14 TH EUROPEAN MEETING OF MEAT RESEARCH WORKERS
BRNO. CZECHOSLOVAKIA AUGUST 26th —31st 1968

SECTION C 13

N. Nestorov, L. Lilov und A. Grosdanov

DER EINFLUSS EINIGER PFLANZENPROTEASEN AUF DAS LEBERGEWEBE

I. Die Succinatdehydrogenaseaktivität der mit Ficin, Papain und Bromelin behandelten Lebermitochondrien

Beim Zartmachen des Fleisches finden die Pflanzenproteasen Ficin, Papain und Bromelin immer mehr und mehr Anwendung (1,2). Die Literaturangaben über ihre Wirkung auf verschiedene Organe und Zellstrukturen sind mit Ausnahme histologischer und histochemischer Untersuchungen gering (3,4). Wie bekannt, führt die Papainbehandlung mit kleinen Enzymmengen ante mortem zur Erweichung nur des Leber-, Zungen- und Nierengewebes, während die Muskeln unbeeinflusst bleiben (5). Nach Angaben von Moro u.a. (6) wird das Papain vorwiegend in den Nieren (144 - 270 mg/kg) und in der Leber (40-60 mg/kg) verteilt, während seine Konzentration im Muskelgewebe wesentlich niedriger ist (0 - 5 mg/kg).

Besonders interessant sind die Untersuchungen von Dianzani (7), der eine Hemmung der Succinat-, Cytochrom-, Laktat- und D-Aminosäureoxydaseaktivität von mit Tripsin oder Papain behandelten Lebermitochondrien festgestellt hatte.

Das Problem eventueller Wirkung der genannten Proteasen auf die Membrane und Enzymsysteme der subzellulären Strukturen ist noch nicht geklärt (8). Das Ziel unserer Versuchsreihe

ist, eine Erläuterung über diese Frage zu geben. Als Modell wurden isolierte Rattenlebermitochondrien, Mikrosomen und Hyaloplasma verwendet.

Diese Vorversuche bilden die Grundlage weiterer Forschungen in vivo unter intrevenöser Applikation von Ficin, Papain und Bromelin. Die Untersuchungen der Succinatdehydrogenaseaktivität von Lebermitochondrien beruht auf der Tatsache, dass diese Aktivität als enzymatisches Merkmal für den funktionellen Zustand der Mitochondrien gilt.

MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzenproteasen - Es wurden wässrige Lösungen von Ficin, Papain und Bromelin der Firma "Miles chem. Co New Jersey" angewendet. Das Endvolumen der inkubierten Probe war 2 ml und enthielt durchschnittlich 7 mg mitochondrieles Eiweiss. Die Daten über die Konzentration der verwendeten Proteasen werden in µg Enzymeiweiss in 1 ml ausgedrückt.

2. Das Isolieren von Mitochondrien - Die Untersuchungen wurden über von Rattenleber nach Schneider und Hogeboom (9) isolierte Mitochondrienpräparate unter Anwendung von 0,18 M Sacharose nach Johnson und Lardy (10) durchgeführt. 1 ml Suspension enthielt ungefähr 14 mg mitochondriales Eiweiss.

3. Bestimmungsmethode für Succinatdehydrogenaseaktivität - Es wurde nach der kolorimetrischen Methode von Slater und Bonner (11) gearbeitet. Als 100 %ige Succinatdehydrogenaseaktivität nehmen wir die Aktivität der Mitochondrien ohne Proteasebehandlung an. Auf dieser Basis wird prozentuell das Aktivieren bzw. die Hemmung der untersuchten Enzymaktivität errechnet.

4. Bestimmungsmethode der proteolytischen Aktivität - Die proteolytische Aktivität der Pflanzenproteasen wird nach Anson (12) unter Anwendung der Substrate: Casein, Hämoglobin und Myosin bestimmt.

5. Bestimmungsmethode für Eiweissmenge - Der Eiweissgehalt wurde nach Kjeldahl und Lowry (13) bestimmt.

ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

A. Proteolytische Aktivität von Ficin, Papain und Bromelin - Aus den Aufführungen auf der Abb. 1 geht hervor, dass das Ficin im Vergleich zu Papain und Bromelin gegenüber dem Casein, Hämoglobin und Myoglobin eine wesentliche Aktivität zeigt.

