

Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus *Russula delica* auf Tyrosin, tyrosinhaltige Polypeptide und einige andere Verbindungen unter verschiedenen Bedingungen.

Von

Emil Abderhalden und **Markus Guggenheim.**

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. Dezember 1907.)

Die Bildung der Farbstoffe und ganz speziell der sogenannten Melanine im tierischen und pflanzlichen Organismus ist trotz eifriger Bemühungen bis jetzt so gut wie gar nicht aufgeklärt. Weder kann man mit Bestimmtheit angeben, welche Bausteine an ihrer Bildung beteiligt sind, noch läßt sich etwas Genaueres über die Art ihrer Entstehung aussagen. Die größte Wahrscheinlichkeit hat die Annahme für sich, daß die Proteine die Grundsubstanzen zur Melaninbildung liefern, und von den Bausteinen dieser Körperklasse kommen wiederum einzelne ganz besonders in Betracht, so das Tyrosin, das Tryptophan und vielleicht auch in gewissen Fällen das Cystin, das Prolin und Oxyprolin und vielleicht auch die Glutaminsäure. Die letzteren drei Verbindungen dürfen höchstwahrscheinlich als Bausteine für das Hämatin und auch für das Chlorophyll betrachtet werden. Sie stehen alle drei in naher Beziehung zum Pyrrol, Prolin und Oxyprolin direkt, die Glutaminsäure indirekt durch ihre Beziehungen zur Pyrrolidoncarbonsäure. Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese Verbindungen auch beim Aufbau der sogenannten Melanine eine Rolle spielen. Nun kennen wir seit den ausgezeichneten Untersuchungen von Bourquelot und vor allem von Bertrand ein Ferment der Gruppe der Oxydasen, die sogenannte Tyrosinase, welche Tyrosin in einen Farbstoff verwandelt. Wird zu einer Lösung von Tyrosin Tyrosinase

hinzugegeben, so färbt sich die Flüssigkeit zunächst hellrot, nach einiger Zeit wird sie dunkler und schließlich scheiden sich schwarze Flocken ab, die in ihrem ganzen Verhalten und Aussehen lebhaft an die sogenannten Melanine erinnern. Es war sehr naheliegend, die Entstehung dieser letzteren auf analoge Prozesse zurückzuführen, und das um so mehr, als die Beobachtungen von O. v. Fürth und H. Schneider¹⁾ ergeben haben, daß die früher nur in der Pflanzenwelt aufgefundene Tyrosinase auch im Tierreich auftritt. So enthält das Insektenblut ein Ferment, das Tyrosin in eine dunkelgefärbte Substanz umwandelt, und auch bei der Bildung des Sekretes der Tintendrüse der Cephalopoden ist ein derartiges Ferment beteiligt.²⁾ Da nun der Abbau der so sehr widerstandsfähigen Melanine bis jetzt nicht zu Resultaten geführt hat, welche irgend eine bestimmte Schlußfolgerung auf die Entstehungsart dieser Klasse von Substanzen gestatten, so schien es uns von ganz besonderem Interesse zu sein, die Bildung gefärbter Substanzen aus Tyrosin unter der Einwirkung der Tyrosinase und auch anderer Oxydationsmittel genauer zu verfolgen, um auf diesem Wege vielleicht zu Erfahrungen zu gelangen, die für die Bearbeitung der Melanine von Wert sein könnten. Zu gleicher Zeit haben wir das Verhalten der Tyrosinase gegenüber anderen Aminosäuren untersucht und in Analogie zu den Untersuchungen des einen von uns mit Gigon³⁾ den Einfluß der verschiedenen Aminosäuren auf die Reaktionsgeschwindigkeit geprüft. Weitere Studien waren dem Einfluß von Alkali- und Säurezusatz auf die Tyrosinase gewidmet und

¹⁾ O. v. Fürth und H. Schneider, Über tierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung, Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. I, S. 241, 1901.

²⁾ O. v. Fürth, Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere, Gustav Fischer, Jena, 1903, S. 372. — Vgl. auch Heim, Études sur le sang des Crustacés décapodes, Thèse de la Faculté des sciences de Paris, 1892.

³⁾ Emil Abderhalden und Alfred Gigon, Weiterer Beitrag zur Kenntnis des Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung, Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 251, 1907.

endlich haben wir die Tyrosinase auf tyrosinhaltige Polypeptide und Anhydride einwirken lassen. Es sei noch erwähnt, daß jüngst O. v. Fürth und Ernst Jerusalem¹⁾ eine ausführliche Studie über die melanotischen Pigmente und die Farbstoffbildung aus Tyrosin unter der Einwirkung von Tyrosinase veröffentlicht haben. Sie kommen zu dem Schlusse, daß vorläufig nichts dagegen spricht, daß die Melanine aus Tyrosin oder einem anderen cyclischen Komplex des Eiweißmoleküls durch Fermentwirkung hervorgehen. Sie beziehen diese Folgerung besonders auf das bis jetzt am meisten untersuchte, relativ leicht zugängliche Hippomelanin. So interessant und wertvoll die Betrachtung aller bis jetzt bekannten und von den Verfassern erweiterten Beobachtungen über das Hippomelanin und deren Diskussion im Sinne einer fermentativen Melaninbildung aus dem aromatischen Komplex der Proteine auch ist, so muß doch mit den Verfassern hervorgehoben werden, daß diese Beweisführung eine nur indirekte und deshalb ihr Wert ein nur relativer ist. Dazu kommt, daß bis jetzt noch kein Abbauprodukt der Melanine bekannt geworden ist, das als primäres Spaltprodukt dieser Stoffe betrachtet werden darf. Die Eingriffe bei der Aufspaltung der Melanine mußten der Eigenart dieser Körper entsprechend stets derart brutale sein, daß der Einwand einer sekundären Bildung gefundener Abbauprodukte nahe liegt. Auch ist zu betonen, daß die Einheitlichkeit der Melanine in keiner Weise erwiesen ist. Dieser Umstand muß besonders deshalb hervorgehoben werden, weil die bei der Aufspaltung der Melanine und speziell des Hippomelanins erhaltenen identifizierbaren Produkte fast durchweg in verhältnismäßig kleinen Mengen gewonnen worden sind. Dies setzt den Wert der einzelnen Beobachtungen wesentlich herab, weil der Vermutung, daß die isolierten Substanzen aus anderer Quelle als den Melaninen selbst, also aus etwaigen Beimengungen, entstanden sein könnten, die Berechtigung nicht ohne weiteres abgesprochen werden kann. Wir geben mit diesen Bemerkungen

¹⁾ Otto v. Fürth und Ernst Jerusalem, Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung, Hofmeisters Beiträge, Bd. X, S. 131, 1907.

