

Weitere Charakterisierung einer Chlorogensäure-Hydrolase aus *Aspergillus niger*

Further Characterization of a Chlorogenic Acid Hydrolase from *Aspergillus niger*

B. Schöbel und W. Pollmann

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

Z. Naturforsch. 35 c, 699–701 (1980); eingegangen am 12. Mai/20. Juni 1980

Chlorogenic Acid Hydrolase, *Aspergillus niger*, Polyacrylamid Gelelectrophoresis, Amino Acid Analysis, Substrate Specificity

In addition to our previous paper [1] further characteristics of the chlorogenic acid hydrolase are described. Polyacrylamid gelelectrophoresis revealed only one band for the purified enzyme. Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamid gelelectrophoresis showed a molecular weight of 60000, demonstrating four subunits of the enzyme (total molecular weight 240000). The enzyme is stable in a pH-range of 3.0–8.5 and up to a temperature of 55 °C. The temperature coefficient Q_{10} is 1.5, the activation energy E_A is 6.0 kcal/mol. The amino acid analysis and substrate specificity data are given in tables. Essential for the enzyme activity is the C=C double bound neighbouring the ester linkage. The enzyme crystallizes in prisms.

Einleitung

Chlorogensäure, ein Depsid aus Kaffeesäure und Chinasäure, ist im Pflanzenbereich weit verbreitet und verfügt über zahlreiche biologische Wirkungen [2–8]. Es ist daher von Interesse, über den enzymatischen Abbau dieses Depsids Näheres zu wissen.

Wie in einer früheren Publikation beschrieben [1], konnte erstmals eine Chlorogensäure-Hydrolase isoliert und weitgehend charakterisiert werden. In der vorliegenden Arbeit werden weitere Daten des Enzyms angegeben.

Material und Methoden

Die Gewinnung des Ausgangsmaterials erfolgte wie in Ref. [1, 9] beschrieben.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde in einem 5-prozentigen Gel [10] bei 90 V und 150 mA über einen Zeitraum von 3–5 Stunden durchgeführt. Zur Anfärbung der Proteinbanden diente eine 0,5% Amidoschwarzlösung in 7-prozentiger Essigsäure. Die Bestimmung der Protein-Untereinheiten erfolgte nach Zusatz von 2% SDS und Mercaptoäthanol. Als Eichproteine dienten Ribonuclease, Rinderserumalbumin und Katalase.

Für die Aminosäureanalyse wurden 1,8 mg Enzym pro ml mit 6 N Salzsäure 22 Stunden bei 110 °C

hydrolysiert. Die Bestimmung erfolgte mit 200 µl im Aminosäureanalysator (Biotronik System LC 6000 E).

Ergebnisse

Das Mikrodensitogramm der PAGE zeigt (Abb. 1) einen einheitlichen Peak für das gereinigte Enzym. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ergab ebenfalls eine einheitliche Bande mit einer relativen Molekulmasse von etwa 60000. Daraus folgt, daß die Chlorogensäure-Hydrolase aus vier Untereinheiten besteht, da die relative Molekulmasse des intakten Enzyms 240000 beträgt [1].

Die pH-Stabilität der Chlorogensäure-Hydrolase wurde über einen pH-Bereich von 3–11 bei 45 °C untersucht. Die Inkubationsdauer betrug jeweils 10 min. Die pH-Stabilität des Enzyms ist bei pH 7,0 am größten. Bei pH 3,0 waren noch 80% der Aktivität vorhanden. Weniger stabil verhielt sich das Enzym bei pH 9,0 (65% Restaktivität), bei pH 11,0 waren nur noch 15% nachweisbar.

Die Temperatur-Stabilität des Enzyms wurde bei 25 °, 45 °, 55 °, 65 ° bzw. 75 °C bei pH 6,5 über 10 min untersucht. Die anschließende Messung der Enzymaktivität erfolgte wiederum bei 45 °C nach Zugabe des Substrates.

Wie Abb. 2 zeigt, tritt eine Inaktivierung der Chlorogensäure-Hydrolase erst bei Temperaturen über 55 °C auf. Bei 65 °C sind noch 15% Aktivität vorhanden, bei 75 °C ist die Aktivität praktisch null. Zur Bestimmung der zeitlichen Inaktivierung wur-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Pollmann.
0341-0382/80/0900-0699 \$ 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 digitized 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.

