

13. Tagung der Europäischen Fleischforscher in Rotterdam
Niederland, August 20-26, 1967

D₁

DIE HEMMWIRKUNG DES BLUTSERUMS AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT
VON FICIN

N.Nestorov

L.Lilov.

Technologisches Forschungsinstitut für Fleischwirtschaft Bulgarien,
Sofia, Malschewska No. 10

Einleitung

Die intravenöse Applikation von Ficin (E C 3.4.4.12) vor der Schlachtung der Tiere wird als effektives Mittel zur Aktivierung der Fleischreifungsprozesse verwendet. Im Zusammenhang damit ist die Kenntnis über den Einfluss von Blut und Blutserum auf die Enzymaktivität von Ficin sehr wichtig.

Die Hemmwirkung des Blutserums auf Ficin ist von Astrup und Alkjaersig (1) entdeckt worden, welche die proteolytischen Enzyme auf Grund ihrer Beziehung mit gewissen Inhibitoren klassifiziert hatten. Interessante Ergebnisse haben auch Tsugo und Jamauchi (2) ermittelt, die die Wirkung von Blutserum auf Enzymaktivität von Renin und von anderen Proteasen (einschliesslich Ficin) auf eine breitere Grundlage erforscht hatten. Nach diesen Autoren und nach Mandl und McLaren (3) ist der Inhibitorfaktor des Blutserums eiweissartiger Natur.

Das Ziel unserer Untersuchungen ist die Hemmwirkung des Serums eingehend zu erforschen im Hinblick darauf, neue Mittel zu finden, die diesen Effekt abschwächen sollen. So könnte dann die Aktivität des vor der Schlachtung injizierten Ficins erhöht und demgemäss auch die Fleischreifungsprozesse verstärkt werden.

Methode

Es wird nach der von Kunitz-Modifikation der Ansonmethode gearbeitet (4).

Ergebnisse und Diskussion

A. Vorherige Untersuchungen auf die Enzymaktivität von Ficin =====

Die Notwendigkeit vorheriger Forschung ergibt sich darauf, dass man experimentell die Bedingungen feststellen muss, unter denen der Inhibitor richtig anzuwenden ist. Nur auf diese Weise können nach Webb (5) die gewonnenen Erkenntnisse richtig und vollwertig sein.

1. Die Enzymaktivität des Ficins in Abhängigkeit von dessen Konzentration- Die Daten über diese Korrelation sind graphisch in der Figur 1 ausgedrückt. Alle Versuche sind in solchen Intervallen durchgeführt worden, in denen die Geschwindigkeit der Enzymreaktion eine lineare Abhängigkeit von der Ficinkonzentration aufweist. Es wurde immer mit kleinen Enzymmengen gearbeitet, um Bedingungen nahe den physiologischen zu erreichen.

2. Die Enzymaktivität des Ficins in Abhängigkeit von der Inkubationszeit- Diese Abhängigkeit hat einen linearen Charakter im Bereich von 10 bis 60 Minuten, was uns hilft, die Proben immer 30 Minuten zu in-

kubieren (s. Fig. 2.)

3. Der Temperatureinfluss auf die Ficinaktivität- Er ist in der Figur 3 dargestellt. Die experimentelle Untersuchung über diese Abhängigkeit ist mit der Einwirkung mancher Inhibitoren auf die Ficinaktivität unter verschiedene Temperaturbedingungen berücksichtigt worden. Mehrere unserer Versuche sind bei 30°C durchgeführt, die den Standardforderungen entspricht und der Körpertemperatur nahe ist. Die Inkubationszeit ist 30 Minuten.

Bei den Versuchen wurde eine Phosphatbufferlösung pH-7,00 verwendet worden, die durch Neutralisieren einer alkalischen Lösung von denaturiertem Haemoglobin durch Orthophosphorsäure hergestellt wurde.

Beim Gebrauch einer Tris-Lösung, die neutralisiert mit Orthophosphorsäure ist, haben wir eine schwache Hemmung auf die Ficinaktivität festgestellt.

