

Fermentative Spaltung von Dipeptiden.¹⁾

Von
Hans Euler.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. Februar 1907.)

Nachdem E. Fischer und E. Abderhalden festgestellt hatten, daß eine Anzahl von abiureten Polypeptiden durch Pankreassaft nicht verdaut werden, zeigte vor kurzem E. Abderhalden mit Yutaka Teruuchi²⁾ und A. Schittenhelm³⁾, daß die durch Pankreassaft nicht angreifbaren Peptide von Erepsin, dem von O. Cohnheim zuerst aus der Darmschleimhaut gewonnenen Ferment gespalten werden.

Die letzteren wichtigen Arbeiten veranlaßten eine vorläufige Mitteilung meiner schon früher angestellten Untersuchungen⁴⁾ über den zeitlichen Verlauf der Dipeptidspaltung, welche hier im Zusammenhang mit der einschlägigen Trypsinliteratur dargestellt werden sollen.

Mit der Methode der elektrischen Leitfähigkeit, welche bereits Sjöquist⁴⁾ bei der Verfolgung der Pepsinverdauung angewandt hatte, haben V. Henri und Languier des Bancels⁵⁾ und neuerdings Bayliss⁶⁾ die Trypsinwirkung studiert. Henri und sein Mitarbeiter geben 4 Versuchsreihen für die tryptische Spaltung der Gelatine an, aus denen sie folgende Schlüsse ziehen:
1. Die Aktivität des Trypsins bleibt bei der Verdauung während

¹⁾ Siehe Svenska Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. II, Nr. 31. Mitgeteilt 14. Nov. 1906.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 1, 1906.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 26, 1906.

⁴⁾ Skand. Archiv f. Physiologie, Bd. V (1895).

⁵⁾ C. r. Soc. de Biol., Bd. LV, S. 563, 787, 788, 866 (1903).

⁶⁾ Archives des sciences biol., Bd. XI, Suppl. 261 (1904).

1. Stunde konstant. 2. Die Reaktionsprodukte verzögern die Reaktion. 3. Die Änderung der Leitfähigkeit während der ersten Stunde kann durch das logarithmische Gesetz $K = 1/t \cdot \log a - a-x$ dargestellt werden.

Die zwei mit Casein angestellten Versuche zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Gelatine-Versuche.

Weit eingehender ist die Untersuchung von Bayliss: auch diese ist an Gelatine und Casein angestellt. Von den Ergebnissen seien folgende hervorgehoben:

1. Die Reaktionsgeschwindigkeit folgt nicht der logarithmischen Kurve, sondern nimmt wegen des verzögernden Einflusses der Reaktionsprodukte mit der Zeit ab. 2. Die Geschwindigkeitskonstante K ist proportional der Substratkonzentration bis zu 4%igen Caseinlösungen: in 4—8%igen Caseinlösungen ist die Geschwindigkeit unabhängig von der Caseinkonzentration und nimmt in noch konzentrierteren Lösungen ab. 3. Zu Beginn der Reaktion ist die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional der Enzymmenge, später wird die Beziehung eine Exponentialfunktion und schließlich wird die Geschwindigkeit unabhängig von der Enzymkonzentration. 4. Der Reaktionsverlauf wird am besten erklärt durch die Annahme einer Verbindung, sowohl zwischen Trypsin und Substrat, als zwischen Trypsin und den Reaktionsprodukten.

Auch für das Studium der chemischen Dynamik der Trypsinwirkung ist die Anwendung der von E. Fischer dargestellten Dipeptide von größtem Vorteil. Während früher bei den Messungen¹⁾ an so schlecht definierten Produkten wie Witte-Pepton oder an so komplizierten Körpern wie Gelatine eine Menge unbekannter, gleichzeitig verlaufender Reaktionen zu einem chemisch quantitativ und qualitativ undefinierten Endzustand führten — Casein stellte schon ein relativ günstiges Material dar. — kann erst jetzt, wo in den Dipeptiden ein einheitliches Substrat bekannter Konstitution gewonnen ist, dessen Spaltung

¹⁾ Hier ist nicht von solchen in heterogenem System, also nach Metts Methode ausgeführten, die Rede. Bei diesen wird ja der zeitliche Verlauf stark durch die Diffusionsgeschwindigkeit beeinflusst.

in einer Reaktion erster Ordnung besteht, die physikalische Chemie der Verdauung auf eine sichere Grundlage gestellt werden.

