

III. *symm.* Trichlor-anilin.

Löst man 20 g Anilin in 500 ccm Salzsäure ($d = 1.19$) und führt die Elektrolyse, wie vorangehend beschrieben, jedoch ohne fortwährend zu rühren, und unter ständiger Kühlung mit Eiswasser durch, so wird die Lösung erst grün, dann dunkel schwarzblau. Nach etwa 8 Stdn. habe ich die Elektrolyse eingestellt, worauf sich die Farbstoffe zusammengeballt hatten. Die abgesaugte Flüssigkeit erscheint nunmehr hell grünlichgelb und enthält das *symm.* Trichlor-anilin als Chlorhydrat. Durch starkes Verdünnen mit destilliertem Wasser wird das Salz zersetzt; das frei gewordene Trichlor-anilin bildet zuerst eine milchige Trübung, dann einen käsigen Niederschlag, der sich in $1/2$ Stde. in ein Gemenge von feinen weißen Krystallnadeln umwandelt. Das abfiltrierte Produkt habe ich bei 45° getrocknet, durch Sublimation gereinigt und aus Alkohol umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt stimmte dann genau mit dem des *symm.* Trichlor-anilins (76.5°) überein. Die Ausbeute war etwa 4 g aus 20 g Anilin.

0.1776 g Sbst.: 11.8 ccm N (17.5° , 750 mm). — 0.2214 g Sbst.: 15.5 ccm N (18.5° , 753.4 mm). — 0.2146 g Sbst.: 0.4712 g AgCl. — 0.1678 g Sbst.: 0.3670 g AgCl.

$C_6H_4NCl_3$. Ber N 7.13, Cl 54.16.

Gef. „ 7.55, 7.96, „ 54.31, 54.09.

Zusammenfassung.

Bei der Elektrolyse von Anilin in salzsaurer Lösung ließ sich folgendes ermitteln: Anilin läßt sich durch Elektrolyse zu *symm.* Trichlor-anilin chlorieren bzw. zu chlorierten Chinonen chlorieren und oxydieren. Je größer die Konzentration der Salzsäure ist, um so geringer wird der Grad der Oxydation und der Chlorierung. In 10-proz. Salzsäure erhält man Tetrachlor-chinon; in 20-proz. Salzsäure Trichlor-chinon; in konz. Salzsäure als Endprodukt ausschließlich *symm.* Trichlor-anilin. Menge und Art der entstehenden Produkte hängen auch von der Versuchs-Temperatur ab. Zur Darstellung von Tetrachlor-chinon ist es am besten, wenn sich die Flüssigkeit während der Elektrolyse spontan auf $35-40^{\circ}$ erwärmt. Trichlor-chinon entsteht, wenn die Lösung durch Eiswasser auf $5-15^{\circ}$ abgekühlt wird, und *symm.* Trichlor-anilin bei mäßiger Kühlung. Die Stromdichte betrug in allen Fällen etwa 0.1 Amp./qcm.

180. Ernst Waldschmidt-Leitz und Arnold K. Balls: Zur Kenntnis der Amino-Polypeptidase aus Darm-Schleimhaut (19. Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen).

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

(Eingegangen am 5. April 1930.)

Über die Unterscheidung zweier besonderer ereptischer Enzyme im Darm, einer Amino-Polypeptidase neben einer Dipeptidase, ist vor etwa Jahresfrist berichtet worden¹⁾; sie beruhte auf der selektiven Adsorption des dipeptid-spaltenden Enzyms durch Eisenhydroxyd. In ähnlicher Weise wurde inzwischen die Auflösung des ereptischen Enzym-Gemisches im Pankreas²⁾ und in anderen tierischen Organen³⁾ nach Dipeptidase und Amino-Polypeptidase durchgeführt.

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls u. J. Waldschmidt-Graser, B. 62, 956 [1929]. ²⁾ Noch unveröffentlicht.

³⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner, J. J. Bek u. E. Blum, Ztschr. physiol. Chem. 188, 17, u. zw. S. 18 [1929/30].

Für die Untersuchung der spezifischen Adsorptions-Auslese ist das Verhalten der proteolytischen Enzyme, z. B. des Verdauungs-Traktes, besonders lehrreich geworden; denn die Adsorptions-Affinitäten dieser Enzyme erscheinen, dem differenzierten elektrochemischen Charakter ihrer Substrate entsprechend, stärker ausgeprägt, ihr Adsorptions-Verhalten weniger durch Begleitstoffe entstellt. So bieten diese Enzyme auch ein günstiges Material, um den Einfluß der chemischen Natur der Adsorbentien auf die Spezifität der Adsorption zu prüfen. Einen Beitrag zu dieser Frage liefert das Adsorptions-Verhalten von Amino-Polypeptidase und Dipeptidase aus Darm-Schleimhaut gegenüber verschiedenen Oxyden und Oxydhydraten, z. B. des Eisens.

