

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.  
Bd. 350, S. 129—138, Februar 1969

## Verwendung wasserunlöslicher Enzymharze mit polyanionischer und polyamphoterer Harzmatrix zur Isolierung von Proteaseinhibitoren

HANS FRITZ\*, MARIA GEBHARDT, EDWIN FINK, WOLFGANG SCHRAMM und EUGEN WERLE

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen Klinik der Universität München

(Der Schriftleitung zugegangen am 31. Oktober 1968)

**Zusammenfassung:** Wasserunlösliche Enzymharze, in denen die Enzyme an einen einseitig negativ geladenen Harzträger (Kopolymer aus Maleinsäure und Äthylen, LEVIN und Mitarb.<sup>16</sup>) fixiert sind, binden nur solche Inhibitoren, deren isoelektrische Punkte über etwa 4—5 liegen. Durch Einführung basischer Gruppen in das Harzgerüst wird die stark negative Ladung der Kopolymerketten „neutralisiert“: Diese polyamphoterer Enzymharze besitzen ein wesentlich höheres spezifisches Bindungsvermögen gegenüber Inhibitoren als die entsprechenden polyanionischen Enzymharze und eignen sich deshalb auch zur Isolierung von Inhibitoren mit

niedrigen isoelektrischen Punkten. Außerdem werden die Inhibitoren aus ihren wasserunlöslichen Komplexen mit den polyamphoterer Enzymharzen bei wesentlich geringeren H<sup>+</sup>-Konzentrationen abgelöst als aus denen der entsprechenden polyanionischen Enzymharze. Folgende Inhibitoren wurden verwendet bzw. isoliert: Trypsininhibitor aus Pankreas von Schwein und Schaf, Trypsininhibitoren aus Sojabohnen und Ovomuroid, Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Samenblasen von Meerschweinchen, Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderlunge (Trasyol), Trypsininhibitoren aus Schweineseren.

**Summary:** *The use of water-insoluble enzyme resins with polyanionic and polyamphoterer resin matrices for the isolation of protease inhibitors.* Water-insoluble enzyme resins, in which the enzymes are bound to a unilaterally negatively charged resin carrier (copolymer of maleic acid and ethylene, LEVIN et al.<sup>16</sup>) will only bind inhibitors whose isoelectric points lie above pH 4—5. When the strong negative charge of the copolymer chains is neutralised by the introduction of basic groups into the resin structure, the polyamphoterer enzyme resins possess an essentially higher specific binding capacity for inhibitors than the corresponding polyanionic enzyme resins; they are therefore suitable

for the isolation of inhibitors with lower isoelectric points. Furthermore, much lower H<sup>+</sup>-concentrations are required to remove the inhibitors from their water-insoluble complexes with the polyamphoterer enzyme resins than from the corresponding polyanionic enzyme resin-inhibitor complexes. The following inhibitors were used or isolated: trypsin inhibitor from swine and sheep pancreas, trypsin inhibitors from Soya beans and ovomucoid, trypsin-plasmin inhibitor from the seminal vesicles of the guinea pig, trypsin-kallikrein inhibitor from bovine lung (Trasyol), trypsin inhibitors from swine sera.

Proteaseinhibitoren mit einem Molekulargewicht um 6000, die in sauren Lösungen stabil sind, lassen sich auf einfache und spezifische Weise mit Hilfe wasserunlöslicher Enzymharze isolieren<sup>1-3</sup>. Im Ver-

lauf weiterer Untersuchungen fanden wir, daß die Bindung eines Inhibitors an das kovalent am Harz (Kopolymer aus Maleinsäure und Äthylen) fixierte Enzym nicht nur von sterischen Effekten, sondern auch vom Ladungscharakter der Harzmatrix stark

\* Postanschrift: Dr. H. FRITZ, D-8 München 15, Nußbaumstraße 20.

<sup>1</sup> H. FRITZ, H. SCHULT, M. NEUDECKER u. E. WERLE, *Angew. Chem.* **78**, 775 [1966]; *Angew. Chem. int. Edit.* **5**, 735 [1966].

<sup>2</sup> H. FRITZ, H. SCHULT, M. HUTZEL, M. WIEDEMANN u. E. WERLE, *diese Z.* **348**, 308 [1967].

<sup>3</sup> H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD, H. HAENDLE u. E. WERLE, *Ann. New York Acad. Sci.* **146**, 400 [1968].

beeinflusst wird. Es gelang uns nun, durch den Einbau basischer Gruppen den einseitig polyanionischen Ladungscharakter der Harzmatrix zu „neutralisieren“<sup>4, 5</sup>. Die auf dieser Basis hergestellten sog. N-Enzymharze eignen sich im Gegensatz zu den polyanionischen, sog. A-Enzymharzen, auch zur Isolierung höhermolekularer Inhibitoren mit relativ niedrigen isoelektrischen Punkten, wie z. B. dem Trypsininhibitor aus Sojabohnen und aus Hühnereiklar (Ovomucoid).

## Material und Methoden

### Material

*N,N*-Dimethyl-äthylendiamin, Schuchardt; EMA-Harze, Monsanto; Hexamethylendiamin, Fluka; Triäthanolamin-hydrochlorid, Boehringer Mannheim GmbH; Plasmin Novo\* und Trypure Novo\*\*, Novo Industrie; Inhibitoren: Ovomuroid, Worthington; Trypsininhibitor aus Sojabohnen, Serva; Trypsininhibitor aus Schweinepankreas<sup>6</sup>; Trypsin-Kallikrein-Inhibitor Trasylol\*\*, Farbenfabriken Bayer. Der Reinheitsgrad der verwendeten Präparate ist den Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

### Aktivitätsbestimmung und Hemmung von Trypsin und Plasmin

Die Bestimmung der Aktivität und Hemmung von Trypsin erfolgte mit Hilfe des Substrates *N*-Benzoyl-arginin-*p*-nitro-anilid<sup>7, 8</sup>: 1 mU Trypsin entspricht einer Extinktionsänderung  $\Delta E_{405}$  von 0,00332/Min. (hervorgerufen durch ca. 1  $\mu$ g Trypure Novo), 1 mIU der Verminderung der Extinktionsänderung um denselben Betrag. Zur Bestimmung der Aktivität und Hemmung von Plasmin verwendeten wir das Substrat *N*-Benzoyl-arginin-äthylester, dessen Spaltung mit Hilfe eines Indikatorsystems (Alkoholdehydrogenase aus Hefe, 15418 EAAD-NAD, 15300 CNA, Boehringer Mannheim GmbH) verfolgt

\* Wir danken der Fa. Novo Industrie, Mainz, für die Überlassung des Präparates.

