

Der Verlauf der fermentativen Polypeptidspaltung.

Von

Emil Abderhalden und Leonor Michaelis.

(Aus dem I. chemischen Institute der Universität und dem bakteriol. Laboratorium des städt. Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juni 1907.)

Der eine von uns¹⁾ hat kürzlich in Gemeinschaft mit A. H. Koelker gezeigt, mit welcher Leichtigkeit und welcher großer Exaktheit sich der Verlauf der fermentativen Spaltung von Polypeptiden bei Verwendung optisch einheitlicher Glieder dieser Reihe quantitativ verfolgen läßt. Mit diesen Versuchen ist ein einwandfreier Weg eröffnet worden, um die Gesetze der Fermentwirkung auch bei der Gruppe der proteolytischen Fermente in exakter Weise einer Prüfung zu unterwerfen. Eine Fülle von Fragestellungen harret ihrer Lösung. Bei den bisherigen Untersuchungen über die Art der Wirkung der proteolytischen Fermente war man auf Versuche mit Proteinen angewiesen. Wir stehen in diesem Falle zum vornherein einem in seiner Zusammensetzung noch nicht völlig aufgeklärten Ausgangsprodukte gegenüber. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus dem Umstand, daß beim fermentativen Abbau der Proteine eine große Menge uns zum Teil noch gänzlich unbekannter Spaltprodukte entstehen, deren Einfluß auf den Gang der Ferment-spaltung wir vorläufig nicht feststellen können. Die Verwendung von in ihrem Aufbau genau bekannten Polypeptiden beseitigt alle diese Schwierigkeiten. Wir befinden uns ganz einfachen und bekannten Verhältnissen gegenüber. Dies gestattet uns auch, die Bedingungen der einzelnen Versuche von Fall zu Fall zu ändern und die Frage nach dem fermentativen Abbau von verschiedenen Seiten in Angriff zu nehmen. Der Wert dieser Untersuchungen wird nicht vermindert werden, auch wenn der exakte Beweis geführt werden sollte, daß die die einfachen Polypeptide abbauenden Fermente anderer Natur sind als diejenigen Fermente,

¹⁾ Emil Abderhalden und A. H. Koelker, Die Verwendung optisch-aktiver Polypeptide zur Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer Fermente, Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 294, 1907.

welche das genuine Eiweiß angreifen.¹⁾ In diesem Falle wird es unsere Aufgabe sein, durch Anwendung komplizierter gebauter Polypeptide auch die eigentlichen proteolytischen Fermente in ihrer Wirkung zu prüfen.

Bei den genannten Versuchen handelte es sich vornehmlich um zwei Fragestellungen. Einmal sollte der Nachweis geführt werden, ob die Spaltung optisch-aktiver Polypeptide bei Verwendung von Fermentlösungen verschiedener Herkunft gleich rasch verläuft, oder ob sich große Unterschiede nachweisen lassen. Es waren Pankreassaft, Darmsaft und Hefepreßsaft in ihrer Wirkung auf d-Alanyl-d-Alanin geprüft worden. Es hatte sich ergeben, daß in der Tat große Unterschiede bestehen. Am raschesten hydrolysierte der Hefepreßsaft, eine langsamere Spaltung erfolgte bei Anwendung von Darmsaft und als noch weniger «aktiv» erwies sich der Pankreassaft. Die zweite Frage, die aufgeworfen wurde, war die, wie sich der Verlauf der Hydrolyse gestaltet, wenn bei gleichbleibender Konzentration an Dipeptid die Fermentmenge wechselt. Eine ganze Reihe von Versuchen diente zur Lösung dieses Problems. Im folgenden seien deren Resultate einer Analyse unterworfen, und zwar stützen wir uns auf den am besten verlaufenen auf S. 306—309 der oben zitierten Arbeit beschriebenen Versuch.

Zunächst müssen wir die beobachteten Zahlen derart umformen, daß sie direkt einen Einblick auf die jeweilig noch vorhandene Menge Dipeptid und auf die schon gebildete Menge an Aminosäuren gestatten. Wenn wir die abgelesene Drehung nach vollkommener Spaltung als 0 ansetzen und die übrigen Drehungen von diesem Nullpunkt an rechnen, so liefert der Drehungswinkel direkt ein Maß für die noch vorhandene Menge an Dipeptid. Als Nullpunkt können wir nun, wie aus den erwähnten Versuchen hervorgeht, die Drehung $+ 0,10$ setzen. Die wahre Drehung der zu Anfang vorhandenen Dipeptidmenge beträgt $- 1,35^\circ$, also in unserem Sinne reduziert $- 1,45$. Schreiben wir nun zunächst die so reduzierten Werte auf, so ergibt sich folgende Reihe:

¹⁾ Vgl. hierzu: Emil Abderhalden und H. Deetjen, Über den Abbau einiger Polypeptide durch die Blutkörperchen des Pferdes, Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 334, 1907.