B. Der Einfluss des Blutserums und anderer Effektoren auf die Enzymaktivität von Ficin

Unsere Versuche haben gezeigt, dass das native Serum die Aktivität von 500 mkg / 1ml. Inkubationgemisch völlig hemmt. Deswegen muss man das Blutserum mit physiologischer Lösung verdünnen, wodurch die Möglichkeit zur quantitativen Beurteilung der Hemmwirkung gesichert ist. Die verwendete Ficinmenge bei den nachfolgenden Versuchen war 10-15 mkg/ml. Unter Berücksichtigung der Serumverdünnung ist diese Menge nahe der FicinKonzentration im Blut der injizierten Tieren vor der Schlachtung.

1. Die Hemmwirkung des Blutserums in Abhängigkeit von seiner Menge- Die exponentielle Kurve in Figur 4 zeigt die Korrelation zwischen dem Hemmungsgrad der Ficinaktivität und der Menge des Inhibitors (des Serums). Der Hemmungseffekt ist noch messbar bei einer Verdünnung des Blutserums von 1:180 d.h. der unbekannte Inhibitorfaktor im Serum übt seine Wirkung bei einer sehr kleinen Konzentration aus.

2. Die Vorinkubationszeit der Ficinlösung mit dem Serum bei 30°C spielt keine Rolle für den Hemmungsgrad. Das resultiert aus unseren bei 0, 10, 20 und 30 Minuten durchgeführten Vorinkubationen. Die angewendeten Zeiträume sind solche, bei denen das Ficin und die anderen Proteasen in den Tieren vor der Schlachtung verbleiben.

Wir sind geneigt anzunehmen, dass die Hemmung des Ficins durch das Blutserum sofort auftritt, doch unabhängig davon haben wir alle Versuche mit einer zehnminütigen Vorinkubation bei 30°C durchgeführt.

3. Das Serum von Kühen, Kälbern, Pferden, Ziegen wie auch des Menschen hemmt die Enzymaktivität des Ficins in vitro.

4. Das Aufbewahren des Blutserums für einigen Tage bei Zimmertemperatur übt keinen Einfluss auf seinen Hemmungsgrad aus. Das geht aus unseren Versuchen hervor. Es ist anzunehmen, dass der Inhibitorfaktor im

Serum bei den beschriebenen Bedingungen stabil bleibt.

Es folgen die Ergebnisse unserer Vorversuche zur Erklärung der Wirkungsweise des Serums bei der Ficinhemmung.

Nach Webb (6) kann man den Hemmungsmechanismus der Enzymaktivität auf zwei verschiedene Weise charakterisieren: einerseits durch Störung der Kinetik der Enzymprozesse und andererseits durch die Hemmwirkung auf einzelne Teile des Enzyms oder durch den Mechanismus der Katalyse auf ein Molekularniveau.

Bernhard und Gutfreund (7) stellten fest, dass das Ficin ein Sulfhydrylenzym ist, das durch reduzierende Verbindungen wie Cystein und 2, 3-Merkaptopropanol aktiviert wird. Hammond und Gutfreund (8) sind der Meinung, dass am aktiven Enzymzentrum eine ionisierte Carboxylgruppe, eine Sulfhydrylgruppe und eine protonisierte Aminogruppe teilnehmen.

Im Anfang nahmen wir die chemische Reaktion zwischen der Ficins -SH Gruppe und des Serums als möglich an. Deshalb orientierten wir uns auf die Wechselwirkung der Metallionen oder Oxydationsmittel im Serum und dieser funktionellen Gruppe.

5. Die Hemmwirkung von Blutserums und E D T A - Die Hemmung der Ficinaktivität von dem verdünnten Serum wurde in Anwesenheit von Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA) untersucht. Es wurde festgestellt, dass eine ausreichende Konzentration dieses Komplexbildners ($10^{-3}M$) zu keiner Veränderung des Hemmungsgrades führt. Also die Hemmung der Ficinaktivität ist wahrscheinlich nicht mit der Wirkung der Metallionen im Serum verbunden.

