



# Die proteolytischen Enzyme von *Maja squinado* Latr.

<https://hdl.handle.net/1874/308898>



DIE  
PROTEOLYTISCHEN ENZYME  
VON MAJA SQUINADO LATR.

Diss.  
Utrecht

1932















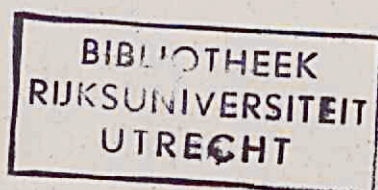
DIE  
PROTEOLYTISCHEN ENZYME  
VON MAJA SQUINADO LATR.

P R O E F S C H R I F T

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN  
DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GE-  
ZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. L.  
S. ORNSTEIN, HOOGLEERAAR IN DE FACUL-  
TEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS  
BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSI-  
TEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE  
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE  
TE VERDEDIGEN OP MAANDAG 4 JULI 1932,  
DES NAMIDDAGS 4 UUR

DOOR

JEANNETTE JACOBA MANSOUR-BEK  
GEBOREN TE HILVERSUM



---

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER  
IN BERLIN · 1932







## VOORWOORD.

Nu tenslotte mijn wensch om mijn studietijd te besluiten met het schrijven van een proefschrift toch nog in vervulling is gegaan, wil ik gaarne van deze gelegenheid gebruik maken, om aan allen, die tot mijne academische opleiding bijdroegen, mijnen hartelijken dank te betuigen.

Hooggeleerde van Romburgh, Kruyt, Ornstein, Moll, Zeergeleerde Strengers. Uit Uwe colleges en practica mocht ik de grondslagen der chemie en physica leeren, welke zoo noodzakelijk zijn voor den bioloog. Hiervoor zeg ik U hartelijk dank.

Hooggeleerde Pulle. U dank ik zeer voor Uw onderricht in de systematiek der planten.

Hooggeleerde Went. Met dankbaarheid zie ik terug op den tijd, dat ik in Uw laboratorium werkzaam was en Uwe leerrijke colleges volgde.

Hooggeleerde Nierstrasz. Uit Uwe heldere colleges en gedurende het practisch werk onder Uwe leiding mocht ik veel van U leeren, ook hoe onontbeerlijk eene kritische beschouwingwijze voor wetenschappelijk onderzoek is. Hiervoor ben ik U veel dank verschuldigd.

Zeergeleerde de Lange. De tijd, dat ik in Uw laboratorium werkzaam was en de voortdurende belangstelling, die ik daarbij van U mocht ondervinden, zullen steeds bij mij in aangename herinnering blijven.

Sehr geehrter Herr Professor Waldschmidt-Leitz. Ich brauche Ihnen wohl kaum zu versichern, wie vielen Dank ich Ihnen schulde für die Gelegenheit, welche Sie mir gegeben haben, in Ihrem Institut die neueren Methoden der Enzymforschung kennenzulernen. Ohne diese Gelegenheit wäre es mir unmöglich gewesen, dieses Thema zu bearbeiten. Auch Ihnen, Herr Dr. Schöffner, bin ich sehr dankbar für die viele Hilfe, die Sie mir zuteil werden ließen, ebenso wie allen, welche während meines Aufenthaltes in Prag mir so freundlich entgegengekommen sind.

Hooggeleerde Jordan, Hooggeachte Promotor. Van het oogenblik af, dat ik Uwe boeiende colleges begon te volgen, voelde ik mij tot de vergelijkende physiologie aangetrokken. De wijze, waarop gij op de nog onvoltooide problemen weet te wijzen, heeft steeds mijn bewondering gewekt. Dat ik op Uw aanraden onder leiding van



Professor Waldschmidt-Leitz te Praag heb gewerkt, is voor mijn onderzoek van onschatbare waarde geweest. Ook voor Uwe aanmoediging gedurende het practische werk voor dit proefschrift en voor Uwe welwillendheid bij de publicatie ervan, ben ik U zeer dankbaar. Aan den tijd, dat ik assistente op Uw laboratorium was, heb ik de prettigste herinneringen. Voor de vriendelijke gastvrijheid mij door Mevrouw Jordan en U betoond, zeg ik U eveneens hartelijk dank.

Zeergeleerde Vonk. Uwe groote bereidwilligheid om mij bij elke moeilijkheid in mijn werk te helpen, was mij een groote steun, die er veel toe heeft bijgedragen, dat dit proefschrift beeindigd kon worden. Hiervoor zeg ik U ook op deze plaats hartelijk dank.

De groote hulpvaardigheid van wijlen van Norden zal bij mij steeds in goede herinnering blijven. Ook U, waarde van Mastbergen, dank ik voor Uw hulp.

Ten slotte ook een woord van hartelijken dank aan hen, die door hun daadwerkelijke belangstelling mij hebben geholpen dit proefschrift te voltooien.



<b>Inhaltsübersicht.</b>		Seite
Kap. I.	Einleitung . . . . .	153
Kap. II.	Der Rohextrakt . . . . .	168
	1. Das Material . . . . .	168
	2. Bestimmungsmethoden . . . . .	170
	3. Spezifität und $p_H$ -Optima . . . . .	176
	4. Versuche zur Aktivierung . . . . .	184
Kap. III.	Adsorptionsversuche. . . . .	187
	1. Einleitung. Adsorbentia und Eluentia. . . . .	187
	2. Technik der Adsorption . . . . .	189
	3. Adsorptionsverhalten. . . . .	190
Kap. IV.	Die Proteinase . . . . .	198
	1. Gewinnung und Beständigkeit . . . . .	198
	2. Spezifität. . . . .	199
	3. $p_H$ -Kurven . . . . .	199
	4. Versuche zur Aktivierung . . . . .	201
	Schlußbetrachtung . . . . .	202
	Zusammenfassung . . . . .	204
	Literatur . . . . .	206

## Kapitel I.

### Einleitung.

Die Enzyme der Wirbellosen wurden von ihrer ersten Entdeckung an verglichen mit den besser bekannten Wirbeltierenzymen. Im allgemeinen wurden bei den verschiedenen Gruppen von Invertebraten Enzyme beschrieben, wovon das eiweißspaltende dem Trypsin der Säugetiere ähnlich sein sollte; ferner fand man verschiedene der kohlehydrat- und fettspaltenden Enzyme wieder. Eine Aufzählung der verschiedenen älteren Befunde hier wiederzugeben, ist überflüssig, zumal die Literatur sehr ausführlich zusammengestellt ist von JORDAN (35), von BIEDERMANN in WINTERSTEINS Handbuch der vergleichenden Physiologie (9) und neuerdings wieder von JORDAN in BETHES Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie (38).



Die meisten älteren Untersuchungen über die eiweißspaltenden Fermente bei Tieren aus den verschiedenen Klassen hatten gezeigt, daß ein Enzym vorhanden ist, welches imstande ist, verschiedene native Eiweißkörper (Gelatine, Casein, Fibrin) zu spalten, und zwar (nach der Mehrzahl der Autoren) vorwiegend bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion, wobei weiter eine „freie Säure“ schädigend wirkt und bei welcher Spaltung Peptone und oft Tryptophan und Tyrosin als Produkte auftreten. Die Frage nach der Ähnlichkeit mit einer der verdauenden Proteasen der Vertebraten lag nahe; es wurden meistens die Enzyme als „typsinähnliche Proteasen“ oder „Urtrypsin“ beschrieben (siehe dazu JORDAN [35]). Daneben war zuerst nur bei Cephalopoden von COHNHEIM (15) ein Erepsin gefunden worden, welches mit dem im vorangehenden Jahre von ihm in der Darmschleimhaut von Säugern entdeckten Erepsin (14) verglichen wurde.

Die eiweißverdauende Wirkung des Magensaftes der Crustaceen wurde im Jahre 1877 von HOPPE-SEYLER (32) bei *Astacus* nachgewiesen; er verglich das darin vorhandene Ferment seiner Wirkung nach mit dem eiweißspaltenden Ferment aus dem Pankreas der Vertebraten und zeigte, daß es von der sogenannten Leber sezerniert wurde. Gegenüber seiner Meinung wurde im folgenden Jahre von KRUKENBERG (47) das Vorhandensein sowohl von Trypsin als von Pepsin im Magensaft angegeben.

JORDAN (34) widerlegte KRUKENBERGS Angaben und zeigte, daß HOPPE-SEYLERs Auffassung des Enzyms als dem Trypsin ähnlich, richtig war: bei der Einwirkung des Magensaftes auf Eiweißkörper konnten im Verdauungsgemisch neben Albumosen und Peptonen Tyrosin und Leucin nachgewiesen werden.

Für andere Decapoda (*Cancer pagurus*, *Maja squinado*) fand SELLIER (68) eine ähnliche Wirkung des Magensaftes, auch ROAF (63) fand bei *Cancer* eine Protease, welche Fibrin bei neutraler und alkalischer Reaktion spaltet.

Nachdem durch die Untersuchungen von SÖRENSEN (75, 76, 77) die große Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Wirksamkeit eines Enzyms klargelegt worden war, wurde versucht, die Enzyme der Wirbellosen zu charakterisieren und, falls möglich, mit denen der Pflanzen oder Tiere zu identifizieren durch die Bestimmung der  $p_H$ -Optima. Die proteolytischen Enzyme wurden unterschieden in eigentliche Proteasen, welche native Eiweißkörper angreifen, und Peptidasen, welche Peptide spalten; zu den letzteren wurde das Erepsin gerechnet. Die eigentlichen Proteasen umfaßten drei Typen:

1. Pepsin, welches in stark saurem Gebiet wirkt, Opt.  $p_H$  = ungefähr 2.
2. Trypsin, welches in alkalischem Gebiet wirkt, Opt.  $p_H$  = 8,2 bis 8,7.



3. Papain, dessen  $p_H$ -Opt. bei dem isoelektrischen Punkt der Substrate liegt<sup>1</sup>.

In einer Untersuchung über das Papain, das proteolytische Enzym aus dem Milchsafte von *Carica papaya*, verglichen RINGER u. GRUTTERINK (62) das proteolytische *Astacus*-Enzym mit dem Papain, mit welchem es die  $p_H$ -Optima der Enzymwirkung auf verschiedene Substrate gemein hatte.

KRÜGER (42) und KRÜGER u. GRAETZ (45) arbeiteten mit *Astacus*-Magensaft; sie glaubten anfänglich gezeigt zu haben, daß eine Pepsinfraktion neben einer Trypsinfraktion mit einem Opt. bei  $p_H = 7-8$  anwesend sei; in einer späteren Publikation (46), worauf ich weiter unten zurückkomme, wird aber die Annahme einer Pepsinase bezweifelt. Auch wurde die Anwesenheit eines Erepsins mit einem  $p_H$ -Opt. bei 7,3—8,9 nachgewiesen.

HIRSCH (30, siehe auch JORDAN u. HIRSCH [38]) fand bei der Untersuchung des Sekretionsrhythmus bei *Astacus*, daß, wenn man den Magensaft zu verschiedenen Zeiten nach der Nahrungsaufnahme auf Enzymkraft prüft, der Höhepunkt der Kurve für die Kaseinspaltung nicht mit dem für die Peptonspaltung zusammenfällt, vielmehr ist das Maximum der ersten Kurve gleichzeitig mit dem Minimum der zweiten; hieraus wurde auf das wahrscheinliche Vorkommen von zwei Proteasen, einer „Kaseinase“ und einer „Peptonase“ geschlossen.

SHINODA (69) wiederholte mittels der Alkoholtitrierung und mit verschiedenen Substraten die Versuche von HIRSCH über den Sekretionsrhythmus der beiden angegebenen Enzyme, konnte aber auf diese Weise nicht die Existenz zweier Enzyme nachweisen; die Kurven für sämtliche geprüften Substrate waren gleich den Kurven von HIRSCH für Pepton. Auch KRÜGER u. GRAETZ (46) bezweifeln die Angaben von HIRSCH über das Vorkommen zweier Proteasen, sie nehmen die Anwesenheit von nur einer Protease, dem *Astacus*-Trypsin, neben einer Erepsinkomponente an. Die von ihnen früher angegebene Pepsinase konnte nicht nachgewiesen werden, das früher beobachtete kleine Optimum der Fibrin- (und auch Kasein-)spaltung in saurem Gebiet dürfte verursacht sein „durch Adsorption von titrierbaren Gruppen an der Oberfläche der Fibrinkörnchen bei den verschiedenen  $p_H$ “ (l. c. S. 488). Bei Benutzung einer Lösung eines Eiweißkörpers, Pflanzenkasein, war das Optimum im sauren Gebiet verschwunden, doch lag die Annahme einer „Pepsinase“, dem Säugetierpepsin ähnlich, noch nahe, weil der *Astacus*-Magensaft nach ihm weit in das saure Gebiet hinein noch Spaltungen hervorruft. Weil aber die Spaltung von Clupein, welches von Pepsin sicher nicht angegriffen wird, durch *Astacus*-Magensaft ebensogut wie die Spaltung von Pepton, Kasein u. a. bis zu einem  $p_H = 2$  stattfindet, schlossen die Verfasser, daß eine Pep-

<sup>1</sup> Siehe hierzu Fußnote S. 166.



sinase fehlt, und daß also nur eine einzige Protease<sup>1</sup> vorhanden ist, deren Wirksamkeit sich weit in das saure Gebiet erstreckt. (Für die Fibrin-spaltung wurde der Wirkungsbereich von  $p_H < 2$  bis  $p_H > 12$  angegeben.)

Aus den gefundenen  $p_H$ -Optima (welche für Fibrin und Pepton bei 7—8 bzw. 7,5 bestimmt wurden), die zwar teilweise durch Erepsinwirkung abgeändert sind, und aus dem Verhältnis der gefundenen Spaltwerte für die verschiedenen Substrate schlossen KRÜGER u. GRAETZ auf eine Ähnlichkeit mit dem Hefetrypsin, während sie auch zu den intracellulären Enzymen der Vertebraten Beziehungen wahrscheinlich machen; so für die *Astacus*-Proteinase mit der Proteinase aus der Milz (94). Diese Ansicht war von ihnen auch schon in früheren Publikationen geäußert worden (45) und sollte nicht nur für die proteolytischen, sondern auch für die lipatischen (44) und für die kohlehydratspaltenden Enzyme zutreffend sein.

VONK (83) hatte 1927 auch schon die Auffassung geäußert, daß die Proteinase von *Astacus* und *Homarus* zu den pflanzlichen Proteinasen, die ihr Optimum bei dem isoelektrischen Punkt der Substrate haben, Beziehungen aufweist, wobei er auch auf die Arbeit von RINGER u. GRUTTER-RINK (62), worin die *Astacus*-Proteinase mit dem Papain verglichen wurde, hinwies und nicht, wie KRÜGER meint, auf RINGERS Arbeit über das  $p_H$ -Optimum für Trypsin.

SHINODA (69) versuchte ebenfalls der Art der Proteasen von *Astacus* näher zu kommen mit Hilfe der  $p_H$ -Optimabestimmungen und der Bestimmung der spezifischen Substrate, die nur von bestimmten Enzymen der Vertebraten gespalten werden. Er fand u. a. eine Spaltung von Bindegewebe (welches als ausschließlich von Pepsin spaltbar galt) durch *Astacus*-Magensaft. Auch Dipeptide wurden gespalten. Nach ihm umfaßt die Wirkung des Magensaftes alle diejenigen Wirkungen, welche die verschiedenen Säfte der Wirbeltiere zusammen ausüben, die proteolytische Wirkung erstreckt sich also auf die ganze Breite der Eiweißlösung.

Später wurde von VONK (85) darauf hingewiesen, daß THOMAS u. SEYMOUR-JONES (78) 1923 gezeigt hatten, daß Bindegewebe nicht nur von Pepsin, sondern auch von Trypsin angegriffen wird, nur liegt das  $p_H$ -Optimum für die Spaltung durch Trypsin außerordentlich niedrig (bei  $p_H = 5,9$ ). Also war der Widerspruch, daß hier ein Enzym vorhanden ist, welches Bindegewebe spaltet, aber sonst keinerlei Pepsineigenschaften zeigt, damit fortgefallen.

Die Bestimmung der  $p_H$ -Optima für die Spaltung von nativen Eiweißkörpern durch den *Astacus*-Magensaft ergab nach SHINODA das  $p_H$ -Optimum für Gelatine bei  $p_H = 6,5$  nach Messung der freiwerdenden

<sup>1</sup> KRÜGER spricht hier von Protease. Im Anschluß an die neueren Befunde von WALDSCHMIDT-LEITZ (100, 105) (s. dazu S. 165 u. 166) mag hier darauf hingewiesen werden, daß es richtiger wäre, hier von Proteinasewirkung zu sprechen, was im folgenden dann auch getan worden ist.



Aminosäuren; bei  $p_H = 5$  und  $p_H = 8$ , wenn man die freiwerdenden Polypeptide titriert, und bei 5,5 und 7,7, wenn man die Verflüssigung einer Gelatinesäule als Maß der Enzymwirkung nimmt. Für Kasein lag das Wirkungsoptimum bei  $p_H = 5,6$  und für Fibrin bei 5,5 und 8. Überdies wurde das  $p_H$ -Optimum für die Spaltung von Pepton bestimmt; für Pepton Witte lag es bei 6,7 und für Pepton F bei 6,2.

Nach SHINODA ist die Bestimmung der  $p_H$ -Optima ungenügend zur Feststellung der Anwesenheit von einzelnen Enzymen, wie sie nach WALDSCHMIDT-LEITZ bei den Säugetieren vorkommen, und von welchen jedes eine spezifische Aufgabe hat zur Lösung bestimmter Bindungen im Eiweißmolekül. Es geht aus den  $p_H$ -Optima nur hervor, daß „die Wirkung des *Astacus*-Magensaftes auf einige spezifische Substrate unter ganz anderen Bedingungen vor sich geht als die entsprechende Wirkung durch die jeweiligen Enzyme des Säugetieres“ (l. c. S. 342). Die  $p_H$ -Optima des *Astacus*-Magensaftes stimmen größtenteils mit dem natürlichen  $p_H$  des Saftes, der bei 5–5,6 gefunden wurde, überein.

Überdies fand SHINODA ein Optimum der Autolyse bei  $p_H = 3,5$  und ein zweites bei  $p_H = 9$ . Bei dem natürlichen  $p_H$  des Saftes ist die Autolyse fast null, so daß keine Verdauung des eigenen Eiweißes stattfindet. Dagegen findet KRÜGER (46) fast keine Autolyse; auch in einer späteren Mitteilung (43) verneint KRÜGER die Anwesenheit einer bedeutenden Autolyse und bestreitet SHINODAs Angaben darüber; nach ihm ist eine sehr geringe Autolyse nur im sauren Gebiet wahrnehmbar.

SHINODA gibt an, daß die Dipeptidspaltung, die letzte Phase des proteolytischen Abbaues, nur sehr gering ist; dieses läßt vermuten, daß die Endverdauung in den Zellen der Mitteldarmdrüse stattfindet. Auch kann es die Bedeutung haben, einer Überschwemmung des Organismus mit Aminosäuren vorzubeugen (VONK, 84). Als Optimum für die Dipeptidspaltung fand SHINODA  $p_H = 9$ .

Aus den Versuchen von SHINODA und aus dem Fehlen irgendeiner Aktivierung schloß VONK (84), daß die *Astacus*-Proteinase mehr Übereinstimmung zeigt mit pflanzlichen Proteasen, wie sie in der Hefe gefunden worden waren, als mit den proteolytischen Enzymen der Vertebraten.

KRÜGER (43) vergleicht in seiner letzten Publikation die *Astacus*-Enzyme mit denen des Hefepreßsaftes; diese Vergleichung sollte auch für die übrigen Wirbellosen gelten. Bei allen von ihm untersuchten Arten fand er Proteinasewirkung (gemessen an Peptonspaltung) und Dipeptidasewirkung; auch konnte er für *Astacus* Polypeptidasewirkung<sup>1</sup> nachweisen, die derjenigen der Hefe ähnlich war.

<sup>1</sup> Ich spreche hier von Proteinasewirkung usw., weil man ohne Trennung der Enzyme nicht berechtigt ist von einer Proteinase, Polypeptidase usw. zu reden; es könnte ein Enzym vorhanden sein, das allein alles leistet wozu die Teilenzyme der Vertebraten imstande sind. Nur die Wirkung wurde wahrgenommen.



Für die Proteinasewirkung von *Astacus* wurde das Optimum der Caseinspaltung bei  $p_H = 7$  gefunden.

Im *Astacus*-Magensaft (und auch wohl bei den anderen Wirbellosen) sind also nach KRÜGER drei Fermente zu unterscheiden: eine Proteinase, eine Polypeptidase und eine Dipeptidase, wie sie auch in Hefepreßsaft vorkommen (siehe aber Fußnoten 1 auf S. 156 u. 157).

Auch bei anderen Wirbellosen hat man in den letzten Jahren versucht, durch  $p_H$ -Optimabestimmungen dem Charakter ihrer proteolytischen Fermente näher zu kommen.

Für die *Coelenterata* schlossen BODANSKY u. ROSE (11) und BODANSKY (10) aus den von ihnen gefundenen  $p_H$ -Optima 3,0 und 7,3 (für die Verflüssigung von Gelatine durch den Extrakt der Mesenterialfilamente von *Physalia*, *Stomolophus* und *Metridium*) auf die Anwesenheit von Pepsin und Trypsin; auch eine „Lab“-wirkung wurde nachgewiesen.

YONGE (143) schloß aus seinen  $p_H$ -Optimabestimmungen für Leibesflüssigkeit von *Fungia* und für Extrakte der Mesenterialfilamente von *Lobophyllia* auf die Anwesenheit einer extracellulären Protease in den beiden Arten, welche Proteine bis zu Polypeptiden abbaut, und deren Optimum bei  $p_H = 7,1$  liegt, neben (bei *Lobophyllia*) einer intracellulären Protease, welche Proteine bis zu Aminosäuren spaltet, und deren Optimum bei 9,2 liegt. Diese letzte konnte durch Adsorption in eine trypsinähnliche Proteinase und eine Peptidase getrennt werden (siehe auch S. 167 u. 168). Ein Optimum der Wirkung von Extrakten, bei  $p_H = 5,3$  gelegen, wurde auf eine wahrscheinlich anwesende Protease der Zooxanthellen zurückgeführt.

Bei den *Echinodermen* wurde von OOMEN (59) gefunden, daß bei den Holothuriern eine Protease anwesend ist, deren Wirkung bei steigender Alkalinität zunimmt; ein deutliches Optimum wurde nicht gefunden.

KRÜGER (43) fand für *Holothuria* schätzungsweise ein  $p_H$ -Optimum für Pepton bei  $p_H = 7,5$ ; er fand höhere Spaltungswerte als von OOMEN angegeben.

Für die *Polychaeta* ist eine Arbeit von NICOL (57) zu erwähnen, der bei *Sabella* eine Protease fand, welche Gelatine bei einem Optimum  $p_H = 8$  spaltet; auch andere native Eiweißkörper und Pepton werden gespalten und zwar unter Auftreten von freien Aminosäuren.

In der Gruppe der *Mollusca* wurde von GRAETZ (17, 18) bei verschiedenen Pulmonata ein proteolytisches Enzym gefunden, welches seine Wirkung hat bei  $p_H$  2—11,5, mit einem Optimum bei  $p_H = 7,6$ , neben einem ereptischen Enzym, dessen Optimum bei  $p_H = 7,3$  liegt. Die Wirkung der beiden proteolytischen Enzyme ließ sich mit der von *Astacus*-Magensaft vergleichen.

Für einige Opisthobranchiata zeigte KRÜGER (43) die Anwesenheit ähnlicher Enzyme.

YONGE (142) fand für den Lamellibranchier *Ostrea edulis* zwei Optima der Gelatineverdauung, das eine bei  $p_H = 3,7$ , das zweite bei  $p_H = 9$ .

SAWANO (67) fand für Extrakte der Mitteldarmdrüse von *Ostrea circumpecta* das Optimum der Gelatinespaltung bei  $p_H = 8,0$ , für Casein bei  $p_H = 4,0$ .

In der Gruppe der *Cephalopoda* zeigte KRÜGER (43) bei *Eledone*, *Sepia* und *Octopus* die Anwesenheit einer Protease und Erepsin; der Magensaft von *Eledone* hatte schätzungsweise ein Optimum bei  $p_H = 7,5$  für die Peptonspaltung.

In der Gruppe der *Insecta* (wofür eine sehr ausführliche Aufzählung der verschiedenen Befunde durch UVAROV [81] gegeben ist) wurde von ABBOTT (1) die Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms, welches dem Trypsin ähnlich sein



sollte, für *Periplaneta* angegeben, andere Autoren geben eine „Pepsin“-fraktion an (PAVLOVSKY u. ZARIN [61] bei der Honigbiene).

WIGGLESWORTH (110, 111) untersuchte das proteolytische Enzym bei *Periplaneta*, und schloß auf Grund der Natur der Verdauungsprodukte, des Verhaltens gegenüber Blausäure und der Ähnlichkeit der  $p_H$ -Kurven für verschiedene Substrate (Optimum bei  $p_H = 7-7,5$ ) mit denen des Trypsins, auf den trypsinähnlichen Charakter der Protease; daneben konnte auch Erepsin, mit einem Optimum bei  $p_H = 8,5$ , nachgewiesen werden. Auch das Adsorptionsverhalten des Enzyms ist nach ihm das gleiche wie für Pankreastrypsin; es gelang ihm, die „Trypsinfraktion“ erepsinfrei, und das „Erepsin“ trypsinfrei zu bekommen (siehe dazu auch S. 167 u. 168).

