

396. Richard Willstätter: Über Isolierung von Enzymen.

[Zusammenfassender Vortrag, gehalten auf Veranlassung der Deutschen Chemischen Gesellschaft bei der Hundertjahrfeier der Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte in Leipzig am 20. September 1922.]

(Eingegangen am 26. September 1922.)

Die Absicht, Enzyme aus pflanzlichen und tierischen Zellen, Organen und Sekreten zu isolieren, geht von der Annahme aus, daß die Träger enzymatischer Reaktionen Stoffindividuen von unbekannter chemischer Eigenart sind. Diese Voraussetzung, nach der es eine Aufgabe der präparativen organischen Chemie ist, die allein durch ihre spezifischen Wirkungen beschriebenen organischen Katalysatoren in reineren und reinen Zustand überzuführen, um die Erforschung ihrer chemischen Konstitution anzubahnen, ist nicht unbestritten. Schon die Annahme, daß den enzymatischen Wirkungen gewisse, bestimmbare Enzymmengen zugrunde liegen, muß ihre Berechtigung erst erweisen gegenüber folgendem Einwand, den z. B. vor kurzem A. Kiesel¹⁾ erhoben hat: »Erstens wird der quantitative Vergleich verschiedener Objekte und Individuen in bezug auf Fermentgehalt unrichtig, da wir nur auf Grund der fermentativen Wirkung eine Vorstellung über die Quantität des Ferments bekommen, die fermentative Wirkung aber von den Beimengungen höchst beeinflußt wird. Zweitens können die anwesenden fremdartigen Körper der Tätigkeit des Ferments einer zum Angriff dargebotenen Substanz gegenüber hinderlich, einer anderen gegenüber aber ohne Einfluß oder sogar behilflich sein.« Noch weiter entfernt sich mein wegleitender Gedanke von der Betrachtung der Enzyme, die das neue Buch von A. Fodor »Das Fermentproblem« ausspricht²⁾; danach erscheinen nämlich die Enzyme als Biokolloide aus den Gruppen chemisch bekannter Verbindungen, die ihre Wirkung besonderen Dispersitätsgraden verdanken. Invertin³⁾ wird als Hefegummi, Peptid-spaltendes Ferment⁴⁾ als Hefephosphorprotein erklärt. Am schärfsten endlich drückt sich der Gegensatz zwischen der Annahme chemischer Individuen, der sog. Stofftheorie der Enzyme, und der die materielle Natur der Fermente bestreitenden Vorstellung⁵⁾, daß eine Fermentation »mehr von einer geeigneten Mischung« »oder von einem geeigneten Fluß chemischer Änderung innerhalb derselben« abhänge, in folgenden Worten von

¹⁾ H. 118, 284 [1921/22]. ²⁾ 1922, Verlag Th. Steinkopff.

³⁾ Das Fermentproblem, S. 177 u. 233. ⁴⁾ Das Fermentproblem, S. 156

⁵⁾ E. Baur und E. Herzfeld, Bio. Z. 117, 96 [1921].

E. Baur¹⁾ aus: »Der Schleier, hinter dem sich bisher die Natur der Fermente verbarg, ist gelüftet. Es stellt sich heraus, daß Fermente ganz gewöhnliche und zudem wohl bekannte Stoffe sind, deren fein abgestimmte Wirkung mehr auf Mischungen und auf zusätzlichen Bedingungen beruht, als auf einem geheimnisvollen chemischen Aufbau. Es sind Versuche über synthetische Fermente, gewissermaßen Urzeugung von Fermenten, die von E. Herzfeld²⁾, E. Baur, R. Ehrenberg³⁾ in diesem Sinne gedeutet werden.

Bedeutung der quantitativen Analyse.

Die präparative Arbeit wird zwischen diesen Anschauungen entscheiden. Sie soll in jedem Schritte von Methoden der quantitativen Analyse geleitet werden. Man hat bekanntlich sehr häufig und mit vielen Erfolgen an der Schätzung oder der Bestimmung enzymatischer Reaktionen gearbeitet, und ein großer Teil der auf dem Enzymgebiete geleisteten Arbeit betrifft die Kinetik enzymatischer Reaktionen. Aber bis in die letzten Jahre ist die Durchführung der quantitativen Methode nach zwei Richtungen unvollständig geblieben, die notwendig ist und selbstverständlich sein sollte so wie etwa bei der Isolierung eines natürlichen Farbstoffs die Bestimmung der Farbstoffausbeute und Farbstärke.

Die Arbeit von dem pflanzlichen oder tierischen Ausgangsmaterial bis zum Präparate bedarf der quantitativen Kontrolle:

1. hinsichtlich der Ausbeute im Verhältnis zum Ausgangsmaterial,
2. hinsichtlich der enzymatischen Konzentration, des Reinheitsgrades, in den erhaltenen Lösungen und Präparaten.

Die Meßbarkeit durch Reaktionsgeschwindigkeiten unterscheidet die Arbeit an Enzymen von der chemischen Untersuchung gewisser innerer Sekrete oder der Vitamine und auch der Toxine und Antitoxine. Hier fehlt es, bei vielen sonstigen Analogien zwischen diesen Forschungsgebieten, an der Möglichkeit so empfindlicher, objektiver und sicherer Kontrolle der Mengen.

¹⁾ In R. Meyers Jahrb. d. Chem. **25**, 384 [1915]; ferner Bio. Z. **117**, 97, Fußnote 1 [1921].

²⁾ Bio. Z. **64**, 103 [1914]; **68**, 402 [1915]; E. Herzfeld und R. Klinger, Bio. Z. **88**, 260 [1918].

³⁾ Bio. Z. **128**, 431 [1922].

Die eine von den beiden Richtungen der Analyse hat fürs erste praktische Bedeutung. Da eine lange Folge von chemischen Operationen durchzuführen ist, kommt es zunächst darauf an, daß man bei den ersten Schritten, z.B. bei der Trocknung einer Drüse oder bei der Herstellung einer wäßrigen Enzymlösung aus Hefe, nicht schon den größten Teil des Enzyms vernichtet oder zurückläßt, und daß man jede weitere Vornahme wie die Bildung eines Adsorbates und seine Zerlegung ebenfalls mit praktisch brauchbarer Ausbeute durchführen muß, da sonst die Multiplikation der vielen Brüche zu unerträglich kleinen Mengen führt. Man findet durch solche Ausbeutekontrolle z.B., daß die Pankreasdrüse nicht, wie üblich, mit Alkohol behandelt werden darf, weil sonst viel von den Enzymen zerstört wird, sondern mit Aceton. Man findet, daß eine Invertin-Lösung aus der Hefe nicht durch Zerreissen und Abpressen oder Auslaugen hergestellt werden darf. Zugleich gelangt man aber auch auf diesem Wege der vergleichenden Ausbeutebestimmung zu einer tieferen Kenntnis von dem natürlichen Vorkommen eines Enzyms und vom Wesen des Auflösungsvorganges.

Es ist auf diese Weise festgestellt worden¹⁾, daß das Rohrzucker-spaltende Enzym der Hefe frei, wasserlöslich, nicht an unlösliche Bestandteile gebunden in der Zelle vorhanden ist, obwohl es aus ihr nicht einfach durch Lösungsmittel isoliert werden kann. Nach vollkommener mechanischer Zerstörung der Zellstruktur (nicht einfach durch Aufreißen oder Zerkleinern der Zelle) kann das Invertin in seiner ganzen Menge herausgelöst werden. Aber das ist ein für praktische Zwecke nicht anwendbarer Weg. Die praktische Methode, Invertin in Lösung zu bringen, beruht auf der Freilegung des von einer schützenden Schicht abgeschlossenen Enzyms durch einen enzymatischen Abbau und zwar durch einen von der allgemeinen Autolyse der Hefe unterschiedenen enzymatischen Vorgang. Man kann die Hefe abtöten und durch Einwirkung proteolytischer Enzyme von Eiweiß entleeren ohne Verlust an Invertin und dann durch Behandeln mit Amylase das Invertin in Lösung bringen.

