

Untersuchungen über die Bildung der Proteinase aus einem *Aspergillus awamori*-Stamm. I. Faktoren mit Einflüssen über die Bildung der Proteinase

Von Jiro HOSHINO

(Eingegangen am 1. Mai, 1958)

Die proteolytischen Enzyme werden bekanntlich von verschiedenartige Schimmelpilzen in die Nährlösung sezerniert, die deswegen von alters her in den orientalischen Ländern zur Gärungsindustrie verwendet worden sind. Über den gründlichen Bildungsmechanismus der Proteinase aus dem Schimmelpilz ist aber wenig untersucht worden. Es ist daher dem Verfasser ein besonderes Interesse, solche Probleme mittels eines Pilzes *Aspergillus awamori* aufzuklären, das vom Verfasser aus der Erde isoliert wurde und ein starkes Vermögen zur Bildung der "sauren" Proteinase bietet, von denen der Verfasser eine enzymatische Natur angegeben hat¹⁾.

Die Bildung der Proteinase unter den verschiedenen Züchtungsbedingungen durch das Oberflächenverfahren hat der Verfasser näher studiert^{2,3)}, aber infolge der Mycelentwicklung ist das Versuchssystem in diesem Falle etwas kompliziert und damit wird der wesentliche Bildungsmechanismus des Enzyms schwer aufzuklären.

Verwendet man dagegen das ausgewaschene Schüttelmycel in einem stickstofffreien Milieu, so kann man die oben erwähnte Schwierigkeit leicht beseitigen.

In den letzten Jahren wurden die Bildungsmechanismen der Enzyme von mehreren Forschern, wie z. B. dasselbe der Amylase aus *Bacillus subtilis* von J. Fukumoto et al.⁴⁾ und von M. Nomura⁵⁾, der Amylase aus *Asp. oryzae* von O.

Tanabe et al.⁶⁾ und der Proteinase aus *Asp. oryzae* von H. Shiota et al.⁷⁾, mittels des ausgewaschenen schüttelmycels oder der Zellen mitgeteilt.

Um weitere Kenntnisse über den Bildungsmechanismus der "sauren" Proteinase zu erkennen, hat der Verfasser in den vorliegenden Arbeiten das ausgewaschene Schüttelmycel als Versuchsmaterial zur Prüfung unterworfen.

Arbeitsmethode

Gewinnung des ausgewaschenen Schüttelmycels.—Einige Anzahl der Schüttelkolben von 500 ccm Inhalt wurden mit je 80 ccm Nährlösung beschickt, die 10% Rohrzucker, 0.2% Ammoniumnitrat und Monokaliumphosphat, 0.025 % Magnesiumsulfat heptahydrat, 0.002% Mangansulfat tetrahydrat, 0.0025% Eisen(III)-chlorid hexahydrat und 0.03% Gelatine als Nährsubstrat enthält. Nach dem üblichen Sterilisieren wurden jede Kolben von den etwa 5~10 Tagen Würzeagarkulturen mit Conidiosporen von Stamm Nr. 82—2 geimpft, und danach wurden die Kulturen 72 Stunden lang auf einer Schüttelmaschine mit 130 Hin- und Herbewegungen pro Minute bei 30°C behandelt. Das so sich entwickelnde Mycel wurde dann unter sterilen Bedingungen gemeinsam auf einem groben Filter gesammelt. Das gut abgesaugte und ausgewaschene Mycel wurde in kleine Stücke (1.0 g feuchtes: etwa 0.2 g Trockengewicht) zerschnitten, welche zur Untersuchungen der Bildung der Proteinase in den 50 ccm Versuchslösungen wieder suspensiert, und bei 30°C weiter geschüttelt wurden.

Bestimmung der proteolytischen Aktivität.—Zur Ermittlung der proteolytischen Aktivität hat der Verfasser die Caseinverdauung mittels des Folinischen Reagens nach B. Hagiwara⁸⁾ kolorimetrisch bestimmt, wobei die enzymatische Reaktion unter den Bedingungen von 1% Casein, pH=3.2, bei 55°C eine Stunde lang geprüft wurde. Der Wert der proteolytischen Aktivität wurde

1) J. Hoshino und N. Taketomi, *Waseda Applied Chem. Soc. Bull.* (Waseda Ōyokagakukaihō), 24, No. 65 9 (1957).

