

Über die chemische Natur des Papains. II.⁽¹⁾ Reinigung des Papains durch Taka-Amylase.

Von Shigeo OKUMURA.*

(Eingegangen am 18. Juli 1938.)

Die Münchener Schule hat die Reinigung des Papains mit Hilfe der Adsorption an Tonerde durchzuführen versucht, aber keine nennenswerten Erfolge⁽²⁾ damit erzielt.

Vor kurzem haben Akabori und Kasimoto⁽³⁾ die interessante Erscheinung beobachtet, dass das Papain durch Zugabe von Taka-amylaselösung fast völlig aus seiner konzentrierten Lösung gefällt wird. Der so gewöhnlichen Papain-Amylase-Niederschlag ist vermutlich ein Papain-Amylase-Symplex im Sinn R. Willstätters, da der Niederschlag die beiden enzymatischen Wirkungen von Papain und Amylase von hohem Reinheitsgrade besitzt. Während Papain, sowie Taka-amylase in Wasser leicht löslich ist, ist der „Symplex“ im Wasser schwer, aber in Salzlösungen leicht löslich. Da Akabori und Kasimoto⁽³⁾ die Bindung dieses Symplexes mittels Nukleinsäure auflösen konnten, ist von den genannten Autoren eine weitgehende Reinigung der Amylase erreicht worden. Der Verfasser hat sich bemüht, die Reinigung des Papains über den Papain-Amylase-Niederschlag durchzuführen, und gefunden, dass diese Arbeitsweise bessere Erfolge ergibt als die bisher angewandten üblichen Methoden.

„Papain-Amylase-Symplex“ löst man in 2 N Essigsäure-Acetat-Puffer von $pH = 5$ und lässt die Lösung eine Säule von Aluminiumoxyd durchfließen. Während Amylase dabei von dem Adsorbens festgehalten wird, geht Papain in die Restlösung über. Die Lösung enthält nun das Papain zu etwa 40% der angewandten Menge in sehr hohen Reinheitsgrade und die Aktivitätserhöhung steigt immer mehr und zwar bis zum Zwanzigfachen der Anfangsaktivität. Das so gereinigtes Papain ist aber infolge der Entfernung der Begleitstoffe sehr unbeständig und koaguliert bei der Dialyse der Lösung gegen Wasser zum grossen Teil. Wird die Adsorptionsrestlösung durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf Sättigung gebracht, der dabei entstandene Niederschlag in wenig Wasser aufgelöst

* Früher Shigeo MAEDA.

(1) I. Mitteilung: dies Bulletin, **12** (1937), 319.

(2) *Z. physiol. Chem.*, **138** (1924), 184; **164** (1927), 10.

(3) *J. Chem. Soc. Japan*, **59** (1938), 563; dies Bulletin, **13** (1938), 453.

und gegen destilliertes Wasser bei 5° dialysiert, ist die Koagulierung des Enzyms bis zu einem gewissen Grade zu vermeiden. Aus der Innenlösung der Dialyse wird durch Fällung mit Aceton ein hochgereinigtes Papainpräparat gewonnen, das 48.46% C, 7.03% H und 13.7% N enthält. Der Tryptophangehalt beträgt 1.39%, also um die Hälfte weniger als der des Ausgangspräparats (3.43%). Während im gereinigten Präparat die SH-Reaktion mit Nitroprussidnatrium weder vor noch nach dem Behandeln mit Blausäure positiv verläuft, ist aber das Präparat, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, durch Blausäure aktivierbar. Diese Aktivierung beobachtet man nur bei mehrstündiger Einwirkung des Enzyms auf Gelatine, nicht aber bei der Anfangsverdauung. Auf Grund der obigen Tatsachen glaubt der Verfasser Anhaltspunkte dafür gewonnen zu haben, dass die Blausäureaktivierung des Papains nicht auf der Aufspaltung der in dem Enzymkomplex enthaltenen -S-S- Gruppen in SH-Gruppen beruht,⁽⁴⁾ wie bisher in zahlreichen Arbeiten ausschliesslich angenommen worden ist, sondern auf der Entfernung des Hemmungskörpers, der im Lauf der Verdauung entsteht oder im Papainpräparat vorkommt. Das Papain ist vielleicht ein spezielles Protein, das eine Aldehyd-Gruppe, aber keine -S-S- Gruppen oder SH-Gruppen trägt, wie der Verfasser schon in der I. Mitteilung erörtert hat.