Abb. 1

Die parallelen Untersuchungen der drei Enzyme bei gleichen Bedingungen benötigen wir bei der Gegenüberstellung deren Wirkung auf die Succinatdehydrogenaseaktivität von Lebermitochondrien.

B. Der Einfluss der Ficin-, Papain- und Bromelinkonzentration auf die Succinatdehydrogenaseaktivität der Lebermitochondrien - Bei verschiedenen Konzentrationen der verwendeten pflanzlichen Proteasen wurden die Mitochondrien 30 Minuten bei 37° C inkubiert, wonach die Succinatdehydrogenaseaktivität bestimmt wird. Die Ergebnisse daraus sind graphisch auf Abb. 2 dargestellt.

Abb. 2

Die Daten weisen darauf hin, dass sich die Succinatdehydrogenaseaktivität bei kleinen Enzymkonzentrationen bedeutend erhöht. Der höchste Grad des Aktivierens wurde bei Konzentrationen von 200 µg Papain/ml und 400 µg Ficin oder Bromelin/ml erreicht. Bei höheren Konzentrationen tritt eine Hemmung auf, indem bei Konzentrationen von 2,000 µg Papain und 4,000 µg Ficin oder Bromelin in 1 ml die Enzymaktivität völlig unterdrückt wurde. Also von den drei Enzymen zeichnet sich das Papain durch eine höhere Wirkung sowohl in Hinsicht auf Aktivierungs- als auch auf Hemmungsgrade der Succinatdehydrogenaseaktivität aus. Es kann angenommen werden, dass das Papain und die übrigen untersuchten Proteasen bei niedrigen Konzentrationen nur auf begrenzten Bereich der Mitochondrienmembrane einwirken können, wodurch ihre Permeabilität verändert wird. Es ist nicht ausgeschlossen, dass Mitochondrienfragmente existieren, deren Succinatdehydrogenase-

aktivität im Vergleich mit dieser der intakten Lebermitochondrien höher ist.

Anderseits besitzen das Papain bei Konzentrationen über 800 µg und das Ficin oder das Bromelin über 800 µg in 1 ml einen gut ausgedrückten Hemmungseffekt. Wahrscheinlich ist der Übergang des Aktivierens zum Inhibieren der Succinatdehydrogenase durch eine tiefere Destruktion der mitochondrialen Strukturen, die in das Eiweiss eingreift, begründet.

Diese Ergebnise entsprechen den Daten für eine verhältnismässig grosse Widerstandsfähigkeit, die bei der Fragmentation der Elektronentransportkette in den mit Trypsin behandelten Mitochondrien (14) festegestellt wurde.

C. Optische Dichte der mit Papain behandelten mitochondrialen Suspension - Mitochondriale Suspension wurde mit wässrigen Papainlösungen verschiedener Konzentration (200, 400, 600, 800 und 1,000 µg in 1 ml) behandelt. Nach 30 Minuten Vorinkubation bei 37° C wurde die optische Dichte bei 400 nm gemessen (Abb. 3).

Abb. 3

Die scharfe Senkung der optischen Dichte bei etwa 600 µg Papain/1 ml und darüber ist durch Hydrolyse der mitochondrialen Eiweisstoffe und entsprechende Beschädigung der Mitochondrien verursacht. Ein ähnlicher Effekt wurde auch von Dianzani beobachtet (7).

Bei unseren Untersuchungen muss auf eine Korelation zwischen der Papainkonzentration, bei der sich die Succinatdehydrogenaseaktivität erhöht, und der Stabilität der mitochondrialen Suspension hingedeutet werden. Die eingehende Forschung dieser Tatsache wird zur Klärung des Mechanismus vom Aktivieren der Succinatdehydrogenaseaktivität beitragen.

D. Der Einfluss der Vorinkubationszeit - Die Wirkung der Pflanzenproteasen auf die Succinatdehydrogenaseaktivität hängt von deren Vorinkubationszeit mit den Mitochondrien ab.

Die Versuche wurden unter Enzymkonzentration durchgeführt, die bei einer Vorinkubationszeit von 30 Min. ein maximales Aktivieren der Succinatdehydrogenaseaktivität bzw. ungefähr 50 % Hemmung gewähren (Abb. 4).

