

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;  $p_H = 8.0$ ;  $30^\circ$ ; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommenen Proben von 5.0 ccm.)

Zeit in Min.	mg N beob.	NH <sub>2</sub> -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. Dernby<sup>1)</sup> 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. Grassmann<sup>2)</sup> 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

<sup>1)</sup> Biochem. Ztschr. **81**, 107 [1917].

<sup>2)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **153**, 250 [1926].

die Wirkung eines einzigen Enzyms zurückgeführt, das, abweichend sowohl vom Pepsin wie vom tierischen Trypsin, Eiweißkörper und Peptone bei schwach saurer Reaktion (Optimum bei etwa  $p_H = 5$ ) angreift und am ehesten mit gewissen pflanzlichen Tryptasen, z. B. dem aktivierten Papain oder auch mit der Protease der Milz (S. G. Hedin<sup>3</sup>), E. Waldschmidt-Leitz und W. Deutsch<sup>4</sup>), verglichen werden kann. Die Existenz eines dritten proteolytischen Enzyms, des „Hefe-Trypsins“ von Dernby, fanden Willstätter und Grassmann nicht bestätigt; sie schien in den Untersuchungen Dernbys durch das Zusammenwirken der beiden anderen Komponenten in den rohen Enzym-Lösungen vorgetäuscht zu sein.

Aber auch in Bezug auf die dipeptid-spaltende Komponente, das Hefe-Erepsin, war in der Folge die Auffassung Dernbys einer Revision zu unterziehen. Die Spezifität dieses Enzyms stimmt nämlich durchaus nicht mit derjenigen des Darm-Erepsins überein. Erste Befunde in dieser Richtung haben sich in einer Untersuchung von E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner und W. Grassmann<sup>5</sup>) ergeben: Es zeigte sich, daß beim fraktionierten enzymatischen Abbau von Eiweißkörpern Zwischenprodukte erhalten werden können, die rasch und weitgehend durch Darm-Erepsin, aber keineswegs durch das dipeptid-spaltende Hefe-Enzym zerlegt werden. Ebenso findet man eine Reihe einfacher oder aliphatisch und aromatisch substituierter Amide der Amino-säuren spaltbar für Darm-Erepsin, aber nicht für das ereptische Enzym der Hefe (Waldschmidt-Leitz, Grassmann und Schäffner<sup>6</sup>)). Ein grundlegender Unterschied zwischen den beiden Peptidasen ist wenig später von dem einen von uns<sup>7</sup>) aufgefunden worden: Der Spezifitäts-Bereich des ereptischen Hefe-Enzyms ist, in scharfem Gegensatz zu demjenigen des Darm-Erepsins, auf die Spaltung von Dipeptiden beschränkt; eine Anzahl untersuchter Tri- und Tetrapeptide hat sich ausnahmslos als resistent gegenüber dem Enzym erwiesen. Das Spaltungsvermögen der Hefe-Autolysate für die Tri- und Tetrapeptide findet sich dagegen bei dem angewandten adsorptiven Trennungsverfahren in dem leichter adsorbierbaren und in die Elutionen übergehenden Anteil des Enzym-Materials, der — völlig wirkungslos gegen alle untersuchten Dipeptide — die auf natürliche Proteine einwirkende Komponente, die eigentliche Protease der Hefe, enthält. Die in mehreren Enzym-Präparaten festgestellte annähernde Konstanz des Verhältnisses zwischen Protease- und Polypeptidase-Wirkung ließ es zunächst wahrscheinlich erscheinen, daß die Wirkungen gegen beide Klassen von Substraten auf ein einziges Enzym-Individuum zurückzuführen seien. „Indessen wird sich erst an einem umfangreicheren und methodisch vollkommeneren Versuchsmaterial die Frage entscheiden lassen, ob das tryptische und das polypeptid-spaltende Enzym der Hefe identisch sind“<sup>8</sup>).

In der Tat können, wie wir vor kurzem mitgeteilt haben<sup>9</sup>), im Verhältnis der proteolytischen und der Polypeptidase-Wirkung erhebliche Verschiebungen angetroffen werden, „die mit der Annahme einer Identität

<sup>3</sup>) Ztschr. physiol. Chem. **32**, 341, 531 [1901]; Journ. Physiol. **30**, 155 [1904]; Biochem. Journ. **2**, 112 [1906/07]; Journ. biol. Chem. **54**, 117 [1922].

<sup>4</sup>) Ztschr. physiol. Chem. **167**, 285 [1927].

<sup>5</sup>) Ztschr. physiol. Chem. **156**, 68 [1926].

<sup>6</sup>) B. **60**, 359 [1927].

<sup>7</sup>) Ztschr. physiol. Chem. **167**, 202 [1927].

<sup>8</sup>) W. Graßmann, a. a. O., S. 206.

<sup>9</sup>) Ztschr. physiol. Chem. (im Druck).

der tryptischen und der polypeptid-spaltenden Komponente nicht ohne besondere Hilfsannahmen zu vereinigen sind“. Neuere Ergebnisse machen es uns überzeugend, daß man die Wirkung auf die beiden Klassen von Substraten scharf zu unterscheiden hat. Vor kurzem<sup>10)</sup> ist über ein Verfahren zur Gewinnung dipeptidase-freier und ziemlich weitgehend gereinigter Trockenpräparate der Protease und der Polypeptidase berichtet worden, dessen wesentliche Schritte in der kurzen Autolyse der Hefe bei alkalischer Reaktion, der Abscheidung des Enzyms durch Adsorption an säure-fällbare Proteinbestandteile des Hefe-Auszuges, kurzer und energischer Selbstverdauung unter Dialyse und Fällung mit Aceton bestehen. Geringfügige und in ihrer Bedeutung noch nicht völlig geklärte Abweichungen von dem erprobten Arbeitsverfahren, z. B. längere Dauer der Dialyse und energischere Einwirkung des Acetons, führen nicht selten zu Präparaten, die bei normalem tryptischem Leistungsvermögen in ihrer Polypeptidase-Wirksamkeit stark geschädigt erscheinen. Unter zahlreichen Trockenpräparaten der beschriebenen Art fand sich — in einer für die Durchführung der unten angeführten Versuche mehr als ausreichenden Menge — eines, in dem wir auch bei langer Versuchszeit und mit großen Enzym-Mengen keine Polypeptidase mehr nachzuweisen vermögen.

So spalten 0.4 mg eines normalen, gut gelungenen Polypeptidase-Trockenpräparates 49 mg Leucyl-glycyl-glycin in 1 Stde. zu 62 %; von dem erwähnten polypeptidase-freien Präparat dagegen bewirkten 4 mg in 54 Stdn. unter denselben Bedingungen keine sicher meßbare Hydrolyse. Dabei war die proteolytische Wirksamkeit des zweiten Präparates eher ein wenig höher: 2.8 mg ergaben nämlich unter den Bedingungen der Hefe-Trypsin-Bestimmung einen Aciditäts-Zuwachs von 0.64 ccm  $n/5$ -KOH im Falle des zweiten, von 0.50 ccm im Falle des ersten Präparates.

