

Über die chemische Natur der Taka-Amylase. II. Über das Molekulargewicht der Taka-Amylase.

Von Shiro AKABORI und Katuhiko KASIMOTO.

(Eingegangen am 31. Janur 1938.)

In der ersten Mitteilung⁽¹⁾ haben S. Akabori und K. Okahara in Bezug auf die chemische Natur der Taka-Amylase auf Grund der Tatsache, dass sie durch Proteininasen nicht spaltbar ist und durch Kolloidummembranen zu diffundieren vermag, den Schluss gezogen, dass sie weder ein Protein noch ein Polypeptid sein dürfte.

Für die weitere Entwicklung der Reinigungsmethode war es zunächst wünschenswert zu wissen, wie gross das Molekül der Taka-Amylase ist.

*Für die Molekulargewichtsbestimmung kann man selbstverständlich bei den gewöhnlichen Enzympräparaten die kryoskopische Methode nicht anwenden.

Eine einfache, für nicht ganz reine Enzympräparate anwendbare Methode ist die Berechnung aus dem Diffusionskoeffizienten nach der Gleichung $D\sqrt{M} = \text{Konst.}$ Die Gültigkeit dieser Regel für mehrere organische Substanzen ist von v. Euler⁽²⁾ und Oeholm⁽³⁾ festgestellt

(1) Akabori und Okahara, dieses Bulletin, **12** (1937), 55.

(2) v. Euler, *Ann.*, **63** (1897), 273.

(3) Oeholm, *Z. physiol. Chem.*, **70** (1910), 378.

worden. Mit dieser Methode erhielten v. Euler und Kullberg⁽⁴⁾ für Saccharase das Molekulargewicht 20,000.

Die Diffusionsgeschwindigkeit darf natürlich nicht im Zusammenhang mit der stofflichen Menge des Enzympräparats, sondern muss im Zusammenhang mit der Enzymwirkung verfolgt werden. Für diesen Zweck ist es unbedingt notwendig, die relative Enzymmenge, d.h. die Enzym-Einheiten möglichst genau zu bestimmen. Die Amylase-Einheiten werden gewöhnlich durch die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei bestimmten Verdauungsbedingungen gegeben, unter der Annahme, dass die Verdauung in monomolekularer Reaktion verläuft. Unseren Experimenten nach ist jedoch diese Annahme nur unter beschränkten Verdauungsbedingungen gültig. Wir haben deshalb zuerst versucht, die Bedingungen aufzufinden, bei denen die Maltosebildung in monomolekularer Reaktion verläuft und die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante genau der Enzymmenge proportional ist. Für die Bestimmung der Enzym-Einheiten wandten wir die Methode von Willstätter und Schudel⁽⁵⁾ unter den Verdauungsbedingungen von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse⁽⁶⁾ an. Der zeitliche Verlauf der Maltosebildung mit wechselnden Mengen Takadiastase ist aus Abb. 1 ersichtlich.

Zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k dient die Gleichung

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

worin t = die Versuchszeit in Minuten, a = die maximal entstehende Menge der Maltose und x = die zur Zeit t gebildete Maltosemenge.

Abb. 2 zeigt die Änderung von k in Abhängigkeit von Enzymmenge und Verdauungszeit.

Man ersieht aus Abb. 2, dass die Geschwindigkeitskonstante unter den Verdauungsbedingungen von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse bei kleineren Mengen Enzym (weniger als A. E. = 0.016) und kürzeren Zeiten (5 bis 10 Minuten) der Enzymmenge proportional ist (Abb. 3).

Die Diffusionsgeschwindigkeit konnten wir in einfacher Weise mit Hilfe des Northrop- und Ansonschen Immersionsfilters⁽⁷⁾ messen. Die Methode soll hier kurz erwähnt werden. Der angewandte Apparat wird in Abb. 4 wiedergegeben. L_1 : konzentrierte Lösung. L_2 : verdünnte

(4) v. Euler und Kullberg, *Z. physiol. Chem.*, **73** (1911), 335.

