**Über das Verhalten des Pyrrolidoncarbonsäureamids gegenüber
Gewebeenzym und Bakterienenzym.
Anhang: Zur Kenntnis der Biuretreaktion.**

Von

Senzi Utzino, Daizi Hiwatasi und Kimio Osima.

(内野仙治) (樋渡大次) (大島公男)

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen
Fakultät der Kaiserlichen Tohoku-Universität, Sendai.*

Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

In Bezug auf die Spezifität der Glutaminase, die man in der Hauptsache sehr reich an Nierengewebe des Kaninchens und des Meerschweinchens hält, hat Krebs (1935)¹⁾ die Resistenz des Benzoyl- wie Phenacetylglutamins gegenüber Rattenhirnextrakt beobachtet, während Iso-Glutamin nur in geringerem Grad dadurch desamidiert wurde. Glutaminylglutamin und Glutaminylglycin widerstanden auch der Glutaminasewirkung von Rattenhirnextrakt. Nach der Feststellung von Ishiyama (1933)²⁾, dass die Pyrrolidoncarbonsäure und ihr Amid den Verdauungsenzymen wie Pepsin, Trypsin oder Erepsin gegenüber widerstanden, hat Suzuki (1936)³⁾ beobachtet, dass Pyrrolidoncarbonsäureamid wie Glycylasparagin, Anhydroglycylasparagin und auch Glukosamin durch den mit Kaolin behandelten Presssaft der Kalbsleber unter Ammoniakabspaltung angegriffen wurden, während der Leberextrakt, der das Asparagin hydrolysieren konnte, auf das Pyrrolidoncarbonsäureamid ganz und gar unwirksam war, und der Autor zu dem Schluss kam, dass das Pyrrolidoncarbonsäureamid durch die Asparaginase nicht hydrolysierbar ist, wohl aber durch das andere Organferment.

In der vorliegenden Arbeit haben wir das Verhalten des Pyrrolidoncarbonsäureamids gegenüber Enzymwirkung der Gewebe und der Wasservibrien vergleichend studiert, die das Asparagin deutlich desamidieren konnten (Hiwatasi, 1941⁴⁾; Osima, noch nicht veröffentlicht). Da die Amidbindung des Pyrrolidoncarbonsäureamids, beson-

ders in einer stärkeren Konzentration, durch die schwach alkalische Lösung (z. B. K_2CO_3), wenn auch in schwachem Grad, hydrolysisierbar sein kann, hat man auf die Konzentration wie auch auf die Kontrollwerte Rücksicht genommen. Die Ergebnisse zeigen keine Ammoniakabspaltung aus dem Amid durch Gewebesmazeration, wie schon von Suzuki (1936)³⁾ berichtet worden ist.

In den Versuchen mit Vibrionenenzym scheinen einige Stämme die Ammoniakabspaltung aus Pyrrolidoncarbonsäureamid zu beschleunigen. Die stärkste Spaltung zeigt das Trockenpräparat des Stamms Nr. 3, Nr. 7 oder Nr. 12, während der Stamm Nr. 11 ohne Einfluss auf das Amid blieb. Die stärkere Wirkung des Trockenpräparats mag sich vielleicht auf die grössere Menge Enzym als auf die des Autolysats beziehen.

Anhang: Was die Bedingungen der Biuretreaktion anbelangt, so wissen wir, dass nach den Schiffschen Grundtypen (1898)⁵⁾ die Verbindung, welche die Biuretreaktion gibt, im Moleküle mindestens 2 Gruppen, $-CONH_2$, $-CSNH_2$, $-C(NH)NH_2$ zum Teil auch $-CH_2NH_2$ in bestimmter Kombination enthalten muss, und zwar diese Gruppen direkt zu zweien durch ihre Kohlenstoffatome oder durch ein drittes Atom Kohlenstoff oder Stickstoff verketteten dürfen. Aus weit ausgeführten Beobachtungen über verschiedene Körper kam Tomita (1923, 1930, 1931)⁶⁾ zur Schlussfolgerung, dass diejenigen Verbindungen die Biuretreaktion zeigen können, die im Moleküle mindestens einen endständig oder mittelständig liegenden Aminooxyäthylenrest besitzen. Wie der Versuchsteil zeigt, konnten wir hier anlässlich der Versuche feststellen, dass das Pyrrolidoncarbonsäureamid, welches zuerst von Menozzi und Appiani (1894)⁷⁾ und dann von Fischer und Böhner (1911)⁸⁾ und ferner von Abderhalden und Rossner (1926)⁹⁾ dargestellt, aber nie auf seine Reaktion hin geprüft wurde, mit Lauge und Kupfersulfat eine intensiv rote Färbung wie Biuret oder Peptonkörper gibt.

Obwohl das Asparagin nach der Angabe von Schiff (1898)⁵⁾ der Biuretreaktion zugänglich ist, wissen wir aber nichts Weiteres betreffs der Reaktion des Pyrrolidoncarbonsäureamids in der Literatur. Andererseits fanden wir, dass das Glycinanhydrid mit Lauge und Kupfersulfat eine blauviolette Färbung, wenn auch in schwächerem Grad als das Amid, zeigt, wie aus der analogen chemischen Gruppe erwartet.

