

Der äther-unlösliche Anteil der Kondensationsprodukte besteht aus den von v. Braun und von Ferber beschriebenen höhermolekularen Verbindungen. Ihre Bildung überwiegt vollends bei länger dauerndem oder höherem Erhitzen.

Hrn. Ing. G. C. Eger möchte ich auch an dieser Stelle für seine Assistenz bei der Herstellung der beschriebenen Verbindungen danken.

352. H. v. Euler, Signe Myrbäck und Karl Myrbäck: Über Spezifität bei enzymatischer Dipeptid-Spaltung.

[Aus d. Biochem. Institut d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 18. Juli 1929.)

Vor einiger Zeit konnte an gewissen Bastarden von Gerste eine deutliche Mendel-Spaltung ohne Transgredienz für einen quantitativ festgelegten Enzym-Gehalt, nämlich für den Katalase-Gehalt, nachgewiesen werden¹⁾. Als untersucht werden sollte, ob sich an gleichem oder verwandtem Gersten-Material eine Mendel-Spaltung auch hinsichtlich der Dipeptidase nachweisen läßt, machten wir die Beobachtung, daß sich Extrakte aus einer Reihe von verschiedenen Gersten-Sorten gegenüber Glycyl-glycin fast ganz unwirksam verhielten. Dies war um so auffallender, als der Nachweis, daß ein Glycyl-glycin spaltendes Enzym in keimenden Samen vorkommt, vom einen von uns bereits 1906 geliefert worden war²⁾; an diesem Beispiel war die Kinetik der Spaltung dieses einfachsten Dipeptides überhaupt zum erstenmal studiert worden, allerdings nicht mit keimender Gerste, sondern mit keimenden Lupinen-Samen. Gleichzeitig hatten Abderhalden und Schittenhelm³⁾, ebenfalls mit Enzym aus keimenden Lupinen-Samen, die Spaltung von **aktiven** Leucyl-glycin verfolgt. Aus Lupinen-Samen wird also ein Extrakt erhalten, welcher sowohl Glycyl-glycin als Leucyl-glycin spaltet. Das Gleiche ist, wie sich später ergeben hat, mit Extrakten anderer Samen, wie Erbsen und Raps, und ferner mit Hefen-Extrakt der Fall.

In der Fortsetzung der oben erwähnten Untersuchung⁴⁾ hat der eine von uns sich über die Angreifbarkeit verschiedener Dipeptide folgendermaßen geäußert: „Es scheint mir ein wesentliches Problem, zu entscheiden, ob auch hier der bekannte Vergleich mit dem Schloß, welches nur von seinem spezifischen Schlüssel geöffnet wird, zutrifft, oder ob es hier im wesentlichen Unterschiede in der Geschwindigkeit der Spaltung sind, welche sich beim Angriff der Carbamingruppe (R.CO.NH.R') geltend machen. Schon unter den Dipeptiden ist der Unterschied, mit welcher Erepsin auf dieselben einwirkt, recht erheblich. So habe ich (unter analogen Umständen) folgende Reaktionskonstanten gefunden:

Alanyl-glycin	$10^3 \cdot k$	= 58.4,
Leucyl-glycin	13.1,
Glycyl-glycin	7.0''.

¹⁾ Euler u. Harald Nilsson, Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **10** B, Nr. 6 [1929]; Naturwiss. **17**, 289 [1929].

²⁾ Euler, Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **2**, Nr. 31 [1906].

³⁾ Abderhalden u. Schittenhelm, Ztschr. physiol. Chem. **49**, 26 [1906].

⁴⁾ Euler, Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **2**, Nr. 39 [1907].

Nachdem Waldschmidt-Leitz (1925/26) den außerordentlich wichtigen Nachweis erbracht hatte, daß Peptidase und tryptisches Enzym scharf zu trennen sind⁵⁾, vertrat er die Auffassung, daß Erepsin spezifisch nur auf die Hydrolyse eigentlicher (niedriger) Peptide eingestellt ist: „Als spezifische Substrate zum Nachweis und zur Bestimmung des Erepsins wird man, entgegen vielen in der Literatur empfohlenen Verfahren, nur einfache Peptide, z. B. Di- oder Tripeptide, anwenden können.“ Seither wurde in der Literatur zwischen Dipeptidase und Polypeptidase unterschieden. Eine weitere Spezifität unter den Dipeptidasen wurde nicht in Erwägung gezogen, sondern man nahm an, daß die Dipeptidase verschiedene Dipeptide mit größerer oder geringerer Geschwindigkeit angreift, wobei man im allgemeinen das oben angegebene Geschwindigkeitsverhältnis bestätigt fand. Willstätter und Grassmann⁶⁾ geben z. B. als „Dipeptidase-Einheit“ diejenige Enzym-Menge, die das in 225 mg *d, l*-Leucyl-glycin enthaltene *l*-Peptid bei $p_H = 7.8$ in 1 Stde. bei 40° zur Hälfte spaltet.“

