

**358. Ernst Waldschmidt-Leitz und Arnulf Purr:
Über Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas.
(XVII. Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen.)**

[Aus d. Institut für Biochemie d. Deutsch. Techn. Hochschule in Prag.]

(Eingegangen am 8. Juli 1929.)

Die neuere Enzym-Forschung sieht als ihr vornehmstes Ziel die Reinigung und die stoffliche Beschreibung der Enzyme. Mit diesem Ziel ist eng verbunden die Frage nach der Einheitlichkeit eines Enzyms, nach der spezifischen Zugehörigkeit der an einer Enzym-Lösung beobachteten Wirkungen, und die Aufgabe, die chemische Reaktionsfähigkeit der Enzyme, ihre chemisch aktiven Gruppen zu kennzeichnen. Zwar scheint es, als seien außer der spezifischen katalytischen Aktivität kaum Eigenschaften zu erkennen, welche den Enzymen selbst angehören, welche nicht nur durch mit ihnen assoziierte Begleitstoffe vorgetäuscht sind. Allein es wird wohl nur einer Steigerung in der Spezifität der angewandten Reagenzien bedürfen, um zwischen den Eigenschaften der enzymatischen und denen der nicht-enzymatischen Stoffe eine Unterscheidung zu treffen. Dies gilt zum Beispiel für die Verfahren der Enzym-Adsorption, deren Anwendung zur Reinigung von Enzymen und zur Auflösung von Enzym-Gemischen sich schon so fruchtbar erwiesen hat; denn die chemische und auch die enzym-chemische Spezifität der Adsorptionsmittel scheint uns noch lange nicht in genügendem Umfange geklärt. Fortschritte in der Bereitung und in der Anwendung spezifischer Adsorptionsmittel sollten auch für die Kennzeichnung der chemisch aktiven Gruppen in den Enzymen selbst Bedeutung erlangen; es sollte möglich sein, an einem Gemisch zahlreicher Enzyme die Adsorption so spezifisch auszugestalten, daß sie jeweils nur eines der vorhandenen enzymatischen Individuen erfaßt. Die Darstellung chemisch einheitlicher und möglichst verschiedenartiger Adsorbentien und die Ermittlung der p_H -Abhängigkeit ihrer Adsorptionswirkungen, die man noch nicht gründlich geprüft hat, wird dafür ausschlaggebend sein. Denn es gibt Adsorptions- p_H -Kurven von Enzymen mit ausgeprägtem Optimum¹⁾, nicht nur Aktivitäts- p_H -Kurven; ihre Auswertung zur Kennzeichnung der reaktionsfähigen Gruppen in den Enzymen sollte nicht weniger aussichtsreich sein.

So ist für die Auflösung des Gemisches der proteolytischen Enzyme im tierischen Verdauungstrakt durch Adsorption neben der chemischen Natur des Adsorbens die Wasserstoff-Zahl, bei welcher die Adsorption erfolgt, bestimmend. In den Sekreten und Auszügen der Pankreas-Drüse und in denen aus Darm-Schleimhaut findet sich ein Gemisch tryptischer und ereptischer Enzyme. Sie unterscheiden sich in ihrer Angriffsweise gegenüber den Substraten; denn die Anlagerung erfolgt bei den ereptischen Enzymen an die basische, die Aminogruppe, bei den tryptischen an die elektronegative, die Carboxylgruppe, der Substrate. Sie unterscheiden sich in dem gleichen Sinne in ihrer Adsorptions-Spezifität; die ereptischen, bei saurer Reaktion, zeigen die stärker sauren Eigenschaften, sie werden von basischen Adsorbentien, wie dem Tonerde-Gel, $Al(OH)_3$, auswählend aufgenommen, ihre Trennung von den tryptischen Enzymen wird so bewirkt²⁾.

¹⁾ Nach Versuchen von Dr. A. K. Balls an tierischer Dipeptidase und Amino-Polypeptidase.

²⁾ Zufolge E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, Ztschr. physiol. Chem. **147**, 286 [1925]; E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Grassmann, ebenda **156**, 68, u. zw. S. 82 [1926].

Auch die Scheidung des Gemisches der ereptischen Enzyme im Verdauungstrakt, einer Dipeptidase und einer Polypeptidase, durch spezifische Adsorption ist durchgeführt³⁾: sie beruht auf der Einwirkung eines stärker basischen Adsorbens, wiederum bei saurer Reaktion, von Ferrihydroxyd, welches auswählend mit dem dipeptid-spaltenden Enzym reagiert; die sauren Eigenschaften scheinen bei diesem stärker ausgeprägt. Die Adsorptions-Spezifität dieser beiden ereptischen Enzyme ist von einer bemerkenswerten Konstanz: unabhängig von der Herkunft und vom Reinheitsgrad, in den Auszügen aus Darm-Schleimhaut, Pankreas und Milz⁴⁾, zeigen sie das nämliche Verhalten.