Abb. 4

Die Proben mit erhöhter Succinatdehydrogenaseaktivität bei 30 Min. Vorinkubation unter 200 µg Papain oder Bromelin in 1 ml zeigen eine schwache Hemmung nach Verlängerung der Vorinkubationszeit auf 60 Minuten. Die beobachtete Hemmung bei 30 Min. Vorinkubation unter 200 µg Papain oder Bromelin in 1 ml verstärkt sich bis zu vollem Inhibieren der Succinatdehydrogenaseaktivität, wenn die Vorinkubationszeit auf 60 Minuten verlängert wird. Daraus ist zu schliessen, dass die Veränderungen der Mitochondrien zur Störung der Atmungskette führen könnten.

Die Ergebnisse unserer Forschungen, die unter verschiedenen Konzentrationen der Pflanzenproteasen durchgeführt worden sind, zeigen zwei quantitativ verschiedene Effekte: Aktivieren oder Hemmung. Diese Veränderungen der Succinatdehydrogenaseaktivität der mit Ficin, Papain und Bromelin behandelten Lebermitochondrien sind durch den Ablauf der Proteolyse begründet. Die Art der hervorgerufenen Destruktion der Mitochondrienmembrane und Enzymsysteme erfordert weitere eingehende Untersuchungen.

Literatur

1) Benk J.F., A.L. Sivish, P.A. Goesser, J.M. Hogan - (to Swift & Co) US Pat. 2,903,362, Sept. 8, 1959
2) Anonimous, Food Engineering; 32, 7, 81 (1960)
3) Wang H., C.E. Weir, M.L. Birkner, B. Ginger-Food Research, 23, 423 (1958)
4) Otavi J.; Janado Jgaku Zasshi; 14, 1 (1963)
5) Palmer A.Z., D.L. Huffman, J.W. Carpenter, R.L. Shirley, J.F. Hentges - Quart.J.Florida Acad.Sci 28, 106 (1965)
6) Moro I. R. - nicht veröffentlicht
7) Dienzani M.U. - Experimentia, 9, 343 (1953)
8) "The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food" - The University of Wisconsin Press, 255 (1966)
9) Schneider W.C., G.H. Hogeboom - J.Biol.Chem., 183, 123 (1950)
10) Johnson D., H.A. Lardy - Nature, 181, 701 (1958)
11) Slater E.C., W.D. Bonner - Biochem. J., 193, 265 (1952)
12) Anson M.L. - J.Gen.Phys., 22, 79 (1938)
13) Lowry O.H., N.J. Rosebrough, Ferr A.L., R.J. Randall - J.Biol.Chem., 193, 65 (1951)