den Eindruck wieder, den eigene Untersuchungen über das Hippomelanin und dessen Abbau uns ergeben haben. Die Versuche, die zum Teil schon mehrere Jahre zurückliegen (1904 und 1905), führten vorläufig ebenfalls zu keinen identifizierbaren Substanzen, die quantitativ in irgend welcher Beziehung zum angewandten Ausgangsmaterial zu bringen gewesen wären. Die auf bekannte Verbindungen zurückführbaren Spaltprodukte waren stets in unverhältnismäßig kleiner Menge gewonnen worden, dazu kommt, daß stets Eingriffe notwendig waren, die ihrer ganzen Art nach die sekundäre Bildung der beobachteten Abbauprodukte nicht ausschließen, allerdings lassen sie auch die Möglichkeit offen, daß die isolierten, definierbaren Spaltprodukte an Ausbeute deshalb so gering sind, weil die betreffenden Eingriffe die gebildeten Spaltprodukte zum Teil zerstören. Jedenfalls muß die Entstehungsart der Melanine speziell der höheren Tiere vorläufig als ein unbekannter Prozeß bezeichnet werden und ebenso sind positive Kenntnisse über die Zusammensetzung dieser Körperklasse in einwandfreier Weise bis jetzt nicht erbracht. In diesem Sinne möchten wir unsere Versuche über die Farbstoffbildung aus Tyrosin, tyrosinhaltenen Polypeptiden und anderen Verbindungen in Hinsicht auf die Zusammensetzung und die Entstehungsweise der Melanine der höheren Tiere aufgefaßt wissen.

Im folgenden geben wir die einzelnen Versuche nach Gruppen geordnet wieder. Die verwendete Tyrosinase ist aus *Russula delica* dargestellt worden, und zwar wurde 1 g des trockenen Pilzes mit 50 ccm Wasser nach Zusatz von Toluol 24 Stunden bei 37° extrahiert. Das filtrierte Extrakt war vollkommen klar und nur leicht gelb gefärbt. Wir haben die Fermentlösung stets sofort verwendet. Für jede Versuchsserie diente eine neue Lösung. Im allgemeinen war kein Extrakt älter als 24 Stunden. Wir heben dies deshalb hervor, weil die Wirkung der Tyrosinase rasch nachläßt und daher Versuche nur dann vergleichbare Werte liefern, wenn sie zu gleicher Zeit mit derselben Fermentlösung ausgeführt werden. Die Pilze verdanken wir der großen Liebenswürdigkeit von Herrn Professor Chodat in Genf.

Einwirkung der Tyrosinase auf l-Tyrosin unter Zusatz verschiedener Aminosäuren.

Zu dieser Untersuchung diente eine Lösung von l-Tyrosin, die $\frac{1}{300}$ Molekül dieser Aminosäure enthielt. Auch die zugesetzten Aminosäuren wurden in Lösungen molekularer Mengen verwendet. Wir bezeichnen diese Lösungen ganz allgemein mit dem Buchstaben **m**. Die angewandten Aminosäuren waren alle sehr rein.

Nr.	Angewandte Tyrosinmenge	Angewandte Fermentmenge	Zusatz	Beginn der Färbung	Bemerkungen
1	4 ccm $\frac{1}{300}$ -m-Lösung	1 ccm	1 ccm Wasser	Sofort	Erst rosa, dann rotbraun, braun und schließlich nach längerem Stehen schwarz unter Abscheidung von schwarz. Flocken.
2	„	„	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-Glykokoll	Fast sofort.	Wie bei 1.
3	„	„	1 ccm $\frac{1}{1}$ -m-Glykokoll	Verzögert. Etwa 2 Minut. später als bei 2.	Wie bei 1. Die Färbung ist weniger intensiv und bleibt schwächer.
4	„	„	1 ccm $\frac{1}{1}$ -m-Sarkosin	Fast sofort.	Wie bei 1. Keine Hemmung od. Abschwächung.
5	„	„	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m-d-Alanin	Etwas später als bei 2.	Färbung etwas schwächer als bei 2, wird jedoch nach einiger Zeit intensiver als bei Vers. 3.
6	„	„	1 ccm $\frac{1}{1}$ -m-d-Alanin	Fast sofort.	Wie bei 2.
7	„	„	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-d-Valin	„	„
8	„	„	1 ccm $\frac{1}{4}$ -m-d-Valin	„	„
9	„	„	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-l-Leucin	„	„
10	„	„	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-l-Prolin	„	„

Fortsetzung.

Nr.	Angewandte Tyrosinmenge	Angewandte Fermentmenge	Zusatz	Beginn der Färbung	Bemerkungen
11	4 ccm $\frac{1}{300}$ -m-Lösung	1 ccm	1 ccm $\frac{1}{1}$ -m-Prolin	Fast sofort	Wie bei 2.
12	"	"	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-d-Serin	"	"
13	"	"	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-dl-Isoserin	"	"
14	"	"	1 ccm $\frac{1}{3}$ -m-dl-Isoserin	"	"
15	"	"	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-l-Phenylalanin	"	"
16	"	"	"	"	"
17	"	"	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-l-Asparaginsäure	Nach ca. $\frac{1}{2}$ Stunde	Ausgesprochene Hemmung. Die Färbung bleibt schwächer als bei Versuch 2
18	"	"	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m-d-Glutaminsäure	"	Die Hemmung war etwas schwächer als bei Versuch 17.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die Färbung der angewandten Menge l-Tyrosin durch Zusatz von geringen Mengen von Aminosäuren nicht beeinflußt wird. Einzig d-Glutaminsäure und l-Asparaginsäure machen eine Ausnahme. Hier zeigt sich starke Hemmung bei Anwendung von $\frac{1}{100}$ -m-Lösung der genannten Aminosäuren. Diese ausgesprochene Hemmung hängt offenbar ausschließlich mit dem stark sauren Charakter dieser beiden Dicarbonsäuren zusammen. Bei Verwendung stärkerer Konzentrationen (Normallösung) zeigte sich bei Glykokoll und d-Alanin, besonders aber bei ersterem eine deutliche Hemmung. Wurden noch größere Konzentrationen gewählt, so ließ sich bei allen verwendeten Aminosäuren eine ausgesprochene Verlangsamung der Reaktion nachweisen und durch ganz große Konzentrationen wurde der Eintritt der Reaktion fast ganz

verhindert. Mit diesen letzteren Beobachtungen stehen wir in Einklang mit analogen Resultaten von Chodat.¹⁾ Offenbar hat Chodat bei seinen Versuchen ausschließlich konzentriertere Lösungen von Aminosäuren angewandt. Er fand bei Zusatz von Glykokoll, Leucin, Alanin Hemmung der Tyrosinase-reaktion. Genauere Angaben über die Mengen der angewandten Aminosäuren sind nicht mitgeteilt. Bemerken wollen wir noch, daß wir in keinem Falle eine Änderung in der Qualität der Farben beobachtet haben.

