

Spaltung des Leucinesters durch Pankreasferment.

Von
Otto Warburg.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 25. Mai 1906.)

In einer Notiz¹⁾ habe ich mitgeteilt, daß der Leucinäthylester durch Pankreasferment asymmetrisch verseift wird. Ich habe jetzt festgestellt, daß die Reaktion auch nach Entfernung der Lipase stattfindet und daß sie zur Darstellung des natürlichen (l)-Leucins sich gut eignet.

Zum Nachweis des fettspaltenden Ferments bediente ich mich des Buttersäureäthylesters, den Kastle und Loevenhart²⁾ als empfindlichstes Reagens empfehlen. Die proteolytische Wirksamkeit wurde mit den Mettschen Röhren³⁾ gemessen. Es kam darauf an, die Lipase zu entfernen und dabei das proteolytische Ferment möglichst wenig zu schädigen. Über lipasefreies «Trypsin» finden sich in der Literatur Angaben von Gulewitsch⁴⁾ und von Schwarzschild⁵⁾. Gulewitsch stellte seine Präparate zunächst aus der Drüse nach 24stündiger Autolyse dar; dann fand er, daß das Grüblersche «Trypsin» vollständig lipasefrei sei, und benutzte dieses für die Mehrzahl seiner Versuche. Er prüfte auf fettspaltendes Ferment mit

¹⁾ Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 187.

²⁾ Am. Chem. Journ., Bd. XXIV, S. 491; Bd. XXVII, S. 481; Bd. XXXI, S. 521.

³⁾ S. G. Mett, Du Bois-Archiv 1894.

A. Samojloff, Archives des sciences biolog. (St. Petersb.), T. 2, p. 699 (1893).

⁴⁾ Über das Verhalten des Trypsins gegen einfachere chemische Verbindungen. Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 540.

⁵⁾ Über die Wirkungsweise des Trypsins, Hofmeisters Beiträge, Bd. IV, S. 155.

Salol und Olivenöl. Schwarzschild dehnte die Autolyse über 8 Tage aus und fällte mit Uracylacetat. Er gibt nicht an, wie die Abwesenheit der Lipase festgestellt wurde. Das Grüblersche «Trypsin», das ich in Händen hatte, verseifte Äthylbutyrat sehr deutlich (Versuch 6), kam also für meine Versuche nicht ohne weiteres in Betracht. Die Fällung mit Uracylacetat ist nach Rosell¹⁾ für die Trennung von fettspaltendem und proteolytischem Ferment nicht brauchbar.

Ich benutzte für alle Versuche in dieser Arbeit das Pankreatin der Firma Rhenania, das aus Ochsenpankreas hergestellt wird. Es enthält eine sehr wirksame Lipase (Versuch 7a und 7b). Läßt man es mit Wasser unter Toluol 24 Stunden im Brutraum stehen (Autolyse), so ist die Hauptmenge des fettspaltenden Ferments zerstört (Versuch 8), insbesondere, ohne das proteolytische Ferment zu schwächen; doch läßt sich der Rest nicht fortschaffen, selbst wenn man die Autolyse auf 10 Tage ausdehnt. Dagegen gelingt die Entfernung der Lipase bis auf minimale Spuren (Versuch 9), wenn man das Wasser durch etwa $\frac{1}{10}$ normale Natronlauge ersetzt und 20 Stunden im Brutraum stehen läßt. Ob man dies der Autolyse in alkalischer Lösung oder der Wirkung des freien Alkalis zuschreiben muß, bleibt unentschieden. Die proteolytische Wirksamkeit sank nur auf etwa den dritten Teil, die Reaktion auf Leucinäthylester war sehr deutlich (Versuch 9). Da der Leucinester stark basisch ist, wäre der Einwand möglich, daß im «Pankreatin» mehrere Lipasen enthalten sind, und daß eine in alkalischer Lösung wirkende nicht entfernt ist. Es wurden deshalb in dieser Richtung zwei Versuche angestellt (10a und 10b), die zeigten, daß ein solcher Einwand unbegründet ist.