Von den Dipeptiden, welche nach Fischer und Abderhalden durch Pankreassaft zerlegt werden, habe ich das Alanylglycin als Versuchsmaterial gewählt. Ich kann angeben, daß Pankreassaft — ich verdanke denselben der Güte von Herrn Prof. Pawlow —, welcher in der üblichen Weise aktiviert wurde, Alanylglycin innerhalb ziemlich weiter Grenzen asymmetrisch nach den Gesetzen zerlegt, welche die Theorie für katalytische Reaktionen 1. Ordnung fordert: innerhalb gewisser, vom Konzentrationsverhältnis Ferment: Dipeptid abhängiger Grenzen ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Enzymkonzentration.

Zur genaueren Verfolgung der Reaktionsgesetze der tryptischen Verdauung ist die Anwendung eines optisch aktiven Dipeptids wünschenswert. Die Messungen an einem solchen, *d*-Alanyl-*d*-Alanin sollen in Gemeinschaft mit Herrn E. Abderhalden ausgeführt werden, welcher bereits auf die Bedeutung der optisch aktiven Dipeptide für das Studium der tryptischen Verdauung hingewiesen hat.¹⁾

Beim Arbeiten mit källichem Pankreatin (*Rhenania*) hatte sich indessen ergeben, daß die Spaltung durch daraus hergestellte Extrakte außerordentlich viel rascher erfolgte als durch Pankreassaft und ferner, daß Dipeptide wie *d*-Leucylglycin, welche von letzterem nicht angegriffen werden, von Pankreatinextrakt gespalten werden. Die Annahme eines besonderen Enzyms im Herstellungsmaterial des Pankreatins lag sehr nahe,²⁾ und die Vermutung, daß hier das von Cohnheim entdeckte Erepsin wirksam war, bestätigte sich, als ich Glycerinextrakte aus der mechanisch abgeschabten Schleimhaut des Dünndarms des Schweines herstellte. Zusatz von 1 cem dieses Extraktes zu 50 cem einer Dipeptidlösung bewirkte halbe Spaltung in etwa einer Stunde. Durch partielle Fällung des Glycerinextraktes mit

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 365. Anm.

²⁾ E. Fischer und Abderhalden hatten bereits beobachtet, daß Leucylalanin, welches gegen frischen Pankreassaft ganz beständig ist, von Pankreatin partiell gespalten wird. (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 3103).

absolutem Alkohol und Verreiben des Niederschlages mit Alkohol und Äther wird ein wochenlang vollkommen unverändertes Erepsinpräparat erhalten, das in Wasser so gut wie vollständig löslich ist und pro Gramm Trockensubstanz auch auf solche Dipeptide, welche von Pankreassaft angegriffen werden, außerordentlich viel stärkere Wirkung ausübt als dieser.

Dieses Dipeptid spaltende Ferment wurde sodann in Pflanzenteilen aufgesucht und zwar fiel die Wahl auf keimende Lupinensamen, wo die stärkste Eiweißspaltung zu erwarten war. Lupinensamen wurden nach 48 stündigem Keimen bei 30° direkt ausgepreßt. Aus 50 ccm Preßsaft wurde durch Zusatz von 10 ccm Alkohol die Hauptmenge der Eiweißkörper gefällt. Sodann wurde das Filtrat noch in 2 Fraktionen mit Alkohol gefällt. Die Fällung aus 60%igem Alkohol erwies sich als nicht erheblich weniger wirksam, als das aus Darmschleimhaut gewonnene. Nicht ganz so wirksam waren Präparate aus Raps- und Erbsensamen.