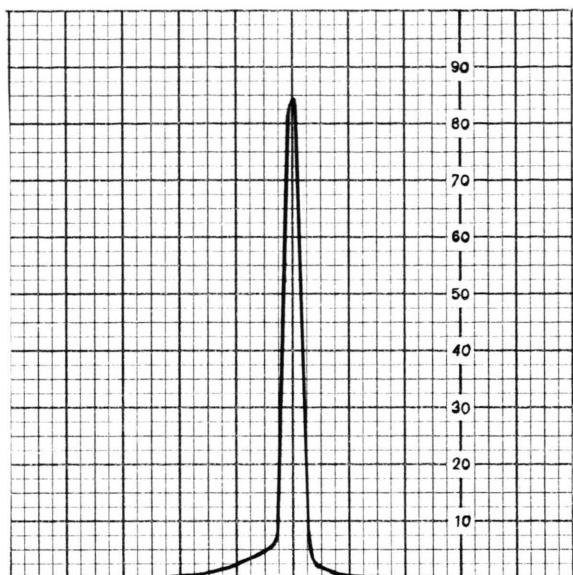


Abb. 1. Chlorogenase-Peak nach Polyacrylamidgelektrophorese.

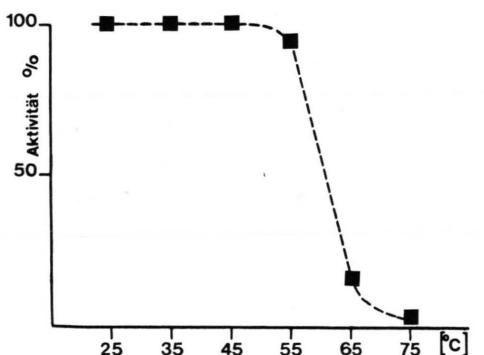


Abb. 2. Temperatur-Stabilität der Chlorogenase.

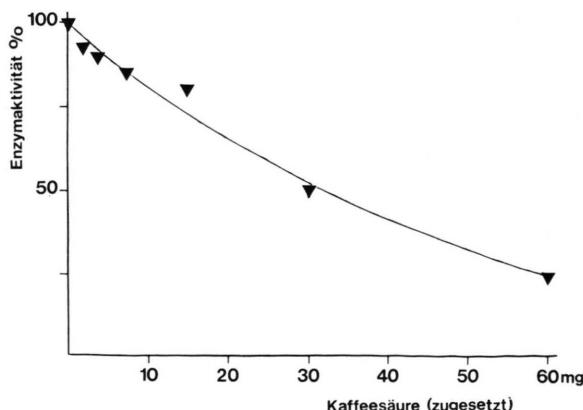


Abb. 3. Hemmung der Chlorogenase-Aktivität durch das Reaktionsprodukt Kaffeesäure.

den Enzymlösungen bei pH 6,5 und 45 °C inkubiert. Die einzelnen Zeitwerte wurden eingefroren und am Ende des Versuches gemeinsam mit Substrat (Chlorogensäure) auf Aktivität geprüft. Wie der Aktivitätsverlauf zeigt, nimmt die enzymatische Wirkung langsam exponentiell mit einer Halbwertszeit von ca. 7 Stunden ab.

Untersuchungen zur Enzymkinetik ergeben einen Temperaturkoeffizienten Q_{10} von 1,5 im Temperaturbereich von 5–40 °C. Dieser Wert liegt damit in dem für Enzymreaktionen üblichen Bereich von 1,4–2,0 [11]. Die Aktivierungsenergie errechnet sich nach folgender Formel:

$$E_A = \frac{4,575 \cdot T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{k_2}{k_1} \text{ [cal/mol].}$$

Durch Einsetzen verschiedener Temperaturpaare ergibt sich ein mittlerer E_A -Wert von 6,0 kcal/mol.

Hemmversuche mit Physostigmin ergaben im Gegensatz zu DFP [1] keine Wirkung. Dagegen konnte eine deutliche Produkthemmung durch Kaffeesäure beobachtet werden (Abb. 3). Eine Substrathemmung liegt nicht vor.

Die Aminosäureanalyse der Chlorogensäure-Hydrolase ist in Tab. I dargestellt. Es fällt auf, daß besonders die sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure stark vertreten sind. Dieser Befund stimmt mit dem früher beschriebenen [1] isoelektrischen Punkt von 4,0–4,5 überein.

Tab. I. Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse.

Aminosäure	Zahl der AS pro Enzymmolekül
Phosphoserin	NN
Asparaginsäure	131
Hydroxyprolin	NN
Threonin	82
Serin	95
Glutaminsäure	89
Prolin	63
Glycin	97
Alanin	82
Valin	55
Methionin	NA
Cystathionin	NN
Isoleucin	36
Leucin	81
Tyrosin	56
Phenylalanin	45
β-Alanin	NN
Lysin	31
Histidin	17
Arginin	32
Tryptophan	40
	1032

NN = nicht nachweisbar

NA = nicht auswertbar, da Peak überlagert.

Bei Zugrundelegung einer relativen Molekülmasse M_r von 115 pro Aminosäurerest ergibt sich bei 1032 Aminosäuren für den Proteinanteil des Enzyms ein M_r von ca. 120 000. Bei einer relativen Gesamt molekülmasse von 240 000 für das intakte Enzym ($4 \times 60\,000$) beträgt der Proteinanteil somit etwa 50%; der Rest entfällt auf gebundene Polysaccharide.

