

heißes Schwefelsäure-Bad ein und erwärmt dann mit normaler Geschwindigkeit, so schmilzt sie unter Zersetzung bei 170–173<sup>0</sup>.

Herzig und Pollak<sup>9)</sup> geben für ihr aus Tetramethyl-hämatoxylin über Tetramethyl-hmatoxylylon gewonnenes Produkt, das sogen. „Tetramethyl-desoxyhmatoxylylon“, den Schmp. zu 170–175<sup>0</sup> an. Der Schmelzpunkt des von uns nach der Vorschrift von Herzig und Pollak erhaltenen Tetramethyl-desoxyhmatoxylylons lag bei 169–172<sup>0</sup>. Der Misch-Schmp. unseres synthetischen Produktes und des nach Herzig und Pollak erhaltenen Abbauproduktes betrug 168–170<sup>0</sup>; eine Depression war also nicht vorhanden. Die völlige Identität beider Verbindungen ergab sich vor allem aus den Farbreaktionen. In beiden Fällen tritt beim Anblasen mit Chlor oder Brom tief purpurrote Färbung auf, die nach einiger Zeit verschwindet und einer orangen Färbung Platz macht. Konz. Salpetersäure löst beide Verbindungen mit tief blutroter Farbe und purpurrotem Ablauf; erwärmt man die Lösungen, so färben sie sich orangegeflbt mit gelbem Ablauf. Konz. Schwefelsäure gibt in beiden Fällen intensiv zinnoberrote Halochromie mit rotem Ablauf.

4.612 mg Sbst.: 11.954 mg CO<sub>2</sub>, 2.504 mg H<sub>2</sub>O. — 5.577 mg Sbst.: 14.406 mg CO<sub>2</sub>, 2.959 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>. Ber. C 70.56, H 5.93. Gef. C 70.69, 70.45, H 6.08, 5.94.

Bonn. Chem. Institut d. Universität, im Dezember 1927.

#### 48. Ernst Waldschmidt-Leitz, Anton Schffner, Hans Schlatter und Willibald Klein:

##### Zur Spezifität von Pankreas-Trypsin und Darm-Erepsin. (Zwölfte Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen.)

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 28. Dezember 1927.)

Für die Untersuchungen über die Spezifität der proteolytischen Enzyme, die im Rahmen der Eiweiß-Forschung ihre Nutzenanwendung finden, sind nach den letzten Erfahrungen neue Gesichtspunkte wegleitend geworden. Die Auffindung eines Peptids, des Leucyl-triglycyl-tyrosins, als spezifisches Substrat für Pankreas-Trypsin, die beschrieben wurde<sup>1)</sup>, schien uns für die Kenntnis der spezifischen Wirkungsweise tryptischer und ereptischer Enzyme, wie für die Beurteilung der Eiweiß-Struktur von besonderer Bedeutung; denn die Erfahrungen, daß der Abbau natürlicher Proteine auch durch Trypsin in der Auflösung von Peptid-Bindungen besteht, und daß die Anteile der einzelnen Proteasen an der Gesamthydrolyse der Proteine einfache Bruchteile der lösbaren Peptid-Bindungen darstellen<sup>2)</sup>, veranschaulichte sie zuerst an synthetischem Material.

<sup>9)</sup> B. 38, 2166 [1905].

<sup>1)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, W. Grassmann und H. Schlatter, B. 60, 1906 [1927].

<sup>2)</sup> vergl. E. Waldschmidt-Leitz, A. Schffner und W. Grassmann, Ztschr. physiol. Chem. 156, 68, u. zw. S. 78 [1926]; E. Waldschmidt-Leitz und E. Simons, ebenda 156, 114 [1926]; E. Waldschmidt-Leitz und G. Künstner, ebenda 171, 70, 290 [1927].

Die Feststellung, „daß für die Spezifität von Pankreas-Trypsin und Darm-Erepsin neben der Länge der vorliegenden Peptidkette die Natur der Amino-säure-Bausteine selbst ausschlaggebend ist“, ist nun bestätigt und erweitert worden. Die Prüfung der enzymatischen Spaltbarkeit einer größeren Anzahl synthetischer Peptide und ihrer Derivate, die wir vorgenommen haben, hat erlaubt, die früher gewonnenen Erfahrungen zu sichern und zu vertiefen; sie führt andererseits zu bestimmteren Aussagen über einen verschiedenen Wirkungs-Mechanismus der untersuchten Enzyme und über einige der Bedingungen, die ihre Reaktion mit den Substraten, ihre Anlagerung, ermöglichen oder vereiteln.

