

Energetik des methanogenen Benzoatabbaus durch *Syntrophus gentianae*

Ludger Schöcke

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der Universität Konstanz

Konstanz 1997

Diese Arbeit erscheint auch als Verlagspublikation beim
[Hartung-Gorre-Verlag](#), Konstanz, als Nr. 549 der Schriftenreihe *Konstanzer Dissertationen*
ISBN 3-89649-255-1

Energetik des methanogenen Benzoatabbaus durch *Syntrophus gentianae*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Universität Konstanz

vorgelegt von

Ludger Schöcke

aus Düren

Konstanz 1997

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. B. Schink in der Zeit von Juli 1994 bis Dezember 1997 an der Fakultät für Biologie, Lehrstuhl Mikrobielle Ökologie der Universität Konstanz angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. B. Schink für die Überlassung des interessanten Themas, sein stetes Interesse und für die vielen wertvollen Diskussionen und Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. A. M. Cook möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Bei allen heutigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die stets freundliche Atmosphäre im Labor, die fachliche Gespräche förderte.

Mein besonderer Dank gilt Jochen Müller: Nicht nur für die kölsche Tön im Labor, sondern neben vielem anderem auch für die Durchsicht des Manuskripts.

Bei Gudrun Junge möchte ich mich ebenfalls für akribische Fellersuche und einige Tassen Kaffeedanken.

Waltraud Dilling danke ich nicht nur für technische Unterstützung.

„Nix - blev - wie - et - es

Doch - eens - is - jewiss

Et - kütt - wie - et - kütt!“

„Ja, das ist Schopenhauers
»Die Welt als Wille und Vorstellung«
auf den Punkt gebracht.“

(anonym, Köln, 1997)

(...)

| | |
|--------------------------------|----------|
| INHALTSVERZEICHNIS..... | I |
|--------------------------------|----------|

| | |
|-----------------------------------|----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | V |
|-----------------------------------|----------|

| | |
|---------------------------|----------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
|---------------------------|----------|

| | |
|----------------------|---|
| 1.1 Allgemeines..... | 1 |
|----------------------|---|

| | |
|---|---|
| 1.2 Syntrophe Prozesse bei der anaeroben methanogenen Mineralisation..... | 1 |
|---|---|

| | |
|--|---|
| 1.3 Aerober und anaerober Abbau aromatischer Verbindungen..... | 3 |
|--|---|

| | |
|---|---|
| 1.4 Interspecies Hydrogen Transfer..... | 5 |
|---|---|

| | |
|--|---|
| 1.5 Der syntrophe Abbau von Benzoat..... | 6 |
|--|---|

| | |
|----------------------|---|
| 1.6 Zielsetzung..... | 8 |
|----------------------|---|

| | |
|--------------------------------------|----------|
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 9 |
|--------------------------------------|----------|

| | |
|---|----------|
| 2.1 Mikrobiologische Methoden..... | 9 |
|---|----------|

| | |
|---|---|
| 2.1.1 Herkunft der verwendeten Mikroorganismen..... | 9 |
|---|---|

| | |
|-------------------|---|
| 2.1.2 Medien..... | 9 |
|-------------------|---|

| | |
|-----------------------------------|---|
| 2.1.3 Kultivierungstechniken..... | 9 |
|-----------------------------------|---|

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 2.2 Biochemische Methoden..... | 10 |
|---------------------------------------|-----------|

| | |
|----------------------|----|
| 2.2.1 Zellernte..... | 10 |
|----------------------|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| 2.2.2 Zellsuspensionsversuche..... | 10 |
|------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2.2.2.1 Einsatz von Hemmstoffen..... | 10 |
|--------------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 2.2.3 Herstellung von zellfreien Extrakten..... | 10 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| 2.2.3.1 Nicht-selektiver Zellaufschluß..... | 10 |
|---|----|

| | |
|---------------------------------------|----|
| 2.2.3.2 Selektiver Zellaufschluß..... | 11 |
|---------------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 2.2.4 Fraktionierung des zellfreien Extrakts..... | 11 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| 2.2.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten..... | 11 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| 2.2.5.1 Kontinuierliche Enzymtests..... | 11 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| 2.2.5.2 Diskontinuierliche Enzymtests..... | 11 |
|--|----|

| | |
|--------------------------|----|
| 2.2.5.3 Testansätze..... | 12 |
|--------------------------|----|

| | |
|-------------------------------|----|
| 2.2.6 Proteinbestimmung | 13 |
|-------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| 2.2.7 Isolierung von radioaktiv markierten Zwischenprodukten aus dem Benzoatstoffwechsel | 14 |
|--|----|

| | |
|---|-----------|
| 2.3 Analytische Methoden | 14 |
| 2.3.1 Spektralphotometrie..... | 14 |
| 2.3.2 Fluoreszenzphotometrie..... | 14 |
| 2.3.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)..... | 15 |
| 2.3.3.1 Reversed Phase-HPLC..... | 15 |
| 2.3.3.2 Ionenausschlußchromatographie..... | 16 |
| 2.3.4 Gaschromatographie..... | 16 |
| 2.3.4.1 Wasserstoff..... | 16 |
| 2.3.4.2 Kurzkettige Fettsäuren..... | 16 |
| 2.3.4.3 Methan..... | 17 |
| 2.4 Dünnschichtchromatographie (DC) | 17 |
| 2.4.1 Detektion radioaktiver Abbauprodukte..... | 17 |
| 2.4.1.1 Autoradiographie..... | 17 |
| 2.4.1.2 PhosphorImaging..... | 17 |
| 2.5 Berechnungen | 17 |
| 2.6 Chemikalien, Radiochemikalien und Gase | 18 |
| 2.6.1 Chemikalien und Biochemikalien..... | 18 |
| 2.6.2 Radiochemikalien..... | 18 |
| 2.6.3 Gase..... | 18 |
| 3 ERGEBNISSE | 19 |
| 3.1 Teil 1: Energetik des Benzoatabbaus auf der Ebene der syntrophen Beziehung zu einem methanogenen Partnerorganismus | 19 |
| 3.1.1 Wachstumsexperimente..... | 19 |
| 3.1.2 Experimente mit dichten Zellsuspensionen ohne Manipulation der Produktkonzentrationen..... | 20 |
| 3.1.3 Manipulation des Wasserstoff-Partialdrucks..... | 21 |
| 3.1.4 Manipulation der Acetatkonzentration..... | 23 |
| 3.1.5 Korrelation zwischen Acetatkonzentration und $\Delta G'$ | 24 |
| 3.2 Teil 2: Identifizierung von Zwischenprodukten des Benzoatabbaus durch <i>Syntrophus gentianae</i> | 26 |
| 3.2.1 Experimente zur Bestimmung von Zwischenprodukten mittels [Ring- ¹⁴ C]-Benzoat..... | 26 |
| 3.3 Teil 3: Messung einzelner Enzyme in zellfreien Extrakten von <i>Syntrophus gentianae</i> | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.1 Übersicht über die gemessenen Enzyme..... | 31 |
| 3.3.2 Eigenschaften der Acyl-CoA-Transferase..... | 32 |
| 3.3.3 Eigenschaften der Acyl-CoA-Ligase..... | 33 |
| 3.3.4 Eigenschaften der Pyrophosphatase..... | 36 |
| 3.3.4.1 Membranständigkeit der Pyrophosphatase..... | 36 |
| 3.3.4.2 Abhängigkeit der Aktivität von der Pyrophosphatkonzentration..... | 45 |
| 3.3.4.3 Hitzestabilität der Pyrophosphatase..... | 46 |
| 3.3.4.4 Aktivität der Pyrophosphatase bei verschiedenen Temperaturen..... | 47 |
| 3.3.4.5 Inhibitoren der Pyrophosphatase..... | 48 |
| 3.3.4.6 Ertragmessungen bei Kulturen mit exogener Zugabe von Benzoat und Pyrophosphat..... | 49 |
| 3.3.5 Eigenschaften der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase..... | 50 |
| 3.3.5.1 Nachweis im gekoppelten photometrischen Test..... | 50 |
| 3.3.5.2 Lokalisation der Decarboxylaseaktivität..... | 50 |
| 3.3.5.3 Einfluß von Avidin und Biotin auf die Glutaconyl-CoA- Decarboxylaseaktivität..... | 51 |
| 3.3.5.4 Na ⁺ -Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität..... | 52 |
| 3.3.6 Eigenschaften der Hydrogenase und der Formiatdehydrogenase..... | 55 |
| 3.3.7 Eigenschaften der Gentsyl-CoA-Reduktase..... | 57 |
| 3.3.7.1 Potentielle artifizielle Elektronen-Donoren für die Gentsyl-CoA- Reduktase..... | 57 |
| 3.3.7.2 Lokalisation der Gentsyl-CoA-Reduktase..... | 59 |
| 3.4 Teil 4: Experimente zum Benzoatabbau durch <i>Desulfobacterium anilini</i>..... | 60 |
| 3.4.1 Experimente zur Bestimmung von Zwischenprodukten mittels [Ring- ¹⁴ C]-Benzoat..... | 60 |
| 3.4.2 Messung einzelner Enzyme in zellfreien Extrakten..... | 63 |
| 3.4.2.1 Übersicht über die gemessenen Enzyme..... | 63 |
| 3.4.2.2 Eigenschaften der Acyl-CoA-Ligase..... | 63 |
| 3.4.2.3 Eigenschaften der Pyrophosphatase..... | 65 |
| 3.4.2.4 Eigenschaften der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase..... | 65 |
| 3.4.2.5 Lokalisation der Decarboxylaseaktivität..... | 66 |
| 3.4.2.6 Einfluß von Avidin und Biotin auf die Glutaconyl-CoA-Decarboxylase-Aktivität..... | 66 |
| 3.4.2.7 Na ⁺ -Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität..... | 67 |
| 4 DISKUSSION..... | 69 |
| 4.1 Teil 1: Energetik des Benzoatabbaus auf der Ebene der syntrophen Beziehung zu einem methanogenen Partnerorganismus..... | 69 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Teil 2: Identifizierung von Zwischenprodukten..... | 72 |
| 4.3 Teil 3: Messung einzelner Enzyme in zellfreien Extrakten..... | 80 |
| 4.4 Teil 4: Experimente zum Benzoatabbau durch <i>Desulfobacterium anilini</i> | 83 |
| 5 ZUSAMMENFASSUNG | 91 |
| 6 LITERATURVERZEICHNIS..... | 89 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ACMA | 9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BES | Bromethansulfonsäure |
| CCCP | Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon |
| CoA, CoASH | Coenzym A |
| DC | Dünnschicht-Chromatographie |
| DTE | 1,4-Dithioerythritol |
| ϵ_{λ} | Molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ |
| E° | Redoxpotential unter Standardbedingungen |
| $E^{\circ'}$ | Redoxpotential unter Standardbedingungen bei pH 7 |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ΔG° | Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen |
| $\Delta G^{\circ'}$ | Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen bei pH 7 |
| ΔG_B° | freie Bildungsenthalpie unter Standardbedingungen |
| g | Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m s}^{-2}$) |
| HEPES | (N-[Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]) |
| HPLC | Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie |
| K_M | Michaelis-Konstante |
| NAD(P) ⁺ | Nicotinsäureamidadenin dinukleotid-(phosphat), oxidierte Form |
| NAD(P)H | Nicotinsäureamidadenin dinukleotid-(phosphat), reduzierte Form |
| OD_{λ} | "Optische Dichte" einer Bakteriensuspension bei der Wellenlänge λ |
| p.a. | pro analysi |
| P_i | ortho-Phosphat |
| PP_i | Pyrophosphat |
| R_f | relative Laufgeschwindigkeit |
| Tab. | Tabelle |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV/Vis | Ultraviolett/Visible |
| Y_{ATP} | molarer Ertragskoeffizient |
| (v/v) | Volumenprozent |
| (w/v) | Gewichtsprozent |

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Syntrophe Kooperationen sind spezielle Formen von Symbiosen, die besonders an anoxischen Standorten eine zentrale Rolle spielen, wo es nur einen limitierten Zufluß externer Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Sulfat, Eisen (III) oder oxidiertes Mangan-Ionen gibt. Unter Syntrophie versteht man eine auf wechselseitiger Ernährung beruhende Assoziation zweier oder mehrerer Organismen. Das Nutzverhältnis zwischen beiden Partnern in einer syntrophen Beziehung zeichnet sich durch eine strikte beiderseitige Abhängigkeit aus, die nicht einfach durch Zusatz von Cosubstraten oder Nährstoffen aufgehoben werden kann.

Der Begriff „syntrophe Kultur“ wurde erstmals für die Beschreibung der Kooperation zwischen dem schwefelreduzierenden Bakterium *Desulphuromonas acetoxidans* und phototrophen grünen Schwefelbakterien der Gattung *Chlorobium* verwendet (Pfennig und Biebl, 1976). *D. acetoxidans* oxidiert Acetat unter Reduktion von elementarem Schwefel zu Schwefelwasserstoff, der für die von Chlorobien durchgeführte Photosynthese als Elektronendonator dient. Diese scheiden Schwefel ins Medium aus. Der Schwefel steht dann *D. acetoxidans* wieder als Elektronenakzeptor zur Verfügung. Die erste Beschreibung einer syntrophen Kultur erfolgte schon 1967 durch Bryant *et al.* Sie konnten nachweisen, daß die Ethanol-oxidierende Kultur *Methanobacillus omelianskii* (Barker, 1940) eine symbiotische Assoziation zweier Organismen war. Der S-Organismus oxidierte Ethanol zu Acetat und Wasserstoff, während der methanogene Stamm M. o. H. Wasserstoff bei der Reduktion von Kohlendioxid zu Methan oxidierte. Am Beispiel dieser Kultur wurde zum ersten Mal die Bedeutung des Wasserstoff-Partialdruckes deutlich und das Prinzip des „interspecies hydrogen transfer“ bekannt.