\*\* Den Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, sind wir für die Überlassung größerer Mengen dieser Präparate zu großem Dank verpflichtet.

<sup>4</sup> H. FRITZ, Habilitat. I. Mediz. Fakultät d. Univers. München, 1968.

<sup>5</sup> H. FRITZ, K. HOCHSTRASSER, E. WERLE, B. BREY u. M. GEBHARDT, Z. analyt. Chem., im Druck.

<sup>6</sup> H. FRITZ, I. HÜLLER, M. HUTZEL, M. WIEDEMANN u. E. WERLE, diese Z. 348, 405 [1967].

<sup>7</sup> H. FRITZ, G. HARTWICH u. E. WERLE, diese Z. 345, 150 [1966].

<sup>8</sup> H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE in H. U. BERGMAYER: Methoden der Enzymatischen Analyse, im Druck.

wurde<sup>8, 9</sup>: 1 mU Plasmin entspricht einer Extinktionsänderung  $\Delta E_{366}$  von 0,0011/Min. bzw. ca. 0,002 Novo-Einheiten Plasmin.

Zur Bestimmung des *Biuret-Proteins*: mg Protein/Probe =  $E_{546} \cdot 36$ ; Schichtdicke der Meßküvette: 1 cm; Endvolumen: 10 ml, davon 5 ml Biuret-Reagens.

## Ergebnisse

### 1. Zur Wahl des EMA-Harzes

Die im Handel erhältlichen EMA-Harze (Kopolymere aus Maleinsäureanhydrid und Äthylen) wurden hinsichtlich ihres Anteils an freien Carboxylgruppen und ihrer Verseifungsgeschwindigkeit untersucht. Dabei wurden nicht nur von Typ zu Typ, sondern auch von Charge zu Charge z. T. beträchtliche Unterschiede gefunden (vgl. Tab. 1). Zur Herstellung wasserunlöslicher Proteinharze eignen sich vor allem solche Harzchargen, bei denen der Anteil der freien Carboxylgruppen zwischen 1 und 5% liegt. EMA-Harze mit höherem Gehalt an freien Carboxylgruppen hydrolysieren zu rasch; bei Harzen mit niedrigem Gehalt an Carboxylgruppen ist die Benetzbarkeit in wäßriger Lösung so sehr vermindert, daß auch bei langen Reaktionszeiten nur relativ geringe Proteinmengen gebunden werden.

### 2. Herstellung der Enzymharze

Aufgrund des unterschiedlichen Reaktionsvermögens der EMA-Harze ist es ratsam, jede neue Harzcharge auf ihre Bindungskapazität und Bindungsgeschwindigkeit für Proteine zu untersuchen: 20 mg EMA-Harz werden zu einer eisgekühlten (0–4°C) Mischung aus 2 ml 0,1-proz. Hexamethylendiaminlösung und 7,5 ml 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, gegeben, die Suspension wird kurz homogenisiert (Ultraturrax) und danach unter Kühlung lebhaft gerührt. 2 Min. nach der Harzzugabe wird die Suspension mit einer gekühlten Lösung von 100 mg Trypsin in 7,5 ml desselben Puffers versetzt. Nun werden bei rasch verseifenden Harzen im Abstand von Minuten, bei langsamer verseifenden Harzen in größeren Zeitabständen Proben entnommen (Pipette mit abgebrochener Spitze verwenden!) und sofort durch Faltenfilter filtriert. Im Filtrat wird die Konzentration an gelöstem, d. h. nicht an das Harz gebundenem Trypsin bestimmt.

Liegt der Gehalt an freien Carboxylgruppen bei den verwendeten EMA-Harzen zwischen 1 und 5%, so sind bereits nach einigen (2–5) Min. maximale Mengen (80–95%) des eingesetzten Enzyms am Harz fixiert. Mit zunehmendem Gehalt an freien

<sup>9</sup> I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, diese Z. 325, 48 [1961].

Carboxylgruppen im Ausgangsharz nimmt die Menge des insgesamt gebundenen Trypsins rasch ab; bei Harzen mit geringerem Gehalt (unter etwa 1%, z. B. 31-D 3255 in Tab. 1) ist die Fixierung des

Enzyms bei mäßiger Ausbeute erst nach 6–10 Std. beendet.

Tab. 1. Freie Carboxylgruppen in % und Verseifungsgeschwindigkeit von EMA-Harzen in Wasser.

Versuchsdurchführung und Auswertung: Die angegebene Harzmenge wurde auf den Boden des trockenen Titriergefäßes (Volumen: 2,5 ml) gegeben. Danach wurden in das Titriergefäß gleichzeitig 1,2 ml dest. Wasser, die Elektroden und der Magnet eingebracht und sofort Autotitratoren (Radiometer Copenhagen, Kombination SBR 2, TTT 1c und ABU 1b) und Rührer eingeschaltet. Der Verbrauch an 0,01N NaOH (0,25-ml-Bürette) wurde bei konstantem Papiervorschub (1 cm/Min.) registriert. Alle Harzchargen zeigten nach einem Sofortverbrauch an NaOH — ein Maß für den Gehalt an freien Carboxylgruppen — konstante Hydrolysegeschwindigkeit, die erst bei hohen Verseifungsgraden wieder zunahm. Zur Berechnung: 1,28 mg EMA-Harz (enthaltend 10  $\mu$ Mol Anhydridgruppen) würden bei völliger Verseifung 2,0 ml (20  $\mu$ Mol) 0,01N NaOH verbrauchen. Bei der Berechnung der sofort titrierbaren, bereits freien Carboxylgruppen wurde die von Beginn der Titration bis zum Knickpunkt der Kurve daneben ablaufende Verseifungsreaktion berücksichtigt.

EMA-Harz	pH-Wert	spon- tan ver- seift <sup>a</sup>	Verseifungs- geschw. NaOH- Verbrauch	Zeit bis zur völligen Verseifung <sup>b</sup>
Typ Charge [mg]		[%]	[ $\mu$ Mol/Min.]	[Std.]
11 D 1981	10 8,0	0,1	0,29	9,0
21 D 3100	10 8,0	< 0,1	0,08	33
31 D 3255	10 8,0	0,1	0,06	43
B 2 <sup>c</sup>	10 8,0	0,4	0,17	15,4
D 2159	10 7,5	0,5	0,26	10
	8,0	0,4	0,31	8,4
	8,2	0,3	0,54	4,8
	8,5	0,3	0,33	7,8
	9,0	0,3	0,8	3,3
B 1 <sup>c</sup>	2 8,0	2,1	0,24	2,2
D 1180	1 8,0	> 10	1,5	0,17
getrocknet <sup>d</sup>	1 8,0	0,8	0,08	3,3
61 D 1852	2 8,0	2,4	0,35	1,5
71 D 2000	2 8,0	1,7	0,32	1,6
81 D 1892	1 8,0	8,4	0,5	0,5
91 D 2148	2 8,0	1,3	0,23	2,2

a Entspricht dem Gehalt an freien Carboxylgruppen, s. Text.

b Aus dem linearen Teil der Titrationskurve ohne Berücksichtigung der Zunahme der Verseifungsgeschwindigkeit bei höheren Verseifungsgraden berechnet.

c Proben der Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld.

d D 1180 12 Std. bei 140°C. über Phosphorpentoxid im Vak. getrocknet.

