

Tabelle 5.

Hydrolyse-Geschwindigkeit acylierter Peptide mit Trypsin und Trypsin-Kinase.

(Substrat-Lösungen mit $n\text{-NH}_3$ auf $p_H = 8.4$ eingestellt; 0.72 T.-(e.), enterokinase-frei, a) ohne Aktivierung, b) nach Aktivierung mit Enterokinase angewandt; 9 Stdn., 30°; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 4.0 ccm.)

Enzym	Angew. mg	Carbäthoxyl-glycyl- <i>d, l</i> -leucin		Acetyl- <i>d, l</i> -[phenyl-alanyl]- <i>d, l</i> -alanin		
		Aciditäts- Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung (%)	Angew. mg	Aciditäts- Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung (%)
Trypsin	51.2	1.48	38	40.1	0.78	27
Trypsin-Kinase . . .	48.8	1.51	40	51.3	0.90	24

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

103. Ernst Waldschmidt-Leitz und Gertrud Rauchalles: Zur Spezifität der Peptidasen, II.: Vergleich der Peptid-Zucker- Kondensation mit der Wirkungsweise des Erepsins.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 10. Februar 1928.)

Für die spezifische Wirkungsweise einiger der am Eiweiß-Abbau beteiligten Enzyme hat man in neuerer Zeit bestimmtere Anhaltspunkte gewonnen. So haben für das einfachste Beispiel, die Hydrolyse von Dipeptiden durch tierisches Erepsin, H. v. Euler und K. Josephson¹⁾ aus der verschiedenen Angreifbarkeit von Peptid-Derivaten und aus Hemmungs-Erscheinungen die Vorstellung abgeleitet, „daß die Bindung eines Substrates an das Erepsin aus Schweine-Darm wenigstens zum Teil durch eine freie Aminogruppe des Substrates vermittelt wird“; dieser Anschauung entsprechen die Erfahrungen über die enzymatische Spaltbarkeit einer größeren Anzahl von Peptid-Derivaten, von denen wir inzwischen berichtet haben²⁾, und die zu dem Ergebnis führen, daß die Substitution der freien Aminogruppe in den Peptiden beispielsweise durch Acyl ihre Angreifbarkeit durch Erepsin verhindert, eine Veränderung an der Carboxylgruppe dagegen sie unbeeinflußt läßt. Auch über die Natur der spezifischen substrat-bindenden Gruppe des Erepsins, die seine Anlagerung an die Aminogruppe vermittele, haben v. Euler und Josephson Betrachtungen angestellt; aus Versuchen über die Hemmung der Erepsin-Wirkung durch einige Aldehyd-Reagenzien,

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926]; K. Josephson und H. v. Euler, ebenda **162**, 85 [1926/27].

²⁾ siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz, W. Grassmann und A. Schäffner, B. **60**, 359 [1927]; E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein, B. **61**, 299 [1928]; E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, voranstehende Abhandlung.

Phenyl-hydrazin, Cyankalium und Sulfit, folgern sie, „daß die gesuchte Affinitätsgruppe“ des Erepsins „... Aldehyd-Eigenschaften besitzt“. Allein die experimentellen Unterlagen, die hierfür erbracht wurden, erscheinen noch zu einseitig und nicht eindeutig genug, um den angeregten Vorstellungen über die Reaktion zwischen Erepsin und Peptiden im Sinne der intermediären Bildung Schiffischer Basen genügend Gewicht zu verleihen.

Für das Verständnis des Reaktions-Mechanismus der Peptid-Spaltung durch Erepsin hat uns die Untersuchung der Reaktion einfacher Zucker mit Amino-säuren und Peptiden bestimmtere Anhaltspunkte vermittelt. Die Kondensation von Zuckern mit Amino-säuren ist zuerst von S. Kostytschew und W. Brilliant³⁾, sodann von C. Neuberg und M. Kobel⁴⁾ und besonders eingehend von H. v. Euler und seinen Mitarbeitern⁵⁾ beschrieben worden; die Befunde dieser Autoren stimmen darin überein, daß die Reaktion zwischen Amino-säuren und Aldehyd-Zuckern, die vor allem bei alkalischer Reaktion zu beobachten ist, mit meßbarer Geschwindigkeit verläuft, während Keto-Zucker, wie Fructose, momentan und nur in geringem Maße zu reagieren scheinen. Nach H. v. Euler, E. Brunius und K. Josephson⁵⁾ führt die Reaktion von Amino-säuren, wie Glykokoll oder Alanin, mit Glucose, die eine stöchiometrische ist, zur Einstellung eines Gleichgewichtes, welches bei steigender Alkalität der Versuchslösung einer starken Zunahme der Kondensation entspricht. Bei der Einwirkung von Aldehyd-Zucker auf Pepton hat man indessen viel geringere⁶⁾, bei der Einwirkung auf genuine Proteine⁷⁾ gar keine sicheren Ausschläge beobachtet, entsprechend der geringfügigeren Menge reaktionsfähiger Aminogruppen in diesen Substraten; an Peptiden andererseits sind Erfahrungen noch nicht beschrieben worden.

