

1. Richard Willstätter: Über Fortschritte in der Enzym-Isolierung.

(Vorgetragen in der Sitzung am 16. November 1925; eingegangen am 23. November 1925.)

Nach den Erfahrungen, die in den letzten Jahren gesammelt wurden, liegen den enzymatischen Wirkungen nicht besondere Dispersitätsverhältnisse beliebiger Stoffe zugrunde, sondern bestimmte organische Verbindungen von unbekannter Konstitution. Man vermag die Enzyme noch nicht in reinem Zustand kennen zu lernen, und es erscheint verfrüht, Untersuchungen über ihre Formeln und Strukturen in Angriff zu nehmen. Es ist nur möglich gewesen, den Reinheitsgrad der Enzyme so weit zu steigern, daß sich die ersten Fragen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung entscheiden, gewisse Konstitutionsannahmen ausschließen lassen. Das Ergebnis ist, daß die Enzyme nicht zu den Proteinen oder Kohlehydraten, überhaupt nicht zu den bekannten großen Gruppen der komplizierteren organischen Verbindungen zählen.

Die analytischen Untersuchungen hingen davon ab, daß eine Methodik für die Steigerung der enzymatischen Konzentrationen geschaffen wurde, die in den natürlichen Vorkommnissen sehr gering sind. Da sich mit den Enzymen, abgesehen von den Wirkungen auf ihre Substrate und den Beziehungen zu Aktivatoren und zu Hemmungskörpern noch keine chemischen Umwandlungen ausführen ließen, wobei ihr Wirkungsvermögen unversehrt blieb, so ist allein die Adsorptionsmethode, Bildung und Zerlegung von Adsorbaten, für die Isolierung der Enzyme und anderer physiologisch aktiver Stoffe aus Gemischen mit Fremdkörpern und für die Trennung verschiedener Enzyme voneinander entwicklungsfähig gewesen.

Für die präparativen Arbeiten war es das erste Erfordernis, die Mengen und die Konzentrationen der Enzyme zu messen, nämlich sie aus der Bestimmung von Reaktionsgeschwindigkeiten abzuleiten. Da aber der Reaktionsverlauf in vielen Fällen durch Begleitstoffe beeinflußt wird, sogar bei den Wirkungen eines Enzyms auf verschiedene Substrate in verschiedener Weise durch den nämlichen Begleitstoff, so sind diese Messungen noch für jeden Schritt der Isolierung von neuem nachzuprüfen und hinsichtlich ihrer Zulässigkeit und Genauigkeit vorsichtig zu bewerten. Die quantitativen Bestimmungen und Vergleiche der Enzym-Mengen sind oft ungenau und unsicher, aber sie sind unentbehrlich.

Den größten Schwierigkeiten und Abweichungen begegnete man anfangs bei lipatischen Enzymen, deren Wirkungsvermögen von der Verteilung und von den Begleitstoffen in unbestimmbarer Weise abhängig zu sein schien. Diese wechselvollen Einflüsse lassen sich aber zum Beispiel bei pankreatischer Lipase durch ausgleichende Aktivierung oder ausgleichende Hemmung über-

winden¹⁾. Dieser Ausgleich kann indessen nicht auf eine andere Lipase, z. B. Leber-Lipase, übertragen werden, da die Erscheinungen der Aktivierung und der Hemmung ein vollkommen verschiedenes Bild bei Leber- und Pankreas-Enzym geben²⁾. Für dieses gibt es eine Anzahl aktivierend wirkender Zusatzstoffe, welches auch die Substrate sein mögen, hohe oder niedere Glyceride oder Ester einwertiger Alkohole wie Buttersäure-methylester. Diese Aktivatoren, wie Natriumglykocholat, Natrium- und besonders Calciumoleat, versagen beim Leber-Enzym, sie wirken hier sogar hemmend. Beim Vergleich dieser beiden tierischen Esterasen ist auch ihre quantitativ weit differierende Spezifität für Substrate von verschiedener Konstitution zu beachten. Um dieselbe Spaltung wie mit 10 mg entfetteter und getrockneter Pankreasdrüse zu erzielen, sind von getrockneter Leber für die Hydrolyse von Buttersäure-methylester nur 4 mg, von Tributyrin 1000 mg, aber von Olivenöl 106000 mg nötig.

Den Verhältnissen bei den fett- und ester-spaltenden Enzymen entgegengesetzt ist der geringe Einfluß, den Reinheits- und Verteilungszustand bei den Carbohydrasen, namentlich bei der am gründlichsten untersuchten Saccharase ausüben. Die Invertin-Bestimmungen erstrecken sich über ein sehr breites Gebiet enzymatischer Konzentrationen. Es sind nämlich Invertin-Gehalte von Hefen gemessen worden, deren Saccharase-Werte sich zwischen $\frac{1}{25000}$ und $\frac{1}{15}$ bewegen, und von Präparaten bis zum Saccharase-Wert 10. Bei keinem der zahlreichen und verschiedenartigen Schritte der Reinigung kamen Widersprüche vor, die Assoziationen des Enzyms mit Begleitstoffen und seine vielfach veränderten Dispersitätsverhältnisse ließen das enzymatische Wirkungsvermögen annähernd konstant, wenn auch in manchen Fällen Unterschiede in der Reaktionskinetik beobachtet wurden. Abweichend von unseren Erfahrungen beobachteten aber vor kurzem H. v. Euler und I. Lindstål³⁾ beim Erwärmen gereinigter Invertin-Lösungen eintretende Aktivitätssteigerungen, die sie nicht auf Änderungen der Reaktionskinetik zurückführen, sondern als „Übergänge von einem inaktiven in einen aktiven Zustand“ erklären. Solche Fälle vermochten wir nicht zu beobachten.

