Über die Proteasenwirkung der ruhenden und keimenden Sojabohne.

Von

Isamu Anzai.

(安西 勇)

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät
der Kaiserlichen Tohoku-Universität in Sendai.

Direktor: Prof. Dr. S. Utzino.)

Nachdem Abderhalden und Schittenhelm (1906)¹⁾ eine Dipeptidhydrolyse, und zwar eine asymmetrische Spaltung, im Pressaft keimender Samen des Weizens und der Lupinen beobachtet hatten, kamen dann Abderhalden und Dammhahn (1908)²⁾ zu der Feststellung, dass Diglycin und Glycyl-l-tyrosin deutlich durch den Pressaft gekeimter Samen wie Lupinen-, Weizen-, Gerstensamen oder Maiskörner hydrolysiert wurden, während die Spaltung dieser Dipeptide durch den der ungekeimten nicht zutage trete.

In diesen Versuchen, die bei Zimmertemperatur (ca. 25°C) und vielleicht bei nicht gut geeigneten ph-Werten angestellt wurden, bezog sich die Methode der Beurteilung auf die Isolierung der gespaltenen Aminosäuren.

Bei den histochemischen Untersuchungen mit dem keimenden Gerstenkorn, in dem Peptidasen sich im Blattkeim und in den Primordialwurzeln befanden, nicht aber im Rest des Korns, haben Linderström-Lang und Holter (1932)³⁾ festgestellt, dass die Dipeptidaseaktivität eine beträchtliche Variation längs der Primordialwurzel der keimenden Gerste, eine sehr geringe aber längs des Blattkeims zeigte, und zwar, dass sie ein scharfes Maximum in einer Entfernung von 0,8 mm von der Wurzelspitze der Primordialwurzel hat. Diese Aktivität war an das Wachstum der Wurzel geknüpft und sie wurde zwar durch das Längenwachstum der Zellen, nicht aber durch den Zellteilungsvorgang bedingt.

Daraufhin haben Euler und Günther (1933)⁴⁾ den Einfluss der Erhitzung auf die Enzymwirkungen der Gerstenkeimlinge, besonders auf Katalase, Peroxydase und Carboxylase studiert. Was die Dipeptidase—Alanylglycinspaltung—anlangt, so war der Effekt nach 15 Minuten langer Erhit-

Experimenteller Teil.**Versuch I. Proteasenwirkung der ruhenden Sojabohne.****Tabelle 1.***Optimalreaktion der Sojabohnenproteasen.*

Enzym: Die im Exikkator trocken aufbewahrte Sojabohne wurde beim Gebrauch durch Zerkhackmaschine pulverisiert und in einer Konzentration von 2% im Digestat verwendet.

Versuchsansatz: a) 2 ccm 10%ige Glycininlösung + 18 ccm Phosphatpuffer + 0,4 g Sojabohnenpulver oder b) 0,2 g Pepton K + 20 ccm Phosphatpuffer + 0,4 g Sojabohnenpulver digeriert unter Toluol bei verschiedenen pH-Werten und bei 37° C.

Zur Kontrolle wurden die Versuche mit Enzym-Puffer ohne Substrat unter den sonst gleichen Bedingungen angestellt. Nach einer gewissen Digestionsfrist titrierte man die Acidität in 4 ccm Digestat nach der Sörensenschen Formolmethode. Nach Abzug dieser Kontrollwerte wurden die korrigierten Werte des Hauptversuchs in der Tabelle eingetragen.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)											
Substrate	<div>Zeit^{ph} (st)</div>	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
a) Glycinin	6	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0
	24	0	0,1	0,2	0,3	0,3	0,6	0,5	0,3	0,2	0
	72	0	0,1	0,3	0,3	0,5	0,7	0,7	0,6	0,3	0,1
b) Pepton K	6	0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1
	24	0	0,3	0,5	0,7	0,9	1,0	1,2	0,9	0,7	0,5
	72	0	0,3	0,6	0,8	1,0	1,1	1,4	1,2	1,0	0,8

Tabelle 2.*Optimaltemperatur der Sojabohnenpeptonase.*

Enzym und Versuchsansatz: Ebenso wie in der Tabelle 1.

