

## Über die chemische Natur des Papains.

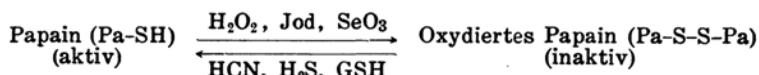
Von Shigeo MAEDA.

(Eingegangen am 28. Mai 1937.)

Willstätter und Grassmann haben die ersten sorgfältigen Untersuchungen über das Papain angestellt. Sie fanden<sup>(1)</sup>, dass die Aktivierung des Papains mit HCN mit der Beziehung zwischen Enterokinase und Tryptase<sup>(2)</sup> grosse Ähnlichkeit hat. Der wichtigste Befund der genannten Autoren ist der, dass die Spezifität des nativen Papains von der des aktivierten Enzyms deutlich verschieden ist. Z.B. spaltet das native Papain Gelatine und nicht Pepton; Papaincyanhydrin dagegen spaltet die beiden Substrate.

Vor einigen Jahren hat W. Grassmann angegeben, dass in Papainpräparaten eine schwefelhaltige Verbindung vorkommt, die unter dem Einfluss von Cyanwasserstoff in eine SH-Verbindung von phytokinaseartiger Wirkung übergeht<sup>(3)</sup>.

Diese Vorstellung wurde durch E. Maschmann<sup>(4)</sup> eingehend experimentell bestätigt. Die Weiterentwicklung dieser Anschauung, besonders auf Grund von Befunden über teilweise reversible Inaktivierung mit Oxydationsmitteln, führte ihn zur Postulierung der Thiolnatur für das Papain<sup>(5)</sup>. Th. Bersin hat angenommen, dass die die Aktivität hervorruhenden SS- und SH-Gruppen wie beim Insulin in die Peptidkette des Papainmoleküls eingebaut sind<sup>(6)</sup>.



Im Rahmen dieser Forschung ist von E. Maschmann<sup>(7)</sup> in einer gründlichen Untersuchung die Frage erörtert worden, welche Rolle ein "Begleitstoff-X" für die Proteolyse spielt, der Papainpräparaten durch wässrigen Alkohol entzogen werden kann. Er kommt zu dem Ergebnis,

- (1) R. Willstätter und W. Grassmann, *Z. physiol. Chem.*, **138** (1924), 184.
- (2) E. Waldschmidt-Leitz, *Z. physiol. Chem.*, **132** (1923-1924), 181.
- (3) W. Grassman, *Z. angew. Chem.*, **44** (1931). 105.
- (4) *Z. physiol. Chem.*, **219** (1933), 99; **228** (1934), 141; *Biochem. Z.*, **277** (1935), 97.
- (5) *Z. physiol. Chem.*, **220** (1933), 209; **222** (1933), 177; *Ergeb. Enzymforsch.*, **4** (1935), 68.
- (6) *Z. physiol. Chem.*, **233** (1935), 59.
- (7) *Z. physiol. Chem.*, **228** (1934). 141.

dass der "Begleitstoff-X" mit S-S-Glutathion nicht identisch ist, aber ein noch unbekanntes disulfidhaltiges Polypeptid sein kann<sup>(8)</sup>. W. Grassmann<sup>(9)</sup> hat den schwefelhaltigen Begleitstoff des Papains nach vorausgegangener Reduktion mit Schwefelwasserstoff auf Grund seiner Löslichkeit in 70%igem Alkohol vom Enzym abgetrennt und gefunden, dass die so gewonnenen Aktivatorfraktionen zum wesentlichen Teil aus einem oder mehreren Cystein-Glutaminsäurepeptiden bestehen. Auf Grund dieser Tatsache könnte man zu dem Schluss geführt werden, dass die Postulierung der Thiolnatur für das Papain nach Bersin zum mindesten unwahrscheinlich ist, und dass vielmehr ein spezifischerer, SH-Gruppen tragender Begleitstoff, dessen Existenz für die Aktivierung des Enzyms notwendig ist, im Papainpräparat vorkommt<sup>(10)</sup>.

M. Bergmann und Mitarbeiter<sup>(11)</sup> wollen durch teilweise Inaktivierung des Papains mit verschiedenen Reagenzien und darauffolgende Reaktivierung das Vorkommen von zwei Peptidasen und einer Proteinase im gewöhnlichen Papainpräparat festgestellt haben, und zwar soll nur eine von beiden Peptidasen durch Phenylhydrazin oder Hydroxylamin inaktiviert werden und dieselbe daher ein Carbonylgruppen enthaltendes Enzym sein. Nach den genannten Autoren soll aber im Proteinase-anteil kein Carbonylgruppen enthaltendes Enzym sein, weil es durch Phenylhydrazin nicht inaktiviert wird.

