

## Über den „Papain-Amylase-Symplex“ (Über die chemische Natur der Taka-Amylase. III.)<sup>(1)}</sup>

Von Shiro AKABORI und Katuhiko KASIMOTO.

(Eingegangen am 25. Mai 1938.)

Bei einem Versuch über die Wirkung von Papain auf Taka-Amylase haben wir zufällig beobachtet, dass sich beim Zusammenbringen der beiden Enzymlösungen ein Niederschlag bildet, der sowohl hohe Amylase wie Papain-Wirkung besitzt. Beim Verdünnen der Mutterlauge des obigen Niederschlags ( $N_1$ ) mit destilliertem Wasser bildet sich wiederum ein neuer Niederschlag ( $N_2$ ).  $N_2$  hat stets höhere Aktivität als  $N_1$ . Dieselben Erscheinungen findet man sowohl bei der Aussen- wie Innenflüssigkeit der Dialyse von Taka-Amylase-Lösung mittels Kolloidumhülse. Man könnte wohl glauben, dass die Niederschlagsbildung darauf beruht, dass sich die beiden leicht in Wasser löslichen Stoffe, Taka-Amylase und Papain zu einem in Wasser schwer löslichen „Papain-Amylase-Symplex“ verbinden. Der Symplex ist in destilliertem Wasser schwer, in Salzlösungen aber leicht löslich. Beim Verdünnen der Lösung mit Wasser wird der „Papain-Amylase-Symplex“ wieder niedergeschlagen.

Behandelt man den in N-Aacetatpuffer ( $pH = 5$ ) gelösten „Papain-Amylase-Symplex“ mit einem mit gleichem Puffer gewaschenen Aluminiumoxydpräparat (nach Brockmann), so wird die Amylase völlig absorbiert und das Papain bleibt in der Restlösung. Aus dieser Lösung, durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat, Dialysieren mittels Kolloidumhülse und Fällen mit Aceton, gewinnt man auf zehn- bis zwanzigfach gereinigtes Papain als das Ausgangspapainpräparat. Aus dem Adsorbat lässt sich Amylase mit  $N/3$  Phosphatpuffer ( $pH = 8$ ) eluieren. Dieses Trennungsverfahren ist geeignet für die Reinigung von Papain, aber nicht für die Reinigung von Amylase, weil das so gewonnenes Amylasepräparat vom Phosphat schwer zu befreien ist.

Wir konnten nun Papain folgenderweise von Papain-Amylase befreien. Setzt man eine wässrige Lösung von hefe-nukleinsaurem Natrium zur Lösung der „Papain-Amylase“ ( $N_2$ ) in N-Aacetatpuffer hinzu, so scheidet sich ein weißer Niederschlag aus, der aus nukleinsaurem Papain besteht. In der Mutterlösung bleibt die gesamte Amylase und überschüssige Nukleinsäure zurück. Diese lässt sich durch Zusatz einer wässrigen

(1) II. Mitteil. Ababori und Kasimoto, dies Bulletin, 13 (1938), 291.

Lösung von Benzidinchlorhydrat fällen. Aus der nach oben gewonnenen Amylase-Lösung erhält man durch Fällung mit Aceton ein hochaktives Amylasepräparat. Manchmal beobachtet man, dass die Amylasewirkung durch Benzidin stark gehemmt wird; z.B. verliert die Innenflüssigkeit der Dialyse und die daraus gewonnene „Papain-Amylase“ ( $N_1$ ) den grösseren Teil ihrer Wirkung durch Benzidin. Dagegen bleibt die Wirkung der Aussenflüssigkeit der Dialyse, der daraus gewonnenen „Papain-Amylase“ ( $N_1$  und  $N_2$ ) und des  $N_2$  aus der Innenflüssigkeit völlig unbeeinflusst vom Benzidin. Daraus darf man wohl den Schluss ziehen, dass im Taka-Amylase-Präparat eine Substanz vorkommt, welche unter Mitwirkung von Benzidin die Amylasewirkung hemmt, nicht durch Kolloidummembran diffundiert und leichter durch Papain als durch Amylase fällbar ist. Daher muss man zum Zweck der Reinigung der Amylase „Papain-Amylase“ aus der Aussenflüssigkeit der Dialyse, oder „Papain-Amylase“  $N_2$  aus der Innenflüssigkeit der Dialyse benutzen.

Die experimentellen Wege zur Reinigung der Taka-Amylase werden in der folgenden Tabelle schematisch angegeben.

Bei den nach oben über den „Papain-Amylase-Symplex“ gereinigten Amylasen haben wir die Diffusionsgeschwindigkeiten nach der Northrop-Ansonschen Methode<sup>(2)</sup> gemessen und folgende Resultate gewonnen.