Weitere Untersuchungen zur Substratspezifität der Chlorogensäure-Hydrolase ergaben, daß neben der Chlorogensäure in geringerem Umfange 3,5-Di-O-Caffeychinasäure (ein Teil der „Iso“-Chlorogensäure) sowie Zimtsäureäthylester gespalten werden (Tab. II).

Demnach ist – wie auch von anderen Esterasen bekannt – der Alkoholteil des Esters für die Enzymspezifität weniger entscheidend als der Säurerest. Die – wenn auch geringere – Spaltbarkeit des Zimtsäureesters zeigt, daß für die Spezifität der Chlorogensäure-Hydrolase die 3,4-Dihydroxy-Gruppierung der Kaffeesäure nicht unbedingt erforderlich ist. Da Substrate wie Mandelsäureester oder Hydroxy-Mandelsäureester nicht hydrolysiert werden, ist für das Erkennen durch das Enzym eine zur Esterbindung benachbarte C=C-Doppelbindung im Substrat erforderlich.

Damit unterscheidet sich die Chlorogensäure-Hydrolase (EC 3.1.1.x) deutlich von anderen Esterasen wie Tannase (EC 3.1.1.20) [12, 13], Orsellinat-Depsid-Hydrolase (EC 3.1.1.40) [14], Acetylesterase (EC 3.1.1.16) [15, 16] und Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) [17].

Tab. II. Untersuchungen zur Substratspezifität der Chlorogensäure-Hydrolase (EC 3.1.1.x), Tannase (EC 3.1.1.20) und Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) aus Schweineleber

Substrat	Chlorogen- säure- Hydrolase	Tannase	Schweine- leber- Esterase
Aesculetin	—	—	—
Buttersäuremethyl- ester	—	—	++++
Buttersäureäthyl- ester	—	—	++++
Buttersäure-naphthyl- 1-ester	—	—	++
Chlorogensäure	+++	—	—
„iso-Chlorogensäure“	+	—	—
Ellagsäure	—	—	—
Essigsäure-glycerin- triester	—	—	++++
Essigsäure-naphthyl- 1-ester	—	—	+++
Essigsäure-naphthyl- 2-ester	—	—	(+)
Evernsäure	—	—	—
Gallussäuremethyl- ester	—	+++	—
(+)-Lichesterinsäure	—	—	—
(-)-Lichesterinsäure	—	—	—
Mandelsäureäthylester	—	—	++++
p-OH-Mandelsäure- äthylester	—	—	(+)
Scopoletin	—	—	—
Sonnenblumenöl	—	—	—
Tannin	—	++++	—
Umbelliferon	—	—	—
Zimtsäureäthylester	+	—	++++

- [1] B. Schöbel u. W. Pollmann, *Z. Naturforsch.* **35 c**, 209–212 (1980).
- [2] K. Herrmann, Fortschritte in der Chemie organischer Naturstoffe, Bd. **35**, 73–132, Springer Verlag, Wien, New York 1978.
- [3] E. Jurics, *Ernährungsforschung* **12/3**, 427–433 (1967).
- [4] E. Sondheimer, *Arch. Biochem. Biophysics* **74**, 131–138 (1958).
- [5] G. Czok u. K. Lang, *Arzneimittelforschung* **11**, 448–450 (1961).
- [6] G. Czok, Suppl. 5 zur *Z. Ernährungswiss.* (1966).
- [7] G. Czok u. K. Lang, *Arzneimittelforschung* **11**, 545–549 (1961).
- [8] G. Czok, W. Midani u. R. J. Finke, Suppl. 14 zur *Z. Ernährungswiss.* 68–77 (1972).
- [9] E. J. Beckhorn, M. D. Labbee u. L. A. Underkofler, *Agric. Food Chem.* **13/1**, 30 (1965).
- [10] H. R. Maurer, *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamidegel Electrophoresis*, de Gruyter, Berlin 1971.
- [11] H. M. Rauen, *Biochem. Taschenbuch* **2**, Springer Berlin 1964.
- [12] K. Aoki, R. Shinke u. H. Nishira, *Agric. Biol. Chem.* **40/1**, 79–85 (1976).
- [13] K. Aoki, R. Shinke u. H. Nishira, *Agric. Biol. Chem.* **40/2**, 297–302 (1976).
- [14] J. Schultz u. K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.* **22**, 153–157 (1971).
- [15] A. J. Ooms, J. Breebaart-Hansen u. B. Ceulen, *Biochem. Pharmacol.* **15**, 17–30 (1966).
- [16] B. Schöbel u. W. Pollmann, *Z. Naturforsch.* **35 c**, ## (1980).
- [17] K. Krisch, *The Enzymes*, Vol. **V**, 43–69, (P. Boyer, 3rd ed.), Academic Press, New York, London 1971.