Einstweilen hat bereits E. Abderhalden mit Y. Fernbach mitgeteilt (l. c.), daß Dipeptide durch Preßsäfte von Leber und Rindermuskel gespalten werden, und hat die Spaltprodukte isoliert. Ebenso haben Abderhalden und Schittenhelm gezeigt, daß Leucylglycin durch Preßsaft aus keimenden Lupinensamen die gleiche Spaltung erleidet.

Beim racemischen Leucylglycin, dem am leichtesten vorzuzustellenden Dipeptid, werden, wenn auch mit sehr verschiedener Geschwindigkeit, die beiden optischen Antipoden durch Erepsin angegriffen. Hierdurch wird in manchen Fällen der Reaktionsverlauf kompliziert: auf die Spaltung einer aktiven Komponente durch Erepsin werden Herr E. Abderhalden und ich zurückkommen.

Von dieser Komplikation wird man unabhängig bei Anwendung von Glycylglycin als Substrat.

Die bisher mit diesem Dipeptid gewonnenen Resultate sollen hier mitgeteilt werden.

Versuchsordnung.

In dem stets auf 37° gehaltenen Thermostaten wurden die Lösungen des mit den angegebenen Mengen Alkali versetzten

Glycylglycins¹⁾ mit dem stets vorher gelösten Erepsinpräparat gemischt. Wenige Minuten später erfolgte die erste Messung, welche folgendermaßen ausgeführt wurde: In ein Arrheniusches Widerstandsgefäß werden 5 bzw. 2.5 ccm der Reaktionsflüssigkeit zu 10 bzw. 5 ccm einer vorher gekühlten Natronlauge pipettiert, deren Konzentration je nach den Umständen 0.04—0.10 norm. war, worauf die elektrische Leitfähigkeit der Mischung unmittelbar bei 18° gemessen wurde. Der Endwert, also der Leitfähigkeitswert, welcher erreicht wird, wenn das Glycylglycin vollständig gespalten ist, wurde ausgehend von entsprechend konzentrierten Glykokollösungen besonders bestimmt. In der hierdurch ermöglichten sicheren Kenntnis des Endwertes scheint mir einer der Hauptvorteile der Dipeptide als Substrate der Trypsin- und Erepsinspaltungen zu liegen. Es wurde ferner noch eingehend festgestellt, daß die Abnahme der Leitfähigkeit proportional der Abnahme der Peptidkonzentration ist.²⁾ Die direkt abgelesenen Widerstände variierten im Verlauf eines Versuches je nach den Konzentrationsbedingungen zwischen 60 und 120% ihres Wertes: die absoluten Werte schwankten meist

¹⁾ Dasselbe war nach der Vorschrift von E. Fischer und Fournéau (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 279) dargestellt unter Anwendung der von Fischer kürzlich (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 2930) angegebenen Modifikation.

²⁾ Der Nachweis dieser Proportionalität, welche die Grundlage für alle weiteren Berechnungen bildet, ist bei den früheren Arbeiten, welche mit der Leitfähigkeit die tryptische oder peptische Verdauung verfolgt haben, nicht erbracht worden. Trotzdem kann diese Proportionalität nicht einmal als wahrscheinlich bezeichnet werden. Die Leitfähigkeit wird sowohl durch das verschwindende Ausgangsmaterial als durch fast alle auftretenden höheren Spaltprodukte, sowie durch Albumosen, Peptone, Peptide und Aminosäuren beeinflusst, welche in einer grossen Zahl von nebeneinander verlaufenden Reaktionen entstehen. Deswegen befremdet es auch den Chemiker, zu hören, daß hier eine monomolekulare Reaktion vorliegt. Es darf wohl kaum von vornherein angenommen werden, daß gerade diejenige Spaltung bzw. die Spaltungen, welche für die Zerfallsgeschwindigkeit maßgebend sind, auch die Leitfähigkeit vorwiegend beeinflussen. Bei der mangelhaften Kenntnis, welche wir vom Zerfall höherer Eiweißkörper haben, werden wir also die für den zeitlichen Verlauf dieses Zerfalls aufgestellten Formeln einstweilen als empirische Interpolationsformeln aufzufassen haben.

zwischen 50 und 150 Ohm und konnten mit $\pm 5\%$ Genauigkeit abgelesen werden. Durch die beschriebene Versuchsanordnung wird eine größere Änderung der Leitfähigkeit während der Reaktion erzielt, als bei direkter Messung der reagierenden Flüssigkeit. In vielen Fällen ist die Methode schärfer, d. h. erlaubt kleinere Effekte festzustellen, als die optische Methode.