In anderen Fällen lehrt die quantitative Analyse der Ausbeuten in enzymhaltigen Auszügen, daß die Enzyme in den Zellen in der Form von Adsorptionsverbindungen festgehalten sind. Es gelingt, die Adsorptionsaffinitäten mit chemischen

¹⁾ R. Willstätter und F. Racke, A. 425, 1 [1920/21] u. 427, 111 [1921/22].

Mitteln, und zwar sehr gelinden, zu überwinden und die Ausbeuten dadurch wesentlich zu steigern. So wird Emulsin¹⁾ aus den Amygdaleensamen, Peroxydase aus Getreidekeimlingen durch Wasser mit geringer, durch sehr verdünnte Alkalien mit hoher Ausbeute gelöst. Derartige Bindung durch Adsorption ist eine häufige Erscheinung, die von einer chemischen Bindung nicht leicht zu unterscheiden ist. Die Beobachtungen an den Enzymen können zur Erklärung der Bindungsweise anderer hochmolekularer Stoffe beitragen. Befunde²⁾ über das Verhalten des Chlorophylls im Blatte sprechen dafür, daß sich das Pigment in den Chloroplasten nicht frei, molekular gelöst, sondern wenigstens in der Hauptmenge in einem Adsorptionszustand befindet, der sein Löslichkeitsverhalten entstellt. Das nämliche Verhalten wie ein durch Adsorption festgehaltenes Enzym scheint mir auch der Blutfarbstoff zu zeigen. Das Oxyhämoglobin wird durch Pyridin oder durch sehr geringe, von den Arbeitsbedingungen abhängige Mengen von Säure mit großer Leichtigkeit in Globin und Hämochromogen zerlegt, am besten durch gelindes Ansäuern des Oxyhämoglobins unter Überzonen mit Äther, der das Hämochromogen aufnimmt³⁾. Das ist nicht das Verhalten einer chemischen Verbindung, die gespalten wird, sondern einer Adsorptionsverbindung. Dieselbe Beobachtung erklärt auch die Kolloidsorbate unlöslicher Komponenten, zu welchen man mit großer Wahrscheinlichkeit die Inkrusten der Cellulose, die Assoziationen der Cellulose mit den Ligninsubstanzen, rechnen darf⁴⁾.

Der zweite Sinn, in dem die Isolierung der Enzyme von der quantitativen Analyse geleitet wird, ist die Bestimmung der enzymatischen Konzentration. Der Erfolg der Trennungs- und Reinigungsprozesse wird durch die Steigerung des Reinheitsgrades ausgedrückt. Es ist noch in keinem Falle gelungen,

¹⁾ R. Willstätter und W. Csanyi, H. 117, 172 [1921].

²⁾ R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918, S. 263 u. f. Im Gegensatz dazu schließt, ohne diese Arbeit zu berücksichtigen, eine neuere Untersuchung von K. Stern (Ber. Dtsch. Botan. Ges. 38, 28 [1920]) allein aus qualitativen Beobachtungen über Fluoreszenz des Chlorophylls in lebenden Zellen, daß das Chlorophyll in diesen echt gelöst in Lipoiden, molekulardispers, vorhanden sei.

³⁾ vergl. die Dissertation von A. Madinaveitia, Zur Kenntnis der Katalysen, Zürich 1912, S. 14.

⁴⁾ vergl. die Untersuchungen von H. Wislicenus über die Holzbildung (Tharandter forstl. Jahrb. 60, 313 [1909] u. Kolloid-Ztschr. 6, 17 [1910]).

die Reinigung so weit fortzusetzen, bis weitere Operationen, seien es auch nur Wiederholungen, gar keine Steigerung des Reinheitsgrades mehr ergeben hätten. Dies ist in jedem Falle das Ziel. In einigen Beispielen (so beim Invertin) ist die enzymatische Konzentration allerdings so weit gesteigert, daß durch weitere Anwendungen der Reinigungsmethoden erzielte Fortschritte durch die spontane Zersetzung der Enzyme und die Unvollkommenheit der Apparate, namentlich der Dialysatoren, und die Unreinheit der Reagenzien kompensiert werden. Es führt daher von einem gewissen Reinheitsgrad eines Enzyms an unter Umständen weiter, wenn die präparative Methode auch durch quantitative Bestimmung akzessorischer Eigenschaften statt allein durch Messung der Enzymwirkung geleitet wird. Wenn man Peroxydase nach dem Eisen-, Invertin nach dem Phosphor-Gehalt fraktioniert, so ergibt der Vergleich der Enzymfraktionen wesentliche Unterschiede in den Eigenschaften und in der Reinheit, die allein auf Grund der enzymatischen Konzentration nicht leicht erreicht werden könnten.

Über die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung.

Die Bedeutung der quantitativen Analyse für die Isolierung der Enzyme wird keinem Widerspruch oder Zweifel begegnen, hingegen die Annahme, daß die Analyse ausführbar ist. Wenn es nicht in der Tat Schwierigkeiten zu überwinden gäbe, so wäre diese Frage längst gelöst. Die Schwierigkeiten liegen in den Einflüssen der Begleitstoffe auf die enzymatischen Wirkungen und in deren Abhängigkeit von der Verteilung der Enzyme. Dadurch wird die Beziehung zwischen Enzymmenge und Enzymwirkung weniger einfach. Wenn man zwei möglichst verschiedene Fälle untersucht, das von Begleitstoffen am wenigsten abhängige Invertin und die ungemein abhängige Lipase, so findet man nicht allgemein die Wirkung einer gewissen Enzymmenge konstant, aber ihr Wirkungsvermögen, nämlich diejenige Wirkung, die das Enzym unter gewissen Bedingungen auszuüben vermag, wenn auch nicht unter den in irgend einer vorhandenen Lösung gegebenen Bedingungen.

Das Invertin ist auf seinem Wege vom lebenden Pilz (Zeitwert z.B. 340) bis zu seiner mehr als 1600-fachen Konzentration im besten Präparate (Zeitwert 0.2) mit vielen Hunderten von Analysen verfolgt worden. Es hat sich dabei ohne Widerspruch ergeben, daß die Assoziationen des Invertins mit den begleitenden fremden Körpern für die quantitativen Verhältnisse der Invertinwirkung belanglos sind, und daß die Invertinwirkung auch von dem gesamten

Kolloidsystem, von der Teilchengröße, von der Verteilung und der elektrischen Ladung, die dem Enzym als Kolloid zukommt, unabhängig ist. Die Affinität des Invertins zum Rohrzucker erweist sich für Invertin aus einem gegebenen Hefematerial als konstant von der Reaktion an, die der lebende Pilz auf den Rohrzucker ausübt bis zu dessen Hydrolyse durch das von Kohlehydraten, Eiweißstoffen und Phosphorverbindungen völlig befreite Invertinpräparat. (Es gibt natürlich auf diesem Weg Verluste, so daß z. B. nur $\frac{1}{6}$ vom gesamten Hefeenzym gewonnen wird; aber es sind Verluste von derselben Art, wie wenn ein Alkaloid, Glucosid oder ein Farbstoff aus kompliziertem Ausgangsmaterial isoliert wird.) Anders würde es sich verhalten, wenn man mit demselben Maße Invertin aus verschiedenen Hefen vergleichen wollte. Die Differenz zwischen den Dissoziationskonstanten der Saccharase-Saccharose-Verbindung, die von H. von Euler und J. Laurin¹⁾ = 0.026, zuvor aber von L. Michaelis und L. Menten²⁾ = 0.016 gefunden wurden, deutet schon an, daß dasselbe Maß nicht für Invertin irgendwelcher Herkunft gilt. Die Ausschläge zwischen den Dissoziationskonstanten werden beim Vergleich von Invertinpräparaten aus einer Anzahl verschiedener Hefen noch größer gefunden: sie bewegen sich zwischen 0.016 und 0.040. Aus einer Untersuchung, die Hr. R. Kuhn³⁾ in meinem Laboratorium ausgeführt, wird hervorgehen, daß die Differenzen in der Affinität zum Rohrzucker auf Hemmung der Invertinwirkung durch dem Invertin sehr nahestehende Stoffe beruhen, für deren Abtrennung wir noch keine Methoden kennen.

