

Die Verwendung optisch-aktiver Polypeptide zur Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer Fermente.

Von

Emil Abderhalden und A. H. Koelker.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text.

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

(Der Redaktion zugegangen am 13. März 1907.)

Durch zahlreiche Arbeiten aus dem hiesigen Institut ist bewiesen worden, daß nicht nur der Pankreassaft Fermente enthält, welche eine große Anzahl der von Emil Fischer synthetisch gewonnenen Polypeptide¹⁾ spalten, sondern, daß derartige Fermente offenbar allen Organen zukommen. Es ließ sich ferner der Nachweis erbringen, daß die Organfermente und auch die Fermente des Darmsaftes manche Polypeptide in ihre Komponenten zerlegen, welche der reine Pankreassaft nicht merklich angreift. Die Polypeptide bilden ein sehr wertvolles Material zu derartigen Untersuchungen, weil sich durch ihre Anwendung bei Fernhaltung aller Fehlerquellen stets mit voller Schärfe durch Isolierung aller Spaltprodukte oder auch des unveränderten Ausgangsmateriales der Beweis erbringen läßt, ob eine Einwirkung der betreffenden Fermente stattgefunden hat oder nicht. Es kann nicht mehr zweifelhaft sein, daß es mit Hilfe der Polypeptide auch gelingen wird, den eindeutigen Nachweis zu erbringen, ob wir für die verschiedenen Abbaustufen der Proteine verschiedene Fermentarten, etwa wie beim Abbau der Kohlehydrate, anzunehmen

¹⁾ Vgl. die grundlegende Arbeit auf diesem Gebiet: Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52. 1905. Hier ist zum erstenmal reiner Pankreassaft zur Spaltung von Polypeptiden in Anwendung gekommen.

haben, und bei welchen Abbaustufen die einzelnen Fermente in Wirksamkeit treten. Versuche nach dieser Richtung sind im Gange und sollen demnächst mitgeteilt werden.

Der eine von uns hat in Gemeinschaft mit Peter Rona¹⁾ die Polypeptide bereits angewandt, um proteolytische Fermente zu unterscheiden. Einstweilen handelt es sich nur um die Trennung in die beiden großen Klassen der trypsinartig und der pepsinartig wirkenden Fermente. Bis jetzt ist es nicht gelungen, ein Polypeptid aufzubauen, das vom Magensaft in nachweisbarer Menge angegriffen wird. Diese Tatsache ermöglicht eine scharfe Unterscheidung zwischen Trypsin und Pepsin. Erleichtert wird eine derartige Feststellung, wenn ein durch Trypsin spaltbares Polypeptid zur Verwendung kommt, das selbst spielend löslich in Wasser ist, bei dessen Hydrolyse jedoch schwer lösliche Aminosäuren frei werden und zur Abscheidung gelangen. Sehr geeignet sind nach dieser Richtung z. B. die Dipeptide Glycyl-l-tyrosin, Dialanyleystin und d-Alanyl-l-Leucin. Setzt man z. B. zu einer konzentrierten Lösung von Glycyl-l-tyrosin eine zur Gruppe des Trypsins gehörende Fermentlösung, so sieht man nach wenig Stunden Ausscheidung von Tyrosin, während man das Glycyl-l-tyrosin unverändert wieder gewinnen kann, wenn man z. B. Magensaft auf dieses einwirken läßt.

Man könnte versuchen, die genannten Polypeptide zu quantitativen Untersuchungen über die Wirksamkeit bestimmter Fermente zu benützen, indem man das nach bestimmten Zeiten ausgeschiedene Produkt, im vorliegenden Falle das Tyrosin, zur Wägung bringt. Wir hatten die Absicht, an Stelle der Verwendung der Mettschen Röhren, die keineswegs einwandfreie Resultate ergeben, die genannten Polypeptide anzuwenden, und wir zweifeln nicht daran, daß ihre Benutzung einen Fortschritt gegenüber den alten Methoden der Feststellung der Wirksamkeit der Verdauungs- und Organsäfte bedeuten würde. Ganz exakte Resultate sind nicht erreichbar, weil die Menge des ausgeschiedenen Tyrosins nicht ausschließlich von der Wirk-

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

samkeit des Fermentes abhängig ist, sondern auch die Lösungsbedingungen eine große Rolle spielen. Es können unter Umständen ganz beträchtliche Tyrosinmengen in Lösung gehalten werden. Es müßte jeder Untersuchung eine exakte Isolierung des Tyrosins vorausgehen. Zu diesem Zwecke würde zur Entfernung der mit der Fermentlösung zugeführten Produkte die Verdauungsflüssigkeit am besten so stark mit Wasser verdünnt, daß eine etwa 1%ige Lösung an Aminosäuren vorhanden wäre, und nun mit Phosphorwolframsäure gefällt. Aus dem Filtrat des sorgfältig gewaschenen und abgepreßten Niederschlages könnte dann nach Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure mit Baryt und nach der genauen Fällung von dessen Überschuß mit Schwefelsäure durch Einengen das Tyrosin abgeschieden und seine Menge recht genau bestimmt werden.