Was die Herstellung der Erepsinpräparate betrifft, so wurden in zwei Portionen 30 m Dünndarm von Schweinen unmittelbar nach dem Schlachten mechanisch gereinigt, mit Wasser abgespült, zerschnitten und mit Glycerin während eines Tages extrahiert. Dieser Extrakt (A) schied allmählich Eiweißkörper als Bodensatz ab, behielt aber seine starke Wirksamkeit wochenlang beinahe unverändert bei. Aus diesem Extrakt wurden durch partielle Fällung entweder mit wasserfreiem Aceton oder mit absolutem Alkohol und Äther dauerhafte und sehr wirksame, in Wasser so gut wie vollständig lösliche Erepsinpräparate als staubtrockene Pulver erhalten.

Resultate.

Zunächst ergab sich, daß die Spaltungsgeschwindigkeit des Glycylglycins durch Erepsin in hohem Grad von der Alkalinität der Lösung abhängig ist. Siehe Tab. A.

Tabelle I.

0,1 n-Glycylglycin. 5 g Erepsinpulver in 100 ccm.

Alkalikonzentration	0	0,04	0,05	0,075	0,10
Reaktionskonstante $\times 1000$	$< 0,05$	7,0	6,2	2,6	0,2

Bei einer anderen, später angestellten Versuchsreihe lag das Optimum der Alkalinität etwas höher, obwohl das Erepsinpulver in der gleichen Weise bereitet war und noch 20% kräftiger wirkte.

Tabelle II.

0,1 n-Glycylglycin. 4 g Erepsinpulver in 100 ccm Lösung.

Alkalikonzentration	0,035	0,04	0,05	0,06	0,075
Reaktionskonstante $\times 1000$	5,0	7,0	8,3	8,0	6,5

Das Optimum ist hier nicht so scharf wie in der ersten Versuchsreihe.

1. Die Alkalinität ist in dieser und allen folgenden Tabellen durch die Normalität des gesamten Na ausgedrückt. Die wirkliche Alkalinität, also die Konzentration der freien Base ist in allen Fällen sehr viel geringer, da der größte Teil zur Neutralisation des Glycylglycins verbraucht wird. Ich habe zur Ermittlung des in der Lösung vorhandenen freien Alkalis die Stärke des Glycylglycins und im Anschluß daran auch des Leucylglycins und des Alanylglycins als Säuren und Basen gemessen.

Die Untersuchung geschah durch Messung der Leitfähigkeiten von Lösungen, welche gleiche Äquivalente Peptid und Salzsäure bzw. Peptid und Ammoniak enthielten.

Unter K_S sind die Dissoziationskonstanten der drei Dipeptide als Säuren, und unter K_B die Konstanten ihrer basischen Dissoziation angegeben. Zum Vergleich sind die entsprechenden Größen der einfachen Aminosäuren nach Winkelblech beigelegt.

Tabelle III.

Amphoterer Elektrolyt	K_S	K_B
Glycylglycin	$1.8 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-11}$
Leucylglycin	$1.5 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-11}$
Alanylglycin	$1.8 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-11}$
Glykokoll	$1.9 \cdot 10^{-10}$	$5.1 \cdot 10^{-12}$
Leucin	$1.8 \cdot 10^{-10}$	$2.3 \cdot 10^{-12}$
Alanin	$1.8 \cdot 10^{-10}$	$2.7 \cdot 10^{-12}$

Berücksichtigt man unter Benutzung dieser Konstanten die Salzbildung des Glycylglycins, so ergibt sich aus Tabelle 1 und 2 die Optimalkonzentration des freien Alkalis zu rund 0,00002.