SHINODA (70) fand für eine Larve von *Bombyx mori* (der Seidenraupe), daß die Protease ihr Optimum bei  $p_H = 9,5$  hat. HOBSON (31) fand für die Larve von *Lucilia* (der Fleischfliege), daß eine „Tryptase“ mit einem Optimum für Gelatine bei  $p_H = 8$  im Mitteldarm anwesend sei, die  $p_H$ -Kurve für die Tryptase von *Lucilia* geht beinahe mit einer Pankreas-Trypsin- $p_H$ -Kurve parallel; nur ist die erstere im sauren Gebiet wirksamer, genau wie WIGGLESWORTH es für *Periplaneta* fand. Eine „Peptase“, dem Pepsin ähnlich, ist nicht vorhanden; eine Peptidase ist anwesend.

In der Gruppe der *Tunicata* fand YONGE (141) bei *Ciona intestinalis* eine Protease, welche bei alkalischer und neutraler Reaktion wirkt.

KRÜGER (43) fand bei der nämlichen Art eine stärkere proteolytische Wirkung als YONGE, er konnte die Wirkungen einer Protease, einer Polypeptidase und einer Dipeptidase zeigen.

Für andere *Tunicata*, *Tethyum*, *Boltenia*, *Molgula*, *Ascidia* fand BERRILL (8) im „Leber“-Extrakt eine Protease, welche im Bereich von  $p_H 6-10$  wirksam ist, und deren Optimum bei  $p_H 8,0-8,5$  liegt.

Aus dieser Übersicht geht hervor, daß beim näheren Studium der proteolytischen Enzyme der Wirbellosen diese einerseits mit den Pflanzenenzymen verglichen wurden (VONK, KRÜGER u. GRAETZ), oder mit den proteolytischen Enzymen der Organe der Säugetiere (KRÜGER), andererseits mit den Verdauungsenzymen der Wirbeltiere, und speziell mit den Pankreasenzymen (YONGE, WIGGLESWORTH, HOBSON, BODANSKY und ROSE, diese letzten auch mit Pepsin).

Was die Untersuchung nach der Art der Enzyme erschwert, ist die Tatsache, daß bei den Invertebraten sämtliche Enzyme an einem Ort wirken, so daß von einer räumlichen Trennung, wie sie beim Säugetier (und nach VONK [83] für die Proteasen auch bei Amphibien und Fischen, nach WOLVEKAMP (140) auch bei Schildkröten) besteht, keine Rede ist.

JORDAN (37, 38) wies auf die Bedeutung dieses Unterschiedes zwischen Wirbellosen und Wirbeltieren hin. Durch die Tatsache, daß bei den Vertebraten die Enzyme, welche die Verdauung beenden (Erepsin, Maltase), über die Länge des Mitteldarmes verteilt sind und immer getrennt sind von den Enzymen, welche die Verdauung anfangen (Pepsin im Magen, Trypsin vom Pankreas an den Darm abgegeben, Amylase in Speichel und Pankreas), ist der Organismus vor einer Überschwemmung mit den Endprodukten geschützt. Bei den Wirbellosen ist die Verdauung langsam, überdies tritt die Nahrung nur in kleinen Portionen in den Mitteldarm ein, wo erst die Resorption stattfindet.

Obwohl hier eine Regulierung der Verdauung durch die geringe Menge der



Endenzyme zwar vielleicht vorkommen kann (kleine Dipeptidspaltung bei *Astacus*), aber auch fehlen kann (für die Karbohydrasen siehe WIERMA u. v. D. VEEN [109]), ist doch durch die oben erwähnten Umstände eine Überschwemmung mit Verdauungsprodukten ausgeschlossen.

In solchen Enzymgemischen, wo also die ganze Verdauung von einem einzigen Saft geleistet wird, die einzelnen Wirkungen dieses Saftes auf spezifische Substrate, auf bestimmte „Enzymindividuen“ zurückzuführen nach den jeweiligen  $p_H$ -Optima, ist äußerst schwierig. Erstens weil im Falle der proteolytischen Enzyme ein mit der Protease anwesendes Erypsin durch die weitere Spaltung der entstehenden Produkte eine Verschiebung der  $p_H$ -Optima oder ein zweites  $p_H$ -Optimum verursachen kann (siehe dazu VONK [83] an den kohlehydratspaltenden Enzymen der Fische, WALDSCHMIDT-LEITZ [94] an den proteolytischen Enzymen der Milz). Zweitens hat die Anwesenheit von Elektrolyten einen großen Einfluß auf die Lage des  $p_H$ -Optimums (siehe RINGER [62] an Papain); auch andere begleitende Stoffe können das Optimum wesentlich entstellen (siehe WILLSTÄTTER [130], über Magenlipase). Drittens ist die Zeit der Einwirkung zu beachten; die Beständigkeit der Enzyme ist verschieden bei verschiedener Acidität, das Resistenzoptimum fällt nicht immer mit dem Wirkungsoptimum zusammen (siehe SJÖBERG [71] über Amylase von *Phaseolus*). Eine Charakterisierung und Identifizierung der Enzyme in Gemischen nach ihren  $p_H$ -Optima ist also keine sichere, um so mehr als auch die verschiedenen Substrate mit dem nämlichen Enzym verschiedene  $p_H$ -Optima ergeben. Nach NORTHROP (58) sollten für Pepsin und Trypsin die  $p_H$ -Kurven mit den Dissoziationskurven der angewandten Substrate übereinstimmen, wobei Pepsin nur mit den Eiweißkationen, Trypsin nur mit den Eiweißanionen reagieren soll. Für Papain fällt nach WILLSTÄTTER (123) das  $p_H$ -Optimum zusammen mit dem isoelektrischen Punkt des Substrates; das Papain würde danach nur das undissoziierte Eiweißmolekül angreifen. Auch für Kathepsin, die Proteinase aus tierischen Organen, hat der elektrochemische Charakter des Substrates Einfluß (WALDSCHMIDT-LEITZ, 105); hier dürfte aber „in erster Linie der elektrochemische Charakter der Kathepsin-Substratverbindung bestimmend sein für die Reaktionsgeschwindigkeit“ (l. c. S. 35).

Ist also die Bestimmung der  $p_H$ -Optima nicht genügend zur definitiven Charakterisierung der Enzyme, auch die spezifische Wirkung auf verschiedene Substrate erlaubt nicht, wenn es sich um verschiedene Wirkungen eines einzigen Saftes handelt, die einzelnen Wirkungen auf verschiedene Enzyme zurückzuführen (siehe dazu auch JORDAN [37, S. 21]). Nur nach erfolgter Isolierung der einzelnen Enzyme der Wirbellosen aus ihren Gemischen kann man versuchen, sie mit den, ebenfalls isolierten, Enzymen der Wirbeltiere oder Pflanzen zu vergleichen (siehe dazu JORDAN, l. c. S. 21, SHINODA [69] S. 343).



Die Isolierung von Enzymen aus ihren Gemischen mit fremden Begleitstoffen und mit anderen Enzymen wurde von WILLSTÄTTER vorgenommen. In einer umfangreichen Reihe von Untersuchungen, die von ihm und seinen Schülern in den Jahren 1920—1928 (113, siehe auch 89) ausgeführt wurden, hat er eine Methode zur Reinigung und Isolierung der Enzyme ausgearbeitet und angewandt; die Methode, die er benutzte, war die der fraktionierten Adsorption und Elution aus den Adsorbaten. Es hat sich nämlich gezeigt, daß sogenannte oberflächenaktive Stoffe, wie Kaolin, Tonerde, Eisenhydroxyd u. a., imstande sind, die Enzyme mittels kleinen Affinitätsbeträgen an sich zu binden. Diese kleinen Mengen an Affinität lassen sich im allgemeinen mit sehr gelinden chemischen Mitteln wieder aufheben, z. B. durch verdünnte Alkalien.

Im vorigen Jahrhundert wurden schon vereinzelte Versuche gemacht und einige Enzyme aus ihren Gemischen durch Adsorption abgetrennt; unter anderem gelang es BRÜCKE (12) 1861 das Pepsin durch Adsorption seiner Lösung zu entziehen und nachher aus diesem Adsorbat frei zu legen. Die so erhaltene Enzymlösung zeigte fast keine Eiweißreaktionen mehr. Auch die Trennung von Enzymen aus einem Gemisch, nämlich dem Pankreassaft, wurde mit Hilfe des Adsorptionsverfahrens schon 1862 von DANILEWSKY (16) und später von COHNHEIM (13) versucht; das eiweißspaltende Enzym wurde dabei frei von Diastase erhalten, und ebenso die Diastase frei von Trypsinwirkung.

Erst 1907 nahm MICHAELIS (54, 55, 56) die Adsorption von Enzymen wieder auf, und zwar versuchte er der elektrochemischen Natur der Enzyme näher zu kommen. Aus der Tatsache, daß Invertin bei jeder Reaktion durch das elektropositive Adsorbens Tonerde adsorbiert wurde, schloß er auf den sauren Charakter dieses Enzyms, aus der Aufnahme von Trypsin bei jeder Reaktion durch Tonerde und ebensogut durch das elektronegative Adsorbens Kaolin auf die amphotere Natur des Trypsins. Indessen hat es sich später herausgestellt, daß dieses Adsorptionsverhalten der Enzyme nicht diesen selbst zukommt, doch für ihre Aggregate mit begleitenden Stoffen, wie sie sich in den Enzymlösungen finden, gilt. So konnte WILLSTÄTTER (132) für das Invertin zeigen, daß das Adsorptionsverhalten vom Reinheitsgrad des Enzyms abhängig sei: während aus der Rohlösung nur eine Adsorption mit Tonerde gelang, war es möglich aus reineren Lösungen das Enzym an Kaolin zu adsorbieren; es besitzt also sowohl saure wie basische Eigenschaften. Trypsin aus Pankreas wird nach einer vorläufigen Reinigung gar nicht mehr von Tonerde, aber quantitativ von Kaolin aufgenommen, die basische Natur überwiegt jetzt (WILLSTÄTTER u. WALDSCHMIDT-LEITZ [135]).

„Das Adsorptionsverhalten von Enzymen aus unreinen Lösungen sagt also nichts über die elektrochemische Natur eines Ferments aus, sondern es läßt nur erkennen, ob in dem aus einem Ferment und seinen jeweiligen Begleitstoffen gebildeten Additions- oder Adsorptionsprodukt die Säure- oder Basennatur überwiegt“ (WILLSTÄTTER [132, S. 57]). Die Begleitstoffe vermögen also das Adsorptionsverhalten eines Enzyms abzuändern, auch können sie auf die Zerlegung der Adsorbate mit chemischen Mitteln einen Einfluß haben: mit dem Enzym können Stoffe adsorbiert sein, welche beim Eluieren mitwirken (von WILLSTÄTTER als Ko-eluentia bezeichnet), oder solche, welche das Enzym fester an das Adsorbens binden (Ko-adsorbentia).

Eine quantitative Messung der Enzyme, die als Kontrolle zu ihrer Reinigung notwendig ist, ist nur möglich nach ihrer katalytischen Wirk-



samkeit. Bis jetzt ist es auch WILLSTÄTTER trotz weitgehender Reinigung vieler Enzyme nicht gelungen, ein Enzym auf Grund anderer, z. B. chemischer oder physikalischer Merkmale zu beschreiben. Wo bestimmte Stoffe als wesentliche Bestandteile eines Enzyms aufgefaßt wurden, konnte immer gezeigt werden, daß sie für die Enzymwirkung belanglos waren (so Proteine, Kohlehydrate oder Phosphorverbindungen für die Saccharase aus Hefe, Proteine und Kohlehydrate für Lipase aus Pankreas). Chemische Reaktionen für die Enzyme selbst sind also nicht bekannt; überdies werden fast alle Enzymeigenschaften durch Begleitstoffe beeinflusst (so z. B. die Abhängigkeit ihrer Wirkungen von der H-Ionenkonzentration, ihre Haltbarkeit, ihr Temperaturoptimum, ihr Adsorptionsverhalten). Die einzige Eigenschaft, die den Enzymen selbst zukommt, ist ihre spezifische katalytische Wirkung.

Die quantitative Analyse der Enzyme wurde von WILLSTÄTTER durchgeführt (114). Einerseits wurde durch quantitative Kontrolle die Ausbeute, die sich bei der Herstellung von Enzymlösungen und bei der weiteren adsorptiven Reinigung ergab, im Verhältnis zum Ausgangsmaterial bestimmt, andererseits die enzymatische Konzentration oder der Reinheitsgrad in den erhaltenen Lösungen festgestellt. Als allgemeines Maß für die Enzymwirkung wurden von WILLSTÄTTER u. KUHN (129, auch 115) Einheiten aufgestellt, die auf Grund der Messung von Reaktionsgeschwindigkeiten festgestellt wurden. Die Einheiten sind durch bestimmte Leistungen unter gewissen Bedingungen der Zeitdauer, der Temperatur, der Konzentration der Substrate, der Acidität usw. definiert. Die Ausbeuten wurden in Enzymeinheiten angegeben; die enzymatische Konzentration oder der Reinheitsgrad, also die Verdünnung der unbekannten reinen Enzyme mit Fremdstoffen, wird gemessen, indem man die Anzahl der Enzymeinheiten in 1 g Substanz ermittelt.

Obwohl es sich zeigte, daß der Reaktionsverlauf in vielen Fällen von Begleitstoffen abhängig ist und daß also die Messung von einem Enzym in verschiedenem Reinheitsgrad und bei verschiedenem Ursprung in ungleichem Maße von Begleitstoffen beeinflusst wird, berechtigt doch die Messung der Spaltungen unter bestimmten Bedingungen zum Vergleich von Enzymmengen, die in Präparaten aus dem nämlichen Ausgangsmaterial gefunden werden (siehe dazu WILLSTÄTTER, 116).

Die von WILLSTÄTTER und seinen Schülern aufgestellten Maße haben nur Bedeutung für den Vergleich der Mengen des nämlichen Enzyms, sie erlauben keine Beurteilung des Mengenverhältnisses verschiedener Enzyme.

Mit Hilfe dieser quantitativen Bestimmung konnte der Gang einer Adsorption leicht festgestellt werden. Mittels der Adsorptionsmethoden ist es WILLSTÄTTER und seinen Schülern in vielen Fällen gelungen, manche Enzyme von den mit ihnen vergesellschafteten fremden Begleitstoffen zu



trennen, und so deren Einfluß auf die Enzymwirkung zu beseitigen und auch der chemischen Natur des Enzyms selbst näher zu kommen (siehe auch WILLSTÄTTER, 115). Im allgemeinen nimmt ein Adsorbens, wie Ton-erde, ein Enzym zusammen mit einer bedeutenden Menge von Fremdkörpern auf. Eine Aufgabe besteht darin, die Adsorption genügend auswählend zu gestalten; je geringer die Menge eines Adsorbens, welches zur Aufnahme eines Enzyms erforderlich ist, desto höher ist die zu erwartende Steigerung der enzymatischen Konzentration. Der Adsorptionswert (139) (d. h. die Anzahl der Enzymeinheiten, welche von 1 g des Adsorbens aufgenommen werden), welcher als Maß für die Adsorption gilt, ist verschieden bei verschiedener Acidität der Lösung und u. a. auch abhängig von der Verdünnung der Enzymlösung. Durch Abänderung dieser Faktoren gelingt es, die Adsorption so auswählend wie möglich zu gestalten. Es stellte sich bei den Untersuchungen von WILLSTÄTTER heraus, daß ein Wechsel im Adsorptionsmittel die enzymatische Konzentration weiter zu steigern vermag. Die Grenze der Methode wird hier durch den Umstand gezogen, daß eine weitere Steigerung des Reinheitsgrades durch die zunehmende Unbeständigkeit des Enzyms selbst kompensiert wird.

Es wurden mit Hilfe dieser Methode Enzympräparate erhalten, welche, wie z. B. die Hefesaccharase, 3000mal konzentrierter waren als das Ausgangsmaterial; andere, wie die Pankreaslipase, sind auf 250maligen Reinheitsgrad gebracht.

Diese Methode ermöglichte es, die Wirkung des Enzyms selbst, unabhängig von seinen Begleitstoffen kennen zu lernen und es zeigte sich, daß verschiedene Eigenschaften, wie sie für Enzyme beschrieben worden waren, nicht länger für die gereinigten Enzyme galten. So war u. a. für die Magenlipase verschiedener Säugetiere ein  $p_H$ -Optimum bei 4—5 gefunden; das gereinigte Enzym aber hat das nämliche Optimum wie Pankreaslipase, und zwar bei  $p_H = 8,9$  (130). Auch können begleitende Stoffe eine hemmende Wirkung auf das Enzym ausüben, so daß erst nach ihrer Beseitigung das Enzym seine volle Wirkung zu zeigen vermag, wie bei der Pankreaslipase; diese ist in der Drüse mit Eiweißstoffen vergesellschaftet, die ihre Wirkung in saurem Milieu hemmen (138).

Eine zweite Aufgabe bestand darin, in einem Gemisch von Enzymen die einzelnen Enzyme voneinander zu trennen, um danach deren Wirkungen scharf umgrenzen zu können. Die Trennung von Enzymen aus einem Gemisch gründet sich auf die Tatsache, daß verschiedene Enzyme in ihren sauren und basischen Eigenschaften feine Abstufungen zeigen.

Das erste Beispiel für die Trennung von Enzymen durch Adsorption war das am pankreatischen Enzymgemisch von Lipase, Trypsin und Amylase (WILLSTÄTTER u. WALDSCHMIDT-LEITZ [135, 137]). Die Lipase läßt sich durch eine Tonerdesorte, Cy genannt, dem Gemisch entziehen; bei der zweiten Tonerdeadsorption ist die Lipase einheitlich im Adsorbat anwesend und läßt sich durch



schwach alkalisches Phosphat eluieren. In der Restlösung sind Amylase und Trypsin vorhanden; aus ihr wird Trypsin mit Kaolin aufgenommen; in der Elution des Adsorbates mit verdünntem Alkali findet sich das Trypsin einheitlich wieder, die Amylase bleibt allein in der Restlösung zurück. In einer weiteren Untersuchung gelang es WALDSCHMIDT-LEITZ (86, 87), das tryptische Enzym mittels Adsorption von seinem Aktivator, der Enterokinase, zu trennen; dadurch wurde es möglich, die Wirkung des nichtaktivierten Trypsins von der des aktivierten Enzyms zu unterscheiden. Auch konnten WALDSCHMIDT-LEITZ u. HARTENECK (95, 96) von der Trypsinkomponente des Pankreas das Erepsin abtrennen durch mehrmalige Adsorption an Tonerde und Elution der Adsorbate.

In derselben Weise wurden von WILLSTÄTTER verschiedene pflanzliche Enzyme isoliert.

Mit den einheitlichen Enzymlösungen, so z. B. denjenigen der Proteasen, wurden Versuche angestellt, um durch ihre spezifische Wirkung der Struktur des Eiweißes näher zu kommen.

Die eiweißspaltenden Enzyme, von welchen man mittels der Adsorptionsmethode jedes einheitlich erhielt, waren:

1. *Pepsin*, aus dem Magensaft, greift native Eiweißstoffe an;  $p_H$ -Optimum bei  $p_H =$  ungefähr 2<sup>1</sup>.

2. *Trypsin*, aus Pankreas, und zwar: a) inaktives, spaltet Peptone;  $p_H$ -Optimum 8,2—8,7; b) aktiviertes, spaltet native Eiweißkörper und Peptone;  $p_H$ -Optimum 8,2—8,7.

3. *Erepsin*, aus Pankreas, Darm, Hefe und Organen der Säugetiere, spaltet Di- und Polypeptide;  $p_H$ -Optimum bei ungefähr 8.

4. *Papain*, aus dem Milchsafte von *Carica papaya*, und zwar: a) inaktives, spaltet native Eiweißkörper (und kein Pepton),  $p_H$ -Optimum der Wirkung bei dem jeweiligen isoelektrischen Punkt des Substrates; b) aktiviertes (durch Blausäure), spaltet native Eiweißkörper und Peptone,  $p_H$ -Optimum bei dem isoelektrischen Punkt des Substrates<sup>2</sup>.

5. *Hefeprotease* oder *Hefetrypsin*, welches mit dem aktivierten Papain nahezu übereinstimmt.

6. *Kathepsin* aus tierischen Organen und Geweben, und zwar: a) inaktives, spaltet nur Pepton, Optimum  $p_H =$  ungefähr 4; b) aktiviertes (durch Blausäure) spaltet native Eiweißkörper und Pepton, Optimum  $p_H =$  ungefähr 4.

In den letzten Jahren erkannte man, daß was man bisher als einheitliche Enzyme aufgefaßt hatte, doch noch Mischungen waren, die sich bei weiterer Anwendung der Adsorptionstechnik voneinander trennen ließen. So ist die Einteilung der oben angeführten proteolytischen Enzyme aus dem Verdauungstrakt der Säugetiere, die immer als Pepsin, Trypsin und Erepsin gekennzeichnet wurden, abgeändert worden; das nämliche gilt für die intracellulären Organenzyme, die von WALDSCHMIDT-LEITZ u.

<sup>1</sup> Das Pepsin wurde nicht durch Adsorption gereinigt; trotzdem hat sich seine Stellung zu den anderen Enzymen nicht geändert.

<sup>2</sup> Siehe auch Fußnote S. 166.



DEUTSCH (94) als „Protease“ und „Erepsin“ bezeichnet worden waren, sowie für die pflanzlichen Enzyme, die in einer Reihe von Arbeiten von WILLSTÄTTER und GRASSMANN untersucht wurden.

WALDSCHMIDT-LEITZ (100) konnte zeigen, daß das Pankreastrypsin in zwei Komponenten zerlegt werden kann, wovon die eine, die Proteinase, aktiviert durch Enterokinase, nur native Eiweißkörper angreift, die andere, die Carboxypolypeptidase, auch durch Enterokinase aktivierbar, bestimmte Polypeptide angreift, und zwar solche, bei denen die Carboxylgruppe frei ist. Und zwar ist, wie es scheint, eine gewisse stärkere Ionisation dieser Gruppe notwendig. Nach ABDERHALDEN (3) ist auch dieses letzte Enzym wieder in zwei Teilenzyme zerlegt worden, wovon das eine acylierte Peptide, das andere Tyrosinpeptide spaltet.

Das Erepsin aus Pankreas und Darm besteht auch aus zwei Komponenten (6, 92), einer Aminopolypeptidase, welche nur Polypeptide spaltet, und einer Dipeptidase, die nur auf Dipeptide wirkt. Beide wirken nur bei Gegenwart einer freien Aminogruppe im Substrat. Nach LINDERSTRÖM-LANG (50, 51, 53) sollte die Dipeptidase aus Malz und Darm zwei Komponenten aufweisen; die eine Komponente, Dipeptidase I, soll Alanyl-Glycin viel schneller als Leucyl-Glycin angreifen, und das Optimum bei  $p_H = 7,3$  haben; die andere, Dipeptidase II, soll Leucyl-Glycin schneller spalten und ihr Optimum bei  $p_H = 8,2$  haben. Die erste Komponente ist unbeständig, die zweite beständig. Von GRASSMANN (27) wurde diese Auffassung von zwei Enzymen kritisiert, er führt den Unterschied in der Spaltung beider Dipeptide zurück auf ungleichen Einfluß von hemmenden Begleitstoffen.

Von dem proteolytischen Gemisch aus Organen, z. B. aus der Milz, zeigt die Protease eine Aktivierung durch einen natürlichen Aktivator, die Zookinase. Diese kann mittels Alkoholextraktion von der Proteinase abgetrennt werden. Sie kann in ihrer Wirkung durch Blausäure und Schwefelwasserstoff ersetzt werden (93, 105). Im ganzen ist nach WALDSCHMIDT-LEITZ (90, 105) dieses proteolytische Gemisch aus vier Enzymen zusammengesetzt. Und zwar wurde die Protease zerlegt in eine Proteinase (die nach WILLSTÄTTER [117] als Kathepsin bezeichnet wurde und ein  $p_H$ -Optimum hat bei 4–5<sup>1</sup>) und eine Carboxypolypeptidase, welche ein  $p_H$ -Optimum bei 4,2 hat. Diese Carboxypolypeptidase greift wie die tryptische Carboxypolypeptidase nur bestimmte Polypeptide an. Diese beiden Enzyme sind durch Zookinase, HCN und  $H_2S$  aktivierbar. Das aktivierte Kathepsin spaltet native Eiweißkörper; das nichtaktivierte Kathepsin spaltet Peptone der peptischen und tryptischen Verdauung, nicht aber die von Papain-Blausäure gebildeten.

<sup>1</sup> Siehe dazu auch HEDIN (29), der mit anderer Methodik auch neuerdings wieder die Existenz zweier Proteasen in der Milz angibt, deren eine, die  $\alpha$ -Protease, bei einem  $p_H = 8$  als Optimum wirkt, die andere bei  $p_H = 4$  ihr Optimum hat.



Das Erepsin ist hier auch wieder zerlegt worden in eine Aminopolypeptidase und eine Dipeptidase; für die beiden ist HCN ein Gift, beide haben ihr Optimum bei  $p_H = 8$ .

Auch in Organen von Wirbellosen, u. a. in der grünen Drüse von Crustaceen, wurde eine, bei saurer Reaktion optimal wirkende Proteinase gefunden (79, 80).

