

Versuche zur Darstellung hochaktiver Saccharasepräparate. (IV. Mitteilung.)

Von

Olof Svanberg.

(Aus dem Laboratorium für anorganische Chemie der Universität Göttingen und dem
biochemischen Laboratorium der Hochschule zu Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 6. Dezember 1920.)

Über Membranfiltration gereinigter Saccharase- lösungen.

In einigen vorhergehenden Mitteilungen über die Darstellung hochaktiver Saccharasepräparate aus Hefe^{1) 2) 3)} sind wir zu dem Ergebnis gekommen, daß die Enzymlösungen durch fraktionierte Fällungen, durch Kaolinadsorption und durch Dialyse sich bei der fortschreitenden Reinigung, d. h. beim Gewinn an enzymatischer Aktivität pro g Trockensubstanz, chemisch immer in derselben Richtung verändern, nämlich so, daß in der Trockensubstanz sich der Hefegummi immer mehr anreichert, um zuletzt den quantitativ weit überwiegenden Bestandteil derjenigen Körper⁴⁾ auszumachen, unter denen das Enzym zu suchen ist. So haben wir in unseren II. und III. Mitteilungen die Darstellung einer Reihe Saccharaselösungen beschrieben, wo in der gesamten Enzymtrockensubstanz nur 1,2—1,75% Stickstoff vorhanden waren, während nach Hydrolyse mit Schwefelsäure 91—92% Hexosen, Spaltprodukte des Hefegummis, nachgewiesen wurden.

In einer weiteren Untersuchung⁴⁾, welche die Diffusionsgeschwindigkeit des Enzyms unter verschiedenen Bedingungen

¹⁾ Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 (1919).

²⁾ Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 109, S. 65 (1920).

³⁾ Euler und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 175 (1920).

⁴⁾ Euler, Hedelius und Svanberg, Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 190 (1920).

zum Gegenstand hatte, wurde gefunden, daß sich das Enzym in dieser Hinsicht in verschiedenen wäßrigen Lösungen als ein sehr hochmolekularer Körper verhielt, mit einem Molekulargewicht von etwa 20000.

Unsere besonders kohlehydratreichen Saccharasepräparate waren nach fraktionierten Alkoholfällungen und Kaolinadsorption durch Dialyse in dünnen Kollodiummembranen hergestellt worden. Solche Membrane sind indessen in kolloidchemischer Hinsicht als eine besonders undurchlässige Scheidewand zu betrachten, indem sich durch dieselben nur sehr wenige kolloid gelösten Stoffe filtrieren lassen. In den Membranfiltern größeren Durchlässigkeitsgrades, über welche R. Zsigmondy und W. Bachmann¹⁾ berichten und welche nunmehr von der Firma E. de Haën im Markt geführt werden, besitzen wir Membrane, durch welche — wie sich herausgestellt hat — sich Lösungen von Arabin und auch von Hefegummi glatt filtrieren lassen, ohne daß sich der Gummi oberhalb des Filters merklich konzentriert. Es schien also von vornherein nicht ausgeschlossen, daß sich ein geeigneter Durchlässigkeitsgrad dieser Membrane ausprägen ließe, welcher in der präparativen Enzymchemie anwendbar sein könnte, um z. B. aus Saccharaselösungen den Gummi ganz oder teilweise von dem nach den oben genannten Messungen sehr hochmolekularen Enzym abzufiltrieren, was einen wesentlichen Fortschritt für unsere Arbeiten bedeuten würde.

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, ist eine solche Trennung bei Saccharaselösungen unter Anwendung der de Haënschen Membrane nicht ausführbar. Bei den größeren Durchlässigkeitsgraden passieren alle wesentlichen Bestandteile einer aus Hefe durch unsere Reinigungsmethode dargestellten Saccharaselösung das Membranfilter, sowohl der Gummi als auch das Enzym. Geht man zu Membranen größerer Porendichte über, so ändert sich vorläufig nur die Filtrationsgeschwindigkeit, die Saccharase passiert aber noch bei Benutzung von Filtern

¹⁾ Zsigmondy und Bachmann, Über neue Filter, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. Bd. 103, S. 119 (1918).

des Durchlässigkeitsgrades Nr. 300 beinahe ungeschwächt das Filter, in einem vorliegenden Fall zu 66%. Bei den kleinsten Durchlässigkeitsgraden tritt zuletzt eine Erscheinung zutage, welche bei Anwendung von Kollodiummembranen vollständig ausbleibt und die grundwesentliche Verschiedenheit der beiden Membrantypen hervorhebt. Während nämlich bei der Benutzung eines Kollodiumfilter's sich von unseren Saccharaselösungen das Wasser und die niedrigstmolekularen Stoffe (Aminosäuren, Asche) ohne weiteres abfiltrieren lassen, ist dies bei den Membranfiltern de Haëns von etwa der Durchlässigkeit Nr. 400 an nicht mehr der Fall, es tritt überhaupt keine Filtration ein. Wir begegnen hier also Verhältnissen, welche uns, wie die Filtration des durch Gummi arabicum oder Gelatine geschützten kolloidalen Goldes, durch Membranfilter oder fein verteilter Kohle mit einer Seifenlösung durch Papierfilter daran erinnern, daß in vielen Fällen nicht die Porengröße des Filters oder seine Durchlässigkeit für Wasser das für die Filtrationswirkung maßgebende ist, sondern vielmehr die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Filters und der zu filtrierenden Substanzen¹⁾.