Die Maltase⁴⁾ verhält sich nur bei der Analyse der Hefen und ihrer Autolysate, sowohl in frischem wie in gealtertem Zustande, der Saccharase ähnlich; sie folgt in diesem Zustand gemäß zahlreichen Proben stets demselben Zeit-Umsatz-Gesetze; aber ihre Reaktionskinetik ändert sich schon beim Übergang in Adsorbate und Elutionen, so daß der Mengenvergleich erschwert wird. Noch eine andere Erscheinung beobachten wir in allen Fällen bei Maltase, aber nie bei Saccharase in Hefe-Autolysaten, die einige Tage in der Kälte stehen: bedeutende Zunahme der Enzym-Wirkung und zwar ohne Änderung des zeitlichen Verlaufes der Maltose-Spaltung. Vielleicht werden dabei reaktionshemmende Begleitstoffe verändert oder abgeschieden.

Von der Bestimmbarkeit dieser biosen-spaltenden Enzyme hängt es ab, welche Rolle ihnen bei der alkoholischen Gärung der zusammengesetzten

¹⁾ R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und F. Memmen, H. 125, 93 [1922/23].

²⁾ R. Willstätter und F. Memmen, H. 138, 216 [1924].

³⁾ Mitgeteilt von H. v. Euler und K. Josephson, H. 145, 130, und zwar S. 135 [1925].

⁴⁾ VI. Mitteilung über Maltase von R. Willstätter und E. Bamann, H. (im Druck).

Zucker zuzuschreiben ist. Nach der allgemein angenommenen Anschauung von E. Fischer und P. Lindner⁵⁾ soll die Vergärung der zusammengesetzten Zucker „immer erst indirekt — d. h. nach primär erfolgter Zerlegung in gärfähige Monosaccharide“ erfolgen. Merkwürdigerweise fehlt⁶⁾ aber viel angewandten Spiritus-Hefen der Praxis eben dasjenige Enzym, dessen Funktion man als Vorbedingung für die Vergärung des Malzzuckers ansah. Es gibt nämlich Brennerei-Hefen, die fast maltase-frei sind, und sie vermögen Maltose in Zeiten zu vergären, in denen die Hydrolyse gar keine Rolle spielt. Gegen diese Annahme der direkten Maltose-Gärung sind von H. v. Euler und K. Josephson⁷⁾ Bedenken geäußert worden. Die Erklärung für die angeführte Erscheinung wird von ihnen in der Unvollkommenheit der Maltase-Bestimmung gesucht; möglicherweise werde die Maltase wie die Enzyme des Zymase-Komplexes durch die bei der Analyse angewandten Zellgifte inaktiviert.

Die Bestimmung der Maltase in den Hefen ist indessen jetzt zu demselben Grade von Sicherheit und Genauigkeit wie die Invertin-Bestimmung vervollkommenet worden. Die Analysen der Hefen nach verschiedenen Verfahren und die der Autolysate ergeben mit einander gut übereinstimmende Maltase-Beträge. Und es hat sich an weiterem Material bestätigt, daß Maltose von Hefen leicht vergoren wird, die praktisch maltase-frei sind. Unsere Schlußfolgerung aus der Maltase-Bestimmung der abgetöteten Hefe auf die Maltase-Wirkung lebender Hefe wird noch durch den Vergleich mit der Saccharase-Wirkung bestätigt. Die zwecks Ausschaltung der Gärung abgetötete Hefe bewirkt genau ebensoviel Biosen-Spaltung wie lebende. Unsere saccharase-reichsten Hefen (S.-W. etwa $\frac{1}{20}$) erlauben, den Vergleich der Invertin-Wirkung in Hefe bei Gegenwart und bei Abwesenheit von Zellgift mit großer Genauigkeit auszuführen. Denn hier kommt die Gärung neben der Spaltung in der Bestimmungszeit gar nicht in Betracht: z. B. Halbgärzeit $2\frac{1}{2}$ Std., Halbspaltungszeit unter den Gärbedingungen 15 Sekunden.

Es ist schwieriger zu ermitteln, ob auch Rohrzucker ohne vorangehende Inversion vergoren werden kann. Denn die üblichen Hefen wirken verhältnismäßig viel stärker auf Rohrzucker als auf Malzzucker. Deshalb streben R. Willstätter und Ch. D. Lowry⁸⁾ an, den Invertin-Gehalt von ober- und untergärenden Hefen auf einen kleinen Bruchteil herabzudrücken, was ohne Schädigung des Gärvermögens beim Behandeln mit 0.15-n. Schwefelsäure oder 0.05-n. Natronlauge gelingt. Der Effekt genügt aber noch nicht, da die invertin-arm gemachten Hefen, deren Saccharase-Werte $\frac{1}{30}$ — $\frac{1}{80}$ der gewöhnlichen betragen, während des Gärverlaufes wieder invertin-reicher werden. Allein es wird bei Vergärung des Rohrzuckers durch sehr invertin-arme Hefen in saurem Medium ($p_H =$ etwa 2) erreicht, daß die Gärung der Inversion vorausseilt. Die Gärung wird nämlich unter diesen Bedingungen um 30—50%, die Invertin-Wirkung auf nur 6—14% herabgesetzt:

	1.	2.	4. Beispiel
Halbspaltungszeit ..	213	465	305 Minuten.
Halbgärzeit	190	323	226 „ .

⁵⁾ B. 28, 984, 3034 [1895]; E. Fischer, H. 25, 60, und zwar S. 72 [1898].

⁶⁾ R. Willstätter und W. Steibelt, H. 115, 211 [1921].

⁷⁾ H. 120, 42 [1922]. ⁸⁾ H. (im Druck).

Die Unterschiede zwischen den Zeiten der Spaltung und der Gärung sind, anders als bei den maltase-armen Hefen, nicht groß. Und es ist noch unbeachtet geblieben, daß im Gärversuch die hemmend wirkende Monose beseitigt wird, also die Invertin-Wirkung größer sein kann, als die Bestimmung anzeigt. Unsere Schlußfolgerung wird aber dadurch gestützt, daß, obwohl die Invertin-Wirkung als Primärvorgang nicht oder kaum mehr ausreicht, dennoch ein beträchtlicher Teil der gebildeten Monosen, vom Rohrzucker verdrängt, die Hefezelle zu verlassen scheint.

