

Aus dem Physiologisch-Chemischen Universitäts-Institut Mainz

Über die Spaltung von N-Sorboylaminosäuren durch Enzyme des Verdauungstraktes

Vorläufige Mitteilung

Von E. KRUG und K. LANG

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 15. Februar 1965)

Im Zusammenhange von Arbeiten unseres Instituts über Sorbinsäure und chemisch veränderte Proteine interessierte uns die Frage, inwieweit N-Sorboylaminosäuren im Verdauungstrakt enzymatisch gespalten werden. Es war zu erwarten, daß N-Sorboylaminosäuren als Substrate für die Acylase I, die in hoher Aktivität in der Niere vorkommt, dienen kann. In der Tat ergaben auch unsere Versuche, daß dies der Fall ist. Vorversuche mit einem käuflichen Pankreaspräparat (Pancerera) zeigten jedoch auch eine gewisse Acylase-Aktivität. Da es denkbar war, daß eine im Pankreas enthaltene Acylase bei der Herstellung des Präparates weitgehend inaktiviert werden könnte, haben wir das Überstehende von Pancreashomogenaten auf ihre Acylase-Wirkung gegenüber den Sorboylaminosäuren untersucht. In der Tat stellten wir eine nicht unbedeutende Spaltung der Sorboylaminosäuren durch unsere Pankreaspräparation fest. Mit der Anreicherung, Reinigung und Charakterisierung des hierbei aktiven Enzyms sind wir zur Zeit beschäftigt. Wie zu erwarten war, wurden die N-Sorboylaminosäuren durch die Endopeptidasen des Pankreas (Trypsin, Chymotrypsin) nicht angegriffen.

Experimentelles

Material:

Die enzymatische Spaltbarkeit dreier Sorbinderivate wurde untersucht:

1. N-Sorboylglutaminsäure	MG: 241	FP: 155°
2. N-Sorboylalanin	MG: 183	FP: 167°
3. N-Sorboylsarkosin	MG: 183	FP: 122°

Folgende Enzyme werden in die Untersuchung einbezogen:

1. Trypsin Krist. (Novo)
2. α -Chymotrypsin (Choay 5 C. Hb-E mg)
3. Pankreon (Kali-Chemie) ein standardisiertes Pankreasfermentpräparat enthaltend 32 Lipase-, 72 Amylase- und 120 Trypsin-Einheiten nach WILLSTÄTTER.
4. Acylase I rein (Serva 500–600 EU g aus Schweineniere)
5. Der Überstand aus Pancreashomogenat.
6. Eine hochaktive Lipase unbekannter Provenienz.

Methoden:

Die bei der Abspaltung entstandenen Aminosäuren werden entweder colorimetrisch (MOORE und STEIN) (1) oder titrimetrisch (VAN SLYKE) erfaßt.

Zur colorimetrischen Bestimmung wird von allen Proben 1 ml entnommen, mit 1 ml Reagens versetzt, 20 min im Wasserbad erhitzt und mit Propanol Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Extinktion wird bei $578 \text{ m}\mu$ am Eppendorf abgelesen.

In Vorversuchen wurden parallel dazu die Proteasen nach der Inkubation ausgefällt und weiter nach einer modifizierten Ninhydrinmethode verfahren. Die titrimetrische Bestimmung des Carboxylstickstoffs wird nach VAN SLYKE in der Ausführung nach (2) durchgeführt.

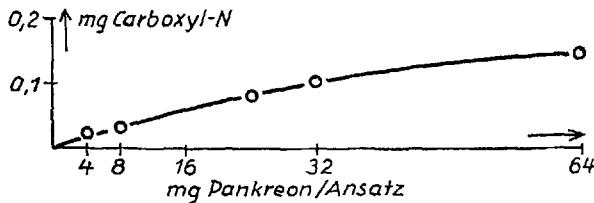


Abb. 1. Spaltung von Sorboylaminosäuren durch Pankreas.