Auch W. Grassmann findet in einer sehr bemerkenswerten Arbeit über Hefen-Dipeptidase, daß Alanyl-glycin etwa doppelt so schnell spaltbar ist als Leucyl-glycin, „und mit erheblichem Abstand folgen Glycyl-glycin und das besonders schwer angreifbare *d, l*-Leucyl-*d, l*-alanin“. „Diese Tatsache, die ein Gegenstück in den Verhältnissen bei den entsprechenden Tripeptiden findet, wird nicht als Argument für die Annahme der Identität des tierischen Erepsins und der Hefen-Dipeptidase auszuwerten sein. Es ist wahrscheinlicher, daß die Festigkeit der Peptid-Bindung selbst für die beobachteten Unterschiede verantwortlich zu machen ist.“

Die neuen eingehenden Untersuchungen von Abderhalden⁸⁾ und Mitarbeitern, von Levene und Mitarbeitern sowie von Northrop und Simms sollen an anderer Stelle näher besprochen werden.

Die minimalen hydrolytischen Spaltungen, welche wir an Glycyl-glycin bei Anwendung von Extrakt aus gekeimter Gerste im Verlauf des Frühjahrs beobachtet haben (Versuche von Frl. D. Runehjelm), schienen um so auffallender, als Mill und Linderström-Lang⁹⁾ durch offenbar einwandfreie Versuche Leucyl-glycin-Spaltung gefunden hatten. Es blieb unter diesen Umständen nur der Schluß übrig, daß die Peptidase des Malzes gegen Glycyl-glycin nur sehr wenig wirksam ist, und daß sich also die Dipeptid-Spaltung des Malzes von derjenigen durch andere Organ-Extrakte hinsichtlich des Verhältnisses der Wirksamkeit auf Glycyl-glycin und Leucyl-glycin wesentlich unterscheidet.

Diese Vermutung hat sich, wie wir vorausschicken wollen, durch unsere Versuche bestätigt. Nach Abschluß dieser Versuche ist uns eine Untersuchung von Linderström-Lang¹⁰⁾ bekannt geworden, aus welcher

⁵⁾ Waldschmidt-Leitz, Ztschr. physiol. Chem. **147**—**151** [1925/26].

⁶⁾ Willstätter u. Grassmann, Ztschr. physiol. Chem. **153**, 250 [1926].

⁷⁾ Wölf. Grassmann, Ztschr. physiol. Chem. **167**, 202 [1927]. — Grassmann u. Dyckerhoff, ebenda, **175**, 18 [1928]; siehe auch Grassmann, Habilitationsschrift, München 1928.

⁸⁾ Abderhalden u. Köppel, Fermentforsch. **9**, 445 [1928]. — Abderhalden u. Rossner, **9**, 497 [1928].

⁹⁾ C. K. Mill und K. Linderström-Lang, Medd. Carlsberg-Lab. **17**, Nr. 10 [1929].

¹⁰⁾ Linderström-Lang, Ztschr. physiol. Chem. **182**, 151 [1929].

der Schluß gezogen wird, daß gewöhnliches Darm-Erepsin aus Darm-Schleimhäuten von Schweinen zwei Dipeptidasen enthält, von denen die eine maximal bei etwa $p_H = 7.3$, und zwar Leucyl-glycin und Glycyl-glycin mit etwa derselben Geschwindigkeit, spaltet, während die andere ihr p_H -Optimum bei etwa 8.1 hat und Leucyl-glycin etwa 20-mal schneller spaltet als Glycyl-glycin. Nach Angabe des genannten Autors „macht die Superposition der Aktivitäts- p_H -Kurven die quantitative Feststellung unsicher, und die Zahlen sind deshalb als vorläufige zu betrachten.“ Wir können deshalb, ohne auf diese Arbeit näher einzugehen, uns auf die Feststellung beschränken, daß unsere mit Leucyl-glycin und Malz-Extrakt gewonnenen Ergebnisse mit den Angaben über Darm-Erepsin von Levene¹¹⁾, Waldschmidt-Leitz und Linderström-Lang durchaus in Übereinstimmung stehen.