Wie der eine von uns früher schon hervorgehoben hat,¹⁾ kann diese umständliche Methode durch die Anwendung optisch-aktiver Polypeptide sehr vereinfacht werden. Wir konnten damals diesem Probleme nicht näher treten, weil die Methoden der Darstellung von Polypeptiden, die aus aktiven, in der Natur vorkommenden Aminosäuren aufgebaut sind, noch nicht so ausgearbeitet waren, daß aktive Polypeptide in größerer Menge zu gewinnen waren. Nachdem durch die Untersuchungen Emil Fischers²⁾ diese Schwierigkeit behoben worden ist, haben wir den Versuch gemacht, derartige Polypeptide zur quantitativen Untersuchung der Wirksamkeit bestimmter Fermentlösungen zu benutzen. Der Erfolg ermuntert uns, unsere Versuche weiter auszudehnen.

Die Methode der Verwendung optisch-aktiver Polypeptide ist eine sehr einfache. Sie gewinnt dadurch noch besonders

¹⁾ Emil Abderhalden und Peter Rona, l. c. Vgl. die Anmerkung S. 365.

²⁾ Vgl. Emil Fischer und Otto Warburg, Optisch aktive α -Brompropionsäure, J. Liebigs Annalen der Chemie, Bd. CCCXL, S. 168, 1905. — Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden, XV, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXIX, S. 2893, 1906. — Emil Fischer, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XL, S. 489, 1907.

an Schärfe, weil manche Polypeptide ein sehr starkes Drehungsvermögen in wässriger Lösung besitzen, während manche ihrer Komponenten unter den gewählten Versuchsbedingungen kein in Betracht kommendes Drehungsvermögen zeigen, wie z. B. das d-Alanin. Die Ausführung der Versuche ist sehr einfach. Das betreffende optisch-aktive Polypeptid wird in der Fermentlösung gelöst und zwar am besten gleich in einem Rohr, das eine sofortige Ablesung der Drehung gestattet. Wir benützten ein Rohr, das von einem Metallmantel umgeben war. Durch diesen konnten wir während der Ablesung Wasser von 37° durchleiten oder wenigstens durch Einfüllung von warmem Wasser die Verdauungsflüssigkeit beständig auf 37° halten. Das Innenrohr, das die Verdauungsflüssigkeit enthielt, besaß einen Tubus, durch den wir ein Thermometer einführten. Dieser Tubus gestattet zugleich Toluol aufzuschichten, um jeder Fäulnis vorzubeugen, ohne daß die Bestimmung des Drehungsvermögens behindert wird. Wir lasen nun nach Einfüllung des Fermentpolypeptidgemisches und Erwärmung auf 37° sofort die Drehung ab, und brachten dann das Rohr in einen Wärmekasten zurück, der die Temperatur der Verdauungsflüssigkeit ganz gleichmäßig auf 37° hielt. In bestimmten Zeitintervallen wurden die Ablesungen wiederholt. Man kann so in sehr übersichtlicher Weise den allmählichen Abbau der Polypeptide verfolgen und die Wirksamkeit einer bestimmten Fermentlösung genau feststellen. Der Einfluß der Konzentration der Fermentlösung usw. läßt sich scharf beweisen, und wir zweifeln nicht daran, daß diese Methode am besten geeignet ist, um die Gesetze der Fermentwirkung unter bestimmten Bedingungen genau klarzulegen.¹⁾ Auch zu vergleichenden Untersuchungen ist diese Methode sehr geeignet.

Unsere Untersuchungen, die wir bis jetzt ausgeführt haben, hatten das Ziel, die Verwendbarkeit der Methode auszuprobieren. Sie sollen auch zeigen, welche eklatante Unterschiede in der Wirksamkeit der Fermente verschiedener Herkunft existieren. Zur Untersuchung gelangten Pankreas- und Darmsaft und ferner

¹⁾ Herr Prof. Euler, Stockholm, wird derartige Versuche gemeinsam mit dem einen von uns ausführen.

Hefepreßsaft. Von Polypeptiden verwendeten wir d-Alanyl-d-Alanin und d-Alanyl-l-Leucin.