Unter den Bedingungen dieser Gärversuche, nämlich im sauren Medium, ist es ein leichtes zu zeigen⁹⁾, daß auch die maltase-reichen Hefen (z. B. Löwenbräu-Hefe) den Malzzucker mit unverminderter Geschwindigkeit vergären, wenn die Maltase durch die für sie ungeeignete Acidität gänzlich außer Funktion gesetzt wird.

Für die Entwicklung der Adsorptionsmethoden war es wohl ein fördernder Umstand, daß die Extrakte aus Drüsen und die Autolysate der Hefe die gesuchten Enzyme in sehr unreinem Zustand enthalten. In unseren ersten Arbeiten über Invertin (Abh. I bis VIII) gelang es, den Reinheitsgrad dieses Enzyms auf das 20-fache der enzymatischen Konzentration zu steigern, die nach den noch weniger auswählenden älteren Verfahren der Fällung durch Alkohol, der Abtrennung von Fremdkörpern durch Bleiacetat und durch Dialyse zu erzielen war. Ein derartiges Invertin-Präparat enthielt außer fremden Stoffen, die von der Auflösung des Hefe-Protoplasmas herrühren, enzymatische und enzym-ähnliche Substanzen, nämlich neben der Saccharase andere polyosen- und glucosid-spaltende und sonstige Enzyme sowie Substanzen, die den aktiven Enzymen am nächsten verwandt sind, nachweislich Zersetzungsprodukte (inaktivierte Enzyme) und wahrscheinlich Vorstufen.

Es bedeutet nun für die Darstellung eines Enzyms, z. B. der Saccharase, eine günstigere Grundlage, wenn es gelingt, im Ausgangsmaterial das Verhältnis ihrer Menge zu den anderen enzym-artigen Substanzen zu verbessern. Diesen Sinn hat unsere Darstellung und Verarbeitung invertin-reicher Hefen. Schon viel früher hatten H. v. Euler und seine Mitarbeiter¹⁰⁾ sowie J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper¹¹⁾ den Enzym-Gehalt der Hefe, die zur Verarbeitung auf Invertin bestimmt war, durch tagelang dauernde und mehrere Male wiederholte intensive Gärung bei hoher Zucker-Konzentration ansehnlich zu steigern vermocht. Die früheren Ergebnisse lassen sich aber durch Gärführung bei niedrigster Zucker-Konzentration schon in kurzer Dauer weit übertreffen¹²⁾, der Erregungszustand bei der limitierten Gärung scheint der Enzym-Neubildung besonders günstig zu sein. Es ist eine merkwürdige Erscheinung, daß die Enzym-Vermehrung ungemein selektiv erfolgt; die Saccharase nimmt sonderbarerweise im enzymatischen Apparat des Pilzes eine Ausnahmestellung ein. Der Invertin-Gehalt der Hefe (S.-W. $\frac{1}{300}$) steigt auf das 10–20-fache (Saccharase-Wert $\frac{1}{20}$ – $\frac{1}{16}$), während andere Enzyme wie Maltase, Trypsin und die Enzyme des Zymase-Komplexes nur geringen oder gar keinen Zuwachs erfahren. Die dadurch bedingte Verschiebung des

⁹⁾ Unveröffentlichte Arbeit von R. Willstätter und E. Bamann.

¹⁰⁾ H. v. Euler und B. af Ugglas, H. 70, 279 [1910/11]; H. v. Euler und H. Cramer, H. 88, 430, 89, 272 [1914]; H. v. Euler und O. Svanberg, H. 106, 201, 107, 269 [1919].

¹¹⁾ Bio. Z. 54, 122 [1913]; 67, 364 [1914].

¹²⁾ R. Willstätter, Ch. D. Lowry und K. Schneider, H. 146, 158 [1925].

Verhältnisses der Saccharase zu anderen Enzymen und sonstigen Inhaltsstoffen der Hefe wird noch durch neue Verfahren der Enzym-Freilegung und -Auflösung gesteigert¹³⁾. Die Freilegung, die auf enzymatischen Vorgängen beruht, nimmt einen günstigeren Verlauf, wenn die Hefe unverdünnt durch Behandlung mit Toluol oder anderen Zellgiften abgetötet und einige Zeit nach der Verflüssigung vom ausgetretenen Saft abgetrennt wird. Diese fraktionierte Autolyse liefert Hefe-Auszüge, deren Saccharase-Konzentration 4—8-mal größer ist als die der angewandten Hefen, während bisher der Übergang vom Pilz in das Autolysat die enzymatische Konzentration nur auf das Doppelte bis höchstens Dreifache gesteigert hatte. Das Freilegungsverfahren läßt sich noch mehr auswählend gestalten¹⁴⁾ durch Neutralisieren und Neutralhalten der verflüssigten Hefe. So gelangen wir zu Hefe-Auszügen, deren Saccharase-Werte (0.5—1) sogar das 10—20-fache von denjenigen der invertinreichsten Hefen betragen. Allein durch Dialyse steigt die Saccharase-Konzentration dieses Ausgangsmaterials auf S.-W. 2.5, das 300—500-fache der Werte früherer ohne Dialyse weiter verarbeiteter Autolysate. Die Enzym-Konzentration in den rohen Invertin-Lösungen ist also viel höher, wenn an Stelle der bis vor kurzem angewandten langsamen Autolyse verdünnter Hefe die rasche Autolyse (Dauer 1 Tag) unverdünnter Hefe und Fraktionierung nach der Verflüssigung tritt, sei es, daß der Prozeß bei Zimmertemperatur oder in der Wärme ausgeführt wird. Der Unterschied mag geringfügig erscheinen, ob die mit dem gleichen oder doppelten Gewicht Wasser verdünnte Hefe der Einwirkung von Toluol oder Essigester unterliegt, oder ob das Zellgift zuerst einige Minuten auf die unverdünnte, immerhin etwa 75% Wasser enthaltende Frisch-Hefe einwirkt. Aber der Unterschied ist von großer Tragweite für den Verlauf des enzymatischen Protoplasma-Abbaus, wovon die Freilegung eines zucker-spaltenden Enzyms ein Teilvorgang ist. Die langsamere Abtötung der verdünnten Hefe ist nicht schonender, sondern sie bewirkt viel weiter gehende Ausleerung der Zelle und stärkeren Abbau der Enzym-Komplexe. Leitet man dagegen die Exomose der Enzyme durch den kräftigeren Eingriff der Abtötung unter Verflüssigung unverdünnter Hefe und Abtrennung des Verflüssigungssaftes ein, so geschieht die Freilegung und Auflösung der Saccharase und Maltase so viel auswählender, daß diese Enzyme mit einem Zwanzigstel bis einem Zehntel der Hefemasse statt mit dem halben Gewicht in Lösung gehen.