Die Erscheinungen der Enzymspezifität, die Beobachtungen über Zersetzung und Stabilisierung gereinigter Invertinlösungen und besonders die Einflüsse der Verteilung auf die enzymatische Wirkung, die bei anderen Enzymen gefunden wurden, führen zu der Auffassung, daß das Molekül eines Enzyms aus einem kolloiden Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe besteht. Die natürlichen enzymfremden Begleitstoffe des Invertins assoziieren sich mit dem kolloiden Träger, und diese Anlagerung ist ohne Einfluß auf die an der wirksamen Gruppe verlaufende Hydrolyse des Rohrzuckers. Nach Art dieser natürlichen Adsorbate sind auch die mit Tonerde oder Kaolin gebildeten konstituiert; in den ersteren wirkt das Invertin

¹⁾ H. 110, 55 [1920]. ²⁾ Bio. Z. 49, 133 [1913].

³⁾ H. [1922], im Druck.

quantitativ unverändert, und zwar auch ohne daß Elution erfolgt¹). In gewissen Schwermetallsalz-Fällungen ist hingegen die Invertinwirkung dadurch aufgehoben, daß die aktive Gruppe durch chemische Reaktion inaktiviert wird²). Zwischen diesen Typen der Enzymadsorbate stehen Assoziationen des Enzyms, die den Umsatz an der wirksamen Gruppe in Mitleidenschaft zu ziehen, zu hemmen vermögen. Auf diese Art verursachen gewisse, dem Invertin in chemischer Hinsicht am nächsten verwandte Stoffe die wechselnde Affinität der Saccharase zum Rohrzucker, und dadurch ist es bedingt, daß man nicht Invertin von verschiedener Herkunft mit der Zeitwert-Bestimmung seiner Menge nach vergleichen kann.

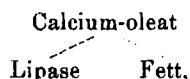
Verschieden vom Invertin verhalten sich die lipatischen Enzyme, z. B. die Pankreas-Lipase. Von allen möglichen enzymatischen Wirkungen scheint nämlich am wenigsten die lipatische im bestimmten Verhältnis zur Stoffmenge des Katalysators zu stehen, das Quantum des Enzyms durch die spezifische Wirkung bestimbar zu sein. Es wird angegeben, daß seine Wirkung von Begleitstoffen beeinflußt, von Aktivatoren gesteigert wird, von der Viscosität und Emulgierung abhängt. Vielfach wird wegen der Unentbehrlichkeit der aktivierenden Zusätze nicht fertige Lipase, sondern eine Vorstufe, Lipase-Zymogen, als Bestandteil des pankreatischen Saftes angenommen. Obwohl sich zu den bekannten Erfahrungen über die Einflüsse der Begleitstoffe und der Verteilung auf die Lipase noch neue gesellen, führt eine Untersuchung, die ich gemeinsam mit den HHrn. E. Waldschmidt-Leitz und F. Memmen ausgeführt habe³), zu dem Ergebnis, daß die Lipase ihrer stofflichen Menge nach von der Pankreasdrüse bis zur 300-fachen Konzentration in den reinsten Präparaten verfolgt werden kann, was auch die jeweils vorhandenen Begleitstoffe seien und die jeweilige Verteilung. Die Quantität der Lipase in irgend einem Zustand ist eine bestimmte, und sie läßt sich bestimmen ohne Rücksicht auf die Wirkung, welche die Lipase in dem gegebenen Zustand ausübt. Sie wird nämlich durch die Wirkung gemessen, die sie unter bestimmten Umständen auszuüben vermag. Der auf-

¹) R. Willstätter und R. Kuhn, H. 116, 53 [1921] u. zwar S. 59 u. 128, 1 [1922] u. zwar S. 52. Ferner J. M. Nelson und D. J. Hitchcock, Am. Soc. 43, 1956 [1921].

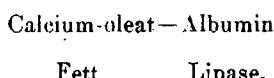
²) vergl. H. von Euler und O. Svanberg, H. 114, 137 [1921] und R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn, H. 123, 1 [1922] und zwar S. 15.

³) H. [1922], im Druck.

fallende Unterschied zwischen dem Verhalten von Saccharase und Lipase ist ein Unterschied zwischen den Systemen Saccharose-Saccharase und Fett-Lipase. Die Pankreas-Lipase, die sich in Wasser löst, ist, um in Funktion zu treten, auf Einstellung eines gewissen Adsorptionszustandes angewiesen, dessen Verbesserung und dessen Störung für den enzymatischen Wirkungsgrad maßgebend ist. Die Wasserstoff-ionen-Konzentration ist in diesem Falle nur einer von vielen, die Wirkung bestimmenden Faktoren. Das Zufällige und Wechselnde im enzymatischen System wird überwunden, Unterschiede im Wirkungsvermögen werden ausgeglichen, indem man die Lipase entweder bei alkalisch beginnender, sauer endigender Ölspaltung durch Zusammenwirken geeigneter Mengen von Albumin (15 mg in der Bestimmungsprobe) und Calciumchlorid (10 mg) so stark aktiviert, daß die natürlich vorkommenden Aktivatoren keine weitere Steigerung bewirken können, oder dadurch, daß man bei Hydrolyse in saurem Medium die Lipase mit Albumin in entsprechendem Maße hemmt. Die zahlreichen Erscheinungen der Lipase-Aktivierung lassen sich mit der Annahme erklären, daß die Aktivierung auf der Erzeugung von Kolloidteilchen beruht, die zugleich auf Enzym und Substrat adsorbierend wirken (komplexe Adsorbate), z. B.:



und die Kombinationswirkung mehrerer Aktivatoren erklärt sich durch die Annahme, daß sie auf einander chemisch oder mit Adsorptionskräften einwirken und sich zu einem Kolloid von gesteigertem, für die Beziehung zwischen Enzym und Substrat noch günstigerem Adsorptionsvermögen verbinden (gekoppelte Adsorbenzien), z. B.:



Ein derartiger Ausgleich, den die Abhängigkeit der Enzymwirkung von den Fremdkörpern nötig macht, ist bei den die Pankreas-Lipase begleitenden Enzymen, Amylase und Trypsin, viel einfacher. Da die Amylase auf Chlor-Ion, Trypsin auf Calcium-Ion angewiesen ist, beruht ihre quantitative Bestimmung bei verschiedenem Reinheitsgrad auf ausgleichender Aktivierung, für Amylase mit Chlorwasserstoff (1 ccm "/_5 in der Bestimmungsprobe), für Trypsin mit Calciumchlorid (40 mg in der Probe).

Zur Kolloidnatur der Enzyme.

Die Kolloidnatur, die durch sie bedingte Abhängigkeit in den physikalischen und chemischen Eigenschaften, im Wirkungsgrade und in der Empfindlichkeit ist scharf abgestuft vom Invertin zur Pankreas-Lipase und zur pflanzlichen Lipase. Für das Invertin bestimmt der Kolloidzustand nicht, wie es wirkt, sondern er hat nur Einfluß darauf, ob es wirksam bleibt. Dieses Enzym besitzt, wenn es von analytisch nachweisbaren Beimischungen befreit ist, die Empfindlichkeit eines an elektrischen Ladungen sehr armen Kolloides. Verlust der Kolloidnatur und Auslöschung der aktiven Enzymgruppe scheinen zusammenzuhängen und sich gegenseitig zu bedingen. Die Zerstörung des Invertins im Zustand der gereinigten Lösungen wird daher als Vernichtung seiner aktiven Gruppe zu betrachten sein, womit der Verlust der Beständigkeit des Soles bedingenden Aufladung Hand in Hand geht. Dagegen ist die Pankreas-Lipase in der Wirkung, die sie jeweils ausübt, von jeder Beeinflussung des kolloiden Systems, in das sie eingebettet ist, abhängig. Die Angaben der Literatur über die Löslichkeitsverhältnisse dieses Enzyms sind unzutreffend oder ungenau. Es ist leicht löslich in Wasser und in Glycerin und sehr haltbar in Glycerinlösung. Das Sekret der Pankreasdrüse findet am Reaktionsorte, im Darme, die zu seiner Aktivierung dienenden Stoffe, Proteine und Galle, die das zweckmäßige Kolloid-System vervollständigen. Die Lipase der Pflanzensamen¹⁾ dagegen, ein wahres intracelluläres Enzym, ist unlöslich und sogar höchst unbeständig gegen Wasser, Elektrolytlösungen und Glycerin. Ihre Wirkung unterliegt keiner Aktivierung. Während der Keimung des Samens wird sie nicht mobilisiert, da die Glyceride in der Zelle dem Enzym dargeboten werden; sie unterliegt aber einer eigentümlichen Veränderung, die man auch künstlich durch Behandlung mit Pepsin erzielen kann. Erst nach dieser Veränderung ist die Lipase imstande, bei neutraler Reaktion Glyceride zu spalten. Ihre Empfindlichkeit ist vermindert, wenn auch das Enzym immerhin noch viel leichter denaturiert wird als Pankreas-Lipase. Die Salnen-Lipase ist entweder durch Adsorption an einen unlöslichen Träger aus der Proteingruppe verankert und wird durch eine beginnende Hydrolyse derselben (Keimung, Pepsinwirkung) in ihrem gesamten Verhalten beeinflußt, oder die Proteinsubstanz ist der kolloide Träger der lipatisch aktiven Gruppe als ein Bestandteil des Lipase-Moleküles selbst.

