

Analyse der enzymatischen Spaltung von N-Acylaminosäuren durch automatische Titration der entstehenden Aminosäuren

Von

M. Röhr, F. Baumann und R. Brunner

Aus dem Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie der Technischen Hochschule Wien

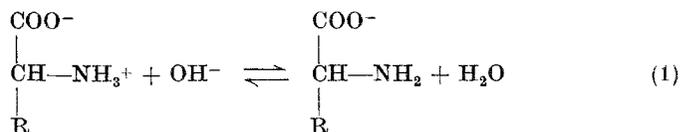
(Eingegangen am 13. Juli 1968)

Die durch enzymatische Hydrolyse von N-Acylaminosäuren freiwerdenden Aminosäuren können, ausgehend von pH 7,5, durch direkte Titration auf einen vorgewählten Endpunkt mittels einer automatischen Titrationsanlage mit hinreichender Genauigkeit quantitativ bestimmt werden. Als geeigneter Titrationsendpunkt (Äquivalenzpunkt) hat sich bei den meisten Aminosäuren pH 11,0, bei Lysin 11,50, Cystein 11,75 und Prolin 11,80 bewährt. Die Anwendung der Methode wird an praktischen Beispielen der enzymatischen Hydrolyse von N-Acylaminosäuren demonstriert.

Analysis of Enzymatic Cleavage of N-Acylamino Acids by Automatic Titration of the Amino Acids Formed

Amino acids enzymatically liberated from N-acylamino acids can be assayed with adequate precision by an automatic potentiometric titration from pH 7.5 to a fixed end point. For the majority of amino acids pH 11.0 proved to be the most suitable end point, whereas the respective value for leucine was pH 11.50, for cysteine pH 11.75 and for proline 11.80. Two representative examples are given for the applicability of the method.

Bei der quantitativen Analyse der enzymatischen Hydrolyse von N-Acylaminosäuren sowie Peptiden werden vorwiegend maßanalytische, kolorimetrische und gasvolumetrische Methoden zur Erfassung der beim Spaltvorgang freiwerdenden Aminosäuren verwendet. Entsprechend der Zwitterionenstruktur der Aminosäuren ist es prinzipiell möglich, entweder die Carboxylgruppe oder die NH_3^+ -Gruppe zu titrieren. Die Titration der NH_3^+ -Gruppe entspricht Gl. (1).



Aus den pK -Werten für die NH_3^+ -Gruppen (pK_2) der einzelnen Aminosäuren kann aus der Gl. (2) der für die Bestimmung günstigste pH -Bereich ermittelt werden.

$$\text{pH} = pK_2 + \log \frac{(\text{R}^- - \text{NH}_2)}{(\text{R}^- - \text{NH}_3^+)} \quad (2)$$

Aus der Beziehung (2) geht nämlich hervor, daß bei der Titration von Aminosäuren von $\text{pH} = pK_2 - 2$ bis $\text{pH} = pK_2 + 2$ ein Äquivalent Lauge zur Neutralisation der protonisierten NH_2 -Gruppe verbraucht wird. Dadurch ergibt sich, weil die meisten Aminosäuren pK_2 -Werte zwischen 9 und 10 aufweisen, ein Titrationsintervall zwischen pH 7 und 11 und 8 und 12; der hierbei zu erwartende Fehler beträgt maximal 2%, da bei $\text{pH} = pK_2 - 2$ bereits etwa 1% der Aminosäure neutralisiert ist, während beim Endpunkt $\text{pH} = pK_2 + 2$ etwa 99% der Aminosäure nach Gl. (1) neutralisiert sind. Die Carboxylgruppen der Aminosäuren haben in diesem Bereich keinen störenden Einfluß, da die pK_1 -Werte meist unter oder um 3 liegen und sich daher erst bei Titrationen unter pH 5 auswirken würden. Der Umstand, daß z. B. bei Cystein, Lysin und Tyrosin mehr als zwei titrierbare Gruppen im Molekül enthalten sind, muß entsprechend berücksichtigt werden.

