

Weiterer Beitrag zur Kenntnis des Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung unter verschiedenen Bedingungen.

Von

Emil Abderhalden und A. H. Koelker.

Mit einer Kurvenzeichnung im Text.

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

(Der Redaktion zugegangen am 28. Dezember 1907.)

Wir haben in einer früheren Mitteilung¹⁾ Versuche veröffentlicht, bei denen die Hydrolyse von d-Alanyl-d-alanin durch Hefepreßsaft bei gleichbleibender Dipeptidmenge und wechselnder Fermentkonzentration verfolgt worden war. Es war nun von Interesse, mit dem gleichen Dipeptid diese Versuche in der Weise zu wiederholen, daß nunmehr die Fermentkonzentration konstant blieb und die Menge des Dipeptides verändert wurde. Das zu diesem Versuche dienende d-Alanyl-d-Alanin haben wir nicht in der früher mitgeteilten Weise dargestellt. Wir gingen diesmal vom d-Alaninester aus. Diesen gewannen wir entweder durch Veresterung von schon isoliertem reinem d-Alanin aus Seide, oder aber wir verwendeten die Esterfraktion, die beim Destillieren der in Freiheit gesetzten Aminosäureester aus Seidenfibrin nach vorheriger sorgfältiger Entfernung des Glykokolls als Esterchlorhydrat bei 10—15 mm Druck und einer Temperatur bis 85° des Wasserbades übergeht. Wir haben sowohl den Äthyl- als auch den Methyl-ester dargestellt. Vorläufig erhielten wir mit letzterem keine guten Ausbeuten. Die Ester wurden dann im Brutraum stehen gelassen oder auf dem Wasserbade auf etwa 60° erhitzt. Allmählich trat Abscheidung von d-Alanin-

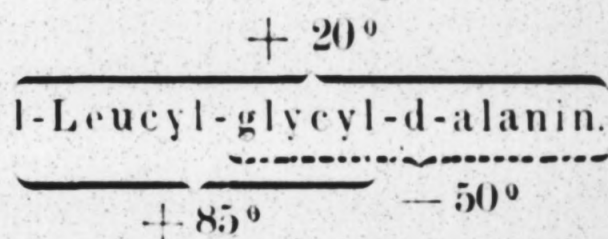
¹⁾ Die Verwendung optisch-aktiver Polypeptide zur Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer Fermente, Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 294, 1907.

Anhydrid auf. Durch Aufspaltung dieses Anhydrids durch möglichst kurzdauerndes Kochen mit Bromwasserstoffsäure gewannen wir dann d-Alanyl-d-Alanin, das ein recht gutes Drehungsvermögen aufwies. Wir werden auf diese Methode demnächst ausführlich zurückkommen, sobald ihre Durchführung so ausgearbeitet ist, daß sie zu besseren Ausbeuten führt. Vorläufig lassen diese noch zu wünschen übrig. Die Resultate der genannten Versuche sind in der unten stehenden Tabelle mitgeteilt.

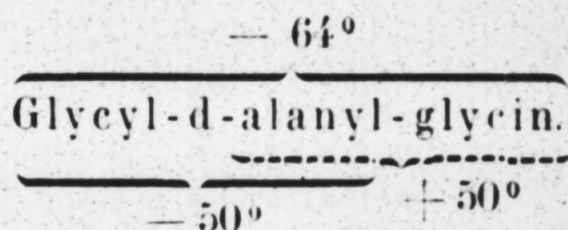
Wir haben ferner ein zweites Problem in Angriff genommen, nämlich die Frage, an welcher Stelle ein komplizierter gebautes Polypeptid vom Ferment zuerst angegriffen wird. Wir haben dieses Problem zunächst am einfachsten Falle, nämlich an Tripeptiden, zu lösen versucht. Durch geeignete Kombination von Aminosäuren ist es möglich, optisch-aktive Polypeptide aufzubauen, die ein anderes Drehungsvermögen aufweisen, als die zunächst bei der Spaltung entstehenden Bruchstücke, und auch diese müssen untereinander ein so verschiedenes optisches Verhalten zeigen, daß es möglich ist, genau zu entscheiden, welche Aminosäure — falls wir die Spaltung eines Tripeptides verfolgen — zuerst abgespalten wird. Die ganze Fragestellung läßt sich am besten an Hand der bis jetzt ausgeführten Beispiele erläutern. Wir studierten die Spaltung von l-Leucyl-glycyl-d-alanin¹⁾ und von Glycyl-d-alanyl-glycin. Das spezifische Drehungsvermögen des Tripeptides ist $+20^{\circ}$. Durch Hydrolyse können zunächst theoretisch zwei Dipeptide entstehen. Wird zuerst d-Alanin abgespalten, so bleibt l-Leucyl-glycin übrig. Dieses dreht $+85^{\circ}$. Dieser Verlauf der Spaltung müßte sich durch ein beträchtliches Anwachsen der Drehung im gleichen Sinne bemerkbar machen. Würde dagegen zunächst l-Leucin frei, dann käme es zur Bildung von Glycyl-d-alanin. Dieses Dipeptid dreht nun das polarisierte Licht 50° im entgegengesetzten Sinne. Seine Entstehung müßte somit durch das Sinken der Drehung und durch den schließlichen Übergang in die entgegengesetzte Drehungsrichtung zum Ausdruck kommen.

¹⁾ Vgl. die Darstellung bei Joseph Steingroever, Synthese einiger Polypeptide mit Beziehung zu dem Isobutyldiketopiperazin, Inaug.-Diss. Berlin 1907.

Es sind dies die idealen Fälle. Natürlich ist es auch denkbar, daß die Spaltung an beiden Enden des Tripeptids zugleich einsetzt. Auch einen solchen Verlauf der Spaltung müßte man aus dem Verhalten der Drehung herauslesen können. Natürlich kann das gebildete Dipeptid auch für sich wieder in neue Komponenten zerlegt werden. Am klarsten ergeben sich die geschilderten Verhältnisse aus folgendem Schema:



Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse beim Glycyl-d-Alanyl-glycin, wie das folgende Schema zeigt:



Ein weiteres Problem, das uns beschäftigt hat, galt dem Einfluß von Alkalien und Säuren auf den Gang der Hydrolyse und auf die Fermente selbst. Es läßt sich auch bei diesen Untersuchungen sehr scharf zeigen, wie viel exakter sich derartige Versuche durch die Verwendung von Verbindungen ganz bekannter Zusammensetzung und Struktur durchführen lassen. Einzig die Fermentlösung bleibt als unbekannte Größe bestehen, und sogar sie ist noch imstande, manchen Befund vieldeutig zu machen, wie die unten mitgeteilten Versuche zum Teil deutlich zeigen.

Schließlich haben wir in mehreren Versuchsreihen den Einfluß der Glykochol- und Taurocholsäure¹⁾ auf die Spaltung von Dipeptiden durch peptolytische Fermente festzustellen versucht. Wir sind vorläufig zu keinem eindeutigen Resultate gelangt und müssen aus mancherlei Gründen mit bestimmten Schlußfolgerungen abwarten, bis weitere Versuche vorliegen. Vor allem ist noch in ganz einwandfreier Weise zu entscheiden, ob Glykochol-

¹⁾ Vgl. hierzu: Otto v. Fürth und Julius Schütze, Über den Einfluß der Galle auf die fett- und eiweißspaltenden Fermente des Pankreas. Hofmeisters Beiträge, Bd. IX, S. 28, 1907.

und Taurocholsäure durch Pankreas- und Darmsaft und auch durch Hefepreßsaft gespalten werden. Bis jetzt haben wir eine Spaltung nicht beobachtet. Da wir jedoch die genannten Gallensäuren als Alkalisalze in Lösung brachten, so ist es nicht ganz ausgeschlossen, daß in Analogie mit den Spaltungsversuchen mit Glycyl-l-tyrosin und d-Alanyl-d-alanin bei Zusatz von Alkali auch hier eine Hemmung der Fermentwirkung vorlag.