Versuch a.

1,45 Einheiten Dipeptid + 6 ccm Fermentlösung.

t	a - x	x	Bemerkungen
0	1,45	0	
3	1,06	0,39	t = Zeit in Minuten.
7	0,84	0,59	x = Die zur Zeit t gespaltene Menge an Dipeptid.
11	0,61	0,84	a = Anfangsmenge des Dipeptids.
13	0,53	0,92	
18	0,30	1,15	
20	0,26	1,19	
24	0,16	1,29	
27	0,09	1,36	
34	0,05	1,40	
40	0,03	1,42	
55	0,00	1,45	
65	0,00	1,45	

Versuch b.

1,45 Einheiten Dipeptid + 4 ccm Ferment + 2 ccm Wasser.

t	a - x	x
0	1,45	0
3	1,27	0,18
7	1,08	0,37
10	0,91	0,54
11	0,88	0,57
16	0,66	0,79
17	0,61	0,84
25	0,31	1,14
30	0,19	1,26
34	0,10	1,35
35	0,08	1,37
43	0,03	1,42
54	0,02	1,43

Versuch c.

1,45 Einheiten Dipeptid + 3 ccm Ferment + 3 ccm Wasser.

t	a - x	x
0	1,45	0
5	1,26	0,19
6,5	1,19	0,26
7,5	1,15	0,30
16	0,86	0,59
22	0,64	0,81
23	0,61	0,84
28	0,42	1,03
29	0,39	1,06
30	0,35	1,10
38	0,19	1,26
45	0,09	1,36
47	0,06	1,39
60	0,03	1,42

Versuch d.

1,45 Einheiten Dipeptid mit 2 ccm Ferment + 4 ccm Wasser.

t	a - x	x
0	1,45	0
5	1,33	0,12
11	1,17	0,28
15	1,09	0,36
23	0,90	0,55
31	0,70	0,75
41	0,46	0,99
53	0,24	1,21
65	0,08	1,37
80	0,01	1,44

Betrachten wir nun zunächst innerhalb einer jeden der 4 Reihen, also bei konstanter Fermentmenge, den allge-

meinen Ablauf der Reaktion. Zwei besonders einfache Möglichkeiten sind zunächst zu diskutieren:

1. Der Umsatz ist in gleichen Zeiten stets der gleiche, unabhängig von der Menge des noch zu spaltenden Substrates.

Aus dieser Annahme würde sich ein geradliniges Fortschreiten der Reaktion ergeben. Die dieser Annahme entsprechende Differentialgleichung ist:

$$\frac{dx}{dt} = k,$$

wobei die Konstante k irgend eine Funktion der Fermentmenge sein würde, und ihr Integral

$$\frac{x}{t} = k.$$

Wenn wir die 4 Reihen unter den gegebenen Gesichtspunkten prüfen, so ergibt sich:

a		b		c		d	
t	k	t	k	t	k	t	k
3	0,1300	3	0,0600	5	0,0380	5	0,0240
7	0,0843	7	0,0529	6,5	0,0400	11	0,0255
11	0,0713	10	0,0540	7,5	0,0400	15	0,0240
13	0,0708	11	0,0518	16	0,0369	23	0,0239
18	0,0639	16	0,0494	22	0,0368	31	0,0242
20	0,0595	17	0,0494	23	0,0365	41	0,0241
24	0,0538	25	0,0456	28	0,0368	53	0,0228
27	0,0504	30	0,0420	29	0,0366	65	0,0212
34	0,0411	34	0,0397	30	0,0314	80	0,0180
				38	0,0332		
				45	0,0302		

Wir bemerken, daß in der Reihe a der Wert für k durchaus nicht konstant ist, sondern im Lauf der Zeit stark abfällt. In der Reihe b sinkt er schon viel weniger, und bei c und noch mehr bei d ist er als befriedigend konstant zu betrachten, nur ganz zum Schluß fällt er in geringem, jedoch merklichem Maße.

Wir können hieraus zunächst den wichtigen Schluß ziehen, daß bei gleicher Anfangsmenge des Substrates sich mit abnehmender Fermentmenge die Kurve des Umsatzes immer mehr der geraden Linie nähert.

