

**345. Max Bergmann, Leonidas Zervas und Hans Schleich:
Über proteolytische Enzyme, II. Mitteil.: Bindungsart des Prolins
in der Gelatine.**

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Lederforschung in Dresden.]

(Eingegangen am 22. Oktober 1932.)

In einer vor kurzem erschienenen Mitteilung¹⁾ haben wir die Synthese des Glycyl-*l*-prolins und des *d*-Alanyl-*l*-prolins nach dem Carbobenzoxy-Verfahren beschrieben. Wie die nebenstehende Formel des Glycyl-prolins zeigt, handelt es sich hier um Peptide mit tertiärem Stickstoff in der Peptid-Bindung. Wir fanden¹⁾, daß beide Peptide durch ein Ferment der Darm-Schleimhaut und der Hefe gespalten werden (Amino-Polypeptidase oder ein anderes, mit ihr vergesellschaftet auftretendes Enzym).

Den Verlauf der fermentativen Spaltung verfolgten wir durch die übliche Titration der freigelegten Carboxylgruppen in alkohol. Lösung (nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz); erwartungsgemäß blieb während der Hydrolyse der Amino-Stickstoff (nach van Slyke ermittelt) konstant. Wir hatten damit einen proteolytischen Vorgang kennen gelernt, bei dem Amino- und Carboxylgruppen nicht in äquivalenten Beträgen gebildet werden. Bekanntlich ist bei der Hydrolyse gewöhnlicher Peptide und natürlicher Proteine mit allen daraufhin untersuchten Proteasen bisher immer Äquivalenz der gebildeten Amino- und Carboxylgruppen beobachtet worden (E. Waldschmidt-Leitz). Diese Äquivalenz ist auch grundsätzlich für jede fermentative Proteolyse gefordert worden²⁾.

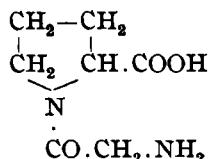
Es galt zu prüfen, ob die fermentative Spaltbarkeit der Peptide vom Typus des Glycyl-*l*-prolins eine zusätzliche, unbiologische Leistung des Ferment-Systems der Darm-Schleimhaut darstellt, oder ob Prolin und Oxyprolin tatsächlich in derartigen Bindungen in den natürlichen Proteinen vorkommen. Die Festlegung des Quotienten NH₂: COOH bei der enzymatischen Hydrolyse, insbesondere bei der Einwirkung von Erepsin auf prolin-haltige Eiweißstoffe, sollte uns auf diese Frage Antwort geben. Wir berichten im folgenden über entsprechende Versuche an Gelatine, die bekanntlich über 20% an Prolin und Oxy-prolin enthält.

Zunächst untersuchten wir die Einwirkung von „Trypsin“ auf Gelatine. Unser Ferment enthielt hauptsächlich die aktive Proteinase und Carboxy-Polypeptidase, während Dipeptidase nur in geringer Menge vorhanden war und Amino-Polypeptidase fast völlig fehlte. Der Fortgang der Hydrolyse wurde sowohl titrimetrisch in Alkohol wie durch van-Slyke-Bestimmung verfolgt. Wir stellten dabei fest, daß in gleichen Spaltungs-Zeiten innerhalb einer geringen Fehlgrenze immer äquivalente Beträge von Carboxyl- und primären Aminogruppen gebildet sind; mithin besteht die „tryptische“ Verdauung von Gelatine ausschließlich in der Sprengung normaler —CO.NH-Bindungen, worunter sich auch Bindungen vom Typus des Prolyl-glycins³⁾ befinden könnten.

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **212**, 72 [1932].

²⁾ Literatur siehe bei W. Grassmann in Nord-Weidenhagen, Ergebn. d. Enzym-Forschung I, S. 133.

³⁾ Über die fermentative Spaltbarkeit derartiger Prolyl-peptide vergl. E. Fischer u. A. Luniak, B. **42**, 4752 [1909]; W. Grassmann, H. Dyckerhoff u. O. v. Schoenbeck, B. **62**, 1307 [1929]; Ztschr. physiol. Chem. **210**, 1 [1932].



Als wir dann das Produkt der tryptischen Verdauung weiterhin der Einwirkung eines an ereptischen Enzymen reichen Auszuges aus Darm-Schleimhaut unterwarfen und den Fortgang der Hydrolyse genau wie oben verfolgten, konnten wir in keinem Falle eine Äquivalenz zwischen den freigelegten Amino- und Carboxylgruppen beobachten. In zahlreichen Versuchs-Reihen erhielten wir für den Quotienten $\text{NH}_2 : \text{COOH}$ ausschließlich Werte, die erheblich kleiner als 1 waren. Im Mittel stellte sich das Verhältnis auf 0.5 : 1, doch waren auch Fälle nicht selten, bei denen eine noch größere Verschiebung zugunsten des Carboxyl-Anteils gemessen wurde⁴⁾. Dieses Ergebnis kann auch unter Beachtung systematischer Fehlerquellen⁵⁾ nur dahin gedeutet werden, daß in der Gelatine die Iminogruppe des Prolins und wohl auch des Oxy-prolins für den Aufbau von Peptidketten verbraucht ist und aus dieser Bindung erst bei der ereptischen Verdauung herausgelöst wird. In der Gelatine kommen also tatsächlich Bindungen vor, wie wir sie im Glycyl- und Alanyl-prolin realisiert haben.

