

Vergleichende Untersuchungen von Amylasen

Von

H. Michl und A. Pastuszyn

Aus dem Analytischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 12. März 1964)

Es werden die optimalen pH-Werte, Inhibitoren und Spezifität von Unken-, Speichel- und Pankreasamylase bestimmt und verglichen.

Wird Amylose bzw. Stärke mit Unkengift bebrütet, so verliert sie rasch ihre Fähigkeit, mit $\text{KJ}-\text{J}_2$ die charakteristische Blaufärbung zu geben. Es entstehen violette und bräunliche Farbtönungen, bis schließlich keine sichtbare Reaktion mehr auftritt. Dies spricht für das Vorhandensein einer α -Amylase (α -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase)¹ im Unkengift. Das Vorkommen eines solchen Fermentes im Hautsekret von Unken ist sehr überraschend. Wenn überhaupt, würde man es in Sekreten von Giftorganen erwarten, die mit dem Verdauungsapparat in Zusammenhang stehen. Der Speichel von Unken ist aber vollständig frei von diesem Ferment, wie das ja von einem Carnivoren zu erwarten ist.

Zur Charakterisierung dieser Amylasen wurde versucht, sie mit gut bekannten tierischen α -Amylasen, und zwar Pankreasamylase und Speichelamylase zu vergleichen. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse:

Tabelle 1

Enzym	pH Optimum	ADTA, 50% Hemmung, mol/l	Na-Oxalat, 50% Hemmung, mol/l	Na-Citrat 50% Hemmung, mol/l
Pankreasamylase	6,2—6,3	0,00005	> 0,1	0,008
Speichelamylase	6,0—6,1	0,00004	0,02	0,002
Unkengift	6,6	0,00014	0,02	0,014

¹ Report of the Commission on Enzymes of the International Union on Biochemistry 1961, Pergamon Press, Oxford.

Wie bei den beiden bekannten Amylasen^{2, 3} hängt das pH-Optimum der Unken-amylase von der Chloridkonzentration ab und liegt unter den gewählten Versuchsbedingungen um eine halbe Einheit höher als bei diesen. Alle drei Amylasen werden stark von ÄDTA, weniger von Citrat und Oxalat gehemmt. Die Unken-amylase dürfte also ebenso wie die anderen Amylasen^{2, 3} Ca-Ionen für ihre Aktivität benötigen. Tatsächlich lassen sich auch in der Asche von Unkengift Spuren von Ca nachweisen.

Tab. 2. gibt über die Spezifität des Enzymes Auskunft.

Tabelle 2

Kohlenhydrat	Spaltprodukte	Kohlenhydrat	Spaltprodukte
Amylose	Maltose, Glucose, Maltotriose	Maltotetrose	Glucose, Maltose, Maltotriose
Cellobiose	—	Maltotriose	Maltose, Glucose
Inulin	—	Melezitose	—
Lactose	—	Melibiose	—
Maltose	—	Raffinose	—

Von den hochmolekularen Substraten wird nur Amylose und Stärke abgebaut, von den niedermolekularen Maltotetrose und langsamer Maltotriose angegriffen. Auch diese Spezifität entspricht der einer tierischen α -Amylase ohne Beimengung von Glykosidasen.

Experimenteller Teil

Amylase aus Unkengift. Die Amylase kann durch fraktionierte Fällung mit Aceton bei 0—5° angereichert werden. Die Ausb. hängt vom verwendeten Gift ab. Tab. 3 gibt ein typisches Beispiel für eine solche Anreicherung:

Tabelle 3. Fraktionierte Fällung von Unkengift

Fällung	Ausb., mg	Anreicherung	Ausbeute an Aktivität in %
190 mg Unkengift werden in 15 ml Collidinpuffer ⁴ von pH 7,0 aufgenommen			
↓→ „unlöslicher Teil“	36,1	inaktiv	—
Lösung mit 7,5 ml Aceton (1:0,5 v/v) gefällt			
↓→ Fällung 1	1,4	0,65	} 41,5
Lösung mit 22,5 ml Aceton (1:1,5 v/v) gefällt			
↓→ Fällung 2	26,0	3,0	

² P. Bernfeld, Adv. Enzymol. **12**, 379 (1951).

³ E. H. Fischer und E. A. Stein in: „The Enzymes“ (Herausgeber: P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck), Bd. 4, New York 1960.

⁴ H. Michl und H. Bachmayer, Mh. Chem. **94**, 814 (1963).

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Fällung	Ausb., mg	Anreicherung	Ansbeute an Aktivität in %
Lösung 2 Trockengewicht 25 mg Fällung 2 werden in 1,5 ml Pyridinpuffer ⁴ von pH 4,7 gelöst	78,0	inaktiv	—
↓→ „unlöslicher Teil“	2,5	3,0	} 40,5
Lösung wird mit 1 ml Ace- ton (1:0,66 v/v) gefällt			
↓→ Fällung 3	11,0	4,0	
Lösung wird mit 3 ml Ace- ton (1:2) versetzt			
↓→ Fällung 4	2,3	11,0	
Lösung 4	2,7	inaktiv	—

Speichelamylase. Diese wurde nach *Fischer* und *Stein*⁵ aus menschlichem Speichel hergestellt.

Pankreasamylase. Es wurde ein käufliches Produkt (Fluka 50799) verwendet.

Amylose. Diese wurde nach der Thymolmethode nach *Street*⁶ hergestellt.