¹⁾ Aus einer unveröffentlichten Untersuchung über Ricinus-Lipase von R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz.

Bedeutung der Adsorptionsmethoden für die Isolierung.

Für ihre Isolierung aus den Mischungen mit großen Mengen fremder Stoffe, namentlich von Proteinen, Kohlehydraten und Salzen, bieten die Enzyme, soviel man weiß, keine Angriffspunkte für chemische Mittel. Vom Reaktionsvermögen ihrer spezifisch-aktiven Gruppe abgesehen, sind sie chemisch indifferente Stoffe. Es kommt zwar häufig vor, daß sie in Fällungsreaktionen abgeschieden werden, z. B. Invertin durch essigsäures Blei oder Uranylacetat, aber die Enzyme sind im allgemeinen nur von den Fällungen adsorbiert¹⁾. Da die Niederschlagsbildung nicht dem Enzym selbst, sondern den Begleitstoffen zuzuschreiben ist, so hängt sie von der wechselnden, mehr zufälligen Beschaffenheit der Enzym-haltigen Lösung zu sehr ab. Dazu kommt, die Isolierung erschwerend, das für die Abtrennung der Fremdkörper ungünstige Löslichkeitsverhalten der Enzyme, die in vielen organischen Solvenzien, namentlich in den mit Wasser nicht mischbaren, unlöslich sind.

Es gibt daher nur eine einzige allgemeine Methode für die Isolierung der Enzyme, die Anwendung der auf kleinen Affinitätsbeträgen, auf Affinitätsresten beruhenden Adsorptionsvorgänge. Sie ist anpassungs- und Entwicklungsfähig und vielfältig, wie es die Natur der Adsorptionserscheinungen selbst ist. In den ersten, genauer untersuchten Anwendungen dieser Methode sind einige wesentlich verschiedene Enzyme auf hohen Reinheitsgrad gebracht worden, z. B. das Rohrzucker-spaltende (Hefe-Saccharase), ein Fett-spaltendes (Pankreas-Lipase), ein Stärke-spaltendes (Pankreas-Amylase), ein Oxydationsenzym (pflanzliche Peroxydase). Dabei sind drei Aufgaben erkennbar geworden, deren Lösung für unsere Kenntnis der Enzyme entscheidend sein wird.

Eine Aufgabe besteht darin, die Adsorptionen mehr auswählend zu gestalten: Das Adsorbens nimmt im allgemeinen ein Enzym zusammen, mit einer bedeutenden Menge von Fremdkörpern auf, die ihm zum Teil einfach beigemischt, zum anderen Teil mit ihm enger vergesellschaftet sind. Je geringer die erforderliche Menge Adsorbens, desto höher wird der Reinheitsgrad im Adsorbaten sein.

¹⁾ Nur die Fällung der Peroxydase durch Tannin scheint bisher eine Reaktion des Enzyms selbst zu sein (vergl. R. Willstätter und A. Pollinger, III. Abh. über Peroxydase, im Druck).

Vor einer zweiten Aufgabe, Trennung von Enzymen, stellt uns z.B. die Untersuchung des Pankreas. Die Drüse bringt hauptsächlich Fett-, Stärke- und Eiweiß-spaltendes Enzym hervor. Um das Verhalten eines von ihnen kennen zu lernen, genügt es nicht, das Gemisch aus dem Pankreas mit nur einer Wirkung zu beschreiben und danach zu benennen. Richtiger wird man als Voraussetzung für die Untersuchung eines der pankreatischen Enzyme die Abtrennung der begleitenden, nach ihrer Wirkung ganz verschiedenen Enzyme ansehen und die Adsorptionsmethode dafür ausbilden.

Die Steigerung des enzymatischen Reinheitsgrades wird anfangs leicht mit dem Verschwinden der empfindlichen Reaktionen auf Proteine, Purine, Kohlehydrate u. dergl. verfolgt. Dann bietet sich eine dritte Aufgabe, die fast noch ganz ungelöst ist und die bisher nur am Beispiel der Peroxydase mit einem Erfolg in Angriff genommen wurde. Das ist die Abtrennung von enzymatisch Unwirksamem, das sich nicht durch chemische Reaktionen, Farb- oder Fällungsscheinungen verrät. Es ist noch nicht sicher erkannt, wie weit die Adsorptionsmittel unserer Methoden zwischen den aktiven Enzymen einerseits, ihren Vorstufen und ihren Zersetzungspunkten andererseits zu wählen vermögen. Wahrscheinlich sind die in den Kolloideigenschaften dem Enzym nächst verwandten, durch das Fehlen der aktiven spezifischen Gruppe von ihm sich unterscheidenden Umwandlungsprodukte die harähnigsten Begleiter.

Zur Geschichte der Adsorption von Enzymen.

Die erste Untersuchung über Enzym-Adsorption stammt aus dem Jahre 1861; sie wurde von Ernst Brücke in seinen Beiträgen zur Lehre von der Verdauung veröffentlicht¹⁾. Als es gelang, das Pepsin »mechanisch an kleine feste Körper zu binden«, z.B. an Calciumphosphat, Schwefel oder an Cholesterin, schlug Brücke auch sogleich die beiden möglichen Wege ein, um das Enzym aus seinem Adsorbate wieder frei zu legen. Die Fällung von phosphorsaurem Calcium wurde mit Phosphorsäurehaltigem Wasser behandelt, um Pepsin zu eluieren, im anderen Falle der Cholesterin-Niederschlag mit Äther, um das Adsorbens vom Enzym wegzulösen. Dann aber, als die üblichen Eiweißreaktionen in der Pepsinlösung abgeschwächt waren, fehlte es

¹⁾ Sitzungsber. math.-naturw. Klasse d. K. Akad. d. Wiss. Wien 43, 601 [1861].

an einer Kontrolle für die weitere Reinigung. Der Faden, dem Brücke bis dahin gefolgt, war ihm nach seinen Worten in der Hand zerrissen. Hier finden wir von neuem den Faden, indem wir die Steigerung der enzymatischen Konzentrationen bei weiteren Reinigungsprozessen quantitativ verfolgen.

In dem auf Brückes Untersuchung folgenden Jahre erschien aus Kühnes Laboratorium in Berlin eine Arbeit, von A. Danilewsky¹⁾, die grundlegende Bedeutung hätte gewinnen können; aber sie ist unbeachtet geblieben. Danilewsky hat nicht nur die drei physiologischen Reaktionen des Pankreassäftes auf drei spezifische Träger zurückgeführt, er hat auch schon ihre Trennung mit Adsorptionsverfahren angestrebt. Aus einem allerdings lipatisch unwirksamen künstlichen Pankreassafte wurde durch Adsorption mit Kolloidum das Eiweiß-spaltende Enzym frei von Diastase erhalten, aus dem Filtrate durch Ausfällen mit einem Teil von Eiweiß und Eluieren der Fällung durch verdünnten Alkohol die Diastase, allerdings noch trypsinhaltig.