Versuche.

Die zu diesen Versuchen benutzten Saccharaselösungen wurden aus der untergärigen Bierhefe der städtischen Brauerei (Göttingen) dargestellt. Es wurde von 3 kg unvorbehandelter abgepreßter Hefe ausgegangen und unseren gewöhnlichen, früher veröffentlichten Methoden gefolgt: Autolyse — ohne Zusatz von Wasser — mit etwas Toluol bei Zimmertemperatur, fraktionierte Fällung der abfiltrierten Autolysesäfte mit Alkohol und zuletzt Adsorption der letzten Eiweißreste mit Kaolin.

Der Saccharasegehalt der Ausgangshefe war von derselben Größenordnung wie bei den Stockholmer Hefen: 1,1 g Hefe vom Trockengewicht 30% gab bei 18° in 60 ccm 0,8% NaH_2PO_4 -Lösung, die 4,8 g Rohrzucker enthielt, die Inversions-

¹⁾ Vgl. Bechhold, Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 60, S. 257 (1907); Bd. 64, S. 328 (1908).

konstante $137 \cdot 10^{-4}$. Dies bedeutet eine Inversionsfähigkeit pro g Trockensubstanz der Hefe von If: 0,20 oder in O'Sullivan-Tompsons Skala $\pm 0^{\circ} = 230$ Minuten¹⁾. Nach 7 tägiger Autolysedauer gab 1 ccm des Saftes konstant — bei derselben Rohrzuckermenge den Inversionskoeffizienten $200 \cdot 10^{-4}$. Es wurden 945 ccm Autolysesäfte gewonnen, welche in zwei Portionen verarbeitet wurden und nach fraktionierten Alkohol-fällungen und Kaolinadsorption die Saccharaselösungen **3 Ea** und **3 Eb** gaben, welche durch die folgenden Zahlen definiert werden:

	3 Ea	3 Eb
Inversionskonstante (4,8 g Zucker, 1 ccm Enzymlösung in 60 ccm bei 18° und p _H -Optimum) . .	$326 \cdot 10^{-4}$	$343 \cdot 10^{-4}$
% Trockensubstanz	5,04	5,43
If.	3,1	3,04
$\pm 0^{\circ}$, Minuten	14,9	15,2
Drehung (5 cm-Rohr)	—	$1,32 \pm 0,02^{\circ}$
Entspr. % Hefegummi	—	2,97
% Hefegummi der Trockensubstanz . . .	—	55

Bei der Messung der Inversionsgeschwindigkeit wurde immer zu 60 ccm 8%iger Rohrzuckerlösung 1 ccm der Enzymlösung bei 18–18,5° gegeben und die fortschreitende Inversion durch Proben nach 6, 8, 10 und 12 Minuten verfolgt, die mit Sodalösung vermischt und dann polarisiert wurden (10 ccm der Probe und 10 ccm einer 5%igen Sodalösung). Bei den Polarisationen wurde ein sehr genaues Instrument von Winkel in Göttingen gebraucht.

Bei den Filtrationen wurden 15 cm-Filter verwendet und der einfache Ultrafiltrationsapparat nach Zsigmondy²⁾³⁾ mit

¹⁾ Betreffs den Angaben des Saccharasegehalts vgl. Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 269 (1919).

²⁾ Zsigmondy, Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 26, S. 447 (1913).

³⁾ Zsigmondy und Jander, Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 58, S. 241 (1919).

gewölbter Siebplatte und $8\frac{1}{2}$ cm Siebfläche. Die Durchlässigkeitsangaben schließen sich denen des Lieferanten an und können bis auf 50% unsicher sein. Die Saccharaselösungen filtrierte überraschenderweise ohne zu schäumen.

1. Filtration durch de Haëns Membranfilter.

Es wurden in jedem Falle etwa 10 ccm Enzymlösung 3 Ea filtriert und die Filtrate auf Enzymgehalt und Trockengewicht untersucht.