Über die Darstellung und Eigenschaften der verwendeten Polypeptide ist folgendes zu bemerken. Wir gingen beim d-Alanyl-d-Alanin in dem einen Falle aus von aus Seide gewonnenem d-Alanin. Um zu d-Alanyl-d-Alanin zu gelangen, kann man d-Alanin chlorieren und direkt mit d-Alanin kuppeln. Wir verwendeten eine andere, von Emil Fischer häufig angewandte Methode, indem wir mit Hilfe der Waldenschen Umkehrung l-Alanin, das durch Vergärung von dl-Alanin durch Hefe nach F. Ehrlich¹⁾ gewonnen worden war, in d-Brompropionsäure überführten und diese nach Bildung des d-Brompropionylchlorids mit d-Alanin kombinierten. Das so gebildete d- α -Brompropionyl-d-Alanin zeigte folgende spezifische Drehung:

0,3952 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 14,4418 g. $\alpha = -0,73^\circ (\pm 0,02^\circ)$ im 2 dm-Rohr und bei Natriumlicht. $d_4^{20^\circ} = 1,006$. $[\alpha]_D^{20^\circ} = -13,18^\circ (\pm 0,4^\circ)$.

Die zu diesen Versuchen verwendete d-Brompropionsäure zeigte $[\alpha]_D^{20^\circ} = +27,9^\circ$.

11 g des d-Brompropionyl-d-alanins wurden in 66 ccm 25%igem wässerigem Ammoniak gelöst und 4 Tage bei 25° aufbewahrt. Zur Isolierung des d-Alanyl-d-Alanins wurde die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen. Die Lösung engten wir nun in einer Platinschale auf dem Wasserbade auf etwa 15 ccm ein und fällten mit etwa 90 ccm absolutem Alkohol das d-Alanyl-d-Alanin aus. Nach dreistündigem Stehen bei 0° wurde abfiltriert. Die Ausbeute betrug 4,85 g. Zur Reinigung wurde dieses Rohprodukt in 3 Teilen Wasser gelöst, mit Tierkohle gekocht und das Filtrat mit 25 Teilen Alkohol gefällt. Nach einer mehrmaligen Reinigung gab das Präparat in Wasser folgenden optischen Wert:

0,3816 g Substanz. Gesamtgewicht der wässerigen Lösung

¹⁾ Vgl. Felix Ehrlich, Über eine Methode zur Spaltung racemischer Aminosäuren mittels Hefe. Biochemische Zeitschrift, Bd. 1, S. 8, 1906.

7,6638 g. $\alpha = -2,16^\circ$ im 2 dm-Rohr bei Natriumlicht.
 $d_4^{20^\circ} = 1,013$. $[\alpha]_D^{20^\circ} = -21,41^\circ (+0,2^\circ)$.

Das Präparat zeigte somit die gleiche Drehung, wie das von E. Fischer¹⁾ dargestellte Präparat.

Da die eben geschilderte Darstellung des d-Alanyl-d-Alanins zeitraubend und kostspielig ist, folgten wir bei der Gewinnung eines zweiten Präparates der Vorschrift von E. Fischer und A. Schulze,²⁾ indem wir von d-Alanin und dl- α -Brompropionylbromid ausgingen und das dl-Brompropionyl-d-Alanin durch Stehenlassen in wässerig-ammoniakalischer Lösung in das Dipeptid verwandelten. Unter den gleichen Bedingungen, wie E. Fischer und A. Schulze angaben, erhielten wir 57,5% der Theorie des angewandten Bromkörpers an reinem d-Alanyl-d-Alanin. Zur völligen Reinigung wurde es zweimal in 3 Teilen Wasser gelöst, mit Tierkohle gekocht und dann mit 40 Teilen Alkohol gefällt.

0,6935 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 13,9129 g. $d_4^{20^\circ} = 1,013$. $\alpha = -2,14^\circ$ im 2 dm-Rohr. $[\alpha]_D^{20^\circ} = -21,2^\circ (+0,2^\circ)$.

Die Reinheit des Präparats wurde noch durch die Überführung des d-Alanyl-d-Alanins über den Methylester in das Anhydrid erhärtet. Das erhaltene Produkt erwies sich als identisch mit dem von E. Fischer dargestellten d-Alanin-anhydrid.

0,1927 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung: 9,6182 g. $d_4^{20^\circ} = 1,003$. $\alpha = -1,16^\circ$ im 2 dm-Rohr. $[\alpha]_D^{20^\circ} = -28,9^\circ (+0,5^\circ)$.

Daß das angewandte d-Alanyl-d-Alanin frei von l-Alanyl-d-Alanin war, beweist sein Verhalten gegen Hefepreßsaft. Dieser greift, wie der eine von uns gemeinsam mit C. Funk³⁾ nach-

¹⁾ Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden, XIV., Ber. der Deutsch. chem. Ges., Jg. XXXIX, S. 453, 1906.

²⁾ Emil Fischer und Arnold Schulze, Synthese von Polypeptiden, XVI., Derivate des d-Alanins, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XL, S. 954, 1907.