Wir stellen die Ergebnisse unserer Versuche, die die Spaltung einer Reihe von Dipeptiden und Dioxo-piperazinen mit wechselnden Bausteinen, sowie höherer Peptide und von Peptid-Derivaten betreffen, nachstehend tabellarisch zusammen.

Tabelle 1.

Spaltbarkeit von Dipeptiden und Dioxo-piperazinen.

(Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive Hydrolyse, o = nicht geprüft)

Nr.	Substrat	Enzym	
		Darm-Erepsin	Trypsin-Kinase
1	Glycyl-glycin <sup>3)</sup> .....	+	—
2	Leucyl-glycin <sup>3)</sup> .....	+	—
3	Leucyl-leucin .....	—	—
4	Glycyl-serin .....	+	—
5	Alanyl-serin .....	+	—
6	Leucyl-methyl-isoserin .....	—	o
7	Glycyl-cystin .....	+	—
8	Dileucyl-cystin .....	+	—
9	Leucyl-glutaminsäure .....	+	—
10	[Phenyl-alanyl]-glutaminsäure .....	+	—
11	Glycyl-tyrosin <sup>3)</sup> .....	+	—
12	Alanyl-tyrosin .....	+	—
13	Diarginin-trinitrat .....	—	—
14	Alanyl-[ $\beta$ -amino- <i>n</i> -buttersäure] .....	+	o
15	Leucyl-[ $\beta$ -amino- <i>n</i> -buttersäure] .....	+	o
16	Glycyl-[ $\alpha$ -amino- <i>n</i> -capronsäure] .....	+	o
17	Alanyl-[ $\alpha$ -amino- <i>n</i> -capronsäure] .....	+	o
18	Leucyl-[ $\epsilon$ -amino- <i>n</i> -capronsäure] .....	+	o
19	Glycin-anhydrid <sup>4)</sup> .....	—	—
20	Glycyl-alanin-anhydrid .....	—	—
21	Alanin-[phenyl-alanin]-anhydrid .....	—	—
22	Glycyl-serin-anhydrid .....	—	—
23	Phenyl-dioxo-piperazin .....	—	—

<sup>3)</sup> Zufolge E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, Ztschr. physiol. Chem. **149**, 203, u. zw. S. 208 [1925].

<sup>4)</sup> Zufolge E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner, B. **58**, 1356, u. zw. S. 1358 [1925].

Tabelle 2.

Spaltbarkeit von Polypeptiden und Peptid-Derivaten.

(Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive, ++ = verstärkte Hydrolyse, o = nicht geprüft)

Nr.	Substrat	Enzym		
		Darm-Erepsin	Trypsin-Kinase	Trypsin
1	Leucyl-triglycyl-leucin .....	+	—	o
2	Leucyl-heptaglycin .....	+	—	o
3	Leucyl-nonoglycin .....	+	—	o
4	[ $\alpha$ -Brom-isocapronyl]-nonoglycin .....	—	—	o
5	[ $\alpha$ -Brom-isocapronyl]-triglycyl-leucyl-nonoglycin .....	—	o	o
6	Leucyl-triglycyl-leucyl-triglycyl-leucyl-nonoglycin .....	+	—	o
7	Leucyl-glycyl-tyrosin .....	+	+	o
8	Glycyl-alanyl-tyrosin .....	o	+	o
9	Glycyl-tyrosyl-glycin .....	+	+	o
10	Glycyl-alanyl-glycyl-tyrosin .....	+	+	o
11	Leucyl-triglycyl-tyrosin <sup>5)</sup> .....	—	+	o
12	$\beta$ -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin .....	—	++	+

Die Analyse der Tabellen ergibt, daß unter den geprüften, enzymatisch spaltbaren Substraten die Dipeptide eine gewisse Sonderstellung einnehmen: unabhängig von der Natur der an ihrem Aufbau beteiligten Aminosäuren haben sie als spezifische Substrate des Erepsins zu gelten. Nach den Untersuchungen von W. Graßmann<sup>6)</sup> ist diese Sonderstellung der Dipeptide für die Spezifität pflanzlicher Proteasen noch ausgeprägter, da sich die Wirkung des pflanzlichen Erepsins auf die Hydrolyse von Dipeptiden beschränkt.