In den farblosen Blutkörperchen (117, 118, 120) und in der Magenschleimhaut (118), in den Speicheldrüsen (118, 119) und im Blutserum (26) wurde von WILLSTÄTTER und Mitarbeitern die Anwesenheit eines Kathepsins, dem Milzenzym ähnlich, neben einer Trypsinkomponente, nachgewiesen; daneben kommen in Leukocyten auch eine Carboxypolypeptidase, eine Aminopolypeptidase und eine Dipeptidase vor.

Aus dem papainhaltenden Milchsaft von *Carica papaya*, welcher aus VINES' Untersuchungen bekannt war, und aus welchem das Enzym in reinerem Zustande von WILLSTÄTTER u. GRASSMANN (121) erhalten worden war, konnten drei Komponenten durch Adsorption voneinander getrennt werden:

1. Eine Proteinase, das Papain, von welcher das Reaktionsoptimum für verschiedene Substrate mit deren isoelektrischem Punkt übereinstimmt (123) und welches (inaktiviert und aktiviert) native Eiweißkörper und aktiviert Peptone spaltet<sup>1</sup>. Von AMBROS u. HARTENECK (4, 5) wurde im Milchsaft auch ein natürlicher Aktivator des Papains gefunden, den sie als „Phytokinase“ bezeichneten.

2. Eine Polypeptidase, welche durch HCN aktivierbar ist und also wahrscheinlich mit der katheptischen Carboxypolypeptidase identisch ist (5).

3. Eine Dipeptidase, deren Wirkung durch HCN gehemmt wird (5).

Für die proteolytischen Enzyme der Hefe hatten WILLSTÄTTER u. GRASSMANN (122, 24) die Anwesenheit eines „Trypsins“, welches dem aktivierten Papain gleichzustellen sei, neben einem (nur Dipeptide spaltenden) Erepsin nachgewiesen. Später konnte GRASSMANN (19, 20, 21, 22) die Gegenwart einer Proteinase, welche durch einen natürlichen Aktivator, sowie durch HCN und  $H_2S$  aktivierbar ist, und welche wie Papain das Wirkungsoptimum bei dem isoelektrischen Punkt des Substrates hat, nachweisen neben einer Aminopolypeptidase, welche von HCN und  $H_2S$  gehemmt wird, und einer Dipeptidase. Die Verschiedenheit in Spezifität zwischen der inaktiven Hefeproteinase und inaktivem Papain und

<sup>1</sup> Die Lage des isoelektrischen Punktes des Fibrins wird aber sehr stark beeinflusst von der Art der Ionen des benutzten Puffergemisches. Siehe dazu VONK (85a). Wenn derartige große Unterschiede in der Lage des isoelektrischen Punktes (für Fibrin von  $p_H$  7—3,7) auch für andere Substrate gefunden werden sollten, ist es zweifelhaft, ob die Auffassung, daß es eine Gruppe von Enzymen gibt, welche ihre Substrate optimal beim isoelektrischen Punkte spalten, auf die Dauer aufrecht erhalten werden kann.



zwischen aktivierter Hefeproteinase und aktiviertem Papain führte er zurück auf die Anwesenheit zweier natürlicher Aktivatoren, eines für Pepton-, des anderen für Gelatinespaltung, welche beide durch HCN ersetzbar sind und in verschiedener Menge in den verschiedenen Enzympräparaten angetroffen werden.

Auch die chemische Natur der Aktivatoren ist nach ihrer Abtrennung von den Enzymen untersucht worden, und zwar fand GRASSMANN (23, 28), daß die Aktivierung des Papains, der Hefeproteinase und des Kathepsins aus Nieren nicht nur von den natürlichen Aktivatoren und von HCN herbeigeführt wird, sondern auch von der reduzierten Form des Glutathions und von Cystein. Dieser letztere Stoff hemmt die Wirkung von (durch Enterokinase aktiviertem) Trypsin, während die oxydierte Form des Cysteins, das Cystin, die Trypsinaktivierung, ebenso gut wie Enterokinase, herbeiführen kann<sup>1</sup>. WALDSCHMIDT-LEITZ (91, 101, 102) konnte die Zookinase aus Leber reinigen bis zu einem kristallinischen Präparat, welches mit der reduzierten Form des Glutathions identisch gefunden wurde.

Die Frage, ob die katheptische Aktivierung auf einer Reaktion des Aktivators mit dem Enzym selbst oder ob sie auf einer Ausschaltung der hemmenden Wirkung von Schwermetallionen (KREBS, 41) durch Komplexbindung des Aktivators mit diesen beruht, scheint noch nicht entschieden zu sein.

Es hatte sich also in den letzten Jahren bei näherer Kenntnis der eiweißspaltenden Enzyme der Vertebraten und der Pflanzen herausgestellt, daß zur Spaltung des Eiweißmoleküls mehrere Enzyme notwendig sind, die sich in ihrer Wirkung nicht vertauschen lassen; jedes einzelne von ihnen hat die Aufgabe, eine bestimmte Bindung zu zersprengen. Es fragte sich, wie die Enzyme der Wirbellosen, wo ja ein einziger Saft alles leistet, sich verhalten.

Das Problem war also das folgende: Mittels der Adsorptionsmethode zu untersuchen, ob das verdauende Gemisch der Crustaceen mehrere eiweißspaltende Enzyme enthält, ob es möglich ist, sie proteolytisch einheitlich zu bekommen und weiterhin zu versuchen, sie mit den bekannten anderen Enzymen zu vergleichen.

Die erste Anwendung der Adsorptionsmethode bei Invertebraten geschah durch KARRER (39) bei seinen Untersuchungen über die Lichenase, das Reservezellulose spaltende Enzym von *Helix pomatia*, welches durch Adsorption von einem anderen cellobiosespaltenden Enzym befreit werden konnte.

Der erste Versuch, bei Invertebraten einzelne proteolytische Enzyme aus ihrem Gemisch zu isolieren, wurde von WIGGLESWORTH (110, 111) an Glycerinextrakten von *Periplaneta* gemacht; kurz darauf von YONGE (143) an Extrakten

<sup>1</sup> Die Aktivierung von Trypsin durch Cystin scheint inzwischen von GRASSMANN widerrufen zu sein. Siehe dazu: WALDSCHMIDT-LEITZ u. PURR, Hoppe-Seylers Z. 198, 260 (1931) und zwar S. 261, Fußnote 5.



der Mesenterialfilamente von *Lobophyllia*. Weil schon das Adsorptionsverhalten der pankreatischen Enzyme von ein und derselben Tierart verschieden sein kann, und in hohem Maße von der Beschaffenheit des Drüsenmaterials und der Anwesenheit von Begleitstoffen abhängig ist (siehe WALDSCHMIDT-LEITZ u. HARTENECK [96, S. 215]), so erscheint es merkwürdig, daß sowohl WIGGLESWORTH wie YONGE mit genau dem nämlichen Verfahren wie es für die Trennung von Pankreastrypsin und -erepsin benutzt wird, bei *Periplaneta* und bei *Lobophyllia* eine Trennung in Trypsin und Erepsin herbeiführen konnten. Übrigens sind sie bei dieser ersten Analyse geblieben.

Weil die Adsorptionsmethode bekanntlich viel Material beansprucht, wurde für die Untersuchung nicht *Astacus*, sondern *Maja squinado* gewählt.

## Kapitel II.

### Der Rohextrakt.

#### 1. Das Material.

Als Material wurde *Maja squinado* LATR., die Meerspinne, benutzt, die mir in reichlicher Anzahl in „The Marine Biological Laboratory“ in Plymouth freundlichst zur Verfügung gestellt wurde<sup>1</sup>.

Die frisch gefangenen Tiere wurden in großen Wasserbecken 1 bis 3 Tage aufbewahrt und daraus nach Bedarf entnommen. Im ganzen kamen 100 Tiere zur Anwendung.

Im Anfang wurde versucht, den intakten Tieren den Magensaft mittels einer gebogenen Glasröhre, in der Weise wie es für *Astacus* geschieht (36) zu entnehmen. Leider stellte sich das bald als unmöglich heraus, weil die Tiere mit ihren starken Mandibeln die Glasröhre, nachdem sie in den Magen eingeführt worden war, hartnäckig festhielten und öfters zersplitterten. Ich mußte also darauf verzichten, dem nämlichen Tiere einige Male nacheinander den Magensaft zu entnehmen.

Zunächst wurde bei jedem Tier das erste Paar Gehfüße mit den großen Scheren abgeschnitten, danach so schnell wie möglich die anderen Beine. Da es nicht möglich war, die Tiere mittels Chloroform oder Äther zu betäuben, wurde darauf das Zerebralganglion vernichtet. Dann wurde der Magensaft mittels einer gebogenen Glasröhre aus dem Magen ausgehebert, und sofort mit 4 Teilen Glycerin (ungefähr 87%) vermischt. Nach einigen Tagen wurde das Gemisch durch Glyzerinfilter filtriert; man erhielt eine klare, schwach orangebraune Lösung. Im Ganzen bekam ich auf diese Weise von 54 Exemplaren von *Maja* 670 ccm Enzymlösung mit einem Gehalt von ungefähr 70% Glycerin. Diese Glyzerinkonzentration genügt zur Stabilisierung mancher Vertebratenproteasen (WALDSCHMIDT-LEITZ [95], VONK [83], auch VERNON [82]). Dementsprechend war auch hier die Wirkung der Enzymlösung, gemessen an Caseinverdauung, nach 5 Monate langem Stehen unvermindert erhalten, wie aus untenstehenden Zahlen hervorgeht (für die Methodik siehe dieses Kapitel, Abschnitt 3).

Pro Titration (Alkoholtitration) 2 ccm, d. h. 40 mg Casein, 0,1 ccm Enzymlösung, 1,2 ccm Pufferlösung  $\frac{1}{5}$  mol. Kaliumbiphtalat-Salzsäure,  $p_H = 6,0$ . Verdauungszeit 90 Min. Temperatur 30° C. Sofort nach Herstellung der Enzymlösung Aciditätszuwachs 0,59 ccm 1/10 n NaOH. Nach 5 Monaten Stehen Acidi-

<sup>1</sup> Herrn Dr. E. J. ALLEN, Direktor dieser Station, sei an dieser Stelle nochmals mein herzlicher Dank ausgesprochen für sein freundliches Entgegenkommen.



tätswachst 0,55 ccm 1/10 n NaOH. Diese Enzymlösung wird im Folgenden mit „Magensaft 1:4“ bezeichnet.

Nachdem der Magensaft dem Tiere entnommen war, wurde vom frontalen Ende anfangend, wo ja ein Schnitt durch das Ganglion schon vorlag, der Rückenpanzer ringsum durchschnitten und vorsichtig abgehoben. Dann wurde festgestellt, ob der Magen bei der Ausheberung des Saftes intakt geblieben war. Wo dies in vereinzelt Fällen nicht der Fall war, wurde der betreffende Magensaft nicht weiter benutzt. Die Mitteldarmdrüse wurde darauf sorgfältig herauspräpariert, mit Filtrierpapier ganz leicht getrocknet und gewogen. Es wurden zuerst die Drüsen von 40 Tieren verarbeitet. Sie wurden dann mit der Schere zerschnitten und mit geglühtem Quarzsand zerrieben, danach mit 4 Teilen Glycerin (87%) auf der Schüttelmaschine für kurze Zeit geschüttelt. Nach 3 Wochen langem Stehen wurde erst durch ein lockeres Tuch kolliert und darauf die noch sehr trübe Lösung durch Glycerinfilter filtriert und das Volumen gemessen. Ich erhielt in dieser Weise von 40 Tieren, deren Mitteldarmdrüsen ein Frischgewicht von 962,5 g hatten, 4280 ccm klaren Extrakt, mit einem Gehalt von ungefähr 70% Glycerin. In dieser Glycerinlösung war auch nach 6 Monate langem Stehen keine oder nur eine geringe Verminderung der Enzymwirkung, gemessen an Casein und Glycylglycin, zu erkennen, wie aus untenstehenden Zahlen hervorgeht.

Pro Titration (Mikro-v. SLYKE) 2 ccm, d. h. 40 mg Casein, 0,1 ccm Rohextrakt, 1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol. Kaliumbiphtalat-Salzsäure,  $p_H = 6,0$ . Verdauungszeit 90 Minuten. Temperatur 30° C. Bald nach Anfertigung des Extraktes Aciditätszuwachs 0,42 ccm 1/10 n  $NH_2$ . Nach 6 Monate langem Stehen 0,39 ccm 1/10 n  $NH_2$ .

Pro Titration (alkohol. Titration) 10 ccm, d. h. 66 mg Glycylglycin, 0,5 ccm Rohextrakt, 4 ccm Pufferlösung 1/5 mol. Glycocoll-NaOH,  $p_H = 8,4$ . Verdauungszeit 6 Stunden. Temperatur 30° C. Bald nach Anfertigung des Extraktes Aciditätszuwachs 1,84 ccm 1/10 n NaOH. Nach 5 Monate langem Stehen 1,70 ccm 1/10 n NaOH.

Dieser Glycerinextrakt wird im Folgenden mit „Rohextrakt“ bezeichnet.

Von 60 anderen Exemplaren von *Maja* wurden die herauspräparierten Mitteldarmdrüsen in der Weise wie es von WILLSTÄTTER u. WALDSCHMIDT-LEITZ (135) für Schweinepankreas gemacht wurde, mit Aceton und Äther getrocknet (siehe dazu RONA [65, S. 234]). Das feingemahlene Pulver (247 g) wurde trocken aufbewahrt.

Nach Bedarf wurden hiervon einige Gramm entnommen und mit 16 Volumteilen Glycerin (87%) (135) 4 Stunden lang auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Darauf wurde filtriert und mit destilliertem Wasser einmal verdünnt. In dieser Weise erhielt ich eine Enzymlösung, die pro Kubikzentimeter eine Enzymmenge enthielt, stammend von ebensoviel Gramm Frischgewicht der Drüse als der Rohextrakt frischer Drüsen (abgesehen von Verlust an Enzym bei der Siebung des Pulvers). Bestimmungen der Casein- und Glycylglycinspaltung durch diesen „Extrakt getrockneter Drüsen“ ergaben bei ähnlichen Ansätzen, wie für den Rohextrakt frischer Drüsen, niedrigere Werte als dieser; der Enzymgehalt ist in dem letzteren höher, doch ist die enzymatische Konzentration niedriger, das Enzym mehr verunreinigt mit Fremdstoffen, die bei der Trocknung der Drüsen schon weggenommen wurden (95).

	Caseinspaltung	Glycylglycinspaltung
Rohextrakt frischer Drüsen .	0,42 ccm 1/10 n $NH_2$	1,84 ccm 1/10 n NaOH
Extrakt getrockneter Drüsen.	0,25 ccm 1/10 n NaOH	1,33 ccm 1/10 n NaOH
Magensaft 1:4 . . . . .	0,59 ccm 1/10 NaOH	1,78 ccm 1/10 n NaOH



Ein Vergleich der Wirkung von Magensaft 1:4 und Mitteldarmdrüsenextrakt zeigte für die beiden eine Stärke der Enzymwirkungen der nämlichen Größenordnung, sowohl für Casein- als für Glycylglycinspaltung. Es scheint also die Erepsinwirkung nicht in besonderem Maße in den Follikeln der Mitteldarmdrüse stattzufinden, wie man aus dem geringen Erepsingehalt von *Astacus*-Magensaft (SHINODA, 69) geneigt sein würde zu vermuten. Übrigens ist der Erepsingehalt hier nicht so niedrig, wie SHINODA (69) es für *Astacus* angegeben hat.

Die Übereinstimmung der Enzymwirkungen in Magensaft und Drüsenextrakt berechtigt zur Benutzung des letzteren für das Studium der verdauenden Enzyme, was bei den großen Mengen von Drüsen-substanz, verglichen mit dem spärlichen Magensaft, einen großen Vorteil bedeutet. Auch ist die Beschaffenheit der Drüsenauszüge (siehe auch 108) nicht, wie die des Magensaftes, abhängig von dem wechselnden Zustand des lebenden Tieres und ebensowenig abhängig vom Mageninhalt.

Für den allergrößten Teil der Versuche wurde der Rohextrakt frischer Drüsen benutzt.

Der  $p_H$  des Magensaftes wurde sofort nach Entnahme, leider nur colorimetrisch, bestimmt und gefunden, daß er im Mittel 6,3 betrug (von 68 Tieren, wo keine Reste von Nahrung anwesend waren<sup>1</sup>). Von 10 Tieren, die 1 Woche gehungert hatten, betrug der  $p_H$  des Magensaftes im Mittel 6,1<sup>2</sup>.

SHINODA (69) fand für *Astacus*-Magensaft  $p_H = 5,6$ , bei Hungertieren  $p_H = 5,01$ , KRÜGER bei Hungertieren  $p_H = 4,67$ , nach Fleischnahrung  $p_H = 6,6$  (46).

## 2. Bestimmungsmethoden.

Es gibt zwei prinzipiell verschiedene Gruppen von Methoden, nach welchen man den Verlauf einer enzymatischen Proteolyse messen kann; die erste umfaßt diejenigen Verfahren, wobei man das unveränderte Substrat mißt, die zweite beruht auf der Messung der entstandenen Spaltprodukte. Beim Abbau der Proteine durch die verschiedenen Enzyme werden die hochmolekularen Eiweißstoffe bis zu ihren einfachsten Bausteinen, den Aminosäuren, zerkleinert. Für die Peptidasen, die Di- und Polypeptide angreifen, wußte man, daß sie die CO-NH-Bindung sprengen. Für die Proteasen, die native Eiweißkörper und deren höhere Abbauprodukte angreifen, wurde oft eine desaggregierende Wirkung, wobei Molekülkomplexe gesprengt werden sollten, neben einer rein chemischen Spaltung angenommen (2, 7, 60). Doch ist für die Beispiele des Pepsins (106, 107), Trypsins (104), Papains (104, 124) und der Hefeproteinase (22, 24) gezeigt worden, daß auch hier die Enzymwirkung in der Auf-

<sup>1</sup> Werte der  $p_H$ 's schwankend zwischen 5,9 und 6,6.

<sup>2</sup> Werte der  $p_H$ 's schwankend zwischen 5,9 und 6,3.



spaltung von Peptidbindungen besteht<sup>1</sup>, wobei also COOH und NH<sub>2</sub> in gleichem Maße freikommen. Für die Untersuchung der Enzymwirkung durch Messung der entstehenden Spaltprodukte kann man daher zwei Wege einschlagen und entweder die freigewordene COOH- oder die NH<sub>2</sub>-Gruppe bestimmen. Das letztere wird getan von LINDERSTRÖM-LANG (49) bei der acidimetrischen Titration der Aminogruppen in Gegenwart von Aceton und durch das gasanalytische Verfahren nach v. SLYKE (72, 73, auch RONA, 65); dieses beruht auf der Tatsache, daß bei der Reaktion der freiwerdenden Aminogruppen mit salpetriger Säure nach der Gleichung:  $R\text{NH}_2 + \text{HNO}_2 = R\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$  Stickstoff freikommt, der dann gasvolumetrisch gemessen wird.

Für die Bestimmung der freigewordenen COOH-Gruppen andererseits kann man entweder die Formoltitration nach SÖRENSEN (74) benutzen, wobei NH<sub>2</sub> durch Formaldehyd neutralisiert, und dann die COOH-Gruppe acidimetrisch titriert wird, oder die Alkoholtitration nach WILLSTÄTTER (112, 134) ausführen, wobei durch den Alkohol die basischen Eigenschaften der Aminogruppe zurückgedrängt werden und die COOH-Gruppe acidimetrisch bestimmt werden kann.

Von diesen vier Verfahren wurden das zweite, nach v. SLYKE, und das vierte, nach WILLSTÄTTER hier benutzt. Die alkoholische Titration wurde von WILLSTÄTTER und seinen Schülern verbessert (131, 136, 103, 19, 88) und von GRASSMANN (25) in einer Mikroausführung angegeben, die hier zur Ersparnis von Material benutzt wurde und sich als sehr zuverlässig erwies. Neuerdings wurde von LINDERSTRÖM-LANG (52) eine Mikromodifikation beschrieben, die es gestattet, bei Titration von sehr geringen Mengen, und zwar 0,000056 mg Aminostickstoff ( $\frac{1}{10}$  der Menge bei GRASSMANN angegeben) eindeutige Ergebnisse zu bekommen.

Die Verfolgung der Adsorptions- und Elutionsprozesse geschah mit Hilfe der alkoholischen Mikrotitrationsmethode, die Bestimmung der p<sub>H</sub>-Kurven hauptsächlich mit dem Mikro-v. SLYKE, teilweise auch mit der Alkoholtitrierung.

#### *A. Bestimmung der Proteinase mit Casein.*

Aus einem Ansatz von 2 ccm, enthaltend 60 mg Casein, 0,8 ccm Pufferlösung  $\frac{1}{5}$  mol.<sup>2</sup> (für die späteren Adsorptionsversuche 0,5 ccm), und 0,2 ccm Rohextrakt, p<sub>H</sub> = 6,2 (der das Optimum darstellt, siehe folgenden Abschnitt) wurden 0,5 ccm mittels einer Kapillarmeißpipette entnommen und titriert (Kontrolle), der

<sup>1</sup> Siehe dagegen die Befunde von RONA u. MISLOWITZER (66), durch welche eine Molekülzerkleinerung ohne COOH-Zuwachs durch Trypsin gezeigt wurde.

<sup>2</sup> Die Caseinlösung wurde in der Weise hergestellt, daß 6 g Casein gelöst wurden in 6 ccm 1 n NaOH + einige Kubikzentimeter destillierten Wassers (unter kräftigem Schütteln und bei Zugabe von einigen Tropfen Octylalkohol zur Verhinderung übermäßigen Schäumens) und auf ungefähr 20 ccm aufgefüllt mit destilliertem Wasser. Darauf wurde mit 80 ccm (und weil es sich als genügend erwies, später mit 50 ccm)  $\frac{1}{5}$  mol. Pufferlösung, deren Zusammensetzung



Ansatz sofort in den Thermostaten von 30° C gestellt und 4 Stunden darin gelassen, darauf zur Bestimmung wieder 0,5 ccm titriert. Zur Titration wurde zu dieser Probe von 0,5 ccm 5 Tropfen einer 0,1%igen alkoholischen Thymolphthaleinlösung zugefügt, und darauf mit 1/100 n 90% alkoholische Lauge bis zur

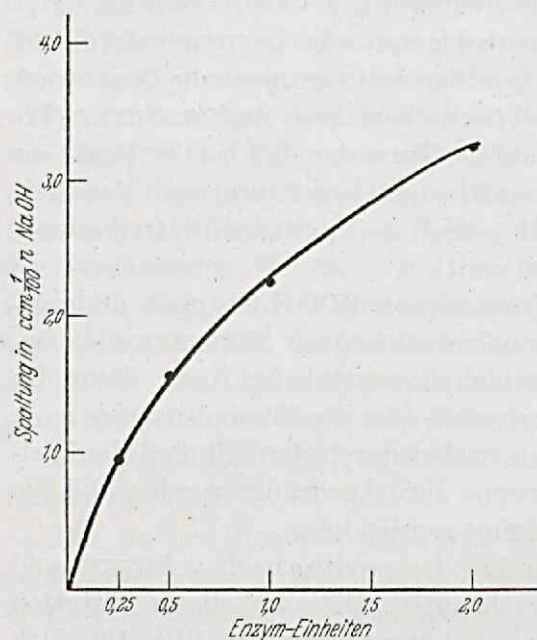


Abb. 1. Maja-Proteinasemenge und Spaltungsgrad.

deutlichen Blaufärbung titriert; dann wurde das 9fache Volumen (4,5 ccm) kochenden absoluten Alkohols zugegeben, wodurch die blaue Farbe verschwindet und wieder bis zum Endpunkt titriert; die hier auftretende Farbe läßt sich mit einer 1/400 mol.  $\text{CuCl}_2$ -Lösung in überschüssigem Ammoniak vergleichen. Die Titration findet am besten beim Licht einer Tageslichtlampe (200 Kerzen) statt, im Innern eines weißbekleideten Kastens.

Der Titrationsfehler ist nach GRASSMANN (25) für eine Titrationsprobe von 0,2 ccm auf 0,005 ccm 1/100 n NaOH zurückzubringen; nach einiger Übung war hier, bei einer Titrationsprobe von 0,5 der Fehler der Titration 0,02 ccm 1/100 n NaOH.

Bei Bestimmungen mit verschiedenen Enzymmengen (1:8) in einer bestimmten Zeit stellte es sich heraus, daß keine direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz besteht (siehe Tabelle 1); auch eine einfache Beziehung zwischen Zeit und Umsatz ist hier nicht aufgefunden worden, wie aus Tabelle 1 hervorgeht und wie es auch für die Proteinspaltung durch andere Proteasen (Trypsin [136], Papain [121] und Milzprotease [94]) gefunden worden war.

Tabelle 1. Zeitlicher Verlauf der Caseinspaltung mit verschiedenen Enzymmengen. Spaltung von 15 mg Casein in 0,5 ccm bei 30° C während 6 Stunden, Kaliumbiphtalatpuffer,  $p_H$  des Ansatzes = 6,2; Spaltung in ccm 1/100 n KOH.

