

ÜBER DEN ENZYMATISCHEN CUTIN-ABBAU

V. MITTEILUNG: DIE LYSE VON PEROXYD-BRÜCKEN IM CUTIN DURCH EINE PEROXYDASE AUS *PENICILLIUM SPINULOSUM* THOM.

WOLFGANG HEINEN

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Nijmegen, Holland)

(received November 23rd, 1962)

ABSTRACT

An enzyme solution, obtained from crude extracts from *Penicillium spinulosum* at 20 % saturation with ammonium sulfate, contains besides fatty acid oxidizing enzymes a peroxidase. This enzyme shows up at low concentrations of the mixed enzymes, as well as after dialysis of the solution, whereby the fatty acid oxidizing enzymes are partly inactivated. This enzyme, which takes part in the destruction of linoleic and linolenic peroxide, catalyzes the release of oxygen from carboxy-cutin. The latter is formed by pretreatment of cutin by a crude extract from *P. spinulosum*, containing cutin-esterase. A scheme for the first steps during the breakdown of cutin is given.

Während der Untersuchung der am Cutin-Abbau beteiligten Fettsäure-Oxydationsenzyme hatten sich verschiedentlich Hinweise ergeben, die darauf schliessen liessen, dass Extrakte aus *Penicillium spinulosum* unter bestimmten Bedingungen die Freisetzung von O₂ aus Cutin katalysieren. Da auch die Arbeiten zur Biosynthese des Cutins die Annahme von Peroxydbrücken im Cutin nahelegten, zielten unsere weiteren Untersuchungen darauf ab, diese Frage zu klären. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass neben der Cutin-esterase eine andere Komponente an der Cutinolyse beteiligt ist, die unter Freisetzung von Sauerstoff die Peroxydbrücken des Cutins löst.

METHODIK

Die Bestimmung der Cutin-esterase und der manometrische Nachweis der Oxydasen und der Peroxydasen geschah nach den bisher verwendeten Methoden ohne wesentliche Änderungen (HEINEN u. VAN DEN BRAND 1961, HEINEN 1962).

ERGEBNISSE

Schon die ersten Untersuchungen zur Cutinolyse (HEINEN 1960) hatten gezeigt, dass in Anwesenheit der Cutin-esterase im Extrakt ein oxydativer Angriff des Cutins sowohl durch den Rohextrakt, als auch durch Ammonsulfatfällungen daraus, möglich ist. Weitere Bestimmungen ergaben (HEINEN 1963a), dass bei fraktionierter Ammonsulfatfällung die grössere Aktivität in der unteren Fraktion (20 % Sättigung) vorlag, die Fähigkeit zur Cutinoxydation in der folgenden Fällung (20-60 % Sättigung) dagegen geringer war. Unsere weiteren Bestimmungen zeigten jedoch, dass der Rückgang der Aktivität auf den geringen Gehalt der zweiten Fällung an Cutin-esterase zurück-

TABELLE 1

Relative Konzentration der Cutin-esterase, Peroxydase und der Fettsäure-Oxydase in verschiedenen Ammonsulfatfraktionen aus Extrakten von *Penicillium spinulosum*.

Ammonium-sulfat-konzentration	Cutin-esterase	Peroxydase	Fettsäure-oxydase
30%	++	(+)	+++
20%	++++	-	++++
0-20%	++	++	+ (+)
20-40%	(+)	-	+++
40-60%	+	+	+

zuführen ist (vgl. Tab. 1). Verwendet man bei beiden Fraktionen ($F_1 = 20\%$ Sättigung, $F_2 = 20-60\%$ Sättigung) als Substrat statt des frischen Cutins eine Cutinprobe, die zuvor mit dem Extrakt "R" 14 Stunden inkubiert wurde (= R-Cutin), so ergibt sich das Bild der Abb. 1: Die Aktivität der Oxydase in der zweiten Fraktion ist 4-5 mal so gross wie in der ersten Fällung. Nach der Bestimmung der

