

# Zur Kenntnis des proteolytischen Fermentes des Pylorus- und des Duodenalsaftes.

Von

**Emil Abderhalden und Peter Rona.**

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)  
(Der Redaktion zugegangen am 3. März 1906.)

Es ist vorläufig noch unentschieden, ob die Drüsen des gesamten Magens ein einheitliches proteolytisches Ferment ab-scheiden oder aber, ob den verschiedenen Teilen des Magens, vor allem der Pylorusgegend und dem Fundus, verschieden-artig wirkende Fermente zukommen. Diese Frage ist deshalb so schwer zu entscheiden, weil wir die Fermente selbst nicht kennen, sondern nur ihre Wirkungen. Auch diese können gerade bei den proteolytischen Fermenten nur in recht be-schränktem Maße verfolgt werden. Feinere Abgrenzungen nach der Art des Eiweißabbaus und den bei der Hydrolyse sich bildenden mehr oder weniger komplizierten Spaltprodukten sind uns einstweilen unmöglich. Die Frage, ob einerseits das Pepsin und andererseits das Trypsin einheitliche Fermente darstellen, bleibt eine offene, dagegen sind wir, wie der eine von uns in Gemeinschaft mit Béla Reinbold<sup>1)</sup> und Otto Rostoski<sup>2)</sup> gezeigt hat, wohl imstande, in voller Schärfe wenigstens die beiden genannten proteolytischen Fermente nach ihrer Wirkung zu unterscheiden. Bei der peptischen Verdauung von Edestin

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden und Béla Reinbold, Die Monoamino-säuren des «Edestins» aus Sonnenblumensamen und dessen Verhalten gegen Pankreassaft. Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 284, 1905. Der Abbau des Edestins aus Baumwollsamensamen durch Pankreassaft. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 159, 1905.

<sup>2)</sup> Emil Abderhalden und Otto Rostoski, Die Monoamino-säuren des «Edestins» aus Baumwollsamensamen und dessen Verhalten gegen Magensaft. Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 284, 1905.

konnten höchstens Spuren von Tyrosin, im übrigen jedoch keine einfachen Eiweißspaltprodukte nachgewiesen werden, bei dem tryptischen Eiweißabbau lassen sich hingegen in recht kurzer Zeit Tyrosin, Tryptophan und andere Aminosäuren aus der Verdauungsflüssigkeit gewinnen. Der Unterschied zwischen den beiden proteolytischen Fermenten Trypsin und Pepsin ließ sich, wie Emil Fischer und Emil Abderhalden<sup>1)</sup> gezeigt haben, durch deren Einwirkung auf die künstlichen Polypeptide in besonders ausgeprägter Weise zeigen. Während z. B. Trypsin das Dipeptid Glycyl-l-Tyrosin in kurzer Zeit zum weitaus größten Teil in seine beiden Komponenten Glykokoll und l-Tyrosin zerlegt, findet unter der Einwirkung von Pepsinsalzsäure keine nachweisbare Hydrolyse des genannten Peptides statt. Wir heben ausdrücklich hervor, daß die Resultate dieser Versuche ausschließlich mit den Sekreten einesteils des Magens (kleiner Magen nach Pawlow) und anderenteils der Pankreasdrüse (Pankreasfistel) erhalten worden sind. Es muß unbedingt im Interesse einer einheitlichen Auffassung der Wirkung des Magen- und Pankreassaftes und auch der übrigen Verdauungssäfte gefordert werden, daß nur diese selbst und in keinem Falle aus Extrakten der betreffenden Organe dargestellte Fermente zur Anwendung gelangen dürfen. Wir stehen nicht an, alle in der Literatur niedergelegten Versuche, welche mit derartigen Präparaten ausgeführt worden sind, als für die vorliegenden Fragen ungeeignet zu bezeichnen. Daß dieser Standpunkt völlig gerechtfertigt ist, geht einesteils aus der Beobachtung hervor, daß Peptide, welche von reinem, aktiviertem Pankreassaft nicht angegriffen werden, bei der Anwendung des Handelspräparates Pankreatin Spaltung zeigten. Auch konnten wir bei der Verwendung eines von Grübler bezogenen Pepsinpräparates nach recht kurzer Zeit bei dessen Einwirkung auf Casein freie Aminosäuren und speziell Tryptophan nachweisen, während bei der Anwendung von reinem Hundemagensaft, wie schon erwähnt, höchstens Spuren von Aminosäuren in der Verdauungsflüssigkeit auftraten. Schließlich

