

Die Wirkung der proteolytischen Fermente keimender Samen des Weizens und der Lupinen auf Polypeptide.

Von

Emil Abderhalden und Alfred Schittenhelm.

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

(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1906.)

Wie namentlich die Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben, spielen bei den Stoffwechselfvorgängen speziell der keimenden Samen proteolytische Fermente eine sehr bedeutungsvolle Rolle.¹⁾ Das Reserveeiweiß wird abgebaut, es entstehen Aminosäuren und kompliziertere Spaltprodukte, und diese Bausteine werden von neuem zum Aufbau von Eiweiß verwendet. In der Tat besteht zwischen den im keimenden Pflanzensamen sich abspielenden Prozessen und den im Darmkanal der Tiere vor sich gehenden eine weitgehende Analogie. Hier wie dort stehen Abbau und Synthese einander gegenüber. Es war nun von Interesse, zu verfolgen, ob die proteolytischen Fermente keimender Samen in gleicher Weise auf Peptide einwirken, wie die entsprechenden Fermente des Tierreiches. Wir benützten zu diesen Versuchen keimende Weizen- und Lupinensamen. Diese wurden zunächst mit Sand im Mörser zerquetscht und zerrieben und dieses Produkt dann mit Kieselgur zu einer plastischen Masse zusammengeknetet. Diese wurde dann in Segeltuch eingeschlagen und unter einem Druck von 300 Atmosphären ausgepreßt. Der so erhaltene Preßsaft war hellbraun gefärbt. Wir setzten von ihm bestimmte Mengen zur Lösung von Glycyl-

¹⁾ Es sei auf die eben erschienene wertvolle Übersicht von E. Schulze, Über den Abbau und den Aufbau organischer Stickstoffverbindungen in den Pflanzen, Landwirtschaftl. Jahrbücher, Bd. XXXV, S. 621, 1906, hingewiesen.

glycin, dl-Leucyl-glycin und Dialanyleystin hinzu und konnten durch den Nachweis von aktiven Aminosäuren in allen Fällen beweisen, daß eine Spaltung stattgefunden hatte. Natürlich überzeugten wir uns durch Kontrollversuche, daß die von uns verwendeten Mengen von Preßsaft keine oder doch nur Spuren von Aminosäuren enthielten.

Auch hier erfolgte die Hydrolyse bei der Verwendung von racemischen Peptiden asymmetrisch, d. h. es wird nur die eine Hälfte des Racemkörpers angegriffen. Als Produkte der Hydrolyse treten stets diejenigen aktiven Aminosäuren auf, welche in den natürlichen Proteinen enthalten sind. Es fragte sich, ob auch racemische Aminosäuren selbst unter dem Einfluß von Organpreßsäften und von Pankreassaft gespalten werden. Wir kamen zu dieser Fragestellung, weil man durch Einführung racemischer Aminosäuren unter Umständen die Ausscheidung der einen optischen Komponente im Urin feststellen kann. So fand Wohlgemuth,¹⁾ daß nach der Verfütterung von viel dl-Leucin beim Kaninchen d-Leucin in den Harn übertritt. Es muß in diesem Fall das dl-Leucin gespalten worden sein. Das l-Leucin wird verbrannt, während die der in der Natur vorkommenden optisch aktiven Komponente entgegengesetzte Form, das d-Leucin, nur zum Teil abgebaut wird. Eine Trennung optisch inaktiver Aminosäuren in ihre optisch aktiven Komponenten durch Preßsäfte wäre natürlich von der größten Wichtigkeit. Wir können gleich hier erwähnen, daß die verwendeten Organpreßsäfte und auch der Hefepreßsaft keine

¹⁾ J. Wohlgemuth, Über das Verhalten stereoisomerer Substanzen im tierischen Organismus. Die inaktiven Monoaminosäuren, Berichte der Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVIII, S. 2064, 1905. — Vergl. auch A. Schittenhelm und A. Katzenstein, Verfütterung von i-Alanin am normalen Hunde, Zeitschrift f. experim. Path. u. Ther., Bd. II, S. 560, 1906, und Emil Abderhalden und F. Samuely, Der Abbau des Leucins und Leucyl-leucins im Organismus des Hundes, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 346, 1906. — Von größtem Interesse ist nach dieser Richtung die Beobachtung von F. Ehrlich (Über eine Methode zur Spaltung racemischer Aminosäuren mittels Hefe, Biochemische Zeitschrift, Bd. I, S. 8, 1906), daß Hefe racemische Aminosäuren spaltet, d. h. sie verwendet die eine optisch aktive Komponente und läßt die andere zum größten Teil zurück.

für uns nachweisbare Spaltung bewirkten. Die zugesetzten Aminosäuren blieben inaktiv, und wenn sich auch ab und zu eine geringe Drehung nachweisen ließ, dann blieb es unentschieden, ob sie nicht durch irgend einen Stoff des Organsaftes bedingt war. Diese Versuche waren auch deshalb unternommen worden, weil wir hofften, von ihnen aus einen Einblick in den normalen Abbau der Aminosäuren in den Geweben zu erhalten. Bei unserer Versuchsanordnung, bei der vor allem jede Einwirkung von Mikroorganismen peinlichst ausgeschlossen wurde, vermochten wir eine Desamidierung der zugesetzten Aminosäuren in keinem Falle zu beobachten. Wir gewannen die zugesetzten Aminosäuren fast quantitativ wieder. In einem Fall, in dem nach Zusatz von Hefepreßsaft eine nicht unbedeutende Drehung des isolierten Alanins nachweisbar, ließ sich durch Darstellung der β -Naphthalinsulfoverbindung der Nachweis führen, daß trotzdem dl-Alanin vorlag. Der negative Ausfall dieser Versuche war vorauszusehen, weil eine nachweisbare Spaltung nur dann zu erwarten wäre, wenn eben die eine optisch aktive Komponente verbraucht würde. Wir müssen deshalb nach Bedingungen suchen, unter denen es zum Abbau der einen Hälfte des Racemkörpers kommt. Vielleicht führt die Verwendung von Oxydasen zum Ziel.

