



Doctoral Thesis

The physical properties and chemical applications of penicillin acylase and myrosinase

Author(s):

Pessina, Antonio

Publication Date:

1990

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000592532> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 9130

**THE PHYSICAL PROPERTIES AND CHEMICAL APPLICATIONS
OF
PENICILLIN ACYLASE AND MYROSINASE**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences



presented by
ANTONIO PESSINA
Dipl. Chem. ETH
born the 31 August 1962
citizen of Ligornetto (TI)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. P.L. Luisi, examiner
Prof. Dr. J.R. Bourne, co-examiner

Zurich 1990



CatE

ETHICS ETH-BIB



00100003243154

Abstract

In the first part of the present dissertation the enzymatic amide bond synthesis with the enzyme penicillin acylase was studied.

Penicillin acylase is able to synthesize amide bonds e.g. through the coupling of phenyl acetic acid and a dipeptide. This is not the natural reaction catalyzed by penicillin acylase, in fact the natural reaction involves the hydrolysis of the side chain of the penicillin molecule. This study illustrates again a case in which an enzyme specificity can be extended to a larger family of compounds having a functional similarity with the original (natural) substrate.

The specificity both on the side of the acyl component and on the side of the amino component was studied. It was found that in the first case the specificity is very high and almost only phenyl acetic acid can be used as substrate. Some analogs of phenyl acetic acid as well as trans-3-hexenoic acid are also substrates, whereas phenylglycine or phenylalanine, which have some structural similarity with phenyl acetic acid, give no reaction. On the side of the amino component the specificity is rather low, i.e. amino acids esters (but not amino acids with the free carboxyl group), some dipeptides and tripeptides can act as substrates. It is interesting to notice that the first amino acid residue (X) of a dipeptide of the type X-Y is fairly important. In fact dipeptides with small residues (X) such as glycyl, seryl, alanyl are substrates, whereas dipeptides with bulky residues, e.g. thyrosyl or methionyl are not substrates. On the contrary bulky amino acid esters like Tyr-OEt or Met-OEt are substrates. All dipeptides of type Gly-X can act as substrates, the second amino acid residue (Y) of this type of dipeptides has an influence only on the yield.

For synthesis carried out in aqueous buffer using phenylacetic acid as acyl component the yields of the enzymatic coupling varied from about 10% for Ser-OMe or GlyAsp, to about 25% for GlyLeu or SerTyr, or to about 70% for Met-OEt. Penicillin acylase can catalyze also the coupling of phenylacetic acid with D-amino acid and dipeptides containing D-amino acids (L-X-D-Y type). The yields of these reactions are lower when compared to those with L-amino acids or with dipeptides containing only L-amino acids. The lower yields are presumably due to the enzyme catalytic activity, which is affected by the configuration at the C(α)

of the concerned amino acid.

In the second part of the dissertation the enzyme myrosinase, a glycoprotein present in the mustard seeds (*Sinapis alba* L.), was purified and characterized. In nature myrosinase is the enzyme responsible for the hydrolysis of the glucosinolates. Their hydrolysis produces a variety of products such as thiocyanates, isothiocyanates, nitriles, oxazolidine-2-thiones, amines etc. depending on the hydrolysis conditions.

The first step of the purification consisted of an affinity chromatography on a Concanavalin A column. This step was followed by a gel filtration and subsequently by chromatofocusing in the pH range 5 to 7. After chromatofocusing the activity of myrosinase increased up to $70 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ and the purity increased by a factor 80 to 115. The enzyme was pure as judged by native and SDS gel electrophoresis as well as by analytical ultracentrifugation. However the pure enzyme presented a microheterogeneity when analyzed by isoelectric focusing; the IEF-gels revealed the presence of 3-4 isoenzymes in the pI region 5.05-5.15. This is not surprising because glycoproteins often present charge paucidispersity due to small variation in the sugar content. Myrosinase purified by this method was physically characterized.

The extinction $E^{1\%}(280\text{nm},1\text{cm})$ was found to be 14.5 and the isopotential partial specific volume was $0.714 \times 10^{-3} \text{ m}^3\cdot\text{kg}^{-1}$, a rather low value for globular proteins but typical for glycoproteins. The molecular weight of the enzyme in the native conformation is 135100 Dalton and in the unfolded conformation the enzyme is divided in two, very similar if not identical, subunits of molecular weight 71700 Dalton. CD spectroscopy indicates that myrosinase is denaturated by guanidinium chloride with a midpoint between the folded and the unfolded conformation between 2.5 and 4M. Below a guanidinium chloride concentration of about 2M myrosinase is not appreciably denaturated, above 5M it is completely and irreversibly denaturated. The analysis of the CD data indicate that myrosinase contains about 19% of α -helix and 35% β -sheet, the rest of the structure being conformationally aperiodic.

The last chapter shows the application of AOT/isooctane microemulsion for the simultaneous extraction of oil and glucosinolates from oilrape seeds. The extraction of oil is possible at $w_o \geq 0$ ($w_o = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{Surfactant}]$, molar ratio), whereas the extraction of the glucosinolates is complete only at $w_o=25$ or 30.

Kurzfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurde die durch Penicillin Acylase katalysierte enzymatische Amidbindungssynthese untersucht.

Penicillin Acylase ist ein Enzym, das Amidbindungen verknüpfen kann, z.B. die Amidbindung zwischen Phenylelessigsäure und einem Dipeptid. Diese Reaktion ist jedoch nicht die natürliche Reaktion. In der Natur katalysiert das Enzym die Hydrolyse der Amidbindung in der Seitenkette von Penicillin.

