

Die multikomponenten Formen von Cellulase (EC 3.2.1.4) aus *Aspergillus oryzae*

Dimiter Kolev^{a,*} und Fawzy Hatour^b

^a Lehrstuhl für Biochemie, Fakultät für Biologie,
Universität Sofia, BG-1421 Sofia, Bulgarien

^b Institut für landwirtschaftliche Biochemie,
Universität El-Minia, El-Minia, Ägypten

(Eingegangen 9. Oktober 1987. Angenommen 11. November 1987)

Multiple Forms of Cellulase (EC 3.2.1.4) from Aspergillus oryzae

The enzyme cellulase from *Aspergillus oryzae* was resolved into four multiple forms, using anion exchange chromatography on DEAE Sephadex A-50 and gel filtration on Sephadex G-75. The stages of fractionation were followed by electrophoresis on cellulose acetate strips. These enzyme forms are characterized by different enzyme activities and isoelectric points.

(*Keywords: Cellulase; Cellulase from Aspergillus oryzae; Multiple forms of cellulase; Electrophoresis of cellulase*)

Einleitung

In den letzten Jahren wurde mit größtem Interesse der enzymatische Abbau der Cellulose untersucht. Dieser Prozeß wird von den Enzymen des Cellulasekomplexes (Cellulase, Cellulose 1,4- β -cellobiosidase und β -Glucosidase) katalysiert [1]. In einer Reihe von Arbeiten wurde die Existenz multikomponenter Formen der Enzyme des Cellulasekomplexes publiziert [2—12]. Es wurde auch festgestellt, daß die Bildung dieser Enzymformen eine charakteristische Eigenschaft der Cellulasebildner ist, wie z. B. bei *Trichoderma*-Arten [12].

In der vorliegenden Arbeit wird die Homogenität der Cellulase (EC 3.2.1.4) aus *Aspergillus oryzae* untersucht.

* Herrn Univ.-Prof. Dr. Hans Tuppy zum 65. Geburtstag herzlichst gewidmet.

Experimenteller Teil

Enzyme

Als Ausgangsstoff für die Cellulase aus *Aspergillus oryzae* wurde das Handelspräparat „Luzym“® (Luitpoldwerk, BRD) verwendet. Dieses Präparat wurde in 0.05 M Phosphatpuffer bei $pH = 7.2$ aufgelöst (4% g/v). Der unlösliche Niederschlag wurde durch Zentrifugieren (10 000 U/min, 2°C, 20 min) abgetrennt; er besaß keine Enzymaktivität.

Substrat

Es wurde Natriumcarboxymethylcellulose (Na-CMC) als Handelsprodukt „Tylose C 1000p“® (Farbwerke Hoechst AG, BRD) mit einem Molgewicht 140 000, DP 640 und DS 0.7 verwendet.

Aktivitätsbestimmung

Die Cellulaseaktivität wurde nach der *Somogyi-Nelson-Methode* [13] bestimmt. Als relative Aktivitätseinheit (IRE) wurde diejenige Enzymmenge angenommen, die aus dem Substrat das Äquivalent von 20 μg Glucose in 1 ml Reaktionsgemisch freisetzt [14].

Proteinbestimmung

Die Proteine wurden nach der *Lowry-Methode* [15] bestimmt.

Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien (CAF)

Zur elektrophoretischen Trennung wurden CAF (25 × 145 mm; Sartorius-Membranfilter GmbH, BRD) und ein „Mikrophor“ (Boskamp, BRD) bei folgenden Versuchsbedingungen verwendet: 0.06 M Veronalpuffer bei $pH = 8.6$; 150 V Spannung; Trennzeit 90 min; Färbelösung: 0.5% Amidoschwarz 10 B in einem Gemisch aus Methanol-Essigsäure (9 : 1, v/v) bei einer Maximalfärbungszeit von nicht mehr als 5 min; Entfärbungslösung: Methanolgemisch-Essigsäure (9 : 1, v/v) und einer Entfärbungszeit von 10 min.

Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrischen Punkte der multikomponenten Cellulaseformen wurden nach der von uns beschriebenen Methode [16] bestimmt.

Ionenaustauscherchromatographie

Die Fraktionierung mit der Ionenaustauscherchromatographie wurde bei folgenden Versuchsbedingungen durchgeführt: Temperatur 4–5°C; Gelbett 260 × 40 mm aus DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia, Schweden) in 0.05 M Phosphatpuffer bei $pH = 7.2$; Eluieren erfolgte am Anfang mit dem gleichen Puffer und dann mit einem linearen NaCl-Gradienten (0–1 M im 0.05-M-Phosphatpuffer bei $pH = 7.2$); Aussalzen mit festem Ammoniumsulfat; Auflösen der Niederschläge in 0.01 M Pyridin-Acetatpuffer bei $pH = 5.0$; Dialyse und Gefriertrocknung.