Es ist sehr bemerkenswert, daß, wie Tabelle I veranschaulicht, nicht etwa die gefällten Eisengele von großer Oberflächen-Entwicklung, sondern daß Oxyde und Oxydhydrate von einheitlichem oder nahezu einheitlichem Krystallbau, Hämatit oder gelbes Eisenhydroxyd, am auswählendsten adsorbieren. Die Steigerung der Adsorptions-Spezifität gefällten Eisenhydroxyds bei der Alterung, die wir beobachten, weist darauf hin, daß auch bei diesem Adsorbens die Adsorptions-Auslese auf den Gehalt an dem kristallisierten Endprodukte seiner Alterung, an Hydro-Hämatit⁴⁾, zurückzuführen sein wird.

Tabelle I.

Adsorptions-Spezifität von Oxyden und Oxydhydraten.

(Angaben bedeuten: ++ = stark, + = mäßig, — = gar nicht adsorbiert; Adsorption vorgenommen bei $p_{\text{H}} = 4.0$.)

Adsorbens	Adsorption von Amino- Dipeptidase Polypeptidase	
Eisenhydroxyd, rot, frisch gefällt ⁵⁾	++	++
Gefälltes Eisenhydroxyd, 2 Jahre gealtert	+	++
Gelbes Eisenhydroxyd ($\text{Fe}_2\text{O}_3, \text{H}_2\text{O}$) ⁶⁾ , frisch gefällt	—	++
Geglühtes Eisenoxyd, Hämatit (Fe_2O_3)	—	++
Natürlicher Goethit ($\text{Fe}_2\text{O}_3, \text{H}_2\text{O}$)	—	—
Tonerde C γ ($\text{Al}_2\text{O}_3, 3\text{H}_2\text{O}$) ⁷⁾	++	++

Man hat zwischen allgemeiner und spezifischer Adsorptions-Tüchtigkeit zu unterscheiden. Die erstere ist den kolloiden Stoffen von großer Oberfläche und ungeordneter Struktur, die letztere Stoffen mit einheitlichem Krystallgitter eigen. Für die spezifische Adsorption sind also bestimmte, chemisch definierte Restvalenzen in den Krystalliten entscheidend. So verdient es Beachtung, daß von den geprüften Eisenmineralien das wasserfreie Eisenoxyd, der Hämatit, spezifisch die Dipeptidase adsorbiert, während das Monohydrat Goethit gar keine Adsorptions-Wirkung zeigt. Für die

⁴⁾ vergl. G. F. Hüttig u. A. Zörner, Ztschr. Elektrochem., im Druck.

⁵⁾ Bereitet nach den Angaben von R. Willstätter, H. Kraut u. W. Fremery, B. 57, 1491, u. zw. S. 1498 [1924].

⁶⁾ D. Tommassi, Monit. Scientif. 31, 164 [1888]; Hrn. Prof. Dr. G. F. Hüttig, Prag, sind wir für seine Ratschläge bei der Darstellung des Präparates zu Dank verpflichtet.

⁷⁾ R. Willstätter, H. Kraut u. O. Erbacher, B. 58, 2448 [1925].

Bereitung hochwirksamer und spezifischer Adsorbentien sollte mehr als je⁸⁾ die Richtlinie gelten, die Gewinnung von Gelen mit bestimmter und mit einheitlicher Struktur anzustreben, welche den Vorzug hohen Adsorptions-Vermögens mit dem der Spezifität vereinigen sollten; denn die kristallisierten mineralischen Stoffe von kleinerer Oberfläche sind den hochdispersen Gelen in der quantitativen Leistungsfähigkeit als Adsorbentien noch unterlegen.