2. Die zweite nahe liegende Möglichkeit wäre:

Der in je einem kleinen Zeiteilchen vor sich gehende Umsatz ist proportional der zu dieser Zeit noch vorhandenen Menge der ungespaltenen Substanz. So ist es ja bei der Säureinversion der Disaccharide der Fall. Die hierfür passende Differentialgleichung ist:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 (a - x)$$

und ihr Integral:

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

Untersuchen wir, wie sich unsere Versuche in dieser Beziehung verhalten:

a	b	c	d
k_1	k_1	k_1	k_1
0,0453	0,0192	0,0125	0,00710
0,0390	0,0183	0,0132	0,00847
0,0342	0,0202	0,0134	0,00824
0,0336	0,0197	0,0142	0,00901
0,0380	0,0214	0,0161	0,01020
0,0373	0,0203	0,0163	0,01216
0,0399	0,0268	0,0192	0,01474
0,0451	0,0294	0,0196	0,01920
0,0430	0,0342	0,0209	0,01810
	0,0359	0,0232	
		0,0265	

Wir bemerken, daß in der Reihe a die Werte für k_1 eine nicht schlechte, wenn auch nicht völlig befriedigende Konstanz zeigen, während sie bei b sehr merklich ansteigen, nämlich bis auf das Doppelte des anfänglichen Wertes; c verhält sich etwa

ebenso. Bei d ist der Anstieg noch stärker, und zwar auf das $2^{1/2}$ fache.

Wir können aus diesem Ergebnis den weiteren Schluß ziehen, daß bei gleicher Anfangsmenge des Substrats sich mit zunehmender Fermentmenge die Kurve des Umsatzes immer deutlicher der logarithmischen Kurve nähert.

Wir werden nun späterhin versuchen, eine Gleichung zu finden, die gewissermaßen in der Mitte zwischen den beiden soeben diskutierten steht und nach Möglichkeit unter allen Bedingungen des Fermentzusatzes gilt.

Zunächst aber sei noch die Abhängigkeit des Umsatzes von der Menge des Fermentes erörtert.

Wenn wir auch den Ablauf der Spaltung auf längere Zeit hin noch nicht durch eine allgemein gültige Gleichung wiedergegeben haben, so folgt doch aus dem Gesagten, daß die Abweichungen von dem geradlinigen Verlauf für sehr kurze Zeitläufe auf alle Fälle unerheblich sind. Wir können also, wenn wir immer sehr kurze Umsatzzeiten mit einander vergleichen, die Spaltungskurve als geradlinig annehmen und die Umsatzgeschwindigkeit durch den oben definierten Wert von k ausdrücken. Wir wollen nun untersuchen, in welcher Weise k von der Fermentmenge abhängig ist.

Die Verminderung des Dipeptids von 1,45 bis auf 1,00 wird erreicht ¹⁾

	bei	a	b	c	d
α)	in	$3^{1/2}$	$8^{1/2}$	12	18 Minuten.

Die Verminderung von 1,45 bis 0,8

	bei	a	b	c	d
β)	in	8	12	18	27 Minuten.

Die Verminderung von 0,86 auf 0,61

	bei	a	b	c	d
γ)	in	4	$5^{3/4}$	7	9 Minuten.

Die Verminderung von 0,86 auf 0,45

	bei	a	b	c	d
δ)	in	$7^{1/2}$	10	$11^{1/2}$	$16^{1/2}$ Minuten.

¹⁾ Die gewonnenen Zahlen sind nötigenfalls durch Interpolation gewonnen und sollen in ihren absoluten Größen keinen Anspruch auf große Genauigkeit machen. Trotzdem genügen sie ihren Zwecken völlig.

Die Verminderung von 0,5 auf 0,25

ε)	bei	a	b	c	d
	in	7 1/4	8	9 1/2	14 Minuten.

Die Verminderung von 0,25 auf 0,10

ζ)	bei	a	b	c	d
	in	6 1/2	6 1/2	9 1/2	11 Minuten.

Die Verminderung von 0,2 auf 0,05

η)	bei	a	b	c	d
	in	12	12	14—18	16—20 Minuten.

Betrachten wir diese Zahlen, so finden wir überall ausgeprägt, daß der größeren Fermentmenge die größere Reaktionsgeschwindigkeit zukommt. Aber die Abhängigkeit dieser beiden Größen ist verschiedener Art, wenn man von verschiedenen Anfangspunkten ausgeht.

