

Enzymologische Mitteilungen.

Von

Ernst Willy Schmidt.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts in Jena.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. Juni 1910.)

I.

Über das Erhitzen von Enzymen.

In der einschlägigen Literatur finden sich eine ganze Anzahl von Angaben über das Verhalten von Enzymen höheren Temperaturen gegenüber. Die Angaben sind häufig sich widersprechende: je nach der chemischen Reinheit des verwendeten Fermentpräparates schwankt die Empfindlichkeit höheren Temperaturen gegenüber. Die reinsten Enzyme erwiesen sich als sehr thermolabil, so daß im allgemeinen der Schluß gerechtfertigt erscheint: Die Thermolabilität steht in einem umgekehrten Verhältnis zur Reinheit eines Fermentes. Je weniger verunreinigt ein gewonnenes Enzym ist, um so empfindlicher wird es gegen steigende Hitzegrade. Da nun in quantitativer Hinsicht an den Fermentverunreinigungen hauptsächlich Proteinkörper beteiligt sind — nur bei den allerreinsten Enzympräparaten bleibt in einigen Fällen die Biuretreaktion aus —, so sind wahrscheinlich diese Eiweißstoffe, oder schlechthin kolloide Substanzen, die Ursache für eine gewisse Hitzeresistenz vieler Enzyme. Immerhin sind die Wärmegrade, die von solchen mit Kolloiden verunreinigten Enzympräparaten in Lösung ertragen werden, noch keine beträchtlichen. Über 60° C. geht die Resistenz zumeist nicht hinaus (ausgenommen das Papayotin, das ein noch unaufgeklärtes Optimum bei 90—95° C. haben soll), so daß im großen Ganzen die Fermente zu den thermo-

labilen Stoffen gerechnet werden. Die Tatsache, daß die meisten Enzyme durch die Koagulationstemperatur des Eiweißes vollständig vernichtet werden, dient wesentlich mit zur Unterstützung der Annahme von der Proteinnatur der Enzyme.

Wenn nun die ein Ferment fast stets verunreinigenden Eiweißkörper je nach ihrer Menge modifizierend auf die Thermolabilität des betreffenden Enzymes einwirken, so könnte es möglich sein, durch Eintragen eines Enzymes in eine kolloide Lösung die Hitzeempfindlichkeit praktisch auszuschalten.

Ich arbeitete mit Trypsin (Schuchard), dessen Thermolabilität in wässriger Lösung bekannt ist. Ich trug eine Messerspitze voll Trypsin in 10 ccm einer 5%igen Peptonlösung (schwach alkalisch) und erhitzte bis zum lebhaften Sieden. Nach dem Erkalten setzte ich dieser gekochten Pepton-Trypsinlösung eine Fibrinflocke zu, diese wurde in normaler Weise verdaut. Ein Kontrollversuch mit in destilliertem Wasser erhitzten Trypsin ergab, daß das Trypsin hierbei zerstört wurde.

Der Versuch ward in folgender Weise wiederholt: Eine durch Kochen und nachträgliche Filtration vollkommen klar hergestellte 5%ige Peptonlösung (10 ccm) wurde mit 1 ccm einer ebenfalls klar filtrierten, konzentrierten Trypsinlösung (ca. 5%) versetzt. Das gut durchgeschüttelte Gemisch wurde im Reagenzrohre zum Sieden gebracht. Die vorher goldklare Flüssigkeit wird dabei regelmäßig in der Nähe der Siedetemperatur trübe, es entsteht ein flockiger grauer Niederschlag, der beim Erkalten sich langsam ballt und sich in kurzer Zeit am Boden des Glases locker sedimentiert. Wurde die konzentrierte Trypsinlösung ohne Peptonwasserzusatz kurz aufgeköcht, so blieb sie klar; nachträglich noch einmal mit Peptonwasser erhitzt, trat ebenfalls keine Trübung der Lösung ein.