Die Trennung der ereptischen Komponenten in Darm und Pankreas wird ergänzt durch die Auflösung des Systems der tryptischen Enzyme, über die wir nachstehend berichten. Das Pankreas-Trypsin ist nämlich, wie es sich gezeigt hat, nicht einheitlich: es besteht aus einer proteinspaltenden und einer polypeptid-spaltenden Komponente, aus einer Proteinase und einer Polypeptidase, welche letztere wir auf Grund ihrer Reaktionsweise als Carboxy-Polypeptidase bezeichnen, unterschieden von der Amino-Polypeptidase, dem ereptischen Enzym. Für die Trennung der beiden Enzyme in ihren natürlichen Gemischen, beispielsweise den Auszügen aus Pankreas, ist neben der Wahl des Adsorptionsmittels die Wasserstoff-Zahl, bei welcher die Adsorption erfolgt, von entscheidender Bedeutung⁵⁾. Während beide Enzyme von Tonerde der Sorte C₇ in saurem Milieu übereinstimmend nur in geringem Maße aufgenommen werden, betrifft die Adsorption durch dieses Gel in neutralem Milieu vorwiegend die polypeptid-spaltende Komponente. Man erreicht so leicht und in kurzem Arbeitsgang eine vollständige Trennung des tryptischen Enzym-Gemisches; denn in den Adsorptions-Restlösungen verbleibt die Proteinase, in den Elutionen der Adsorbate findet sich die Carboxy-Polypeptidase in proteolytisch-einheitlichem Zustande.

Der Gang der präparativen Vornahmen, die die adsorptive Abscheidung der vier einzelnen proteolytischen Enzyme aus Darm und Pankreas gestatten, läßt sich durch nachstehendes Schema veranschaulichen; in der Einfachheit und Sicherheit ihrer Durchführung mögen sie an die Verfahren zur Scheidung anorganischer Stoffgemische erinnern:

Proteinase, Carboxy-Polypeptidase, Amino-Polypeptidase, Dipeptidase
+ Tonerde C₇ bei p_H = 4

Adsorpt.-Restlösung:	Elution:
Proteinase, Carboxy-Polypeptidase	Amino-Polypeptidase, Dipeptidase
+	+
Tonerde C ₇ bei p _H = 7	Eisenhydroxyd bei p _H = 4
Adsorpt.-Restlösung:	Elution:
Proteinase Carboxy-Polypeptidase	Adsorpt.-Restlösung: Elution:
	Amino-Polypeptidase Dipeptidase

³⁾ Zufolge E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls und J. Waldschmidt-Graser, B. **62**, 956 [1929].

⁴⁾ Nach demnächst zu veröfentlichenden Versuchen mit J. J. Bek und A. Schäffner.

⁵⁾ Siehe dazu die Beobachtungen über Wirkungsverschiebungen bei der Adsorption mit Tonerde C₇ und verschiedenem p_H von E. Abderhalden und Mitarbeitern, Ferment-Forschung **10**, 474, 478, 481 [1929].

Für die beiden tryptischen Enzyme, Proteinase und Carboxy-Polypeptidase, welche nun in proteolytisch einheitlichem Zustande zugänglich sind, ist kennzeichnend, daß sie durch ein und denselben Stoff, Entero-kinase, eine spezifische Aktivierung erfahren; denn auch nach einer weitgehenden Reinigung des Aktivators haben wir keine Änderung seines Leistungsvermögens gegenüber den beiden Enzymen beobachtet. Aber seine Bedeutung für die beiden Enzyme ist eine ungleiche: Proteinase in aktivator-freiem Zustande finden wir gegenüber allen untersuchten Substraten wirkungslos, Carboxy-Polypeptidase dagegen auch ohne den Aktivator zur Hydrolyse einer Reihe von Stoffen befähigt; die Wirkungen der aktivator-freien Carboxy-Polypeptidase decken sich nämlich, auch dem Umfange nach, mit den für „nicht-aktiviertes Pankreas-Trypsin“ bisher beschriebenen. Aber auch bei diesem Enzym bewirkt der Aktivator, wenigstens beim Abbau komplizierter zusammengesetzter Substrate wie der Protamine, eine Erweiterung des Spezifitäts-Bereiches, keine einfache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Die spezifischen Wirkungen der beiden Enzyme, Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas, die wir an einer Reihe von Substraten geprüft haben, sind streng zu unterscheiden. Wie nachstehende Tabelle 1 veranschaulicht, ist die Wirkung der Proteinase auf die Spaltung der eigentlichen Eiweißstoffe, beispielsweise des Caseins, des Histons und der Protamine, beschränkt, während die Wirkung der Carboxy-Polypeptidase sich auf die Zerlegung von Polypeptiden bestimmter Zusammensetzung, sowie von acylierten Amino-säuren und Peptiden und auch von Protaminen erstreckt. Für die Angreifbarkeit durch Carboxy-Polypeptidase ist nämlich der Ionisationsgrad der freien Carboxylgruppe in den Substraten von Bedeutung, der durch die Einführung von Säureresten in Amino-säuren und Peptide oder von bestimmten Amino-säure-Resten, beispielsweise von Tyrosin, eine Verstärkung erfährt⁶⁾; daneben bemerkt man einen konfigurativen Einfluß der die freie Carboxylgruppe tragenden Amino-säure auf die Anlagerung des Enzyms.

