

**490. Karl Josephson:  
Die Enzyme des Emulsins, I.: Über die Amylase-Wirkung einiger  
Emulsin-Präparate.**

[Aus d. Biochem. Laborat. d. Hochschule Stockholm.]

(Eingegangen am 22. Oktober 1925.)

Die verschiedenen hydrolysierenden Wirkungen des Mandel-Emulsins auf Glucoside und verschiedene Zuckerarten hat man durch die Annahme zu erklären gesucht, daß das Emulsin eine Mischung von mehreren Enzymen darstellt. Ein jedes Teil-Enzym des Enzym-Gemisches ist nach dieser Auffassung auf sein Substrat oder seine Substrate spezifisch eingestellt. So sollen nach H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und E. Horton<sup>1)</sup> bei der enzymatischen Hydrolyse des Amygdalins zwei verschiedene glucosid-spaltende Enzyme wirksam sein, nämlich erstens die Amygdalase, welche die Spaltung des Amygdalins in Mandelsäurenitril-glucosid (Prunasin) und Glucose bewirkt<sup>2)</sup>, und zweitens die Prunase, ( $\beta$ -Glucosidase), welche die Spaltung des Prunasins bewirkt. Von E. Bourquelot und H. Hérissé<sup>3)</sup> liegen weitere Angaben über die Hydrolyse anderer Glucoside (Galaktoside) und zusammengesetzter Zuckerarten vor. Diese Enzym-Wirkungen wurden von den genannten Forschern auf die Mischung des Emulsins mit Enzymen, welche mit den oben erwähnten bei der Amygdalin-Spaltung wirkenden Komponenten des Enzym-Gemisches nicht identisch sind, zurückgeführt.

Neuerdings hat R. Kuhn<sup>4)</sup> außerdem einige Versuche mitgeteilt, welche die enzymatische Hydrolyse der Stärke sowie einiger Abbauprodukte der Stärke durch Emulsin-Präparate betreffen. Obwohl nach den ziemlich wenigen Versuchen des erwähnten Forschers die Frage noch offen bleiben mußte, inwieweit das gefundene Stärke-Spaltungsvermögen der untersuchten Emulsin-Präparate einer in den Mandeln vorkommenden von dem 1,4- $\beta$ -glucosid-spaltenden Enzym ( $\beta$ -Glucosidase) verschiedenen Amylase zuzuschreiben ist, findet Kuhn doch seine Versuche als „vielleicht geeignet, die teilweise  $\beta$ -glucosidische Natur der Stärke auf neuem Wege wahrscheinlich zu machen“.

Nun hat Kuhn<sup>4)</sup> bezüglich der Amylasen eine Verschiedenheit im Wirkungsmechanismus konstatiert, und auf Grund dessen unterscheidet er zwischen  $\alpha$ -Amylasen, als deren ersten Vertreter Pankreas- und Taka-Diastase anzuführen sind, und  $\beta$ -Amylasen, welche bisher nur durch die Malz-Amylase vertreten sind. Das Unterscheidungsmerkmal der beiden Amylase-Typen soll darin bestehen, daß die  $\alpha$ -Amylasen das Endprodukt der Stärke-Hydrolyse in  $\alpha$ -Form entstehen lassen, während bei der Hydrolyse der Stärke durch  $\beta$ -Amylasen das Endprodukt primär in  $\beta$ -Form entsteht. Nun soll man nach Kuhn mit den Bezeichnungen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen „keinesfalls die Vorstellung verbinden, daß die ersteren wie die Maltasen der Hefen  $\alpha$ -spaltende Glucosidasen, die letzteren  $\beta$ -Glucosidasen vom Typ der im

<sup>1)</sup> Soc. 85, 359 [1912].

<sup>2)</sup> Nachdem die  $\beta$ -Natur der Amygdalin-Biose von Kuhn (B. 56, 857 [1923]) festgestellt worden ist, muß allerdings die Amygdalase als ein  $\beta$ -Enzym betrachtet werden.

<sup>3)</sup> Soc. Biol. 55, 219 [1903].

<sup>4)</sup> H. 135, 12 [1924]; A. 443, 1 [1925]; vergl. O. v. Friedrichs, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 5, Nr. 2 [1913]. — Euler und Helleberg, H. 139, 24 [1924].

