

# Vergleichende Untersuchungen über einige proteolytische Fermente pflanzlicher Herkunft.

Von

Emil Abderhalden und Yutaka Teruchi, Tokio.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. August 1906.)

Vor kurzem hat der eine von uns in Gemeinschaft mit P. Rona<sup>1)</sup> auf die große Bedeutung der von Emil Fischer dargestellten Peptide für die Klassifizierung der proteolytischen Fermente hingewiesen. Pepsinsalzsäure hat bis jetzt noch keines der untersuchten Peptide gespalten, während Pankreassaft viele derselben rasch in ihre Komponenten zerlegt, bzw. rasch angreift.<sup>2)</sup> Ein ganz besonders geeignetes Peptid ist nach dieser Richtung das Glycyl-l-tyrosin. Es ist durch seine große Löslichkeit in Wasser ausgezeichnet. Seine Komponenten lassen sich sehr leicht nachweisen, indem das Tyrosin selbst in Wasser sehr schwer löslich ist, während das Glykokoll durch die Schwerlöslichkeit seines Esterchlorhydrates leicht festgestellt werden kann. Das Peptid selbst krystallisiert nicht und ist hygroskopisch, sehr schöne Eigenschaften hat dagegen das in Alkohol schwer lösliche Esterchlorhydrat und ferner das aus heißem Wasser unkrystallisierbare Glycyl-l-tyrosinanhydrid, das leicht aus dem Ester des Dipeptides durch Kochen mit alkoholischem Ammoniak zu gewinnen ist. Beide Verbindungen sind geeignet, um das unveränderte Dipeptid nachzuweisen. Wir verweisen in bezug auf die Einzelheiten der Durchführung einer derartigen Untersuchung auf die oben zitierte Arbeit.<sup>1)</sup> Ist Tyrosin aus dem Glycyl-l-tyrosin beim Versuche abgeschieden worden, so läßt es sich immer, wenn

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden und Peter Rona, Zur Kenntnis des proteolytischen Fermentes des Pylorus- und des Duodenalsaftes, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 359, 1906.

<sup>2)</sup> Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 52, 1905.

es nicht durch besondere Umstände in Lösung gehalten wird, als krystallinische Abscheidung an den Wänden des Gefäßes nachweisen. Dadurch gestaltet sich der ganze Versuch qualitativ zu einem außerordentlichen einfachen und überzeugenden. In manchen Fällen wird die Verwendung des genannten Peptids noch übertroffen werden durch die Benützung optisch aktiver Peptide. In diesem Falle zeigt die Änderung der Drehung sofort den Eintritt der Hydrolyse an. Glücklicherweise drehen manche Peptide in wässriger Lösung schon sehr stark, während die entstehenden Spaltstücke, die Aminosäuren, wie z. B. das Alanin, in wässriger Lösung fast gar keine Drehung aufweisen.

Es schien uns von Interesse, mit Hilfe des Glycyl-l-tyrosins einige proteolytische Fermente der Pflanzenwelt zu untersuchen. Wie schon früher betont wurde, sind wir bis jetzt nicht imstande, die proteolytischen Fermente nach ihrer Wirkung in allen Einzelfällen zu gruppieren. Bis jetzt können wir mit Sicherheit nur zwei große Gruppen aufstellen, nämlich die Gruppe des Trypsins und die Gruppe des Pepsins, und als sicherstes Kennzeichen der Zugehörigkeit bestimmter Fermente zu der einen oder anderen Gruppe können wir das Verhalten gegen Peptide und speziell gegen Glycyl-l-tyrosin betrachten. Dieses Peptid wird von Trypsin rasch gespalten, von Pepsin dagegen nicht in nachweisbarer Menge hydrolysiert. Es muß unser Bestreben sein, über die grobe Einteilung hinaus eine Untergruppierung in jeder der beiden Typen herbeizuführen. Dieses Ziel dürfte wohl ausschließlich mit Hilfe der von Emil Fischer dargestellten Peptide erreichbar sein.

Wir haben vorläufig Hefepreßsaft, Papayotin und Saft von Nepenthes untersucht. Es seien die einzelnen Versuche angeführt.

