

Über die chemische Natur der Taka-Amylase. I. Enzymatische Verdauung von Taka-Amylase-Präparaten durch Proteinasen.

Von Shiro AKABORI und Kunio OKAHARA.

(Eingegangen am 7. Dezember 1936.)

Über die chemische Natur der Amylase bestand durch Jahre ein Argument zwischen den Schulen von Willstätter und Sherman. Die erstere behauptete⁽¹⁾ auf Grund Reinigungsversuche der Pankreas-amylase, dass dieses Enzym kein Protein, die letztere dagegen⁽²⁾ dass Amylase ein Protein sei. Nishimura⁽³⁾ hat Taka-amylase mit Hilfe der Adsorptionsmethode gereinigt und ein hochaktives Amylase-präparat gewonnen. Sein Präparat gibt fast alle Eiweissreaktionen und enthält 27% Kohlenhydrat. Dagegen fehlen Eiweisseigenschaften bei den gereinigten Amylasen aus *Ipomoea Batatas* nach Giri⁽⁴⁾ und aus Reismalz nach Itoh.⁽⁵⁾

Wir haben die Wirkung von Trypsin und Papain auf teilweise gereinigtes, proteinhaltiges Taka-amylase-präparat geprüft und konnten feststellen, dass die Stärkeverzuckerungswirkung dieser Amylase durch die beiden proteolytischen Enzyme nicht zerstört wird, während der Proteinanteil deutlich verdaut wird. Taka-amylase geht bei der Dialyse mit Kollodiummembran gegen 50%iges Methanol teilweise in die Aussenflüssigkeit. Aus dieser Flüssigkeit gewinnt man durch Fällen mit Methanol, Auflösen in Wasser, Adsorbieren an Tonerde und Eluieren mit einer 0.1 N Lösung von sekundärem Natriumphosphat ein Amylase-präparat, das mit Trichloressigsäure keine Fällung, aber deutliche Molisch-Reaktion gibt. Bei der Erepsinwirkung auf dieses Amylase-präparat lässt sich auch keine Abnahme der Stärkeverzuckerungswirkung beobachten.

Aus den obigen Resultaten kann man den Schluss ziehen, dass Taka-amylase kein Protein oder Polypeptid ist.

(1) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse, *Z. physiol. Chem.*, **126** (1923), 143; **142** (1925), 14; E. Waldschmidt-Leitz und M. Reichel, *Z. physiol. Chem.*, **204** (1932), 197.

(2) H. C. Sherman, M. L. Caldwell und M. Adams, *J. Am. Chem. Soc.*, **48** (1926), 2947; M. L. Caldwell, L. E. Booher und H. C. Sherman, *Science*, **74** (1931), 37; H. C. Sherman, M. L. Caldwell und S. E. Doebbeling, *J. Biol. Chem.*, **104** (1934), 501.

(3) S. Nishimura, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **2** (1926), 129.

(4) K. V. Giri, *Biochem. Z.*, **275** (1935), 106.

(5) R. Itoh, *J. Biochem.*, **23** (1936), 125.

Beschreibung der Versuche.

Amylase-präparat-A. 50 g. Taka-diastase wurden in 200 c.c. Wasser gelöst, mit 233 c.c. Methanol versetzt und die von dem abgeschiedenen Niederschlag abfiltriert. Lösung wiederum mit 367 c.c. Methanol versetzt (die Methanolkonzentration der entstandenen Lösung soll 70% sein). Der zweite Niederschlag wurde abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet. Das so erhaltene Präparat (Sf. 2.1-3.3) wurde in 75 c.c. Wasser gelöst und bei $pH = 5$ eine grosse Menge von gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Der abgeschiedene Niederschlag wurde wiederum in Wasser gelöst und mittels einer Kollodiumhülse dialysiert. Das durch Trocknen der Innenlösung gewonnene proteinhaltige Präparat hat Sf. 12-22.

Verdauungsversuche mit Trypsin. Ansätze: <5% ige Lösung des Amylase-präparats-A> 5 c.c.+<1/5 Mol Na_2HPO_4 > 2 c.c.+<Trypsin-Lösung> 1 c.c. ($T_{(e)} = 0.6$). Nach dem Verlauf von 1 bzw. 5 Stunden wurde der Amino-N nach der van Slykeschen Methode gemessen.

	Stdn. d. Verd.	Amino-N (mg.)	Amino-N-Zuwachs (mg.)
I	0	2.86	—
II	1	4.51	1.65
III	5	6.43	3.57

Amylase-Trypsin-Gemische, wie oben hergestellt, wurden auf das 100-fache verdünnt und mit je 1 c.c. dieser verdünnten Enzymlösungen deren Stärkeverzuckerungswirkung nach der Methode von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse⁽⁶⁾ gemessen.