Tabelle 1.

Spezifität von Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas.

(Angaben bedeuten: — = negative, + = positive, ++ = verstärkte Hydrolyse)

Substrat	Proteinase		Carboxy-Polypeptidase	
	aktivator-frei	aktiviert	aktivator-frei	aktiviert
Casein	—	+	—	—
Histon	—	+	—	—
Clupein	—	+	+	++
Leucyl-glycyl-tyrosin	—	—	+	++
Leucyl-glycyl-glycin	—	—	—	—
Chloracetyl-tyrosin	—	—	+	++
Chloracetyl-leucin	—	—	+	+
Phthalyl-glycyl-glycin	—	—	+	++

Die Spaltbarkeit gewisser Substrate, so von Protaminen, durch Proteinase und Carboxy-Polypeptidase zugleich, die man beobachtet, besteht indessen nicht in einer Übereinstimmung der Enzym-Wirkungen. Am Beispiel des

⁶⁾ Nach demnächst zu veröffentlichenden Versuchen mit W. Klein.

Clupeins läßt sich vielmehr zeigen, daß die enzymatischen Einzelwirkungen unabhängig voneinander, nämlich auch nacheinander, zur Geltung kommen; die Einzelleistungen der beiden Enzyme teilen sich nämlich hier in die tryptische Gesamtleistung in dem Verhältnis 1:1. Mit der Beschreibung der spezifischen Reaktionsprodukte in solchen Fällen werden wir zu prüfen haben, worin die Spezifitäts-Unterschiede zwischen Proteinase und Carboxy-Polypeptidase begründet sind.

Für die Konstitutions-Aufklärung der tryptischen Substrate, vor allem der natürlichen Proteine, sind mit der Unterscheidung der beiden Komponenten neue Wege eröffnet; denn man verfügt nun schon über eine größere Anzahl verschiedener peptid-spaltender Enzyme bekannter Spezifität⁷⁾ zur Kennzeichnung proteolytischer Reaktionsprodukte. Die spezifische Wirkungsweise dieser Enzyme ist heute im wesentlichen sichergestellt; ihre Kenntnis erlaubt einen stufenweisen Abbau von Peptiden auf den verschiedenartigsten Reaktionswegen. Sie sollte einen Einblick nicht nur in die Anordnung der Bausteine im Eiweiß und in seinen Spaltprodukten vermitteln, auch für die Anzahl der vorhandenen Amino-säure-Reste, für die Molekulargröße, wird man aus dem Verhältnis der einzelnen enzymatischen Leistungen beim Abbau sichere Unterlagen gewinnen.

Beschreibung der Versuche.

1. Zur Bestimmung der Carboxy-Polypeptidase.

p_H -Abhängigkeit: Die Wirkung der Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas messen wir an einem spezifischen Substrate, Chloracetyl-*l*-tyrosin, und zwar nach Aufladung des Enzyms mit Enterokinase. Das Wirkungs-Optimum des aktivierten Enzyms liegt für das angewandte Substrat, wie aus der nachfolgenden Tabelle 2, sowie aus der Figur hervorgeht, zwischen $p_H = 6.9$ und $p_H = 7.4$, also bei nahezu neutraler Reaktion. Die Hydrolyse des Substrates verfolgen wir durch Ermittlung des Zuwachses freier NH_2 -Gruppen nach van Slyke; zuweilen ist es infolge der Abscheidung des bei der Spaltung gebildeten schwerlöslichen Tyrosins erforderlich, vor der Einwirkung der salpetrigen Säure durch Zusatz verd. Lauge eine vollkommene Lösung des Reaktionsgemisches zu bewirken.

