

Über neuartige pepsinwirksame Stoffe

Von der Technischen Hochschule Danzig
zur Erlangung
der Würde eines Doktor-Ingenieurs
genehmigte Dissertation

Vorgelegt von
Diplom-Ingenieur **Alfred Schneider**
aus Hönningen-Rhein

Referent: Prof. Dr. H. Albers
Korreferent: Prof. Dr. E. Glimm

Tag der Promotion: 24. Juli 1939

1940

Druck: J. Borowsky, Köln, Aachenerstraße 26. Fernruf 5 1900.

II 38387



B-ka GPG
D/G-227/57

Meinen Eltern!

Einleitung.

Im Rahmen der von ALBERS und Mitarbeitern¹⁾ durchgeführten Untersuchungen an Fermenten, insbesondere im Rahmen der Co-Ferment-Frage, behandelt die vorliegende Arbeit das Pepsin als eines der wichtigsten eiweiß-abbauenden Fermente.

Vorerst stehen uns für die Einteilung der eiweiß-abbauenden Fermente - Proteasen - keine rein chemischen Aufbauprinzipien zur Verfügung. Wir sind daher gezwungen, die Einteilung auf Grund der Wirkungsspezifität und der p_H -Abhängigkeit vorzunehmen. Wir unterscheiden zwischen Proteinase und Peptidasen. Erstere spalten nur hochmolekulare Eiweißkörper, während die Peptidasen nur auf Peptide einwirken. Bei ihnen unterscheiden wir wieder zwischen Polypeptidasen und Dipeptidasen je nach Art des Substrats.

Die Proteasen.

Proteinase	Wirkungs- Optimum bei p_H	Peptidasen	Wirkungs- Optimum bei p_H
Pepsin	etwa 2	Dipeptidase	etwa 7-8,5
Papain	" 4-7	Aminopoly- peptidase	" 7-8.5
Kathepsin	" 4-7	Carboxylpoly- peptidase	" 7-8.5
Trypsin	" 8		

Dazu kommen die Protaminase und die Prolinase und die Imino-peptidase²⁾.

1) vgl. die zusammenfassende Arbeit von H. ALBERS *Angew.Chem.* 49, 448 (1936), sowie H. ALBERS, E. BEYER, A. BOHNENKAMP und G. MÜLLER, *B.* 71, 1913 (1938).

2) vgl. Ergebnisse Enzymforschung 5, 79 ff (1936).

Ohne auf die in der Literatur diskutierten Möglichkeiten des Eiweißabbaues durch die Proteasen eingehen zu wollen, sollen drei durch GRASSMANN (1) formulierte Sätze angeführt werden:

- 1) "Man kennt bisher kein proteolytisches Ferment von rein desaggregierender Wirkung."
- 2) "Man kennt bisher keine auf die Aufspaltung von Dioxypiperazinen (Peptidanhidriden) eingestellten Fermente."
- 3) "Bei der enzymatischen Proteinspaltung werden Amino- und Carboxylgruppen immer in äquivalenter Menge gebildet, es werden also ausschließlich -CO-NH-Bindungen zerlegt."

Zu 2) ist zu bemerken, daß auf Grund verschiedener Arbeiten⁺⁾ die Möglichkeit einer fermentativen Spaltung der Diketopiperazine möglich erscheint, die basische oder saure Gruppen tragen.

In Bezug auf die Spezifität und Wirkungsweise der Proteinaseen hat sich ergeben, daß Pepsin auf Eiweißkationen und Trypsin auf Eiweißanionen eingestellt ist, während das Pepain als pflanzliches Ferment ungeladene isoelektrische Eiweißmoleküle spalten soll. Beobachtungen verschiedener japanischer (2) Forscher (2) lassen die Möglichkeit offen, daß Pepsin auch Diketopiperazine angreifen kann, wenn eine freie NH₂-Gruppe vorhanden ist.

Zur Nomenklaturfrage der Fermentsysteme sei bemerkt, daß die von H. v. EULER und seiner Schule für das Zymase-System vorgeschlagene Formulierung:

Apo-Zymase + Co-Zymase \rightleftharpoons Holo-Zymase
 später auf alle Fermentsysteme übertragen wurde und zu folgender Gleichung führt:

Apo-Ferment + Co-Ferment \rightleftharpoons Holo-Ferment

Danach wäre also das "Apo-Ferment" identisch mit dem "Träger" oder "Pheron" und das "Co-Ferment" gleich der "prothetischen" oder "aktiven Gruppe" oder dem

+) Vgl. Erg. Enzymforschung 5, 79 (1936).

"Agon". Das Apo-Ferment ist nach den bisherigen Ergebnissen stets ein hochmolekulares Eiweiß und bedingt die Substratspezifität; das Co-Ferment ist ein niedermolekularer Stoff und maßgebend für die Wirkungsspezifität; erst Apo-Ferment und Co-Ferment vereinigt zum Holo-Ferment sind wirksam. Prinzipiell ergibt sich so die Möglichkeit, daß dasselbe Apo-Ferment zusammen mit verschiedenen Co-Fermenten auch verschiedene Wirkungsspezifitäten entfalten kann.

Bei den Proteasen ist die Einheitlichkeit der isolierten Fermente weitgehend diskutiert worden. J.H. NORTHROP gelang es, 1930 das Pepsin (3) und 1932 das Trypsin (4) zu kristallisieren⁺⁾ . Seit der Auffindung der kristallisierten Fermente wird von den verschiedensten Forschern die Frage diskutiert, ob die kristallisierten Produkte, die sämtlich den Charakter und die Zusammensetzung von Eiweißen zeigen, die Fermente "selbst" sind, oder ob auch hier ein Apo-Ferment zusammen mit einem Co-Ferment die fermentative Wirkung des Holoferments bedingen.

Somit stehen zwei Theorien bezüglich der proteolytischen Fermente zur Diskussion:

- 1) die unitarische oder Proteintheorie,
- 2) die dualistische oder Co-Ferment-Theorie.

Als Vertreter der Proteintheorie stützen sich J.B. SUMNER und J.H. NORTHROP in erster Linie auf die Tatsache, daß alle Veränderungen, die am Ferment Eiweißkörper vorgenommen wurden, auch eine enzymatische Wirkungsschwächung zur Folge haben.

Der Auffassung NORTHROPs, daß das von ihm kristallisierte Pepsin das Ferment selbst ist, stehen die Befunde von E. v. BRÜCKE (11), C. SUNDBERG, (12) und P. SCHRÜMP (13) gegenüber, denen es auf ver-

⁺⁾ Hierbei sei erwähnt, daß bereits im Jahre 1926 J.B. SUMNER die Urease (5) als kristallisiertes Ferment isolierte.- Nach dem Pepsin und dem Trypsin wurden in neuerer Zeit noch die Amylase (6) die Carboxypolypeptidase (7) die Lipase (8), die Katalase (9) und das Papain (10) kristallisiert erhalten.

schiedenen Wegen gelungen ist, "eiweißfreie" Präparate von hoher Aktivität darzustellen. R. WILLSTÄTTER und W. ROHDEWALD (14) bestätigen die Abwesenheit von Eiweiß in einem nach SUNDBERG dargestellten Präparat, wobei jedoch zu bemerken ist, daß die Wirksamkeit ihrer eiweißfreien Lösungen recht gering war. Sie kommen zu dem Schluß, daß das von NORTHROP isolierte Pepsin mit einem großen Teil von Ballast-Proteinen behaftet ist, während Brücke-Pepsin mit ähnlichem Wirkungsvermögen durch "andersartige Fremdkörper" belastet ist.

H. KRAUT und E. TRIA (15) haben zur Entscheidung der Frage, ob das kristallisierte Pepsin das Enzym selbst darstellt, Untersuchungen ausgeführt, in denen sie aus dem gleichen Ausgangsmaterial (Park-Davis-Pepsin 1:10.000) einerseits kristallisiertes Pepsin nach NORTHROP, andererseits "eiweißfreies Pepsin", Brücke-Pepsin, darstellten. Beide Präparate wurden verglichen in ihrer Wirksamkeit bezogen auf den N-Gehalt, den Tyrosin- (Reaktion nach Millon) bzw. Tryptophangehalt und den Spaltungsverlauf mit Casein als Substrat.

Northrop-Pepsin hat einen N-Gehalt von 15,5 %, einen Tyrosingehalt von 10,3 % und einen Tryptophangehalt von 2,2 %. Das von H. KRAUT und E. TRIA dargestellte Brücke-Pepsin hat einen N-Gehalt von 8,2 %, "wenig oder gar kein Tyrosin und Tryptophan" und unterscheidet sich "durch die Einzelheiten des Verlaufs der Caseinspaltung" vom Northrop-Pepsin. Die Zusammensetzung des Brücke-Pepsins mit 8,2 % Stickstoff ist also anders als die eines typischen Eiweißkörpers. In bezug auf die übrigen Eiweißreaktionen ließ sich kein Schluß ziehen, da die zur Verfügung stehenden Mengen zu gering waren. Es ließ sich nur nachweisen, daß die angewandten Reaktionen (Biuret, Sulfosalizylsäure und Ferrozyanwasserstoffsäure) bei gleichen Mengen Northrop- und Brücke-Pepsin im ersten Fall positiv, bei Brücke-Pepsin dagegen negativ waren. Aus der Untersuchung geht hervor, daß es zwei sehr ähnliche, aber in ihrer Spezifität doch

unterscheidbare Proteinase sind. Bei beiden liegt das Optimum der Wirkung bei p_{H2} ; "es besteht die Möglichkeit, daß im Northrop- und Brücke-Pepsin dasselbe Agon (aktive Gruppe) mit verschiedenem Pheron (Träger) verbunden ist, und daß dadurch die Spezifität des Symplex modifiziert wird.

Allgemeiner Teil.