(5) Willstätter und Schudel, *Ber.*, **51** (1918), 780.

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

(7) Northrop und Anson, *J. Gen. Physiol.*, **12** (1926), 543.

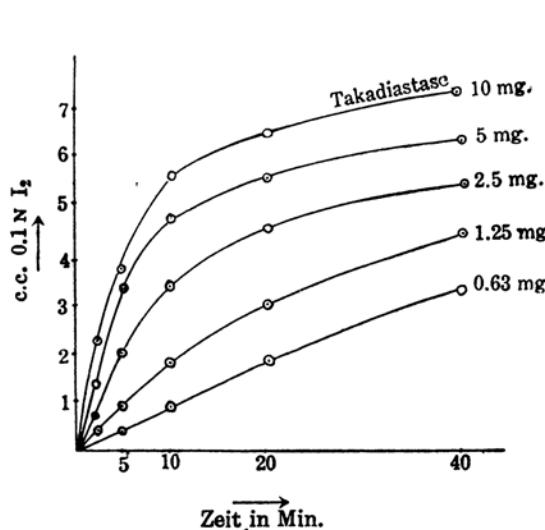


Abb. 1.

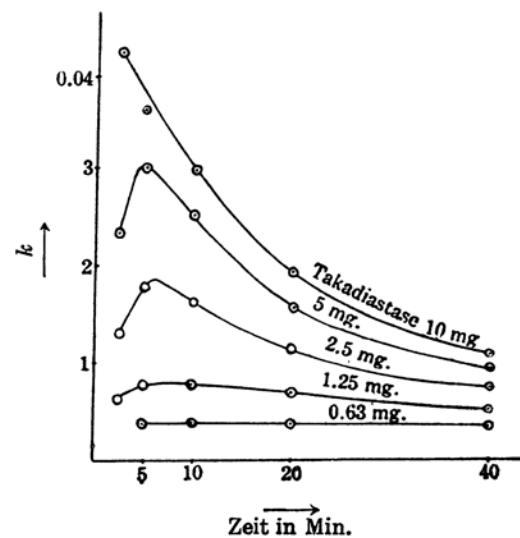


Abb. 2.

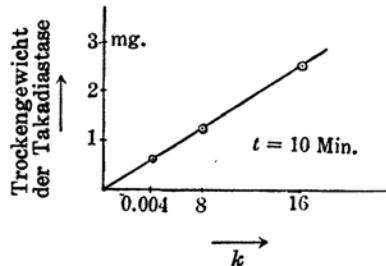


Abb. 3.

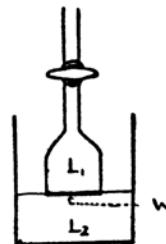


Abb. 4.

Lösung. W: Diffusionswand aus Glasfiltermasse. Wenn man einen ganz kleinen Bruchteil der gelösten Substanz durch die Diffusionswand diffundieren lässt, ist die Diffusionskoeffizient D durch folgende Formel gegeben:

$$D = \frac{hm}{Qt(C_1 - C_2)} \quad (1),$$

wo m Menge der gelösten Substanz, die in der Zeit t von der Lösung L_1 in die Lösung L_2 diffundiert, h Dicke der Diffusionswand, Q Querschnitt der Diffusionswand, C_1 Konzentration der Lösung L_1 , C_2 Konzentration der Lösung L_2 , t Diffusionsdauer bedeutet.