Im Anschluß an diese Versuche seien solche über die Einwirkung von Tyrosinase auf l-Tyrosin, d-Tyrosin, Dijodtyrosin, l-Phenylalanin, Homogentisinsäure, d-Tryptophan, Skatol, Indol, l-Prolin und Cystin mitgeteilt.

Aus der nachfolgenden Übersicht ergibt sich, daß das in der Natur bis jetzt nicht mit Sicherheit beobachtete d-Tyrosin zwar auch angegriffen wird, jedoch viel später als das l-Tyrosin. Es ist schwer zu entscheiden, ob das angewandte d-Tyrosin ganz rein war und wirklich kein l-Tyrosin enthielt, ebenso unbekannt ist es, welche Mengen des oxydierten Tyrosins hinreichen, um die beobachtete Fällung hervorzurufen. Hier werden erst im Gange befindliche, quantitative Untersuchungen eine Entscheidung bringen können. Da jedoch nach allen Beobachtungen die Tyrosinase kein ausgesprochen spezifisches Ferment zu sein scheint und auch Verbindungen, wie z. B. Phenol angreift, so ist es nicht unwahrscheinlich, daß auch d-Tyrosin durch sie direkt oxydiert wird. Auffallend ist die Beobachtung, daß d-Tryptophan angegriffen wird. Am naheliegendsten ist die Annahme, daß dem d-Tryptophan Spuren von Tyrosin angehaftet haben. Die angewandten Präparate waren allerdings sehr rein. Wir haben den Versuch mehrmals wiederholt und sind stets zu denselben Resultaten gelangt. Da nun auch, wie weiter unten mitgeteilt ist, Lösungen von tryptophanhaltigen Polypeptiden eine Färbung nach Zusatz von Tyrosinase an-

¹⁾ R. Chodat, Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. Archives des sciences physiques et naturelles, 112^e année, 4^e période, Tome XXIV, 1907.

Nr.	Angewandte Aminosäure	Angewandte Fermentmenge	Bemerkungen
1	4 ccm $\frac{1}{300}$ -m-Lösung von l-Tyrosin	1 ccm	Nach 30 Sekunden Beginn der Färbung.
2	4 ccm $\frac{1}{300}$ -m-Lösung von d-Tyrosin	1 „	Erst nach 30 Minuten zeigt sich Rotfärbung. Sie wird im Laufe der Zeit ebenso intensiv, wie bei Versuch 1.
3	4 ccm kalt gesättigte Lösung von Dijodtyrosin	1 „	Keine Färbung.
4	4 ccm $\frac{1}{100}$ -m-Lösung von l-Phenylalanin	1 „	„ „
5	4 ccm $\frac{1}{100}$ -m-Lösung von d-Phenylalanin	1 „	„ „
6	4 ccm $\frac{1}{100}$ -m-Lösung von dl-Phenylalanin	1 „	„ „
7	4 ccm $\frac{1}{100}$ -m-Lösung von Homogentisinsäure	1 „	„ „
8	4 ccm $\frac{1}{1}$ -m-Lösung von Homogentisinsäure	1 „	Schwache Braungelbfärbung.
9	4 ccm $\frac{1}{100}$ -m-Lösung von d-Tryptophan	1 „	Nach $\frac{1}{4}$ Stunde schwache, sehr deutliche Rosafärbung. Sie wird auch bei längerem Stehen nicht intensiver.
10	4 ccm kalt gesättigte Lösung von Skatol	1 „	Keine Färbung.
11	4 ccm kalt gesättigte Indollösung	1 „	„ „
12	Kalt gesättigte Cystinlösung in 4 ccm Wasser	1 „	„ „
13	4 ccm $\frac{1}{100}$ -m-Lösung von l-Prolin	1 „	„ „

nehmen, so scheint es uns als fast ganz ausgeschlossen, daß geringe Beimengungen von Tyrosin die Ursache der beobachteten Färbungen sind. Lösungen von Indol und Skatol zeigten keine Färbung. Interessant ist, daß l-Phenylalanin nicht angegriffen zu werden scheint, wenigstens tritt keine Färbung auf.

Wir haben diesen Versuch sehr oft mit l-, d- und dl-Phenylalanin wiederholt, und wir konnten in keinem Falle eine Färbung der angewandten Lösungen nach Zusatz von Tyrosinase beobachten. Es scheint, daß die Tyrosinase nur dann angreift, wenn im Benzolkern schon mindestens eine OH-Gruppe vorhanden ist. Ganz sicher gestellt wird die Unangreifbarkeit des Phenylalanins durch die Tyrosinase jedoch erst sein, wenn es gelingt, das angewandte Phenylalanin quantitativ unverändert wieder zu gewinnen. Derartige Versuche auch mit anderen Aminosäuren sind im Gange. Homogentisinsäure wurde deutlich angegriffen, wenn sie in konzentrierterer Lösung verwendet wurde. Die Lösung von Dijodtyrosin zeigte keine Veränderung. Ganz gleich verhielten sich die Lösungen von Prolin und Cystin. Es sei erwähnt, daß wir nach analogen, an weiter unten mitgeteilten Versuchen mit tyrosinhaltigen Polypeptiden gemachten Erfahrungen, Phenylalanin, Tryptophan, Prolin und Cystin nach Zusatz anderer Aminosäuren, wie Glykokoll, d-Alanin usw. der Wirkung der Tyrosinase aussetzten. Es ließ sich kein Einfluß auf die Intensität der Färbung feststellen. Die Lösungen von Phenylalanin, Cystin und Prolin blieben ungefärbt.

Einwirkung der Tyrosinase auf tyrosinhaltige Polypeptide.

Zu den folgenden Versuchen dienten: Glycyl-l-tyrosin, d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin,¹⁾ l-Leucyl-glycyl-l-tyrosin, l-Leucyl-triglycyl-l-tyrosin,¹⁾ ein aus Seide gewonnenes Tetrapeptid,²⁾ bestehend aus 1 l-tyrosin, 1 d-Alanin und 2 Glykokoll und ferner ein offenbar noch komplizierter gebautes tyrosinhaltiges Polypeptid aus Seide. Wir haben ferner von den synthetisch dargestellten Polypeptiden auch die entsprechenden Halogenacylverbindungen untersucht, und schließlich noch auf das von uns neu dargestellte, später eingehend zu

¹⁾ Vgl. Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden, XXI. Derivate des Tyrosins und der Glutaminsäure, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XL, S. 3704, 1907.

²⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XL, S. 3544, 1907.

beschreibende Glycyl-dijod-l-tyrosin Tyrosinase einwirken lassen. Das Glycyl-dijod-tyrosin wurde aus krystallisiertem Glycyl-l-tyrosin¹⁾ dargestellt und zwar in analoger Weise, wie das Dijodtyrosin. Es zersetzt sich gegen 213° (unkorr.) und ist in Wasser schwer löslich. Das zu diesen Versuchen verwendete Glycyl-l-tyrosin enthielt Krystallwasser und zwar ein Molekül.

0,2344 g Substanz verloren beim Trocknen im Toluolbad unter vermindertem Druck 0,0164 g Wasser.

Berechnet für $C_{11}H_{14}N_2O_4 + H_2O$:	Gefunden:
7,03% H_2O .	6,99% H_2O .

0,2134 g wasserfreie Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 8,1468 g. Spezifisches Gewicht 1,0043. $\alpha = +1,34^\circ$ bei Natriumlicht. $[\alpha]_{20}^D = +50,9^\circ (+0,7^\circ)$.

Die Resultate dieser Versuche ergeben sich aus folgender Tabelle (S. 341).

Aus der folgenden Übersicht ergibt sich, daß die Lösungen von tyrosinhaltigen Polypeptiden alle durch Tyrosinase gefärbt werden, und zwar hat offenbar die Art der außer l-Tyrosin an deren Aufbau beteiligten Aminosäuren einen Einfluß auf die Art der entstehenden Farben. So waren die Lösungen von Glycyl-l-tyrosin und d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin ganz verschieden gefärbt und vor allem zeigte sich ein anderes Endresultat. Die Lösung von Glycyl-l-tyrosin wurde prachtvoll grün, nachdem sich die zuerst rote Lösung vorher fast entfärbt hatte, diejenige von d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin blieb dunkelrot. Unter sich ganz gleich waren die Farbennuancen bei l-Leucyl-glycyl-l-tyrosin und l-Leucyl-triglycyl-l-tyrosin. Die grüne Farbe ist bei Glycyl-l-tyrosin nicht die definitive Färbung, nach einiger Zeit erscheint sie im durchfallenden Licht rot und im auffallenden grün und schließlich wird sie blau. Von den Lösungen der Halogenacylverbindungen wurde offenbar ihrer stark sauren Natur wegen keine gefärbt, auch die Lösung von Glycyl-dijod-l-tyrosin zeigte keine Färbung.

¹⁾ Emil Abderhalden und Berthold Oppler, Das Verhalten einiger Polypeptide gegen Blut-Plasma und -Serum, Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 294, 1907.

Nr.	Angewandte Verbindung	Angewandte Fermentmenge	Bemerkungen
1	4 ccm $\frac{1}{100}$ -m-Glycyl-l-tyrosin	$\frac{1}{8}$ ccm	Die Färbung tritt später auf als bei Anwendung von l-Tyrosin. Sie ist zunächst rosa und geht dann in karminrot über, wird dann grün und schließlich blau.
2	4 ccm $\frac{1}{10}$ -m-Glycyl-l-tyrosin	1 ccm + 1 ccm Wasser	Die Reaktion tritt rascher ein als bei 1, jedoch auch noch später als bei Anwendung von l-Tyrosin. Farbe: rosa → karmin → grün und zuletzt blau.
3	4 ccm $\frac{1}{10}$ -m-d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin	1 ccm	Nach etwa 2 Minuten Rosafärbung, dann dunkelrot.
4	4 ccm $\frac{1}{10}$ -m-l-Leucyl-glycyl-l-tyrosin	1 „	Die Lösung wird nach etwa 2 Minuten bismarckbraun.
5	4 ccm $\frac{1}{10}$ -m-l-Leucyl-triglycyl-l-tyrosin	1 „	Diese Lösung zeigte genau dasselbe Verhalten wie bei Versuch 4. Die Farbnuance war auch genau dieselbe und ganz verschieden von der bei Versuch 3 auftretenden.
6	4 ccm $\frac{1}{10}$ -m-Tetra-peptid aus Seide (1 l-tyrosin, 1 d-Alanin und 2 Glykokoll)	1 „	Nach etwa 2 Minuten Braunrotfärbung.
7	Tyrosinhaltiges Poly-peptid aus Seide unbekannter Zusammensetzung. Kalt gesättigte Lösg.	1 „	Wird braun, dann grün und schließlich rot.
8	Chloracetyl-l-tyrosin $\frac{1}{100}$ -m-Lösung	1 „	Keine Färbung.
9	d-Brompropionyl-glycyl-l-tyrosin $\frac{1}{100}$ -m-Lösung	1 „	„ „
10	d-Bromisocapronyl-glycyl-l-tyrosin $\frac{1}{100}$ -m-Lösung	1 „	„ „
11	d-Bromisocapronyl-triglycyl-l-tyrosin $\frac{1}{100}$ -m-Lösung	1 „	„ „
12	Glycyl-dijod-l-tyrosin Kalt gesättigte Lösung	1 „	„ „

In allen Fällen trat bei Verwendung der tyrosinhaltigen Polypeptide die Färbung später ein als bei Anwendung von l-Tyrosin, und zwar auch dann, wenn in der angewandten Polypeptidmenge dieselbe Menge Tyrosin vorhanden war, als im Parallelversuch Tyrosin angewandt wurde. Das spätere Einsetzen der Färbung gab zu der Vermutung Anlaß, daß der Oxydation eine Hydrolyse der Polypeptide vorausgehen könnte. Es würde dann die Färbung in dem Maße auftreten, in dem Tyrosin frei würde. Gegen diese Anschauung sprach allerdings der Umstand, daß die Färbung der Lösung von Glycyl-l-tyrosin und auch der anderen tyrosinhaltigen Polypeptide eine andere ist, als bei Anwendung von Tyrosin allein und bei Zusatz von Aminosäuren verschiedener Art. Dieser Unterschied bezieht sich vor allem auf die Endfarbe. Wir haben trotzdem zur Sicherheit folgenden Versuch ausgeführt. Eine bestimmte Menge Glycyl-l-tyrosin wurde in einer bestimmten Menge Wasser gelöst. Nach Zusatz von 1 ccm Tyrosinase-Lösung und etwas Toluol bestimmten wir sofort die Drehung der Lösung. Die Ablesung wurde in kurzen Zwischenräumen wiederholt. Es zeigte sich keine Änderung des Drehungsvermögens, trotzdem die Lösung sich allmählich färbte und schließlich eine Ablesung nicht mehr gestattete. Diese Beobachtung scheint uns zu beweisen, daß schon minimale Spuren von oxydiertem Polypeptid und auch von Tyrosin hinreichen, um eine intensive Färbung zu bewirken, denn auch dann, wenn eine Hydrolyse des angewandten Glycyl-l-tyrosins nicht eingetreten ist, war zu erwarten, daß eine Änderung des Drehungsvermögens mit dem Eintritt und der Zunahme der Färbung sich zeigen würde, denn es ist nicht anzunehmen, daß das Oxydationsprodukt des Glycyl-l-tyrosins das gleiche Drehungsvermögen besitzt, wie das unveränderte Glycyl-l-tyrosin selbst. Wir hatten gehofft, durch Verfolgung der Drehung in analoger Weise, wie dies beim Studium der Wirkung proteolytischer Fermente auf optisch-aktive Polypeptide geschehen ist,¹⁾ die Einwirkung der Tyrosinase auf Tyrosin und