Als Substrat wurde Pepton K in 1%iger Konzentration benutzt. Hier wurden die Versuchsansätze unter Toluol bei pH 7,5 bei verschiedener Temperatur digeriert. Der Ansatz für 50° C oder 70° C wurde zuerst nur 30 Minuten lang bei dieser hohen Temperatur und dann weiter jedoch bei 37° C digeriert, da durch langdauernde Hitzewirkung bei 50° C oder 70° C starke Inaktivierung auftreten muss, wie die Tabelle zeigt.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei ph 7,5 (ccm 0,1 n-NaOH)			
Temperatur \ st	6	24	72
0°C	0	0,05	0,1
10°C	0	0,15	0,35
25°C	0,1	0,25	0,5
37°C	0,45	1,3	1,55
50°C 30 min und dann 37°C	0,3	0,75	1,2
70°C 30 min und dann 37°C	0,3	0,55	0,85

die Sojabohnenpeptonase am günstigsten bei 37° C auftritt, da nach halbstündigem Liegenlassen auf 50° C die Aktivität deutlich abnahm.

Tabelle 3.

Vergleichende Beobachtung über die Proteinase und Peptonasewirkung der Sojabohne.

Enzym und Versuchsansatz: Ebenso wie in der Tabelle 1 und digeriert bei ph 7,5 und 37° C unter Toluol.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei ph 7,5 (ccm 0,1 n-NaOH)				
Substrate	st	6	24	72
Casein (Hammarsten) (1 %)		0,1	0,5	0,8
Glycinin (1 %)		0,15	0,4	0,75
Gelatine N (1 %)		0,1	0,3	0,6
Pepton K (1 %)		0,55	1,4	1,7

Bei ph 7,5 und 37° C wurden dann Proteine wie Casein, Glycinin und Gelatine fast im gleichgrossen Umfang durch Sojabohnenproteinase hydrolysiert. Auffallenderweise zeigte der Peptonansatz einen grösseren Hydrolysenwert (Tabelle 3).

Tabelle 4.

Peptonasewirkung des Wassereextraktes der Sojabohne und des abgeschleuderten Rückstandes.

Enzym: Die Sojabohnenpulver extrahierte man mit der 5fachen Volummenge Wasser eine Stunde lang bei Zimmertemperatur und zentrifugierte den Extrakt ab.

Je 2 ccm getrennte Flüssigkeit wurden als Enzym in einem Ansatz A benutzt. Den abgeschleuderten Bodensatz brachte man mit Wasser auf die originale Volummenge und schüttelte das Gemisch gut. In Versuchen B kamen je 2 ccm dieser Suspension zur Anwendung.

Versuchsansatz: 2 ccm Enzymlösung oder Suspension + 18 ccm Phosphatpuffer von verschiedenen ph-Werten + 0,2 g Pepton K + Toluol; digeriert bei 37° C.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)							
Enzym	ph	6,0	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
A) Lösung	st						
	24	0,1	0,2	0,3	0,2	0,15	0,1
	48	0,2	0,4	0,5	0,25	0,2	0,1
B) Rückstand-Suspension	72	0,3	0,45	0,6	0,35	0,2	0,1
	24	0,55	0,6	0,75	0,55	0,2	0,15
	48	0,6	0,8	0,95	0,85	0,35	0,25
	72	0,7	0,85	1,1	0,95	0,45	0,45

Was nun die Löslichkeit der Sojabohnenpeptonase anbelangt, so wurde eine ziemlich gute Ausbeute der aufgelösten Peptonase in Wasserextrakt bei Zimmertemperatur beobachtet; im Rückstand blieb jedoch noch eine grössere Menge Peptonase erhalten (Tabelle 4). Die Aktivität des Rückstandes ist also ungefähr etwa doppelt grösser als die der Lösung im Volumenverhältnis.

Tabelle 5.