Somit ist die eingangs gestellte Frage nach der Einheitlichkeit des Pepsins zwar anscheinend zugunsten der Co-Ferment-Theorie ergänzt, aber sie ist noch nicht entschieden. - Für die Entscheidung ist neben der von KRAUT erwähnten Schwierigkeit der einwandfreien Bestimmungsmethodik für Pepsin aus verschiedenen Ausgangsmaterialien auch die äußerst hohe Empfindlichkeit des kristallisierten Produkts gegen äußere Einflüsse maßgebend.

Zur Methodik der Pepsinbestimmung.

Zur Bestimmung der Wirksamkeit der im folgenden beschriebenen Substanzen sei bemerkt, daß neben Casein als Substrat auch Gelatine und Eialbumin geprüft wurden. Auf Grund vieler Versuche unter mannigfaltigster Variation der Zusammensetzung der Versuchsansätze hat sich herausgestellt, daß mit gleichen Enzymmengen in Versuchsansätzen mit bzw. ohne Zugabe von Puffer keine vergleichbaren und reproduzierbaren Werte ermittelt werden. Weiter zeigt sich, daß die verschiedensten Versuchsansätze auch ohne Zugabe von Ferment einen nicht unerheblichen Zuwachs titrierbarer Carboxylgruppen ergeben. Auch der von E. WALDSCHMIDT-LEITZ und G. KÜNSTNER (16) in ihrer Untersuchung zur Kenntnis der Pepsinwirkung angegebene Versuchsansatz zeigt einen erheblichen Verbrauch an alkoholischer KOH ohne Zugabe von Ferment. - Es sei darauf hingewiesen, daß auch hier sowohl die Menge des Caseins als auch die Menge und Art des verwendeten Puffers in der verschiedensten Weise va-

riert und die entsprechenden Leerversuche geprüft wurden.

In dem von uns gewählten Versuchsansatz wurde auf die Zugabe von Puffer verzichtet und das Optimum der Pepsinwirkung bei p_{H^2} durch Zugabe von Salzsäure eingestellt. Die Konstanz des eingestellten p_H -Wertes wurde potentiometrisch durch jeweilige Messung vor, während und nach dem Versuch ermittelt. Auch bei Zugabe der zu prüfenden Substanzen trat - wie sich zeigte - keine Verschiebung ein. Als Substrat wurde Casein nach HAMMARSTEN (Schering-Kahlbaum) verwendet, und es ist dabei unbedingt erforderlich, eine möglichst gleiche Bereitungsweise der Caseinlösung vorzunehmen. Auch darf, wenn man reproduzierbare Werte erhalten will, nur Caseinlösung von bestimmtem Alter verwendet werden.

Versuche zur Auftrennung von Pepsinen.

Zur Prüfung der zusammengesetzten Natur des Pepsins wurde die bei anderen Fermenten mit gutem Erfolg angewandte Methode der Dialyse für die Auftrennung eines Holo-Fermentes in Apo- und Co-Ferment verwendet.

Auf Grund der bereits erwähnten sehr großen Empfindlichkeit des kristallisierten Pepsins muß für derartige Reihenversuche, die zunächst als Vorversuche zu werten sind, ein Handelspepsin - in unserem Falle Witte-Pepsin ⁺) - verwandt werden.

NORTHROP und Mitarbeiter ⁺⁺⁾ geben an, daß sie ein kristallisiertes Pepsin durch Dialyse und dann durch Hitzekoagulation in zwei Fraktionen zerlegt haben. Beide Fraktionen unterscheiden sich durch ihren Gehalt an Aminosäuren - insbesondere an Cystin und Tyrosin - voneinander.

+) Für die Überlassung der Enzympräparate danke ich der Fa. Gebr. Witte, Rostock auch an dieser Stelle.

++) Vgl. Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen, Supplement 6, 843 (1936).

Das Ergebnis der Dialysenversuche spricht nicht für die Auftrennung; trotz der mannigfaltigsten Variationen der Versuchsbedingungen (Änderung des p_H -Wertes der Außenflüssigkeit, der Art des Puffers und der Konzentration der zu dialysierenden Lösung) ist es nicht möglich gewesen, eindeutig durch Co-Ferment - etwa durch Kochsäfte - aktivierbare Apo-Fermentlösungen zu erhalten. Zwar gelingt es durch Dialyse

(1) bei p_H 4-5, zu einer ^{+) inaktiven Fermentlösung zu kommen, die durch Zugabe von Trypsin, welches selber bei dem Optimum der Pepsinwirkung keine Spaltung bewirkt, zu aktivieren ist. Dabei ist bemerkenswert, daß auch Vitamin C einen aktivierenden Einfluß hat, und daß somit die Möglichkeit besteht, daß dieses Vitamin beim fermentativen Abbau der Eiweißkörper eine Rolle spielt.}

Wenn dieser Befund auch den Anschein erweckt, als ob ein in der Dialyse entstandenes Apo-Pepsin durch eine Coprotease des wirkungsgleichen Trypsins wieder ergänzt wurde zum aktiven Holo-Pepsin, so wird sein Wert doch eingeschränkt durch die Tatsache, daß eine Oxydation zumindest mit verantwortlich ist für die gefundene Inaktivierung bei der Dialyse.

(2) Dialysiert man nämlich unter Luftabschluß, d.h. unter Einleiten von Stickstoff, so tritt keine Inaktivierung ein, und die dialysierte Lösung zeigt noch nach ungefähr 40 Stunden langer Dialyse nur eine ganz geringe Abnahme der Aktivität ⁺⁺⁾.

Es wurde dann versucht, auf einem anderen Wege die Entscheidung über eine Auftrennbarkeit des Pepsins herbeizuführen. Nehmen wir an, daß tatsächlich zwischen p_H 4 und 5 eine Dissoziation des Holo-Fermentes eintritt, so müßte es möglich sein, durch Ultrafiltration die beiden Anteile auf Grund ihrer verschiedenen Molekülgröße zu trennen.

+) Siehe Versuch (1), (2) usw.

++) Daraus geht hervor, daß die von H. ELBLINGER und C. FUNK beobachtete Inaktivierung des Pepsins durch Schütteln zusätzlich durch eine Oxydation bedingt sein kann.

- Die Versuche ergeben, daß sowohl beim Handels-
- (3) pepsin, als auch bei weitestgehend gereinigtem Witte-
- (4) Pepsin (analog der Northrop'schen Vorschrift zur Bereitung von kristallisiertem Pepsin) im Niederschlag wie im Ultrafiltrat peptische Aktivität gefunden wird. Das heißt aber, daß ein Stoff vorhanden ist, dessen Molekulargewicht auf Grund von Erfahrungen, die mit anderen Fermenten (Phosphatasen) und gleichen Filtermembranen gemacht wurden, kleiner sein muß als 6000-10000, und wenn wir das Molekulargewicht des Northrop-Pepsins zu 35000 annehmen, so ist mit dieser Ultrafiltration eine Auftrennbarkeit der verwendeten Pepsinlösungen in (mindestens) zwei Komponenten erwiesen.

Wir unterscheiden im folgenden diesen offenbar niedermolekularen peptisch aktiven Stoff als Pepsidin von dem bisher bekannten hochmolekularen Pepsin⁺.

Einen Hinweis auf eine Aufteilbarkeit des Pepsins könnten weiterhin Versuche von H. ELBLINGER und C. FUNK (18) bieten: Die Bearbeiter fällten Handelspepsin (MERCK) mit verschiedenen Reagenzien, insbesondere durch Bleiacetat, und fanden, daß die wässrigen Lösungen leicht "durch allzu große Verdünnung, Bewegung, vielleicht auch teilweise durch Luftzufuhr schnell inaktiviert werden". Es konnten zwei Fraktionen erhalten werden, die die Verfasser zu dem Schluß kommen lassen, daß das Pepsin "aus inaktivem Ferment und Kinase besteht".

Wir unternahmen Versuche in gleicher Richtung, gingen aber aus von einer Rohlösung (siehe S. 22) in der Absicht, jede eventuelle Veränderung des Pepsins bei einer technischen Darstellung zu umgehen. Dabei zeigt sich, daß nur im stark alkalischen Gebiet auf Zusatz von Bleiacetat eine vollständige Fällung eintritt, d.h. daß die resultierende Lösung nach dem Entbleien und Entfernen des Schwefelwasserstoffs keine proteolytische Wirksamkeit mehr zeigt. Diese Inakti-

⁺) Später als "Northrop-Pepsin" bezeichnet.

vierung ist aber auf die starke Alkalität zurückzuführen, denn fällt man beim natürlichen p_H der Lösung (2,5) mit Bleiessig oder bei p_H 5.0 mit Bleiacetat, so tritt eine weitgehende Reinigung ein, aber keine vollständige Fällung des proteolytisch wirksamen Anteils, weil sowohl Niederschlag, als auch Filtrat nach dem Entbleien peptisch wirksam sind.

Nach H. ELBLINGER und C. FUNK soll die Fällung mit neutralem Bleiacetat vollständig sein. Man kommt so zu dem Schluß, daß in der hier angewandten Rohlösung ein Stoff vorhanden ist, der dem Merck-Pepsin - vielleicht auf Grund seiner Aufarbeitung - fehlt. Weiter ist anzunehmen, daß dieser Stoff kein Eiweißkörper im Sinne des kristallisierten Pepsins sein kann, weil sonst nach allen Erfahrungen mit hochmolekularem Eiweiß eine Fällung durch Bleisalze eintreten müßte. Im Filtrat des Bleiniederschlages ist also offenbar ein nicht eiweißartiger niederer-molekularer Stoff mit peptischer Aktivität vorhanden.

(6) Auf Zusatz von Silbernitrat zu einer Lösung, die diesen Stoff enthält, tritt nur eine inaktive Fällung auf; wieder zeigt das Filtrat peptische Aktivität.