³⁾ Nach noch nicht veröffentlichten Versuchen.

weisen konnte, l-Alanyl-d-Alanin nicht in nachweisbarer Menge an. Das Vorhandensein dieser Kombination hätte somit bei unseren Versuchen zum Ausdruck kommen müssen.

Bei der Darstellung des d-Alanyl-l-Leucins folgten wir genau den Angaben von Emil Fischer.

Über die Beschaffenheit der verwendeten Fermentlösungen ist folgendes zu bemerken. Der Pankreassaft stammte von einem im hiesigen Institut befindlichen Pankreasfistelhund. Er war nach Pawlow unter Benützung einer von Herrn B. Babkin aufgefundenen Modifikation von diesem Forscher selbst operiert worden. Das Tier, ein Jagdhund, zeigt noch jetzt, ein Jahr nach der Operation, das beste Wohlbefinden. Es hat immer an Gewicht zugenommen und liefert bei einer Mahlzeit bis zu 100 ccm an reinem Pankreassaft. Dieser wird in aktiver Form abgegeben. Das Versuchstier erhält beständig gewöhnliche Nahrung. Soda haben wir ihm mit Ausnahme der ersten Tage nicht verabreicht. Auch die Milch-Brot-nahrung verließen wir bald, weil der Hund bei dieser Ernährung sehr herunterkam. Jetzt erinnert außer der Fistel nur der ab und zu breiige, reichliche und unangenehm riechende Stuhl an den Zustand des Tieres. Außer nach Fütterungen läßt sich auch eine Sekretion bei psychischen Prozessen freudiger Art (bei Liebkosungen usw.) feststellen. Eine besonders reichliche Sekretion scheint die Verfütterung von Darmstücken zur Folge zu haben.

Den Darmsaft verdanken wir der Güte von Herrn Prof. Dr. London, St. Petersburg. Er wurde vor Gebrauch durch ein Tonfilter filtriert, ebenso behandelten wir den Pankreassaft und den Hefepreßsaft. Letzteren verdanken wir der Freundlichkeit des Herrn Prof. Dr. E. Buchner. Eine Schwierigkeit bereitete bei diesen Untersuchungen wiederholt der Umstand, daß der klar filtrierte Saft bei Zusatz der Lösung des Polypeptides sich trübte, obgleich wir die Dipeptide in physiologischer Kochsalzlösung lösten. Trat eine solche Trübung ein, so mußte die Lösung filtriert werden. Gewöhnlich ließ sich dieser Zwischenfall vermeiden. Die Lösungen waren jedoch meist doch nicht klar genug, um die Bestimmung des Drehungsvermögens bei Natriumlicht vornehmen zu können. Meist kontrollierten wir bei weißem

Licht, oft waren wir gezwungen, mit diesem allein zu arbeiten. Eine weitere Komplikation brachte der Umstand mit sich, daß die Fermentlösungen selbst ein, wenn auch geringes, Drehungsvermögen aufwiesen, das sich während der Verdauung änderte. In diesen Fällen kann man entweder eine Korrektur ermitteln, indem man entsprechende Mengen des reinen Verdauungssaftes unter gleichen Bedingungen der Selbstverdauung überläßt und die Drehungsänderung feststellt, oder indem man den Saft zunächst solange bei 37° aufbewahrt, bis sich keine Drehungsänderung mehr nachweisen läßt, und ihn dann verwendet. Man kann die Versuche gewiß vereinfachen, indem man nicht den Pankreassaft und die Organ- und Zellpreßsäfte als solche anwendet, sondern die Fermente isoliert. Für unsere Versuche kam es nur darauf an, die drei untersuchten Fermentlösungen unter sich zu vergleichen, und das konnten wir mit genügender Genauigkeit durchführen, weil wir bei jeder Versuchsserie unter genau denselben Bedingungen arbeiteten.

Die Resultate unserer Versuche ergeben sich aus den nachfolgenden Übersichten ohne weiteres. Pankreassaft greift d-Alanyl-d-Alanin nur sehr langsam an. Nach 48 Stunden war die anfängliche Drehung noch fast unverändert. Darmsaft hydrolysiert das genannte Dipeptid bedeutend rascher. Bei weitem am wirksamsten erwies sich der Hefepreßsaft.

Bei jeder einzelnen Versuchsserie läßt sich sehr deutlich der Einfluß der Konzentration der Fermentlösung feststellen. Wir halten unsere Versuche nicht für ausreichend, um auf der Basis der erhaltenen Resultate die Gesetze der Fermentwirkung zu diskutieren, und wollen weitere Untersuchungen abwarten.

I. Untersuchungen mit d-Alanyl-d-Alanin.

1. Pankreassaft.

0,45 g Dipeptid in 6 ccm Pankreassaft gelöst.