Endlich haben wir einige Versuche, die der eine von uns gemeinsam mit Alfred Gigon¹⁾ ausgeführt hat, wiederholt. Es handelt sich um die Hemmung der Hydrolyse von Dipeptiden und speziell von Glycyl-l-tyrosin durch Hefepreßsaft nach Zusatz von optisch-aktiven, in der Natur vorkommenden Aminosäuren. Wir werden diese Versuche auf weitere optisch-aktive Dipeptide ausdehnen, um festzustellen, ob bei allen Dipeptiden dieselben Verhältnisse sich zeigen, oder ob Unterschiede sich finden. Vor allen Dingen beabsichtigen wir den Einfluß des Zusatzes der entsprechenden racemischen Dipeptide und des Antipoden des angewandten Dipeptides genauer zu verfolgen. Ferner sind Versuche mit verschiedenen Salzen und vor allem auch mit Natriumcarbonat im Gange. Über alle diese zuletzt erwähnten Versuche werden wir demnächst berichten und ebenso über neuere Versuche, welche den Aufbau von Polypeptiden aus Aminosäuren durch Fermentwirkung zum Ziele haben. Es ist klar, daß die Versuche über den Abbau komplizierterer Polypeptide gleichfalls noch auf ein größeres und mannigfaltigeres Material übertragen werden müssen. Bei dieser Gelegenheit wollen wir nicht unerwähnt lassen, welche große Bedeutung für alle diese Versuche die möglichste Reinheit der angewandten optisch-aktiven Polypeptide hat. Selbst kleine Verunreinigungen und vor allem die Beimengung von Racemkörpern bewirken bei manchen Versuchen starke Abweichungen und können leicht zu ganz falschen Schlüssen führen. Aus diesem Grunde sind derartige Versuche sehr zeitraubend und vor allen Dingen auch sehr kostspielig. Ist ein optisch-aktives Polypeptid mit

¹⁾ Emil Abderhalden und Alfred Gigon, Weiterer Beitrag zur Kenntnis des Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung. Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 251, 1907.

vieler Mühe aufgebaut, so kann der Nachweis, daß es nicht einheitlich ist, d. h. mehrere Prozent Racemkörper enthält, seine Verwendung ganz unmöglich machen. Das dargestellte Material ist dann für manche Versuche völlig wertlos. Absolut optisch einheitliche Substanzen dürften auch wir zu den untenstehenden Versuchen kaum benützt haben. Es ist in keinem Falle ausgeschlossen, daß durch die angewandten Methoden in geringem Umfange Racemisierung eintritt. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die erhaltenen Resultate noch schärfer sein würden, wenn die verwendeten Polypeptide völlig einheitlich gewesen wären. Da wir stets die zu vergleichenden Versuche mit ein und derselben Lösung eines bestimmten Polypeptides durchgeführt haben, so gleicht sich bis zu einem gewissen Grade die durch das nicht absolut optisch einheitliche Polypeptid eingeführte Fehlerquelle wieder aus. Ist ein größerer Teil des Polypeptides racemisch, so ergeben sich Resultate, die völlig von den mit optisch möglichst einheitlichen Polypeptiden gewonnenen Befunden abweichen. Derartige Erfahrungen machten wir bei der Verfolgung des Einflusses von Aminosäurezusatz auf die Raschheit der Hydrolyse von d-Alanyl-d-alanin durch Hefepreßsaft und Pankreasaft. Das verwendete Dipeptid drehte statt $-21,6^{\circ}$ nur etwa 16° . Die erhaltenen Resultate stehen im Widerspruch mit allen unseren sonstigen Erfahrungen und rühren offenbar daher, daß wir in der Lösung nicht, wie sonst, im Verlauf des Versuches im wesentlichen nur drei Verbindungen, nämlich das angewandte d-Alanyl-d-alanin, das durch Spaltung frei gewordene d-Alanin und die zugesetzte Aminosäure hatten, sondern außerdem den Racemkörper dl-Alanyl-dl-alanin. Wie wir aus anderweitigen Versuchen wissen, beeinflußt die Anwesenheit von Racemkörpern den Verlauf der fermentativen Spaltung ganz erheblich.

I. Spaltung von d-Alanyl-d-alanin durch Hefepreßsaft bei konstant bleibender Fermentmenge und wechselnder Konzentration des Dipeptids.

Zu diesen Versuchen diente eine Lösung der molekularen Menge von d-Alanyl-d-Alanin. Von dieser Stammlösung verwendeten wir eine bestimmte Anzahl Kubikzentimeter. Das ver-

wendete d-Alanyl-d-alanin drehte — $19,6^{\circ}$ statt $21,6^{\circ}$, es war somit nicht völlig optisch einheitlich. Für diese Versuche war seine Reinheit genügend. Versuche 6, 8 und 10 wurden am 3. XII. ausgeführt, in demselben Sinne gehören die am 11. XII. durchgeführten Versuche 1, 2 und 3 zusammen. Versuch 4 ist am 2. XII. ausgeführt worden. Die wesentlichsten Fehlerquellen dieser Versuche sind durch das Abmessen sowohl der Dipeptidmenge als auch der Fermentlösung gegeben. Wir haben natürlich bei diesen Operationen die größte Sorgfalt angewandt. Ganz allgemein muß bemerkt werden, daß die erste Ablesung nicht sehr zuverlässig ist. Offenbar ist einesteils die Durchwärmung der ganzen Flüssigkeit und damit auch die Mischung im Beginne des Versuches keine ganz gleichmäßige. Die erhaltenen Resultate ergeben sich ohne weiteres aus den beifolgenden Tabellen und der Zeichnung.

Zeit Minuten	Versuch 1.	Versuch 2.	Versuch 3.
	($1/2000$ -mol.) 0,5 ccm d-Alanyl- d-alaninlösung 1,0 ccm Hefepreßsaft 5,0 » Wasser	($1/1000$ -mol.) 1,0 ccm Dipeptid- lösung 1,0 » Hefepreßsaft 4,5 » Wasser	($1/500$ -mol.) 1,5 ccm Dipeptid- lösung 1,0 » Hefepreßsaft 4,0 » Wasser
	Abgelesene Winkel		
6	— $0,24^{\circ}$	— $0,44^{\circ}$	— $0,68^{\circ}$
12	— $0,16^{\circ}$	— $0,42^{\circ}$	— $0,65^{\circ}$
18	— $0,16^{\circ}$	— $0,38^{\circ}$	— $0,62^{\circ}$
26	— $0,07^{\circ}$	— $0,27^{\circ}$	— $0,51^{\circ}$
35	— $0,00^{\circ}$	— $0,24^{\circ}$	— $0,49^{\circ}$
43	— $0,00^{\circ}$	— $0,20^{\circ}$	— $0,45^{\circ}$
50	—	— $0,16^{\circ}$	— $0,40^{\circ}$
60	—	— $0,11^{\circ}$	— $0,30^{\circ}$
71	—	— $0,08^{\circ}$	— $0,24^{\circ}$
86	—	— $0,03^{\circ}$	— $0,17^{\circ}$
98	—	+ $0,01^{\circ}$	— $0,12^{\circ}$
110	—	+ $0,02^{\circ}$	— $0,08^{\circ}$
120	—	—	— $0,07^{\circ}$
140	—	—	— $0,01^{\circ}$

Versuch 4.

($1/666$ -mol.)

2,0 ccm d-Alanyl-d-alaninlösung

1,0 „ Hefepressaft

3,5 „ Wasser

Zeit in Minuten	Abgelesener Winkel
7	— 0,93°
35	— 0,69°
48	— 0,60°
71	— 0,42°
100	— 0,23°
134	— 0,09°
164	— 0,01°
208	+ 0,01°

Versuch 6.

($1/333$ mol.)

3,0 ccm d-Alanyl-
d-alaninlösung

1,0 ccm Hefepressaft

2,0 „ Wasser

Versuch 8.

($1/250$ mol.)

4,0 ccm d-Alanyl-
d-alaninlösung

1,0 ccm Hefepressaft

1,0 „ Wasser

Versuch 10.