1.2 Syntrophe Prozesse bei der anaeroben methanogenen Mineralisation

Der Abbau organischer Materie zu CO₂ und Methan ist ein weitverbreiteter Prozeß von großer Bedeutung. Er ist typisch für das Süßwassersediment, das reich an organischen Verbindungen ist, für Sümpfe, für Reisfelder, für die Faultürme kommunaler und industrieller Kläranlagen. Erwähnt sei auch der Pansen der Wiederkäuer. Im Vergleich zum oxidativen Abbau und zu anaeroben Atmungen ist er aus energetischer Sicht der ungünstigste. Diese geringe Energieausbeute mag auch der Grund dafür sein, daß der Prozeß der Methanogenese erst dann einsetzt, wenn alle anderen potentiellen Elektronenakzeptoren außer CO₂ reduziert sind. Der Gesamtprozeß der Mineralisierung kann dabei in drei Schritte, die dabei aktiven metabolischen Gruppen von Bakterien und Archaea in fünf Gruppen eingeteilt werden (Zehnder *et al.*, 1982; Dolfing und Tiedje, 1988; Schink, 1992; Schink, 1997; ABBILDUNG 1).

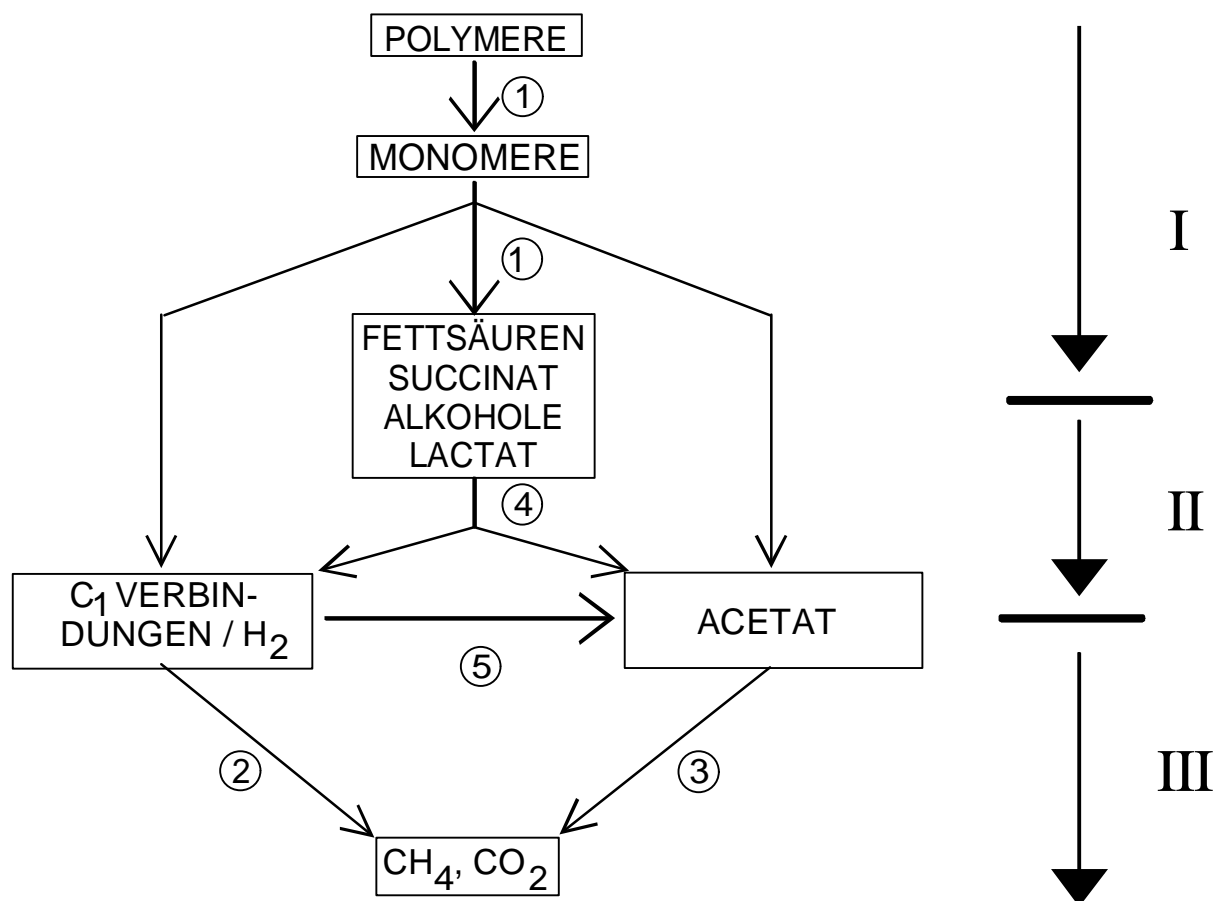


Abb. 1: Kohlenstoff- und Elektronenfluß durch die verschiedenen metabolischen Gruppen, die in die Mineralisierung komplexer organischer Substanz zu CO_2 und CH_4 involviert sind. 1) Primäre Gärer; 2) Wasserstoffoxidierende Methanogene; 3) acetiklastische Methanogene; 4) Sekundäre (obligat protonenreduzierende) Gärer; 5) Homoacetogene Bakterien. I, II, III: Stufen des Abbaus. Modifiziert nach Schink, 1992.

Dabei variiert der Grad der gegenseitigen Abhängigkeit erheblich: Während die späteren Glieder der Nahrungskette immer von den früheren bezüglich ihres Substrates abhängen, können sie durch die Entfernung der Stoffwechselprodukte der ersteren unter Umständen auch einen erheblichen Einfluß auf diese haben. Zunächst werden Polymere wie Polysaccharide, Proteine und Fette aber auch sonstige Makromoleküle wie Lignin in Monomere derselben zerlegt. Dies geschieht durch extrazelluläre Enzyme, die üblicherweise von den „klassischen“ Gärern ausgeschieden werden. Einige der Gärprodukte wie z. B. Acetat, Wasserstoff, Kohlendioxid und andere C-1-Verbindungen können durch methanogene Archaea direkt zu Methan konvertiert werden. Der Abbau anderer Gärprodukte wie z. B. Fettsäuren, Alkohole und verzweigt-kettige oder aromatische Fettsäuren wird von einer anderen metabolischen Gruppe, den sekundären oder auch „obligat protonenreduzierend“ genannten Gärern bewerkstelligt. Die Stoffwechselprodukte dieser Gruppe sind Wasserstoff (eventuell Formiat), Kohlendioxid und Acetat und werden wie oben erwähnt im weiteren durch methanogene Archaea verstoffwechselt. Die obligat protonenreduzierenden Gärer wurden in der Vergangenheit auch obligat syntrophe Bakterien genannt, doch läßt sich dies nicht länger rechtfertigen, da die meisten bisher isolierten Organismen auf bestimmten Substraten in Reinkultur gehalten werden können. Eine Bezeichnung des jeweiligen Stoffwechseltyps als syntroph erscheint hingegen sinnvoll.

1.3 Aerober und anaerober Abbau aromatischer Verbindungen

Der Abbau aromatischer Verbindungen führt häufig über Benzoat als Zwischenprodukt. Aromatische Aminosäuren sind nach dem Lignin, das 30-40% der pflanzlichen Biomasse ausmacht, die zweitwichtigste Quelle aromatischer Verbindungen in der Natur. Lignin selbst wird in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff kaum angegriffen, doch können auch monomere Ligninvorläufer und tierische und mikrobielle Sekundärmetabolite zu Benzoat umgewandelt werden (Schink *et al.*, 1992). Eine weitere Quelle von nicht unerheblichem Maße bilden fossile Brennstoffe wie Kohle oder Erdöl. Schließlich sind vom Menschen eine Vielzahl von aromatischen Substanzen in industriellem Maßstab synthetisiert worden, die in der Natur nicht oder selten vorkommen, meist in Form organischer Lösungsmittel oder „Pestizide“. Vollständige Mineralisierung der aromatischen Substanzen zu CO₂ ermöglicht die Aufrechterhaltung des globalen Kohlenstoffkreislaufs. Der Abbau aromatischer, toxischer oder cancerogener Xenobiotika wie beispielsweise polychlorierter oder -methylierter aromatischer Substanzen ist dabei von großer Wichtigkeit. Da dieser Abbau alle Standorte umfaßt, kommt es zu keiner Akkumulation dieser Verbindungen in irgendwelchen Standorten. In Tieren findet ein Abbau von Aromaten kaum statt; nach Hydroxylierung durch unspezifische, meist Cytochrom P-450 enthaltende Monooxygenasen und nach Bildung von gut wasserlöslichen Konjugaten werden diese zur Entgiftung ausgeschieden. Pflanzen sind zwar in der Lage Aromaten zu modifizieren, können diese allerdings nicht vollständig zu CO₂ metabolisieren. Somit beschränkt sich der biologische Abbau aromatischer Substanzen weitgehend auf Mikroorganismen.

Aromatische Verbindungen sind gekennzeichnet durch ein delokalisiertes π -Elektronen-system, was ihnen eine hohe Stabilität verleiht. Abhängig davon, ob molekularer Sauerstoff zur Verfügung steht, sind in der Natur zwei verschiedene Strategien zur Überwindung der Resonanzenergie verwirklicht. Die Reaktivität des „aktivierten Sauerstoffs“ in den von Mono- oder Dioxygenasen katalysierten Umsetzungen ist ausreichend, um Hydroxygruppen direkt am aromatischen Ring einzuführen. Darüber hinaus werden von Monooxygenasen auch Oxidationen an chemisch wenig reaktiven Seitengruppen wie beispielsweise der Methylgruppe des Toluols katalysiert (Harayama *et al.*, 1992). Die überwiegende Zahl mono- oder polyzyklischer aromatischer Substanzen wird im aeroben Stoffwechsel in eines der drei zentralen Intermediate Brenzcatechin (1,2-Dihydroxybenzol), Protocatechuat (3,4-Dihydroxybenzoat) oder Gentsiat (2,5-Dihydroxybenzoat) überführt, wobei der Abbau einer Substanz je nach Organismus über verschiedene Wege erfolgen kann. Die sich anschließende, von Dioxygenasen katalysierte Ringöffnung erfolgt bei allen drei Intermediaten oxygenolytisch. Die resultierenden doppelt ungesättigten Mono- oder Dicarbonsäuren können schließlich nach entsprechenden enzymatischen Umformungen in den zentralen Stoffwechsel eingeschleust werden (Young, 1984; Dagley, 1985; Harayama *et al.*, 1992).

Lange Zeit hielt man einen anaeroben Abbau aromatischer Verbindungen für unmöglich, doch bereits 1934 haben Tarvin und Buswell in Pionierarbeiten einen vollständigen mikrobiellen Abbau aromatischer Substrate zu CO₂ und CH₄ unter methanogenen Bedingungen nachgewiesen. Allerdings herrschte mehrere Jahrzehnte lang Unklarheit darüber, nach welchem Mechanismus der aromatische Ring in Abwesenheit von Sauerstoff gespalten werden könnte.

Es ist offensichtlich, daß beim aeroben Abbau stets aktivierter Sauerstoff an den mechanistisch schwierigen oder energetisch ungünstigen Reaktionsschritten beteiligt ist. Diese Rolle des Sauerstoffes im aeroben Aromatenstoffwechsel hebt ihn über seine Bedeutung als Elektronenakzeptor in der Atmungskette hinaus. In Abwesenheit von molekularem Sauerstoff entwickelten sich daher eine Reihe alternativer enzymatisch katalysierter Transformationsreaktionen, von denen einige nach dem heutigen Stand des Wissens einzigartig in der Natur sind (Übersichtsartikel: Evans und Fuchs, 1988; Tschech, 1989; Schink *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1994; Heider und Fuchs, 1997). Typisch sind dabei reduktive Eliminierungen von Amino- (Lochmeyer *et al.*, 1992), Hydroxy- (Bonting und Fuchs, 1996) oder Chlor-Substituenten des Ringes (Sulfita *et al.*, 1982), Carboxylierungen oder Decarboxylierungen (Tschech und Schink, 1985; Lack und Fuchs, 1992), Transhydroxylierungen am Ring (Brune und Schink, 1990; Reichenbecher *et al.* 1994, 1996), α -Oxidation von Carboxymethylgruppen (Magdy *et al.*, 1993) oder *o*-Demethylierungen (Bache und Pfennig, 1981). Vor kurzem wurden Hinweise auf einen weiteren, neuartigen Reaktionstyp gefunden: Danach erfolgt der anaerobe Abbau des Toluols nicht wie beispielsweise im aeroben Stoffwechsel über die Oxidation der Methylgruppe, sondern kann über eine Addition von Fumarat an Toluol mit Benzylsuccinat als Reaktionsprodukt erfolgen. Die weitere anaerobe Oxidation von Benzylsuccinat zu Benzoyl-CoA ist mechanistisch wenig problematisch (Biegert *et al.*, 1993). Die unter Ausschluß von Sauerstoff nur schwer vorstellbare direkte Oxidation der Methylgruppe des Toluols wird also über den Umweg der Bildung eines leichter oxidierbaren Intermediats umgangen.

Durch die oben genannten Transformationsreaktionen des peripheren Stoffwechsels wird die große Anzahl der aromatischen Verbindungen nach heutigem Stand in eines der lediglich drei Schlüsselintermediate Benzoyl-CoA, Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol) oder Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol) überführt; erst dann wird schließlich der aromatische Charakter aufgehoben.

Resorcin und Phloroglucin weisen gegenüber den Schlüsselintermediaten des aeroben Stoffwechsels keine, im Bezug auf eine Carboxygruppe, α -ständige Hydroxygruppen auf. Bei Resorcin und Phloroglucin sind jeweils meta-ständige Hydroxyl-Gruppen vorhanden, welche durch die Keto-Enol-Tautomerie die Elektronendichte im Ring verringern und diesen dadurch einem reduktiven Angriff leichter zugänglich. Daher können diese Substanzen ohne weiteres von Enzymen mit Elektronendonoren wie beispielsweise NADPH reduziert werden (Haddock und Ferry, 1989; Kluge *et al.*, 1990; Brune und Schink, 1990; Brune und Schink, 1992). Die Öffnung des Rings erfolgt anschließend über Hydrolasen, der weitere Abbau über eine modifizierte β -Oxidation. Es sind hauptsächlich mehrfach hydroxylierte aromatische Verbindungen wie Resorcylsäuren oder Gallussäure, welche über Resorcin oder Phloroglucin abgebaut werden (Tschech und Schink, 1985).