Wenn man für L_2 reines Lösungsmittel anwendet, wird Gl. (1) wie folgt:

$$D = \frac{hm}{QtC_1} = K \frac{m}{tC_1} = KF \quad (2),$$

$$\text{wo} \quad F = \frac{m}{tC_1} \quad (3).$$

Wird F für eine bekannte und eine unbekannte Substanz gemessen, so kann das Molekulargewicht (M_x) der letzteren, auf dem Grund der Gleichung $D \sqrt{M} = \text{Konst.}$, nach folgender Gleichung (4) berechnet werden:

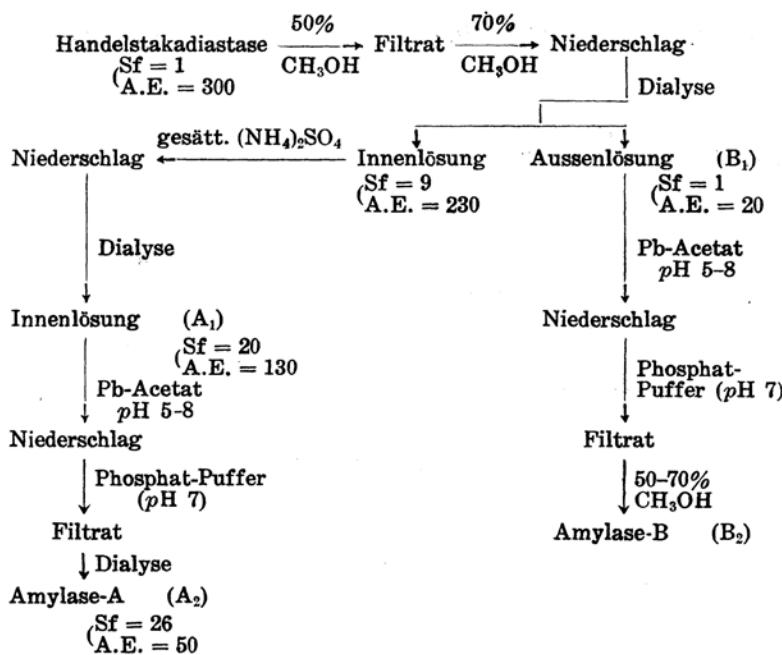
$$M_x = M \left(\frac{F}{F_x} \right)^2 \quad (4).$$

Als Standardsubstanz nahmen wir *d*-Glukose, da deren Menge jodometrisch schnell bestimmt werden kann, und prüften die Genauigkeit der Methode bei Maltose und Methylstrychninbetalin mit einem Immersionsfilter von 50 c.c. Inhalt bei 4°. (Herr Prof. M. Kotake hatte die grosse Freundlichkeit, uns Methylstrychninbetalin zur Verfügung zu stellen, wofür wir zu besten Dank verpflichtet sind.)

Substanz	F	M(Ber.)	M(Gef.)
Glukose	0.0730	180	—
Maltose	0.0530	342	340
Methylstrychninbetalin	0.0495	356	390

Man sieht also, dass die Diffusionsmethode mit befriedigender Genauigkeit anwendbar ist.

Reinigung der Taka-Amylase. Wie in der ersten Mitteilung beschrieben wurde, lässt sich der wirksame Bestandteil der Handelstakadiastase nicht durch 50%iges, sondern durch 70%iges Methanol ausfällen und geht bei der Dialyse mit einer Kolloidumhülse teilweise in die Aussenflüssigkeit. Das aus der Innenlösung gewonnene Amylasepräparat bezeichnen wir als Amylase-A und das aus der Aussenlösung gewonnene als Amylase-B. Das Reinigungsverfahren wird im folgenden Schema angegeben:



Die Molekulargewichtsbestimmung bei den Amylasepräparaten A_1 , A_2 , B_1 und B_2 gibt nach der Diffusionsmethode folgende Resultate:

Amylasepräparate	F	F_G	$(F_G/F)^2$	M
A_1	0.0196	0.0651	11.1	1990
A_2	0.0250	0.0732	8.6	1550
B_1	0.0426	0.0732	3.0	540
B_2	0.0445	0.0732	2.7	490

F_G bedeutet $\frac{m}{C_1 t}$ bei Glukose; s. Gl. (8).

Unseren Resultaten bei dieser Molekulargewichtsbestimmung kann natürlich noch kein grosses Gewicht beigelegt werden. Es ist aber wohl sicher, dass das Taka-Amylase-Molekül viel kleiner als ein gewöhnliches Eiweissmolekül ist. Merkwürdigerweise scheint der Träger der Taka-Amylase, im Gegensatz zum Falle des Flavinenzymes, keine grosse Rolle bei der Enzymwirkung zu spielen, denn bei dem Zusammenbringen der Aussen- und Innenflüssigkeit der Dialyse findet weder Aktivierung noch Hemmung statt.