Für Titrationen mit einem Endpunkt zwischen pH 11 bis 12 gibt es aber keine geeigneten Farbindikatoren. Diesem Umstand tragen die bekannten Methoden der Formoltitration nach *Sørensen*¹ sowie der Titration nach *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*² Rechnung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit einer direkten Titration von Aminosäuren in wäßriger Lösung auf Titrationsendpunkte zwischen pH 11 und 12 (entsprechend $\text{pH} = pK_2 + 2$) studiert. Als erfolgversprechende Möglichkeit bot sich die elektrometrische Anzeige des Endpunktes der Titration in Verbindung mit einer geeigneten automatischen Titrationsanlage an. Die ausgearbeitete Methodik wurde am praktischen Beispiel der enzymatischen Spaltung von N-Acylaminosäuren durch spezifische Enzyme erprobt.

Apparatur

Es wurde eine automatische Titrationseinrichtung der Firma Radiometer A/S Kopenhagen verwendet, die sowohl die exakte Aufnahme von Titrations-

¹ S. P. L. *Sørensen*, *Biochem. Z.* **7**, 45 (1908).

² R. *Willstätter* und E. *Waldschmidt-Leitz*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **54**, 2988 (1921).

kurven als auch die Titration von einem definierten Anfangs-pH-Wert auf einen vorgewählten pH-Endpunkt mit großer Genauigkeit und geringem Zeitaufwand erlaubt.

Diese Einrichtung setzte sich aus folgenden Einheiten zusammen: pH-Meßgerät PHM 25, Titrator TTT11, Autobürette ABU1 (Bürettenkapazität 2,5 ml; Ablesegenauigkeit 0,001 ml) und Mikrotitrationseinrichtung TTA31 mit Glaselektrode G2222C und Kalomelektrode K4112. Titriert wurde mit 0,1*n*-NaOH; der Titrantverbrauch wurde durch den Recorder SBR2 registriert. Zur Konstanthaltung der Meßtemperatur wurde ein thermostatisiertes Titrationsgefäß verwendet. Durch einen Magnetrührer wurde für gute Durchmischung im Reaktionsgefäß gesorgt.

Versuche und Ergebnisse

Bestimmung von Aminosäuren bei verschiedenen Konzentrationen durch Titration auf einen vorgewählten Endpunkt

Es wurde die Titration folgender Aminosäuren und Peptide studiert: Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cystein, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Hydroxyprolin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin; Glycylglycin, Glycylleucin und Glycylglycylglycin.

Die Durchführung von Aminosäurebestimmungen durch Titration von einem geeigneten pH-Anfangspunkt auf einen vorgewählten pH-Endpunkt stößt bei Aminosäuren mit hohen pK_2 -Werten auf Schwierigkeiten, die dazu führen, daß das Titrationsintervall von $pH = pK_2 - 2$ bis $pH = pK_2 + 2$ nicht immer eingehalten werden kann.

Bei pK_2 -Werten um 10 müßte theoretisch bis zum Endpunkt pH 12 titriert werden. Ab pH 11,5 zeigte sich aber schon eine beträchtliche Trägheit des Elektrodensystems. Blindversuche mit reinem Lösungsmittel (Wasser) zeigten überdies, daß bis pH 11 nur sehr geringe Mengen an 0,1*n*-NaOH benötigt werden, um dieses auf den entsprechenden pH-Wert einzustellen. Von pH 11,0 bis 11,5 war aber bereits ein deutlicher Anstieg im Blindverbrauch festzustellen. Ab pH 11,5 war der Blindverbrauch so groß, daß er bei geringen Aminosäurekonzentrationen ein Mehrfaches der zur Titration der Aminosäure notwendigen Menge 0,1*n*-NaOH betrug, was sich natürlich auf die Genauigkeit der Titration auswirkt. Die naheliegende Möglichkeit, zur Titration nicht 0,1*n*-NaOH, sondern 1*n*-NaOH zu verwenden, war sowohl aus apparativen Erwägungen als auch wegen der um eine Zehnerpotenz geringeren Erfassungsgrenze nicht erstrebenswert. Um eine möglichst rasche Titration zu erreichen, war der Titrationsendpunkt so niedrig wie möglich zu wählen, da bei enzymatischen Reaktionen vielfach in kürzester Zeit Proben gezogen und bestimmt werden müssen. Aus den hier angeführten Gründen wurde die Möglichkeit untersucht, die Titration schon bei pH 11,0 als Endpunkt zu beenden und eventuell entsprechende Korrekturen anzubringen. Lediglich bei Cystein, Lysin und Prolin wurden entsprechend den hohen pK_2 -Werten von pH 11,0 abweichende Endpunkte vorgesehen. Für alle Aminosäuren mit Ausnahme der Peptide wurde ein einheitlicher Titrationsbeginn bei pH 7,5 gewählt.