Beschreibung der Versuche.

I. Darstellung der Taka-amylaselösung. 50 g. Taka-amylase wurden in 200 c.c. Wasser gelöst, mit 235 c.c. Methanol versetzt und der von dem abgeschiedenen Niederschlag abzentrifugierten Lösung wiederum 367 c.c. Methanol zugefügt. Der hierbei gewonnene zweite Niederschlag wurde abzentrifugiert, im wenig Wasser gelöst, mittels einer Kollodiumhülse gegen destilliertes Wasser dialysiert und die Innen- und Aussenlösung der Dialyse zur Reinigung von Papain angewandt.

II. Papaineinheit und Papainwert. Der Verfasser definiert diejenige Enzymmenge als Papain-Einheit [$P-(e)$], die unter den nachstehenden Verdauungsbedingungen einen COOH-Zuwachs entsprechend 1 c.c. einer 0.2 N KOH ergibt. Als Mass für den Reinheitsgrad wird der Papain-Wert [$P-(w)$] vorgeschlagen, welcher die Anzahl der Papain-Einheiten in 10 mg. Präparat angibt.

Ausführung der Bestimmung. Eine Mischung von 5 c.c. 5%iger Gelatinelösung, 5 c.c. N/5 Essigsäure-Acetat-Puffer (ρ H = 5) und (5 - x)c.c. destilliertem Wasser versetzt man mit x c.c. der zu bestimmenden unbekannten Menge von Papainlösung (Gesamtvolumen 15 c.c.). Nachdem die Mischung 10 Minuten bei 36° verblieben ist,

(4) W. Grassmann, *Z. angew. Chem.*, **44** (1931), 105; *Biochem. Z.*, **279** (1935), 131; Th. Bersin, *Ergeb. Enzymforsch.*, **4** (1935), 68; *Z. physiol. Chem.*, **220** (1933), 209; **222** (1934), 177; E. Maschmann, *ibid.*, **219** (1933), 99; **228** (1934), 141; *Biochem. Z.*, **277** (1935), 97.

wird sie unter Zusatz von Formol titriert. Bei der Bestimmung der Papain-Einheit darf der COOH-Zuwachs nicht über 0.2 Milliäquivalent (1.0 c.c. 0.2 N KOH) steigen; denn der COOH-Zuwachs ist bei den erwähnten Verdauungsbedingungen nur innerhalb der obigen Grenze der verwandten Enzymmenge proportional, wie in Abb. 1 graphisch dargestellt ist.

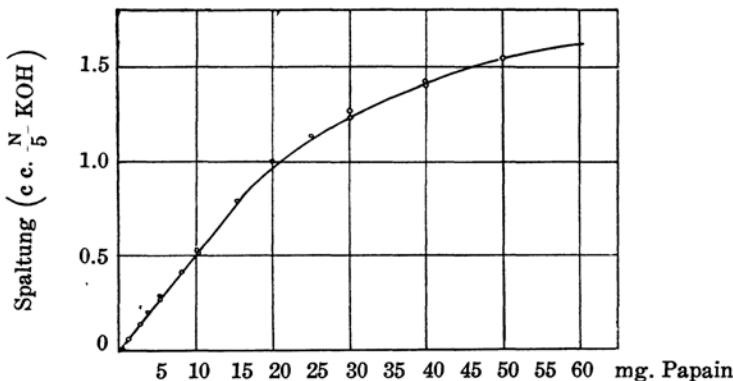


Abb. 1. Papainmenge und Grad der Hydrolyse.

III. Vorreinigung des Papains. 100 g. Handelspapain wurden mit 500 c.c. destilliertem Wasser durchgeschüttelt, 4–5 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, abzentrifugiert und mittels einer Kolloidumhülse 17 Stunden lang bei 5° gegen Wasser dialysiert. Aus der Innenlösung (SH-Reaktion war sehr deutlich) wurde das Papain durch Zusatz von Aceton gefällt und über Schwefelsäure unter Vakuum getrocknet (SH-Reaktion war sehr schwach). 50 g. des getrockneten Papains ($[P-(e)] = 390$, $[P-(w)] = 0.06$) wurden in 250 c.c. N Essigsäure-Aacetat-Puffer vom $pH = 5$ gelöst, zweimal mit je 30 g. Aluminiumoxyd behandelt, abzentrifugiert und in der Restlösung sowohl die Enzymmenge als auch der Reinheitsgrad bestimmt. Mittels dieser Behandlung kann man den Reinheitsgrad auf das Doppelte steigern ($[P-(e)] = 330$, $[P-(w)] = 0.14$).