Auf Grund dieser Beobachtungen möchten wir als Gesetzmässigkeit ableiten, dass für den positiven Ausfall der Biuretreaktion in Polypeptiden, wie in Tripeptiden und auch in Acyldipeptiden wohl die Gruppe $-HN-CO-CH-NH-CO-$ verantwortlich sein dürfte. Was die

Reaktion des substituierten Körpers anbetrifft, werden die Untersuchungen weiter fortgeführt.

Die folgenden Verbindungen zeigen die Biuretreaktion:

Versuchsteil.

Pyrrolidoncarbonsäureamid.

Das Pyrrolidoncarbonsäureamid wurde nach der Vorschrift von Menozzi und Appiani (1894)⁷⁾ und auch von Fischer und Böhner (1911)⁸⁾ hergestellt. Zuerst wurde das Glutaminsäureesterchlorhydrat auf übliche Weise bereitet und schmolz bei 95–96° C.

4 g Glutaminsäureäthylesterchlorhydrat wurden dann in 60 ccm absolutem Alkohol gelöst, mit trockenem NH_3 -Gas unter Eiskühlung gesättigt und 2 Tage in Raumtemperatur stehen gelassen. Das von ausgeschiedenem Niederschlag abfiltrierte Filtrat wurde unter vermindertem Druck stark eingeeengt. Die dabei ausgeschiedene mit Chlorammon beigemengte Kristallmasse wurde aus heissem Wasser umkristallisiert. Die derben Kristalle sind löslich im heissen Alkohol und Wasser, schwerer aber in kaltem Alkohol und Wasser und reagieren neutral gegen Lakmus. Sie zeigen positive Biuretreaktion, indem sie mit Lauge und Kupfersulfat eine rote Färbung geben, nicht aber Ninhydrinreaktion. Beim Zufügen mit Nessler Reagens trat keine rote Färbung auf, jedoch machte sich mit der Zeit die rote Färbung

bemerkbar. Die Substanz ohne Kristallwasser schmolz bei 158° C (nach Sintern gegen 100° C).

Analyse: 277,8 mg Substanz (lufttrocken) verloren bei 100° C (Vakuum) 33,4 mg an Gewicht.

Ber. für $C_5H_8N_2O_2 \cdot H_2O$ (Mol.-Gew. 146,10) H_2O 12,33 %

Gef. H_2O 12,02 %.

19,4 mg Substanz (lufttrocken) 13,2 ccm 0,02 n- H_2SO_4 (Kjeldahl)

Ber. für $C_5H_8N_2O_2 \cdot H_2O$ (Mol.-Gew. 146,10) N 19,18 %

Gef. N 19,05 %.

22,7 mg Substanz (bei 100° C in Vak. getrocknet) 17,38 ccm 0,02 n- H_2SO_4 (Kjeldahl)

Ber. für $C_5H_8N_2O_2$ (Mol.-Gew. 128,08) N 21,88 %

Gef. N 21,44 %.

1,000 g Substanz, in der kein Aminostickstoff nach Van Slyke nachweisbar ist, wurde in 20 ccm n- H_2SO_4 aufgelöst, 6 Stunden lang auf dem Wasserbade am Rückfluss erhitzt und mit Wasser genau auf 100 ccm gebracht. Das Hydrolysat zeigte nicht mehr Biuretreaktion, jedoch positive Ninhydrinreaktion.

Analyse: 5,0 ccm Hydrolysat (= 0,05 g Substanz) verbrauchten 17,08 ccm 0,02 n- H_2SO_4 zur Neutralisation des nach Folin abdestillierten Ammoniaks.

Ber. für $C_5H_8N_2O_2 \cdot H_2O$ (Mol.-Gew. 146,10) NH_3-N 9,59 %

Gef. NH_3-N 9,57 %.

Tabelle I.

Verhalten des Pyrrolidoncarbonsäureamids gegenüber Leber- und Hirnmazeration.

Enzym: Kaninchen-, Schweins- oder Krebsleberbrei oder Schweinsgehirnbrei wurde mit der 3fachen Volummenge Glycerinwasser (1:1) gut zerrieben, durch Gaze koliert und geprüft. Die Mazeration hat man unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt. Über die Asparaginase-Aktivität dieser Gewebemazeration ausser Krebsleber wurde schon vom einen von uns berichtet (Hiwatasi, 1941)⁴⁾.

Versuchsansatz: 1 ccm 0,1 Mol-Pyrrolidoncarbonsäureamidlösung (oder 0,1 g Amid) + 2 ccm Enzymlösung + 10 ccm Phosphatpufferlösung von pH 7,5 + Toluol; digeriert bei 37° C 72 Std. Nach 72stündiger Digestion wurde das gebildete Ammoniak in 0,02 n- H_2SO_4 nach Folin abdestilliert. Der Wert des Säureverbrauchs in Kontrollversuchen wurde von dem des Hauptversuchs abgezogen und diese korrigierten Werte sind in Tabelle angegeben.