Emulsin vorhandenen Fermente sind“. Eine ähnliche Auffassung vertritt auch H. Pringsheim<sup>6)</sup>, der außerdem einige Versuche angestellt hat zur Prüfung, inwieweit die Amylase des Emulsins als eine  $\alpha$ -Amylase oder eine  $\beta$ -Amylase zu charakterisieren ist. Aus dem Verhalten der Kombinationen Malz + Emulsin zu Stärke schließt Pringsheim weiter, daß die Emulsin-Amylase nicht, wie man erwarten könnte, eine  $\beta$ -Amylase, sondern eine  $\alpha$ -Amylase ist; falls diese Auffassung als richtig angenommen werden kann, ist das Verhalten der Stärke zu Emulsin kaum, wie Kuhn meint, geeignet, die teilweise  $\beta$ -glucosidische Natur der Stärke „auf neuem Wege wahrscheinlich zu machen“, wenn auch das Vorkommen sowohl von  $\alpha$ - wie  $\beta$ -Bindungen im Stärke-Molekül als wahrscheinlich betrachtet werden muß<sup>6)</sup>.

Die im experimentellen Teil mitgeteilten Versuche betreffen nun die mit den modernen Hilfsmitteln der Enzym-Reinigung ermöglichte Trennung der Einzel-Enzyme eines Enzym-Gemisches, und zwar die teilweise Trennung der  $\beta$ -Glucosidase vom stärke-spaltenden Enzym im Emulsin. Die Versuche sind zur Zeit nur als vorläufige zu betrachten, indem bis jetzt keine vollständige Trennung der beiden Enzym-Wirkungen bewirkt werden konnte; es soll aber gezeigt werden, daß Emulsin-Präparate verschiedener Reinheitsgrade ein stark differierendes Verhalten einerseits zu dem  $\beta$ -Glucosid Salicin, andererseits zu Stärke zeigen. Es wurden also Versuche angestellt, welche vergleichende quantitative Messungen der beiden besprochenen Enzym-Wirkungen ermöglichten. Wegen der variierenden Selektivität der Reinigungsmittel gegenüber den beiden Teil-Enzymen des Enzym-Gemisches konnten Präparate dargestellt werden, welche ungleiche Mengen der beiden Enzyme enthalten.

Obwohl die Anwendung der Adsorptionsmethoden in diesem Falle viel ungünstiger war als z. B. im Falle der Hefen-Saccharase, wurden Enzym-Präparate erhalten, welche pro Gramm Trockengewicht eine stärkere  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität zeigten als vorher erhaltene Emulsin-Präparate. Das beste der im experimentellen Teil beschriebenen Präparate zeigte also  $\text{Sal. f} = 0.61$  ( $\beta$ -Gl.-W. = 10.1), wobei die Messung der Aktivität unter den vom Verfasser näher festgestellten Bedingungen bei der Bestimmung der Salicin-Spaltungsfähigkeit<sup>7)</sup> ausgeführt wurde.

### Beschreibung der Versuche.

Als Enzym-Material wurden teils Emulsin-Präparate von ähnlichem Reinheitsgrad wie die vom Verfasser vorher bei dem Studium der Wirkungsweise der  $\beta$ -Glucosidase angewandten Präparate, also mit  $\text{Sal. f} =$  etwa 0.2, verwendet, teils einige Präparate, die durch Anwendung der Adsorptionsmethoden noch weiter von Verunreinigungen befreit worden waren.

Von den Präparaten, die nur durch die Vorreinigung mit Alkohol-Fällung gereinigt waren, zeigte das Präparat  $E_8$  (einmal mit Alkohol gefällt)  $\text{Sal. f} = 0.20$  und das daraus durch eine zweite Alkohol-Fällung erhaltene Präparat  $E_9$   $\text{Sal. f} = 0.22$ .

<sup>6)</sup> H. Pringsheim und J. Leibowitz, B. 58, 1262 [1925]; vergl. auch H. v. Euler und K. Myrbäck, Sv. Kem. Tidskrift 37, 173 [1925].