2) J. Hoshino, *Synopses of Eng. Graduate School of Sci. and Eng. Waseda Univ.* (Waseda Daigaku Kōgaku Kenkyū Ihō), 6, 64 (1957).

3) J. Hoshino, *Memoirs of College of Sci. and Eng. Waseda Univ.* (Waseda Daigaku Rikogakubu Kiyō), (im Druck).

4) J. Fukumoto, T. Yamamoto und D. Tsuru, *J. Agr. Chem. Soc. Japan* (Nippon Nōgei Kagaku Kaishi), 31, 421, 429, 506, 510, 545 (1957).

5) M. Nomura et al., *J. Biochem.*, 43, 251, 841 (1956), 44, 87 (1957).

6) O. Tanabe et al., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* (Nippon Nōgei Kagaku Kaishi), 30, 596 (1956), 28, 227 (1954).

7) H. Shiota et al., ebenda, 30, 724 (1956), 31, 173 (1957).

8) B. Hagiwara, *Ann. Rep. Fac. Sci. Osaka Univ.*, 2, 35 (1954).

mit dem Absorptionskoeffizient pro Gramm trockenen Mycels pro 50 ccm Versuchslösung derjenigen mit dem Folinschen Reagens sich färbenden und 0.2 M Trichloroessigsäure löslichen Stoffen, die unter den obigen Bedingungen aus Casein bilden, bei der Wellenlänge von 660 m μ ausgedrückt.

Ergebnisse

1. Bildungsverlauf der Proteinase.—

Der Bildungsverlauf der Proteinase aus dem Schüttelmycel wurde unter Verwendung von $M/30$ KH_2PO_4 (pH=4.8) und des destillierten Wassers als Versuchslösung beobachtet. Die Ergebnisse sind in der Figur 1 dargestellt.

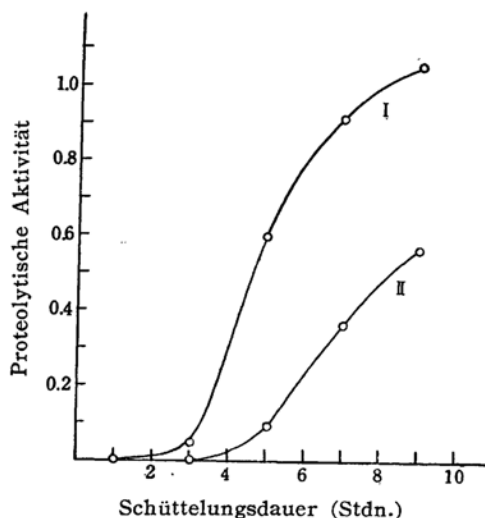


Fig. 1. Bildungsverlauf der Proteinase.
Versuchslösung:

Kurve I, $M/30$ KH_2PO_4 (pH=4.8)

Kurve II, Destilliertes Wasser

Das Mycel fängt an, wie aus der Figur ersichtlich ist, beim Schütteln mit der stickstofffreien Phosphatlösung nach einer Weile Proteinase reichlich zu sezernieren.

Weiter ist es auch der Fall mit dem Wasser Proteinase zu bilden. Hierbei bleibt aber die Frage noch offen, ob die Proteinase durch das Mycel wirklich *de novo* synthetisch hergestellt wurde oder die innere Proteinase durch das Schütteln ausgelassen wurde. Um diese Frage zu beantworten, hat der Verfasser die Mycelhomogenate und den Auszug des Acetonpulvers des Mycels zur Ermittlung der proteolytischen Aktivität herangezogen. Keine proteolytischen Aktivität wurde darin bestätigt (Tabelle I). Einige metabolischen Inhibitoren, wie Kaliumcyanid, 2,4-Dinitrophenol und Toluol haben die

Bildung der Proteinase verhindert (Tabelle II). Durch die oben angegebenen Tatbestände wurde es festgestellt, dass die Bildung der Proteinase sich nicht das Auslassen der inneren Proteinase, sondern echte Biosynthese durch einen von den genannten metabolischen Inhibitoren verhinderten Prozess stattfindet.

TABELLE I

PROTEOLYTISCHE AKTIVITÄT DES MYCEL-HOMOGENATES UND DES AUSZUGS

Reaktionsdauer (Min.)*	15	30	60	120
Mycelhomogenate	0	0	0	0
Auszug	0	0	0	0
Kontrolle**	0.39	0.52	0.64	0.71

* Enzymatische Reaktionen wurden unter den Bedingungen von 1% Casein, pH=3.2 bei 55°C ausgeführt.