Es kann somit als festgestellt betrachtet werden, daß der Leucinester verseift wird, wenn aus dem Gemisch der Pankreasfermente die Lipase entfernt ist. Gekochte Fermentflüssigkeit wirkt nicht anders als Wasser (Versuch 4). Abgesehen von Lipase und «Trypsin» sind im «Pankreatin» zweifellos noch einige andere von der großen Zahl der Pankreasfermente vorhanden; ob sie durch die Behandlung mit Alkali zerstört wurden, unter-

¹⁾ Rosell, Inauguraldissertation, Straßburg 1901.

suchte ich im allgemeinen nicht; nur auf Diastase prüfte ich, mit Stärke und Fehlingscher Lösung, stets mit positivem Erfolg. Trotzdem wird man, bei der Beziehung des Leucins zu den Proteinstoffen, kein Bedenken tragen, die Hydrolyse des Leucinesters dem proteolytischen Ferment zuzuschreiben. Vielleicht ist es nicht aussichtslos, eine Trennung der leucinesterspaltenden von der peptidspaltenden Wirksamkeit zu versuchen.

Wie schon erwähnt, findet die Verseifung des Leucinesters asymmetrisch statt. Aus dem inaktiven Ester entsteht l-Leucin, während der d-Leucinester unverändert bleibt. Hierbei hat es sich gezeigt, daß lipasereiche Fermentflüssigkeiten zur Darstellung optisch einheitlichen Leucins nicht brauchbar sind, da stets auch einige Prozente des Antipoden verseift werden. Die Lipase reagiert weniger fein auf sterische Unterschiede, als das proteolytische Ferment. Dakin¹⁾ erhielt mit Leberlipase aus inaktivem Mandelsäuremethylester eine Säure von der spezifischen Drehung $+ 27^{\circ}$ (gegen $+ 156^{\circ}$ der reinen Säure). Ist aber die Hauptmenge der Lipase entfernt, so erhält man Leucinpräparate, die in 20%iger Salzsäure die spezifische Drehung $+ 15^{\circ}$ (Ausbeute 83%) und $+ 15,5^{\circ}$ (Ausbeute 70%) zeigen. (Vorschrift Versuch 13.) Die spezifische Drehung des l-Leucins wurde von E. Fischer und O. Warburg²⁾ unter den gleichen Bedingungen mit großer Wahrscheinlichkeit zu $+ 15,6^{\circ}$ gefunden.

Wie man aus der Vorschrift ersieht, wurde der Äthylester durch den Normalpropylester ersetzt (Darstellung des Propylesters, Versuch 11); dies geschah hauptsächlich, um die spontane Verseifung zu verlangsamen.

Für die Konzentration des Ferments gibt es ein Optimum. Je größer man sie wählt, um so schneller geht die fermentative Verseifung, um so weniger stört also die spontane Verseifung. Andererseits wird die Isolierung des Leucins durch größere Fermentmengen erschwert.

Das inaktive Leucin wurde nach der Vorschrift von E. Fischer aus Isovaleraldehyd dargestellt. Es war frei von

¹⁾ Journ. of Physiol., Bd. XXX, S. 253; Bd. XXXII, S. 199.
Proceed. Chem. Soc., Bd. XIX, S. 161.

²⁾ Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVIII, S. 3997.

Isoleucin. Der Methylalkohol blieb beim Auskochen des Kupfersalzes fast farblos. Der Ester drehte die Polarisationssebene nicht, während nach Ehrlich¹⁾ der unter den Bedingungen der Darstellung entstandene Isoleucinester optisch aktiv sein müßte.²⁾

Herrn Geheimrat Emil Fischer bin ich für Interesse und Ratschläge zu größtem Dank verpflichtet.

Versuche.