Ganz zu Anfang einer jeden Versuchsreihe ist nämlich die Reaktionsgeschwindigkeit fast genau direkt proportional der Fermentmenge. Multiplizieren wir die Zeiten gleichen Umsatzes in der Reihe mit den zugehörigen Fermentmengen, so erhalten wir:

$$(3\frac{1}{2} \times 6 = 21)$$

$$8\frac{1}{2} \times 4 = 34$$

$$12 \times 3 = 36$$

$$18 \times 2 = 36$$

und in der Reihe β

$$8 \times 6 = 48$$

$$12 \times 4 = 48$$

$$18 \times 3 = 54$$

$$27 \times 2 = 54$$

Die Proportionalität ist, wie man sieht, nicht ganz genau, sondern dahin verschoben, daß die n-fache Fermentmenge eine etwas mehr als n-fache Reaktionsgeschwindigkeit verursacht als die einfache Fermentmenge. Aber die einzige Zahl, welche zu einer solchen Annahme notwendig zwingen müßte, ist die erste (21), und der hierzugehörige Wert ist wegen der großen Reaktionsgeschwindigkeit gerade dieser Versuchsreihe, und weil es die erste abgelesene Zahl ist, nicht absolut beweisend.

Es wird sich also in künftigen Versuchen darum handeln müssen, festzustellen, ob etwa bei sehr großen Fermentmengen wirklich eine Abweichung von der einfachen Proportionalität

der Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt. Auf jeden Fall aber scheint diese Abweichung nur in dem Sinne bestehen zu können, daß eine große Fermentmenge relativ zu schnell arbeitet.

Nehmen wir aber als Ausgangspunkt für diese Rechnung nicht den Anfangspunkt des Versuchs, sondern einen mittleren Punkt, siehe S. 332, γ , δ , ϵ , ζ , η , so zeigt sich genau das Umgekehrte: eine größere Fermentmenge arbeitet in Beziehung auf das oben formulierte Gesetz der einfachen Proportionalität sehr merklich zu langsam. Bilden wir wiederum die Produkte aus den Fermentmengen und den Zeiten gleichen Umsatzes, so ergibt sich

$$\text{für } \gamma: 4 \times 6 = 24$$

$$5\frac{3}{4} \times 4 = 23$$

$$7 \times 3 = 21$$

$$9 \times 2 = 18$$

$$\text{für } \delta: 7\frac{1}{2} \times 6 = 45$$

$$10 \times 4 = 40$$

$$11\frac{1}{2} \times 3 = 34$$

$$16\frac{1}{2} \times 2 = 33$$

$$\text{für } \epsilon: 7\frac{1}{4} \times 6 = 43$$

$$8 \times 4 = 32$$

$$9\frac{1}{2} \times 3 = 28$$

$$14 \times 2 = 28$$

$$\text{für } \zeta: 6\frac{1}{2} \times 6 = 39$$

$$6\frac{1}{2} \times 4 = 26$$

$$9\frac{1}{2} \times 3 = 28$$

$$11 \times 2 = 22$$

$$\text{für } \eta: 12 \times 6 = 72$$

$$12 \times 4 = 48$$

$$16 \times 3 = 48$$

$$18 \times 2 = 36$$

Man ersieht hieraus, daß die Unproportionalität in diesem Sinne um so auffälliger wird, einen je tieferen Anfangspunkt man wählt. Bei γ und δ (welche gleichen Anfangspunkt haben), verhalten sich die größten Werte zu den kleinsten wie 1,33 : 1, bei ϵ wie 1,5 : 1, bei ζ wie 1,8 : 1, bei η wie 2 : 1.

Es fragt sich nun, wie dieses Verhalten zu erklären ist. Es gibt zwei Möglichkeiten:

1. Entweder ist das Gesetz, welches wir für unsere Anfangsgeschwindigkeit annähernd verwirklicht fanden, nicht allgemein richtig, sondern gilt nur zufällig, wenn die Substratmenge gerade den Wert 1,45 hat, während es für andere Anfangswerte nicht zutrifft.

2. Oder das Gesetz ist für alle Substratmengen gültig, und die Abweichungen werden dadurch hervorgerufen, daß die Spaltungsprodukte auf die Reaktionsgeschwindigkeit einen Einfluß haben.

Dieser Einfluß kann sowohl als eine Hemmung wie als eine Beschleunigung gedeutet werden. Nimmt man an, daß ohne den Einfluß der Spaltungsprodukte die Umsatzkurve logarithmisch wäre, so handelte es sich um eine Beschleunigung; nimmt man sie als geradlinig an, wäre es eine Hemmung.