Dieser Befund, der durch die Ausarbeitung sicher reproduzierbarer Verfahren zur Gewinnung polypeptidase-freier Protease-Präparate und umgekehrt durch Versuche zur Darstellung der protease-freien Hefe-Polypeptidase noch zu ergänzen sein wird, stellt das polypeptid-spaltende Enzym als dritten Bestandteil des Gemisches neben das protein-spaltende und das dipeptid-spaltende. Für das protein-spaltende Enzym der Hefe sind synthetische Substrate gegenwärtig nicht mit Sicherheit bekannt. Die Präparate der Hefe-Protease sind, ebenso wie diejenigen des Papains, unwirksam gegen acylierte Dipeptide vom Typus des Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosins<sup>11)</sup>, die nach den letzten Befunden von Waldschmidt-Leitz und Mitarbeitern<sup>12)</sup> zu den Substraten des Pankreas-Trypsins zu zählen sind. Die Wirkungen polypeptidase-haltiger Präparate der Hefe-Protease gegenüber einer Reihe untersuchter Tri- bis Oktapeptide sind ausschließlich auf ihren Gehalt an Polypeptidase, nicht auf die Protease, zurückzuführen. Dasselbe gilt hinsichtlich der Spaltung der untersuchten Peptid- und Aminosäure-Derivate. Es erscheint uns nicht sehr wahrscheinlich, daß die Abgrenzung zwischen den Spezifitäts-Bereichen der Hefe-Polypeptidase und der Protease durch eine bestimmte Anzahl der Aminosäure-Bausteine gegeben sein wird; eher wird man Beziehungen zu bestimmten Aminosäure-Typen, etwa zu den Dicarbonsäuren oder den Diamino-säuren, vermuten können, deren Polypeptide hinsichtlich ihrer enzymatischen Angreifbarkeit noch nicht ausreichend untersucht worden sind.

<sup>10)</sup> W. Graßmann und H. Dyckerhoff, a. a. O.

<sup>11)</sup> W. Graßmann und H. Dyckerhoff, a. a. O.

<sup>12)</sup> B. 61, 299 [1928].

Hinsichtlich der Abgrenzung des Spezifitäts-Bereiches zwischen Dipeptidase und Polypeptidase hat sich ein spezifischer Einfluß bestimmter Amino-säure-Bausteine bisher nicht auffinden lassen. Neue Versuche, über deren qualitatives Ergebnis die Tabelle 1 berichtet, bestätigen und erweitern die bisherigen Erfahrungen an einigen Beispielen, die neben höheren Polypeptiden einige Dipeptide des Serins, Tyrosins und der Glutaminsäure betreffen. In allen Fällen erweisen sich die Dipeptide ausschließlich als Substrate der Dipeptidase, während höhere Peptide ausnahmslos von der Polypeptidase gespalten werden.

Trotzdem läßt sich leicht der Nachweis führen, daß nicht eigentlich die Anzahl der Amino-säure-Bausteine, die „Größe“ des Peptid-Moleküls, für die spezifische Angreifbarkeit einer bestimmten Peptid-Bindung durch Dipeptidase oder Polypeptidase maßgebend ist. H. v. Euler und K. Josephson<sup>13)</sup> haben als erste eine Hypothese ausgesprochen, wonach der Angriff der Peptidasen vom Typus des Darm-Erepsins durch die primäre Anlagerung des Enzyms an die freie Aminogruppe des Substrates zustande kommen soll. Eine Anzahl scheinbar entgegenstehender Befunde der Literatur, auf die Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter<sup>14)</sup> hingewiesen haben, ist inzwischen, wie aus einer gleichzeitig erscheinenden Mitteilung von E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein<sup>15)</sup> hervorgeht, in anderem Sinne aufgeklärt worden. Der Übertragung einer solchen Auffassung auf den Fall der Hefe-Peptidase steht ein Befund von Waldschmidt-Leitz, Grassmann und Schäffner (a. a. O.) entgegen, wonach Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin durch Hefe-Dipeptidase zwar langsam, aber deutlich zerlegt wird. Dieser Befund ist vereinzelt geblieben. In einer gemeinsam mit E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein durchgeführten Versuchsserie ist gegenüber einer größeren Anzahl anders acylierter Dipeptide keine sicher nachweisbare Wirkung der Hefe-Dipeptidase gefunden worden.

Tabelle 1.

## Spezifität der Hefe-Peptidasen.

(Angaben bedeuten: + = positive Hydrolyse, — = keine nachweisbare Hydrolyse, o = nicht untersucht.)

	Di-peptidase	Poly-peptidase	Protease
a) Dipeptide:			
Glycyl-glycin .....	+ <sup>16)</sup>	— <sup>16)</sup>	— <sup>16)</sup>
Glycyl-leucin .....	+ <sup>16)</sup>	— <sup>16)</sup>	— <sup>16)</sup>
Alanyl-glycin .....	+ <sup>16)</sup>	— <sup>16)</sup>	— <sup>16)</sup>
Leucyl-glycin .....	+ <sup>16)</sup>	— <sup>16)</sup>	— <sup>16)</sup>
Glycyl-tyrosin .....	o	—	—
Alanyl-tyrosin .....	+	o	o
Alanyl-serin .....	+	—	—
<i>l</i> -Leucyl- <i>d</i> -glutaminsäure .....	+	—	—
Alanyl-[ $\beta$ -amino-buttersäure] .....	—	—	—
Glycyl-[ $\epsilon$ -amino-capronsäure] .....	—	—	—

<sup>13)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926], **162**, 85 [1926], **166**, 294 [1927]; B. **60**, 1341 [1927]. <sup>14)</sup> B. **60**, 359 [1927]. <sup>15)</sup> B. **61**, 640 [1928].

<sup>16)</sup> vergl. W. Graßmann, Ztschr. physiol. Chem. **167**, 202 [1927], u. zw. S. 210 und 212.

Tabelle I (Fortsetzung).