<sup>1)</sup> Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft. Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52, 1905.

können wir auch anführen, daß nach den Versuchen des einen von uns mit Herrn Yutaka Teruuchi<sup>1)</sup> Peptide, z. B. das Glycylglycin, welche vom Pankreassaft nicht angegriffen werden, vom Leberextrakt rasch in ihre Komponenten zerlegt werden. Nach diesen Erfahrungen müssen wir auch die von Karl Glaessner<sup>2)</sup> zur Entscheidung der Frage, ob das von dem Pylorusteil des Magens und vom Fundusteil sezernierte Ferment identisch ist oder nicht, ausgeführten Versuche als nicht ausschlaggebend bezeichnen, denn auch er vermied die Mitwirkung der Zellfermente der Magenwand nicht.

Wir sind nun durch die große Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Pawlow in St. Petersburg in den Besitz größerer Mengen ganz reinen Duodenal- und Pylorussaftes gekommen. Wir danken Herrn Prof. Pawlow auch an dieser Stelle herzlich für seine große Freundlichkeit. Beide Säfte waren aus Fisteln gewonnen. Sie stellten wasserklare Flüssigkeiten dar. Sie reagierten auf rotes Lackmuspapier ganz schwach. Der Duodenalsaft war sehr zähflüssig und enthielt viel Mucin. Der Pylorussaft war etwas dünnflüssiger. Wir suchten nun die Frage zu entscheiden, in welche Gruppe von Fermenten die in diesen beiden Säften enthaltenen hineingehören. Zu diesem Zwecke ließen wir sie auf Glycyl-l-Tyrosin einwirken und zwar bei neutraler, saurer und alkalischer Reaktion. Das Glycyl-l-Tyrosin blieb in allen Fällen unangegriffen. In jedem Einzelversuche setzten wir zu 1 g des reinen Peptids, das in 3 ccm Wasser gelöst war, 1—5 ccm des Saftes und hierzu 1—10 ccm n-Salzsäure, so daß der Salzsäuregehalt des Gemisches im Maximum 0,4% betrug. In ganz demselben Verhältnis wurde der Alkaligehalt gesteigert. Die Verdauungsflüssigkeiten blieben vollständig klar, und zwar auch dann, wenn einesteils der Säuregehalt durch die entsprechende Menge n-Natronlauge und umgekehrt der Alkaligehalt durch n-Salzsäure genau neutralisiert wurde,

<sup>1)</sup> Die Versuche werden demnächst publiziert.

<sup>2)</sup> Karl Glaessner, Über die örtliche Verbreitung der Profermente in der Magenschleimhaut. Hofmeister's Beiträge, Bd. I, S. 24, 1902, und Über die Funktion der Brunner'schen Drüsen. Ebenda, Bd. I, S. 105, 1902.

und die nun neutrale Flüssigkeit auf 0° abgekühlt wurde. Kontrollproben mit Pepsinsalzsäure ergaben genau dasselbe Resultat. Wurde dagegen aktiver Pankreassaft verwendet, so ließ sich schon nach einer halben Stunde die Ausscheidung von Tyrosin nachweisen und nach 6 Stunden war die ganze Flüssigkeit mit Krystallen dieser Aminosäure angefüllt. Es konnten ohne Einengen der Flüssigkeit direkt 0,4 g Tyrosin gewonnen werden.

