

Beitrag zur Kenntniss der peptischen Verdauung.

Von

Dr. Hans Malfatti.

(Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie, Innsbruck.)

(Der Redaction zugegangen am 28. August 1900.)

Das Auftreten von Produkten der tieferen Eiweisspaltung bei der peptischen Verdauung wurde schon sehr frühe beobachtet.¹⁾ Während aber Hoppe-Seyler die Bildung dieser Produkte der verlängerten Einwirkung des Pepsins zuschrieb, wurde später nach dem Vorgange von Kühne und Neumeister das Auftreten tryptischer Verdauungsprodukte bei der Magenverdauung auf Verunreinigung der extrahirten Magenschleimhaut bezogen.²⁾ Die im Folgenden zu beschreibenden Beobachtungen dürften als Stütze der älteren Anschauung dienen.

Um das Auftreten tryptischer Eiweisspaltung nachzuweisen, diente mir die Rothfärbung mit Bromwasser. Die Versuchsanordnung war letzterhand folgende: Eine 1 %ige gut ausgekochte und wieder abgekühlte Lösung von Witte'schem Pepton wurde mit dem zu prüfenden Ferment versetzt, wenn nöthig neutralisirt oder ganz schwach angesäuert, davon je

1) *Physiol. Chemie*, Bd. II, S. 228; cf. A. Hirschler (*Zeitschr. f. Physiol.*, Bd. II, S. 34); H. Winternitz (*ibid.*, Bd. XVI, S. 464).

2) Auffallende Befunde, wie die von Lawrow (*Zeitschr. f. physiol. Chemie*, Bd. XXVI, S. 513), der Fibrin durch das Dialysat von Schweinsmageninfus verdaute und dabei beobachtete, dass fast die gesammte Eiweissmenge im Verlauf von wenigen Wochen in krystallinische Produkte übergegangen war, sind wohl sicher auf solche Verunreinigungen zurückzuführen.

5 ccm. (sammt dem etwa entstandenen Niederschlage) in 12 Eprouvetten vertheilt und durch passenden Zusatz von verdünnten Soda- bzw. Salzsäurelösungen auf einen Gehalt von 0,28, 0,16, 0,09 % kohlelsauren Natrons, anderseits von 0, 0,04, 0,08, 0,11, 0,14, 0,19 und 0,22 % Salzsäure gebracht und bei Bruttemperatur hingestellt. Um Pilzentwicklung hintanzuhalten, wurde in jede Eprouvette etwas Chloroform, in Aether gelöst, gebracht. Es wird nämlich auf diese Weise die ganze Flüssigkeit gleichmässig und langsam mit dem oben aufschwimmenden Chloroform gesättigt. Beim Stehen von in gewöhnlicher Weise mit Chloroform gesättigten Lösungen in nur lose verschlossenen Gefässen kann es geschehen, dass das Chloroform aus den obersten Schichten verdunstet, bevor Sterilisation eingetreten ist; ich habe in solchen Proben öfters Pilzentwicklung auftreten sehen, bei den mit Aether-Chloroform sterilisirten Proben aber kaum je einen Misserfolg gehabt.¹⁾

Nach 2—3 Tagen wird dann der Inhalt der Eprouvetten mit Bromwasser geprüft. Man gibt das Bromwasser auch hier tropfenweise hinzu, verbraucht aber im Verhältniss zu den bei der Eiweissverdauung durch Trypsin gewöhnten Verhältnissen ziemlich viel davon, bis die Rothfärbung auftritt. Mit grösserer Bequemlichkeit und ebenso sicher kann die

1) Es ist übrigens für diese Versuche eine strenge Antisepsis nicht nöthig. Um nämlich die Zuverlässigkeit der Reaction mit Brom als Zeichen für tryptische Verdauung zu prüfen, habe ich eine sehr grosse Anzahl (182) verschiedener Bacterienarten unter den hier in Betracht kommenden Bedingungen (natürlich ohne Chloroform) auf Tryptophanbildung geprüft. In keinem Falle konnte ich vor Ablauf des dritten Tages Bromreaction finden. Dann trat bei einigen Sarcinen (und einem Wasserbacterium aus dem Kieler Hafen) die Bromreaction auf, während nach Ablauf des vierten und fünften Tages bei ziemlich vielen Bacterienarten Tryptophan nachweisbar war. Das stimmt überein mit dem so häufig gemachten Befunde von Tryptophan in alten Bacterienculturen, hauptsächlich bei der Untersuchung von Massenculturen. Man darf wohl annehmen, dass bei den untersuchten Bacterien während des Lebens Tryptophan nicht aus Eiweiss gebildet, bzw. wieder aufgebraucht wird, dass aber aus den absterbenden Bacterien tryptisches Ferment ausgelaugt wird und dann Eiweiss spaltet.