Um auf Lipase zu prüfen, wird zu der Fermentflüssigkeit Toluol, Phenolphthaleinlösung und Buttersäureäthylester zugegeben, mit Eis gekühlt und mit normaler Natronlauge unter kräftigem Schütteln neutralisiert. Dann stellt man kurze Zeit in den Thermostaten, kühlt wieder auf 0° ab und neutralisiert wie oben mit Normalnatronlauge. Um einen deutlichen Umschlag zu erhalten, sind ganz bestimmte Mengenverhältnisse nötig. Konzentrierte Fermentlösungen sind sehr ungenau zu titrieren, es wird deshalb stets entsprechend verdünnt. Unter meinen Versuchsbedingungen war es nicht zweckmäßig, die Natronlauge verdünnter als normal zu wählen. Die Phenolphthaleinlösung war eine 2%ige alkoholische.

Versuch 1 (Kontrollversuch): Gekochtes Ferment und Äthylbutyrat. 0,24 g Pankreatin; 10 ccm Wasser; durchgeschüttelt; 15 Minuten in kochendes Wasser; 0,5 ccm Toluol; 0,1 ccm Phenolphthaleinlösung; 2 ccm Äthylbutyrat. Eis. Neutralisiert mit n.-NaOH. 12 Stunden Brutraum. Verbraucht 0 ccm n.-NaOH.

Versuch 2 (Kontrollversuch): Änderung der Reaktion der Fermentflüssigkeit, wenn kein Äthylbutyrat zugegeben wurde.

0,24 g Pankreatin; 10 ccm Wasser; 0,1 ccm Phenolphthaleinlösung; 0,5 ccm Toluol; Eis. Neutralisiert mit n.-NaOH. 20 Stunden Brutraum. Verbraucht 0 ccm n.-NaOH. Die Reaktion wird also durch die Selbstverdauung der Fermente nicht meßbar geändert, sodaß hierdurch bei der Prüfung auf Lipase keine Fehlerquelle entsteht.

Versuch 3 (Kontrollversuch): Leucinester und Wasser.

¹⁾ Zeitschrift des Vereins der deutschen Zuckerindustrie, Bd. LV, Heft 592.

²⁾ Der Valeraldehyd, der als Ausgangsmaterial dient, ist häufig optisch aktiv.

1 ccm Wasser; 0,1 ccm Toluol; 1 ccm Leucinäthylester; Thermostat 25° unter häufigem Umschütteln. Nach 7 Stunden ist noch keine Abscheidung von Krystallen zu bemerken. Beim Versetzen mit Alkohol und Äther entsteht eine feine Trübung.

Versuch 4 (Kontrollversuch): Leucinester und gekochtes Ferment.

Behandelt man 1 ccm Leucinäthylester unter den Bedingungen von Versuch 3 mit Fermentflüssigkeit, die 0,05 g Pankreatin auf 1 ccm Wasser enthält und die 15 Minuten in siedendes Wasser gebracht war, so ist nach 7 Stunden keine Abscheidung von Krystallen zu sehen.

Versuch 5: Leucinester und Pankreatin.

1 ccm Leucinäthylester; 1 ccm einer Fermentflüssigkeit der gleichen Konzentration wie Nr. 4, aber nicht gekocht. 2½ Stunden Thermostat 25°. Von Krystallen durchsetzt. Mit Alkohol und Äther versetzt. Abgesaugt 0,2 g.

Versuch 6: Nachweis der Lipase im «Trypsin» Grüber.

0,8 g Trypsin; 40 ccm Wasser; 1 ccm Toluol; 1 ccm Phenolphthaleinlösung; 2 ccm Äthylbutyrat; Eis; neutralisiert mit n.-NaOH. Thermostat 38,6° 15 Minuten. Verbraucht 0,3 ccm n.-NaOH. (Bei diesem Versuch ist der Umschlag nicht scharf, weil die Fermentkonzentration zu groß.)

