

368. O. Gerngross und W. Deseke: *Thermolyse neutraler wäßriger Lösungen von Polypeptiden zunehmender Kettenlänge in ihrer Beziehung zur Thermolyse der Proteine.*

[Aus d. Techn.-chem. Institut d. Techn. Hochschule Berlin u. d. Technolog. Institut d. Landwirtschaftl. u. veterinär-medizin. Hochschule Ankara.]

(Eingegangen am 18. Oktober 1933.)

Es ist bekannt, daß beim längeren Erhitzen auch von neutralen oder ganz schwach sauren (iso-elektrischen) Gelatine- und Leim-Lösungen die Gelatinierfähigkeit, die Quellbarkeit, die Mutarotation und insbesondere die Viscosität irreversibel abfallen. Es ist nachgewiesen, daß bei diesen Vorgängen das Micellar- bzw. Molekulargewicht von etwa 90000 auf etwa 4000 abnimmt¹⁾. Die früher wohl vorherrschende Annahme, daß in einem ähnlichen Ausmaß auch hydrolytische Aufspaltung von Peptid-Bindungen auftrete, hat sich nicht bestätigen lassen. So wurden bei Versuchen, bei denen Lösungen von iso-elektrischer, osmotisch gereinigter Gelatine etwa 75 Std. auf 100° erhitzt wurden, keine wesentliche Peptid-Spaltung festgestellt, erst bei längerem Erhitzen tritt einigermaßen deutlich Hydrolyse auf²⁾. Unter Zuhilfenahme der röntgenographischen Befunde³⁾ läßt sich dies wohl dahin deuten, daß die in der intakten Gelatine zu den Micellen zusammengesetzten langen Polypeptid-Ketten bei der Hitze-Behandlung mehr und mehr losgelöst und dispergiert werden. Nach kurzem Erhitzen finden sie sich wieder zur alten Ordnung zusammen, nach längerem nur unvollkommen, und nach sehr langem Kochen ist der Micellar-Verband völlig vernichtet.

Dabei ist aber nicht ohne weiteres verständlich, wieso z. B. bei 10-stdg. Kochen eines Gelatine-Sols, bei dem die physikalischen Eigenschaften bereits weitgehend irreversibel verändert sind, die Polypeptid-Ketten die Fähigkeit zum Zusammenschluß verloren haben, wenn sie nicht selbst irgendwie auch eine chemische Veränderung erlitten haben. Es ist dabei doch in erster Linie an eine mäßige Hydrolyse zu denken, die so gering sein kann, daß sie sich insbesondere in Anbetracht des Riesenausmaßes des Moleküls zunächst der analytischen Feststellung entzieht.

In diesem Zusammenhang bot es Interesse, über die Widerstandsfähigkeit der Peptid-Bindungen gegen Hydrolyse in rein wäßriger Lösung ein genaueres Bild zu gewinnen. Es war zu erwarten, daß aus dem Verhalten von Polypeptid-Ketten gegen hydrolytische Einflüsse in rein wäßrigen, neutralen Lösungen sich Rückschlüsse auf das Verhalten der Polypeptid-Ketten in der Gelatine unter ähnlichen Bedingungen ziehen lassen würden.

Wir haben aus diesem Grunde neutrale, verdünnte, wäßrige Lösungen von Alanyl-glycyl-glycin, Alanyl-diglycyl-glycin, Leucyl-diglycyl-glycin und Leucyl-tetraglycyl-glycin 9 Tage auf 100° erhitzt und die Zunahme der primären Aminogruppen mit der sich als besonders

¹⁾ O. Gerngross, Graf O. Triangi u. P. Koeppe, B. **63**, 1603 [1930].

²⁾ Dies., l. c.

³⁾ J. R. Katz u. O. Gerngross, Naturwiss. **13**, 900 [1925]; O. Gerngross u. J. R. Katz, Kolloid-Ztschr. **39**, 180 [1926]; K. Herrmann, O. Gerngross u. W. Abitz, Ztschr. physikal. Chem. (B) **10**, 371 [1930]; O. Gerngross, K. Herrmann u. R. Lindemann, Kolloid-Ztschr. **60**, 276 [1932].

geeignet erweisenden van-Slyke-Methode untersucht. Gleichzeitig wurde auf eine etwaige Änderung der p_{H} -Werte der Lösungen geachtet. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen 1 und 2 wiedergegeben.

Tabelle 1.

Amino-Stickstoff nach van Slyke und p_{H} -Werte der Lösungen von Alanyl-glycyl-glycin und Alanyl-diglycyl-glycin nach verschiedener Erhitzungs-Dauer.

Erhitzungs-Dauer in Std.n.	Alanyl-glycyl-glycin		Alanyl-diglycyl-glycin	
	mg N ₂ aus 2 ccm 0.0283-n. Lösung	p_{H}	mg N ₂ aus 2 ccm 0.0192-n. Lösung	p_{H}
0	1.65	6.18	1.08	6.29
24	1.64	—	1.19	—
72	1.82	6.27	1.31	6.39
120	1.85	—	1.36	—
216	1.92	6.71	1.40	6.71

Tabelle 2.