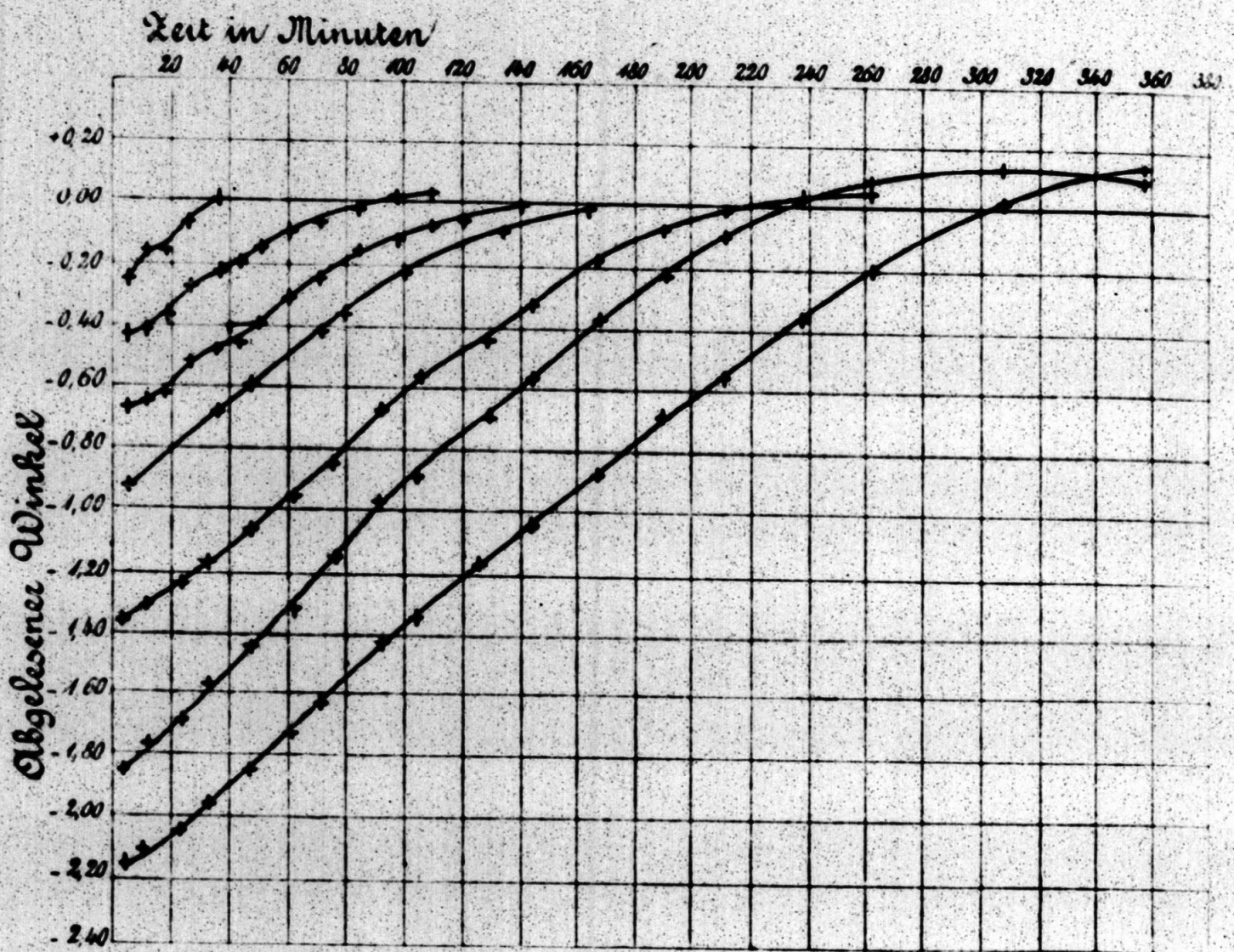
($1/200$ mol.)

5,0 ccm d-Alanyl-
d-alaninlösung

1,0 ccm Hefepressaft

Zeit Minuten	Winkel	Winkel	Winkel
4	— 1,36°	— 1,83°	— 2,15°
12	— 1,31°	— 1,75°	— 2,10°
23	— 1,23°	— 1,68°	— 2,05°
32	— 1,17°	— 1,58°	— 1,97°
47	— 1,05°	— 1,44°	— 1,84°
61	— 0,95°	— 1,31°	— 1,73°
76	— 0,83°	— 1,15°	— 1,62°
92	— 0,67°	— 0,97°	— 1,43°
105	— 0,57°	— 0,87°	— 1,33°
128	— 0,42°	— 0,69°	— 1,16°
144	— 0,32°	— 0,57°	— 1,03°
167	— 0,18°	— 0,38°	— 0,86°
190	— 0,08°	— 0,23°	— 0,69°
211	— 0,01°	— 0,11°	— 0,54°
238	+ 0,03°	+ 0,01°	— 0,35°
262	+ 0,05°	+ 0,07°	— 0,20°
308	+ 0,05°	+ 0,13°	+ 0,02°
357	+ 0,05°	+ 0,12°	+ 0,15°
377	+ 0,11°	+ 0,18°	+ 0,29°

Die graphische Darstellung gibt eine leichtere Übersicht des Verlaufs.



Es gehen aus dieser Übersicht die Beziehungen zwischen Dipeptidmenge und Fermentmenge klar und eindeutig hervor. Je mehr Ferment im Verhältnis zum vorhandenen Dipeptid vorhanden ist, um so rascher erfolgt die Spaltung. Erwähnen wollen wir noch, daß im Beginn der Hydrolyse eine Beschleunigung einzutreten scheint. Es geht dies namentlich deutlich aus den beigegebenen Kurven hervor. Wir werden diesen Befund weiter verfolgen.

II. Hydrolyse von optisch-aktiven Tripeptiden durch Pankreassaft und Darmsaft.

Wie schon in der Einleitung bemerkt worden ist, haben wir zu diesen Versuchen l-Leucyl-glycyl-d-alanin und Glycyl-d-alanyl-glycin verwendet. Zunächst prüften wir das Verhalten der etwa entstehenden Dipeptide gegen die von

ans verwendete Fermentlösung, also von l-Leucyl-glycin und Glycyl-d-alanin. Das Verhalten von d-Alanyl-glycin haben wir nicht besonders festgestellt, weil dieses Dipeptid, wie aus früheren Versuchen hervorgeht, durch Pankreassaft allein schon leicht gespalten wird. Die beiden anderen Dipeptide widerstanden hingegen der Einwirkung des Pankreassaftes.¹⁾ Aus den unten mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß l-Leucyl-glycin von unserer Fermentlösung relativ rasch gespalten wurde, während Glycyl-d-alanin entweder gar nicht oder doch nur sehr langsam angegriffen worden ist. Der Umstand, daß l-Leucyl-glycin von Pankreassaft und Darmsaft gespalten wird, ist nicht auffallend. Es ist früher schon beobachtet worden,²⁾ daß der Darmsaft ganz anders wirkt als der Pankreassaft und die dem Pankreassaft zugesetzte Menge Darmsaft ausschlaggebend sein kann für die Wirksamkeit des Gemisches beider Säfte. Auffallender ist die Beobachtung, daß dasselbe Fermentgemisch Glycyl-d-alanin nicht oder doch sehr langsam angreift. Weitere Versuche müssen entscheiden, welche Ursache diese Erscheinung hat. Es ist möglich, daß der Darmsaft, der dl-Leucyl-glycin asymmetrisch spaltet, Glycyl-d-alanin nicht angreift. Für die Beurteilung unserer Versuche genügt die Feststellung, daß die verwendete Fermentlösung l-Leucyl-glycin in einem bestimmten Zeitraume spaltet und Glycyl-d-alanin nicht.

Wir haben gleichzeitig unsere Fermentlösung auf dl-Leucyl-glycin einwirken lassen und festgestellt, daß auch dieses Dipeptid gespalten wird. Ferner untersuchten wir den Einfluß des Zusatzes von dl-Leucyl-glycin auf die Spaltung von l-Leucyl-glycin durch Pankreassaft und Darmsaft. Wie der Versuch zeigt, hemmte dieser Zusatz ganz entschieden.