Auf die Trennung einer Dipeptidase und Polypeptidase durch Waldschmidt-Leitz, Balls und J. Waldschmidt-Graser¹²⁾ wollen wir hier noch besonders hinweisen.

Aus unseren Versuchen geht also zunächst hervor, daß Extrakt aus gekeimter Gerste Leucyl-glycin rund 15–20-mal so schnell und Alanyl-glycin rund 8-mal so schnell spaltet wie Glycyl-glycin. Dieses Verhältnis ist wesentlich anders als das für andere Extrakte gekeimter Samen und auch für andere tierische Organ-Extrakte gefundene. Man kann natürlich zunächst annehmen, daß spezifische Dipeptidasen existieren, von welchen eine nur oder ganz vorzugsweise Glycyl-glycin angreift. Daß dieses Enzym nicht oder nur in minimaler Menge im Malz-Extrakt vorhanden ist, wäre wohl damit in Zusammenhang zu bringen, daß die Proteine der keimenden Gerste die Glycyl-glycin-Gruppe im Gegensatz zu den Proteinen anderer keimender Samen nicht enthalten. Hierüber sind genauere Untersuchungen nötig und wünschenswert; denn Aufschlüsse über Grad und Ursachen der Spezifität sind besonders geeignet, den Vorgang der Enzym-Bildung aufzuklären, welcher für die enzym-chemische Bearbeitung der Genetik so wichtig ist.

Wir möchten aber hervorheben, daß wir die Existenz spezifischer Dipeptidasen noch nicht für bewiesen halten. Die starke Hemmung der Leucyl-glycin-Spaltung durch Glycyl-glycin ist bei der Beurteilung dieser Frage immerhin in Betracht zu ziehen. Wenn auch Hemmungen bei Enzym-Reaktionen bekannt sind, welche sich nicht auf Besetzung der spezifischen Affinitätsstellen haben zurückführen lassen, so legt die starke Hemmung der Leucyl-glycin-Spaltung durch Glycyl-glycin immerhin die Annahme nahe, daß letzteres Dipeptid zur Dipeptidase des Malz-Extraktes eine erhebliche Affinität besitzt, ohne daß es gespalten werden kann. Dann könnte das Ergebnis unseres Hemmungsversuches darauf hindeuten, daß keimende Gerste eines Aktivators entbehrt, welchen z. B. Lupinen-Samen besitzen, und welcher sich im lebenden Material unter dem Einfluß vorhandenen Substrates ausbildet.

Unser Ergebnis, das so ausgedrückt werden könnte, daß sich die typische Grünmalz-Dipeptidase wesentlich von der oder den in anderen keimenden

¹¹⁾ Levene, Bass und Steiger, Journ. biolog. Chem. **81**, 221 [1929]. — Levene, Steiger und Bass, **82**, 155 [1929]. — Siehe auch Northrop u. Simms, Journ. gen. Physiol. **12**, 313 [1929].

¹²⁾ Waldschmidt-Leitz, Balls und J. Waldschmidt-Graser, B. **62**, 956 [1929].

Samen und in tierischen Organ-Extrakten enthaltenen Dipeptidasen unterscheidet, fordert dazu auf, in Extrakten aus solchen pflanzlichen Organen, deren Proteine hinsichtlich der aus ihnen entstehenden Dipeptide näher bekannt sind, nach weiteren spezifischen Dipeptiden zu suchen, um dabei den Anschluß an die spezifischen Tri- und Polypeptidasen herzustellen. Eine solche Untersuchung soll im Einverständnis mit den HHrn. Abderhalden, Grassmann und Waldschmidt-Leitz in Angriff genommen werden.

Das Enzym, welches wir einstweilen als Grünmalz-Dipeptidase bezeichnen wollen, wird, wie die Versuche S. 2199 zeigen, durch Glykokoll und durch Leucin sehr ungleich gehemmt. Die Verschiedenheiten sind hier sehr viel größer, als bei einem an Darm-Erepsin und Alanyl-glycin von Euler und Kertész¹³⁾ angestellten Versuch. Diese am Grünmalz-Enzym eintretenden Hemmungen interessieren uns besonders im Zusammenhang mit der von Euler und Josephson¹⁴⁾ ausgesprochenen und von Waldschmidt-Leitz¹⁵⁾, von Abderhalden, sowie von Grassmann¹⁶⁾ bestätigten und durch interessante Arbeiten erweiterten Vorstellung, wonach der Angriff der Peptidasen vom Typus des Darm-Erepsins durch eine Reaktion des Enzyms mit der freien Aminogruppe des Substrates zustande kommt. Spezifische Dipeptidasen würden sich zu der von Euler und Josephson aufgeworfenen Frage, über die diese Bindung vermittelnde Carbonylgruppe des Enzyms besonders eignen.