Der Verfasser hat auch die vorliegende Arbeit zu dem Zwecke unternommen, die stoffliche Natur des Papains auf chemische und enzymatische Weise zu untersuchen.

Wurde Handelspapain in Wasser gelöst und durch eine Kolloidiumhülse dialysiert, so verminderte sich dabei die Aktivität des Papains stark, konnte aber durch Zugabe von Cyanwasserstoff in hohem Masse reaktiviert werden. Die Außenflüssigkeit der Dialyse wies keine enzymatische Wirkung auf. Aus der Innenlösung wurde durch Fällung mit Methanol ein Enzym-präparat gewonnen, das 15.02% N enthielt. Es war eine gelatineartige amorphe Masse, die sich durch relativ hohen Gehalt an Tryptophan (3.43%) auszeichnete und deren relative Aktivität vor und nach der Aktivierung mit Cyanwasserstoff 0.44 und 1.66 betrug.

Der Verfasser hat die Wirkungen verschiedener Reagenzien, nämlich Hydrazin, Phenylhydrazin, Hydroxylamin, Natriumbisulfit und Dimethylbarbitursäure, auf das Papain geprüft. Die Hemmungswirkung der

(8) *Biochem. Z.*, **277** (1935), 111.

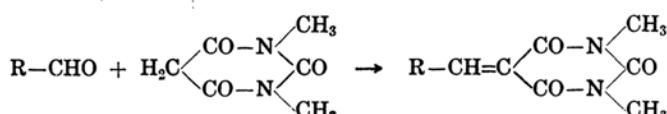
(9) *Biochem. Z.*, **279** (1935), 131.

(10) A. Purr, *Biochem. J.*, **29** (1934), 5.

(11) M. Bergmann und W. F. Ross, *J. Biol. Chem.*, **111** (1935), 659.

Carbonylreagenzien auf Papain ist eine Zeitreaktion und wird erst beim tagelangem Stehen vollständig. Beim 2-3 tägiger Einwirkung der Reagenzien wurde nicht nur die Peptidasewirkung, sondern auch die Wirkung der Gelatinespaltung (Proteinase) fast völlig gehemmt, und durch Cyanwasserstoff oder Benzaldehyd konnte keine Reaktivierung erzielt werden. Nach den obigen Resultaten müsste man zu einem von der Bergmannschen Ansicht verschiedenen Schluss kommen, dass nämlich nicht nur der Papainpeptidase-, sondern auch der Proteinase-anteil des Papains ein Carbonylgruppen enthaltender Komplex ist.

Und die Hemmung durch Dimethylbarbitursäure lehrt uns, dass die Carbonylgruppe, die mit der Aktivität des Papains in engem Zusammenhang steht, zu einer Aldehydgruppe gehört, weil Dimethylbarbitursäure nur mit Aldehyden, aber nicht mit Ketonen reagiert.<sup>(12)</sup>



Die entstandenen Aldehyd-dimethylbarbitursäuren sind gelb gefärbt, wenn die Aldehyd aromatisch oder Furanderivate sind. Die Papain-dimethylbarbitursäurelösung färbt sich allmählich beim Stehen und die Hemmung schreitet parallel mit der Vertiefung der Farbe fort.

Mein Papainpräparat ist durch proteolytische Enzyme schwer verdaubar. Bei der Trypsin- und Pepsin-wirkung war eine kleine Zunahme des COOH zu beobachten, während sich die Aktivität des Enzyms nicht verminderte.

Ob Papain ein Protein ist oder nicht, kann man jetzt noch nicht mit Sicherheit sagen. Jedenfalls ist aber Papain eine hochmolekulare Substanz und vielleicht ein spezielles Protein, das eine Aldehyd-gruppe trägt.

#### Beschreibung der Versuche.

**1. Reinigung des Papains.** 50 g. Handelpapain wurden mit 500 c.c. destilliertem Wasser durchgeschüttelt, 4-5 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, abzentrifugiert und die klare Lösung mittels einer Kolloidumhülse 70 Stunden lang gegen destilliertes Wasser dialysiert. Aus der Innenflüssigkeit wurden durch Zusatz von Methanol 10.7 g. eines Niederschlags gewonnen, der relativ geringe Aktivität aufwies, aber durch HCN stark aktiviert wurde.