#### a) Polyanionische, sog. A-Enzymharze

Die Herstellung polyanionischer Enzymharze, bei denen der Harzträger ein Polyanion darstellt, wurde bereits beschrieben (s. o.)<sup>1-3</sup>. Sie erfolgt analog der Herstellung der polyamphoterer Enzymharze (s. u.), jedoch ohne Zusatz von *N,N*-Dimethyl-äthylen-diamin. Unter den oben angegebenen Voraussetzungen (1–5% freie Carboxylgruppen im Ausgangsharz) wurden 80–95% des eingesetzten Trypsins an das Harz gebunden.

#### b) Polyamphotere, sog. N-Enzymharze

Gibt man, sobald genügend Enzym an das unlösliche Harz gebunden ist, das einseitig geschützte *N,N*-Dimethyl-äthylen-diamin im Überschuß zum Reaktionsansatz, so gelingt es durch aminolytische Spaltung der noch intakten Anhydridgruppen, relativ stark basische tertiäre Aminogruppen in den Harzträger einzuführen, der damit einen polyamphoterer Charakter erhält<sup>4,5</sup>.

#### *N*-Trypsinharz

1 g EMA-31-Harz (B 1, Tab. 1) wurde zu einer auf 0–4°C gekühlten Mischung aus 100 ml 0,1proz. Hexamethylen-diaminlösung und 375 ml 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8, gegeben. Die Suspension wurde sofort unter Kühlung homogenisiert (Ultraturrax), lebhaft gerührt und nach 2 Min. (ab Harzzugabe gerechnet) mit einer 0–4°C kalten Lösung von 5 g Trypsin in 375 ml desselben Puffers versetzt. Nach 4min. Rühren dieser Reaktionsmischung wurde eine mit 2N HCl auf pH 7,8 eingestellte 50proz. (v/v) wäßrige Lösung von 20 g *N,N*-Dimethyl-äthylen-diamin dazugegeben, der Reaktionsansatz unter Kühlung noch 2 Std. gerührt und anschließend zentrifugiert (Kühlzentrifuge). In der überstehenden Lösung befanden sich, je nach verwendeter Harzcharge, 32–18% des eingesetzten Trypsins, d. h. 68 bis 82% des Trypsins wurden an das wasserunlösliche Harz gebunden. (Bedeutend niedrigere Ausbeuten an gebundenem Trypsin erhielten wir, wenn der Gehalt an freien Carboxylgruppen im Ausgangsharz unter 1% bzw. über 5% lag.) Der wasserunlösliche Enzymharz-Niederschlag wurde, mit dem doppelten Volumen Cellulosepulver Cellex XF 1 (Bio-Rad Laboratories) gemischt, in eine auf 0°C gekühlte Säule gegossen und so lange (über Nacht) mit Salz-Pufferlösung (0,1M Triäthanolamin, 0,1M NaCl, 0,01M CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8) gewaschen, bis im Durchlauf keine tryptische Aktivität mehr nachweisbar war. Das Auswaschen der noch löslichen Anteile aus dem Enzymharz gelingt auch durch mehrmaliges Auf-rühren des Enzymharzes in der Salz-Pufferlösung mit jeweils anschließender Zentrifugation.

### N-Plasminharz

Die Herstellung des N-Plasminharzes erfolgte nach der beim N-Trypsinharz angegebenen Vorschrift mit jeweils  $\frac{1}{100}$  der dort verwendeten Mengen an Reagentien. Von den eingesetzten 50 mg Plasmin Novo wurden 45 mg kovalent an den unlöslichen Harzträger gebunden.

Weiterhin wurden die Enzymharze vor ihrer Verwendung zur Inhibitorisolierung auch mit den Salz-Pufferlösungen, Harnstoff- oder Guanidinsalzlösungen ausgiebig gewaschen, die bei den betreffenden Isolierungsschritten auf die Enzymharze zur Einwirkung kommen. Dadurch wird eine Verunreinigung der Inhibitoren durch geringe Mengen eventuell löslicher Harzanteile vermieden.

### 3. Bindungskapazität und unspezifische Adsorption

Die Abhängigkeit des Bindungsvermögens eines polyamphoteren N-Trypsinharzes vom Molekulargewicht und isoelektrischen Punkt (IP) des Inhibitors wurde an 4 charakteristischen Beispielen untersucht (Tab. 2). Danach ist die Bindungskapazität um so kleiner, je größer und saurer das betreffende Inhibitormolekül ist. Bei polyanionischen A-Trypsinharzen ist diese Tendenz noch wesentlich stärker ausgeprägt: Vergleichbare Mengen des A-Trypsinharzes binden zwar etwa gleich viel Trypsin-Kallikrein-Inhibitor wie das N-Harz (vgl. Tab. 2), jedoch ca. 20% weniger von den Inhibitoren aus Sojabohnen und Eiklar.

Um eine eventuell auftretende unspezifische Adsorption von Inhibitoren durch ionische Kräfte zu untersuchen, wurden wasserunlösliche A- und N-Harze ohne Zusatz von Trypsin hergestellt. Von äquivalenten Mengen dieser proteinfreien Harze wurde aus 0,2M Salzlösung von den in Tab. 2 angegebenen Inhibitoren nur der stark basische Trypsin-Kallikrein-Inhibitor adsorbiert, und zwar am A-Harz 23% und am N-Harz 19% der in Tab. 2 angegebenen, vom Trypsinharz gebundenen Menge. Mit zunehmender Salzkonzentration in der Pufferlösung verringert sich diese unspezifisch adsorbierte Inhibitormenge: In 0,4–0,5M Salz-Pufferlösung tritt keine nennenswerte Adsorption mehr auf.

### 4. Dissoziationsverhalten von Enzymharz-Inhibitor-Komplexen

In der Abbildung sind die Dissoziationskurven verschiedener Trypsinharz-Inhibitor-Komplexe dargestellt, die unter vergleichbaren Bedingungen aufgenommen wurden. Danach erfolgt die Ablösung

Tab. 2. Bindungsvermögen eines N-Trypsinharzes für verschiedene Inhibitoren.