Gelfiltration

Die Fraktionierung mit der Molekularsiebchromatographie erfolgte unter folgenden Versuchsbedingungen: Temperatur 4–5°C; Gelbett 142 × 2.2 cm aus

Sephadex G-75 (Farmacia, Schweden) in 0.1 M Phosphatpuffer bei $pH = 7.2$; Eluieren und Isolieren wie oben beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Die Elektrophorese der Enzymlösung mit CAF zeigte, daß sich das Ausgangspräparat bei $pH = 8.6$ in zwei zur Kathode wandernden und in drei zur Anode wandernden elektrophoretischen Fraktionen spaltet (Abb. 1, oben — 0).

Die mit verschiedenen Ionenaustauschern durchgeführten Vorversuche wiesen darauf hin, daß DEAE Sephadex A-50 am geeignetsten ist. Der Austauscher sichert die verhältnismäßig volle Trennung von Kathode- bzw. Anode-wandernden Fraktionen (Abb. 1, oben — 1, 2 und 3) und hält eine große Anzahl der Farbstoffe, die im untersuchten Präparat enthalten sind, zurück.

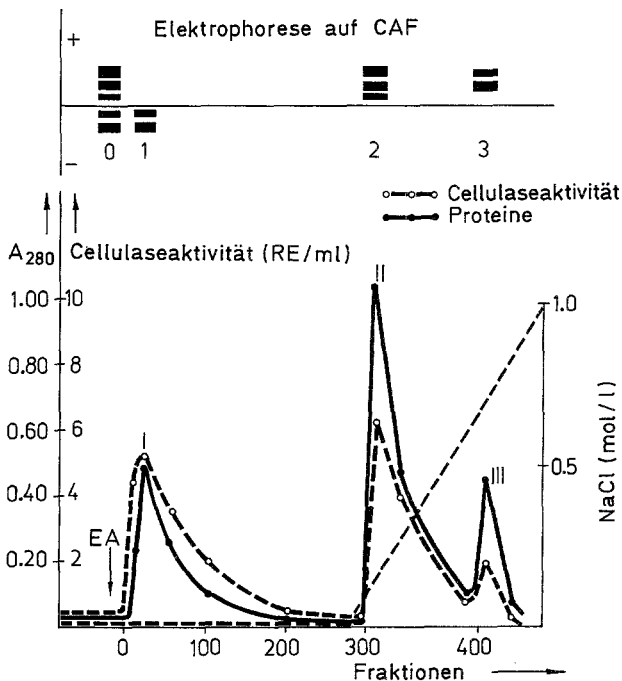


Abb. 1. Anionenaustauscherchromatographie mit DEAE Sephadex A-50 mit 0.05 M Phosphatpuffer ($pH = 7.2$); Eluieren mit Linear-NaCl-Gradienten; Aktivität (Substrat: Na-CMC) —○—○—○— und Absorption —●—●—●—. Im oberen Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der CAF-Elektrophorese dargestellt: Ausgangspräparat-AP (0) und Peaks nach der Fraktionierung (1, 2 und 3)