Versuchsergebnisse. (a) *Diffusion der Glukose.* Anfangskonz. der Lösung 16.11%. $C_1 = 161.1 \text{ mg./c.c.}$

Exp. Nr.	<i>t</i>	Diffundierte Glukose (mg.)
I	1	11.70
II	1	11.88
III	1	11.70
IV	1	11.97
	Mitt.	11.81

$$F = 0.0732$$

(b) *Diffusion der Maltose.* Anfangskonz. der Lösung 33.6%. $C_1 = 336 \text{ mg./c.c.}$

Exp. Nr.	<i>t</i>	Diffundierte Maltose (mg.)
I	1	17.15
II	1	18.52
III	1	18.01
	Mitt.	17.89

$$F = 0.0530$$

$$\left(\frac{F_G}{F}\right)^2 = 1.90$$

Mol. Gew.

$$\text{Gef. : } 180 \text{ (Glukose)} \times 1.9 = 342$$

$$\text{Ber. für } C_{12}H_{22}O_{11} : \quad 342$$

(c) *Diffusion des Methylstrychninbetrains.* Die Bestimmung des Methylstrychninbetrains wurde durch Messung der Intensität der mit konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumbichromat erhaltenen Färbung mit Hilfe eines Kolorimeters ausgeführt.

Exp. Nr.	<i>t</i>	<i>F</i>
I	1	0.050
II	2	0.048
III	2	0.050
IV	1	0.051
V	3	0.048
VI	2	0.051
	Mitt.	0.0497

$$\left(\frac{F_G}{F}\right)^2 = 2.2$$

Mol. Gew.

$$\text{Gef. : } \quad 390$$

$$\text{Ber. für } C_{22}H_{26}N_2O_5 : \quad 366$$

$$\text{Ber. für } C_{22}H_{26}N_2O_5 \cdot 4H_2O : \quad 421$$

(d) *Amylasepräparat-B.* (i) B_1 im Schema. $C_1 = 0.2064 \text{ A.E./c.c.}$

Exp. Nr.	<i>t</i>	Diffundierte A.E.	$F = 0.0426$
I	1	0.00913	
II	1	0.00810	$\left(\frac{F_G}{F}\right)^2 = 3.0$
III	1	0.00913	
		Mitt. 0.00879	Mol. Gew. = 540

(ii) B_2 im Schema. $C_1 = 0.343$ A.E./c.c.

Exp. Nr.	<i>t</i>	Diffundierte A.E.	$F = 0.0445$
I	1	0.0158	
II	1	0.0131	$\left(\frac{F_G}{F}\right)^2 = 2.7$
III	1	0.0165	
IV	1	0.0158	
		Mitt. 0.0158	Mol. Gew. = 490

(e) Amylasepräparat-A. (i) A_2 im Schema. $C_1 = 1.558$ A.E./c.c.

Exp. Nr.	<i>t</i>	Diffundierte A.E.	$F = 0.0250$
I	1	0.0389	
II	1	0.0381	$\left(\frac{F_G}{F}\right)^2 = 8.6$
III	1	0.0396	
		Mitt. 0.0389	Mol. Gew. = 1550

(ii) A_1 im Schema. $C_1 = 0.930$ A.E./c.c.

Exp. Nr.	<i>t</i>	Diffundierte A.E.	$F = 0.0196$
I	2	0.0368	
II	2	0.0371	$\left(\frac{F_G}{F}\right)^2 = 11.1$
III	2	0.0364	
		Mitt. 0.0368	Mol. Gew. = 1990

Bei dieser Bestimmung haben wir ein anderes Immersionsfilter ($F_G = 0.0651$) benutzt als bei den übrigen Experimenten.

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.