Enzymmenge in ccm Rohextrakt	Reaktionsdauer in Stunden					
	1/2	1	1 1/2	2	4	6
	Zunahmen in 1/100 n KOH vom Anfang an gerechnet					
0,0125	—	—	—	—	0,94	1,17
0,025	0,58	0,83	1,15	1,38	1,56	1,83
0,05	1,00	1,28	1,60	—	2,25	2,56
0,10	2,00	2,18	2,45	—	3,25	3,70

Die Bestimmungsmethode beruht auf der Messung der Spaltungen, welche in einer bestimmten Zeit, und zwar 4 Stunden, von verschiedenen in einem Kontrollversuch bestimmt worden war, auf 100 ccm aufgefüllt. (Um im Ansatz den  $p_H$  = 6,2 zu erzielen, wurde 80 ccm bzw. 50 ccm 1/5 n Kaliumbiphtalat-Natronlauge vom  $p_H$  = 5,8 zugegeben.) Jeder Ansatz von 2 ccm enthielt 1 ccm dieser Mischung.



Enzymmengen hervorgerufen wurden; als vorläufiges Maß für die Menge der *Maja*-Proteinase, die zur Kontrolle ihres Verhaltens bei der adsorptiven Trennung von den anderen proteolytischen Enzymen dienen soll, ist die (*Maja*-) *Proteinase-Einheit* eingeführt worden. Sie wurde angenommen als diejenige Enzymmenge, welche unter den Bestimmungsbedingungen (Vol. 0,5 ccm, 15 mg Casein, 30° C,  $p_H = 6,2$ ) in 4 Stunden eine Spaltung von 2,25 ccm 1/100 n KOH bewirkt; sie ist in 0,05 ccm des Rohextraktes vorhanden. Die mit Enzymmengen 1 : 8 in 4 Stunden erzielten Spaltungen (siehe Tabelle 1) sind in der Abb. 1 zusammengestellt, so daß man aus dem jeweils unter den Bestimmungsbedingungen gefundenen Spaltungswert die Menge des vorhandenen Enzyms mittels der Kurve ableiten kann.

Es sind aber noch künftige eingehendere kinetische Messungen notwendig, um diese vorläufige Einheit durch eine allgemeinere zu ersetzen.

#### *B. Bestimmung der Carboxypolypeptidase.*

Carboxypolypeptidase, das polypeptidspaltende Enzym, das nur diejenigen Polypeptide spaltet, in denen eine freie COOH-Gruppe anwesend ist, ist bisher gefunden worden als tryptische Carboxypolypeptidase vermischt mit tryptischer Proteinase, und davon getrennt worden (100) (das Enzym ist durch Enterokinase aktivierbar) und als katheptische Carboxypolypeptidase in den Organen der Vertebraten, aktivierbar durch Zookinase, HCN oder H<sub>2</sub>S (105) und in den farblosen Blutkörperchen (117).

Für die Bestimmung einer eventuellen Carboxypolypeptidase bei *Maja* wurde hier als Substrat Chloracetyl-1-tyrosin<sup>1</sup> benutzt, das nach WALDSCHMIDT-LEITZ zu den Substraten der bekannten Carboxypolypeptidasen zählt (98, 99, 100, 105). Es wurde eine geringe, doch deutliche Spaltung gefunden.

Zur Bestimmung (mit der alkoholischen Mikrotitration) kamen aus einem Ansatz von 2 ccm, enthaltend 0,4 ccm Chloracetyltyrosinlösung (11,3 mg = 4/100 Millimol Substrat), 0,8 ccm Pufferlösung 1/5 mol.<sup>2</sup> und 0,2 ccm Rohextrakt,  $p_H = 6,2$ , jedesmal 0,5 ccm zur Titration zur Anwendung. (Der  $p_H = 6,2$  war willkürlich; eine Bestimmung der  $p_H$ -Optimumkurve fand nicht statt.)

Die 0,5 ccm Titrationsprobe wurde dem Gemisch mit einer Kapillarmeißpipette entnommen, nach Zugabe von 5 Tropfen einer 0,1%igen alkoholischen Thymolphthaleinlösung bis zu deutlicher Blaufärbung titriert, darauf 4,5 ccm absoluter Alkohol zugegeben, und wieder bis zum Endpunkt titriert. (Zweckmäßig soll die Größe der Spaltung so gewählt werden, daß das abgespaltene Tyrosin in Lösung bleibt, weil es sonst die Titration unmöglich macht.)

Bei Bestimmungen mit verschiedenen Enzymmengen stellte es sich heraus, daß eine Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz in einer bestimmten Zeit besteht (Tabelle 2), wenigstens für Spaltungen bis ungefähr 60% (0,60 ccm 1/100 n KOH).

<sup>1</sup> Für die Überlassung von 4 g dieses Präparates bin ich Herrn Privatdozent Dr. A. SCHÄFFNER zu Prag zu vielem Dank verpflichtet.

<sup>2</sup> Um im Ansatz den  $p_H = 6,2$  zu erzielen, wurde 0,8 ccm 1/5 n Natriumborat-Salzsäure vom  $p_H = 6,54$  zugegeben; diese Zusammensetzung war in einem Vorversuch ermittelt worden.



Messungen zur Verfolgung des Reaktionsverlaufes wurden nicht gemacht. Als (*Maja*)-Carboxypolypeptidase-Einheit, die daher nur als eine vorläufige anzusehen ist, und nur zur Verfolgung der Adsorptionen dienen

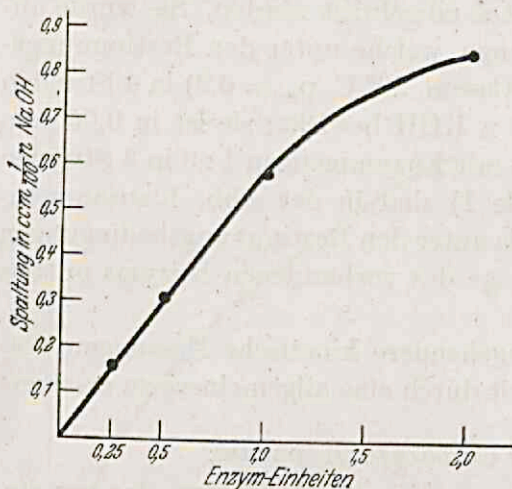


Abb. 2. *Maja*-Carboxypolypeptidasemenge und Spaltungsgrad.

Tabelle 2. Enzymmenge und Umsatz. Spaltung von 2,58 mg = 1/100 Millimol Chloracetyltyrosin in 0,5 cem bei 30° C während 6 Stunden, Natriumboratpuffer,  $p_H$  des Ansatzes = 6,2; Aciditätszuwachs in cem 1/100 n KOH.

Enzymmenge in cem des Rohextraktes	Aciditätszuwachs in cem 1/100 n KOH
0,0125	0,16
0,025	0,31
0,05	0,58
0,10	0,85

soll, ist diejenige Enzymmenge gewählt, die unter den Bestimmungsbedingungen (Vol. 0,5 cem, 2,575 mg. Chloracetyltyrosin, 30° C,  $p_H$  = 6,2, 6 Stunden) eine Spaltung von 0,58 cem 1/100 n KOH bewirkt; sie ist in 0,05 cem des Rohextraktes vorhanden.

Die Beziehung zwischen dem gemessenen Umsatz und der Enzymmenge veranschaulicht die Kurve in der Abb. 2, die auf den Messungen der Tabelle 2 beruht.

### C. Bestimmung der Aminopolypeptidase.

Aminopolypeptidase, das polypeptidsplattende Enzym, dessen Anlagerung an die freie Aminogruppe der Peptide erfolgt (WALDSCHMIDT-LEITZ, 105), ist in Pankreas- und Darmerepsin (92, 6), in der Magenschleimhaut (117), in den farblosen Blutkörperchen (118, 119), in tierischen Organen (105) und Blutserum (25) sowie im Hefepreßsaft (19, 20, 21, 22) nachgewiesen worden; auch konnte KRÜGER (43) im Magensaft von *Astacus* und im Mitteldarmdrüsenextrakt von *Ciona* eine Wirkung auf Leucyldiglycin nachweisen.

Die Bestimmung einer eventuellen Aminopolypeptidase bei *Maja* fand mit Leucyldiglycin<sup>1</sup> bei dem optimalen  $p_H$  = 8,2 (siehe nächsten Abschnitt) statt.

Zur Bestimmung (mit der alkoholischen Mikrotitration) kamen aus einem Ansatz von 2 cem, enthaltend 0,4 cem. Leucyldiglycinlösung (19,6 mg = 8/100 Millimol Substrat), 0,8 cem Pufferlösung 1/5 mol.<sup>2</sup> und 0,2 cem Rohextrakt,

<sup>1</sup> Das mir freundlichst von Herrn Privatdozent Dr. A. SCHÄFFNER in Prag überlassen wurde.

<sup>2</sup> In einem Vorversuch wurde die Zusammensetzung des Puffers bestimmt, der im Ansatz den  $p_H$  = 8,2 erzielt; der gefundene Puffer war Glycocoll-NaOH von einem  $p_H$  = 12,39.



$p_H = 8,4$ , jedesmal 0,5 ccm zur Titration zur Anwendung. Die Titration fand, wie für die Chloracetyltyrosinspaltung beschrieben, statt.

Es ergab sich bei Bestimmungen mit verschiedenen Enzymmengen, daß eine Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz in einer bestimmten Zeit besteht (Tabelle 3), wenigstens für die Spaltungen bis ungefähr 60% (auf eine

Tabelle 3. *Enzymmenge und Umsatz.*  
Spaltung von 4,9 mg = 2/100 Millimol Leucyldiglycin, in 0,5 ccm bei 30° C, während 6 Stunden, Glycoco-Puffer,  $p_H$  des Ansatzes = 8,2; Spaltung in ccm 1/100 n KOH.

Enzymmenge in ccm des Rohextraktes	Aciditätszuwachs in ccm 1/100 n KOH
0,0125	0,30
0,025	0,57
0,05	1,11
0,10	1,74

Bindung bezogen, d. h. 1,20 ccm 1/100 n KOH). Weitere kinetische Messungen wurden nicht gemacht, die aufgestellte Einheit ist also nur als vorläufige zu betrachten.

Als (*Maja*)-Aminopolypeptidaseeinheit wurde diejenige Enzymmenge gewählt, die unter den Bestimmungsbedingungen (Vol. 0,5 ccm, 4,9 mg Leucylglycylglycin, 30° C,  $p_H = 8,2$ , 6 Stunden) eine Spaltung von 1,10 ccm 1/100 n KOH bewirkt; sie ist in 0,05 ccm des Rohextraktes vorhanden.

Die Beziehung zwischen dem gemessenen Umsatz und der Enzymmenge veranschaulicht Abb. 3, die auf den Messungen der Tabelle 3 beruht, und mit deren Hilfe die Menge des vorhandenen Enzyms aus dem jeweils gefundenen Spaltungswert abgeleitet werden kann.

#### D. Bestimmung der Dipeptidase.

Die Dipeptidase, die im Pflanzen- und Tierreiche weit verbreitet ist, ist nur imstande, Dipeptide zu zerlegen. Ihre Wirkung wurde meistens bei früheren „Erepsinbestimmungen“ gemessen und dann als Erepsinwirkung angesehen. Ihre Einheitlichkeit ist in letzter Zeit bestritten worden (50, 53, 51, auch 27), siehe dazu Kapitel I.

Die Wirkung der Dipeptidase wurde hier nur gemessen an der Hydrolyse von Glycylglycin, bei dem optimalen  $p_H = 8,4$  (siehe nächsten Abschnitt).

Aus einem Ansatz von 2 ccm, enthaltend 0,4 ccm Glycylglycinlösung (10,56 mg = 8/100 Millimol Substrat), 0,8 ccm Pufferlösung 1/5 mol.<sup>1</sup> und

<sup>1</sup> Um im Ansatz den  $p_H = 8,4$  zu erzielen, wurde 0,8 ccm 1/5 n Glycoco-NaOH von einem  $p_H = 12,67$  zugegeben; diese Zusammensetzung war in einem Vorversuch ermittelt worden.

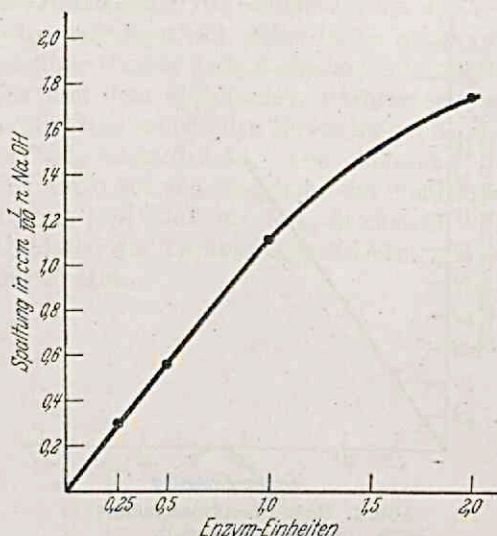


Abb. 3. *Maja*-Aminopolypeptidasemenge und Spaltungsgrad.



0,2 ccm Rohextrakt,  $p_H = 8,4$ , kamen jedesmal 0,5 ccm zur alkoholischen Titration, die, wie für die Chloracetyltyrosinspaltung beschrieben, stattfand, zur Anwendung.

Auch hier wurde, bei Bestimmungen mit verschiedenen Enzymmengen, gefunden, daß eine Proportionalität zwischen Enzymmenge und Umsatz in einer

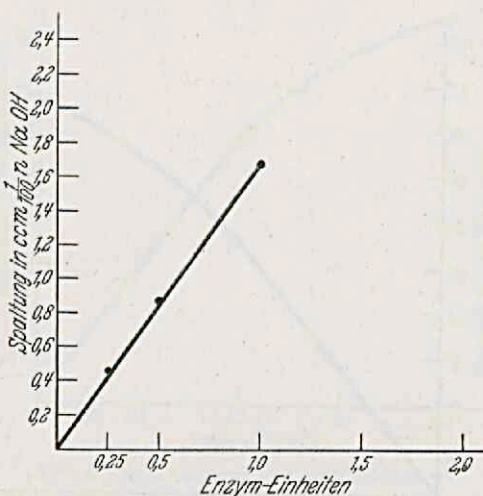


Abb. 4. *Maja*-Dipeptidasemenge und Spaltungsgrad.

Tabelle 4. *Enzymmenge und Umsatz*. Spaltung von 2,64 mg = 2/100 Millimol Glycylglycin in 0,5 ccm bei 30° C während 6 Stunden, Glycocol-Puffer,  $p_H$  des Ansatzes = 8,4; Aciditätszuwachs in ccm 1/100 n KOH.

Enzymmenge in ccm des Rohextraktes	Aciditätszuwachs in ccm 1/100 n KOH
0,0125	0,46
0,025	0,87
0,05	1,67
0,10	2,00

bestimmten Zeit besteht (Tabelle 4). (Weil bei der Spaltung durch 0,1 ccm Rohextrakt, das gesamte Substrat gespalten ist, ist dieser Punkt nicht

in die Kurve Abb. 4 eingetragen; die späteren Messungen [siehe Kap. III] fallen aber alle in den linearen Verlauf der Kurve.)

Messungen zur Verfolgung des Reaktionsverlaufes wurden nicht gemacht. Als (*Maja*)-Dipeptidaseeinheit, die daher nur als eine vorläufige anzusehen ist, und nur zur Verfolgung der Adsorptionen dienen soll, wurde diejenige Enzymmenge gewählt, die unter den Bestimmungsbedingungen (Vol. 0,5 ccm, 2,64 mg Glycylglycin, 30° C,  $p_H = 8,4$ , 6 Stunden) eine Spaltung von 1,67 ccm 1/100 n KOH bewirkt; sie ist in 0,05 ccm des Rohextraktes vorhanden.

Die Beziehung zwischen dem gemessenen Umsatz und der Enzymmenge veranschaulicht Abb. 4, die auf den Messungen der Tabelle 4 beruht.

### 3. Spezifität und $p_H$ -Optima des Rohextraktes.

#### A. Caseinspaltung bei verschiedenen $p_H$ .

Die Bestimmung der  $p_H$ -Abhängigkeit der Caseinspaltung fand mittels zweier Methoden statt, erstens mit dem gasanalytischen Verfahren nach v. SLYKE, und zwar in dem Mikroapparat (72, 73), zweitens mit der Alkoholtitration nach WILLSTÄTTER (136); die erste Methode hat den großen Vorteil, die Schwierigkeit der Eigenfärbungen der Lösungen, die bei Titrierungen oft störend wirken, ganz zu umgehen.

Zur Bestimmung im v. SLYKE-Apparat wurden 3,5 ccm einer 6%igen Caseinlösung<sup>1</sup> (210 mg Casein) mit 6 ccm Pufferlösung 1/5 mol. (meistens Phosphat-

<sup>1</sup> Bereitet wie auf S. 171, Fußnote 2, nur mit dest. Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.



puffer) vermischt und auf 30° C vorgewärmt. Darauf wurde 0,5 ccm Rohextrakt zugesetzt, sofort 2 ccm im v. SLYKE-Apparat „titriert“, und der Ansatz nach Entnahme einiger Kubikzentimeter zur elektrometrischen  $p_H$ -Bestimmung in den Thermostaten von 30° C gestellt. Nach 90 Min. wurden wieder 2 ccm dem Ansatz entnommen, im v. SLYKE-Apparat titriert und aus den beiden gefundenen Werten für die freigewordenen Stickstoffmengen die Menge des bei der Verdauung freigewordenen Aminostickstoffes berechnet mit Hilfe der in RONA (65) gegebenen Tabellen für die Dichte des über Wasser aufgefangenen Stickstoffes bei der jeweils abgelesenen Temperatur und dem abgelesenen Barometerstand. Zum Vergleich mit der alkoholischen Titration wurde der Zuwachs an Aminostickstoff in Kubikzentimeter 1/10 n  $NH_2$  ausgedrückt. Die Ablesung des Stickstoffs ist in dem Mikroapparat bis auf 0,001 ccm möglich; der Fehler der Titration ist nach KUPELWIESER u. SINGEL (48) 0,003 mg  $NH_2$ -Stickstoff, d. h. also 0,002 ccm 1/10 n  $NH_2$ . Die Schütteldauer des Verdauungsgemisches mit der salpetrigen Säure im Apparat war immer 20 Min.

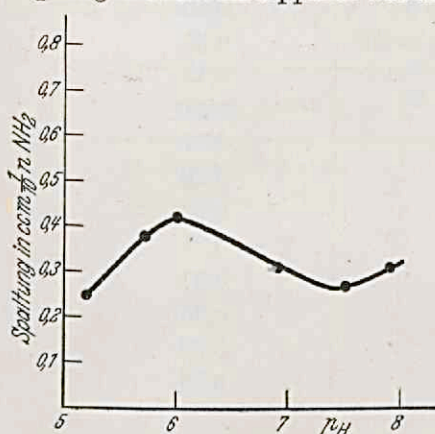


Abb. 5. Caseinspaltung durch Rohextrakt und Wasserstoffzahl.

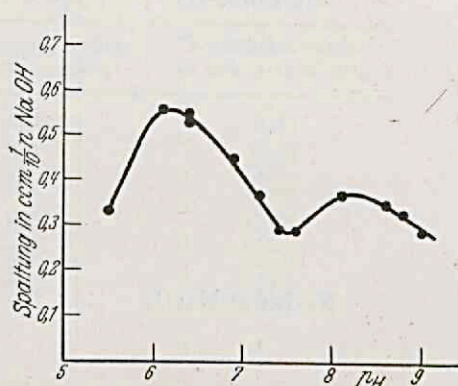


Abb. 6. Caseinspaltung durch Magensaft und Wasserstoffzahl.

Das Ergebnis der Bestimmung der Spaltungen bei verschiedenen  $p_H$  ist zusammen gestellt in Tabelle 5 und in der Kurve Abb. 5.

Tabelle 5. Caseinspaltung durch Rohextrakt und Wasserstoffzahl. 2 ccm : 42 mg Casein, 0,1 ccm Rohextrakt (2 Prot.-Einheiten), 1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol., 30° C, 90 Min. Titration im Mikro-v. SLYKE-Apparat.

Puffergemisch	$p_H$ des Ansatzes (elektrometrisch gemessen)	Aciditätszuwachs in ccm 1/10 n $NH_2$
Kaliumbiphtalat NaOH	5,2	0,25
$KH_2PO_4$ , $Na_2HPO_4$	5,7	0,38
„ „	6,0	0,42
„ „	6,9	0,31
„ „	7,5	0,27
„ „	7,9	0,31

Die  $p_H$ -Abhängigkeit der Caseinspaltung durch Magensaft wurde mit der Alkoholtitration untersucht; hierbei wurden aus einem gleichen Ansatz wie oben (nur wurde 0,1 ccm Magensaft statt 0,1 ccm Rohextrakt verwandt) 2 ccm in ein Gemisch von 1 ccm abs. Alkohol und 3 ccm Aqua dest. unter Zufügung von



0,5 ccm 0,5% Thymolphthalein gebracht, und mit 1/10 n 90% alkoholischer Lauge titriert; darauf nach Zugabe von 24 ccm siedenden abs. Alkohol die Titration zu Ende geführt. Der Titrationsfehler ist nach einiger Übung ungefähr 0,05 ccm 1/10 n NaOH.

Das Ergebnis ist zusammengestellt in Tabelle 6 und in der Kurve Abb. 6.

Tabelle 6. *Caseinspaltung durch Magensaft und Wasserstoffzahl.* 2 ccm : 42 mg Casein, 0,1 ccm Magensaft 1 : 4 (ungefähr 3 Prot.-Einheiten), 1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol., 30° C, 90 Min. Alkoholische Titration.

Puffergemisch	p <sub>H</sub> des Ansatzes colorimetrisch gemessen	Aciditätszuwachs in 1/10 n NaOH
K-Biphtalat-NaOH	5,5	0,33
„ „	6,1	0,56
„ „	6,4	0,53
Na-Borat-HCl	6,4	0,55
„ „	6,9	0,45
„ „	7,0	0,41
„ „	7,2	0,37
„ „	7,4	0,29
„ „	7,6	0,29
„ „	7,7	0,31
„ „	8,1	0,37
„ „	8,6	0,35
Na-Borat-NaOH	8,8	0,33
„ „	9,0	0,29

Das p<sub>H</sub>-Optimum liegt für Rohextrakt und für Magensaft bei einem p<sub>H</sub> = ungefähr 6, wie es auch von SHINODA (69) für *Astacus*-Magensaft gefunden worden war (zwischen 5,6 und 6,5), im Gegensatz zu KRÜGER u. GRAETZ (45, 46), die das Optimum für *Astacus*-Magensaft bei 7—8 fanden, welch hohes Optimum sie auf die Anwesenheit von (bei alkalischer Reaktion wirkender) Peptidase neben der Proteinase zurückführten. In einer späteren Publikation gibt KRÜGER (43) das Optimum bei ungefähr 7 (6,8 bis 7,3) an.

Für die ungereinigte *Maja*-Proteinase liegt das Optimum eher im schwach sauren Gebiet, die Anwesenheit der Peptidase veranlaßte einen leichten Anstieg im alkalischen Gebiet, wodurch ein zweites niedriges Optimum entstand. (Für das Optimum der gereinigten Proteinase siehe Kapitel IV, Abschnitt 3.)

Die Kurven fallen nach der sauren Seite ziemlich steil ab, bei einem p<sub>H</sub> < 4 war keine Enzymwirkung nachweisbar.

#### *B. Gelatinespaltung bei verschiedenen p<sub>H</sub>.*

Die Bestimmung der Spaltungen wurde wieder für den Rohextrakt im Mikro-V. SLYKE (in ähnlicher Weise wie es für die Caseinspaltung be-



schrieben wurde) und für den Magensaft mit der alkoholischen Titration ausgeführt. Bei der alkoholischen Titration wurde die Titrationsprobe von 2 ccm in ein Gemisch von 2 ccm destilliertem Wasser und 4 ccm absolutem Alkohol gebracht, so daß die alkoholische Konzentration 50% betrug, nach Zugabe von 0,4 ccm 0,5% Thymolphthalein mit 1/10 n 90% alkoholischer Lauge titriert, darauf nach Zugabe von 35 ccm siedendem absoluten Alkohol wieder bis zum Endpunkt titriert (136).

Das Ergebnis ist zusammengestellt in den Tabellen 7 und 8 und den Kurven Abb. 7 und 8.

Tabelle 7. *Gelatinespaltung durch Rohextrakt und Wasserstoffzahl*. 2 ccm : 40 mg Gelatine (0,4 ccm 10%iger Lösung, im Thermostaten 30° C flüssig gehalten), 0,1 ccm Rohextrakt, 1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol., 30° C, 90 Min. Titration im Mikro-v. SLYKE-Apparat.

Puffergemisch	p <sub>H</sub> des Ansatzes elektrometrisch gemessen	Aciditätszuwachs in ccm 1/10 n NH <sub>2</sub>
K-Biphtalat-NaOH	4,9	0,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,3	0,53
" "	6,1	0,74
" "	6,2	0,72
" "	6,7	0,70
" "	7,5	0,60

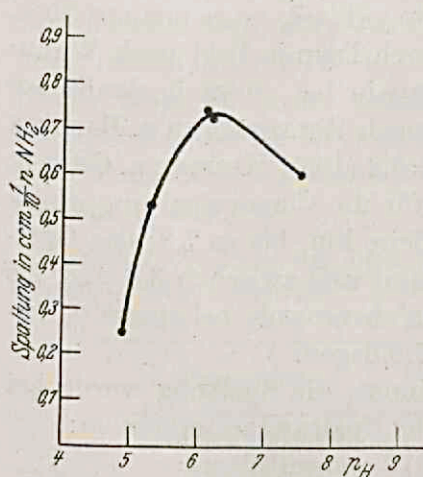


Abb. 7. Gelatinespaltung durch Rohextrakt und Wasserstoffzahl.