Es stand wohl zu erwarten, daß die Adsorptionsmethode aus so gutem Ausgangsmaterial Invertin-Präparate von viel höherer enzymatischer Konzentration herausholen würde, zumal die Methodik selbst viele Fortschritte gemacht hatte. Das Adsorptionsvermögen z. B. des Aluminiumhydroxyds, nämlich die Zahl der von 1 g Al_2O_3 aufgenommenen Enzym-Einheiten, erreichte schon in unserer ersten Arbeit über Invertin dank der Anwendung geeigneter Sorten der Tonerde-Gele und guter Hefe-Autolysate Werte von etwa 0.15. Die Adsorptionwerte sind dann durch Berücksichtigung der für die Adsorption jeweils geeigneten Verdünnung und optimalen Acidität, durch fraktionierte und mehrmals wiederholte Anwendung des Adsorbens und andere methodische Verbesserungen auf mehr als das Tausendfache,

¹³⁾ R. Willstätter, K. Schneider und E. Bamann, H. 147, 248 [1925].

¹⁴⁾ R. Willstätter, K. Schneider und E. Wenzel, XII. Abh. über Invertin, H. (im Druck).

auf A.-W. > 200 gesteigert worden¹⁵⁾. Nun enthält 1 g Al_2O_3 die Saccharase von 12—14 kg frischer Brauerei-Hefe, von 3 bis $3\frac{1}{2}$ kg Trockenhefe. Wenn ein gutes Invertin-Präparat von Tonerde mit diesem Adsorptionswert aufgenommen wird, so hat das von 1 g Adsorbens gebildete Adsorbat das Gewicht von $2\frac{1}{2}$ g.

Für die Vervollkommnung der Adsorptionsmethode war der Gedanke maßgebend, das präparative Verfahren im Zusammenhang mit einer planmäßigen Untersuchung von H. Kraut und E. Wenzel¹⁶⁾ „Über Enzym-Adsorption“ so zu leiten, daß sich das Verhalten des Enzyms gemäß den nach H. Freundlich¹⁷⁾ ermittelten Adsorptionskurven mehr und mehr dem Adsorptionsverhalten eines einheitlichen Stoffes näherte. Dieses Ziel, das die Grenze der Leistungsfähigkeit der Adsorptionsmethode zu bedeuten scheint, wurde wirklich erreicht, allein die Invertin-Präparate waren dann, wie die Analyse ergab, von Einheitlichkeit dennoch weit entfernt. Die gefundene Adsorptionskurve ist eben gar nicht die des Enzyms selbst, sondern die eines enzym-führenden Begleitstoffes, nämlich eines Aggregates, das aus dem Enzym und den ihm nächst verwandten Stoffen zusammen mit adsorptiv verbundenen Begleitstoffen besteht. Die Adsorption hat das Enzym nicht aus den Aggregaten abzutrennen vermocht, worin es mit einem Koadsorbens oder mit mehreren vergesellschaftet war. Bei der Untersuchung innerer Sekrete und für die Serumforschung wird diese Methode zur Steigerung des Reinheitsgrades physiologisch-aktiver Stoffe mit Erfolg anzuwenden sein, aber man wird die Grenzen ihres Leistungsvermögens zu beachten haben.

Soweit irgend ein einzelner Bestandteil solcher Enzym-Aggregate, ein Begleitstoff des Enzyms, chemisch definiert war, standen analytische Kontrollen für die Aufgabe zur Verfügung, durch Wechsel und Anpassung der Reinigungsvornahmen ihn vollständig abzutrennen und als entbehrlich erkennen zu lassen. So ist es bei Peroxydase und bei Pankreas-Lipase, namentlich aber beim Invertin, an dem die präparativen Verfahren am weitesten entwickelt wurden, gelungen, das Enzym von jedem einzelnen analytisch nachweisbaren organischen Begleitstoff zu befreien. Schon in unseren ersten Arbeiten gewannen wir Invertin frei von Kohlehydraten wie Hefegummi, von Proteinen und von Phosphorverbindungen. Eine wichtige Anregung für solche indirekte Analyse des Enzyms gab vor kurzem die Anschauung von H. v. Euler und K. Josephson¹⁸⁾, daß die Saccharase eine protein-ähnliche Substanz sei, deren Aktivität mit einer als „Proteinteil“ bezeichneten Komponente aufs engste zusammenhänge, und die Entdeckung der Stockholmer Forscher, daß das Enzym-Eiweiß von ganz spezifischer Bauart sei, ausgezeichnet durch einen auffallend hohen Gehalt an Tryptophan.

Es hat aber damit dieselbe Bewandnis wie z. B. mit dem der Saccharase oft hartnäckig folgenden Träger der Millon-Reaktion¹⁹⁾, der wohl ein Tyrosin-peptid ist. Unter Neutralisation bereitete frische Autolysate liefern Invertin, das keine Millon-Probe zeigt. Schon ein aus unserer ersten

¹⁵⁾ R. Willstätter und K. Schneider, VIII. Abh. über Invertin, H. 142, 257 [1924/25].

¹⁶⁾ H. 133, 1 [1923/24], 142, 71 [1924/25].

¹⁷⁾ Kapillarchemie, III. Aufl., Leipzig [1923], S. 232 ff.

¹⁸⁾ B. 56, 446, 1097 [1923], 57, 299, 859 [1924]; H. 138, 11, 38 [1924].

