

**253. Über die Enzyme des *Mycobacterium tuberculosis* und anderer säurefester Bakterien.**

3. Mitteilung<sup>1)</sup>.

**Über den enzymatischen Abbau von L-Peptiden durch säurefeste Bakterien<sup>2)</sup>**

von F. Roulet und E. A. Zeller.

(23. IX. 48.)

Im Gegensatz zu der grossen Bedeutung der Tuberkulose für die Human- und Veterinärmedizin stehen die geringen Kenntnisse über den Fermentapparat der Tuberkelbazillen. Diese Feststellung gilt im besondern Maße für die Enzyme des Eiweissaufbaues und -abbaues. Für andere Bakterienarten liegt dagegen schon ein beträchtliches experimentelles Material vor<sup>3)</sup>. Als Gründe für diesen erstaunlichen Tatbestand sind wohl in erster Linie der Mangel an geeigneten Bestimmungsmethoden und die Schwierigkeiten, die mit dem Herauslösen von Fermenten aus säurefesten Bakterien verbunden sind, verantwortlich zu machen. Im Bestreben, die erwähnte Lücke teilweise auszufüllen, versuchten wir vorerst, diese beiden experimentellen Hindernisse zu überwinden.

Als Bestimmungsmethode wurde ein kürzlich entwickeltes manometrisches Verfahren herangezogen, das darin besteht, das zu bestimmende Ferment durch ein zweites, zugesetztes „Messferment“ zu erfassen<sup>4)</sup>. Dieses neue, allgemeinerer Anwendung fähige Prinzip beruht im vorliegenden Falle auf der Eigenschaft fast aller bisher untersuchter Schlangengifte, zahlreiche L-Aminosäuren mit grosser Geschwindigkeit zu oxydieren<sup>5)</sup>. Die Ophio-L-Aminosäureoxydase greift wohl Aminosäuren, aber keine Peptide an. Bei geeigneter Wahl von Peptid, Peptidase und Oxydase bildet die manometrisch leicht erfassbare Oxydationsgeschwindigkeit ein Mass für die Aktivität der Peptidase<sup>6)</sup>. Da die Peptidasen in diesem System eine Aktivierung erfahren, können sehr geringe Aktivitäten derselben gemessen werden<sup>7)</sup>.

<sup>1)</sup> 1. Mitt. F. Roulet und E. A. Zeller, Helv. **28**, 1326 (1945); 2. Mitt. F. Roulet, H. Wydler und E. A. Zeller, Helv. **29**, 1937 (1946).

<sup>2)</sup> Vorläufige Mitteilung F. Roulet und E. A. Zeller, Exper. I, 122 (1945).

<sup>3)</sup> M. J. Johnson und J. Berger, Advances in Enzymology **2**, 69 (1942); E. Maschmann, Ergebnisse der Enzmeforschung **9**, 155 (1943).

<sup>4)</sup> E. A. Zeller und A. Maritz, Helv. physiol. pharmacol. acta **3**, C 6 (1945).

<sup>5)</sup> E. A. Zeller und A. Maritz, Helv. **27**, 1888 (1944); E. A. Zeller, Advances in Enzymology **8**, 459 (1948).

<sup>6)</sup> E. A. Zeller, Helv. physiol. pharmacol. acta **5**, C 22 (1947).

<sup>7)</sup> E. A. Zeller, Helv. physiol. pharmacol. acta **3**, 47 (1945).

Mit diesem Verfahren konnte der Nachweis des enzymatischen Abbaues von L-Peptiden durch intakte säurefeste Bakterien geleistet werden. Um diese Peptidasen eingehender charakterisieren zu können, wurden zahlreiche Mittel versucht, um sie aus den Bakterienkörpern herauszulösen. Die Aufschliessung der Mikroorganismen mit Hilfe von Ultraschallwellen liess uns in den meisten Fällen im Stich. Hingegen konnten beträchtliche Anteile der Peptidasen mit einem einfachen „Homogenizer“ in Lösung gebracht werden, obwohl die Bakterien nach dieser Behandlung nur geringfügige Veränderungen bei der mikroskopischen Kontrolle aufwiesen. Alle andern von uns bisher untersuchten Enzyme gingen bei diesem Verfahren nicht in die Extraktionsflüssigkeit über.

### Experimentelles.

Bakterien. Die gleichen, in den vorangehenden Mitteilungen angeführten Stämme wurden auf *Sauton*-Nährösung gezüchtet. Die auf der Oberfläche sich entwickelnden Schichten wurden abgehoben, zwischen Filterpapierschichten getrocknet und gewogen. Je 40 mg dieses Materials wurden in 1 ml m/15-Phosphatpuffer pH 7,2 suspendiert.

Später wurden die Bakterien mit einer kleinen Menge Phosphatpuffer vermischt und folgendermassen homogenisiert: Ein aus einem Glasrohr von 7 mm geblasener Stempel von 16 mm Durchmesser dreht sich in einem dickwandigen Reagensglas mit einer Geschwindigkeit von 1400 U/min. An der halbkugeligen Unterseite des Stempels sind 5 Erhöhungen angebracht, deren Reibwirkung durch Anschleifen während des Gebrauchs wesentlich gesteigert wird. Glasrohr und Motorenwelle sind mit einem dickwandigen Gummischlauch elastisch miteinander verbunden. Da bei der erwähnten hohen Umdrehungszahl erhebliche Wärmemengen gebildet werden, wird die Aussenseite des Reagensglases mit Eiswasser gekühlt.