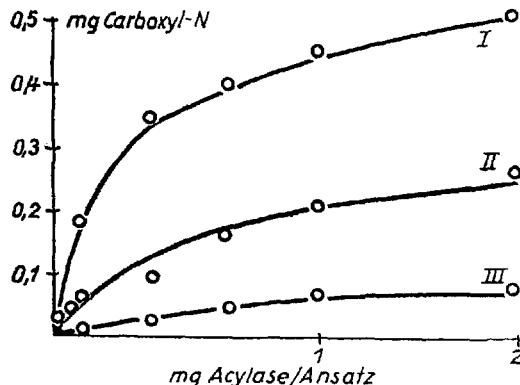


Abb. 2. Spaltung von Sorboylaminosäuren durch Acylase (Schweineniere). I Sorboylglutaminsäure, II Sorboylalanin, III Sorboysarkosin.

1. **Proteasen:** Die Sorbinsäurederivate werden in Tris-Puffer pH 8,0 unter Zusatz von Ca-Ionen, die Proteasen in $n\ 1000$ HCl gelöst. Die Konzentration der Proteasen beträgt bis zu 10% der Substratkonzentration. Inkubationsdauer 2 Std. Die Menge der abgespaltenen Aminosäuren wird colorimetrisch erfaßt. Zur Kompensation der möglicherweise autolytisch entstandenen Aminosäuren wird ein entsprechend vorbereiteter Leerwert mitgeführt.
2. **Pankreas:** Vorbereitung und Prüfung analog. Die Konzentration des Pankreas wurde 5fach höher gewählt.
3. **Acylase:** 1 g der Sorboylaminosäure wird in 100 ml Tris-Puffer pH 7,85 gelöst. 10 mg Acylase werden in 5 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst. Jeweils 1 ml der Sorboylaminosäurelösung wird im Brutschrank bei 37°C 2 Std mit steigenden Mengen Acylase (0,02–2 mg) inkubiert. Die Menge der abgespaltenen Aminosäure wird titrimetrisch bestimmt.
4. **Pancreas:** Rinderpankreas wird mit der doppelten Menge Phosphatpuffer pH 7,0 homogenisiert. Man läßt das Homogenat 20 min in der Kälte stehen, zentrifugiert und verwendet für die Spaltversuche den Überstand.

5. Lipase: Die Aktivität der Lipase wird nach einer improvisierten Methode titrimetrisch bestimmt. Dazu wird ein entsprechender Ansatz auf pH 8,0 eingestellt und in 10minutigem Abstand die pH-Verschiebung ins saure Gebiet mit $n/100$ NaOH kompensiert.

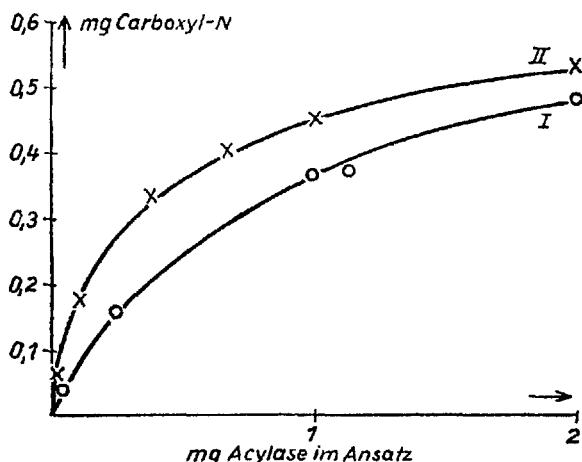


Abb. 3. Kurve der colorimetrische (I) und titrimetrisch (II) bestimmten Werte bei Sorboylglutaminsäure.