Die überwiegende Zahl der aromatischen Substanzen, deren Abbau beschrieben ist, wird jedoch über Benzoyl-CoA abgebaut (Fuchs *et al.*, 1994), bei dem der aromatische Charakter im Vergleich zu oben genannten Verbindungen aufgrund der schwächeren elektronenziehenden Effekte des CoA-Thioesters stark ausgeprägt ist. Die Reduktion des Ringes auf der Stufe eines Intermediates mit ausgeprägter Resonanzstabilisierung des Benzolrings stellt vom energetischen Standpunkt her hohe Anforderungen an ein Enzymsystem.

1.4 Interspecies Hydrogen Transfer

Die Bedeutung des Wasserstoffpartialdruckes für den Abbau organischen Materials wurde erst erkannt, nachdem Bryant *et al.* (1967) entdeckten, daß die Kultur *Methanobacillus omelianskii* tatsächlich aus zwei verschiedenen Bakterienarten bestand. Beide Arten, der S-Organismus und das Methanbakterium M. o. H., kooperieren bei der Umsetzung von Ethanol zu Acetat und Methan über einen sogenannten „interspecies hydrogen transfer“. Unter Standardbedingungen ist die Oxidation von Ethanol zu Acetat und Wasserstoff eine endergone Reaktion, die erst exergon wird, wenn der Wasserstoffpartialdruck niedriger als 10^{-3} bar ist. In der syntrophen Kultur *M. omelianskii* wird der Wasserstoff durch das methanogene Archaeabakterium verbraucht und damit der Partialdruck auf dem notwendig niedrigen Wert gehalten. Unter diesen Bedingungen können beide Partner ausreichend Energie zum Wachstum gewinnen. Auch die Oxidationen der meisten anderen Substrate der Phase 2 des anaeroben Abbaus organischer Substanz (ABBILDUNG 1) sind unter Standardbedingungen endergon. Syntrophe Prozesse wurden unter anderem auch für die Oxidation von Acetat (Zinder und Koch, 1984; Lee und Zinder, 1988), Isovalerat (Stieb und Schink, 1986) und Phenol (Barik *et al.*, 1985) beschrieben.

Am natürlichen Standort herrschen Bedingungen, die weit von den definierten Standardbedingungen entfernt sind. Die tatsächliche freie Energie der Reaktion hängt von den Konzentrationen der Reaktanden und der Produkte ab. Sie kann nach folgender Gleichung bestimmt werden, wobei die Variablen in Klammern für die molaren Konzentrationen der gelösten Substanzen oder für den Partialdruck eines Gases stehen.

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

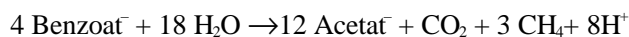
Syntrophe Kopplungen sind auch mit anderen als methanogenen Wasserstoff-oxidierenden Partnern möglich. Eine an eine Sulfatreduktion gekoppelte Wasserstoffoxidation ist nicht nur energetisch günstiger als die Methanbildung aus CO_2 (Dolfing und Tiedje, 1988), Sulfatreduzierer haben auch eine deutlich höhere Affinität zum Wasserstoff als Methanogene (Kristjansson *et al.*, 1982; Robinson und Tiedje, 1984).

Der Elektronentransfer zwischen Wasserstoffproduzenten und -konsumenten ist nicht unbedingt an Wasserstoff als Elektronencarrier gebunden, sondern kann unter Umständen auch über Formiat erfolgen. Für bestimmte Mischkulturen wird sogar einem „interspecies formate transfer“ die dominierende Rolle zugesprochen (Thiele und Zeikus, 1988). Aufgrund der im Vergleich zum Wasserstoff besseren Löslichkeit in wässrigen Systemen wird Formiat von manchen Autoren als der günstigere Elektronencarrier angesehen (Boone *et al.*, 1989). Zumindest für syntrophe Kulturen, in denen der beteiligte methanogene Partner kein Formiat zu oxidieren vermag, kann ein Formiat-Transfer ausgeschlossen werden. Es erscheint in speziellen Fällen auch möglich, eine syntrophe Kopplung über Acetat zu etablieren (Schöcke und Schink, 1997).

1.5 Der syntrophe Abbau von Benzoat

Physiologische Untersuchungen mit syntrophen Kulturen sind schwierig, da man es nicht mit Reinkulturen, sondern mit definierten Mischkulturen zu tun hat. Desweiteren zeichnen sich diese Kulturen i. d. R. durch sehr niedrige Wachstumsraten aus (McInerney *et al.*, 1979; Boone und Bryant, 1980; Mountfort und Bryant, 1982; Stieb und Schink, 1986). Möglicherweise sind das Gründe dafür, daß bis heute nur relativ wenige definierte syntrophe Mischkulturen beschrieben worden sind.

Die bisher einzige definierte syntrophe Kultur, die mit Benzoat als Substrat isoliert wurde, ist *Syntrophus buswellii* (Mountfort und Bryant, 1982). Eine syntrophe Oxidation von Benzoat wurde auch für *Syntrophus gentianae* beschrieben, der mit Hydrochinon als Reinkultur isoliert wurde (Szewzyk und Schink, 1989). Der methanogene Abbau von Benzoat wird durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben (Ferry und Wolfe, 1976; Mountfort und Bryant, 1982; Szewzyk und Schink, 1989):



$$\Delta G^\circ = -48,5 \text{ kJ/mol Benzoat.}$$

Sowohl Acetat als auch Wasserstoff inhibieren den Benzoatabbau thermodynamisch und müssen durch den methanogenen Partner aus dem System entfernt werden (Schink, 1992). Zusätzlich zum thermodynamischen Effekt beeinflußt Acetat den Abbau vermutlich noch durch Beeinflussung des elektrochemischen Protonengradienten $\Delta\mu\text{H}^+$ und des pH-Gleichgewichts (Krulwich *et al.*, 1987; Dolfing und Tiedje, 1988; Fukuzaki *et al.*, 1990). In einer ähnlichen syntrophen Beziehung, dem syntrophen Abbau des Butyrats, kooperieren die Partnerorganismen so, daß sie die zur Verfügung stehende Energie zu gleichen Teilen mit jeweils -20 kJ bis $-25 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ Reaktion teilen (Schink und Thauer, 1988; Wallrabenstein und Schink, 1994). Dies korrespondiert mit einem Drittel einer ATP-Einheit (Schink, 1990). Diese Annahme wurde experimentell mit Zellsuspensionsversuchen bewiesen (Wallrabenstein und Schink, 1994). Im Gegensatz zu den Butyrat-abbauenden syntrophen Cokulturen weiß man von Benzoat-abbauenden Cokulturen nichts darüber, wie sie die zur Verfügung stehende Energie teilen. So ist es unklar, ob jeder der beteiligten Partner einen der Hälfte der insgesamt freiwerdenden Energie entsprechenden Betrag „erhält“ oder ob einer der Partner Energie von beispielsweise einem $2/3$ des Gesamt-ATP entsprechenden Betrag erhält, während der andere mit nur $1/3$ Gesamt-ATP-Äquivalent auskommen muß.

Enzymatische Untersuchungen zum Abbau von Benzoat in syntrophen Kulturen sind bisher noch nicht durchgeführt worden, doch wird angenommen, daß der Abbau in Teilen analog dem hauptsächlich an Nitratreduzieren und phototrophen Bakterien untersuchten Benzoat-Weg verläuft (ABBILDUNG 2; Dutton und Evans, 1969; Schink *et al.*, 1992; Übersicht: Heider und Fuchs, 1997).

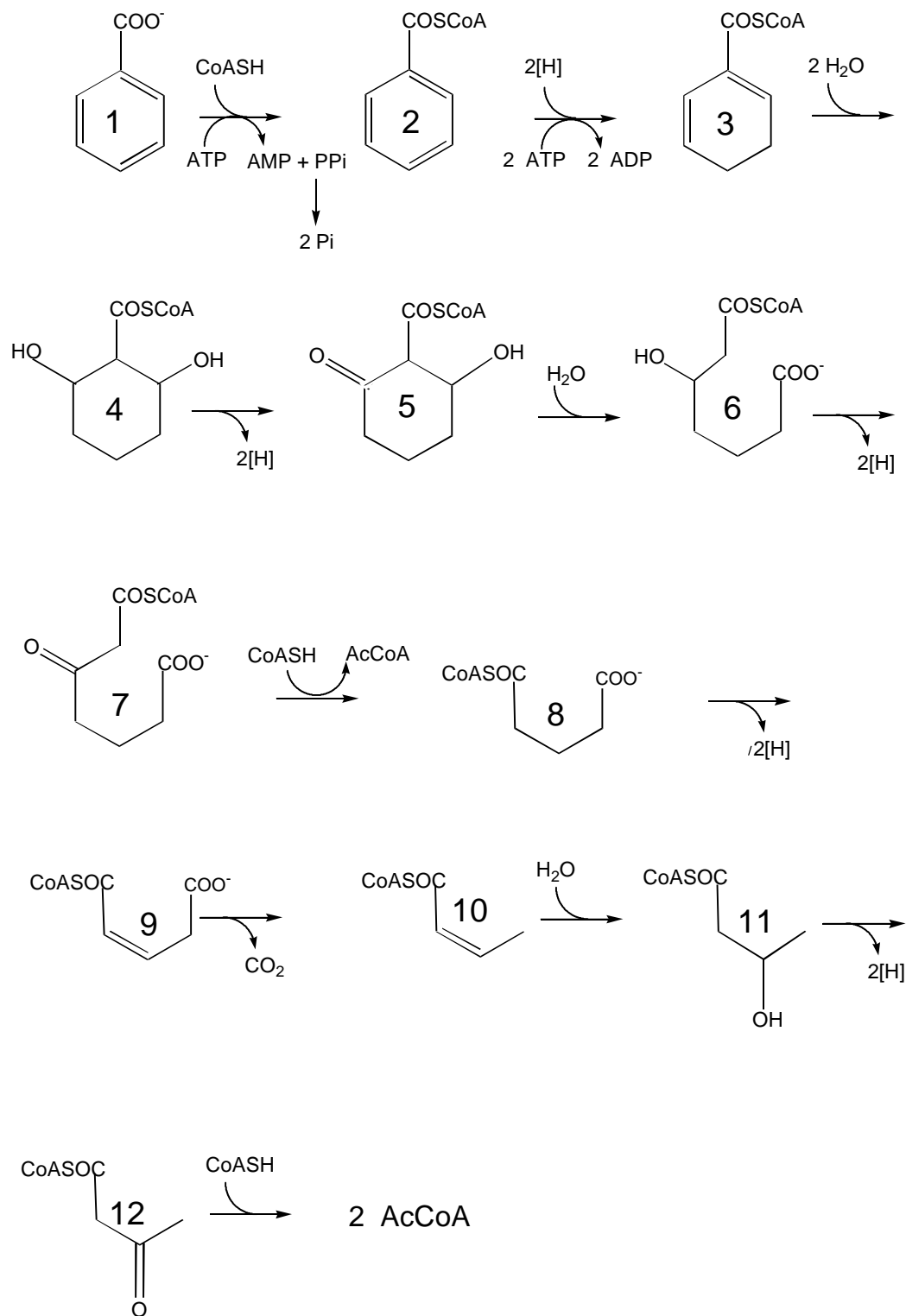


Abb. 2: Vorgeschlagener Abbauweg für Benzoat bei *Thauera aromatica*. 1) Benzoat, 2) Benzoyl-CoA, 3) Cyclohex-1,5-diene-1-carboxyl-CoA, 4) 2,6 Di-hydroxy-cyclohexan-carboxyl-CoA, 5) 2-Keto-6-hydroxy hydroxy-cyclohexan-carboxyl-CoA, 6) 2-Hydroxy-pimelyl-CoA, 7) Oxopimelyl-CoA, 8) Glutaryl-CoA, 9) Glutaconyl-CoA, 10) Crotonyl-CoA 11) 3-Hydroxybutyryl-CoA, 12) Acetyl-CoA

Aufgrund der weitaus geringeren Energie, die den Gärern zur Verfügung steht, sind jedoch Unterschiede im Stoffwechsel zu fordern. So erscheint die Investition von zwei ATP zur Bildung des Benzoyl-CoA als für Gärer

zu hoch. Eine CoA-Transferasereaktion kommt hier als Alternative in Frage. Auch könnte durch eine Decarboxylierungsreaktion, die an den Transport von Ionen über die Membran gekoppelt ist, Energie konserviert werden. Ähnliches gilt für die Reduktion von Benzoyl-CoA. Eine vollständige Ringsättigung mit sechs Elektronen wäre weniger energieaufwendig, als ein Zwei-Elektronenschritt, bei dem pro Elektron ein ATP investiert werden muß.

Diese Fragen wurden in der Vergangenheit ausführlich diskutiert, doch gibt es wenig „harte Daten“, die die Fragen tatsächlich zufriedenstellend beantworten.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den Energiestoffwechsel eines syntrophen Benzoat-Vergärers zu verstehen. Dazu sollte der Einfluß von Acetat und Wasserstoff auf eine methanogene, Benzoat-abbauende binäre Mischkultur bestimmt werden. Es sollten Edukt- und Produktkonzentrationen bestimmt werden, um Informationen darüber zu erhalten, wie hoch der minimale Bedarf an freier Reaktionsenthalpie sein muß, um *Syntrophus gentianae* Wachstum zu ermöglichen.

Desweiteren sollten durch Messung von Enzymen, die vermutlich am Abbau des Benzoats beteiligt sind, Hinweise auf den Abbauweg gefunden werden. Dabei waren energetische Aspekte von besonderer Bedeutung. Außerdem sollte eine Möglichkeit gefunden werden, Zwischenprodukte des Stoffwechsels zu identifizieren.