Im folgenden seien die Versuche mitgeteilt:

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten einiger Polypeptide gegen Pankreassaft, Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 264, 1907.

²⁾ Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi, Studien über die proteolytische Wirkung der Pankreassaft einiger tierischen Organe sowie des Darmsaftes, Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 1, 1906.

1. Spaltung von Leucyl-glycin durch Pankreassaft + Darmsaft.

a) l-Leucyl-glycin.

0,0944 g l-Leucyl-glycin ($\frac{1}{2000}$ mol.)

0,9 ccm Pankreassaft

0,1 » Darmsaft

5,5 » Wasser.

Zeit	Abgelesener Winkel
10 Minuten	+ 1,01° [Angesetzt am 5. XII. 07]
24 »	+ 0,94°
115 »	+ 0,88°
370 »	+ 0,79°
1240 »	+ 0,48°
168 Stunden	- 0,06°
360 »	- 0,02°

b) l-Leucyl-glycin bei Zusatz von dl-Leucyl-glycin.

0,0944 g l-Leucyl-glycin ($\frac{1}{2000}$ mol.)

0,0944 » dl-Leucyl-glycin ($\frac{1}{2000}$ mol.)

0,9 ccm Pankreassaft

0,1 » Darmsaft

5,5 » Wasser.

Die Lösung wurde filtriert.

Der Versuch begann am 6. XII. 07.

Zeit in Minuten	Abgelesener Winkel
10	+ 0,98°
55	+ 0,95°
105	+ 0,92°
180	+ 0,89°
280	+ 0,85°

Über Nacht im Brutraum aufbewahrt.

20 Stunden + 0,75°

Über Nacht im Brutraum. Die trübe gewordene Lösung wurde filtriert.

72 Stunden + 0,53°

Im Brutraum über Nacht.

90 Stunden + 0,44°

216 » + 0,36°

288 » + 0,13°

c) dl-Leucyl-glycin.

0,1890 g dl-Leucyl-glycin ($\frac{1}{1000}$ mol.)

0,9 ccm Pankreassaft

0,1 » Darmsaft

5,5 » Wasser.

Angesetzt am 6. XII. 07. Die Lösung wurde filtriert.

Zeit	Abgelesener Winkel
10 Minuten	— 0,08°
1 Stunde	— 0,08°
2 Stunden	— 0,09°
5 „	— 0,12°
20 „	— 0,22°
26 „	— 0,27°
72 „	— 0,42°
90 „	— 0,56°
210 „	— 0,94°
282 „	— 1,00°

Offenbar ist das gesamte l-Leucyl-glycin gespalten worden und fast reines d-Leucyl-glycin übrig geblieben. Der Versuch stimmt in seinem Verlauf sehr gut mit dem entsprechenden Versuche mit l-Leucyl-glycin überein. Bei diesem letzteren war die Drehung von $+ 1,01^\circ$ auf 0° gefallen und beim Versuche mit dl-Leucyl-glycin ergab sich als Enddrehung $- 1,00^\circ$, d. h. es entspricht offenbar die Menge des verbliebenen d-Leucyl-glycins, wie es auch bei der vollständigen Spaltung der angewendeten 0,1890 g dl-Leucyl-glycin der Fall sein muß, der Menge des beim Versuch 1 a) angewandten l-Leucyl-glycins.

2. Einwirkung von Pankreassaft und Darmsaft auf Glycyl-d-alanin.

0,0733 g Glycyl-d-alanin ($\frac{1}{2000}$ mol.)

0,9 ccm Pankreassaft

0,1 „ Darmsaft

5,5 „ Wasser.

Zeit	Winkel
10 Minuten	— 0,52°
16 Stunden	— 0,49°

3. Spaltung von l-Leucyl-glycyl-d-alanin durch Pankreassaft und Darmsaft.

Es sind zwei Versuche ausgeführt worden. Der eine mit 0,259 g Tripeptid und der zweite mit 0,130 g des gleichen Tripeptids. Die angewandte Fermentmenge war in beiden Fällen beim Beginne des Versuches dieselbe. Beim ersten Versuch blieb die Drehung nach etwa 11 Stunden stehen und war auch

nach längerem Warten nicht wesentlich verändert. Erst auf Zusatz von neuem Ferment ging die Spaltung weiter. Beim zweiten Versuch trat ein solcher Stillstand nicht auf, offenbar deshalb nicht, weil im Verhältnis zum angewandten Tripeptid im Vergleich zum ersten Versuch von Anfang an die doppelte Menge Ferment vorhanden war. Allerdings muß auch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß das Aufbewahren der Lösung beim ersten Versuche im Eisschrank einen Einfluß hatte. An und für sich erleiden Pankreassaft und Darmsaft beim Stehen bei 0° keine bemerkbare Veränderung, abgesehen davon, daß die Wirksamkeit mit der Zeit zurückgeht. Es ist jedoch möglich, daß das Stehen des Fermentes mit dem Tripeptid und den Spaltprodukten von Einfluß war. Wir werden durch direkte Versuche zu entscheiden suchen, ob das Aufhören der Spaltung im vorliegenden Versuche auf das Stehen bei 0° zurückzuführen ist oder aber, ob die Fermentmenge nicht ausreichte.

Versuch 1.

5,0 ccm Stammlösung, enthaltend 0,259 g Tripeptid ($\frac{1}{1000}$ mol.)
 0,9 » Pankreassaft
 0,1 » Darmsaft
 0,5 » Wasser.

Angesetzt am 6. XII. 07 um 1⁴⁰ nachmittags. Die Lösung wurde filtriert.

Zeit in Stunden	Abgelesener Winkel
$\frac{1}{2}$	+ 0,75°
1 $\frac{1}{2}$	+ 0,76°
2 $\frac{1}{3}$	+ 0,80°
3 $\frac{2}{3}$	+ 0,87°
5 $\frac{1}{3}$	+ 0,94°
Hier wurde die Lösung über Nacht im Eisschrank aufbewahrt.	
6 $\frac{2}{3}$	+ 0,98°
8 $\frac{5}{6}$	+ 1,01°
11	+ 1,04°
Über Nacht im Eisschrank aufbewahrt.	
16 $\frac{1}{2}$	+ 1,07°
31	+ 1,05°

Da die Drehung innerhalb von 20 Stunden sich wenig verändert hatte, wurde nochmals die gleiche Fermentmenge hinzugegeben. Die Konzentration der Lösung hat sich hierbei natürlich verändert.

Die nunmehr beobachtete Drehung der Lösung und der darauf erfolgende Rückgang des Drehungsvermögens müssen unter sich betrachtet werden.

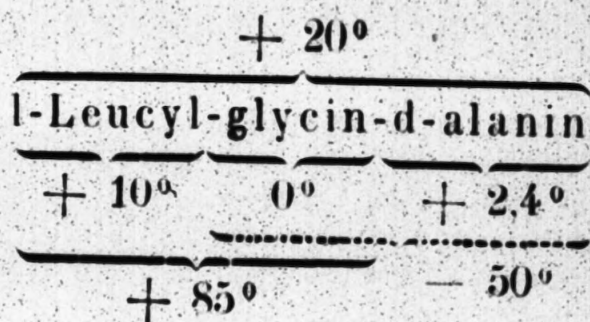
31 Stunden	+ 0,74°
34 ¹ / ₄ „	+ 0,60°
50 ³ / ₄ „	+ 0,38°
175 „	+ 0,02°
295 „	- 0,09°

Versuch 2.

- 2,5 ccm Stammlösung, 0,130 g Tripeptid oder $\frac{1}{2000}$ mol.
- 3,0 „ Wasser
- 0,9 „ Pankreassaft
- 0,1 „ Darmsaft.