<sup>8)</sup> siehe hierzu O. v. Friedrichs, a. a. O. — P. Karrer, Helv. 3, 258 [1918]. — Euler und Helleberg, a. a. O.

<sup>7)</sup> H. 147, 1, und zwar 26ff. [1925].

Die durch Adsorption gereinigten Präparate wurden in folgender Weise erhalten.

Präparat E<sub>10</sub>: 100 ccm einer Lösung des Präparates E<sub>8</sub>, enthaltend 30 mg in 1 ccm wurden nach Verdünnen auf das vierfache Volumen mit 20 ccm einer Tonerde-Suspension (enthaltend 0.84 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) versetzt. Dabei wurden 25 % der  $\beta$ -Glucosidase adsorbiert. Nach Zusatz von weiteren 55 ccm Al(OH)<sub>3</sub>-Suspension wurde das Adsorbat abzentrifugiert. Die Untersuchung der Restlösung ergab, daß rund 95 % der  $\beta$ -Glucosidase adsorbiert waren. Die Elution wurde mit 150 ccm einer 0.75-proz. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung vorgenommen. Nach Neutralisation mit Essigsäure wurde die Aktivität geprüft. Es zeigte sich, daß nur rund 20 % der adsorbierten  $\beta$ -Glucosidase-Menge eluiert worden waren. Bei der nachfolgenden zweitägigen Dialyse in Kollodium-Membranen traten wieder große Enzym-Verluste ein, so daß in der schließlichen Lösung E<sub>10</sub> nur etwa 10 % von der in der ursprünglichen Lösung E<sub>8</sub> vorhandenen  $\beta$ -Glucosidase-Menge erhalten wurden. Trotzdem war die Aktivität der Lösung pro Gramm Trockengewicht mehr als verdoppelt, indem Sal. f zu 0.55 ( $\beta$ -Gl.-W. = 9.1) bestimmt wurde.

Präparat E<sub>11</sub>: Das Präparat wurde in analoger Weise wie das Präparat E<sub>10</sub> dargestellt, durch fraktionierte Adsorption aus der Lösung E<sub>8</sub>. Die dialysierte Elution E<sub>11</sub> zeigte Sal. f = 0.61 ( $\beta$ -Gl.-W. = 10.1). Nach der Adsorption wurden in der Restlösung nur 3 % von der ursprünglichen  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität wiedergefunden, während von der Amylase-Wirkung noch 10 % in nicht adsorbierter Form zurückblieben.

Die Bestimmung der Amylase-Wirkung wurde mit Reaktionsmischungen von folgender Zusammensetzung ausgeführt:

- 1 g löslicher Stärke (Merck),
- 10 ccm 0.3-n. Phosphat-Mischung (p<sub>H</sub> = 5.0),
- a ccm Enzym-Lösung,
- 40—a ccm destilliertes Wasser,
- 50 ccm Totalvolumen.

Die Versuchsmischungen waren in einem elektrisch erhitzten Thermostaten mit einer Temperatur von  $30.0 \pm 0.05^0$  eingesenkt. Die Verfolgung der Stärke-Spaltung geschah reduktionsanalytisch unter Anwendung der Methode von G. Bertrand. Die Amylase-Wirkungen wurden nach der Formel

$$Sf^{30} = (k \times g \text{ Maltose}) : g \text{ Enzym-Präparat}$$

ausgedrückt.

In dieser Formel bedeutet k den nach der Formel für monomolekulare Reaktionen berechneten Reaktionskoeffizienten (t in Min.); g Maltose ist die aus der Stärke gebildete maximale Menge der Maltose (aus 1 g Stärke 1.056 g Maltose); g Enzym-Präparat bedeutet die in der Versuchsmischung bei der Messung von k vorhandene Menge Enzym-Präparat (Trockengewicht der a ccm Enzym-Lösung).

Tabelle 1.

Bestimmung der Amylase-Wirkung von entfettetem Mandel-Pulver (Placenta amygdalarum amararum). Sal. f = 0.020. 1 g Placenta in 50 ccm Reaktionsmischung.