Diese Untersuchung ist bei Kühne sogleich (1863) und nur noch einmal von J. Cohnheim²⁾ fortgesetzt worden. Durch Fällen mit Calciumphosphat und Elution mit Wasser erhielt Cohnheim die Speichel-Diastase frei von Eiweiß-Substanzen, und aus dem Infus des Pankreas gewann er auf dieselbe Weise eine Diastase-Lösung, die er für trypsinfrei hielt. Das Adsorbat von Diastase erschien leichter zerlegbar als das zugleich gebildete von Trypsin.

An einem weiteren Beispiel wurde die Trennung von Enzymen durch Adsorption von O. Hammarsten³⁾ im Jahre 1872 versucht. Als eine Methode, mit der es möglich war, pepsinfreie Chymosinlösungen darzustellen, beschrieb Hammarsten die fraktionierte Fällung mit kohlensaurer Magnesia oder Bleizuckerlösung. In seinen späteren, eingehenden »Studien über Chymosin- und Pepsinwirkung« hat O. Hammarsten⁴⁾ das Prinzip seines Verfahrens der fraktionierten Adsorption nicht mehr aufgenommen. Die Bedeutung der erzielten Trennung erscheint heute in anderem Lichte. Die Chymosinlösung wird nach den Untersuchungen von J. P. Pawlow und S. W. Parastschuk⁵⁾

¹⁾ Virchows Archiv 25, 279 [1862].

²⁾ Virchows Archiv 28, 241 [1863].

³⁾ R. Malys Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Tierchemie 2, Bd. 1, 1872, S. 118 [1874].

⁴⁾ H. 108, 243 [1919] und 121, 240 [1922].

⁵⁾ H. 42, 415 [1904].

und von O. Hammarsten¹⁾ und anderen Forschern nicht frei von Pepsin, sondern von Pepsinwirkung; sie enthält inaktives Pepsin.

Es sind 50 Jahre verflossen, in denen die Enzymforschung nicht an die Angaben über Trennung durch Adsorption angeknüpft hat, und diese sind in der referierenden Literatur in den Hintergrund getreten. Zu der geringen Schätzung und Vernachlässigung mag die ungenügende Entwicklung der quantitativen Bestimmungen beigetragen haben. Die älteren Beobachtungen büßten an Glaubwürdigkeit oder Sicherheit ein, als man auf die Bedeutung der Acidität und auf die Wichtigkeit der Aktivatoren für die enzymatischen Systeme aufmerksam wurde.

Adsorptionsverhalten der Enzyme.

Die Entwicklung der Adsorptionsmethoden gewann einen bedeutenden Antrieb durch die Untersuchungen von L. Michaelis und M. Ehrenreich²⁾ »Über die Adsorptionsanalyse der Fermente«, neben denen die etwa gleichzeitigen »Studien über Katalyse von Fermenten und Kolloiden« von H. Iscovesco³⁾ hervorzuheben sind. Michaelis und Ehrenreich untersuchten die unspezifische Adsorption der Enzyme und zwar die elektrochemische. Durch Anwendung derjenigen Adsorbenzien, die »unter allen Bedingungen entschiedene und einsinnige Ladungen tragen«, wählten Michaelis und Ehrenreich solche Fälle der Adsorption aus, in denen die entgegengesetzte elektrische Ladung von Adsorbens und Adsorbendum maßgebend ist. Dabei wurde festgestellt, »daß alle Substanzen, die durch Kaolin adsorbiert werden können, Basen sein müssen, alle Substanzen, die durch Tonerde adsorbiert werden können, Säuren sein müssen«. Auf Grund dieses Leitsatzes ließ sich die elektrochemische Natur der untersuchten Fermente mit Leichtigkeit feststellen, was ohne quantitative Bestimmung, nur auf Grund von Schätzungen geschah.

»Invertin wird bei allen Reaktionen von Tonerde adsorbiert, bei keiner Reaktion von Kaolin, hat also den Charakter einer Säure.«

»Speichel-Diastase wird unter allen Umständen von Kaolin und Tonerde adsorbiert, ist also ein amphoterer Körper.«

¹⁾ H. 56, 18 [1908].

²⁾ Bio. Z. 10, 283 [1908]; L. Michaelis, Bio. Z. 7, 488 [1907/08] und 12, 26 [1908].

³⁾ Compt. rend. Soc. Biol. 1, 770 und 861 [1907]; Bio. Z. 24, 53 [1909/10].

»Trypsin wird von Kaolin und Tonerde adsorbiert« (nämlich »bei neutraler und saurer Reaktion vollkommen«), »ist also ein amphoterer Körper.«

Diese Befunde gelten indessen nicht für die Enzyme selbst, sondern für ihre Aggregate mit begleitenden Stoffen. Am Beispiel des Invertins ist nämlich von R. Willstätter und F. Racker¹⁾ gezeigt worden, daß es aus reineren Lösungen von Kaolin leicht adsorbiert wird, von R. Willstätter und W. Wassermann²⁾, daß es auch aus rohen Hefe-Autolysaten unter gewissen Bedingungen quantitativ adsorbiert werden kann. Invertin hat also basische und saure Eigenschaften.

Außer dem Adsorptionsverhalten wird von den Begleitstoffen auch die Beständigkeit der Adsorbate bestimmt. Ihre Zerlegung mit chemischen Mitteln gewährt tieferen Einblick in die Zusammensetzung der Enzymadsorbate. Diese können Stoffe enthalten, die beim Eluieren mitwirken oder sie können ihnen fehlen; andererseits können zusammen mit Invertin Stoffe in den Adsorbaten enthalten sein, die das Enzym fester an das Adsorbens binden. Stoffe beider Art kommen in den Adsorbaten wirklich vor. Diese Begleiter werden als Ko-eluenzien und Ko-adsorbenzien bezeichnet.

Die Amylase aus Pankreas, die mit Speichel-Amylase identisch oder nahe verwandt ist, bietet ein dem Invertin entgegengesetztes Beispiel, indem das Enzym die ihm zugeschriebene Adsorbierbarkeit durch Reinigung vollständig verliert. In reinem Zustand wird die Amylase weder aus saurer, noch aus neutraler oder alkalischer Lösung von Aluminiumhydroxyd oder von Kaolin adsorbiert.

Trypsin finden wir schon nach teilweiser, wenn auch unvollkommener Reinigung durch Tonerde aus saurer Lösung gar nicht mehr adsorbierbar, dagegen quantitativ durch Kaolin. Seine basische Natur überwiegt.

Dem Adsorptionsverhalten entspricht die elektrische Überführbarkeit. Die Angabe von L. Michaelis³⁾, daß Invertin rein anodisch wandere, gilt für ein rohes Hefe-Autolysat. Das reinere Invertin wandert schon bei p_H 6 überwiegend kathodisch⁴⁾.

Die Adsorptionsanalyse oder die elektrische Überführung sagt, sofern sie mit sehr unreinen Enzymlösungen ausgeführt wird,

¹⁾ A. 425, 1 und zwar S. 55 [1920/21].

²⁾ H. [1922], im Druck.

³⁾ Bio. Z. 16, 81 [1909].

⁴⁾ R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn, H. 123, 1, und zwar S. 55 u. 73 [1922].

über die Natur eines Fermentes nichts aus, sondern sie läßt nur erkennen, ob in dem aus einem Ferment und seinen jeweiligen Begleitstoffen gebildeten Additions- oder Adsorptionsprodukt die Säure- oder Basennatur überwiegt.