Ein Vergleich der gefundenen Daten mit veröffentlichten Daten von Nitratreduzieren und mit durch Versuche bestimmte Daten eines benzoatabbauenden Sulfatreduzierers sollte Unterschiede im Stoffwechsel zeigen und Besonderheiten des syntrophen Gärers betonen.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Herkunft der verwendeten Mikroorganismen

Die verwendete Mischkultur von *Syntrophus gentianae* (DSM 8432) mit *Methanospirillum hungatei* und die Reinkulturen von *Desulfobacterium desulfuricans* CSN (DSM 9104) und *Desulfobacterium anilini* (DSM 4660) stammten aus der Stammsammlung des Lehrstuhls Prof. Schink der Universität Konstanz. *Methanosaeta concilii* (DSM 3671) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, erworben. *Thauera aromatica* wurde freundlicherweise von Herrn Boll, Freiburg, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Medien

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in einem Mineralsalzmedium kultiviert, das in einem speziell konstruierten Kolben (Widdel, 1980) hergestellt wurde. Die autoklavierten Medien wurden unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre (80:20, v/v) abgekühlt und mit 30 mM NaHCO₃ gepuffert. Anschließend wurden eine 7-Vitamine-Lösung (Pfennig, 1978), eine Selenit-Wolframat-Lösung und die Spurenelementlösung SL 10 (Widdel *et al.*, 1983) zugegeben. Der pH-Wert des Mediums wurde mit steriler HCl oder sterilem Na₂CO₃ auf pH 7,2 eingestellt. Das Medium für nitratreduzierende Bakterien basierte auf obigem Medium; allerdings wurde auf Sulfid als Reduktionsmittel verzichtet und 1 mM Na₂SO₄ als Schwefelquelle eingesetzt. Das Medium für sulfatreduzierende Bakterien basierte ebenfalls auf obigem Medium; es wurde Sulfid als Reduktionsmittel eingesetzt und 10 mM Na₂SO₄ als Elektronenakzeptor eingesetzt. Das Medium wurde in sterile Kulturgefäße abgefüllt und mit N₂/CO₂ (80:20, v/v) begast.

2.1.3 Kultivierungstechniken

Zellmaterial für physiologische und biochemische Experimente wurde in 12 l Steilbrustflaschen im fed-batch Verfahren herangezogen. Alle drei bis vier Tage wurden vier bis fünf Liter entnommen und durch neues Medium mit allen Zusätzen ersetzt.

Die Reinheit der Kulturen wurde während des Wachstums mikroskopisch kontrolliert sowie zusätzlich durch Wachstum auf Komplexmedium (0,1% Hefeextrakt, 5 mM Fumarat, 5 mM Pyruvat, 5 mM Glukose oder AC-Medium, 1:10 verdünnt) untersucht.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 Zellernte

Die Zellen wurden in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Dazu wurden die vier bis fünf Liter Zellkultur in eine Anaerobenkammer (Coy, Ann Arbor, Mich., USA) mit N₂/H₂-Atmosphäre (95:5, v/v) überführt und in Zentrifugenbecher aus Polypropylen verteilt, die mindestens 24 h in der Anaerobenkammer vorinkubiert waren, um den im Kunststoff gelösten Sauerstoff zu entfernen. Die Zellen wurden in einem GSA-Rotor in einer Sorvall RC5-B-Zentrifuge (Du Pont de Nemours, Bad Homburg) bei 10 000 g und Raumtemperatur 30 Minuten lang abzentrifugiert. Für Zellsuspensionsversuche wurde das Pellet in der Anaerobenkammer mit Medium ohne Substratzusatz gewaschen, für biochemische Untersuchungen wurden die Zellen in Tris/HCL Puffer (10 mM, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in weniger Medium bzw. Puffer aufgenommen und in Serumflaschen (8-120 ml) überführt. Die so erhaltenen Zellsuspensionen hatten einen Proteingehalt von 1-5 mg × ml⁻¹.

2.2.2 Zellsuspensionsversuche

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Zellsuspensionsversuche in 60 oder 120 ml Serumflaschen bei 28°C durchgeführt. Benzoat wurde aus anoxischen Stammlösungen zugeführt, für die Benzoat- und die Acetatanalyse wurden 250 µl Proben gezogen, für die Wasserstoff- und die Methananalyse wurden 0,3 ml Proben aus dem Gasraum entnommen. Für die Auftrennung radioaktiver Zwischenprodukte wurden 50 µl Proben gezogen.

2.2.2.1 Einsatz von Hemmstoffen

Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon (CCCP) wurde als Protonophor in Zellsuspensionsexperimenten eingesetzt. Von einer ethanolischen Stammlösung wurde jeweils 10 µl × ml⁻¹ im Testansatz (20-50 nmol × mg Protein⁻¹) eingesetzt. Zur Kontrolle wurde in Parallelansätzen 10 µl × ml⁻¹ Ethanol eingesetzt.

Bromethansulfonsäure (BES) wurde den Zellsuspensionen aus anoxischen wässrigen Stammlösungen als spezifischer Hemmstoff methanogener Bakterien in Konzentrationen von 5mM zugesetzt.

Molybdat in einer Konzentration von 5mM wurde zur Hemmung sulfatreduzierender Bakterien eingesetzt.

2.2.3 Herstellung von zellfreien Extrakten

2.2.3.1 Nicht-selektiver Zellaufschluß

Zellfreie Extrakte wurden anoxisch durch Aufschluß der dichten Zellsuspensionen (OD₅₇₈ = 5-10) in einer French-Press (Amicon Silver Springs, Maryland, USA) bei 136 MPa hergestellt. Der Aufschluß erfolgte durch drei- bis viermalige Passage und wurde mikroskopisch kontrolliert. Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation in einem SS-34 Rotor bei 5000 g abgetrennt. Der Überstand wurde mit

einer N₂-gespülten Spritze entnommen, in ein weiteres sauerstofffreies Serumfläschchen überführt und im Eisbad aufbewahrt.

2.2.3.2 Selektiver Zellaufschluß

Dichte Zellsuspensionen wurden in Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8,0) aufgenommen, der 0,5 mg Lysozym \times ml⁻¹ und 10 mM EDTA enthielt. Die Lysozym-Endkonzentration entsprach 2,5-5 μ g \times mg Zellprotein⁻¹. Die Zellen wurden für 30-45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lyse mikroskopisch kontrolliert.

Mußten die Zellen unter besonders schonenden Bedingungen aufgeschlossen werden, um die Lokalisation eventuell membranständiger Enzyme zu bestimmen, wurden die Zellen in Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8,0) aufgenommen, der neben 0,5 mg Lysozym \times ml⁻¹ und 10 mM EDTA 20% Saccharose (w/v) enthielt. Die Sphäroplasten wurden abzentrifugiert und zur Lyse in Tris/HCl-Puffer mit 10 mM Mg²⁺ aufgenommen.

2.2.4 Fraktionierung des zellfreien Extrakts

3 ml Saccharoselösung (20%, w/v) wurde mit 0,5 ml zellfreiem Extrakt, der weniger als 10 mg Protein \times ml⁻¹ enthielt, überschichtet und bei 100000 g 90 Minuten bei 4 °C in einer Optima TL-Ultrazentrifuge (Beckman Instruments) zentrifugiert. In der Anaerobenkammer wurde der Überstand, der die cytoplasmatische Fraktion darstellte, abgenommen. Das aus Membranbruchstücken bestehende Pellet wurde in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, einmal gewaschen, erneut abzentrifugiert und anschließend in demselben Puffer resuspendiert.

2.2.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Enzymaktivitäten wurden entweder spektroskopisch in kontinuierlichen Tests oder diskontinuierlich durch Quantifizierung von Substrat oder Produkt mittels HPLC-Analyse gemessen. Alle Aktivitäten wurden bei Raumtemperatur mit mindestens drei unabhängig voneinander hergestellten zellfreien Extrakten bzw. Extraktfraktionen bestimmt. Innerhalb der Meßreihen wurde darauf geachtet, ob die Enzymaktivität linear von der eingesetzten Proteinmenge abhing. Durch Kontrollen mit hitzedenaturiertem Extrakt wurde sichergestellt, daß die gemessenen Umsätze tatsächlich Protein-katalysiert waren.

2.2.5.1 Kontinuierliche Enzymtests

Um in spektrophotometrischen Tests Enzymaktivitäten anoxisch zu messen, wurden Halbmikroküvetten mit Normschliff verwendet, die mit Gummisepten verschlossen und anschließend mit N₂ begast wurden. Die anoxisch hergestellten Puffer und alle anderen Zusätze wurden mit gasdichten Unimetrics Mikroliter-Spritzen (Macherey-Nagel, Düren) zugegeben.

2.2.5.2 Diskontinuierliche Enzymtests

Diskontinuierliche Enzymtests wurden in N₂-begasten, mit Naturkautschuksepten verschlossenen 2 ml-Röhrchen durchgeführt. Alle Lösungen wurden, wie bei den kontinuierlichen Tests, mit Spritzen zugegeben. Nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von Substrat wurden in regelmäßigen Zeitintervallen mit Unime-

trics-Spritzen Proben von 100 μl gezogen, die in HPLC-Probengefäßen mit 400 μl 0,1 M H_3PO_4 abgestoppt und dabei gleichzeitig verdünnt wurden. Die Proben wurden entweder sofort mittels HPLC analysiert oder bei -20°C eingefroren.

2.2.5.3 Testansätze

Acyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.-) wurde diskontinuierlich in folgendem Testansatz gemessen: 20 mM Triethanolamin-Puffer (pH 8,0) oder 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,2), 10 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 1 mM CoASH und 1 mM des zu aktivierenden Substrats (2-Hydroxybenzoat, 3-Hydroxybenzoat, 4-Hydroxybenzoat, 2,5-Dihydroxybenzoat oder Benzoat). Kontinuierlich wurde die *Acyl-CoA-Synthetase* in einem gekoppelten Test mit Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40), Myokinase (EC 2.7.4.3) und Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) als Hilfsenzymen gemessen (Geissler *et al.*, 1988).

Der Nachweis einer *Acyl-CoA: Akzeptor-CoA-Transferase* (EC 2.8.3.-) wurde analog dem diskontinuierlichen Test zur Messung der *Acyl-CoA-Synthetase* durchgeführt. Es wurde jedoch kein ATP zugegeben. An Stelle von CoASH wurde Acetyl-CoA, Acetoacetyl-CoA oder Benzoyl-CoA als CoA-Donor angeboten.

Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (EC 1.3.99.7) wurde, nach Stams *et al.* (1984) modifiziert, wie folgt bestimmt: 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 % (w/v) Triton X-100, 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,1 mM Phenazinmethosulfat und 0,5 mM Glutaryl-CoA. Die Reduktion des Elektronenakzeptors $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ wurde bei 420 nm gemessen ($\epsilon_{420} = 0,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Glutaconyl-CoA-Decarboxylase (EC 4.1.1.70) wurde in einem gekoppelten Test gemessen. Der Testansatz enthielt 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,2), 0,1 % (w/v) Triton X-100, 20 mM NaCl, 2 mM DTE, 2 mM EDTA, 1 mM NAD^+ , 1 mM Acetylphosphat, 0,125 mM CoASH, 1 mM Na-Glutaconat und einen Satz von fünf Hilfsenzymen (*Acetyl-CoA:Glutaconat-CoA-Transferase*, *Crotonase*, *3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase*, β -*Ketothiolase* und *Phosphotransacetylase*; $0,2 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$), die aus *Acidaminococcus fermentans* isoliert worden waren (Buckel, 1986). Dieses Enzymgemisch wurde von Prof. Dr. W. Buckel, Marburg, zur Verfügung gestellt. Die Reduktion von NAD^+ wurde bei 334 nm verfolgt ($\epsilon_{334} = 6,11 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Gorny und Schink, 1993). Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Enzyms von Na^+ wurde der Puffer mit nahezu Na^+ -freien Komponenten ($\leq 50 \mu\text{g Na}^+ \times \text{g}^{-1}$) hergestellt und über eine mit 3 M KCl äquilibrierte Kationenaustauschersäule (Hi-Trap SP, 1 ml, Pharmacia) gegeben. Na-Glutaconat wurde durch eine mit KOH neutralisierte Glutaconylsäure-Lösung ersetzt. Alle Lösungen wurden in Quarz- oder Kunststoffgefäßen aufbewahrt, die vorher mit Millipore-Wasser ausgespült worden waren.

3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (EC 1.1.1.157) wurde über die Oxidation von NADH bei 365 nm gemessen. Der Ansatz enthielt 0,1 mM NADH und 0,3 mM Acetoacetyl-CoA in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,2) (modifiziert nach Bergmeyer, 1983).

D-Ketothiolase (EC 2.3.1.16) wurde spektrophotometrisch nach Lynen und Ochoa (1953) bestimmt. Die Abnahme von Acetoacetyl-CoA konnte anhand der charakteristischen Absorption des Acetoacetyl-CoA / Mg^{2+} -Komplexes bei 303 nm ($\epsilon_{303} = 14,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) verfolgt werden (Stern, 1956).

Acetatkinase (EC 2.7.2.1) und Phosphotransacetylase (EC 2.3.1.8) wurden nach Standardmethoden durch Kopplung an NADH-Oxidation gemessen (Bergmeyer, 1983). Propionatkinase wurde analog zur Acetatkinase gemessen.

Hydrogenase (EC 1.18.99.1) und Formiatdehydrogenase (EC 1.2.1.2) wurden über die Reduktion von Benzylviologen nach Zugabe des jeweiligen Substrats bestimmt (nach Diekert und Thauer, 1978).

Pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) wurde durch Messung des gebildeten Phosphats bestimmt (Jetten *et al.*, 1992).

Pyrophosphat wurde durch einen käuflich erwerblichen Enzym-Kit (Sigma) bestimmt. Dabei wurde das Pyrophosphat von einer Pyrophosphat-abhängigen Fruktose-6-phosphat-Kinase gespalten und über eine Aldolase, eine Triosephosphat-Isomerase und eine Glycerinphosphat-Dehydrogenase an die Oxidation von NADH/ H^+ gekoppelt. Diese wurde bei 340 nm verfolgt.