6. Die Hemmwirkung von Blutserum und Cystein - Wenn man den Einfluss einer Oxydationfähigen Verbindung auf die - SH Gruppe des Ficins annimmt, folgt, dass diese Oxydation von einem starken Reduktor wie Cystein eliminiert wird. Diese Aminosäure hat eine aktivierende und Schutzwirkung auf die Enzymaktivität von Ficin (7). Die Anwesenheit von Cystein ($10^{-3}M$) verändert nicht den Hemmwirkungsgrad des Serums auf die Ficinaktivität. Dieser Tatsache spricht wenig für die Möglichkeit, die Hemmwirkung des Serums durch die Oxydation der - SH Gruppe zu erklären.

7. Die Enzymaktivität des Ficins und Kalium Ferricyanid - Unabhängig von den obengenannten Ergebnissen hatten wir den Einfluss eines schwachen Oxydationsmittels wie Kalium Ferricyanid untersucht, das im Stande ist, die Sulfhydrylgruppen einiger Enzyme zu oxydieren (9.10).

Es wurde die Enzymaktivität des Ficins nur in seiner Anwesenheit (ohne Serum) untersucht, die bei einer Inkubation von 7° und $30^{\circ}C$ unverändert bleibt. Ein interessantes Ergebnis wurde bei $60^{\circ}C$ festgestellt. Das Kalium Ferricyanid ($10^{-4}M$) hemmt bei dieser Temperatur.

etwa 50% die Enzymaktivität des Ficins. Wir sind fast geneigt anzunehmen, dass es sich hierbei um eine Oxydation der Sulphydrilgruppen des Enzyms handelt, weil die Geschwindigkeit der Redoxyprozesse von der Temperatur abhängig ist. Die Daten aus diesem Versuch sind graphisch in Figur 5 dargestellt.

Die Oxydation der Sulphydrilgruppen des Ficins als wahrscheinlicher Mechanismus der beobachteten Hemmung lassen wir völlig weg, indem wir auch von der Ergebnissen der folgenden Versuche ausgehen.

8. Die Hemmwirkung des Blutserums auf die Enzymaktivität des Ficins bei verschiedenen Temperaturen - Die Hemmwirkung von Serum wurde bei 7°, 30° und 60°C untersucht. Es wurde festgestellt, dass der Hemmungsgrad der Ficinaktivität bei 60°C wesentlich niedriger im Vergleich zu diesem bei 30° bzw. 7°C ist (s. Fig. 5). Dieses Resultat ist genau umgedreht mit dem erhaltenen Resultat mit Kalium Ferricyanid bei 60°.

Das Ergebnis aus diesem Versuch bringt uns auf den Gedanken dass der Inhibitorfaktor thermolabil ist. Zur Bestätigung dieser Annahme haben wir die Hemmwirkung des erwärmten Serum auf 60°C im Laufe von 30 Minuten untersucht. Wir fanden eine starke Abschwächung der Hemmwirkung im Vergleich zu den gleichen Serumproben, die nicht einer Wärmebehandlung unterworfen waren. Die verschiedenen Hemmungsgrade sind in Figur 6 ausgedrückt.

Die letzten Ergebnisse erlauben uns anzunehmen, dass die Wärmebehandlung des Fleisches von Schlachttieren, die im voraus mit Papain injiziert waren, führt nicht zur Aktivierung des Enzyms (11), sondern zu einer Hemmwirkung des unbekanntes Inhibitors.

Die in Figur 6 dargestellten Ergebnisse bestätigen unsere Vermutung, dass der Inhibitorfaktor thermolabil ist, was mit den Beobachtungen von Tsugo und Jamauchi (2) über Renin übereinstimmt.