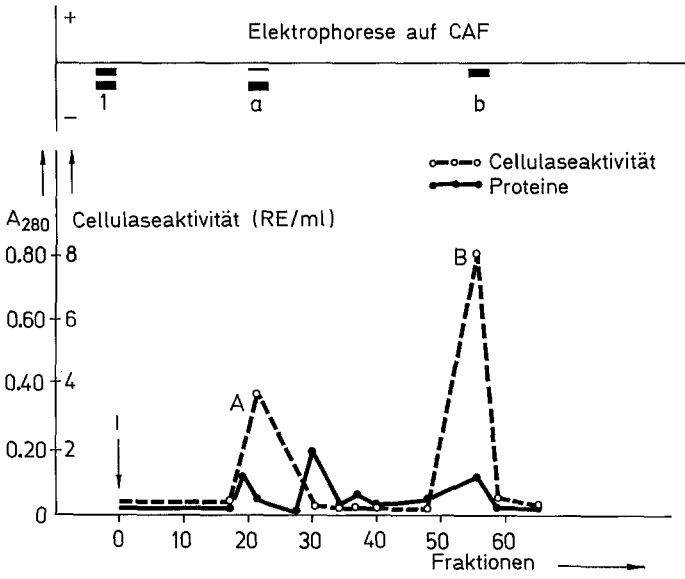


Abb. 2 a

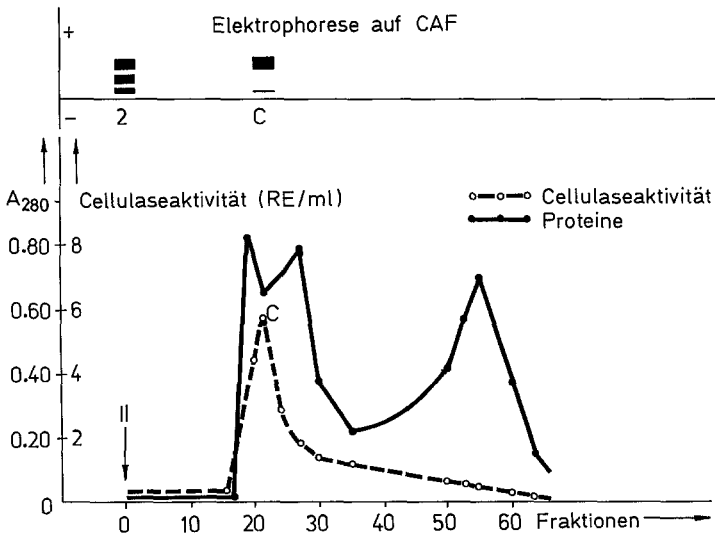


Abb. 2 b

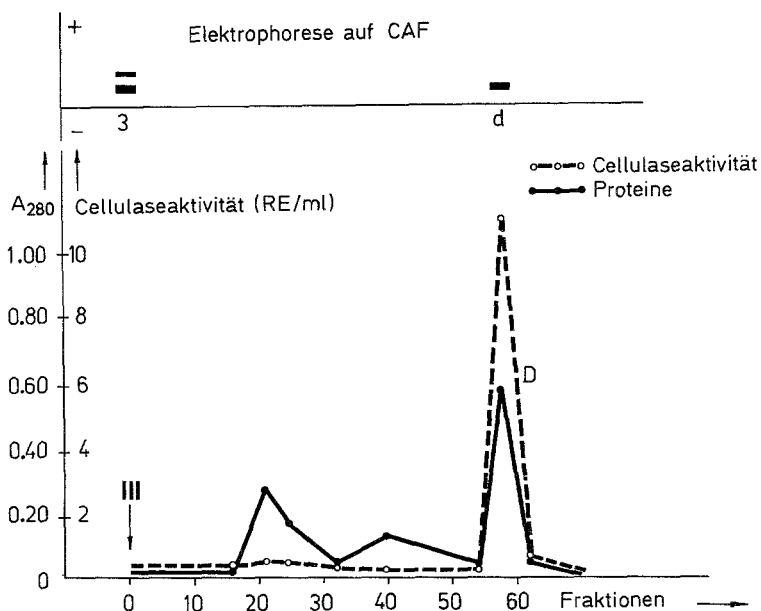


Abb. 2 c

Abb. 2. Gelfiltration von Peak I (A), Peak II (B) und Peak III (C) auf Sephadex G-75; Aktivität (Substrat: Na-CMC) —○—○—○— und Absorption —●—●—●—. Im oberen Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der CAF-Elektrophorese dargestellt: Ausgangspeaks (I, II und III) und Peaks nach der Gelfiltration (a, b, c und d)

In den erhaltenen Aktivitätspicks wurden 25% (für Peak I), 44% (für Peak II) und 10% (für Peak III) von der ursprünglichen Aktivität nachgewiesen. Die Anionenaustauscherchromatographie des Präparates Luizym ergab somit ca. 20% Verlust an Cellulaseaktivität und ca. 26% Verlust der Proteine.

Die erhaltenen Cellulasefraktionen wurden mit der Gelfiltration weiter gereinigt (Abb. 2A, B und C). Vom Peak I wurden zwei zur Kathode wandernden Fraktionen gewonnen (Abb. 2A, oben — a und b), von denen eine elektrophoretisch homogen war: Von den Peaks II und III wurden auf dieselbe Weise je eine zur Anode wandernde Fraktion (Abb. 2B, oben — c und Abb. 2C, oben — d) erhalten, von denen die Fraktion d elektrophoretisch homogen war.

