

Isolierung und Charakterisierung einer Acetylester-Hydrolase aus *Aspergillus niger*

Isolation and Characterization of an Acetylester-Hydrolase from *Aspergillus niger*

B. Schöbel

Fachbereich Biologie, Universität Mainz

und

W. Pollmann

Abteilung Biochemie, C. H. Boehringer Sohn, Binger Straße, D-6507 Ingelheim

Z. Naturforsch. **35 c**, 696–698 (1980); eingegangen am 7. Mai 1980

Acetylester-Hydrolase, *Aspergillus niger*, Gelfiltration, Autotitration

The characteristic features of an acetic acid esters hydrolyzing enzyme (acetylesterase, EC 3.1.1.16) are described. The pH- and temperature optimum were 7.0 and 40 °C respectively. The stability of the enzyme regarding different pH- and temperature conditions was investigated. The molecular weight of the acetylesterase could be determined to 160 000. A small acetic ester hydrolyzing activity was found too with a molecular weight of about 25 000. The activity was not inhibited by addition of di-isopropylphosphorfluoridate (DFP) or physostigmine. The K_M -value for glyceryl triacetate was about 90 mM. Concentration of the enzyme was done by ultrafiltration and column-chromatography. The enzymatic activity tests were performed titrimetrically using glyceryl triacetate for substrate.

Einführung

Während in einer früheren Arbeit [1] durchgeführten Untersuchungen einer Chlorogensäure spaltenden Esterase (Chlorogenase) aus dem Kulturfiltrat von *Aspergillus niger* wurde eine Glycerintriacetat spaltende Aktivität beobachtet, die unspezifischen Esterasen zugeschrieben wurde. Im Verlaufe der Versuche zur Substratspezifität der Chlorogenase stellte sich heraus, daß es sich bei diesen „unspezifischen Esterasen“ um eine Acetylesterase handelt. Acetylesterasen (EC 3.1.1.16) sind schon seit längerem bekannt und ihre Wirkungsweise ist in mehreren Arbeiten [2–7] beschrieben worden. Trotzdem ist die Charakterisierung dieser Enzyme noch sehr lückenhaft.

Material und Methoden

Quelle für die in der vorliegenden Arbeit isolierte und charakterisierte Acetylester-Hydrolase waren *Aspergillus niger*-Kulturen. Die Züchtung des Pilzes erfolgte auf halbfestem Medium [8] im Mikrobiologischen Labor der Firma C. H. Boehringer Sohn,

Ingelheim. Die Zellen wurden durch Behandlung mit hypertonischen Salzlösungen [8] extrahiert und die wässrigen Extrakte durch eine Ultrafiltration mit Amicon-Ultrafiltern PM 30 konzentriert. Das Permeat enthielt in Wasser gelöste Salze und niedermolekulare Verbindungen. Das Retentat wurde anschließend sprühgetrocknet. Dieses sprühgetrocknete Produkt enthielt neben geringen Mengen Acetylester-Hydrolase noch wenig Chlorogenase sowie hauptsächlich Pektinasen, Cellulasen und Proteasen.

Der Gesamtproteingehalt der Enzymlösungen wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 280 nm am Zeiss Spectrophotometer KM 6 bestimmt [9]. Es wurde für die Extinktion $E_{280}^{1\text{cm}} = 0,1$ eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml angenommen.

Die enzymatische Aktivität wurde durch Titration der infolge Esterspaltung freigesetzten Säure bestimmt. Für die Versuche zur Substratspezifität wurden folgende Ester verwendet: Chlorogensäure, Iso-Chlorogensäure, Triacetyl glycerin, Acetylthiocholin, Buttersäureäthyl- und -methylester, Buttersäurenaphthyl-(1)-ester, Naphthyl-(1)- und -(2)-acetat, DL-*p*-Hydroxy-mandelsäure-äthylester, Eversäure, (+)- und (–)-Lichesterinsäure, Tannin, Gallussäuremethylester, Ellagsäure, Aesculetin, Umbelliferon, Scopoletin, Zimtsäureäthylester, außerdem Sonnenblumenöl.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Pollmann.
0341-0382/80/0900-0696 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Das für die Messungen verwendete Titrationssystem Autotitrator bestand aus Auto-Burette, Titri-graph und Titrator (Radiometer, Copenhagen). Die Substrate (100 mg + 3 ml Wasser) wurden nach Einstellung auf pH 7,0 mit 0,5 ml Testlösung im Reaktionsgefäß ca. 5 min bei 40 °C inkubiert. Bei lipophilen Substraten wurden diese zunächst mit 0,5 ml Aceton angelöst und langsam mit 2,5 ml Wasser verdünnt. Bei den Naphthylestern trat trotzdem eine feine Suspension auf.

Die Angabe der Enzymaktivität erfolgte in Units [U]. Dabei ist 1 Unit als die Enzymmenge definiert, welche die Bildung von 1 µmol Produkt pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert [10].