Versuch 7: Nachweis der Lipase im «Pankreatin».

a) 0,24 g Pankreatin; 10 ccm Wasser; 0,5 ccm Toluol; 0,1 ccm Phenolphthaleinlösung; 2 ccm Äthylbutyrat. Eis. Neutralisiert mit n.-NaOH. 20 Minuten Thermostat bei 38,6°. Verbraucht 0,7 ccm n.-NaOH.

Konzentrierte Pankreatinlösungen verseifen schneller. Der Umschlag ist aber dann ziemlich unscharf.

b) 0,8 g Pankreatin; 10 ccm Wasser; 0,5 ccm Toluol; 0,2 ccm Phenolphthaleinlösung; 2 ccm Äthylbutyrat. Eis. Neutralisiert mit n.-NaOH.

	Zeit im Thermostat bei 38,6° Minuten	Verbrauchte Kubikzentimeter n.-NaOH
1 e	20	2,6
2 »	20	2,6
3 »	20	2,6
4 »	20	2,1
5 »	20	1,9
6 »	20	1,3
7 »	20	0,8
8 »	20	0,3

Jetzt wurde noch 1 ccm Äthylbutyrat zugegeben und neutralisiert. 20 Minuten Thermostat bei 38,6°. Verbraucht 2,1 ccm n.-NaOH.

Versuch 8: Abnahme der lipolytischen Wirksamkeit bei der Selbstverdauung.

1,6 g Pankreatin; 20 ccm Wasser; 3 ccm Toluol; durch-

geschüttelt; Brutraum 23 Stunden. Dann filtriert,¹⁾ bis die Flüssigkeit klar durchlief.

3 ccm des Filtrats; 7 ccm Wasser; 0,5 ccm Toluol; 0,1 ccm Phenolphthaleinlösung; 2 ccm Äthylbutyrat; Eis; neutralisiert mit n.-NaOH. 20 Minuten Thermostat bei 38,6°. Verbraucht 0 ccm n.-NaOH. Dieses Resultat ist zu vergleichen mit 7a. Die proteolytische Wirksamkeit der beiden Flüssigkeiten ist ungefähr gleich. Erst nachdem die Flüssigkeit 1 Stunde im Brutraum gestanden hatte, wurde die Verseifung meßbar. Verbraucht 0,15 ccm n.-NaOH. Eine derartig hergestellte Lösung verseift Leucinester kräftig. Dehnt man die Selbstverdauung auf 10 Tage aus, so ist die lipolytische Wirksamkeit nicht erheblich gesunken.

Versuch 9: Entfernung der Lipase durch verdünntes Alkali.

1,6 g Pankreatin; 20 ccm Wasser; 3 ccm Toluol; 0,4 ccm Phenolphthaleinlösung; Eis; neutralisiert mit n.-NaOH (nur annähernd möglich bei der gewählten Fermentkonzentration). Dann noch 1,7 ccm n.-NaOH dazu und die Flüssigkeit 21 Stunden in den Brutraum. In den ersten Stunden wurde einigemal umgeschüttelt. Dann wurde durch ein Faltenfilter gegossen, bis die Flüssigkeit klar durchlief.

3 ccm des Filtrats; 7 ccm Wasser; 0,5 ccm Toluol; 0,05 ccm Phenolphthaleinlösung; Eis; neutralisiert mit n.-HCl und dann mit 1 Tropfen n.-NaOH rot gefärbt. 5 Stunden Brutraum. Verbraucht 0 ccm n.-NaOH. Erst nach 13 Stunden wird die Verseifung meßbar. Verbraucht 0,15 ccm n.-NaOH. Dieses Resultat ist zu vergleichen mit 7a. Es sind also nur noch ganz minimale Spuren von Lipase vorhanden gewesen. Die proteolytische Wirksamkeit ist nur auf ein Drittel zurückgegangen. Um dies nachzuweisen, wurde mit Eis gekühlt, mit n.-HCl neutralisiert und mit Mettschen Röhrchen gemessen.

