

Einige Bemerkungen über proteolytische Fermente.

Von

Dr. K. Hirayama.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. März 1910.)

Die Untersuchungen von Takemura¹⁾ haben die von A. Kossel und A. Mathews gefundene Tatsache, daß das reine Pepsin gewisse Protamine nicht angreift, im Prinzip bestätigt. Doch zeigten sich hierbei einzelne Erscheinungen, welche nicht anders zu erklären sind, als durch die Annahme, daß den käuflichen Pepsinpräparaten unter Umständen andere in saurer Lösung wirksame Fermente beigemischt sind, welche eine Hydrolyse des Clupeins herbeiführen können.

In Anbetracht der weiten Verbreitung solcher Gewebsfermente, die in saurer Lösung eine tiefgreifende Proteolyse herbeiführen — wie z. B. der Hedinschen Lieno- β -protease —, wäre diese Tatsache nicht merkwürdig, denn die käuflichen Pepsinpräparate werden aus Gewebsextrakten dargestellt. Auffallend ist jedoch die Beobachtung Takemuras, daß auch der Fistelmagensaft eines Hundes sich so verhielt, als ob er eine « β -Protease» im Sinne Hedins, d. h. ein in saurer Lösung tiefgreifend proteolytisch wirksames Ferment enthielte (Versuch 6).

Diese Tatsache schien einer weiteren Untersuchung zu bedürfen und ich habe daher auf Veranlassung von Professor A. Kossel einige Versuche hierüber angestellt.

Ich benutzte für diese Versuche nicht Protamin, sondern Eieralbumin und bemühte mich, zwei verschiedenartige Fermentwirkungen in derselben Lösung nebeneinander zu verfolgen, deren eine vorwiegend für das Pepsin, deren andere vorwiegend für die β -Protease charakteristisch ist. Die erste ist die Lösung des Eiweißes, beobachtet nach dem Verfahren von Mett; die zweite die Bildung von Carboxylgruppen durch weitere Spaltung, gemessen durch die Formoltitrierung nach Sørensen.

Ich bemühte mich fernerhin, die Versuchsbedingungen so zu variieren, daß sie bei gewissen Versuchen für das Pepsin,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 201.

bei anderen für die β -Protease günstiger waren. Hierbei ging ich von der Annahme aus, daß das Optimum der Pepsinwirkung bei anderen Aciditätsverhältnissen liegt, als das der β -Protease. Ich stellte einige Versuche an bei Gegenwart von Salzsäure, andere bei Gegenwart von Phosphorsäure, Milchsäure und Essigsäure.

Von einer größeren Zahl von Versuchen will ich nur einige anführen.

Versuch I.

Pepsin Grübler (0,3%) und Eieralbumin.

Bezeichnung der Säure	Verfahren nach Mett (Millimeter)		Verfahren nach Sørensen*) (Milligramm Stickstoff)	
	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stund.	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden
Salzsäure 0,2%	2,1	9,0	2,1	3,76
Phosphorsäure 0,2%	0,9	5,0	1,8	3,1
Milchsäure 0,2%	Spur	1,4	1,2	2,66
Essigsäure 0,2%	Veränderung nicht bemerkbar	0,7	0,73	1,65

*) Die hierzu benutzte Albuminlösung wurde bereitet, indem ich 25 g käufliches Eieralbumin (Merck) mit 1 l Wasser 1 Stunde schüttelte und sodann filtrierte. Das klare, leicht gelbliche Filtrat enthielt 0,27% Stickstoff. Zu dieser Lösung fügte ich die in der ersten Kolonne angegebenen Säuren hinzu.

Versuch II.

Pepsin Merck (0,3%) und Eieralbumin.

Bezeichnung der Säure	Verfahren nach Mett (Millimeter)		Formoltitration nach Sørensen*) (Milligramm Stickstoff)	
	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden
Salzsäure 0,2%	2,8	11,4	2,4	3,8
Phosphorsäure 0,2%	0,8	4,9	1,7	3,3
Milchsäure 0,2%	Spur	1,9	1,5	3,6
Essigsäure 0,2%	>	1,0	1,1	2,8

*) Die Albuminlösung war die in Versuch I benutzte.

Diese Versuche beweisen die Gegenwart einer β -Protease neben dem Pepsin zwar nicht mit Sicherheit, machen sie jedoch

sehr wahrscheinlich, denn sie zeigen, daß bei Ersatz der freien Salzsäure durch Milchsäure oder Essigsäure das Eiweißlösungsvermögen offenbar schneller abnahm, wie die Bildung freier Carboxylgruppen aus dem gelösten Eiweiß. Eine wirkliche Beweiskraft besitzt jedoch der folgende Versuch, welcher mit dem Fistelmagensaft vom Hunde angestellt wurde.

Versuch III.

Fistelmagensaft vom Hund und Eialbumin.

Bezeichnung der Säure *)	Verfahren nach Mett (Millimeter)		Verfahren nach Sørensen**) (Milligramm Stickstoff)	
	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden	Nach 6 Stunden	Nach 24 Stunden
A. Salzsäure (0,266%)	1,8	7,1	1,1	2,1
B. Phosphorsäure	1,4	6,0	2,1	4,2

*) Die freie Säure des Fistelesaftes wurde mit Natronlauge neutralisiert. Dann fügte ich bei A Salzsäure bis zur ursprünglichen Acidität, bei B die äquivalente Menge Phosphorsäure hinzu.

**) Die Albuminlösung war ebenso wie in den vorhergehenden Versuchen bereitet worden.

Hier sind zwei Versuchsreihen A und B einander gegenübergestellt, deren eine bei Gegenwart von Salzsäure, deren andere bei Gegenwart der äquivalenten Menge Phosphorsäure ausgeführt war. Beim Ersatz der Salzsäure durch Phosphorsäure war die eine Fermentwirkung, nämlich die Lösung des Eiweißes, gesunken, hingegen die andere, nämlich der Zuwachs der Carboxylgruppen, gestiegen. Dies Ergebnis stimmt mit der Annahme überein, daß im sezernierten Hundemagensaft unter gewissen Umständen neben dem Pepsin ein zweites in saurer Lösung nach Arten der β -Proteasen wirksames Ferment vorhanden sein kann, dessen Wirkungsoptimum bei anderen Aciditätsverhältnissen liegt, als das des Pepsins.¹⁾ Es ist somit im Einklang mit den Versuchsergebnissen von Takemura.

¹⁾ Aus einem Versuch von Hahn und Geret (Zeitschrift f. Biologie. Bd. XL, S. 147, Vers. IV) scheint sich zu ergeben, daß auch bei der Endotryptase der Hefe Phosphorsäure günstiger wirkt wie die äquimolekulare Menge Salzsäure (0,2%).