Reaction erzeugt werden durch tropfenweisen Zusatz einer Lösung von unterchlorig- oder bromigsaurem Natron zu der angesäuerten Probeflüssigkeit.

Wenn man nun in der angegebenen Weise verschiedene Pepsinpräparate prüft, so kann man Folgendes beobachten. Nimmt man Glycerinextracte oder dialysirte Infuse von Magenschleimhaut, so tritt sehr bald Rothfärbung der alkalischen und ganz schwach sauren, bei längerer Dauer des Versuches auch der stärker sauren Proben bei Bromzusatz auf. Solche Präparate enthalten immer Trypsin.

Man kann das Trypsin zerstören, wenn man die (eiweissarmen) Präparate längere Zeit in kräftig saurer Lösung digerirt. Prüft man jetzt wieder, so tritt eine auffallende Erscheinung auf; die alkalischen und ganz schwach sauren Proben gaben keine Rothfärbung, wohl aber die Proben mit dem Säuregehalt bis zu 0,2^o/_o. Diese Tryptophanbildung kann nicht von Trypsin herrühren. In so eiweissarmen Flüssigkeiten wirkt nämlich Trypsin bei ca. 0,1^o/_o Säuregehalt nicht spaltend, zudem lassen sich die geringsten Mengen von solchen Proben absichtlich zugesetztem Pankreas-Trypsin, leicht durch die Spaltung auch der alkalischen (häufig nur der schwächer alkalischen) Proben erkennen.

Andererseits ist der entstehende Farbstoff wohl sicher als Proteinchrom anzusprechen. Er ist in Wasser unlöslich, in Alkohol löslich, zeigt das spectroskopische Verhalten des Proteinchroms, auch Schwefel konnte nach erfolgter Schmelzung mit Salpeter darin nachgewiesen werden.

Es handelt sich also um die Bildung von Tryptophan in schwach saurer Lösung durch Magenpepsin, wodurch sich dieses den bei Pflanzen, speciell bei Pilzen gefundenen peptischen Fermenten an die Seite stellen würde, oder durch ein dem Pepsin anhängendes besonderes Ferment. Die erstere — Hoppe-Seyler'sche — Ansicht, ist die wahrscheinlichere. Es gelang mir nämlich nicht, die beiden Fermente zu trennen. Bei der Reinigung des Pepsins nach Brücke bezw. Sundberg¹⁾ wird

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 319.

das supponirte Ferment zwar geschwächt, aber nicht vom Pepsin getrennt, durch alle Einwirkungen aber, welche das Pepsin zerstören, wurde es gleichfalls zerstört.

Gegen diese Ansicht aber spricht, dass es sehr kräftige peptische Wirkungen gibt, ohne dass die beschriebene Bromreaction aufzufinden wäre. Zum Beispiel gibt das Grüber'sche Pepsinum sicc. puriss. manchmal keine, manchmal nur eine sehr undeutliche Bromreaction. Am auffallendsten zeigt sich dieses Verschwinden des einen Ferments, oder vielleicht besser der einen fermentativen Eigenschaft bei der Reinigung des Pepsins durch Bleifällung nach Pekelharing.¹⁾

Um das Pepsin nach Pekelharing darzustellen, ist es zu empfehlen, die sorgfältigst filtrirte Verdauungsflüssigkeit nicht direkt zu dialysiren, sondern zuerst nach Brücke auszufällen, indem man zweckmässig zuerst nur mit Kalkmilch neutralisirt, und in der durch Decantation vom entstandenen Niederschlage, der den grössten Theil des Pepsins enthält, getrennten Flüssigkeit durch abwechselnden Zusatz von Phosphat und Chlorcalcium neue geringe Niederschläge erzeugt. Die erhaltenen Fällungen werden in Salzsäure gelöst und (nach längerem Stehen in der Brutwärme zur Zerstörung des Trypsins) filtrirt und dialysirt. Man erhält so sehr reichlich den Pekelharing'schen Pepsinniederschlag.