Die Kondensation von Glucose mit Peptiden, die wir geprüft haben, unterscheidet sich von der Reaktion des Aldehyd-Zuckers mit einfachen Amino-säuren, mit der sie in vielem Übereinstimmung zeigt, beispielsweise in ihrem stöchiometrischen Verlauf oder in ihrer Abhängigkeit von der Konzentration der Komponenten, in einer bemerkenswerten Beziehung: sie ist gekennzeichnet durch eine ganz andere Abhängigkeit von der H^+ -Ionen-Konzentration, von der Alkalität der Versuchslösung. Es entspricht, wenigstens dem Sinne nach, dem Unterschiede im elektrochemischen Charakter von Peptid einerseits, von Amino-säure andererseits, wenn wir beobachten, daß die Geschwindigkeit der Kondensation von Peptiden, Glycyl-glycin oder Leucyl-glycin, mit Glucose, schon bei schwach alkalischer Reaktion, $p_H = 8.0$, optimal, bei stärker alkalischer, etwa $p_H = 9.0$, nur noch unbedeutend gefunden wird, während die Kondensation der einfachen Amino-säuren, Glykokoll oder Alanin, zufolge H. v. Euler und E. Brunius⁸⁾ erst in stärker alkalischem Milieu beträchtlicher zu werden beginnt.

³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **91**, 372 [1914], **127**, 224 [1923].

⁴⁾ Biochem. Ztschr. **162**, 496 [1925].

⁵⁾ H. v. Euler und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **153**, 1 [1926]; H. v. Euler, E. Brunius und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **155**, 259 [1926]; H. v. Euler und E. Brunius, B. **59**, 1581 [1926], **60**, 992, 997 [1927].

⁶⁾ vergl. H. v. Euler und E. Brunius, B. **60**, 992, 997 [1927].

⁷⁾ vergl. H. v. Euler und E. Brunius, B. **60**, 992, 997 [1927]; S. P. L. Sørensen und I. Lorber, B. **60**, 999 [1927].

⁸⁾ B. **59**, 1581, u. zw. S. 1583 [1926].

In Hinblick auf die Vorstellung, daß die Anlagerung des Erepsins an die Aminogruppen der Substrate durch eine freie Aldehydgruppe des Enzyms vermittelt werde, scheint uns der Vergleich der p_H -Abhängigkeit der Peptid-Spaltung einerseits, der Peptid-Kondensation mit Glucose andererseits von besonderer Bedeutung. Wie nachstehende Figur erkennen läßt, stimmt die p_H -Kurve der Glycyl-glycin-Spaltung durch Darm-Erepsin mit der p_H -Kurve der Kondensations-Geschwindigkeit von Glycyl-glycin mit Glucose innerhalb der Bestimmungsfehler vollständig überein.

Die Schlußfolgerung erscheint berechtigt, daß das Peptid in beiden Fällen mit ähnlichen chemischen Gruppen in Reaktion tritt, die Bildung der Erepsin-Peptid-Verbindung dem Vorgange der Kondensation von Aldose und Peptid wesensverwandt und für ihre Vermittlung eine freie Aldehydgruppe des Enzyms verantwortlich ist. Auch läßt es sich zeigen, daß entsprechend den Erfahrungen über die Unangreifbarkeit acylierter Peptide auch ihre Kondensationsprodukte mit Glucose von Erepsin nicht zerlegt werden; in Peptid-Kondensaten der Glucose, die nach den Erfahrungen von H. v. Euler und E. Brunius¹⁰⁾ an Amino-säuren reversible sein werden, tritt also der Aldehyd-Zucker, dessen Affinität geringer, dessen Konzentration aber beträchtlicher ist, mit dem Enzym in Wettbewerb, er stört seine Anlagerung an das Peptid. Es ist bemerkenswert, daß mit Fructose keine Kondensation des Peptides, auch keine Herabsetzung seiner Spaltbarkeit beobachtet wird.

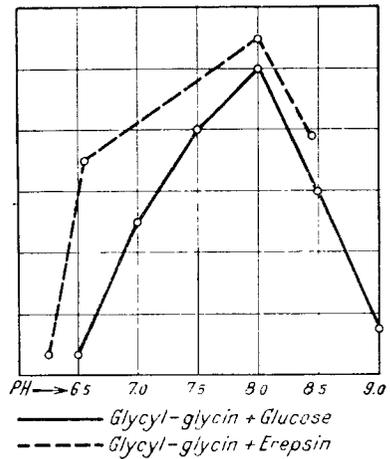


Fig. 1. p_H -Abhängigkeit der Glucose-Peptid-Kondensation und der Peptid-Spaltung durch Erepsin⁹⁾.