---

(12) S. Akabori, *Ber.*, **66** (1933), 139.

## Tabelle 1.

Ansatz: N/5 Acetatpuffer ( $pH = 5$ ) 1 c.c. + 5%ige Gelatinelösung 5 c.c. (oder 1/5 Mol Hippuramidlösung 5 c.c.) + 5%ige Papainlösung 1 c.c.

COOH Zuwachs (c.c. N/5 KOH) bei 36°						
Stunde	Gelatine			Hippuramid		
	1	4	24	1	4	24
Gereinigtes Papain	0.44	0.98	1.68	0.02	0.04	0.84
HCN (16 mg.)	1.66	2.46	3.42	0.10	0.48	1.26

2. Analysen des Papains. (a) Gesamt-Stickstoff nach Kjeldahl. Gef.: N, 15.10, 15.05, 14.92; mittlerer Wert, 15.02%.

(b) Amino-Stickstoff nach Van Slyke. Gef.: NH<sub>2</sub>-N, 2.14, 2.45, 2.23; mittlerer Wert, 2.27%.

$$\frac{\text{NH}_2\text{-N}}{\text{N}} = 0.144 \dots \text{etwas höher als gewöhnliche Proteine.}$$

(c) Bestimmung von Tryptophan. Es ist heute eine ganze Anzahl von Methoden zur Bestimmung von Tryptophan unter verschiedenen Bedingungen bekannt. Es sei an die kolorimetrische von J. Tillmans und A. Alt<sup>(13)</sup> erinnert, die auf Verwendung von Formalin in Gegenwart von Schwefelsäure beruht, an die jodometrische von A. Homer<sup>(14)</sup>, die auf der Bildung des Octabromtryptophans basiert. C. Itagaki und R. Masayama<sup>(15)</sup> verbesserten die Methode von Tillmans und Alt mit Hilfe eines Stufenphotometers. Diese von Itagaki und Masayama angegebene Methode wird als sehr zweckmäßig empfohlen.

Ausführung: Zu 1 c.c. der zu bestimmenden Enzymlösung (geeigneter Konzentration), die sich in einem 20 c.c.-Messkolben befindet, fügt man 2 Tropfen einer 2%igen Formalinlösung hinzu und füllt mit 66%iger Schwefelsäure genau bis zur Marke auf. Nachdem man die Mischung 5 Minuten stehen gelassen hat, (dabei zeigt die Lösung eine Gelbfärbung), pipettiert man eine Probe in eine Küvette von geeignetem Inhalt und bestimmt den Extinktionskoeffizienten K mittels eines Stufenphotometers (als Filter Zeiss S 47 verwendet). Als Kontrolllösung wurde ein Probelösung ohne Zusatz von Formalinlösung verwendet. Die Berechnung des Tryptophangehaltes erfolgt mit Hilfe einer Kurve, durch die vorher der Zusammenhang zwischen Tryptophangehalt und Extinktionskoeffizient festgestellt worden ist. (Gef.: Tryptophan, 3.34, 3.57, 3.40; mittlerer Wert, 3.43%).

Herrn Dr. R. Masayama im medizinischen Institut der hiesigen Universität, unter dessen freundlicher Leitung diese Bestimmungen durchgeführt worden sind, bin ich sehr verbunden.

3. Einfluss von verschiedenen Reagenzien auf Papain. Es wurden jeweils 0.2 g. Reagens in 5 c.c. 5%iger Papainlösung aufgelöst (4%ige Probelösung). Dann wurde nach einer bestimmten Zeitspanne 1 c.c. abpipettiert und die Aktivität geprüft.

(13) Biochem. Z., **164** (1925), 135.

(14) J. Biol. Chem., **22** (1915), 369.

(15) Mitt. Med. Ges. Osaka, **35** (1936), 1743.

Tabelle 2. Einfluss von verschiedenen Reagenzien auf Papain.