Von den geprüften Dipeptiden, unter welchen auch Derivate nicht natürlich vorkommender Aminosäuren, so der  $\beta$ -Amino-*n*-buttersäure, der  $\alpha$ -, sowie der  $\epsilon$ -Amino-*n*-capronsäure sich als erepsin-spaltbar erwiesen haben, scheint nur das Diarginin-trinitrat<sup>7)</sup> (Tab. 1, Nr. 13), nach der Anschauung von E. Fischer und U. Suzuki<sup>8)</sup> ein Salz des Arginyl-arginins, durch seine Resistenz ausgezeichnet zu sein; es erscheint zweifelhaft, ob diesem Präparate, das nach den Erfahrungen von Fischer und Suzuki auch bei der Behandlung mit Säure nicht hydrolysiert wurde, die angenommene Zusammensetzung zukommt, oder ob man ihm nicht vielmehr in Anlehnung an neuere Beobachtungen von A. Kossel und W. Staudt<sup>9)</sup> anhydrid-artige Struktur zuschreiben hat<sup>10)</sup>. Die enzymatische Unangreifbarkeit der Dioxo-piperazine,

<sup>5)</sup> Zuzolge E. Waldschmidt-Leitz, W. Grassmann und H. Schlatter, B. 60, 1906, u. zw. S. 1908 [1927].

<sup>6)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 167, 202, u. zw. S. 206 ff. [1927].

<sup>7)</sup> Originalpräparat aus der Sammlung Emil Fischers.

<sup>8)</sup> B. 38, 4173 [1905].

<sup>9)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 170, 91, u. zw. S. 94 [1927].

<sup>10)</sup> Die Dioxo-piperazin-Reaktion des Präparates mit Pikrinsäure war stark positiv.

die Tabelle 1 in Bestätigung früherer Erfahrungen<sup>11)</sup> nun an einem größeren Material belegt, würde eine solche Schlußfolgerung stützen.

Die Feststellung ferner, daß für den Spezifitäts-Unterschied von Pankreas-Trypsin und Darm-Erepsin „eine Verlängerung der Peptidkette“ in Peptiden aus einfachen aliphatischen Monoamino-monocarbonsäuren, „beispielsweise im Glycyl-glycin oder Leucyl-glycin, durch Einführung allein von Glycin-Resten bis zum Oktapeptid..... bedeutungslos“ gefunden wird<sup>12)</sup>, bestätigen und erweitern wir mit der Erkenntnis, daß auch die Einführung von Leucin-Resten keine Spezifitäts-Änderung bedingt (Tab. 2, Nr. 1—3 u. 6); auch das höchste, von E. Fischer<sup>13)</sup> aus Glycin und Leucin aufgebaute Peptid, das Oktadekapeptid Leucyl-triglycyl-leucyl-triglycyl-leucyl-nonglycin, wird nur vom Erepsin, gar nicht von dem tryptischen Enzym angegriffen (Tab. 2, Nr. 6). Die gleiche Aussage gilt nach E. Abderhalden<sup>14)</sup> für ein ähnliches Peptid aus 19 Amino-säure-Resten.