¹⁹⁾ vergl. R. Willstätter und K. Schneider, V. Abh. über Invertin, H. 133, 193 [1923/24].

Arbeit stammendes Präparat, das allerdings nach seinem Saccharase-Wert nicht zu den guten zählt, spricht gegen die Unentbehrlichkeit auch des Tryptophans. Es ist frei davon. Auch ein nach dem zuvor erwähnten verbesserten Verfahren dargestelltes Autolysat aus invertin-reicher Hefe enthält nach der Dialyse ohne weitere Reinigung nur 0.25 mg Tryptophan auf 1 S.-E., während in den von H. v. Euler und K. Josephson analysierten besten Saccharase-Präparaten (S.-W. 3.7 und 4.0) auf 1 S.-E. 0.667 und 0.695 mg Tryptophan trafen. Sodann gelang es wiederholt, einmal durch Reinigung mit Bleiacetat, ein anderes Mal durch fraktionierte Adsorption mit Bleiphosphat, die Saccharase von sehr hohen Reinheitsgraden völlig frei von Tryptophan zu erhalten²⁰⁾. Wenn sich aber in irgend einem Präparate das Enzym unter Erhaltung seiner Aktivität von einem bestimmten Begleitstoff abtrennen ließ, so ist dieser als bedeutungslos für die Zusammensetzung des Enzyms erkannt, mag er auch vielleicht auf die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat, auf seine Hemmung durch dessen Spaltungsprodukte von Einfluß sein. Das mit der Saccharase aufs hartnäckigste zusammenhängende tryptophan-haltige Peptid hat auch nicht etwa einen ausgeprägten Einfluß auf die Stabilität des Enzyms. Viele Beobachtungen deuten darauf hin²¹⁾, daß die Saccharase auf eine kolloide Substanz oder mehrere als Schutzstoffe angewiesen ist, die wirklich durch Adsorptionsvorgänge abgetrennt werden können, z. B. mit Bleiphosphat oder Kaolin. Aber weder Hefegummi noch tyrosin- oder tryptophan-haltiges Peptid ist ein spezifischer Schutzstoff.

Die Erwartung, daß die neuen Autolysate von den außerordentlich hohen Saccharase-Werten 0.5—1, in denen das Invertin gegenüber anderer enzymatischer Substanz stark überwiegt, und die vervollkommnete Methodik der Adsorption besonders durch Tonerde reinere Saccharase liefern würde, hat sich nicht erfüllt. Die Darstellung wird nur bequemer. Ohne Mühe kommt man in kurzer Arbeit, schon mit einer einzigen Tonerde-Adsorption, von der Hefe zu Invertin-Präparaten vom S.-W. 5, der im allgemeinen ein Grenzwert ist. Es ist sogar viel leichter gewesen, die enzymatische Konzentration noch etwas weiter, z. B. zu Saccharase-Werten von 7.5 zu steigern mit dem in bezug auf Enzym-Konzentration ungünstigen Ausgangsmaterial, das durch längerdauernde Autolyse und langdauernde Alterung gewonnen war. Dabei erfolgen eben proteolytische Vorgänge, wodurch die natürlichen Enzym-Komplexe in tiefgreifender Weise verändert werden. Die Saccharase wechselt im Laufe dieser Vorgänge ihre Gesellschaft von Begleitstoffen, ihre Komplexe werden kleiner, verlieren aber an Beständigkeit, welche die geschonten, ursprünglichen Enzym-Komplexe auszeichnet.

Bis dahin hat die Adsorptionsmethode nur für die Trennung des Enzyms von den ihm nicht näher verwandten Stoffen hingereicht. Immer bleiben die in den kolloiden Eigenschaften dem Enzym nächst verwandten, durch das Fehlen der aktiven spezifischen Gruppe von ihm sich unterscheidenden Umwandlungsprodukte die hartnäckigsten Begleiter. In dieser Hinsicht und auch in bezug auf die Steigerung der enzymatischen Konzentration

²⁰⁾ VIII. und XII. Abh. über Invertin; vergl. H. v. Euler und K. Josephson, H. 145, 130 [1925].

²¹⁾ vergl. XII. Abh. über Invertin, Abschnitt III, 4, Beständigkeitsverlust nach fraktionierter Adsorption.

finden wir ²²⁾ einen bedeutenden methodischen Fortschritt in einem Verfahren fraktionierter Adsorption an ein Adsorbens, das erst in der Enzym-Lösung erzeugt wird. Durch die teilweise Bildung eines adsorptiv wirksamen Niederschlages von Bleiphosphat lassen sich die z. B. durch Kaolin oder Tonerde gereinigten und nicht weiter zu reinigenden Invertin-Präparate noch auf höhere enzymatische Konzentration bringen. Sie lassen sich derart fraktionieren, daß in den letzten Fraktionen doppelt so hohe Saccharase-Werte erreicht werden. Auch gelingt es mit diesem Verfahren zum ersten Male in sicherer Weise, das Enzym vom Produkte seiner Inaktivierung zu trennen. Wenn Invertin durch Stehen oder beim Erwärmen seiner Lösung eine starke Wirksamkeitseinbuße erlitten hat, so liefert die Fraktionierung mittels des teilweise entstehenden Bleiphosphats eine Restlösung von Invertin mit dem vor dem Aktivitätsverluste gegebenen Saccharase-Werte.

Die in einigen Beispielen erreichten besten Saccharase-Werte sind etwa 10. In diesem Zustand ist das Enzym zwar ungefähr 30-mal reiner als in den besten Präparaten, die vor 5 Jahren bekannt waren, aber es ist noch unrein.