Wenn wir die Übereinstimmung der angeführten p_H -Kurven in dem Sinne deuten, daß die spezifische substrat-bindende Gruppe des Erepsins eine freie Aldehydgruppe sei, so wird diese Vorstellung weiterhin gestützt durch den Vergleich der Kondensationsfähigkeit einfacher Amino-säuren mit ihrem Hemmungsvermögen gegenüber der Wirkung des Erepsins; es verdient Beachtung, daß so wie die Kondensation der Amino-säuren, Glykokoll oder Alanin, auch ihr hemmender Einfluß auf die enzymatische Peptid-Spaltung bei stärker alkalischer Reaktion immer beträchtlicher wird^{10a)}. Man wird gegen diese Schlußfolgerungen einwenden können, daß die Reaktionsfähigkeit von Peptid wie Amino-säure in jedem Falle durch den elektrochemischen Charakter bedingt sei, unabhängig von der Natur der mit der freien Aminogruppe reagierenden Komponenten; allein diese Anschauung entspricht nicht den Erfahrungen über die Reaktionsfähigkeit

⁹⁾ Die p_H -Kurve der Erepsin-Wirkung ist den Beobachtungen von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner (Ztschr. physiol. Chem. **151**, 31, u. zw. S. 39 [1925/26]) entnommen. ¹⁰⁾ B. **59**, 1581, u. zw. S. 1582 [1926]. ^{10a)} H. v. Euler und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926].

der Aminogruppen in anderen Fällen, beispielsweise bei der Einführung von Säure-Resten, die keine Unterschiede in der Abhängigkeit von der Alkalität zwischen Peptid und Amino-säure erkennen läßt. Es ist viel wahrscheinlicher, daß der Analogie in der p_H -Abhängigkeit von Aldehyd- und Erepsin-Kondensation eine Analogie der reaktionsfähigen chemischen Gruppen zugrunde liegt.

Diese spezielle Annahme über den Mechanismus der Erepsin-Wirkung, die wir aus ihrer p_H -Abhängigkeit ableiten, würde bedeuten, daß der Einfluß der Wasserstoff-Ionen in dem vorliegenden Falle die Bildungs-Geschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung, nicht ihre Zerfalls-Geschwindigkeit betrifft, und daß die Geschwindigkeit der Erepsin-Wirkung durch die Bildungs-Geschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung bestimmt wird. Diese Feststellung, die durch exakte Affinitäts-Messungen und durch die Ermittlung des bei verschiedener Wasserstoff-Zahl an das Peptid gebundenen Enzym-Anteils, welcher veränderlich sein sollte, zu erhärten sein wird, würde den Mechanismus der Erepsin-Wirkung von dem der enzymatischen Rohrzucker-Spaltung grundsätzlich unterscheiden; denn nach den Untersuchungen von R. Kuhn¹¹⁾ wird das Gleichgewicht zwischen Rohrzucker und Saccharase unabhängig von der Wasserstoff-Zahl gefunden; „die Wasserstoff-Ionen bestimmen die Zerfalls-Geschwindigkeit des Saccharase-Saccharose-Komplexes“.

Für das Verständnis der enzymatischen Peptid-Spaltung mag das Studium der Affinitäts-Verhältnisse einfacher Zucker zu Peptiden und Aminosäuren förderlich sein. Auch die Vorstellungen über den Mechanismus der Enzym-Wirkung überhaupt, die in der Annahme von Bildung und Zerfall intermediärer Enzym-Substrat-Verbindungen gipfeln, gewinnen an Anschaulichkeit, wenn man bedenkt, daß unter den Bedingungen optimaler Affinität zwischen Zucker und Peptid, z. B. bei $p_H = 8.0$, nur eine geringe Affinität der Glucose zu den Spaltprodukten des Peptides, den Aminosäuren, zu bemerken ist. Wenn es gelänge, in einen solchen Zucker eine spezifische substrat-spaltende Gruppe einzuführen, zur Auflockerung der Peptid-Bindung oder ihrer Enol-Form befähigt, so wäre das Modell eines enzymatischen Katalysators der Verwirklichung nicht mehr so fern.

Beschreibung der Versuche.

1. Kondensation von Zuckern mit Peptiden.

a) Einwirkung von Glucose.