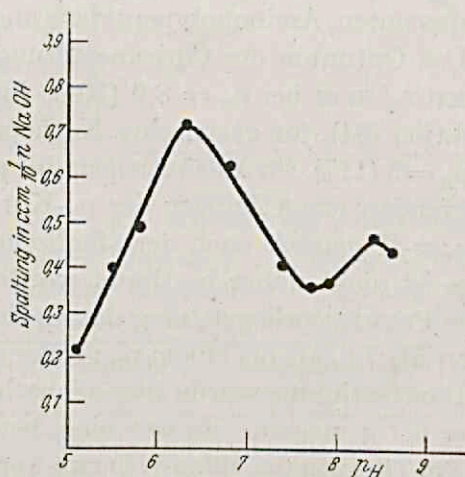


Abb. 8. Gelatinespaltung durch Magensaft und Wasserstoffzahl.

Das p<sub>H</sub>-Optimum der Gelatinespaltung durch Rohextrakt und Magensaft liegt also bei einem p<sub>H</sub> = 6,1—6,3, wie es auch von SHINODA für *Astacus*-Magensaft gefunden wurde (ungefähr 6,5).

Auch hier ist der leichte Anstieg auf der alkalischen Seite deutlich zu erkennen.



Tabelle 8. *Gelatinespaltung durch Magensaft und Wasserstoffzahl*. 2 ccm : 40 mg Gelatine (0,4 ccm 10%iger Lösung, im Thermostaten 30° C flüssig gehalten), 0,1 ccm Magensaft 1:4 (ungefähr 3 Prot.-Einheiten), 1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol., 30° C, 90 Min., alkoholische Titration.

Puffergemisch	p <sub>H</sub> des Ansatzes colorimetrisch gemessen	Aciditätszuwachs in ccm 1/10 n NaOH
K-Biphtalat-NaOH	5,1	0,22
„ „	5,5	0,40
„ „	5,8	0,49
„ „	6,3	0,72
Na-Borat-HCl	6,8	0,63
„ „	7,1	0,51
„ „	7,4	0,41
„ „	7,7	0,36
„ „	7,9	0,37
„ „	8,4	0,47
„ „	8,6	0,44

### C. Spaltbarkeit von Clupein<sup>1</sup>.

Clupein, das Protamin aus Heringssperma, ist für Pepsin unangreifbar (KOSSEL, 40), von Trypsin wird es angegriffen, und zwar sowohl von der Carboxypolypeptidase als von der Proteinase; von dieser letzten nur nach Aktivierung mit Enterokinase (101). Ebenso wird es von aktiviertem Papain gespalten (105) und auch vom Kathepsin (117, 105), und zwar im letzten Falle sowohl von der aktivierten Proteinasefraktion als von der aktivierten Carboxypolypeptidase. Für die beiden „Erepsin“-komponenten, Aminopolypeptidase und Dipeptidase, ist es unangreifbar.

Das Optimum der Clupeinspaltung durch Trypsin liegt nach WALDSCHMIDT-LEITZ bei p<sub>H</sub> = 8,9 (104), für Papain bei schwach alkalischer Reaktion (64), für gastrisches Kathepsin nach WILLSTÄTTER u. BAMANN bei p<sub>H</sub> = 5 (117), für Milzkathepsin bei p<sub>H</sub> = 5,2 (105). KRÜGER u. GRAETZ (46) fanden einen Anstieg der p<sub>H</sub>-Kurve für die Clupeinspaltung durch *Astacus*-Magensaft nach der alkalischen Seite hin, bis zu 7,8; das Optimum ist nicht näher bestimmt worden, und weil zwischen 3,6 und 7,8 keine Punkte vorliegen, mag das Optimum ebensowohl bei einem p<sub>H</sub> geringer als 7,8, als bei einem p<sub>H</sub> größer als 7,8 liegen.

Das Optimum wurde hier nicht bestimmt, die Spaltung wurde bei p<sub>H</sub> = 6,2 gemessen. Es war eine deutliche Spaltung zu erkennen:

Pro Titration (im Mikro-v. SLYKE-Apparat) 2 ccm enthaltend:

0,1 ccm Rohextrakt (2 Prot.-Einh.).

40 mg Clupeinsulfat.

1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol. (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). p<sub>H</sub> = 6,2. 30° C.

Aciditätszunahme in 90 Minuten . . . . . 0,37 ccm 1/10 n NH<sub>2</sub>

„ „ 4 Stunden . . . . . 0,95 ccm 1/10 n NH<sub>2</sub>

Bei einem p<sub>H</sub> = 8,2 war die Aciditätszunahme in

4 Stunden . . . . . 0,61 ccm 1/10 n NH<sub>2</sub>

<sup>1</sup> Für die Überlassung dieses Substrats bin ich Herrn Privatdozent Dr. A. SCHÄFFNER zu Prag zu Dank verpflichtet.



*D. Spaltbarkeit von Pepton.*

Nach SHINODA (69) ist das Optimum der Peptonspaltung durch *Astacus*-Magensaft für Pepton F  $p_H = 6,2$  und für Pepton WITTE  $p_H = 6,7$ . KRÜGER (46) fand das Optimum bei  $p_H = 7,6$  für Pepton (KAHLBAUM). Die  $p_H$ -Kurve wurde hier nicht bestimmt, nur wurde eine Spaltung von Pepton (Ex alb. Merck) durch Rohextrakt bei einem  $p_H = 6,2$  nachgewiesen.

Pro Titration (im Mikro-v. SLYKE-Apparat) 2 ccm enthaltend:

0,1 ccm Rohextrakt.

100 mg Pepton.

1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol. ( $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ).  $p_H = 6,2$ . Temperatur  $30^\circ C$ .

Aciditätszunahme in 90 Minuten . . . . . 0,55 ccm 1/10 n  $NH_2$

„ „ 4 Stunden . . . . . 1,48 ccm 1/10 n  $NH_2$

*E. Spaltung von Bindegewebe durch Magensaft bei verschiedenen  $p_H$ .*

Im Anschluß an SHINODAS (69) Angaben über das  $p_H$ -Optimum der Bindegewebsverdauung durch *Astacus*-Magensaft (bei ungefähr 6—7 titrimetrisch gemessen, bei  $p_H = 6,3$  colorimetrisch gemessen) wurde die  $p_H$ -Optimumkurve für die Spaltung von Ligamentum nuchae nochmals mit *Maja*-Rohextrakt titrimetrisch bestimmt; das Optimum (siehe Tabelle 9 und die Kurve Abb. 9) wurde gefunden bei  $p_H = 6,4$ , das für Trypsin liegt nach THOMAS u. SEYMOUR-JONES (78) bei  $p_H = 5,9$ .

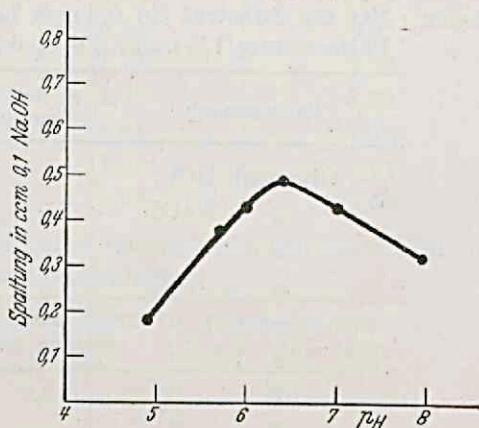


Abb. 9. Spaltung von Bindegewebe durch Magensaft und Wasserstoffzahl.

Tabelle 9. Spaltung von Bindegewebe durch Magensaft und Wasserstoffzahl. 3 ccm: 0,025 g Ligamentum nuchae, 0,25 ccm Magensaft 1 : 4, 2,5 ccm Pufferlösung 1/5 mol.,  $30^\circ C$ , Zeit 6 Stunden, alkoholische Titration.

Puffergemisch	$p_H$ des Ansatzes colorimetrisch gemessen	Aciditätszuwachs in ccm 1/10 n NaOH
K-Biphtalat-NaOH	4,9	0,18
Na-Borat-HCl	5,7	0,38
„ „	6,0	0,43
„ „	6,4	0,49
„ „	7,0	0,43
„ „	7,9	0,32

*F. Spaltung von Leucylglycylglycin durch Magensaft bei verschiedenen  $p_H$ .*

Das  $p_H$ -Optimum, das hier gefunden wurde (siehe Tabelle 10 und die Kurve Abb. 10) liegt bei  $p_H$  ungefähr 8,2, ebenso wie es von WALD-



SCHMIDT-LEITZ (105) für die Aminopolypeptidase aus Milz angegeben wird; für die Aminopolypeptidase aus dem Darmerepsin liegt es bei  $p_H = 8,0$  (92), für die der Hefe bei 6,7—7,0 (21, 22), für die aus Blut-

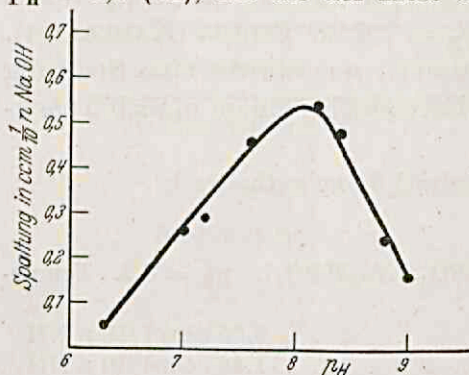


Abb. 10. Spaltung von Leucylglycylglycin durch Magensaft und Wasserstoffzahl.

serum bei 7,4—7,5 (26). KRÜGER (43) fand für die Spaltung von Glycocollesterchlorhydrat durch Mitteldarmdrüsenextrakt von *Aplysia* einen Anstieg der Kurve von der sauren Seite nach dem Neutralpunkt zu (leider ist die Kurve nicht nach der alkalischen Seite verfolgt worden); mit *Astacus*-Magensaft fand bei  $p_H = 6,9$  eine Spaltung dieses Substrates statt.

Tabelle 10. Spaltung von Leucylglycylglycin durch Magensaft und Wasserstoffzahl. 2 ccm : 19,6 mg Substrat (in 0,4 ccm Lösung), 0,2 ccm Magensaft 1:4, 1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol., 30° C, 6 Stunden, alkoholische Titration.

Puffergemisch	$p_H$ des Ansatzes colorimetrisch gemessen	Aciditätszuwachs in ccm 1/10 n NaOH
Glycocoll-HCl	6,3	0,05
„ NaOH	7,0	0,25
„ „	7,2	0,29
„ „	7,6	0,46
„ „	8,2	0,54
„ „	8,4	0,48
„ „	8,8	0,24
„ „	9,0	0,16

#### G. Glycylglycinspaltung bei verschiedenen $p_H$ .

Das Optimum für Rohextrakt (siehe Tabelle 11 A und die Kurve Abb. 11) und für Magensaft (siehe Tabelle 12 und die Kurve Abb. 12) liegt bei einem  $p_H = 8,4$ , also ein wenig mehr nach der alkalischen Seite hin als für die meisten untersuchten Dipeptidasen; für Milz (94, 105), Darm (103, 92), Pankreas (95) und Hefe (122) wird das Optimum bei  $p_H = 8,0$  angegeben; für das Enzym der Leukocyten gibt HUSFELDT (33) das  $p_H$ -Optimum bei 7,3 an; für die Dipeptidase, welche Papain begleitet, bei  $p_H = 7,6$  (5).

Für *Astacus*-Magensaft gibt SHINODA (69) das Optimum der Wirkung auf Dipeptide bei  $p_H = 9$  an, während KRÜGER (45) mit dem nämlichen Material arbeitend, das Optimum bei 7,3—8,0 findet. Für verschiedene Pulmonaten hat GRAETZ (17, 18) das Optimum bei 7,3 gefunden.

Weil nach SHINODA (69) die Autolyse von *Astacus*-Magensaft sehr bedeutend ist, und die Werte für die Dipeptidspaltung nur eine Fraktion



der bei der Autolyse gefundenen Werte darstellen (siehe dagegen KRÜGER (43), der fast keine Autolyse und eine bedeutende Dipeptidspaltung findet) wurde hier untersucht, inwieweit die Autolyse hier Einfluß hat. Die Titration wurde ausgeführt, wie für Glycylglycinspaltung, nur ohne Substrat; die für die Autolyse gefundenen Werte sind in der Tabelle 11 B zusammengestellt.

Tabelle 11 A. *Glycylglycinspaltung durch Rohextrakt und Wasserstoffzahl*. 10 ccm: 66 mg Glycylglycin (in 0,5 ccm Lösung), 0,5 ccm Rohextrakt, 4 ccm Pufferlösung 1/5 mol., 30° C, 6 Stunden, alkoholische Titration.

Puffergemisch	p <sub>H</sub> des Ansatzes elektrometrisch gemessen	Aciditätszuwachs in ccm 1/10 n NaOH gefunden	
			nach Korrektur für Autolyse s. Tab. 11 B
Glycocoll-HCl	6,1	0,10	0,10
„ NaOH	7,1	0,26	0,21
„ „	7,5	0,46	0,41
„ „	7,8	0,94	0,87
„ „	7,9	1,17	1,09
„ „	8,2	1,74	1,64
„ „	8,4	1,84	1,76
„ „	8,7	1,67	1,61
„ „	8,9	1,63	1,56

Tabelle 11 B. *Autolyse von Rohextrakt und Wasserstoffzahl*. Ansatz wie für Tabelle 10, nur ohne Substrat.

Puffergemisch	p <sub>H</sub> des Ansatzes elektrometrisch gemessen	Aciditätszunahme in ccm 1/10 n NaOH
Glycocoll-HCl	3,3	0,01
„ „	3,7	0
„ „	4,0	0,05
„ „	4,4	0,08
K-Biphtalat-NaOH	4,8	0,03
„ „	5,1	0,02
„ „	5,8	0,03
Glycocoll	6,1	0
K-Biphtalat-NaOH	6,2	0,02
Na-Borat-HCl	6,5	0,05
„ „	6,8	0,06
„ „	7,3	0,04
Glycocoll-NaOH	7,5	0,05
„ „	7,8	0,07
Na-Borat-HCl	7,9	0,08
Glycocoll-NaOH	8,2	0,10
„ „	8,4	0,08
„ „	8,6	0,06
„ „	8,8	0,07



Die gefundenen Autolysewerte, die also nur sehr gering sind, wurden in der Tabelle 11 A in Rechnung gebracht; die in der letzten Spalte angegebenen Werte sind als Differenz der gefundenen Spaltungen und der gefundenen Autolysewerte berechnet; die Kurve Abb. 11 beruht auf diesen Zahlen. Auf die Lage des  $p_H$ -Optimums oder auf die Form der Kurve hat die Autolyse aber keinen Einfluß.

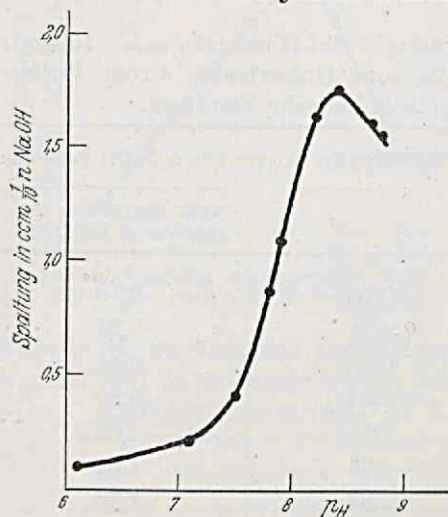


Abb. 11. Glycylglycinspaltung durch Rohextrakt und Wasserstoffzahl.

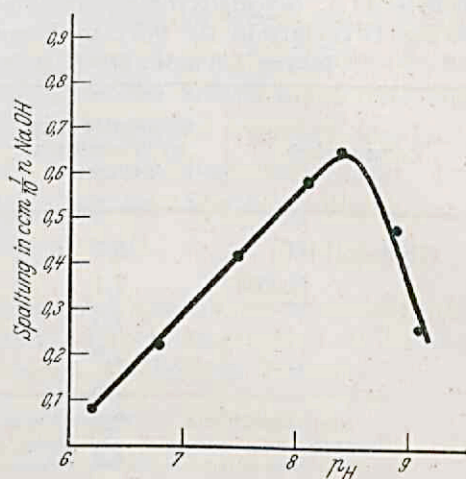


Abb. 12. Glycylglycinspaltung durch Magensaft und Wasserstoffzahl.

Auch mit dem v. SLYKE-Apparat wurde die Aciditätszunahme bei der Autolyse gemessen; die stärkste, wenn auch sehr geringe, Autolyse zeigte sich bei  $p_H = 8,1$ .

Die Spaltung von Glycylglycin durch Magensaft zeigte ein gleiches  $p_H$ -Optimum bei  $p_H = 8,4$  (siehe Tabelle 12 und Abb. 12).

Tabelle 12. Glycylglycinspaltung durch Magensaft und Wasserstoffzahl. 2 cem zu 10,56 mg Glycylglycin (in 0,8 cem Lösung), 0,2 cem Magensaft 1:4, 0,8 cem Pufferlösung 1/5 mol., 30° C, 6 Stunden, alkoholische Titration.

Puffergemisch	$p_H$ des Ansatzes colorimetrisch gemessen	Aciditätszunahme in cem 1/10 n NaOH
Glycocoll-HCl	6,2	0,08
„ NaOH	6,8	0,22
„ „	7,4	0,40
„ „	7,8	0,49
„ „	8,1	0,58
„ „	8,4	0,65
„ „	8,9	0,48
„ „	9,1	0,26

#### 4. Versuche zur Aktivierung des Rohextraktes.

Um der Frage, ob und mit welcher der jetzt bekannten Proteinase das proteolytische *Maja*-Enzym zu vergleichen ist, näher zu kommen,



wurde versucht, den Rohextrakt mit einem der jetzt bekannten Aktivatoren zu prüfen. Als Aktivatoren sind bekannt:

1. Enterokinase, für die tryptische Proteinase (und auch die tryptische Carboxypolypeptidase) (86, 87, 97, 100).

2. Zookinase, für die katheptische Proteinase aus Geweben (und auch für die katheptische Carboxypolypeptidase) (93, 94, 105).

3. Phytokinase, für Hefeproteinase (22) und für Papain (4, 5).

4. HCN und  $H_2S$ , welche für Kathepsin (93, 105), Papain (121, 4, 5) und Hefeproteinase (22) die natürlichen Aktivatoren zu ersetzen vermögen.

Von diesen wurden die Zookinase (129, 130) und die Phytokinase (28) mit der reduzierten Form des Glutathions identisch gefunden, auch kann ihre Wirkung durch Cystein ersetzt werden, dagegen die Wirkung der Enterokinase durch Cystin<sup>1</sup>.

Von diesen Aktivatoren wurde die Wirkung von Enterokinase, Zookinase, HCN und  $H_2S$  auf die Protease von *Maja* geprüft.

#### a) Versuche mit HCN und $H_2S$ .

Zur Aktivierung mit HCN wurde zu 5 ccm des Rohextraktes 2 ccm 5%ige HCN-Lösung zugegeben (5% KCN mit HCl auf  $p_H = 4$  gebracht) und das Gemisch 3 Stunden im Thermostaten bei 30° C belassen, dann neutralisiert und zu 10 ccm aufgefüllt (also Rohextrakt 1:1). Für den Rohextrakt ohne Zusatz, der als Kontrolle dienen soll, wurde 5 ccm mit 2 ccm angesäuertem destilliertem Wasser, die nämliche Zeit bei 30° C gelassen, darauf auch auf 10 ccm verdünnt.

$H_2S$  wurde aus einem Kippapparat während  $1/2$  bzw. 1 bzw.  $1 1/2$  Stunden durch die Enzymlösung geführt, darauf neutralisiert und auch hier auf die Verdünnung 1:1 gebracht.

Tabelle 13. Versuch zur Aktivierung des Rohextraktes mit HCN und  $H_2S$ . 2 ccm: 40 mg Gelatine (0,4 ccm 10%ige Lösung, im Thermostaten 30° C flüssig gehalten), 0,2 ccm Rohextrakt 1:1 (2 Prot.-Einheiten), 1,2 ccm Phosphatpufferlösung 1/5 mol.,  $p_H = 6,1$  (Opt.  $p_H$ ), 30° C, 90 Min. Titration im Mikro-v. SLYKE-Apparat.

Enzymlösung	Zeit der Aktivierung in Stunden	Aciditätszunahme in ccm 1/10 n $NH_2$
Rohextrakt + $H_2O$	—	0,71
„ $H_2S$	$1/2$	0,54
„ „	$1/2$	0,50
„ „	1	0,21 <sup>2</sup>
„ „	$1 1/2$	0,17
Rohextrakt + $H_2O$	—	0,57
„ HCN <sup>3</sup>	3	0,51

<sup>1</sup> Siehe aber Fußnote S. 167.

<sup>2</sup> In der vorläufigen Mitteilung (53a) wurde diese Zahl versehentlich als 0,51 angegeben.

<sup>3</sup> In der vorläufigen Mitteilung versehentlich als „ $H_2S$ “ bezeichnet.



Mit  $H_2S$  findet eine beträchtliche Verminderung der Enzymwirkung statt, die wohl auf Enzymzerstörung zurückzuführen ist. Die verminderte Enzymwirkung nach 3stündiger Aktivierung mit HCN scheint größtenteils auf den Einfluß der sauren Reaktion zurückzuführen zu sein.

Von einer Aktivierung mit HCN und mit  $H_2S$  ist keine Rede.

#### *b) Versuche mit Enterokinase.*

Ein Enterokinasepräparat wurde aus getrockneter Darmschleimhaut bereitet nach WALDSCHMIDT-LEITZ (87) (und zwar S. 239, auch in RONA [65], und zwar S. 263). Nach der Fällung mit Gerbsäure wurde die Mutterlauge (mit 30 ccm Kaolin 2,64 g) adsorbiert und darauf mit 100 ccm 0,05 n Ammoniak eluiert.

Diese Elution ist erepsinfrei, eine Erepsinbestimmung nach WALDSCHMIDT-LEITZ (103) ausgeführt (10 ccm, 132 mg Glycylglycin, 5 ccm 1/5 mol. Phosphatpuffer, 1 ccm der Enterokinaselösung,  $p_H = 7,8$ ,  $30^\circ C$ , Titration nach Zugabe von 130 ccm Methylalkohol mit 1/10 n 90%igem alkoholischen NaOH), ergab in 6 Stunden einen Aciditätszuwachs = 0,0 ccm 1/10 n NaOH.

Um den Enterokinasegehalt dieser Elution zu bestimmen, wurde 1 g Pankreastrocknenpulver mit 16 ccm Glyzerin, 87%ig, 5 Stunden lang im Thermostaten bei  $30^\circ C$  extrahiert, darauf zentrifugiert. 5 ccm dieser Lösung wurden mit 25 ccm Wasser verdünnt und nochmals zentrifugiert. An dieser Enzymlösung wurden Trypsinbestimmungen ausgeführt nach WILSTÄTTER u. WALDSCHMIDT-LEITZ (136), und zwar eine ohne und eine nach Aktivierung durch die Enterokinaselösung.

Eine Trypsinbestimmung ohne Aktivierung ergab (10 ccm : 300 mg Casein, 2 ccm 1 n  $NH_4Cl - NH_4OH$ -Puffer 1 : 1, 2,5 ccm Trypsinlösung,  $p_H = 8,9$ ,  $30^\circ C$ ) in 20 Min. eine Aciditätszunahme von 0,57 ccm 1/10 n NaOH.

Nach Aktivierung während 30 Min. bei  $30^\circ C$  mit 0,5 ccm der Enterokinaselösung ergab eine ähnliche Bestimmung in 20 Min. eine Aciditätszunahme von 3,01 ccm 1/10 n NaOH.

Die Zunahme der Spaltung durch 0,5 ccm Enterokinase war also: 2,44 ccm 1/10 n NaOH.

Zur Aktivierung des Rohextraktes wurden 2 ccm Rohextrakt mit 4 bzw. 8 ccm der Enterokinase versehen und während  $1\frac{1}{2}$  Stunde im Thermostaten bei  $30^\circ C$  belassen; zur Kontrolle wurden zu 2 ccm Rohextrakt 8 ccm destilliertes Wasser zugefügt und das Ganze die nämliche Zeit im Thermostaten gelassen. Dann wurden Casein- und Pufferlösung (auf  $30^\circ C$  vorgewärmt) zugegeben und nach Titration einer Kontrollprobe das Gemisch 4 Stunden im Thermostaten bei  $30^\circ C$  belassen.

Die gefundenen Werte sind in Tabelle 14 angegeben; es findet keine Wirkungssteigerung des Rohextraktes mit Enterokinase statt.



Tabelle 14. Versuch zur Aktivierung des Rohextraktes mit Enterokinase. 10 ccm zu 300 mg Casein (5 ccm 6%ige Lösung), 0,5 ccm Rohextrakt (10 Prot.-Einheiten) mit 2 ccm Aqua dest., bzw. 1, bzw. 2 ccm Enterokinase<sup>1/2</sup> Stunde bei 30° C belassen, 2 ccm Ammonchlorid-Ammoniakpuffer,  $p_H = 8,1$ , 30° C, 4 Stunden. Alkoholische Titration.