Ein aus EMA-31-Harz hergestelltes N-Trypsinharz wurde in gleiche, jeweils 50 mg (d. s. ca. 50 U) gebundenes Trypsin enthaltende Portionen aufgeteilt. Diese wurden in den betreffenden Inhibitorlösungen (20 ml, 0,1M NaCl plus 0,1M Triäthanolaminpuffer, pH 7,8) unter Eiskühlung 2 Std. lebhaft aufgerührt. Nach Zentrifugation wurde die Abnahme der Inhibitorkonzentration in der überstehenden Lösung bestimmt und daraus die an das N-Trypsinharz gebundene Inhibitormenge berechnet. Nach vollständiger Ablösung der Inhibitoren von den Trypsinharz-Proben in saurer Lösung (0,2M KCl/HCl-Puffer, pH 2,0, vgl. Tab. 3) wurden die Versuche zur Bestimmung der Bindungskapazität, wie angegeben, wiederholt. IP = isoelektrischer Punkt.

Trypsininhibitor	IP <sup>10</sup>	Mol.-Gew. <sup>10</sup>	vom N-Trypsinharz gebundene Inhibitormenge	
			[IU]	[%] <sup>a</sup>
Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Trasylol)	10,5	6500	24 <sup>b</sup>	48
aus Schweinepankreas	8 <sup>c</sup>	5800 <sup>d</sup>	19,5	39
aus Sojabohnen	4,5	20000 bis 24000	16	32
aus Ovomuroid	3,8–4,5	24000 bis 28000	6,5	13

a Bezogen auf das Inhibitorbindungsvermögen von 50 mg gelöstem, nicht gebundenem Trypsin.

b Verwendung von 0,4M (davon 0,3M NaCl) statt 0,2M Salz-Pufferlösung bei der Bindung des Inhibitors an das Trypsinharz.

c l. c. <sup>4</sup>

d l. c. <sup>4, 11, 12</sup>

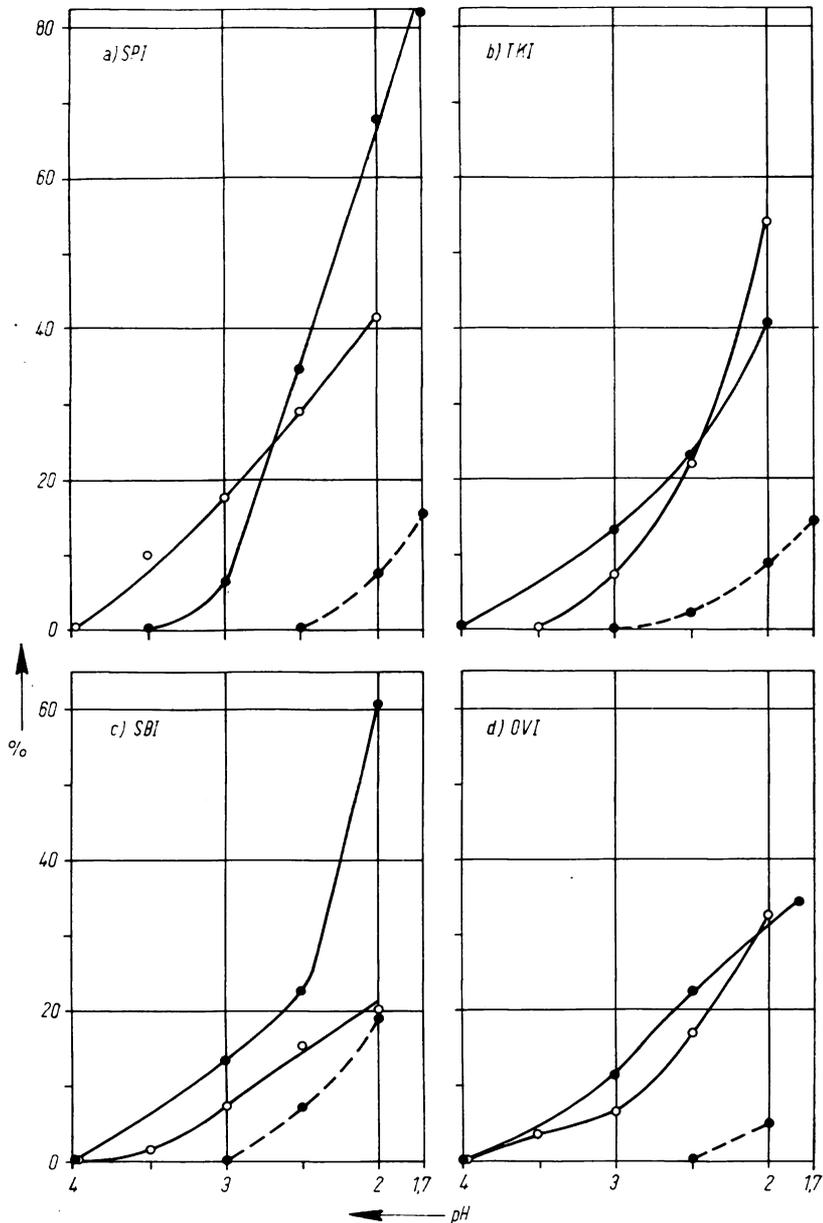
der Inhibitoren aus den polyamphoteren N-Trypsinharz-Komplexen (ausgezogene Kurven) bereits bei wesentlich geringeren H<sup>+</sup>-Konzentrationen als bei den einseitig polyanionischen A-Trypsinharz-Komplexen. Vergleicht man das Verhalten von N-Trypsinharz-Komplexen mit höherem Harzanteil (○—○, Gewichtsverhältnis\* Harz:Trypsin etwa 1:2,5) mit solchen mit niedrigerem Harzanteil (●—●, Gewichtsverhältnis\* Harz:Trypsin etwa 1:4), so findet man bei letzteren bei demselben pH-

\* Berechnet aus der bei der Harzherstellung gebundenen Trypsinmenge und der eingesetzten Harzmenge.

<sup>10</sup> R. VOGEL, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, *Natürliche Proteinase-Inhibitoren*, Thieme-Verlag, Stuttgart 1966.

<sup>11</sup> H. TSCHESCHE, diese Z. **348**, 1216 [1967].

<sup>12</sup> L. J. GREENE, J. J. DiCARO, A. J. SUSSMAN u. D. C. BARTELT, *J. biol. Chem.* **243**, 1804 [1968].



Dissoziationskurven wasserunlöslicher Trypsinharz-Inhibitor-Komplexe.