Man darf in Analogie zu dem obigen Befund bei der Ultrafiltration annehmen, daß der so nachgewiesene niedermolekulare peptisch wirksame Stoff dem bei der Ultrafiltration nachgewiesenen entspricht und somit wahrscheinlich ebenfalls als Pepsidin anzusprechen ist. Zur Charakterisierung des niedermolekularen peptisch wirksamen Stoffes wurde das wohlbekannte, hochmolekulare Pepsin durch Erhitzen der Lösungen zerstört:

(8) Eine Rohlösung wird mit Eisessig versetzt, erhitzt und dazu nach dem Abkühlen zur Eiweißfällung ein Chloroform-Alkohol-Gemisch gegeben. Das Filtrat zeigt nach dem Vertreiben der Fällungsmittel noch eine zwar geringe, aber deutlich peptische Aktivität. Auf Zusatz eines Oxydationsmittels: (H_2O_2 Wasserstoffsperoxyd) wird diese gesteigert im Gegensatz zum Pepsin, bei dem stets eine Schädigung der Aktivität erhalten

wird +).

- (9) Ein niedermolekularer peptisch aktiver Anteil kann Handelspräparaten ferner durch Extraktion entzogen werden: Extrahiert man festes Witte-Pepsin im Soxhlet-Apparat mit n-Butylalkohol, so zeigt sich nach dem Abdestillieren des Butylalkohols und Lösen des braunen Rückstandes in Wasser, daß dieser einen Stoff enthält, der Casein unter Freilegung von Carboxylgruppen abzubauen vermag. Das gleiche Ergebnis erhält man durch Extraktion bzw. durch einfaches Erhitzen von Rohlösung zusammen mit Butylalkohol ++).
- (10)

Auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd tritt auch bei dem Extraktstoff keine Schädigung, sondern eine Erhöhung der Aktivität ein.

Auf Grund der bisherigen Darstellungen des bzw. der niedermolekularen Pepsidine ergibt sich, daß dieses sicher kein Eiweiß im üblichen Sinne mehr ist.

nach

-
- +) Selbstverständlich werden auch die entsprechenden Leerversuche geprüft.
- ++) Der mit Wasser aufgenommene Rückstand des Butylalkohol-Extraktes wurde außer mit Casein mit demselben Erfolg auch mit Eialbumin und Pepton als Substrat im Versuch geprüft.

Über ein weiteres eiweißfreies Pepsin.

Aus den bisherigen Versuchen geht zweifelsfrei hervor, daß es neben dem hochmolekularen Pepsin in Pepsin-Präparaten einen niederer-molekularen ultrafiltrierbaren Anteil mit peptischer Aktivität gibt, Pepsidin genannt, und daß ein niedermolekularer Anteil in Pepsinlösungen kochbeständig ist

Über die Identität des "Pepsidins" mit jenem im Phenylhydrazinderivat vorhandenen aktiven Stoff ist damit aber noch nichts ausgesagt. Zur Entscheidung dieser Frage wurden Versuche angestellt, die sich gleichzeitig mit der Klärung des noch rätselvollen sogen. "Brücke-Pepsins" beschäftigen sollten.

Das von H. KRAUT und E. TRIA untersuchte Brücke-Pepsin wurde, wie bereits berichtet, aus Park-Davis-Pepsin hergestellt, während E. v. BRÜCKE die Darstellung dieses Pepsins mit der Selbstverdauung von frischer Magenschleimhaut in Gegenwart von phosphorsäurehaltigem Wasser beginnt. Erst die zweite oder dritte Extraktion wird aufgearbeitet. Nach Absorption des Pepsins an phosphorsaurem Kalk wird in verdünnter Salzsäure gelöst, das Pepsin an Cholesterin adsorbiert und durch Ausäthern des Cholesterins wieder in Lösung gebracht. Einen Verlust von 80 % der Wirksamkeit steht mehr als 90 % Verlust an Trockensubstanz entgegen, sodaß insgesamt nur eine zweifache Reinigung erfolgt. Von der ursprünglichen Wirksamkeit sind noch 1 % erhalten. Daraus geht hervor, daß diese Art der Darstellung sehr verlustreich ist, und daß zur eingehenden Untersuchung erhebliche Mengen an Ausgangsmaterial benötigt werden.

An anderen Fermenten (Phosphatasen+) wurde die Erfahrung gemacht, daß es durch längere Autolyse gelingt, zu hoch aktiven Präparaten zu kommen. In unseren aus Magenschleimhaut bereiteten Rohlösungen, die im Eisschrank bei 0° aufbewahrt wurden, hatte

1) H. u. E. Albers: Ztschr. f. physiol. Chem. 232, 189 (1935)

- (1) sich gezeigt, daß ein Eigenabbau oder eine Autolyse statt hatte. Der dabei entstehende voluminöse Niederschlag wurde von Zeit zu Zeit abzentrifugiert. Nach zweimonatigem Stehen wird eine sobehandelte Rohlösung bei einem p_H von etwa 3.2 bis zur Viertel-sättigung mit Magnesiumsulfatlösung (ges.) versetzt. Der so entstandene Niederschlag kann nach dem Abzentrifugieren durch Behandeln mit 70 %igem Alkohol in eine lösliche (Su.70 a₁) und in eine unlösliche Fraktion (Su.70 c) zerlegt werden. Beide Fraktionen stellen ein weiß-gelbliches Pulver dar, sie sind beide hochaktiv +).

Auch durch direkte Behandlung des Magnesiumsulfat-Niederschlags mit Aceton und anschließendem Auswaschen mit Alkohol und Äther gelingt es, zu einem haltbaren, pulvrigen Produkt zu gelangen. Die Schwierigkeit einer solchen Darstellung peptisch hochaktiver Präparate liegt lediglich darin, daß die isolierten Substanzen einen nicht unerheblichen Aschegehalt (in der Hauptsache wohl Magnesiumsulfat) haben. Es besteht aber die Möglichkeit, durch entsprechend lange Dialyse das Magnesiumsulfat zu entfernen.

- (19) Im Gegensatz zu dieser gealterten Rohlösung, in der die Eiweiße weitgehend abgebaut sind, wird eine frisch dargestellte Rohlösung der gleichen Behandlung unterworfen in der Absicht, zu einem Pepsin zu kommen, das nicht "eiweißfrei" ist. Der aus einer frischen Lösung mit Magnesiumsulfat gefällte Niederschlag wird einmal mit Aceton und in einem zweiten Anteil mit 70 %igem Alkohol digeriert.

Das mit Aceton behandelte Produkt stellt ebenfalls ein weißes Pulver dar Su.80 a₁

Bei der Behandlung mit 70 %igem Alkohol geht ein Teil des Niederschlags in Lösung: dieser lösliche Anteil fällt beim Stehen bei -18° oder auf Zugabe von Aceton wieder aus. Der ausgefallene Niederschlag ist kolloider Natur, er läßt sich weder fil-

+) Siehe S. 43 u.f.

trieren noch zentrifugieren. Der geringe auf dem Filter verbleibende Rückstand verschmiert sofort.

Es sei noch erwähnt, daß auch durch einfaches Schütteln des Mg-Pepsins mit 96 %igem Alkohol ein wirksames Präparat dargestellt werden kann.

Die Analysen der so dargestellten Substanzen ergaben:

Substanz	% C	% H	% N		% Asche
"Mg-Pepsin" 80 a ₁	26.32	5.54	8.22	(11.44) ⁺	28.26
"Mg-Pepsin A" 70 c	31.81	6.02	8.53	(11.26)	24.24
"Mg-Pepsidin" 70 a ₁	50.54	6.68	14.23	(14.44)	00.61

(Das von H. KRAUT und E. TRIA dargestellte "Brücke-Pepsin" hat einen N-Gehalt von 8,2% und einen Aschegehalt von 35.96 %⁺⁺). Die Substanzen sind hygroskopisch, aber absolut haltbar, eine Tatsache, die für die weiteren Untersuchungen von größtem Vorteil ist, zumal das reine kristallisierte Pepsin auf Grund seiner sehr großen Empfindlichkeit ein längeres Aufbewahren nicht verträgt.

Eiweiß-Reaktionen.

Die mit den Substanzen ausgeführten Eiweiß-Reaktionen sowie die Bereitung der erforderlichen Lösungen erfolgten genau nach dem von S.W. COLE (19) gegebenen Vorschriften, was für das Gelingen der Reaktionen unbedingt erforderlich ist.

+) N-Werte berechnet nach Abzug des Asche-Gehalts. Siehe S. 52.

++) Berechnet aus der Angabe von H. KRAUT und E. TRIA daß 1 ccm Cholesterineluats 0,57 mg organischer Substanz enthielt neben 0,32 mg Asche.

Tabelle 1:

Art der Reaktion	S u b s t a n z N r.		
	80 a ₁ "Mg-Pepsin"	70 c "Mg-Pepsin A"	70 a ₁ "Mg-Pepsidin"
Sulfosalizylsäure	5 mg -	5 mg -	5 mg -
Xanthoprotein	+	(+)	(+)
Millon'sche Reaktion	(+)	(+)	+
Voisinet	+	+	+
Biuret	+	(+)	+
Molisch	-	-	-

(20) Kolorimetrische Bestimmung des Tryptophangehalts.

Die Bestimmung erfolgt auf Grund der Voisinet'schen Farbreaktion mit Formaldehyd, Salzsäure und Nitrit unter den von O. v. FÜRTH und Z. DISCHE (20) angegebenen Bedingungen.

Als Eichkurve werden die von R. KUHN und P. DesNUELL (21) ermittelten Werte der Tryptophanbestimmung im Casein zu Grunde gelegt.