Bei Cystein ($pK_2 = 10,78$ und $pK_{(SH)} = 8,27$) wurde im Titrationsintervall von pH 7,50 bis 11,75 gearbeitet und ein Verbrauch von 2 Äquivalenten festgestellt (NH_3^+ -Gruppe und SH-Gruppe). Lysin ($pK_{(\alpha-NH_2)} = 8,95$ und

$pK_{(\varepsilon-NH_2)} = 10,53$) wurde im Titrationsintervall pH 7,5 bis 11,5 bestimmt, wobei ebenfalls ein Verbrauch von 2 Äquivalenten beobachtet wurde ($\alpha-NH_2$ -Gruppe und $\varepsilon-NH_2$ -Gruppe). Prolin ($pK_2 = 10,60$) wurde von pH 7,50 auf pH 11,80 titriert. Die Peptide mit pK_2 -Werten um 8 wurden im Intervall von pH 6,0 bis 10,0 titriert.

Bei den Untersuchungen wurden die Aminosäuren und Peptide (mit Ausnahme von Tyrosin) in Konzentrationen von 10, 25 und 50 $\mu\text{Mol/ml}$ in Wasser gelöst; von Tyrosin wurden wegen seiner geringen Löslichkeit in Wasser Lösungen niedrigerer Konzentrationen (2,5, 5,0 und 10,0 $\mu\text{Mol/ml}$) bereitet. Die Lösungen wurden auf die gewählten Anfangs-pH-Werte, 7,5 für Aminosäuren und 6,0 für Peptide, eingestellt. Das Titrationsvolumen war 1 ml; titriert wurde bei 20° C mit 0,1*n*-NaOH. Es wurden jeweils zwei parallele Bestimmungen durchgeführt.

Für jedes pH-Intervall wurde der Verbrauch an 0,1*n*-NaOH bestimmt, der benötigt wird, um den pH-Wert des reinen Wassers vom Anfangs-pH-Wert auf den End-pH-Wert der Titration zu bringen. Dieser Verbrauch wurde bei der Ermittlung der Aminosäuremenge vom Gesamtverbrauch als Blindwert abgezogen.

Die in der beschriebenen Arbeitsweise durchgeführten Titrationsversuche ergaben, daß die Abweichungen des tatsächlichen NaOH-Verbrauches vom theoret. Verbrauch im Bereich von maximal $\pm 3\%$ lagen. Somit war es auch nicht notwendig, bei der Titration von Aminosäuren mit hohen pK_2 -Werten Korrekturen anzubringen, wie sie auf Grund theoretischer Überlegungen [vgl. Gl. (2)] notwendig erschienen. Die Methode ist daher den konventionellen Verfahren zur Bestimmung von Aminosäuren sowohl hinsichtlich Genauigkeit als auch Schnelligkeit zumindest gleichwertig.

Besonders für die Analyse von enzymatischen Spaltvorgängen, wie sie z. B. die Hydrolyse von N-Acylaminosäuren darstellt, erscheint die beschriebene Bestimmungsmethode sehr geeignet, wie in den folgenden Anwendungsbeispielen gezeigt wird.

Untersuchung der Hydrolyse von Hippursäure durch Hippurathydrolase

Das von Röhr³ (vgl. Röhr und Hampel⁴) in verschiedenen Mikroorganismen aufgefundene Enzym Hippurathydrolase (N-Benzoylaminosäure-amidohydrolase) bewirkt die Hydrolyse von Hippursäure und anderen N-Benzoylaminosäuren unter Bildung von Benzoessäure und der entsprechenden Aminosäure. Für die Untersuchung der Eigenschaften dieses Enzyms hat sich die angegebene Methode sehr gut bewährt. Im Folgenden sei ein typischer Versuch zur Spaltung von Hippurat durch eine etwa 100fach angereicherte Präparation dieses Enzyms beschrieben:

Versuchsansatz:

12 ml Hippursäurelösung (56 $\mu\text{Mol/ml}$) pH 7,5

1 ml Enzymlösung (Proteingehalt 5,75 mg/ml) in 0,05*m*-Phosphatpuffer pH 7,5.