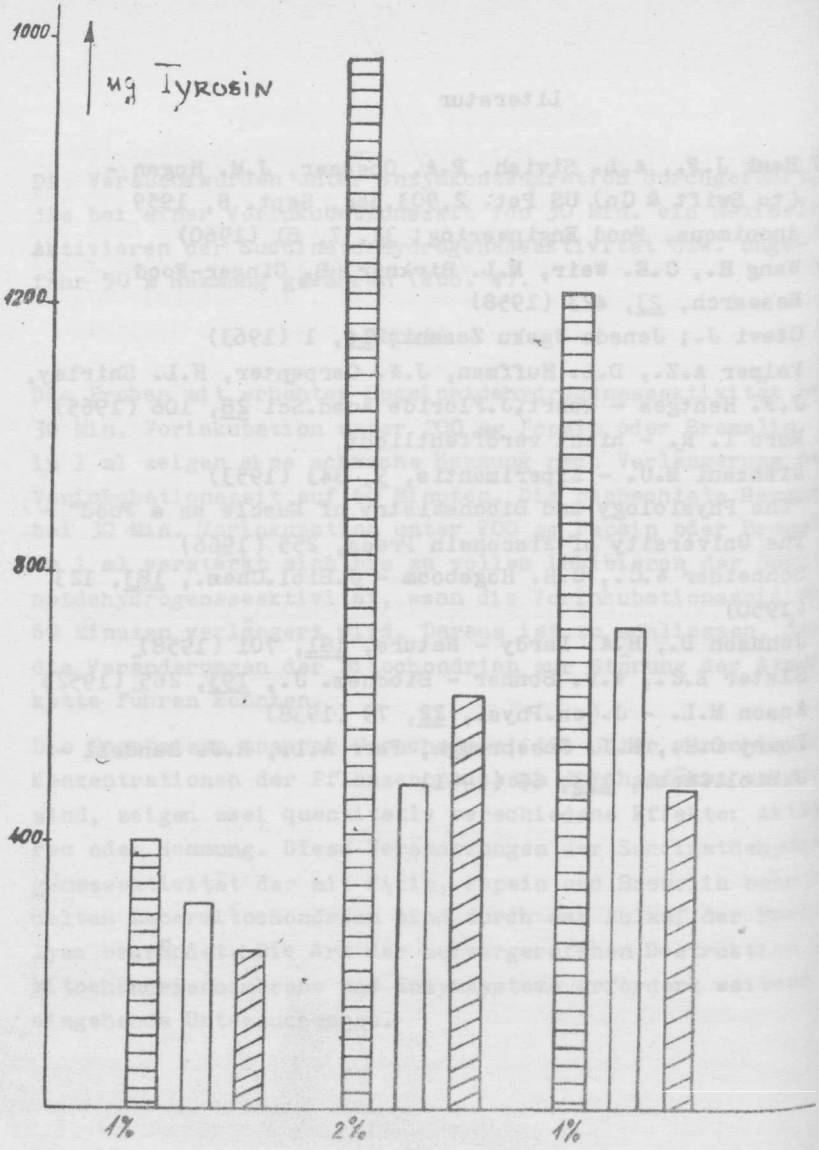

Abb. 1

Ficin Papain Bromelin

Abszisse - Substraten

Ordinate - Proteolytische Aktivität ausgedrückt in µg Tyrosin/130 µg Enzymeiweiß/30 Min/30 °C