Der von uns gefundene Tryptophangehalt wird angegeben unter Einbegriff aller Mängel der angewandten Reaktion⁺ und mit der für kolorimetrische Verfahren bedingten Genauigkeit. Den Prozent-Gehalt an Tryptophan bezogen auf vorhandene Menge organischer Substanz bzw. auf die gefundene Menge Stickstoff in mg zeigt die Tabelle

⁺) Siehe dazu: O. v. Fürth, und Z. Dische. Biochem. Ztschr. 146, 275 (1924)

Substanz Nr.	% Tryptophan ber. auf organ. Subst.	% Tryptophan ber. auf gef. Stickstoff
"Mg-Pepsin" 80 a ₁	1.77	15.40
"Mg-Pepsin A" 70 c	2.54	23.17
"Mg-Pepsidin" 70 a ₁	3.44	24.00

Es ergibt sich also, daß die so dargestellten Substanzen ähnlich sind dem "Brücke-Pepsin" insofern, daß sie mit den typischen Eiweißreagenzien keine Fällungen geben und auch bei diesen Präparaten der Tryptophangehalt wie in dem von H. KRAUT und E. TRIA dargestellten Brücke-Pepsin unter 4% liegt. Der Vergleich der einzelnen Fraktionen mit den bisher bekannten Pepsinen wird später diskutiert.

Es ist nur darauf hinzuweisen, daß durch die oben angegebene Art der Darstellung die Möglichkeit gegeben ist, zu hochaktiven und haltbaren Präparaten zu kommen, die für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiete weit besser geeignet sind als das kristallisierte Pepsin oder das Brücke-Pepsin.

Experimenteller Teil.

=====

Zur Bestimmung der Wirksamkeit.

Die peptische Wirksamkeit der untersuchten Substanzen wird durch Caseinspaltung bestimmt. Die Zahl der freigelegten Carboxylgruppen wird ermittelt durch Titration mit alkoholischer Kalilauge nach WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ (22). Verwandt wurde n/10 bzw. n/50 KOH ⁺). Als Substrat wählten wir 6 %ige Casein-Lösung (6 g Casein in 94 ccm Wasser + 6,0 n/1 NH₃). Die Caseinlösung muß vor den Versuchen mindestens zwei Tage gestanden haben.

Wenn nicht anders vermerkt, wurde der folgende Versuchsansatz zur Prüfung der Aktivität angewandt: 10 ccm Caseinlösung werden 10 Minuten im Thermostaten ($t=40^{\circ}$) stehen gelassen. Dann gibt man die Caseinlösung unter Schütteln in eine Lösung, die 6,0 ccm n/5 HCl und die zu prüfende Substanz gelöst in n/100 HCl enthält. Die Menge n/100 HCl ist so zu wählen, daß das Gesamtvolumen des Ansatzes stets 25,0 ccm beträgt. Es wird der Verlauf der Spaltung gemessen bei $t=40^{\circ}$ und zu jeder Bestimmung werden 5,0 ccm des Versuchsansatzes herauspipettiert.

Die für diesen Versuchsansatz ohne Ferment ermittelten Werte ergeben:

<u>ccm n/10 KOH nach Minuten</u>				
0	10	30	60	120
0,00	0,02	0,05	0,07	0,08

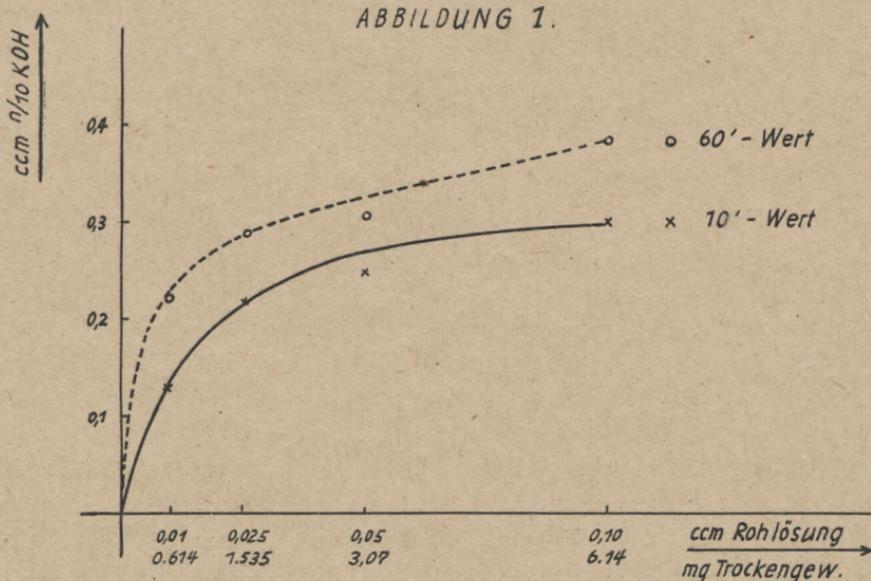
Zu jeder Versuchsreihe wurde ein Leerversuch gemacht; dabei zeigte sich der für die einzelnen Zeiten ermittelte Verbrauch an alkoholischer KOH innerhalb der Grenze + 0.01 als absolut konstant. Bei den

+) Fräulein J. Pohl danke ich für die Ausführung der Titrationsen.

angegebenen Spaltungswerten der geprüften Substanzen sind die Werte des Leerversuchs abgezogen.

Darstellung der Rohlösung.

Die Bereitung der verwendeten Rohlösung erfolgte mit einigen Abänderungen nach der von C.A. PEKELHARING (23) gegebenen Vorschrift. Der Fundusteil von 20 Schweinemägen wird zerkleinert und in 8 l 0,5-%iger HCl 30 Stunden lang bei 37° verdaut. Nach dem Zentrifugieren und Filtrieren wird die klare Lösung bis auf 1/3 ihres ursprünglichen Volumens im Vakuum bei einer Temperatur von 25 - 30° eingeengt und dann im Eisschrank aufbewahrt. Die Aktivitäten von steigenden Mengen einer so bereiteten Lösung ⁺ bezogen auf mg Trockengehalt zeigt die Abbildung 1.



⁺) Im folgenden als "Rohlösung" bezeichnet.

Darstellung des kristallisierten Pepsins
nach Northrop.

Die Darstellung erfolgte nach der von NORTHROP⁺) angegebenen Vorschrift. Das kristallisierte Produkt wird unter gesättigter Magnesiumsulfatlösung im Eisschrank aufbewahrt. Für die einzelnen Versuche wird das kristallisierte Pepsin in n/100 Salzsäure gelöst. Neben der Bestimmung des Trockengewichts wird der in 1 ccm enthaltene Stickstoffgehalt durch Analyse ermittelt. Die gemessene Aktivität wird bezogen auf den gefundenen Stickstoffgehalt. Wir erhielten aus 100 g Park-Davis-Pepsin etwa 8 g kristallisiertes Produkt. Die Ausbeute beträgt analog den von H.KRAUT und TRIA gemachten Angaben 30-40%. Auf Grund der Unmöglichkeit der Festlegung einer Pepsineinheit bei Anwendung verschiedener Substrate oder Versuchsansätze benutzen wir die gefundene Aktivität des kristallisierten Pepsins nur als Vergleichsmöglichkeit. Die Mengenwirkungskurve bezogen auf mg Pepsin-N zeigt Abbildung 3 (S. 39).

D i a l y s e n .

Versuch (1)

5 g WITTE-Pepsin gelöst in 200 ccm n/10 HCl werden 22 Stunden lang gegen fließenden n/100 Acetat-Puffer vom p_H 4.4 in einem rotierenden Schnelldialysator dialysiert. Die Aktivität von 0,49 ccm n/10 KOH (60 Min. Wert) für 5.0 ccm Ausgangslösung geht nach der Dialyse auf 0.02 ccm zurück. Zu 5.0 ccm der dialysierten Lösung gibt man nun das gleiche Volumen einer Trypsinlösung (15 mg⁺⁺) in 1/3 mol. Citrat-Puffer p_H 1.9) und läßt 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, Nach Zugabe dieses Gemisches zum Substrat findet man nach 60 Minuten eine Spaltung von 0.20 ccm n/10 KOH⁺⁺⁺).

+) Siehe dazu: Abderhalden, Handb.d.biol.Arbeitsmethoden Abb, IV, 2. 2213.

++) Trypsin der Firma Witte, Rostock.

+++) Das Trypsin allein ist bei p_H 1.9 völlig inaktiv.

Dialyse unter Luftabschluß.

Versuch (2)

5 g Witte-Pepsin werden gelöst in 100 ccm n/10000 HCl und 39 Stunden lang gegen fließenden n/30 Citrat-Puffer vom p_H 3,8 unter Einleiten von sauerstoff-freiem Stickstoff in dem Schnelldialysator dialy-siert. Die Prüfung von 3 ccm Lösung vor und nach der Dialyse ergibt praktisch keine Aktivitätsabnahme:

	ccm n/10 KOH nach Minuten		
	10	30	60
vorher	0,22	0.54	0.76
nachher	0.09	0.35	0.70

Die gleiche Lösung wird weitere 44 Stunden dialy-siert gegen fließenden n/50 Acetat-Puffer vom p_H 4.4. Es fällt ein voluminöser Niederschlag aus, der durch Zentrifugieren getrennt und mit Wasser aufgeschlemmt wird zum gleichen Volumen der dialysierten Lösung.

Nd. in Wasser: Lg. D_1 .

Dialysat: Lg. D_2

Lg	ccm	ccm n/10	KOH nach Minuten	
			10	30
D_1	0,5	0,22	0.34	0.70
D_2	0.5	0.18	0.46	0.68

Gegen die vorige Aktivität ist danach eine (scheinbare ⁺) Aktivitäts-Steigerung eingetreten.

Ultrafiltrationen.

Versuch (3)

3 g eines durch Extraktion ⁺⁺) gereinigten Witte-

+) Vergl. dazu das auf S. 38 diskutierte Verhältnis Enzym-Substrat.

++) Es gelingt durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln die Aktivität der Witte-Pepsine auf etwa den dreifachen Wert des Ausgangsmaterials zu steigern.

Pepsins werden in 60.0 ccm n/10000 HCl gelöst und 50.0 ccm dieser Lösung U_1 bei einem N_2 -Druck von 50 atü durch ein Collodiumfilter (2 μ ig) ultrafiltriert. Der Filtrerrückstand und das Ultrafiltrat werden untersucht:

Filter-Rückstand

gel. in 50 ccm n/10000 HCl

Lg. U_2 ; Trockengewicht 10,9 mg/ccm.

