

Studien über die Spezifität der peptolytischen Fermente bei verschiedenen Pilzen.

I. Mitteilung.

Von

Emil Abderhalden und **Hans Pringsheim**.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule und dem chemischen Institute der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. März 1909.)

Die in der Natur vorkommenden Fermente sind je nach ihrer Wirkungsweise mehr oder weniger spezifisch auf ein ganz bestimmtes Substrat eingestellt. Von den Oxydasen wissen wir, daß ihre Wirkung im allgemeinen keine eng begrenzte ist, während für andere Fermente namentlich durch die Untersuchungen von Emil Fischer eine ausgesprochene Abhängigkeit von der Konfiguration der einzelnen Verbindungen nachgewiesen ist. In besonders scharfer Weise ist dies für manche auf bestimmte Kohlenhydrate eingestellte Fermente erwiesen worden. Sehr ausgesprochen ist der Einfluß der Konfiguration auch bei den peptolytischen Fermenten des tierischen Organismus. Sie greifen, soweit unsere bisherigen Kenntnisse reichen,¹⁾ nur Polypeptide an, welche die in der Natur vorkommenden Aminosäuren enthalten. Sehr deutlich kommt dieses Verhalten bei Anwendung von racemischen Polypeptiden zum Ausdruck. Diejenige Kombination, welche die in der Natur nicht vorkommenden optisch-aktiven Aminosäuren enthält, wird nicht gespalten. Dieses Verhalten zeigen nicht nur die peptolytischen Fermente des Pankreas- und Darmsaftes, sondern auch die aus Organen

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52, 1905, und Über das Verhalten einiger Polypeptide gegen Pankreassaft, Ebenda, Bd. LI, S. 264, 1907.

gewonnenen, Polypeptide spaltenden Fermente. Auch bei niederen Organismen — Avertebraten — konnten bis jetzt nur peptolytische Fermente aufgefunden werden, die gleichfalls eine deutliche Abhängigkeit von der Konfiguration ergeben. Schließlich ergaben Versuche mit keimenden Pflanzensamen, daß auch diese während der Keimung Fermente enthalten, welche racemische Polypeptide asymmetrisch spalten.

Wir haben diese Versuche auf Pilze ausgedehnt, und zwar verwendeten wir ausschließlich den aus ihnen gewonnenen Preßsaft zu unseren Untersuchungen. Er wurde in bekannter Weise durch Zerreiben der Pilzrasen mit Quarzsand, Vermischen mit Kieselgur und Auspressen mit der hydraulischen Presse gewonnen. Die Versuche sind im einzelnen in der oft an dieser Stelle geschilderten Weise durchgeführt worden. Wir verwendeten zunächst nur racemische Dipeptide, und zwar Glycyl-dl-alanin, dl-Alanyl-glycin. Später haben wir noch Glycyl-l-tyrosin angewandt. Die ersten Versuche sind mit Preßsaft aus *Aspergillus niger* ausgeführt worden. Sie ergaben das auffallende Resultat, daß zwar die racemischen Dipeptide deutlich gespalten wurden, daß dagegen die zu erwartenden Spaltprodukte (d-Alanin und Glycyl-l-alanin) keine Drehung zeigten. Es ließen sich nachweisen: Glykokoll als Glykokollesterchlorhydrat und ferner inaktives Alanin. Auch das verbleibende Dipeptid, das als Anhydrid isoliert wurde, war inaktiv. Eine Spaltung war unzweifelhaft eingetreten, nur war sie offenbar nicht asymmetrisch erfolgt. Erwähnt sei, daß Glycyl-l-tyrosin nicht in nachweisbarer Menge gespalten wurde. Ferner sei hervorgehoben, daß ein Präparat von *Aspergillus niger*, daß nach Art der Acetondauerhefe hergestellt worden war, deutlich Polypeptide spaltete. Der verwendete Pilz war auf Rohrzucker (2 %), schwefelsaurem Ammon plus geringen Mengen von Pepton gezüchtet worden. Auf 4 Liter wurden 33 g Dauerpräparat erhalten. Geprüft wurden die Polypeptide: Diglycyl-glycin, Glycyl-dl-alanin, dl-Alanyl-glycin. Bei den beiden Dipeptiden ließ sich zwar eine ausgesprochene Spaltung, nicht aber das Auftreten optisch-aktiver Substanzen nachweisen. Diese Befunde stimmen somit völlig mit den eben erwähnten überein.