Tabelle 2.

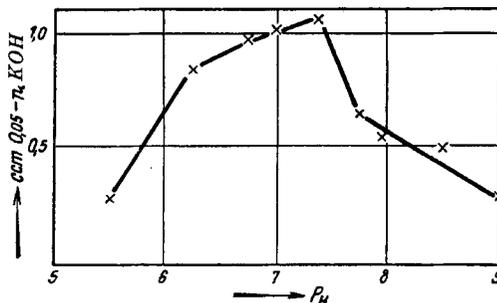
Chloracetyl-*l*-tyrosin-Spaltung und Wasserstoff-Zahl.

(0.0515 g Substrat (= 0.0002 Mol.); 0.25 ccm gereinigte Enzymlösung, mit Enterokinase aktiviert; 2.00 ccm $\frac{1}{15}$ -mol. Phosphat-Puffer; Gesamtvolumen 7.0 ccm; 45 Min., 30°)

p_H	NH_2 -Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung %
5.6	0.31	8
6.2	0.80	20
6.6	0.96	24
6.9	1.03	28
7.4	1.12	31
7.7	0.63	16
8.0	0.55	14
8.5	0.51	13
9.0	0.31	8

⁷⁾ Siehe dazu auch die Beobachtungen von W. Grassmann, H. Dyckerhoff und O. v. Schoenebeck über das Vorkommen einer für die Hydrolyse von Prolin-Peptiden spezifischen Peptidase, B. 62, 1307 [1929].

Kinetik: Die Hydrolyse des Chloracetyl-*l*-tyrosins durch das Enzym verläuft, wie sich gezeigt hat, gemäß einer Reaktionsgleichung erster Ordnung. Auch gilt innerhalb gewisser Grenzen die Beziehung, wonach die Zeiten gleichen Umsatzes den Enzymmengen umgekehrt proportional, die Reaktionskonstanten den Enzymmengen proportional gefunden werden, nämlich zufolge der Versuche in Tabelle 3 für einen Bereich der Enzymmengen wie 1:4; bei Anwendung zu kleiner Enzymmengen und längerer Versuchsdauer findet man indessen die Umsätze zu gering, die Zerstörung der enzymatischen Aktivität schon beträchtlich.



Chloracetyl-tyrosin-Spaltung und Wasserstoff-Zahl.

Tabelle 3.

Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit.

(0.0002 Mol. Chloracetyl-*l*-tyrosin; gereinigte Enzymlösung aus Pankreas, mit Entero-kinase aktiviert; 2.00 ccm $\frac{1}{15}$ -mol. Phosphat-Puffer von pH = 7.4; 30°)

Enzymlösung ccm	Zeit Min.	NH ₂ -Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung %	k = 1/t log 10 a/a-x (ber.)
1.00	15.5	1.52	38	0.0134
	30	2.40	60	0.0133
	45	2.89	72	0.0124
	60	3.29	82	0.0125
0.50	32	1.43	36	0.0060
	62	2.27	57	0.0059
	90	2.79	70	0.0058
	120	3.18	80	0.0058
0.25	32	0.80	20	0.0030
	60	1.35	34	0.0030
	90	1.83	46	0.0030
	120	2.15	54	0.0028
0.125	60	0.91	23	0.0019
	90	1.07	27	0.0015
	120	1.31	33	0.0014
	240	1.86	47	0.0011
	360	2.18	55	0.0010

Bestimmungsmethode: Das Verfahren zur Bestimmung der Carboxy-Polypeptidase, das wir anwenden, gründet sich auf die zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit bestehenden Beziehungen, und es bezieht sich auf die Messung des maximal durch Entero-kinase aktivierten Enzyms; man bewirkt seine Aktivierung, wie die der Proteinase aus Pankreas⁸⁾, durch $\frac{1}{2}$ -stdg. Einwirkung überschüssiger Kinase bei 30°.

Als Maß für die Menge des Enzyms dient die „Carboxy-Polypeptidase-Einheit (C.-Pol.-E)“, nämlich das Tausendfache derjenigen Enzymmenge, für welche sich unter den nachstehend angeführten Bedingungen

⁸⁾ vergl. R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, S. Duñaiturria und G. Künstner, Ztschr. physiol. Chem. **161**, 191, u. zw. S. 209 [1926].

die Konstante der monomolekularen Reaktion zu 0.001 ergibt; die Reaktionskonstante ergibt also zugleich die Anzahl Enzym-Einheiten in der Bestimmungsprobe.