Zeit in Stunden	Abgelesener Winkel
$\frac{1}{6}$	+ 0,37°
$\frac{5}{12}$	+ 0,39°
1	+ 0,41°
1 ¹ / ₃	+ 0,43°
2 ¹ / ₃	+ 0,47°
3 ¹ / ₃	+ 0,48°
22	+ 0,22°
27	+ 0,14°
35	+ 0,09°
49	- 0,02°

Wenn wir die erhaltenen Resultate überblicken, so kommen wir zum Resultate, daß zunächst in der Hauptsache d-Alanin abgespalten worden ist, d. h. die Spaltung des Tripeptids hat zwischen Glycin und d-Alanin eingesetzt. Wir ziehen diesen Schluß aus folgender Beobachtung an Hand des folgenden Schemas.



Das Drehungsvermögen nahm in der ersten Zeit ganz beträchtlich zu und zwar im ersten Versuch um etwa 40%. Eine solche Zunahme ist nur möglich, wenn bei der Spaltung l-Leucyl-glycin entsteht. Würde l-Leucin abgespalten, so würde Glycyl-d-alanin entstehen und dieses würde nach der entgegen-

gesetzten Richtung drehen, d. h. das Drehungsvermögen müßte fallen. Würden gleichzeitig in gleichen Mengen l-Leucin und d-Alanin abgespalten, so würde das Drehungsvermögen gleichfalls sinken, denn alle entstehenden Spaltprodukte würden weniger drehen (Glykokoll gar nicht) als das angewandte Tripeptid. Wir können somit mit Bestimmtheit zum Ausdruck bringen, daß das angewandte Tripeptid in der Hauptsache zunächst zwischen Glycin und d-Alanin gespalten wird, und daß vorübergehend das Dipeptid l-Leucyl-glycin auftritt. Es ist damit nicht ausgeschlossen, daß in geringerem Umfang auch eine Spaltung zwischen l-Leucin und Glykokoll stattfindet. Im weiteren Verlauf des Versuches sinkt dann das Drehungsvermögen wieder ab. Es hängt dieser Rückgang der Drehung höchstwahrscheinlich mit der Spaltung des gebildeten l-Leucyl-glycins in seine Komponenten zusammen. Glycyl-d-alanin scheint nach den vorliegenden Versuchen entweder gar nicht oder doch in nicht beträchtlichen Mengen bei der ganzen Hydrolyse zu entstehen.

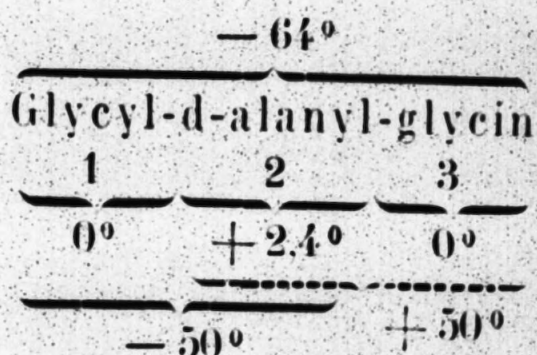
All diese Schlußfolgerungen sind unter der Voraussetzung gezogen, daß das angewandte l-Leucyl-glycyl-d-alanin optisch einheitlich war. Ein beträchtlicher Gehalt an Racemkörper würde natürlich das Resultat stark beeinflussen, weil wir nach den sonstigen Erfahrungen mit asymmetrischen Spaltungen rechnen müßten, und das würde die Entstehung von Spaltprodukten bedingen, über deren Drehungsvermögen sich zum Teil nicht aussagen läßt. Es liegt jedoch kein Grund vor, anzunehmen, daß das angewandte Tripeptid in irgendwie erheblichem Maße mit Racemkörpern verunreinigt gewesen ist. Auch müßten schon größere Mengen von solchen Beimengungen vorhanden sein, bis sie einen Einfluß auf die gemachten Beobachtungen haben würden.

4. Spaltung von Glycyl-d-alanyl-glycin durch Pankreassaft + Darmsaft.

3.0	ccm Stammlösung (0,09 g Tripeptid)
0,9	• Pankreassaft
0,1	• Darmsaft
2,5	• Wasser.

Zeit	Abgelesener Winkel
3 Minuten	— 0,89°
30 „	— 0,86°
95 „	— 0,76°
155 „	— 0,67°
290 „	— 0,50°
20 Stunden	— 0,03°
48 „	+ 0,28°
96 „	+ 0,20°
144 „	+ 0,13°

Auch läßt sich mit ziemlicher Sicherheit feststellen, an welcher Stelle die Spaltung zuerst eingetreten ist, wie das folgende Schema zeigt:



Das Drehungsvermögen fällt und geht schließlich nach der entgegengesetzten Richtung über, um dann wieder abzunehmen. Das erstere Verhalten spricht dafür, daß die Spaltung zunächst zwischen 1 und 2 eintritt. Es müßten in diesem Falle Glykokoll und d-Alanyl-glycin entstehen. Letztere Verbindung dreht nach rechts, während das angewandte Tripeptid nach links dreht. So erklärt sich die Abnahme des Drehungsvermögens und der Übergang der Drehungsrichtung nach rechts. Der Umstand, daß dann eine nochmalige Abnahme des Drehungsvermögens eintritt, spricht dafür, daß das entstehende d-Alanyl-glycin weiter in Glykokoll und d-Alanin zerlegt wird. Wäre die Spaltung zwischen 2 und 3 erfolgt, dann hätte Glycyl-d-alanin entstehen müssen. Das Drehungsvermögen der Lösung hätte auch eine Abnahme erfahren, da $[\alpha]_{20}^D$ beim Tripeptid — 64° und bei Glycyl-d-alanin nur — 50° beträgt. Diese Abnahme hätte jedoch eine nur geringe sein dürfen, und vor allem hätte die Drehung niemals positiv werden können. Auch hier muß natürlich die Einschränkung gemacht werden, daß es nicht ausgeschlossen ist, daß in geringerem Umfang gleichzeitig auch zwischen 2 und 3

eine Spaltung eintritt. Jedenfalls ist es von Interesse, daß ein Gemisch von Pankreassaft und Darmsaft, das d-Alanyl-glycin leicht spaltet, dagegen Glycyl-d-alanin nicht oder doch nur langsam angreift, Glycyl-d-alanyl-glycin zwischen 1 und 2 zerlegt.

Überblicken wir die beiden bis jetzt vorliegenden Versuche, so ergibt sich, daß das Ferment einmal die Kette vorne und einmal hinten zuerst gespalten hat. Weitere Versuche mit anderen optisch-aktiven Polypeptiden sind abzuwarten, ehe Schlußfolgerungen möglich sein werden. Vor allen Dingen werden wir die Hydrolyse der gleichen Tripeptide mit Säuren und eventuell mit Alkalien verfolgen, um zu erfahren, ob der Gang der Hydrolyse durch das Ferment in spezifischer Weise bestimmt wird, oder ob Bedingungen rein chemischer Natur ausschlaggebend für das beobachtete Verhalten der beiden untersuchten Tripeptide gegen Pankreassaft und Darmsaft sind. Es erweist sich auch als durchaus notwendig, die Hydrolyse von optisch-aktiven Polypeptiden und speziell auch von Dipeptiden mit molekularen Mengen — auch Bruchteilen hiervon und mehrfachen Mengen — von Säuren und Alkalien zu verfolgen, um auf diese Weise die Resultate, die wir bei der Fermenthydrolyse erhalten haben, besser beurteilen zu können. Derartige Versuche sind im Gange.

III. Einwirkung von Alkali und Säure auf Pankreassaft und Darmsaft und auf Hefepreßsaft.

2,7 ccm Pankreassaft mit 0,3 ccm Darmsaft vermischt und 2,4 ccm n-Na(OH) zugesetzt. Die Lösung blieb 5 Minuten bei 18° stehen. Sie wurde nun mit 2,4 ccm n-HCl versetzt. Hierbei wurde die vorher klare Lösung trübe. Das Volumen der gesamten Flüssigkeit betrug nunmehr 7,8 ccm. Zur Prüfung der Wirksamkeit dieser Fermentlösung wurden 2,6 ccm mit 2,0 ccm einer Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin vermischt, die molekulare Mengen dieses Dipeptides im Liter enthielt. Die Lösung drehte + 0,60°. Nach 30 stündigem Stehen bei 38° hatte sich das Drehungsvermögen noch nicht verändert. Nach weiteren 20 Stunden konstatierten wir eine geringe Abnahme (+ 0,53°). Jedenfalls erschien die Fermentlösung durch das kurze Stehen

mit Alkali sehr abgeschwächt zu sein, vorausgesetzt, daß das in Lösung vorhandene Kochsalz keinen Einfluß hatte. Es ist dies jedoch nach unseren sonstigen Erfahrungen und speziell nach dem Resultate des nachfolgenden Versuches ausgeschlossen. Die im Pankreassaft und Darmsaft enthaltenen proteolytischen Fermente scheinen somit gegen freies Alkali sehr empfindlich zu sein.