Verhalten der Aktivität des schwerlöslichen Anteils der Sojabohnen-Peptonase bei der Aufbewahrung bei 37° C.

Enzym: Das pulverisierte Sojabohnenpräparat wurde mit der 5fachen Volummenge Wasser eine Stunde lang unter Umrührung extrahiert und dann in der Zentrifuge abgeschleudert. Dieser getrennte Extrakt wurde als Enzymlösung geprüft. Den abgeschleuderten Bodensatz hat man mit der 3fachen Volummenge Wasser unter Umrührung gewaschen und wieder zentrifugiert. Der Bodensatz kam als Suspension zur Verwendung, nachdem er mit Wasser auf das Originalvolum gebracht worden war. Andererseits wurde diese Bodensatzsuspension unter Toluol bei 37° C verschiedene Zeit lang aufbewahrt, um das Enzym in Lösung zu bringen. Nach der Aufbewahrung liess man eine abpipettierte Probe des Suspensionsdigestats wieder zentrifugieren und in Lösung und Bodensatz trennen. Den Bodensatz brachte man mit Wasser auf das Volum vor dem Zentrifugieren gebracht und suspendierte ihn darin.

Je 2 ccm dieser Enzymlösung oder Rückstandsuspension wurden auf ihre Aktivität hin geprüft.

Versuchsansatz: 0,2 g Pepton + 18 ccm Puffer + 2 ccm Enzym + Toluol.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)			
Aufbewahrungszeit (st)	Enzym	24	72
Sofort	Extrakt	0,2	0,4
	Rückstandsuspension	0,6	1,05
24	Extrakt	0,1	0,35
	Rückstandsuspension	0,3	0,85
48	Extrakt	0,1	0,3
	Rückstandsuspension	0,1	0,25
72	Extrakt	0,1	0,3
	Rückstandsuspension	0,1	0,1

Merkwürdigerweise geht die Peptonaseaktivität durch Aufbewahrung bei 37° C leicht verloren (Tabelle 5).

Versuch II. Proteasenwirkungen der keimenden Sojabohne.

Tabelle 6.

Optimalreaktion der Proteasenwirkung der keimenden Sojabohne.

Enzym: Die Sojabohnen, die ungefähr von gleicher Grösse und in lauwarmem Wasser bei 37° C 12 Stunden lang aufbewahrt worden waren, liess man an dem befeuchteten Sandboden in einem Kästchen bei 25°C im Dunkelzimmer liegen. Täglich zweimal, morgens und abends, wurde der Sandboden mit Wasser besprengt. Eine gewisse Frist nach dieser Zeit wurde eine Probe herausgenommen und auf ihre Enzymaktivität hin untersucht. Am zweiten Tag danach kam eine Keimknospe zum Vorschein.

Hier wurden Sojabohnen, die am zweiten Tag nach der Aufbewahrung gewonnen wurden, mit der 5fachen Volummenge Wasser gut zerrieben, durch Gaze koliert und als Enzym (je 2 ccm für einen Ansatz) benutzt.

Versuchsansatz: Ebenso wie in der Tabelle 1.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)									
Substrate	st	ph							
		4,5	5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0
Glycinin (1 %)	6	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0	0
	24	0	0	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1
	72	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3
Pepton K (1 %)	6	0	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,2
	24	0	0,1	0,4	0,6	0,8	0,9	0,8	0,4
	72	0	0,1	0,6	0,8	1,1	1,2	1,1	0,5

Tabelle 7.

Peptonaseaktivität der Sojabohne bei der Keimung unter besonderer Berücksichtigung der Keimungstage.

Enzym: Ebenso wie in der Tabelle 6 liess man die Sojabohnen keimen. Nach dem vierten Keimungstage wurde das Material in Bohnen und in Malzen getrennt und mit der 5fachen Volummenge Wasser gut zerrieben, koliert und geprüft.