Aus EMA-31 hergestellte A-Trypsinharze (●—●) und N-Trypsinharze (●—●: ca. 80%, ○—○: ca. 50% des Trypsins bei der Harzherstellung gebunden; vgl. S. 130f.) wurden, wie in Tab. 2 angegeben, in den betreffenden Inhibitorlösungen aufgerührt, danach wurde der Inhibitorüberschuß durch mehrmaliges Aufrühren der Trypsinharz-Inhibitor-Komplexe in 0,2M Salz-Pufferlösung (pH 7,8, 0°C) und jeweils anschließende Zentrifugation vollständig entfernt. Der Harzniederschlag wurde in 20–60 ml/ 0,2M KCl-Lösung (0°C) aufgeschlämmt und mit Hilfe eines pH-Meters der gewünschte pH-Wert (Reihenfolge: 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,7) durch Zugabe von 2N HCl eingestellt. Danach wurde die Suspension bei dem betreffenden pH-Wert 0,5–1 Std. unter Eiskühlung gerührt und nach Zentrifugation die Inhibitorkonzentration in der überstehenden Lösung bestimmt. — Zur Untersuchung der Dissoziation des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors, Kurve (○—○), wurde eine 0,4M KCl/HCl Lösung verwendet. Ordinatens: % der bei dem betreffenden pH-Wert der Suspension (Abszissen) vom Trypsinharz-Komplex abgelösten Inhibitormenge, bezogen auf die insgesamt von der betreffenden Trypsinharzprobe gebundene Inhibitormenge. SPI = Schweinepankreas-Inhibitor; TKI = Trypsin-Kallikrein-Inhibitor; SBI = Sojabohnen-Inhibitor; OVI = Ovomucoïd-Inhibitor.

Wert z. T. wesentlich höhere Dissoziationsgrade. — Die Abweichung von diesem Verhalten beim Komplex mit dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor ist methodisch bedingt, da hier beide Kurven unter verschiedenen Versuchsbedingungen (●—●: 0,2M KCl/HCl-Puffer, ○—○: 0,4M KCl/HCl-Puffer) aufgenommen wurden. Der Dissoziationsgrad der ●—●-Kurve ist in Wirklichkeit höher, da dieser Inhibitor in 0,2M Salz-Pufferlösung vom Harzträger auch in unspezifischer Weise adsorbiert wird (vgl. S. 132).

Die Dissoziationsversuche ließen sich mit denselben Ergebnissen wiederholen, nachdem die Komplexe jeweils mit saurer Salz-Pufferlösung (pH 2 bei N-Harzen, pH 1,7 bei A-Harzen) vollständig dissoziiert und die so regenerierten Trypsinharze aufs Neue mit den Inhibitoren beladen worden waren. Die Bedeutung der erhaltenen Befunde für die Isolierung von Inhibitoren wird in der Diskussion erörtert.

Der Komplex eines N-Plasminharzes mit dem Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Meerschweinchen-Samenblasen<sup>3,13</sup> wurde ebenfalls auf sein Dissoziationsverhalten untersucht. Unter den in der Abbildung angegebenen Bedingungen sind von der bei pH 7,8 gebundenen Inhibitormenge (6150 mIU für Trypsin) bei pH 4 23%, pH 3 30% und bei pH 2 37% dissoziiert.

### 5. Isolierung von Inhibitoren mit N-Enzymharzen

#### a) Trypsininhibitor aus Schweinepankreas

Die Bauchspeicheldrüsen wurden nach einem bei der Gewinnung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors bewährten Verfahren aufgearbeitet und die in wäßrigem Methanol löslichen Substanzen an Kieselgur\* adsorbiert<sup>10</sup>. Durch mehrmaliges Aufrühren des Kieselgurniederschlags in dest. Wasser wurde eine inhibitorhaltige Lösung erhalten, die durch Zugabe von krist. NaCl, Triäthanolaminhydrochlorid und 2N NaOH auf eine 0,2M Salz-Pufferkonzentration vom pH-Wert 7,8 eingestellt wurde.

In diese gekühlte (0–4°C) Lösung wurde ein aus EMA-31-Harz hergestelltes N-Trypsinharz (mit 6 g gebundenem Trypsin) eingebracht und die Suspension 1,5 Std. lang unter Kühlung (0–4°C) gerührt. Danach wurde zentrifugiert und der Inhibitorgehalt der überstehenden Lösung bestimmt. Der Harzniederschlag wurde 3mal in eiskalter 0,2M Salz-Pufferlösung, pH 7,8, aufgerührt und anschließend jeweils abzentrifugiert.

\* Wir danken den Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, für die Herstellung des Kieselguradsorbates.

<sup>13</sup> H. HAENDLE, H. FRITZ, I. TRAUTSCHOLD u. E. WERLE, diese Z. 343, 185 [1965].

Zur Ablösung des Inhibitors aus dem Trypsinharz-Komplex wurde der Harzniederschlag 1 Std. in 0,2M KCl/HCl-Puffer, pH 2, unter Kühlung (0–4°C) aufgerührt, danach abzentrifugiert und der Inhibitor- und Proteingehalt des sauren Überstandes bestimmt. Zur völligen Ablösung des Inhibitors wurde die Prozedur mit frischem KCl/HCl-Puffer wiederholt.

Nach dem beschriebenen Verfahren wurden mehrere Inhibitorchargen mit unterschiedlichem Reinheitsgrad über dasselbe Trypsinharz aufgearbeitet; zwei willkürlich ausgewählte Beispiele sind in Tab. 3 aufgeführt.

Die sauren Inhibitorlösungen wurden durch Zugabe von krist. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf pH 4–5 gebracht, im Vak. konzentriert und anschließend auf mit 0,05M Collidinacetat, pH 8, oder 0,02M Ammoniumacetat, pH 7,5, äquilibrierten Sephadex-G-50-Säulen fraktioniert. Die nach Lyophilisation der inhibitorhaltigen Fraktionen anfallenden Inhibitorpräparate (Ausbeute: 80–90%, bezogen auf den Gehalt der sauren „Desorbate“) besitzen eine spezif. Aktivität von 2,7–3,0 mIU/μg Protein.

Bei den N-Trypsinharzen tritt, ebenso wie bei den A-Harzen, auch bei häufiger Verwendung zur Inhibitorisolierung erst nach mehreren Monaten ein spürbarer Verlust an Bindungsvermögen auf, der durch ausreichende Kühlung (0–4°C) aller mit den Harzen in Kontakt kommenden Lösungen sowie durch Zusatz bakterizider Substanzen (z. B. Chloroform, Phenol) bei der Aufbewahrung (0–4°C) der Trypsinharze sehr verlangsamt wird. Ähnliche Beobachtungen liegen aus dem Arbeitskreis von TSCHESCHE vor<sup>14</sup>.