Denselben Versuch führten wir auch mit Säure aus. 2,7 ccm Pankreassaft + 0,3 ccm Darmsaft wurden mit 2,4 ccm $\frac{1}{10}$ -n-HCl versetzt, und zu dieser Lösung nach 5 Minuten langem Stehen 2,4 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Na(OH) zugesetzt. Zu 2,6 der gesamten Lösung fügten wir 2,0 ccm der schon erwähnten Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin zu. Die Drehung betrug im 1 dm-Rohr + 0,60°. Nach 30 Minuten lasen wir + 0,62° ab, nach 3 Stunden + 0,54° und nach 31½ Stunden + 0,26°. Die weitere Verfolgung der Hydrolyse wurde durch Ausfallen von Tyrosin verhindert. Säuren scheinen somit die proteolytischen Fermente des Pankreas- und Darmsaftes weniger zu schädigen als freies Alkali.

Im folgenden teilen wir einige Versuche über die Spaltung von optisch-aktiven Dipeptiden durch Fermente unter gleichzeitigem Zusatz bestimmter Mengen von Alkali und von Säuren mit.

Da wir in den folgenden Versuchen mit Lösungen von ganz bestimmtem Gehalt zu arbeiten pflegten, so haben wir es für nötig gehalten, wie in den eben mitgeteilten Versuchen auch hier mit mol-Lösungen zu arbeiten.

a) Zusatz von Alkali.

Zu diesen Versuchen dienten Stammlösungen von Glycyl-l-tyrosin, die $\frac{3}{34}$, $\frac{3}{32}$ und $\frac{1}{10}$ Molstärke besaßen.

Serie A.

0,53 mol. NaOH bezogen auf das Dipeptid.	Kontrollversuch ohne Alkalizusatz.
a) 6,0 ccm Stammlösung von Glycyl- l-tyrosin ($\frac{3}{34}$ mol. Stärke)	b) 6,0 ccm Stammlösung von Glycyl- l-tyrosin ($\frac{3}{34}$ mol. Stärke)
0,9 * Pankreassaft	0,9 * Pankreassaft
0,1 * Darmsaft	0,1 * Darmsaft
0,3 * n-NaOH = 0,53 mol.	0,6 * Wasser
0,3 * Wasser	

Zeit	Abgelesene Winkel	
7 Min.	+ 0,73°	+ 0,64°
85 »	+ 0,57°	+ 0,54°
163 »	+ 0,43°	+ 0,40°
205 »	+ 0,36°	+ 0,37°
275 »	+ 0,29°	+ 0,33°

Von hier ab schwer abzulesen.

Serie B.

a) 1,5 mol. NaOH. b) 1,0 mol. NaOH. c) ohne NaOH als Kontrolle
 Bezogen auf die angewandte Menge Dipeptid.

4,0 ccm $\frac{3}{32}$ mol. Lösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm $\frac{3}{32}$ mol. Lösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm $\frac{3}{32}$ mol. Lösung von Glycyl-l-tyrosin
0,6 ccm Pankreassaft	0,6 ccm Pankreassaft	0,6 ccm Pankreassaft
0,07 ccm Darmsaft	0,07 ccm Darmsaft	0,07 ccm Darmsaft
0,55 » n-NaOH	0,37 » n-NaOH	1,6 » Wasser
1,05 » Wasser	1,23 » Wasser	

Zeit Minuten	Abgelesene Winkel		
6	+ 0,80°	+ 0,73°	+ 0,59°
15	+ 0,81°	+ 0,75°	+ 0,57°
41	+ 0,80°	+ 0,64°	+ 0,48°
174	+ 0,76°	+ 0,60°	+ 0,40°
260	+ 0,73°	+ 0,54°	+ 0,38°
378	+ 0,58°	+ 0,43°	+ 0,23°
1428	+ 0,49°	+ 0,31°	+ 0,09°

Serie C.

a) 2,3 mol. NaOH. b) 2,0 mol. NaOH. c) 1,8 mol. NaOH.
 Bezogen auf die angewandte Menge Dipeptid.

4,0 ccm $\frac{3}{32}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm $\frac{3}{32}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm $\frac{3}{32}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin
0,6 ccm Pankreassaft	0,6 ccm Pankreassaft	0,6 ccm Pankreassaft
0,07 ccm Darmsaft	0,07 ccm Darmsaft	0,07 ccm Darmsaft
0,88 » n-Na(OH)	0,74 » n-Na(OH)	0,67 » n-Na(OH)
0,72 » Wasser	0,86 » Wasser	0,93 » Wasser

Zeit	Winkel	Winkel	Zeit	Winkel
5 Min.	+ 0,92°	+ 0,91°	$\frac{1}{2}$ Std.	+ 0,88°
23 Stund.	+ 0,97°	+ 0,92°	$3\frac{1}{2}$ »	+ 0,75°
			21 ¹ »	+ 0,64°
			43 »	+ 0,63°

Serie D.

	a) 2.2 mol. NaOH.	b) 2.0 mol. NaOH.	c) 1.8 mol. NaOH.
	Bezogen auf die angewandte Menge Dipeptid.		
	4,0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Glycyl-l-tyrosin-lösung	4,0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Glycyl-l-tyrosin-lösung	4,0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Glycyl-l-tyrosin-lösung
	0,9 ccm Pankreassaft	0,9 ccm Pankreassaft	0,9 ccm Pankreassaft
	0,1 ccm Darmsaft	0,1 ccm Darmsaft	0,1 ccm Darmsaft
	0,88 » n-NaOH	0,8 » n-NaOH	0,72 » n-NaOH
	0,62 » Wasser	0,70 » Wasser	0,78 » Wasser
Zeit	Winkel	Winkel	Winkel
5 Min.	+ 0,94°	+ 0,88°	+ 0,85°
13 Stund.	+ 0,93°	+ 0,88°	+ 0,73°

Serie E.

	a) 2.2 mol. NaOH.	b) 2.0 mol. NaOH.	c) 1.8 mol. NaOH.
	Bezogen auf die angewandte Menge Dipeptid.		
	4,0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Glycyl-l-tyrosin-lösung	4,0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin
	1,8 ccm Pankreassaft	1,8 ccm Pankreassaft	1,8 ccm Pankreassaft
	0,2 ccm Darmsaft	0,2 » Darmsaft	0,2 ccm Darmsaft
	0,88 » n-NaOH	0,8 » n-NaOH	0,72 » n-NaOH
Zeit	Winkel	Winkel	Winkel
1½ Std.	+ 0,83°	+ 0,78°	+ 0,61°
4 »	+ 0,68°	+ 0,61°	+ 0,47°
20 »	+ 0,61°	+ 0,50°	+ 0,31°

Serie F.

	a) 4,4 mol. NaOH	b) 2,2 mol. NaOH.
	Bezogen auf die angewandte Menge Dipeptid.	
	4,0 ccm $\frac{3}{34}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm $\frac{3}{34}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin
	0,6 » Pankreassaft	0,6 » Pankreassaft
	0,07 » Darmsaft	0,07 » Darmsaft
	1,6 » n-Na(OH)	0,8 » n-Na(OH)
		0,8 » Wasser
Zeit	Abgelesene Winkel	
7 Minuten	+ 0,77°	+ 0,77°
23 Stunden	+ 0,75°	+ 0,80°

Die Lösung färbte sich dunkelrot.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß schon geringe Mengen von Alkali die Hydrolyse von Glycyl-l-tyrosin durch Pankreassaft + Darmsaft verzögern. Sehr deutlich geht dieses

Verhalten aus Serie B hervor. Auf die angewandte Menge Glycyl-l-tyrosin bezogen, hemmte bereits 1 Molekül Na(OH) beträchtlich. Bei $1\frac{1}{2}$ Molekül Na(OH) ist die Verzögerung noch viel ausgesprochener. Aus Serie C geht hervor, daß bei 2 Molekülen Na(OH) die Spaltung ganz gehemmt ist und ebenso bei 2,4 Molekülen Na(OH). Bei 1,8 Molekül Na(OH) tritt noch Spaltung ein. Die Versuche der Serie D ergaben ganz das gleiche Resultat. Wurde dagegen, wie es in Serie E geschehen ist, die zugesetzte Fermentmenge unter sonst gleichen Bedingungen wesentlich erhöht, so ging die Spaltung des Glycyl-l-tyrosins auch nach Zusatz von 2,2 Molekülen Na(OH) noch vor sich.