Säureverbrauch (ccm 0,02 n- H_2SO_4)

Kaninchen			Schwein			Krebs
Leber 1 ccm 0,1 Mol Amidlösung	Gehirn 1 ccm 0,1 Mol Amidlösung	Dünndarm- mucosa 1 ccm 0,1 Mol Amidlösung	Leber 0,1 g Amid	Grosshirn 0,1 g Amid	Kleinhirn 0,1 g Amid	Leber 0,1 g Amid
0	0	0	0	0	0	0

Tabelle II.

Verhalten des Pyrrolidoncarbonsäureamids gegenüber Wasservibrioenzym.

Autolysat: Die aus Plattagarkulturen (1 Tag) gesammelten frischen Bakterien wurden im 3fachen Volumen Wasser suspendiert und unter Zusatz von Toluol bei 37° C 1 Tag lang unter zeitweiser Schüttelung digeriert und dann abzentrifugiert. Dieses zentrifugierte Autolysat wurde als Enzymlösung bei den Versuchen angewendet.

Trockenpräparat: Bei den anderen Versuchen wurden die aus Massenkulturen auf Plattagar gesammelten Bakterien mit Aceton und Äther behandelt und über SO_4H_2 im Exsikkator getrocknet. 4 g Trockenpulver wurden mit 100 ccm Glycerinwasser (1:1) im Mörser gut zerrieben und verwendet. Betreffs der Asparaginaseaktivität dieses Autolysats und des Trockenpräparats ist eine Bestätigung von einem von uns erfolgt (Osima, noch nicht veröffentlicht).

Versuchsansatz: 0,1 g Substrat+3 ccm zentrifugiertes Autolysat der frischen Vibrionenleiber oder Mazeration des trocknen Vibrionenpulvers+10 ccm 1/15 Mol Phosphatpuffer+Toluol; digeriert bei 37° C. Nach 3 Tagen wurde das gebildete Ammoniak nach Folin mit 0,02 n- SO_4H_2 wie in Tabelle I bestimmt.

Kontrolle mit Enzympuffer ohne Substrat oder mit Substratpuffer ohne Enzym.

Diese Kontrollwerte wurden von denjenigen des Hauptversuchs abgezogen und die korrigierten Werte in Tabelle angegeben.

Stammnummer der Wasservibrien	pH*	Säureverbrauch (ccm in 0,02 n- SO_4H_2)	
		Trockenpräparat	Autolysat
Nr. 1	6,6	1,60 (4,7 %)	0,20 (0,6 %)
Nr. 2 (Vib. Dunbar)	8,0	3,00 (8,8 %)	0,90 (2,7 %)
Nr. 3	7,6	4,40 (12,9 %)	0,30 (0,9 %)
Nr. 4	7,6	1,50 (4,4 %)	0,20 (0,6 %)
Nr. 5	8,6	1,05 (3,1 %)	0
Nr. 7	9,0	4,50 (13,2 %)	0
Nr. 8	8,6	2,50 (7,5 %)	0,60 (1,8 %)
Nr. 10	8,6	2,20 (6,6 %)	0,90 (2,7 %)
Nr. 11	8,6	0	0
Nr. 12	8,0	4,35 (12,7 %)	1,90 (5,6 %)

* Die hier versuchte Reaktion entspricht dem Optimal-pH der Asparaginase-Aktivität der entsprechenden Vibrionen (nach Osima).

Zusammenfassung.

1) Das Pyrrolidoncarbonsäureamid widersteht der Enzymwirkung von Schweinsleber, -hirn und -dünndarm, Kaninchenleber und -hirn und Krebsleber, während das Vibrionenenzym die Ammoniakspaltung aus dem Amid zu katalysieren scheint.

2) Da das Pyrrolidoncarbonsäureamid und das Glycinanhydrid die Biuretreaktion geben können, dürfte die Annahme erfolgen, dass die Gruppe -HN-CO-CH-NH-CO- für den Reaktionsausfall in Polypeptiden wie in Tripeptiden verantwortlich sein kann.

Literatur.

- (1) Krebs, H. A. (1935): Biochem. Journ., **29**, 1951.
 - (2) Ishiyama, T. (1933): Journ. Biochem., **17**, 285.
 - (3) Suzuki, Y. (1936): Journ. Biochem., **23**, 57.
 - (4) Hiwatasi, D. (1941): Dieses Journ., **41**, 295, 307 u. 384.
 - (5) Schiff, H. (1898): Liebigs Ann., **299**, 236.
 - (6) Tomita, M. (1923): Zeits. f. physiol. Chem., **124**, 253; (1930): ibid., **187**, 238; (1931): ibid., **201**, 38.
 - (7) Menozzi und Appiani (1894): zitiert nach Biochem. Handlexikon IV, 618.
 - (8) Fischer, E. u. E. Böhner (1911): Ber. d. Deut. Chem. Ges., **44**, 1332.
 - (9) Abderhalden, E. u. E. Rossner (1926): Zeits. f. physiol. Chem., **152**, 271.
 - (10) Imai, T. (1924): ibid., **136**, 205.
-