Als Maß für den Reinheitsgrad, für den die vorliegende Abhandlung noch kein Beispiel aufweist, wird der „Carboxy-Polypeptidase-Wert (C.-Pol.-W.)“ vorgeschlagen, welcher die Anzahl der Carboxy-Polypeptidase-Einheiten in 1 g Präparat angibt.

Ausführung der Bestimmung: 0.5150 g Chloracetyl-*l*-tyrosin (= 0.002 Mol.) werden in wenig (etwa 10 ccm) heißem Wasser gelöst und durch Zusatz von *n*-NaOH mit Brom-thymolblau als Indicator auf $p_H = 7.4$ eingestellt; die Substrat-Lösung wird sodann mit 20 ccm $\frac{1}{15}$ -mol. Phosphat-Puffer von $p_H = 7.4$ vermischt und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

Zu 5.0 ccm der so bereiteten Substrat-Lösung (0.0002 Mol. Chloracetyl-*l*-tyrosin enthaltend) fügt man die zuvor während 30 Min. und bei 30° mit Enterokinase aktivierte und auf 2.0 ccm mit Wasser verdünnte Probe der Enzym-Lösung hinzu und beläßt das Reaktionsgemisch sodann im Thermostaten von 30°. Nach Ablauf der Bestimmungsdauer unterbricht man die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 2 ccm *n*-NaOH, durch welche zugleich etwa abgeschiedenes Tyrosin gelöst wird, und mißt alsbald die Menge der reaktionsfähigen Aminogruppen nach dem Verfahren von van Slyke. Zu jeder Analyse ist eine Leerbestimmung auszuführen, deren NH_2 -Wert von dem der Hauptbestimmung in Abzug zu bringen ist. Die Enzymmenge in der angewandten Analysenprobe soll zwischen 0.003 und 0.01 C.-Pol.-E., die Hydrolyse des Substrates zwischen 20 und 80% betragen und die Dauer der Bestimmung 2 Stdn. nicht überschreiten.

2. Adsorptionsverhalten von Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas.

Der Vergleich des Adsorptionsverhaltens von Proteinase und Polypeptidase in den von den ereptischen Enzymen befreiten Lösungen, den wir mit einer Anzahl von Adsorbentien, Tonerde verschiedener Zusammensetzung, Eisenhydroxyd und Berylliumhydroxyd, vorgenommen haben, hat nur in einem Falle bemerkenswerte Unterschiede für die beiden Enzyme ergeben: Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, wirkt von den geprüften Adsorbentien nur das Tonerde-Gel C_7 , von der Zusammensetzung $Al(OH)_3$, und bei neutraler Reaktion genügend spezifisch; es nimmt nämlich vorwiegend polypeptid-spaltendes Enzym auf, während von demselben Gel schon bei mäßig saurer Reaktion, $p_H =$ etwa 4, die beiden Enzyme zu ähnlichen Beträgen adsorbiert werden; denn auf dieser Vornahme beruht ja ihre gemeinsame Trennung von den ereptischen Enzymen der Drüse⁹⁾. Es wird eine reizvolle Aufgabe sein, die wir in Angriff nehmen, die spezifische Adsorption der beiden Enzyme durch die verschiedenen Mittel in ihrer Abhängigkeit von der elektrochemischen Natur der Adsorbentien eingehender zu prüfen; denn es scheint, daß ein bestimmter, mäßig basischer Charakter des Adsorptionsmittels für die auswählende Adsorption der Polypeptidase am günstigsten ist. Für die präparative Trennung der beiden Enzyme, für die wir nachstehend ein Beispiel anführen, ist nach den bisherigen Erfahrungen allein die Tonerdesorte C_7 auswählend genug. Man erreicht mit diesem Adsorbens, wie die Belege der Tabelle 5 erweisen, daß nach öfter wiederholter Adsorptionsvornahme in der Adsorptions-Mutterlauge die Proteinase in guter Ausbeute

⁹⁾ Zufolge E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner und W. Grassmann, Ztschr. physiol. Chem. **156**, 68, u. zw. S. 82 [1926].

frei von dem polypeptid-spaltenden Enzym verbleibt; in der Elution der Tonerde-Adsorbate findet sich dagegen die Carboxy-Polypeptidase neben nur geringen Anteilen an Proteinase, deren vollständige Abtrennung, wenn auch mit bedeutenderen Verlusten an polypeptid-spaltendem Enzym, durch eine Wiederholung der Tonerde-Adsorption gelingt.