Glucose-Menge und Kondensation: Für die zahlreichen Versuche der Kondensation von Glucose und Glycyl-glycin bzw. Leucyl-glycin, die wir ausgeführt haben, dienten mol., in einigen Fällen 2-mol. Lösungen des Zuckers und 0.5—0.1-mol. Lösungen der Peptide. Das Gleichgewicht zwischen Kondensat einerseits und Peptid bzw. Glucose andererseits, das unter den angewandten Reaktionsbedingungen, $p_H = 7.8—8.0$, in der Regel nach einigen Stunden erreicht wird, ist abhängig von der Konzentration und dem Mengenverhältnis der reagierenden Komponenten, wie nachstehender Versuch 1 veranschaulicht. Es empfiehlt sich jedoch wegen der größeren analytischen Genauigkeit, keinen zu großen Überschuß an dem Zucker anzuwenden, zumal bei mäßigem Zucker-Überschuß, den wir gewöhnlich an-

¹¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **125**, 28, 11. zw. S. 44 [1922/23].

gewandt haben (z. B. 5—10 Mol Glucose: 1 Mol Leucyl-glycin bzw. 4 Mol Glucose: 1 Mol Glycyl-glycin), der Kondensationsgrad schon beträchtlich gefunden wird (Versuch 2). Man verfolgte den Verlauf der Reaktion und ihren Stillstand durch polarimetrische Analyse, sowie durch Ermittlung des reaktionsfähigen Amino-Stickstoffs nach van Slyke, in vielen Fällen auch durch Bestimmung der Glucose-Menge mit Hypojodit nach dem Verfahren von R. Willstätter und G. Schudel¹²⁾.

Versuch 1: Glycyl-glycin + Glucose, a) 1 Mol: 50 Mol, b) 1 Mol: 4 Mol.

Angesetzt zu a): 4.0 ccm 0.5-mol. Glycyl-glycin (pH = 7.6, eingestellt mit *n*-NaOH) + 50 ccm 2-mol. Glucose (pH = 7.6, eingestellt mit *n*-NaOH); Zimmer-Temperatur; NH₂-Stickstoff, bestimmt in 5.0 ccm der Lösung.

Zeit in Min.	Drehung beob.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Kondensat., bezog. auf Glycyl-glycin (%)
0	+ 18.14	6.70	3.35	0
250	+ 17.85	4.04	2.02	37
1440	+ 17.90	4.04	2.01	37

Angesetzt zu b): 20 ccm 0.5-mol. Glycyl-glycin (pH = 7.6) + 40 ccm mol. Glucose; Zimmer-Temperatur; NH₂-Stickstoff und Reaktionsvermögen, bestimmt in 1.0 ccm der Lösung.

Zeit in Min.	Drehung beob.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)	Jod-Verbr. ccm 0.1-n.	Kondensat., bezog. auf Glucose (%)
0	+ 6.35	6.34	3.17	0	13.58	0
115	—	5.47	2.73	14	13.14	13
420	+ 5.98	4.88	2.44	23	12.80	24
1260	+ 5.98	4.88	2.44	23	—	—

Versuch 2: Leucyl-glycin + Glucose, a) 1 Mol: 5 Mol, b) 1 Mol: 10 Mol.

Angesetzt zu a): 20 ccm 0.4-mol. *d,l*-Leucyl-glycin (pH = 7.8) + 40 ccm mol. Glucose (pH = 7.8); Zimmer-Temperatur; NH₂-Stickstoff, bestimmt in 2.0 ccm der Lösung.

Zeit in Stdn.	Drehung beob.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)
0	+ 6.38	8.74	4.37	0
26	+ 5.69	6.40	3.20	27
91	+ 5.70	—	—	—

¹²⁾ B. 51, 780 [1918]; die durch die Gegenwart der stickstoff-haltigen Substanz bedingte Unsicherheit in der Zucker-Bestimmung war infolge der verhältnismäßig geringen Peptid-Menge nur unbedeutend; auch wurde sie durch Ausführung von Leerbestimmungen nahezu ausgeglichen.

Angesetzt zu b): 20 ccm 0.2-mol. *d,l*-Leucyl-glycin ($p_{H} = 7.8$) + 40 ccm mol. Glucose ($p_{H} = 7.8$); Zimmer-Temperatur; NH_2 -Stickstoff, bestimmt in 5.0 ccm der Lösung.

Zeit in Stdn.	Drehung beob.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Kondensat. bezog. auf Peptid (%)
0	+6.10	10.23	5.12	0
17	+5.63	7.41	3.70	28

Verhältnis von Glucose zu Peptid im Kondensat: Der Befund von H. v. Euler, E. Brunius und K. Josephson¹³⁾, wonach an der Kondensation von Glucose mit Amino-säuren die reagierenden Komponenten in stöchiometrischem Verhältnis sich beteiligen, bestätigt sich auch für die analoge Reaktion der Peptide; man findet, wie nachstehende Versuche belegen, beispielsweise nach erreichter Gleichgewichtslage, die Abnahme freien Amino-Stickstoffs der Abnahme reduzierenden Zuckers äquivalent; es liegt also in den Kondensaten eine Verbindung aus 1 Mol Glucose und 1 Mol Peptid vor.