Experimenteller Teil.

1. Versuche mit Preßsaft aus keimenden Lupinensamen.

a) 2,5 g dl-Leucyl-glycin wurden in 75 ccm Wasser gelöst und 25 ccm Preßsaft nebst etwas Toluol zugesetzt. Dieses Gemisch wurde 2 Tage lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die weitere Verarbeitung war dieselbe, wie sie wiederholt an dieser Stelle beschrieben worden ist. Auch hier wurde die Estermethode angewandt und die Trennung der einfachen Aminosäureester von den Peptidestern durch die Destillation der freien Ester bis 100° bewerkstelligt. Hierbei gehen die Aminosäureester über und schließlich können die noch im Destillationskolben zurückgebliebenen einfachen Aminosäureester mit Äther ausgelaugt werden. Im Destillationsrückstand suchten wir dann das etwa vorhandene Dipeptid durch die Überführung des Esters

in das Anhydrid festzustellen. Bei diesem Versuche gewannen wir 0,35 g Glykokoll und 0,8 g Leucin. Leucyl-glycinanhydrid konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Seine Menge reichte jedoch zu einer Bestimmung des optischen Verhaltens nicht aus. Das isolierte Leucin erwies sich als l-Leucin. Es ergab im 1 dm-Rohr in 20% iger Salzsäure bei Natriumlicht $[\alpha]_{20.0}^D = + 14,8^\circ$. Es war also auch hier offenbar eine asymmetrische Spaltung eingetreten.

b) 2,5 g Glycyl-glycin wurden in 20 ccm Wasser gelöst, und die Lösung nach Zusatz von 25 ccm Preßsaft 2 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Auch hier wandten wir nach vorheriger Dialyse die Estermethode an. Bei der Veresterung fand nach erfolgter Abkühlung bald eine reichliche Abscheidung von Krystallen statt. Sie schmolzen bei 142° (unkorr.). Offenbar lag Glykokollesterchlorhydrat vor. Wir verzichteten auf seine direkte Isolierung, weil Glycyl-glycinesterchlorhydrat beigemischt sein konnte, und setzten zunächst die Ester mit der berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit. Aus dem Destillat gewannen wir durch Einengen des Gemisches von Alkohol und der Monoaminosäureester durch Einleiten gasförmiger Salzsäure Glykokollesterchlorhydrat und zwar 1,5 g. Es schmolz gegen 142° (unkorr.). Aus dem Destillationsrückstand erhielten wir 0,8 g Glycinanhydrid. Das verwendete Glycyl-glycin war somit in beträchtlichem Maße gespalten worden.

2. Versuche mit Preßsaft aus keimendem Weizensamen.

a) Glycyl-glycin: Angewandt wurden 3 g Peptid, die in 20 ccm Wasser gelöst waren, 20 ccm Preßsaft und etwas Toluol. Dieses Gemisch blieb 5 Tage lang bei Zimmertemperatur stehen. Auch hier wurde dialysiert, das Dialysat eingedampft und der Rückstand verestert. Isoliert wurden 1,5 g Glykokollesterchlorhydrat. Glycinanhydrid war vorhanden, ließ sich jedoch nicht völlig rein gewinnen.

b) Dialanyl-cystin: Verwendet wurden 2 g des Peptids. Sie wurden in 20 ccm Wasser gelöst, und die Lösung mit 20 ccm Preßsaft nach Toluolzusatz 5 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Es schieden sich wohl dunkel gefärbte Massen ab,

die jedoch nicht als Cystin identifiziert werden konnten. Wir verzichteten deshalb auf den Nachweis des Cystins und fahndeten auf freies Alanin. Dieses wurde mit Hilfe der Estermethode isoliert. Es wurden 0,6 g salzsaures Alanin von der spezifischen Drehung $[\alpha]_{20}^D = +10,0^\circ$ erhalten. Den Destillationsrückstand haben wir nicht weiter untersucht.

c) dl-Leucyl-glycin: Mit diesem Peptid haben wir 2 Versuche ausgeführt. Beim einen verwandten wir 3 g und beim zweiten 2 g Peptid. Beim ersten Versuche war das Leucyl-glycin in ca. 100 ccm Wasser gelöst und mit 50 ccm Preßsaft versetzt worden. Das Gemisch blieb 5 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Im zweiten Fall lösten wir das Peptid in ca. 60 ccm Wasser und gaben neben Toluol 20 ccm Preßsaft zu. Auch dieser Versuch dauerte 5 Tage. In beiden Fällen gewannen wir Glykokoll und l-Leucin und zwar in Versuch I 0,45 g Glykokollesterchlorhydrat und 0,8 g l-Leucin und im zweiten Versuch 0,30 g Glykokollesterchlorhydrat und 0,6 g l-Leucin.

Die Analyse des Leucins aus dem ersten Versuch ergab:

0,1609 g Substanz gaben 0,3239 g CO_2 und 0,1463 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$: Gefunden:

54,96% C und 9,92% H. 54,90% C und 10,10% H.

Beim zweiten Versuch wurde für das Leucin in salzsaurer Lösung

$$[\alpha]_{20}^D = +14,9^\circ$$

gefunden. Leucyl-glycinanhydrid konnte nicht in reinem Zustande gewonnen werden.