¹⁾ Kastle u. Loevenhart (loc. cit.) haben gefunden, daß Filtration durch Filtrierpapier die Lipase unter gewissen Bedingungen fast vollständig zerstört. Ich konnte eine Schwächung der lipolytischen Wirksamkeit deutlich konstatieren; sie ließ sich jedoch nicht weiter als etwa auf $\frac{1}{4}$ zurückbringen. Die Fermentflüssigkeiten wurden durch Faltenfilter Schleicher u. Schüll 588 filtriert.

1 ccm des bei 0° mit n.-HCl neutralisierten Filtrats wurde mit 1 ccm Leucinäthylester und 0,1 ccm Toluol in den Thermostaten bei 25° gestellt. Nach wenigen Stunden war ein Krystallbrei entstanden.

Versuch 10 a): Einwirkung lipasearmer Fermentflüssigkeit in alkalischer Lösung auf Äthylbutyrat.

Zur Verwendung kam eine Fermentlösung, aus der durch mehrtägige Autolyse die Hauptmenge der Lipase entfernt war. Sie enthielt 0,2 g Pankreatin in 8 ccm Wasser; dazu 0,5 ccm Toluol; 0,1 ccm Phenolphthaleinlösung; 2 ccm Äthylbutyrat; Eis; neutralisiert mit n.-NaOH. Dann 2 ccm n.-NaOH dazu und 2 Stunden Brutraum. Mit Eis gekühlt und mit n.-HCl die überschüssige n.-Natronlauge zurücktitriert. Verbraucht 0,6 ccm n.-HCl.

10 b). Genau wie 10 a; nur war die verwendete Fermentflüssigkeit 15 Minuten auf 95—100° gebracht; verbraucht 0,5 ccm n.-HCl.

Versuch 11: Darstellung des Leucin-Normalpropylesters.

Sie geschieht nach der Vorschrift, die E. Fischer¹⁾ für den Äthylester gegeben hat. Die Ausbeute beträgt 75—80% der Theorie. Nach den neueren Vorschriften E. Fischers (2malige Veresterung, Isolierung der Ester mit Natriummethylat) wird er sich wohl ziemlich quantitativ gewinnen lassen. Der käufliche Propylalkohol muß fraktioniert werden. Der Ester kocht unter 12 mm Druck bei 95—96°. (Thermometer ganz im Dampf.)

Analyse:

0,2014 g Substanz; 13,9 ccm N über 33%iger KOH; 17°; 763 mm.

Berechnet:

8,1 % N

Gefunden:

8,05 % N.

Versuch 12: Fermentflüssigkeit zur Darstellung des aktiven Leucins.

1,6 g Pankreatin wurden mit 20 ccm Wasser und 3 ccm Toluol kräftig durchgeschüttelt. Die Flüssigkeit blieb 23 Stunden im Brutraum. Dann wurde sie filtriert, bis sie klar durchlief. Um sich zu überzeugen, daß die Hauptmenge der Lipase entfernt ist, verdünnt man 3 ccm des Filtrats mit 7 ccm Wasser und verfährt nach Versuch 8. — Die Fermentflüssigkeiten behalten ihre Wirksamkeit mehrere Tage ziemlich unverändert bei. Man stellt sie in den Eisschrank.

¹⁾ Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 449.

Versuch 13: Darstellung des l-Leucins.