** Zum Kontrollversuch wurde die Versuchslösung herangezogen, nachdem sie mit dem ausgewaschenen Mycel 20 Stunden lang geschüttelt worden war.

TABELLE II

EINWIRKUNGEN DER METABOLISCHEN INHIBITOREN AUF DIE PROTEINASEBILDUNG

Inhibitoren	Konz.	Proteolytische Aktivität der Versuchslösung		
		Schüttelungsdauer (Std.)		
		3	5	24
Toluol	10% V/V	0	0	0.06
KCN	1×10^{-2} M	0	0	0.27
	1×10^{-3} M	0	0	2.94
	1×10^{-2} M	0	0	0.09
2,4-DNP*	1×10^{-2} M	0	0	0.95
	1×10^{-3} M	0	0	0.95
Kontrolle	1×10^{-3} M	0	0.24	3.16

* 2,4-Dinitrophenol

2. Bildung der Proteinase bei der Züchtung und durch das Schütteln des dabei sich entwickelten Mycels.—Als einzelne C-Quelle zur Entwicklung des Pilzes wurden je 10% Saccharose, Glucose, Fructose und Lactose in der Nährlösung zugesetzt und die Anhäufung der Proteinase in der Kulturflüssigkeit nach 3 Tagen und das Bildungsvermögen derselben des so sich entwickelten Mycels beobachtet.

Die Versuche mit dem ausgewaschenen Mycel wurden mittels derjenigen Versuchslösung ausgeführt, die aus $M/5$ -Phosphatpuffergemisch (pH=6.1) und 1% Glucose besteht. Die Resultate sind in der Tabelle III zusammengestellt. Dabei hat es sich ergeben, dass das ausgewaschene Schüttelmycel ein größeres Vermögen zur Proteinasebildung unter dem Mangel an den

TABELLE III
PROTEINASEBILDUNG DURCH DAS AUSGEWASCHENE MYCEL UND DURCH
DAS ENTWICKLUNGSVERFAHREN

	C-Quelle im Nährboden	Schüttelverfahren		
		Oberflächenverfahren		
		Entwicklungs- züchtung*	Entwicklungs- züchtung*	Dabei entwickeltes ausgewaschene Mycel**
		7 Tage	3 Tage	24 Stunden
Proteinasebildung (Prot. Akt.)	Saccharose	0.31	0.39	5.29
	Fructose	6.65	0.20	6.53
	Glucose	0.08	0.06	9.70
	Lactose	—	0.82	10.57
Entwicklung (Gewicht des Mycels in mg)	Saccharose	91	560	
	Fructose	913	562	
	Glucose	81	540	
	Lactose	—	116	

* Die Entwicklungsnährlösung steht im Text geschrieben, aber ohne Gelatine für Oberflächenverfahren.

** Die Versuchslösung besteht aus 0.2 M Phosphatpufferlösung und 1% Glucose.

Nährsubstrate als des sich entwickelten Mycels erweist.

3. Proteinasebildungsvermögen des Mycels in den verschiedenen Entwicklungsphasen.—Es ist bekannt, dass sich die physiologische oder biochemische Aktivität der Zellen mit der Dauer der Züchtung ändert. Hinsichtlich dieses Tatbestandes hat der Verfasser das Proteinasebildungsvermögen des Schüttelmycels in den verschiedenen Entwicklungsphasen ermittelt und seine Beziehung zum Gehalt des Mycels an den freien Aminosäuren näher studiert. Die Ergebnisse sind in der Figur 2 illustriert.

Die Anhäufung der Proteinase nach dem zwanzigstündigen Schütteln des Mycels in der 1% glucosehaltigen m/5-Phosphatpufferlösung wurde zur Bestimmung des Proteinasebildungsvermögens ermittelt.

Wie aus der Figur 2 ersichtlich ist, fand eine beträchtliche Änderung des Vermögens des Mycels während seiner Entwicklung statt: je jünger das Mycel ist, desto grösser ist das Vermögen. Dementsprechend sind die reichlichere Mengen der wasserlöslichen Eiweissstoffe und des totalen Stickstoffes im solchen Mycel enthalten. Wenn das Mycel sich kräftig entwickelt, vermindert sich allmählich sein Proteinasebildungsvermögen. Es deutet an, dass es zwischen dem anabolischen Stoffwechsel des sich entwickelnden Mycels und demselben des ruhenden Mycels ein grosser Unterschied gibt, wie von M. Nomura⁵⁾ schon darauf hingewiesen wurde.