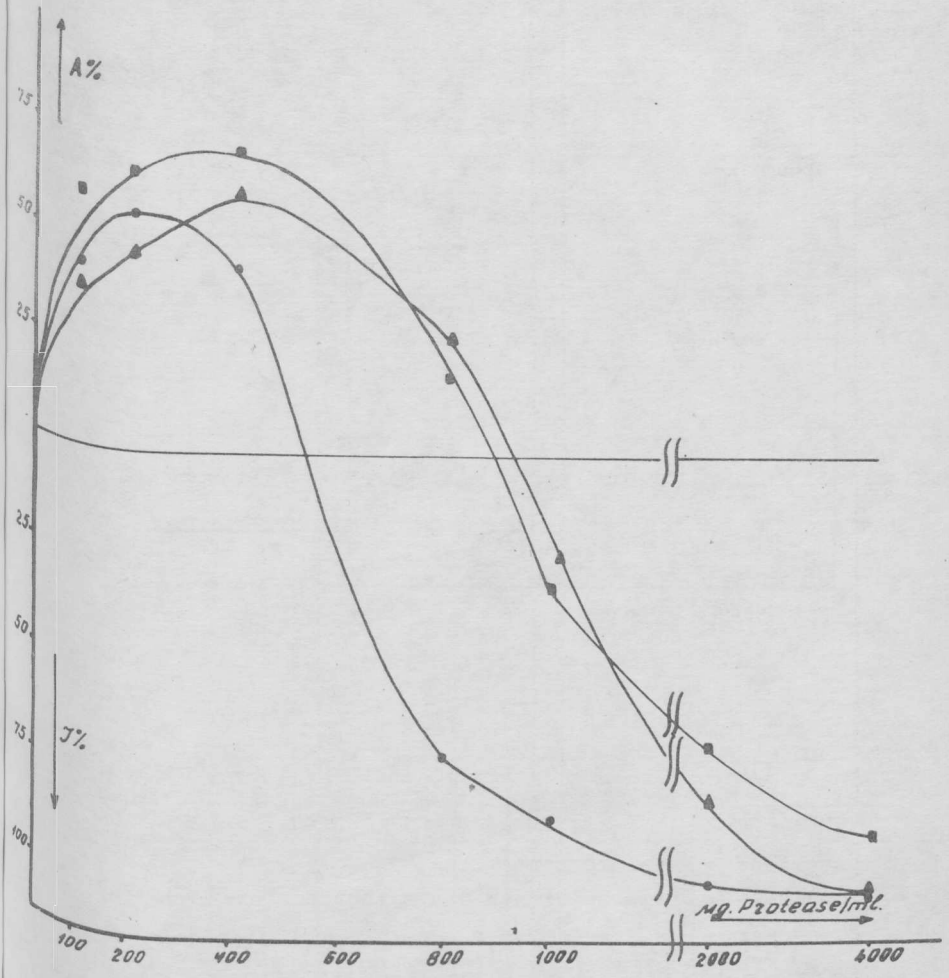

Abb. 2

▲—▲ Ficin ●—● Papin ■—■ Bromelin

Abszisse - Proteasenkonzentration

Ordinate - Aktivität in %

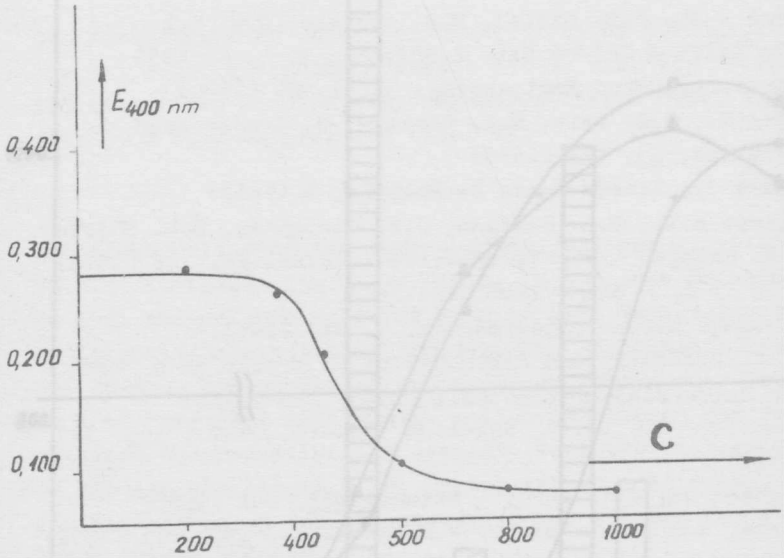

Abb. 3

Abszisse - Papainkonzentration
Ordinate - Optische Dichte der mitochondrialen Suspension

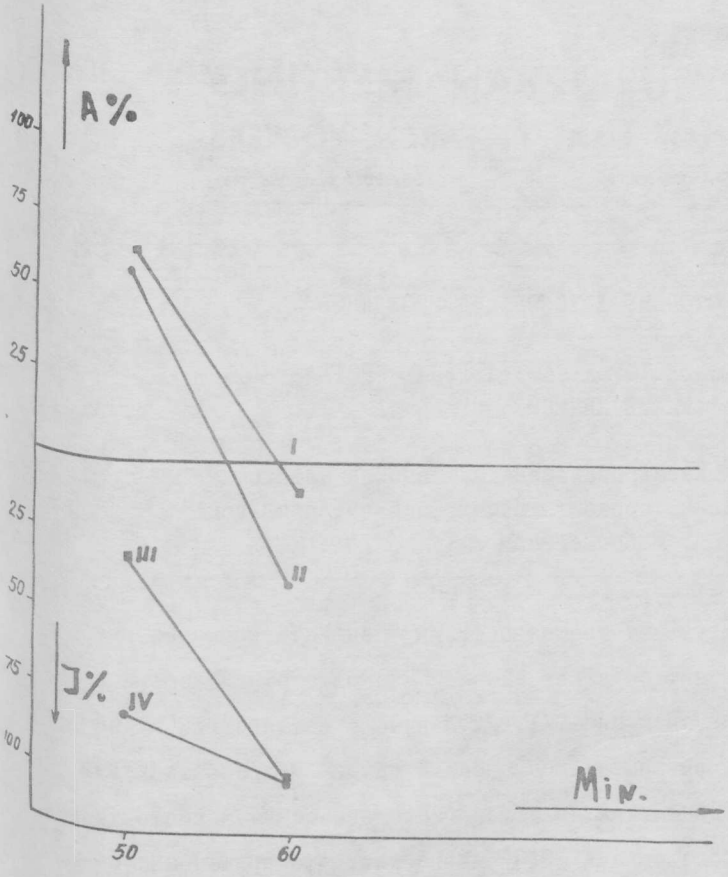

Abb. 4

Abszisse - Vorincubationszeit in Min.