Es ist vorläufig schwer, ein bestimmtes Urteil über die Rolle des Alkalis bei diesen Versuchen abzugeben. Es ist möglich, daß das zugesetzte Alkali das Ferment direkt schädigt. Da Glycyl-l-tyrosin im Sinne unserer Versuche als eine zweibasische Säure aufzufassen ist, so könnte man das vollständige Aufhören der Fermenthydrolyse nach Zusatz von mehr als 2 Molekülen Alkali so auffassen, daß das freie Alkali, d. h. das Alkali, das durch das Glycyl-l-tyrosin nicht mehr neutralisiert wird, das Ferment schädigt. Es ist jedoch auch möglich, daß die Ursache des Nichteintrittes der Spaltung von Glycyl-l-tyrosin bei Anwesenheit von 2 und mehr als 2 Molekülen Alkali darauf beruht, daß das Alkalisalz von Glycyl-l-tyrosin an und für sich für das Ferment unangreifbar ist. Einstweilen sind sichere Schlußfolgerungen deshalb unmöglich, weil wir mit der Fermentlösung unbekannte Substanzen in die Lösung hineinbringen, die gleichfalls Alkali binden können. So erklärt sich vielleicht, weshalb nach Zusatz von mehr Fermentlösung die Hydrolyse von Glycyl-l-tyrosin auch bei Anwesenheit von mehr als 2 Molekülen Na(OH) noch vor sich ging. Hat die Spaltung einmal eingesetzt, dann entstehen neue saure Gruppen und damit verschiebt sich die ganze Verteilung von Alkali und Säure.

Um dem Einwand zu begegnen, daß die angewandte Menge Alkali eventuell für sich Glycyl-l-tyrosin angreifen oder etwa gar die Fermentlösung in ihrem optischen Verhalten beeinflussen könnte, haben wir die folgenden Kontrollversuche ausgeführt.

1.

6,0 ccm Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin ($\frac{1}{34}$ mol.)
 1,2 » n-Na(OH) (2,1 mol.)
 1,0 » Wasser.

Zeit	Winkel
10 Minuten	+ 0,98°
21 Stunden	+ 1,01°
63 »	+ 1,02°

2.

1,8 ccm Pankreassaft
 0,2 » Darmsaft
 1,6 » n-Na(OH)
 9,4 » Wasser

Zeit	Winkel
10 Minuten	— 0,03°
15 Stunden	— 0,04°

Ein Einfluß der angewandten Menge Alkali auf Glycyl-l-tyrosin und auf die Fermentlösung ist somit aus der Verfolgung des optischen Verhaltens der beiden Lösungen nicht zu schließen.

Ganz analoge Versuche haben wir mit d-Alanyl-d-alanin und Hefepreßsaft durchgeführt.

Serie A.

a) 1,5 mol. Na(OH)		b) 1,0 mol. Na(OH)		c) 0,8 mol. Na(OH)	
1,0 ccm mol. Stammlösung von d-Alanyl-d-alanin		2,0 ccm mol. Stammlösung von d-Alanyl-d-alanin		2,0 ccm mol. Stammlösung von d-Alanyl-d-alanin	
1,5 ccm n-Na(OH)		2,0 ccm n-Na(OH)		1,6 ccm n-Na(OH)	
0,5 Hefepreßsaft		1,0 » Hefepreßsaft		1,0 » Hefepreßsaft	
0,5 Wasser		1,5 » Wasser		1,8 » Wasser	
Zeit	Winkel	Zeit	Winkel	Zeit	Winkel
$\frac{1}{2}$ Stunde	— 0,82°	23 Minuten	— 0,92°		— 0,90°
46 Stunden	— 0,94°	40 »	— 0,91°		— 0,90°
67 »	— 0,91°	4 $\frac{1}{2}$ Stund.	— 0,85°		— 0,74°
		20 »	— 0,89°		— 0,76°

Serie B.

a) 1,0 mol. NaOH		b) 0,8 mol. NaOH	
2,0 ccm mol. Stammlösung von d-Alanyl-d-alanin		2,0 ccm mol. Stammlösung von d-Alanyl-d-alanin	
2,0 » n-NaOH		1,6 » n-NaOH	
1,0 » Hefepreßsaft		1,0 » Hefepreßsaft	
1,5 » Wasser		1,9 » Wasser	

Zeit	Winkel	Winkel
$\frac{1}{2}$ Stunde	— 0,84°	— 0,87°
1 „	— 0,86°	— 0,86°
2 Stunden	— 0,81°	— 0,80°
4 „	— 0,88°	— 0,76°
6 „	— 0,85°	— 0,72°
21 „	— 0,87°	— 0,68°

Auch hier ließen wir zur Kontrolle auf Hefepreßsaft Alkali einwirken, um festzustellen, ob dieses das Drehungsvermögen des Saftes selbst verändert.

2,0 ccm Hefepreßsaft
4,0 „ n-Na OH)
7,0 „ Wasser
Anfangsdrehung + 0,08°
Nach 20 Stunden + 0,08°

Wie die vorliegenden Versuche zeigen, hört die Spaltung von d-Alanyl-d-alanin durch Hefepreßsaft schon bei Zusatz von 1 Molekül Alkali auf. Auch hier läßt sich eine sichere Entscheidung über die Art der Wirkung des Alkalis noch nicht fällen.

¹ Zum Schluß seien noch Versuche mitgeteilt, welche den Einfluß von Säuren auf die Spaltung von Glycyl-l-tyrosin und d-Alanyl-d-alanin prüfen sollten. Es ergab sich, daß schon geringe Mengen Säure die Spaltung vollständig aufheben.

Versuch 1.

a) $\frac{2}{10}$ mol. HCl		b) $\frac{1}{10}$ mol. HCl	
bezogen auf die angewandte Menge Dipeptid			
4,0 ccm	$\frac{3}{32}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin	4,0 ccm	$\frac{3}{32}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin
0,6 „	Pankreassaft	0,6 „	Pankreassaft
0,07 „	Darmsaft	0,07 „	Darmsaft
0,75 „	$\frac{1}{10}$ -n-HCl	0,37 „	$\frac{1}{10}$ -n-HCl
0,86 „	Wasser	1,23 „	Wasser
Zeit	Abgelesener Winkel	Zeit	Abgelesener Winkel
5 Minuten	+ 0,59°	5 Minuten	+ 0,60°
210 „	+ 0,60°	100 „	+ 0,43°
22 Stunden	+ 0,59°	210 „	+ 0,41°
		22 Stunden	+ 0,25°
			unter Fällung von Tyrosin.

Versuch 2.

1.0 ccm	der Stammlösung von d-Alanyl-d-alanin
2.0	" $\frac{1}{10}$ -n-HCl (0.2 mol.)
0.5	" Hefepreßsaft

Zeit	Winkel
10 Minuten	— 1.09°
2 Stunden	— 1.02°
50	— 1.15°

Wie wir schon in der Einleitung erwähnten, haben wir eine größere Reihe von Versuchen begonnen, um den Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Spaltung von Polypeptiden durch peptolytische Fermente zu prüfen. Bis jetzt sind Versuche mit Tauro- und Glykocholsäure durchgeführt. Die Mitteilung dieser Versuche soll erfolgen, sobald noch einige Kontrollversuche erledigt sind.