Mit diesem Gerät<sup>1)</sup> können bei kurzfristiger Einwirkung und niedriger Tourenzahl die Bakterien in eine homogene Suspension gebracht werden, viel besser, als es bisher durch Zerreiben mit dem Pistill möglich war.

Durch energischere Behandlung — höchste Tourenzahl während 5 Minuten — wurde versucht, nicht nur die Bakterien in eine homogene Suspension zu überführen, sondern die Peptidasen aus den Bakterien heraus zu eluieren. Das Reagensglas wurde bei rotierendem Stempel mehrmals gesenkt und gehoben. Zur Suspension wurde soviel Phosphatpuffer zugefügt als nötig war, um das erwähnte Verhältnis von 40 mg Bakterienmasse zu 1 ml Lösungsmittel zu erhalten. Die Suspension wurde jeweilen über Nacht im Kühlschrank gegen Phosphatpuffer dialysiert und am folgenden Morgen bei einer Tourenzahl von ungefähr 3500 auszentrifugiert. Sowohl die überstehende flüssige Phase als der im ursprünglichen Volumen Phosphatpuffer suspendierte Niederschlag wurden weitere 24 Stunden und länger dialysiert.

**Manometrie.** In den seitlichen Anhang der Manometergefässe wurden die Bakterien, in den zylinderförmigen Einsatz 10-proz. Natriumhydroxyd und in den Hauptraum Schlangengift (*Vipera aspis*, *Naia naia* und *Bothrops atrox*) pipettiert, wobei alle Agentien in Phosphatpuffer gelöst oder suspendiert wurden. Das Gesamtvolumen betrug entweder 2,5 ml oder 3,0 ml. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf das fertige Reaktionsgemisch und nicht auf die einzelnen verwendeten Lösungen.

**Ammoniakbestimmungen.** Für die Destillation des Veraschungsgemisches im Mikro-Kjeldahl wurde der Dampf mit Hilfe eines Tauchsieders von 600 Watt erzeugt. In die Vorlage wurden einige Tropfen Wasser und *Tashiro*-Reagens gegeben, was eine direkte Titration ermöglichte.

<sup>1)</sup> *V. R. Potter*, The Homogenate Technique, in *W. W. Umbreit, R. H. Burris* und *J. F. Stauffer*, *Manometric Methods*, Minneapolis, 1945.

Für die Ammoniakbestimmung in den Fermentansätzen wird die *Conway'sche* Methode benutzt, wobei in den zentralen Teil der „units“ das von *Conway* angegebene Gemisch von Schwefelsäure, *Tashiro-Reagens* und Äthylalkohol, das einer n/150 Schwefelsäure entspricht<sup>1)</sup> eingefüllt wird (1 ml). Nach mehrstündiger Diffusion erfolgt die Rücktitration mit 0,01-n. Natriumhydroxyd aus einer *Bang-Bürette*.

**Ultraschallwellen.** Es wurde ein Piezoquarz von einer Frequenz von 1,49 Megahertz verwendet. Die Leistung des Quarzes betrug ungefähr 300 Watt. Die Bakteriensuspension war in dünnwandige, zylinderförmige Glasgefäße mit flachen Boden eingefüllt, die beschwert und auf den mit Paraffin bedeckten Quarzkristall gestellt wurden. Die Expositionszeit wechselte von einer bis zu zehn Minuten<sup>2)</sup>.

### Ergebnisse.

#### 1. Abbau von L-Peptiden durch unbehandelte Tuberkelbazillen.

Wenn Tuberkelbazillen in einer Sauerstoffatmosphäre geschüttelt werden, so verschwindet der Sauerstoff. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs ist von der verwendeten Kultur und dem Alter derselben abhängig (vgl. Abschnitt 3). Der Zusatz von Schlangengiften mit einer aktiven Ophio-L-Aminosäure-oxydase bewirkt eine geringfügige Steigerung des Sauerstoffverbrauchs. Es treten somit nur sehr kleine Mengen von entsprechenden L-Aminosäuren in das umgebende Medium über. Wenn aber geeignete L-Peptide zu der Bakteriensuspension zugekippt werden, so resultiert eine erhebliche Zunahme des Sauerstoffverbrauchs gegenüber den Kontrollen (Fig. 1). Damit ist mit Sicherheit bewiesen, dass die Tuberkelbazillen die Fähigkeit besitzen, Glycyl-L-leucin, Glycyl-L-tyrosin, L-Leucyl-glycin und L-Leucyl-glycyl-glycin zu zerlegen; die angegebenen Peptide werden, wie schon erwähnt, durch die Ophio-oxydase nicht angegriffen.