Tabelle 4.

Adsorptionsverhalten von Proteinase und Carboxy-Polypeptidase.

(60 ccm Enzymlösung, durch 3-malige Adsorption mit Tonerde C γ (= je 62.5 mg Al $_2$ O $_3$) bei p H = 3.8 von ereptischen Enzymen befreit (enthaltend 30.0 T.-(e.) neben 0.48 C.-Pol.-E.); p H der Adsorption eingestellt mit verd. Natronlauge bzw. Essigsäure; Bestimmungen ausgeführt an den in der Zentrifuge abgetrennten Adsorptions-Mutterlaugen; Messung der Proteinase nach dem früher beschriebenen Verfahren¹⁰⁾ mit Casein als Substrat)

Angew. Adsorbens	Anzahl der Adsorptionen	Angew. mg Oxyd	pH des Adsorbens	Adsorbiert (%)	
				Proteinase	Carboxy-Polypeptidase
Tonerdesorte A ¹¹⁾	3	je 80	7.0	50	37
Tonerdesorte B ¹¹⁾	3	je 103	7.0	22	26
Tonerdesorte C γ ¹²⁾	3	je 62.5	7.0	20	90
Ferrihydroxyd ¹³⁾	3	je 490	7.0	50	67
„	2	je 490	3.8	20	18
Berylliumhydroxyd ¹⁴⁾	3	je 14.4	7.0	0	10

Tabelle 5.

Trennung von Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas.

(100 ccm Enzymlösung (mit 120 T.-(e.) und 0.42 C.-Pol.-E.), aus 50 ccm Glycerin-Auszug von Trockenpankreas (1:10) durch Verdünnen mit 50 ccm Wasser und 4-malige Behandlung mit je 5.0 ccm Tonerde C γ (= je 125 mg Al $_2$ O $_3$) bei p H = 3.8 bereitet, von ereptischen Enzymen frei; 11-malige Adsorption bei p H = 7.0 mit je 6.0 ccm Tonerde C γ (= je 150 mg Al $_2$ O $_3$): Adsorptions-Restlösung; Adsorbate vereinigt und nach Waschen mit 40 ccm 20-proz. Glycerin eluiert mit 50 ccm 0.04-n. NH $_3$ (20 % Glycerin enthaltend): 1. Elution; 40 ccm der 1. Elution durch 3-malige Adsorption mit je 4.0 ccm der Tonerde (= je 100 mg Al $_2$ O $_3$) bei p H = 7.0 und Elution des gewaschenen Adsorbates, wie oben, mit 50 ccm 0.04-n. NH $_3$ (20 % Glycerin enthaltend) weiter gereinigt: 2. Elution; Angaben bedeuten den Enzymgehalt in aliquoten Teilen der Lösungen)

Enzym-lösung	Gehalt der Analysenprobe an		Ausbeute (%) an	
	T.-(e.)	C.-Pol.-E.	Proteinase	Carboxy-Polypeptidase
Ausgangslösung	1.2	0.0042	—	—
Adsorpt.-Restlösung	0.50	0	42	0
1. Elution	0.10	0.0014	8	32
2. Elution	0	0.0005	0	12

¹⁰⁾ R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, S. Duñaiturria und G. Künstler, Ztschr. physiol. Chem. **161**, 191, u. zw. S. 206ff. [1926].

¹¹⁾ siehe R. Willstätter und H. Kraut, B. **56**, 149 [1923].

¹²⁾ siehe R. Willstätter, H. Kraut und O. Erbacher, B. **58**, 2448, u. zw. S. 2453 [1925].

¹³⁾ siehe die Darstellung bei R. Willstätter, H. Kraut und W. Fremery, B. **57**, 1491, u. zw. S. 1498 [1924].

¹⁴⁾ Durch Fällern von Berylliumchlorid-Lösung mit verd. Ammoniak bei 70° und Auswaschen mit Wasser bereitet.

