Über die Algenproteinase.

(Dritte Mitteilung über Pflanzenproteasen¹⁾)

Von Yasuo TAZAWA* und Ayako MIWA

田沢康夫, 三輪綾子: 藻類プロテイナーゼについて. (植物蛋白分解酵素についての第3報)

Eingegangen am Oktober 20, 1952

Unsere Kenntnis über das proteolytische Enzymsystem in Algen ist bis jetzt noch unzureichend. Zwar wurde es schon früher von B. ALEEFF²⁾ an *Pedistrum Borganum* und *Kirchneriella lunaris* dargetan, dass das Plasmaprotein dieser Grünalgen beim Überlassen im Toluolwasser einer ziemlich starken Autolyse unterliegt. Jedoch wurde die Frage dabei noch offen gelassen, ob irgendein an diesem Vorgange beteiligtes Enzym tatsächlich aus Algenzellen extrahierbar sei oder nicht. In Anbetracht dieser Sachlage habe ich einige Versuche mit *Eisenia bicyclis* und *Porphyra tenera* angestellt, um damit die Algenproteinase darzustellen und ihre enzymatische Natur kennenzulernen.

Die Algenhalli wurden unter Toluolzusatz einer langandauernden Autolyse unterworfen, wobei die $\text{NH}_2\text{-N}$ -Zunahme an *Eisenia* zu 4.56 Proz. des Gesamtpeptid-N, und an *Porphyra* zu 4.46 Proz. des Gesamtpeptid-N erreichte. Aus dem Autolysat liess sich unter Verwendung der Reinigungsverfahren wie Adsorption an Kaolin, Elution mit verd. Ammoniak, Dialyse und Acetonfällung, ein proteolytisches Enzym in pulverigem Zustande darstellen. Die proteolytische Aktivität wurde an diesem Enzympräparat nach der Angabe von W. GRASSMANN u. H. DYCKERHOFF³⁾ bestimmt, mit dem Ergebnis, dass 100 mg des *Eisenia*-Enzyms zu 1.05 Hefe-Pr.-E., und 100 mg des *Porphyra*-Enzyms zu 1.30 Hefe-Pr.-E. entsprechen.

Um weiter eine tiefere Einsicht in die Natur der Algenprotease zu gewinnen, habe ich den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Aktivität gegen Gelatine sowie die Beständigkeit des Enzyms untersucht. Die Versuche ergaben, dass das Aktivitätsoptimum im pH-Bereiche 5.0–6.0 liegt, und dass das Stabilitätsoptimum im pH-Bereiche 4.0–8.0 liegt. Zur Ermittlung der enzymatischen Spezifität wurden die Spaltungsversuche mit Glycyl-DL-asparagin, L-Leucylglycylglycin, Benzoylglycin, Benzoylglycylglycin, Eisenin (d. i. Glutaminylglutaminsäureanhydrid-alanin⁴⁾) und Gelatine bei verschiedenen pH-Bereichen ausgeführt. Dabei hat es sich ergeben, dass das Enzym ganz frei von jedweder peptidatischen Wirkung ist.

Gestützt auf die schon früher von uns⁵⁾ erhobene Feststellung, liegt es hierbei nahe anzunehmen, dass die Algenproteinase der Kategorie von Papainasen bzw. Kathepsinasen angehören müsse.

* Biologisches Laboratorium der Universität zu Niigata.

Beschreibung der Versuche.

I. Darstellung der Enzympräparate.

Eisenia-Proteinase: 400 g der lufttrocknen Thalli von *Eisenia bicyclis* Setchell wurden zerschnitten und pulverisiert, mit 2 l Toluolwasser versetzt, und einen Monat lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Autolysat wurde filtriert, und das klare Filtrat wurde im Cellophanmembran 3 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert. Die dialysierte Enzymlösung wurde bei 40° unter stark vermindertem Druck eingeeengt und in Aceton eingetragen. Der dabei abgeschiedene Fällungskörper wurde auf Glasfilter gesammelt, mit Alkohol und Äther nachgewaschen und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute betrug etwa 2 kg.

Porphyra-Proteinase: 2 kg der frischen Thalli von *Porphyra tenera* Kjellmann wurden mit 2 l Toluolwasser versetzt. Nach einmonatlicher Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurde die Aufschwemmung filtriert. Die abfiltrierte Enzymlösung wurde mit Kaolin von MERCK zugesetzt und zentrifugiert, wobei die Acidität der Flüssigkeit von pH 5.6 auf pH 3.7 steigte. Das Adsorbat wurde im Wasser verteilt, mit wässrigem Ammoniak zu pH 9.0 eingestellt und zentrifugiert. Das ammonalkalische Eluat wurde im Cellophanschlauch unter Toluolzusatz gegen fließendes Wasser dialysiert. Aus der eingeeengten Innen-Flüssigkeit wurde das Enzym durch Behandlung mit Aceton und Äther im Zustande fast farblosen Pulvers erhalten. Ausbeute etwa 0.4 g.

Die auf diese Weise dargestellten Enzympräparate gaben bei der Biuretprobe eine rosarötliche Farbe, während sie sich weder durch Erhitzung noch durch Sättigung mit Ammoniumsulfat ausfällbar erwiesen, was auf ihre Peptonnatur hindeutet.

II. pH-Abhängigkeit der Gelatine-Spaltung durch Algenproteinase.

Anstellung der Versuche und Bestimmung der Aktivität: 1 ccm Ansatz enthielt 60 mg Gelatine und 10 mg Enzym, daneben verschiedene Menge der Salzsäure oder des Ammoniaks als Puffer. Toluol als Antiseptikum. Versuchstemperatur 30°.