Bei der Analyse der Kurven der nachstehenden Figur muss man sich der Tatsache bewusst sein, dass die L-Peptide vorerst in die Bakterien eindringen müssen und erst innerhalb des Bakterienkörpers hydrolysiert werden. Die Reaktionsprodukte treten in die umgebende Lösung über, um schliesslich dort von der Ophio-oxydase angegriffen zu werden. Es erhebt sich somit die Frage, welcher dieser Teilvergänge für die Geschwindigkeit des Gesamtorganges den limitierenden Faktor darstellt. Die Peptide sind so gewählt worden, dass immer nur eine Aminosäure, L-Leucin oder L-Tyrosin, oxydiert wird, da die andere Komponente, Glykokoll, in Gegenwart der Ophio-oxydase nicht zerlegt wird und eine zu vernachlässigende Affinität zu diesem Ferment besitzt. Es kommt somit nicht zu einer Konkurrenz der Reaktionsprodukte um das „Messferment“. An dieser Stelle des Systems herrschen somit einfache, übersichtliche Verhältnisse. Für die Peptide Glycyl-L-leucin und L-Leucyl-glycin sind die Reaktionsprodukte überhaupt identisch, so dass für diese die Geschwindigkeit des Austritts aus den Bakterien und die Oxydationsgeschwindigkeit völlig übereinstimmen müssen. Wenn von der unwahrscheinlichen Annahme vorerst abgesehen wird, dass der Eintritt der beiden Peptide mit sehr verschiedener Geschwindigkeit erfolge, so muss der in Fig. 1 dargestellte Unterschied der Oxydationsgeschwindigkeit nach Zusatz von Leucyl-glycin und Glycyl-leucin auf einem analogen Unterschied der Hydrolysengeschwindigkeiten zurückgeführt werden. Somit sind trotz der Kompliziertheit der verwendeten Systeme offenbar nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen über die Peptidase-Aktivität möglich. Diese Überlegungen wurden durch die in den Abschnitten 4 und 5 mitgeteilten Ergebnisse bestätigt.

Die durch diese Versuche dokumentierte, grosse Permeabilität der Tuberkelbazillen ist von ähnlicher Grössenordnung, wie sie in früheren Mitteilungen für die Diamine (1. Mitteilung, l.c.),  $\alpha$ -Oxysäuren (2. Mitteilung, l.c.) und  $\alpha$ -Ketosäuren<sup>3)</sup> gefunden wurde.

<sup>1)</sup> *E. J. Conway*, Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, London, 1947.

<sup>2)</sup> Wir sind Herrn Prof. Dr. *H. Zickendrath*, Basel, dafür sehr zu Dank verpflichtet, dass er uns seine Ultraschallwellenapparatur zur Verfügung stellte und uns bei der Durchführung der Versuche half.

<sup>3)</sup> *F. Roulet* und *E. A. Zeller*, Verhandl. Schweiz. Naturf. Ges. 127, 112 (1947).

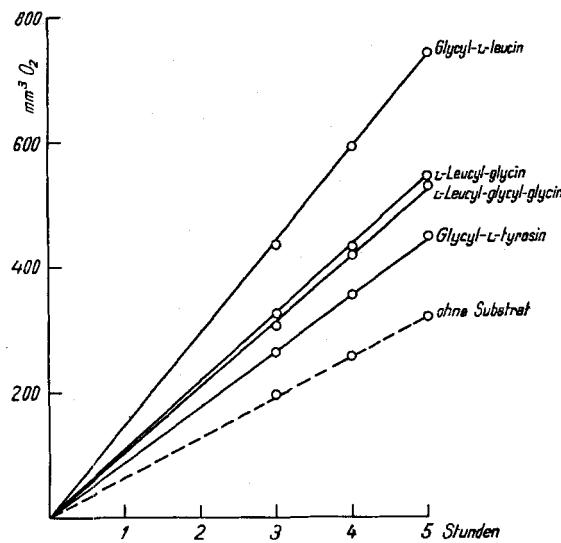


Fig. 1.

Enzymatischer Abbau von L-Peptiden durch Tuberkelbazillen.  
Abszisse: Zeit (Stunden), Ordinate: Sauerstoffverbrauch in  $\text{mm}^3$ . Fermente: 40 mg  
unbehandelte Tuberkelbazillen (typus humanus) Stamm Mt, 12-tägige Kultur; 0,5 mg  
Cobragift. Übrige Versuchsbedingungen vgl. Tabelle 1.

Tabelle 1.

## Hydrolyse von L-Peptiden durch säurefeste Bakterien.

Die angeführten Zahlen geben die nach 5 Stunden verbrauchten  $\text{mm}^3$  Sauerstoff an. In 2,5  $\text{cm}^3$  m/15 Phosphatpufferlösung vom  $\text{p}_\text{H}$  7,2 sind enthalten: 40 mg Bakterien (Feuchtgewicht), 0,02-m. Peptide (GL = Glycyl-L-leucin, GTy = Glycyl-L-tyrosin, LG = L-Leucyl-glycin, LGG = L-Leucyl-glycyl-glycin) und 0,5 mg Schlangengift. Mit Ausnahme des Versuchs mit *M. phloei*, bei dem Gift von *Naia naia* verwendet wurde, handelt es sich um das gleiche Präparat von *Vipera aspis*.  $\Delta$  bezeichnet die Differenz des Sauerstoffverbrauches aus den Ansätzen mit und ohne Substrat.

Stämme	Alter der Kultur	Ohne Substrat	GL	$\Delta$	GTy	$\Delta$	LG	$\Delta$	LGG	$\Delta$
	Tag	$\text{mm}^3$								
<i>Mycobacterium tuberculosis humanum</i>										
Stamm Z <sub>1</sub> . . . . .	13	326	598	272	467	141	710	384	672	356
" A <sub>1</sub> . . . . .	14	244	587	343	422	178	720	476	663	419
" Z <sub>2</sub> . . . . .	14	224	505	281	374	150	672	448	765	541
" Mt . . . . .	14	520	980	460	694	174	1360	840	1025	505
<i>Mycobacterium tuberculosis bovinum</i>										
Stamm Va . . . . .	13	328	434	106	362	34	457	129	497	169
<i>Mycobacterium Smegmatis</i> . . . . .	6	287	1260	973	724	437	1230	943	904	617
<i>Mycobacterium Phloei</i> . . . . .	11	268	467	199	329	61	424	156	348	80

## 2. Abbau von L-Peptiden durch verschiedene säurefeste Bakterien.

In der gleichen Weise, wie im voranstehenden Abschnitt beschrieben wurde, untersuchten wir mehrere Stämme von pathogenen und nicht-pathogenen säurefesten Bakterien auf ihre Fähigkeit, L-Peptide zu zerlegen. Einige der hierbei gewonnenen Ergebnisse wurden in Tab. 1 zusammengefasst.