Ultra-Filtrat

mit n/10000 HCl auf 50 ccm gebracht

Lg. U_3 ; Trockengewicht 34.6 mg/ccm.

Das Ergebnis der Prüfung der einzelnen Lösungen im Versuchsansatz zeigte folgende Tabelle:

Lg.	verwendete ccm (entspr. mg Tr.)	ccm n/lp KOH nach Min.		
		10	30	60
U_1	4.0 (200)	0.17	0.27	0.76
U_2	4.0 (43.6)	0.31	0.50	0.75
U_3	4.0 (138.4)	0.01	0.13	0.76
U_2)	2.0			
)	+			
+)	2.0			
U_3)	(21.6)			
)	+			
)	(69.2)	0.04	0.19	0.69

Versuch (4)

40 g Witte-Pepsin werden nach der von NORTHROP angegebenen Vorschrift zur Darstellung des kristallisierten Pepsins über eine Magnesium-Fällung, Auflösen des Niederschlags in Na(OH) (p_H nicht über 5,0) und Wiederausfällen mit Schwefelsäure gereinigt. Der so erhaltene Niederschlag wird in 25,0 ccm n/10000 HCl gelöst ($p_H=4,0$). 20.0 ccm dieser Lösung werden unter den oben angegebenen Bedingungen ultrafiltriert.

Filter-Rückstand:

gelöst in 20,0 ccm n/10 HCl, mit Na(OH) auf p_H 4,0 (als Ausgangs- p_H) gebracht und auf 30,0 ccm aufgefüllt.

Lösung: U₆

Ultrafiltrat:

mit n/10000 HCl zum Ausgangsvolumen (20,0 ccm) aufgefüllt:

Lösung U₅.

Geprüft werden im Versuch die gleichen Mengen des Ultra-Filtrats und der Ausgangslösung. Von Lösung U₆ entsprechen die zur Prüfung angewandten 2,0 ccm einem Trockengewicht von 17,6 mg.

Lg.	Verwendete ccm	ccm n/10 KOH nach Min.		
		10	30	60
U ₄	5,0	0,32	0,46	p.55
U ₅	5,0	0,02	0,14	0,19
U ₆	2,0	0,18	0,22	0,37

Versuch (5) Schwermetallsalzfällungen.

Fällung mit Bleiessig bei p_H 2,5:

400,0 ccm Rohlösung mit einem Trockengewicht von 119,0 mg/ccm werden mit 300 ccm Bleiessig versetzt.

Der entstehende Niederschlag wird nach dem Absitzen durch Zentrifugieren abgetrennt und mit n/10 Essigsäure ausgewaschen. Niederschlag:

Niederschlag:

In 200 ccm n/10 Essigsäure aufgeschlemmt, mit H₂S entbleit und der Schwefelwasserstoff durch CO₂-Durchleiten entfernt.

Lg.B; Trockengewicht: 8,4 mg/ccm

Lösung:

Wird nach Zusatz von 3,0 ccm Eisessig durch H₂S entbleit und der Schwefelwasserstoff durch CO₂-Durchleiten entfernt. Lg.B₁; Trockengewicht: 22,2 mg/ccm.

Lg.	Verwendete ccm	entspr. mg Tr.	ccm n/10 KOH nach Min.		
			10	30	60
B	1.0	8.4	0.11	0.23	0.28
B ₁	1.0	22.2	0.11	0.13	0.13

150,0 ccm der Lösung B₁ werden im Vakuum bei 25-30° eingedampft; es resultiert ein gelblich-weißes Pulver als Rückstand.

Silberfällung.

Versuch (6)

500 mg des obigen Rückstandes werden im Mörser zerkleinert und in 5,0 ccm Wasser gelöst (gelbe Lösung) p_H 5.0 (kolor.). Zu dieser Lösung gibt man 40 Tropfen einer 10 %igen Silbernitratlösung und prüft auf Vollständigkeit der Fällung.

Der entstehende Niederschlag (kein AgCl!) wird durch Zentrifugieren abgetrennt. Lösung (a) und Niederschlag werden nach dem Entsilbern und Entfernen des Schwefelwasserstoffs geprüft. Die aus dem Niederschlag erhaltene Lösung war inaktiv, die Lösung (a) ergab:

Verwendete ccm	ccm n/10 10	KOH nach Min.	
		30	60
2.0	0.4	0.16	0.16

Fällung mit Bleiacetat bei p_H 5.0

Versuch (7)

250 ccm Rohlösung werden mit n/1 Ammoniak auf p_H 5.0 (kolor.) gebracht und mit 50.0 ccm Bleiacetatlösung (10 %ig) versetzt. Auf Vollständigkeit der Fällung wird geprüft. Der entstehende Niederschlag wird durch Zentrifugieren abgetrennt. Niederschlag und Lösung werden behandelt wie oben beschrieben; wir erhalten zwei Lösungen mit einem Trockengewicht von 15.2 mg/ccm bzw. 36.3 mg/ccm. (Lg B₂); Lg B₃).

Lg	Verwendete ccm	entspr. mg -Tr.	ccm n/10 KOH nach Min.		
			10	30	60
B ₂	2.0	30.4	0.20	0.26	0.28
B ₃	3.0	108.9	0.10	0.22	0.23

Nachweis eines kochbeständigen Pepsidins.

Versuch (8)

100 ccm Rohlösung werden mit 20.0 ccm Eisessig versetzt und 10 Minuten lang am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen versetzt man zur Eiweißfällung mit 70.0 ccm einer Chloroform-Alkohol Mischung (60.0 ccm CHCl₃ + 10.0 ccm C₂H₅OH). Nach dem Zentrifugieren und Trennen im Scheidetrichter wird die wässrige Schicht im Vakuum eingedampft, und der Rückstand mit 100 ccm Wasser zum Volumen der Ausgangslösung aufgenommen.

(Lg E)

40.0 ccm der so erhaltenen wässrigen Lösung E werden mit 10.0 ccm Wasserstoffsuroxyd-Lösung (3 %ig) versetzt und über Nacht stehen gelassen. Die Aktivität wird ohne und mit Zugabe von Wasserstoffsuroxyd bestimmt.

Lg	Verwendete ccm	H ₂ O ₂	ccm n/10 KOH nach Min.		
			10	30	60
E	2.0	-	0.06	0.08	0.08
E	2.0	+	0.32	0.33	0.41

Wasserstoffsuroxyd vermag allein in entsprechender Lösung keine Spaltung hervorzurufen.

Extraktion mit n-Butylalkohol.

Versuch (9)

3.0 g Witte-Pepsin werden 8 Stunden lang mit n-Butylalkohol im Soxhlet extrahiert. Der Butylalkohol ist danach braun gefärbt. Nach Abdestillieren im Va-

kuum wird der braune Rückstand mit Wasser aufgenommen, von etwa Unlöslichem abfiltriert und auf 25,0 ccm aufgefüllt.

Lg. E₃ (Farbe: gelb) Tr.: 6.1 mg/ccm.

Wir erhalten also aus 3 g Witte-Pepsin 152,5 mg durch n-Butylalkohol extrahierbare Substanz.

Die Prüfung erfolgt mit:

1) 10,0 ccm 6 %ige Casein-Lösung (Normal-Ansatz),

2) als Versuchsansatz:

10,0 ccm Casein-Lösung S₃ (5,0 ccm 6 %ige Casein-Lösung + 5,0 ccm Citrat-Puffer p_H 1.15) 10,0 ccm n/100 HCl,

6,0 ccm Wasser

Dazu: 4.0 ccm Lg. E₃

3) 100 ccm 6 %ige Pepton-Lösung (analog Normal-Ansatz, Witte-Pepton)

Lg	ccm mg -Tr.	ccm n/10 KOH nach Min.			gepr.n. Ansatz
		10	30	60	
E ₃	4.0 (24.4)	0.14	0.22	0.32	(1)
E ₃	4.0 (24.4)	0.03	0.07	0.10	(2)
E ₃	4.0	0.02	0.06	0.20	(3)

Das gleiche Ergebnis zeigt eine Extraktion unter Einleiten von Stickstoff.

Versuch (10)

300 ccm Rohlösung werden mit 150 ccm n-Butylalkohol etwa 5 Stunden lang am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wird im Scheidetrichter getrennt und von einem ausgefallenen Niederschlag (Eiweiß) abfiltriert. Die klare Butylalkohol-Schicht wird im Vakuum eingedampft; es resultiert eine braune, sehr hygroskopische Schmiere, die mit 40,0 ccm Wasser zu einer braunen Lösung aufgenommen wird.

Lg E₄ Tr.: 8,7 mg/ccm

Verglichen wird die Aktivität vor und nach dem 12-stündigen Behandeln mit Wasserstoffsuperoxyd.

(20 ccm Lg. + 5 ccm H₂O₂ 3 %ig).

Lg	ccm mg-Tr.	H ₂ O ₂	ccm n/10 KOH nach Min.		
			10	30	60
E ₄	2.0	-	0.09	0.13	0.14
	17.4				
E ₄	2.0	+	0.22	0.27	0.32
	17.4				

Herstellung des Mg-Pepsins und des Mg-Pepsidins.

Versuch (17) Fällung durch Halbsättigung mit MgSO₄.

1000 ccm Rohlösung mit einem Trockengewicht von 61,4 mg/ccm werden unter Rühren mit 500 ccm gesättigter Magnesiumsulfatlösung versetzt. Dann wird mit n/2 NaOH auf etwa p_H 3.5(kolor.)eingestellt und nochmals das gleiche Volumen Magnesiumsulfatlösung zugegeben. Nach 12-stündigem Stehen im Eisschrank wird der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert, in 200 ccm 70%igem Alkohol suspendiert und gut geschüttelt. Nach dem Absaugen des ungelösten Teils wird dieser mit 96%igem Alkohol kurz gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Es resultiert ein weißes Pulver (38 b).