Die erhaltenen Resultate waren auffallend und führten uns zu der Vermutung, daß bei Pilzen peptolytische Fermente vorkommen könnten, welche nicht nur Kombinationen von in der Natur vorkommenden Aminosäuren, sondern auch von deren Antipoden spalten. Wir haben zunächst festgestellt, daß manche Pilze und Hefearten nicht nur d-Alanin, sondern auch das in der Natur bis jetzt nicht nachgewiesene l-Alanin angreifen. Das angewandte l-Alanin hatte eine spezifische Drehung von -10.2° (Drehung des salzsauren Salzes). Es wurde folgende Nährlösung angewandt: 3 % Dextrose, 0,5 % l-Alanin, Salze, 0,1 % Weinsäure. Die folgende Übersicht gibt die erhaltenen Resultate wieder. + = schwaches, + + = mittelstarkes und + + + = starkes Wachstum.

1. Hefe (Rasse XII)	+ +
2. <i>Aspergillus niger</i>	+ + +
3. " <i>Wentii</i>	+ + +
4. <i>Mucor corymlifer</i>	+ + +
5. " <i>mucedo</i>	+
6. <i>Monilia candida</i>	+ + +
7. <i>Rhizopus tonkinensis</i>	+ +
8. <i>Allescheria Gayonii</i>	+ + +

Um die Frage, ob gewisse Pilze peptolytische Fermente enthalten, die auch Polypeptide spalten, an deren Aufbau nicht nur optisch-aktive Aminosäuren enthalten sind, welche in der Natur vorkommen, ganz exakt zu entscheiden, haben wir die Preßsäfte der unten angeführten Pilzarten einmal auf dl-Leucyl-glycin und ferner auf l-Leucyl-d-leucin einwirken lassen. Da die Möglichkeit besteht, daß die Art der peptolytischen Fermente von der Zusammensetzung der Nährlösung abhängig ist, so sei im folgenden genau angegeben, wie wir die Pilze gezüchtet haben.

1. *Allescheria Gayonii*.¹⁾ Zweimal dargestellt. 1. Wachstum: 30. November—15. Dezember 1908. 2. Wachstum: 6. Januar—19. Januar 1909. Nährlösung: Dextrose und phosphorsaures Ammon. Nährsalze (Na_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl und FeSO_4).

¹⁾ Vgl. Literatur Lafar: Handbuch der technischen Mykologie. Bd. IV. S. 234.

2. *Rhizopus tonkinensis*. Zweimal gezüchtet. 1. Wachstum. 30. Oktober — 9. November 1908. Nährlösung: Rohrzucker, Asparagin, Nährsalze. 2. Wachstum. 2. Dezember bis 9. Dezember 1908. Nährlösung: Dextrose, Asparagin, Nährsalze.

3. *Aspergillus Wentii*. Einmal dargestellt. Wachstum vom 20. Dezember 1908 — 20. Januar 1909. Nährlösung: Rohrzucker + Dextrose. Phosphorsaures Ammon. Salze + geringe Mengen Asparagin.

4. *Mucor mucedo*. Einmal dargestellt. Wachstum vom 28. Januar — 10. Februar 1909. Nährlösung: Rohrzucker + Dextrose. Phosphorsaures Ammon + geringe Mengen Asparagin. Salze.

In allen Fällen wurde 0,1% Weinsäure zugesetzt.