Ich trennte nun Niederschlag und Lösung durch Filtration und prüfte sowohl den gut ausgewaschenen, in Alkali unlöslichen Niederschlag, wie auch die Lösung auf die verdauende Kraft gegenüber Fibrin: Die Fibrinflocke wurde in beiden Fällen restlos gelöst, das Filtrat verdaute jedoch beträchtlich schneller.

Die ohne Pepton gekochte konzentrierte Trypsinlösung

hatte ihre verdauende Kraft verloren, infolgedessen auch die vor Zusatz von Pepton erhitzte Trypsinportion. Ein nachträglicher Zusatz von Peptonlösung zu schon erhitztem Trypsin übte keinerlei Wirkung aus.

Anstatt Peptonwasser versuchte ich noch Gelatinelösungen und Agar-Agar¹⁾ in bezug auf eine Schutzwirkung für Trypsin gegen Erhitzen. So wurden 10 ccm einer 2%igen Agarlösung mit 1 ccm einer konzentrierten Trypsinlösung versetzt und auf 100° C. gebracht. Nach Erkalten wurde über die feste Agarmasse eine 0,3%ige Na₂CO₃-Lösung geschichtet, der eine Fibrinflocke beigegeben war. Das Fibrin ward bei Bruttemperatur normaliter gelöst. Denselben Effekt hatte Gelatine; mit einer 10%igen Gelatinelösung (neutral) auf 100° C. erhitztes Trypsin behielt seine fibrinverdauende Wirkung bei. — Das Arbeiten mit Gelatinelösungen führte zur Auffindung eines Phänomens: Trypsin spaltet Gelatine bei 100° C. momentan bis zu Tryptophan! Bei den verschiedenen Versuchen mit Gelatine war mir schon aufgefallen, daß die Gelatine nach einem ganz kurzen Aufkochen mit Trypsin ihr Erstarrungsvermögen²⁾ verliert, sie bleibt flüssig. Es ist durch diese kurze, aber allem Anscheine nach äußerst heftige Reaktion mit dem Trypsin bei 100° C. eine weitgehende strukturelle Modifikation, verbunden mit einer chemischen Umsetzung, vor sich gegangen. Schon während des Erhitzens mit Trypsin entstand eine Trübung der gelatinösen Flüssigkeit. Nach dem Erkalten fiel ein starker gelblicher Niederschlag aus. Auch unter strömendem Wasser und nach tagelangem Stehen in der Kälte konnte eine derart

¹⁾ Als Adsorbens für Enzyme wurde Agar-Agar verschiedentlich gebraucht (vgl. Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme, 1910, S. 57). Das von einem Agarwürfel adsorbierte Trypsin wird später leicht wieder an die umgebende Flüssigkeit abgegeben. Auf diesem Verhalten beruht eine Methode von Eirianian zum Nachweis von Trypsin in Faeces (Eirianian, Über den Nachweis der Darmfermente, speziell des Trypsins, in den Faeces, nebst einer neuen Methode desselben. Dissertation, Halle 1909).

²⁾ W. M. Bayliss (Das Wesen der Enzym-Wirkung, 1910, S. 27) erwähnt, daß eine Enzymwirkung (Trypsin) von 5 oder 6 Minuten bei 40° C. genüge, um die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine zu vernichten.

behandelte Gelatinelösung nicht mehr zum Erstarren gebracht werden. Die Gelatine hatte die Eigenschaften eines Hydrogeles verloren, schon an der Änderung der Viskosität der Flüssigkeit nach der Reaktion mit Trypsin war diese Tatsache zu erkennen.

Es ist somit die plötzliche Überführung einer Gelatinelösung in einen irreversiblen Zustand durch Trypsin in der Siedehitze festgestellt. — In rein chemischer Hinsicht war das Auffällige, daß eine solche Lösung mit Essigsäure angesäuert und mit Bromwasser versetzt eine tief rotviolette Färbung gab: die typische Tryptophanreaktion.