2,5-Dihydroxybenzoat-CoA Reduktase wurde diskontinuierlich im gekoppelten Test mit Acyl-CoA-Synthetase oder durch Zugabe von enzymatisch synthetisiertem Substrat (0,3 mM) gemessen. Der Testansatz enthielt: 50 mM HEPES- oder 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0), 2 mM DTE, 5 mM $MgCl_2$ und 0,1-1 mM Elektronen-Donator. Viologen-Derivate wurden entweder direkt durch Dithionit reduziert oder durch Zugabe von 10 mM Formiat unter Ausnutzung der im zellfreien Extrakt vorhandenen Formiat-Dehydrogenase. Im photometrischen Test wurde die Oxidation von reduziertem Benzyl- oder Methylviologen nach Zugabe von 0,3 mM Gentsyl-CoA bei 578 nm verfolgt.

Benzoyl-CoA-Reduktase wurde nach der Methode von Koch und Fuchs (1992) gemessen.

2.2.6 Proteinbestimmung

Um aus den Volumenaktivitäten, die in den einzelnen Enzymtests bestimmt worden waren, spezifische Enzymaktivitäten berechnen zu können, wurde die Proteinkonzentration der zellfreien Extrakte und Extraktfraktionen mit Hilfe von Testreagenzien von Pierce (Rockford, Ill., USA) bestimmt. Der Nachweis beruht auf folgendem Prinzip: In alkalischem Milieu reagiert Protein mit Cu^{2+} -Ionen unter Bildung von Cu^+ -Ionen, die mit je 2 Molekülen Bicinchoninischer Säure einen purpurfarbenen Komplex bilden (Bradford, 1976).

100 μ l Probe wurde mit 1 ml Testreagenz, das nach Vorschrift des Herstellers zusammengesetzt worden war, in 2 ml-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) im Wasserbad bei 60 °C 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Ansätze in Eiswasser abgekühlt wurden. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Von jeder zu untersuchenden Probe wurde der Proteingehalt in drei verschiedenen Verdünnungsstufen jeweils in Doppelbestimmungen quantifiziert.

Eine Eichgerade wurde mit Rinderserum-Albumin im Bereich von 0-250 μ g ml^{-1} erstellt.

Da die Reaktion in alkalischem Milieu ablief, war der Test auch für die Bestimmung des Proteingehalts von Zellsuspensionen geeignet, ohne die Zellen zuvor aufschließen zu müssen.

2.2.7 Isolierung von radioaktiv markierten Zwischenprodukten aus dem Benzoatstoffwechsel

50 µl Proben wurden mit Unimetrics-Spritzen aus dem Reaktionsgefäß (i. d. R. Durham-Röhrchen) entnommen und in HPLC-Vials überführt, in denen sich 4 µl 5 M KOH befand. Sofort anschließend wurden die Vials in flüssigen Stickstoff gelegt, so daß keine weitere Reaktion stattfand. Nach Entnahme der letzten Probe wurden die Vials zur Durchführung einer alkalischen Hydrolyse der gebildeten Thioester für 20 min in ein 80 °C heißes Wasserbad gegeben. Danach wurden sie mit 5 µl 5 M HCl angesäuert, erneut in flüssigem Stickstoff gefroren und dann lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit 20 µl Methanol versetzt und 5-10 µl wurden auf die DC-Platte aufgetragen.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Spektralphotometrie

Um die optische Dichte von Bakterienkulturen zu messen bzw. die Extinktionsänderung durch Enzymaktivitäten in kontinuierlichen Testverfahren zu bestimmen, wurde ein Einstrahl-Spektralphotometer U-1100 (Hitachi, Tokyo, Japan) verwendet. Die Änderung der Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit wurde mit einem SE-120 Metrawatt-Schreiber (BBC-Goerz, Wien, Österreich) aufgezeichnet. Aus der Steigung des Graphen konnte unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Aktivität des Enzyms berechnet werden.

UV-Absorptionsspektren im Bereich von 200 nm bis 350 nm wurden in Halbmikro-Quarzküvetten in einem Uvikon 930 Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Zürich, Schweiz) aufgenommen. Die aromatischen Verbindungen wurden in 100 mM Phosphorsäure, die ebenfalls als Referenz diente, verdünnt, wodurch sie vor Oxidation durch Luftsauerstoff geschützt wurden.

UV-Absorptionsspektren wurden ebenfalls herangezogen, um die Wellenlänge zu ermitteln, die geeignet war, um eine aromatische Verbindung in der HPLC-Analyse zu identifizieren.

Zur photometrischen Bestimmung von Konzentrationen wurde die Extinktion bei einer festen Wellenlänge in einem Uvikon 930 Spektralphotometer gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden konnten die den gemessenen Extinktionen entsprechenden Konzentrationen errechnet werden.

2.3.2 Fluoreszenzphotometrie

Fluorometrische Messungen wurden unter Anwendung von 2-8 µM 9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin (ACMA) durchgeführt. Bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm und einem Schlitz von 3 nm wurde die Emission bei 490 nm (Schlitz = 3 nm) in einem Perkin Elmer (Überlingen) Lumineszenz-Spektrometer LS 50 mit Rührzelle gemessen.

2.3.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.3.3.1 Reversed Phase-HPLC

Aromatische Verbindungen und CoA-Ester wurden durch Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in einer Beckman System Gold-Anlage (Beckman Instruments, München) analysiert. Die Anlage bestand aus zwei Hochdruck-Pumpen, Modell 116 bzw. 126, die die hochdruckseitige Mischung binärer Gradienten erlaubten, und einem UV/Vis-Detektor Modell 166 oder 167. Zur Trennung wurde im allgemeinen eine Ultrasphere ODS-Säule ($5 \mu \times 4,6 \text{ mm} \times 15 \text{ cm}$, Beckman Instruments) als stationäre Phase und ein Gemisch aus 100 mM Ammoniumphosphat-Puffer (pH 2,6) und Methanol als mobile Phase verwendet. Die Flußrate betrug $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Die Proben wurden entweder manuell über eine 20 μl - oder 50 μl -Probenschleife oder mit dem Autosampler Modell 502 (Beckman Instruments) aufgegeben. Die Auswertung erfolgte über Integration der Peaks durch die Auswerte-Software von Beckman-System Gold. Die Verbindungen wurden durch einen Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren mit denen bekannter Verbindungen identifiziert.

2.3.3.1.1 Aromatische Verbindungen

Alle carboxylierten einkernigen aromatischen Verbindungen wurden isokratisch getrennt. Je nach Hydrophobizität der Verbindung wurde der Methanol-Anteil zwischen 16 % und 50 % variiert. Detektiert wurde jeweils bei einem Absorptionsmaximum, das zuvor durch Aufnahme von UV-Spektren ermittelt worden war.

2.3.3.1.2 CoASH, aromatische und aliphatische CoA-Ester

Zur Analyse von CoASH und CoA-Estern wurde die Zusammensetzung der mobilen Phase durch folgenden Gradienten gesteuert: Start mit 10 % Methanol, 1 min nach der Injektion linearer Gradient auf 70 % Methanol in 6 min, nach 10 min Äquilibration der Säule mit 10% Methanol, nach 15 min Ende der Analyse.

Zur Trennung von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA wurde eine längere Ultrasphere ODS-Säule ($5 \mu \times 4,6 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$, Beckman Instruments) verwendet. Der Gradient der Zusammensetzung der mobilen Phase wurde entsprechend verlängert.

2.3.3.1.3 ATP, ADP und AMP

Adenosin-Derivate wurden mittels Ionenpaar-Chromatographie getrennt und bestimmt (Litters und Schmelzeisen-Redeker, 1989). Als stationäre Phase wurde eine Ultrasphere ODS-Säule ($5 \mu \times 4,6 \text{ mm} \times 15 \text{ cm}$, Beckman Instruments) verwendet. Eluiert wurde mit 80 mM KH_2PO_4 (mit 1 M KOH auf pH 6,0 eingestellt), 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in Methanol (77/23, v/v) als mobiler Phase und einer Flußrate von 1,25 ml/min. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.3.3.2 Ionenausschlußchromatographie

Fettsäuren wurden durch Ionenausschlußchromatographie getrennt. Eine Aminex[®] Ion Exclusion HPX-87H-Säule ($300 \text{ mm} \times 7,8 \text{ mm}$, Bio-Rad, Richmond, Cal., USA) wurde isokratisch mit 5 mM H_2SO_4 als Eluent bei einer Temperatur von 40 °C und einer Flußrate von $0,6 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$ betrieben. Detektiert wurde mit einem Refraktionsindexdetektor Typ ERC-7512 (Erma, Tokyo, Japan). 50 μl Probe wurde entweder manuell oder mit einem Intelligent Autosampler 851-AS (Jasco, Tokyo, Japan) aufgegeben.

2.3.4 Gaschromatographie

Um kurzketttige Fettsäuren, Methan und Kohlendioxid zu messen, wurde ein Vega 6000-Gaschromatograph (Carlo Erba, Mailand, Italien) eingesetzt. Detektiert wurde mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) mit den Brenngasen Wasserstoff ($30 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$) und Luft ($300 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$). Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit einem D-2000 Integrator (Merck-Hitachi, Darmstadt) oder durch die Auswerte-Software für HPLC (Beckman-System Gold) nach Umwandlung durch ein Analog-Digital-Interface AI 402 (Beckman Instruments). Die Peaks wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und Peakflächen mit externen Standards bekannter Konzentrationen identifiziert und quantifiziert.

2.3.4.1 Wasserstoff

Die Analyse geringer Wasserstoffmengen erfolgte mit einem Reduction Gas Detector RGD2 (Wolters, Düsseldorf). Am Quecksilberoxidbett des Detektors war ein Photometer angeschlossen, das bei einer Wellenlänge von 254 nm die Freisetzung von Quecksilberdampf infolge einer Oxidationsreaktion detektierte. Die Aufzeichnung erfolgte durch einen Shimadzu Integrator. Die Trennsäule ($1,8 \text{ m} \times 2 \text{ mm}$) war mit einem Molekularsieb (5 \AA , Serva, Heidelberg) gepackt. Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet ($25 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$).

Die Quantifizierung der Gasproben (50 μl) erfolgte durch Vergleich der Peak-Fläche mit der Retentionszeit und der Peak-Fläche von Gasgemischen bekannter Zusammensetzung.

2.3.4.2 Kurzkettige Fettsäuren

Zur Trennung flüchtiger Fettsäuren wurde eine gepackte Glassäule ($2 \text{ m} \times 2 \text{ mm}$; 60/80 mesh Carbopack C / 0,3 % Carbowax 20 M / 0,1 % H_3PO_4 , Supelco, Bellefonte, Pa., USA) bei 130°C betrieben. Als Trägergas

wurde Stickstoff ($40 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$) verwendet. Detektor und Injektor wurden bei einer Temperatur von 180°C betrieben. $100 \mu\text{l}$ Überstand einer abzentrifugierten Probe wurde unmittelbar vor der Analyse mit $5 \mu\text{l}$ 10 M Ameisensäure versetzt. Das Injektionsvolumen betrug $2 \mu\text{l}$.

2.3.4.3 Methan

Um Methan zu messen, wurde eine Glassäule ($2 \text{ m} \times 2 \text{ mm}$), die mit einem Molekularsieb (60/80 mesh Porapak N, 5 \AA , $0,2\text{-}0,25 \text{ mm}$ (Supelco)) gepackt war, bei einer Betriebstemperatur von 120°C eingesetzt. Detektor und Injektor wurden auf 150°C geheizt. Als Trägergas diente Stickstoff ($60 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$). Es wurde $100 \mu\text{l}$ Gasvolumen injiziert.

2.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der [Ring- ^{14}C]-Benzoessäure und ihrer Abbauprodukte erfolgte auf Kieselgel 60 F₂₅₄-Aluminiumplatten ($20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$, Schichtdicke $0,2 \text{ mm}$, Merck). Die Auftrennung wurde bei Raumtemperatur mit einem Laufmittelgemisch aus Diisopropylether/Butanol (75:25, %, v/v) durchgeführt (Laufmittelgemisch A). Alternativ wurde ein Laufmittelgemisch aus Toluol/Dioxan/Essigsäure (8/1/1, %, v/v) benutzt (Laufmittelgemisch B).

2.4.1 Detektion radioaktiver Abbauprodukte

2.4.1.1 Autoradiographie

[^{14}C]-markierte Substanzen auf Dünnschichtplatten wurden teilweise über Autoradiographie sichtbar gemacht. Hierbei wurden ein Röntgenfilm (Kodak, X-OMAT, Xar-351, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) für mindestens drei Tage im Dunkeln den Platten exponiert.

2.4.1.2 PhosphorImaging

Zur Detektion geringster Mengen radioaktiver durch dünnschichtchromatographische Verfahren aufgetrennter Benzoatabbauprodukte wurden die DC-Platten für mindestens 12 Stunden einem PhosphorImaging Screen ausgesetzt (Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics). Dieser wurde anschließend mit einem PhosphorImager (Molecular Dynamics) ausgewertet.

2.5 Berechnungen

Vor Abbruch eines jeden Experiments mit Bestimmung von $\Delta G'$ wurden die Konzentrationen von Benzoat, Acetat und Wasserstoff bestimmt. Da die pH-Werte nicht signifikant variierten ($< 0,2$ Einheiten) wurde die Protonenaktivität als konstant angenommen. Die Gibbs Freie Reaktionsenthalpie ($\Delta G'$) für den Benzoatabbau

unter Nicht-Standard-Bedingungen wurde unter Berücksichtigung der gemessenen Endkonzentrationen des Eduktes und der Produkte nach folgender Gleichung berechnet:

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + RT \ln \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]^3 [\text{H}_2]^3 [\text{HCO}_3^-]}{[\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-]}$$

Dabei ist $[\text{H}_2]$ der Wasserstoff-Partialdruck in Atmosphären [1 atm = 1,0129 bar], R ist die allgemeine Gas-konstante ($8,314 \text{ J} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$), T die Temperatur (alle Experimente wurden bei 301 Kelvin durchgeführt) und die Werte in eckigen Klammern sind die gemessenen Konzentrationen der beteiligten Reaktanden. Die Bicarbonatkonzentration entspricht in allen Experimenten 30 mM. Die Gibbsche Freie Reaktionsenthalpie unter Standardbedingungen (ΔG°) beträgt $+49,5 \text{ kJ} \times \text{mol Benzoat}^{-1}$ (Schink, 1992).