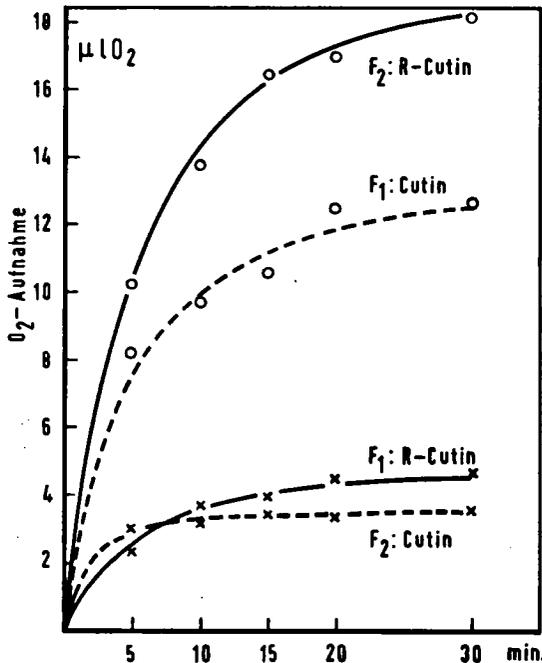


Abb. 1. Aktivität zweier verschiedener Ammonsulfatfraktionen aus *P. spinulosum*-Rohextrakt gegenüber nicht vorbehandeltem und mit Cutin-esterasehaltiger Lösung "R" präinkubiertem Cutin. Ansätze: 2.0 ml Enzymlösung in 0,1 m Phosphatpuffer, 0,5 mg Substrat, 0,5 ml 0,1 m Phosphatpuffer, End-pH 6,2; alle Ansätze bei 30° C unter Luft.

Cutin-esterase in beiden Enzymlösungen ergab sich für das unterschiedliche Verhalten gegenüber den beiden Substraten folgende Erklärung: Der Hauptteil der Oxydasen erscheint erst in der zweiten Fällung. Ihre Konzentration in der ersten Fraktion ist zwar geringer, die Cutin-esterase liefert jedoch genügend Substrat, um eine Oxydation zu ermöglichen. Bei der geringeren Aktivität der Cutin-esterase in der zweiten Fraktion werden dagegen nicht genügend Fettsäuren aus dem Cutin freigesetzt, so dass die Wirkung der Oxydasen nicht erkennbar wird. Verwendet man dagegen ein Cutin, das durch Präinkubation bereits genügend freie Fettsäuren enthält, so zeigt sich, dass die zweite Fraktion den grösseren Teil der Oxydasen enthält.

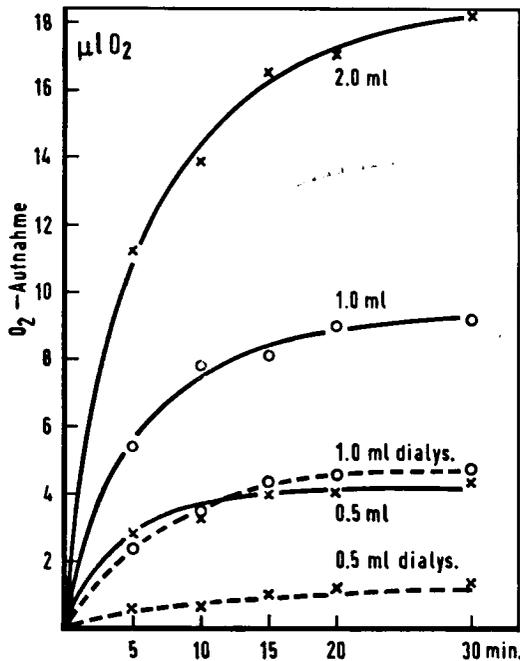


Abb. 2. Einfluss der Enzymkonzentration auf die R-Cutin-Oxydation bei Verwendung der zwischen 20 und 60 % erhaltenen Ammoniumsulfatfällung aus *P. spinulosum*-Extrakt (= F₂). Teil-Inaktivierung der Enzymlösung durch Dialyse.