¹⁾ Emil Abderhalden und A. H. Koelker, Die Verwendung optisch-aktiver Polypeptide zur Prüfung der Wirksamkeit proteolytischer

auf tyrosinhaltige Polypeptide unter verschiedenen Bedingungen feststellen zu können. Wie diese ersten Versuche zeigen, ist ein Erfolg nach dieser Richtung kaum zu erwarten.

Um festzustellen, ob die von uns verwendete Tyrosinase-Lösung überhaupt proteolytische Fermente enthält, haben wir sie auf d-Alanyl-d-Alanin einwirken lassen. Das Drehungsvermögen der angewandten Lösung blieb auch nach langem Stehen konstant. Eine Hydrolyse war somit nicht erfolgt.

In einer weiteren Versuchsreihe prüften wir den Einfluß des Zusatzes verschiedener Aminosäuren auf die Raschheit des Eintritts der Färbung bei Anwendung von tyrosinhaltigen Polypeptiden und auf die Art der entstehenden Farbe. Der letztere Punkt war von besonderem Interesse, nachdem Chodat¹⁾ die interessante Beobachtung gemacht hatte, daß l-Tyrosin-anhydrid- und Glycyl-l-tyrosin-anhydridlösungen eine ganz verschiedene Farbe annehmen, je nachdem man sie für sich allein der Wirkung von Tyrosinase aussetzt oder aber zugleich andere Aminosäuren, wie Glykokoll, Alanin, Leucin usw. zusetzt, und zwar war die Art der Farbe im letzteren Falle abhängig von der Art der zugesetzten Aminosäure. Unsere Beobachtungen mit Glycyl-l-tyrosin führten zu dem Resultate, daß geringe Mengen von Aminosäuren ($\frac{1}{100}$ - und $\frac{1}{10}$ -m-Lösungen) den Eintritt der Färbung durch Tyrosinase ganz auffallend beschleunigen, während größere Mengen ($\frac{1}{1}$ -m-Lösung und höhere Konzentrationen) den Eintritt der Färbung hemmen, ja fast aufheben können. Eine Ausnahme machen die Asparagin- und Glutaminsäure. Sie hemmen beide schon in geringen Konzentrationen. Auffallend beschleunigt wurde die Reaktion durch Sarkosin und Isoserin. Sehr intensiv war vor allem der Einfluß des l-Prolinzusatzes auf die Farbensnuance. Die folgende Übersicht gibt einen Einblick in diese Beobachtungen.

Fermente, Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 294, 1907, und Emil Abderhalden und Alfred Gigon, Weiterer Beitrag zur Kenntnis des Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung, Ebenda, Bd. LIII, S. 251, 1907.

¹⁾ l. c.

Nr.	Angewandte Menge Glycyl-l-tyrosin	Ferment- menge	Zusatz	Bemerkungen
1	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- Glycyl-l-tyrosin	1 ccm + 1 ccm Wasser	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- Glykokoll	Starke Hemmung. Die Lösung wird rot und schließlich grün.
2	•	•	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- Prolin	Starke Beschleunigung des Eintritts der Färbung. Farbe intensiv karminrot.
3	•	2 ccm	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- d-Alanin	Beschleunigung der Reaktion. Rot → grün.
4	•	•	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m- d-Valin	•
5	•	•	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m- l-Leucin	•
6	•	•	1 ccm $\frac{1}{100}$ -m- l-Phenyl- alanin	•
7	•	•	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- l-Phenyl- alanin	Unbedeutende Beschleunigung des Auftretens der Färbung.
8	•	•	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- l-Asparagin- säure	Starke Hemmung.
9	•	•	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- d-Glutamin- säure	•

Eine ausgesprochene Veränderung der Farbe war nur bei Zusatz von l-Prolin vorhanden. Die übrigen Aminosäuren bewirkten wohl auch zum Teil eine geringe Änderung der Nüance, aber schließlich blieb als letzte Färbung stets grün übrig. Bei längerem Stehen erhält man dieselben beim Glycyl-l-tyrosin schon erwähnten Änderungen der Farbe, bis endlich die blaue Färbung auftritt. Regelmäßig beobachtet man beim Übergang von rot zu grün eine Aufhellung und fast vollständige Entfärbung als Zwischenstadium. Offenbar sind in diesem Momente die roten und grünen Farbstoffe in ungefähr gleichen Mengen vorhanden.

Wir haben im Anschluß an die Beobachtung, daß l-Prolin in so auffallender Weise die Färbung von Glycyl-l-tyrosin durch Tyrosinase beeinflusst, einige Versuche mit Verbindungen unter-

nommen, die nicht zur Reihe der Aminosäuren gehören. Bevor wir auf diese Versuche eingehen, seien noch solche über die Einwirkung der Tyrosinase auf tyrosinhaltige Anhydride, und zwar auf Glycyl-l-tyrosinanhydrid und Tyrosinanhydrid mit und ohne Zusatz von Aminosäuren mitgeteilt.