Ordinate - Aktivierung oder Hemmung der Succinatdehydrogenaseaktivität

in %

I - Bromelin - 200 g/ml II - Papain - 200 g/ml

III- Bromelin -1000 g/ml IV - Papain -1000 g/ml

14 TH EUROPEAN MEETING OF MEAT RESEARCH WORKERS
BRNO. CZECHOSLOVAKIA AUGUST 26th – 31st 1968

SECTION C 13

Н.НЕСТОРОВ, Л.ЛИЛОВ и А.ГРОЗДАНОВ

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ НА ТКАНЬ ПЕЧЕНИ

Сукцинатдегидрогеназная активность митохондрий печени, обрабатываемых фицином, папаином и бромелином

Растительные протеазы фицин, папаин и бромелин широко применяются в современной мясной промышленности с целью смягчения мяса /I,2/. Данные о воздействии их на различные органы и ткани весьма скудны и преобладающими в этом направлении являются гистологические и гисто-химические исследования /3,4/. Известно, что применение папаина в небольших дозах доводит до смягчения ткани печени и почек, причем действие это не распространяется на мускулы /5/. По данным Моро и сотр. /6/ папаин распределяется преимущественно в почках от I44 до 270 мг/кг и печени от 40 до I60 мг/кг. , в то время, как в мускульной ткани концентрация его значительно ниже (от 0 до 5 мг/кг). Особенный интерес представляют исследования Диансани /7/, который устанавливает ингибирование сукцинат-

цитохрома, лактата и Д-аминокислотной аксидазной активности митохондрий печени, на которые воздействовали трипсином или папаином.

Проблема возможного действия растительных протеаз фицина, папаина и бромелина на мембраны и энзимные системы субклеточных структур еще не выяснена /8/. Целью настоящего исследования является - осветить до известной степени этот вопрос. Для примера использовались изолированные митохондрии печени, микрозомы и гиалоплазма крысы. Эти предварительные опыты служат основанием к дальнейшим исследованиям в условиях in vivo при интравенозном применении фицина, папаина и бромелина.

Изучение сукцинатдегидрогеназной активности митохондрий печени определяется тем, что активность является энзимным показателем функционального состояния митохондриальных структур.

Методы и материалы

I. Изолирование митохондрий. Проводились исследования митохондриальными препаратами из печени крысы, изолированными по методу Шнейдера и Хозебума /9/ с использованием 0,I8 М сахарозы по Джонсону и Лерди /I0/. В I мл суспензии содержатся митохондрии 600 мг свежей ткани (в среднем I4 мг митохондриального белка).

2. Метод определения сукцинатдегидрогеназной активности. Использовался колориметрический метод Слатера и Бонера /II/. Сукцинатдегидрогеназная активность нетит-

рированных митохондрий была принята за 100%, в отношении которой перечислялись остальные пробы в процентах активирования или ингибирования энзимной активности.

3. Метод установления протеолитической активности. Протеолитическая активность растительных протеаз установлена по методу Ансона /12/ при субстратах казеина, гемоглобина и миозина.

4. Методы установления белка. Использовались методы Лоури /13/ для белка и Кьельдаля для белкового азота.

5. Растительные протеазы. Использовались растворы в воде фицина, папаина и бромелина производства "Miles Chem.Co. Cliftor New Jersey". Конечный объем инкубационной смеси составлял 2 мл и содержал в среднем 7 мг митохондриального белка. Данные о концентрации использованных протеаз представлены в мг - ензимном белке на 1 мл реакционной смеси.

Результаты и обсуждение

А. Протеолитическая активность фицина, папаина и бромелина

Экспериментальные данные (рис.1) выражают значительную протеолитическую активность фицина по сравнению с папаином и бромелином по отношению к субстратам казеина, гемоглобина и миозина.

Данные параллельных исследований трех энзимов при одинаковых концентрациях и прочих равных условиях сопоставлялись с данными их влияния на сукцинатдегидрогеназ-

ную активность митохондрий печени.