Bei Versuchen zur Enzymkonzentration unter Verwendung verschiedener Mengen Enzymlösungen im Warburg-Ansatz, ergab sich für die Fraktion F₂ eine klare Abhängigkeit der Oxydationsintensität von der Enzymkonzentration (Abb. 2). Ganz anders verhielt sich dagegen die erste Fraktion: Bei Verminderung der Enzymkonzentration zeigte sich anfangs eine geringe Sauerstoffaufnahme, doch setzt bereits nach 10 min. eine stetige O₂-Abgabe ein. Die weitere Reduzierung der Enzymkonzentration hatte zur Folge, dass von Beginn an eine Abgabe von Sauerstoff aus dem Substrat (R-Cutin) stattfand

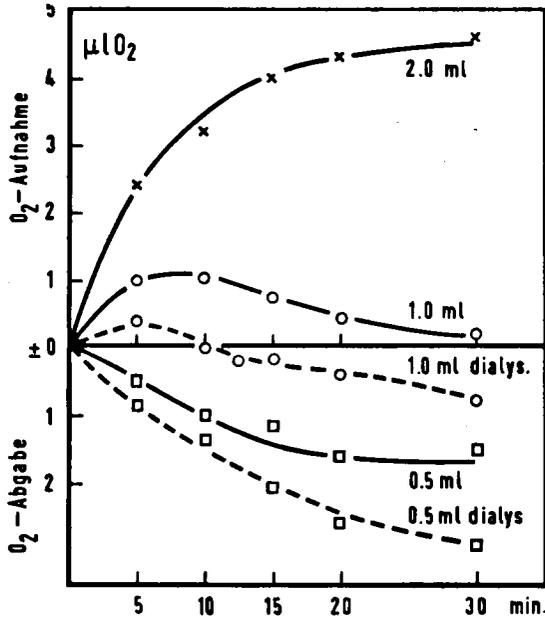


Abb. 3. Sauerstoff-Aufnahme und -Abgabe aus präinkubiertem Cutin in Abhängigkeit von der Konzentration der Enzymlösung F_1 (Ammoniumsulfatfraktion aus *P. spinulosum*-Extrakt, erhalten bei 20 %iger Sättigung). Verhalten der Oxydasen und der Peroxydase-Aktivität nach 5-stündiger Dialyse.

(Abb. 3). Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass nicht in der Fraktion F_2 , wohl aber in F_1 neben den Oxydasen ein anderes Enzym vorlag, das die gegenteilige Reaktion, nämlich die Freisetzung von Sauerstoff aus dem präinkubierten Cutin katalysiert. Diese Gegenreaktion wird bei relativ hohen Enzymkonzentrationen durch die Oxydasen-Aktivität verdeckt, erklärt jedoch, weshalb diese bei R-Cutin als Substrat niedriger liegt als in F_2 , in der die Freisetzung von O_2 nicht auftritt. Bei Verminderung der Enzymkonzentration erreichen die Oxydasen offenbar früher den Grenzwert, wodurch die Wirkung der Peroxydase sichtbar wird.

Da sich bereits in früheren Versuchen ergeben hatte, dass die Aktivität der Oxydasen durch Dialyse weitgehend verringert wird (HEINEN 1960), wurden zu den weiteren Bestimmungen beide Enzymlösungen vor ihrer Verwendung 5 Stunden gegen dest. Wasser dialysiert. Bei Verwendung dieser Lösungen mit präinkubiertem Cutin als Substrat ergab sich für F_2 der erwartete Abfall der Aktivität (Abb. 2). Bei der F_1 -Fraktion wurde dagegen durch die Teil-Inaktivierung der Oxydasen die O_2 -freisetzende Reaktion deutlicher erkennbar (Abb. 3). Am deutlichsten wird die Peroxydase-Reaktion bei der niedrigsten Enzymkonzentration, bei der die O_2 -Abgabe nach der Dialyse fast verdoppelt ist. Versuche zur vollständigen Trennung der beiden Reaktionen durch längere Dialyse brachten keine befriedigenden

Ergebnisse. Zwar können die Oxydasen fast restlos inaktiviert werden. Doch tritt dabei auch eine Schädigung der Peroxydase ein, deren Aktivität nach längerer Dialyse ebenfalls abnimmt.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal für die beteiligten Enzyme ergab sich jedoch bei der Bestimmung der pH-Aktivität: Während die Oxydasen (zur Substratspezifität vgl. HEINEN 1963 a) ein ausgeprägtes Optimum bei pH 6.0–6.5 haben, ist die Aktivität der Peroxydase im Bereich von pH 5.2–8.0 fast konstant, fällt dann jedoch sowohl zur sauren als auch zur alkalischen Seite hin sehr rasch ab (Abb. 4). Der Versuch, die Peroxydase durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von den Oxydasen und der Cutin-esterase zu trennen,