a) 10 ccm der nach Versuch 12 bereiteten Fermentflüssigkeit werden mit 10 g inaktivem Leucinpropylester durchgeschüttelt und in einen Thermostaten gebracht, der auf 25° eingestellt ist. Die Mischung bleibt 11 Stunden bei dieser Temperatur. Bald beginnt die Leucinausscheidung; solange es noch möglich ist, schüttelt man jede halbe Stunde. Später wird mit einem Spatel sehr sorgfältig durchgerührt, etwa 10mal. (Um alles von den Gefäßwänden bequem entfernen zu können, wurde in einem zylindrischen Gefäß gearbeitet.) Bei größeren Mengen wird es sich empfehlen, fortgesetzt mechanisch zu rühren. Zum Schluß gibt man 10 ccm absoluten Alkohol und 10 ccm absoluten Äther zu, rührt um, läßt einige Minuten stehen, saugt ab und wäscht mit Äther bis zum Verschwinden des Estergeruchs. Die bei 100° getrocknete Masse wird staubfein gepulvert, mit 200 ccm Wasser unter Schütteln auf dem Wasserbad einige Zeit erwärmt, dann mit Tierkohle wenige Minuten aufgekocht, filtriert und auf dem Wasserbad auf etwa 5 ccm verdampft. Da das Leucin sich sehr voluminös abscheidet, saugt man ab, wenn bis auf 50 ccm eingeengt ist, und dampft das Filtrat weiter ein. Die Menge des mit wenig Wasser gewaschenen, analysenreinen Leucins beträgt 3 g. Filtrat und Waschwässer werden auf dem Wasserbad wieder eingeengt und mit Kupferacetat in geringem Überschuß gefällt. Das mit Wasser und Alkohol gewaschene Kupfersalz wiegt 0,19 g, entsprechend 0,15 g Leucin. Die Ausbeute an Leucin beträgt also 3,15 g oder 83% der Theorie.

Die Analyse ergab:

0,1635 g Substanz; 0,1481 g H₂O; 0,3292 g CO₂.

Berechnet:	Gefunden:
54,9% C, 9,9% H.	54,9% C, 10,1% H.

Die optische Bestimmung:

0,7016 g Leucin; gelöst in 20%iger Salzsäure; Gesamtgewicht der Lösung 15,033 g; spez. Gewicht = 1,1; Drehung im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht + 0,77°. Daraus

$$\alpha_{[D]} = + 15^{\circ} \pm 0,4^{\circ}$$

b) Bei einem anderen Versuch, der früher abgebrochen wurde, konnte ein Leucinpräparat in einer Ausbeute von 70% isoliert werden, dessen spez. Drehung $+ 15,5^{\circ}$ in 20%iger Salzsäure betrug.

Versuch 14: Die ätherische Mutterlauge des l-Leucins enthält den d-Leucinester. Da die Versuche nie solange ausgedehnt wurden, bis die Ausbeute an l-Leucin theoretisch war, so enthielt er stets einige Prozente l-Leucinester. Um das d-Leucin zu gewinnen, verdampft man die ätherische Lösung, destilliert unter vermindertem Druck Wasser und Propylalkohol ab und nimmt wieder mit absolutem Äther auf. Es bleibt dann in geringer Menge ein Rückstand, der teils aus Ferment, teils aus Leucin besteht. Man filtriert davon ab, verdampft den Äther und kocht den Ester am Rückflußkühler mit der zehnfachen Menge Wasser, bis die Reaktion nicht mehr alkalisch ist. Hierzu genügen etwa 7 Stunden. Dann behandelt man in der Wärme kurze Zeit mit Tierkohle, filtriert und verdampft das Filtrat auf dem Wasserbad fast zur Trockene. Das d-Leucin scheidet sich dann rein weiß ab. Die Drehung hängt ab von der Ausbeute, die man an l-Leucin erhalten hat. Im Falle des Versuches 13a ergab die optische Bestimmung in 20%iger Salzsäure für $\alpha_{[D]}$ den Wert $- 12,4^{\circ} \pm 0,4^{\circ}$.

Analyse dieses Präparates:

0,1954 g Substanz; 18,2 ccm N über 33%iger Kalilauge bei 21° u. 760 mm.

Berechnet:

10,7% N.

Gefunden:

10,7% N.

Wenn beim Verseifen des Propylesters keine Racemisation eintritt, läßt sich das d-Leucin zweifellos optisch einheitlich gewinnen; man muß dann nur den nach dem Verdampfen des Äthers, Wassers und Alkohols erhaltenen Rückstand noch einige Zeit mit neuer Fermentflüssigkeit stehen lassen.