Dieselben Einflüsse machen sich bei der Adsorption von Toxinen, Lysinen und ihren Antikörpern geltend, die in einer sorgfältigen Arbeit von E. Zunz¹⁾ untersucht worden ist. Zunz hat darauf hingewiesen, wie wichtig es sei, mit reinen Adsorbenzien zu arbeiten, da durch Beimischungen die elektrischen Ladungen der Adsorbenzien und der adsorbierten Substanzen modifiziert werden können, und es ist ihm nicht entgangen, daß die Begleitstoffe der immunisierenden Körper, die in weiten Grenzen wechseln, einen veränderlichen Einfluß auf den Charakter der elektrischen Ladung der Toxine, Lysine und ihrer Antikörper ausüben können. Man kann hinzufügen, daß auch die hier vorliegenden Beobachtungen durch den Einfluß der Begleitstoffe noch entstellt sein können.

In einem wertvollen Buche über die Kolloide in der Biologie heißt es: »Aus der vorphysiokchemischen Zeit ist es in der biologischen Chemie vielfach noch üblich, nach den »reinen« chemischen Substanzen zu suchen.« Dies sollte üblich bleiben. Die reinen Substanzen sind für die physikalisch-chemische Untersuchung und für die Lösung physiologischer Fragen unentbehrlich.

Trennung der pankreatischen Enzyme durch Adsorption.

Verschiedene Enzyme zeigen zugleich saure und basische Eigenschaften mit feinen Abstufungen. Darauf läßt sich ihre Trennung durch Adsorption gründen. Sie gelang bei Enzymen, die von einander so erheblich differieren wie die verschiedenen Enzymgruppen angehörenden Komponenten des Pankreasgemisches.

Die Eigenschaften der Pankreas-Lipase entsprechen dem Umstand, daß sie in ihrem Reaktionssystem von unspezifischen Adsorptionsverhältnissen stark beeinflußt wird. Sie ist sehr leicht adsorbierbar und in dieser Beziehung von Begleitstoffen wenig abhängig. Sie wird von elektropositiven Adsorbenzien, wie Tonerde, und auch von elektronegativen, wie Kaolin, adsorbiert und läßt sich durch alkalische Phosphatlösung (2 $\frac{1}{3}$ -bas. Ammoniumphosphat), am besten glycerinhaltige, eluieren. Ihre sauren Eigen-

¹⁾ Z. f. Immunitätsforschung 19, 326 [1913]; C. 1913, II 1997.

schaften sind viel stärker ausgeprägt als die von Amylase und von Trypsin. Daher kann die Lipase von den begleitenden Enzymen mit Hilfe der Tonerde quantitativ getrennt werden¹⁾. Die Trennung ist nur dadurch erschwert, daß den beiden anderen Enzymen durch ihre Begleitstoffe (Ko-adsorbenzien) Adsorptionseigenschaften verliehen werden, die sie an sich nicht besitzen. Die Ko-adsorbenzien halten aber auch die begleitenden Enzyme im Adsorbat mehr zurück, wenn die Lipase eluiert wird; dies unterstützt die Trennung. Während das Tonerde-Adsorbat den größten Teil und die daraus gewonnene Elution beispielsweise $\frac{2}{3}$ der angewandten Lipase enthält, gehen von der Amylase $\frac{1}{4}$ in das Adsorbat, aber nur etwa 3% in die Elution mit, etwas mehr vom Trypsin. Durch nochmalige Adsorption mit Aluminiumhydroxyd aus der angesäuerten Elution und erneute Elution mit ammoniakalischem Phosphat wird die Abtrennung der die Lipase begleitenden Enzyme quantitativ.

Die Pankreas-Amylase hat keine sauren Eigenschaften. In reinerem Zustand wird sie aus wässriger Lösung von Aluminiumhydroxyd gar nicht aufgenommen, auch nicht, wenn sie mit Lipase vermischt ist. Der Amylase fehlen andererseits auch die basischen Eigenschaften. Hierauf beruht ihre Trennung vom Trypsin, dessen basische Eigenschaften ausgeprägt sind. Bei wiederholtem Behandeln in saurer Lösung mit Kaolin wird die Amylase von Trypsin befreit, wenn auch nicht ohne erheblichen Verlust. Auch hier spielen nämlich die Ko-adsorbenzien eine große Rolle. Bei der ersten Einwirkung von Kaolin führen sie einen Teil, z. B. $\frac{1}{4}$, der Amylase in das Adsorbat mit über und wirken zugleich adsorptionshemmend auf Trypsin. Dabei erschöpft sich der Gehalt der Enzymlösung an diesen Begleitstoffen, so daß bei einer zweiten Behandlung mit Kaolin nur noch sehr wenig von Amylase, aber alles Trypsin durch das Adsorbens aufgenommen wird. Aus diesem kann dann Trypsin in viel reinerem Zustand eluiert werden.

Das wahre Adsorptionsverhalten der Amylase, die gegen elektropositive und elektronegative Adsorbenzien indifferent ist, wird erst in höherem Reinheitsgrade erkennbar. Das Enzym läßt sich zunächst aus der neutralen Lösung, wenn sie 50% Alkohol enthält, durch Tonerde adsorbieren. Aber die daraus freigelöste Amylase ist nicht mehr oder nur noch zum kleinen Teile unter

¹⁾ R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, Über Pankreas-Lipase, im Druck (H.); Die Angaben über Amylase sind einer gemeinsam mit Hrn. A. R. F. Hesse ausgeführten, unveröffentlichten Untersuchung entnommen.

denselben Verhältnissen adsorbierbar durch Tonerde, natürlich gar nicht aus wäßrigem Medium. Durch den Zusatz des Alkohols wird wahrscheinlich der saure Charakter der mit der Amylase assoziierten amphoteren Stoffe entwickelt, wie es bei Amino-säuren und Peptiden gefunden wurde¹⁾.

Von den drei Pankreas-Enzymen hat die Lipase die stärksten sauren, Trypsin die stärksten basischen Eigenschaften.

Steigerung des Reinheitsgrades durch Adsorption.

a) Wechsel im Adsorptionsmittel.

Wenn man ein Enzym nach dem geschilderten Adsorptionsverfahren auf höhere Reinheitsstufe zu heben sucht, so wird der Erfolg dadurch beschränkt, daß das Adsorbens zugleich auch eine bedeutende Menge von enzymatisch indifferenten Stoffen an sich zieht, die wohl gleichfalls in der Hauptmenge ihm entgegengesetzte elektrische Ladung tragen. Die Konzentration der zwei Male mit Tonerde gereinigten Pankreas-Lipase ist nur 30-mal größer als in der getrockneten Drüse. Die Konzentration des mit Tonerde gereinigten Invertins beträgt beispielsweise nur das Hundertfache von derjenigen in der Hefe. In diesem Zustand besteht das Invertin noch zu etwa 65—75% aus Hefegummi. Von diesem Punkte an führt der Wechsel in der elektrischen Polarität des Adsorptionsmittels weiter. Wenn nach dem elektropositiven ein elektronegatives Adsorbens angewandt wird, so gelingt die Abtrennung der noch mitgeführten Fremdkörper, vor allem elektronegativer.

Invertin, das unter den bisher üblichen Bedingungen aus Hefe-Autolysaten von Kaolin nicht aufgenommen wird, läßt sich aus der reineren Lösung glatt adsorbieren, während der Hefegummi in seiner ganzen Menge in der Mutterlauge zurückbleibt. Für die Steigerung der Enzymkonzentration ist diese Trennung von großer Bedeutung, der Reinheitsgrad des Invertins steigt beim Eluieren des Kaolin-Adsorbates mit sehr verdünntem Alkali, z. B. auf das 500-fache der Konzentration, die es in der Hefe aufweist.

Auch bei der Lipase hat der Übergang vom elektropositiven zum elektronegativen Adsorbens Erfolg. Die mit Tonerde gereinigte Lipase wird, einmal mit Kaolin adsorbiert und daraus wieder eluiert, achtfach konzentrierter, d. i. etwa 250-mal konzentrierter als in der getrockneten Pankreasdrüse.

¹⁾ R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, B. 54, 2988 [1921].