Es wird zu prüfen sein, inwieweit bei der ereptischen Hydrolyse anderer prolin-haltiger Eiweißstoffe ebenfalls Differenzen zwischen Amino- und Carboxyl-Zuwachs auftreten.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ganz ergebenst für die Gewährung von Mitteln zu dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche.

Als Substrat für unsere Verdauungs-Versuche wählten wir die übliche Gold-Gelatine des Handels. Das Trypsin bereiteten wir uns aus Handels-Pankreatin durch Extraktion mit Glycerin und 3-malige Adsorption mit Tonerde C_Y bei $p_H = 4.0$. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von Acetat-Puffer eingestellt. Die erhaltene Restlösung wurde mit Natronlauge neutralisiert und so zu den Versuchen gebraucht. 2.0 ccm dieser Restlösung spalteten 0.3 Millimol Glycyl-glycin in 5 ccm Versuchs-Mischung bei $p_H = 7.8$ und 30° in 3 Stdn. zu 6%; unter entsprechenden Bedingungen wurden von 0.5 Millimol *d*, *l*-Leucyl-glycyl-glycin 7.5% gespalten. Als Erepsin-Lösung verwendeten wir einen Glycerin-Auszug aus Schweinedarm-Schleimhaut, der durch Zentrifugieren geklärt worden war.

2.0 ccm dieses Auszuges spalteten 0.5 Millimol *d*, *l*-Leucyl-glycyl-glycin in 5 ccm Versuchs-Mischung bei $p_H = 7.0$ in 1 Stde. zu 63%, auf eine Peptid-Bindung der biologischen Form berechnet.

Für die tryptische Hydrolyse der Gelatine stellten wir Verdauungs-Ansätze zusammen, die in 50 ccm Gesamtvolumen enthielten: 20.0 ccm einer Gelatine-Lösung 1 : 10, 1.2 ccm 0.3-n. Natronlauge, 5.0 ccm *m/z*-Phosphat-

⁴⁾ Es ist nicht ausgeschlossen, daß der Quotient $\text{NH}_2 : \text{COOH}$ noch kleiner ausfällt, wenn man das tryptische Hydrolysat nicht mit rohem Erepsin, sondern mit „Aminopolypeptidase“ spaltet, also Dipeptidase ausschaltet.

⁵⁾ Eine solche Fehlerquelle könnte man in der Tatsache erblicken, daß Glycylketten im Gegensatz zu Glykokoll erheblich größeren van-Slyke-Stickstoff geben, als ihrem Gehalt an NH_2 -Gruppen entspricht. Bei der Verdauung solcher Glycin-Ketten müßte der Zuwachs von Amino-Stickstoff durch den Vergleich mit einem zu hohen Anfangswert zu niedrig gefunden werden. Will man diesen extremen Fall bei der Verdauung der Gelatine in Rechnung ziehen, so ist die Äquivalenz trotzdem nicht gewahrt.

puffer-Lösung vom $p_H = 8.3$ und 10.0 ccm der Trypsin-Lösung. Diesen Ansätzen wurden bei Beginn der Versuchszeit und dann nach den betreffenden Versuchszeiten je zwei Proben entnommen. Für die Bestimmung der Acidität wurden 2 ccm in 90-proz. Alkohol mit n_{20}^{14} -Kalilauge gegen Thymol-phthalein titriert. Für die Ermittlung der freien Aminogruppen wurden je 1.3-ccm-

I. Tryptische Hydrolysen.

Versuchszeit in Stdn.	van-Slyke-Werte			Titrations-Zahlen			$\text{NH}_2:\text{COOH}$
	mg $\text{NH}_2\text{-N}$	ccm n_{20}^{14} -KOH	Zuwachs in ccm	ccm n_{20}^{14} -KOH	Zuwachs in ccm		
Versuch a:							
0	0.827	1.18	—	1.94	—		—
1	1.391	1.99	0.81	2.68	0.74		1.09
2	1.484	2.12	0.94	2.83	0.89		1.05
4	1.897	2.71	1.53	3.14	1.20		1.27
6	1.957	2.80	1.62	3.32	1.38		1.16
7	1.862	2.66	1.48	3.46	1.52		0.98
8	1.940	2.77	1.59	3.46	1.52		1.05
Versuch b:							
0	0.966	1.38	—	2.09	—		—
1	1.834	2.62	1.24	3.16	1.07		1.16
2	1.988	2.84	1.46	3.42	1.33		1.10
4	2.184	3.12	1.74	3.67	1.58		1.10
6	2.338	3.34	1.96	3.96	1.87		1.05
8	2.464	3.52	2.14	4.00	1.91		1.12