Amino-Stickstoff nach van Slyke und p_{H} -Werte der Lösungen von Leucyl-diglycyl-glycin und Leucyl-tetraglycyl-glycin nach verschiedener Erhitzungs-Dauer.

Erhitzungs-Dauer in Std.n.	Leucyl-diglycyl-glycin		Leucyl-tetraglycyl-glycin	
	mg N ₂ aus 2 ccm 0.0125-n. Lösung	p_{H}	mg N ₂ aus 2 ccm 0.0201-n. Lösung	p_{H}
0	0.70	5.33	1.12	4.77
24	0.73	—	1.20	—
72	0.78	5.46	1.33	4.80
120	0.82	—	1.45	—
216	0.87	5.63	1.60	4.96

Es ergibt sich somit in allen Fällen eine in den ersten Stunden unmerkliche, aber später deutlich werdende, mit der Zeit zunehmende Hydrolyse. In Prozenten der Anfangs-Werte ausgedrückt, zeigen sich bei den verschiedenen Polypeptiden die in Tabelle 3 zusammengestellten Zunahmen.

Tabelle 3.

Prozentuale Zunahme der van-Slyke-Werte nach verschiedener Erhitzungs-Dauer der Polypeptid-Lösungen.

Erhitzungs-Dauer in Std.n.	Zunahme der van-Slyke-Zahlen in % der Ausgangs-Werte			
	Alanyl-glycyl-glycin	Alanyl-diglycyl-glycin	Leucyl-diglycyl-glycin	Leucyl-tetraglycyl-glycin
24	0	10.2	4.3	7.2
72	11.0	21.3	11.4	18.8
120	12.8	25.9	17.1	29.5
216	17.1	35.2	24.3	28

Um ein Maß für die hydrolytische Spaltbarkeit der Peptid-Bindungen in den verschiedenen Polypeptiden zu erhalten, kann man die obigen Prozentzahlen durch die Anzahl der im Molekül vorhandenen Peptid-Bindungen dividieren, wodurch sich die in Tabelle 4 zusammengestellten reduzierten Zunahmen, ausgedrückt in Prozenten der bei völliger Hydrolyse maximal erreichbaren Zunahmen, ergeben.

Tabelle 4.

Relative Zunahme der van-Slyke-Werte nach verschiedener Erhitzungs-Dauer der Polypeptid-Lösungen.

Erhitzungs-Dauer in Stdn.	Zunahme der van-Slyke-Zahlen in % der theoret. max. Zunahme			
	Alanyl-glycyl-glycin	Alanyl-diglycyl-glycin	Leucyl-diglycyl-glycin	Leucyl-tetra-glycyl-glycin
24	0	3.4	1.4	1.4
72	5.5	7.1	3.8	3.8
120	6.4	8.6	5.7	5.9
216	8.5	11.7	8.1	8.6

Sowohl in der Alanyl-glycyl-Reihe wie in der Leucyl-glycyl-Reihe zeigt sich eine höhere molekulare Hydrolysen-Geschwindigkeit mit steigender Kettenlänge (Tab. 3). Auf die einzelne Peptid-Bindung bezogen, ist in der Alanyl-glycyl-Reihe die Hydrolysierbarkeit größer beim Tetrapeptid als beim Tripeptid; in der Leucyl-glycyl-Reihe ist sie beim Hexapeptid nur wenig größer als beim Tetrapeptid (Tab. 4). Es hat demnach, soweit die beiden Versuchsreihen einen solchen Schluß zulassen, den Anschein, als ob sich die Hydrolysen-Geschwindigkeit einer Peptid-Bindung bei den Anfangs-Gliedern analog gebauter Reihen mit zunehmender Kettenlänge steigert, aber bald einem Endwert zustrebt. Auch von anderer Seite ist bei steigender Kettenlänge, und zwar bei der Alkali-Hydrolyse, Zunahme der Spaltgeschwindigkeit festgestellt worden⁴⁾.

Auf jeden Fall spricht nichts dafür, daß etwa Polypeptide mit steigender Kettenlänge widerstandsfähiger gegen Hydrolyse in wäßriger Lösung bei 100° werden. Dementsprechend müßten so lange Polypeptid-Ketten, wie wir sie in der Gelatine anzunehmen haben, mit verhältnismäßig erheblicher Geschwindigkeit in heißer wäßriger Lösung hydrolysiert werden, sofern sie hier in molekularer Dispersion vorliegen. Die Tatsache, daß trotzdem die Hydrolyse der Gelatine bei der Thermolyse sich erst relativ spät bemerkbar macht, kann man vielleicht folgendermaßen erklären: Unmittelbar nach ihrer Auflösung liegen auch in der heißen Lösung zunächst noch mehr oder weniger intakte Gelatine-Micelle vor⁵⁾. Dadurch ist es verständlich, daß die Peptid-Bindungen bis zu einem gewissen Grade eine Zeitlang vor dem hydrolytischen Angriff geschützt werden, da die von ihnen ausgehenden Partialvalenzen sich mit den entsprechenden Gruppen der im Micell benachbarten Moleküle (Primärteilchen) absättigen. Erst nachdem eine Peptidkette aus dem Micell völlig losgelöst wurde, fällt sie rascher der Hydrolyse anheim.

