

Über die chemische Natur des Papains. III. Mitteilung.⁽¹⁾
Über die Wirkungsweise der Blausäure auf Papain.

Von Shigeo OKUMURA.

(Eingegangen am 28. März, 1939.)

In seiner II. Mitteilung⁽²⁾ hat der Verfasser eine Reinigungsmethode des Papains mittels Taka-Amylase beschrieben und dabei erwähnt, dass bei dem so gewonnenen Papain-Präparat die SH-Reaktion mit Nitroprussidnatrium weder vor noch nach dem Behandeln mit Blausäure positiv verläuft, das Papain-Präparat aber durch Blausäure aktivierbar ist. Aus diesem Umstand hat der Verfasser abgeleitet, dass die Blausäureaktivierung des Papains nicht auf der Aufspaltung der in dem Enzymkomplex enthaltenen -S-S-Gruppen in SH-Gruppen, sondern auf der Entfernung des Hemmungskörpers beruht, der im Laufe der Verdauung entsteht oder im Papain-Präparat vorkommt.

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

(2) dies Bulletin, **13** (1938), 534.

Auf Grund der oben erwähnten Tatsachen hat der Verfasser gemäss der vorliegenden Mitteilung Versuche über die Wirkungsweise der Blausäureaktivierung durchgeführt. Dabei wurde die Vorstellung des Verfassers über die Natur der Blausäure-Aktivierung durch den Befund, der in Abb. 1 und Tabelle 1 wiedergegeben ist, experimentell bestätigt. Es wurde nämlich, nachdem Gelatine durch ein mit Amylase gereinigtes Papain 24 Stunden lang verdaut worden war, abermals Gelatine zugesetzt. Dabei war der Anstieg der Verdauungskurve beim Papain-Gelatine-System (Kurve I) sehr gering, beim HCN-Papain-Gelatine-System (Kurve II) jedoch sehr deutlich.

Aus diesem Befund kann man den Schluss ziehen, dass das Papain beim HCN-Papain-Gelatine-System, da es infolge der Schutzwirkung der Blausäure vor einer Hemmungswirkung der Abbauprodukte behütet wird, die frisch zugesetzte Gelatine gut verdauen kann, während das Papain bei Abwesenheit von Blausäure durch Protein-Abbauprodukte gehemmt wird.

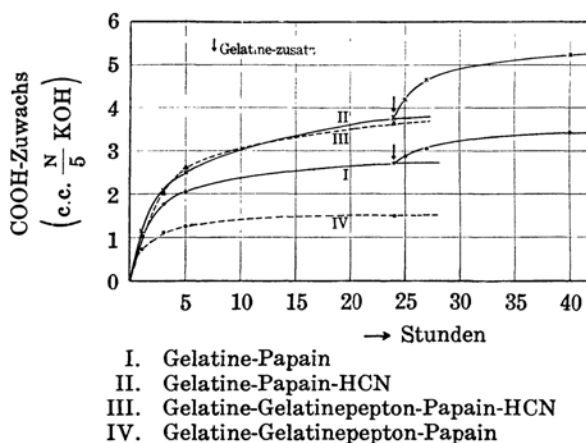


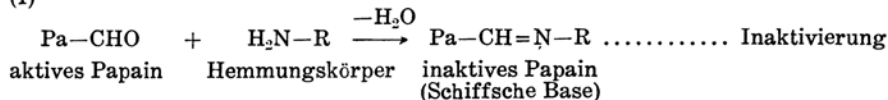
Abb 1.

Um seine Annahme weiter zu verstärken, hat der Verfasser einen Versuch angestellt, bei dem er gefunden hat, dass das Papain beim Papain-Gelatine-System (Kurve IV) bereits von Anfang der Verdauung an stark, beim HCN-Papain-Gelatine-System (Kurve III) dagegen nicht gehemmt wird, wenn man das vorher hergestellte Protein-Abbauprodukt schon auf das Papain einwirken lässt, bevor dieses zur Gelatine gemischt wird. Demnach möchte der Verfasser annehmen, dass die Blausäureaktivierung des Papains nicht auf der Erweiterung der Spezifität, sondern auf der Beseitigung schädlichen Einflusses von Seiten des Hemmkörpers beruht.