Stunden	mg Maltose	$k \times 10^4$ (t in Stdn.)	$Sf^{30}$ (t in Min.)
3	9.2	64	0.00010
7.75	18.5	51	
22	54.2	59	
46	78.4	44	
$\infty$	211.2	—	

Die ausgeführten Amylase-Bestimmungen sind in den untenstehenden Tabellen wiedergegeben. Die Sal.-f-Bestimmungen werden aber, um Raum

zu sparen, hier nicht wiedergegeben. Die Sal.-f-Werte der verschiedenen Präparate sind aber bei den betreffenden Tabellen über die Amylase-Wirkungen wiedergegeben.

Das Verhältnis zwischen  $\beta$ -Glucosidase-Wirkung und Amylase-Wirkung für das Ausgangsmaterial bei der Darstellung der Enzym-Präparate berechnet sich zu  $\text{Sal. f/Sf}^{30} = 200$ .

Nach der Fällung mit Alkohol und Wiederauflösung der Fällung in Wasser wurde das Verhältnis  $\text{Sal. f/Sf}^{30}$  vergrößert gefunden; die Anreicherung der  $\beta$ -Glucosidase ist also größer als die Anreicherung der Amylase. Die Bestimmungen der Amylase-Wirkungen der beiden mit Alkohol gefällten Präparate  $E_8$  und  $E_9$  finden sich in den Tabellen 2 und 3.

Tabelle 2.

Stärke-Spaltung durch Präparat  $E_8$  ( $\text{Sal. f} = 0.20$ ). 150 mg  $E_8$  in 50 ccm Reaktionsmischung.

Stunden	mg Maltose	$k \times 10^4$ (t in Stdn.)	$\text{Sf}^{30}$ (t in Min.)
6	6.8	48	0.00056
18	19.4	49	
26	26.3	48	
42	39.3	48	
72	52.8	43	
96	53.9	32	
146	65.8	29	
$\infty$	105.6	—	

$\text{Sal. f/Sf}^{30}$  wird also zu 360 berechnet. Die Aktivität der  $\beta$ -Glucosidase-Wirkung pro Gramm Trockengewicht war auf das 10-fache gesteigert, während die Aktivität der Amylase-Wirkung nur auf das 5.6-fache gesteigert war.

Tabelle 3.

Stärke-Spaltung durch Präparat  $E_9$  ( $\text{Sal. f} = 0.22$ ). 326 mg  $E_9$  in 50 ccm Reaktionsmischung.

Stunden	mg Maltose	$k \times 10^4$ (t in Stdn.)	$\text{Sf}^{30}$ (t in Min.)
3.5	13.6	83	0.00042
7	23.9	75	
21	65.5	77	
$\infty$	211.2	—	

Durch die Umfällung durch Alkohol wurde also die Amylase-Wirkung etwas vermindert, wahrscheinlich wegen der Empfindlichkeit der Amylase gegen Alkohol, während die  $\beta$ -Glucosidase eine geringe Aktivitätsverbesserung zeigte.  $\text{Sal. f/Sf}^{30}$  wurde zu 520 berechnet.

Anders liegen die Verhältnisse bei Anwendung von Tonerde-Hydrat als Reinigungsmittel. Bei Anwendung der Adsorptionsmethode gingen nämlich die Quotienten  $\text{Sal. f/Sf}^{30}$  wieder zurück, indem die Amylase-Aktivität bei der Adsorption oder vielleicht besonders bei der Elution in stärkerem Maße als die  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität verbessert wurde. Die Elution  $E_{10}$  zeigte

nämlich eine 5.7-mal bessere Amylase-Aktivität als die Lösung  $E_8$ , während die  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität nach der Elution und Dialyse nur 2.75-mal stärker als beim Präparat  $E_8$  gefunden wurde.

Tabelle 4.

Stärke-Spaltung durch Präparat  $E_{10}$  (Sal. f = 0.55). 14.2 mg  $E_{10}$  in 50 ccm Reaktionsmischung.

Stunden	mg Maltose	$k \times 10^4$ (t in Stdn.)	$Sf^{30}$ (t in Min.)
18	10.3	25	0.0032
28.5	16.2	25	
51	29.2	28	
72	39.0	28	
96	44.2	25	
146	54.7	22	
190	61.0	20	
$\infty$	105.6	—	

Der Quotient Sal. f/ $Sf^{30}$  berechnet sich zu 170.