Gereinigte Amylase aus	$D_G/D$
1. Aussenamylase	2.76
2. Innenamylase	2.62

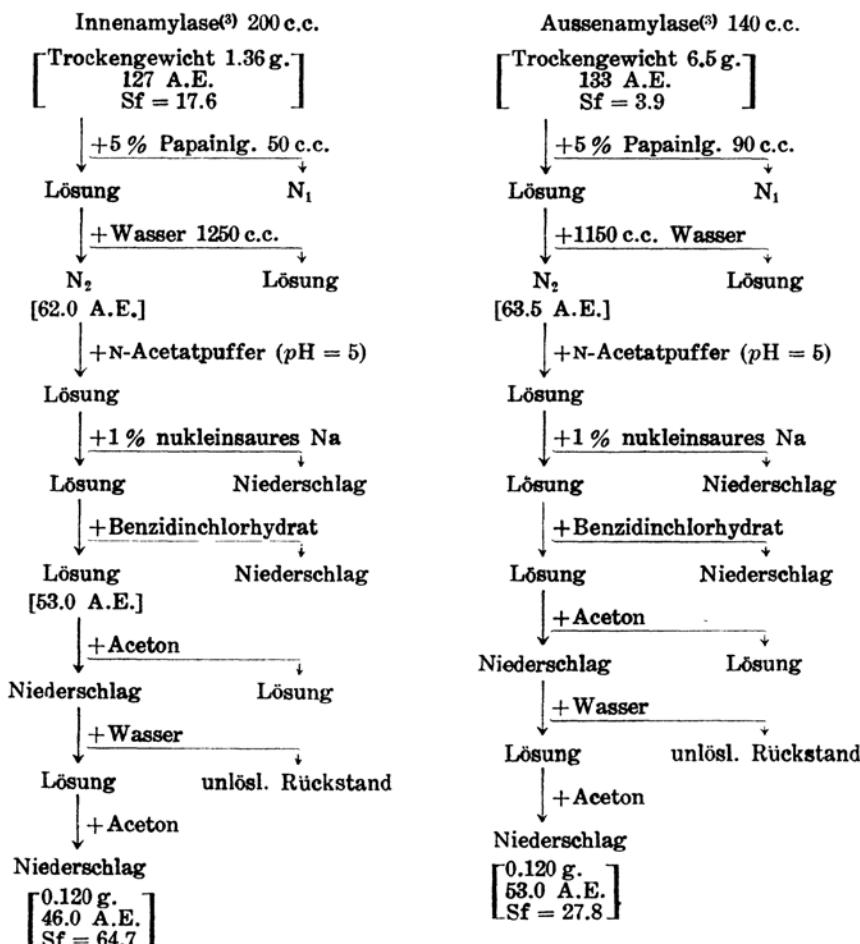
$D_G$  bzw.  $D$  bedeuten die Diffusionskoeffizienten der Glucose bzw. des Enzyms.

Wenn man aus den obigen Resultaten das scheinbare Molekulargewicht des Enzyms berechnet unter der Annahme, dass der Diffusionskoeffizient der Quadratwurzel des Molekulargewichts umgekehrt proportional sei, so gewinnt man für die Aussenamylase das Mol. Gew. = 1370 und für die Innenamylase das Mol. Gew. = 1240.

In unserer früheren Publikation<sup>(1)</sup> über die chemische Natur der Taka-Amylase haben wir Ergebnisse bei der Molekulargewichtsbestimmung nach der Diffusionsmethode mitgeteilt. Seinerzeit hatten wir für das Molekulargewicht der Aussenamylase ca. 500 und für Innenamylase 1500–2000 gewonnen. Die über den „Papain-Amylase-Symplex“ gereinigte Amylase hat also ein grösseres Molekulargewicht als die ursprüngliche Aussenamylase und ein kleineres als die ursprüngliche Innenamylase, und zwar scheint es fast gleich, ob man von Innen- oder auch von Aussen-Amylase ausgegangen ist.

---

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



Mit Rücksicht auf die obigen experimentellen Resultate kann man wohl glauben, dass das eigentliche Taka-Amylase-Molekül verhältnismässig klein ist, sodass es durch Kollodiummembranen durchgehen kann, das Innenamylasepräparat jedoch irgendeine eiweissartige, hochmolekulare Substanz enthält, an die das Amylasemolekül locker gebunden ist, wodurch seine Diffusion verhindert worden ist. Die über den „Papain-Amylase-Symplex“ gereinigte Amylase ist von ihrem natürlichen Begleiter befreit worden und zeigt daher dieselbe Diffusionsgeschwindigkeit. Was die Frage anbelangt, warum die gereinigte Amylase langsamer diffundiert

(3) Innen- bzw. Aussen-Amylase bedeutet die bei der Dialyse von Taka-Amylase-Lösung mittels Kollodiumhülse in der Innen- bzw. Aussenflüssigkeit befindliche Amylase.

als die nicht gereinigte Aussenamylase, so kann man noch nichts mit Sicherheit sagen, dürfte aber wohl folgendes vermuten: die Amylase-Moleküle werden sich wohl bei Nichtanwesenheit von Salzen zu grösseren Teilchen assozieren, bei Anwesenheit von Salzen dagegen einzeln peptisiert vorliegen.

Zum Schluss möchten wir der Taniguchi Kogyo-Shoreikai (der Taniguchi-Gesellschaft zur Förderung der technischen Industrie) für ihre finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit unseren besten Dank aussprechen.

*Chemisches Institut der Kaiserlichen  
Universität zu Osaka.*

---