Aus den Zahlen der Tabelle geht hervor, dass mit wenigen Ausnahmen der Zusatz eines der angeführten L-Peptide eine erhebliche Zunahme des Sauerstoffverbrauchs gegenüber den Kontrollen bedingt. Die Daten geben noch keinen endgültigen Aufschluss über die Frage, ob ein oder mehrere Fermente am Abbau der 4 Peptide beteiligt sind; die letztere Annahme ist wahrscheinlicher als die erstere.

## 3. Einfluss des Alters der Bakterienkultur auf die L-Peptidase-Aktivität.

In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Alter der für die Fermentanalysen verwendeten Bakterienkulturen von erheblichem Einfluss auf die Aktivität der Diamin-oxydase und  $\alpha$ -Oxysäure-oxydase (1. und 2. Mitteilung, l.c.) ist. Dasselbe gilt für die L-Peptidasen (Tab. 2). Es sind bei der Deutung der Resultate die gleichen Überlegungen hinsichtlich der Bedeutung der Permeabilität anzustellen, wie sie in Abschnitt 1 angedeutet wurden. Jedenfalls können vergleichbare Werte nur dann erhalten werden, wenn das Alter der Kulturen berücksichtigt wird. Bei andern Bakterienstämmen wurden ähnliche Schwankungen der Peptidase-Aktivität in Abhängigkeit des Alters gefunden<sup>1)</sup>.

**Tabelle 2.**

### Einfluss des Alters der Kultur *Mycobacterium tuberculosis humanum* auf die Geschwindigkeit des Peptidabbaues.

Die angeführten Zahlen geben die nach 5 Stunden verbrauchten  $\text{mm}^3$  Sauerstoff an. Der Stamm ist derselbe, der in Tabelle 1 als humaner Stamm Mt bezeichnet wird. Schlangengift: 0,5 mg *Vipera aspis*. LTy = L-Leucyl-tyrosin, GTr = Glycyl-L-tryptophan.

Alle übrigen Daten sind bei der Tabelle 1 angegeben.

Alter der Kultur	Ohne Substrat	GL	A	GTy	A	LG	A	LGG	A	LTy	A	GTr	A
Tage	$\text{mm}^3$												
6	313	582	269	466	153	838	525	708	395	641	328	646	333
14	520	980	460	694	174	1360	840	1025	505	916	396		
20	284	650	366	466	182	859	575	601	317	582	298	552	268
28	184	253	69	209	25	279	95	255	71	284	100	242	58
51	29	46	17	39	10	63	34	108	79	113	84	49	20

Aus den in Tab. 2 dargestellten Versuchen geht eindeutig hervor, dass eine enge Verknüpfung zwischen Bakterien-Atmung und Peptidase-Aktivität besteht. Mit wenigen, unbedeutenden Ausnahmen verlaufen beide Prozesse parallel. Das Intensitätsmaximum beider Vorgänge findet sich bei den 14-tägigen Kulturen.

Analoge Ergebnisse erhielten wir mit *Mycobacterium smegmatis*.

Fernerhin geht aus den vorstehenden Ergebnissen hervor, dass außer den früher erwähnten 4 Peptiden noch zwei weitere, L-Leucyl-L-tyrosin und Glycyl-L-tryptophan, durch die Tuberkelbazillen zerlegt werden. Dasselbe gilt auch für eine dreitägige Kultur von Smegmabazillen (Tab. 3).

## 4. Extraktion von L-Peptidasen.

Nachdem die Versuche, die Bakterienstruktur mit Hilfe der Ultraschallwellen zu zerstören und damit die Peptidasen in Lösung zu bringen, misslangen, wurden mechanische

<sup>1</sup> E. Maschmann, l.c.

Mittel herangezogen. In einem gläsernen „Homogenizer“ wurden die Bakterien solange unter Eiskühlung zerrieben (vgl. Experimentelles), bis sie bei den mikroskopischen und färberischen Kontrollen einen teilweisen Zerfall in kleinere Bruchstücke erkennen liessen.

Tabelle 3.

Enzymatischer Abbau von L-Peptiden durch *Mycobacterium smegmatis*.

Die Zahlen geben die nach 5 Stunden verbrauchten  $\text{mm}^3$  Sauerstoff an. Alle übrigen Angaben siehe Tabellen 1 und 2.

Zusätze	Sauerstoffverbrauch	$\Delta$
Bakterien allein . . . . .	500 $\text{mm}^3$	
Bakterien + Gift (V. aspis) . .	656 „	
B. + Gift + GL . . . . .	1340 „	684 $\text{mm}^3$
B. + Gift + GTy . . . . .	1060 „	404 „
B. + Gift + LG . . . . .	1450 „	794 „
B. + Gift + LGG . . . . .	1220 „	564 „
B. + Gift + LTy . . . . .	1139 „	474 „
B. + Gift + GTr . . . . .	1100 „	444 „

Die überwiegende Anzahl der Bakterien wies keine morphologischen Veränderungen auf. Trotzdem war aber ihr Aufbau soweit verändert, dass ein erheblicher Teil der Peptidasen in Lösung ging, wie der in Fig. 2 dargestellte Versuch beweist.