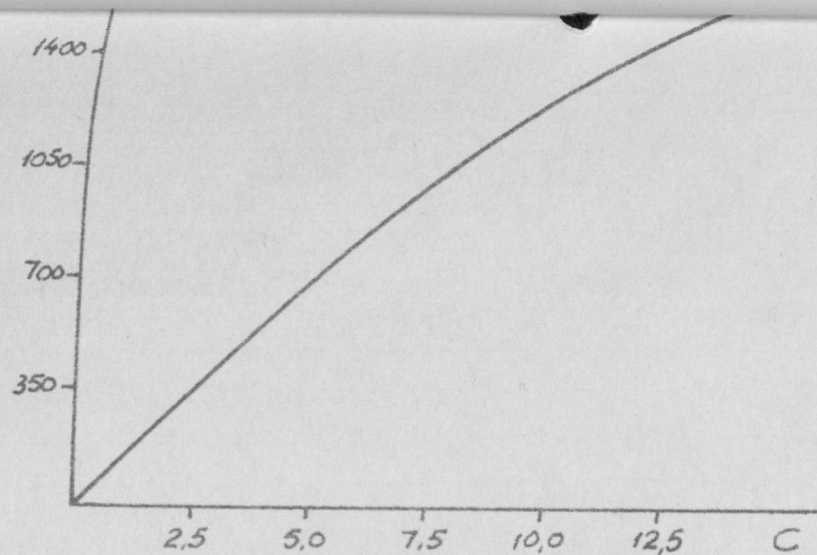
9. Der Einfluss einiger Serumeiweißfraktionen auf die Ficinaktivität - Wir haben den Einfluss von isolierten Gammaglobulinen und Albuminen auf die Ficinaktivität untersucht. Gleichzeitig damit wurde auch die Wirkung von Rindalbuminprodukten, die wir nach einer weichen alkalischen Hydrolyse bzw. nach einer alkalischen Denaturierung erhalten haben, erforscht.

Die Gammaglobuline des menschlichen und Pferdeserums wie auch ihre Hydrolysate (2-stündige Hydrolyse mit 1 n NaOH im Wasserbad) beeinflussen nicht die Enzymaktivität von Ficin.

Eine geringe Hemmung üben die Albumine von menschlichem und Rindserum aus. Im Vergleich zu diesen ist der Hemmungseffekt des Ovalbumin etwas stärker.

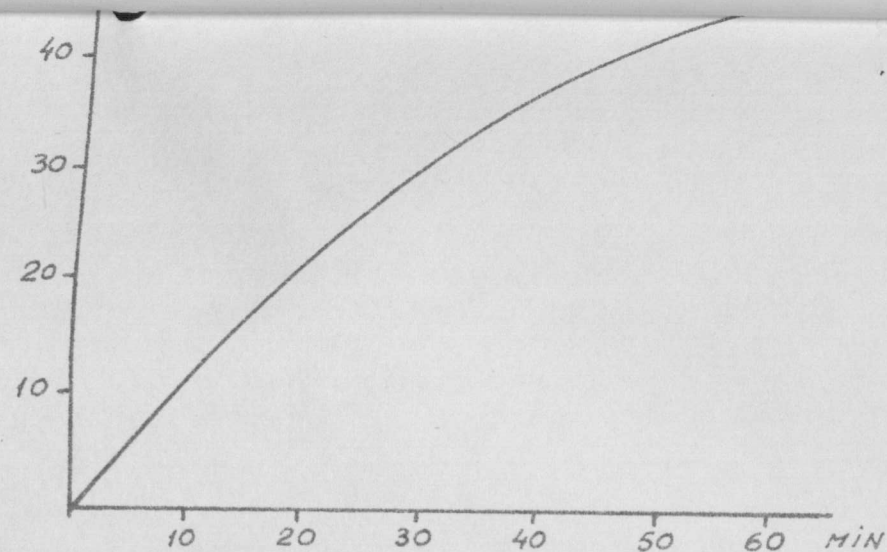
Die Produkte einer weichen alkalischen Hydrolyse dieser Albuminarten hemmen in hohem Grade (40-60%) die Ficinaktivität. Ähnliche Resultate bekommt man durch Rindalbumin nach seiner zweistündigen Denaturierung mit 1 n NaOH bei 18°C.