⁴⁾ W. Kuhn, C. Molster u. K. Freudenberg, B. **65**, 1179 [1932].

⁵⁾ O. Gerngross, K. Herrmann u. R. Lindemann, Kolloid-Ztschr. **60**, 276 [1932].

Jedenfalls macht aber das Verhalten der untersuchten Polypeptide beim Erhitzen ihrer wäßrigen Lösungen recht wahrscheinlich, daß die hydrolytische Spaltung der Primärteilchen neben der dispersoid-chemischen Aufteilung der Sekundärteilchen bei der Thermolyse der Gelatine-Lösungen eine Rolle spielen dürfte. Der erstere Vorgang, auch wenn er zunächst auf chemisch-analytischem Wege noch nicht deutlich erkennbar ist, erscheint geeignet, die Irreversibilität der Änderungen in den physikalischen Eigenschaften der Gelatine-Lösungen bei anhaltendem Erhitzen verständlich zu machen. Weitere Untersuchungen sollen den Vorgang noch mehr aufklären.

Bezüglich der Darstellung der in der Arbeit verwendeten, synthetisch gewonnenen Polypeptide sei erwähnt, daß wir das Glycyl-glycin, welches wir als Zwischenprodukt benötigten, etwas abweichend von der bestehenden Vorschrift⁶⁾ bereiteten.

10 g Glycin-anhydrid (1 Mol.) wurden mit 100 ccm *n*-Natronlauge (1.14 Mol.) 20 Min. bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt. Die Natronlauge wurde mit 100 ccm *n*-Überchlorsäure neutralisiert, die Flüssigkeit unter vermindertem Druck auf etwa $\frac{1}{6}$ ihres Volumens eingedampft, filtriert und heiß mit Alkohol (etwa dem 3-fachen Volumen der eingedampften wäßrigen Flüssigkeit) versetzt. Das Glycyl-glycin schied sich langsam in schönen, glänzenden Blättchen in Rhombenform ab, während das Natriumperchlorat in Lösung blieb. Die gefällte Substanz wurde abgenutscht und mit Alkohol, dann mit Äther gewaschen. Ausbeute: 9.9 g = 85.5% d. Th.

Formol-Titration: 94.55 mg Sbst. verbraucht. 3.51 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH.

Gef. 10.38% Amino-Stickstoff, ber. 10.60%.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sind wir für die Bewilligung von Mitteln für diese Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

369. O. Gerngross und W. Deseke: Notiz über die gasvolumetrische Methode zur Bestimmung von Amino-Stickstoff nach van Slyke bei Glykokoll und bei glycin-haltigen Peptiden.

[Aus d. Techn.-chem. Institut d. Techn. Hochschule Berlin u. d. Technol. Institut d. Landwirtschaftl. u. veterinär-medizin. Hochschule Ankara.]

(Eingegangen am 18. Oktober 1933.)

Bekanntlich enthält das Glutin rund 25% Glykokoll. Es war nahelegend, für die in der voranstehenden Mitteilung beschriebenen Versuche die relativ einfach herzustellenden, nur aus Glycylresten bestehenden Peptide zu verwenden. Es zeigte sich aber bald, daß, wie aus der Literatur bekannt, Glykokoll und den Glycylrest als Anfangsglied enthaltende Peptide nach der van-Slyke-Methode sich nicht messen lassen¹⁾.

So erhielten wir in 6 Bestimmungen an 0.5358 g Glykokoll eine Stickstoff-Menge von 0.2204 g N₂, entspr. 20.60% Amino-Stickstoff. Der theoretisch berechnete Gehalt ist 18.66%, so daß der Befund um 10.2% zu hoch liegt.

An Glycyl-glycin wurden, um eine größere Menge Gas zu sammeln, 11 Bestimmungen mit insgesamt 0.8992 g Substanz vorgenommen, die 0.2560 g Stickstoff ent-

⁶⁾ E. Fischer, B. **38**, 607 [1905].

¹⁾ E. Abderhalden u. D. van Slyke, Ztschr. physiol. Chem. **74**, 505 [1911]; vergl. auch E. Fischer u. W. Koelker, A. **340**, 177 [1905]; E. Fischer, B. **39**, 579 [1906]; A. Hynd u. M. McFarlane, Biochem. Journ. **20**, 1264 [1926].