Über die Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen V^{1, 4}Hydrolyse von *N*- α -Benzoyl-L-arginin-äthylester durch Papain *

GERHARD TALSKY und JOHANN MARIS

Institut für Technische Chemie der Technischen Hochschule München

(Z. Naturforsch. 23 b, 645—649 [1968]; eingegangen am 7. Dezember 1967)

Die pH-Profile der Hydrolyse von *N*- α -Benzoyl-L-arginin-äthylester durch kristallisiertes sowie zusätzlich chromatographisch gereinigtes Papain wurden zwischen 20 und 45 °C ermittelt. Das anomale Temperaturverhalten, welches sich im Auftreten eines Kurvenzuges anstelle einer Geraden im Arrhenius-Diagramm ausdrückte, tritt auch dann auf, wenn die Reaktion im pH-Optimum der jeweiligen Temperatur abläuft. Die mittleren experimentellen Aktivierungsenergien werden angegeben und die Anomalien diskutiert.

Papain, eine Peptid-Peptidohydrolase pflanzlicher Herkunft aus *Carica Papaya* und von relativ geringer Spezifität, hydrolysiert eine Reihe natürlicher aber auch synthetischer Substrate mit Peptid- und Amidbindungen. Darüber hinaus werden ähnlich wie von den proteolytischen Enzymen Trypsin und Chymotrypsin auch Aminosäureester gespalten. Besonders gut eignet sich als synthetisches Substrat *N*- α -Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAÄE), den wir deshalb bei unseren Untersuchungen verwendeten.

Unter den von SIZER und Mitarb.² untersuchten Enzymen wird auch Papain genannt, bei dem die Autoren ein anomales Temperaturverhalten angeben. Danach tritt mit Kollagen als Substrat bei 38 °C ein Knick im Arrhenius-Diagramm auf, d. h. unterhalb 38 °C ergab sich eine experimentelle Aktivierungsenergie E_{exp} von 44, oberhalb 38 °C eine E_{exp} von 21 Kcal Mol⁻¹.

Besonders STOCKELL und SMITH³ untersuchten erneut die Kinetik dieses Enzyms und prüften vor allem die pH- und Temperaturabhängigkeit der Reaktion. Unter Verwendung von *N*- α -Benzoyl-L-argininamid als Substrat und Acetat- sowie Phosphatpuffer war es beim Auftragen von $\ln k/T$ gegen $1/T$ nur bei pH 6 möglich, durch alle Meßpunkte eine Gerade zu ziehen, dagegen nicht bei pH 4,5, 5,2 und pH 7,0.

Nachdem unsere Untersuchungen die in der Literatur beschriebenen Knicke im Arrhenius-Diagramm durch Bestimmung der Temperaturabhängigkeit in kleinen Intervallen in Kurvenzüge auflösen

konnten^{4, 5}, haben wir auch das Papain in unsere Versuche einbezogen. Wir hatten damit ein kristallisiertes Enzym von niederem Mol.-Gew. (20 500) in der Hand, welches auch in Lösung verhältnismäßig gut beständig ist.

Experimentelles

Methode: Sämtliche Messungen wurden mit der bereits früher⁴ von uns beschriebenen automatischen Apparatur mit potentiometrischer Indikation in Abwesenheit von Puffer unter Konstanthaltung des pH-Wertes durch kontinuierliche Zugabe von 0,02-*n*. NaOH durchgeführt. Der experimentell ermittelte Fehler der Anfangs-Brutto-Reaktionsgeschwindigkeit v_{br} betrug dabei nicht mehr als $\pm 2,5\%$ und wurde bei den $\log v_{\text{br}}/1/T$ -Diagrammen als Fehlerbereich eingetragen. v_{br} wurde aus dem anfänglich linearen Bereich der Zeit-Umsatz-Diagramme oder nötigenfalls durch Anlegen der Tangente im Ursprung der leicht gekrümmten Kurven ermittelt.

Enzymlösung: Es wurde hochgereinigtes, kristallisiertes Papain (Serva, Heidelberg und Sigma, St. Louis, Mo.; suspendiert in 0,05-*m*. NaOCOCH₃, pH 4,5) verwendet. Für einen Teil der Versuche wurde das Enzym zusätzlich gelchromatographisch gereinigt.