IV. Reinigung des Papains durch Amylase. (1) Versuche mit der Innenflüssigkeit der Dialyse von Taka-amylase. Versetzt man 100 c.c. Papainlösung ($[P-(e)] = 132$, $[P-(w)] = 0.14$) mit einer überschüssigen Menge von 10%iger Taka-amylaselösung, so entsteht ein dunkelbrauner Papain-Amylase-Niederschlag N, welcher abzentrifugiert wird. Aus dem Filtrat lässt sich durch Zugabe der fünffachen Menge destillierten Wassers der zweite Niederschlag N_2 fällen. Der erste Niederschlag N₁ wird in 2N Essigsäure-Aacetat-Puffer vom $pH = 5$ aufgelöst und nun durch eine mit Al_2O_3 gefüllte Röhre, welche vor der Adsorption mit der selben Pufferlösung gewaschen worden ist, sehr langsam hindurchgesaugt. Dabei wird die Amylase auf dem Adsorbens festgehalten, während das Papain in die Restlösung geht. Nach dreimaliger Adsorption wird das Papain durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat ausgesalzen und die Suspension daraufhin mehrere Stunden in einem kalten Raum absitzen gelassen. Die klare obere Flüssigkeit wird mit einem Heber abgetrennt und die Suspension mittels einer Kolloidumhülse bei 5° dialysiert. Die Innenflüssigkeit filtriert man ab, fällt

mit dem sechsfachen Volumen an Aceton und trocknet im Vakuum über Schwefelsäure. Ein wie oben gereinigtes Papainpräparat zeigt einen Papain-Wert von 1.38.

Der zweite Niederschlag N₂ wird in gleicher Weise behandelt, wobei fast dasselbe Resultat ($[P-(w)] = 1.36$) gewonnen wird. Die Experimente wird in Tabelle 1 schematisch angegeben.

(2) Versuche mit Aussenflüssigkeit der Dialyse von Taka-amylase. Die Versuche mit der Aussenamylase (Amylase in der Aussenflüssigkeit der Dialyse) ergaben fast gleiche Resultate.

Tabelle 1.

Vorgereinigte Papainlösung 100 c.c. [P-(e)] = 132; [P-(w)] = 0.14	
Innenflüssigkeit der Amylase zugesetzt	
Niederschlag N ₁ [P-(e)] = 74.90; [P-(w)] = 0.28	Filtrat
Restlösung	Zugabe von 5 Volumina Wasser
Ausgesalzen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialysiert	Niederschlag N ₂ [P-(e)] = 57.0; [P-(w)] = 0.27
Innenlösung	Restlösung
Fällung mit 6 Volumina Aceton	Ausgesalzen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialysiert
Papain-Präparat [P-(e)] = 30.0; [P-(w)] = 1.38	Innenlösung
	Fällung mit 6 Volumina Aceton
	Papain-Präparat [P-(e)] = 24.0; [P-(w)] = 1.36

in 2 N $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ -Puffer
(pH = 5) gelöst, adsorbiert an Al_2O_3

Restlösung

Ausgesalzen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialysiert

Innenlösung

Fällung mit 6 Volumina Aceton

Papain-Präparat

V. Aktivierung des gereinigten Papains. Zu 10 c.c. der Adsorptionsrestlösung (Trockengewicht 2.6 mg. pro 1 c.c.) fügt man 10 c.c. einer 3%igen Blausäurelösung hinzu, lässt 2 Stunden lang in einem Thermostaten von 36° voraktivieren, versetzt dann 80 c.c. 5%ige Gelatin-lösung, pipettiert nach verschiedenen Zeiträumen je 10 c.c. ab und prüft die Aktivität mit Hilfe der Formoltitration. Die Versuchsresultate sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)					
Stunde	1/6	1	3	5	24
ohne HCN	0.36	1.04	1.80	2.03	2.80
mit HCN	0.32	1.15	2.10	2.75	3.85

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. S. Akabori und Herrn K. Kasimoto für ihre liebenswürdigen Ratschläge und freundliche Unterstützung meinen herzlichen Dank aussprechen.

Chemisches Institut der Kaiserlichen Universität zu Osaka.