Nr.	Angewandte Menge Anhydrid	Ange- wandte Fer- ment- menge	Zusatz	Bemerkungen
1	4 ccm Glycyl- l-tyrosin-anhydrid (0,0730 g in 50 ccm Wasser gelöst)	1 ccm	0	Nach $\frac{1}{4}$ Stunde beginnt sich die Lösung schwach gelblich und dann bräunlich zu färben.
2	„	„	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- Glykokoll	Nach ca. 5 Minuten wird die Lösung rötlich. Bei längerem Stehen tritt Rotbraunfärbung auf.
3	„	„	1 ccm $\frac{1}{1}$ -m- Glykokoll	Schon nach 2 Minuten Rotfärbung. Sie blaßt allmählich ab und geht in Blau über.
4	„	„	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- d-Alanin	Dieselben Farben und dasselbe Verhalten wie bei Versuch 2.
5	„	„	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- l-Prolin	Nach 7 Minuten intensive Violettfärbung. Sie wird nach 12 Stunden etwas bräunlich.
6	4 ccm l-Tyrosin- anhydrid (0,0460 g in 50 ccm Wasser. Ein kleiner Teil blieb ungelöst)	„	0	Nach mehrstündig. Stehen wird die Lösung schwach rosa gefärbt.
7	„	„	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- Glykokoll	„
8	„	„	1 ccm $\frac{1}{1}$ -m- Glykokoll	„
9	„	„	1 ccm $\frac{1}{10}$ -m- d-Alanin	„

Aus diesen Resultaten geht hervor, daß der Zusatz von Aminosäuren die Färbung der Lösung von Glycyl-l-tyrosin-

anhydrid durch Tyrosinase sehr beschleunigt, und daß zugleich die Art der Farbe stark beeinflußt wird. Es gilt dies in ganz besonders ausgesprochenem Maße vom Prolin. Beim Tyrosin-anhydrid ließen sich solche Einflüsse nicht nachweisen. Wie schon erwähnt, hat bereits Chodat¹⁾ analoge Beobachtungen gemacht. Vorläufig müssen wir es dahingestellt sein lassen, ob der Oxydation der genannten Anhydride eine Aufspaltung zu den entsprechenden Dipeptiden vorausgeht.

Der Einfluß der zugesetzten Aminosäuren muß sowohl bei den tyrosinhaltigen Polypeptiden und speziell beim Glycyl-l-tyrosin und ganz besonders vor allem beim Glycyl-l-tyrosin-anhydrid ein zweifacher sein. Einesteils gewinnt man den Eindruck, daß die zugesetzten Aminosäuren die Reaktion direkt beschleunigen, und anderenteils führt die Beobachtung, daß bestimmte Aminosäuren eine Änderung der Färbung bewirken, zur Vermutung, daß diese in irgend einer Weise bei der Farbstoffbildung beteiligt sind. Diese Vermutung wird gestützt durch folgende Beobachtungen.

Läßt man $1/10$ -m-Lösung von Phenol mit 1 ccm Tyrosinase-lösung stehen, so tritt nach einiger Zeit Braunfärbung auf. Ein Kontrollversuch ohne Tyrosinasezusatz ergab in der gleichen Zeit keine Färbung. Wird zu derselben Phenolmenge unter ganz gleichen Bedingungen außer Tyrosinase noch 1 ccm $1/10$ -m-Glykokoll zugesetzt, so tritt Cochenillefärbung auf, die nach etwa 12 Stunden in violett übergeht. Wird an Stelle von Glykokoll 1 ccm $1/10$ -m-Prolin verwendet, so zeigt sich fast sofort intensive Violettfärbung. Über ganz ähnliche Beobachtungen mit Kresol berichtet Chodat.¹⁾ Es ist nun von größtem Interesse, daß es gelingt, ganz analoge Färbungen durch Oxydation mit Kaliumbichromat an Stelle der Tyrosinase hervorzurufen. Wird zu farblosem geschmolzenem Phenol l-Prolin hinzugefügt und nun mit einer Spur Kaliumbichromat erhitzt, so tritt Violettfärbung auf. Wird an Stelle von Prolin Glykokoll genommen, so erhält man die analoge Farbe, wie wenn Tyrosinase angewandt wurde. Wird Phenol für sich allein oxydiert, so zeigt sich eine schmutzig-gelbbraune

¹⁾ l. c.

Färbung. Diese Versuche wurden wiederholt und ergaben stets dasselbe Resultat. Wir werden sie weiter ausdehnen und hoffen, durch das genauere Studium dieser Reaktionen einen Einblick in das Wesen der entstehenden Farbstoffe zu erhalten und damit auch dem Problem der Farbstoffbildung durch Tyrosinase-wirkung näher zu kommen.

Erwähnt sei, daß die bei der Oxydation von Tyrosin, der tyrosinhaltigen Polypeptide und Anhydride entstehenden Farben in alkalischer Lösung unbeständig sind. Sie gehen in braun über. Durch Zusatz von Aminosäuren oder Mineralsäuren können wieder die ursprünglichen Farben hervorgerufen werden. Diese Beobachtungen sind vor allem am Glycyl-l-tyrosin gemacht worden. In der Hitze sind die Farben beständig. Beim Glycyl-l-tyrosin geht allerdings die grüne Farbe beim Erhitzen in blau über, um dann beim Abkühlen wieder in grün umzuschlagen. Ganz besonders schön zeigt diese Veränderungen das mit Prolin versetzte Glycyl-l-tyrosin. Beim Kochen mit Säuren werden die Farben nicht verändert.

Schließlich haben wir versucht, Tyrosin in neutraler Lösung mit Ozon zu oxydieren. 1 g Tyrosin wurde in 50 ccm Wasser suspendiert und 3 Stunden Ozon durch das Gemisch geleitet. Der größte Teil des Tyrosins blieb ungelöst. Die Lösung färbte sich hellgelb. Sie reagierte stark sauer und gab auf Tyrosinasezusatz keine Reaktion mehr. Beim Eindampfen der filtrierten Lösung verblieb ein brauner harziger Rückstand.

In einem zweiten Versuch wurde 1 g Tyrosin in der berechneten Menge (2 Mol.) Alkali gelöst und die Lösung mit Wasser auf 50 ccm verdünnt. Beim Durchleiten von Ozon trat intensive Braunschwarzfärbung auf. Es schieden sich keine Flocken ab und auch beim Neutralisieren und Ansäuern trat keine Fällung ein.

Weiterhin haben wir 0,5 g Glycyl-l-tyrosin in 25 ccm Wasser gelöst und während 3 Stunden Ozon in die klare Lösung geleitet. Es zeigte sich zunächst Braunfärbung. Bald trat Aufhellung ein und die Lösung blieb nun hellgelb gefärbt. Beim längeren Stehen zeigte sich wieder Dunkelfärbung. Die Lösung war optisch vollständig inaktiv geworden. Sie reagierte noch mit

Millons Reagens intensiv. Beim Eindampfen der Lösung verblieb ein brauner, harziger, in Wasser leicht löslicher Rückstand.

Durch die Einwirkung von Ozon allein auf Tyrosin und Glycyl-l-tyrosin waren somit keine analogen Färbungen erhalten worden, wie mit der Tyrosinase. Wir werden die Versuche unter Zusatz verschiedener Aminosäuren wiederholen.