Versuch 3: a) Glycyl-glycin + Glucose.

a) Angesetzt: 20 ccm 0.5-mol. Glycyl-glycin + 40 ccm mol. Glucose; $p_{H} = 7.3$; Zimmer-Temperatur; NH_2 -Stickstoff, sowie Reduktionsvermögen, bestimmt in 1.0 ccm der Lösung.

Zeit in Stdn.	Drehung beob.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)	Jod-Verbrauch ccm 0.1-n.	Kondensat., bezog. auf Glucose (%)
0	+12.48	6.09	3.05	0	14.26	0
22	+11.81	—	—	—	—	—
46	+11.81	4.80	2.40	21.2	13.59	20.4

b) Angesetzt: 20 ccm 0.5-mol. Glycyl-glycin ($p_{H} = 7.4$); Zimmer-Temperatur; NH_2 -Stickstoff in 2.0 ccm, Reduktionsvermögen in 1.0 ccm der Lösung bestimmt.

Zeit in Stdn.	Drehung beob.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)	Jod-Verbrauch ccm 0.1-n.	Kondensat., bezog. auf Glucose (%)
0	+6.35	7.17	3.09	0	14.24	0
16	+5.96	—	—	—	—	—
117	+5.96	5.19	2.60	15.9	13.64	16.8

Versuch 4: Leucyl-glycin + Glucose.

a) Angesetzt: 20 ccm 0.2-mol. *d,l*-Leucyl-glycin + 40 ccm mol. Glucose; $p_{H} = 7.9$; Zimmer-Temperatur; NH_2 -Stickstoff in 5.0 ccm, Reduktionsvermögen in 1.0 ccm der Lösung bestimmt.

¹³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **155**, 259 [1926].

Zeit in Stdn.	Drehung beob.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)	Jod- Verbrauch ccm o. I-n.	Kondensat., bezog. auf Glucose (%)
0	+ 6.26	10.33	5.17	0	13.49	0
18	+ 5.73	7.12	3.56	31.1	13.10	28.9

b) Angesetzt: 20 ccm 0.4-mol. *d,l*-Leucyl-glycin + 40 ccm mol. Glucose; $p_H = 7.6$; Zimmer-Temperatur; NH₂-Stickstoff in 2.0, Reduktionsvermögen in 1.0 ccm der Lösung bestimmt.

Zeit in Stdn.	Drehung beob.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)	Jod- Verbrauch ccm o. I-n.	Kondensat., bezog. auf Glucose (%)
0	+ 6.48	8.26	4.13	0	13.56	0
6	+ 5.95	6.93	3.47	16.1	13.05	19
25	+ 5.79	5.93	2.97	28.2	12.00	26
70	+ 5.74	—	—	—	—	—

Kondensations - Geschwindigkeit und Wasserstoff - Zahl: Während die Reaktion zwischen Amino-säuren und Glucose zufolge H. v. Euler und E. Brunius¹⁴⁾ erst bei stärker alkalischer Reaktion, von $p_H = 8.2$ an, deutlicher zu werden beginnt, die Gleichgewichtskonstante im System Amino-säure - Glucose mit steigender Alkalität, wie es scheint, bis $p_H = 11.0$, eine sehr starke Zunahme erfährt, ist die Kondensations-Geschwindigkeit einfacher Peptide mit Glucose ausgezeichnet durch ein scharfes Optimum bei schwach alkalischer Reaktion, $p_H = 8.0$, entsprechend der für die Erepsin-Wirkung optimalen Wasserstoff-Zahl¹⁵⁾. Auch für die Lage des Gleichgewichtes scheint die Wasserstoff-Zahl, wie man aus der Tabelle 1 auf S. 652 entnehmen wird, in dem nämlichen Sinne bestimmend zu sein.

b) Einwirkung von Fructose.

Während C. Neuberg und M. Kobel¹⁶⁾ über eine beim Vermischen von Alanin- und Fructose-Lösungen momentan eintretende, geringfügige Drehungsänderung berichten, die aus der Addition der in den Ausgangslösungen beobachteten Drehungswerte abgeleitet wird, scheinen uns die Versuche von H. v. Euler und E. Brunius¹⁷⁾ zu dem Ergebnis zu führen, daß hierbei keine eindeutige, die Unsicherheit der Analyse übersteigende Änderung in der Molekülzahl der Mischung zu bemerken ist. Die Bestimmung der Menge reaktionsfähigen Amino-Stickstoffs in den Gemischen von Fructose und Leucyl-glycin, die wir vorgenommen haben, läßt erkennen, daß im Gegensatz zu den für die Einwirkung von Glucose beschriebenen Erfahrungen unter den dort gewählten und optimal befundenen Bedingungen keine Reaktion stattzufinden scheint; auch entspricht die unmittelbar nach dem

¹⁴⁾ B. 59, 1581, u. zw. S. 1583 [1926].