	Di-peptidase	Poly-peptidase	Protease
b) Tripeptide:			
Diglycyl-glycin . . . . .	— <sup>16)</sup>	+ <sup>16)</sup>	—
<i>d, l</i> -Alanyl-glycyl-glycin . . . . .	— <sup>16)</sup>	+ <sup>16)</sup>	—
<i>d, l</i> -Leucyl-glycyl-glycin . . . . .	— <sup>16)</sup>	+ <sup>16)</sup>	—
Diglycyl- <i>l</i> -leucin . . . . .	o	+ <sup>17)</sup>	o
Glycyl- <i>d, l</i> -leucyl-glycin . . . . .	o	+ <sup>17)</sup>	o
<i>l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -leucin . . . . .	o	+	—
Glycyl- <i>d</i> -alanyl-glycin . . . . .	o	+	—
Glycyl-tyrosyl-glycin . . . . .	o	o	—
c) höhere Polypeptide:			
Triglycyl-glycin . . . . .	—	+	—
<i>d, l</i> -Alanyl-diglycyl-glycin . . . . .	—	+	—
<i>l</i> -Leucyl-diglycyl-glycin . . . . .	— <sup>16)</sup>	+ <sup>16)</sup>	—
<i>l</i> -Leucyl-triglycyl- <i>l</i> -leucin . . . . .	—	+	—
Leucyl-heptaglycin . . . . .	o	+	—
d) Peptid-ester (Peptid-Bindung):			
Glycyl-glycin-ester . . . . .	nicht unter-suchbar	+	—
Leucyl-glycin-ester . . . . .	„	+	—
Glycyl- <i>d, l</i> -leucin-ester . . . . .	„	+	o
Glycyl- <i>d, l</i> -alanin-ester . . . . .	„	+	—
Leucyl-glycyl-glycin-ester . . . . .	—	+	—
Diglycyl-glycin-ester . . . . .	—	+	—
e) Peptid- und Amino-säure-amide:			
Glycyl-leucin-amid . . . . .	—	+	—
decarboxylierte Dipeptide, z. B. Glycyl-decarboxy-leucin . . . . .	— <sup>18)</sup>	+	—
Glycin-amid . . . . .	— <sup>18)</sup>	+	—
<i>d, l</i> -Leucin-amid . . . . .	— <sup>18)</sup>	+	—
f) acylierte Peptide:			
Benzoyl-glycyl-glycin . . . . .	—	— <sup>19)</sup>	— <sup>19)</sup>
Glycyl-glycin-carbonsäure . . . . .	—	o	o
Carbäthoxy-glycyl- <i>d, l</i> -leucin . . . . .	—	o	o
Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin . . . . .	±	o	o
Naphthalinsulfonyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin . . . . .	—	— <sup>19)</sup>	— <sup>19)</sup>
Benzoyl-diglycyl-glycin . . . . .	—	— <sup>19)</sup>	— <sup>19)</sup>

Für den Angriff der Hefe-Dipeptidase ist aber, anders als im Falle des Darm-Erepsins, auch die gleichzeitige Nachbarschaft einer freien Carboxylgruppe in der für die normalen Dipeptide charakteristischen Position zur Peptid-Bindung Voraussetzung. Es sind vier Klassen von Peptid-Derivaten, an denen dies anschaulich gemacht werden kann: die Ester der Dipeptide, die Amide der Dipeptide, zu denen auch die Tripeptide und die höheren

<sup>17)</sup> vergl. W. Graßmann und H. Dyckerhoff, Ztschr. physiol. Chem. (im Druck).

<sup>18)</sup> vergl. E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und A. Schöffner, B. 60, 359 [1927].

<sup>19)</sup> vergl. W. Graßmann und H. Dyckerhoff, a. a. O.

Polypeptide zu zählen sind, die decarboxylierten Dipeptide, aus denen durch Entalkylierung die gewöhnlichen Amino-säure-amide hervorgehen, und schließlich die Dipeptide vom Typus der Glycyl- $[\beta$ -aminobuttersäure], in denen die Carboxylgruppe zwar erhalten, aber hinsichtlich ihrer Stellung zur Peptid-Bindung verändert ist. Die bisher von uns geprüften Dipeptid-ester finden wir beim Wirkungs-Optimum der Dipeptidase so wenig beständig, daß sie für die Untersuchung ausscheiden. Dagegen erweisen sich die untersuchten Vertreter der drei anderen Klassen gegenüber der proteolytisch einheitlichen Hefe-Dipeptidase ausnahmslos als resistent, während vom Darm-Frepsin sowohl die decarboxylierten als auch die amidierten Dipeptide (einschließlich der höheren Polypeptide) rasch zerlegt werden.

Auch der Angriff der Hefe-Polypeptidase scheint durch die Anwesenheit einer freien Aminogruppe im Substrat vermittelt zu werden. Wie wir in der voranstehenden Abhandlung dieser Reihe an einer Anzahl von Beispielen durch Isolierung der Spaltstücke nachgewiesen haben, erfolgt die Spaltung der Tri- und Tetrapeptide durch das Enzym immer und ausschließlich in der Weise, daß die dem Amino-Ende der Peptid-Kette benachbarte Peptid-Bindung der Hydrolyse anheimfällt. Übereinstimmend damit konnten wir bei einem acylierten Tripeptid, dem Benzoyl-diglycylglycin, keine Spaltung durch Polypeptidase beobachten.

Bei der Untersuchung der Angriffsweise der Hefe-Polypeptidase ist bisher niemals, weder in den älteren Untersuchungen von E. Abderhalden und Mitarbeitern<sup>20)</sup>, noch in unseren eigenen, der Fall beschrieben worden, daß der Angriff des Enzyms auf ein Polypeptid an der dem Carboxyl-Ende benachbarten Peptid-Bindung eingesetzt hätte. Es konnte also erwartet werden, daß die Anwesenheit einer freien Carboxylgruppe für den Angriff des Enzyms nicht erforderlich sein würde. In der Tat haben schon H. v. Euler und K. Josephson (a. a. O.) gezeigt, daß rohe Hefe-Auszüge — also Mischungen der beiden Hefe-Peptidasen — den Äthylester des Triglycyl-glycins, die „Biuretbase“ von Curtius, zu spalten vermögen. Dieser Befund ist indessen aus dem Grunde nicht überzeugend, weil alle Präparate der Hefe-Polypeptidase, die wir bisher untersuchen konnten, auch gegenüber einfachen Amino-säure-estern — nicht dagegen gegenüber niederen Fettsäure-estern oder Fetten — ein recht deutliches Spaltungsvermögen aufweisen. Die Angabe von Euler und Josephson<sup>21)</sup> ist indessen zu bestätigen. Durch vergleichende Bestimmung des Zuwachses an Carboxyl- und an Aminogruppen läßt sich leicht zeigen, daß die Hydrolyse von Tripeptid-estern so gut wie ausschließlich an der Peptid-Bindung erfolgt, und daß erst zu Ende der Reaktion die Verseifung der Estergruppe einen beträchtlicheren Umfang annimmt.

Die Bedeutung, die der freien Carboxylgruppe für den enzymatischen Angriff zukommt, ist indessen mit dieser Feststellung nicht erschöpft. Überraschenderweise findet man nämlich auch die Ester der Dipeptide spaltbar für die Hefe-Polypeptidase. Die Hydrolyse dieser Substrate erfolgt nicht langsamer als diejenige ähnlich gebauter Tripeptide und betrifft vorwiegend — zu Beginn der Reaktion so gut wie ausschließlich — die Peptid-Bindung.

<sup>20)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **54**, 363 [1907/08], **55**, 416 [1908], **57**, 342 [1908], **62**, 145 [1909], **66**, 277 [1910], **81**, 1 [1912].

<sup>21)</sup> B. **60**, 1341 [1927].

Dasselbe gilt von den Dipeptid-amiden, die durch unsere Polypeptidase-Präparate außerordentlich rasch und, wie sich leicht zeigen läßt, gleichfalls primär an der Peptid-Bindung, gespalten werden, während sie gegenüber der Dipeptidase resistent sind.