Enzymlösung	Aciditätszuwachs in ccm 1/10 n NaOH
Rohextrakt + H <sub>2</sub> O	3,54
Rohextrakt + 1 ccm Enterokinase	3,51
Rohextrakt + 2 ccm Enterokinase	3,51

### c) Versuche mit Zookinase.

Eine Zookinase<sup>1</sup>lösung wurde hergestellt nach den Angaben von WALDSCHMIDT-LEITZ (105) aus Schweineleber, und zwar wurden 300 g Schweineleber mit 500 ccm 96%igem Alkohol während <sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunde geschüttelt, dann der alkoholische Extrakt abgesaugt und der Rückstand wieder mit 500 ccm 70%igem Alkohol behandelt, die beiden alkoholischen Extrakte vereinigt und durch Eindampfen im Vakuum bei 30° C von Alkohol befreit, darauf mit Wasser auf 60 ccm aufgefüllt; diese trübe Lösung enthält den Aktivator.

Um ihre Wirksamkeit zu prüfen, wurde eine inaktive Kathepsinlösung nach WALDSCHMIDT-LEITZ (105) hergestellt aus mit Alkohol und Äther getrockneter Schweineleber; pro 1 g Trockengewicht wurde mit 10 ccm Glycerin, 87%, extrahiert.

Eine Kathepsinbestimmung nach WALDSCHMIDT-LEITZ (105) ausgeführt ergab (1,2 ccm : 18 mg Gelatine, 0,225 ccm Leberextrakt, 0,4 ccm Aqua dest. bzw. 0,4 ccm Zookinase<sup>1</sup>lösung, 0,25 ccm Acetatpuffer 1 n, 30° C,  $p_H = 4$ , Titration im Mikro-v. SLYKE-Apparat) in 24 Stunden die folgenden Werte:

Kathepsin ohne Zookinase . . .	0,04 ccm 1/10 n NH <sub>2</sub> ,
Zookinase allein . . . . .	0,01 ccm 1/10 n NH <sub>2</sub> ,
Kathepsin mit Zookinase . . . .	0,39 ccm 1/10 n NH <sub>2</sub> .

Hierauf wurde versucht, den Rohextrakt mit dieser Zookinase<sup>1</sup>lösung zu aktivieren:

10 ccm : 300 mg Casein, 0,5 ccm Rohextrakt (10 Prot.-Einheiten) mit 2 ccm dest. Wasser bzw. 2 ccm Zookinase <sup>1</sup> lösung versehen, 2 ccm Ammoniumchlorid-Ammoniak Puffer 1 n, $p_H = 8,1$ , 30° C, 4 Stunden, alkoholische Titration.	
Rohextrakt + H <sub>2</sub> O. Aciditätszunahme . . . . .	3,62 ccm 1/10 n NaOH,
Rohextrakt + Zookinase <sup>1</sup> lösung. Aciditätszunahme . . . . .	3,56 ccm 1/10 n NaOH.

Auch mit der Zookinase findet also keine Aktivierung statt.

## Kapitel III.

### Adsorptionsversuche.

#### 1. Einleitung. Adsorbentia und Eluentia.

Es galt hier, der Frage nach der Vielheit und der Natur der proteolytischen Enzyme bei niederen Tieren näher zu kommen mittels der in Kapitel I besprochenen Adsorptionsmethoden.



Als Adsorbentia wurden benutzt:

1. *Kaolin*, nach WILLSTÄTTER u. SCHNEIDER (133) bereitet.

500 g Böhmisches Kaolin<sup>1</sup> wurden mit 1,5 Liter reiner Salzsäure (spezifisches Gewicht 1,18) gut vermischt und erwärmt, zunächst so langsam, daß es einen Tag bis zum beginnenden Kochen dauerte, dann einen weiteren Tag zum lebhaften Sieden. Durch Verdünnen und wiederholtes Dekantieren trennt man die eisenhaltige Lösung vom Kaolin ab und wiederholte noch dreimal diese Behandlung mit Salzsäure, so daß im ganzen 14 Tage dazu nötig waren. Schließlich wird das Kaolin mit kaltem Wasser soweit ausgewaschen, daß das Wasser fast keine Säurereaktion mehr zeigt, während eine kleine Probe des Kaolins auf Lackmus noch stark saure Reaktion aufweist.

10 ccm dieser Kaolinaufschlammung hatte einen Gehalt von 0,88 g Kaolin.

2. *Tonerde Cy*. Eine Tonerdesuspension wurde bereitet nach der Vorschrift von WILLSTÄTTER u. KRAUT (125).

Die heiße Lösung von 500 g  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 + 18 \text{ H}_2\text{O}$  in 1 Liter Wasser wurde auf einmal in 6,5 Liter Ammoniumsulfat-Ammoniakwasser von 60° eingetragen. Dieses Reagens enthält 300 g Ammoniumsulfat und 430 ccm ungefähr 20%igen Ammoniak (d. h. 78,4 g statt berechnet 76,6 g Ammoniak). Dieser Überschuß ist nötig, die Lösung muß schwach alkalisch bleiben. Während des Fällens und einer weiteren Viertelstunde wird lebhaft gerührt, wobei man die Temperatur nicht unter 60° sinken läßt.

Die Fällung ist anfangs ungemein voluminös, und wird erst während des Rührens flockig.

Man verdünnt auf 40 Liter und dekantiert, wobei sich der Niederschlag zunächst rasch absetzt, klar, aber in ziemlich hoher Schicht. Um noch vorhandenes oder während des Auswaschens aus Ammoniumsulfat zurückgebildetes basisches Aluminiumsulfat vollends zu zerlegen, wird zum Waschwasser beim 4. Dekantieren 80 ccm 20% Ammoniak hinzugefügt. Nach häufigem Auswaschen (zwischen dem 12. und 20. Mal) wird die Waschflüssigkeit nicht mehr klar; von da an dekantiert man noch zweimal, wofür mindestens einige Tage erforderlich sind.

Dieses Präparat wurde einige Monate, bevor es zur Enzymadsorption verwendet wurde, bereitet.

Die erhaltene Tonerdesuspension, die in der Cy-Modifikation anwesend war (WILLSTÄTTER u. KRAUT, 126, 127), bildete eine weiße, flockige, etwas plastische Suspension.

10 ccm enthielten 145 mg  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

3. *Eisenhydroxyd*. Bereitung nach WILLSTÄTTER (128).

100 g Ferriammoniumalaun, in 200 ccm Wasser gelöst, werden bei gewöhnlicher Temperatur auf einmal unter lebhaftem Rühren in 800 ccm Ammoniak-Ammoniumsalzgemisch eingetragen, das 10,8 g (statt 10,6 g) Ammoniak mit 27,5 g Ammoniumsulfat enthielt. So entstand eine gleichmäßige, rotbraune Fällung, die noch eine halbe Stunde lang stark gerührt wurde. Dann wurde auf 4 Liter aufgefüllt und dekantiert, wobei sich das Gel anfangs langsam und in hoher Schicht, später rasch und niedrig absetzte. Nach den ersten Dekantierungen ist es zweckmäßig, zweimal einige Kubikzentimeter konzentriertes Ammoniak hinzuzufügen. Dadurch gelingt es, das Gel von einem noch recht beträchtlichen

<sup>1</sup> Das ich freundlichst von der Fabrik „de Porceleijne Flesch“ in Delft erhielt.



SO<sub>4</sub>-Gehalt zu befreien. Bei den letzten Malen (vom 10. Mal an) war das Waschwasser sehr trübe, es ließ sich beim 14. Mal vollständig von dem jetzt plastisch gewordenen Gel abgießen. (Sulfat war nun nicht mehr nachweisbar.)

10 ccm der Eisenhydroxydsuspension enthielt 0,309 g Trockengewicht.

Als *Eluentia* wurden benutzt:

1. 0,04 n NH<sub>4</sub>OH-Lösung, enthaltend 30% Glycerin.

2. 0,4% Dinatriumphosphat, 17% Glycerin.

3. Ungefähr 0,6% 2<sup>2</sup>/<sub>3</sub> Ammoniumphosphat (nach WILLSTÄTTER, 135, 86), bestehend aus 57 Volumenteilen 1%iges Diammoniumphosphat, 3 Teilen n NH<sub>3</sub>, 40 Teilen 87%iges Glycerin. Glyceringehalt also ungefähr 30%.

4. 0,05 n Phosphatgemisch (Pufferlösung p<sub>H</sub> = 8,2), 20% Glycerin.

5. 0,05 n Essigsäure.

## 2. Technik der Adsorption.

Das Verfahren zur Adsorption und Elution eines Enzyms ist folgendes:

In einen graduierten Meßzylinder wird eine bestimmte Menge einer Enzymlösung gebracht, mit ebensoviel destilliertem Wasser verdünnt und aus einer Pipette eine bestimmte Menge des Adsorbens zugegeben, darauf mit einigen Kubikzentimetern 1 n Essigsäure, deren Menge in einem Kontrollversuch vorher bestimmt worden ist, auf den gewünschten p<sub>H</sub> gebracht. Darauf wird gut durchgeschüttelt und sofort das Gemisch in zwei bis vier Zentrifugengläser übergebracht und ungefähr 3 Min. zentrifugiert, wobei eine Schnelligkeit von mindestens 3000 Umdrehungen pro Minute notwendig sein soll. Darauf wird die überstehende „Restlösung“ von dem Adsorbat abgegossen, in einen Meßzylinder gebracht und, falls sie nicht nochmals zur Adsorption zur Verwendung kommt, mit NaOH neutralisiert (gegenüber Lackmuspapier) und das Volumen abgelesen.

Um aus dem Adsorbat das Enzym zu eluieren, wird erst ausgewaschen, nach Adsorption bei saurer Reaktion zweckmäßig mit angesäuertem destilliertem Wasser mit einem Gehalt von 30% Glycerin. Mit einem abgerundeten Glasstab wird das Adsorbat mit einigen Tropfen Waschwasser zerrieben, darauf mehr Wasser zugegeben bis auf das ursprüngliche Volumen; darauf wieder abzentrifugiert. Hiernach wird mit der jeweils benutzten Elutionsflüssigkeit (im Volumen wie die Ausgangslösung) das Adsorbat in der oben beschriebenen Weise vermischt und sofort zentrifugiert. Die Elution wird in einen Meßzylinder gebracht und nach Neutralisieren das Volumen bestimmt.

Die Restlösungen und Elutionen wurden sobald wie möglich nach ihrer Herstellung zu Verdauungsversuchen verwendet. Außerdem fand in sämtlichen Versuchen die Adsorption und Elution unter Eiskühlung



statt, auch wurden alle Enzymlösungen sofort nach ihrer Bereitung in den Eisschrank gestellt bis sie zur Verwendung kamen.

Ein Beispiel, welches die Ausbeute an Proteinase und Dipeptidase nach einmaliger Kaolinadsorption und Elution des Adsorbates angibt, mag hier zum besseren Verständnis angeführt werden:

20 ccm<sup>1</sup> Rohextrakt enthaltend 400 Proteinaseeinheiten (0,05 ccm Rohextrakt veranlassen unter den in Kap. II, Abschnitt 2, angeführten Bestimmungsbedingungen: Vol. 0,5 ccm, 15 mg Kasein,  $p_H = 6,2$ , Zeit 4 Stunden, einen Aciditätszuwachs von 2,25 ccm 1/100 n NaOH, enthalten also 1 Proteinaseeinheit) und 400 Dipeptidaseeinheiten (0,05 Rohextrakt : 1,67 ccm 1/100 n NaOH oder 1 Dipeptidaseeinheit) werden mit 20 ccm Aqua dest. verdünnt und mit 2,5 ccm Kaolinsuspension (220 mg) bei einem  $p_H = 4$  (eingestellt durch n Essigsäure) adsorbiert. Die Restlösung der Adsorption (56 ccm) enthielt noch 348 Proteinaseeinheiten (0,14 ccm Restlösung ergab unter den Bestimmungsbedingungen einen Aciditätszuwachs von 2,10 ccm 1/100 n NaOH, enthielt also nach der Kurve Abb. 1 0,87 Proteinaseeinheiten), d. h. 87%, neben 148 Dipeptidaseeinheiten (0,14 ccm Restlösung ergab unter den Bestimmungsbedingungen einen Aciditätszuwachs von 0,66 ccm 1/100 n NaOH, enthielt also nach der Kurve Abb. 4 0,37 Dipeptidaseeinheiten), d. h. 37%.

Das Adsorbat wurde ausgewaschen mit 40 ccm 30%igem Glyzerinwasser von einem  $p_H = 4$ , nach Abzentrifugieren des Waschwassers wurde es mit 40 ccm 0,04 n  $NH_4OH$  (30% Glyzerin enthaltend) eluiert; Elution 40 ccm, die Elutionsausbeute betrug 16 Proteinaseeinheiten (0,1 ccm Elution : 0,14 ccm 1/100 n NaOH, also 0,04 Proteinaseeinheiten) oder 4% neben 0 Dipeptidaseeinheiten (0,1 ccm Elution : 0,0 ccm 1/100 n NaOH).

Wenn man die Enzymbestimmungen an aliquoten Teilen der Enzymlösungen ausführt (wie im oben angeführten Beispiel 0,05 ccm Rohextrakt bzw. 0,14 ccm Restlösung bzw. 0,1 ccm Elution), kann man aus dem jemals gefundenen Aciditätszuwachs mit Hilfe der Kurven Abb. 1, 2, 3 und 4 die Ausbeute in Enzymeinheiten sofort ablesen und in % des Ausgangsmaterials berechnen. Dieses ist in den im folgenden angeführten Tabellen geschehen<sup>2</sup>.

### 3. Adsorptionsverhalten.

Es zeigte sich, daß die Proteinase schwer adsorbierbar war, sowohl Tonerde wie Kaolin vermochten, auch bei wiederholter Adsorption und bei verschiedenen Aciditäten nur einen Bruchteil des Enzyms an sich zu binden, wie aus Tabelle 15 hervorgeht.

Dagegen wurden die anderen proteolytischen Enzyme besser adsorbiert; in den Elutionen der Adsorbate findet sich die Proteinase in mäßiger Ausbeute, neben den beiden Polypeptidasen vor (siehe Tabelle 17),

<sup>1</sup> Der Übersichtlichkeit wegen wurde in den im Folgenden angeführten Tabellen immer von 20 ccm Rohextrakt ausgegangen, wie es auch meistens in den Versuchen geschah; hier und da wurde aber nur 10 ccm Rohlösung angewandt, die übrigen Lösungen in entsprechenden Mengen.

<sup>2</sup> In Gegensatz zu der in der vorläufigen Mitteilung (53a) gebrachten Berechnung, wobei die Ausbeuten an Enzym in Prozenten angegeben waren, übereinstimmend mit dem Prozent der beobachteten Spaltungen.



Tabelle 15. *Adsorptionsverhalten der Maja-Proteinase mit Kaolin und Tonerde.* Angewandt jeweils 20 cm Rohextrakt, mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt,  $p_H = 4$ , eingestellt durch  $n$  Essigsäure,  $p_H = 8$  durch  $0,1 n$   $NH_4OH$ , Angaben beziehen sich auf aliquote Teile der Lösungen (siehe S. 190), Angaben für die Wirkung bedeuten Zuwachs an Kubikzentimeter  $1/100 n$  NaOH unter den Bestimmungsbedingungen.

Ausgangslösung	Angewandt			Reaktion der Lösung $p_H$	Enzymlösung		Proteinase		
	Adsorbens	ccm	mg				Beobachtete Spaltung	Proteinase- Einheiten	Ausbeute in % des Roh- extraktes
Rohextrakt	—	—	—	—	Rohextrakt	2,25	1	100	
"	Kaolin	1,25	110	4	Restlösung 1. Adsorption	2,18	0,94	94	
"	"	2,5	220	4	"	2,09	0,86	86	
"	"	5	440	4	"	2,00	0,78	78	
"	"	10	880	4	"	1,95	0,75	75	
Rohextrakt	Tonerde	1,25	18	4	Restlösung 1. Adsorption	2,21	0,96	96	
"	"	5	72	4	"	1,99	0,77	77	
"	"	1,25	18	8	"	2,18	0,94	94	
"	"	2,5	36	8	"	2,10	0,87	87	
"	"	5	72	8	"	2,04	0,81	81	
Rohextrakt	Kaolin	2,5	220	4	Restlösung 1. Adsorption	2,09	0,86	86	
Restlösung 1. Adsorption	"	2,5	220	4	" 2.	1,97	0,76	76	
" 2.	"	2,5	220	4	" 3.	1,88	0,70	70	
" 3.	"	2,5	220	4	" 4.	1,79	0,65	65	
Rohextrakt	Kaolin	1,25	110	4	Restlösung 1. Adsorption	2,18	0,94	94	
Restlösung 1. Adsorption	"	1,25	110	4	" 2.	2,13	0,89	89	
" 2.	"	1,25	110	4	" 3a.	2,08	0,85	85	
" 2.	"	1,25	110	8	" 3b.	1,95	0,75	75	
" 2.	"	2,5	220	8	" 3c.	1,93	0,74	64	
" 2.	"	5,0	440	8	" 3d.	1,90	0,72	72	



Tabelle 15 (Fortsetzung).

Ausgangslösung	Angewandt			Reaktion der Lösung pH	Enzymlösung	Proteinase		
	Adsorbens	ccm	mg			Beobachtete Spaltung	Proteinase- Einheiten	Ausbeute in % des Roh- extraktes
Rohextrakt	Tonerde	1,25	18	8	Restlösung 1. Adsorption	2,18	0,94	94
Restlösung 1. Adsorption	"	1,25	18	8	" 2a. "	2,11	0,88	88
" 1. "	"	1,25	18	4	" 2a. "	2,06	0,83	83
Rohextrakt	Kaolin	2,5	220	4	Restlösung 1. Adsorption	2,09	0,86	86
Restlösung 1. Adsorption	"	2,5	220	4	" 2. "	1,97	0,76	76
" 2. "	Tonerde	2,5	36	4	" 3. "	1,91	0,73	73
" 3. "	"	2,5	36	4	" 4. "	1,88	0,70	70
" 2. "	"	2,5	36	8	" 3. "	1,91	0,73	73
" 3. "	"	2,5	36	8	" 4. "	1,89	0,71	71
Rohextrakt	Tonerde	1,25	18	8	Restlösung 1. Adsorption	2,18	0,94	94
Restlösung 1. Adsorption	"	1,25	18	8	" 2. "	2,11	0,88	88
" 2. "	Kaolin	1,25	110	4	" 3. "	1,96	0,76	76
" 3. "	"	1,25	110	4	" 4. "	1,88	0,70	70
" 4. "	Tonerde	1,25	18	8	" 5. "	nicht bestimmt		
" 5. "	"	1,25	18	8	" 6. "	1,82	0,67	67
Rohextrakt	—	—	—	—	—	3,25	2	100
4 maliger Adsorption	Kaolin	2,5	220	4	Restlösung 4. Adsorption	2,67	1,36	68
Restlösung 4. Adsorption	Tonerde	2,5	36	8	" 5. "	2,47	1,18	59
" 5. "	"	2,5	36	8	" 6. "	2,45	1,16	58
" 4. "	"	2,5	36	4	" 5. "	2,50	1,20	60
" 5. "	"	2,5	36	4	" 6. "	2,48	1,18	59



so daß der Vorgang der Adsorption und Elution für die Gewinnung einheitlicher Proteinase keine Aussicht bot.

Es war erwartet worden, daß die Proteinase und Carboxypolypeptidase auch hier, wie es für Trypsin (100) und Kathepsin (105) der Fall ist, einigermaßen das nämliche Adsorptionsverhalten zeigen würden, und im Anfange wurde dann auch nur versucht, die „Trypsin“-fraktion vom „Erepsin“ zu trennen, gemessen an den Wirkungen auf Casein und Glycylglycin. Nachdem aber die caseinspaltende Fraktion frei von „Erepsin“ erhalten worden war (durch viermalige Adsorption an Kaolin bei  $p_H = 4$  (siehe Tabelle 16), stellte es sich heraus, daß die Proteinase auch

Tabelle 16. *Trennung von „Protease“ und „Erepsin“ durch Kaolinadsorption.* Kaolinadsorption: 20 ccm Rohextrakt + 20 ccm dest. Wasser + 2,5 ccm (220 mg) Kaolin,  $p_H = 4$ , 1 Kaolinrestlösung noch dreimal mit je 2,5 ccm Kaolin adsorbiert; jedes Adsorbat nach einmaligem Waschen (mit 40 ccm 30%igem Glycerinwasser vom  $p_H = 4$ ) eluiert: in Versuch A mit 40 ccm  $2\frac{2}{3}$  Ammoniumphosphat, in Versuch B mit 40 ccm 0,04 n  $NH_4OH$ . Angaben beziehen sich auf aliquote Mengen der Lösungen (und zwar entsprechend 0,05 ccm Rohextrakt), Angaben für die Wirkung bedeuten Zuwachs an Kubikzentimeter 1/100 n NaOH unter den Bestimmungsbedingungen.

Enzymlösung	Proteinase			Dipeptidase		
	Wirkung	Einheiten	Ausbeute	Wirkung	Einheiten	Ausbeute
Rohextrakt . . . . .	2,25	1,0	100	1,67	1,0	100
Restlösung der 1. Adsorption . . .	2,10	0,87	87	0,66	0,37	37
Elution A des 1. Adsorbates . . .	0,14	0,03	3	0,0	0,0	0
Restlösung der 2. Adsorption . . .	1,96	0,76	76	0,48	0,26	26
Elution A des 2. Adsorbates . . .	0,09	0,02	2	0,0	0,0	0
Restlösung der 3. Adsorption . . .	1,88	0,70	70	0,28	0,15	15
Elution A des 3. Adsorbates . . .	0,09	0,02	2	0,0	—	—
Restlösung der 4. Adsorption . . .	1,79	0,65	65	0,01	0	0
Elution A des 4. Adsorbates . . .	0,09	0,02	2	0,0	—	—
Rohextrakt . . . . .	2,25	1,0	100	1,67	1,0	100
Restlösung der 1. Adsorption . . .	2,06	0,83	83	0,65	0,36	36
Elution B des 1. Adsorbates . . .	0,14	0,03	3	0	0,0	0
Restlösung der 2. Adsorption . . .	1,97	0,76	76	0,52	0,29	29
Elution B des 2. Adsorbates . . .	0,08	0,02	2	0,0	0,0	0
Restlösung der 3. Adsorption . . .	1,91	0,73	73	0,29	0,16	16
Elution B des 3. Adsorbates . . .	0,08	0,02	2	0,0	0	0
Restlösung der 4. Adsorption . . .	1,79	0,65	65	0,0	0	0

jetzt noch mit der Aminopolypeptidase vergesellschaftet war; die vierte Restlösung der Kaolinadsorption enthielt neben 65% der Proteinase 49% der Aminopolypeptidase (siehe dazu Tabelle 17, vierte Alinea von unten), ein anderes Mal 60% der Proteinase, 32% der Aminopolypeptidase (Ta-



Tabelle 17. *Adsorptionsverhalten der vier Enzyme bei Adsorption an Kaolin und Elution aus den Adsorbaten. Kaolinadsorption: 20 ccm Rohextrakt + 20 ccm dest. Wasser + 2,5 ccm (220 mg) Kaolin,  $p_H = 4,0$ , Kaolinrestlösung 1 noch dreimal mit je 2,5 ccm Kaolin adsorbiert; jedes Adsorbat nach einmaligem Waschen (mit 40 ccm 30%igem Glycerinwasser von  $p_H = 4$ ) eluiert mit 40 ccm  $2\frac{2}{3}$  Ammonphosphat. Angaben beziehen sich auf aliquote Mengen der Lösungen, und zwar entsprechend 0,05 ccm Rohextrakt, Angaben für die Wirkung bedeuten Zuwachs an Kubikzentimeter 1/100 n NaOH unter den Bestimmungsbedingungen.*

— bedeutet nicht bestimmt, 0 Aciditätszuwachs = 0.

Enzymlösung	Proteinase			Carboxypolypeptidase			Aminopolypeptidase			Dipeptidase		
	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %
Rohextrakt . . . . .	2,25	1	100	0,58	1	100	1,10	1	100	1,70	1	100
Restlösung d. 1. Adsorption	2,31	1	100	0,56	0,95	95	1,02	0,93	93	—	—	—
Elution aus d. 1. Adsorbat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Restlösung d. 2. Adsorption	2,11	0,87	87	0,40	0,65	65	0,89	0,80	80	0,50	0,28	28
Elution aus d. 2. Adsorbat	0,22	0,05	5	0,18	0,28	28	0,15	0,14	14	—	—	—
Restlösung d. 3. Adsorption	1,95	0,75	75	0,25	0,40	40	0,70	0,63	63	0,34	0,18	18
Elution aus d. 3. Adsorbat	0,16	0,03	3	0,15	0,23	23	0,05	0,05	5	—	—	—
Restlösung d. 4. Adsorption	1,79	0,65	65	—	—	—	0,55	0,49	49	—	—	—
Elution aus d. 4. Adsorbat	0,17	0,03	3	0,15	0,23	23	0,07	0,06	6	—	—	—
Rohextrakt (0,1 ccm) . . .	3,25	2	100	0,85	2	100	1,74	2	100	—	—	—
Restlösung d. 4. Adsorption	2,49	1,19	60	0	0	0	0,72	0,64	32	—	—	—



belle 17, zweite Alinea von unten) und war frei von Dipeptidase und Carboxypolypeptidase.