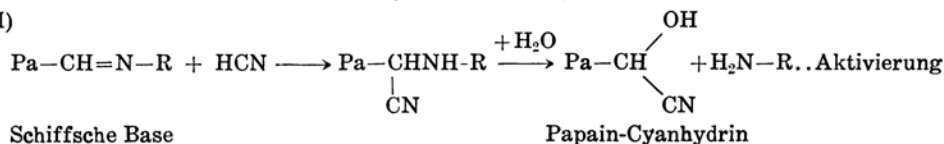
Der gleiche Hemmungseffekt auf Papain konnte man auch bei Glycyl-leucin beobachten. Die Hemmungswirkung dieses Peptides lässt sich gleichfalls durch Blausäure beseitigen (Tabelle 3). Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass der Hemmkörper vielleicht ein spezielles Peptid sei. Zieht man die Tatsache in Betracht, dass das Papain ein eine Aldehyd-Gruppe tragendes Protein ist, wie der Verfasser schon in der I. Mitteilung mitgeteilt hat, so wird man zu dem Schluss kommen, dass

die Hemmungserscheinungen auf einer Schiffsch-Base-Bildung durch die Kondensation der Aldehyd-Gruppen des Papains mit den Amino-Gruppen der Peptide beruhe, und die Blausäureaktivierung daher ihren Grund in einer Behinderung dieser Kondensation und einer Regeneration der Aldehyd-Gruppen des Papains aus der bereits entstandenen Schiffsch-Base bestehe. Dieser Vorgang kann folgendermassen formuliert werden:

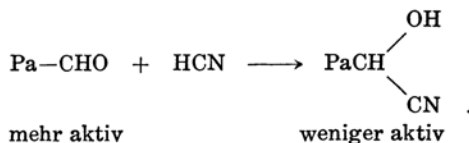
(I)



(II)

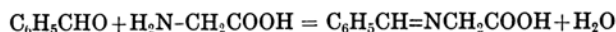


(III)

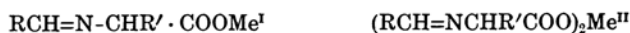


Nach der obigen Formulierung nimmt der Verfasser an, dass das Papain-Cyanhydrin mit Gelatine schwerer zu verbinden ist als das Papain, dass daher die Anfangsaktivität des Papain-Cyanhydrins niedriger, seine proteolytische Wirkung jedoch dauernder ist.

Über die Kondensation von Aldehyden mit Aminosäuren bzw. Peptiden sind Untersuchungen von Gerngross und Zühlke⁽³⁾, Scheibler und Baumgarten⁽⁴⁾ und Bergmann⁽⁵⁾ angestellt worden. Die Aminosäuren bzw. Peptide werden nämlich schon durch Schütteln mit den Aldehyden in wässrigem alkalischen Medium leicht kondensiert. Z. B. entsteht aus Benzaldehyd und Glycin Benzyliden-Glycin.



Vor allem stellte M. Bergmann zahlreiche Aldehyd-Aminosäure-Verbindungen folgender Typen dar,



Me^I = einwertiges Metall oder Radikal

Me^{II} = zweiwertiges Metall

und erhielt die Ausgangsaminosäuren bzw. Peptide durch Spaltung mittels Mineralsäure wie Schwefelsäure, Salzsäure und Salpetersäure zurück.

Um den Wirkungsmechanismus der Blausäure zu prüfen, hat der Verfasser als Modellversuch das Benziliden-Glycin-Barium nach Angaben

(3) Gerngross, *Biochem. Z.*, **108** (1920), 89; Gerngross, Zühlke, *Ber.*, **57** (1924), 1482.

(4) Scheibler, Baumgarten, *Ber.*, **55** (1922), 1358.

(5) M. Bergmann, *Ber.*, **58** (1925), 1034; Bergmann, Zervas, *Z. Physiol. Chem.*, **152** (1926), 293, **172** (1927), 286.

von Bergman dargestellt und sowohl mittels 5N-Schwefelsäure als auch 20%ige Blausäure⁽⁶⁾ aufgespalten. Dabei hat er beobachtet, dass das Benziliden-Glycin-Barium in Blausäurelösung leicht löslich und gleichzeitig unter Benzaldehyd-Abspaltung leicht zersetzlich ist.