Es wird aber auch ein Teil des Alkalis durch das Erepsinpräparat gebunden. Berücksichtigt man auch diese Salzbildung durch das Erepsin, so wird die Optimalkonzentration 0,000012.

Diese Zahl ist viel kleiner, als den vorliegenden diesbe-

Bei der tryptischen Spaltung höherer Eiweißkomplexe üben die Spaltprodukte einen stark hemmenden Einfluß aus. Mein gegenteiliger Befund an Glycylglycin beruht nicht etwa auf dem ungleichen Verhalten von Trypsin und Erepsin, denn wie ich gefunden habe, verläuft die Caseinspaltung durch Pankreas-trypsin und durch Darmerepsin analog. Der wesentliche Unterschied beider Spaltungsvorgänge besteht darin, daß bei der Hydrolyse des Glycylglycins die Spaltprodukte vom Enzym nicht mehr angegriffen werden, während bei der tryptischen Verdauung höherer Eiweißkörper die anfänglichen Spaltprodukte weiter zerlegt werden, also selbst wieder Substrat sind. Da nun nach übereinstimmender Annahme fast aller Autoren der hydrolytischen Spaltung eine Bindung zwischen Substrat und Enzym vorangeht, so wird der primären Hydrolyse der Teil des Enzyms, der die weitere Verarbeitung der ersten Spaltprodukte ausführt, entzogen. Da wir aber die relativen Geschwindigkeiten der einzelnen Spaltungsvorgänge nicht kennen, so stößt eine genaue rechnerische Behandlung auf Schwierigkeiten.

Man könnte einwenden, daß nach dieser Auseinandersetzung zwar Albumosen und Peptone, nicht aber Aminosäuren auf die tryptische Spaltung des Caseins einwirken dürften, während doch Bayliss (l. c.) gezeigt hat, daß Zusätze von Glycin und Leucin die Reaktionsgeschwindigkeit stark herabsetzen. Diese letztere Wirkung ist aber offenbar verschieden von der oben erwähnten und besteht darin, daß die Konzentration des freien Ammoniaks durch die Salzbildung mit den Aminosäuren stark vermindert wird, wodurch die Konzentration der Hydroxylionen weit unter die Optimalkonzentration sinkt.

3. Wie auch aus den eben angegebenen Konstanten ersichtlich, ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Peptids nur wenig abhängig. Diese Unabhängigkeit gilt indessen nur für gewisse Konzentrationsverhältnisse Ferment: Substrat. Bei kleiner Fermentmenge steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration.

0.1 n-Glycylglycin; 0.04 n-Na
1000 K = 0.35

0.2 n-Glycylglycin; 0.05 n-Na
1000 K = 0.55

Da, wie oben erwähnt, hier auch noch die Konzentration des freien Alkalis die Reaktionsgeschwindigkeit in hohem Maße beeinflusst, so ist der Einfluß der Substratkonzentration recht schwierig aufzuklären und sind weitere Versuche notwendig. Es scheint, daß besonders das Alkalisalz des Peptids der Spaltung unterliegt.

4. Was schließlich den Einfluß der Fermentkonzentration betrifft, so kann gesagt werden, daß in den meisten der untersuchten Konzentrationsverhältnisse die Reaktionsgeschwindigkeiten proportional der Enzymkonzentration waren. Die Schütz-Borissowsche Regel erwies sich in keinem Falle gültig. Ich führe folgende Zahlenbeispiele an (vgl. Tab. C).

Erepsinkonzentration:	5	4	3	2
1000 K:	6,5	5,4	4,3	2,8

Bei kleinen Fermentkonzentrationen, besonders bei Anwendung schwacher Pankreatinpräparate, steigt K viel schneller als die Fermentkonzentration.¹⁾

Bei relativ großen Fermentkonzentrationen treten allerdings Abweichungen von der Proportionalität im Sinne der Schütz'schen Regel ein; indessen wurden bei diesen innerhalb weniger Minuten verlaufenden Reaktionen die Versuchsfehler zu groß, als daß Schlüsse aus diesem Zahlenmaterial gezogen werden könnten.