	Stdn. d. Verd. mit Trypsin	N/10 I ₂ (c.c.)	Maltose (mg.)	A-E
I	0	4.95	84.9	0.0139
II	1	4.99	85.6	0.0140
III	5	4.97	85.2	0.0140

Verdauungsversuche mit Papain. Ansätze: <5% ige Lösung des Amylase-präparats-A> 1 c.c.+<1N Acetat ($pH = 5.0$)> 0.4 c.c.+<mit Cystein aktivierte Papain-Lösung> 0.4 c.c. +<Wasser> 3.2 c.c. Nach ein bzw. fünf Stunden wurde der Amino-N bestimmt.

	Stdn. d. Verd.	Amino-N (mg.)	Amino-N-Zuwachs (mg.)
I	0	0.69	—
II	1	1.19	0.50
III	5	1.34	0.65

(6) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und A. R. F. Hesse, *Z. physiol. Chem.*, **126** (1923), 143.

Wie oben bereitete Amylase-Papain-Lösungen wurde auf 20 c.c. verdünnt und mit je 1 c.c. davon deren Aktivitäten in üblicher Weise gemessen.

	Stdn. d. Verd. mit Papain	N/10 I ₂ (c.c.)	Maltose (mg.)	A-E
I	0	4.11	70.3	0.0109
II	1	4.13	70.8	0.0110
III	5	4.08	70.0	0.0109

Man ersieht also aus den obigen Resultaten, dass das Amylase-präparat-A ein durch Trypsin und Papain spaltbares Protein enthält, bei dessen Spaltung aber keine Inaktivierung der Amylase selbst erfolgt.

Amylase-präparat-B. Das wie beim Amylase-präparat-A durch fraktionierende Fällung teilweise gereinigte Amylase-präparat wurde in 50%igem Methanol gelöst und in einer Kolloidumhülse gegen 50%iges Methanol dialysiert. Die Aussenflüssigkeit wurde mit einer grossen Menge von Methanol versetzt, der Niederschlag abgetrennt, in Wasser gelöst und bei pH = 5.0 an Tonerde C_T adsorbiert. Das Adsorbat wurde mit 0.1 N Na₂HPO₄ eluiert und wieder mit Methanol gefällt. Die Menge des getrockneten Niederschlags betrug 0.5 g. aus 50 g. Taka-diastase. Sf. 17.6. Die wässrige Lösung dieses Präparats gab keine Fällung mit Trichloressigsäure, aber mit basischem Bleiacetat einen weissen Niederschlag und deutliche Molisch-Reaktion.

Verdauungsversuche mit Trypsin. Ansatz: <3 % ige Lösung des Amylase-präparats-B> 5 c.c.+<1/5 Mol Phosphat (pH = 7.7)> 2 c.c.+<Trypsin-Lösung> 1 c.c. (T_(e) = 0.45)+<Wasser> 2 c.c. Nach verschiedenen Zeiten wurde jeweils 1 c.c. der Ansatzlösung herausgenommen auf 50 c.c. verdünnt und mit 1 c.c. davon die Stärkeverzuckerungswirkung gemessen.

	Stdn. d. Verd. mit Trypsin	N/10 I ₂ (c.c.)	Maltose (mg.)	A-E
I	0	1.34	23.0	0.0029
II	½	1.38	23.7	0.0030
III	1	1.34	23.0	0.0029
IV	5	1.35	23.2	0.0029

Verdauungsversuche mit Erepsin. Erepsin-Lösung wurde aus der Schleimhaut von Schweinsdünndarm hergestellt und ihre Aktivität mit Leucyl-diglycin und Leucyl-glycin nachgewiesen. Ansätze I: <1/5 Mol Tripeptid-Lösung (pH = 9)> 5 c.c.+<Erepsin-Lösung> 2 c.c. Ansätze II: <1/5 Mol Dipeptid-Lösung (pH = 9)> 5 c.c.+<Erepsin-Lösung> 2 c.c.

Verdauungsz. in Min.	COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)	
	Tripeptid	Dipeptid
20	0.93	0.17
60	1.29	0.45

Aktivität der Amylase-Erepsin-Lösung: <3 %ige Lösung des Amylase-präparats-B> 5 c.c. + <1/5 Mol Phosphat ($pH = 7.7$)> + <Erepsin-Lösung> 1 c.c. + <Wasser> 2 c.c. Nach verschiedenen Zeiten wurde jeweils 1 c.c. der Verdauungslösung herauspipetiert, auf 50 c.c. verdünnt und mit 1 c.c. davon die Stärkeverzuckerungswirkung gemessen.

	Stdn. d. Verd. mit Erepsin	N/10 I ₂ (c.c.)	Maltose (mg.)	A-E
I	0	1.35	23.0	0.0029
II	½	1.36	23.7	0.0030
III	1	1.33	23.0	0.0029
IV	5	1.34	23.2	0.0029

Zum Schluss möchten wir der Taniguchi Kogyo-shoreikai (der Taniguchi-Gesellschaft zur Förderung der technischen Industrie) für die finanzielle Unterstützung, die diese Versuche ermöglicht hat, unseren herzlichen Dank aussprechen.

Chemisches Institut der Kaiserlichen Universität zu Osaka.