Das Adsorptions-Verhalten der beiden ereptischen Enzyme im Verdauungs-Trakt, Amino-Polypeptidase und Dipeptidase, findet man dagegen gegenüber Tonerde-Präparaten sehr ähnlich. Wie sich gezeigt hat⁹⁾, werden die beiden Enzyme auch durch eine Anzahl kristallisierter Tonerde-Hydrate verschiedener Zusammensetzung gleichmäßig adsorbiert; ihre gemeinsame Trennung von den tryptischen Enzymen, Carboxy-Polypeptidase und Proteinase, wird mit Tonerde durchgeführt¹⁰⁾. Zwischen dem Verhalten dieser vier proteolytischen Enzyme gegenüber basischen Adsorbentien einerseits und ihrer spezifischen Wirkungsweise gegenüber Substraten andererseits scheinen so Beziehungen zu bestehen. Aus den Versuchen dieser Abhandlung geht hervor, daß die Amino-Polypeptidase, wie es für tierische Dipeptidase beschrieben war¹¹⁾, mit der freien Aminogruppe der Substrate in Reaktion tritt, während die tryptischen Enzyme, wie man weiß¹²⁾, sich zur Anlagerung der freien Carboxylgruppe in den Substraten bedienen. Dies entspricht aber dem Adsorptions-Verhalten der beiden Enzymgruppen, von welchen die ereptischen vorwiegende Affinität zu basischen Adsorbentien bekunden. Es hat den Anschein, daß ähnliche, wenn nicht die gleichen, aktiven Gruppen der Proteasen für die Reaktion mit den Substraten und mit den Adsorbentien verantwortlich sind.

Die vergleichende Anwendung von Amino-Polypeptidase, Carboxy-Polypeptidase und Dipeptidase zum Abbau, für die wir im Versuchs-Teil ein Beispiel anführen, ist für die Struktur-Ermittlung proteolytischer Abbauprodukte von Bedeutung. Die Untersuchung der Carboxy-Polypeptidase-Wirkung auf Substrate unbekannter Struktur wird die Gegenwart besonderer Amino-säure-Bausteine¹³⁾ am Carboxyl-Ende der Peptidketten erkennen lassen. Die Einwirkung der Amino-Polypeptidase, welche weniger spezifisch ist, vermittelt dagegen Aufschlüsse anderer Art. Der Angriff dieses Enzyms auf Polypeptide erfolgt von der freien Aminogruppe

⁸⁾ siehe dazu R. Willstätter, B. 59, 1, u. zw. S. 9 [1926]; Naturwiss. 14, 937, u. zw. S. 940 [1926].

⁹⁾ Nach Versuchen mit G. F. Hüttig u. Fr. E. Zimmermann.

¹⁰⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. A. Schöffner, Ztschr. physiol. Chem. 151, 31 [1925/26].

¹¹⁾ H. v. Euler u. K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. 157, 122, u. zw. S. 124, 137 [1926]; K. Josephson u. H. v. Euler, ebenda 162, 85 [1926/27]; E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann u. A. Schöffner, B. 60, 359 [1927]; E. Waldschmidt-Leitz u. W. Klein, B. 61, 640 [1928].

¹²⁾ vergl. J. H. Northrop, Naturwiss. 11, 713 [1923] (Pankreas-Proteinase); E. Waldschmidt-Leitz u. W. Klein, a. a. O.; E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein u. A. Schöffner, B. 61, 2092 [1928] (Pankreat. Carboxy-Polypeptidase).

¹³⁾ vergl. E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein u. A. Schöffner, a. a. O.; E. Abderhalden u. E. Schwab, Ferment-Forschung 9, 501 [1928], sowie weitere Arbeiten daselbst.

her unter Abspaltung von Amino-säuren¹⁴⁾, er endet bei der Stufe der Dipeptide. Das Verhältnis der möglichen hydrolytischen Leistungen von Amino-Polypeptidase und Dipeptidase an einem Substrate gestattet also eine Aussage über die Kettenlänge des Peptids, über die Anzahl der vorhandenen Amino-säure-Reste. Zur Kennzeichnung von Abbauprodukten der Protamine, über die wir an anderer Stelle berichten werden, hat dieses Verfahren bereits wertvolle Dienste geleistet.

Beschreibung der Versuche.