Es gibt also drei, die Carboxylgruppe betreffende Veränderungen eines Dipeptid-Moleküls, die das Dipeptid aus einem Substrat der Dipeptidase in ein solches der Polypeptidase umwandeln: die Veresterung, die Amidierung und die Verlängerung der Peptid-Kette an der Carboxylgruppe, d. h. die Überführung in das Tripeptid. Diese Feststellung macht uns den Satz überzeugend: Die Nachbarstellung einer freien Carboxylgruppe zur Peptid-Bindung verhindert den Angriff der Polypeptidase.

Diese Auffassung wird weiter gestützt durch den Befund, daß auch die decarboxylierten Dipeptide und die noch um einen Alkylrest ärmeren einfachen Amino-säure-amide von allen unseren Polypeptidase-Präparaten — nicht dagegen von der Hefe-Dipeptidase<sup>22)</sup> und der polypeptidase-freien Hefe-Protease — zum Teil mit sehr beträchtlicher Geschwindigkeit angegriffen werden. Es scheint also, als ob Glycin-amid und Leucin-amid als die einfachsten Substrate der Hefe-„Polypeptidase“ zu betrachten seien.

Die über die Spezifität der beiden Hefe-Peptidasen bisher vorliegenden Befunde lassen sich, wie es scheint, in das folgende einfache Schema einordnen, dem man versuchsweise auch die Spezifitäts-Befunde am Darm-Erepsin angliedern kann:

	Nachbarstellung einer freien NH <sub>2</sub> -Gruppe	COOH-Gruppe
Hefe-Dipeptidase . . . . .	nötig	nötig
Hefe-Polypeptidase . . . . .	nötig	hindert
Darm-Erepsin . . . . .	nötig	entbehrlich und gleichgültig

Unsere Untersuchung hat zu dem Ergebnis geführt, daß eine Reihe derjenigen Wirkungen des Darm-Erepsins, die bei der Hefe-Dipeptidase vermißt werden, so die Spaltung der Polypeptide und ihrer Ester, der decarboxylierten Peptide und der Amino-säure- und Peptid-amide, im Falle der Hefe-Enzyme von der Polypeptidase übernommen werden. Damit erklärt es sich zwanglos, daß H. v. Euler und K. Josephson<sup>23)</sup>, die ihre Versuche mit Gemischen der beiden Hefe-Peptidasen durchgeführt haben, einen Unterschied zwischen Hefe- und Darm-Peptidase nicht aufzufinden vermochten. Es ist denkbar, daß die beiden Enzym-Individuen der Hefe, zwischen denen die Funktionen des Darm-Erepsins aufgeteilt erscheinen, gemäß dem angeführten Schema sowohl untereinander wie auch vom Darm-Erepsin verschieden sind. Aber die experimentellen Befunde wären auch mit der Annahme vereinbar, daß in dem trypsin-freien Darm-Erepsin ein Gemisch aus zwei Komponenten von der Art der Hefe-Peptidasen enthalten ist, das — ähnlich wie das Gemisch der Hefe-Polypeptidase und der Hefe-

<sup>22)</sup> Die geringfügige Spaltung von *d,l*-Leucin-amid, über die Waldschmidt-Leitz, Graßmann und Schöffner (a. a. O.) früher berichtet haben, beruht ohne Zweifel auf einer Verunreinigung der benützten Enzym-Materialien durch geringe Beimengungen an Polypeptidase, die sich, wie inzwischen festgestellt worden ist, aus den Dipeptidase-Lösungen weit schwerer als die Protease vollständig entfernen lassen.

<sup>23)</sup> B. 60, 1341 [1927].

Protease — bei der Adsorption an Tonerde nicht aufgeteilt wird. Zu dieser Frage scheint uns gegenwärtig noch kein entscheidendes experimentelles Material vorzuliegen.

### Beschreibung der Versuche.

#### 1. Das Enzym-Material.

Die in dieser Arbeit benutzten Präparate der Hefe-Dipeptidase waren Enzym-Lösungen, die nach dem Verfahren der 8. Abhandlung<sup>24)</sup> von Protease und Polypeptidase befreit worden waren. Durch sehr häufig wiederholte Adsorption an kleine Mengen von Tonerde C $\gamma$  ist es uns gelungen, die Lösungen von jeder nachweisbaren Beimengung an Polypeptidase zu befreien.

Zu den Versuchen mit Protease und Polypeptidase kamen ausschließlich Trockenpräparate zur Anwendung, die von Dipeptidase befreit und ziemlich weitgehend gereinigt worden waren:

Protease- und Polypeptidase-Präparat A: Das Präparat war nach dem in der 10. Abhandlung<sup>25)</sup> beschriebenen Verfahren der Autolyse bei alkalischer Reaktion in dipeptidase-freiem Zustande gewonnen und durch Säure-Fällung und 20-stdg. Dialyse gereinigt worden. Die Fällung mit Aceton erfolgte wie früher bei etwa  $-10^{\circ}$ , jedoch in erheblich größerer Verdünnung, wobei zur Erzielung einer zentrifugierbaren Abscheidung ein Zusatz von etwas Essigsäure erforderlich war.

0.4 mg des Präparates spalten 49 mg *d,l*-Leucyl-glycyl-glycin in 1 Stde. ( $m/_{30}$ -Phosphat,  $p_{\text{H}} = 7.0$ ; Vol. = 2 ccm;  $t = 40^{\circ}$ ) zu 62%; (Aciditäts-Zuwachs 1.23 ccm  $n/_{20}$ -KOH). — 2.8 mg spalten unter den Bedingungen der Hefe-Trypsin-Bestimmung ( $p_{\text{H}} = 5.0$ ,  $m/_{32}$ -Dinatriumcitrat;  $40^{\circ}$ ) 0.60 g Gelatine in 24 Stdn., entsprechend einem Aciditäts-Zuwachs von 0.50 ccm  $n/_{5}$ -KOH.

Protease- und Polypeptidase-Präparat B: Das Präparat war durch 2-malige Adsorption an Tonerde C $\gamma$  und Elution mit Diammoniumphosphat bzw. Ammoniak von Dipeptidase praktisch frei erhalten und durch Abdunsten bei Zimmer-Temperatur im Faust-Heimischen Apparat in trockne Form gebracht worden.

0.8 mg spalten 49 mg *d,l*-Leucyl-glycyl-glycin in 1 Stde. zu 72% (Aciditäts-Zuwachs 1.44 ccm  $n/_{20}$ -KOH). — 4 mg spalten 0.60 g Gelatine in 24 Stdn., entsprechend einem Aciditäts-Zuwachs von 0.42 ccm  $n/_{5}$ -KOH. — 8 mg ergeben unter den Bedingungen der Dipeptidase-Bestimmung in 6 $\frac{1}{2}$  Stdn. einen Aciditäts-Zuwachs von 0.06 ccm  $n/_{5}$ -KOH.

Protease-Präparat C, polypeptidase-frei: Das Präparat war ähnlich wie A gewonnen, jedoch durch Dialyse von 4-tägiger Dauer und durch Aceton-Fällung bei Zimmer-Temperatur gereinigt.