Die Gelfiltration diente zur Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung des Enzyms.

Es erwies sich ein bereits vorgequollenes Polyacrylamidgel, AcA 34 (LKB) mit einer Trennkapazität für Molekülgrößen bis 350 000 als geeignet. Die Eichung der Säulen erfolgte mit Cytochrom c (MG 12 500), Aldolase (MG 158 000), Katalase (MG 240 000) und Ferritin (MG 450 000).

Ergebnisse

Ultrafiltration mit den Filtertypen PM 30, XM 50 und AM 100 ermöglicht es, eine Vielzahl von Verbindungen niederen bis mittleren Molekulargewichts (bis MG ~ 100 000), u. a. die Pektinasen, Cellulasen und Proteasen abzutrennen. Das Verbleiben der Acetylcster-Hydrolase im Retentat spricht bereits für ein Molekulargewicht von über 100 000.

Tab. I. Fraktionierte Äthanol-fällung von 15 g PM 30-Retentat (O. D. 280 nm = 13,5 g Protein) in 150 ml Wasser. Jedes Präzipitat wurde in 20 ml destilliertem Wasser aufgenommen.

Fraktion	Äthanol-konzentration [%]	Protein [g]	Glycerintriacetat-Spaltung [mU/mg]
1	6	0,12	—
2	17	0,36	168
3	25	0,21	243
4	32	0,33	303
5	38	0,44	679
6	42	0,61	820
7	46	0,51	706
8	50	0,32	886
Überstand (250 ml)	50	10,1	62
		13,0	
PM 30-Retentat (150 ml)	—	13,5	285

Tab. I zeigt die Ergebnisse einer fraktionierten Fällung von PM 30-Retentat mit Äthanol. Die Fraktionen Nr. 6 und 8 zeigten die höchste Aktivität (820 bzw. 886 mU/mg).

Die bei der fraktionierten Äthanol-fällung auftretenden beiden Aktivitätsmaxima weisen auf zwei unterschiedliche Acetylcsterasen hin.

Abb. 1 zeigt den Elutionsverlauf von 2 g XM 50-Retentat mit 0,1 M Trispuffer pH 6,5 an einer 5 × 80 cm-Säule. Die aktiven Fraktionen fanden sich nach 1120 bzw. 1390 ml im Eluat. Diesen Elutionsvolumina entsprechen nach den Eichproteinen Molekulargewichte von 160 000 bzw. 250 000.

Die spezifische Aktivität in den aktiven Fraktionen beträgt jeweils etwa 5 U/mg. Demnach ist der Anreicherungsfaktor bei der Gelfiltration mit 17,5 wesentlich höher als bei der fraktionierten Äthanol-fällung (3,0).

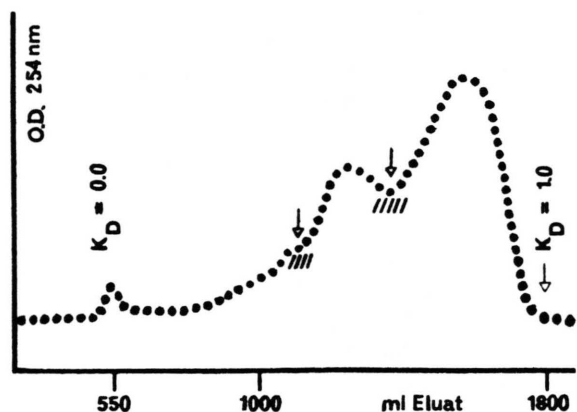


Abb. 1. Säulenchromatographie von XM 50-Retentat an AcA 34-Ultrogel.

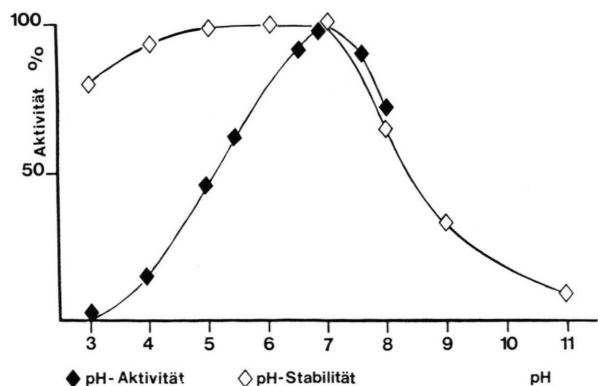


Abb. 2. pH-Stabilität der Acetylcster-Hydrolase pH-Abhängigkeit der Hydrolaseaktivität.

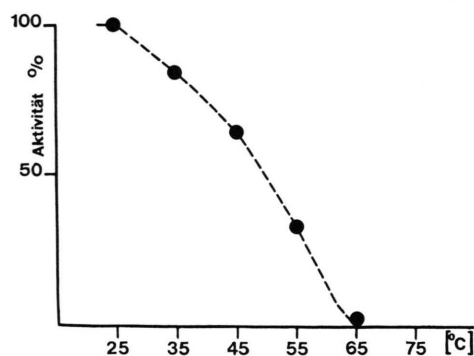


Abb. 3. Temperaturstabilität der Acetylester-Hydrolase.