#### b) Trypsininhibitor aus Schafspankreas

Pankreashomogenate wurden durch Behandlung mit 3proz. Perchlorsäure von höhermolekularen Proteinen und vom Trypsinogen befreit<sup>7</sup>. In die auf pH 7,8 eingestellten Extrakte (250 IU in 1,5 l) wurde, wie beschrieben, das N-Trypsinharz (mit ca. 6 g gebundenem Trypsin) eingerührt; die weitere Aufarbeitung erfolgte in analoger Weise wie beim Inhibitor aus Schweinepankreas. Quantitative Angaben sind Tab. 3 zu entnehmen. Spezif. Aktivität des Inhibitorpräparates nach Sephadex-G-50-Gelfiltration (s. o.): 3–4 mIU/μg Protein.

#### c) Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Samenblasen von Meerschweinchen

Die inhibitorhaltigen Extrakte wurden wie früher beschrieben<sup>7,8,13</sup> gewonnen. Die Isolierung des Inhibitors über das N-Trypsinharz erfolgte nach der beim Inhibitor aus Schweinepankreas angegebenen Vorschrift: quantitative Angaben sind in Tab. 3 enthalten. Spezif.

<sup>14</sup> H. TSCHESCHE u. H. KLEIN, diese Z. 349, 1645 [1968]. H. KLEIN, Dissertation, I. Mediz. Fakultät d. Univers. München, 1969.

Tab. 3. Quantitative Angaben zur Isolierung von Inhibitoren über N-Trypsinharze. Die Versuchsdurchführung ist im Text beschrieben.

	Inhibitor aus					
	Schweinepankreas		Schafspankreas		Samenblasen von Meerschweinchen	
Inhibitorgehalt [IU]	694	1038	250	150	540	594
spezif. Aktivität [mIU/ $\mu$ g]	0,014	0,13	0,009	0,009	0,15	0,15
Vol. des Ausgangsextraktes [l]	2,0	0,72	1,5	1,2	3,0	3,3
vom Trypsinharz nicht gebundene Inhibitormenge [IU]	23	48	49,7	53,6	9	24
In saurer Lösung abgelöste Inhibitormenge [IU]						
1. „Desorbat“	426 <sup>a</sup>		108,5 <sup>c</sup>	47,5		
2. „Desorbat“	32,6 <sup>b</sup>		17 <sup>d</sup>	10,0		
insgesamt	458,6	685	125,5	57,5	425 <sup>e</sup>	544 <sup>e</sup>
% der gebundenen Inhibitormenge	68,5	66	63	60	80	95
spezif. Aktivität [mIU/ $\mu$ g Protein] <sup>f</sup>	0,32	0,4	1,0		1,6	1,6

a in 1,0 l; b in 0,6 l; c in 0,33 l; d in 90 ml. e Nach 4maliger Extraktion des Harz-Komplexes. f Vgl. dazu die Diskussion.

Aktivität des Inhibitorpräparates nach Sephadex-G-50-Gelfiltration: 2,9 mIU/ $\mu$ g Protein.

Zur Isolierung dieses Inhibitors verwendeten wir auch ein polyamphoteres *N-Plasminharz* (Herstellung s. S. 132), das etwa 45 mg Plasmin gebunden enthielt. Von den im Ausgangsextrakt (112 ml, 0,2M Salz-Pufferlösung, pH 7,8) enthaltenen 12,6 IU für Trypsin (spezif. Aktivität: 0,0084 mIU/ $\mu$ g Protein) wurden beim Rühren über Nacht (Kühlung!) 7,5 IU vom *N-Plasminharz* gebunden, d. s. ca. 65% der Inhibitormenge, die zur Inaktivierung von 45 mg gelöstem Plasmin Novo nötig wären. Nach dem Auswaschen der Begleitsubstanzen und Aufrühren des unlöslichen Plasmin-Inhibitor-Komplexes in 0,2M KCl/HCl-Puffer (18 ml, 1 Std., Kühlung), pH 2, befanden sich 5,4 IU, d. s. 72% des gebundenen Inhibitors im sauren Überstand mit einer spezif. Aktivität von 0,38 mIU/ $\mu$ g Protein. Nach der bei diesem Isolierungsschritt erzielten 45fachen Anreicherung des Inhibitors gelingt seine Reindarstellung (spezif. Aktivität: 3 bis 4 mIU/ $\mu$ g Protein) durch anschließende Fraktionierung an Sephadex-G-50-Säulen<sup>15</sup>.

In einem weiteren Ansatz mit demselben *N-Plasminharz* wurde der Inhibitor in einer Ausbeute von 75% vom Harz abgelöst. Da Plasmin in schwach sauren Lösungen (pH 2–3) sehr stabil ist, können auch Plasminharze wiederholt zur Isolierung von Inhibitoren verwendet werden.

Der *Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderlung* wird vom *N-Plasminharz* ebenfalls gebunden, wo-

<sup>15</sup> H. FRITZ, E. FINK, W. SCHRAMM, K. HOCHSTRASSER u. E. WERLE, in Vorbereitung.

bei praktisch das gesamte am *N-Harz* fixierte Plasmin auch zur Komplexbildung befähigt ist. Die Ablösung des Inhibitors vom Komplex erfolgte unter den gleichen oben geschilderten Bedingungen. Im Gegensatz dazu wird der *Inhibitor aus Sojabohnen* vom *N-Plasminharz* nicht gebunden.

#### d) *Trypsininhibitor aus Sojabohnen*

Ein käufliches Inhibitorpräparat (149,4 IU für Trypsin, spezif. Aktivität: 0,36 mIU/ $\mu$ g Protein) wurde nach der beim Inhibitor aus Schweinepankreas angegebenen Vorschrift über ein *N-Trypsinharz* gereinigt. Spezif. Aktivität des vom *N-Trypsinharz*-Komplex in 90proz. Ausbeute abgelösten Inhibitors: 0,53 mIU/ $\mu$ g Protein. Nach Fraktionierung über eine Sephadex-G-50-Säule betrug die spezif. Aktivität des Inhibitorpräparates 1,5 mIU/ $\mu$ g Protein.

#### e) *Trypsininhibitor aus Serum*

Der nach Säurebehandlung (Zusatz von Perchlorsäure bis pH 1,0) von Rinder- und Schweineserum in Lösung verbleibende Trypsininhibitor (10–14 IU in 40 ml) wurde vom *N-Trypsinharz* nahezu quantitativ gebunden. Aus nativem Schweineserum werden dagegen von einer *N-Trypsinharzm*enge, die 50 mg Trypsin gebunden enthält, nur 2,3 IU gebunden. Die Ablösung der Serum-Trypsininhibitoren vom Harz-Komplex mit sauren Pufferlösungen gelang nicht.