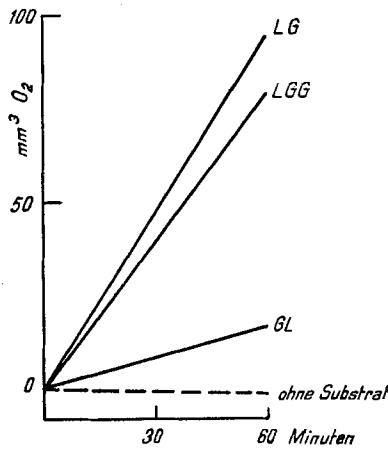


Fig. 2.

Enzymatischer Abbau von L-Peptiden durch Smegmabazillen-Extrakt.  
Abszisse: Zeit (Minuten), Ordinate: Sauerstoffverbrauch in  $\text{mm}^3$ . Fermente: Extrakt aus 20 mg Smegmabazillen einer 4-tägigen Kultur, dialysiert; 1 mg Gift von *Vipera aspis*. Peptide: 0,008-m. Gesamtvolume 3  $\text{cm}^3$ .

Die in dem voranstehenden Versuch (Fig. 2) verwendete Enzimlösung, im folgenden als „Lösung“ bezeichnet, enthielt nur vereinzelte Bakterien. Der Sauerstoffverbrauch der substratlosen Ansätze war äusserst gering. Es liegen somit hier sehr günstige Verhältnisse für Fermentanalysen vor. Wenn aber der Rückstand, der die Hauptmasse der Bakterien-

körper enthielt, in dem ursprünglichen Volumen Phosphatpuffer aufgeschwemmt und diese Suspension, hinfert als „Rückstand“ angeführt, der Peptidase-Bestimmung unterworfen wurde, so ergab sich ein völlig anderes Bild (Fig. 3). Der Sauerstoffverbrauch der scheinbar durch die mechanische Bearbeitung nur wenig veränderten Bakterien ist sehr viel grösser als der der unveränderten Smegmabazillen (vgl. Fig. 1 und Tab. 1). Mit Ausnahme von Glycyl-leucin bewirkt der Zusatz von Peptiden nicht eine Vermehrung, sondern eine Verminderung der Oxydationsgeschwindigkeit, verglichen mit den substratlosen Kontrollen. Dieses Verhalten ist nicht so zu verstehen, dass überhaupt keine Peptide zerlegt werden, sondern dass die Reaktionsprodukte der Peptidase-Spaltung mit den Substraten konkurrieren, die den hohen Sauerstoffverzehr verursachen.

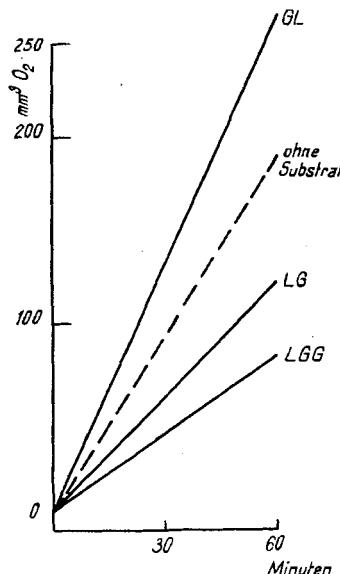


Fig. 3.

**Enzymatischer Abbau von L-Peptiden durch Smegmabazillen**  
Abszisse: Zeit (Minuten), Ordinate: Sauerstoffverbrauch in  $\text{mm}^3$ . Fermente: Rückstände von 20 mg mechanisch bearbeiteten Smegmabazillen, suspensiert in Phosphatpuffer und dialysiert; 1 mg Gift von *Vipera aspis*. Übrige Versuchsbedingungen vgl. Figur 2.

Offenbar ist das Enzym, das für die Hydrolyse von Glycyl-leucin verantwortlich ist, nur spurenweise gelöst worden (Fig. 2); der grösste Teil desselben blieb in den Bakterienkörpern zurück (Fig. 3). In anderen Versuchen, beispielsweise mit Smegmabazillen einer 7-tägigen Kultur, wurde dieses Enzym viel besser extrahiert, während das Ferment, das das Tripeptid zerlegte, nur spurenweise in der „Lösung“ zu finden war. Der „Rückstand“ wies dementsprechend im Vergleich zu Fig. 3 eine grössere Aktivität auf. Hingegen waren alle „Lösungen“ imstande, Leucyl-glycin mit beträchtlicher Geschwindigkeit zu hydrolysieren. Diese Extraktionsversuche lassen sich am ehesten mit der Annahme erklären, dass die drei angewandten Peptide durch drei verschiedene Peptidasen gespalten werden.

Wenn somit einzelne Peptidasen durch unser Verfahren teilweise in Lösung übergeführt werden können, so gilt das nicht für die drei Fermente: Diamin-oxydase,  $\alpha$ -Keto-säure-oxydase und  $\alpha$ -Oxysäure-oxydase (vgl. Abschnitt 1).

In mehreren Versuchen wurde die Verteilung des *Kjeldahl*-Stickstoffs zwischen „Lösung“ und „Rückstand“ gemessen. In der ersten fanden sich Werte, die zwischen 20

und 30 Prozent schwankten, ein weiteres Zeichen dafür, dass durch die mechanische Behandlung eine tiefgreifende Veränderung der Smegmabazillen eingetreten ist.