3. Zur Spezifität von Proteinase und Carboxy-Polypeptidase.

Für die spezifischen Wirkungen der beiden Enzyme ist ihr Aktivierungszustand ausschlaggebend. Während wir für die Proteinase in aktivatorfreiem Zustande gar keine proteolytischen Wirkungen beobachten, findet man für das polypeptid-spaltende Enzym auch in nicht-aktiviertem Zustande schon eine gewisse Aktivität. Es ist indessen nicht erreicht, die Polypeptidase, deren Aktivierung wie die der Proteinase durch Enterokinase bewirkt wird (Tab. 6), nach ihrer Abtrennung von der Proteinase in völlig aktivator-freier Form zu gewinnen; denn die im Verlauf der Adsorptionsvornahmen eintretende spontane Aktivierung des Enzyms ist auch bei vorichtigster Ausführung der Operationen nicht ganz zu vermeiden. Es ist sehr bemerkenswert, daß die spontan gebildete Enterokinase vorzugsweise mit dem polypeptid-spaltenden Enzym in Reaktion tritt; die Polypeptidase scheint danach durch eine viel bedeutendere Affinität zur Enterokinase ausgezeichnet als die Proteinase. Zur Gewinnung enterokinase-freier Carboxy-Polypeptidase ist man daher noch auf das Verfahren zur Darstellung von „enterokinase-freiem Trypsin“¹⁵⁾ angewiesen, dessen Wirkungen nach unseren Befunden denen der aktivator-freien Carboxy-Polypeptidase gleichzusetzen sind.

Wir belegen nachstehend in den Tabellen 7 und 8 die Ergebnisse der Spezifitäts-Prüfung von aktivierter Carboxy-Polypeptidase einerseits, von aktivierter und von aktivator-freier Proteinase andererseits an einer Anzahl natürlicher und synthetischer Substrate.

Die Wirkungen der aktivierten und die der nicht-aktivierten Polypeptidase unterscheiden sich, wie sich am Beispiel des Clupeins (Tab. 9) zeigen läßt, nicht nur in der Hydrolysen-Geschwindigkeit, sondern vor allem hinsichtlich des spezifischen Wirkungsbereichs; dieser ist nämlich bei den aktivierten Enzym ein größerer. Es wird zu prüfen sein, auf welche spaltbaren Komplexe in den Protaminen, den einzigen bekannten natürlichen Substraten der aktivator-freien Polypeptidase, sich die durch den Aktivator bedingte Mehrleistung bezieht; bei der Hydrolyse einfacherer Substrate indessen, beispielsweise der des Leucyl-glycyl-tyrosins, bei welcher sich die Polypeptidase-Wirkung auf die Aufspaltung einer einzigen Säureamid-Bindung beschränkt, kommt die Wirkung des Aktivators nur in einer Geschwindigkeits-Steigerung zum Ausdruck.

Tabelle 6.

Aktivierbarkeit von Carboxy-Polypeptidase und Proteinase durch Enterokinase von verschiedenem Reinheitsgrad.

(Kinase-freier Glycerin-Auszug aus Trockenpankreas; rohe Kinase-Lösung durch Extraktion von getrockneter Darm-Schleimhaut mit Ammoniak und Fällern mit Essigsäure gewonnen¹⁶⁾; gereinigte Kinase-Lösung, bereitet durch Fällen der essigsäuren Rohlösung mit Alkohol und Auflösen in 45-proz. Glycerin¹⁷⁾; Aktivierungs-Dauer 30 Min.

¹⁵⁾ E. Waldschmidt-Leitz und K. Linderström-Lang, Ztschr. physiol. Chem. **166**, 241 [1927].

¹⁶⁾ vergl. E. Waldschmidt-Leitz, Ztschr. physiol. Chem. **142**, 217, u. zw. S. 224 [1924/25].

¹⁷⁾ vergl. E. Waldschmidt-Leitz, a. a. O., u. zw. S. 229.

(30°); Aktivitäts-Bestimmungen an Casein und Chloracetyl-*l*-tyrosin, wie üblich, ausgeführt; Angaben bedeuten den Aciditäts-Zuwachs in ccm 0.2-*n*. nach 20 Min. für die Casein-Spaltung bzw. 30 Min. für die Spaltung des Chloracetyl-tyrosins; angewandte Enzymmenge 0.50 bzw. 0.25 ccm Auszug)

Kinase- Lösung	angew. ccm	Hydrolyse von	
		Casein	Chloracetyl- <i>l</i> -tyrosin
Rohlösung	0.017	0.85	1.15
	0.083	1.55	1.85
	0.50	1.80	1.75
	1.0	1.90	—
Gereinigte Lösung	0.017	0.85	1.20
	0.083	1.55	1.65
	0.50	1.90	1.70
	1.0	1.90	—

Tabelle 7.

Spezifität der Carboxy-Polypeptidase (aktiviert).