Alle diese Möglichkeiten lassen sich leicht entscheiden, wenn es gelingt, die Kurve für den Umsatz unter Ausschaltung des Einflusses der Spaltungsprodukte zu finden, also die «ideale Kurve der Fermentwirkung». Das kann man in der Weise, daß man eine Reihe von Spaltungen mit stets gleicher Fermentmenge und fallenden Substratmengen ausführt und die einzelnen Anfangsgeschwindigkeiten miteinander vergleicht. Das soll unsere nächste Aufgabe sein. Untersuchungen nach dieser Richtung sind bereits im Gange, und wir werden bald die Möglichkeit haben, diese Frage einwandfrei zu entscheiden.

Wir kehren nunmehr zu unserer Aufgabe zurück, eine Gleichung zu finden, welche der Umsatzkurve gerecht wird. Wir sahen, daß die Gleichung:

$$(1) \quad \frac{x}{t} = k$$

nicht völlig genügt, weil die k -Werte allmählich abfallen, und daß die Gleichung:

$$(2) \quad \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} = k_1$$

nicht genügt, weil die k_1 -Werte allmählich ansteigen. Unter diesen Umständen liegt es nahe, durch Summation der beiden, mit geeigneten konstanten Faktoren multiplizierten Gleichungen

eine neue Gleichung zu finden, welche möglicherweise konstante Werte liefert. Da wir bei der Ausrechnung der k_1 -Werte mit dekadischen statt mit natürlichen Logarithmen rechnen, werden wir, um vergleichbare Werte zu erhalten, außerdem die Gleichung (1) mit dem Modulus des natürlichen Logarithmen-systems $M = 0,4343$ multiplizieren. Wir erhalten dann

$$\epsilon M \cdot \frac{x}{t} = \epsilon M k$$

wo ϵ jenen Faktor bedeutet. Durch Addition dieser Gleichung mit Gleichung (2) erhalten wir

$$(3) \quad \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} + \epsilon M \frac{x}{t} = M k_1 + \epsilon M k_2 = k_3.$$

Setzen wir nun für den Versuch a den Faktor $\epsilon = 0,7$, so erhalten wir für 100 k_3 folgende Werte:

(8,49)
6,63
5,49
5,52
5,68
5,54
5,63
6,04
5,55

also mit Ausnahme der der ersten, der schon oben als unsicher hingestellten Ablesung entsprechenden Zahl Werte von recht befriedigender Konstanz.

Versuch b gibt bei $\epsilon = 1,5$
100 $k_3 =$

5,74
6,52
5,90
5,51
5,25
5,91
5,91
6,15
6,17

Versuch c gibt bei $\epsilon = 3,0$
100 $k_3 =$

6,20
6,54
6,56
6,22
6,41
6,40
6,72
6,53
6,17
6,64
6,58

und Versuch d bei ϵ etwa = 10

100 k_3 =	11,1
	11,9
	11,2
	11,3
	11,5
	11,7
	11,1
	11,1
	[9,6]

Der Wert für ϵ und k_3 ist also von der Fermentmenge abhängig.

Die so gewonnene, zunächst rein empirische Formel würde also lauten:

$$\ln \frac{a}{a-x} + \epsilon \cdot \frac{x}{t} = k_3$$

wo ϵ und k_3 zwar mit der Fermentmenge, nicht aber mit dem Fortschreiten der Reaktion bei konstanter Fermentmenge sich verändern.

Diese Formel führt prinzipiell zu dem gleichen Resultat wie die von V. Henri für die Spaltung des Rohrzuckers durch Invertin abgeleitete Formel¹⁾

$$(1 + n a) \ln \frac{a}{a-x} + (m-n) x = k_3 t,$$

wo n und m zwei Konstanten darstellen, die von der Anfangsmenge des Substrats a und der jeweiligen Menge der Spaltungsprodukte unabhängig sind. Inwieweit sie von der Fermentmenge unabhängig sind, ist aus Henris Versuchen nicht sicher zu entnehmen. Nach der theoretischen Ableitung, die Henri für diese Formel entwickelt hat, sollten m und n von der Fermentmenge unabhängig, k_3 der Fermentmenge einfach proportional sein. Mit dieser theoretischen Entwicklung von Henri werden wir uns aber noch näher zu beschäftigen haben und wir werden vorläufig unsere Gleichung als eine empirische betrachten.

¹⁾ V. Henri, Lois générales de l'action des diastases. Paris 1903, p. 92.