2.8 mg spalten 0.6 g Gelatine unter den üblichen Bedingungen, entsprechend einem Aciditäts-Zuwachs von 0.70 (wiederholt 0.70; 10 Monate später wiederholt 0.64) ccm  $n/_{5}$ -KOH. — 4 mg spalten 49 mg *d,l*-Leucyl-glycyl-glycin a) in 22 Stdn., b) in 54 Stdn., entsprechend einem Aciditäts-Zuwachs von a) 0.00 (wiederholt  $-0.01$ ), b) 0.02 ccm  $n/_{20}$ -KOH.

#### 2. Versuche mit Peptiden.

Für die Versuche dieser Arbeit stand uns unter anderem eine Anzahl von Peptid-Präparaten aus der Sammlung E. Fischers zur Verfügung, für deren Überlassung wir Hrn. Dr. Hermann O. L. Fischer, Berlin, sowie auch Hrn. Prof. Dr. Waldschmidt-Leitz zu großem Danke verpflichtet sind.

<sup>24)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **167**, 188 [1927], u. zw. S. 198.

<sup>25)</sup> Ztschr. physiol. Chem. (im Druck).



Tabelle 2.

Einwirkung von polypeptidase-haltigen und polypeptidase-freien Präparaten der Hefe-Protease auf Peptide.

(In der Titrationsprobe von 2 ccm sind enthalten: 1.2 mg Trockenpräparat A bzw. C (0.07 bzw. 0.10 Hefe-Trypsin-Einheiten enthaltend), 0.16 ccm  $m/3$ -Phosphat  $p_H = 7.0$ ; 2 Stdn. bei 40°.)

Substrat	angew. Milli- mol. <sup>26)</sup>	Präparat A (polypeptidase- haltig) Hydrolyse		Präparat C (polypeptidase- frei) Hydrolyse	
		ccm $n/20$ - KOH	% <sup>27)</sup>	ccm $n/20$ - KOH	%
Glycyl- <i>l</i> -tyrosin .....	0.10	0.00	0	—	—
<i>d, l</i> -Alanyl-serin .....	0.10	—0.01	0	—	—
<i>l</i> -Leucyl- <i>d</i> -glutaminsäure .....	0.10	—0.03	0	—	—
[ <i>d, l</i> -Phenyl-alanyl]- <i>d</i> -glutaminsäure ..	0.10	—0.02	0	—	—
<i>d</i> -Alanyl-[ $\beta$ -amino- <i>n</i> -buttersäure] ....	0.10	—0.01	0	—	—
Glycyl-[ $\epsilon$ -amino-capronsäure] .....	0.10	—0.01	0	—	—
Glycyl- <i>l</i> -tyrosyl-glycin .....	0.015	— —	—	0.00	0
Glycyl- <i>d</i> -alanyl-glycin .....	0.10	0.72	36	—0.02	0
<i>d, l</i> -Alanyl-glycyl-glycin .....	0.10	+ <sup>28)</sup>	+ <sup>28)</sup>	—0.02	0
<i>l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -leucin .....	0.10	1.23	61	— —	—
Diglycyl-glycin .....	0.10	+ <sup>28)</sup>	+ <sup>28)</sup>	—0.01	0
<i>d, l</i> -Alanyl-diglycyl-glycin .....	0.10	2.13	106	0.00	0
Triglycyl-glycin .....	0.10	+ <sup>28)</sup>	+ <sup>28)</sup>	0.02	0
<i>l</i> -Leucyl-diglycyl-glycin .....	0.10	+ <sup>28)</sup>	+ <sup>28)</sup>	0.01	0
<i>l</i> -Leucyl-triglycyl- <i>l</i> -leucin .....	0.05	1.14	114	0.01	0
<i>d, l</i> -Leucyl-heptaglycin .....	0.035	0.13	19	—	—

Tabelle 3.

Einwirkung von Hefe-Dipeptidase auf Peptide.

(0.10 Millimol Peptid; 0.2 Dipeptidase-Einheiten; Vol. = 2 ccm;  $p_H = 7.8$ , eingestellt mit  $n/25$ -Ammoniumchlorid-Ammoniak-Mischung. Spaltung gemessen in ccm  $n/20$ -KOH; der Abspaltung einer Carboxylgruppe entspricht ein Aciditäts-Zuwachs von 2.00 ccm.)

Substrat	Spaltung nach	
	3 Stdn.	24 Stdn.
<i>d, l</i> -Alanyl-serin .....	0.65	—
<i>d</i> -Alanyl- <i>l</i> -tyrosin .....	1.28	—
<i>l</i> -Leucyl- <i>d</i> -glutaminsäure .....	1.80	—
<i>d, l</i> -Alanyl-[ $\beta$ -amino- <i>n</i> -buttersäure] ...	0.00	—
Glycyl-[ $\epsilon$ -amino-capronsäure] .....	—0.01	—
Triglycyl-glycin .....	0.00	0.01
<i>d, l</i> -Alanyl-diglycyl-glycin .....	—0.01	0.00

<sup>26)</sup> Bei Racematen bezieht sich die Angabe auf die anwesende Menge des spaltbaren Peptids der *l*-Reihe.

<sup>27)</sup> Bezogen auf die Hydrolyse einer Peptid-Bindung pro Mol.

<sup>28)</sup> vergl. 9. Abhandlung dieser Reihe, S. 212.

<sup>29)</sup> vergl. 10. Abhandlung dieser Reihe.

## 3. Versuche mit Amino-säure- und Peptid-estern.

## a) Beständigkeit von Amino-säure- und Peptid-estern in wäßriger Lösung.

In wäßrigen, insbesondere schwach alkalischen Lösungen unterliegen die Ester der Amino-säuren und der Peptide zwei Arten von Umwandlungen: der Verseifung der Estergruppe und der Kondensation zwischen Ester- und Aminogruppe, die in erster Linie zum Übergang in das Diketo-piperazin führt. Die für Peptid-ester mögliche dritte Reaktion, die Hydrolyse der Peptid-Bindung, kommt bei den Aciditäts-Bedingungen und Reaktionszeiten unserer Versuche nicht wesentlich in Frage.

Bei der Titration in alkoholischer Lösung wird der Übergang zum Diketo-piperazin nicht erfaßt. Weder die freien Amino-säure- und Peptid-ester, noch die daraus gebildeten Peptid-anhydride verbrauchen in alkoholischer Lösung meßbare Mengen von Alkali. Um ein vollständiges Bild von der Beständigkeit der Amino-säure- und Peptid-ester zu gewinnen, ist es daher notwendig, die Bestimmung der durch Verseifung entstehenden freien Carboxylgruppen zu ergänzen durch ein zweites Verfahren, das die verschwindenden basischen Gruppen erfaßt. Für diesen Zweck steht zunächst die gasometrische Methode von van Slyke zur Verfügung. Da aber die Amino-säure-ester keine amphoterer Substanzen, sondern starke Basen sind, genügt es in diesem Falle, den vorhandenen Amino-säure-ester, ähnlich wie etwa Ammoniak, durch Titration mit Säure in wäßriger Lösung unter Anwendung eines im schwach sauren Gebiet umschlagenden Indicators zu bestimmen. Für den vorliegenden Zweck, wo es sich teilweise um die Verfolgung sehr rasch verlaufender Reaktionen handelte, war ein solches Verfahren vorzuziehen. Als Indicator diente mit Rücksicht auf die Anwesenheit von Phosphat Brom-phenol-Blau. Anwesende Amino-säuren stören die Titration nicht, Peptide nicht wesentlich, da sie keine in Betracht kommenden Mengen von Säure verbrauchen, wenn man die Titration beim ersten erkennbaren Umschlag des Indicators beendet (vergl. dazu auch L. J. Harris<sup>30)</sup>).