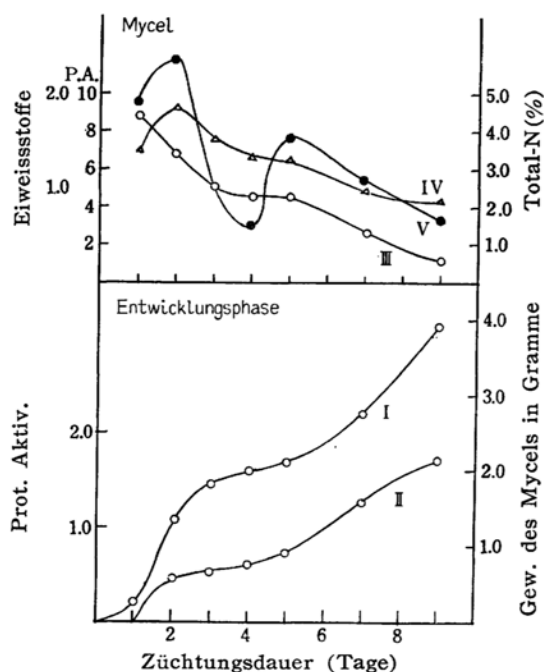


Fig. 2. Änderung des Proteinasebildungsvermögens des Mycels mit der Züchtungsdauer.

- Kurve I: Mycelentwicklung
II: Proteinasebildung bei der Züchtung
III: Proteinasebildungsvermögen des Mycels (P. A.)
IV: Stickstoffgehalt des Mycels
V: Wasserlösliche Eiweissstoffe*

* Ausgewaschenes Mycel wurde unter Rückflüsskühler mit Wasser 10 min. dreimal extrahiert, Eiweissstoffe im Extrakt wurden mittels des Folinischen Reagens kolorimetrisch ermittelt.

TABELLE IV
EINFLUSS DER ANAEROBEN BEDINGUNGEN AUF DIE PROTEINASEBILDUNG

	Kontrolle				Anaerobenschütteln									
	Wattebausch				Gummistöpsel				N ₂ -Einfüllung				Vakuum	
0.2 M-Phosphatpuffer	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	+	
1% Glucose	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	+	
Schluss pH	5.6	1.4	5.9	5.4	5.6	1.8	5.9	5.6	5.6	2.2	5.9	5.8	5.8	
Proteolytische Aktivität	4.3	0.7	4.0	4.2	4.0	0.9	3.8	4.4	0.6	1.4	0.8	1.2	0	

4. Einfluss des pH auf die Proteinasebildung.—Um den Einfluss des pH auf die Bildung der "sauren" Proteinase zu erkennen, hat der Verfasser die Pufferlösungen von N/10-Phosphat und N/10-Acetat als Versuchslösungen unter den variierenden pH verwendet. Die Ergebnisse sind in der Figur 3 illustriert.

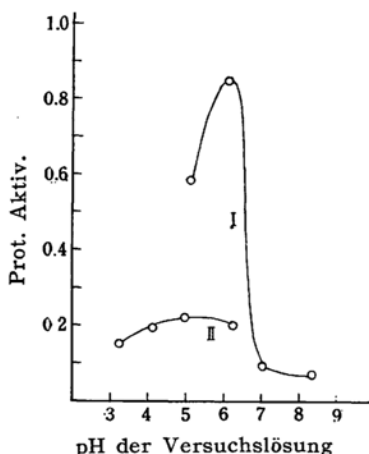


Fig. 3. pH-Abhängigkeit der Proteinasebildung.

Versuchslösung; I, N/10 Phosphatpuffer
II, N/10 Acetatpuffer

Bei den Versuche mit den Phosphatpufferlösungen ergab es sich, dass die Bildung der Proteinase gegen die Änderung des pH äusserst empfindlich ist, deren Optimum bei pH=6.1 liegt. Demgegenüber bleibt die Acetatpufferlösung auf die Bildung der Proteinase ohne Wirkung, die daher durch das Phosphat gar nicht ersetzlich ist. Daraus wurde es festgestellt, dass das Phosphat nicht nur als ein Puffer, sondern auch als ein Hilfsmittel auf die Biosynthese der Proteinase wesentlich einwirkt.