(Proteinase-freie Enzymlösung, mit überschüssiger Enterokinase aktiviert; $pH = 7.4$, 30°; Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 5.0 ccm)

Substrat	Angew. mg	Angew. C.-Pol.-E.	Zeit Stdn.	Aciditäts- Zuwachs	
				ccm 0.05- <i>n</i> .	
Casein	300	0.0018	3	0.00	
Thymus-Histon	100	0.0037	1.5	0.00	
Clupein	100	0.0037	2	1.75	
<i>d,l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin	35.1	0.0029	1	1.10	
Chloracetyl- <i>l</i> -tyrosin	51.5	0.0029	1	1.32	
Chloracetyl- <i>l</i> -leucin	41.5	0.0029	2	0.77	
Phthalyl-glycyl-glycin	26.2	0.0018	1	0.40	

Tabelle 8.

Spezifität der Proteinase.

(Proteinase-Lösung, frei von Carboxy-Polypeptidase und von Enterokinase; zur Aktivierung mit überschüssiger Enterokinase behandelt; $pH = 8.4$, 30°; Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 5.0 ccm)

Substrat	Angew. mg	Angew. T.-(e.)	Zeit Stdn.	Aciditäts-Zuwachs (ccm 0.05- <i>n</i> .)	
				aktivator-frei	aktiviert
Casein	300	1.0	0.33	0.00	1.05
Thymus-Histon	100	0.4	2	0.01	0.62
Clupein	100	0.4	2	0.00	2.90
<i>d,l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin	35.1	0.5	2	0.00	0.00
Chloracetyl- <i>l</i> -tyrosin ..	51.5	1.0	12	0.00	0.05
Chloracetyl- <i>l</i> -leucin ...	41.5	1.0	6	0.00	0.00
Phthalyl-glycyl-glycin .	26.2	0.5	2	0.00	0.00

Tabelle 9.

Hydrolyse von Clupein mit Carboxy-Polypeptidase und Proteinase und enzymatischer Wirkungsbereich.

(2.0 g Clupein-Sulfat, luft-trocken, im Gesamtvolumen von 100 ccm; Enzym-Einwirkung vorgenommen bis zur Konstanz des Aciditäts-Zuwachses und durch erneute Enzym-Zugabe kontrolliert; pH = 8.4, 35°; Angaben beziehen sich auf die in der Analysenprobe enthaltene Menge von 0.10 g Clupein-Sulfat entspr. 0.071 g wasser- und asche-freies Clupein)

Vers. Nr.	Angew. Enzym	Angew. Einh. (insges.)	Zeit Std.	Aciditäts-Zuwachs ccm 0.05-n.
1a	Proteinase (aktiviert)	12 T.-(e.)	7	3.13
1b	Carboxy-Polypeptidase (akt.) nach Proteinase (akt.)	0.1133 C.-Pol.-E.	38	3.30
2	Proteinase (akt.) + Carboxy-Polypept. (akt.) ¹⁸⁾	—	24	6.30
3	Carboxy-Polypeptidase (aktivator-frei) ¹⁹⁾	—	8	1.80

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

359. L. Zechmeister und P. Tuzson: Zur Kenntnis des Xanthophylls (II. Mittel.).

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Pécs, Ungarn.]
(Eingegangen am 2. August 1929.)

In der I. Mitteilung¹⁾ ist gezeigt worden, daß Xanthophyll, ein typischer Polyen-Farbstoff, bei der katalytischen Hydrierung, wie Carotin, 22 Wasserstoff-Atome bindet. Aus dem Verlauf der colorimetrischen Hydrierungskurve wurde auf die Gleichheit der ungesättigten Systeme in den beiden gelben Blattfarbstoffen geschlossen. Unabhängig von uns sind auch R. Pummerer und seine Mitarbeiter²⁾ zur Überzeugung gelangt, daß die beiden Chromogene identisch sind; die nahe Struktur-Verwandtschaft zwischen Carotin und Xanthophyll wird auch durch die von ihnen mitgeteilten Absorptionskurven schön illustriert. Der Beobachtung von R. Pummerer und L. Rebmann, daß Benzopersäure nur 8 Doppelbindungen des Carotin- oder Xanthophyll-Moleküls erfaßt, können die untenstehenden Versuche angereicht werden, wonach Brom in Chloroform-Lösung gleichfalls 8 Doppelbindungen sättigt. Erst sekundär machen sich Umwandlungen geltend, die mit einer Abgabe von Bromwasserstoff verknüpft sind.

¹⁸⁾ Zufolge E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Grassmann, Ztschr. physiol. Chem. **156**, 68, u. zw. S. 91 [1926].

¹⁹⁾ Zufolge E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Grassmann, a. a. O., u. zw. S. 89. ¹⁾ B. **61**, 2003 [1928].

²⁾ R. Pummerer und L. Rebmann, B. **61**, 1090 [1928]; mit W. Reindel, B. **62**, 1411 [1929].