Ferner haben wir einige Versuche über den Einfluß von Aminosäurezusatz auf den Verlauf der Spaltung von Glycyl-l-tyrosin durch Hefepreßsaft ausgeführt. Wir werden auch bei diesen Versuchen in Zukunft die Mengen der zugesetzten Aminosäuren auf die Menge des verwendeten Polypeptids beziehen, um so zu vergleichbaren Werten zu gelangen. Die Resultate der folgenden Versuche stimmen mit den früher von dem einen von uns und Gigon¹⁾ mitgeteilten überein.

Serie 1.

a) 2 mol. d-Valin	b) 2 mol. d-Alanin	c) Kontrollversuch ohne Zusatz
bezogen auf die Menge des Dipeptids.		
4.0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin	4.0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Stammlösung von Glycyl-l-tyrosin	4.0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Stammlösung
1.0 ccm Hefepreßsaft	1.0 ccm Hefepreßsaft	1.0 ccm Hefepreßsaft
0.0936 g d-Valin	0.0712 g d-Alanin	
1.0 ccm Wasser	1.0 ccm Wasser	1.0 ccm Wasser
Drehung des d-Valins = + 0.09°	Drehung des d-Alanins = + 0.03°	

¹⁾ l. c.

Zeit Minuten	Winkel	Winkel nach Abzug der Drehung von d-Valin	Winkel	Winkel nach Abzug der Drehung von d-Alanin	Winkel
6	+ 0,68°	+ 0,59°	+ 0,68°	+ 0,65°	+ 0,61°
17	+ 0,76°	+ 0,67°	+ 0,67°	+ 0,64°	+ 0,58°
33	+ 0,74°	+ 0,65°	+ 0,76°	+ 0,73°	+ 0,57°
53	+ 0,70°	+ 0,61°	+ 0,73°	+ 0,70°	+ 0,52°
70	+ 0,70°	+ 0,61°	+ 0,62°	+ 0,59°	+ 0,51°
110	+ 0,65°	+ 0,56°	+ 0,59°	+ 0,56°	+ 0,43°
165	+ 0,56°	+ 0,47°	+ 0,52°	+ 0,49°	+ 0,33°
305	+ 0,41°	+ 0,32°	+ 0,35°	+ 0,32°	+ 0,14°

Bei all diesen Versuchen hatten wir Gelegenheit, das Verhalten der benutzten Fermentlösungen während langer Zeit zu beobachten und festzustellen, wie lange eine solche Lösung brauchbar bleibt. Es seien einige solcher Beobachtungen mitgeteilt.

1. Hefepreßsaft.

Er wurde stets im Eisschrank bei etwa + 4° gehalten.

Am 29. X. 07. verlief die Spaltung von Glycyl-l-tyrosin in folgender Weise:

5,0 ccm Stammlösung — 0,1 g Glycyl-l-tyrosin.
1,0 „ Hefepreßsaft.

Zeit	Winkel
9 Minuten	+ 0,67°
27 „	+ 0,31°
38 „	+ 0,14°
50 „ trübe	+ 0,09°
65 „	+ 0,05°

Am 19. XII. 07. zeigte derselbe Saft folgende Wirksamkeit:

4,0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Glycyl-l-tyrosin.
1,0 „ Hefepreßsaft.
1,0 „ Wasser.

Zeit	Winkel
6 Minuten	+ 0,61°
17 „	+ 0,58°
33 „	+ 0,57°
53 „	+ 0,52°
70 „	+ 0,51°
110 „	+ 0,43°
165 „	+ 0,33°
305 „	+ 0,14°

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß die Wirksamkeit des Hefepreßsaftes mit der Zeit abnimmt, daß hingegen nach fast 2 Monaten eine noch sehr ausgesprochene Wirkung auf Polypeptide, speziell auf Glycyl-l-tyrosin vorhanden ist. Es ist von Interesse, daß die Zymase im Gegensatz zu den untersuchten Fermenten schon nach relativ kurzer Zeit beim einfachen Aufbewahren von Hefepreßsaft ihre Wirksamkeit einbüßt.

2. Pankreassaft + Darmsaft.

Wir verwendeten zu allen Versuchen Pankreas- und Darmsaft vom Hunde. Auch diese Säfte bewahrten wir im Eisschrank auf. Es seien folgende Beobachtungen mitgeteilt:

a) 8. XI. 07.

6,0 ccm	$\frac{3}{34}$ mol. Glycyl-l-tyrosin.
0,9	> Pankreassaft.
0,1	> Darmsaft.
	Zeit
10	Minuten
26	>
66	>
135	>
338	>
	Winkel
	+ 0,74°
	+ 0,69°
	+ 0,64°
	+ 0,57°
	+ 0,46°

b) 13. XI. 07.

6,0 ccm	$\frac{3}{34}$ mol. Glycyl-l-tyrosin.
0,9	> Pankreassaft.
0,1	> Darmsaft.
0,6	> Wasser.
	Zeit
10	Minuten
49	>
125	>
214	>
453	>
	Winkel
	+ 0,66°
	+ 0,58°
	+ 0,49°
	+ 0,41°
	+ 0,28°

c) 14. XI. 07.

6,0 ccm	$\frac{3}{34}$ mol. Glycyl-l-tyrosin.
0,9	> Pankreassaft.
0,1	> Darmsaft.
0,3	> Wasser.
	Zeit
6	Minuten
177	>
480	>
	Winkel
	+ 0,69°
	+ 0,44°
	+ 0,27°

d) 21. XI. 07.

4,0 ccm $\frac{3}{34}$ mol. Glycyl-l-tyrosin.
 0,6 » Pankreassaft.
 0,07 » Darmsaft.
 1,6 » Wasser.

Zeit	Winkel
6 Minuten	+ 0,54°
36 »	+ 0,50°
85 »	+ 0,45°
138 »	+ 0,38°
268 »	+ 0,30°
1410 »	+ 0,16°

e) 23. XI. 07.

4,0 ccm $\frac{3}{32}$ mol. Glycyl-l-tyrosin.
 0,6 » Pankreassaft.
 0,07 » Darmsaft.
 1,6 » Wasser.

Zeit	Winkel
7 Minuten	+ 0,58°
36 »	+ 0,54°
142 »	+ 0,46°
259 »	+ 0,35°
23 Stunden	+ 0,06°

f) 25. XI. 07.

4,0 ccm $\frac{1}{32}$ mol. Glycyl-l-tyrosin.
 0,6 » Pankreassaft.
 0,07 » Darmsaft.
 1,6 » Wasser.

Zeit	Winkel
6 Minuten	+ 0,59°
15 »	+ 0,57°
41 »	+ 0,48°
174 »	+ 0,40°
260 »	+ 0,38°
378 »	+ 0,23°
1428 »	+ 0,09°

g) 19. XII. 07.

4,0 ccm $\frac{1}{10}$ mol. Glycyl-l-tyrosin.
 0,9 » Pankreassaft.
 0,1 » Darmsaft.
 1,5 » Wasser.

Zeit	Winkel
10 Minuten	+ 0,60°
18 „	+ 0,61°
34 „	+ 0,56°
54 „	+ 0,52°
102 „	+ 0,54°
179 „	+ 0,58°
286 „	+ 0,50°
19 Stunden	+ 0,23°

Wie die Vergleichung der einzelnen Beobachtungen ergibt, nimmt auch der aktivierte, mit Darmsaft versetzte Pankreassaft an Wirksamkeit ab. Er bleibt aber recht lange brauchbar. Ob die Abnahme der Wirkung dieser Säfte mit der Spaltung der in ihnen enthaltenen Proteine zusammenhängt, wagen wir nicht zu entscheiden. Jedenfalls beobachtet man sehr oft Ausscheidung von nicht unbedeutlichen Mengen Tyrosin.