Wenn der durch den Modellversuch dargestellte Vorgang wirklich stattfindet, dann liegt die Möglichkeit nahe, dass sich die durch Blausäure gespaltenen Hemmungskörper H_2N-R nach Schema (II) isolieren lassen soll, was sich experimentell leicht nachprüfen lässt. Nachdem das vorgereinigte⁽²⁾ Papain in Wasser gelöst und mit Blausäure aktiviert worden ist, wird die Enzymlösung mittels Kollodiumhülle gegen destilliertes Wasser dialysiert. Aus der Aussenlösung der Dialyse wird durch Eindampfen im Vakuum eine dunkle braune Masse gewonnen, welche die Ninhydrin-Reaktion sehr deutlich zeigt und keine proteolytische Wirkung besitzt. Dabei ist es bemerkenswert, dass die Aktivität des Papains durch Beseitigung des Hemmungskörpers verstärkt wird. Wie in der Tabelle 4 ersichtlich ist, kann dieser dunkle braune Hemmungskörper die Wirkung des Papains hemmen, das letztere aber durch Zusatz der Blausäure reaktiviert werden.

Der Verfasser glaubt hiermit, dass, auf Grund der oben beschriebenen experimentellen Tatsachen, der Mechanismus der Blausäureaktivierung des Papains einigermassen geklärt worden sei.

Beschreibung der Versuche.

Versuchsreihe I. Zum Versuche wurde das mit Amylase gereinigte Papain angewandt. Ansätze: Nr. 1; 1%ige Papainlösung 10 c.c. (N-Acetatpuffer-Lösung, (pH = 5)) + 5%ige Gelatine-Lösung 80 c.c. + Wasser 10 c.c. Nr. 2; 1%ige Papainlösung 10 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 80 c.c. + 3%ige Blausäure-Lösung 10 c.c. Dann wurden nach einer bestimmten Zeitspanne 10 c.c. abpipettiert und deren Aktivität geprüft, nach 24 Stunden wieder 20 c.c. 5%ige Gelatine-Lösung zugesetzt, 12 c.c. abpipettiert und titriert. Nr. 3; 1%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Wasser 20 c.c. Nr. 4; 1%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Wasser 15 c.c. + 3%ige Blausäure 5 c.c. Nr. 5; 1%ige Papainlösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + 5%ige Gelatine-Pepton-Lösung 10 c.c. + Wasser 10 c.c. Nr. 6; 1%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + 5%ige Gelatine-Pepton-Lösung 10 c.c. + 3%ige Blausäure-Lösung 5 c.c. + Wasser 5 c.c. Die Aktivität wurde mit jeweils 10 c.c. geprüft.

Tabelle 1. COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)

Stunde			1/6	1	3	5	24	Nachträgliche Zugabe von Gelatine		
								25	27	40
A	Nr. 1	ohne Zusatz	0.35	1.04	1.80	2.03	2.80	2.90	3.05	3.48
	Nr. 2	+HCH	0.32	1.15	2.10	2.55	3.75	4.20	4.70	5.30
B	Nr. 3	ohne Zusatz	0.28	1.14	1.66	2.00	2.71	—	—	—
	Nr. 4	+HCN	—	1.08	1.99	2.43	3.53	—	—	—
	Nr. 5	+Gelatine-Pepton	0.16	0.72	1.13	1.28	1.74	—	—	—
	Nr. 6	Nr. 5+HCN	—	1.04	2.03	2.51	3.65	—	—	—

(6) Gesättigte Lösung von gasförmiger Blausäure, die aus $Na_3Fe(CN)_6$ und H_2SO_4 entwickelt worden war.

Dieselbe Erscheinung wurde natürlich auch bei dem vorgereinigten Papain⁽²⁾ beobachtet. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 und 3 zusammengestellt.

Versuchsreihe II. Ansätze: Nr. 1; 5%ige Papain-Lösung (N-Acetat-Puffer-Lösung ($pH = 5$)) 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Wasser 20 c.c. Nr. 2; 5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + 3%ige Blausäure-Lösung 5 c.c. + Wasser 15 c.c. Nr. 3; 5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + 4%ige Witte-Pepton-Lösung 10 c.c. + Wasser 10 c.c. Nr. 4; 5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + 4%ige Witte-Pepton-Lösung 10 c.c. + 3%ige Blausäure-Lösung 5 c.c. + Wasser 5 c.c. Nr. 5; 2.5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Wasser 20 c.c. Nr. 6; 2.5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Gelatine-Pepton-Lösung 10 c.c. + Wasser 10 c.c. Nr. 7; 2.5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Gelatine-Pepton-Lösung 20 c.c. Die Aktivität wurde mit jeweils 10 c.c. geprüft.