Gelchromatographie: 0,3 ml Papainsuspension in 0,05-*m*. NaOCOCH₃ mit 4,8 mg Enzym wurden auf eine Sephadex-G 75-Säule aufgegeben, deren Durchmesser 15 mm und deren Länge 190 mm betrug. Zur Elution bei 0–1 °C wurde dest. Wasser verwendet und eine Durchlaufgeschwindigkeit von 11,5 ml/Std. erzielt. Die erhaltenen Fraktionen von je 2,5 ml wurden in einem UV-Gerät (Zeiss M 4 Q III, Schichtdicke 1 cm) ausgemessen. Abb. 1 zeigt ein typisches Elutionsdia-

* Peptid-Peptidohydrolase, EC 3.4.4.10.

¹ IV. Mitt.: G. Talsky u. G. Klunker, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1372 [1967].² I. W. Sizer, Ann. Surgery 121, 231 [1945].³ A. Stockell u. E. L. Smith, J. biol. Chemistry 227, 1 [1957].⁴ I. Mitt.: F. Patat u. G. Talsky, Z. Naturforsch. 22 b, 524 [1967].⁵ G. Talsky, Z. Naturforsch. 22 b, 1111 [1967].

gramm. Wie daraus ersichtlich ist, enthält das verwendete Papain nur geringe höher- und niedermolekulare Anteile; die Aktivität (Substrat BAÄE, pH 4,6, 25 °C, pufferfrei) fiel mit dem Hauptpeak zusammen; die übrigen Fraktionen waren inaktiv.

Abb. 1. Elutionsdiagramm der Gelchromatographie von Papain an Sephadex G-75. — Absorption bei 280 nm, --- Absorption bei 253 nm, - · - · - Aktivität von je 1 ml der Fraktionen in Mol l^{-1} Min. $^{-1}$.

Vor der Reinigung betrug die spezifische Aktivität des Enzyms durchschnittlich 3–4 U mg $^{-1}$ **; nach der Gelchromatographie konnte eine Anreicherung im Hauptpeak auf durchschnittlich 14 U mg $^{-1}$ erreicht werden (in Abb. 1 hat Fraktion 14 eine spezifische Aktivität von 11,6 U mg $^{-1}$).

Substratlösung (0,03-m.): 1,0275 g *N*- α -Benzoyl-L-arginin-äthylester·HCl (BAÄE) wurden in 100 ml dest. Wasser gelöst.

pH-Abhängigkeit: 5 ml Substratlösung (0,03-m.) wurden mit 9,5 ml dest. Wasser verdünnt und durch Zugabe geringer Mengen NaOH oder HCl bei der jeweiligen Temperatur auf den gewünschten pH-Wert gebracht. Hierauf wurden 0,5 ml Enzymlösung mit einem Gehalt von 175–320 γ Eiweiß zugegeben und die Umsatzgeschwindigkeit automatisch registriert. Alle in den Abb. 2 und 3 angegebenen Anfangs-Brutto-Reaktionsgeschwindigkeiten wurden auf Mol Min. $^{-1}$ pro mg Eiweiß umgerechnet.

Temperaturabhängigkeit: Die Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit. Die Konzentration des Substrates im Reaktionsvolumen von 15 ml betrug 0,01 Mol l^{-1} , die des Enzyms lag zwischen 13,3 und 16 mg l^{-1} . Der pH-Wert wurde konstant auf 4,44 (Abb. 5/I, II und Abb. 6/I) bzw. 4,98 (Abb. 6/II) gehalten oder jeweils auf das pH-Maximum der Reaktionstemperatur eingestellt (vgl. Abb. 4 sowie Abb. 6/III). Alle v_{br} -Werte wurden in Mol l^{-1} Min. $^{-1}$ angegeben und beziehen sich auf die in den Legenden angeführten Enzymkonzentrationen.

** 1 U = 1 Enzymeinheit; entspricht dem Umsatz von 1 μ Mol BAÄE pro Min. bei Substratsättigung, konst. pH 4,44 ohne Puffer, 25 °C.

Ergebnisse

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Zur Einstellung der Reaktionslösung auf niedrigere pH-Werte als 4,0 war Zusatz geringer Mengen von HCl (maximal $2 \cdot 10^{-3}$ Mol l^{-1}) nötig. Um sicher zu gehen, dadurch nicht die Reaktionsgeschwindigkeit zu verändern, haben wir zuerst den Einfluß der Chloridionen in Form von NaCl bis zu einer Konzentration von 0,6 Mol l^{-1} geprüft, jedoch bis 10^{-2} Mol l^{-1} praktisch keine Störung des Reaktionsablaufes vorgefunden.