1. Amino-Polypeptidase-Wirkung und Wasserstoff-Zahl.

Die p_H -Abhängigkeit der Polypeptidase-Wirkung gegenüber Leucyl-di-glycin haben E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls und J. Waldschmidt-Graser¹⁵⁾ an den rohen Enzym-Lösungen dahin beschrieben, daß zwei Scheitelpunkte der Aktivitäts- p_H -Kurve, ein ausgeprägtes Optimum bei $p_H = 7.2$, ein schwächeres bei $p_H = 8.0$ beobachtet wurden. Für den Wiederanstieg der Reaktionsgeschwindigkeit bei schwach alkalischer Reaktion wurde die Mitwirkung von Dipeptidase verantwortlich gemacht. Diese Deutung hat sich nicht aufrecht erhalten lassen. Die Erscheinung des Abfalls der Aktivität in dem Gebiete zwischen $p_H = 7.2$ und $p_H = 8.0$ wird auch bei dem dipeptidase-freien Enzym beobachtet; allein sie erweist sich als abhängig von der angewandten Substrat-Konzentration: im Bereiche höherer Substrat-Konzentrationen verschwindet die Depression der Aktivitäts- p_H -Kurve, die Umsätze zeigen zwischen $p_H = 7.0$ und $p_H = 8.0$ kein ausgesprochenes Optimum mehr (Tabelle 2, sowie Figur 1). Es hat den Anschein, daß das bei Anwendung verd. Substrat-Lösungen auftretende zweifache Optimum auf ein verschiedenes Verhältnis der Bildungs- und der Zerfalls-Geschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung bei wechselndem p_H zurückzuführen ist. Vergleichende Affinitäts-Messungen bei wechselnder Wasserstoff-Zahl, die wir noch nicht ausgeführt haben, sollten darüber Aufschluß geben. Es ist in diesem Zusammenhange bemerkenswert, daß für die Hydrolyse des Leucyl-di-glycin-esters, welche mit viel geringerer Geschwindigkeit als die des freien Peptids verläuft, ein ausgeprägtes Optimum bei $p_H = 8.0$ beobachtet wird (Tabelle 3, sowie Figur 2).

Zu der Frage nach der Existenz zweier verschiedener leucyl-di-glycinspaltender Enzyme im Darm, welche durch neuere Beobachtungen von K. Linderström-Lang¹⁶⁾ aufgeworfen wurde, erlauben die vorliegenden Ergebnisse noch keine sichere Stellungnahme. Der Vergleich der enzymatischen Affinität in verschiedenem Reinheitsgrade und bei verschiedener Wasserstoff-Zahl, den wir unternehmen, soll zur Entscheidung der Frage dienen, ob das Auftreten zweier Scheitelpunkte in der Aktivitäts- p_H -Kurve, auch Verschiebungen im Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten bei $p_H = 7.0$ und $p_H = 8.0$, die man an verschiedenem Ausgangsmaterial beobachtet (Tabelle 4), mit der Existenz zweier Enzyme oder aber, ob sie in dem oben angedeuteten Sinne zu erklären sind.

¹⁴⁾ vergl. die Beobachtungen von W. Grassmann u. H. Dyckerhoff, Ztschr. physiol. Chem. 175, 18 [1928], über die Wirkungsweise der Polypeptidase aus Hefe.

¹⁵⁾ B. 62, 956, u. zw. S. 958 [1929].

¹⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. 188, 48, u. zw. S. 59 ff. [1930].

Tabelle 2.

pH-Abhängigkeit der Leucyl-di-glycin-Spaltung und Substrat-Konzentration.

(Enzym-Lösung mit gealterter Suspension gefällten Eisenhydroxyds von Dipeptidase befreit; 0.0012 Mol. Phosphat-Puffer; Volumen 5.0 ccm; Angaben bedeuten den Aciditäts-Zuwachs in ccm 0.05-n.)

Angew. Pol.-(e.)	Peptid Mol.	Zeit Min.	pH =								
			6.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.5	7.8	8.0	8.2
0.0058	0.00025	30	0.16	—	0.27	0.48	0.62	0.43	0.73	0.86	0.65
0.0058	0.00025	50	0.20	—	.35	0.75	0.95	0.83	0.92	1.00	0.75
0.0046	0.00050	120	—	0.80	1.70	1.90	2.30	2.10	2.10	2.20	1.50
0.0029	0.00075	182	—	—	—	2.20	2.30	2.40	—	2.40	—

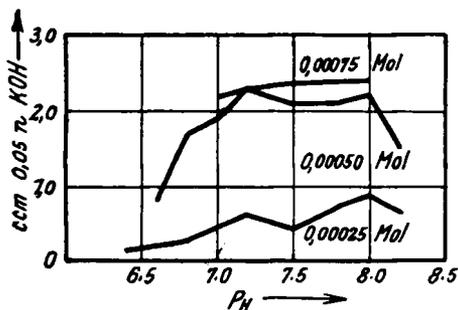


Fig. 1. Leucyl-di-glycin-Spaltung und Wasserstoff-Zahl.

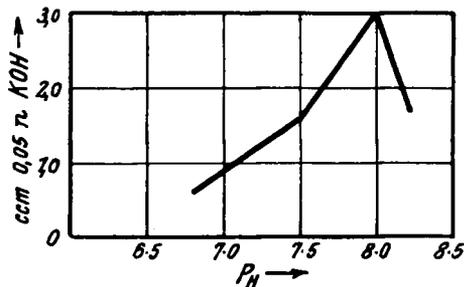


Fig. 2. Leucyl-di-glycin-ester-Spaltung und Wasserstoff-Zahl.