2.6 Chemikalien, Radiochemikalien und Gase

2.6.1 Chemikalien und Biochemikalien

Handelsübliche Chemikalien in p. a.-Qualität wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Biomol (Ilvesheim), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.6.2 Radiochemikalien

[Ring-UL- ^{14}C]-Benzoat lieferte teilweise die Firma Sigma (St. Louis, Mo., USA) und teilweise die Firma American Radiolabeled Chemicals Inc./Biotrend Chemikalien GmbH, Köln.

2.6.3 Gase

N_2O wurde von der Firma Linde (Unterschleißheim) bezogen. Alle anderen Gase und Gasgemische der Reinheitskategorie 5.0 stammten von Messer Griesheim (Ludwigshafen) und dem Sauerstoffwerk in Friedrichshafen.

3 Ergebnisse

3.1 Teil 1: Energetik des Benzoatabbaus auf der Ebene der syntrophen Beziehung zu einem methanogenen Partnerorganismus

3.1.1 Wachstumsexperimente

Benzoat wurde durch wachsende Mischkulturen von *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei* abgebaut. Während des Abbaus stand *S. gentianae* aufgrund der energetischen Bedingungen (Konzentrationen von Substrat und Produkten, pH, Temperatur) eine Freie Reaktionsenthalpie von -55 bis $-50 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ zur Verfügung. Der Abbau endete bei einer Restbenzoatkonzentrationen von $0,2 \text{ mM}$. Dies entspricht einer Gibbs-schen Freien Energie von $-44,7 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$. ABBILDUNG 3 zeigt ein typisches Beispiel des Benzoatabbaus und der Produktbildung in einer wachsenden Kultur. Alle weiteren Experimente wurden mit dichten Zellsuspensionen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit und die Umsatzraten zu erhöhen.

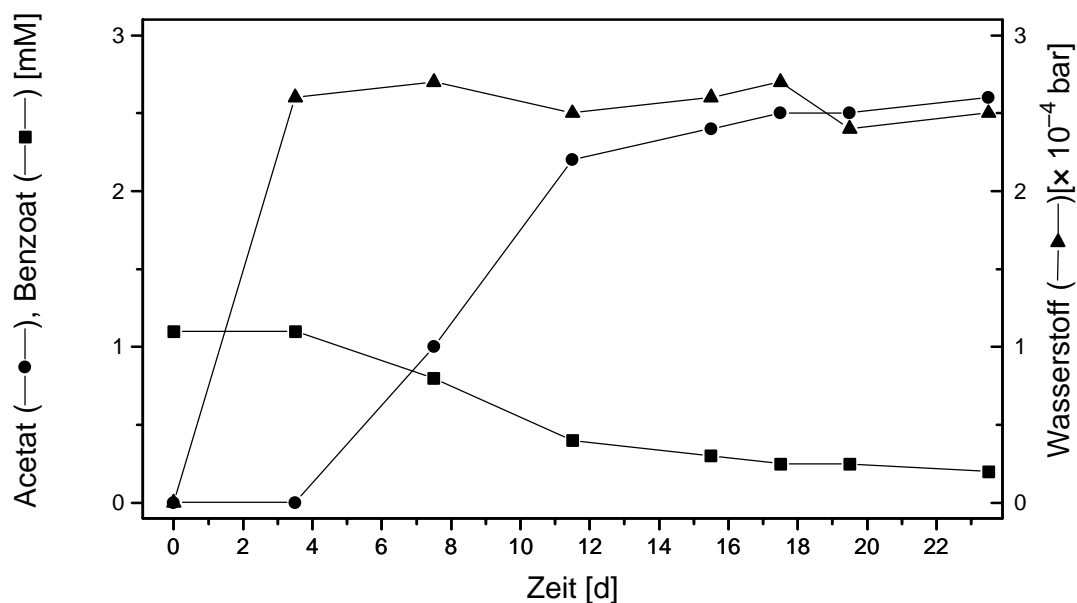


Abb. 3: Benzoatabbau und Acetatakkumulation durch eine wachsende Kokultur von *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei*

3.1.2 Experimente mit dichten Zellsuspensionen ohne Manipulation der Produktkonzentrationen

Dichte Zellkulturen von *S. gentianae* und *M. hungatei* bauten Benzoat mit einer Rate von $6,5 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ ab. Beim Abbau wurde Benzoat nur bis auf eine Restkonzentration (größer als $10 \mu\text{M}$) verstoffwechselt, auch nach Verlängerung der Inkubationszeit (zehn Tage). Dabei lag die für *S. gentianae* verbleibende Reaktionsenthalpie zwischen $-43,2$ und $-30,5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$. TABELLE 1a zeigt repräsentative Werte der Endkonzentrationen vom Substrat und den Produkten, ausgehend von verschiedenen Benzoat-Anfangskonzentrationen. In weiteren Experimenten wurden die Konzentrationen der Produkte Wasserstoff und Acetat manipuliert, um Erklärungen für die gefundenen Benzoat-Restkonzentrationen zu finden.

Tab. 1 Endkonzentrationen von Benzoat und den Abbauprodukten, die nach Abbau von Benzoat in dichten Zellsuspensionen von *Syntrophus gentianae* mit *Methanospirillum hungatei* erreicht wurden.

a) ohne Zugabe von BES, b) mit Zugabe von BES

| Acetat, Anfang [mM] | Benzoat, Anfang [mM] | Acetat, Ende [mM] | Benzoat, Ende [mM] | P _{H₂} [bar] | verbleibendes ΔG' [kJ · mol ⁻¹] |
|---------------------|----------------------|-------------------|--------------------|----------------------------------|---|
| a | | | | | |
| 0,3 | 0,95 | 3,2 | < 0,01 | 4,8×10 ⁻⁵ | > -43,2 |
| 0,1 | 2,2 | 6,3 | 0,023 | 0,9×10 ⁻⁴ | -40,6 |
| 0 | 3,3 | 9,7 | 0,01 | 6,2×10 ⁻⁵ | -38,2 |
| 0,1 | 3,9 | 12,2 | 0,072 | 1,1×10 ⁻⁴ | -36,9 |
| 0 | 5,17 | 15,3 | 0,028 | 8,7×10 ⁻⁵ | -34,6 |
| 0,1 | 5,85 | 17,8 | 0,012 | 6,9×10 ⁻⁵ | -33,1 |
| 0 | 8,3 | 21,9 | 0,937 | 7,3×10 ⁻⁵ | -30,5 |
| b | | | | | |
| 0,3 | 14,2 | 3,75 | 12,9 | 9,5×10 ⁻⁴ | -42,6 |
| 0,1 | 17,6 | 2,5 | 16,8 | 1,4×10 ⁻³ | -43,3 |
| 0 | 19 | 1,1 | 18,6 | 2,9×10 ⁻³ | -44,3 |
| 0,1 | 24,3 | 0,25 | 24,2 | 1,3×10 ⁻² | -44,8 |

3.1.3 Manipulation des Wasserstoff-Partialdrucks

Nach Zugabe von 5 mM BES, einem Inhibitor des Metabolismus methanogener Archaea, zu den Zellsuspensionen akkumulierte Wasserstoff zu Partialdrücken im Bereich von 10⁻³ bis 10⁻² bar (TABELLE 1b). Wurde der Wasserstoff-oxidierende Sulfatreduzierer *Desulfovibrio desulfuricans* CSN zu den BES-gehemmten Co-kulturen gegeben, sank der Wasserstoff-Partialdruck auf Werte um 4 × 10⁻⁶ bar. Dies ermöglichte somit einen weiteren Benzoatabbau. Bei Erreichen der neuen Gleichgewichtssituation lag die Benzoatkonzentration unter der Meßgrenze (ABBILDUNG 4). Dementsprechend lagen die Gibbsschen Freien Reaktionsenthalpien unter denen der Versuche mit rein methanogenen Mischkulturen (TABELLE 2).

Tab. 2. Endkonzentrationen von Benzoat und dessen Abbauprodukten in Benzoat-abbauenden Cokulturen von *Syntrophus gentianae* mit *Methanospirillum hungatei*, die durch BES gehemmt waren, nach Zugabe von *Desulfovibrio desulfuricans* CSN.

| Acetat, Anfang [mM] | Benzoat, Anfang [mM] | Acetat, Ende [mM] | Benzoat, Ende [mM] | P _{H₂} [bar] | verbleibendes ΔG' [kJ · mol ⁻¹] |
|---------------------|----------------------|-------------------|--------------------|----------------------------------|---|
| 0 | 1,57 | 4,7 | < 0,01 | 3,4×10 ⁻⁶ | > -65,2 |
| 0 | 2,09 | 6,3 | < 0,01 | 5,2×10 ⁻⁶ | > -59,8 |
| 0,1 | 4,1 | 12,2 | < 0,01 | 2,6×10 ⁻⁶ | > -60,1 |
| 0,1 | 6,3 | 18,7 | < 0,01 | 4,2×10 ⁻⁶ | > -53,3 |

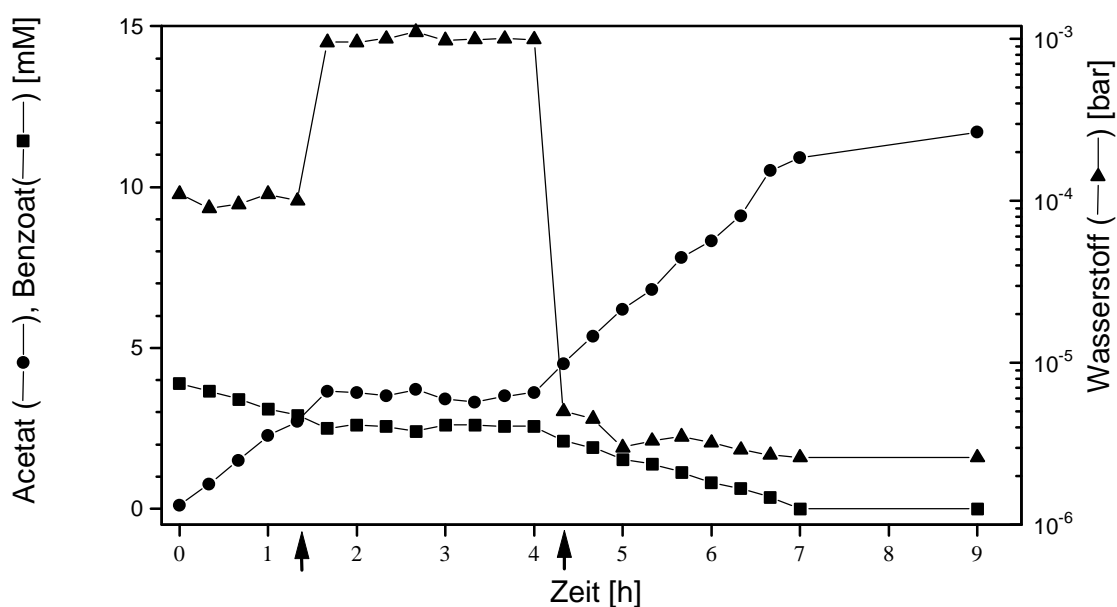


Abb. 4: Auswirkung der Zugabe von *Desulfovibrio desulfuricans* CSN auf eine Benzoat-abbauende Cokultur von *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei* in Gegenwart von 5 mM BES. Der Pfeil bei t = 1,3 h indiziert die Zugabe von BES, der Pfeil bei t = 4,3 h indiziert die Zugabe des Stamms CSN.

In Cokulturen von *S. gentianae* und *D. desulfuricans* in Abwesenheit von *M. spirillum* lag die Benzoatkonzentration zum Zeitpunkt, an dem keine Erhöhung der Acetatkonzentration festgestellt werden konnte, ebenfalls unter der Meßschwelle. Hemmung des Sulfatreduzierers durch 5 mM Molybdat bewirkten einen erhöhten Wasserstoff-Partialdruck (bis zu

$7,5 \times 10^{-3}$ bar) und das Ende des Benzoatabbaus. Die $\Delta G'$ -Werte lagen zwischen $-45,0$ und $-42,5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$.

3.1.4 Manipulation der Acetatkonzentration

Da sowohl Wasserstoff als auch Acetat in einer Stöchiometrie von drei Mol pro Mol Benzoat produziert werden, ist eine thermodynamische Hemmung durch Acetat genauso wahrscheinlich wie durch Wasserstoff. Die Entfernung von Acetat aus dem Gleichgewicht einer zum metabolischen Stillstand gekommenen Cokultur durch Zugabe des acetiklastischen Methanogenen *Methanosaeta concilii* resultierte in einer weiteren Verstoffwechslung von Benzoat (ABBILDUNG 5).

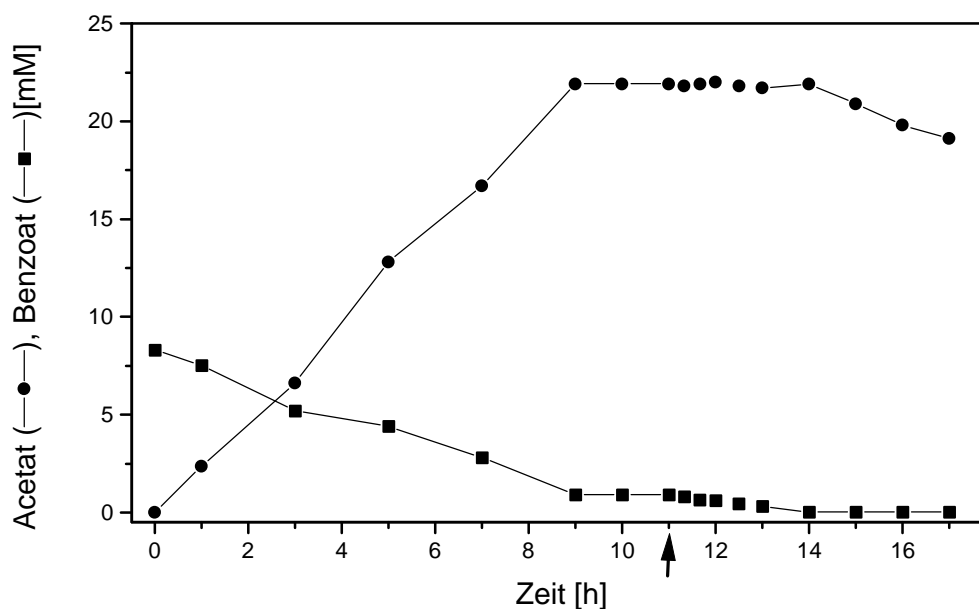


Abb. 5: Auswirkung des Acetatabbaus durch *Methanosaeta concilii* auf eine Benzoat-abbauende Cokultur von *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei*, die eine detektierbare Benzoat-Grenzkonzentration zeigt. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Zugabe von *Msa. concilii* an.