Die Auslegung der obenaufgeführten Versuche erfordert eine experimentelle Überprüfung dieses Effektes z.B. durch Gelfiltration der Produkte der alkalischen Hydrolyse bzw. der alkalischen Denaturierung des Albumins in Anwesenheit von Ficin.



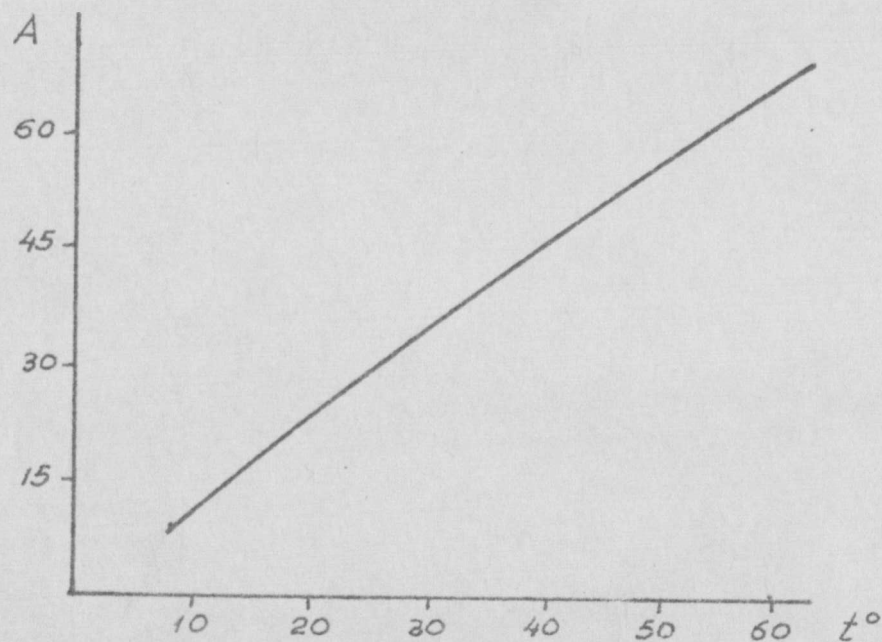
Figur 1

Abszisse - Die Konzentration mkg/ml
 Ordinate - Die Enzymaktivität des Ficins



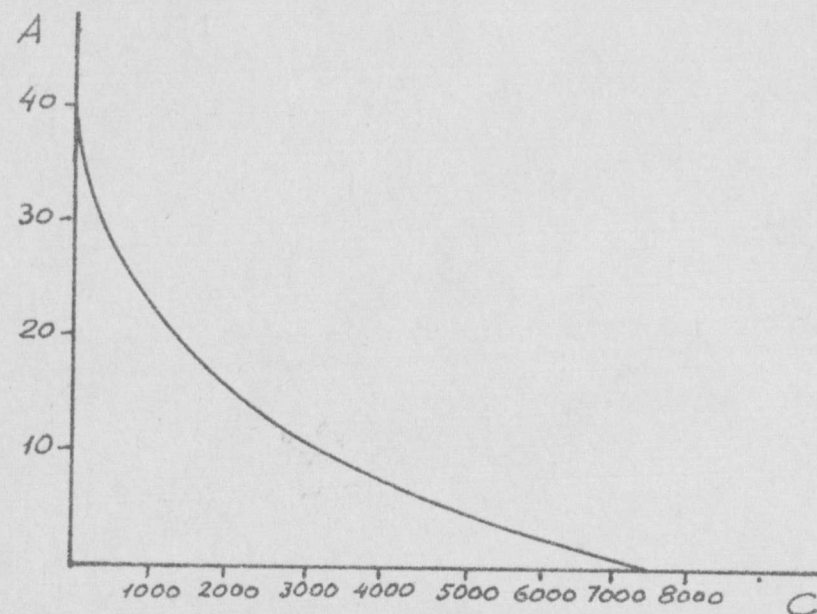
Figur 2

Abszisse - Die Inkubationszeit in Minuten
 Ordinate - Die Enzymaktivität des Ficins