Für die Spaltbarkeit höherer Peptide durch Pankreas-Trypsin, das man gegenüber allen Dipeptiden wirkungslos findet, ist die Gegenwart besonderer Amino-säuren erforderlich, als deren erste wir hier das Tyrosin beschreiben. Im Gegensatz zum einfachen Glycyl-tyrosin werden schon die Tripeptide Leucyl-glycyl-tyrosin und Glycyl-alanyl-tyrosin, wie aus Tabelle 2 hervorgeht (Nr. 7 u. 8), von Trypsin gespalten; aber sie unterliegen, gleichwie das Tetrapeptid Glycyl-alanyl-glycyl-tyrosin (Tab. 2, Nr. 10), auch noch dem Angriff des Erepsins; erst das Penta-peptid Leucyl-triglycyl-tyrosin hat als spezifisches Trypsin-Substrat zu gelten. Die Angreifbarkeit der tyrosin-haltigen Tri- und Tetrapeptide durch Trypsin und Erepsin zugleich wird indessen nicht mit einer Identität der beiden Enzym-Wirkungen zu deuten sein, sie dürfte in einer verschiedenen Angriffsweise ihre Erklärung finden. Wir erwarten, daß die nähere Untersuchung des Reaktionsverlaufs in beiden Fällen, die wir vornehmen, unsere Annahme bestätigen wird, daß der Abbau dieser Peptide durch Erepsin von der freien Aminogruppe her, der tryptische dagegen vom Carboxyl-Ende her erfolgt, und daß er in diesem Falle mit der Abspaltung des Tyrosins sein Ende findet; die Hydrolyse von mehr als einer Peptid-Bindung durch Trypsin in diesen Substraten ist nämlich noch nicht beobachtet worden. Für die Aufklärung der verschiedenen Reaktionsweise der beiden Enzyme wird ferner die Kennzeichnung der jeweiligen Spaltprodukte bei der Einwirkung auf Peptide mit nicht endständigem Tyrosin, die gleichfalls durch Trypsin angegriffen werden (Tab. 2, Nr. 9), besonders förderlich sein. Die Ausdehnung der Spezifitäts-Prüfung auf höhere Peptide mit anderen als den bisher untersuchten Bausteinen, der Ersatz des Tyrosins beispielsweise durch Phenyl-alanin, Serin, Tryptophan, Prolin und andere Amino-säuren, den wir in Angriff nehmen, soll weiter dazu dienen, die Kenntnis der spezifischen Trypsin-Substrate unter den Peptiden zu erweitern und die Bedingungen der tryptischen Wirkung zu definieren.

Die neuen Erfahrungen, von denen wir berichten, eröffnen der enzymatischen und der Eiweiß-Forschung ein weites Gebiet; denn die Aufklärung der besonderen Reaktionsweise der am Eiweiß-Abbau beteiligten Enzyme an einfachen synthetischen Substraten wird bei der Beurteilung des Abbaus

<sup>11)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner, B. 58, 1356 [1925].

<sup>12)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, W. Grassmann und H. Schlatter, a. a. O.

<sup>13)</sup> B. 40, 1754 [1907].

<sup>14)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 151, 151 [1925/26].

natürlicher Proteine allgemein und in besonderen Fällen ihre Nutzenanwendung finden. Auch für die Erkenntnis der besonderen funktionellen Aufgabe der Enterokinase und anderer spezifischer proteolytischer Aktivatoren, von Blausäure und Schwefelwasserstoff für Papain, und nicht minder für die Kennzeichnung der spezifischen Wirkungsweise des Pepsins<sup>15)</sup> darf man von der Anwendung synthetischer Substrate weitere Klärung erwarten.

Für die Ursache der Spezifitäts-Unterschiede von Trypsin und Erepsin, die wir hier behandeln, ergibt sich ein erster Hinweis aus dem bemerkenswerten Befund, daß eine Änderung der spezifischen Spaltbarkeit einer Säure-amid-Bindung, in dem Dipeptide Glycyl-tyrosin, durch Einführung eines Acylrestes, der  $\beta$ -Naphthalinsulfonylgruppe, erreicht werden kann: Glycyl-tyrosin wird nur von Erepsin,  $\beta$ -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin dagegen nur von Trypsin zerlegt (Tab. 1, Nr. 11 u. Tab. 2, Nr. 12), und zwar unter Abspaltung des Tyrosins. Die alte Beobachtung von E. Fischer und P. Bergell<sup>16)</sup> über die Spaltbarkeit des  $\beta$ -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosins durch Pankreatin bestätigt sich also, sie gilt nämlich für das Pankreas-Trypsin. So ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß auch die Angreifbarkeit der tyrosinhaltenen Tripeptide durch Trypsin auf einer aciditäts-verstärkenden Wirkung des dritten Amino-säure-Restes, der Wirkung des Acylrestes vergleichbar, beruht; die größere Spaltungsgeschwindigkeit des acylierten Peptides, die wir beobachten, spricht in diesem Sinne. Allein man wird diese Frage, die für das Problem der spezifischen enzymatischen Affinität, wie für die Eiweiß-Struktur gleich bedeutsam erscheint, an einem umfangreicheren Material acylierter Peptide zu prüfen haben. Auch den Einfluß der Enterokinase, der in einer Steigerung der Spaltungsgeschwindigkeit bei dem acylierten Peptide zum Ausdruck kommt, dessen Bedeutung aber noch nicht erkennbar ist, wird man dabei beachten müssen.