Aus den Versuchen der Tabellen 4 und 5, in denen einerseits die verschwundene Ester-Menge (Abnahme des Titers gegen Brom-phenol-Blau), andererseits der durch Titration in alkohol. Lösung ermittelte Zuwachs freier Carboxylgruppen verzeichnet ist, geht hervor, daß sowohl der Glykokoll-äthylester als auch der Glycyl-glycin-äthylester in dem Bereich von etwa  $p_H = 5$  bis etwa  $p_H = 6.4$  praktisch beständig ist. Mit steigender Hydroxyl-Ionen-Konzentration beobachtet man im Falle des Glykokoll-esters in zunehmendem Maße das Verschwinden des basischen Esters, das unter den eingehaltenen Konzentrations-Bedingungen zum Teil auf Verseifung und zum Teil auf die Anhydrid-Bildung entfällt. Wesentlich anders ist das Verhalten des Dipeptid-esters. Die Zerstörung des Esters ist in außerordentlich hohem Maße von der Hydroxyl-Ionen-Konzentration abhängig: Während man bei  $p_H = 7$  innerhalb einer Stunde 12% der vorhandenen Ester-Menge umgesetzt findet, genügen bei  $p_H = 9.4$  schon wenige Minuten, um mehr als die Hälfte des anwesenden Dipeptid-esters in Reaktion zu bringen. Die Reaktion verläuft in scharfem Gegensatz zu den Verhältnissen beim Glykokoll-ester praktisch ohne Bildung freier Carboxylgruppen, führt also so gut wie ausschließlich zum Peptid-anhydrid. Die Beständigkeit eines Tripeptid-esters, Leucyl-glycyl-glycin-ester, finden wir erheblich größer: nach 1 Stde. waren bei  $p_H = 8.3$  erst 4%, bei

<sup>30)</sup> Proceed. Roy. Soc. London B 95, 500 [1923].

$p_{\text{H}} = 9.2$  12% des Esters verschwunden, und zwar ausschließlich unter Verseifung.

Tabelle 4. Beständigkeit des Glykokoll-esters in wäßriger Lösung. (Die Titrationsprobe von 5 ccm enthielt 34.7 mg Glykokoll-äthylester-Chlorhydrat (= 0.25 Millimol) und 1 ccm  $m/3$ -Phosphat-Puffer. Bestimmung der verschwundenen Ester-Menge durch Titration in wäßriger Lösung mit  $n/20$ -HCl (Indicator Brom-phenol-Blau); Bestimmung der gebildeten Carboxyle durch Titration in alkoholischer Lösung mit  $n/20$ -KOH (Indicator Thymol-phthalein).)

Vers.-Nr.		Reaktionszeit in Stdn.				
		1	2	4	24	48
1	$p_{\text{H}}$ .....	5.3	—	5.1	—	—
	Ester verschwunden % .....	0	—	0	—	2
	Carboxyl gebildet % .....	0	—	0	—	1
2	$p_{\text{H}}$ .....	6.4	6.4	6.4	—	—
	Carboxyl gebildet % .....	—	0	0	1	—
3	$p_{\text{H}}$ .....	6.9	6.9	6.9	—	6.3
	Ester verschwunden % .....	5	11	18	58	69
	Carboxyl gebildet % .....	2	4	10	—	61
4	$p_{\text{H}}$ .....	8.0	8.0	8.0	—	7.5
	Ester verschwunden % .....	16	26	50	—	97
	Carboxyl gebildet % .....	7	—	35	—	75
5	$p_{\text{H}}$ .....	9.3	9.3	9.2	9.1	—
	Ester verschwunden % .....	41	64	84	96	—
	Carboxyl gebildet % .....	47	70	92	102	—

Tabelle 5. Verhalten von Glycyl-glycin-ester in wäßriger Lösung. (Die Titrationsprobe von 5 ccm enthält 0.25 Millimol Ester-Chlorhydrat, mit Ammoniak auf das gewünschte  $p_{\text{H}}$  gebracht neben 1 ccm  $m/3$ -Phosphat. Titration wie in Tabelle 4.)

Vers.-Nr.		Reaktionszeit							
		Min.				Stdn.			
		3	5	10	20	1	2	4	24
1	$p_{\text{H}}$ .....	5.3	—	—	—	5.3	—	5.3	5.3
	Ester verschwunden % .....	—	—	—	—	0	—	0	0
	Carboxyl gebildet % .....	—	—	—	—	0	—	0	1
2	$p_{\text{H}}$ .....	6.4	—	—	—	—	6.4	6.3	6.1
	Ester verschwunden % .....	—	—	—	—	—	2	4	12
3	$p_{\text{H}}$ .....	7.0	—	—	—	6.9	6.8	6.6	6.3
	Ester verschwunden % .....	—	—	—	—	12	20	28	43
	Carboxyl gebildet % .....	—	—	—	—	1	—	1	2
4	$p_{\text{H}}$ .....	—	6.7	—	7.4	—	7.2	—	—
	Ester verschwunden % .....	—	8	16	28	46	58	—	—
	Carboxyl gebildet % .....	—	—	—	—	1	—	1	—
5	$p_{\text{H}}$ .....	—	8.4	—	—	8.2	—	—	—
	Ester verschwunden % .....	—	38	60	76	93	—	—	—
6	$p_{\text{H}}$ .....	—	9.4	—	9.4	9.3	—	—	—
	Ester verschwunden % .....	52	69	88	91	—	—	—	—
	Carboxyl gebildet % .....	—	—	0	1	—	4	—	46

## b) Spaltungs-Versuche.

Hefe-Autolysate, sowie alle von uns geprüften Präparate der Hefe-Polypeptidase zeigen, wie aus den Beispielen der Tabelle 6 hervorgeht, eine recht deutliche, wenngleich nicht sehr erhebliche, verseifende Wirkung gegenüber Amino-säure-estern. Eine Wirkung auf Methylbutyrat oder auf Olivenöl konnte dagegen in einer Anzahl von Versuchen, für deren Durchführung wir Hrn. Dr. E. Bamann zu großem Danke verpflichtet sind, unter mehrfach geänderten Bedingungen niemals festgestellt werden.

Wir belegen dies an einem Versuch mit Methylbutyrat:

0.179 g Methylbutyrat, 6 mg Trockenpräparat A, 2 ccm  $m/3$ -Phosphat,  $p_{11} = 7.0$  im Volumen von 20 ccm.