Man kann die Lösung dieses Pepsins wiederholt derselben Behandlung unterwerfen, ohne dass das tryptophanbildende Ferment verschwindet, wenn aber eine solche Lösung nach vorsichtiger Neutralisation mit Bleiessig und Ammoniak gefällt, dann das Ferment aus dem Bleiniederschlage durch Behandeln mit Oxalsäure, und von dieser durch Dialyse befreit wird, so ist das fragliche Ferment ganz oder bis auf Spuren verschwunden, kräftige peptische Wirkung aber noch vorhanden.

Auch der Versuch, eine Verschiedenheit der beiden Fermente dadurch zu constatiren, dass ausser dem Tryptophan auch andere krystallinische Produkte aufgesucht wurden, einer-

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 233.

seits in einer Verdauungsprobe, in welcher Tryptophan aufgetreten war, andererseits in einer solchen, in welcher durch die Wahl des Pepsinpräparates (Grübler), besonders aber durch die Stärke der angewendeten Säure (0,4—0,6 %) die Tryptophanbildung hintangehalten worden war, ergab kein Resultat. In beiden Fällen traten nämlich reichlich krystallinische Produkte auf, unter denen leicht Leucin und Tyrosin und durch Phosphorwolframsäure fällbare Basen nachweisbar waren. Die letzteren liessen sich durch die Silberfällungen und Pikrinsäure nach Kossel in die Histidin-, Arginin- und eine auffallend spärliche Lysinfraktion trennen. Die Analyse der erhaltenen Produkte wird durch die Unmöglichkeit, die verhältnissmässig geringen Substanzmengen in analysenreine krystallisirte Form zu bringen, vereitelt. Uebrigens enthält, wie sich nachträglich herausstellte, auch das Witte'sche Pepton in geringer Menge dieselben Substanzen.

Ich will darum nur kurz das Verfahren angeben, nach welchem ich die krystallinischen Substanzen von den Peptonen zu trennen versuchte.

Ausser den vier von Pick¹⁾ beschriebenen Albumosenfraktionen fand sich constant in der ammoniumsulfatgesättigten schwefelsauren Lösung eine weitere von der Pick'schen Fraction IV verschiedene Albumose, die sich durch Fällen mit viel Ammoniak ausfällen lässt. Die Substanz zeichnet sich — von Pepton befreit — durch ihre relative Schwerlöslichkeit in Wasser und ihren Reichthum an locker gebundenem Schwefel aus. Die Peptone und Reste von Albumosen, welche in der salzgesättigten Flüssigkeit dann noch gelöst sind, werden durch vorsichtigen Zusatz von ganz concentrirter Eisenchloridlösung oder nach dem Vorgange von Siegfried²⁾ mit Eisenoxydammonsulfat als isabellgelber Niederschlag ausgefällt. Die Flüssigkeit darf dabei nur ganz schwach sauer werden und wird nach dem Abfiltriren des Niederschlages nochmals mit Eisensalz und Ammoniak behandelt, um weitere Antheile der

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, S. 246.

2) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 335.

Peptone zu fällen. Das Filtrat wird zuletzt, wenn nöthig, durch Ammoniakzusatz vom Eisen befreit; durch vorsichtiges Eindampfen bei niederer Temperatur und Auskrystallisiren lassen ein grosser Theil des Ammonsalzes entfernt. Eine weitere Menge des Ammonsulfats wird durch Zusatz von Methylalkohol weggeschafft; dieser verdient nämlich den Vorzug vor dem Aethylalkohol, weil er das Salz als Krystallpulver ausfällt und nicht Anlass zur bekannten Schichtenbildung gibt. Der Methylalkohol wird abdestillirt und aus dem Rückstand das noch vorhandene Ammoniak entfernt, indem man die Flüssigkeit in flachen Schalen bei gelinder Temperatur portionenweise mit Barytlauge versetzt, während gleichzeitig mit Hülfe eines Abzugkamins oder ähnlicher Vorrichtungen ein kräftiger Luftstrom darüber gesaugt wird. Den überschüssigen Baryt entfernt man durch Schwefelsäure und kann nun die verschiedenen Produkte in üblicher Weise zu trennen versuchen.