Die Versuche wurden im allgemeinen so ausgeführt, daß eine klare neutrale 10%ige Gelatinelösung mit 2 ccm einer konzentrierten, ebenfalls vollkommen klaren Trypsinlösung in einem Reagenzglas zusammengefügt, über der Flamme bis zum heftigen Sieden erhitzt und sofort unter strömendem Wasser zum Erkalten gebracht wurde. Die ganze Manipulation kann in etwa einer halben Minute vorgenommen werden. In gleicher Weise gibt eine mit Trypsin aufgekochte Peptonlösung Tryptophanreaktion.

Zur Kontrolle erhitzte ich wiederum die konzentrierte Trypsinlösung für sich und setzte sie dann einer Gelatine- bzw. Peptonlösung zu, die Reaktion blieb nunmehr aus, die Gelatine behielt nach dem Aufkochen ihr Erstarrungsvermögen, es entstand kein Niederschlag in der Gelatine- bzw. Peptonlösung, die Tryptophanreaktion trat nicht auf.

Auch der mit Trypsin zusammen gekochten Gelatinelösung wurde nachträglich Fibrin zugesetzt, es wurde, wie in den ersten Versuchen mit Pepton und Agar, ebenfalls glatt gelöst bei schwach alkalischer Reaktion. Schließlich sei noch eines kleinen interessanten Versuches Erwähnung getan, der eine ganz merkwürdige Hitzeresistenz des Trypsins betrifft. Trypsin (Schuchard) wurde trocken in wasserfreies Glycerin eingetragen; durch kräftiges Umschütteln ward dann das Trypsin auf das feinste in dem Glycerin verteilt; diese Suspension wurde einige Minuten im Sieden erhalten. 1 ccm dieses Glycerintrypsingemisches wurde zu 10 ccm Na_2CO_3 (0,3%) hinzu-

gefügt und dieser Verdauungsflüssigkeit eine Fibrinflocke zugesetzt. Das Fibrin¹⁾ wurde in normaler Weise bei Bruttemperatur verdaut. Es hat demnach das in Glycerin eingetragene Trypsin eine Temperatur von 292° C. (Siedepunkt des Glycerins) ohne Schaden ertragen.

Von einer Erklärung der verschiedenen hier kurz mitgeteilten Tatsachen ist vorläufig noch ganz abgesehen worden: nur eine möglichst genaue Beschreibung schien angängig. Da wir kein einziges Enzym in der Hand haben, das mit Sicherheit als chemisch rein zu bezeichnen ist, so wäre es müßig, nach Hypothesen zu suchen, um Vorgänge zu erklären, bei denen das diese Vorgänge auslösende Agens selbst noch seinem Charakter nach hypothetischer Natur ist.

II.

Zur Sterilisation von Enzymen.

Bei Anstellung von Versuchen über die spezifische Wirksamkeit irgend eines Fermentes ist es von größter Wichtigkeit, die Bakterien sicher auszuschalten. Man pflegt durch Zusatz von Desinfizientien dieser Forderung Rechnung zu tragen. Die Beigabe von Protoplasmagiften ist aber immer mehr als ein, wenn auch notwendiges, Übel erkannt worden. Die fermentative Tätigkeit wird stets in etwas beeinflußt, zudem ist die giftige Wirkung der verschiedenen Antiseptika nur eine relative. Vom Thymol²⁾ konnte ich nachweisen, daß es als Desinfizient für Verdauungsversuche ungeeignet ist. Toluol, Chloroform und Fluornatrium scheinen auch nicht unbedingt sicher eine Ausschaltung der Bakterientätigkeit zu garantieren. Es wäre deshalb von Wert, wenn man ohne Desinfizientien bei enzymologischen Arbeiten, besonders bei einer meist länger andauernden und wegen ihrer alkalischen Reaktion für Bakterien

¹⁾ Das Fibrin war gut; überdies wurde ein Versuch gleichzeitig angestellt, ob sich das Fibrin nicht in Alkali bei Bruttemperatur spontan auflöst. Das Fibrin blieb jedoch unverändert, während das in Glycerin + Trypsin eingetragene vollkommen gelöst war.