Die pH-Abhängigkeit der Esterhydrolyse durch Papain wurde zwischen pH 3 und pH 7 sowohl bei kristallisiertem Enzym als auch bei zusätzlich chromatographisch gereinigten Präparaten bestimmt. Wie aus den Abb. 2 und 3 sowie Tab. 1 ersichtlich ist,

Abb. 2. pH-Aktivität der Hydrolyse von BAÄE durch kristallisiertes Papain bei verschiedenen Temperaturen.

□-□-□ 19,98 °C, ○-○-○ 24,98 °C, △-△-△ 29,85 °C, ■-■-■ 34,70 °C, ●-●-● 39,75 °C, ▲-▲-▲ 44,50 °C. (Substratkonz. 0,01 Mol l^{-1} , Enzymkonz. 1 mg l^{-1} , Spez. Aktivität 2,9 U mg $^{-1}$.)

werden die pH-Kurven mit zunehmender Temperatur spitzer. Zusätzlich gereinigtes Papain zeigte allgemein flachere Maxima als das normal kristallisierte Enzym. Außerdem ist es temperaturempfindlicher, was sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen durch

Abb. 3. pH-Abhängigkeit der Hydrolyse von BAÄE durch kristallisiertes und zusätzlich gelchromatographisch gereinigtes Papain bei verschiedenen Temperaturen.

□—□—□ 20,10 °C, ○—○—○ 25,80 °C, △—△—△ 30,05 °C, ■—■—■ 34,70 °C, ●—●—● 39,60 °C, ▲—▲—▲ 44,10 °C. (Substratkonz. 0,01 Mol l^{-1} , Enzymkonz. 1 mg l^{-1} , Spez. Aktivität 17,6 U mg^{-1} .)

Temperatur [°C]	pH-Maximum	
	von zusätzlich gereinigtem Papain	von kristallisiertem Papain
20	4,5 — 6,0	4,3 — 5,6
25	4,4 — 5,2	4,15 — 5,5
30	4,3 — 5,1	4,4 — 5,0
35	4,0 — 4,7	4,4 — 4,9
40	4,4 — 4,75	4,5 — 4,8
45	4,35 — 4,7	3,9 — 5,0

Tab. 1. pH-Maxima von kristallisiertem Papain (spez. Aktiv. 2,9 U mg^{-1}) und zusätzlich gelchromatographisch gereinigtem Enzym (spez. Aktiv. 17,6 U mg^{-1}) bei verschiedenen Temperaturen.

Senken des Temperatur-Optimum von 45 auf 35 °C ausdrückt. Auf die Änderung der Form der Kurven soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden, da sie nur zur Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen dienen.

Trägt man den mittleren pH-Wert des Maximum bzw. des Bereiches gegen die Temperatur auf, so ergibt sich bei 35 °C für die Kurve ein Minimum (Abb. 4). Wie weit das pH-Profil das Temperaturverhalten beeinflusst, wurde im folgenden geprüft.

Abb. 4. pH-Optimum in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur von kristallisiertem (○—○—○) und zusätzlich gelchromatographisch gereinigtem Papain (□—□—□).

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur

Zur Verfolgung der Reaktionsgeschwindigkeit eignet sich auch im Falle des Systems Papain-*N*- α -Benzoyl-L-arginin-äthylester vorzüglich die potentiometrische Bestimmung im pufferfreiem Medium, die bereits früher von SMITH und PARKER⁶ sowie von uns in abgewandelter automatisierter Form bei kinetischen Untersuchungen an Lipase^{4,5} und Urease¹ Verwendung fand.

Abb. 5 zeigt die $\log v_{br}/1/T$ -Diagramme für kristallisiertes Papain verschiedener Bezugsquellen und verschiedener Aktivität (3,72 U mg^{-1} bzw. 1,82 U mg^{-1}).

Abb. 5. Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von BAÄE durch zwei verschiedene Papainpräparationen. Substrat-Konz. 0,01 Mol l^{-1} , pH 4,44; Enzym-Konz. bei Kurve I 16 mg l^{-1} , bei Kurve II 13,3 mg l^{-1} . (Spez. Aktivität 3,72 bzw. 1,82 U mg^{-1} .)