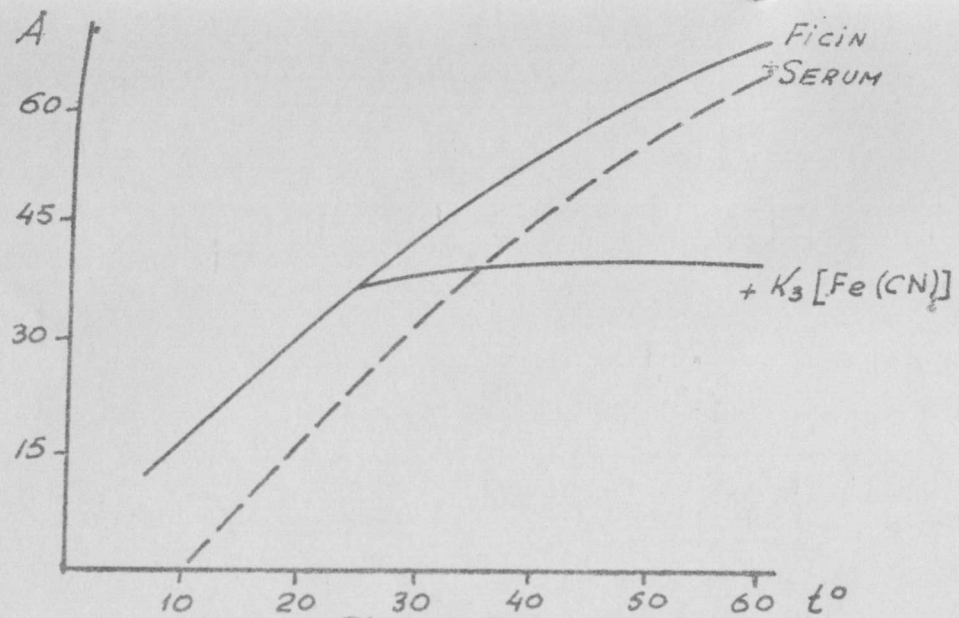
Figur 3

Abszisse - Die Inkubationstemperatur
 Ordinate - Die Enzymaktivität des Ficins



Figur 4

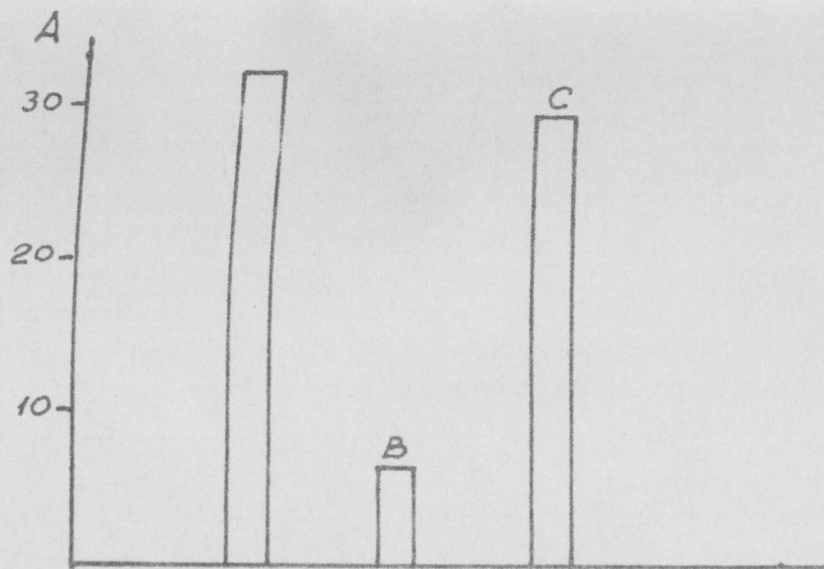
Abszisse - Die Serumeiweißmenge mkg/ml
 Ordinate - Die Enzymaktivität des Ficins



Figur 5

Abszisse - Die Inkubationstemperatur
 Ordinate - Die Enzymaktivität des Ficins

Bemerkung: Die Enzymaktivität des Ficins wird durch mkg Tyrosin/1mkg Ficin/30 Min. bestimmt.