²⁾ In einer binnen kurzem erscheinenden Arbeit.

als Nährboden sehr geeigneten tryptischen Verdauung. auskommen könnte. Dieses ist zu ermöglichen, sobald es gelänge, sowohl das Ferment, wie auch das der Fermentwirkung zu unterwerfende Objekt durch Hitze steril zu bekommen. — Nach den Beobachtungen der vorhergehenden Mitteilung ist nun eine Hitzesterilisation von Trypsin prinzipiell möglich. Ein kleiner Versuch erhärtet diese Annahme. Ich nahm eine in der beschriebenen Weise hergestellte Peptontrypsinlösung, impfte diese mit einer sporogenen Bakterienform und kochte das Ganze einmal auf. Ein Kontrollröhrchen blieb unaufgekocht. Beide Röhrchen wurden sodann bei 28° C. 24 Stunden belassen: in dem Kontrollröhrchen hatte schon eine Trübung eingesetzt, die erhitzte Lösung war vollkommen klar. In dieser waren sämtliche vegetativen Stäbchen durch das kurze Aufkochen vernichtet, nur die Sporen waren am Leben geblieben, die jetzt zu keimen begannen. Es wurde deshalb diese Lösung nochmals kurz aufgekocht, um die jungen Keimstäbchen abzutöten, die sich innerhalb der 24 Stunden aus den Sporen entwickelt hatten. Die so behandelte Lösung blieb weiterhin klar, eine Bakterienentwicklung stellte sich auch nach längerem Aufbewahren nicht ein. Trotzdem ist es sehr wohl möglich, daß manchmal noch Bakteriensporen ungekeimt bleiben, sodaß die Lösung nur relativ steril zu nennen ist. Ein drittes Erhitzen nach weiteren 18—24 Stunden müßte dann diese letzten Bakterienkeime entfernen. Soweit das Prinzip einer fraktionierten Sterilisation von Enzymen. Ich schlug verschiedene Wege ein, um eine solche in praxi durchzuführen.

Einmal kann man sich die schon mitgeteilte Tatsache zunutze machen, daß Trypsin eine Temperatur von 292° C. in Glycerin ohne stärkere Schädigung erträgt.

Sodann wurde der Versuch gemacht, Trypsin in Celloidin suspendiert zu sterilisieren. Ich verteilte Trypsinpulver in einer Lösung von Celloidin in Alkoholäther. Diese Mischung ließ ich in einer offenen kleinen Petrischale abdunsten, schnitt das restierende feste Celloidin, in das nun das Trypsin eingeschlossen war, in kleine Täfelchen, die in strömendem Dampfe zweimal 10 Minuten sterilisiert wurden. Eingetragen in steriles Wasser

diffundiert aus solcherart hergestellten Täfelchen das Trypsin schnell heraus, die verdauende Kraft ist erhalten, wie durch Versuche mit Fibrin bei alkalischer Reaktion sich zeigen ließ.

Um ganz sicher zu arbeiten, empfiehlt es sich, zunächst das trockene Fermentpräparat vorzubehandeln. Man kann das Trypsin in trockenem Zustande bis auf 160° C. ohne Schaden erhitzen.¹⁾ Ein Erhitzen auf 125° C. während 10 Minuten genügt für unsere Zwecke vollauf, zumal da Bakteriensporen auch bei 160° C. mindestens 1 Stunde erhitzt werden müssen,²⁾ um sicher abgetötet zu werden, und auch sicher die verschiedenen Trypsinpräparate sich in bezug auf die Resistenz gegenüber 160° wechselnd verhalten.

