ETH zürich

ETH Library

Isolierung von EXO-α-L-Arabinofuranosidasen, ENDO-β-(1,4)-Xylanasen und Polygalacturonasen aus Handelspräparaten mittels Affinitätschromatographie

Doctoral Thesis

Author(s):
Waibel, Robert

Publication date:
1981

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000257367

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 Nr. 6940

ISOLIERUNG VON EXO-α-L-ARABINOFURANOSIDASEN, ENDO-β-(1,4)-XYLANASEN UND POLYGALACTURONASEN AUS HANDELSPRÄPARATEN MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines DOKTORS DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

ROBERT WAIBEL
dipl.Chem. ETH
geboren am 30. Dezember 1946
von Winterthur/ZH und Böckten/BL

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Neukom, Referent
Prof. Dr. J. Solms, Korreferent

1981

4. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Substratsaffinitätsträger zur Isolierung von Hemicellulasen und Polygalacturonasen des Handels entwickelt.

2. Zur Isolierung von α-L-Arabinofuranosidasen wurde ein ungeladener Polymerträger aus Araban, vernetzt mit Epichlorhydrin in Emulsion, synthetisiert.

3. Zur Isolierung von endo-ß-(1,4)-Xylanasen wurde ein ungeladener Polymerträger aus Xylan, vernetzt mit Epichlorhydrin in Emulsion, synthetisiert.

4. Zur Isolierung von Polygalacturonasen wurden 3 verschiedene Polymerträger aus Pectat, vernetzt mit Epichlorhydrin bzw. Divinylsulfon oder Bisoxiran in Emulsion, synthetisiert, die zum Teil noch Ionenaustauschcharakter aufwiesen.

5. Durch die Vernetzung der Polysaccharidträger in Emulsion in Kügelchenform wurden mechanisch stabile Gele mit guten Durchflusseigenschaften erhalten, die sich auch zur Benützung in grossen Affinitätssäulen eignen.

6. Es wurden die optimalen Parameter der Vernetzung der Gele in Emulsion und der affinitätschromatographischen Elutionen an diesen Gelen bestimmt.

7. Aus Aspergillus niger-Präparaten konnten 3 α-L-Arabinofuranosidasen mit MW 90'000, MW 62'000 und MW 32'000 - 36'000 abgetrennt werden. Nur das Enzym mit dem klein-

sten MW wurde an den Träger gebunden, während die beiden anderen Isoenzyme nicht gebunden wurden. Alle 3 α-L-Arabinofuranosidasen sind Glycoproteine, wobei für das Enzym mit MW 32'000-36'000, das frei von Fremdaktivitäten war, ein Zuckeranteil von 29% gefunden wurde. Dieses Enzym wurde an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert und auf Unterschiede im kinetischen Verhalten und im pH-Optimum gegenüber dem freien Enzym untersucht. Es zeigte sich, dass das sehr stabile immobilisierte Enzym das Substrat p-Nitrophenyl-α-L-Arabinofuranosid sehr rasch abbaute und ein pH-Optimum von 2,2-4,5 hatte. Das freie, reine Enzym hat ein relativ scharfes pH-Optimum bei pH 4.

8. Aus einem "Cellulase"-Produkt des Handels wurde an einem mittelstark vernetzten Xylanträger eine endo ß-(1,4)-Xylanase isoliert. Bei der Chromatographie des Handelsproduktes am Affinitätsträger spalteten sich die Xylanaseaktivitäten in einen bindenden und einen nichtbindenden Anteil. Die bindende Xylanase, die mit gelöstem Substrat vom Träger wieder eluiert wurde, war frei von Glycosidaseaktivitäten. Auch wurden keine Aktivitäten auf CMC und Stärke mehr gefunden.

9. Zur Abtrennung von Polygalacturonasen aus Handelspräparaten erwies sich der Träger aus Pectat, vernetzt mit Divinylsulfon, als am besten geeignet. Mit Hilfe dieses Trägers mit guten Durchflusseigenschaften wurden Polygalacturonasen isoliert, die frei von Glycosidaseaktivitäten waren.

SUMMARY

1. In the work described, various substrate affinity supports were prepared to isolate hemmicellulases and polygalacturonases from industrial sources.

2. A non-ionic polymer support of araban, cross-linked in an emulsion by epichlorhydrin, was synthesised, in order to isolate α-L-arabinofuranosidases.

3. A non-ionic polymer support of xylan, cross-linked in an emulsion by epichlorhydrin, was synthesised, in order to isolate endo-ß-(1,4)-xylanases.

4. Various polymer supports were made from pectate, in order to isolate polygalacturonases. These were cross-linked in an emulsion with either epichlorhydrin or divinylsulphone or bisoxirane. These supports showed some ion-exchange properties.

5. Through the cross-linking of polysaccharides in an emulsion, beads were formed which had good mechanical gel-stabilities, as well as good flow characteristics and are therefore suitable for large affinity columns.

6. Optimal conditions were determined for the cross-linking of gels in emulsion and the affinity-chromatographic elutions on these gels.

7. From Aspergillus niger preparations it was possibe to isolate 3 α-L-arabinofuranosidases with molecular weights of 90'000, 62'000 and 32'000-36'000. Only the

enzyme of lowest molecular weight was bound on the support whereas the other two iso-enzymes were not bound. All 3 α-L-arabinofuranosidases are glycoproteins. The enzyme with a molecular weight of 32'000-36'000 was found to give a sugar content of 29 per cent and was free of any contaminating activities. This enzyme has been compared to an enzyme immobilised on CNBr-activated Sepharose by means of differences in enzyme-kinetics and pH-optima. It was shown that the very stable immobilised enzyme broke down the substrate para-nitrophenyl-α-L-arabinofuranoside very rapidly and the optimum pH was between 2,2-4,5. The free, pure enzyme had a relatively sharp pH-optimum at pH 4.

8. An endo-ß-(1,4)-xylanase was isolated from a commercial "Cellulase" product using a intermediately cross-linked xylan support. The affinity chromatography separated the xylanase activity of the preparations into a bound and an unbound portion. The bound xylanase was eluted with soluble substrate and was found to be free from any contaminating glycosidase activities. It was also found to have no effect on carboxymethylcellulose and starch.

9. For the isolation of polygalacturonases from commercial preparations, the pectate support, cross-linked with divinylsulphone, was found to be the best. With the aid of this support having good flow characteristics, polygalacturonases which were free from glycosidase activities, were obtained.