## Diskussion

Bei den polyanionischen EMA-Enzymharzen sind die fixierten Proteinmoleküle in ein einseitig negativ geladenes Harzgerüst eingebettet<sup>16</sup>. Infolge des starken, von den Kopolymerketten ausgehenden elektrischen Feldes ist die Konzentration von Protonen und positiv geladenen Molekülen in der unmittelbaren Nähe des Harzgerüsts, im Harzgel, größer als in der im Gleichgewicht damit stehenden Lösung. Das pH-Optimum der Aktivitätskurven von polyanionischen Trypsinharzen ist entsprechend um bis zu 2,5 pH-Einheiten zur basischen Seite verschoben<sup>16, 17</sup>; die MICHAELIS-Konstante ist, unter jeweils optimalen Bedingungen gemessen, beim System *N*-Benzoyl-argininamid/A-Trypsinharz bis zu 30mal so klein wie beim entsprechenden System in Lösung<sup>17</sup>. Mit wachsender Ionenstärke und mit zunehmendem Proteinanteil im Harz nähern sich erwartungsgemäß im allgemeinen die mit den polyanionischen Trypsinharzen gefundenen Werte denen des ungebundenen Trypsins<sup>16, 17</sup>.

LEVIN und Mitarbeiter<sup>18</sup> konnten weiterhin zeigen, daß die Spaltungsaktivität von EMA-Trypsinharzen gegenüber höhermolekularen Substraten wie Casein, Hämoglobin und Lysozym nicht nur aus sterischen Gründen vermindert ist, sondern sich unter sonst gleichen Bedingungen auch bei Erhöhung der negativen Ladung des Harzgerüsts (Inkubation bei pH 9,0 statt 7,5) und somit der abstoßenden Kräfte zwischen Harz und Substratmolekülen stark verringert. Ähnlich wie bei der Spaltung des Pepsinogens durch A-Trypsinharze<sup>18</sup> dürften dabei vor allem solche Arginyl- und Lysylbindungen nicht mehr an das aktive Zentrum des Trypsins angelagert und somit hydrolysiert werden, in deren Nachbarschaft sich negativ geladene Aminosäurereste befinden<sup>16</sup>.

Daß von den am polyanionischen Harzgerüst fixierten Trypsinmolekülen nur ein sehr geringer Prozentsatz imstande ist, Inhibitoren mit relativ niedrigen isoelektrischen Punkten komplex zu binden, führen wir ebenfalls auf die einseitig negative Umgebung der Enzymmoleküle zurück. Die abstoßenden Kräfte zwischen diesen Inhibitoren und

den vielen negativen Gruppen der Kopolymerketten dürften hier die bei der Komplexbildung wirksamen anziehenden Kräfte in den meisten Fällen überwiegen; außerdem werden mit zunehmender Molekülgröße auch sterische Effekte die Komplexbildung in immer stärkerem Maße erschweren. Da die Konzentration negativ geladener Inhibitoren am polyanionischen Harzgel geringer ist als in der umgebenden Lösung (s. o.), ergibt sich zusätzlich eine erhöhte Dissoziationskonstante für den fixierten Trypsin-Inhibitor-Komplex. Eventuell ist darauf zurückzuführen, daß auch bei Verwendung eines Harzüberschusses beim Bindungsschritt (vgl. Tab. 3 sowie l. c.<sup>19</sup>) jeweils eine Inhibitor-Restaktivität in Lösung verbleibt. An polyanionische Enzymharze werden deshalb nur solche Inhibitoren in für Isolierungszwecke ausreichender Menge komplex gebunden, deren isoelektrische Punkte über 4–5 liegen.

Die Einführung basischer Gruppen in die Harzmatrix hat zur Folge, daß sich ähnlich wie bei den Aminosäuren innermolekulare Zwitterionen ausbilden können. Dadurch wird der einseitig negative Ladungscharakter des Harzträgers, je nach der Zahl der eingeführten Aminogruppen, mehr oder weniger stark abgeschwächt. Die Bindungskapazität dieser polyamphoteren Trypsinharze ist in Übereinstimmung mit den obigen Überlegungen vor allem gegenüber den über pH 5 negativ geladenen Inhibitoren (vgl. S. 132f. sowie Tab. 2) beträchtlich erhöht, so daß auch die Isolierung von Inhibitoren mit relativ niedrigen isoelektrischen Punkten über ihre N-Trypsinharz-Komplexe praktische Bedeutung erlangt.

N-Plasminharze besitzen aus sterischen Gründen — das Molekulargewicht von Plasmin ist nahezu 4mal so groß wie das von Trypsin — eine wesentlich höhere Bindungskapazität auf molarer Vergleichsbasis als entsprechende N-Trypsinharze (vgl. Tab. 2). Gegenüber dem basischen Trypsin-Kallikrein-Inhibitor sind praktisch alle am Harz fixierten Plasminmoleküle zur Komplexbildung befähigt (beim N-Trypsinharz nur 48%!) gegenüber dem weniger basischen Inhibitor aus Meerschweinchen-Samenblasen (isoelektrischer Punkt bei 7–8, Mol.-Gew. bei 6000) sind es noch etwa 65%. Der negativ geladene Inhibitor aus Sojabohnen wird dagegen vom N-Plasminharz nicht mehr gebunden,

<sup>16</sup> Y. LEVIN, M. PECHT, L. GOLDSTEIN u. E. KATCHALSKI, *Biochemistry* [Washington] 3, 1905 [1964].

<sup>17</sup> L. GOLDSTEIN, Y. LEVIN u. E. KATCHALSKI, *Biochemistry* [Washington] 3, 1913 [1964].

<sup>18</sup> E. B. ONG, Y. TSANG u. G. E. PERLMANN, *J. biol. Chem.* 241, 5661 [1966].

<sup>19</sup> K. HOCHSTRASSER, M. MUSS u. E. WERLE, diese Z. 348, 1337 [1967]; K. HOCHSTRASSER u. E. WERLE, diese Z., im Druck.

wobei hier u. U. die Erhöhung der Dissoziationskonstanten beim fixierten Komplex ausschlaggebend ist.

Ein weiterer Vorteil der polyamphoteren Harzmatrix wird bei der Ablösung der Inhibitoren deutlich: Die Dissoziationskurven zeigen einen wesentlich günstigeren Verlauf als die der entsprechenden A-Trypsinharz-Komplexe (Abbildung). Die Ablösung der Inhibitoren ist deshalb nicht nur bei geringeren  $H^+$ -Konzentrationen möglich, die Hauptmenge des Inhibitors wird im „Batchbetrieb“\* bereits bei 1–2maliger Einwirkung der Pufferlösung, pH 2, im Überstand erhalten. Die Abstoßungskräfte zwischen den in saurer Lösung positiv geladenen Inhibitoren und den eingeführten basischen Aminogruppen haben demnach eine für Isolierungszwecke erwünschte beträchtliche Erhöhung der Dissoziation in diesem Bereich zur Folge.