Drehung beim Beginn des Versuches	—	1,24°
› nach 6 Stunden	—	1,23°
› › 12 ›	—	1,22°

Drehung nach 24 Stunden	— 1,22°
„ „ 36 „	— 1,20°
„ „ 48 „	— 1,19°
„ „ 96 „	— 1,01°

Wir brachen hier den Versuch ab, weil bei der äußerst langsamen Hydrolyse des d-Alanyl-d-Alanins durch Pankreassaft genauere Messungen ausgeschlossen waren. Wir werden später sehen, daß d-Alanyl-l-Leucin viel rascher gespalten wird.

2. Darmsaft.

a) 0,8 g Dipeptid in 8,0 ccm Wasser + 2¹/₂ ccm Darmsaft gelöst.

Drehung nach 1/2 Stunde	— 1,34°
„ „ 31 Stunden	— 1,00°
„ „ 48 „	— 0,84°
„ „ 72 „	— 0,54°
„ „ 79 „	— 0,48°

b) 0,45 g Dipeptid in 6 ccm bis zur konstanten Drehung verdautem Darmsaft gelöst.

Drehung bei Beginn des Versuches	— 1,38°
nach 8 Stunden	— 1,01°
„ 9 „	— 0,93°
„ 24 „	— 0,13°
Der Darmsaft selbst zeigte eine Drehung von	— 0,07°

3. Hefepreßsaft.

a) 0,6 g d-Alanyl-d-Alanin in 7,6 ccm Preßsaft + 0,4 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Drehung nach 5 Minuten	— 1,08°
„ „ 12 „	— 0,85°
„ „ 19 „	— 0,59°
„ „ 26 „	— 0,23°
„ „ 30 „	— 0,09°
„ „ 35 „	+ 0,05°
„ „ 40 „	+ 0,10°

b) 0,6 g Dipeptid in 5,7 ccm Preßsaft + 2,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Drehung nach 3 Minuten	— 1,23°
„ „ 7 „	— 1,09°
„ „ 13 „	— 0,91°

Drehung nach 19 Minuten	—	0,72°
„ „ 26	—	0,46°
„ „ 31	—	0,29°
„ „ 37	—	0,11°
„ „ 39	—	0,06°
„ „ 42	—	0,00°
„ „ 50	+	0,10°

c) 0,6 g Dipeptid gelöst in 3,8 ccm Preßsaft + 4,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Drehung nach 6 Minuten	—	1,20°
„ „ 13	—	1,13°
„ „ 20	—	1,01°
„ „ 25	—	0,92°
„ „ 30	—	0,79°
„ „ 33	—	0,71°
„ „ 42	—	0,47°
„ „ 45	—	0,38°
„ „ 52	—	0,14°
„ „ 55	—	0,09°
„ „ 62	—	0,00°
„ „ 65	+	0,03°
„ „ 125	+	0,03°

d) 0,6 g Dipeptid gelöst in 1,9 ccm Preßsaft + 6,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Drehung nach 5 Minuten	—	1,32°
„ „ 35	—	0,94°
„ „ 55	—	0,71°
„ „ 75	—	0,40°
„ „ 80	—	0,34°
„ „ 90	—	0,19°
„ „ 110	—	0,00°

Dieser Versuch war in dieser Serie zuerst, d. h. vor Versuch a—c durchgeführt worden. Um festzustellen, ob der Preßsaft sich während der 55 stündigen Dauer aller 4 Versuche verändert hatte, haben wir zum Schlusse den ersten Versuch (d) wiederholt.

e) Konzentration wie bei d).

Drehung nach 5 Minuten	—	1,29°
„ „ 12	—	1,23°
„ „ 23	—	1,15°
„ „ 31	—	1,07°

Drehung nach 41 Minuten	—	0,94°
» 51	—	0,81°
» 62	—	0,65°
» 74	—	0,45°
» 84	—	0,28°
» 99	—	0,07°
» 115	+	0,01°
» 147	+	0,02°
» 220	+	0,03°

Ein Blick auf Tabelle d) und e) zeigt, daß der Preßsaft während der Versuchsdauer nicht merklich an Wirksamkeit abgenommen hatte.

Der Hefepreßsaft ist nun selbst optisch-aktiv, und er verändert sein Drehungsvermögen beim Stehen bei 37°. Das Drehungsvermögen des reinen Hefepreßsaftes ist allerdings gering und kommt für unsere Versuche kaum in Betracht.

Zu den folgenden Versuchen verwendeten wir Hefepreßsaft, der 45 Stunden bei 37° aufbewahrt worden war, und bestimmten das Drehungsvermögen des reinen Saftes in den den folgenden Versuchen entsprechenden Konzentrationen.

a) 0,45 g d-Alanyl-d-Alanin gelöst in 0,72 ccm Hefepreßsaft und 5,28 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Hier kommt die Eigendrehung des Hefepreßsaftes nicht in Betracht.