5. Einfluss der Phosphatkonzentration.—Wie im vorigen Paragraph beschrieben, übt die Anwesenheit des Phosphates auf die Bildung der Proteinase eine vorzügliche Wirkung aus, die aber dem Acetat ganz fehlt.

In Berücksichtigung dieser wichtigen

Tatsache hat der Verfasser den Einfluss der Phosphatkonzentration der Versuchslösung auf die Proteinasebildung mit dem Anfangswert von pH=6.1 näher studiert. In der Figur 4 sind die Ergebnisse wiedergegeben. Hierbei ist es gezeigt, dass die Änderung der Phosphatkonzentration sehr einflussreich ist und ihr Optimum bei m/30 liegt.

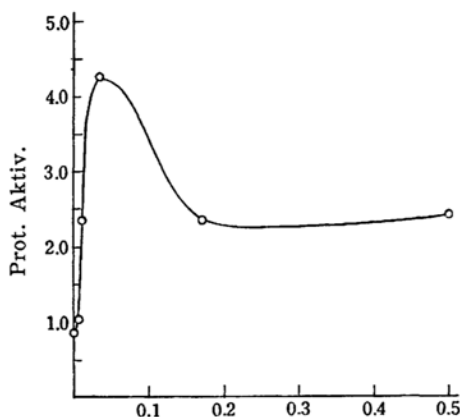


Fig. 4. Einfluss der Phosphatkonzentration.

6. Bedürfnis des Sauerstoffs.—Es wurde von H. Shiota⁷⁾ veröffentlicht, dass die Proteinasebildung aus dem ausgewaschenen Mycel des *Asp. oryzae*-Stammes stark gehemmt wird, wenn die Luft in den Schüttelkolben durch Kohlendioxyd, Stickstoff und Wasserstoff ersetzt wird. Identischer Tatbestand hat J. Fukumoto⁹⁾ bei den Versuche über die Amylasebildung aus *Bacillus subtilis* wahrgenommen.

Um den Effekt der anaeroben Bedingung bei meinem System in Anbetracht dessen zu erkennen, hat der Verfasser das Mycel je in den Kolben mit dem Gummistöpsel, in der Stickstoffatmosphäre und im Vakuum zum Vergleich mit dem Versuch mit dem Wattebausch geschüttelt. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle IV.

9) J. Fukumoto und T. Yamamoto, *J. Agr. Chem. Soc. Japan (Nippon Nogei Kagaku Kaishi)*, **31**, 421 (1957).

Diese zeigen, dass Sauerstoff auf die Bildung der Proteinase unentbehrlich einwirkt, dessen Menge aber mit ein wenig genügend ist.

Schlusswort

Es wurde über die Bildungsfaktoren der "sauren" Proteinase aus den ausgewaschenen Schüttelmycel eines Schimmelpilzes *Aspergillus awamori*, das vom Verfasser neulich isoliert wurde und durch das starke Vermögen zur Bildung der "sauren" Proteinese charakteristisch ist, und auf ihre Beeinflussbarkeit durch einige Schüttelbedingungen untersucht.

Zusammenfassend darf es festgestellt werden, dass das Mycel durch einen synthetischen Prozess aus den Aminosäuren die Proteinase bildet, für das die Zusammenwirkung von Sauerstoff und der Energiequelle sowie Phosphat unent-

behrlich zu sein scheint. Die pH-Abhängigkeit der Bildung dieses Enzyms ist so bemerkenswert, dass man für die reichliche Bildung mit der konzentrierten Pufferlösung günstigen pH-Wert festhalten muss. Das Optimum liegt bei pH=6.1. Diesbezüglich ist diese Proteinasebildung von derselben bei der Entwicklungszüchtung sehr verschieden, wobei sie im mehr sauren Bereich am günstigsten stattfand, während es noch nicht imstande ist, diesen Unterschied aufzuklären.

Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Professor Dr. N. Taketomi für seine Anregung und stetige Leitung bei dieser Arbeit meinen besten Dank auszusprechen.

*Institut der Angewandten Chemie
Fakultät der Naturwissenschaft und
Technik
Waseda Universität
Shinjuku-ku, Tokyo*