1. Versuche mit Preßsaft aus *Allescheria Gayonii*.

0,5 ccm Pilzsaft und $\frac{1}{300}$ -Mol. Glycyl-l-tyrosin.

Drehung bei Beginn des Versuches	+ 0,52°
„ nach 3 Stunden 20 Min.	+ 0,52°
„ „ 5 „ 10 „	+ 0,52°
„ „ 6 „ 10 „	+ 0,53°
„ 20 „ — „	+ 0,53°

Eine Spaltung war nicht eingetreten. Ein zweiter mit 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 5 ccm Preßsaft ausgeführter Versuch ergab dasselbe Resultat. Das Dipeptid konnte als Esterchlorhydrat wiedergewonnen werden.

0,5 ccm Pilzsaft + $\frac{1}{6000}$ -Mol. dl-Leucyl-glycin.

Drehung bei Beginn des Versuches	+ 0°
„ nach 15 Minuten	+ 0°
„ 30 „	— 0,02°
„ 60 „	— 0,05°
„ 90 „	— 0,09°
„ 120 „	— 0,12°
„ 160 „	— 0,12°
„ 180 „	— 0,16°
„ 210 „	— 0,12°
„ 240 „	— 0,08°

0,5 ccm Pilzsaft + $\frac{1}{10000}$ -Mol. l-Leucyl-d-leucin.

Drehung bei Beginn des Versuches	+ 0,30°
„ nach 15 Minuten	+ 0,29°
„ „ 30 „	+ 0,26°
„ „ 45 „	+ 0,23°
„ „ 60 „	+ 0,20°
„ „ 90 „	+ 0,18°
„ „ 120 „	+ 0,16°
„ „ 150 „	+ 0,12°
„ „ 180 „	+ 0,08°
„ „ 210 „	+ 0,05°
„ „ 240 „	+ 0,01°
„ „ 270 „	+ 0,0°

2. Versuche mit Preßsaft aus *Rhizopus tonkinensis*.

Versuch 1.

0,5 ccm Pilzsaft + $\frac{1}{6000}$ -Mol. dl-Leucyl-glycin.

Drehung bei Beginn des Versuches	+ 0,00°
„ nach 15 Minuten	- 0,01°
„ „ 30 „	- 0,02°
„ „ 50 „	- 0,05°
„ „ 70 „	- 0,06°
„ „ 90 „	- 0,08°
„ „ 120 „	- 0,11°
„ „ 140 „	- 0,13°

Nach 16 Stunden war keine Drehung mehr zu beobachten. Die Lösung hatte sich getrübt.

Versuch 2.

0,5 ccm Preßsaft + $\frac{1}{10000}$ -Mol. l-Leucyl-d-leucin.

Drehung bei Beginn des Versuches	+ 0,26°
„ nach 15 Minuten	+ 0,23°
„ „ 30 „	+ 0,21°
„ „ 45 „	+ 0,20°
„ „ 135 „	+ 0,18°
„ „ 16 Stunden 25 Min.	+ 0,01°

Bei einem weiteren Versuche, der mit 1,0 g dl-Leucyl-glycin und 0,5 ccm Preßsaft ausgeführt worden war, ließ sich nach 3 Tagen racemisches Leucin isolieren und ferner Glykokoll. Die Spaltung verläuft, wie der Versuch 1 zeigt, offenbar zuerst asymmetrisch. Es entstehen zunächst l-Leucin und d-Leucyl-glycin. Schließlich wird auch dieses gespalten.

3. Versuche mit Preßsaft aus *Aspergillus Wentii*.0,5 ccm Preßsaft + $\frac{1}{10000}$ -Mol. l-Leucyl-d-leucin.

Drehung bei Beginn des Versuches	+ 0,40°
„ nach 20 Minuten	+ 0,40°
„ „ 40 „	+ 0,40°
„ „ 85 „	+ 0,40°
„ „ 15 Stunden 30 Min.	+ 0,15°
„ „ 19 „	+ 0,14°

4. Versuche mit Preßsaft aus *Mucor mucedo*.

Versuch 1.