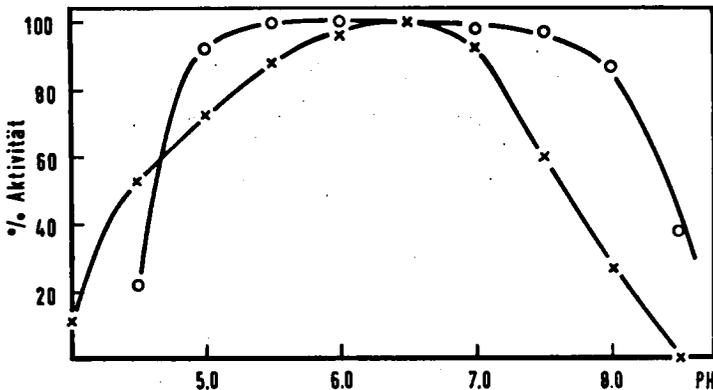


Abb. 4. pH-Aktivität der Oxydasen und der Peroxydase der Fraktion F₁.

verlief unbefriedigend. Peroxydase-Aktivität konnte — wie schon bei der Cutin-esterase — über einen weiteren Bereich festgestellt werden (Tab. 1). Zur Klärung der Frage, ob es sich bei dem vorliegenden Enzym um eine Peroxydase handelt, wurden Versuche zur Substratspezifität angesetzt. Als Substrate dienten, neben den präinkubierten Cutin (R-Cutin), Öl-, Linol- und Linolensäure, sowie die Peroxyde der Linol- und Linolensäure, die durch lipoxydatische Oxydation und anschließende Isolierung (MAIER u. TAPPEL 1959) erhalten wurden. Als Enzymlösung wurde die F₁-Fraktion nach 6-stündiger Dialyse verwendet. Die Konzentration wurde so niedrig gehalten (0,8 ml pro Ansatz, vgl. Abb. 3), dass die geringe Restaktivität der Oxydasen ausgeschaltet war. Die Versuche ergaben, dass die drei Fettsäuren nicht angegriffen werden (Abb. 5). Wohl aber wird aus dem präinkubierten Cutin Sauerstoff freigesetzt. Die Aktivität gegenüber der Peroxyden der Linol- und Linolensäure ist im Vergleich zum Cutin bedeutend höher, so dass diese Verbindungen offenbar die natürlichen Substrate des Enzyms darstellen. Zur Sicherstellung, dass es sich bei den beobachteten Effekten um enzymatisch katalysierte Prozesse handelt, liefen Ansätze mit Enzymlösungen mit, die zuvor 2 min. auf 95° erhitzt worden waren. Mit keinem der hier verwendeten Substrate konnte eine Aktivität festgestellt werden.

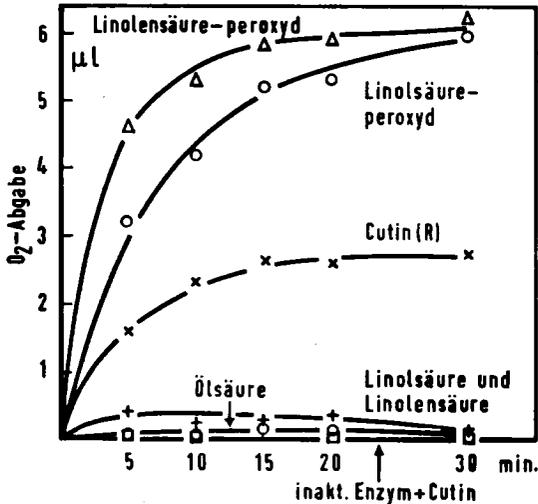
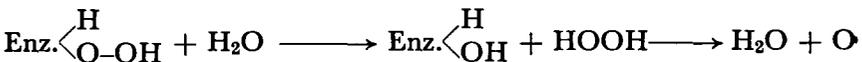
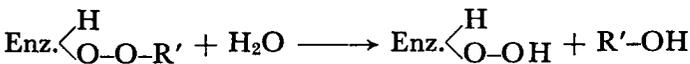
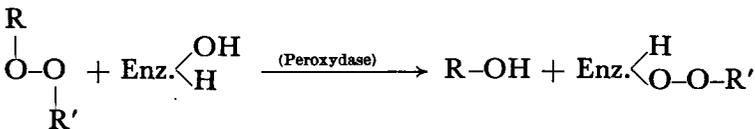
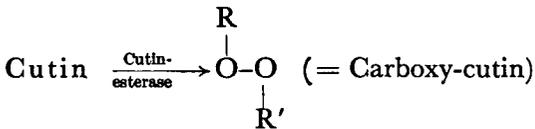