Bei Extraktionsversuchen mit einem Stamm von *Mycobacterium phloei* wurden analoge Resultate wie mit *Mycobacterium smegmatis* erhalten.

### 5. Peptidabbau durch die Kulturflüssigkeit von Smegmabazillen.

Um festzustellen, ob auch Peptidasen ohne mechanische Beeinflussung in die umgebende Flüssigkeit überreten, wurde die Kulturlösung von Smegmabazillen auf ihre Peptidase-spaltende Fähigkeit untersucht. Ein entsprechender Versuch wurde in Tab. 4 dargestellt.

Tabelle 4.

**Abbau von Glycyl-L-leucin durch die Kulturflüssigkeit von Smegmabazillen.**  
 „Lösung“ und „Rückstand“ wurden aus einer 7-tägigen Smegmabazillen-Kultur hergestellt, wobei wie üblich das Verhältnis von 40 mg Bakterien zu 1 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer eingehalten wurde. Von allen Fermentpräparaten gelangten je 1 cm<sup>3</sup> zur Anwendung. Konzentration von GL 0,008-m. Messung des Sauerstoffverbrauchs nach 60 Minuten. Gesamtvolumen 3 cm<sup>3</sup>.

Enzymquelle	Sauerstoffverbrauch		
	ohne GL	mit GL	Δ
„Lösung“ . . .	-0,5 mm <sup>3</sup>	22 mm <sup>3</sup>	22,5 mm <sup>3</sup>
„Rückstand“ . .	13,5 „	60 „	46,5 „
Kulturflüssigkeit .	1,0 „	10,5 „	9,5 „

Es lässt sich somit in der Kulturflüssigkeit eine deutliche Peptidase-Aktivität nachweisen. Doch ist diese nicht sehr gross, da im Vergleich zu „Lösung“ und „Rückstand“ die 25-fache Menge an Enzymmaterial angewandt worden ist. Ob dieses Ferment „sezeriniert“ oder durch das Absterben und die Autolyse der Bakterien frei wurde, bleibe dahingestellt<sup>1)</sup>.

### 6. Quantitative Peptidase-Bestimmung.

Es konnte in einer früheren Mitteilung gezeigt werden, dass die Methode des Nachweises von L-Peptidasen mit Hilfe der Ophio-oxydase auch zu quantitativen Bestimmungen verwendet werden kann, wenn die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer so gewählt werden, dass die Peptidasen den limitierenden Faktor bilden<sup>2)</sup>. Wie der in Fig. 4 dargestellte Versuch zeigt, können solche Bedingungen auch für die Smegma-peptidase gefunden werden, die Glycyl-L-leucin spaltet.

Die Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn des Versuchs ist unendlich klein, da noch kein Substrat für die Ophio-oxydase vorhanden ist. Bald stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Freisetzung und der Oxydation von Leucin ein, das über eine beträchtliche Zeitdauer zu einer konstanten Oxydationsgeschwindigkeit führt. Innerhalb gewisser Grenzen herrscht eine direkte Proportionalität zwischen der angewandten Peptidase-Menge (bis zu 0,5 cm<sup>3</sup>) und der Oxydationsgeschwindigkeit<sup>3)</sup>. In den Fig. 2 und 3 wurde nur diese Phase konstanter Geschwindigkeit gezeichnet.

<sup>1)</sup> Zur Diskussion dieser Frage vgl. die Monographie von E. Maschmann, I. c.

<sup>2)</sup> E. A. Zeller, Helv. physiol. pharmacol. acta 5, C 22 (1947).

<sup>3)</sup> Eine ausführliche Darstellung der experimentellen und theoretischen Grundlagen der Peptidase-Bestimmung mit Hilfe der Ophio-oxydase erscheint demnächst.

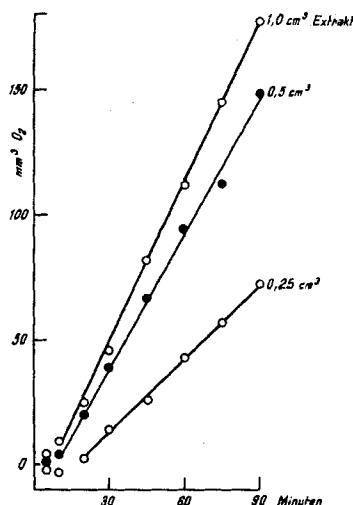


Fig. 4.

Oxydationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Peptidase-Konzentration. Abszisse: Zeit (Minuten), Ordinate: Sauerstoffverbrauch in  $\text{mm}^3$  (Verbrauch der substratfreien Ansätze subtrahiert). Fermente: Dialysierter Extrakt aus Smegmabazillen einer 7-tägigen Kultur; 1 mg Gift von *Vipera aspis*. Substrat: 0,008-m. Glycyl-L-Leucin. Übrige Versuchsbedingungen wie Fig. 2.

#### 7. Desaminierung als Mass für die L-Peptidase-Aktivität.

Bei der Oxydation von L-Aminosäuren durch die Ophio-oxydase wird Ammoniak freigesetzt. In Gegenwart von Katalase, deren Vorhandensein in säurefesten Bakterien früher festgestellt wurde (1. Mitteilung, l.c.), besteht folgende stöchiometrische Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und Ammoniakbildung<sup>1)</sup>:

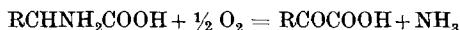


Tabelle 5.