Man könnte daran denken, daß das Glycyl-l-Tyrosin dennoch vom Duodenal- und Pylorussaft gespalten worden ist, daß dagegen das Tyrosin in Lösung gehalten wird. Es gelang nun allerdings nicht, Tyrosin durch Einengen der neutralisierten Lösung zur Abscheidung zu bringen, während bei einem Kontrollversuch, bei dem Tyrosin in Lösung zugefügt worden war, wenigstens die Hälfte aus der stark eingengten Flüssigkeit sich ausschied. Der direkte Nachweis, daß unverändertes Glycyl-l-Tyrosin vorlag, stieß insofern auf große Schwierigkeiten, als dieses Peptid in Wasser sehr leicht löslich ist und infolgedessen von den Beimengungen des Saftes nicht getrennt werden konnte. Wir haben deshalb den indirekten Weg eingeschlagen. In der einen Hälfte der Versuche wurde die Verdauungsflüssigkeit unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol übergossen und durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas verestert. Dieser Prozeß wurde zweimal wiederholt. Nun setzten wir in gewohnter Weise die Ester aus ihren Hydrochloraten mit Alkali und Kaliumcarbonat in Freiheit unter reichlichem Ätherzusatz. Beim Verdunsten des Äthers verblieb ein nur geringer Rückstand. Er wurde in Alkohol aufgenommen und trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet. Es gelang auch nach dem Impfen mit einem Kryställchen von Glykokollesterchlorhydrat nicht, Glykokoll nachzuweisen. Schließlich haben wir in einer zweiten Reihe von Versuchen das Glycyl-l-Tyrosin als Anhydrid wiedergewonnen, indem die unter vermindertem Druck eingedampfte Verdauungsflüssigkeit gleichfalls mit Äthylalkohol und trockenem Salzsäuregas verestert, und die Ester aus den Hydrochloraten mit Natriumäthylat in Freiheit gesetzt wurden. Die nach dem Ab-

filtrieren des ausgefallenen Kochsalzes erhaltene klare, schwach gelb gefärbte, alkoholische Flüssigkeit wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und das Destillat unter sehr starker Kühlung in wässriger Salzsäure aufgefangen. Beim Verdampfen des Destillates hinterblieb nur ein äußerst geringer Rückstand. Der nicht destillierte Teil wurde in absolutem Alkohol aufgenommen und in die klare Lösung trockenes Ammoniakgas bis zur Sättigung eingeleitet.<sup>1)</sup> Bald schied sich das Glycyl-l-Tyrosin-anhydrid in prachtvollen Krystallblättchen ab. Die bei Anwendung von 1 g Glycyl-l-Tyrosin erhaltene Menge an Anhydrid betrug 0,6 g. Aus der Mutterlauge konnte noch weiteres, jedoch recht unreines Anhydrid erhalten werden. Es zersetzte sich beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen 285° (korr.) und gab folgende Analysenzahlen:

0,1805 g Substanz gaben 0,3970 g CO<sub>2</sub> und 0,0884 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:

60,00% C und 5,45% H.

Gefunden:

59,99% C und 5,44% H.

Schließlich haben wir noch folgenden Versuch ausgeführt. 1 g Glycyl-l-Tyrosin wurde in 10 ccm Pepsinsalzsäure gelöst und 8 Tage im Brutraume aufbewahrt. Nun wurde die gesamte Flüssigkeit nach Neutralisation der Salzsäure mit der berechneten Menge Normalnatronlauge unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Den Rückstand übergossen wir mit 5 ccm absolutem Alkohol und leiteten bis zur Sättigung trockene gasförmige Salzsäure ein. Das Reaktionsprodukt wurde unter Zugabe von noch 3 ccm Alkohol 10 Minuten auf dem Wasserbade gekocht. Es war völlige Lösung eingetreten. Sehr bald schieden sich jedoch Krystalle ab. Die Veresterung wurde wiederholt, und dann das beim Abkühlen ausfallende Produkt abgesaugt. Es bestand aus kleinen, wetzsteinartigen, meist zu Gruppen vereinigten Kryställchen, die über Kalk und Schwefelsäure getrocknet gegen 246° (korr.) unter Gasentwicklung schmolzen.<sup>2)</sup> Sie gaben mit

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung eines Dipeptides bei der Hydrolyse des Seidenfibroins. Berichte der Deutschen chem. Gesellsch., Bd. XXXIX, S. 752, 1906.

<sup>2)</sup> Vgl. Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden, II. Berichte der Deutschen chem. Gesellsch., Bd. XXXVII, S. 2496, 1904.