Reaktionszeit in Stdn. ....	2	4	24
Spaltung (ccm $n/20$ -KOH) ....	0.02	0.01	0.03

(Der vollständigen Hydrolyse des angewandten Esters hätte ein Zuwachs von 8.8 ccm Lauge entsprochen.)

Die Wirkung auf Amino-säure-ester fehlt in den polypeptidase-freien Präparaten der Hefe-Dipeptidase und der Protease. Man wird unter diesen Umständen die Möglichkeit zu prüfen haben, ob die Spaltung der Amino-säure-ester nicht von der Polypeptidase selbst katalysiert werden kann. Eine solche Annahme, die mit den im theoretischen Teil entwickelten Vorstellungen über die Spezifität des polypeptid-spaltenden Fermentes nicht völlig unvereinbar erscheint, entspricht einer Auffassung, die vor längerer Zeit durch O. Warburg<sup>31)</sup> in Bezug auf die Natur des Leucin-ester spaltenden Enzyms der Pankreasdrüse vertreten, in der späteren Literatur aber verlassen

Tabelle 6.

Einwirkung von Enzym-Präparaten aus Hefe auf Amino-säure-ester.

(Die Titrationsprobe von 2 ccm enthält 0.10 Millimol Ester;  $m/30$ -Phosphat-Mischung;  $10^0$ . Titration mit  $n/20$ -KOH in alkoholischer Lösung; 100 % Spaltung = 2.00 ccm Lauge.)

Enzym	Präparat und Menge	Ester	pH		Spaltung nach Stdn.		
			Be-ginn	Ende	1	2	4
Rohlösung .....	0.8 ccm	Glycin-ester	5.3	5.2	—	0.45	—
Polypeptidase .....	1.2 mg A	„	6.4	6.2	0.15	0.22	0.28
„	1.2 mg A	Alanin-ester	6.4	6.3	0.10	0.17	0.21
„	1.2 mg A	<i>l</i> -Leucin-ester	6.4	5.4	0.28	0.41	0.54
Kontrolle ohne Enzym	—	„	6.4	6.2	—	0.04	0.10
Dipeptidase .....	0.2 Einh.	Glycin-ester	7.0	6.9	0.01	0.04	0.22
Kontrolle ohne Enzym	—	„	6.9	6.9	0.04	0.08	0.20
Dipeptidase .....	0.2 Einh.	<i>l</i> -Leucin-ester	7.0	7.0	0.00	0.09	—
Protease .....	1.2 mg C	Glycin-ester	6.4	6.4	—	0.01	0.00
„	1.2 mg C	<i>l</i> -Leucin-ester	6.3	6.1	—	0.00	0.10

<sup>31)</sup> B. 38, 187 [1905]; Ztschr. physiol. Chem. 48, 205 [1906].

worden ist (vergl. dazu E. Abderhalden<sup>32</sup>), R. Willstätter und F. Memmen<sup>33</sup>).

In den Versuchen der Tabelle 7, die sich auf die enzymatische Angreifbarkeit der Peptid-Bindung in Dipeptid- und Tripeptid-estern beziehen, wurde mit Rücksicht auf die Möglichkeit einer primären Verseifung der Estergruppe die Hydrolyse sowohl durch Bestimmung des Carboxyl-Zuwachses als auch durch Ermittlung der Aminogruppen nach van Slyke verfolgt. Die Hydrolyse entfällt, wenigstens zu Beginn der Reaktion, fast ausschließlich auf die Auflösung von Peptid-Bindungen. Die nach der Methode von van Slyke ermittelten Werte liegen zum Teil sogar deutlich höher als die Carboxyl-Zahlen. Dies beruht auf einer Eigentümlichkeit der Peptide mit endständigem Glycylrest, die bei der van-Slyke-Bestimmung durchwegs etwas zu hohe Werte liefern (vergl. dazu E. Abderhalden und D. D. van Slyke<sup>34</sup>).

Tabelle 7.

Einwirkung von Enzym-Präparaten aus Hefe auf Peptid-ester. (Versuchsbedingungen wie Tabelle 6;  $m/_{15}$ -Phosphat. Die Ergebnisse der van-Slyke-Bestimmungen sind auf  $ccm\ n/_{20}$ -Lösung umgerechnet. Der Auflösung einer Peptid-Bindung pro Mol entspricht ein Zuwachs von 2.00  $ccm$ .)

Ester	Enzym- Präparat und Menge	PH		Zuwachs an	Reaktionszeit (Stdn.)			
		Be- ginn	Ende		1	2	6	24
a) Versuche mit Polypeptidase:								
Glycyl-glycin-ester . . . . .	1.7 mg B	6.4	6.2	COOH	0.16	0.28	0.70	1.64
				NH <sub>2</sub>	—	0.22	0.58	1.28
Glycyl- <i>d,l</i> -alanin-ester . . . . .	1.7 mg A	6.4	6.2	COOH	—	—	1.82	—
				NH <sub>2</sub>	—	—	1.06	—
Glycyl- <i>d,l</i> -leucin-ester . . . . .	1.7 mg A	6.4	6.2	COOH	—	—	2.44	—
				NH <sub>2</sub>	—	—	1.12	—
<i>d,l</i> -Leucyl-glycin-ester . . . . .	1.7 mg A	6.4	—	COOH	1.70	1.97	—	—
				NH <sub>2</sub>	1.80	1.76	—	—
Diglycyl-glycin-ester . . . . .	1.2 mg A	6.2	5.5	COOH	0.83	1.48	3.00	3.70
				NH <sub>2</sub>	1.06	1.62	2.84	3.50
<i>d,l</i> -Leucyl-glycyl-glycin-ester	1.2 mg A	6.4	6.1	COOH	1.97	2.38	3.58	4.85
				NH <sub>2</sub>	2.16	—	—	4.10
b) Versuche mit Protease (polypeptidase-frei):								
Glycyl-glycin-ester . . . . .	1.8 mg C	6.4	6.4	COOH	—	0.01	0.01	0.01
Leucyl-glycin-ester . . . . .	1.2 mg C	6.4	6.4	COOH	0.01	0.00	—	—
Glycyl- <i>d,l</i> -alanin-ester . . . . .	1.8 mg C	6.4	6.4	COOH	—	0.00	0.00	0.03
Diglycyl-glycin-ester . . . . .	1.2 mg C	6.2	6.2	COOH	0.02	—	0.02	—
<i>d,l</i> -Leucyl-glycyl-glycin-ester	1.2 mg C	6.4	6.4	COOH	—	0.06	—	0.05
c) Versuch mit Dipeptidase:								
<i>d,l</i> -Leucyl-glycyl-glycin-ester	0.2 Einh.	7.0	7.0	COOH	0.01	—	—	—

<sup>32</sup>) Lehrbuch d. physiol. Chemie, 5. Aufl., II. Teil, S. 295 [1923]. — E. Abderhalden, H. Sichel und H. Ueda, Fermentforsch. 7, 91 [1923].

<sup>33</sup>) Ztschr. physiol. Chem. 138, 216 [1924], u. zw. S. 222.