#### Vergleich von Sauerstoffverbrauch und Ammoniakbildung.

Messung des Sauerstoffverbrauchs nach 5 Stunden. Aliquote Teile der Fermentlösungen wurden anschliessend sofort in die Conway-units gegeben. Die angeführten Zahlen stellen Äquivalente  $10^{-5}$  dar. Gleiche Bedingungen wie bei den Versuchen der Tabelle 1 und 2.

Substrate	Mycobact. tub. hum. $\frac{1}{2} \text{O}_2/\text{NH}_3$	Mycobact. smegm. $\frac{1}{2} \text{O}_2/\text{NH}_3$
Glycyl-L-leucin . . . . .	1,6/2,6	6,1/3,6
Glycyl-L-tyrosin . . . . .	1,6/2,3	3,6/3,5
L-Leucyl-glycin . . . . .	5,1/6,2	7,1/5,9
L-Leucyl-glycyl-glycin . .	2,8/2,4	5,0/3,9
L-Leucyl-L-tyrosin . . . .	2,7/2,8	4,2/3,3
Glycyl-L-tryptophan . . .	2,4/1,8	4,0/3,0

<sup>1)</sup> E. A. Zeller und A. Maritz, Helv. 27, 1888 (1944).

Es sollte somit möglich sein, die Peptidase-Aktivität auch durch die Messung des gebildeten Ammoniaks zu verfolgen. Hierfür liegen bei den säurefesten Bakterien günstige Verhältnisse vor, da die Ammoniakwerte der substratfreien Kontrollen sehr gering und im Vergleich mit den Sauerstoff-Äquivalenten um ein bis zwei Zehnerpotenzen kleiner sind. Es schien daher nicht ausgeschlossen, dass auch für die vorliegenden Systeme — Peptid, säurefestes Bakterium, Schlangengift — die erwähnte Gleichung innerhalb gewisser Grenzen erfüllt sein würde. Die in Tab. 5 (S. 1923) zusammengefassten Ergebnisse, die typisch für viele weitere sind, bestätigen diese Erwartung.

Es ist somit durchaus möglich, die Peptidase-Aktivität von säurefesten Bakterien durch Ammoniakbestimmungen zu ermitteln, was um so leichter fällt, als die Reaktionsgeschwindigkeit des gesamten Systems für längere Zeit konstant bleibt.

In der Mehrzahl der Fälle sind die Sauerstoffwerte etwas grösser als die entsprechenden Ammoniak-Äquivalente, was wohl mit der Tatsache zusammenhängt, dass  $\alpha$ -Ketosäuren, die Reaktionsprodukte der oxydativen Desaminierung der  $\alpha$ -Aminosäuren, durch die Myco-Bakterien weiter oxydiert werden können<sup>1)</sup>.

### Diskussion der Ergebnisse.

Nach den geltenden Anschauungen spielen die Peptidasen, zusammen mit andern Gliedern der Gruppe der Proteasen, eine entscheidende Rolle beim Auf- und Abbau der spezifischen Eiweisskörper aller Organismen. Wie in der vorliegenden Publikation angedeutet wurde, sind die Peptidasen auch am Stoffaustausch zwischen Wirt und Parasit beteiligt: Die Peptide dringen sehr leicht in die säurefesten, pathogenen Bakterien ein, und ihre Spaltprodukte, die Aminosäuren, diffundieren aus den Mikroorganismen in die Umgebung hinaus. Ferner bestehen offensichtliche Beziehungen zwischen der Atmungsintensität der Myco-Bakterien und der Aktivität verschiedener L-Peptidasen. Diese wenigen Hinweise mögen genügen, um die Bedeutung der Kenntnisse der Peptidasen für das Studium pathogener Mikroorganismen deutlich zu machen.

Unter den spärlichen Angaben, die in der Literatur über die Existenz von proteolytischen Fermenten zu finden sind, seien die Untersuchungen über die Autolyse von Tuberkelbazillen angeführt<sup>2)</sup>.

Obwohl die vorliegende Mitteilung mehr der Darstellung der Überwindung einiger methodischer Schwierigkeiten gewidmet ist und die angeführten Beispiele nicht viel mehr als Stufen dieser Entwicklung bilden, so wurden ausserdem in säurefesten Bakterien Peptidasen nachgewiesen und einige Eigenschaften derselben festgehalten.

Die verhältnismässig grosse Löslichkeit einzelner Peptidasen, wie beispielsweise derjenigen, die L-Leucyl-glycin spaltet, spricht dafür, daß es sich bei diesen um Lyo-enzyme handelt. Die Ergebnisse der Extraktionsversuche und die Bestimmungen an intakten Bakterien lassen sich am ehesten mit dem Vorhandensein von drei verschiedenen Fermenten, die die drei Peptide Glycyl-L-leucin, L-Leucyl- und L-Leucyl-glycyl-glycin angreifen, vereinbaren. Das Verhältnis

<sup>1)</sup> F. Roulet und E. A. Zeller, Verhandl. Schweiz. Naturf. Ges. **127**, 112 (1947).

<sup>2)</sup> R. Laporte, Ann. Inst. Pasteur **69**, 262 (1943).

zwischen den Aktivitäten gegenüber je zwei Peptiden schwankt so stark, dass kaum eine andere Deutung übrigbleibt (Tabelle 6).

Tabelle 6.

Schwankungsbreite von Quotienten der Oxydations-Geschwindigkeit von je zwei Peptiden.