Bezeichnung des Membrans	k · 10 ⁻⁴ pro ccm	% von 326	Trockengew. %	If.	± 0 ^o Minuten
3 Ea, unfiltriert	326	—	5,04	3,1	14,9
20 Sekunden	292	90	4,80	2,8	16,5
60 "	326	100	4,24	3,69	12,5
85 "	209	64	2,42	4,15	11,1
120 "	289	89	3,72	3,73	12,4
300 "	215	66	2,69	3,84	12,0
360 "			Keine Filtration		
420 "			Keine Filtration		
600 "			Keine Filtration		

2. Filtration durch Kollodiummembrane.

Die Kollodiummembrane wurden dargestellt durch Verdünnen gewöhnlichen käuflichen Kollodiums mit 2—3 Teilen Äther und Ausgießen von je 6—8 ccm auf flache Schalen von 15 cm Durchmesser. Nach Verdunsten des Äthers wurde die fertige Membran sofort mit Wasser losgelöst und kam unmittelbar zur Anwendung.

Bei den Filtrationen sammelten sich die Kolloide der Enzymlösung oberhalb des Filters an, ohne dasselbe zu verstopfen. Es entstand zuletzt ein gummiähnlicher Brei, der mit wenig Wasser aufgenommen und als „Rückstand“ untersucht wurde.

	Filtrate					Rückstände				
	k · 10 ⁻⁴ pro ccm		Trockengew. %	If.	± 0° Min.	k · 10 ⁻⁴ pro ccm		Trockengew. %	If.	± 0° Min.
3Ea, unfiltr.	326	100	5,04	3,1	14,9	—	—	—	—	—
Filtrat I . . .	0	0	1,50	0	—	660	6,49	4,88	9,5	—
Filtrat II . . .	0	0	1,71	0	—	472	4,83	4,7	9,8	—
3Eb, unfiltr.	343	100	5,43	3,04	15,2	—	—	—	—	—
Filtrat III . . .	0	0	1,92	0	—	419	4,44	4,54	10,2	—
3Fα6, unfiltr.	1425	100	10,9	6,2	7,45	—	—	—	—	—
Filtrat IV . . .	601	42	—	—	—	—	—	—	—	—
Filtrat V . . .	691	48	—	—	—	—	—	—	—	—
Filtrat VI . . .	100	7,0	—	—	—	—	—	—	—	—
Filtrat VII . . .	103	7,25	—	—	—	2219	17,9	5,95	7,75	—

Bei den oben definierten Lösungen 3Ea und b konnte also durch die Abfiltrierung der niedrigmolekularen Substanzen (Aminosäuren u. a.) eine Verbesserung der Inversionsfähigkeit pro g Trockengewicht mit etwa 50% erzielt werden. Die Lösung 3Fα6 (vgl. Diese Zeitschr. Bd. 109, S. 85 [1920]) verhielt sich etwas abweichend. Hier passierten bei den Filtrationen IV und V zwischen 40 und 50% des Enzyms die Membrane und erst bei Verwendung der sehr undurchlässigen Membrane VI und VII (aus je 10 ccm 8%igem Kolloidum hergestellt) wurden über 90% des Enzyms zurückgehalten, so daß eine erhebliche Konzentration erzielt werden konnte. Wie kolossal schnell die Inversion von 60 ccm einer 8%igen Rohrzuckerlösung durch 1 ccm des Rückstandes VII bei 18° C. bewirkt wird, geht aus den folgenden Zahlen hervor:

Zeit	Drehung 1 dm-Rohr	k · 10 ⁻⁴
0	+ 2,65°	—
1 Minute	+ 1,21°	2230
2 Minuten	+ 0,37°	2200
3 „	— 0,16°	2227

Zusammenfassung.

Eine Trennung der Substanzen Saccharase und Hefegummi läßt sich durch Membranfiltration nicht ausführen. Dies scheint die zuerst von Euler und Fodor ausgesprochene Vermutung über eine chemische Verwandtschaft zwischen diesen beiden Verbindungen zu bestätigen, wonach also der Gummi als Träger des hohen Molekulargewichts dieses Enzyms angesehen werden sollte.

Die Verbesserung der Reinheit der Enzympräparate durch Filtration durch Kollodiummembrane entspricht sehr genau unseren bei der Dialyse durch solche Membrane erhaltenen Resultaten. Eine Verschiedenheit zwischen der Dialysewirkung und der Filtrationswirkung, worüber Bechhold berichtet¹⁾, läßt sich also in diesem Fall nicht feststellen.

Herrn Professor Dr. R. Zsigmondy und Herrn Privatdozenten Dr. R. Wintgen bin ich für die freundliche Aufnahme im Institut für anorganische Chemie in Göttingen sowie für das meinen Arbeiten entgegengebrachte Interesse zu bleibendem Dank verpflichtet.

¹⁾ Levy, Ref. in Bechhold, Kolloid-Zeitschr. Bd. II, H. 1 und 2 (1907).