Der Versuch wurde bei 37° C durchgeführt. Zu den in Tab. 1 angegebenen Zeiten wurden Proben von jeweils 1 ml entnommen und in der beschriebenen Weise im pH-Intervall 7,5—11,0 titriert. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

³ M. Röhr, Mh. Chem. **99**, 2255, 2278, 2291 (1968).

⁴ M. Röhr und W. Hampel, Mh. Chem. **97**, 1787 (1966).

Tabelle 1. Enzymatische Hydrolyse von Hippursäure
Hippuratkonzentration bei Versuchsbeginn 51,7 $\mu\text{Mol/ml}$ = 672 μMol pro
Versuchsansatz. Titration im pH-Intervall 7,5—11,0.

Zeit, Min.	Verbrauch 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz* ml	Freigesetztes Glycin pro Versuchsansatz (13 ml) μMol
0	0,000	0
5	0,157	204
10	0,323	420
15	0,480	624
20	0,515	670
25	0,516	671
30	0,517	672

* Nach Abzug des Nullwertes (Verbrauch 0,1*n*-NaOH zur Zeit Null = 0,382 ml).

Wie die Ergebnisse zeigen, wurde durch die Analyse eine quantit. Spaltung der eingesetzten Hippursäure in 30 Min. erfaßt.

Untersuchung der Spaltung von N-Phenoxyacetyl-L-alanin durch ein spezifisch induziertes Enzym

Ein spezifisch induziertes Enzym mit der Fähigkeit zur hydrolytischen Spaltung von N-Phenoxyacetylaminosäuren ist derzeit Gegenstand eingehender Studien⁵. Bei der Untersuchung dieses Enzyms wurde die be-

Tabelle 2. Enzymatische Hydrolyse von N-Phenoxyacetyl-L-alanin

N-Phenoxyacetyl-L-alanin-Konzentration bei Versuchsbeginn 25,6 $\mu\text{Mol/ml}$ = 512 μMol pro Versuchsansatz. Titration im pH-Intervall 7,5—11,0.

Zeit Min.	Verbrauch 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz* ml	Freigesetztes Alanin pro Versuchsansatz (20 ml) μMol
0	0,000	0
10	0,033	66
20	0,068	136
30	0,104	208
40	0,135	270
50	0,164	328
60	0,187	374
80	0,218	436
100	0,243	486
120	0,251	502

* Nach Abzug des Nullwertes (Verbrauch 0,1*n*-NaOH zur Zeit Null = 0,812 ml).

⁵ F. Baumann, Dissertation; Technische Hochschule Wien (1969).

beschriebene Methode ebenso mit Erfolg eingesetzt, wie nachstehendes Versuchsbeispiel zeigt:

Versuchsansatz:

4 ml N-Phenoxyacetyl-L-alaninlösung (128 μ Mol/ml) pH 7,5.

2 ml Enzymlösung (Proteingehalt 2,26 mg/ml) pH 7,5.

14 ml Wasser.

Das eingesetzte Enzympräparat war etwa 10fach angereichert; der Versuch wurde bei 37° C durchgeführt. Zu den in Tab. 2 angegebenen Zeiten wurden Proben von jeweils 1 ml entnommen und in der beschriebenen Weise im pH-Intervall 7,5—11,0 titriert. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Eine vollständige Spaltung des eingesetzten N-Phenoxyacetyl-L-alanins konnte nach einer Spaltungsdauer von 120 Min. registriert werden.

Im Zuge dieser enzymatischen Untersuchungen wurde die Spaltung zahlreicher N-Acylaminosäuren, die sowohl präparativ hergestellt als auch im Handel erworben wurden, studiert. Hierbei erweist sich die Aufnahme von Titrationskurven der Substrate in der beschriebenen Apparatur als eine ausgezeichnete Methode zur Überprüfung der Reinheit der verwendeten Präparate. Vorhandene Anteile an nicht acylierter Aminosäure können durch die beschriebene Titrationsmethode quantitativ bestimmt werden. Außerdem kann bei Aminosäuren mit mehreren substituierbaren Gruppen festgestellt werden, welche Gruppen substituiert sind.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methodik scheint auch für die Untersuchung der Wirkung von Peptidhydrolasen geeignet.