Auch betreffend das Präparat  $E_{11}$ , welches durch Adsorption aus dem Präparat  $E_9$  hergestellt wurde, war durch die Reinigung der Quotient Sal. f/ $Sf^{30}$  etwas zurückgegangen. Während der genannte Quotient bei dem Präparat  $E_9$  zu 520 berechnet wurde, betrug er bei dem Präparat  $E_{11}$  420.

Tabelle 5.

Stärke-Spaltung durch Präparat  $E_{11}$  (Sal. f = 0.61). 16.5 mg  $E_{11}$  in 50 ccm Reaktionsmischung.

Stunden	mg Maltose	$k \times 10^4$ (t in Stdn.)	$Sf^{30}$ (t in Min.)
19	11.8	13.1	0.00145
27	16.6	13.2	
44	28.8	14.5	
$\infty$	211.2	—	

Tabelle 6.

Bestimmung der  $\beta$ -Glucosidase-Wirkung der Restlösung  $E_9R$ . 5 ccm  $E_9R$  in 50 ccm Reaktionsmischung (= 1 g Salicin).

Minuten	Drehung	$k \times 10^4$ (t in Min.)	$k \times 10^4$ pro 1 ccm $E_9R$
0	-1.90	—	0.92
11	-1.87	—	
30	-1.80	5.1	
49	-1.77	4.1	
$\infty$	+0.98	—	

Wie oben erwähnt wurde, war die  $\beta$ -Glucosidase etwas leichter durch Tonerde adsorbierbar als die Mandel-Amylase. In den folgenden Tabellen sind zwei Versuche, die diese Verhältnisse näher beleuchten, wiedergegeben. In der Tabelle 6 findet sich nämlich ein Versuch zur Bestimmung der  $\beta$ -Gluc-

sidase-Wirkung der Restlösung  $E_9R$  nach Adsorption mit Tonerde. In der Tabelle 7 ist der Versuch, die Amylase-Wirkung dieser Restlösung zu bestimmen, wiedergegeben. Die bei dem letzten Versuch angewandte Enzym-Menge entsprach 20 ccm der Restlösung, während die Enzym-Menge bei der Bestimmung der  $\beta$ -Glucosidase-Wirkung 5 ccm betrug.

Tabelle 7.

Bestimmung der Amylase-Wirkung der Restlösung  $E_9R$ . 20 ccm  $E_9R$  in 50 ccm Reaktionsmischung.

Stunden	mg Maltose	$k \times 10^4$ (t in Std.)	$k \times 10^4$ (t in Min.) pro 1 ccm $E_9R$
48	12.4	5.5	0.0051
70	22.0	6.8	
$\infty$	211.2	—	

Hieraus läßt sich der Quotient  $Sal. f/Sf^{30}$  für die Restlösung berechnen zu 170, während der Quotient vor der Adsorption 520 betrug.

### Ergebnisse.

Die durch die im Voranstehenden beschriebenen Reinigungs-Operationen (Alkohol-Fällung, Adsorption mit Tonerde-Hydrat) erzielten  $Sal. f$ -Werte und  $Sf^{30}$ -Werte der untersuchten Emulsin-Präparate sind in der Tabelle 8 zusammengestellt. Wie aus den Zahlen der Quotienten in der letzten Spalte der Tabelle zu ersehen ist, ist keine Parallelität zwischen dem Stärke-Spaltungsvermögen und der 1.4- $\beta$ -Glucosidase-Wirkung der Emulsin-Präparate vorhanden. Das Stärke-Spaltungsvermögen des Emulsins ist also auf eine von der 1.4- $\beta$ -Glucosidase verschiedene Amylase zurückzuführen.

Tabelle 8.

Zusammenstellung der  $Sal. f$ - und  $Sf^{30}$ -Werte der untersuchten Emulsin-Präparate.

Präparat	$Sal. f$	$Sf^{30}$	$Sal. f/Sf^{30}$
Mandel-Pulver (entfettet)	0.020	0.00010	200
↓ $E_8$	0.20	0.00056	360
↓ $E_9$ → $E_{10}$	0.55	0.0032	170
↓ $E_9$ → $E_{11}$	0.22	0.00042	520
↓ $E_9R$	—	—	170