Bei der Anwendung von zwei voneinander unabhängigen Trennungsvorgängen (Ionenaustauscherchromatographie mit nachfolgender Gelfiltration und isoelektrischer Fokussierung in natürlichem *pH*-Gradienten [16]) wurden vier aktive multikomponente Formen (a—d) der Cellulase aus *Aspergillus oryzae* nachgewiesen. Sie besaßen eine verschiedene

Enzymaktivität gegen Na-CMC, hatten eine unterschiedliche Beweglichkeit bei der CAF-Elektrophorese und verschiedene isoelektrische Punkte bei der isoelektrischen Fokussierung (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Einige Eigenschaften der multikomponenten Formen der Cellulase aus Aspergillus oryzae*

Eigenschaften	Multikomponente Formen			
	a	b	c	d
Spezifische Aktivität (RE · mg ⁻¹)	56.6	68.1	58.6	44.5
Reinigungsfaktor	4.8	5.8	5.0	3.8
CAF bei pH = 8.6	AWF ^a	AWF ^a	KWF ^b	KWF ^b
Anzahl der Bänder	1	1	2	1
pI ^c im Ausgangspräparat [16]	3.72	4.03	6.30	4.26
pI in einzelnen Fraktionen	3.70	4.00	6.30	4.30
Abweichung (±)	0.02	0.03	0.0	0.04

^a KWF = zur Kathode wandernde Fraktion

^b AWF = zur Anode wandernde Fraktion

^c pI = isoelektrischer Punkt

Bei den Enzymen des Cellulasekomplexes aus anderen Pilzarten (*Acetovibrio cellulolyticum* — zwei Formen [10], *Geotrichum candidum* 3C — sechs Formen [8], *Sporotrichum pulverulentum* — fünf Formen [2, 3], *Thermoascus aurantiacus* — zwei Formen [11], *Trichoderma koningii* — sechs Formen [5], *Trichoderma reesei* — zwei Formen [4], vier Formen [9], fünf Formen [6], u. a.) wurde gleichfalls eine multikomponente Natur nachgewiesen. Es handelt sich offenbar um eine charakteristische Eigenschaft der Enzyme des Cellulasekomplexes [10].

Die Frage, wodurch die multikomponenten Formen der Cellulase-Enzyme hervorgerufen werden, konnte in der Fachliteratur noch nicht beantwortet werden. In einigen Fällen wurde angenommen, daß die vielfältigen Komponenten als Artefakte bei der Bildung von stabilen Komplexen zwischen den Cellulaseproteinen und den Polysacchariden [17—19] auftreten; in anderen Fällen nahm man an, daß es sich um eine Biosynthese von Sequential- oder Konformationsisomeren [20] handelt.

Um den komplizierten Mechanismus, wie die Enzymhydrolyse der nativen Cellulose verläuft, erklären zu können, müßten folgende Fragen beantwortet werden: die multikomponente Natur jedes Enzyms des Cellulasekomplexes, die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Kom-

ponenten jedes Enzyms, die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Enzymen des Cellulasekomplexes sowie diese zwischen den Letzteren und dem angegriffenen Cellulosesubstrat.

Literatur

- [1] *IUB* 1984, Enzyme nomenclature. Academic Press, Orlando, FL
- [2] *Eriksson KE, Pettersson B* (1975) *Eur J Biochem* 51: 193
- [3] *Almin KE, Eriksson KE, Pettersson B* (1975) *Eur J Biochem* 51: 207
- [4] *Berghem LER, Pettersson LG, Axiö-Fredriksson UB* (1976) *Eur J Biochem* 61: 621
- [5] *Wood TM, McCrae SI* (1978) *Biochem J* 171: 61
- [6] *Weber M, Foglietti MJ, Percheron T* (1980) *J Chromatogr* 188: 377
- [7] *Tanaka M, Taniguchi M, Matsuno R, Kamikubo T* (1981) *J Ferment Technol* 59: 177
- [8] *Rodionova NA, Martinovich LI* (1986) In: *Skriabin GK, Golovlev EL, Klyosov AA* (eds) *Problemi biokonversii rastitelnogo siria*. Nauka, Moskwa, p 143
- [9] *Tikhomirov DE, Nutsubidze NN, Lakhtin VM, Klyosov AA* (1987) *Biokhimiya* (Moskow) 52: 1097
- [10] *Saddler JN, Khan AW* (1981) *Canad J Microbiol* 27: 288
- [11] *Tong CC, Cole AL, Shapherd MG* (1980) *Biochem J* 191: 83
- [12] *Labudová J, Farkaš V* (1983) *BBA* 744: 135
- [13] *Chetkarov ML, Hatour FD, Kolev DN* (1984) *Monatsh Chem* 115: 1321
- [14] *Wood TM* (1968) *Biochem J* 109: 217
- [15] *Lowry HO, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ* (1951) *J Biol Chemistry* 193: 265
- [16] *Koleff D, Herzfeld F* (1972) *Die Pharmazie* 27: 471
- [17] *Jermin MA* (1962) *Austr J Biol Science* 15: 769
- [18] *Miller GL, Birzgalis R* (1962) *J Chromatogr* 7: 33
- [19] *Eriksson KE, Pettersson B* (1968) *Arch Biochem Biophys* 124: 142
- [20] *Whitaker DR* (1961) *Bull Soc Chim Biol* 42: 1701