Die meisten Fermentpräparate des Handels sind zudem sehr keimarm, wie ich mich überzeugen konnte an verschiedenen Handelstrypsinen und fünf Papayotinpräparaten. Die in den trockenen Präparaten eventuell vorhandenen Sporen können nach folgendem Verfahren ohne Zerstörung der Fermente abgetötet werden. Ich löste das Trypsin in wenig sterilisiertem Aqu. dest. und ließ die Lösung 12—24 Stunden bei 30° C. stehen, um sie darauf sterilem, noch flüssigem Agar (2%) zuzusetzen. Der Agar ist zuvor zweckmäßig gleich in dem Gefäße, in welchem man den Verdauungsversuch vorzunehmen wünscht — etwa in einem Erlenmeyer-Kolben von entsprechender Größe —, dreimal (an drei aufeinanderfolgenden Tagen) in strömendem Dampfe sterilisiert. In diesem Gefäße wird dann Agar + Trypsinlösung nochmals an zwei Tagen einige Minuten lang auf 100° C. gehalten.³⁾

Ist der Trypsinagar fertig sterilisiert, so wird in den mit

¹⁾ Oppenheimer, Fermente, Spezieller Teil, 1910. S. 196.

²⁾ Arthur Meyer, Praktikum der botan. Bakterienkunde, 1903. S. 4.

³⁾ Es ist auch rätlich, die Agarmasse vor der Verwendung durch Wässern so weit wie möglich zu reinigen. Es geschieht dieses am besten, indem man sich gleich eine größere Agarportion herstellt, noch heiß in eine große Krystallisierschale gießt, erstarren läßt und destilliertes Wasser darüber schichtet. Nach 2—3 Wochen sind unter wiederholtem Wechseln des Wassers alle wasserlöslichen Stoffe aus dem Agar herausdiffundiert. Will man nun den Agar verwenden, so schneidet man die zu benötigende Menge aus der Gesamtmenge heraus, löst und sterilisiert wie üblich.

Watte verschlossenen Erlenmeyer-Kolben, auf dessen Boden der Agar in einer dünnen Schicht aufliegt, unter Berücksichtigung der bei bakteriologischen Arbeiten üblichen Kautelen, steriles Verdauungsalkali eingebracht, nebst der zu verdauenden sterilen Substanz. Wo es nicht darauf ankommt, undenaturiertes Eiweiß zu verwenden, da bieten sich in gekochtem Fibrin und koaguliertem Hühnereiweiß genügend durch Hitze sterilisierte Substanzen. Handelt es sich aber um die im allgemeinen zur Verwendung gelangende möglichst unveränderte «Fibrinflocke», so muß ein anderer Weg des Keimfreimachens eingeschlagen werden.

III.

Versuche einer aseptischen Verdauung in vitro.

Den Vorzügen, die das Blutfibrin als Testobjekt für peptische und tryptische Verdauung genießt, stehen mancherlei Nachteile gegenüber. Die größte Schwierigkeit bereitet seine keimfreie Aufbewahrung, ohne es dabei wesentlich zu verändern. Die übliche Aufbewahrung in Glycerin ist unsicher. Die stets am Fibrin in Menge haftenden Bakteriensporen werden in Glycerin nicht vernichtet. Dann auch ist das Entfernen des Glycerins vor der jeweiligen Benutzung des Fibrins lästig und erhöht, geschieht es nicht mit sterilem Wasser, überdies noch den Keimgehalt des Fibrins. Unter Chloroformwasser oder Alkohol aufbewahrt, liegen die Verhältnisse kaum anders: Chloroform ist kein absolut sicheres Antiseptikum. Auch erleidet das Fibrin schließlich durch die Einwirkung des Chloroforms Veränderungen. Alkohol, in den Konzentrationen, in denen er wirklich antiseptisch wirkt, ist auch nicht indifferent für das Fibrin. Da beide durch Auswaschen entfernt werden müssen, wäre auch hier wieder die Gefahr einer nachträglichen Infektion gegeben.