Versuchsansatz: 18 ccm Phosphatpuffer + 0,2 g Pepton K + 2 ccm Enzym + Toluol, digeriert bei ph 7,5 und 37°C.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei ph 7,5 (ccm 0,1 n-NaOH)			
Enzym	Tage nach Aufbewahrung	st	
		24	72
Bohne	I	0,55	0,85
	II (Auskeimen)	1,15	1,5
	IV	1,35	1,4
	VII	0,95	1,2
	X	0,25	0,3
Malze	IV	0,2	0,3
	VII	0,05	0,15
	X	0,05	0,15

Nach diesen Beobachtungen über die eigenen Proteaseneigenschaften der ungekeimten Sojabohne liess man die Sojabohne unter feuchtwarmen Bedingungen im Dunkelraum keimen.

Tabelle 8.

Peptonaseaktivität der keimenden Sojabohne, die noch nicht reif ist oder vor einem Jahre eingeerntet war.

Enzym: Zum Vergleichszweck wurden hier unreife oder ein Jahr alte Bohnen am zweiten Keimungstage untersucht. Enzymbereitung aus diesen keimenden Bohnen geschah mit der 5fachen Volummenge Wasser ebenso wie in der Tabelle 7.

Versuchsansatz mit Pepton: Wie in der Tabelle 7.

Der ausgekeimte Prozentsatz der unreifen Sojabohnen betrug 50% und derjenige der alten nur 25 %.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat bei pH 7,5 (ccm 0,1 n-NaOH)			
st	6	24	42
a) Reife Sojabohne (1941, Nov.)	0,45	0,8	1,1
b) Unreife Sojabohne (1941, Sept.)	0,1	0,2	0,4
c) Alte Sojabohne (1940, Nov.)	0,3	0,5	0,7

In der vorangegangenen Arbeit hat Verf. auf die Zunahme des C-Vitamins oder ähnlicher Substanz beim Keimen der Sojabohne hingewiesen und hier hat Verf. festgestellt, dass die Peptonase der keimenden Sojabohne am zweiten Tag nach der Keimung sehr auffallend verstärkt wurde. Dieser Aufschwung der Peptonaseaktivität dauerte bis zum siebenten Tag, um dann abzunehmen; also am zehnten war sie sehr schwach (Tabelle 7).

In Malzen wurde nur eine minderwertige Peptonaseaktivität beobachtet. Hier sei auch erwähnt, dass unreife oder alte Sojabohnen, die nicht alles auskeimen konnten, nur eine schwächere Aktivität der Peptonase als die der reifen zu entfalten vermochten (Tabelle 8).

Betreffs der Aktivierung der Sojabohnenpeptonase blieb Enterokinase, Cystein, Schwefelwasserstoff oder Ascorbinsäure fast ohne verstärkenden Einfluss auf die Aktivität derselben. Aus diesen Ergebnissen muss man wohl eine andere Natur der Sojabohnenprotease als die tierische Katheptase oder Tryptase annehmen.

Es stellt nun eine neue Frage, in welchem Verhältnis dieser Aufschwung der Proteasenaktivität der keimenden Sojabohne zu der Substanzzunahme wie C-Vitaminsubstanz oder der Enzymverstärkung wie Carbohydrasen

Tabelle 9.

Einfluss der Zusatzstoffe auf die Aktivität der Sojabohnenprotease.

Enzym: Ebenso wie Tabelle 6 bereitet. Für Kinasebehandlung wurden 2 ccm Enzymlösung mit 0,01 g Enterokinase (Kawaharada, 1943)⁹ bei 37° C 30 Minuten lang stehen gelassen und dann mit 18 ccm Protein-Puffer unter Toluol bei ph 7,5 und 37° C digeriert.