Über die Verschiedenheit der Angriffsweise von Pankreas-Trypsin und Darm-Erepsin erlauben indessen schon die jetzt vorliegenden Beobachtungen bestimmtere Aussagen. Die Prüfung der Spaltbarkeit einer großen Anzahl acylierter Peptide durch Darm-Erepsin, die wir ausgeführt haben, hat die Annahme von H. v. Euler und K. Josephson<sup>17)</sup> bestätigt, daß für die Bindung eines Substrates an das geprüfte Erepsin die Gegenwart einer freien Aminogruppe erforderlich ist, während eine Veränderung an der Carboxylgruppe der Substrate, z. B. eine Amidierung oder eine Veresterung, für seine ereptische Angreifbarkeit belanglos zu sein scheint<sup>18)</sup>. Besondere Untersuchungen, die wir demnächst veröffentlichen werden, begründen die Annahme, daß die Anlagerung des Darm-Erepsins an der Aminogruppe des Substrats durch eine freie Aldehyd- oder Keto-Gruppe des Enzyms vermittelt

---

<sup>15)</sup> Die Meinung der referierenden Literatur, „daß das Pepsin keine einzige der bekannten Polypeptid-Bindungen zu spalten imstande ist“ (C. Oppenheimer: „Die Fermente und ihre Wirkungen“, 5. Aufl., Leipzig 1925, Bd. II, S. 840), ist zu weitgehend, sie erscheint allein nach den Erfahrungen von E. Fischer und E. Abderhalden (Ztschr. physiol. Chem. **46**, 52 [1905]), die sich nur auf niedere Peptide bezogen, noch nicht gerechtfertigt.

<sup>16)</sup> B. **36**, 2592 [1903].

<sup>17)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122, u. zw. S. 124 [1926]; **162**, 85 [1926]; **166**, 294, u. zw. S. 313 [1927].

<sup>18)</sup> Nach demnächst zu veröffentlichenden Versuchen mit W. Klein.

Tabelle 3. Einwirkung von Darm-Erepsin.

(Substrat-Lösungen mit 0.1-n. NH<sub>3</sub> auf pH = 8.0 eingestellt; 30°; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 4.0 ccm)

Nr.	Substrat	Angew. mg	Angew. Er.-E. × 10 <sup>5</sup>	Zeit in Std.	Aciditäts- Zuwachs ccm 0.05-n.	Spalt. (%) bezog. auf 1 CO <sub>2</sub> -NH
1	<i>l</i> -Leucyl- <i>l</i> -leucin	25.9	67	22	1.93	91
2	Glycyl- <i>d,l</i> -serin	8.2	33	22	0.29	29
3	Alanyl- <i>d,l</i> -serin	22.5	67	22	0.87	34
4	<i>l</i> -Leucyl- <i>d,l</i> -methyl-isoserin	29.0	48	22	0.98	39
5	Glycyl- <i>l</i> -cystin	24.0	38	5	0.17	11
6	Di- <i>l</i> -leucyl- <i>l</i> -cystin	4.0	33	5	0.20	117
7	<i>l</i> -Leucyl- <i>d</i> -glutaminsäure	14.2	33	5	0.79	72
8	[ <i>d,l</i> -Phenyl - alanyl] - <i>d</i> - glutamin- säure	37.8	67	22	0.29	11
9	<i>d</i> -Alanyl- <i>l</i> -tyrosin	10.1	38	5	0.44	55
10	Diarginin-trinitrat	21.0	67	22	0.06	0
11	<i>d,l</i> -Alanyl-[β-amino- <i>n</i> -butter- säure]	21.7	48	22	0.63	25
12	<i>d,l</i> -Leucyl-[β-amino- <i>n</i> -butter- säure]	27.0	48	22	0.19	8
13	Glycyl- <i>d,l</i> -[α-amino- <i>n</i> -capron- säure]	23.5	48	22	0.63	25
14	<i>d,l</i> -Leucyl-[α-amino- <i>n</i> -capron- säure]	24.5	48	22	0.93	38
15	<i>d,l</i> -Leucyl-[ε-amino- <i>n</i> -capron- säure]	31.6	48	22	1.03	40
16	Glycyl- <i>d,l</i> -alanin-anhydrid	17.1	67	22	0.00	0
17	<i>d</i> -Alanyl-[ <i>l</i> -phenyl-alanin]- anhydrid	21.0	67	22	0.04	0
18	Glycyl- <i>d,l</i> -serin-anhydrid	20.8	67	22	0.03	0
19	Phenyl-dioxo-piperazin	22.6	67	22	0.02	0
20	<i>l</i> -Leucyl-triglycyl- <i>l</i> -leucin	25.1	67	22	3.07	254
21	<i>l</i> -Leucyl-heptaglycin	30.0	67	22	0.63	54
22	<i>l</i> -Leucyl-nonoglycin	16.6	67	22	0.52	100
23	<i>d</i> -[α-Brom-isocapronyl]-nono- glycin	90.2	48	22	0.06	0
24	<i>d</i> -[α-Brom-isocapronyl]-triglycyl- <i>l</i> -leucyl-nonoglycin	72.5	48	22	0.09	0
25	<i>l</i> -Leucyl-triglycyl- <i>l</i> -leucyl-tri- glycyl- <i>l</i> -leucyl-nonoglycin	7.7	67	22	0.36	300
26	<i>l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin	17.8	33	5	0.83	82
27	Glycyl- <i>l</i> -tyrosyl-glycin	13.5	33	5	0.67	73
28	Glycyl- <i>d</i> -alanyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin	8.9	33	5	0.97	200

