

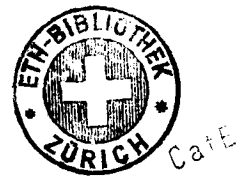
Diss. ETH Nr. 10660

**Enzymkinetische Untersuchungen zum  
Abbauverhalten einer gereinigten  
Endo-Polygalacturonase von *Aspergillus niger***

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von  
MANUEL ELGORRIAGA KUNZE  
dipl. Lm.-Ing. ETH  
geboren am 29. März 1960  
von Hondarribia (Spanischer Staat)

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. R. Amadò, Referent  
Prof. Dr. A. Fiechter, Korreferent



Zürich 1994

## Zusammenfassung

Es wurde eine Endo-Polygalacturonase (EC-Nr. 3.2.1.15) aus einem Ultrafiltrationskonzentrat von *Aspergillus niger* mittels Affinitätschromatographie an vernetztem Alginat, Anionenauschromatographie, Chromatofokussierung und Gelfiltration gereinigt. Der relativ geringen Ausbeute von 4.4 % stand eine hohe Reinheit des Enzyms gegenüber, die sich in einer spezifischen Aktivität von 3660 IU/mg Protein äusserte. Die gereinigte Endo-PG besass ein Molekulargewicht von 41'000 und ein  $pI$  von 5.6. Ihr pH-Optimum lag bei pH 4.5, das Temperatur-Optimum bei 53.5°C. Für Polygalacturonsäure betrug die Aktivierungsenergie 44.4 kJ/mol und die Michaelis-Konstante 0.61 mg/ml. Das Enzym war stabil in einem leicht sauren bis neutralem pH-Bereich von pH 3.0 bis 7.4, jedoch hitzelabil, die Hitzeinaktivierung begann schon bei 40°C.

Oligogalacturonide mit Polymerisationsgrad 2 bis 7 wurden durch enzymatische Hydrolyse von Polygalacturonsäure hergestellt und mittels Anionenauschromatographie und Gelfiltration gereinigt. Der Abbau dieser Oligomeren durch die gereinigte Endo-PG wurden mit HPAEC-PAD quantitativ verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass Digalacturonsäure nicht, Trigalacturonsäure äusserst langsam zu Mono- und Dimeren und Tetragalacturonsäure langsam und nur zu Mono- und Trimeren abgebaut werden. Die Endprodukte aller höheren oligomeren Substrate sowie von Polygalacturonsäure waren in jedem Fall Mono-, Di- und Trigalacturonsäure im Verhältnis 1 : 0.5 : 1. Die Analyse der Produktbildungsfrequenzen von Oligomeren zeigte eine deutliche Bevorzugung der Spaltung bestimmter glycosidischer Bindungen. Endständige Bindungen wurden mit zunehmender Kettenlänge schwieriger hydrolysiert. Alle untersuchten Oligomeren wurden nach dem *preferred attack* Mechanismus angegriffen und gespalten.

Der Abbauverlauf von Polygalacturonsäure konnte mit einem einfachen Modell, das auf der Michaelis-Menten-Kinetik basiert und die Oligomeren mit DP 1 bis 4 einzeln berücksichtigt, gut beschrieben werden. Unabhängig davon wurde erstmals ein quantitatives *subsite*-Modell des aktiven Zentrums einer Endo-PG formuliert. Es umfasst sieben Substratbindungsstellen, mit der katalytischen Stelle zwischen dem vierten und fünften *subsite*. Die numerisch optimierten freien Standardenthalpien der einzelnen *subsites* ermöglichten die Simulation des Abbauverlaufs eines Oligogalacturonidgemisches und ergaben eine gute Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Produktbildungsfrequenzen.

## Summary

An endo-polygalacturonase (EC.-Nr. 3.2.1.15) was purified from an ultrafiltration concentrate from *Aspergillus niger* by affinity chromatography on crosslinked alginate, anion exchange chromatography, chromatofocusing and gel filtration. The small yield of 4.4 % of the total activity was compensated by a high final purity, which led to a specific activity of 3660 IU/mg protein. The purified endo-polygalacturonase showed a molecular weight of 41'000 and an isoelectric point of 5.6. The pH optimum was 4.5 and the temperature optimum 53.5°C. The activation energy for polygalacturonic acid was 44.4 kJ/mol and the Micaelis constant 0.61 mg/ml. The enzyme was stable in the pH-range from 3.0 to 7.4, but not heat resistant, the heat inactivation began already at 40°C.

Oligogalacturonides with DP 2 to 7 were produced by enzymatic hydrolysis of polygalacturonic acid and purified by anion exchange chromatography and gel filtration. The degradation of these oligogalacturonides by the purified endo-PG was monitored and quantified by HPAEC-PAD. It has been demonstrated that the digalacturonic acid is not degraded, trigalacturonic acid very slowly to the mono- and dimer, and tetragalacturonic acid slowly and only to the mono- and trimer. The final products of the higher oligogalacturonides and of polygalacturonic acid hydrolysis are always the mono-, di- and trimer with a ratio of 1 : 0.5 : 1. Analysis of the product formation frequencies showed a clear preference of selected glycosidic bonds. Terminally located bonds were hydrolyzed with more difficulty with increasing chain length of the substrate. All examined oligomers were cleaved by the preferred attack mechanism.

The time course of polygalacturonic acid degradation was successfully described with a simple model based on Michaelis-Menten kinetics and taking into account the oligomers from DP 1 to 4. Independently from this and for the first time a quantitative subsite model of the active site of an endo-PG was formulated. It covers seven binding subsites, with the catalytic site located between the fourth and fifth subsite. The numerically optimized free standard enthalpies of the subsites made it possible to simulate satisfactorily the course of the degradation of an oligogalacturonide mixture and to achieve a good agreement with the experimentally determined product formation frequencies.