Für die Cysteinbehandlung liess man 2 ccm Enzymlösung mit 2 ccm 0,1 Mol-Cystein-HCl-Lösung (neutralisiert) bei ph 6 und bei 37° C 30 Minuten lang liegen. Andererseits fügte man 2 ccm Enzym mit 2 ccm gesättigter H₂S-Lösung oder mit 2 ccm 0,2%iger Ascorbinsäurelösung hinzu. Der Versuchsansatz mit 4 ccm Enzym-Zusatzstoffe-Lösung und 16 ccm Pepton-Puffer wurde unter Toluol bei ph 7,5 und 37° C digeriert.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)				
Substrate	Zusätze	6	24	72
Glycinin (1 %, ph 7,5)	a) Ohne Zusatz	0,15	0,6	0,65
	b) Mit Enterokinase	0,1	0,6	0,6
	Zunahme (b-a)	-0,05	0	-0,05
Casein Hammarsten (1 %, ph 7,5)	c) Ohne Zusatz	0,1	0,55	0,6
	d) Mit Enterokinase	0,1	0,45	0,5
	Zunahme (d-c)	0	-0,1	-0,1
Pepton K (1 %, ph 6)	e) Ohne Zusatz	—	0,3	0,65
	f) Mit Cystein	—	0,1	0,4
	Zunahme (f-e)	—	-0,2	-0,25
	g) Ohne Zusatz	—	0,3	0,65
	h) Mit H ₂ S	—	0,15	0,25
	Zunahme (h-g)	—	-0,15	-0,4
	i) Ohne Zusatz	—	0,3	0,65
	j) Mit Ascorbinsäure	—	0,45	0,5
	Zunahme (j-i)	—	0,15	-0,15

steht. Andererseits handelt es sich um ein sehr wichtiges Problem; wie steht es um die Enzyymbildung oder die Aktivitätssteigerung der Enzyme. Die Untersuchungen diesbezüglich werden weiter im hiesigen Institut fortgesetzt.

Zusammenfassung.

(1) In pulverisierten Sojabohnen wurden Proteinase- und Peptonaseaktivität festgestellt, die am günstigsten bei pH 7,0—7,5 und bei 37° C zutage trat. Die Peptonasewirkung ist imstande, noch in einem weiteren Umfang der Reaktion von pH 6—9 und auch in sehr ausgeprägtem Grade sich zu entfalten.

(2) Die Sojabohnenpeptonase geht teils ziemlich gut in Wassereextrakt, bleibt jedoch in überwiegender Menge im Rückstand erhalten. Die Aktivität dieser beiden Fraktionen nimmt durch Aufbewahrung (z. B. 24 Stunden) auf 37° C ab.

(3) Beim Keimen nimmt die Peptonaseaktivität deutlich zu, die am zweiten Keimungstag, wo eine Knospenbildung bemerkt wird, einen maximalen Wert (also ungefähr doppelt stark) zeigt und mit fortschreitender Entwicklung der Keime wieder abnimmt. Die Aktivität der Malzpeptonase ist sehr minderwertig während des Keimens.

(4) Die Optimalreaktion der Peptonase der gekeimten Sojabohne stimmt mit derjenigen der ungekeimten überein. Unreife oder alte Sojabohne zeigte einen schwächeren Wert der Peptonase. Die Zusatzstoffe wie Enterokinase, Cystein, H₂S oder Ascorbinsäure bleiben fast ohne aktivierenden Einfluss auf die Sojabohnenproteinase und -Peptonase.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung.

Prof. Dr. S. Utzino.

Literatur.

- 1) Abderhalden, E. u. Schittenhelm, A., Zeits. f. physiol. Chem., 1906, **49**, 26.
 - 2) Abderhalden, E. u. Dammhahn, Z., ibidem, 1908, **57**, 332.
 - 3) Linderström-Lang, K. u. Holter, H., ibidem, 1932, **204**, 15.
 - 4) Euler, H. u. Günther, G., ibidem, 1933, **220**, 69.
 - 5) Nordh, G. u. Ohlsson, E., ibidem, 1932, **204**, 89.
 - 6) Zitiert nach Nordh (Journ. Inst. Brewing, **14** (1908), 61.)
 - 7) Ohlsson, E. u. Uddenberg, C. E., Zeits. f. physiol. Chem., 1933, **221**, 165.
Ohlsson, E. u. Edfeldt, O., ibidem, 1933, **221**, 174.
 - 8) Anzai, I., Tohoku Igaku Zassi, 1944, **34**, 269.
 - 9) Kawaharada, M., Journ. Biochem., 1944, **36**, 485.
-