Б. Влияние концентрации фицина, папаина и бромелина на сукцинатдегидрогеназную активность митохондрий печени

Митохондрии печени инкубировали при 37°С в продолжение 30 мин. при различных концентрациях использованных растительных протеаз, после чего определяли сукцинатдегидрогеназную активность. Полученные результаты графически выражены на рис.2.

Результаты опытов показывают, что при низких концентрациях протеолитических энзимов (от 100 до 400 μg/мл) значительно повышается сукцинатдегидрогеназная активность. Максимальный эффект активирования был получен при концентрации 200 μg/мл папаина и 400 μg /мл фицина или бромелина. При более высоких концентрациях наступает ингибирование, а полное приостановление энзимной активности было достигнуто при концентрации 2000 μg /мл папаина и 4000 μg/мл фицина или бромелина. Следовательно, из трех растительных протеаз папаин является наиболее активным как в отношении активизирования, так и в отношении ингибирования сукцинатдегидрогеназной активности. Эти данные не координируются с активностью протеаз в отношении субстратов казеина, гемоглобина и миозина (см.рис.I).

Можно допустить, что папаин и прочие исследованные протеазы при низких концентрациях частично повреждают митохондриальную мембрану, что приводит к увеличению ее пропу-

скаемости. Не исключается также возможность получения митохондриальных фрагментов, сукцинатдегидрогеназная активность которых более высока по сравнению с активностью интактных митохондрий.

С другой стороны папаин в концентрации свыше 600 мкг/мл и фицин или бромелин в концентрации свыше 800 мкг/мл оказывают выраженный ингибиторный эффект. Вероятно этот переход от активизации к ингибированию сукцинатдегидрогеназной активности является результатом более глубокого повреждения митохондриальных структур, достигающего поражения энзимов белков. Эти результаты согласуются с данными о сравнительно высокой устойчивости сукцинатдегидрогеназы, установленной при фрагментации электрон-переносящей цепи в митохондрии, обрабатываемые трипсином /I4/.

В. Оптическая плотность митохондриальной суспензии, обрабатываемой папаином.

Митохондриальная суспензия обрабатывалась водяными растворами папаина различной концентрации (200, 400, 600, 800 и I000 мкг/мл). После 30-минутной инкубации при 37°С измерялась оптическая плотность при 400 нм (рис.3).

Сильное уменьшение оптической плотности митохондриальной суспензии при концентрации папаина в 600 и более мкг/мл указывает, что наступила существенная перемена - вероятнее всего гидролиз митохондриальных белков и соответствующая деструкция митохондрий. Подобный эф-

фект наблюдал Дианзани /7/. Можно отметить корреляцию между концентрациями папаина, при которых наблюдается активизация сукцинатдегидрогеназной активности (рис.2) и стабильность митохондриальной суспензии (рис.3). Подробное изучение этого факта поможет уяснить механизм активизации сукцинатдегидрогеназиса.

Г. Влияние времени прединкубации

Действие растительных протеаз на сукцинатдегидрогеназную активность зависит от времени их прединкубации с митохондриями. Опыты проводили с концентрациями энзимов, обеспечивающими за 30 мин. прединкубации максимальное активирование (50% ингибирования) (рис.4).

При удлинении прединкубации до 60 мин. при концентрации 200 γ папаина или бромелина на I мл наблюдается ингибирование сукцинатдегидрогеназной активности. При тех же условиях ингибиторный эффект, полученный за 30 мин. прединкубации при концентрации в 1000 γ/мл папаина или бромелина углубляется до полного ингибирования сукцинатдегидрогеназной активности при 60-минутной прединкубации.

Следовательно, при более продолжительной прединкубации, как и следовало бы ожидать, перемены в митохондриях углубляются до степени нарушения электронно-транспортной функции дыхательной цепи.

Результаты наших исследований, проведенных в широком диапазоне концентраций растительных протеаз,

указывают на два качественно различных эффекта: активирование или ингибирование. Перемены в сукцинатдегидрогеназной активности митохондрий печени, обрабатываемых фицином, папаином или бромелином зависят от степени их гидролитического эффекта. Характер, наступившей в этих условиях деструкции митохондриальной мембраны и энзимных систем требует углубленных исследований.