¹⁵⁾ vergl. E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner, Ztschr. physiol. Chem. 151, 31, u. zw. S. 39 [1925/26].

¹⁶⁾ Biochem. Ztschr. 162, 496 [1925].

¹⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. 161, 265 [1926].

Vermischen der Lösungen nach van Slyke gemessene Stickstoff-Menge der für das vorhandene Peptid berechneten¹⁸⁾. Die in langen Zeiten beobachtete, geringfügige Abnahme an bestimmbarern Peptid dürfte auf eine andersartige Reaktion zurückzuführen sein.

Tabelle 1.

Kondensation von Glycyl-glycin mit Glucose und Wasserstoff-Zahl. (5.0 ccm 0.5-mol. Glycyl-glycin + 10.0 ccm mol. Glucose + 10.0 ccm Pufferlösung von $p_H = 7.8$ (enthaltend 0.4539 g KH_2PO_4 , 0.95 g Citronensäure, durch Zugabe von 4-n. NaOH eingestellt); Wasserstoff-Zahl eingestellt durch Zugabe von $n-H_2SO_4$ bzw. $n-NaOH$ ¹⁹⁾; Zimmer-Temperatur; NH_2 -Stickstoff, bestimmt mit 5.0 ccm der Lösung.

p_H (zu Beginn gemessen)	Zeit in Stdn.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)	p_H (nach erfolgter Reaktion gemessen)
6.5	0	16.53	8.27	0	6.5
	4	15.92	7.96	3.7	
7.0	0	17.51	8.76	0	7.0
	1	15.83	7.92	9.6	
	2	15.26	7.63	12.8	
	4	15.54	7.77	11.3	
7.5	0	16.30	8.15	0	7.2
	2	13.09	6.55	19.7	
	4	12.96	6.48	20.5	
8.0	0	16.83	8.42	0	7.3
	2	12.67	6.34	24.7	
	4	11.63	5.82	30.9	
8.5	0	16.93	8.47	0	8.2
	1	15.53	7.77	8.3	
	2	14.31	7.16	15.5	
	4	11.97	5.99	29.3	
9.0	0	15.31	7.66	0	8.8
	1	15.07	7.54	1.6	
	2	14.72	7.36	3.8	
	4	13.59	6.80	11.2	

Versuch 5: Leucyl-glycin + Fructose.

Angesetzt: 10.0 ccm 0.2-mol. *d,l*-Leucyl-glycin + 20 ccm mol. Fructose; $p_H = 7.9$; Zimmer-Temperatur; Angaben beziehen sich auf 5.0 ccm der Lösung.

Zeit in Stdn.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)
0	10.09	5.05	0
4	10.15	5.08	0
21	9.80	4.90	3.4

¹⁸⁾ Unter Zugrundelegung des für Leucyl-glycin bestimmten Wertes von 108% d. Th.

¹⁹⁾ Die hierdurch entstandenen, geringfügigen Unterschiede in der Konzentration der Ansätze sind für die Geschwindigkeit der Kondensation belanglos; ihr Einfluß auf die Vergleichbarkeit der Messungen war durch die Ausführung jeweils besonderer Kontrollanalysen sogleich nach der Bereitung der Ansätze ausgeschaltet.

2. Zur Spaltbarkeit der Glucose-Peptid-Kondensate durch Peptidasen.

Die enzymatische Spaltbarkeit der bei der Einwirkung von Glucose auf Peptide gebildeten Kondensationsprodukte in den Reaktionsgemischen selbst ist mit drei typischen Peptidasen, dem Erepsin aus Darm-Schleimhaut, Pankreas und Hefe geprüft worden. Es hat sich übereinstimmend ergeben, daß mit der Kondensation der freien Aminogruppe im *d,l*-Leucylglycin mit dem Aldehyd das Peptid auch seine Angreifbarkeit durch die ereptischen Enzyme einbüßt; der Fehlbetrag an spaltbarem Substrat, der sich aus dem vorzeitigen Stillstand der enzymatischen Reaktion ergibt, entspricht der bei der Kondensation gemessenen Abnahme reaktionsfähiger Aminogruppen. Es geht daraus hervor, daß an der Reaktion mit dem Zucker die beiden optischen Antipoden des angewandten Peptid-Racemates, die enzymatisch spaltbare *l*- wie die nicht zerlegbare *d*-Form, in ähnlichem Maße beteiligt sind. Ein rückläufiger Zerfall der gebildeten Kondensationsprodukte infolge der mit der Peptid-Hydrolyse verbundenen Konzentrationsverschiebung der Komponenten scheint danach in den kurzen, für die Enzymwirkung gewählten Zeiten nicht in merklichem Ausmaße einzutreten; erst in sehr langen Einwirkungszeiten ist, wie wir festgestellt haben, ein langsames Fortschreiten der enzymatischen Hydrolyse zu beobachten.