Es zeigte sich, daß die Proteinase und Aminopolypeptidase weitgehend das nämliche Adsorptionsverhalten zeigen. Weder mit Kaolin bei saurer Reaktion, noch mit Tonerde bei saurer oder alkalischer Reaktion gelang es, die zwei Enzyme, die zusammen in der vierten Restlösung der Kaolinadsorption anwesend sind, voneinander zu trennen (Tabelle 18 a—c). Auch für Eisenhydroxyd bei saurer Reaktion war die Adsorption eine gleichmäßige und die Trennung aussichtslos (Tabelle 18d).

Bei der Adsorption mit Eisenhydroxyd bei neutraler Reaktion wird aber die Aminopolypeptidase vorwiegend adsorbiert. Durch wiederholte Adsorption wurde schließlich die Proteinase frei von der Aminopolypeptidase erhalten (Tabelle 18 e—f). Nach viermaliger Adsorption ist die Proteinase in 29% Ausbeute proteolytisch einheitlich in der Lösung anwesend.

Tabelle 18. Versuche zur Trennung von Proteinase und Aminopolypeptidase. Je 45 ccm Restlösung der viermaligen Kaolinadsorption (aus 20 ccm Rohextrakt), nach dem Beispiele der Tabelle 17 gewonnen (Ausgangslösung) werden

- a) noch dreimal der Adsorption mit je 2,5 ccm (220 mg) Kaolin bei  $p_H = 4$ ,  
 b) „ „ „ „ „ „ 2,5 „ ( 36 „ ) Tonerde bei  $p_H = 4$ ,  
 c) „ „ „ „ „ „ 2,5 „ ( 36 „ ) „ „  $p_H = 8$ ,  
 d) „ „ „ „ „ „ 4 „ (123,6 mg  $Fe_2O_3$ ) Eisenhydroxyd  
 bei  $p_H = 4$ ,  
 e) „ „ „ „ „ „ 4 „ (123,6 mg  $Fe_2O_3$ ) Eisenhydroxyd  
 bei  $p_H = 7$ ,  
 f) „ sechsmal „ „ „ „ 6 „ (185,4 mg  $Fe_2O_3$ ) Eisenhydroxyd  
 bei  $p_H = 7$ ,

unterworfen.

Angaben beziehen sich auf aliquote Teile der Lösungen, entsprechend 0,1 (für d und e 0,05) ccm Rohextrakt, Angaben für die Wirkung bedeuten Zuwachs an Kubikzentimeter 1/100 n NaOH unter den Bestimmungsbedingungen.

Enzymlösung	Proteinase			Aminopolypeptidase		
	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %
Rohextrakt . . . . .	3,25	2	100	1,74	2	100
Ausgangslösung . . . . .	2,59	1,30	65	0,91	0,82	41
a) Restlösung 1. Kaolinadsorption .	2,50	1,20	60	0,86	0,78	39
„ 2. „ .	2,46	1,17	59	0,81	0,73	37
„ 3. „ .	2,44	1,15	58	0,66	0,59	30
b) Ausgangslösung . . . . .	2,59	1,30	65	0,91	0,82	41
Restlösung 1. Tonerdeadsorption						
$p_H = 4$ . . . . .	2,50	1,20	60	0,90	0,82	41
Restlösung 2. Tonerdeadsorption						
$p_H = 4$ . . . . .	2,48	1,18	59	0,79	0,71	36



Tabelle 18 (Fortsetzung).

Enzymlösung	Proteinase			Aminopolypeptidase		
	Wir- kung	Ein- heiten	Aus- beute in %	Wir- kung	Ein- heiten	Aus- beute in %
Restlösung 3. Tonerdeadsorption $p_H = 4$ . . . . .	2,27	1,02	51	0,70	0,63	32
c) Ausgangslösung . . . . .	2,59	1,30	65	0,91	0,82	41
Restlösung 1. Tonerdeadsorption $p_H = 8$ . . . . .	2,47	1,17	59	0,83	0,75	38
Restlösung 2. Tonerdeadsorption $p_H = 8$ . . . . .	2,45	1,16	58	0,78	0,70	35
Restlösung 3. Tonerdeadsorption $p_H = 8$ . . . . .	2,45	1,16	58	0,78	0,70	35
d) Rohextrakt . . . . .	2,25	1,0	100	1,10	1,0	100
Ausgangslösung . . . . .	1,79	0,65	65	0,54	0,48	48
Restlösung 1. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 4$ . . . . .	1,40	0,42	42	0,50	0,44	44
Restlösung 2. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 4$ . . . . .	0,90	0,24	24	0,42	0,36	36
Restlösung 3. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 4$ . . . . .	0,67	0,17	17	0,27	0,23	23
e) Ausgangslösung . . . . .	1,79	0,65	65	0,54	0,48	48
Restlösung 1. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 7$ . . . . .	1,75	0,61	61	0,49	0,43	43
Restlösung 2. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 7$ . . . . .	1,74	0,60	60	0,34	0,29	29
Restlösung 3. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 7$ . . . . .	1,67	0,56	56	0,17	0,15	15
f) Ausgangslösung . . . . .	1,79	0,65	65	0,54	0,48	48
Restlösung 3. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 7$ . . . . .	1,65	0,55	55	0,07	0,06	6
Restlösung 4. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 7$ . . . . .	1,17	0,29	29	0,02	0,02	2
Restlösung 5. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 7$ . . . . .	0,86	0,22	22	0	0,0	0
Restlösung 6. Eisenhydroxydad- sorption $p_H = 7$ . . . . .	0,68	0,17	17	0	0,0	0

Die *Carboxypolypeptidase* wird, wie aus der Tabelle 17 hervorgeht, vom Kaolin bei saurer Reaktion weitgehend adsorbiert. Es gelang, das Enzym aus den vereinigten Kaolinadsorbaten zu eluieren (siehe dazu auch Tabelle 17). Nur war es in dieser Elution mit der Proteinase und Aminopolypeptidase vergesellschaftet (siehe Tabelle 19).

Weil Tonerde bei alkalischer Reaktion die Proteinase und Aminopolypeptidase fast nicht adsorbiert, wurde diese Elution (der vereinigten



Kaolinadsorbate) mit Tonerde adsorbiert, die Carboxypolypeptidase wird vom Adsorbens gut aufgenommen, und bei der Elution mit verdünnter Essigsäure findet sich die Carboxypolypeptidase in 60% Ausbeute einheitlich vor (Tabelle 19).

Die Aminopolypeptidase zeigte, wie schon erwähnt, weitgehend das nämliche Adsorptionsverhalten wie die Proteinase und war schwer davon zu trennen (Tabelle 18). (Auch bei den Hefeenzymen fand GRASSMANN, daß das Gemisch der Proteinase mit der Aminopolypeptidase bei der Adsorption mit Tonerde nicht aufgeteilt wird [24, 19].)

Es gelang, aus den vereinigten drei ersten Eisenhydroxydadsorbaten die Aminopolypeptidase in 28% Ausbeute fast ohne Proteinase freizulegen (Tabelle 20); eine weitere Reinigung konnte durch die geringe Menge des Enzyms nicht durchgeführt werden.

Die Dipeptidase scheint so unbeständig zu sein, daß eine Elution aus irgendeinem Adsorbat bis jetzt nicht möglich gewesen ist, wie schonend und schnell auch gearbeitet wurde. Ob die starke Adsorption durch Kaolin (siehe Tabelle 16) und auch durch Tonerde wirklich auf Adsorption oder auf eine teilweise Vernichtung des Enzyms während der Adsorption beruht, ist zur Zeit nicht zu

Tabelle 19. *Isolierung der Carboxypolypeptidase.* 20 cem Rohextrakt, mit dem nämlichen Volumen dest. Wasser verdünnt, viermal mit je 2,5 cem (220 mg) Kaolin bei  $p_H = 4$  adsorbiert, Adsorbate vereinigt und nach einmaligem Waschen (mit 40 cem 30%igem Glycerinwasser von  $p_H = 4$ ) eluiert mit 2,5 cem (36 mg) Tonerde bei  $p_H = 8$  adsorbiert, Adsorbat nach einmaligem Waschen (mit 40 cem 30%igem Glycerinwasser von  $p_H = 8$ ) eluiert mit 40 cem 1/20 n Essigsäure.

Angaben beziehen sich auf aliquote Mengen der Lösung, und zwar übereinstimmend mit 0,05 cem Rohextrakt, Angaben für die Wirkung bedeuten Zuwachs in Kubikzentimeter 1/100 n NaOH unter den Bestimmungsbedingungen.

Enzymlösung	Proteinase			Carboxypolypeptidase			Aminopolypeptidase			Dipeptidase		
	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %
Rohextrakt . . . . .	2,25	1	100	0,58	1	100	1,10	1	100	1,70	1	100
Restlösung der 4. Kaolinadsorption . . . . .	1,79	0,65	65	0	0	0	0,48	0,42	42	0	0	0
Elution der Adsorbate 1—4 . . . . .	0,38	0,08	8	0,45	0,74	74	0,30	0,25	25	0,08	0,05	5
Restlösung der Tonerdeadsorption . . . . .	0,30	0,06	6	0,07	0,10	10	0,28	0,24	24	—	—	—
Elution des Adsorbates . . . . .	0	0	0	0,37	0,60	60	0	0	0	0	0	0



entscheiden. In den Elutionen der Adsorbate findet sich keine Dipeptidase vor (Tabelle 16).

Tabelle 20. *Versuch zur Isolierung der Aminopolypeptidase.* Je 45 ccm Restlösung aus 20 ccm Rohextrakt der viermaligen Kaolinadsorption (Ausgangslösung) nach dem Beispiel der Tabelle 17 gewonnen, wurden noch dreimal der Adsorption mit je 6 ccm (185,4 mg) Eisenhydroxydaufschlammung bei  $p_H = 7$  unterworfen, die Adsorbate vereinigt und nach einmaligem Waschen (mit 30%igem Glycerinwasser  $p_H = 7$ ) eluiert mit 40 ccm 1/20 n Essigsäure.

Angaben beziehen sich auf aliquote Teile der Lösungen, entsprechend 0,05 ccm Rohextrakt, Angaben für die Wirkung bedeuten den Zuwachs in Kubikzentimeter 1/100 n NaOH unter den Bestimmungsbedingungen.

Enzymlösung	Proteinase			Aminopolypeptidase		
	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %
Rohextrakt . . . . .	2,25	1	100	1,10	1	100
Ausgangslösung . . . . .	1,79	0,65	65	0,48	0,42	42
Restlösung der 3. Eisenhydroxydadsorption $p_H = 7$ . . . . .	1,53	0,47	47	0,10	0,09	9
Elution der 3 Adsorbate . . . . .	0,12	0,02	2	0,33	0,28	28

#### Kapitel IV.

#### Die Proteinase.

##### 1. Gewinnung der Proteinaselösungen und deren Beständigkeit.

Wie am Ende des vorigen Kapitels beschrieben wurde, ergab eine viermalige Adsorption des Rohextraktes mit Kaolin bei  $p_H = 4$  und

Tabelle 21. *Gewinnung der Proteinaselösung.* Proteinaselösung, proteolytisch einheitlich, bereitet nach dem Beispiele der Tabelle 18 f, durch viermalige Adsorption an Kaolin bei  $p_H = 4$  und darauffolgende viermalige Adsorption an je 6 ccm (185,4 mg) Eisenhydroxyd bei  $p_H = 7$ .

Angaben beziehen sich auf aliquote Teile der Lösungen, und zwar 0,05 ccm Rohextrakt, Angaben für die Wirkung bedeuten Zuwachs an 1/100 n NaOH unter den Bestimmungsbedingungen.

Enzymlösung	Proteinase			Aminopolypeptidase		
	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %	Wirkung	Einheiten	Ausbeute in %
Rohextrakt . . . . .	2,25	1	100	1,10	1	100
Restlösung der 4. Kaolinadsorption . . . . .	1,75	0,61	61	0,56	0,50	50
Restlösung der 3. Eisenhydroxydadsorption (Restlösung 7) . . . . .	1,55	0,48	48	0,15	0,13	13
Restlösung der 4. Eisenhydroxydadsorption (Restlösung 8) . . . . .	1,03	0,28	28	0	0	0
Restlösung 4. Kaolinadsorption . . . . .	1,79	0,65	65	0,51	0,45	45
Restlösung 7 . . . . .	1,65	0,54	54	0,07	0,06	6
Restlösung 8 . . . . .	1,17	0,33	33	0	0	0
Restlösung 4. Kaolinadsorption . . . . .	1,90	0,72	72	0,56	0,50	50
Restlösung 7 . . . . .	1,66	0,55	55	0,08	0,07	7
Restlösung 8 . . . . .	1,15	0,32	32	0	0	0



darauf folgende viermalige Adsorption der vierten Restlösung mit Eisenhydroxyd bei  $p_H = 7$ , eine Restlösung, die nur die Proteinase in ungefähr 30%iger Ausbeute und keines der drei anderen Enzyme enthielt.

Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens geht aus der Tabelle 21 hervor.

Die Beständigkeit der Proteinase erlaubt es, Versuche über Spezifität usw. an dem Tage nach der Herstellung der Proteinaselösung auszuführen.

Proteinaselösung, sofort nach Herstellung gemessen: 1,15 ccm 1/10 n  $NH_2$ . Die nämliche Lösung, nach 24 Stunden Stehen im Eisschrank: 1,07 ccm 1/10 n  $NH_2$ .

## 2. Spezifität.

Eine gereinigte Proteinaselösung spaltet Pepton und Clupeinsulfat; hier untenstehend sind die Zahlen der Spaltungen angeführt.

*Peptonspaltung.* Pro Titration (Mikro-v. SLYKE) 2 ccm, enthaltend 0,4 ccm Restlösung (0,2 ccm enthalten 0,3 Proteinaseeinheiten): 100 mg Pepton (Ex alb. Merck).

1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol. ( $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ).  $p_H = 6,4$ , Temperatur  $30^\circ C$ , Aciditätszunahme in 4 Stunden 0,36 ccm 1/10 n  $NH_2$ .

*Clupeinspaltung.* Pro Titration (Mikro-v. SLYKE) 2 ccm, enthaltend 0,4 ccm Restlösung (0,2 ccm enthalten 0,3 Proteinaseeinheiten). 40 mg Clupeinsulfat. 1,2 ccm Pufferlösung ( $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ).  $p_H = 6,2$ , Temperatur  $30^\circ C$ , Aciditätszunahme in 4 Stunden 0,24 ccm 1/10 n  $NH_2$ .

## 3. $p_H$ -Kurven.

Es wurde mit der gereinigten Proteinaselösung die Abhängigkeit der Wirkung auf Gelatine und Casein von der Wasserstoffzahl untersucht; die Bestimmung der Spaltungen wurde im Mikro-v. SLYKE ausgeführt, wie es im Kapitel 2, Abschnitt 3, für den Rohextrakt beschrieben wurde.

Tabelle 22. *Gelatinenspaltung durch Proteinase und Wasserstoffzahl* (siehe Kurve Abb. 13). Pro Titration im Mikro-v. SLYKE 2 ccm (aus einem Ansatz von 10 ccm) enthaltend: 40 mg Gelatine (0,4 ccm 10%ige Lösung, im Thermostaten bei  $30^\circ C$  flüssig gehalten), 1,2 ccm Pufferlösung 1/5 mol., 0,4 ccm Restlösung (0,2 ccm enthalten ungefähr 0,3 Prot.-Einheiten). 90 Min.  $30^\circ C$ .

Puffergemisch	$p_H$ des Ansatzes (elektrometrisch gemessen)	Ac. Zuwachs in 1/10 n $NH_2$
K-Biphtalat-HCl	4,3	0,11
„ NaOH	5,2	0,20
$KH_2PO_4$ , $Na_2HPO_4$	6,3	0,29
„ „	6,8	0,31
„ „	7,7	0,41
„ „	8,1	0,45
„ „	8,6	0,35



Eine Wiederholung in 3 Stunden ergab (Ansatz ganz wie oben):

Puffergemisch	p <sub>H</sub> des Ansatzes (elektrometrisch gemessen)	Ac.-Zuwachs in 1/10 n NH <sub>2</sub>
K-Biphtalat-HCl	4,3	0,21
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,3	0,44
" "	6,8	0,50
" "	8,1	0,64
" "	8,6	0,55

Das p<sub>H</sub>-Optimum der Gelatinespaltung (s. Tabelle 22 u. Abb. 13) ist nach der Reinigung also nach der alkalischen Seite verschoben und liegt,

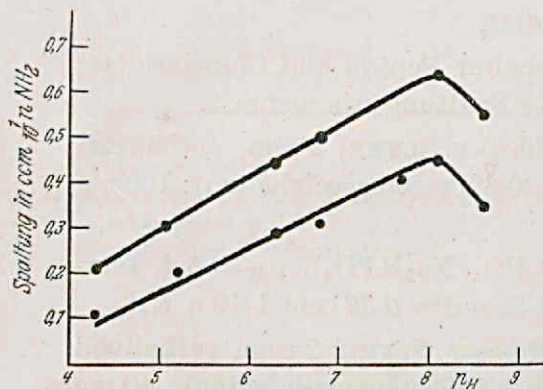


Abb. 13. Gelatinespaltung durch Proteinase und Wasserstoffzahl.

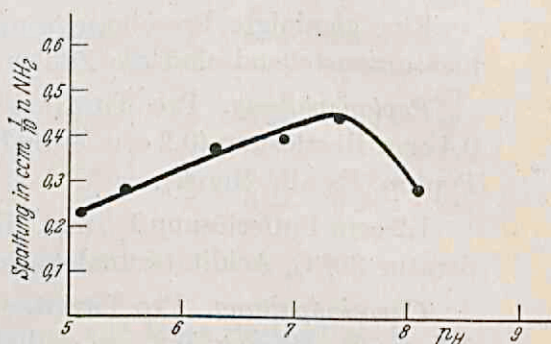


Abb. 14. Caseinspaltung durch Proteinase und Wasserstoffzahl.

statt bei 6,1 jetzt bei 8,1; also in der Nähe des Optimums (8,2—8,7 nach WALDSCHMIDT-LEITZ, 86) der Wirkung von Trypsin auf Gelatine.

Tabelle 23. Caseinspaltung durch Proteinase und Wasserstoffzahl (siehe dazu Kurve Abb. 14). Pro Titration (im Mikro-v. SLYKE) 2 cem (aus einem Ansatz von 10 cem) enthaltend: 40 mg Casein. 1,2 cem Pufferlösung 1/5 mol., 0,4 cem Restlösung (0,2 cem enthalten ungefähr 0,3 Prot.-Einheiten). 3 Stunden. 30° C.

Puffergemisch	p <sub>H</sub> des Ansatzes (elektrometrisch gemessen)	Ac.-Zuwachs in 1/10 n NH <sub>2</sub>
K-Biphtalat-NaOH	5,1	0,23
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,5	0,28
" "	5,8	0,30
" "	6,3	0,37
" "	6,9	0,39
" "	7,4	0,44
" "	7,8	0,38
" "	8,1	0,28

Das p<sub>H</sub>-Optimum für die Caseinspaltung (s. Tabelle 23 u. Abb. 14) ist nach der Reinigung auch mehr im alkalischen Gebiet gelegen, und zwar bei p<sub>H</sub> ungefähr 7,4; für Trypsin liegt das Optimum nach NORTHROP (58 a) bei p<sub>H</sub> = 8,6.



## 4. Versuche zur Aktivierung der ProteinaseLösung.

Auch mit den gereinigten ProteinaseLösungen wurde, wie es für den Rohextrakt (allerdings mit negativen Resultaten) gemacht worden war, untersucht, inwieweit Enterokinase, Zookinase, Blausäure oder  $H_2S$  als Aktivatoren in Betracht kommen.

a) Versuche mit  $HCN$ .

Die Versuche wurden genau wie in Kapitel II, Abschnitt 4 a, für den Rohextrakt beschrieben wurde, angesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24. Versuch zur Aktivierung der ProteinaseLösung durch  $HCN$ . 2 ccm: 40 mg Gelatine (0,4 ccm 10%iger Lösung, im Thermostaten  $30^\circ C$  flüssig gehalten), a) 0,2 ccm ProteinaseLösung (ungefähr 0,3 Prot.-Einheiten) (mit 0,2 ccm Aqua dest. bzw. 0,1, bzw. 0,2 ccm  $HCN$  2 Stunden bei  $30^\circ C$  belassen), b) 0,4 ccm ProteinaseLösung (0,2 ccm = ungefähr 0,3 Prot.-Einheiten) (mit 0,2 ccm Aqua dest. bzw. 0,1, bzw. 0,2 ccm  $HCN$  3 Stunden bei  $30^\circ C$  belassen), 1 ccm Phosphatpufferlösung 1/5 mol.,  $p_H = 8,1$  (Opt.  $p_H$ ),  $30^\circ C$ , 90 Min., Titration im Mikro-v. SLYKE-Apparat.

EnzymLösung	Zeit der Aktivierung in Stunden	Aciditätszunahme in ccm 1/10 n $NH_2$
ProteinaseLösung a + $H_2O$	—	0,17
„ a + 0,1 ccm $HCN$	2	0,15
„ a + 0,2 „ „	2	0,14
ProteinaseLösung b + $H_2O$	3	0,35
„ b + 0,1 ccm $HCN$	3	0,25
„ b + 0,2 „ „	3	0,25

Auch hier ist keine Aktivierung nachweisbar.

## b) Versuche mit Enterokinase.

Die benutzten EnterokinaseLösungen wurden in ähnlicher Weise bereitet wie es in Kapitel 2, Abschnitt 4 b, beschrieben wurde.

0,5 ccm EnterokinaseLösung 1 erteilte 25 mg Trockenpankreas (für die Ausführung der Bestimmung siehe Kap. II, Abschnitt 4 b) eine Steigerung der Aciditätszunahme von 2,09 ccm 1/10 n  $NaOH$ ; die EnterokinaseLösung war erepsinfrei.

0,5 ccm EnterokinaseLösung 2 erteilte 25 mg Trockenpankreas eine Steigerung der Aciditätszunahme von . . . . . 2,48 ccm 1/10 n  $NaOH$ ,

0,5 ccm EnterokinaseLösung 3 ebenso . . . . . 2,80 ccm 1/10 n  $NaOH$ ,

0,5 ccm EnterokinaseLösung 4 ebenso . . . . . 2,35 ccm 1/10 n  $NaOH$ .

Auch diese drei letzten wurden erepsinfrei gefunden.

Ein Versuch, der mit der EnterokinaseLösung 1 angestellt wurde, ergab für die Spaltung von 2 ccm (40 mg Gelatine, 1,2 ccm Phosphatpufferlösung 1/5 mol., 0,2 ccm ProteinaseLösung (0,3 Proteinaseeinheiten),  $p_H = 8,1$ ,  $30^\circ C$ , 3 Stunden, Titration im Mikro-v. SLYKE-Apparat, die folgenden Werte:



ohne Aktivierung mit Enterokinase . . . . . 0,32 ccm 1/10 n  $\text{NH}_2$ ,  
 nach Aktivierung mit 0,2 ccm Enterokinaselösung 1 . 0,42 ccm 1/10 n  $\text{NH}_2$ .

Es wurde darauf, mit jeweils frisch hergestellten Enterokinaselösungen dieser Versuch, nur jetzt mit Caseinspaltung, wiederholt; die Ergebnisse sind in der Tabelle 25 zusammengestellt.

Tabelle 25. *Versuche zur Aktivierung der Proteinaselösung durch Enterokinase.* 10 ccm : 300 mg Casein (5 ccm 6%ige Lösung), 2 ccm Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer, 2 ccm Proteinaselösung (0,2 ccm = 0,3 Prot.-Einheiten) während  $\frac{1}{2}$  Stunde mit Aqua dest. bzw. 1 ccm bzw. 2 ccm Enterokinaselösung im Thermostaten  $30^\circ \text{C}$  belassen,  $\text{pH} = 8,1$ ,  $30^\circ \text{C}$ , 4 Stunden, alkoholische Titration.

Enzymlösung	Aciditätszunahme in ccm 1/10 n NaOH
Proteinaselösung + $\text{H}_2\text{O}$	1,02
„ + 1 ccm Enterokinaselösung 2	1,50
„ + $\text{H}_2\text{O}$	1,35
„ + 1 ccm Enterokinaselösung 3	1,73
„ + $\text{H}_2\text{O}$	1,26
„ + 2 ccm Enterokinaselösung 4	1,63

Es findet also eine Aktivierung durch Enterokinase statt; es muß also ein natürlicher Aktivator der Proteinase im Rohextrakt anwesend sein und dieser ist bei der adsorptiven Reinigung von ihr abgetrennt worden. Da Enterokinase den spezifischen Aktivator für Trypsin darstellt, scheint die *Maja*-Proteinase also trypsinähnlichen Charakter aufzuweisen.

#### c) *Versuche mit Zookinase.*

Die benutzte Zookinaselösung war die nämliche, die für die Versuche über Aktivierung des Rohextraktes benutzt worden war; es wurde versucht, ob die Proteinaselösung durch sie aktiviert werden konnte. Eine Titration von 11 ccm (300 mg Casein, 2 ccm Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer 1 n, 2 ccm Proteinaselösung (0,2 ccm = 0,3 Proteinaseeinheiten), mit 2 ccm Aq. dest. bzw. 2 ccm Zookinaselösung vermischt,  $\text{pH} = 8,1$ ,  $30^\circ \text{C}$ , 4 Stunden, alkoholische Titration) ergab: für Proteinaselösung +  $\text{H}_2\text{O}$  eine Aciditätszunahme von 1,00 ccm 1/10 n NaOH, für Proteinaselösung mit Zookinase eine Aciditätszunahme von 0,96 ccm 1/10 n NaOH.