wird<sup>19)</sup>. Für die Anlagerung des Trypsins ist dagegen eine freie Aminogruppe entbehrlich: sie erfolgt auch an das acylierte Peptid, das β-Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin. Die spärlichen, bisher vorliegenden

<sup>19)</sup> Nach Versuchen mit G. Rauchalles.

Erfahrungen über die tryptische Spaltbarkeit von Peptiden und ihren Derivaten scheinen vielmehr anzudeuten, daß das Trypsin, dessen Angriff von der Carboxylgruppe her erfolgt, sich dieser zur Anlagerung bedient; allein es ist auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Bindung des Enzyms durch besondere Gruppen, etwa die OH-Gruppe in den Tyrosin-Peptiden, vermittelt oder verstärkt wird. Wir erwarten, daß die Fortführung der Spezifitäts-Prüfung der einzelnen Proteasen an den synthetischen Peptiden und ihren Derivaten, die in so großer Mannigfaltigkeit zugänglich sind, unsere Kenntnis von dem spezifischen Mechanismus enzymatischer Reaktionen erweitern wird, die man bisher vorwiegend am Beispiel der kohlehydrat-spaltenden Enzyme gewonnen hat.

Tabelle 4.

## Einwirkung von Trypsin-Kinase.

(Trypsin aktiviert mit erepsin-freier Enterokinase; Substrat-Lösungen mit 0.1-n.  $\text{NH}_3$  auf  $\text{pH} = 8.4$  eingestellt;  $30^\circ$ ; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 4.0 ccm)

Nr.	Substrat	Angew. mg	Angew. T.-(e.)	Zeit in Stdn.	Aciditäts-Zuwachs ccm 0.05-n.	Spalt. (%) bezog. auf I CO.NH
1	<i>l</i> -Leucyl- <i>l</i> -leucin .....	20.9	0.64	19	0.05	0
2	Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -serin .....	7.6	0.28	5	0.05	0
3	<i>d</i> , <i>l</i> -Alanyl-serin .....	19.3	0.64	9	0.13	6
4	Glycyl- <i>l</i> -cystin .....	32.9	0.28	5	0.02	0
5	Di- <i>l</i> -leucyl- <i>l</i> -cystin .....	4.0	0.28	5	0.02	0
6	<i>l</i> -Leucyl- <i>d</i> -glutaminsäure .....	14.2	0.28	5	0.07	0
7	[ <i>d</i> , <i>l</i> -Phenyl-alanyl]- <i>d</i> -glutaminsäure .....	38.1	0.64	19	0.03	0
8	<i>d</i> -Alanyl- <i>l</i> -tyrosin .....	10.0	0.28	5	0.00	0
9	Diarginin-trinitrat .....	24.3	0.64	19	0.01	0
10	Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -alanin-anhydrid .....	18.8	0.64	22	0.04	0
11	<i>d</i> -Alanyl-[ <i>l</i> -phenyl-alanin]-anhydrid .....	17.6	0.64	22	0.04	0
12	Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -serin-anhydrid .....	23.4	0.64	22	0.03	0
13	Phenyl-dioxo-piperazin .....	25.5	0.64	22	0.05	0
14	Phenyl-methyl-dioxo-piperazin ..	11.1	0.64	22	0.03	0
15	<i>l</i> -Leucyl-triglycyl- <i>l</i> -leucin .....	22.3	0.64	19	0.03	0
16	<i>l</i> -Leucyl-heptaglycin .....	38.0	0.64	19	0.04	0
17	<i>l</i> -Leucyl-nonoglycin .....	26.3	0.64	19	0.04	0
18	[ <i>d</i> - $\alpha$ -Brom-isocapronyl]-nonoglycin .....	35.7	0.64	22	0.04	0
19	<i>l</i> -Leucyl-triglycyl- <i>l</i> -leucyl-triglycyl- <i>l</i> -leucyl nonoglycin .....	18.5	0.64	19	0.03	0
20	<i>l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin .....	20.2	0.64	9	0.62	54
21	Glycyl- <i>d</i> -alanyl- <i>l</i> -tyrosin .....	11.1	0.64	9	0.43	60
22	Glycyl- <i>l</i> -tyrosyl-glycin .....	13.5	0.28	5	0.30	33
23	Glycyl- <i>d</i> -alanyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin ..	8.9	0.28	5	0.40	82