Beschreibung der Versuche.

Eine schwedische Gerste (Binder, Svalöf) wurde in Wasser 30 Stdn. lang geweicht und dann zwischen feuchtem Filtrierpapier ausgebreitet. Nach 4 Tagen entsprach die Gerste, da die Temperatur ziemlich hoch war, äußerlich etwa dem Grünmalz-Stadium. Die Keimlinge waren etwa 10–15 mm lang, einzelne Husaren kamen vor. Dieses Grünmalz wurde mehrmals in einer Fleisch-Mahlmaschine gemahlen. Von dieser Masse wurden 300 g mit 200 ccm Wasser verrieben; man ließ sie dann 2 Stdn. bei 30° autolysieren und stellte sie hierauf über Nacht auf Eis. Am nächsten Morgen wurde der Extrakt abgeseigt und bei 0–5° verwahrt.

Die Peptidase wurde nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz^{16a)} bestimmt, und zwar mit 0.10-n. Substrat; das pH eingestellt mit Ammoniumchlorid-Ammoniak-Puffer. Temperatur 40°. Das freigemachte Carboxyl wurde durch Titration mit 0.096-n. alkoholischem Kali in 90-proz. Alkohol mit Thymol-phthalein bestimmt. In den folgenden Tabellen ist unter „ccm KOH“ der Unterschied in ccm obiger alkoholischer Lauge angegeben, welcher zwischen einer Probe zu Anfang des Versuches und zu einer gewissen Zeit

¹³⁾ Euler u. Kertész, B. **61**, 1525 [1928].

¹⁴⁾ Euler u. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926], **166**, 294 [1927]; B. **60**, 1341 [1927].

¹⁵⁾ Waldschmidt-Leitz, Schäffer, Schlatter u. Klein, B. **61**, 640 [1928]; Abderhalden u. Schwab, Fermentforsch. **9**, 501 [1928].

¹⁶⁾ Grassmann, Habilitationsschrift.

^{16a)} B. **54**, 2988 [1921]. — Siehe zur Methodik auch Grassmann u. Heyde, Ztschr. physiol. Chem. **188**, 32 [1929].

gefunden wurde. 5 ccm Enzym-Lösung wurden auf das Totalvolum von 25 ccm des Reaktionsgemisches verdünnt.

Versuch I.

Stdn.	Leucyl-glycin		Glycyl-glycin	
	ccm KOH	% Spaltung ¹⁷⁾	ccm KOH	% Spaltung
1	3.45	33	0.2	ca. 2
2	5.20	50	0.35	ca. 3.4
3	5.35	51	0.5	ca. 4.8

Dieser Versuch zeigte schon den außerordentlich großen Unterschied in der Spaltungsgeschwindigkeit beider Substrate.

Versuch 2. Als einfachen Ausdruck der Reaktionsgeschwindigkeit gibt man oft die Reaktionskonstante 1. Ordnung an. Um zu sehen, in welchem Grade die nach der Formel für monomolekulare Reaktionen ausgerechneten Koeffizienten k konstant sind, wurde folgender Versuch mit Leucyl-glycin angestellt.

Min.	ccm KOH	% Spaltung	k · 10 ⁴	% Spaltung
				Min.
17	0.90	8.65	49	0.51
32	1.70	16.3	54	0.51
47	2.45	23.8	60	0.51
61	2.95	28.4	60	0.47
98	4.00	38.4	65	0.39
128	4.55	43.7	71	0.34

Die Konstante ist ausgerechnet unter der durch unsere Versuche gestützten Annahme, daß nur das eine optische Isomere des Leucyl-glycins gespalten wird. Wir sehen, daß die Konstante in diesem Versuch stark ansteigt. Bis zu über 50% ist die Spaltung direkt proportional mit der Reaktionszeit. Ein solcher Verlauf erinnert an Befunde an anderen Peptidasen. Man kann dieses Ergebnis folgendermaßen deuten: solange sich „% Spaltung/Minuten“ konstant hält, ist das Enzym mit dem Substrat ganz gesättigt, und die Hemmung durch die Reaktionsprodukte ist noch wenig bemerkbar, so daß ein Verbrauch des Substrates den Umsatz pro Zeiteinheit nicht ändert.