Tabelle 3.

pH-Abhängigkeit der Leucyl-di-glycin-ester-Spaltung und Substrat-Konzentration.

(Enzym-Lösung durch Adsorption mit gealtertem Eisenhydroxyd von Dipeptidase befreit; 0.5 Mol. Phosphat-Puffer pro 1 Mol. Substrat; Volumen 5.0 ccm; Angaben bedeuten den Aciditäts-Zuwachs in ccm 0.05-n.)

Angew. Pol.-(e.)	Ester Mol.	Zeit Min.	pH =						
			6.8	7.0	7.2	7.5	7.8	8.0	8.2
0.0037	0.00010	120	0.17	0.16	0.20	0.17	0.16	0.30	0.17
0.037	0.0010	60	0.60	—	—	1.60	—	3.00	1.70

Tabelle 4.

Aktivitäts-Vergleich von Polypeptidase-Präparaten bei pH = 7.0 und pH = 8.0.

(Wechselnde Enzym-Mengen u. Zeiten; 0.0005 Mol. *d, l*-Leucyl-diglycin; 0.00025 Mol. Phosphat-Puffer; Volumen 5.0 ccm.)

Enzym-Lösung	Aciditäts-Zuwachs (ccm 0.05-n.)		Aktivitäts-Verhältnis
	bei pH = 7.0 8.0		
	7.0	8.0	
Glycerin-Auszug aus Darm-Schleimhaut I	1.40	2.05	0.68
„ „ „ „ II	1.44	1.37	1.05
Auszug II, nach Adsorption mit gealtertem Eisengel ...	1.45	1.25	1.15
Glycerin-Auszug aus Darm-Schleimhaut III	0.85	1.60	0.53
Auszug III, 30 Min. bei 30° u. pH = 9.8 aufbewahrt	1.32	2.40	0.55
„ III, 3-mal mit Eisengel adsorbiert	1.19	2.08	0.57
„ III, nach Adsorption mit Kaolin (bei pH = 4.7) .	1.00	2.00	0.50

2. Zur Bestimmung der Amino-Polypeptidase.

Als Maß für die Polypeptidase-Menge war die Polypeptidase-Einheit (Pol.-(e.)) vorgeschlagen¹⁷⁾. Ihre Definition beruhte auf der noch nicht erwiesenen Annahme monomolekularen Reaktionsverlaufs; sie ist nunmehr abzuändern. Denn es hat sich gezeigt, daß der Reaktionsverlauf der Peptid-Hydrolyse, ähnlich wie es für Amino-Polypeptidase aus tierischen Organen gilt¹⁸⁾, sich als ein annähernd linearer beschreiben läßt (Tabelle 5).

Als Einheit der Amino-Polypeptidase aus Darm-Schleimhaut (Pol.-(e.)) bezeichnen wir daher, in Anlehnung an die für das Milz-Enzym gegebene Definition²⁾, das Tausendfache derjenigen Enzym-Menge, für welche sich unter den Bedingungen der Bestimmung (0.245 g *d, l*-Leucyl-di-glycin, 0.0005 Mol Phosphat-Puffer, Volumen 10,0 ccm, $pH = 8.0$, 30°) der Quotient aus Umsatz (in ccm 0.2-n. COOH) und Reaktionsdauer (in Minuten) zu 0.001 ergibt.

Tabelle 5.

Zeitlicher Verlauf der Leucyl-di-glycin-Spaltung.

0.122 g *d, l*-Leucyl-di-glycin; Enzym-Lösung, von Dipeptidase befreit; $pH = 8.0$; 30°; Volumen 5.0 ccm.)

Enzym-Menge ccm	Zeit Min.	Aciditäts-Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung %	Umsatz (ccm 0.2-n. COOH Zeit (Minuten))	
0.25	140	2.06	41	0.0037	
0.25	190	2.60	52	0.0034	0.0035
0.25	242	3.31	66	0.0034	
0.25	416	4.68	94	0.0028	
0.50	20	0.51	10	0.0064	
0.50	40	1.25	25	0.0078	
0.50	70	1.96	39	0.0070	0.0069
0.50	95	2.60	52	0.0068	
0.50	121	3.15	63	0.0065	
0.50	208	4.75	95	0.0057	
1.00	35	2.06	41	0.015	
1.00	48	2.63	53	0.014	0.0140
1.00	61	3.31	66	0.014	
1.00	104	4.75	95	0.011	
2.00	18	2.06	41	0.029	
2.00	24	2.71	54	0.028	0.0280
2.00	30	3.30	66	0.028	
2.00	39	4.00	80	0.026	
2.00	60	4.80	96	0.020	

3. Adsorptions-Verhalten von Polypeptidase und Dipeptidase.

Das Adsorptions-Verhalten der beiden ereptischen Enzyme in den Rohlösungen gegenüber verschiedenen Oxyden und Oxydhydraten ist bereits in der Einleitung behandelt worden; wir geben dafür nachstehend die experimentellen Belege (Tabelle 6).