### 1. Versuche mit Hefepreßsaft.

Der verwendete Preßsaft wurde genau nach den Angaben, die uns Herr Prof. E. Buchner, dem wir auch hier für seine große Freundlichkeit herzlich danken, machte, dargestellt. Bekanntlich ist ein proteolytisches Ferment im Hefepreßsaft schon längst beschrieben und als Endotryptase bezeichnet worden. Ihm ist auch das rasche Zugrundegehen der Zymase im Preß-

saft zugeschrieben worden. Wie unsere Versuche ergeben haben, ist im Hefepreßsaft tatsächlich ein sehr aktives proteolytisches Ferment vorhanden, und zwar findet es sich auch dann noch, wenn die Zymase bereits unwirksam geworden ist.

1. Glycyl-glycin: 1,5 g dieses Peptides wurden in 15 ccm Wasser gelöst, mit 10 ccm Hefepreßsaft versetzt und die Lösung unter Zusatz von Toluol drei Tage im Brutraum aufbewahrt. Die Flüssigkeit wurde dann kurz aufgeköcht, filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Nach der Veresterung erhielten wir 1,1 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt  $140^{\circ}$  (unkorr.) und 0,4 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt  $178^{\circ}$  (unkorr.). Es war somit der größte Teil des verwendeten Glycyl-glycins gespalten worden.

2. Glycyl-l-tyrosin: Von diesem Peptid verwandten wir 0,5 g. Es wurde in 10 ccm Wasser gelöst und die klare Lösung unter Zugabe von 10 ccm Preßsaft und Toluol 4 Tage in den Brutraum gestellt. Es zeigten sich bald Abscheidungen. Ihre Menge war allerdings sehr gering. Bei der großen Verdünnung, die wir angewandt hatten, sprach dieser Befund nicht im Sinne einer ausgebliebenen oder nur in geringem Umfang eingetretenen Spaltung. Wir kochten die Verdauungsflüssigkeit kurz auf, filtrierten und engten dann ein. Hierbei schieden sich 0,15 g Tyrosin ab. Aus der Mutterlauge suchten wir Glykokoll als Esterchlorhydrat zu gewinnen. Seine Menge war jedoch zu gering, um es mit Sicherheit zu identifizieren. Daß eine Spaltung von Glycyl-l-tyrosin mit Hefepreßsaft stattfindet, bewies ein zweiter Versuch, bei dem 1 g Glycyl-l-tyrosin in 10 ccm Hefepreßsaft direkt gelöst wurden. Sehr bald erschienen an der Wand des Gefäßes krystallinische Abscheidungen. Sie wurden jeden Tag entfernt. Nach 4 Tagen hatten wir auf diese Weise 0,35 g reines Tyrosin gewonnen. Nach dem Enteiweißen gewannen wir durch Einengen der Flüssigkeit noch 0,1 g Tyrosin und aus der Mutterlauge vom Tyrosin stellten wir 0,15 g Glykokollesterchlorhydrat dar, und zwar in der Weise, daß wir die Ester aus den Esterchlorhydraten, die wir durch Veresterung des Trockenrückstandes der Tyrosinmutterlauge gewonnen hatten, mit Natriumalkoholat in Freiheit setzten und im Destillat auf Glykokoll fahndeten. Man

vermeidet so eine Verdeckung des vorhandenen Glykokollesterchlorhydrates durch das sehr schwer lösliche Glycyl-tyrosinesterchlorhydrat, ein Umstand, der eventuell eintreten kann, wenn die ursprüngliche Mutterlauge des Tyrosins direkt auf Glykokoll untersucht wird. Den sehr geringen Destillationsrückstand kochten wir mit alkoholischem Ammoniak. Es gelang, eine geringe Menge von Glycyl-tyrosinanhydrid zu gewinnen, das nach dem Umkrystallisieren aus heißem Wasser gegen 280° (korr.) sich zersetzte. Natürlich überzeugten wir uns durch eine Kontrollprobe ohne Peptid, daß die gebildeten Aminosäuren Tyrosin und Glykokoll aus der zugesetzten Verbindung stammten.