Versuch 3. Abgesehen von einem weiteren Vergleich zwischen der Spaltung des Glycyl-glycins und des Leucyl-glycins, wurde nun auch noch Alanyl-glycin untersucht. Der in der Tabelle angegebene Blindversuch betrifft die Eigenspaltung des Malz-Extraktes.

Min.	Leucyl-glycin		Glycyl-glycin		Alanyl-glycin		Blindprobe ccm KOH
	ccm KOH	% Spalt.	ccm KOH	% Spalt.	ccm KOH	% Spalt.	
48	2.25	21.2	0.15	ca. 1.4	—	—	—
105	4.20	40.4	0.35	ca. 3.4	—	—	—
135	—	—	—	—	3.25	31.2	—
195	5.12	49.2	0.4	ca. 3.9	—	—	—
1000	5.75	54.5	1.1	ca. 8.5 ¹⁸⁾	—	—	0.2

¹⁷⁾ Nicht korrigiert wegen der Eigenspaltung des Extraktes.

¹⁸⁾ Korrigiert wegen der Eigenspaltung des Malz-Extraktes.

Für die 3 untersuchten Dipeptide ist also das Verhältnis

% Spaltung	Leucyl-glycin ..	0.44
	Alanyl-glycin ..	0.23
	Glycyl-glycin ...	0.03

Der für Alanyl-glycin erhaltene Wert ist weniger genau als die beiden anderen, da der o-Wert berechnet ist.

Versuch 4. Im Anschluß an frühere Untersuchungen aus diesem Institut wurden Versuche über die Hemmung dieser Dipeptid-Spaltungen angestellt. Die Angaben der folgenden Tabelle beziehen sich wie gewöhnlich auf 0.1-n. Substrat und außerdem auf 0.1-n. Amino-säuren. Die optimale Acidität ist mit Lauge wiederhergestellt.

Min.	Leucyl-glycin		Leucyl-glycin + Glykokoll		Leucyl-glycin + Leucin	
	ccm KOH	% Spalt.	ccm KOH	% Spalt.	ccm KOH	% Spalt.
75	3.50	33.6	3.15	30.3	2.50	24.0
% Hemmung	—		10		28	

Das Leucin hemmte also bei diesen Versuchen 3-mal so stark wie das Glykokoll.

Versuch 5. Hemmung der Leucyl-glycin-Spaltung durch Glycyl-glycin.

Die Reaktionsmischung ist 0.1-n. hinsichtlich jeder der beiden Dipeptide.

Min.	Leucyl-glycin		Leucyl-glycin + Glycyl-glycin	
	ccm KOH	% Spalt.	ccm KOH	% Spalt.
60	2.45	23.6	1.45	13.9
Hemmung	—		41	

Die Hemmung durch Glycyl-glycin ist also sehr stark.

353. N. D. Zelinsky und N. N. Semiganowsky: Über die Zersetzung des Cholesterylens und des Cholesteryläthers durch Aluminiumchlorid.

[Aus d. Organ.-chem. Laborat. d. I. Universität, Moskau.]

(Eingegangen am 30. Juli 1929.)

In früheren Arbeiten von Zelinsky und Lawrowsky¹⁾ wurde bewiesen, daß bei der thermischen Zersetzung des Cholesterins in Gegenwart von Aluminiumchlorid Kohlenwasserstoffe entstehen, die mit den Erdöl-Kohlenwasserstoffen identisch sind. Hierbei wurde festgestellt, daß die höher siedenden Fraktionen dieser Kohlenwasserstoffe („schweres Öl“) Rechtsdrehung aufweisen. Bei der Behandlung dieser Fraktionen mit Schwefelsäure²⁾ verschwindet die optische Aktivität fast vollständig, was auch bei den entspr. Fraktionen des natürlichen Erdöls der Fall ist. Es war somit ein Zusammenhang zwischen dem ungesättigten Charakter des „schweren Öls“ und seiner optischen Aktivität zu erwarten.

¹⁾ B. 60, 1793 [1927], 61, 1291 [1928].

²⁾ vergl. v. Traubenberg, Chem.-Ztg. 38, 950 [1914].