⁶ E. L. SMITH u. M. J. PARKER, J. biol. Chemistry **233**, 1387 [1958].

mg⁻¹). Die beiden Kurvenzüge sind zwar nicht völlig identisch, doch geben sie eindeutig gleichen charakteristischen Verlauf wieder. Der Einfluß von pH-Änderungen ist aus Abb. 6 (Kurve I und II) zu entnehmen. Erhöhung des pH-Wertes führte zu Änderungen der Kurvenform sowie Abnahme der mittleren experimentellen Aktivierungsenergie oberhalb 38 bis 40 °C von 4,6 auf 3,4 Kcal Mol⁻¹. Schließlich bringt Abb. 6 (Kurve III) den Kurvenverlauf der Tem-

Abb. 6. Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von BAÄE durch kristallisiertes Papain bei pH 4,44 (Kurve I; Enzym-Konz. 16 mg l⁻¹), pH 4,98 (Kurve II; Enzym-Konz. 16 mg l⁻¹) sowie im pH-Optimum der jeweiligen Temperatur (Kurve III; Enzym-Konz. 13,3 mg l⁻¹). Substrat-Konz. überall 0,01 Mol l⁻¹. (Spez. Aktivität bei I u. II 3,72, bei III 1,92 U mg⁻¹.)

peraturabhängigkeit, wenn man bei der jeweiligen Temperatur in dem aus Abb. 4 ermittelten pH-Optimum arbeitet. Aus Abb. 7/I ist das Temperatur-

verhalten von zusätzlich an Sephadex G-75 bei 0 bis 1 °C gereinigtem Enzym ersichtlich. Gegenüber kristallisiertem Papain trat eine „Phasenverschiebung“ auf (vgl. Abb. 7/I und 7/II), ähnlich, wie wir dies schon bei Xanthinoxidase⁸ beobachtet hatten. In

Abb. 7. Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von BAÄE durch kristallisiertes (Kurve II) und zusätzlich gelchromatographisch gereinigtes Papain (Kurve I) bei pH 4,44. Substrat-Konz. 0,01 Mol l⁻¹, Enzym-Konz. 44 mg l⁻¹ (Kurve I) und 16 mg l⁻¹ (Kurve II). (Spez. Aktivität bei I 16,42, bei II 3,72 U mg⁻¹.)

jedem Fall erhielten wir aber Kurven, die um einen Mittelwert oszillieren; in der Gegend des von SIZER beschriebenen Knickes bei 38 °C nahm der Kurvenzug nur eine flachere Neigung an. Die aus den Diagrammen ermittelten durchschnittlichen experimentellen Aktivierungsenergien sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Enzymqualität	pH	Temperaturintervall [°C]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Mittlere experimentelle Aktivierungsenergie [kcal Mol ⁻¹]	Beleg
1. Kristallisiert	4,44	15–38	3,72	7,0	Abb. 5/I
	4,44	38–46	3,72	4,6	u. Abb. 6/I
2. Kristallisiert (von anderem Hersteller als 1. bezogen)	4,44	18–41	1,82	7,7	Abb. 5/II
	4,44	41–52	1,82	4,3	
3. Kristallisiert (wie 1.)	4,98	20–35	3,72	7,0	Abb. 6/II
	4,98	35–42	3,72	3,4	
4. Kristallisiert (wie 2.)	*	20–41	1,92	7,8	Abb. 6/III
		41–51	1,92	2,3	
5. Kristallisiert und zusätzlich gelchromatographisch gereinigt	4,44	19–39	16,42	7,2	Abb. 7/I
	4,44	39–46	16,42	4,1	

Tab. 2. Mittlere experimentelle Aktivierungsenergien verschiedener Papainpräparate unter diversen Reaktionsbedingungen.
* Im Verlauf des pH-Optimums.

⁷ E. L. SMITH, B. J. FINKLE u. A. STOCKELL, *Discuss. Faraday Soc.* **20**, 96 [1955].

⁸ G. TALSKY u. G. FINK, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **348**, 1141 [1967].

Diskussion

STOCKELL und SMITH³ sowie SMITH und FINKLE⁷ fanden für die Spaltung von *N*- α -Benzoyl-L-argininamid bei 5 °C eine wesentlich andere pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit als bei 38 und 66 °C vor; daraus leiten sie einen Wechsel der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktion bzw. deren Chemismus ab.

Nach unseren Untersuchungen liegt auch bei Verwendung des Substrates *N*- α -Benzoyl-L-arginin-äthylester ein von der Temperatur und dem Reinheitsgrad des Enzyms abhängiges pH-Profil vor (Abb. 2 und 3). Das in Abb. 4 auftretende Minimum könnte man als Änderung des Reaktionsablaufes deuten. Einen weiteren Hinweis für diese Interpretation gibt der Verlauf der Temperaturabhängigkeit. Im gleichen Temperaturgebiet von 38–40 °C nimmt nämlich die um eine Gerade oszillierende Kurve eine andere Neigung an; damit sinkt auch die durchschnittliche experimentelle Aktivierungsenergie von 7,6 auf 5 Kcal Mol⁻¹.