Dieser Effekt konnte nicht nur bei methanogenen Cokulturen festgestellt werden, sondern war auch bei sulfatreduzierenden Cokulturen beobachtbar, die durch Zugabe von Molybdat gehemmt waren: Benzoat wurde weiter abgebaut, bis eine minimale restliche Gibbsche Freie Reaktionsenthalpie von $-45,8 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ im System erreicht war (ABBILDUNG 6).

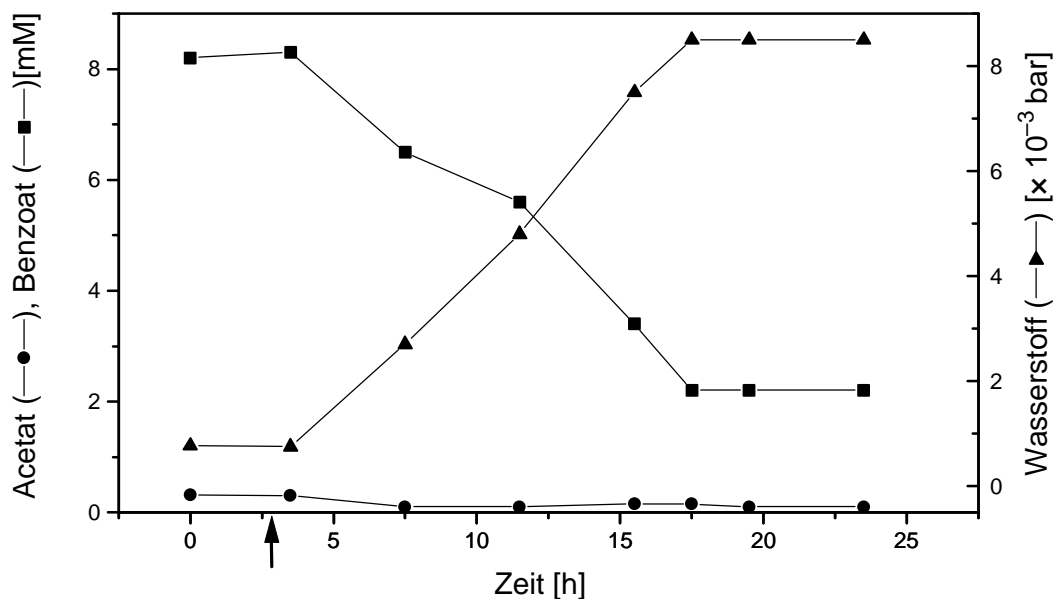


Abb. 6: Auswirkung der Zugabe einer dichten Zellsuspension von *Methanosarcina concilii* zu einer mit Molybdat gehemmten, Benzoat-abbauenden Cokultur von *Syntrophus gentianae* und *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. Der Pfeil indiziert den Zeitpunkt der Zugabe von *Msa. concilii*.

Acetatzugaben zu sulfatreduzierenden Cokulturen in Konzentrationen von 20, 40, 60, oder 80 mM bewirkten keine Erhöhung der verbleibenden Benzoat-Restkonzentrationen in den meßbaren Bereich.

3.1.5 Korrelation zwischen Acetatkonzentration und $\Delta G'$

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die für den Benzoatvergärer zur Verfügung stehende Gibbsche Freie Reaktionsenthalpie am Ende des Benzoatabbaus mit der Acetatkonzentration zum Ende des Abbaus variiert. Dies gilt sowohl für methanogene als auch für sulfatreduzierende Cokulturen. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Acetatkonzentration zu Ende des Benzoatabbaus und der Gibbschen Freien Reaktionsenthalpie festgestellt werden: Höhere Acetatkonzentrationen korrelierten mit höheren $\Delta G'$ -Werten (ABBILDUNG 7).

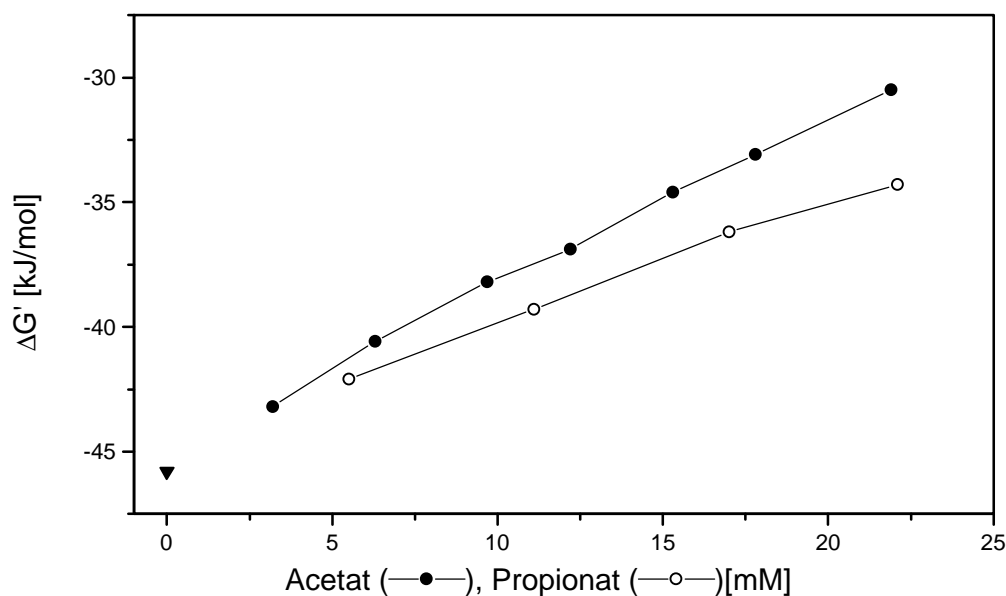


Abb. 7: Auswirkung steigender Endkonzentrationen von Acetat auf $\Delta G'$ auf eine Benzoat-abbauende Cokultur von *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei* bzw. auf eine Benzoat-abbauende Cokultur von *Syntrophus gentianae* und *Desulfovibrio desulfuricans* CSN (P). Auswirkung von Propionatzugaben verschiedener Konzentration auf $\Delta G'$ zum Zeitpunkt keines weiteren Benzoatabbaus durch die Benzoat-abbauende Cokultur von *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei*.

Die Korrelationen zwischen $\Delta G'$ und den Endkonzentrationen des Acetats in BES-gehemmten und nicht gehemmtten Cokulturen waren ähnlich. Die gleiche Korrelation konnte auch mit sulfatreduzierenden Cokulturen gezeigt werden, die durch Molybdat gehemmt waren.

Externe Zugaben von Natriumacetat (50 mM) oder Natriumpropionat (50 mM) zeigten ebenfalls eine auf den Benzoatabbau hemmende Wirkung. Die Zugaben verkleinerten außerdem die Raten, mit denen Benzoat abgebaut werden konnte: Die Rate sank von $6,5 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ auf $3,1 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ bzw. auf $0,83 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ bei Zugabe von 50 mM Propionat bzw. Acetat. Zugaben von Propionat (50 mM) zu benzoatabbauenden Cokulturen zeigten einen ähnlichen Effekt auf $\Delta G'$ am Endpunkt des Abbaus wie Acetat, jedoch weniger deutlich (ABBILDUNG 7). Im Gegensatz dazu zeigten Natriumchloridzugaben (50 mM) keinerlei Effekt.

Zugaben von 2 nmol CCCP pro mg Protein zu BES-gehemmten methanogenen Cokulturen bewirkten einen weiteren Abbau des Benzoats. Die Gibbsche Freie Reaktionsenthalpie zu Ende des durch CCCP bewirkten Benzoatabbaus lag bei $-31 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ (ABBILDUNG 8). Kontrollansätze, die nur Ethanol enthielten, zeigten keinerlei Effekt.

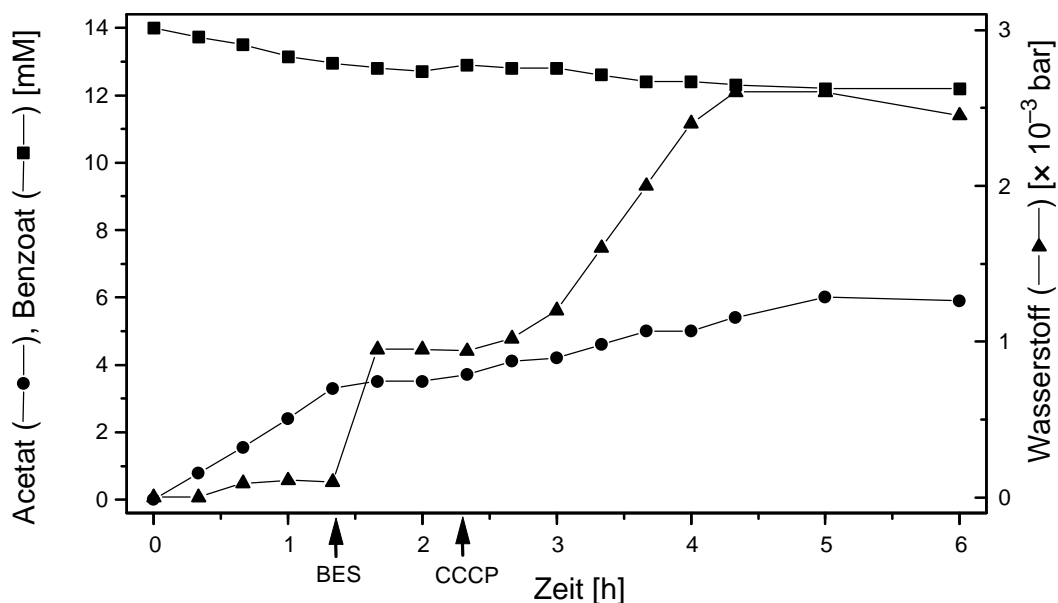


Abb. 8: Auswirkung der Zugabe von $2 \text{ nmol CCCP} \times \text{mg Protein}^{-1}$ zu einer BES inhibierten Benzoatabbauenden Kokultur von *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei*. Der Pfeil bei $t = 1,3 \text{ h}$ indiziert den Zeitpunkt der Zugabe von BES, der Pfeil bei $t = 2,3 \text{ h}$ indiziert den Zeitpunkt der Zugabe von CCCP.

3.2 Teil 2: Identifizierung von Zwischenprodukten des Benzoatabbaus durch *Syntrophus gentianae*

3.2.1 Experimente zur Bestimmung von Zwischenprodukten mittels [Ring- ^{14}C]-Benzoat

Zu dichten Zellkulturen wurde [Ring- ^{14}C]-Benzoat als einzige Kohlenstoffquelle gegeben. In Vorversuchen bei Raumtemperatur konnte jedoch trotz minimalem zeitlichem Abstand zwischen den einzelnen Probenahmen keine zeitliche Auflösung erreicht werden. Schon in der

ersten Probe wurden mehrere radioaktiv markierte Zwischenprodukte gefunden. Daraufhin wurde die Versuchstemperatur auf 8 °C erniedrigt. Bei dieser Temperatur konnte eine zeitliche Auflösung der Zwischenprodukte erreicht werden. Hierbei wurde jede Probe zum Abstoppen der Reaktion in einem HPLC-Gefäß mit NaOH versetzt, und dieses wurde in flüssigen Stickstoff gegeben. Zur Freisetzung der Säuren aus den Thioestern wurden diese anschließend alkalisch hydrolysiert. In den ABBILDUNGEN 9a und 9b sind die Autoradiogramme nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Produkte vergleichend dargestellt. Nach Umsatz von [Ring-¹⁴C]-Benzoat wurde in verschiedenen Ansätzen ein für *Syntrophus gentianae* typisches Produktmuster gefunden. Dieses setzte sich aus weniger polaren (höhere R_F-Werte als Benzoesäure) Produkten und polareren (niedrigere R_F-Werte) Produkten zusammen. Erstere entstehen aus der Reduktion von Benzoyl-CoA, letztere sollten nach der aufgestellten Arbeitshypothese aus den polaren Produkten durch Wasseranlagerung, anaerobe Oxidation und hydrolytische Ringöffnung entstehen. Zum Vergleich wurden zellfreie Extrakte aus *Thauera aromatica* aus *in vivo* Versuchen und Zwischenprodukte aus *in vitro* Versuchen mit [Ring-¹⁴C]-Benzoat auf die DC-Platte aufgetragen.