1 ccm Preßsaft + $\frac{1}{6000}$ -Mol. dl-Leucyl-glycin.

Drehung bei Beginn des Versuches	+ 0,05°
„ nach 15 Minuten	+ 0,03°
„ „ 30 „	— 0,02°
„ „ 45 „	— 0,06°
„ „ 60 „	— 0,06°
„ „ 75 „	— 0,07°
„ „ 15 Stunden 10 Min.	— 0,12°
„ „ 18 „ 30 „	— 0,14°

Versuch 2.

1 ccm Preßsaft + $\frac{1}{10000}$ -Mol. l-Leucyl-d-leucin.

Drehung bei Beginn des Versuches	+ 0,24°
„ nach 30 Minuten	+ 0,24°
„ 80 „	+ 0,24°
„ 14 Stunden 30 Min.	+ 0,24°

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die verschiedenen Pilze verschiedenartige peptolytische Fermente enthalten. Die Preßsäfte aus *Allescheria Gayonii*, *Rhizopus tonkinensis* und *Aspergillus Wentii* spalteten l-Leucyl-d-leucin, während Preßsaft aus *Mucor mucedo* dieses Dipeptid nicht angriff. Dieses Resultat scheint uns biologisch von Interesse. Wir sehen bei diesen niederen Organismen zum Teil wenigstens Fermente auftreten, die Bindungen lösen, auf welche die entsprechenden Fermente der höheren Organismen keinen Einfluß haben. Je höher wir in der Organismenreihe aufsteigen, um so spezifischer wird die Wirkung der Fermente dieser Klasse. Es ist eine verlockende Aufgabe, den Einfluß der Art der Ernährung auf die Wirkung der peptolytischen Fermente zu verfolgen und ferner

festzustellen, ob sich die verschiedenen Gruppen von Pilzen in dieser Beziehung prinzipiell verschieden verhalten.

Im Anschluß an diese Untersuchungen seien noch einige Züchtungsversuche von *Allescheria Gayonii* auf Polypeptiden mitgeteilt.

Nährlösung 3% Dextrose, 0,1 g N in der Stickstoffquelle.
Nährsalze.

100 ccm Nährlösung Geimpft 20. I.	Kohlensäure- abscheidung am		Pilz- ernte am	Oxal- säure- bildung
	12. II.	27. II.	27. II.	
	g	g	g	g
I. dl-Valyl-dl-alanin	0,8	0,2	0,211	0,131
II. Glycyl-dl-alanin	0,4	0,2	0,261	0,189
III. Triglycyl-glycin	0,6	0,4	0,099	0,108
IV. dl-Aminobutyryl-dl-aminobutter- säure	0,9	0,3	0,091	0,117
V. dl-Leucyl-dl-leucin	0,1	0,3	0,296	0,212
VI. dl-Leucyl-glycin	1,2	0,2	0,456	0,048
VII. Diglycyl-glycin	0,7	0,6	0,333	0,081
VIII. Schwefelsaures Ammoniak	1,1	0,3	0,109	0,094
IX. Salpetersaures Natron	0,8	0,3	0,127	0,117

Die Kohlensäureabscheidung ist ein Kriterium für die Vergärung des Zuckers durch die *Allescheria*, die stark gärt.

Hefe gab Gärung mit Geimpft 20. I.	Kohlensäureabscheidung in g	
	am 12. II.	am 27. II.
I. Diglycyl-glycin	0,6	0,4
II. Triglycyl-glycin	0,2	0,4
III. Glycyl-dl-alanin	0,3	0,3
IV. dl-Leucyl-glycin	1,2	0,3
V. dl-Valyl-dl-alanin	0,8	0,4