

57. Kurt Heß und Christa Heß: Anreicherung von Tyrosinase durch Zerschäumung.

[Aus Rubi, Post Langenwang i. Allgäu, eingegangen am 14. April 1947.]

Die Eigenschaft der Tyrosinase, sich in wäßrigen Lösungen bevorzugt im Schaum zu verteilen, wird benutzt, dieses Ferment mit Hilfe einer von Wo. Ostwald beschriebenen kontinuierlich arbeitenden Zerschäumungsvorrichtung anzureichern.

Die bequeme Methode zur quantitativen Bestimmung von Tyrosinase¹⁾ gab uns Veranlassung, einige Anreicherungsversuche durchzuführen.

Konzentrierungsversuche an Tyrosinase-Lösungen sind bisher durch Kombination von Alkoholfällung, Diffusion und Adsorption-Elution durchgeführt worden. M. Graubard und J. M. Nelson²⁾ adsorbierten an Tonerdegel bei p_H 6.1, eluierten mit Dinatriumphosphat bei p_H 8 und erzielten nach mehrmaliger Wiederholung der Operationen eine Anreicherung auf 300%. R. Weidenhagen und F. Heinrich³⁾ eluierten nach Adsorption an Phosphorwolframsäure mit verdünnter Ammoniak-Lösung und konnten dabei auf das 7.3-fache anreichern.

Wo. Ostwald und M. Mischke⁴⁾ haben festgestellt, daß Lipase und Diastase nach Zerschäumung ihrer Lösungen sich bevorzugt im Schaum verteilen. Wir benutzten die von Wo. Ostwald und A. Siehr⁵⁾ angegebene Anordnung, bei der die Zerschäumung im Kreislauf erfolgt, und erzielten bei dem infolge seines höheren Eiweißgehalts gut schäumenden Kartoffelpreßsaft eine Anreicherung auf 335%, bei den eiweißärmeren Säften aus Löwenzahn und seinen Bastarden mit Kok-saghyz auf 156 bzw. 183%. Durch Erhöhung der Schaumkraft dürften sich die Effekte steigern lassen.

Beschreibung der Versuche.

Zur Gewinnung der tyrosinasereichernden Präparate ist die Schaumbeständigkeit so zu wählen, daß ein leichtes Schmelzen des Schaumes (Spumatbildung) erfolgen kann, da schaumzerstörende Mittel, wie Äther, Fette usw., leicht zu einer Inaktivierung des Ferments führen. Bei Kartoffelpreßsaft hat sich eine Verdünnung des Preßsafts im Verhältnis 1 : 4 als zweckmäßig erwiesen, bei den Säften aus Löwenzahn und Kok-saghyz, die eiweißärmer sind, ist der Schaum weniger beständig; in diesen Fällen wurden 2 Volumteile Preßsaft mit nur 1 Teil Puffer-Lösung verdünnt.

Als Fritte in der Ostwaldschen Anordnung erwies sich Modell G_1 günstiger als G_2 (Schott und Gen., Jena):

	tg α Ausgangssaft	tg α Spumat	Aktivitätsänderung in %
G_1	2.68	3.5	+30
G_2	3.65	2.81	-13

Als Zerschäumungsgas war Kohlensäure vorteilhafter als Stickstoff:

	tg α Ausgangssaft	tg α Rückstand	tg α Spumat	Aktivitätssteigerung %
Stickstoff	3.27	0.66	3.42	+ 5
Kohlensäure	4.65	0	15.4	+231

Der Gasdruck wurde so eingestellt, daß der Schaum gerade aus dem Zerschäumungsraum in den oberen Trichter der Anordnung übergetrieben wurde (Wassersäule 230 mm). Im übrigen wurde der Gasdruck während der Zerschäumung so reguliert, daß sich bei

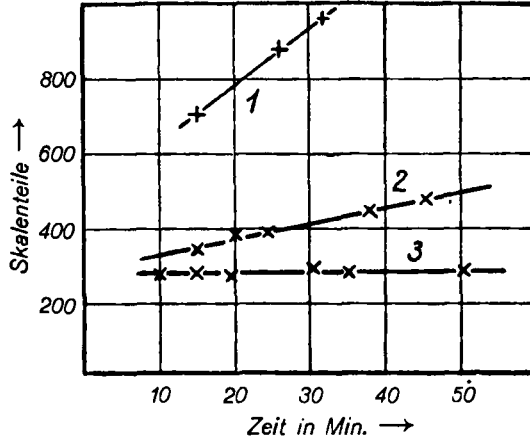
1) K. Heß u. Chr. Heß, s. vorstehende Mitteilung.

2) Journ. Biol. Chem. **112**, 135 [1935]. 3) Ztschr. Ver. dtsch. Zuckerind. **1928**, 512.

4) Koll. Ztschr. **90**, 205 [1940]. 5) Koll. Ztschr. **79**, 13 [1937].

konstantem Gasstrom ein Gleichgewichtszustand einstellt, bei dem das Volumen der Flüssigkeit im Schaum dem Volumen des abfließenden Spumats entspricht. Durch Einstellen des unteren Teils der Apparatur in Eiswasser wurde die Temperatur möglichst tief gehalten (12°). Bei der Zerschäumung sank der p_H -Wert von 6.81 auf 6.06 im Spumat, der noch innerhalb des optimalen p_H -Bereichs für das Ferment liegt.

Die Anreicherung wurde während des kontinuierlichen Arbeitens durch Probeentnahmen zeitlich verfolgt. Bei Kartoffelsaft war das Ferment unter den angegebenen Bedingungen praktisch nach 2 Stdn., bei den fermentärmeren Löwenzahnsäften nach etwa 1 Stde. in den Schaum übergeführt.



Abbild. 1. Farbänderung eines Kartoffelpreßsafts vor (Kurve 2) und nach der Zerschäumung (Kurve 1: Spumat, Kurve 3: Rückstand).

In Abbild. 1 ist beispielsweise die Änderung der $tg\alpha$ -Werte¹⁾ bei der Anreicherung der Tyrosinase für Kartoffelsaft wiedergegeben. Die Zusammenstellung in der folgenden Tafel läßt erkennen, daß man bei der Zerschäumung von tyrosinasehaltigen Säften in kurzer Zeit eine beachtliche Fermentanreicherung erzielen kann, so daß es sich empfiehlt, bei weiteren Anreicherungsversuchen von derartigen Spumaten auszugehen.

Tafel. Zerschäumungsergebnisse für Tyrosinase-Lösungen aus Kartoffeln und Taraxacum-Wurzeln.

	Verdünnung Preßsaft/ Puffer- lösung	Zerschäu- mungs- dauer in Stdn.	$tg\alpha$ vor der Zer- schäu- mung	$tg\alpha$ der rückstän- digen Lösung	$tg\alpha$ des Spumats	Aktivi- täts- steigerung in %
Kartoffel	1/4	2	4.65	0	15.4	+235
Löwenzahn	2/1	1	4.7	0	7.35	+ 56
Kok-saghyz-Bastard	2/1	1	2.4	0	4.4	+ 83