Die Untersuchung des Systems Lipase-Glycerinester zeigte einen deutlichen Einfluß des pH-Wertes auf den Verlauf der Temperaturanomalien⁵. Auch Papain spricht auf pH-Änderungen an, was sich in einer Verschiebung der Wellenzüge äußert (Abb. 6). Um nun auszuschließen, daß das anomale Verhalten lediglich durch Überlagerung verschiedener pH-Einflüsse unter Reaktionsbedingungen, die nach obigen Befunden nicht immer ganz im pH-Optimum liegen, bedingt wird, haben wir auch einmal ein $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm aufgenommen, bei dem wir den pH-Wert jeweils den optimalen Verhältnissen entsprechend einstellten. Wie aber Kurve III in Abb. 6 zu entnehmen ist, sind zwar qualitative Unterschiede festzustellen, die Charakteristik der Kurve blieb jedoch erhalten. Es ergab sich ferner, daß im kristallisierten Papain noch vorhandene nieder- und höhermolekulare Verunreinigungen, die durch zusätzliche chromatographische Reinigung entfernt werden konnten, nicht Grund für die Anomalien sind; sie traten in beiden Fällen deutlich auf. Dies stimmt mit den Befunden anderer Autoren^{7, 9, 10} sowie eigenen Beobachtungen an Xanthinoxydase⁸ überein, wonach ungereinigtes und gereinigtes Enzym ähnliches Verhalten aufweisen.

Unsere bisherigen Untersuchungen des Temperaturverhaltens enzymatischer Reaktionen unter Verwendung von Lipase, Xanthinoxydase, Urease und Papain zeigten deutlich anomales Verhalten nur dann, wenn die Tertiärstruktur nicht wesentlich verändert wurde. Die Anomalien konnten immer dann beeinflusst werden, wenn man Reaktionsbedingungen wählte, von denen man weiß, daß sie zu strukturellen Veränderungen des Enzyms oder Enzym-Substratkomplexes führen. So waren vorsichtige Denaturierung durch Alterung⁵, Veränderung des pH-Wertes des Reaktionsmilieus⁵ sowie Zusätze von Salzen und anderen Substanzen in dieser Richtung wirksam. Der Befund, daß bei höheren Temperaturen die Abweichungen des Kurvenzuges von einer durchgelegten Geraden im allgemeinen geringer werden (vgl. z. B. Abb. 5 und 6), läßt sich als beginnende Wärmedenaturierung und damit strukturelle Veränderung des Proteins interpretieren. Stärkere Strukturänderungen, bedingt z. B. durch thermische Behandlung bei höherer Temperatur oder Harnstoffzusatz¹¹, brachte das charakteristische Verhalten zum Verschwinden. In diesem Fall konnte man durch die gefundenen Meßpunkte im Arrhenius-Diagramm eine Gerade oder zumindest eine leicht gekrümmte und stetige Kurve legen.

Die Frage, wie weit gezielte Änderungen des Enzymmoleküls durch Abbau oder Anfügen definierter Moleküle an reaktionsfähige Gruppen des hochpolymeren Eiweißkörpers oder durch Adsorption auch eine Änderung des Temperaturverhaltens mit sich bringen, ist Aufgabe unserer weiteren Versuche. Schon jetzt kann man aber sagen, daß Molekülvariationen so lange auf das Auftreten der Anomalien keinen oder nur unbedeutenden Effekt ausüben, als dadurch die Tertiär- und möglicherweise Quartärstruktur des Enzyms bzw. Enzym-Substratkomplexes nicht wesentlich verändert wird, sich die angefügten Substituenten also nur an der Oberfläche des Makromoleküls anlagern und sich die im Inneren des gefalteten Moleküls befindlichen strukturstabilisierenden Bindungen nicht lösen.

Wir danken Herrn Prof. F. PATAT für die stete Förderung dieser Arbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Personal- und Sachmitteln.

⁹ J. CLOSE, These de doct., Université de Liege, 1951.

¹⁰ E. L. SMITH, J. R. KIMMEL u. D. M. BROWN, J. biol. Chemistry 207, 533 [1954].

¹¹ G. TALSKY, unveröffentlichte Arbeiten.