Millon's Reagens Rotfärbung und waren das Chlorhydrat des Äthylesters des Glycyl-l-Tyrosins. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug 90% der Theorie. Aus der Mutterlauge des ganz einheitlichen Präparates konnten durch Einengen noch weitere Mengen gewonnen werden. Es gelang nicht, Glykokoll nachzuweisen, und ebensowenig konnte nach der Befreiung der Ester aus der Mutterlauge der ersten Krystallisation des Glycyl-l-Tyrosinesterchlorhydrates durch Alkali und Kaliumcarbonat und deren Aufnahme in Äther Glykokoll gewonnen werden. Genau denselben Versuch haben wir auch bei den Verdauungsversuchen mit Duodenal- und Pylorussaft ausgeführt. In allen Fällen konnte jedenfalls die Hauptmasse des Glycyl-l-Tyrosins als salzsaurer Ester wiedergewonnen werden.

J. P. Pawlow und S. W. Parastschuk<sup>1)</sup> geben an, daß der Saft des isolierten Pfortnerteiles des Magens und des die Brunner'schen Drüsen enthaltenden Abschnitts des Duodenum durch Säure aktiviert wird. In alkalischer Reaktion, d. h. in dem Zustande, in dem die Fermente zur Ausscheidung gelangen, sind sie wirkungslos. Wir überzeugten uns gleichfalls durch Versuche mit Casein, daß weder der Duodenalsaft noch der Pylorussaft eine deutliche Wirkung zeigten, wenn sie nicht vorher mit Säure aktiviert worden waren.

Schließlich benutzten wir das Glycyl-l-Tyrosin noch zur Entscheidung einer anderen Frage. Bekanntlich wirkt der Pankreassaft in alkalischer, neutraler und schwach saurer Reaktion. Es läßt sich nun zeigen, daß bereits ein Gehalt an Salzsäure von 0,05% etwas hemmend auf die Wirkung des Trypsins wirkt, bei einem Gehalt von 0,1% HCl war gegenüber einer normalen Kontrollprobe nur etwa  $\frac{1}{4}$  Glycyl-l-Tyrosin gespalten. Stieg der Salzsäuregehalt auf 0,2—0,25%, dann schien die Wirkung des Trypsins aufgehoben oder doch sehr verlangsamt zu sein.

Überblicken wir das gefundene Resultat, so können wir

---

<sup>1)</sup> J. P. Pawlow und S. W. Parastschuk, Über die ein und demselben Eiweißfermente zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 415, 1904.

mit Bestimmtheit sagen, daß der Pylorussaft und der Duodenalsaft proteolytische Fermente enthalten, welche zu der Gruppe des Pepsins gehören und nicht zu der des Trypsins. Vorläufig können wir aus den oben angeführten Gründen die Frage nicht entscheiden, ob die genannten Fermente mit dem Pepsin identisch sind. Es kann jedoch nicht zweifelhaft sein, daß es mit Hilfe komplizierterer Polypeptide gelingen wird, auch diese Frage zu entscheiden, ein Gedanke, den bereits Emil Fischer und Emil Abderhalden<sup>1)</sup> zum Ausdruck gebracht haben.

Anmerkung: Wir verweisen nach dieser Richtung noch ganz besonders auf die große Wichtigkeit der synthetischen, nach ihrem Aufbau wohl bekannten Peptide für die Erforschung der Wirkung der proteolytischen Fermente und hoffen in Bälde imstande zu sein, mit Hilfe der neuen von Emil Fischer dargestellten aktiven Peptide auch den Fragen nach dem Zymogenzustand und der Aktivierung der proteolytischen Fermente näher treten zu können, und ferner die Gesetze der Fermentwirkung in exakterer Weise, als es bis jetzt möglich war, zu verfolgen. Das Glycyl-l-Tyrosin eignet sich in vorzüglichster Weise zur Demonstration der Wirkung der proteolytischen Fermente. Es wäre von großem Interesse, auch die im Pflanzenreich vorkommenden proteolytischen Fermente in analoger Weise zu prüfen.

Emil Abderhalden.

---

<sup>1)</sup> l. c.

---