angeführten Ergebnissen wurde das Verhalten des Mucino-Peptons (Saft) gegenüber diesen Enzymwirkungen und auch dem Nierenenzym bestätigt, was besonders in Tabelle 7 zusammengefasst ist.

Tabelle 7.

*Das Verhalten des Mucinopeptons (Saft) gegenüber
verschiedenen Enzymarten.*

Das Mucin, welches aus Magenschleimhautextrakt dargestellt wurde, hat man der maximalen Digestion mit Hundemagensaft unterworfen und das Spaltprodukt mit Alkohol gefällt und getrocknet. Die Gewebe-Mazeration besteht aus 1 Teil Gewebesbrei und 3 Volumteilen Glycerin-Wasser (1:1). Die Versuche bei pH 4,5 wurden hier ohne Cysteinzusatz ausgeführt. Der Pankreassaft wurde aus der Pankreasfistel und

der Darmsaft aus der Thiry-Vella'schen Darmschlinge des Hundes gewonnen. Der erstere wurde mit Enterokinase aktiviert.

Versuchsansatz: 20 ccm 1 %iger Substratpufferlösung + 2 ccm Mazeration oder Saft + Toluol; digeriert bei 37°C.

Kontrolle mit Enzym-Puffer ohne Substrat. Formoltitration.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)											
Enzym- arten	Magenschleim- hautmazeration		Darm- saft	Pankreas- saft + Kinase	Pankreas- mazeration		Leber- mazeration		Nieren- mazeration		
	(Hund)	(Kanin- chen)	(Hund)	(Hund)	(Schwein)	(Schwein)	(Schwein)	(Schwein)	(Schwein)	(Schwein)	
Std.	pH	2	2	7,5	7,5	4,5	7,5	4,5	7,5	4,5	7,5
24		0	0	0,4	0,3	0,2	0,5	0,5	0,6	0,4	0,7
72		0	0	0,5	0,3	0,2	0,7	0,5	0,8	0,4	0,8
120		0	0	0,6	0,4	0,3	0,7	0,6	0,9	0,5	0,8

Zusammenfassung.

1. In vorliegender Arbeit wurde das enzymologische Verhalten der Peptonkörper, die nach wiederholter Einwirkung des Hundemagensaftes hergestellt wurden, gegenüber den Proteasenwirkungen verschiedener Herkunft studiert.

Dem Magensaft wie der Mazeration der Magenschleimhaut widerstehen die Peptonkörper, während sie durch den Pankreas- wie durch den Darmsaft des Hundes deutlich angegriffen werden, wobei die Aciditätszunahme durch den Darmsaft viel stärker als die durch den Pankreassaft war.

2. Hier sei besonders hervorgehoben, dass diese Peptonkörper leicht durch die von der Katheptase befreite Ereptase des Gewebes bei pH 7,5 und auch durch die von der Ereptase befreite Katheptase bei pH 4,5 angegriffen werden. Diese Beobachtung lässt wohl an die Angabe von Utzino und Sakai (1941)⁴⁾ erinnern, dass sich in Geweben eine katheptische Peptonase (kurz Kathopeptonase) befindet.

Literatur.

- (1) Itzioka, F., Journ. Biochem., 1937, **25**, 329.
- (2) Mori, T., ibid., 1938, **28**, 205.
- (3) Chen, T.-T., Hirooka, T. u. Kawaharada, M., ibid., 1940, **31**, 335.
- (4) Utzino, S. u. Sakai, T., ibid., 1941, **33**, 457.
- (5) Waldschmidt-Leitz, E. u. Simons, E., Ztschr. Physiol. Chem., 1926, **156**, 99.

- (6) Waldschmidt-Leitz, E. u. Waldschmidt-Graser, J., *ibid.*, 1927, 166, 241.
 - (7) Waldschmidt-Leitz, E. u. Harteneck, A., *Ztschr. Physiol. Chem.*, 1925, 149, 203; Waldschmidt-Leitz, E. u. Schöffner, A., *ibid.*, 1926, 151, 31.
 - (8) Matsuo, M., *Journ. Biochem.*, 1941, 33, 59.
 - (9) Waldschmidt-Leitz, E., Schöffner, A., Beck, J.J. u. Blum, E., *Zeits. Physiol. Chem.*, 1929, 188, 17.
-