Die bei verschiedenen N-Enzymharz-Präparationen in die Harzmatrix eingebaute Menge an *N,N*-Dimethyl-äthylendiamin wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Den geschilderten Ergebnissen ist jedoch zu entnehmen (vgl. Tab. 2 und Abbildung), daß die Bindungskapazität der Trypsinharze für Inhibitoren im allgemeinen um so größer und das Dissoziationsverhalten der Komplexe für die Isolierung um so vorteilhafter ist, je größer der Anteil an Enzym und an Aminogruppen im Harz ist. Besonders günstige Eigenschaften dürften solche Enzymharze aufweisen, bei denen sich die Ladungen der funktionellen Gruppen des Harzträgers durch innermolekulare Wechselwirkung weitgehend ausgleichen: Bei relativ hoher Bindungskapazität im neutralen pH-Bereich wird die Dissoziation im schwach sauren durch die gleichsinnige Aufladung von Harzgerüst und Inhibitor stark gefördert. Zur Isolierung von Inhibitoren mit sehr niedrigen isoelektrischen Punkten wie den Trypsininhibitoren aus Serum, Harn und Sojabohnen<sup>10</sup> werden andererseits Enzymharze mit überwiegender Gehalt an basischen Gruppen im Harzgerüst oder mit einseitig polykationischer Harzmatrix besonders vorteilhaft sein.

Der Polyelektrolytcharakter des Harzträgers ist zur Stabilisierung der fixierten Enzyme bei den häufigen pH-Umstellungen nötig. An Harzträger mit nur geringem Anteil an ionisierbaren Gruppen fixierte Enzyme werden nach unseren Untersuchungen

\* Methode, bei der die Säulenchromatographie durch wiederholtes Rühren in Puffer und Abzentrifugieren ersetzt wird.

unter den Bedingungen der Inhibitorisolierung rasch irreversibel denaturiert.

Durch die ungenügende Standardisierung der im Handel erhältlichen EMA-Harze wird die Auswahl geeigneter Harzchargen zur Enzymharz-Herstellung erschwert (vgl. Tab. 1). Wir versuchen deshalb z. Z. den geeigneten Gehalt an freien Carboxylgruppen durch Lagerung getrockneter (bei 120°C im Vak. über Phosphorpentoxyd) EMA-Harze unter Feuchtigkeit Zutritt zu erhalten. Vor der Herstellung von N-Enzymharzen ist es unerlässlich, die jeweilige Bindungsgeschwindigkeit für das betreffende Enzym zu untersuchen, um den geeigneten Zeitpunkt der Diaminzugabe zu ermitteln.

Bei allen Isolierungsschritten ist eine wirksame Kühlung auf 0–4°C erforderlich. Dadurch wird nicht nur eine vorzeitige Denaturierung der am Harz fixierten Enzyme verhindert, sondern auch ein höherer Verlust bzw. die Modifizierung temporär hemmender Inhibitoren (Trypsininhibitoren aus Pankreas<sup>3, 6, 11, 12, 14, 20</sup> und Samenblasen<sup>3, 13</sup>). Der temporäre Inhibitor aus Schweinepankreas wird während der Isolierung über das Trypsinharz zu einem geringen Prozentsatz (5–10%) modifiziert, so daß mehrere elektrophoretisch und chromatographisch trennbare Inhibitorfraktionen entstehen<sup>14</sup>. Dieser Befund dürfte auch für die anderen über Trypsinharze isolierten temporären Inhibitoren<sup>3, 6</sup> zutreffen, wobei die Modifizierung anscheinend überwiegend im sauren pH-Bereich erfolgt<sup>14, 21</sup>. Die bei der Inhibitorisolierung im „Batchbetrieb“ erhaltenen niedrigeren Ausbeuten (60–80%) als im Säulenbetrieb (80–95%<sup>1–3</sup>) sind zumindest teilweise auf einen erhöhten Abbau der Inhibitoren durch überschüssiges Trypsinharz infolge der häufigeren Kontakte beim Rühren der Suspensionen zurückzuführen. Bei der Ausbeutebestimmung ist zu beachten, daß bei der erstmaligen Verwendung der Enzymharze ein geringer Anteil in Form der betreffenden Inhibitor-Komplexe in Lösung geht. Säurestabile Inhibitoren können daraus durch Behandlung des Überstandes (Bindungsschritt) mit Perchlorsäure zurückgewonnen werden.

Die für die Inhibitoren nach der Isolierung über die

<sup>20</sup> L. J. GREENE, M. RIGBI u. D. S. FACKRE, *J. biol. Chem.* **241**, 5610 [1966]; P. J. BURCK, R. L. HAMILL, E. W. CERWINSKY u. E. L. GRINNAN, *Biochemistry [Washington]* **6**, 3180 [1967]; P. J. BURCK, E. W. CERWINSKY u. E. L. GRINNAN, *Abstr. of the Amer. chem. Soc. Meeting, Chicago, S. C-22, Sept. 1967.*

<sup>21</sup> M. RIGBI u. L. J. GREENE, *J. biol. Chem.* **243**, 5457 [1968].

Enzymharze in den sauren „Desorbaten“ gemessenen spezif. Aktivitäten (0,3—1 mIU/ $\mu$ g Protein, vgl. Tab. 3) stellen nur Orientierungswerte dar, da das in den sauren Pufferlösungen noch vorhandene Triäthanolamin-hydrochlorid im Biuret-Test einen erhöhten Proteingehalt vortäuscht. Die nach Fraktionierung der neutralisierten und konzentrierten Inhibitor-„Desorbate“ über Sephadex-G-50- bzw. -G-25-Säulen erhaltenen Inhibitorpräparate besitzen einen Reinheitsgrad von 70—90% d. Th.<sup>15</sup>. (Die

spezif. Aktivität der reinsten temporären Inhibitoren aus Pankreas und Samenblasen liegt bei 3—4 mIU/ $\mu$ g Protein<sup>3, 6</sup>). Bei den restlichen Verunreinigungen handelt es sich um in Lösung gegangene Enzymharzanteile und vom Harz unspezifisch gebundene Substanzen, die durch Ionenaustauschchromatographie von den Inhibitoren abtrennbar sind<sup>15, 19</sup>.

Wir danken der STIFTUNG VOLKSWAGENWERK, für Sachbeihilfen.