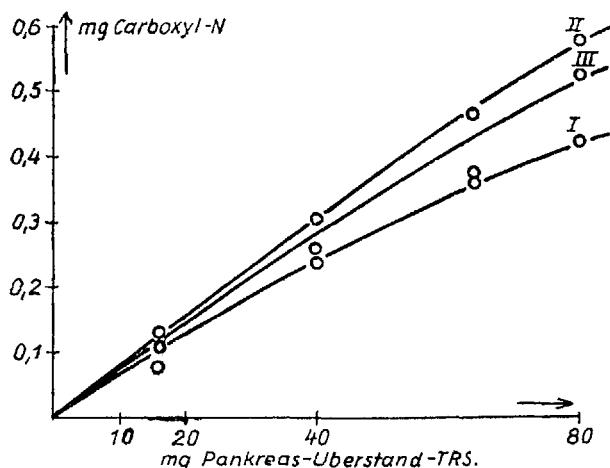


Abb. 4. Spaltung von Sorboylaminosäuren durch Pankreas. I Sorboylglutaminsäure, II Sorboyl-Alanin, III Sorboylsarkosin.

6. Andere benutzte Methoden: 1. Spektralphotometrie zum Nachweis der Spaltung im sauren Milieu. — 2. Dünnschichtchromatographie: Zum Nachweis der Spaltung in HCl-Atmosphäre bei mehrstündigem Aufenthalt in der feuchten Kammer.

Ergebnisse

Bei den Proteasen und bei Pankreon wurde ausschließlich die colorimetrische Methode zur Erfassung der abgespaltenen Aminosäuren herangezogen. Die Modifikation ohne Pikrinsäurefällung ergab zuverlässigere Werte und wurde für die endgültigen Versuche ausschließlich benutzt.

1. Proteasen: Bei keiner der eingesetzten Proteasen konnte eine Spaltung der Sorboylverbindungen beobachtet werden.

2. Pankreon: Bei höherer Konzentration (Abb. 1) läßt sich eine gewisse Farbentwicklung beobachten.

3. Acylase: Bereits bei niedrigen Konzentrationen werden die Sorboylaminosäuren gespalten (Abb. 2). Bei Sorboylglutaminsäure ist die Spaltung am stärksten. In der Spaltungsintensität folgen dann Sorboylalanin und Sorboylsarkosin.

Abb. 3 zeigt eine relativ gute Übereinstimmung der bei der colorimetrischen und titrimetrischen Methode gefundenen Werte (Sorboylglutaminsäure). Bezuglich der Reproduzierbarkeit ist die titrimetrische Methode überlegen.

4. Pankreas: Die untersuchten Pankreaspräparationen enthalten 70–90 mg Trockensubstanz/ml Homogenatüberstand. Hier verläuft die Spaltungsintensität in einer anderen Reihenfolge (Abb. 4).

Den Farbwerken Hoechst danken wir für die Überlassung der N-Sorboylaminosäuren.

Literatur

1. MOORE, S. und W. H. STEIN, J. biol. Chem. **176**, 367 (1948). — 2. HINSBERG-LANG, Med. Chem. 2. Aufl. (Berlin 1951), S. 425.

Anschrift der Verfasser:
Physiolog. Chem. Univ. Inst., 65 Mainz

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Professor Dr. Dr. Ammon)

Untersuchungen über Nährwertverluste bei der Zubereitung von Speisen mit automatisch arbeitenden Großküchenmaschinen

I. Darlegung der Fragestellung und Gesamt-Vitamin-C-Verluste*)

Von W. KUNKEL

Mit 7 Tabellen

(Eingegangen am 1. März 1965)

W. WACHHOLDER (1) wies im Jahre 1940 darauf hin, daß in der Großküche der Vitamin-C-Verlust in Gemüsen und Kartoffeln größer sei als bei den schonenderen Verfahren der Haushaltssuppe. Er lieferte darüber entsprechende Untersuchungsergebnisse.

*) Ein Teil dieser Ergebnisse wurde in einem Kurzvortrag auf dem 6. Internationalen Ernährungskongreß 1963 in Edinburgh mitgeteilt [W. KUNKEL und R. AMMON: Proceedings of the 6th International Congress of Nutrition, Edinburgh 1963, S. 573 (Edinburgh and London, 1964)].