Die pH-Stabilität der Esterase (1. AcA 34-Fraktion) wurde über einen pH-Bereich von 3–11 untersucht (Abb. 2). Nach pH-Einstellung inkubiert man die Enzymlösungen 10 min bei dem jeweiligen pH und 40 °C. Danach erfolgte bei allen so vorbehandelten Testgemischen die Inkubation unter Standardbedingungen mit Triacetyl-glycerin.

Die Ermittlung der Restaktivitäten erfolgte in der Weise, daß die Enzymaktivität bei pH 7,0 inkubierten Proben gleich 100% gesetzt wurde. Anhand dieser Bezugsgröße ließ sich die Enzymaktivität für die übrigen pH-Werte errechnen.

Der Versuch zeigt, daß die pH-Stabilität der Acetylesterase bei pH 5–7 am größten ist. Bei pH 3,0 sind noch 80% der Enzymaktivität vorhanden. Weniger stabil verhielt sich das Enzym bei pH 8,0 (65% Restaktivität). Bei pH 11,0 war nur eine Restaktivität von 10% nachweisbar. Abb. 2 zeigt auch die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Triacetyl-glycerinspaltung. Die Versuchsanordnung zur Temperatur-Stabilität erfolgte analog. Die in Trispuffer aufgenommenen 0,5 ml-Enzymlösungen wurden auf pH 7,0 eingestellt und bei 25 °–45 °–55 °–65 ° bzw. 75 °C 10 min inkubiert. Nach der Triacetyl-glycerinzugabe folgte die Inkubation. Als 100%-Wert diente die bei 25 °C gemessene Enzymaktivität (Abb. 3).

Tab. II. Untersuchungen zur Substratspezifität der Acetyl-esterase und Schweineleberesterase

Substrat	PM 30-Retentat	AcA 34-Fraktion	Schweineleber-Esterase
Aesculetin	–	–	–
Buttersäuremethylester	–	–	++++
Buttersäureäthylester	–	–	++++
Buttersäure-naphthyl-1-ester	–	–	++
Chlorogensäure	++	–	–
„iso-Chlorogensäure“	+	–	–
Ellagsäure	–	–	–
Triacetyl-glycerin	+++	++++	++++
Essigsäure-naphthyl-1-ester	++	+++	+++
Essigsäure-naphthyl-2-ester	(+)	+	(+)
Evensäure	–	–	–
Gallussäuremethylester	–	–	–
(+)-Lichesterinsäure	–	–	–
(–)-Lichesterinsäure	–	–	–
Mandelsäureäthylester	–	–	++++
p-OH-Mandelsäure-äthylester	–	–	(+)
Scopoletin	–	–	–
Sonnenblumenöl	–	–	–
Tannin	–	–	–
Umbelliferon	–	–	–
Zimtsäureäthylester	+	–	++++

Bei der Esterase beginnt der Inaktivierungsprozeß schon bei 35 °C; bei 65 °C ist keine Enzymaktivität mehr nachzuweisen.

Der K_M -Wert wurde im Konzentrationsbereich 10–300 mM Triacetyl-glycerin unter Standardbedingungen nach Lineweaver-Burk zu 90 mM bestimmt. v_{\max} beträgt dabei 8 U (bezogen auf 1 mg Enzym).

Wie aus Tab. II zu entnehmen ist, handelt es sich bei dem Enzym um eine Esterase mit relativ hoher Substratspezifität. Hydrolysiert werden nur Ester der Essigsäure. Andere Substrate konnten nicht aufgefunden werden.

Tab. II zeigt außerdem die Hauptsubstrate der Schweineleberesterase als einer typischen unspezifischen Esterase.

- [1] B. Schöbel u. W. Pollmann, Z. Naturforsch. **35 c**, 209–212 (1980).
- [2] W. N. Aldridge u. E. Reiner, Enzyme Inhibitors as Substrates, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1972.
- [3] K. B. Augustinsson, Nature **181**, 1786–1789 (1958).
- [4] F. Bergmann, R. Segal u. S. Rimon, Biochem. J. **67**, 481–486 (1957).
- [5] F. Bergmann u. S. Rimon, Biochem. J. **77**, 209 (1960).

- [6] P. Boyer, The Enzymes, Vol. V, 3rd. ed., Academic Press, New York, London 1971.
- [7] A. J. Ooms, J. Breebaart-Hansen u. B. Ceulen, Biochem. Pharmacol. **15**, 17–30 (1966).
- [8] E. J. Beckhorn, M. D. Labbee u. L. A. Underkofler, Agricult. Food Chemistry **13**/1, 30 (1965).
- [9] R. Richterich, Klin. Chemie, S. Karger, Basel, München 1971.
- [10] M. Dixon u. E. C. Webb, Enzymes, Academic Press, New York 1979.