Die Drehung betrug nach 7 Minuten	—	1,35°
» 20	—	1,26°
» 35	—	1,16°
» 50	—	1,07°
» 87	—	0,80°
» 112	—	0,62°
» 136	—	0,47°
» 166	—	0,29°
» 185	—	0,21°
» 208	—	0,11°
» 235	—	0,07°
» 280	—	0,02°
» 400	—	0,00°
» 1200	—	0,00°

b) 0,45 g d-Alanyl-d-Alanin gelöst in 1,44 ccm Hefepreßsaft + 4,56 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Eine entsprechend verdünnte Lösung des reinen, selbstverdauten Hefepreßsaftes drehte — 0,04°.

Drehung nach	3 Minuten	—	1,48°
„	15	„	— 1,40°
„	35	„	— 1,15°
„	50	„	— 0,92°
„	70	„	— 0,68°
„	85	„	— 0,52°
„	101	„	— 0,39°
„	115	„	— 0,30°
„	132	„	— 0,22°
„	145	„	— 0,15°
„	1000	„	+ 0,03°

c) 0,45 g d-Alanyl-d-Alanin in 2,88 ccm Hefepreßsaft + 3,12 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die entsprechend verdünnte Lösung des reinen, selbstverdauten Preßsaftes drehte — 0,09°.

Drehung nach	6 Minuten	—	1,47°
„	13	„	— 1,27°
„	19	„	— 1,15°
„	24	„	— 1,05°
„	32	„	— 0,88°
„	42	„	— 0,64°
„	55	„	— 0,37°
„	63	„	— 0,30°
„	75	„	— 0,17°
„	84	„	— 0,14°
„	95	„	— 0,07°
„	108	„	— 0,06°

d) 0,45 g d-Alanyl-d-Alanin in 4,32 ccm Hefepreßsaft + 1,68 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Eigendrehung der verwendeten Verdünnung des Preßsaftes betrug — 0,13°.

Drehung nach	8 Minuten	—	1,52°
„	15	„	— 1,34°
„	21	„	— 1,17°
„	27	„	— 0,99°
„	33	„	— 0,84°
„	39	„	— 0,70°
„	44	„	— 0,60°
„	49	„	— 0,51°
„	56	„	— 0,41°
„	65	„	— 0,31°
„	73	„	— 0,25°

Drehung nach	81 Minuten	—	0,21°
»	102	»	— 0,14°
»	1200	»	— 0,10°

e) 0,45 g d-Alanyl-d-Alanin gelöst in 5,76 ccm Saft und 0,24 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Eigendrehung des Saftes —0,18°.

Drehung nach	7 Minuten	—	1,46°
»	19	»	— 1,21°
»	24	»	— 1,04°
»	30	»	— 0,87°
»	33	»	— 0,80°
»	39	»	— 0,65°
»	44	»	— 0,57°
»	46	»	— 0,54°
»	57	»	— 0,42°
»	76	»	— 0,30°
»	99	»	— 0,24°
»	137	»	— 0,21°
»	212	»	— 0,18°

Die ganze Versuchsreihe hatte 96 Stunden gedauert. In den beiden letzten Versuchen d und e kommt die Zunahme der Konzentration des Hefepreßsaftes nicht mehr zum Ausdruck. Es ist wohl möglich, daß der Preßsaft durch die Selbstverdauung in irgend einer Weise so beeinflusst wurde, daß seine Wirksamkeit während der Dauer des Versuchs zurückging.

Schließlich haben wir noch einen Versuch mit ganz frisch hergestelltem Hefepreßsaft angestellt. Wir ließen ihn nach erfolgter Filtration 48 Stunden unter Toluolzusatz im Brutraum stehen. Der Saft drehte nach 24 Stunden im 1 dm-Rohr 0,04° nach links und änderte sein Drehungsvermögen während weiterer 24 Stunden nicht mehr. Wir haben mit diesem Saft folgende 4 Versuche ausgeführt:

a) 0,45 g d-Alanyl-d-Alanin + 6 ccm Preßsaft.