Die 70 %ige alkoholische Lösung, die grünlich gefärbt ist, versetzt man mit dem gleichen Volumen 96 %igen Alkohol und läßt den entstandenen Niederschlag im Eisschrank absitzen; dann wird abfiltriert, der Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen und anschließend im Exsikkator getrocknet (38 f).

Die Darstellung des in 70 %igem Alkohol löslichen und unlöslichen Anteils wurde in der Folge in verschiedenster Weise variiert; die nachfolgende Vorschrift gilt für die im Vergleich mit Northrop-Pepsin von uns in ihrem chemischen Verhalten und im Spaltungsverlauf untersuchten Präparate.

+) Siehe S. 40.

Versuch (18). Fällung durch Viertelsättigung
mit $MgSO_4$.

1200 ccm Rohlösung werden mit conc. Ammoniak auf ein p_H von etwa 3.2 (Kolor.) eingestellt. Zu dieser Lösung gibt man unter dauerndem Rühren 600 ccm ges. Magnesiumsulfatlösung. Es ist darauf zu achten, daß durch möglichst intensives Rühren und sehr langsames Zugeben der Magnesiumsulfatlösung eine langsame Fällung statt hat. Man läßt etwa 24 Stunden bei 0° stehen und trennt den ausgefallenen Niederschlag durch Zentrifugieren ab. Nach Suspendieren des Niederschlags in 200 ccm 70 %igem Alkohol läßt man unter häufigem Umschütteln (mit Glasperlen) 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und saugt ab.

Die Lösung

bleibt 24 Std. im Tiefkühl- schrank bei -18° stehen. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert und mit Äther gewaschen.

Der Niederschlag

wird so lange mit Äther geschüttelt, bis er flockig erscheint; dann wird abfiltriert und getrocknet.

(Su.70 a₁)

Dann erst wird fraktioniert, mit Aceton gefällt; die einzelnen Fraktionen werden abfiltriert, gewaschen und getrocknet.

(Su.70 c)

Die Herstellung des Pepsidins geschieht zweckmäßig aus gealterten Rohlösungen, die etwa zwei Monate im Eisschrank gestanden haben (siehe S.16, vgl. den folgenden Absatz).

Herstellung des Mg-Pepsins aus einer frischen
Rohlösung.

Versuch (19)

1000 ccm frisch dargestellter Rohlösung werden mit Ammoniak auf p_H 3.2 eingestellt und bis zur Viertelsättigung mit Magnesiumsulfatlösung versetzt (analog der bei 70 a₁ bzw. 70 c gegebenen Vorschrift); nach Absitzen und Abzentrifugieren werden 10 g mit 150 ccm Aceton so lange geschüttelt, bis feine Flocken entstehen, dann wird abfiltriert, mit Äther gewaschen und getrocknet.

(80 a₁)

Kolorimetrische Tryptophan-Bestimmung.

Versuch (20)

Je 75,0 mg der Substanzen 80 a₁, 70 c und 70 a₁ werden in 5 ccm 30 %iger KOH gelöst. Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur wird in je 2,0 ccm der Lösungen der Tryptophan-Gehalt durch die Voisinet'sche Reaktion bestimmt. Die Messung erfolgt im Pulfrich-Photometer mit Filter S. 53. Das Gesamtvolumen jedes Reaktionssatzes beträgt 20,0 ccm

Das Ergebnis der Bestimmung zeigt die Tabelle 3.

Tabelle 3

Substanz	mg	d	k	entspr. γ -Tryptophan
80 a ₁	30.0	1.0	0.240	380.0
70 c	30.0	0.5	0.470	590.0
70 a ₁	30.0	0.5	0.840	1025.0

d = Schichtdicke in cm

k = Extinktionskoeffizient $k = \lg \frac{J_0}{J} = \frac{1}{c \cdot d}$

Zur Kennzeichnung der einzelnen peptisch aktiven Stoffe werden folgende Bezeichnungen eingeführt: Es ist dazu erforderlich zunächst zu unterscheiden zwischen Pepsin: hochmolekular, M.G. etwa 35000 und Pepsidin: niedermolekular. M.G. \sim 10000.

Es werden im folgenden bezeichnet mit:

N-P = Northrop-Pepsin

B-P = Brücke-Pepsin

Mg-Pepsin - Substanz 80 a₁ (Magnesiumfällung mit Aceton behandelt)

Mg-Pepsin A = Substanz 70 c (unlöslich in 70 %igem Alkohol)

Mg-Pepsidin = Substanz 70 a₁ (löslich in 70 %igem Alkohol)

Pepsidin = a) Ultrafiltrat

b) Butylalkoholextrakt

c) Phenylhydrazinderivat.

Diskussion der Ergebnisse.

Vergleich der einzelnen Pepsine in bezug auf

1) Chemische Eigenschaften:

Das Northrop-Pepsin hat die typische Zusammensetzung eines Eiweißes.

H. KRAUT und E. TRIA schließen auf Grund des von ihnen für das "Brücke-Pepsin" gefundenen Stickstoffgehalts von 8.2 % , der nicht mehr dem Stickstoff-Gehalt der typischen Eiweißstoffe entspricht, auf eine Verschiedenheit des Brücke-Pepsins vom Northrop-Pepsin. Der von uns gefundene Stickstoffgehalt der Substanzen Mg-Pepsin und Mg-Pepsin A ist nun wiederum von dem des B-P verschieden. Die Aktivitäten andererseits sind von der gleichen Größenordnung, so daß man, wenn man mit den nachher zu besprechenden Einschränkungen die Aktivitäten als Maß der Fermentmengen annimmt, auf Grund unseres Befundes sogar drei Pepsine zu unterscheiden hätte: N-P, B-P und Mg-Pepsin bzw.

Mg-Pepsin A. Das Präparat Mg-Pepsidin andererseits zeigt als Eiweiß auf Grund seiner Löslichkeit in 70 %igem Alkohol den Charakter eines Protamins, es ist also trotz der annähernd gleichen Zusammensetzung vom N-P verschieden und bildet somit ein viertes unterscheidbares Pepsin. Als fünftes unterscheidbares Pepsin käme das [REDACTED] später zu besprechende "Pepsidin" hinzu.

H.KRAUT und E.TRIA finden, daß bei gleicher Menge Pepsin-Stickstoff (0.02 mg) die Reaktionen mit Sulfosalizylsäure und Ferrocyannwasserstoffsäure bei N-P positiv, beim B-P dagegen negativ sind. In allen von uns dargestellten Präparaten ließ sich auch mit der 5-fachen Menge Pepsin-Stickstoff keine Fällung mit den typischen Eiweißreagentien (Sulfosalizylsäure und Ferrocyannwasserstoffsäure) nachweisen. Sie sind danach sicher nicht unter die hochmolekularen Eiweiße zu rechnen und in diesem Sinne "eiweißfrei", d.h. höchstens vom Charakter eines niedermolekularen Peptons bzw. Peptides. Wegen der unbestimmten Zusammensetzung der Asche lassen sich die C-Werte für eine Beweisführung nicht heranziehen. Über die übrigen Reaktionen auf Eiweiß bzw. Aminosäuren gibt Tabelle 1, S.18 Aufschluß.

Es hat sich gezeigt, daß eine als Mg-Pepsin A zu bezeichnende Pepsin-Fraktion (Subst. 38 b) mit 0,016 mg Stickstoff überhaupt keine der in der Tabelle angeführten Reaktionen mehr gibt. Vergleichen wir den von uns gefundenen Tryptophangehalt (s.S.19) mit dem des N-P von 2,2 %, so zeigt sich, daß der Tryptophangehalt in allen Präparaten verschieden ist. Beziehen wir den gefundenen Tryptophangehalt auf die gefundenen mg Stickstoff, so zeigt sich, daß der %-Gehalt Tryptophan der Substanz Mg-Pepsin A annähernd gleich ist dem der Substanz Mg-Pepsidin. Die Tatsache aber, daß Mg-Pepsin A unlöslich in 70 %igem Alkohol, Mg-Pepsidin dagegen löslich in 70 %igem Alkohol ist, läßt schließen, daß diese Substanzen in wesentlichen Punkten auch hinsichtlich ihrer Zusammensetzung verschieden sein müssen.

2) Spaltungsverlauf der verschiedenen Pepsine mit Casein als Substrat.

Wir vergleichen nunmehr zur weiteren Kennzeichnung den Spaltungsverlauf mit den verschiedenen Pepsinen in Bezugnahme auf das kristallisierte Pepsin (N-P) ⁺). Es werden jedoch nur die für diese Arbeit wesentlichen Tatsachen diskutiert, nachdem es sich herausgestellt hat, daß auf Grund der verschiedensten Untersuchungsmethoden ein sehr uneinheitliches Bild über den Eiweißabbau entsteht ⁺⁺).

Es zeigt sich nämlich, daß für die maximale Wirkung einer bestimmten Fermentmenge auch ein bestimmtes Verhältnis zwischen Enzym und Substrat gewährleistet sein muß. Die tatsächliche Aktivität ist also nicht einfach mengenproportional. Daraus geht hervor, daß man vorerst nur Aussagen machen kann über die "relative" Aktivität und die wirkliche Aktivität erst dann festlegen kann, wenn alle Pepsine unter den gleichen und vergleichbaren Gesichtspunkten geprüft sind.