Tabelle 2. COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)

Stunde			1	3	5	24
A	Nr. 1	ohne Zusatz	1.73	2.37	2.62	3.58
	Nr. 2	+HCN	2.05	2.87	3.20	4.63
	Nr. 3	+Witte-Pepton	1.59	2.10	2.20	2.67
	Nr. 4	+HCN+Witte-Pepton	2.48	3.58	4.10	6.20
B	Nr. 5	ohne Zusatz	1.33	1.70	1.92	2.26
	Nr. 6	+Gelatine-Pepton	0.96	1.20	1.28	1.70
	Nr. 7	+Gelatine-Pepton	0.90	1.06	1.10	1.42

Versuchsreihe III. Ansätze: Nr. 1; 2.5%ige Papain-Lösung (in N-Acetat-Puffer-Lösung ($pH = 5$)) 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Wasser 20 c.c. Nr. 2; 2.5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Glycyl-L-leucin 0.55 g. + Wasser 20 c.c. Nr. 3; 2.5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 30 c.c. + Glycyl-L-leucin 1.1 g. + Wasser 10 c.c. Nr. 4; 5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 40 c.c. + Wasser 10 c.c. Nr. 5; 5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 40 c.c. + 3%ige Blausäure-Lösung 5 c.c. + Wasser 5 c.c. Nr. 6; 5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 40 c.c. + Wasser 10 c.c. + Glycyl-L-leucin 1.1 g. Nr. 7; 5%ige Papain-Lösung 5 c.c. + 5%ige Gelatine-Lösung 40 c.c. + 3%ige Blausäure-Lösung 5 c.c. + Wasser 10 c.c. + Glycyl-L-leucin 1.1 g. Die Aktivität wurde mit jeweils 10 c.c. geprüft.

Tabelle 3. COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)

Stunde			1	3	5	24
A	Nr. 1	ohne Zusatz	1.33	1.70	1.92	2.26
	Nr. 2	+Glycyl-L-leucin (0.1 g.)	1.06	1.49	1.58	1.98
	Nr. 3	+Glycyl-L-leucin (0.2 g.)	0.88	1.00 (2 Std.)	1.13 (4 Std.)	1.67
B	Nr. 4	ohne Zusatz	2.40	3.09	3.41	4.74
	Nr. 5	+HCN	2.37	3.41	3.95	5.78
	Nr. 6	+Glycyl-L-leucin (0.2 g.)	1.78	2.35	2.59	3.83
	Nr. 7	+Glycyl-L-leucin (0.2 g.)+HCN	2.10	2.86	3.40	5.58

Isolierung des Hemmungskörpers. Wenn das vorgereinigte Papain in Wasser gelöst, mit Blausäure 24 Stunden lang aktiviert und schliesslich 48 Stunden lang mittels Kolloidiumhülle gegen destilliertes Wasser dialysiert worden ist, wird die Aus-sen-Lösung im Vakuum engedampft und getrocknet. Die Innen-Lösung wird im Vakuum eingengt und auf ihre Aktivität geprüft.

Tabelle 4. COOH-Zuwachs (c.c. N/5 KOH)

Stunde			1/6	1	3	24
A	Nr. 1	Ausgangs-Enzymlösung	0.40	1.02	—	—
	Nr. 2	Innen-Lösung	0.68	1.40	—	—
	Nr. 3	Nr. 2+Hemmungskörper	0.54	1.12	—	—
B	Nr. 4	Innen Lösung	—	—	2.24	2.94
	Nr. 5	Nr. 4+Hemmungskörper	—	—	1.96	2.60
	Nr. 6	Nr 5+HCN	—	—	2.06	3.34

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. S. Akabori für seine lebens-würdigen Ratschläge und freundliche Unterstützung meinen herzlichsten Dank aussprechen.

*Chemisches Institut der Kaiserlichen
Universität zu Osaka.*