Drehung beim Beginn des Versuches	—	1,21°
» nach 3 Minuten	—	0,96°
» » 7 »	—	0,74°
» » 11 »	—	0,51°
» » 13 »	—	0,43°
» » 18 »	—	0,20°
» » 20 »	—	0,16°
» » 24 »	—	0,06°

Drehung nach 27 Minuten	+ 0,01°
» » 34 »	+ 0,05°
» » 40 »	+ 0,07°
» » 55 »	+ 0,10°
» » 65 »	+ 0,10°

b) 0,45 g Dipeptid + 4 ccm Preßsaft + 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung:

Drehung beim Beginn des Versuches	— 1,31°
» nach 3 Minuten	— 1,17°
» » 7 »	— 0,98°
» » 10 »	— 0,81°
» » 11 »	— 0,78°
» » 16 »	— 0,56°
» » 17 »	— 0,51°
» » 25 »	— 0,21°
» » 30 »	— 0,09°
» » 34 »	— 0,00°
» » 35 »	+ 0,02°
» » 43 »	+ 0,07°
» » 54 »	+ 0,08°

c) 0,45 g Dipeptid + 3 ccm Preßsaft + 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung:

Drehung beim Beginn des Versuches	— 1,31°
» nach 5 Minuten	— 1,16°
» » 6 1/2 »	— 1,09°
» » 7 1/2 »	— 1,05°
» » 16 »	— 0,76°
» » 22 »	— 0,54°
» » 23 »	— 0,51°
» » 28 »	— 0,32°
» » 29 »	— 0,29°
» » 30 »	— 0,25°
» » 38 »	— 0,09°
» » 45 »	+ 0,01°
» » 47 »	+ 0,04°
» » 60 »	+ 0,07°

d) 0,45 g Dipeptid + 2 ccm Preßsaft + 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung:

Drehung beim Beginn des Versuches	— 1,35°
» nach 5 Minuten	— 1,23°
» » 11 »	— 1,07°
» » 15 »	— 0,99°

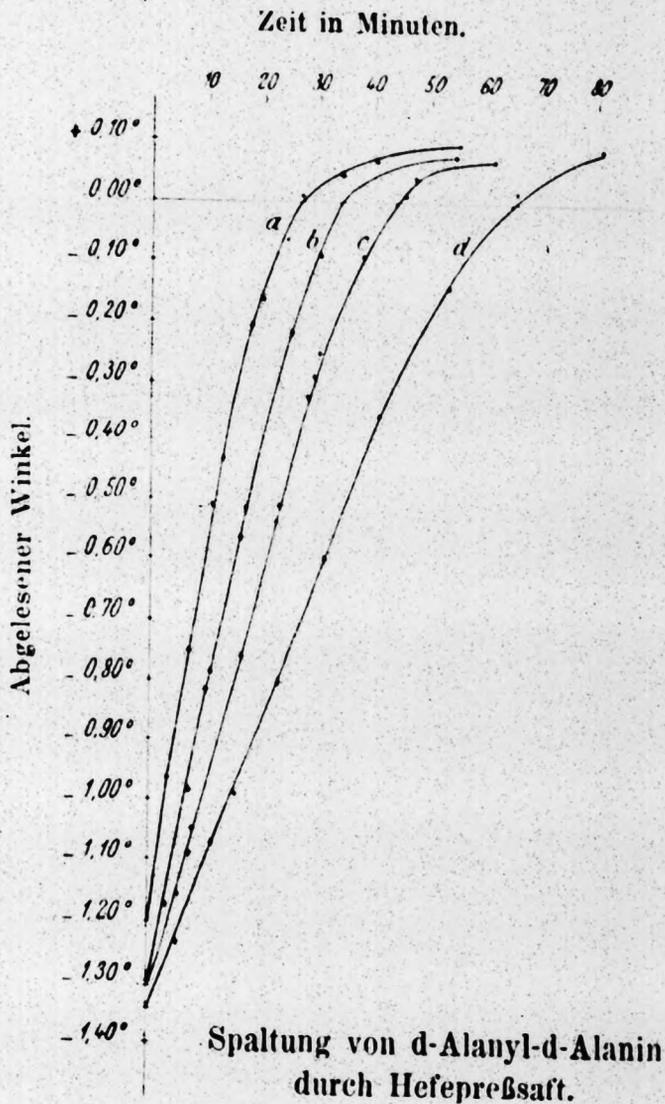
Drehung nach 23 Minuten	— 0,80°
„ „ 31 „	— 0,60°
„ „ 41 „	— 0,36°
„ „ 53 „	— 0,14°
„ „ 65 „	+ 0,02°
„ „ 80 „	+ 0,09°

Zu diesen Versuchen sei noch bemerkt, daß geringe Ungenauigkeiten bedingt waren einmal durch den Umstand, daß die Ablesung oft nicht sofort nach dem Zusammenbringen von Ferment und Dipeptid vorgenommen werden konnte, indem die zuerst vorhandene ungleiche Mischung eine exakte Ablesung erschwerte. Es wurde gleich die erste Ablesung bei 37° vorgenommen. Eine weitere Fehlerquelle, die vielleicht in geringem Umfange eine Rolle gespielt haben kann, liegt in dem Umstand, daß die Temperatur in der Verdauungsflüssigkeit während des Ablesens etwas sinken konnte. Da wir den Mantel mit Wasser von 37° füllten, so dürfte die Temperatur fast konstant geblieben sein, wenigstens gaben Messungen der Temperatur der Verdauungsflüssigkeit vor und nach den Ablesungen keine Unterschiede. Bei den mitgeteilten Versuchen gingen die Ablesungen stets ohne Störungen vor sich, dagegen mußten einige Versuche wegen zu unsicherer Ablesung aufgegeben werden.