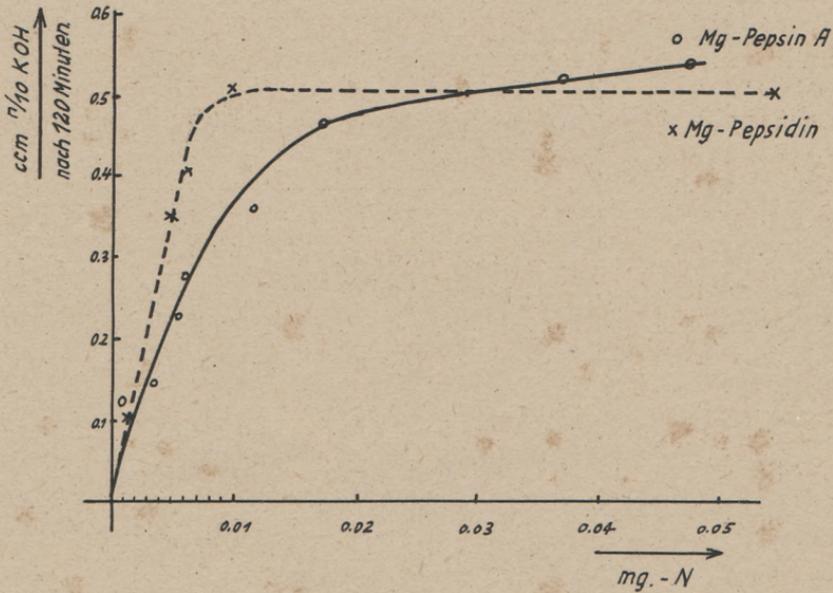
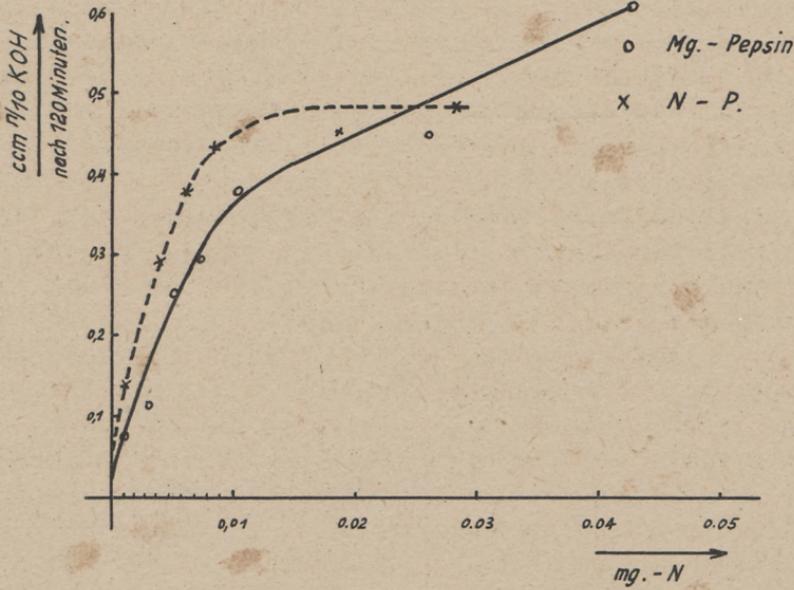
Die Mengen-Wirkungskurve (Spaltung nach 2 Stunden in Abhängigkeit von der Fermentmenge, die in mg N gemessen wird) zeigt die Abb.3. Größenordnungsmäßig ist die Aktivität aller Präparate dieselbe und gleich dem N-P. Sie sind in diesem Sinne also als hochaktiv anzusprechen.

Im einzelnen zeigen die Kurven, daß das N-P bis zu 0.006 mg N in der Zeiteinheit mehr Carboxylgruppen freilegt als die übrigen Substanzen. Weiter zeigt sich, daß etwa zwischen 0.006 und 0.02 mg N beim N-P, beim Mg-Pepsin A und beim Mg-Pepsidin eine weitere Mehrzugabe von Ferment zu derselben Menge Casein keine höheren Spaltungen erzeugt. Wir können daher

+) Es ist nochmals darauf hinzuweisen, daß der von uns verwandte Versuchsansatz (p_H 2.0) keinen Puffer enthält und daß er mit denen anderer Autoren daher nicht direkt vergleichbar ist.

++) Vgl. eine demnächst erscheinende Arbeit von H. Albers und A. Schneider.

ABBILDUNG 3.



annehmen, daß verhältnismäßig bald und größenordnungsmäßig bei den gleichen Konzentrationen ein Sättigungszustand des Substrats gegenüber dem Ferment erreicht wird.

Das Mg-Pepsin zeigt ein abweichendes Spaltungsverhalten: der Verlauf der Mengen-Wirkungskurve zeigt, daß auch mit größeren Mengen Ferment (gemessen in mg N) bei einer gleichen Menge Substrat eine weitere Spaltung statthat.

In Tabelle 3 sind die ermittelten Spaltungswerte für gleiche Mengen der einzelnen Substanzen in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf der Spaltung zusammengestellt.

Tabelle 3

Substanz	mg N	ccm n/10 KOH nach Minuten		
		30	60	120
N-P	0.001	0.065	0.120	0.20
Mg-Pepsin	0.001	0.005	0.030	0.07
Mg-Pepsin A	0.001	0.030	0.050	0.09
Mg-Pepsidin	0.001	0.035	0.055	0.10
N-P	0.005	0.19	0.26	0.38
Mg-Pepsin	0.005	0.05	0.13	0.26
Mg-Pepsin A	0.005	0.19	0.27	0.40
Mg-Pepsidin	0.005	0.10	0.16	0.25
N-P	0.010	0.17	0.25	0.44
Mg-Pepsin	0.010	0.11	0.20	0.40
Mg-Pepsin A	0.010	0.27	0.36	0.50
Mg-Pepsidin	0.010	0.15	0.23	0.37

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei kleineren Mengen (0.001 mg N) das N-P eine höhere Spaltung ergibt; bei Anwendung von 0.005 mg N ist der Spaltungsverlauf des N-P gleich dem des Mg-Pepsin A. Mg-Pepsidin spaltet im Verlauf der ersten 30 Minuten schneller als das Mg-Pepsin und bereits nach 120 Mi-

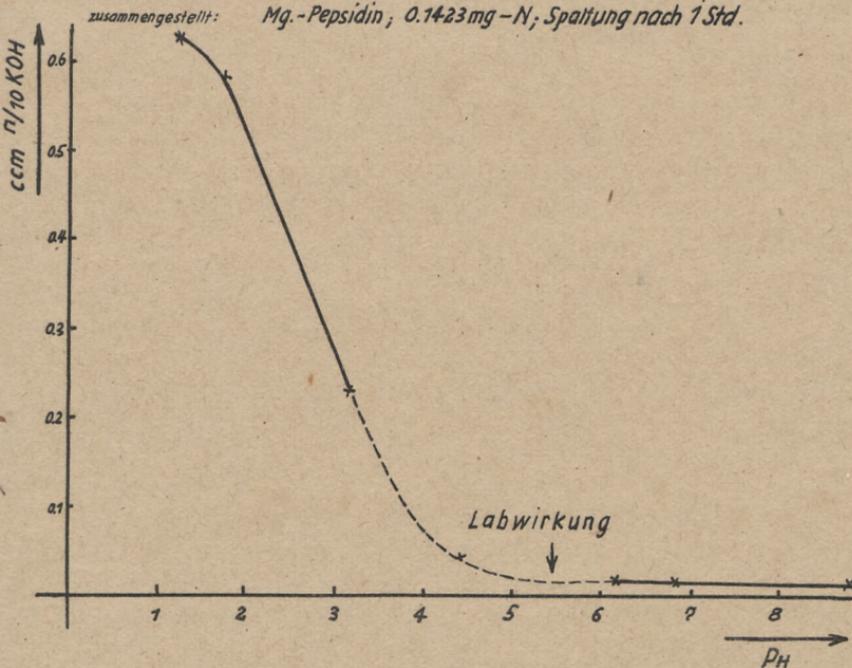
nuten findet man den gleichen Zuwachs an Carboxylgruppen beim Mg-Pepsidin und beim Mg-Pepsin. Wendet man Fermentmengen entsprechend 0.01 mg N zur Prüfung an, so ergibt sich, daß Mg-Pepsin A einen höheren Spaltungsverlauf zeigt als N-P. Bemerkenswert ist, daß das Mg-Pepsin anfänglich einen linearen Spaltungsverlauf zeigt.

Zur Entscheidung der Frage, ob unsere Substanz Mg-Pepsidin identisch ist mit den von H. DYCKERHOFF und G. Tewes (25) bei der Absorption von Pepsin an Eiweiß vermuteten zwei peptischen Enzyme mit verschiedenen p_H -Optimum bei ungefähr $p_H 2$ und $p_H 4$, sind die gefundenen ccm n/10 KOH bei den verschiedenen p_H -Werten in Abb.4 zusammengestellt:

ABBILDUNG 4.

Aktivitäts - p_H - Kurve.

Mg.-Pepsidin, 0.14-23 mg -N; Spaltung nach 1 Std.



Es zeigt sich also, daß auch bei Anwendung größerer Enzymmengen unsere Substanz nur ein sehr steiles Wirkungsoptimum bei p_H 1.6 - 2.1 hat. Auf Zugabe der Substanz zu einer Casein-Versuchslösung vom p_H etwa 5.2 trat sofortige Flockung ein.

Es bleibt aber noch zu entscheiden, ob die bei der Behandlung mit 70%igem Alkohol erhaltenen zwei Fraktionen gemeinsam eine höhere Spaltung erzeugen als jede Fraktion für sich. Das Ergebnis der Prüfung zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4

Versuch Nr.	mg 70 c (mg N)	mg 70 a ₁ (mg N)	ccm n/50 KOH nach Min.	
			60	120
T ₁	0.04 (0.00341)	- -	0.16	1.05
T ₂	- -	0.016 (0.00227)	0.01	1.22
T ₃	0.04 (0.00341)	0.016 (0.00227)	0.41	1.33

Die in der Tabelle angegebenen Fermentmengen bezogen auf mg Stickstoff wurden in n/100 HCl gelöst, eine Stunde bei 40° stehen gelassen und dann zum Substrat gegeben. Der Zuwachs der Zahl der freigelegten Carboxylgruppen ist sehr deutlich nach einer Stunde im Versuch T₁, im Versuch T₂ ist nach einer Stunde noch kein Zuwachs zu beobachten. Nach zwei Stunden zeigen beide Versuche eine hohe Spaltung. Die Spaltung, die nunmehr bei der Kombination Mg-Pepsin A + Mg-Pepsidin zu beobachten ist, ist nach 60' höher als sie einer Summenwirkung entspricht (Versuch T₃); nach zwei Stunden hingegen ist sie beträchtlich geringer. Die Geschwindigkeit des fermentativen Abbaus von Casein durch verschiedene Pepsine ist also abhän-

gig vom Verhältnis der jeweiligen Mengen der diesbezüglichen Pepsine zum Substrat. Besonders deutlich wird dies, wenn das Verhältnis der jeweiligen Pepsinmengen zum Substrat geändert wird.