Figur 6

Abszisse - A Ficinprobe
 B Ficinprobe + Serum 20°C
 C Ficinprobe + Serum 60°C
 Ordinate - Die Enzymaktivität des Ficins

Die Verfasser erforschen die Hemmwirkung von Blutserum auf die Enzymaktivität des Ficins. Die durchgeführten Versuche mit EDTA und Cystein bestätigen die Tatsache, dass diese Hemmung nicht auf der Wechselwirkung zwischen SH - Gruppe des Enzyms, Metallionen oder Oxydationsmitteln des Serums beruht. Bei 60°C wurde eine Hemmwirkung von Kaliumferricyanid festgestellt. Bei der gleichen Temperatur beobachtet man eine wesentliche Abschwächung der Hemmwirkung des Serums auf die Ficinaktivität. Aus den Versuchen geht es hervor, dass der Inhibitor-faktor thermolabil ist.

Die Gammaglobuline des menschlichen und Pferdeserums, sowie auch ihre Hydrolysaten beeinflussen die Enzymaktivität des Ficins nicht. Einer weichen Hydrolyse oder alkalischen Denaturierung unterworfen, erhöhen sie scharf ihre Hemmwirkung auf die Ficinaktivität.

The authors investigate the inhibitor action of blood serum on the enzymic activity of Ficin. Experiments with EDTA and Cystein eliminate the possibility that the inhibitor is a result of reaction between H groups of the enzyme, with metallic cations or oxydants in the serum. At a temperature of 60°C. inhibitor action of $K_3/Fe(CN)_6/$ is established. At the same temperature there is a marked decline in the inhibitor effect of the serum. It shows out that the inhibitor factor is heat unstable. Gamma globulins isolated from human and horse serums as well as their hydrolised products, do not effect the enzymic activity of Ficin. Mild inhibition is established under the action of isolated serum albumins. Submitted to mild alcalic hydrolyses or alcalic denaturation they markedly increase their restrain upon the activity of Ficin.

R E S U M E

Les auteurs conduisent des investigations sur l'action inhibitoire du sérum sanguin sur l'activité enzymique du Ficin. Les essais exécutés avec EDTA et Cystéin excluent la possibilité que l'inhibition soit le résultat d'une réaction entre les groupes H de l'enzyme avec des cations métalliques ou avec des oxydants dans le sérum. On établit une action inhibitoire de $K_3/Fe(CN)_6/$ à une température de 60° C. On observe, à la même température une diminution importante de l'effet inhibitoire des sérums. Le facteur inhibitoire démontre une labilité thermique. Les gamma globulins isolés par des sérums humains et équins, ainsi que leurs produits hydrolisés, ne changent pas l'activité enzymique du Ficin. On a établi une faible inhibition sous l'action des albumins isolés du sérum. Soumis à une hydrolise alcaline ou à une dénaturation alcaline, ils augmentent brusquement leurs restraints sur l'activité du Ficin.

L i t e r a t u r

- 1) T. Astrup, N. Alkjaersig, Nature, 169, 1952, 314
- 2) T. Tsugo, K. Jamauchi, Intern. Dairy Congr. Proc. 13th Congr. Hague, 4, 1953, 641.
- 3) I. Mandl , A.D. Mc.Laren, Arch. Biochem.,21, 1949, 408.
- 4) M. Kunitz, J.Gen. Physiol., 30, 1947, 311.
- 5) J.L. Webb, Enzyme and Metabolic Inhibitors, Acad. Press 1963, 718.
- 6) J.L. Webb, Ibid., 65
- 7) S.A. Bernhard, H. Gutfreund, Biochem.J., 63, 1956, 61
- 8) B.R. Hammond, H. Gutfreund, Biochem.J., 72, 1959, 349.
- 9) F.R. Chinard, L.Hellekman, Methods of Biochem.Anal., 1, 1954, 1.
- 10) N. Ellfolk, Acta Chem. Scand., 7, 1953, 1155