¹⁷⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls u. J. Waldschmidt-Graser, a. a. O. u. zw. S. 958.

¹⁸⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner, J. J. Bek u. E. Blum, Ztschr. physiol. Chem. 188, 17, u. zw. S. 29 [1929/30].

Für die Trennung der beiden Enzyme, die Abscheidung der Dipeptidase und die Gewinnung einheitlicher Polypeptidase, welche in einer ersten Arbeit¹⁹⁾ mit gealtertem Eisenhydroxyd ausgeführt war, ergeben sich nun neue Wege mit der Anwendung von Hämatit oder gelbem Eisenhydroxyd. Es ist aber zweckmäßig, zur Abtrennung der Dipeptidase aus den Enzym-Gemischen sich nicht auf die Anwendung dieser Adsorbentien, wenngleich sie die spezifischsten sind, zu beschränken; dies würde unbequem große Mengen Adsorbens erfordern. Wir ziehen es vor, die Darstellung einheitlicher Polypeptidase mit der Einwirkung gefällten und gealterten roten Eisenhydroxyds einzuleiten, um sie dann durch Anwendung von Hämatit oder gelbem Eisenhydroxyd zu vervollkommen.

Tabelle 6.
Adsorption durch Oxyde und Oxyhydrate.

(Glycerin-Auszug aus Darm-Schleimhaut, durch Fällung mit dem gleichen Volumen 0.06-n. Essigsäure gereinigt, zur Adsorption angewandt 20 ccm von der Mutterlauge der Essigsäure-Fällung; 0.6 ccm n-Natriumacetat, p_H = 4.0, bzw. mit n-NaOH neutralisiert, p_H = 7.0; 5.0 ccm wäßrige Adsorbens-Suspension; Angaben über die Wirksamkeit beziehen sich auf aliquote Teile der Lösungen, entsprechend 20 ccm Ausgangslösung.)

Angew. Adsorbens	mg	p d. Ausgangslösung			Ads.-Restlösung		Adsorb. (%)	
		Ads.	Er.-E.	Pol.-(e.)	Er.-E.	Pol.-(e.)	Dip.	Polyp.
Rotes Eisenhydroxyd, frisch gefällt	100	4.0	0.028	0.28	0.0025	0.12	91	57
Rotes Eisenhydroxyd, 2 Jahre alt	100	4.0	0.028	0.28	0.0062	0.28	78	0
Gelbes Eisenhydroxyd	200	4.0	0.028	0.28	0.017	0.29	40	0
„ „	200	7.0	0.030	0.42	0.021	0.40	30	4
Natürlicher Goethit ..	200	4.0	0.028	0.28	0.028	0.28	0	0
Hämatit	200	4.0	0.028	0.28	0.016	0.29	43	0
„ „	200	7.0	0.030	0.42	0.023	0.39	23	7
Tonerde Cy	40	4.0	0.028	0.28	0.0039	0.034	86	88
„ „	40	7.0	0.028	0.28	0.0087	0.22	69	21

4. Zur Spezifität der Amino-Polypeptidase.

Die Spezifitäts-Prüfung proteolytisch einheitlicher Amino-Polypeptidase an Peptiden und Peptid-Derivaten, deren Ergebnis wir nachstehend tabellarisch wiedergeben (Tabelle 7), läßt erkennen, daß eine Hydrolyse durch das Enzym nur bei Gegenwart einer freien Aminogruppe in den Substraten erfolgt, während man eine freie Carboxylgruppe dafür entbehrlich findet: acylierte Peptide werden nicht hydrolysiert (Nr. 7—9 der Tabelle), wohl aber Polypeptid-ester (Nr. 10 und 11 der Tabelle). In dieser Hinsicht besteht also zwischen der Spezifität der Polypeptidase aus Darm-Schleimhaut und der aus Hefe²⁰⁾ weitgehende Übereinstimmung. Dies gilt indessen nicht für die Spaltbarkeit am Carboxyl substituierter oder decarboxylierter Dipeptide, welche wohl durch das Hefe-Enzym²¹⁾, nicht dagegen durch die Polypeptidase tierischer Herkunft angegriffen werden (Nr. 12—14 der Tabelle). Mit der Ausschaltung einer freien Carboxylgruppe in Nachbarschaft zu der

¹⁹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls u. J. Waldschmidt-Graser, a. a. O., u. zw. S. 960. ²⁰⁾ W. Grassmann u. H. Dyckerhoff, B. 61, 656 [1928].