Um uns zu überzeugen, daß das angewandte d-Alanyl-d-Alanin wirklich in seine Komponenten zerlegt war, haben wir einzelne Proben auf Alanin mit Hilfe der Estermethode verarbeitet. Die Verdauungsflüssigkeit wurde unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, der Rückstand mit Alkohol übergossen und bis zur Sättigung trockene, gasförmige Salzsäure eingeleitet. Durch Einstellen in Wasser verhinderten wir eine zu starke Erwärmung bei der Veresterung. Sie wurde wiederholt und dann aus den Esterchlorhydraten in der schon oft an dieser Stelle geschilderten Weise die Ester mit Natriumäthylat in Freiheit gesetzt oder auch mit Natronlauge | Kaliumcarbonat. Die Ester wurden dann bei 100° des Wasserbades und einem Druck von etwa 12 mm destilliert, das Destillat mit verdünnter Salzsäure versetzt und zur Trockene verdampft. Bei einer ganz genau durchgeführten Bestimmung erhielten wir 70% der Theorie an d-Alanin von der Drehung $[\alpha]_{20}^D = +10.2$

Auch die anderen Proben zeigten ein gutes Drehungsvermögen: $9,9^\circ$ und $10,3^\circ$.

Wir geben im folgenden eine graphische Darstellung des Verlaufs der Hydrolyse beim letzten Versuche bei verschiedener Fermentkonzentration:



II. Untersuchungen mit d-Alanyl-l-Leucin.

Schließlich haben wir noch zwei Versuche mit d-Alanyl-l-Leucin und Pankreassaft ausgeführt.

0,52 g Dipeptid in 7,5 ccm Pankreassaft gelöst.

Drehung nach 45 Minuten	—	0,75°
„ „ 8 Stunden	—	0,67°
„ „ 47 „	—	0,51°
„ „ 71 „	—	0,50°

0,50 g Dipeptid in 6,0 ccm Pankreassaft gelöst.

Drehung beim Beginn des Versuches	—	1,35°
„ nach 30 Minuten	—	1,22°
„ „ 60 „	—	1,16°

Drehung nach 2 Stunden	— 1.10°
" 6	— 1.02°
" 24	— 0.90°
" 32	— 0.70°
" 56	— 0.68°

Die Anwendung des d-Alanyl-l-Leucins ist insofern nicht so rasch orientierend, als das eine Spaltprodukt, das l-Leucin, in wässriger Lösung selbst ein ziemlich starkes Drehungsvermögen besitzt. F. Ehrlich¹⁾ gibt für den Antipoden des l-Leucins, das d-Leucin, $[\alpha]_D^{20} = + 10.34^\circ$ an.

Dieses Dipeptid ist im allgemeinen auch deshalb weniger gut für derartige Versuche als das d-Alanyl-d-Alanin geeignet, weil das frei werdende l-Leucin bei genügender Konzentration auskrystallisiert und so die Drehungsbestimmung beeinträchtigt.

Wir beabsichtigen die angeführte Methode weiter auszuarbeiten, um ihre Verwendbarkeit möglichst zu verallgemeinern. Zunächst interessiert uns die Frage, ob die von dem einen von uns und seinen Mitarbeitern nachgewiesenen Organfermente, welche Polypeptide spalten, alle gleich wirksam sind, oder ob sich Unterschiede nachweisen lassen. Ferner ist es sehr verlockend, mit Hilfe dieser Methode den Zymogenzustand des Pankreassaftes bei verschiedenartiger Ernährung zu verfolgen, und ferner bei Fermenten verschiedener Herkunft festzustellen, mit welchen Mitteln sie aktiviert werden können. Endlich wird es von größtem Interesse sein, die eben beschriebene Methode auch auf Fermente pathologischer Gewebe anzuwenden.

Schwierigkeiten bereitet vor allem noch die Beschaffung der aktiven Polypeptide. Es ist klar, daß zu diesen Versuchen nur ganz reine Produkte verwendbar sind, denn sobald ein zum Teil racemisches Produkt vorliegt, sind die Resultate nicht mehr eindeutig.

Die nicht unerheblichen Kosten der vorliegenden Versuche bestritten wir zum Teil aus Mitteln der Gräfin Bose-Stiftung, für deren Gewährung wir der medizinischen Fakultät der hiesigen Universität sehr zu Dank verpflichtet sind.

¹⁾ l. c. S. 26.