Wir haben noch folgende Verbindungen auf ihr Verhalten zur Tyrosinase untersucht:

p-Amidophenol: 4 ccm p-Amidophenol (kalt gesättigt) + 1 ccm Tyrosinase: Die Lösung färbt sich braun und zwar viel rascher und intensiver als eine Kontrollösung ohne Fermentzusatz.

Bei einem zweiten Versuche gaben wir zu 4 ccm p-Amidophenol + 1 ccm Tyrosinase 1 ccm $\frac{1}{10}$ -m-Glykokoll zu. Ein Einfluß des Glykokolls war nicht zu erkennen.

Anilin: Keine Fällung. Ebenso verhielten sich α - und β -Naphthol, Salicylsäure und salicylsaures Natrium. Glykokollzusatz hatte auch hier keinen Einfluß.

Wenn wir alles zusammenfassen, was wir bis jetzt über die Art der bei der Tyrosinasewirkung auftretenden Farbstoffe wissen, so läßt sich mit ziemlicher Bestimmtheit sagen, daß die Art des Farbstoffes (vorläufig erkennbar an der Art der Färbung) abhängig ist von der Bindung, in der das Tyrosin vorhanden ist. Es färbt sich in freiem Zustand in anderer Weise, als wenn es mit anderen Aminosäuren verbunden in Form von Polypeptiden und Anhydriden vorhanden ist. Es spricht alles dafür, daß die tyrosinhaltigen Polypeptide ohne vorherige Abspaltung von Tyrosin oxydiert werden. Eine noch unentschiedene Frage ist die, ob die tyrosinhaltigen Anhydride vor ihrer Oxydation aufgespalten werden. Jedenfalls werden sie äußerst langsam angegriffen. Wir werden diese Frage noch weiter verfolgen. Endlich kann man mit ziemlich großer Bestimmtheit annehmen, daß die durch Aminosäurezusatz bewirkten Änderungen in der Art der Farbstoffbildung durch die Teilnahme der zugesetzten Aminosäuren am Aufbau des neugebildeten Farbstoffs bedingt ist. Die beobachteten Farbstoffe erinnern in mancher Hinsicht an die Farbstoffe der Gruppe der

Indophenole, Oxazone und Oxazine. Wir wollen nicht unerwähnt lassen, daß durch Versuche mit größeren Mengen von Polypeptiden unter Zusatz von Aminosäuren quantitativ verfolgt werden soll, ob tatsächlich die zugesetzten Aminosäuren in direkte Beziehungen zu dem unter ihrem Einfluß entstehenden Farbstoffe treten.

Wie schon erwähnt, gab auch eine Lösung von d-Tryptophan mit Tyrosinase eine leichte Färbung. Um festzustellen, ob diese Reaktion etwa durch eine Beimengung von Spuren von Tyrosin bedingt sei, haben wir einige tryptophanhaltige Polypeptide auf ihr Verhalten gegen Tyrosinase geprüft. Wir verwendeten: Glycyl-d-tryptophan,¹⁾ d-Tryptophylglycin,¹⁾ d-Alanyl-d-tryptophan,¹⁾ l-Leucyl-d-tryptophan.¹⁾

Nr.	Angewandtes Polypeptid	Ange- wandte Fer- ment- menge	Zusatz	Bemerkungen
1	4 ccm Glycyl-d-tryptophan ^{1/100} -m-Lösung	1 ccm	0	Nach 10 Minuten schwache Rosafärbg.
2	"	"	1 ccm ^{1/10} -m- Glykokoll	"
3	4 ccm Tryptophyl-glycin ^{1/100} -m-Lösung	"	0	"
4	4 ccm d-Alanyl-d-tryptophan ^{1/100} -m-Lösung	"	0	"
5	4 ccm l-Leucyl-d-tryptophan	"	0	Sehr schwach rosa.

Die mit den tryptophanhaltigen Polypeptiden erhaltenen Resultate machen es sehr unwahrscheinlich, daß die beobachteten Färbungen einer Beimengung von Tyrosin zuzuschreiben sind.

Wir haben bereits darauf hingewiesen, daß unter den Aminosäuren die stark sauer reagierenden beiden Dicarbon-

¹⁾ Emil Abderhalden und Martin Kempe, Synthese von Polypeptiden, XX. Derivate des Tryptophans, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XL. S. 2737, 1907.

säuren l-Asparaginsäure und d-Glutaminsäure eine Sonderstellung einnehmen. Sie hemmen die Wirkung der Tyrosinase schon in geringen Konzentrationen. Offenbar hängt diese Wirkung mit der stark sauren Natur dieser beiden Aminosäuren zusammen. Um dies zu prüfen, haben wir das Verhalten der Tyrosinase gegen geringe Konzentrationen Mineralsäuren und zugleich auch gegen Alkali geprüft.

Nr.	Menge der angewandten $\frac{1}{300}$ -m-l-Tyrosinlösung	Menge des Fermentes	Zusatz	Bemerkungen
1	4 ccm	1 ccm	0	Sofort Rosafärbung, dann rotbraun, braun, schwarz.
2	"	"	1 ccm $\frac{1}{100}$ -n-HCl	Nach 2 Stunden kaum erkennbare Rotfärbung. Auch nach längerer Zeit wird die Färbung nicht intensiver.
3	"	"	2 ccm $\frac{1}{100}$ -n-HCl	Keine Färbung.
4	"	"	2 ccm $\frac{1}{1}$ -n-HCl	" "
5	"	"	0,2 ccm $\frac{1}{100}$ -n-HCl	Erst nach 2 Stunden ganz schwache Rosafärbung.
6	"	"	1 ccm $\frac{1}{100}$ -n-Na(OH)	Eintritt der Färbung etwas später als bei 2. Die Farbe wird sofort dunkel und schließlich braunschwarz.
7	"	"	2 ccm $\frac{1}{1}$ -n-Na(OH)	Nach $\frac{1}{4}$ Stunde schwärzlich.

Es ergibt sich ohne weiteres, daß die Salzsäure selbst in großer Verdünnung stark hemmend auf die Tyrosinase einwirkt. Weniger stark hemmend wirkt Natronlauge. Um festzustellen, ob eine dauernde Schädigung der Tyrosinase durch die Säure und das Alkali vorliegt, wurden folgende Versuche ausgeführt.

1. 4 ccm $\frac{1}{300}$ -m-Tyrosinlösung + 1 ccm Tyrosinase + 1 ccm $\frac{1}{10}$ -m-Na(OH). Nach 10 Minuten wird mit 1 ccm $\frac{1}{10}$ -HCl

neutralisiert. Die Tyrosinlösung, die bis dahin ungefärbt geblieben war, färbt sich rasch intensiv rot.