²¹⁾ W. Grassmann u. H. Dyckerhoff, a. a. O., u. zw. S. 659.

zu spaltenden Peptid-Bindung ist also hier im Gegensatz zu den Befunden an Hefe-Polypeptidase keine Änderung der Spezifität verbunden. Es bleibt zu prüfen, ob wirklich, wie man daraus schließen könnte, der Wirkungs-Mechanismus der beiden Polypeptidasen ein verschiedener ist, oder aber, ob für die beobachtete Hydrolyse decarboxylierter oder am Carboxyl substituierter Dipeptide durch Polypeptidase-Präparate aus Hefe die Gegenwart eines besonderen Enzyms in diesen verantwortlich war.

Tabelle 7.

Spezifität gegenüber Peptiden und Peptid-Derivaten.

(Enzym-Lösung durch wiederholte Adsorption mit gealtertem rotem Eisenhydroxyd (bei $p_H = 4.0$) von Dipeptidase, sowie von Carboxy-Polypeptidase und Proteinase befreit; $p_H = 8.0$, mit wenig $n-NH_3$ eingestellt; 30° ; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 5.0 ccm.)

Vers. Nr.	Substrat	Ang. mg	Angew. Pol.-(e.)	Zeit Stdn.	Zuw. COOH	Zuw. NH_2 (ccm 0.05-n.)	Spalt. (%) bez. auf $1CO.NH$
1	Triglycin	95	0.004	2	4.00	—	40
2	Tetraglycin	24	0.004	24	2.91	—	149
3	"	24	0.006	72	3.19	—	162
4	Pentaglycin	25	0.004	22	—	1.14	69
5	Hexaglycin	18	0.002	17	—	0.26	25
6	<i>d,l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin	35	0.002	17	0.58	—	29
7	Benzoyl- <i>d,l</i> -leucyl-glycin	30	0.002	17	0.00	—	0
8	Carbäthoxyl- <i>d,l</i> -leucyl-di-glycin	31	0.002	17	0.00	—	0
9	Chloracetyl- <i>l</i> -tyrosin	26	0.002	17	0.00	—	0
10	<i>d,l</i> -Leucyl-diglycin-äthylester-Chlorhydrat	25	0.012	9.5	—	0.56	35
11	"	25	0.012	9.5	0.70	—	43
12	Glycyl-glycin-methylester-Chlorhydrat	20	0.002	21	0.00	—	0
13	Glycyl- <i>d,l</i> -alanin-äthylester-Chlorhydrat	21	0.002	17	0.00	—	0
14	<i>d,l</i> -Leucyl-decarboxy-glycin ...	27	0.002	17	0.00	—	0

5. Beispiele des fraktionierten enzymatischen Abbaus von Polypeptiden.

Die Hydrolyse von Polypeptiden durch tierische Amino-Polypeptidase betrifft, wie die durch pflanzliches Enzym²²⁾, die Abspaltung des jeweils die freie Aminogruppe tragenden Amino-säure-Restes; sie führt bis zur Bildung von Dipeptiden. Dies wird belegt durch den Stillstand der Hydrolyse bei der theoretisch möglichen Spaltung am Beispiel des *d,l*-Leucyl-glycyl-glycins (s. Versuch auf S. 1211), sowie des *d,l*-Leucyl-glycyl-*l*-tyrosins (Tabelle 8, Nr. 1), sodann durch Isolierung und Identifizierung der Hauptmenge *l*-Leucins unter den Spaltprodukten. Bemerkenswerterweise erfaßt in diesem letzteren Beispiel der Angriff der Amino-Polypeptidase in dem teilweise racemisiertes Tyrosin enthaltenden Peptide auch den *d*-Komponente des Tyrosins tragenden Anteil, also das *l*-Leucyl-glycyl-*d*-tyrosin. Für die sterische Spezifität des Enzyms ist also hier nur die Konfiguration an der Haftstelle selbst, dem Amino-Ende des Peptids, nicht die des Amino-säure-Restes am Carboxyl-Ende entscheidend.