Man kann dabei natürlich den Einwand machen, daß die größere Gesamtfermentmenge verantwortlich ist für die hohe Anfangsgeschwindigkeit. Prüft man aber unter den gleichen Bedingungen etwa gleiche Fermentmengen bezogen auf mg Stickstoff, so zeigt sich, daß dieser Einwand nicht zutreffend ist.

Die Kombination Mg-Pepsin A + Mg-Pepsidin zeigt hier einen Spaltungsverlauf, der in keinem Verhältnis zu der angewandten Menge Ferment bezogen auf den Gesamt-N-Gehalt steht.

Tabelle 5

Versuch Nr.	mg 70 c (mg N)	mg 70 a ₁ (mg N)	ccm n/50 KOH nach Min.	
			60	120
T ₃	0.04 (0.00341)	0.016 (0.00227)	0.41	1.33
T ₄	0.04 (0.00341)	0.012 (0.00171)	0.03	0.56

+) Es sei hier darauf hingewiesen, daß die in Tab.4 angegebenen Mengen Mg-Pepsin A + Mg-Pepsidin in Anlehnung an die Ergebnisse der Ultrafiltration angewandt wurden. (Hier wurde das Trockengewicht des Filterrückstandes und des Ultrafiltrats zugrunde gelegt.

Kommen wir nun zurück auf die eingangs gestellte Frage nach der Einheitlichkeit des Pepsins, so ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

- 1) Das von NORTHROP isolierte und kristallisierte Pepsin kann allein das Enzym "an sich" nicht sein. Selbst die Tatsache, daß es sich um ein kristallisiertes Produkt handelt, kann nicht mehr als Beweis herangezogen werden. Es müßte nämlich die Aktivität der von uns dargestellten Präparate wesentlich geringer sein, zumal die Forscher angeben, daß jede Veränderung am Eiweißkörper einen Wirkungsverlust mit sich bringt.
- 2) Die Ergebnisse der Versuche bei Kombination des Mg-Pepsins A mit dem Mg-Pepsidin sind nicht vereinbar mit der unitarischen Theorie. Es ist nämlich nicht anzunehmen, daß für den Eiweißabbau beim Optimum der Pepsin-Wirkung vier oder fünf verschiedene Pepsine nötig sind.

Auch können die Befunde der aktivierenden Wirkung von Vitamin C darauf hindeuten, wenn man nicht annimmt, daß das ganze Ferment-System der Proteasen (oder nur das Pepsin als solches) ein Redox-System darstellt.

- 3) Auf Grund sehr vieler Versuche wurde - wie bereits auf S.21 erwähnt - gefunden, daß im Leerversuch, d.h. ohne Ferment, ein Zuwachs an COOH-Gruppen in einer gewissen Menge beobachtet wird. Dieser Befund läßt sich nur dahin deuten, daß das Casein-Molekül in der Lösung in kleinere Bruchstücke zerfällt. Ein Teil des Casein-Moleküls könnte die Rolle des Apo-Ferments übernehmen, um dann zusammen mit dem Co-Ferment den Abbau der Eiweißkörper durchzuführen. Das hieße aber, daß für die fermentative Wirkung bei den Proteasen nur das Co-Ferment erforderlich ist, da ja das Apo-Ferment gegeben ist durch das Substrat an sich.
- 4) Will man bei den Proteasen die Co-Ferment-Frage entscheiden, müßte man zu künstlichen Substraten übergehen, die eine ganz bestimmte Anzahl freier Gruppen (-OH, -COOH, -NH₂ usw.) haben und damit vergleichen andere Substrate mit anderer Art oder Zahl der genannten Gruppen, um die durch das Zerfallen des Casein-Moleküls bedingten Unsicherheiten auszuschalten.

Der zweite Weg aber, der bestimmt einfacher zu gehen ist und mehr Erfolg verspricht, ist der, daß man ausgeht von den von uns dargestellten Präparaten. Es wurde bereits öfter darauf hingewiesen, daß die Substanzen absolut haltbar sind und hohe Aktivität zeigen. Auch ist die Darstellung einfach und führt zu Ausbeuten, die man in der Ferment-Chemie als gut bezeichnen kann. Man zerlegt diese Produkte durch vorsichtige Manipulationen in wieder kleinere Bestandteile und müßte so zu einem Stoff kommen, der niedermolekular und somit auch als Co-Ferment angesprochen werden kann, sofern er peptisch aktiv ist.

Analysenergebnisse.Kristallisiertes Pepsin

13.49 mg Subst.: 5.79 mg H₂O; 12.99 mg CO₂; 4.168 mg Asche
 5.782 mg Subst.: 0.345 ccm N₂ (20°; 758 mm)
 gef.: C 26.26 %, H 4.80 %, N 6.93 %

Substanz 80 a₁

7.430 mg Subst.: 3.68 mg H₂O; 7.17 mg CO₂; 2.100 mg Asche
 4.187 mg Subst.: 0.296 ccm N₂ (20°; 758 mm)
 gef.: C 26.32 %, H 5.54 %, N 8.22 %

Substanz 70 c

5.890 mg Subst.: 3.17 mg H₂O; 6.87 mg CO₂; 1.428 mg Asche
 5.010 mg Subst.: 0.376 ccm N₂ (21°; 744 mm)
 gef.: C 31.81 %, H 6.02 %, N 8.53 %

Substanz 70 a₁

8.580 mg Subst.: 5.12 mg H₂O; 15.90 mg CO₂
 3.341 mg Subst.: 0.416 ccm N₂ (21°; 748 mm) 0.052 mg Asche
 gef.: C 50.54 %, H 6.68 %, N 14.23 %

L i t e r a t u r .

- 1) W. Grassmann : Erg. Enzymforschung 1, 128
(1932)
- 2) siehe ebenda : V, 113 (1936)
- 3) I.H.Northrop : J. of gen. Physiol. 13, 739,
(1930)
- 4) I.H.Northrop und : ebenda, 16, 267 (1932)
M.Kunitz
- 5) J.B.Sumner : J.of biolog. Chemie 69, 435
(1936)
- 6) M.C.Caldwell,
L.E.Bocher und : Science (N.Y.) 74, 37
H.C.Sherman (1931)
- 7) M.L.Anson : ebenda, 81, 467 (1935)
- 8) E.Bamann und : Z.f.physiol. Chem. 223, 18
P.Laeverenx (1934)
- 9) I.B.Sumner und : Science (N.Y.) N.S. 85, 366
A.L.Dounce (1937)
- 10) A.V.Balls, : Science (N.Y.) N.S. 86, 379
H.Lineweaver und (1937); J. biol. Chemistry,
R.R.Thompson 121, 417 (1937)
- 11) E.v.Brücke : Vorl. u. Physiol. 2.Aufl. 1,
299 (1875)
- 12) C. Sundberg : Z. f. physiol. Chem. 9, 319
(1885)
- 13) P. Schrupf : Hofmeisters Beitrag 6 , 396
(1905)
- 14) R.Willstätter und : Z.f. physiol.Chem. 208, 258
R.Rohdewald (1932)
- 15) H.Kraut und : Biochem.Z. 290, 277 (1937).
E.Tria



- 16) E.Waldschmidt-Leitz: Z.f.physiol. Chem. 171, 70
und G.Künstner (1927)
- 17) H. Elblinger und : Biochem.Z. 191, 186 (1927)
C.Funk
- 18) ebenda
- 19) S.W.Cole : Practical physiological Che-
mistry (1933)
- 20) O.V.Fürth und : Biochem.Z. 146, 275 (1929)
Z.Dische
- 21) R.Kuhn und : Ber. deutsche chem.Ges.70
P.Desnuelle 1907 (1937)
- 22) R.Willstätter u. : Ber.dtsch.chem.Ges. 54
E.Waldschmidt-Leitz 2988 (1921)
- 23) C.A.Pekelharing : Z.f.physiol. Chemie 22,
233, (1896)
- 24) E.v.Meyer : Journ. prakt. Chemie (2) .
36, 115 (1887)
- 25) H.Dyckerhoff und : Z.f. physiol.Chem.215, 93
G.Tewes (1933)
-



L e b e n s l a u f .

Geboren wurde ich, A l f r e d S c h n e i-
d e r , am 16. September 1911 als Sohn des Kauf-
manns Adolf Schneider und dessen Ehefrau Margarete
geb. Engelhardt in Hönningen-Rhein.

Nach Besuch der Volksschule in Hönningen und
des Gymnasiums in Linz - Rhein begann ich mit dem
S.S. 1931 mein Studium der Chemie an der Techni-
schen Hochschule zu Aachen.

Am 25. März 1934 bestand ich das Diplom-Vor-
examen. Nach meiner einjährigen freiwilligen Dienst-
zeit beim Reichsheer setzte ich mein Studium im
W.S. 1935 an der Technischen Hochschule Hannover
fort. Mit Beginn des W.S. 1936 kam ich zur Techni-
schen Hochschule in Danzig und bestand am 24. März
1937 mein Diplom-Examen. Seit dieser Zeit war ich
als Assistent mit der Ausführung der vorliegenden
Arbeit beschäftigt.

Herrn Professor Dr. ALBERS danke ich bestens
für das stete Interesse und die Förderung bei der
Ausführung dieser Arbeit,

Die mündliche Prüfung bestand ich am 24. Juli 1939.



BIBLIOTEKA GŁÓWNA

II

38387

Politechniki Gdańskiej