### Beschreibung der Versuche.

Durch das liebenswürdige Entgegenkommen von Hrn. Dr. Herm. O. L. Fischer in Berlin stand uns ein großer Teil der geprüften Substrate aus der Sammlung Emil Fischers zur Verfügung; wir schulden Hrn. Dr. Fischer dafür aufrichtigen Dank.

Die angewandten Enzym-Lösungen waren enzymatisch einheitlich; erepsin-freies Trypsin gewann man nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck<sup>20)</sup> aus Schweine-Pankreas, trypsin-freies Erepsin nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner<sup>21)</sup> aus Schweine-Darm. Den Verlauf der enzymatischen Einwirkung verfolgte man durch Ermittlung des Aciditäts-Zuwachses in 90-proz. Alkohol mit 0.05-n. KOH und Thymolphthalein als Indicator.

#### Spaltbarkeit von $\beta$ -Naphthalinsulfonyl-glycyl-*l*-tyrosin.

Da die Titration des  $\beta$ -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosins in alkoholischer Lösung infolge der stark sauren Natur der Naphthalinsulfonylgruppe gestört war, verfolgten wir den Verlauf der Hydrolyse nach dem gasometrischen Verfahren von van Slyke.

a) Einwirkung von Darm-Erepsin: 52.4 mg  $\beta$ -Naphthalinsulfonyl-glycyl-*l*-tyrosin, mit 0.1-n. NaOH zur Lösung gebracht ( $p_H = 8.0$ ), überließ man in 5.0 ccm Lösung 14 Stdn. bei 30° der Einwirkung von 0.00067 Er.-E.; der gemessene  $NH_2$ -Stickstoff belief sich a) sofort, b) nach 14 Stdn. auf a) 1.19, b) 1.15 mg, eine Hydrolyse war also nicht erfolgt.

b) Einwirkung von Trypsin und Trypsin-Kinase: 0.2453 g Präparat wurden mit *n*-NaOH zur Lösung gebracht ( $p_H = 8.0$ ) und mit 15 ccm Trypsin-Lösung (enthaltend 3.35 T.-(e.)) a) enterokinase-frei, b) aktiviert mit Enterokinase, auf 25.0 ccm aufgefüllt; die Bestimmung nach van Slyke erfolgte in 5.0 ccm des bei 30° belassenen Ansatzes.

Zeit in Stdn.	Trypsin-Wirkung		Trypsin-Kinase-Wirkung	
	Zuwachs an mg $NH_2$ -Stickstoff	Spaltung %	Zuwachs an mg $NH_2$ -Stickstoff	Spaltung %
1.5	0.70	44	1.05	66
3.0	1.05	66	1.46	92
5.5	1.40	88	1.45	92

Es war also eine deutliche Steigerung der Spaltungs-Geschwindigkeit nach der Aktivierung mit Enterokinase eingetreten.

c) Beständigkeit bei  $p_H = 8.4$ : 49.2 mg Präparat, durch Zugabe von 0.1-n. NaOH in 5.0 ccm Wasser gelöst ( $p_H = 8.4$ ), ergaben, nach van Slyke bestimmt, in 14 Stdn. bei 30° keinen meßbaren Zuwachs an freiem Amino-Stickstoff.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

<sup>20)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **147**, 286, u. zw. S. 301; **149**, 203, u. zw. S. 214 [1925].

<sup>21)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **151**, 31, u. zw. S. 51 [1925/26].