Die Feststellung, daß die vorliegenden Aldehyd-Derivate der Peptide durch Erepsin nicht angegriffen werden, fügt sich den Erfahrungen ein, die inzwischen über die Spezifität der Peptidasen gegenüber *N*-acylierten Peptiden gewonnen worden sind²⁰⁾; die Auffassung, daß für die Anlagerung der geprüften Enzyme, Pankreas- und Darm-, wie auch Hefe-Erepsin²¹⁾, an ihre Substrate eine freie Aminogruppe unentbehrlich ist, erhält damit eine weitere Stütze.

Wir beschreiben nachstehend unsere Versuche über die Einwirkung der drei Enzyme auf die Gemische von Leucylglycin und Glucose, deren Kondensationsgrad nach Erreichung des Reaktions-Gleichgewichtes gemessen war; es sei bemerkt, daß für die Prüfung des Darm- und Hefe-Enzyms vorgereinigte, vom Trypsin befreite Präparate, für die des Pankreas-Erepsins der trypsin-haltige Glycerin-Auszug der Drüse zur Anwendung kam.

a) Einwirkung von Darm-Erepsin.

Versuch 6: a) Gewinnung des Kondensates.

Angesetzt: 20 ccm 0.2-mol. *d,l*-Leucylglycin + 40 ccm mol. Glucose; $p_{\text{H}} = 7.9$; Zimmer-Temperatur; NH_2 -Stickstoff, bestimmt in 5.0 ccm.

Zeit in Stdn.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)
0	10.33	5.17	0
18	7.12	3.56	31.1

b) Hydrolyse durch Darm-Erepsin.

²⁰⁾ siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, B. 61, 640 [1928].

²¹⁾ vergl. W. Grassmann und H. Dyckerhoff, B. 61, 656 [1928]; E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, B. 61, 640 [1928].

Tabelle 2.

(40 ccm des Reaktionsgemisches zu a) + 5.0 ccm trypsin-freies Darm-Erepsin (enthaltend 0.00307 Er.-E.) + 10 ccm Citrat-Phosphat-Puffer von $p_H = 7.9$ + 0.40 ccm *n*-NaOH; $p_H = 7.9$; 30°; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 5.0 ccm.)

Zeit in Min.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Zuwachs mg	Spaltung (%), bezog. auf	
				Gesamt- Peptid	freies Peptid ²²⁾
0	5.14	2.57	—	—	—
31	5.72	2.86	0.29	7.8	11.3
63	6.32	3.16	0.59	15.5	23.0
92	6.72	3.36	0.79	21.2	30.7
210	7.73	3.87	1.30	34.9	50.6
270	7.63	3.82	1.25	33.5	48.6
381	7.70	3.85	1.28	34.3	49.8

Versuch 7: a) Gewinnung des Kondensates.

Angesetzt: 20 ccm 0.2-mol. *d,l*-Leucyl-glycin + 40 ccm mol. Glucose; $p_H = 7.9$; Zimmer-Temperatur; NH₂-Stickstoff, in 5.0 ccm der Lösung bestimmt.

Zeit in Stdn.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)
0	10.23	5.12	—
17	7.41	3.71	27.6

b) Hydrolyse durch Darm-Erepsin.

Tabelle 3.

(40 ccm des Reaktionsgemisches zu a) + 15 ccm trypsin-freies Darm-Erepsin (enthaltend 0.00882 Er.-E.) + 10 ccm Phosphat-Citrat-Puffer von $p_H = 7.9$ + 0.23 ccm *n*-NaOH; $p_H = 7.9$; 30°; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 5.0 ccm.)

Zeit in Min.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Zuwachs mg	Spaltung (%), bezog. auf	
				Gesamt- Peptid	freies Peptid
0	4.60	2.30	—	—	—
33	6.16	3.08	0.78	24.6	33.9
61	6.54	3.27	0.97	30.5	42.2
88	6.55	3.28	0.98	30.8	42.6
113	6.90	3.45	1.15	36.2	50.0
148	7.03	3.52	1.22	38.4	53.0
354	7.06	3.53	1.23	38.7	53.5

²²⁾ Berechnet aus der zu Beginn der Enzym-Wirkung gemessenen Menge Amino-Stickstoffs.

b) Einwirkung von Pankreas-Erepsin.

Versuch 8: a) Gewinnung des Kondensates.

Angesetzt: 20 cc mo.2-mol. *d,l*-Leucyl-glycin + 40 ccm mol. Glucose; $p_H = 7.8$; Zimmer-Temperatur; NH_2 -Stickstoff, bestimmt in 5.0 ccm der Lösung.