## 2. Versuche mit Papayotin.

Das verwendete Papayotin war frisch von Merck, Darmstadt, bezogen. Wir lösten 0,5 g davon in 20 ccm Wasser und setzten soviel Natriumbicarbonat dazu, bis die Reaktion deutlich alkalisch war. Diese Flüssigkeit löste 1 g Fibrin im Brutraum in weniger als 15 Stunden auf. Zu unseren Versuchen verwendeten wir 1,5 g Glycyl-l-tyrosin. Diese Menge wurde zu einer Lösung von 1 g Papayotin in 10 ccm Wasser zugegeben. Auch hier wurde die Lösung mit Natriumbicarbonat schwach alkalisch gemacht. Nach zweitägigem Stehen des Gemisches bei Zimmertemperatur war eine geringe Abscheidung erfolgt, die sich als Tyrosin erwies. Dessen Filtrat bewahrten wir nun noch 5 Tage im Brutraum auf. Hierbei schieden sich 0,08 g reines Tyrosin aus. Die Mutterlauge vom Tyrosin verdampften wir unter vermindertem Druck zur Trockene und veresterten den Rückstand, wie gewöhnlich. Aus dem Destillat der in Freiheit gesetzten Ester gewannen wir 0,02 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 140° (unkorr.) und aus dem Destillationsrückstand 0,5 g Glycyl-tyrosinanhydrid, das sich gegen 278° zersetzte. Papayotin gehört somit ganz offenbar in die Gruppe der trypsinartig wirkenden proteolytischen Fermente.

## 3. Versuche mit dem Inhalt von Kannen von *Nepenthes*.

Von ganz besonderem Interesse erschien es uns, die proteolytischen Fermente der fleischfressenden Pflanzen auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Sie sind sehr verschieden beurteilt

worden, bald sprach man sie als Pepsin an, bald als Trypsin, ja es fehlt nicht an Stimmen, welche überhaupt bezweifeln, daß die fleischfressenden Pflanzen Eiweiß verdauende Säfte abgeben und an eine Mitwirkung von Mikroorganismen denken. Wir konnten unsere Versuche vorläufig nur auf den Inhalt von Nepentheskannen ausdehnen, hoffen jedoch in Bälde auch andere fleischfressende Pflanzen in den Kreis unserer Untersuchungen ziehen zu können. Die Benutzung des ausgeschiedenen Saftes von Nepenthes verdanken wir der großen Güte des Herrn Geh.-Rat Prof. Engler. Wir benutzten nur solche Kannen, deren Deckel fest geschlossen waren, und die allem Anschein nach keine größeren Mengen von Kondenswasser aus dem Gewächshaus enthielten. Der Saft dieser Kannen war fadenziehend und reagierte neutral. Er griff Fibrinflocken sehr langsam, aber deutlich an, denn in relativ kurzer Zeit — nach 3 Tagen — gab die abfiltrierte Verdauungsflüssigkeit deutlich die Biuretreaktion.

1 g Glycyl-l-tyrosin lösten wir direkt in 10 ccm der aus mehreren Nepentheskannen gesammelten Flüssigkeit und bewahrten die Lösung nach Zusatz von Toluol einige Zeit bei gewöhnlicher Temperatur auf. Mit Ausnahme einer leichten Trübung war keine Abscheidung zu beobachten. Wir brachten deshalb die Flüssigkeit nach 7 Tagen in den Brutraum. Sie zeigte keine Vermehrung der leichten Opaleszenz und auch beim Einengen auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens erhielten wir keine Ausscheidung. Daß die etwa vorhandene Spaltung des Glycyl-l-tyrosins keine sehr umfangreiche sein konnte, bewies der Umstand, daß sich 0,7 g Glycyl-tyrosinesterchlorhydrat isolieren ließen. Ferner gewannen wir aus dem Rückstand der Destillation der Ester noch 0,05 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid.

Es scheint somit, daß die fleischfressende Pflanze Nepenthes nicht über ein trypsinähnliches Ferment verfügt. Wir wagen es nicht, unseren Befund als einen gesicherten hinzustellen, weil es uns aus Mangel an Material unmöglich war, den Versuch unter verschiedenen Bedingungen zu wiederholen. Wir werden diese Untersuchungen wieder aufnehmen und auch auf andere fleischfressende Pflanzen ausdehnen.