²²⁾ siehe dazu W. Grassmann u. H. Dyckerhoff, Ztschr. physiol. Chem. 175, 18 [1928].

Das Gleiche gilt, aber in umgekehrter Auswirkung, für die Hydrolyse durch Carboxy-Polypeptidase; diese betrifft nämlich auch die das *d*-Leucin enthaltende Komponente des *d,l*-Leucyl-glycyl-*l*-tyrosins (Tabelle 8, Nr. 2), der Angriff der Carboxy-Polypeptidase auf Polypeptide wird also vor allem durch die Konfiguration der das Carboxyl tragenden Amino-säure bestimmt²³⁾.

Die Hydrolyse des Tripeptids Leucyl-glycyl-tyrosin, sei es durch Amino-Polypeptidase, sei es durch Carboxy-Polypeptidase eingeleitet und bis zum Stillstande ihrer Einwirkung vorgenommen, wird durch eine darauffolgende Einwirkung von Dipeptidase, wie zu erwarten, unter Spaltung der gebildeten Dipeptide zu Ende geführt. Die Wirkung dieses Enzyms erfaßt hierbei, wie es ja bekannt ist, nur die aus den natürlich vorkommenden Aminosäure-Antipoden aufgebauten Anteile der Dipeptide (Tabelle 8, Nr. 1 und 2). So kann die fraktionierte Hydrolyse mit diesen Enzymen auch dazu dienen, in einfachen Fällen über die sterische Konfiguration der am Aufbau beteiligten Aminosäure-Reste, über den Grad ihrer Racemisierung Aufschlüsse zu vermitteln.

Versuch: Hydrolyse von *d,l*-Leucyl-glycyl-glycin durch Amino-Polypeptidase: 2.00 g Peptid, in 50 ccm Wasser gelöst, überließ man der Einwirkung proteolytisch einheitlicher Amino-Polypeptidase (0.010 Pol.-e.) während 24 Stdn. bei pH = 8.0 und 30°, nämlich bis zum Stillstand der Enzym-Wirkung; diese entsprach dann einem Zuwachs titrierbaren Carboxyls entspr. 3.30 ccm 0.05-n. KOH für 2.0 ccm des Ansatzes, d. i. einer Hydrolyse von 51% einer Peptid-Bindung. Aus der angesäuerten und durch Kochen mit Tierkohle entfärbten Lösung der Reaktionsprodukte (angewandt 42.5 ccm, entspr. 1.70 g Leucyl-glycyl-glycin) isolierte man auf dem Wege über das Kupfersalz 0.80 g β -Naphthalinsulfonyl-*l*-leucin, entspr. 0.31 g *l*-Leucin, d. i. 68% der aus der Aciditäts-Zunahme errechneten Menge.

Tabelle 8.

Fraktionierter Abbau von *d,l*-Leucyl-glycyl-tyrosin²⁴⁾.

(pH = 8.0 für die Wirkung von Amino-Polypeptidase und Dipeptidase, pH = 7.7 für die Wirkung von Carboxy-Polypeptidase; pH eingestellt mittels Phosphat-Puffers (0.00075 Mol. im gesamten Versuchs-Ansatz von 50 ccm); 30°; Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 5.0 ccm.)

Vers. Nr.	Peptid mg	Reihenfolge der Enzyme	Enzym-Einheiten	Zeit Stdn.	Aciditäts-Zuwachs	Spalt.(%), bezog auf 1 CO.NH
1	28.3	Amino-Polypeptidase	0.008	6	0.73	45
	28.3	„	0.0125	8.5	0.76	47
	28.3	Dipeptidase	0.0005	20	0.64	40
	28.3	„	0.0005	27	0.64	40
2	22.6	Carboxy-Polypeptidase	0.014	5.5	1.00	78
	22.6	„	0.014	7.5	1.00	78
	22.6	„	0.027	10	1.00	78
	22.6	Dipeptidase	0.0008	7	0.54	42
	22.6	„	0.0008	20	0.54	42

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

²³⁾ vergl. E. Waldschmidt-Leitz u. H. Schlatter, Naturwiss. 16, 1026 [1928]; E. Abderhalden, ebenda 17, 293, u. zw. S. 294 [1929].

²⁴⁾ Die Tyrosin-Komponente des Tripeptids bestand nach der optischen Analyse seiner Hydrolysenprodukte und nach den übereinstimmenden Ergebnissen des enzymatischen Abbaus zu 80% aus *l*-, zu 20% aus *d*-Tyrosin, war also teilweise racemisiert.