	Intakte Smegmabazillen	Fermentlösung aus Smegmabazillen
GL		
LGG	1,1—2,2	0,2—9,3
LGG		
LG	0,3—0,9	0,1—0,9
LG		
GL	1,0—1,5	1,4—5,6

Wenn die Ergebnisse der Versuche mit nahe verwandten Stämmen mit herangezogen werden, so wird die Schwankungsbreite der in Tabelle 6 angeführten Quotienten noch wesentlich grösser.

#### Zusammenfassung.

1. Es wurde ein Verfahren zur Erfassung von L-Peptidasen in säurefesten Bakterien beschrieben, das auf der Eigenschaft der Ophio-L-Aminosäure-oxydase beruht, L-Aminosäuren, aber nicht L-Peptide, anzugreifen. Unter geeigneten Bedingungen stellt sich zwischen der Bildung von Aminosäuren aus den Peptiden unter der Einwirkung der Peptidasen und der Oxydation der Aminosäuren ein Gleichgewicht ein, das eine quantitative Bestimmung der Peptidasen ermöglicht. Es wurde entweder der Sauerstoff-Verbrauch oder die Ammoniak-Bildung gemessen und damit zum ersten Male in Tuberkelbazillen und verwandten Bakterien L-Peptidasen nachgewiesen.

2. Auf mechanischem Weg wurden einzelne Peptidasen aus den Bakterien gelöst. Die Atmung dieser Lösungen war im Gegensatz zu der der Bakterien äusserst gering, so dass sich jene als günstig für Fermentanalysen erwies. Von den verschiedenen Substraten wurde L-Leucyl-glycin am raschesten durch die Lösungen hydrolysiert.

3. Mehrere Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* humanum und ein Stamm von *Mycobacterium smegmatis* zerlegten die Peptide Glycyl-L-leucin, L-Leucyl-glycin, L-Leucyl-glycyl-glycin, Glycyl-L-tyrosin, L-Leucyl-L-tyrosin und Glycyl-L-tryptophan. Die vier ersten Substrate wurden auch an je einem Stamm von *Mycobacterium tuberculosis bovinum* und *Mycobacterium phloei* ausprobiert und als geeignete Substrate befunden. Die drei erstgenannten Peptide scheinen durch drei verschiedene Peptidasen angegriffen zu werden.

4. Zwischen dem Alter der Kulturen, der Atmung der Bakterien und der Peptidase-Aktivität besteht eine enge Abhängigkeit. Der Peptid-Abbau steigt mit zunehmender Intensität der Bakterien-Atmung.

5. In der Kulturflüssigkeit von Smegmabazillen lässt sich eine geringe Aktivität gegenüber Glycyl-L-leucin nachweisen.

Die Durchführung der Arbeit wurde durch die Unterstützung der *J. R. Geigy AG.*, Basel, ermöglicht. Wir sind der Firma zu grossem Dank verpflichtet. Wir danken Fr. *H. Wydler* und Fr. *I. Muhr* für die wertvolle Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Pathologisch-anatomische Anstalt der Universität, Basel.

#### 254. Etudes sur les matières végétales volatiles, LXXI<sup>1)</sup>.

#### Absorption spectrale des dinitro-2,4-phénylhydrazones des citrals et des ionones

par Yves-René Naves et Pierre Ardizio.

(28 IX 48)

*Allen*<sup>2)</sup> a décrit deux dinitro-2,4-phénylhydrazones de citral (I), F. 108—110° et (II), F. 96°, qu'on a rapportées respectivement aux citrals stéréoisomères a et b. *M. et G. Igolen*<sup>3)</sup> ont décrit à leur tour deux produits, F. 107—108° et F. 95—96°, tandis que *Strain*<sup>4)</sup> rapporte 115° et 99° et *Shriner et Fuson*<sup>5)</sup> 116°.

Nous avons constaté que le dérivé attribué au citral a ne se liquéfie qu'incomplètement entre 107° et 110°; il se solidifie ensuite très rapidement, la température étant élevée progressivement, et ne fond intégralement qu'entre 125° et 125,5°. La polymorphie de dinitro-2,4-phénylhydrazones a été plusieurs fois mentionnée<sup>6)</sup>.

La dinitro-2,4-phénylhydrazone d' $\alpha$ -ionone F. 151—151,5° et celle de  $\beta$ -ionone à 129—129,5°<sup>7)</sup>.

Des spectres de dinitro-2,4-phénylhydrazones ont été étudiés par *Marvel et Inskeep*<sup>8)</sup> et par *Roberts et Green*<sup>9)</sup>. Les dérivés d'aldéhydes

<sup>1)</sup> LXXème communication: *Helv.* **31**, 248 (1948).

<sup>2)</sup> Am. Soc. **52**, 2958 (1930).

<sup>3)</sup> Parfums de France, **1938**, 115.

<sup>4)</sup> Am. Soc. **57**, 760 (1935).

<sup>5)</sup> The systematic identification of organic compounds, 3ème éd., 229, New-York, 1948.

<sup>6)</sup> Voyez *Helv.* **31**, 1873, note 1 (1948).

<sup>7)</sup>  $\alpha$ -Ionone: *Naves et Perrottet*, *Helv.* **24**, 19 (1941);  $\beta$ -ionone: *Strain*, Am. Soc. **57**, 760 (1935).

<sup>8)</sup> Am. Soc. **65**, 1710 (1943).

<sup>9)</sup> Am. Soc. **68**, 214 (1946).