Während es bei der Steigerung der enzymatischen Reinheitsgrade schwierig ist, die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit noch viel weiter hinauszurücken, eröffnet sich der Adsorptionsmethode bei ihrem jetzigen Stande ein großer Anwendungsbereich für die Trennung der Enzyme von solchen Begleitstoffen, die zu ihren eigenen Komplexen gehören, von Hemmungskörpern und Aktivatoren, und für die Auflösung von Enzym-Gemischen, wie sie in Drüsen und Sekreten, in Pilzen, in Pflanzensamen vorkommen. Eines der ersten Beispiele ²³⁾ betraf die Trennung der drei pankreatischen Enzyme, der Lipase, der Amylase und des Trypsins. Jene Untersuchung hat in meinem Laboratorium E. Waldschmidt-Leitz, zum Teil gemeinsam mit A. Harteneck, fortgesetzt, und es ist ihm dabei die Auflösung und die Aufklärung des proteolytischen Systems der Pankreasdrüse geglückt. Zunächst hat E. Waldschmidt-Leitz ²⁴⁾ die Wirkung der Enterokinase auf Trypsin als einen einfachen, spezifischen Aktivierungsvorgang erkannt und mit Hilfe von Aluminiumhydroxyd Enzym und Aktivator auch nach erfolgter Aktivierung wieder zu trennen vermocht. Sogar die Vorstufe des Aktivators, die Prokinase, ließ sich auf dieselbe Weise vom Trypsin abtrennen ²⁵⁾. Darauf ist es gelungen, das pankreatische Proteasen-Gemisch in seine zwei Komponenten zu zerlegen ²⁶⁾. Das Erepsin der Pankreasdrüse verhält sich so, wie wenn seine sauren Eigenschaften stärker ausgeprägt wären, während beim Trypsin die basische Natur zu überwiegen scheint. Die Adsorption durch Tonerde und die Elution der gewonnenen Adsorbate führt bei Verarbeitung angesäuertter Drüsenauszüge in mehrmaliger Wiederholung zu vollständiger Trennung. „In der Restlösung der letzten Adsorptionsvornahmen verbleibt das Trypsin in guter Ausbeute, frei von ereptischer

²²⁾ R. Willstätter, K. Schneider und E. Wenzel, XII. Abh. über Invertin, H. (im Druck), Abschnitt III.

²³⁾ R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, II. Abh. über Pankreas-Enzyme, H. 125, 132 [1922/23].

²⁴⁾ H. 132, 181 [1923/24], 142, 217 [1924/25].

²⁵⁾ E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 149, 221 [1925].

²⁶⁾ E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 147, 286 [1925], 149, 203 [1925].

Wirkung, und die Elutionen der Tonerde-Adsorbate liefern die einheitliche ereptische Komponente.“

Auch zwei analoge Proteasen der Hefe lassen sich nach einer unveröffentlichten Untersuchung von R. Willstätter und W. Graßmann durch Tonerde-Adsorption trennen. In diesem Falle ist es umgekehrt die tryptische Komponente, die aus schwach saurer Lösung leichter adsorbiert wird.

Wären es in den ersten Beispielen solcher Trennung ganz verschiedenartige Enzyme, so erstreckt sich in den angeführten und weiteren Fällen die Anwendung der Methode auf gleichartige, einander nahestehende, bei denen nur geringe Unterschiede im Adsorptionsverhalten zu erwarten waren. Wie Proteasen so lassen sich auch Carbohydrasen voneinander trennen. Eine unveröffentlichte Arbeit von R. Willstätter und E. Bamann behandelt das Beispiel der Hefe-Enzyme Saccharase und Maltase. Es gibt Tonerde-Sorten, die Maltase reichlich, aber Saccharase nur spärlich aus den Autolysaten zu adsorbieren vermögen. Manche Hefe-Autolysate liefern so schon in einem einzigen Vorgang Adsorbate und daraus mit Diammoniumphosphat Elutionen von enzymatisch einheitlicher Maltase, während zugleich die Lösungen der Saccharase mit geringem Verlust von ihrem Gehalt an Maltase befreit werden. Die auswählende Adsorption wird durch eine merkwürdige Methode der auswählenden Elution aus den Enzym-Adsorbaten ergänzt. Durch schwach alkalisches Phosphat wird Maltase wie Saccharase aus Tonerde-Adsorbaten eluiert, auch noch durch Phosphat von $p_H = 6.8$, aber von primärem Phosphat wird fast allein die Saccharase eluiert und zwar vollständig, während der größte Teil der Maltase in enzymatisch einheitlichem Zustand im Adsorbat zurückbleibt und daraus isoliert werden kann.

In diesem Beispiel ist zum ersten Male die Erwartung erfüllt, die für unsere Untersuchungen der Hydrogele von Tonerde, Zinnsäure u. a. bestimmend war. Unterschiede der chemischen Konstitution und, dadurch bedingt, des Adsorptionsverhaltens sollten beispielsweise bei den Aluminiumhydroxyden aufgesucht werden, um sie der Adsorptionsmethode dienstbar zu machen. In der VII. Mitteilung über „Hydrate und Hydrogele“ unterscheiden R. Willstätter, H. Kraut und O. Erbacher²⁷⁾ das frisch dargestellte, möglichst rasch ausgewaschene α -Aluminium-*ortho*-hydroxyd von der durch eintägiges oder mehrtägiges Altern entstehenden β -Modifikation und einem dritten, nach langdauerndem Altern vorliegenden γ -*Ortho*-hydroxyd. Zu diesem chemisch voneinander verschiedenen Hydroxyden kam in der VIII. Mitteilung²⁸⁾ jener Reihe ein bei 250° durch Einwirkung von Ammoniak auf $Al(OH)_3$ gewonnenes Tonerde-Gel von der Formel $AlO.OH$, das sich als ein sehr nützliches Adsorbens erweist.

Kurz gealtertes Tonerde-Gel (β) ist in seiner auswählenden Adsorptionswirkung auf Gemische von Maltase und Saccharase dem ganz frischen Gel weit überlegen, wird aber seinerseits erheblich übertroffen vom Gel der Formel AlO_2H . Dieses *Meta*-hydroxyd ist ein außerordentlich schlechtes Adsorbens für Invertin. Man würde ein Adsorbens also auf Grund der Adsorptionsversuche mit einzelnen Enzymen unrichtig oder unvollkommen beschreiben. Eine genauere Kenntnis gewährt die Prüfung mit Enzym-

²⁷⁾ B. 58, 2448 [1925].