Es fand also keine Aktivierung durch Zookinase statt.

#### Schlußbetrachtung.

Das Studium der Literatur über die proteolytischen Enzyme der Wirbellosen hat uns gezeigt, daß diese auf Grund der  $\text{pH}$ -Optima ihrer Wirkungen auf verschiedene Substrate und auf Grund der Spaltung spezifischer Substrate, einerseits verglichen wurden mit den Pflanzenenzymen (z. B. denen der Hefe) oder mit den intracellulären Enzymen der Organe



der Säugetiere (VONK, KRÜGER, GRAETZ), die wahrscheinlich miteinander sehr nahe verwandt sind. Andererseits dagegen waren sie mit den Verdauungsenzymen der Wirbeltiere und speziell mit den Pankreasenzymen (YONGE, WIGGLESWORTH, HOBSON) verglichen worden. Aus allen diesen Vergleichen ergaben sich wichtige Probleme. Das Problem, welches sich aus der Vergleichung mit den Wirbeltieren ergab, war unser Ausgangspunkt. WALDSCHMIDT-LEITZ hat seine Auffassung über die Natur der Bindungen<sup>1</sup> im Eiweißmolekül aufgebaut auf die Erfahrungen an Wirbeltierenzymen: die verschiedenen Enzyme entsprächen verschiedenen Arten der Bindungen innerhalb des Eiweißmoleküls. Wenn auch an der Richtigkeit dieser Auffassung kaum zu zweifeln war, so ergab doch gerade die Untersuchung bei einem Wirbellosen eine sehr bedeutende Möglichkeit, um die allgemeine Gültigkeit der Auffassung von WALDSCHMIDT-LEITZ zu prüfen. Bei den Wirbeltieren entspricht der Verteilung der Proteolyse auf verschiedene Teilenzyme eine wenigstens teilweise Verteilung dieser Teilenzyme auf verschiedene Abschnitte des Darmtrakts. Die Notwendigkeit der Verteilung des Wirkungsbereiches könnte durch die topographische Anordnung gegeben sein, nicht durch die Eigenart des Eiweißmoleküls. Es könnte sein, daß da, wo ein einheitlicher Verdauungssaft vorkommt (den man sich in seiner Einheitlichkeit verschaffen kann, ohne Extraktion), auch ein einziges proteolytisches Enzym vorhanden ist. Obgleich diese Möglichkeit nach neueren Ergebnissen auch nicht sehr wahrscheinlich war, so ist es doch von Bedeutung, daß wir sie haben ausschließen können.

Eine Entscheidung der Frage nach der Art der bei Wirbellosen anwesenden Enzyme ist nur möglich nach ihrer Isolierung wie sie in manchen Fällen von WILLSTÄTTER und seinen Schülern mittels der Adsorptionsmethoden ausgeführt wurde.

Weil die Adsorptionsmethode viel Material beansprucht, war sie bisher in der vergleichenden Physiologie, mit Ausnahme der Arbeiten von YONGE und WIGGLESWORTH, die sich auf eine erste Trennung von „Trypsin“ und „Erepsin“ beschränkten, noch nicht angewandt worden. Durch die Benützung von *Maja squinado* war es möglich, hinreichendes Material zu bekommen.

Es ergab sich, daß vier Teilenzyme vorhanden sind, wovon drei, die Proteinase, die Carboxypolypeptidase und die Aminopolypeptidase, einheitlich erhalten wurden; die Dipeptidase erwies sich als sehr unbeständig.

Von diesen drei Enzymen wurde die Proteinase, wenn auch nicht ein-

<sup>1</sup> Der Ausdruck „Bindungen“ wird hier in ganz allgemeinem Sinne benutzt. Bei der gleichen Anordnung der Atome an der Bindungsstelle können doch verschiedene Bindungen vorliegen, je nach dem Einfluß, welche die Konfiguration der verbundenen oder benachbarten Moleküle, die Länge der Peptidkette usw. auf die Beständigkeit der Bindung haben.



gehend, näher studiert. Es zeigte sich, daß ihre  $p_H$ -Optimumkurven nach der Reinigung sich unterscheiden von denen des ungereinigten Enzyms, was wohl auf einen Einfluß von Begleitstoffen, auf deren Bedeutung WILLSTÄTTER in manchen Fällen hingewiesen hat, zurückzuführen ist. Die  $p_H$ -Optima für Gelatinespaltung und Caseinspaltung, die für Rohextrakt bei 6 bzw. 6,2 gefunden worden waren, liegen jetzt bei 8,1 bzw. 7,4, sie stimmen jetzt mehr mit den  $p_H$ -Optima der Trypsinwirkung (für Gelatine bei  $p_H = 8,2-8,7$  nach WALDSCHMIDT-LEITZ, für Casein bei  $p_H = 8,6$  nach NORTHROP) überein. Zusammen mit den Begleitstoffen dahingegen passen die Enzyme besser zu den, in den natürlichen Säften verwirklichten Bedingungen.

Die Annahme einer Ähnlichkeit der *Maja*-Proteinase mit Trypsin wird wahrscheinlich durch die Tatsache, daß die Proteinase, die vor der Reinigung keine Aktivierung mit Enterokinase erfuhr, nach ihrer Reinigung von Enterokinase aktiviert wird. Es scheint also ein natürlicher Aktivator bei der adsorptiven Trennung von den anderen Enzymen von ihr abgetrennt zu werden, wodurch das Enzym an Aktivität einbüßt<sup>1</sup>, und nun durch Enterokinase aktivierbar wird.

Künftige Untersuchungen werden die Art dieser Aktivierung näher untersuchen, sowie auch (durch Untersuchung der Spaltbarkeit von Produkten der Trypsinverdauung durch die *Maja*-Proteinase) die eventuelle Identität der Proteinase mit dem Trypsin feststellen müssen.

### Zusammenfassung.

1. Von den Mitteldarmdrüsen von *Maja squinado* wurden Extrakte angefertigt, sowohl von frischen Drüsen als von vorher mit Aceton und Äther getrockneten; auch wurde der Magensaft mit Glyzerin vermischt; die Enzyme erwiesen sich haltbar.

2. Es wurden mit den Rohextrakten Bestimmungen ausgeführt, um das Vorhandensein einer eventuellen Proteinase (gemessen an Caseinspaltung), einer eventuellen Carboxypolypeptidase (gemessen an Chloracetyltyrosinspaltung), einer eventuellen Aminopolypeptidase (gemessen an Leucyldiglycinspaltung) und einer eventuellen Dipeptidase (gemessen an Glycylglycinspaltung) zu untersuchen. Es wurden für diese Enzyme (*Maja*)-Einheiten aufgestellt, die nur als vorläufige aufzufassen sind und nur dazu dienen, die Vorgänge bei der Adsorption verfolgen zu können.

3. Es wurden die  $p_H$ -Optima für den Rohextrakt und den Magensaft bestimmt, und zwar wurde für die Caseinspaltung das Optimum bei  $p_H = 6,2$  gefunden, für Gelatinespaltung bei  $p_H = 6$ , für Spaltung von

<sup>1</sup> Durch die Abtrennung des Aktivators, und durch die Veränderung der Lage des  $p_H$ -Optimums sind die Messungen der Proteinase nicht genau, die Ausbeuten nach der Adsorption also alle zu niedrig.



Ligamentum nuchae bei  $p_H = 6,4$ , für Leucyldiglycinspaltung bei  $p_H = 8,2$ , für Glycylglycinspaltung bei  $p_H = 8,4$ .

4. Im Anschluß an die Erscheinungen der Aktivierung, wie sie für Pflanzen- und Vertebratenenzyme bekannt sind, wurde versucht, mittels einiger dieser Aktivatoren (und zwar  $H_2S$ ,  $HCN$ , Zookinase und Entero-kinase) eine Wirkungssteigerung des Extraktes herbeizuführen; dieses gelang aber nicht.

5. Es wurde versucht, die einzelnen Enzyme zu isolieren und gezeigt, daß tatsächlich vier Enzyme vorhanden sind.

6. Weil die Proteinase sich weder mit Tonerde bei alkalischer oder saurer Reaktion, noch mit Kaolin bei saurer Reaktion adsorbieren ließ, wurde sie nur proteolytisch einheitlich erhalten durch adsorptive Abtrennung der sie begleitenden Enzyme. Die Carboxypolypeptidase und Dipeptidase konnten durch viermalige Adsorption an Kaolin von ihr abgetrennt werden; die Aminopolypeptidase schließlich durch daran anschließende viermalige Adsorption an Eisenhydroxyd. Die Proteinase wurde in einer (scheinbaren) Ausbeute von ungefähr 30% erhalten.

7. Die Carboxypolypeptidase, welche durch Kaolin stark adsorbiert wird, konnte gereinigt werden durch Adsorption der Kaolinelution mit Tonerde und darauffolgende Elution mit verdünnter Essigsäure; sie war in dieser Elution proteolytisch einheitlich anwesend in einer 60%igen Ausbeute.

8. Die Aminopolypeptidase, die erst durch Eisenhydroxydadsorption von der Proteinase getrennt werden konnten, wurde aus der Elution dieser vereinigten Adsorbate fast proteinasefrei erhalten; neben Aminopolypeptidase in 28%iger Ausbeute fanden sich noch 2% der Proteinase in der Elution.

9. Die Dipeptidase konnte nicht gereinigt werden; ihre Unbeständigkeit scheint so groß zu sein, daß eine Elution nicht gelang.

10. Für die gereinigte Proteinase wurden nochmals die  $p_H$ -Optima ihrer Wirkung auf Gelatine und Casein bestimmt, und diese jetzt gefunden bei  $p_H = 8,1$  bzw.  $p_H = 7,4$ , woraus auf eine Ähnlichkeit mit dem Trypsin geschlossen wurde.

11. Versuche zur Aktivierung mit  $HCN$  und Zookinase ergaben bei der gereinigten Proteinase wieder ein negatives Resultat, dagegen trat mit Entero-kinase eine Aktivitätssteigerung auf; dieses ist eine Stütze für die Auffassung, daß das Enzym dem Trypsin ähnlich ist.

Zum Schlusse möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. H. J. JORDAN, herzlichen Dank sagen für die Anregung zu dieser Untersuchung und sein dauerndes Interesse an ihr, sowie Herrn Dr. H. J. VONK für die viele Hilfe bei der Ausführung der Arbeit, die er mir zuteil werden ließ.



Auch Herrn Prof. E. WALDSCHMIDT-LEITZ in Prag bin ich für die Gelegenheit, die er mir wohlwollend bot, die Methoden der Adsorption in seinem Laboratorium kennen zu lernen, zu vielem aufrichtigen Dank verpflichtet; für die viele Hilfe, die Herr Privatdozent Dr. A. SCHÄFFNER mir dabei verlieh, sei ihm auch an dieser Stelle herzlich gedankt.

### Literaturverzeichnis.

1. Abbott, R. L.: J. of exper. Zool. 44, 219 (1926). — 2. Abderhalden, E.: Naturwiss. 12, 716 (1924). — 3. Abderhalden, E., Schwab, E. u. Heumann, J.: Fermentforsch. 12, 559 (1931). — 4. Ambros, O. u. Harteneck, A.: Hoppe-Seylers Z. 181, 24 (1928/29). — 5. Ebenda 184, 93 (1929). — 6. Balls, A. K. u. Waldschmidt-Leitz, E.: Amer. J. Physiol. 90, 272 (1929). — 7. Bergmann, C.: Liebig's Ann. 445, 1 (1925). — 8. Berrill, N. J.: J. of exper. Biol. 6, 275 (1929). — 9. Biedermann, W.: In Wintersteins Handbuch der vergleichenden Physiologie 2. Jena 1911. — 10. Bodansky, M.: Amer. J. Physiol. 67, 547 (1924). — 11. Bodansky, M. u. Rose, W. C.: Ebenda 62, 473 (1922). — 12. Brücke, E.: Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl. 43, 601 (1861). — 13. Cohnheim, J.: Virchows Arch. 28, 241 (1863). — 14. Cohnheim, O.: Hoppe-Seylers Z. 33, 451 (1901). — 15. Ebenda 35, 396 (1902). — 16. Danilewsky, A.: Virchows Arch. 25, 279 (1862). — 17. Graetz, E.: Hoppe-Seylers Z. 180, 305 (1928). — 18. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. 46, 375 (1929). — 19. Graßmann, W.: Hoppe-Seylers Z. 167, 202 (1927). — 20. Graßmann, W. u. Dyckerhoff, H.: Ber. dtsch. chem. Ges. 61, 656 (1928). — 21. Hoppe-Seylers Z. 175, 18 (1928). — 22. Ebenda 179, 41 (1928). — 23. Graßmann, W., Dyckerhoff, H. u. v. Schoenebeck, O.: Ebenda 186, 183 (1930). — 24. Graßmann, W. u. Haag, W.: Ebenda 167, 188 (1927). — 25. Graßmann, W. u. Heyde, W.: Ebenda 183, 32 (1929). — 26. Ebenda 188, 69 (1930). — 27. Graßmann, W. u. Klenk, L.: Ebenda 186, 26 (1929). — 28. Graßmann, W., v. Schoenebeck, O. u. Eibeler, H.: Ebenda 194, 124 (1931). — 29. Hedin, S. G.: Hoppe-Seylers Z. 188 (1930). — 30. Hirsch, G. C.: Zitiert nach Shinoda (69), S. 343—345 und nach Jordan-Hirsch (38), S. 99. — 31. Hobson, R. P.: J. of exper. Biol. 8, 109 (1931). — 32. Hoppe-Seyler, F.: Arch. ges. Physiol. 14, 395 (1877). — 33. Husfeldt, E.: Hoppe-Seylers Z. 194, 137 (1931). — 34. Jordan, H. J.: Arch. ges. Physiol. 101, 263 (1904). — 35. Vergleichende Physiologie wirbelloser Tiere. 1. Ernährung. Jena 1913. — 36. Übungen aus der vergleichenden Physiologie. Berlin 1927. — 37. Allgemeine vergleichende Physiologie der Tiere. Berlin 1929. — 38. Jordan, H. J. u. Hirsch, G. C.: In Bethes Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie 3, 24 (1927). — 39. Karrer, P.: Einführung in die Chemie polymerer Kohlehydrate. Leipzig 1925. — 40. Kossel, A. u. Mathews, A.: Hoppe-Seylers Z. 25, 190 (1898). — 41. Krebs, H. A.: Biochem. Z. 238, 174 (1931). — 42. Krüger, P.: Verh. naturhist. Ver. preuß. Rheinland u. Westfalen 82, 51 (1925). Bonn 1926. — 43. Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. 26, 548 (1929). — 44. Krüger, P. u. Graetz, E.: Sitzgsber. Ges. naturforsch. Freunde Berl. 1927, 48. — 45. Hoppe-Seylers Z. 166, 128 (1927). — 46. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. 45, 463 (1928). — 47. Krukenberg, C. F. W.: Heidelberger Unters. 2, 1 (1878). — 48. Kupelwieser, L. u. Singer, P.: Biochem. Z. 178, 324 (1926). — 49. Linderström-Lang, K.: Hoppe-Seylers Z. 173, 32 (1927/28). — 50. Ebenda 182, 151 (1929). — 51. Ebenda 188, 48 (1930). — 52. Linderström-Lang, K. u. Holter, H.: Ebenda 201, 9 (1931). — 53. Linderström, Lang, K. u. Sato, M.: Ebenda 184, 83 (1929). — 53a. Mansour-Bek, J. J.: Proc. kon. Akad. Wetensch. Amsterd. 33, 858 (1930). — 54. Michaelis, L.: Biochem. Z. 7, 488 (1907/08). — 55. Ebenda 25, 359 (1910). — 56. Michaelis, L. u. Ehrenreich, M.: Ebenda 10, 283 (1908). — 57. Nicol, E. A. T.:



- Trans. Roy. Soc. Edinburgh **56**, 537 (1930). — 58. Northrop, J. H.: Naturwiss. **11**, 713 (1923). — 58a. J. gen. Physiol. **5**, 263 (1922). — 59. Oomen, H. A. P. C.: Publ. Staz. Zool. Napoli **7**, 3 (1926). Auch Diss. Utrecht 1926. — 60. Oppenheimer, C.: Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl. Leipzig 1925/26. — 61. Pavlovsky, E. N. u. Zarin, E. J.: Quart. J. microsc. Sci. **66**, 509 (1922). — 62. Ringer, W. E. u. Grutterink, B. W.: Hoppe-Seylers Z. **156**, 275 (1926). — 63. Roaf, H. E.: Biochemie. J. **3**, 462 (1908). — 64. Rogozinski, F.: Hoppe-Seylers Z. **79**, 398 (1912). — 65. Rona, P.: Praktikum der physiologischen Chemie. I. Fermentmethoden. Berlin 1926. — 66. Rona, P. u. Mislowitz, E.: Biochem. Z. **196**, 197 (1928). — 67. Sawano, E.: Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ., 4. Ser. (Biol.), **4**, 327 (1929). — 68. Sellier, J.: C. R. Soc. Biol. Paris **63**, 703 (1907). — 69. Shinoda, O.: Z. vergl. Physiol. **7**, 323 (1928). — 70. Journ. Biochem. Tokyo. **11**, 345 (1930). — 71. Sjöberg, K.: Biochem. Z. **133**, 294 (1923). — 72. van Slyke, D. D.: Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. I, Teil 7, S. 263. — 73. Ber. deutsch. chem. Ges. **43**, 3170 (1910). — 74. Sörensen, S. P. L.: Biochem. Z. **7**, 45 (1908). — 75. Ebenda **21**, 23 (1909). — 76. Ebenda **22**, 352 (1910). — 77. Ergebnisse der Physiologie **12**, 393 (1912). — 78. Thomas, A. W. u. Seymour-Jones, F. L.: J. amer. Chem. Soc. **45**, 1519 (1923). — 79. Utkina-Ljubowzowa, X. u. Steppuhn, O.: Biochem. Z. **211**, 426 (1929). — 80. Ebenda **220**, 41 (1930). — 81. Uvarov, B. P.: Trans. entomol. Soc. Lond. **76**, 255 (1928). — 82. Vernon, J.: J. of Physiol. **27**, 269 (1901). — 83. Vonk, H. J.: Z. vergl. Physiol. **5**, 445 (1927). — 84. Tijdschr. nederl. dierk. Vereenig. Ser. 3, **1**, 65 (1928). — 85. Verh. deutsch. zool. Ges. **1931**, 205. — 85a. Hoppe-Seylers Z. **198**, 201 (1931). — 86. Waldschmidt-Leitz, E.: Ebenda **132**, 181 (1924). — 87. Ebenda **142**, 217 (1924). — 88. In: Oppenheimer-Pincussen, Fermente und ihre Wirkungen. Bd. III. Methodik der Fermente. Leipzig 1928. — 89. Enzyme actions and properties. Translated and extended by R. P. Walton, New York, London 1929. — 90. Amer. J. Physiol. **90**, 549 (1929). — 91. Physiologie. Rev. **11**, 358 (1931). — 92. Waldschmidt-Leitz, E., Balls, A. K. u. Waldschmidt-Graser, J.: Ber. deutsch. chem. Ges. **62**, 956 (1929). — 93. Waldschmidt-Leitz, E., Bek, J. J. u. Kahn, J.: Naturwiss. **17**, 85 (1929). — 94. Waldschmidt-Leitz, E. u. Deutsch, W.: Hoppe-Seylers Z. **167**, 285 (1927). — 95. Waldschmidt-Leitz, E. u. Harteneck, A.: Ebenda **147**, 286 (1925). — 96. Ebenda **149**, 203 (1925). — 97. Ebenda **149**, 221 (1925). — 98. Waldschmidt-Leitz, E. u. Klein, W.: Ber. deutsch. chem. Ges. **61**, 640 (1928). — 99. Ebenda. **61**, 2092 (1928). — 100. Waldschmidt-Leitz, E. u. Purr, A.: Ebenda **62**, 2217 (1929). — 101. Naturwiss. **18**, 952 (1930). — 102. Waldschmidt-Leitz, E., Purr, A. u. Balls, A. K.: Ebenda **18**, 644 (1930). — 103. Waldschmidt-Leitz, E. u. Schöffner, A.: Hoppe-Seylers Z. **151**, 31 (1926). — 104. Waldschmidt-Leitz, E., Schöffner, A. u. Graßmann, W.: Ebenda **156**, 68 (1926). — 105. Waldschmidt-Leitz, E., Schöffner, A., Bek, J. J. u. Blum, E.: Ebenda **188**, 17 (1930). — 106. Waldschmidt-Leitz, E. u. Simons, E.: Ebenda **156**, 99 (1926). — 107. Ber. deutsch. chem. Ges. **59**, 3000 (1926). — 108. Waldschmidt-Leitz, E. u. Waldschmidt-Graser, J.: Hoppe-Seylers Z. **166**, 247 (1927). — 109. Wiersma, C. A. G. u. v. d. Veen, R.: Z. vergl. Physiol. **7**, 269 (1928). — 110. Wigglesworth, V. B.: Biochemie. J. **21**, 791 (1927). — 111. Ebenda **22**, 150 (1928). — 112. Willstätter, R.: In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, S. 289 (1922). — 113. Untersuchungen über Enzyme, 2 Bände. Berlin 1928. — 114. Ber. deutsch. chem. Ges. **55**, 3601 (1922). — 115. Naturwiss. **14**, 937 (1926). — 116. Ebenda **15**, 585 (1927). — 117. Willstätter, R. u. Bamann, E.: Hoppe-Seylers Z. **180**, 127 (1928/29). — 118. Willstätter, R., Bamann, E. u. Rohdewald, M.: Ebenda **185**, 267 (1929). — 119. Ebenda **186**, 85 (1929). — 120. Ebenda **188**, 107 (1930). — 121. Willstätter, R. u. Graßmann, W.: Ebenda **138**, 184 (1924). — 122. Ebenda **153**, 250 (1926). —



123. Willstätter, R., Graßmann, W. u. Ambros, O.: Ebenda 151, 307 (1926). —
124. Ebenda 152, 164 (1926). — 125. Willstätter, R. u. Kraut, H.: Ber. dtsh. chem. Ges. 56, 1117 (1923). — 126. Ebenda 57, 1082 (1924). — 127. Willstätter, R., Kraut, H. u. Erbacher, O.: Ebenda 58, 2448 (1925). — 128. Willstätter, R., Kraut, H. u. Fremery, W.: Ebenda 57, 1491 (1924). — 129. Willstätter, R. u. Kuhn, R.: Ebenda 56, 509 (1923). — 130. Willstätter, R. u. Memmen, F.: Hoppe-Seylers Z. 133, 247 (1924). — 131. Willstätter, R. u. Persiel, H.: Ebenda 142, 245 (1925). — 132. Willstätter, R. u. Racke, F.: Ann. Chem. 425, 1 (1921). — 133. Willstätter, R. u. Schneider, K.: Hoppe-Seylers Z. 133, 193 (1924). — 134. Willstätter, R. u. Waldschmidt-Leitz, E.: Ber. dtsh. chem. Ges. 54, 2988 (1921). — 135. Hoppe-Seylers Z. 125, 132 (1923). — 136. Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., Duñaiturria, S. u. Künstner, G.: Ebenda 161, 191 (1926). — 137. Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E. u. Hesse, A. R. F.: Ebenda 126, 143 (1923). — 138. Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E. u. Memmen, F.: Ebenda 125, 93 (1922/23). — 139. Willstätter, R. u. Wassermann, W.: Ebenda 123, 181 (1922). — 140. Wolvekamp, H. P.: Z. vergl. Physiol. 7, 454 (1928). — 141. Yonge, C. M.: Brit. J. exper. Biol. 2, 373 (1925). — 142. J. Mar. biol. Assoc. U. Kingd. 14, 295 (1926). — 143. Brit. Mus. Nat. Hist.), Great Barrier Reef Expedition 1928/29. Sci. Rep. 1, Nr 3 (1930).



# STELLINGEN.

---

## I

De proteinase uit het maagsap en middendarmklierextract van *Maja squinado* is identiek met de geactiveerde tryptische proteinase der vertebraten.

## II

De eiwitvertering bij *Maja squinado* geschiedt door tenminste vier enzymen (proteinase, carboxypolypeptidase, aminopolypeptidase en dipeptidase), die achtereenvolgens het eiwit aantasten.

## III

Het is niet noodzakelijk, het verschijnsel der maximale verkorting bij het midden van de hartpauze onder invloed van kortdurende rekking bij het hart van *Helix pomatia* te verklaren door een autokatalytisch proces.

WILLEMS diss. Utrecht 1932, p 44

## IV

Onder natuurlijke omstandigheden is het  $O_2$ -verbruik van *Nereis virens* onafhankelijk van de  $O_2$ -spanning.

HYMAN. Journal Exp. Zool. 61

## V

Uit de proeven van Stekelenburg is gebleken, dat de hypothese van Treub, dat blauwzuur het eerste assimilatieproduct van stikstof is, onjuist is.

Receuil Trav. Bot. Neerl. 28.



## VI

Weber heeft niet aannemelijk gemaakt, dat een tonoplast afwezig is.

Protoplasma 15.

## VII

Het vomer der zoogdieren is homoloog met dat der reptielen.

NAEF. Biol. Zentralblatt 46.

## VIII

Bij de meeste pterygote insecten is het middendarm-epithelium van ectodermalen oorsprong.

---