Um all diese Übelstände zu beseitigen und um somit ohne sonderlichen Eingriff in die Struktur des frischen Fibrins dieses keimfrei zu erhalten, versuchte ich die von v. Tappeiner¹⁾ und

¹⁾ v. Tappeiner und Jodlbauer. Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen, 1907, S. 106.

seinen Schülern eruierten Tatsachen über die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen auf Mikroorganismen, Enzyme usw. für die Frage der Fibrinsterilisation nutzbar zu machen. So sind u. a. auch von v. Tappeiner und Jodlbauer Versuche über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Spaltpilze ausgeführt. Es wurden nach diesen Untersuchungen *Proteus vulgaris* binnen 1—2 Tagen bei zerstreutem Tageslichte durch die Gegenwart von 0,01—0,05% Methylenblau in einer Bouillonkultur getötet. Eosin, 0,1%, wirkte beträchtlich langsamer, erst nach 10 Tagen waren in diesem Falle die Bakterien vernichtet. Diese Tatsachen nun lassen sich direkt verwenden für die Sterilisation von Fibrin.

Das frische Fibrin wird in weite Stöpselgefäße mit destilliertem Wasser gefüllt, dem einige Tropfen Eosin oder besser noch Methylenblau zugesetzt werden. Die Gefäße werden dem Sonnenlichte an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen exponiert, wie sie dann auch weiterhin stets bei Tageslicht aufbewahrt werden. Die Gefäße dürfen nur zu etwa $\frac{2}{3}$ gefüllt sein, damit die relativ niedrige Flüssigkeitsschicht genügend mit Sauerstoff in Berührung kommen kann.

Dieses lichtsterilisierte Fibrin diente mir nur zur Durchführung aseptischer Verdauungsversuche. Das Fibrin hatte zum Teil vier Wochen in Eosinwasser gelegen, ohne sichtbare Veränderung; es speichert den Farbstoff reichlich und hält ihn sehr fest, erst bei der Verdauung wird er wieder frei. Bevor die Flocke zu zerfallen beginnt, zeigt daher schon das Freiwerden des Farbstoffes das Einsetzen des Verdauungsprozesses an. Das sterile Fibrin muß unter Beobachtung der nötigen Vorsichtsmaßregeln (flambierte Pinzette usw.) aus dem Aufbewahrungsgefäß in das dem Verdauungsversuche dienende Gefäß übertragen werden (z. B. in ein mit Agartrypsin in oben geschilderter Weise beschicktes Erlenmeyer-Kölbchen).

Hierbei besteht immerhin noch eine Gefahr durch Luftinfektion, besonders bei Übertragung größerer Fibrinmengen. Wurde letzteres notwendig, so schlug ich einen anderen Weg ein; ich brachte die nötige Fibrinmenge in einen Erlenmeyer-Kolben mit der entsprechenden Flüssigkeitsmenge und setzte

gleich hierzu die fluorescierende Substanz. Der Erlenmeyer-Kolben wurde, wie üblich, dem Lichte ausgesetzt und nach der Lichtsterilisation das sterile Ferment zugesetzt und der Kolben ins Dunkle (Brutschrank) verbracht. Das Trypsin hatte ich wieder in Agar fraktioniert sterilisiert, nur dieses Mal in kleinen Proberröhrchen (4—5 cm lang, 0,3—0,4 cm breit), die mit Watte verschlossen waren. Ein solches Röhrchen, das etwa zu $\frac{2}{3}$ mit Trypsinagar gefüllt ist, wird der Verdauungsflüssigkeit zugesetzt, indem es kurz vor dem Einbringen in den Erlenmeyer-Kolben in der Flamme sterilisiert wird: der ebenfalls sorgfältig abgebrannte Wattepfropf wird dabei schnell entfernt. Aus einem solchen Röhrchen diffundiert das Trypsin in die Verdauungsflüssigkeit in kurzer Zeit hinein. — Solcher Art angesetzte Verdauungsversuche ohne Beigabe von Antiseptics verliefen in vollkommen normaler Weise. Auch nach wochenlangem Stehen waren keine Bakterien wahrzunehmen. Die Färbung der Verdauungsflüssigkeit beeinträchtigt in keiner Weise die Übersicht über das Versuchsbild. Ein chemischer Einfluß durch die fluorescierenden Substanzen auf den Gang der Verdauung dürfte wohl kaum bei der außerordentlichen Verdünnung des Stoffes in Frage kommen.