Zeit in Min.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)
0	10.24	5.12	—
18	7.33	3.67	28.6

b) Hydrolyse durch Pankreas-Erepsin.

Tabelle 4.

(40 ccm des Reaktionsgemisches zu a) + 5.0 ccm Glycerin-Auszug aus Pankreas (enthaltend 0.00899 P. Er.-E.) + 5.0 ccm H_2O + 10 ccm Phosphat-Citrat-Puffer von $p_H = 7.9$ + 0.35 ccm *n*-NaOH; $p_H = 8.0$; 30^0 ; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 5.0 ccm.)

Zeit in Min.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Zuwachs mg	Spaltung (%), bezog. auf	
				Gesamt- Peptid	freies Peptid
0	5.16	2.58	—	—	—
33	6.38	3.19	0.61	16.9	23.1
61	6.82	3.41	0.83	23.0	32.2
86	7.01	3.51	0.93	25.7	36.1
112	7.19	3.60	1.02	28.2	39.5
141	7.27	3.64	1.06	29.3	41.1
206	7.28	3.64	1.06	29.3	41.1

c) Einwirkung von Hefe-Erepsin.

Versuch 9: a) Gewinnung des Kondensates.

Angesetzt: 20 ccm 0.2-mol. *d,l*-Leucyl-glycin + 40 ccm mol. Glucose; $p_H = 7.8$; Zimmer-Temperatur; NH_2 -Stickstoff, bestimmt in 5.0 ccm der Lösung.

Zeit in Stdn.	mg N beob.	NH_2 -N mg	Kondensat., bezog. auf Peptid (%)
0	10.31	5.16	—
20	7.49	3.75	32.4

b) Hydrolyse durch Hefe-Erepsin.

²³⁾ Berechnet aus der zu Beginn der Enzym-Wirkung gemessenen Menge Amino-Stickstoffs.

Tabelle 5.

(40 ccm des Reaktionsgemisches zu a) + 5.4 ccm polypeptidase- und trypsin-freie Lösung von Hefe-Erepsin (enthaltend 3.86 Hefe-Er.-E.) + 10 ccm Phosphat-Citrat-Puffer von $p_H = 7.9 + 0.35$ ccm *n*-NaOH; $p_H = 8.0$; 30^0 ; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommenen Proben von 5.0 ccm.)

Zeit in Min.	mg N beob.	NH ₂ -N mg	Zuwachs mg	Spaltung (%), bezog. auf	
				Gesamt- Peptid	freies Peptid
0	6.16	3.08	—	—	—
57	7.94	3.97	0.89	19.5	28.9
80	8.40	4.20	1.12	24.6	36.4
106	8.50	4.25	1.17	25.7	38.0
131	8.50	4.25	1.17	25.7	38.0

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

104. Wolfgang Graßmann und Hanns Dyckerhoff: Über die Spezifität der Hefe-Peptidasen. (11. Abhandlung über Pflanzen-Proteasen in der von R. Willstätter und Mitarbeitern begonnenen Untersuchungsreihe).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.
(Eingegangen am 15. Februar 1928.)

Theoretischer Teil.

Die proteolytischen Wirkungen der Hefe und ihrer Auszüge werden in einer wichtigen Untersuchung von K. G. Dernby¹⁾ zurückgeführt auf ein System aus drei Einzelkomponenten, nämlich: 1) dem „Hefe-Pepsin“, das bei schwach saurer Reaktion (Optimum $p_H = 4.5$) Eiweißstoffe bis zur Pepton-Stufe, aber nicht darüber hinaus, hydrolysieren soll; 2) dem „Hefe-Trypsin“, das die Spaltung von Proteinen bei neutraler Reaktion (Optimum $p_H = 7$) vollzieht, und 3) dem „Hefe-Erepsin“, dessen spezifische Wirkungsweise und p_H -Abhängigkeit der des Darm-Erepsins entsprechen soll.

K. G. Dernby hat natürlich keines der Einzel-Enzyme in proteolytisch einheitlichem Zustande untersuchen können. Seine Ansichten ergeben sich vielmehr lediglich aus Beobachtungen über die p_H -Abhängigkeit der tryptischen und der ereptischen Wirkung, die an rohen Präparaten des Proteasen-Gemisches gewonnen waren. In einer Untersuchung von R. Willstätter und W. Grassmann²⁾ ist es zum ersten Male gelungen, die dipeptid-spaltende Komponente („Hefe-Erepsin“) von der eiweiß-spaltenden, die im Folgenden kurz als „Hefe-Protease“ bezeichnet werden soll, abzutrennen. Hinsichtlich des Hefe-Erepsins stehen die Beobachtungen Willstätters mit den Annahmen Dernbys in Übereinstimmung. Dagegen wird die Protein-Spaltung auf

¹⁾ Biochem. Ztschr. **81**, 107 [1917].

²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **153**, 250 [1926].