<sup>34</sup>) Ztschr. physiol. Chem. 74, 505 [1911].

Auch die Spaltung der Tripeptid-ester erfolgt, entsprechend den bei der Hydrolyse der Tripeptide selbst festgestellten Verhältnissen, stets in der Weise, daß zunächst die am Amino-Ende stehende Amino-säure abgespalten wird. Dies ergibt sich mit Sicherheit daraus, daß die Hydrolyse zur Auflösung der beiden Peptid-Bindungen führt. Denn etwa gebildetes freies Dipeptid würde von dem angewandten dipeptidase-freien Material nicht weiter zerlegt werden.

Zu den Versuchen der Tabelle 7 dienten die Lösungen der kristallisierten Ester-Chlorhydrate, die durch Zusatz von NaOH auf das gewünschte  $p_{\text{H}}$  eingestellt waren. Nur im Falle des Leucyl-glycin-esters waren wir gezwungen, das Ester-Chlorhydrat, das durch wiederholtes Abdampfen im Vakuum vom Überschuß an Alkohol und HCl nach Möglichkeit befreit worden war, in sirupöser Form zu verwenden.

#### 4. Versuche mit Amino-säure- und Peptid-amiden.

Die geprüften einfachen und substituierten Amino-säure- und Peptid-amide erweisen sich ausnahmslos als Substrate der Polypeptidase. Von polypeptidase-freien Präparaten der Dipeptidase<sup>35)</sup> und der Protease wird keines von ihnen gespalten. Die beim *d,l*-Leucin-amid gefundene Endspaltung weist auf asymmetrischen Verlauf der Hydrolyse hin. Die Spaltung des Glycyl-leucin-amids durch Hefe-Polypeptidase führt gemäß dem gefundenen Aciditäts-Zuwachs, ähnlich wie im Falle der Ester, zur Hydrolyse der Peptid-Bindung und der Amid-Bindung.

Tabelle 8.

#### Einwirkung von Enzym-Präparaten aus Hefe auf Amino-säure- und Peptid-amide.

(Die Titrationsprobe von 2 ccm enthält 0.10 Millimol optisch einheitliches bzw. 0.20 Millimol racemisches Peptid.  $p_{\text{H}} = 7.0$ ,  $m/30$ -Phosphat-Puffer. Der Abspaltung einer Carboxylgruppe entspricht ein Aciditäts-Zuwachs von 2.00 ccm  $n/20$ -KOH.)

Amid	Enzym- Präparat und Menge	Spaltung nach Stdn. (ccm $n/20$ -KOH)		
		3	6	24
a) Versuche mit Polypeptidase:				
Glycin-amid, HCl . . . . .	1.2 mg A	0.14	—	0.22
<i>d,l</i> -Leucin-amid, HBr . . . . .	1.2 mg A	1.22	1.59	2.02
Glycyl- <i>d,l</i> -leucin-amid, HCl . . . . .	1.2 mg A	1.63	2.19	3.05
Glycyl-decarboxy-leucin . . . . .	1.2 mg A	0.18	—	—
	3.0 mg B	0.11	0.20	0.28
Diglycyl-[ <i>p</i> -amino-benzoessäure] . . . . .	0.6 mg A	0.04	0.18	0.30
b) Versuche mit polypeptidase-freier Hefe-Protease:				
Glycin-amid, HCl . . . . .	1.2 mg C	0.02	0.02	0.02
<i>d,l</i> -Leucin-amid, HBr . . . . .	1.2 mg C	—0.02	—0.01	0.00
Glycyl- <i>d,l</i> -leucin-amid, HCl . . . . .	1.2 mg C	0.04	—	0.08
Glycyl-decarboxy-leucin . . . . .	1.2 mg C	0.00	0.00	0.02
c) Dipeptidase:				
Glycyl-leucin-amid, HCl . . . . .	0.2 Einh.	0.00	0.00	—

<sup>35)</sup> vergl. E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und A. Schöffner, a. a. O.

5. Verhalten der Hefe-Dipeptidase gegenüber acylierten Peptiden.  
(Nach Versuchen mit F. Waldschmidt-Leitz und W. Klein.)

Trotz der Anwendung großer Enzym-Mengen und langer Spaltungszeiten ergab sich bei keinem der neugeprüften Substrate ein sicher außerhalb der Fehlergrenze gelegener Aciditäts-Zuwachs. Dagegen ist die früher mitgeteilte<sup>35)</sup> Beobachtung zu bestätigen, wonach Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin von Hefe-Dipeptidase-Präparaten, wenngleich sehr langsam, hydrolysiert wird.

Tabelle 9.

Einwirkung der Hefe-Dipeptidase auf acylierte Peptide.

(Die Titrationsprobe von 10 ccm enthält 1 Dip.-Einh.;  $p_H = 7.8$ ; 18 Stdn. bei 30°; Titration mit  $n'_{20}$ -KOH.)

Substrat	angew. g	Spaltung	
		ccm $n'_{20}$ -KOH	%
Benzoyl-glycyl-glycin .....	0.128	0.00	0
Glycyl-glycin-carbonsäure .....	0.1030	0.10	2
Carbäthoxyl-glycyl- <i>d,l</i> -leucin .....	0.0901	0.09	3
Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin .....	0.0839	0.04	3
Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin .....	0.1290	0.23	6
Benzoyl-diglycyl-glycin .....	0.147	0.00	0

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die Förderung unserer Arbeit durch die zur Verfügung gestellten Mittel.

### 105. H. Gall und G. Lehmann: Über Oxydation von Alkalicyaniden durch Permanganat.

[Aus d. Anorgan. Laborat. d. Techn. Hochschule München.]  
(Eingegangen am 13. Juli 1927.)

Nachdem Baudrimont<sup>1)</sup> bei der Oxydation von Cyaniden durch Permanganat sowohl in alkalischem wie saurem Medium eine ganze Reihe von Reaktionsprodukten beobachtet hatte, war es Volhard<sup>2)</sup> gelungen, indirekt Kaliumcyanat als Hauptprodukt der Reaktion festzustellen, in dem das intermediär entstehende Cyanat durch Ammoniumsulfat in Harnstoff übergeführt und in dieser Form isoliert wurde. Auf diesem Wege lassen sich 68% des angewandten Cyanids als Harnstoff gewinnen. Messungen des Permanganat-Verbrauchs bei dieser Oxydation des Cyanids sind aus den Angaben Volhards nicht zu ersehen, weshalb wir zunächst annähernd den Verbrauch an Permanganat bei der Oxydation des Cyanids festgestellt haben. In stark alkalischem Medium entspricht der Permanganat-Verbrauch, bezogen auf die angewandte Menge Cyanid, ungefähr 2 Äquivalenten Sauerstoff. Die Oxydation erfordert jedoch mehrere Stunden und ist mit umfangreichen Nebenreaktionen verknüpft, so daß diese direkte Oxydation in analytischer Hinsicht vollkommen ausscheidet. Wir versuchten deshalb,

<sup>1)</sup> Baudrimont, Compt. rend. Acad. Sciences 89, 1115.

<sup>2)</sup> Volhard, A. 259, 377.