²⁸⁾ R. Willstätter, H. Kraut und O. Erbacher, B. 58, 2458 [1925].

Gemischen, wie den Hefe-Carbohydrasen, den beiden Pankreas-Proteasen oder den beiden Hefe-Proteasen. Man gewinnt durch diese Art der Prüfung für die Adsorptionsmethode bessere Reagenzien, für die Erklärung der Adsorptions-Erscheinungen vollkommeneres Beobachtungsmaterial.

Die experimentellen Erfahrungen sind der theoretischen Erklärung der Adsorptions-Erscheinungen vorausgeeilt. Die auf L. Michaelis²⁹⁾ zurückgehende einfache Anschauung, nach der die Adsorbentien vermöge ihrer sauren oder basischen Eigenschaften auf die Enzyme oder richtiger auf die Enzym-Komplexe von entgegengesetzter elektrochemischer Natur wirken sollen, ist nicht mehr genügend, die beobachteten Unterschiede zu erklären. Das neue Aluminium-*meta*-hydroxyd ist ein so ausgeprägt selektives Adsorbens, daß nicht die sauren oder basischen Eigenschaften der Tonerde, sondern noch nicht genau zu definierende Affinitätsverhältnisse für die Adsorptionswirkungen bestimmend sein müssen. Vermag doch dieses Gel AlO.OH weder mit 38% Salzsäure noch mit 4% Natronlauge merklich zu reagieren, während das α -Hydroxyd in 0.1-proz. Salzsäure und 0.4-proz. Natronlauge leicht löslich ist.

Die durch auswählende Adsorption zugänglichen homogenen Enzyme eröffnen uns die Möglichkeit, Fragen der enzymatischen Spezifität zu lösen, während die bisherigen Schlußfolgerungen hinsichtlich der Spezifität z. B. der Proteasen und der Struktur ihrer Substrate unsicher waren und sich zum Teil als unrichtig herausstellen. Nach den grundlegenden Untersuchungen von E. Fischer und E. Abderhalden³⁰⁾ schien gemäß dem Verhalten gegen Pankreassaft die große Zahl der natürlichen und künstlichen Polypeptide in biologisch verschiedene Klassen zu zerfallen, hydrolysierbare und nicht hydrolysierbare Peptide. Seit der Entdeckung des Darm-Erepsins durch O. Cohnheim³¹⁾ schrieb man die Peptid-Spaltung dem ereptischen Drüsen-Enzym zu, zu dessen spezifischen Wirkungen aber auch die Hydrolyse von Peptonen, Protaminen und Histonen und wahrscheinlich auch von Casein gerechnet wurde. E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck³²⁾ haben nun den Nachweis geführt, daß nicht einzelne, sondern alle untersuchten einfachen Peptide durch Erepsin gespalten werden und daß sich dessen Wirkung durchaus auf die einfachen Peptide beschränkt. Das Trypsin dagegen und zwar das nicht aktivierte wirkt auf Peptone, Protamine und Histone, während es nur in Verbindung mit seinem Aktivator Enterokinase auf Fibrin, Casein, Gelatine, Gliadin und Zein hydrolysierend zu wirken vermag.

Auch unsere Anschauungen über die in Organen und Geweben der Pflanzen weit verbreiteten Proteasen sind abzuändern. Nach den eingehenden Untersuchungen von S. H. Vines³³⁾ sollen Papain und andere pflanzliche Proteasen Gemische von pepton-bildenden und pepton-spaltenden Enzymen sein, für deren Trennung Vines eine Methode in der fraktionierten Auflöserung durch 2-proz. Natriumchlorid-Lösung gefunden zu haben glaubte. Die pepton-spaltende Komponente sollte im Kochsalz leichter löslich sein, so daß im Rückstand die Komponente zu hinterbleiben schien, die Fibrin zu lösen vermag, während ihr die Wirkung auf Peptone fehlen sollte. Diese Ergebnisse

²⁹⁾ Bio. Z. 7, 488 [1907/08]; L. Michaelis und M. Ehrenreich, Bio. Z. 10, 283 [1908].

³⁰⁾ H. 46, 52 [1905]. ³¹⁾ H. 33, 451 [1901]. ³²⁾ H. 149, 203 [1925].

³³⁾ Annals of Botany 17, 237, 597 [1905], 19, 149, 171 [1907], 22, 103 [1908].

von S. H. Vines haben der Nachprüfung³⁴⁾ nicht standgehalten, die älteren qualitativen Methoden des Enzym-Nachweises und Schätzungsweisen waren irreführend. Weder durch fraktionierte Auflösung, noch durch auswählende Adsorption mit Tonerde, Kaolin oder Fibrin, wofür es ein geeignetes Material zu sein versprach, läßt sich Papain in eine fibrin-lösende und eine pepton-spaltende Komponente zerlegen. Das Verhältnis der Enzym-Wirkungen auf die Substrate Fibrin, Gelatine und Pepton blieb bei diesen Trennungsversuchen konstant. Die Befunde von Vines schienen dadurch gestützt zu sein, daß für die Fibrin-Auflösung schwach alkalische Reaktion, für die Pepton-Spaltung dagegen saure optimal ist. Aber die Verschiedenheit der optimalen Wasserstoffionenkonzentrationen bei den einzelnen Hydrolysen ist kein Kennzeichen für die Funktion besonderer Enzyme. In einer unveröffentlichten Untersuchung von R. Willstätter, W. Graßmann und O. Ambros³⁵⁾ wurde gefunden, daß pflanzliche Proteasen wie Papain auf verschiedene Substrate in deren isoelektrischen Bereichen optimal wirken. Papain hydrolysiert z. B. Fibrin optimal bei $p_H = 7.2$ (isoelektrischer Punkt des Substrates 7.2), Gelatine bei $p_H = 5.0$ (isoelektrischer Punkt 4.8) und Albumin-Pepton bei $p_H = 5.0$ (isoelektrischer Punkt 4.8).