Nr.	Reagenzien (%)	Wirkungsdauer von Reagens auf Papain bei Zimmer- temperatur (Stunden)	COOH Zuwachs (c c. N/5 KOH) bei 36°						
			Gelatine			Hippuramid			
			1 St.	5 St.	24 St.	1 St.	5 St.	24 St.	
1	NH <sub>2</sub> OH	4	15 auf HCN-Papain ohne Reagens	— —	1.12 1.96	1.51 2.76	00 —	00 0.37	0.03 0.78
2	NH <sub>2</sub> OH	4	24 auf Papain	0.34	0.36	0.57	00	00	00
3	NH <sub>2</sub> OH	10	52 auf Papain ohne Reagens	00 1.54	0.08 2.38	0.13 3.23	00 0.22	00 0.84	00 1.36
4	NH <sub>2</sub> OH +C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CHO	8	120 auf Papain 24 auf Papain ohne Reagens	00 00 —	00 00 1.19	00 00 2.27	— — —	— — —	
	NH <sub>2</sub> OH +HCN	4	120 auf Papain 48 auf Papain	00 00	00 00	00 00	— —	— —	
5	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	4	12 auf Papain ohne Reagens	1.52 1.54	2.18 2.38	2.91 3.23	0.39 0.22	0.90 0.84	1.13 1.36
6	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	4	0.5 auf Papain ohne Reagens	1.30 1.70	1.78 2.20	2.02 3.09	0.12 0.24	0.40 0.60	0.92 1.22
7	NaHSO <sub>3</sub>	4	24 auf HCN-Papain ohne Reagens	0.41 1.56	0.59 2.09	2.26 2.82	— —	— —	— —
8	NaHSO <sub>3</sub>	4	24 auf Papain ohne Reagens	0.31 1.21	0.63 1.54	1.19 1.90	— —	— —	— —
9	NaHSO <sub>3</sub>	4	120 auf Papain ohne Reagens	00 —	0.02 1.10	0.04 2.26	— —	— —	— —
10	NaHSO <sub>3</sub> +CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	4	24 auf Papain 24 auf Papain ohne Reagens	0.29 0.38 0.96	0.52 1.42 1.68	1.23 1.93 2.48	— — —	— — —	— — —
11	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHNH <sub>2</sub>	4	24 auf Papain ohne Reagens	0.05 1.08	0.31 1.52	— —	— —	— —	— —
12	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHNH <sub>2</sub> +C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CHO	4	68 auf Papain 22 auf Papain ohne Reagens	00 00 0.76	0.10 00 1.34	— — —	— — —	— — —	— — —
13	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHNH <sub>2</sub>	4	92 auf Papain ohne Reagens	00 0.56	00 1.36	— —	— —	— —	— —
14	D. B. S.*	4	40 auf Papain ohne Reagens	0.27 0.61	0.67 1.44	1.11 2.05	00 0.02	00 0.08	00 0.44
15	D. B. S.	4	sofort nach Zusatz ohne Reagens	1.41 1.49	1.96 1.88	2.23 2.23	— —	— —	— —
16	D. B. S.	4	40 auf HCN-Papain ohne Reagens	1.49 1.59	1.88 2.19	2.11 2.87	— —	— —	— —
17	D. B. S.	4	120 auf Papain ohne Reagens	0.24 0.89	0.48 1.57	0.56 2.31	— —	— —	— —

\* D. B. S. = Dimethylbarbitursäure.

Bergmann<sup>(16)</sup> sagt, dass bei der Inaktivierung durch Phenylhydrazin bei einer Konzentration von 0.03 millimol Reagens pro c.c. einer 0.45%igen Papainlösung die maximale Schädigung erreicht wird und eine weitere Zunahme der Phenylhydrazinkonzentration keine stärkere Hemmung mehr erzeugt. Und er hat daher angenommen, dass die Verdauung von Gelatine durch HCN-Papain über zwei verschiedene enzymatische Prozesse geht. In diesem Zusammenhang habe ich festgestellt, dass diese Aktivitätsemmung durch Vergiftung des Papains eine Zeitreaktion ist, dass also durch 68-stündige Einwirkungsdauer von Phenylhydrazin die Aktivität des Papains fast völlig beseitigt werden kann.

Dimethylbarbitursäure ist etwas schwerer zu kondensieren mit Papaincarbonyl als allgemeine Carbonylreagenzien, und deshalb ist zur vollkommenen Hemmung durch Dimethylbarbitursäure etwas längere Zeit erforderlich als im Fall des Hydroxylamins, Hydrazins und Phenylhydrazins.

Tabelle 3. Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung durch Hydroxylamin, Hydrazin und Phenylhydrazin.