Abb. 5. Versuch zur Substratspezifität der Peroxydase unter Verwendung von Öl- Linol- und Linolensäure, Linol- und Linolensäure-peroxyd sowie präinkubiertem Cutin als Substrat. Enzymkonzentration 0,8 ml/Ansatz 3,0 ml. Versuchsbedingungen wie in Abb. 1.

Unsere Ergebnisse entsprechen den kürzlich mit Soja-Extrakten erhaltenen Befunden (BALLS, AXELROD u. KIES 1943, BLAIN u. BARR 1961), wonach unter gewissen Bedingungen nach lipoxydatischer Oxydation der Linolsäure eine Gegenreaktion einsetzt, die zur Zerstörung des gebildeten Linolsäureproxyds unter O_2 -Abgabe führt. Ob es sich in diesem wie in unserem Falle um Komponenten vom Hämatin-Typ handelt, deren Reaktionsmechanismus von MAIER u. TAPPEL (1959) untersucht wurde, ist bislang nicht geklärt. Folgen wir aber der Formulierung der letztgenannten Autoren als Modellreaktion, so ergibt sich das nachstehende Schema:



Demnach entstehen durch die Primärreaktion der Cutin-esterase zunächst offene Fettsäureketten, die aber noch durch Peroxydbrücken zusammenhängen (= Carboxy-cutin; zur Konstitution des Cutin vgl. HEINEN 1963b). Ob direkt anschliessend an diese Kettenöffnung die Peroxydspaltung einsetzt, oder zunächst eine Oxydation von Dien-Konfigurationen innerhalb der Ketten stattfindet, konnte bislang nicht geklärt werden. In jedem Falle aber werden durch die Cutin-esterase-Wirkung die Peroxydbrücken (R und R' bedeuten im vorstehenden Schema jeweils eine Fettsäurekette) exponiert und dem Angriff der Peroxydase zugänglich. Als Endprodukt der Reaktionen entstehen zwei Hydroxy-Fettsäuren und Wasserstoffperoxyd, das durch die Katalase des Pilzes (HEINEN 1962) in Wasser und Sauerstoff zerlegt wird.

Das Ziel der weiteren Untersuchungen wird sein, das Verhalten der Peroxydase gegenüber Carboxycutin, das durch Präinkubation mit verschiedenen Anreicherungsstufen der Cutin-esterase gebildet wurde, zu bestimmen. Weiterhin soll die Frage geklärt werden, ob die Peroxydase in den Anreicherungsfraktionen der Cutin-esterase vorliegt oder nicht.

Herrn Prof. Dr. H. F. Linskens sei für die Förderung der Untersuchungen gedankt.

LITERATUR

- BALLS, A. K., B. AXELROD and M. W. KIES. 1943. *J. biol. Chem.* **149**: 491.
BLAIN, J. A. and T. BARR. 1961. *Nature (Lond.)* **190**: 538.
HEINEN, W. 1960. *Acta Bot. Neerl.* **9**: 167.
———. 1962. *Arch. Mikrobiol.* **41**: 268.
——— und I. VAN DEN BRAND. 1961. *Acta Bot. Neerl.* **10**: 171.
———. 1963a *Enzymologia* (im Druck)
———. 1963b. *Z. Naturforsch.* (im Druck)
MAIER, V. P. and A. L. TAPPEL. 1959. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **36**: 8 und 12.