2. 4 ccm $1/300$ -m-Tyrosinlösung + 1 ccm Ferment + 1 ccm $1/10$ -n-HCl. Keine Färbung. Nach 10 Minuten Zusatz von 1 ccm $1/10$ -n-Na(OH). Die Hemmung bleibt bestehen.

3. 4 ccm $1/300$ -m-Tyrosinlösung + 1 ccm Ferment + 1 ccm $1/10$ -n-Na(OH). Nach einer Stunde Neutralisation. Die Lösung färbt sich etwas schwächer als im Kontrollversuch ohne vorherigen Alkalizusatz.

4. Derselbe Versuch, mit Säurezusatz ausgeführt, führt zur dauernden Inaktivierung der Tyrosinase.

5. Läßt man Tyrosinase 2 Stunden mit $1/10$ -n-Na(OH) oder $1/10$ -n-HCl stehen, so tritt nach dem Neutralisieren und Zusatz von Tyrosin keine Färbung mehr auf.

Endlich haben wir noch den Einfluß verschiedener Alkohole auf die Wirkung der Tyrosinase geprüft. Angewandt wurden $1/10$ -n-Lösungen von Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutyl-, Amyl-, Hexyl- und Allylalkohol. Es war in keinem Fall eine Hemmung zu beobachten.

Die vorliegenden Beobachtungen führen zu verschiedenen neuen Fragestellungen. Einmal ist es von Interesse, festzustellen, ob und in welcher Weise die Färbung der tyrosinhaltigen Polypeptide und speziell der Anhydride durch gleichzeitigen Zusatz mehrerer Aminosäuren beeinflusst wird. Die jetzt schon mit einem verhältnismäßig kleinen Materiale beobachteten Farbennüancen sind so mannigfaltig, daß man in der Tat versucht sein könnte, die Bildung mancher Farbstoffe der Tier- und Pflanzenwelt auf analoge Prozesse zurückzuführen. Vor allem ist auch daran zu denken, daß verschiedenartige tyrosinhaltige Polypeptide ganz verschiedene Färbungen bilden können. Gewiß kommt einmal die Art der am Aufbau beteiligten Aminosäuren und ferner ihre Zahl in Betracht. Ein ganz besonderes Interesse verdient die weitere Verfolgung der Tyrosin enthaltenden Anhydride. Schließlich sei noch hervorgehoben, daß uns diese Beobachtungen, speziell an tyrosinhaltigen Polypeptiden und Anhydriden, ein Mittel an die Hand geben, um zu prüfen, ob die bisher im Tier- und Pflanzenreich beobachteten Tyrosinasen

identisch sind, oder aber eine ganz verschiedene Wirkung zeigen. Wir hoffen bald in der Lage zu sein, unsere Untersuchungen nach dieser Richtung auszudehnen.

Schließlich sei noch auf eine Beobachtung hingewiesen, die allgemeinere Bedeutung hat. Wird das tyrosinasehaltige Extrakt 24 Stunden auf der Schüttelmaschine bei 37° geschüttelt, so büßt es stark an Wirksamkeit ein. Auch beim Schütteln bei gewöhnlicher Temperatur tritt eine ganz auffallende Hemmung ein. Es ist diese Erscheinung keine für die Tyrosinase spezifische. Auch andere Fermente werden durch Schütteln stark geschädigt, oder vorsichtiger ausgedrückt, in ihrer Wirksamkeit beschränkt. Schüttelt man Hefepreßsaft 48 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur, so tritt eine starke Trübung auf. Läßt man die filtrierte Lösung auf Glycyl-l-tyrosin einwirken, so tritt die Spaltung ganz bedeutend langsamer ein, als wenn man denselben Preßsaft ungeschüttelt anwendet. 0,1890 g Glycyl-l-tyrosin in 13 ccm Wasser gelöst, hiervon 7 ccm mit 1 ccm Hefepreßsaft (nach 48stündigem Schütteln und Filtrieren) versetzt. Anfangsdrehung $+ 0,50^{\circ}$, nach 15 Stunden $+ 0,30^{\circ}$. Derselbe Saft spaltete ungeschüttelt dieselbe Menge Glycyl-l-tyrosin in etwa 4 Stunden vollständig.

Bei einem weiteren Versuche wurde 24 Stunden im Brutraum geschüttelt. Der Hefepreßsaft war nunmehr gänzlich inaktiv geworden.

Wir verfügen über eine größere Anzahl von derartigen Versuchen mit Tyrosinase, Hefepreßsaft und Pankreassaft. Das Resultat war immer dasselbe. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die sich bildenden Fällungen Ferment mit sich reißen. Da jedoch auch klar gebliebene Oxydaselösungen stark gehemmt waren, ist offenbar eine direkte Ausfällung nicht notwendig, um die Wirkung von Fermentlösungen aufzuheben oder doch zu vermindern. Jedenfalls wird man gut tun, bei Fermentdarstellungen z. B. aus Organen stärkeres Schütteln zu vermeiden.

Die erwähnten Versuche sind zum Teil mit Hilfe der Jagow-Stiftung ausgeführt worden.

Anmerkung: Nach Abschluß dieser Versuchsreihe hatten wir Gelegenheit, noch das von Emil Abderhalden und Martin

Kempe¹⁾ beschriebene Oxytryptophan zu untersuchen. Seine Lösung zeigt mit Tyrosinase eine sehr rasch auftretende, intensive Rotfärbung, die in ihrem ganzen Verhalten an Tyrosin erinnert. Die Rotfärbung geht allmählich in Braunrotfärbung über. Das Oxytryptophan unterscheidet sich auch durch diese Reaktion sehr scharf von reinem d-Tryptophan. Der Verdacht liegt nahe, daß Spuren von etwa beigemengtem Tyrosin die so außerordentlich feine Reaktion bedingt haben könnten. Die Beobachtung, daß in viele Krystallfraktionen zerlegtes Oxytryptophan stets in derselben Intensität die Reaktion mit Tyrosinase gab, spricht nicht für diese Auffassung. Auch unter dem Mikroskop beobachtet man keine Beimengungen, die Krystalle sehen ganz einheitlich aus. Der eine von uns hat in Gemeinschaft mit D. E. Baumann das Oxytryptophan wieder bei der Darstellung von d-Tryptophan erhalten. Es sind Untersuchungen im Gange, um festzustellen, ob die beobachtete Verbindung als primäres Spaltprodukt des Caseins aufgefaßt werden muß, oder ob es sekundär aus Tryptophan entsteht.

¹⁾ l. c.