Maltotriose und Maltotetrose. 50 g Kartoffelstärke werden in 250 ml Pyridinpuffer vom pH 4,8 suspendiert, aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit Speichelamylase bzw. 4 ml filtriertem Speichel versetzt. Der so erhaltene Brei wird 24 Stdn. lang bei 30° inkubiert. Dann stoppt man die Reaktion durch Aufkochen und zentrifugiert die Dextrane ab. Nach Wegdampfen des Puffers bei 30° bleiben 15 g eines Zuckergemisches (Glucose, Maltose, Maltotri- und Maltotetrose) zurück⁷. Durch Chromatographie auf Filterpapierbögen (SS 2043 b) und Verteilung mit n-Propanol—Essigester—Wasser [6:1:3 (v/v)]⁸ kann daraus die Maltotri- und Maltotetrose gewonnen werden. Aus 150 mg Zuckergemisch lassen sich 22 mg Maltotriose (15%) und 5,5 mg Maltotetrose (3,6%) erhalten.

Inulin. Für dieses danken wir der Laevosan-Gesellschaft, Linz.

Disaccharide. Cellobiose, Lactose, Maltose, Melibiose, Melezitose usw. waren handelsübliche Produkte.

Bestimmungsmethoden

Amylasebestimmung auf Grund der Jod—Stärkeaktion. Es wurde eine Modifikation der Methode von *Street*⁶ verwendet.

Lösungen: I Phosphatpuffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,15 m, pH 6,6.
II 0,1% (g/v) Lösung von Amylose in 0,01 n NaOH.
III 0,01 n Lösung von J_2 in KJ.

0,5 ml I, 0,2 ml II und 0,2 ml 0,01 n HCl werden vermischt und auf 37° vorgewärmt. Dann fügt man 0,1 ml Enzymlösung zu den Proben bzw. 0,1 ml

⁵ E. H. Fischer und E. A. Stein, Biochem. Preparat. 8, 27 (1961).

⁶ H. V. Street in „Methoden der enzymatischen Analyse“ (Herausgeber: H. U. Bergmeyer), Verlag Chemie, Weinheim, 1962.

⁷ A. G. Clark und K. R. L. Mansford, Nature [London] 200, 30 (1963).

⁸ J. L. Buchan und R. I. Savage, Analyst 77, 401 (1952).

I zu den Blindproben. Nach 2stdg. Erwärmen auf 37° verdünnt man mit 5 ml destill. H_2O und 0,4 ml III. Die Extinktion wird gegen die Blindwerte, die die unveränderte Blaufärbung zeigen müssen, bei 620 $m\mu$ gemessen. Abb. 1 zeigt die Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration an Unkengift.

Amylasebestimmung auf Grund der freigesetzten reduzierenden Zucker. Diese erfolgte nach einer modifizierten Hagedorn—Jensen-Methode⁹. Abb. 2 zeigt den zeitlichen Verlauf des Amyloseabbaues durch Unkenamylase mit beiden Methoden.

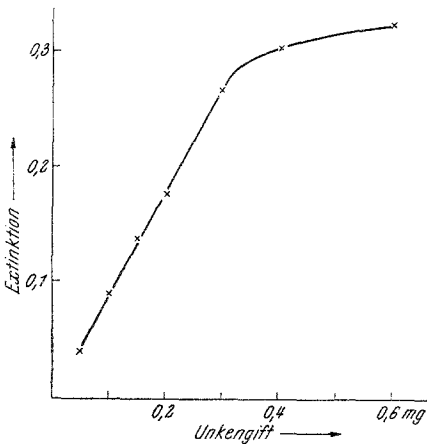


Abb. 1

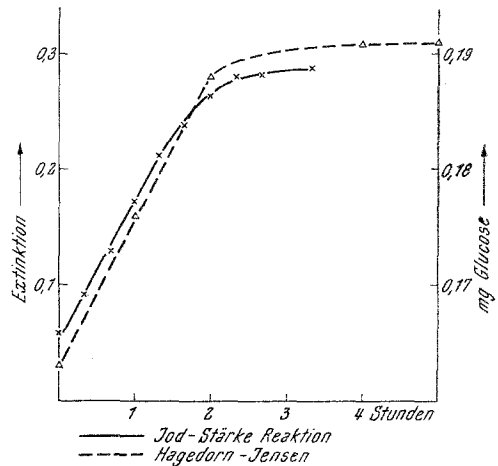


Abb. 2

Einfluß von ÄDTA, Natriumoxalat und Natriumcitrat auf die Enzymaktivität. Es wurde die Amylasebestimmung über die Jod—Stärke-Reaktion verwendet. Mittels einer Verdünnungsreihe wurde die Konzentration des Inhibitors bestimmt, bei der die gleiche Extinktion wie bei einer Probe mit dem halben Gehalt an Amylase auftritt.

Bestimmung der Spezifität. Collidinpuffer wurde 15 Min. lang gekocht und der pH mit Collidin neuerlich auf pH 6,6 eingestellt. Zu 1 ml dieses Puffers fügt man 0,5 ml einer 1proz. Substratlösung und 0,5 ml einer etwa 1proz. Lösung des angereicherten Enzyms, beide im gleichen Puffer, hinzu. Inkubiert wurde bis zu 20 Stdn. lang bei 37° . Dann wurde das Enzym durch Aufkochen zerstört, der Puffer im Rotationsverdampfer bei 30° entfernt und die Zucker mit 80proz. Alkohol extrahiert. Die weitere Untersuchung auf Abbauprodukte erfolgte mit den üblichen papierchromatographischen Methoden.

Der eine von uns (H. M.) dankt für die Unterstützung dieser Arbeit dem National Institute of Health (Bethesda) (Grant RF-33) und der Regierung der USA.

⁹ H. Wildner, „Methoden zur Messung der enzymatischen Amylyolyse“, S. 241; Verlag H. Carl, Nürnberg 1959.