II. Ereptische Hydrolysen.

Versuchszeit in Stdn.	van-Slyke-Werte			Titrations-Zahlen			$\text{NH}_2:\text{COOH}$
	mg $\text{NH}_2\text{-N}$	ccm n_{20}^{14} -KOH	Zuwachs in ccm	ccm n_{20}^{14} -KOH	Zuwachs in ccm		
Versuch a:							
0	1.358	1.94	—	2.80	—		—
1	1.442	2.06	0.12	3.07	0.27		0.45
2	1.512	2.16	0.22	3.21	0.41		0.54
4	1.617	2.31	0.37	3.40	0.60		0.62
6	1.680	2.40	0.46	3.62	0.82		0.56
Versuch b:							
0	1.974	2.82	—	3.34	—		—
1	2.079	2.97	0.15	3.54	0.20		0.75
2	2.086	2.98	0.16	3.72	0.38		0.42
4	2.170	3.10	0.28	4.05	0.71		0.39
6	2.128	3.04	0.22	4.23	0.89		0.25
7	2.219	3.17	0.35	4.32	0.98		0.36
Versuch c:							
0	1.900	2.71	—	3.26	—		—
3	2.039	2.91	0.20	3.63	0.37		0.54
6	2.047	2.93	0.22	3.76	0.50		0.44
22	2.550	3.64	0.93	4.75	1.49		0.62

Proben im Mikro-van-Slyke-Apparat der Einwirkung salpetriger Säure unterworfen und die Werte in der Tabelle auf 2.0 ccm bzw. auf ccm $n/_{20}$ -Kalilauge umgerechnet.

Die Verfolgung der ereptischen Hydrolyse geschah in dem abgekochten und filtrierten tryptischen Verdauungs-Gemisch. Wir vermischten 35 ccm dieses Hydrolysates mit 15 ccm Auszug aus Darm-Schleimhaut. In der Lösung wurde $pH = 7.4$ gemessen. Für die Bestimmung der freigelegten Gruppen verfahren wir wie oben. In beiden Fällen verblieben die Ansätze während der Versuchszeit bei 30° .

346. Wolfgang Langenbeck, Rudolf Hutschenreuter und Walter Rottig: Über organische Katalysatoren, VII. Mitteil.¹⁾: Katalytische Wirkungen von Imidazol-häminen.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Münster i. W.]

(Eingegangen am 21. Oktober 1932.)

Die katalytischen Wirkungen von Para-hämatinen in Abhängigkeit von der Konstitution der angewandten Base sind bisher noch nicht systematisch untersucht worden. Im folgenden bringen wir eine Anzahl Messungen von Reaktionen, bei denen Imidazol-hämine als Katalysatoren wirkten. Diese Klasse von Para-hämatinen schien uns für den angedeuteten Zweck besonders geeignet, weil es verhältnismäßig feste Verbindungen sind, die in wässriger Lösung nicht vollständig zerfallen²⁾.

Wir haben von jedem Imidazol-hämin drei verschiedene Wirkungen gemessen, die katalytische, peroxydatische und eine oxydatische Reaktion (Tabelle 1 bis 3. Die Basen sind nach steigender Aktivität geordnet.) Die Katalase-Wirkung wurde im wesentlichen nach Kuhn und Brann³⁾ bestimmt. Als Substrat für die Hämin-Peroxydase haben wir das Pyrogallol gewählt, unsere Meßmethode schließt sich an die bekannte Methode von Willstätter und Stoll⁴⁾ an. Jodwasserstoff kam als Substrat nicht in Frage, weil die meisten Imidazole sehr schnell mit Jod reagieren. Substrat für die Oxydasen-Wirkung war das Cystein⁵⁾; die Reaktion wurde in schwach saurer Lösung ausgeführt, den Sauerstoff-Verbrauch ohne Katalysator haben wir von den katalytischen Werten abgezogen. Für die Ausarbeitung der Methoden war es ein wichtiger Gesichtspunkt, daß die Bildung der Para-hämatine eine Zeitreaktion ist, die in verdünnter Lösung sehr langsam verlaufen kann⁶⁾. Wenn man also die wahre Aktivität der Imidazol-hämene messen will, muß man Hämin und Base in verhältnismäßig konzentrierter Lösung zusammenbringen und diese Mischung als Katalysator zur Substrat-Lösung geben.

¹⁾ VI. Mitteil.: A., im Druck. Zu der vorliegenden Mitteilung vergl. W. Langenbeck, Naturwiss. **20**, 124 [1932]; B. **65**, 842 [1932].

²⁾ W. Langenbeck, B. **65**, 845 [1932].

³⁾ R. Kuhn u. L. Brann, B. **59**, 2370 [1926]; Ztschr. physiol. Chem. **168**, 27 [1927]. ⁴⁾ R. Willstätter u. A. Stoll, A. **416**, 21 [1918].

⁵⁾ D. C. Harrison, Biochem. Journ. **18**, 1009 [1924]; H. A. Krebs, Biochem. Ztschr. **193**, 347 [1928]. ⁶⁾ W. Langenbeck, B. **65**, 843 [1932].