Die Anwendung der einheitlichen Proteasen und die Erkenntnisse von ihrer Spezifität versprechen zur Erforschung der Protein-Strukturen beizutragen. Die in den Untersuchungen über pflanzliche Proteasen durchwegs beobachtete Konstanz ihrer Wirkungsverhältnisse gegenüber verschiedenen Substraten bestätigt die Brauchbarkeit der angewandten Bestimmungsmethoden. Diese erfassen bei Gelatine und Peptonen den Carboxyl-Zuwachs, den man nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz³⁶⁾ in alkoholischer Lösung alkalimetrisch mißt, während andererseits die Fibrin-Auflösung gravimetrisch verfolgt wird. Für den Verlauf der Hydrolyse von Gelatine und von Albumin-Peptonen ist also der Carboxyl-Zuwachs ein rechtes Maß, das dem wesentlichen Vorgang der Proteolyse entspricht. Ebenso haben E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck³⁷⁾ die Wirkung des enzymatisch einheitlichen Trypsins, die nach den Anschauungen von E. Abderhalden³⁸⁾ sowie von C. Oppenheimer³⁹⁾ als rein desaggregierend betrachtet wird, durch den Zuwachs freier Carboxylgruppen messen können, der sehr bedeutend ist. Auch wurde bei Spaltungen durch reines Trypsin die Abspaltung sehr erheblicher Mengen von Aminosäuren beobachtet. Ebenso wenig bestätigt sich die Annahme depolymerisierender Funktion beim Pepsin⁴⁰⁾, dieses Enzym wirkt gleichfalls durch Freilegung von Carboxylen und Aminogruppen. Die neuen analytischen Ergebnisse stehen aber mit der älteren Anschauung in Einklang, derzufolge der Abbau der Eiweißkörper im wesentlichen in der Auflösung von Gruppen $OC-NH$ besteht, und sie sprechen gegen die seit kurzem in den Vordergrund tretenden Annahmen, wonach die Proteolyse

³⁴⁾ R. Willstätter, W. Graßmann und O. Ambros, V. Abh. über pflanzliche Proteasen, H. (im Druck).

³⁵⁾ III. Abh. über pflanzliche Proteasen, H. (im Druck).

³⁶⁾ B. 54, 2988 [1921].

³⁷⁾ H. 149, 203, und zwar S. 214 [1925].

³⁸⁾ Naturwissensch. 12, 716 [1924].

³⁹⁾ Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., 1925, II. Bd., S. 891.

⁴⁰⁾ E. Waldschmidt-Leitz und E. Simons, angeführt H. 149, 203, und zwar S. 214 [1925].

in einem wesentlichen Teile ein Vorgang der Desaggregation polymerer Komplexe sein soll.

Die Beschreibung der Enzyme weist nach unseren Versuchen, die Reinheitsgrade der Präparate zu steigern, viele negative Züge auf. Chemische Reaktionen, von den Wirkungen auf die Substrate, in gewissen Fällen auch auf Aktivatoren und dergl. abgesehen, und Fällungsreaktionen sind nicht bekannt. Nur mit Tannin liefert Peroxydase⁴¹⁾ in jedem zugänglichen Reinheitsgrad einen Niederschlag, und Saccharase⁴²⁾, so rein wie sie zurzeit bekannt ist, gibt damit bei tiefer Temperatur eine Ausscheidung. Für fast alle Enzym-Eigenschaften aber ist gefunden worden, daß sie von Begleitstoffen beeinflußt werden. Zum Teil beim Invertin, noch mehr bei den Lipasen erkennt man, daß die Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Wasserstoffionenkonzentration, das Verhalten gegen Aktivatoren, Hemmungskörper und Gifte, die Haltbarkeit, das Temperatur-Optimum, die Zerstörungstemperatur, besonders auch das Adsorptionsverhalten von den begleitenden Stoffen beeinflußt wird. Außer der struktur-chemischen Spezifität ist nach der heutigen Kenntnis allein die Spezifität der Enzyme in ihrer Wirkung auf asymmetrisch gebaute Substrate von den Begleitstoffen unabhängig und wirklich eine Eigenschaft der Enzyme selbst. So lassen sich Pankreas-, Leber-, Magen- und Pilz-Lipasen durch ihre Konfigurations-Spezifität gegenüber Estern der Mandelsäuregruppe unterscheiden⁴³⁾, und ihre auswählende Wirkung auf die asymmetrischen Substrate erscheint bisher als eine Eigenschaft der Enzyme selbst, nicht der Enzym-Komplexe.

Versuchen wir ein Bild von der chemischen Natur eines Enzyms zu entwerfen, so zeigt es das „Molekül eines Enzyms aus einem kolloiden Träger und einer rein chemisch wirkenden aktiven Gruppe“ zusammengesetzt. Nach der Kenntnis, daß von den chemisch definierten kolloiden Begleitstoffen, soweit die Versuche reichen, jeder einzelne unter Erhaltung der spezifischen Enzym-Wirksamkeit abgetrennt werden kann, und nach der Erfahrung von der Inkonzanz der Enzym-Affinitäten ist es wahrscheinlich, daß die Natur der kolloiden Träger veränderlich ist. Ein einzelner kolloider Träger scheint also entbehrlich zu sein, wenn dem Enzym ein anderer geeigneter zur Verfügung steht. Das Enzym vermag seine Aggregate zu wechseln. Es ist noch nicht erreichbar, die chemisch wirkende aktive Gruppe, die man als das eigentliche Enzym-Molekül ansehen kann, unter Erhaltung der Wirksamkeit von den schützenden Kolloiden vollkommen abzutrennen.

⁴¹⁾ R. Willstätter und A. Pollinger, A. **430**, 269, und zwar S. 282 [1922/23].

⁴²⁾ XII. Abh., Abschnitt II, H. (im Druck).

⁴³⁾ R. Willstätter und F. Memmen, VIII. Abh. über Pankreas-Enzyme, H. **138**, 216 [1924]; R. Willstätter, F. Haurowitz und F. Memmen, IX. Abh., H. **140**, 203 [1924]; R. Willstätter und H. Kumagawa, XIV. Abh., H. **146**, 151 [1925].