Tabelle 1.

Zusatz als Puffer mM pro 1 ccm Ansatz		pH	Aktivität (COOH-Zunahme in ccm 0.025 n-KOH)	
			<i>Eisenia</i> -Proteinase	<i>Porphyra</i> -Proteinase
HCl	0.08	2.0-2.2	0.30	0.30
HCl	0.04	3.2-3.8	0.85	1.00
—	—	5.4-6.0	2.10	2.60
NH ₄ OH	0.02	6.6-7.2	—	2.55
NH ₄ OH	0.04	7.8-8.2	1.10	—
NH ₄ OH	0.10	8.8-9.4	0.80	1.50
HCN*	0.04	5.2-5.8	—	2.55

* Als Aktivator zugesetzt.

Einwirkungsdauer 24 Stdn. Die Aktivität wurde durch Titrationsmethode nach R. WILLSTÄTTER mit 0.025 *n*-KOH bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 und Fig. 1 angegeben.

Fig. 1.

III. pH-Abhängigkeit der Beständigkeit des Enzyms.

Darstellung der Enzymlösung: In 4 ccm der mit variierender Menge der Salzsäure oder des Ammoniaks zubereiteten Pufferlösungen wurden je 50 mg *Eisenia*-Enzym gelöst, und unter Toluolzusatz bei 30° aufbewahrt. Nach 24 Stunden wurden 2 ccm jeder Enzymlösung entnommen, und darauf mit 1 ccm HCl-NH₄OH-Pufferlösung zugesetzt, um damit die Acidität der Mischung auf pH 5.2–5.6 einzustellen. Als Kontrolle diente die frisch dargestellte Enzymlösung.

Versuchsanstellung: 3 ccm der obigen Enzymlösungen wurden mit 3 ccm 10 proz. Gelatinelösung zugesetzt, und unter Zusatz von Toluol bei pH 5.2–5.6 stehen gelassen. Versuchstemperatur 30°. Einwirkungsdauer 24 Stdn.

Bestimmung der Beständigkeitsgrade: In 2 ccm Ansatz sind 100 mg Gelatine,

Tabelle 2.

Enzymlösung			Beständigkeit	
Enzym mg pro 1 ccm Ansatz	Puffer mM pro 1 ccm Ansatz	pH der Lösung	Aktivität (COOH-Zunahme in ccm 0.025 <i>n</i> -KOH)	Beständigkeitsgrad (%)
12.5	HCl 0.20	1.0	0.30	13.6
12.5	HCl 0.10	1.2–1.4	0.75	34.1
12.5	HCl 0.05	2.2–2.6	1.15	52.3
12.5	HCl 0.02	3.6–4.0	2.10	93.8
12.5	HCl 0.001	5.0–5.4	2.25	100
12.5	NH ₄ OH 0.01	7.2–7.6	2.25	100
12.5	NH ₄ OH 0.02	8.0–8.4	2.20	97.8
12.5	NH ₄ OH 0.05	9.6–9.8	1.50	68.2
Kontrolle		5.2	2.25	100

8 mg Enzym nebst verschiedener Menge von Salmiakpuffer enthalten. Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde wie üblich durch

Fig. 2.

Titrationmethode ausgeführt, und die dabei gemessene COOH-Zunahme wurde in Prozenten von dem Wert, der bei Kontrollversuche ergeben wurde, als Beständigkeitsgrad ausgedrückt.

Die Ergebnisse sind in Tab. 2 und Fig. 2 zusammengestellt.

IV. Spezifität der *Eisenia*-Proteinase.

Versuchsanstellung: 1 ccm Ansatz enthielt 60 mg Gelatine bzw. 0.05 mM Polypeptid, 10 mg *Eisenia*-Enzym, und verschiedene Menge der Salzsäure und des Ammoniaks als Puffer. Toluol als Antiseptikum. Versuchstemperatur 30°. Einwirkungsdauer 24 Stdn.

Bestimmungsmethode: Die COOH-Zunahme wurde durch Titrationmethode mit 0.025 *n*-KOH bestimmt. Der Spaltungsgrad wurde in Prozenten des maximalen Wertes, berechnet aus der spaltbaren Bindung, d. h. 1 (-NH-CO-) Bindung pro Mol. der Substrate gekennzeichnet.

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle veranschaulicht.

Tabelle 3.

Substrat	pH	COOH-Zunahme in ccm 0.025 <i>n</i> -KOH	Spaltungsgrad (%)
Gelatine	5.0	2.10	—
Glycyl-DL-asparagin	8.8	0.00	0.0
L-Leucylglycylglycin	7.0	0.00	0.0
Benzoylglycin	5.0	0.00	0.0
Benzoylglycylglycin	5.0	0.00	0.0
Eisenin	5.4	0.70	35.0

Literatur.

- 1) Vgl. hierzu die früheren Mitteilungen von Y. TAZAWA, T. ISAKA u. S. SUGA (japanisch): Bot. Mag. Tokyo, 61 (1948), 151, 153.
- 2) B. ALEFF: Biochem. Ztschr., 276 (1935), 55.
- 3) W. GRASSMANN u. H. DYCKERHOFF: Ztschr. f. physiol. Chem., 179 (1928), 41.
- 4) Y. TAZAWA: Acta Phytochim., 15 (1949), 141.
- 5) Y. TAZAWA: Acta Phytochim., 14 (1944), 75.