Die Spezifität der Reaktion wurde sowohl auf der Seite der Acylkomponente, als auch auf der Seite der Aminokomponente untersucht. Man hat dabei beobachtet, dass im ersten Fall die Spezifität hoch ist und dass fast ausschliesslich Phenylelessigsäure als Substrat eingesetzt werden kann. Lediglich einige Phenylelessigsäurederivate und auch trans-3-Hexensäure sind Substrate von Penicillin Acylase; Phenylglycin und Phenylalanin dagegen, die einige strukturelle Ähnlichkeiten zu Phenylelessigsäure haben, werden nicht als Substrate akzeptiert. Auf der Seite der Aminokomponente ist die Spezifität ziemlich gering, da sowohl Aminosäureester (aber nicht Aminosäuren mit der freien Carboxylgruppe), als auch einige Dipeptide und Tripeptide als Substrate wirken können. Interessant ist es jedoch zu bemerken, dass der erste Aminosäurerest (x) eines Dipeptides (X-Y) ziemlich wichtig ist: Dipeptide mit kleinem Rest (wie Gly-Y, Ser-Y oder Ala-Y) sind Substrate, während Dipeptide mit grossem Rest (wie z.B. Tyr-Y oder Met-Y) sind nicht Substrate; Tyr-OEt oder Met-OEt sind dagegen Substrate. Im Falle der Gly-Y-Dipeptide hat der zweite Aminosäurerest (Y) lediglich einen Einfluss auf die Ausbeute.

Die Ausbeuten der Synthesen in wässrigem Puffer unter Verwendung von Phenylelessigsäure als Acylkomponente variieren zwischen ca. 10% im Falle von Ser-OMe oder GlyAsp, ca. 25% im Falle von GlyLeu oder SerTyr, und ca. 70% im Falle von Met-OEt. Penicillin Acylase kann auch die Kopplung zwischen Phenylelessigsäure und D-Aminosäuren oder Dipeptiden, welche D-Aminosäuren enthalten (L-X-D-Y-Typ), katalysieren. Die Ausbeuten dieser Reaktionen sind jedoch geringer, als die Ausbeuten mit L-Aminosäuren oder Dipeptiden, die nur

L-Aminosäuren enthalten. Die geringere Ausbeute ist sehr wahrscheinlich durch die katalytische Aktivität des Enzyms, die durch die Konfiguration des C(α)-Zentrums des Substrates beeinflusst wird, verursacht.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde das Enzym Myrosinase, ein Glykoprotein aus Senfsamen (*Sinapis alba L.*), gereinigt und physikalisch charakterisiert.

In der Natur ist Myrosinase für die Hydrolyse der Glucosinolate unter Bildung einer grossen Menge verschiedener Produkte wie z.B. Isothiocyanate, Cyanate, Nitrile, Amine, Oxazolidin-2-Thione usw. verantwortlich.

Der erste Schritt der Reinigung war eine Concanavalin A Affinitätschromatographie. Danach wurden eine Gelfiltration und anschliessend eine Chromatofokussierung im pH-Bereich 5-7 durchgeführt. Die Aktivität von Myrosinase stieg nach der Chromatofokussierung von anfänglich 0.6-0.8 U·mg⁻¹ auf 70 U·mg⁻¹ und der Reinheitsfaktor stieg um 80 bis 115.

SDS-Gelelektrophorese und analytische Ultrazentrifugation zeigten, dass das Enzym bezüglich molekularer Masse einheitlich war. Analytische Isoelektrofokussierung (IEF) deutete jedoch auf eine leichte Mikroheterogenität hin; auf IEF-Gelen konnte man 3-4 Isoenzyme im pI-Bereich 5.05-5.15 nachweisen. Das ist aber bei Glykoproteinen oft der Fall, da sie häufig eine Paucidispersität, durch kleine Änderungen im Zuckergehalt, aufweisen.

Der $E^{1\%}(280\text{nm},1\text{cm})$ Wert wurde zu 14.5 ermittelt und das isopotentielle Partialvolumen zu $0.714 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$, ein Wert, der für globuläre Proteine ausserordentlich tief ist, aber typisch ist für Glykoproteine. Das Molekulargewicht des Enzyms ist in der nativen Konformation 135100 Dalton. In der ungefalteten Konformation besteht Myrosinase aus zwei Untereinheiten, welche sehr ähnlich, oder sogar identisch sind. Das Molekulargewicht der Untereinheiten beträgt 71700 Dalton.

Das Enzym ist in Lösung sehr stabil. Die CD-Spektroskopie zeigte, dass Myrosinase in Anwesenheit von Guanidin-hydrochlorid denaturiert wird. Der Übergang zwischen der gefalteten und der ungefalteten Konformation liegt bei einer Guanidin-hydrochlorid Konzentration von 2.5-4M. Unter 2M ist Myrosinase nicht merkbar denaturiert, über 5M ist das Enzym vollständig denaturiert. Durch Analyse der CD-Spektren konnte man feststellen, dass Myrosinase aus ca. 19%

α -Helix und 35% β -Faltblatt besteht. Der Rest liegt in einer aperiodischen Konformation vor.

Im letzten Kapitel wurden AOT/Isooktan Mikroemulsionen für die gleichzeitige Extraktion von Öl und Glucosinolaten aus Rapssamen verwendet. Die Öl-extraktion war möglich bei $w_o \geq 0$ ($w_o = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{Tensid}]$), die Extraktion der Glucosinolate war nur bei $w_o=25$ oder 30 vollständig.