Noch etwas weiter führt dann die Adsorption mit indifferenten organischen Mitteln, Cholesterin oder Tristearin. Diese Adsorbenzien wirken hier noch strenger auswählend als Kaolin und Aluminiumhydroxyd. Es dürfte anzunehmen sein, daß die Adsorption, z. B. durch Cholesterin, eine der spezifischen Adsorption verwandte, eine chemische Adsorption ist, nämlich eine auf Partialaffinität beruhende Erscheinung, verschieden von mechanischer und von polarer Adsorption. Diese Auffassung wird dadurch gestützt, daß in den Tristearin- und Cholesterin-Adsorbaten die Lipase nur sehr schwach wirksam ist. Ihre aktive Gruppe ist zum Unterschiede von nur mäßigen Abschwächungen in Lipase-Tonerde- und Lipase-Kaolin-Adsorbaten wesentlich in Mitleidenschaft gezogen, ihre Affinität durch eine Störung der Reaktionssphäre bedeutend vermindert. Für die Kenntnis dieser Art von Adsorbaten und für ihre praktische Anwendung ist es wichtig, daß die Lipase darin unversehrt enthalten ist. Es ist nämlich gelungen, das Enzym wirksam daraus zu eluieren.

Die Anwendung von Cholesterin oder Tristearin hat noch einen weiteren Sinn. Für die Bestimmung der erreichten enzymatischen Konzentration ist es nötig, die Lipaselösung durch Dialyse von ihrem Gehalt an Glycerin und Elektrolyten zu befreien. Dabei büßt aber das Enzym seine Wirkung gänzlich ein. Ein Verfahren ist darum erwünscht, das Enzym noch aktiv aus der glycerinhaltigen wässrigen Lösung zu isolieren und so den Reinheitsgrad auf einem von der Dialyse unabhängigen Wege zu kontrollieren. Die enzymatische Konzentration der Lipase steigt nach den vorangegangenen Tonerde- und Kaolin-Reinigungen noch etwas an, aber nicht mehr bedeutend.

b) Adsorption bei großer Verdünnung.

Für den Reinheitsgrad der Präparate ist die Anwendung möglichst geringer Mengen der Adsorbenzien entscheidend. Ein zweiter Weg, den enzymatischen Reinheitsgrad zu erhöhen, wird eingeschlagen, indem man die Adsorptionswirkung der Adsorbenzien steigert und mehr auswählend gestaltet.

Es ist dafür nötig, in jedem einzelnen Falle die geeigneten Präparate der Adsorptionsmittel auszuwählen. Zu diesem Zweck habe ich gemeinsam mit Hrn. H. Kraut¹⁾ eine Untersuchung über Aluminiumhydroxyd in Angriff genommen. Sein Adsorptionsvermögen ist von der Darstellungsweise in be-

¹⁾ Noch unveröffentlicht.

trächtlichem Maße abhängig. Auch ist das Verhalten einer Sorte Aluminiumhydroxyd gegen verschiedene Enzyme ungleich. Das Tonerdepräparat von größtem Adsorptionsvermögen für Invertin hat nicht zugleich für Lipase das größte. Die Darstellung der Tonerde war differierend hinsichtlich der Hydroxyl-ionen-Konzentration bei der Ausfällung aus Aluminiumsalz und der Dauer des Erhitzen nach der Fällung:

Tonerde A, mit überschüssigem konz. Ammoniak gefällt und lange erhitzt, plastisch;

Tonerde B, ebenso gefällt, nicht weiter erhitzt, plastisch;

Tonerde C, in großer Verdünnung gefällt, feinkörnig pulverig.

Um die Unterschiede im Adsorptionsverhalten dieser Präparate zu erklären, genügt die Annahme nicht, daß Aluminiumoxyd oder ein niedriges Hydrat vorliegt, das in verschiedenem Maße mit kolloid gebundenem (adsorbiertem) Wasser beladen ist. Auch die chemischen Reaktionen:

| | 1 proz. Natronlauge | 1-proz. HCl | 15-proz. HCl |
|------------|------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Präparat A | unlöslich | spurenweise löslich | beim Erwärmen nur teilweise löslich |
| Präparat B | leicht löslich | kolloid löslich | beim Erwärmen löslich |
| Präparat C | unlöslich | spurenweise löslich | beim Erwärmen löslich |

und das Verhalten bei der Trocknung machen es wahrscheinlicher, daß eine größere Zahl von bestimmten Hydraten, also Poly-aluminiumhydroxyden, vorliegt.

Beim Trocknen in einem Luftstrom von konstanter Geschwindigkeit, der bei 20° mit Wasserdampf gesättigt ist und dessen Temperatur 10-Grad-weise gesteigert wird, ergeben sich nämlich gewisse Haltepunkte, z. B. für Aluminiumhydroxyd A bei 100, 110, 120, 130, 140° der für $8\text{Al(OH)}_3 - 7\text{H}_2\text{O}$ berechnete Wassergehalt; derjenige des Präparates B stimmt bei 120, 130, 140, 150° für $4\text{Al(OH)}_3 - 3\text{H}_2\text{O}$.

Noch viel größer ist nach den mit Hrn. H. Kraut ausgeführten Versuchen der Einfluß der Verdünnung. Es zeigt sich, daß die Tonerde das Invertin bei großer Verdünnung seiner unreinen Lösung viel mehr auswählend adsorbiert, daß ihr Adsorptionsvermögen für Invertin ein vielfach größeres wird. Es wird also nicht in Übereinstimmung mit vielen bisherigen Erfahrungen von einer gegebenen Menge Adsorbens aus schwächerer Lösung nur verhältnismäßig mehr Substanz aufgenommen als aus konzentrier-

ter, sondern die absolute Menge adsorbierten Enzyms steigt mit der Verdünnung der Lösung, und die Adsorption gestaltet sich beim Verdünnen der Lösung, z. B. des Hefe-Autolysates, in höherem Maße selektiv für Invertin als für irgend ein begleitendes Protein, eine Nucleinsubstanz oder ein anderes Protoplasma-Zerfallsprodukt in der Lösung. Das Verhalten ist offenbar bedingt von den überaus entwickelten Adsorptionsaffinitäten des Enzyms. Und es tritt dann in Erscheinung, wenn bei starkem Verdünnen mit Wasser und noch mehr bei Gegenwart von Säure der Einfluß der Enzym-Begleitstoffe abgeschwächt wird infolge hydrolytischen Zerfalls gebildeter Assoziationsprodukte. Diese Erscheinung ist keine allgemeine, bei Peroxydase wird nur für die Adsorption mit Kaolin, nicht mit Tonerde Analoges beobachtet, bei der Lipase sind die Bedingungen noch nicht gefunden, unter denen das beim Invertin Beobachtete eintritt.

Auch beim Invertin beschränkt sich die auswählende und gesteigerte Adsorption bei großer Verdünnung auf Lösungen, die ganz besonderen Bedingungen genügen; sie wird erst deutlich nach dem Altern der Autolysate. Die bei längerem Stehen der Hefeauszüge erfolgenden Abbauvorgänge greifen die mit dem Enzym vergesellschafteten Inhaltsstoffe der Hefe an; dabei wird das Verhalten der Enzylösung gegenüber den Adsorbenzien gänzlich verändert.

Ein schönes Beispiel für die Änderung bietet das Verhalten der Hefe-Autolysate gegen Bleiacetat. Es ist üblich, durch Fällung mit diesem Reagens Eiweißstoffe zu beseitigen, und dies gelingt oft ohne Verlust an Enzym. Hingegen fällt aus gealterten Autolysaten mit dem Bleiacetat-Niederschlag, von ihm adsorbiert, die ganze Menge des Invertins aus. Durch fortschreitenden Abbau der in den Autolysensaften enthaltenen komplizierten Verbindungen entstehen erst die für die Fällung des Invertins verantwortlichen Stoffe wie z. B. Nucleinsäuren aus Nucleoproteiden. Auf dieser Fällbarkeit mit dem Bleiniederschlag beruht eine Methode¹⁾, Invertin zu isolieren, die zu Präparaten von hohem Reinheitsgrad geführt hat.