Zusammenfassend kann auf die allgemeine Analogie zwischen der Wirkung des Trypsins und des Erepsins hingewiesen werden. Im Hinblick auf obige Resultate dürfte sich eine erneute Prüfung der Schütz'schen Regel bei der Einwirkung des Trypsins und zwar auf Peptone oder Albumosen empfehlen. Die Vermutung scheint naheliegend, daß sowohl das Gleichgewicht zwischen Trypsin und Substrat als zwischen Trypsin und Alkali für die Reaktionsgeschwindigkeit ausschlaggebend ist.

¹⁾ Da das Verhalten des Erepsins wie das anderer Fermente von der absoluten Wirksamkeit der Lösung abhängt, so dürfte es sich empfehlen, um verschiedene Resultate vergleichbar zu machen, eine Normalwirkung festzulegen. Als Normalpräparat könnte etwa ein solches bezeichnet werden, welches in 5%iger Lösung Glycylglycin oder ein optisch aktives Dipeptid in 1 Stunde zur Hälfte spaltet.

Tabelle A.¹⁾

0,10 n-Glycylglycin.

a l.

Minuten	$\Delta \kappa$	1000 (a-x)	1000 K
0	0	915	—
7	11,3	813	7,35
15	22,3	714	7,20
22	30,3	642	7,01
30	38,4	569	6,87

5 g Erepsinpulver in 100 ccm Lösung.

b l.

Minuten	$\Delta \kappa$	1000 (a-x)	1000 K
0	0	932	—
7	10,65	836	6,71
15	20,0	744	6,54
22	28,5	675	6,37
30	35,5	612	6,10

a)

0,04 n-Na.

Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	920	—
7	819	7,20
15	721	7,08
22	649	6,88
30	579	6,70

b)

0,05 n-Na.

Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	935	—
10	806	6,46
17	739	6,00
25	654	6,18
30	622	5,90

c)

0,075 n-Na.

Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	970	—
10	908	2,80
20	860	2,62
30	822	2,39

d)

0,10 n-Na.

Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	990	—
60	968	0,24
120	945	0,17

¹⁾ In dieser und den folgenden Tabellen sind neben den Zeiten unter $\Delta \kappa$ die Änderungen der Leitfähigkeit, unter 1000 (a-x) die mit 1000 multiplizierten wirklichen Konzentrationswerte des Glycylglycins angegeben. K bedeutet die Reaktionskonstante 1. Ordnung.

Tabelle B.

a)			b)		
0,10 n-Glycylglycin; 0,04 n-Na.			0,05 n-Glycylglycin; 0,10 n-Glykokoll; 0,04 n-Na.		
Minuten	1000 (a-x)	1000 K	Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	955	—	0	480	—
8	852	6,25	10	414	6,40
16	766	6,00	18	372	6,20
25	678	5,95	27	329	6,08

c)			d)		
0,20 n-Glycylglycin; 0,05 n-Na.			0,10 n-Glycylglycin; 0,2 n-Glykokoll; 0,05 n-Na.		
Minuten	1000 (a-x)	1000 K	Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	1860	—	0	900	—
6	1692	6,9	6	829	5,9
12	1545	6,7	12	767	5,8
20	1376	6,55			
30	1210	6,2			

Tabelle C.

0,10 n-Glycylglycin; 0,04 n-Na.

a)			b)		
5 g Erepsinpräp. in 100 cem.			4 g Erepsinpräp. in 100 cem.		
Minuten	1000 (a-x)	1000 K	Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	930	—	0	950	—
7	837	6,54	8	861	5,36
13	763	6,60	15	788	5,42
20	690	6,48	25	696	5,40
28	620	6,30	36	617	5,21
36	550	6,33	43	579	5,00

c)

3 g Erepsinpräp. in 100 ccm.

Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	948	—
10	856	4,43
17	807	4,12
24	744	4,38
35	676	4,20

d)

2 g Erepsinpräp. in 100 ccm.

Minuten	1000 (a-x)	1000 K
0	980	—
10	915	2,98
20	861	2,81
32	809	2,60
41	760	2,70