COOH Zuwachs (c.c. N/5 KOH)			
Stunde	NH <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHNH <sub>2</sub>
0	1.51	1.51	1.51
0.5	1.04	1.25	0.36
1	—	1.06	—
3	0.62	0.70	0.20
6	0.38	0.46	0.10
23	0.18	0.12	0.02

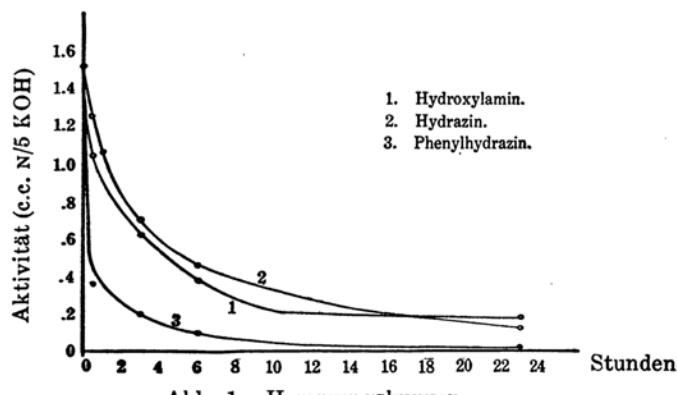


Abb. 1. Hemmungskurven.

Zu einer Lösung von 0.6 g. Inaktivator in 15 c.c. destilliertem Wasser, das nötigenfalls vorher auf etwa pH = 5.0 eingestellt worden ist, setzt man 15 c.c. 5%ige Papainlösung zu. Nachdem die Mischung eine bestimmte Zeitspanne bei 36° verblieben ist,

(16) M. Bergmann und W. F. Ross, *J. Biol. Chem.*, **114** (1936), 717.

pipettiert man 2 c.c. ab, fügt 5 c.c. 5%ige Gelatine und 3 c.c. N/5 Acetatpuffer hinzu und titriert sie. Die Resultate sind in den Tabelle 3 und Abb. 1 angegeben.

**4. Einwirkung proteolytischer Enzyme.** Ich prüfte die Beständigkeit von gereinigtem Papain-präparat gegenüber der Wirkung von Pepsin und Trypsin-kinase, wobei sich in keinem Falle irgendwelche messbare Aktivitäts-einbusse bemerkten liess.

*Verdauung durch Trypsin-kinase und Pepsin.* (Tabelle 4.)

Tabelle 4.

Ansatz: A. 5%ige Papain-lösung ( $pH = 8$ ) 5 c.c.+N Phosphatpuffer ( $Na_2HPO_4$ ) 1 c.c. + Trypsin-kinase 2 c.c. bei  $30^\circ$ ; B. 5%ige Papain-lösung 2 c.c.+N Glykokollmischung ( $pH = 1.93$ ) 1 c.c.+Pepsin (1%) 1 c.c. bei  $36^\circ$ .

COOH Zuwachs (c.c. N/5 KOH)				
Stunde	1/3	1	4	24
Trypsin-kinase	0.08	0.06	0.19	0.21
Pepsin	—	0.06	0.10	0.28

*Aktivität des durch Trypsin-kinase und Pepsin verdauten Papains gegenüber Gelatine.* Kontrollversuch: Nachdem die Mischung von 5 c.c. einer 5%igen Papain-lösung und 1 c.c. N Phosphatpuffer jeweils eine entsprechende Anzahl Stunden bei  $30^\circ$  stehen gelassen worden war, wurden 2 c.c. Trypsin-kinase zugesetzt, sofort auf  $pH = 5.0$  eingestellt und die Aktivität gegenüber Gelatine (5%ige Gelatine 5 c.c.) während einer Stunde bei  $36^\circ$  geprüft. Beim Pepsin: 5%iges Papain 2 c.c., N Glykokollmischung ( $pH = 1.93$ ) 1 c.c. und 1%iges Pepsin 1 c.c. In gleicher Weise ausgeführt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5.

COOH Zuwachs (c.c. N/5 KOH)				
	Stunde	1	4	24
Kontroll-versuch	Trypsin-kinase	1.66	1.64	—
	Pepsin	1.20	1.26	1.18
Haupt-versuch	Trypsin-kinase	1.57	1.58	—
	Pepsin	1.22	1.30	1.18

Es sei mir an dieser Stelle erlaubt, Herrn Prof. S. Akabori für die Überlassung dieser Arbeit, sowie für Anregungen und Ratschläge meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

*Chemisches Institut der Kaiserlichen  
Universität zu Osaka.*