Dieses Altern der Autolysate ist eine der Voraussetzungen für die Steigerung des Adsorptionsvermögens und der selektiven Wirkung, sei es von Aluminiumhydroxyd oder von Kaolin. Die beobachteten Unterschiede im Invertin-Adsorptions-

¹⁾ R. Willstätter, J. Graser und R. Kuhn, III. Abhandl. zur Kenntn. d. Invertins, II. 123, 1 [1922].

wert desselben Aluminiumhydroxyds für dasselbe Autolysat entsprechen dem Verhältnis 90:1. Darauf gründen sich einfache Verfahren¹⁾ der Isolierung des Enzyms mit wenig Aluminiumhydroxyd und noch besser mit wenig Kaolin. Es gelingt, mit einem Bruchteil derjenigen Kaolinmenge, die empfohlen wird, um Eiweiß aus den Hefe-Autolysaten zu entfernen, bei geeigneter Acidität ($^{1/20}$ -Essigsäure) und Verdünnung (20- bis 40-fach) alles Invertin zu adsorbieren. Die Elution aus diesem Adsorbate mit sehr verdünntem Ammoniak liefert ohne weiteres Invertin von noch höherem Reinheitsgrad (Zeitwert 0.48—0.60) als der lange Weg der Reinigung nach Willstätter und Racker durch Vorbehandlung mit Kaolin, Adsorption mit Tonerde, Ausfällung aus der Elution und erneute Adsorption mit Kaolin.

Die Enzympräparate.

Das Ergebnis, zu dem die beschriebenen Methoden führen, ist die Abtrennung der Fremdkörper aus den bekannten Klassen organischer Verbindungen. Damit sind Steigerungen der enzymatischen Reinheitsgrade verbunden, die über die früher erreichten Enzym-Konzentrationen weit hinausführen. Manche Enzyme, diejenigen von geringer Spezifität wie das Fett-, und Ester-spaltende Pankreas-Enzym, sind wahrscheinlich enzymatisch homogen erhalten, ein anderes, das Rohrzucker-spaltende Hefe-Enzym, das zu einer Gruppe von ausgeprägter Spezifität gehört, liegt in Form eines Gemisches mit mehreren, Kohlehydrate und Glucoside spaltenden Enzymen vor.

Die Pankreas-Lipase ist auf das 300-fache der Konzentration gebracht (Lipase-Wert²⁾ 240), die in der entfetteten und entwässerten Drüse gegeben ist, die Pankreas-Amylase auf das 200-fache gesteigert worden. Sie zeigen keine (Amylase fast keine) Kohlehydrat- und keine Eiweiß-Reaktionen mehr. Die Amylase ist etwa 100-mal wirksamer als ein von H. von Euler und O. Svanberg³⁾ beschriebenes Präparat von Malz-Amylase, 16-mal

¹⁾ R. Willstätter und W. Wassermann, IV. Abhandl. zur Kenntn. d. Invertins, H. [1922], im Druck.

²⁾ Die enzymatische Konzentration der Lipase wird durch den »Lipase-Wert« ausgedrückt, d. i. die Anzahl von Lipase-Einheiten in 1 cg der Substanz; die zugrunde liegende »Lipase-Einheit« ist die Menge Enzym, die erforderlich ist, um unter genau bestimmten Bedingungen in 1 Stde. 24% von 2.5 g Olivenöl zu spalten. Von zwei getrockneten Pankreas-Proben enthielt je 1 cg 1 Lipase-Einheit und 0.8 Lipase-Einheiten.

³⁾ H. 118, 193 [1921].

konzentrierter als das beste Pankreas-Präparat von H. C. Sherman und M. D. Schlesinger¹⁾.

Die Hefe-Saccharase, deren Konzentration das 1600- bis 1700-fache des in Form der Hefe selbst gemessenen Enzyms ist und durch den Zeitwert 0.2 gemäß den Bedingungen von C. O'Sullivan und F. W. Tompson und H. von Euler ausgedrückt wird, ist frei von Proteinen und Kohlehydraten erhalten. Der Phosphorgehalt, der in weniger reinen Präparaten ansehnlich war, ist auf 0.006% herabgedrückt. Die Vorstellung²⁾, daß das Enzym eine Phosphorverbindung sei und zahlreiche Nucleinsäuregruppen enthalte, läßt sich nicht mehr aufrecht halten, ebenso wenig wie irgend eine andere von den vorläufigen Vorstellungen, die über die Zusammensetzung von Enzymen geäußert worden sind.

Würde man irgend eine der reineren Enzimlösungen mit einer anderen vertauschen, so könnte dies bis jetzt nur mittels der spezifischen Reaktion analytisch erkannt werden und gar nicht mehr nach dem Erhitzen der Lösungen. Eine Ausnahme bildet die pflanzliche Peroxydase, denn wir finden sie in konzentrierterem Zustand farbig, hell röthlichbraun, ähnlich wie Lösungen von Porphyrinen aus dem Blutfarbstoff oder aus Chlorophyll.

Auch hinsichtlich der Peroxydase sind durch die Reinigung nach den Adsorptionsverfahren die ersten Angaben über die Zusammensetzung, die freilich nur mit dem Vorbehalt gemacht waren, daß sie die erreichte Reinheitsstufe kennzeichnen sollten, weit überholt. In der ersten Arbeit über pflanzliche Peroxydase hatten Willstätter und Stoll³⁾ die erzielte Enzym-Konzentration durch die »Purpurogallin-Zahl« 670 ausgedrückt, d. h. 1 mg Enzym hat unter den gewählten (nicht entfernt optimalen Bedingungen) in 5 Min. 670 mg Purpurogallin gebildet. Jene Präparate enthielten Zuckergruppen. Auch wiesen sie einen bedeutenden, mit der Wirkung anscheinend proportional gehenden Eisengehalt (0.46%) auf. In einer unveröffentlichten Arbeit, die Hr. A. Pollinger mit mir ausgeführt, ist die enzymatische Konzentration der Peroxydase durch Adsorptionsverfahren zur Purpurogallin-Zahl 3100⁴⁾ gesteigert worden. Schon bei einem halb so

¹⁾ Am. Soc. 37, 1305 [1915].

²⁾ H. von Euler und O. Svanberg, H. 112, 282 [1921].

³⁾ A. 416, 21 [1917/18].

⁴⁾ Diese Zahl gilt für ein trocken isoliertes Präparat nach dem Wiederauflösen.

günstigen Reinheitsgrad war keine Spur von Kohlehydrat, frei oder gebunden, mehr nachweisbar. Bei der weiteren Reinigung ist auch die eisenhaltige Substanz zum großen Teil abgetrennt worden, so daß das im Verhältnis zu dem früheren fast 5-fach konzentriertere Präparat einen 7-mal geringeren Eisengehalt aufweist, nämlich 0.06 %. Für die Konstitution und die Farbe der Peroxydase ist also das Eisen belanglos.

Diese Ergebnisse bedeuten eine Vorbereitung des Weges zu reinen Stoffen. Untersuchungen über die Konstitution der Enzyme sind noch nicht begonnen. Wirft man zum Vergleich einen Blick auf die bekannten Naturprodukte von nicht eben geringer Molekulargröße, so findet man unsere Kenntnis entweder wie bei Alizarin, Indigo, Terpenen, Kautschuk, auf Oxydation und Desoxydation beruhend, oder in anderen Fällen auf Hydrolyse gegründet, z.B. bei Stärke, Cellulose, Gerbstoffen, Eiweißstoffen. Bei der Anwendung dieser Methoden auf Enzyme lassen sich einige Schwierigkeiten vorhersehen. Von Fremdkörpern befreit und enzymatisch homogen, stehen sie nur in geringen Mengen zur Verfügung. Ihre spezifischen Gruppen sind so empfindlich, daß jeder Eingriff in den molekularen Bau sie zerstören wird, wie es auch das Schicksal gewisser empfindlicher Gruppen der Eiweißstoffe bei jeglichem Abbau zu sein scheint.

Die Enzyme werden mit den Toxinen und deren Antikörpern zu einer besonderen, großen Klasse von Stoffen zu vereinigen sein, mit deren Ausdehnung und Abstufung sich nur die Eiweißstoffe vergleichen lassen. Das Eigentümliche dieser Klasse ist die Entwicklung und Spezifizierung der Partialaffinität. Darauf sind wohl ihre Wirkungen zurückzuführen, und darauf ist die Methodik für ihre Isolierung zu gründen.