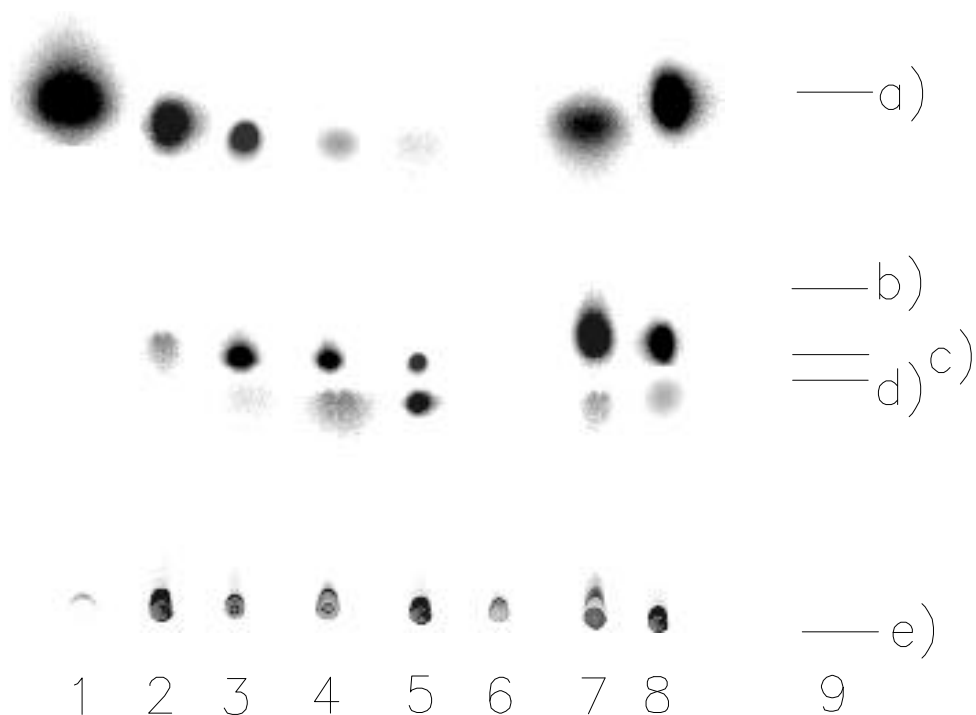


Abb. 9a: Autoradiogramm der durch DC (Laufmittel A, Diisopropylether/Butanol, 75:25, %, v/v) aufgetrennten Zwischenprodukte des Benzoatabbaus durch *Syntrophus gentianae* im Vergleich zu dem von *Thauera aromatica*. Aufgetragen wurde auf den jeweiligen Bahnen: 1) Benzoesäure-Standard; 2) – 6): Zwischenprodukte aus *S. gentianae*, 2) nach 0,5 min, 3) nach 2 min, 4) nach 4 min, 5) nach 7 min 6) nach 7 min, aber nicht hydrolytisch gespalten; 7) – 8): Zwischenprodukte aus *T. aromatica*, 7) *in vivo*, nach 7 min, 8) *in vitro* nach 5 min. Bahn 9 gibt schematisch die R_f -Werte folgender Substanzen wieder: a) Benzoesäure, b) Pimelinsäure, c) *cis*-2-Hydroxycyclohexan-carboxyl-säure, d) *trans*-2-Hydroxycyclohexancarboxyl-säure, e) Startlinie. Die R_f -Werte stammen aus: Koch und Fuchs, 1992

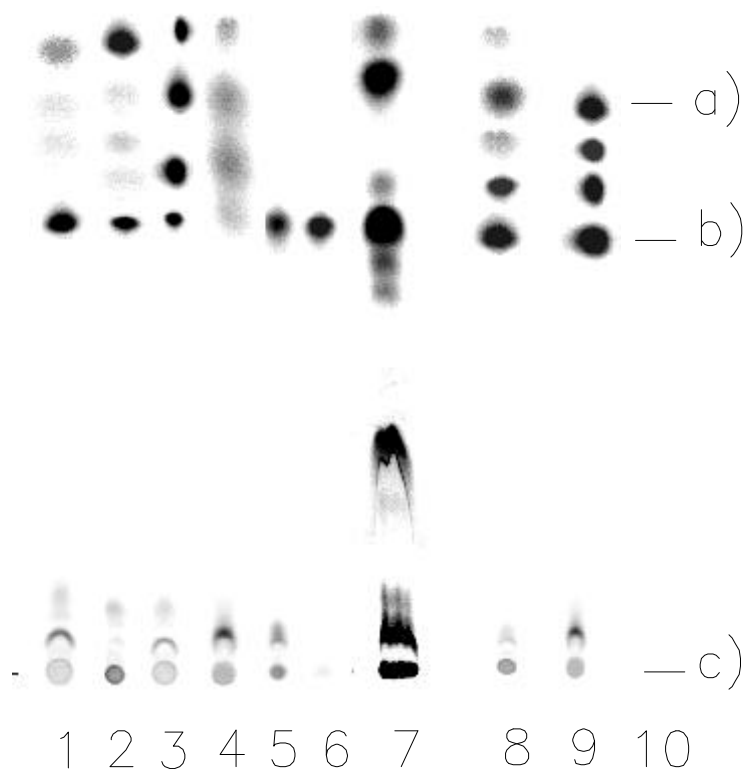


Abb. 9b: Autoradiogramm der durch DC (Laufmittel B, Toluol/Dioxan/Essigsäure, 8/1/1, %, v/v) aufgetrennten Zwischenprodukte des Benzoatabbaus durch *Syntrophus gentianae* im Vergleich zu dem von *Thauera aromatica*. Aufgetragen wurde auf den jeweiligen Bahnen: 1) – 5): Zwischenprodukte aus *S. gentianae*, 1) nach 0,5 min, 2) nach 2 min, 3) nach 4 min, 4) nach 7 min 5) nach 7 min, aber mit für 10 min auf 100 °C erhitzten Zellen; 6) Benzoesäure-Standard; 7) nach 10 min, aber in der 5. Minute durch BES gehemmte Mischkultur von *S. gentianae* und *Msp. hungatei* 8) – 9): Zwischenprodukte aus *T. aromatica*, 8) *in vivo*, nach 7 min, 9) *in vitro*, nach 5 min. Bahn 10 gibt schematisch die R_f -Werte folgender Substanzen wieder: a) Cyclohex-1-encarboxylsäure, b) Benzoesäure c) Startlinie

Auffällig ist die Entstehung eines Produktes aus Benzoat, das deutlich unpolarer ist als Cyclohex-1-encarbonsäure (ABBILDUNG 9b). Es ist bei den Vergleichssubstanzen, die durch *Thauera aromatica* produziert wurden, nicht vorhanden. Dieser Befund zeigt möglicherweise einen Unterschied im Stoffwechsel der beiden Bakterienarten an. Weiterhin ist es interessant, daß diese sehr unpolare Substanz offenbar als erstes Abbauprodukt (Reduktionsprodukt) im Benzoatabbau auftaucht. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zum Laufverhalten von kommerzieller Cyclohexancarboxylsäure ergaben, daß diese den gleichen R_f -Wert hat wie das gefundene Produkt. Neben dieser hochgradig unpolaren Substanz entstehen zwei weitere Zwischenprodukte, die unpolarer sind als Benzoat, wohl aber polarer als das unpolarste Zwischenprodukt. Zwischenprodukte mit gleichen R_f -Werten wurden auch bei den Versuchen mit *Thauera aromatica* gefunden. Bei den Zwischenproduk-

ten aus *Syntrophus gentianae*, die polarer als Benzoat sind, wurden gleiche R_f -Werte gefunden wie bei denen aus *Thauera aromatica*, was darauf schließen läßt, daß es sich um identische Produkte handelt. Sie sind identisch mit denen von den Vergleichsubstanzen *cis*-2-Hydroxycyclohexan-carboxylsäure und *trans*-2-Hydroxycyclo-hexancarboxylsäure. Pimelinsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Versuche, einen von Koch und Fuchs (1992) entwickelten *in vitro* Enzymtest für die Benzoyl-CoA-Reduktase auf zellfreie Extrakte von *S. gentianae* anzupassen, schlugen fehl. Obwohl das Testsystem an sich funktionierte (wie Versuche mit *T. aromatica* Extrakten bewiesen) konnte auch ein Variieren der Konzentrationen der beteiligten Reaktanden und der Menge des zellfreien Extraktes sowie die Verwendung verschiedener artifizierender Elektronendonoren (Dithionit, Ti(III)-citrat, Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum*) nicht zum Erfolg verhelfen. Eine Abnahme an eingesetztem Benzoyl-CoA war nicht meßbar.

3.3 Teil 3: Messung einzelner Enzyme in zellfreien Extrakten von *Syntrophus gentianae*

3.3.1 Übersicht über die gemessenen Enzyme

Im weiteren sind die Ergebnisse aus Versuchen dargestellt, bei denen einzelne Enzyme gemessen wurden. TABELLE 3 gibt eine Übersicht:

Tab. 3: Übersicht über Enzymaktivitäten von *Syntrophus gentianae*, der in Cokultur mit *Methanospirillum hungatei* auf Benzoat gezogen wurde

| Enzym | Spezifische Aktivität ¹⁾ [nmol × min ⁻¹ × mg Protein ⁻¹] |
|-------------------------------------|---|
| Acetat Kinase | 20 (4) |
| Propionat Kinase | < 1 |
| Phosphotransacetylase | 57 (7) |
| Hydrogenase ²⁾ | 1900 (90) |
| Formiat Dehydrogenase ²⁾ | 66 (4) |
| Benzoyl-CoA-Transferase | n. d. ³⁾ |
| Benzoyl-CoA-Ligase | 210 (5) |
| Glutaryl-CoA-Dehydrogenase | 155 (12) |
| Glutaconyl-CoA-Decarboxylase | 48 (4) |
| Pyrophosphatase | 1210 (70) |
| β-Ketothiolase | 5300 (67) |
| 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase | 5374 (62) |

1) in Klammern: Standardabweichung bei n = 5

2) mit Benzylviologen als Elektronendonator gemessen

3) n. d.: nicht detektierbar

Neben Reaktionen zur Modifikation aromatischer Verbindungen wurden durch zellfreien Extrakt von *Syntrophus gentianae* weitere Umsetzungen katalysiert, die die Oxidation des Substrates bis auf die Stufe von Acetat

ermöglichten. Glutaryl-CoA-Dehydrogenase und Glutaconyl-CoA-Decarboxylase wurden ebenso nachgewiesen wie Enzyme der β -Oxidation von Fettsäuren (TABELLE 3). Im Gegensatz zu den spezifischen Aktivitäten der genannten Enzyme, die meist um Größenordnungen über der berechneten *in vivo*-Aktivität von $54 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ lagen, wurden für Phosphotransacetylase und Acetatkinase durchweg sehr niedrige Werte gemessen. Acetatkinase wurde nur nach Abzentrifugation der Zellmembran in Gegenwart des ATPase-Hemmstoffs DCCD erfaßt. Eine reversible, ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase konnte nicht nachgewiesen werden. In TABELLE 3 wurden die spezifischen Aktivitäten zusammengestellt. Die Aktivitäten der Formiatdehydrogenase und der Hydrogenase wurden zur Bestimmung der Gentsyl-CoA-Reduktase im diskontinuierlichen Ansatz genutzt. Es konnten jedoch weder eine ATP-regenerierende Benzoatkinase noch eine Benzoyl-CoA-Akzeptor:CoA-Transferase gemessen werden.

3.3.2 Eigenschaften der Acyl-CoA-Transferase

Im zellfreien Extrakt konnte keine Acyl-CoA-Transferaseaktivität gemessen werden. Bei dem Versuch, sie nachzuweisen, wurden verschiedene Donor-Akzeptor-Kombinationen getestet, doch konnte bei keiner Kombination eine detektierbare Aktivität gefunden werden (TABELLE 4).

Tab. 4: Spezifische CoA-Transferase-Aktivität in zellfreien Extrakten von *S. gentianae* nach Wachstum in syntropher Kokultur

| CoA-Donor | CoA-Akzeptor | Spezifische Aktivität [$\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$] | |
|-----------------|--------------|---|--------------------|
| Benzoyl-CoA | Gentisat | n.d. ¹⁾ | |
| | Acetat | n.d. | |
| Acetyl-CoA | Gentisat | n.d. | |
| | Benzoat | n.d. | |
| Acetoacetyl-CoA | Gentisat | n.d. | |
| | Benzoat | n.d. | |
| 1) | n.d. | = | nicht detektierbar |

Daraufhin wurde der zellfreie Extrakt auf eine Acyl-CoA-Ligase-Aktivität getestet.

3.3.3 Eigenschaften der Acyl-CoA-Ligase

Im zellfreien Extrakt aus syntroph auf Benzoat gewachsenen Zellen von *Syntrophus gentianae* wurden Acyl-CoA-Ligaseaktivitäten gemessen. Benzoat wurde mit relativ hoher Geschwindigkeit zum entsprechenden Ester umgesetzt (ABBILDUNG 10).

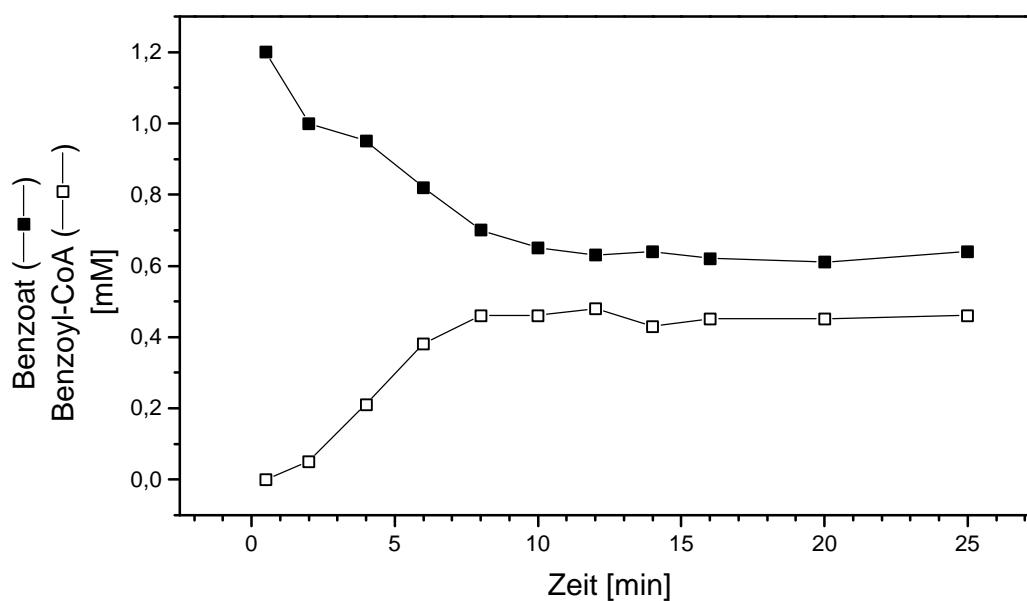


Abb. 10: Die Abbildung zeigt das Verhältnis von Abnahme Benzoat zu Zunahme Benzoyl-CoA aufgrund der Benzoyl-CoA-Ligase-Aktivität in zellfreien Extrakten von *Syntrophus gentianae*. Die Identifikation des CoA-Esters erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.3.1.2 beschrieben.

Dabei wurde ATP zu AMP und Pyrophosphat umgesetzt. Pro Mol gebildetem Benzoyl-CoA wurde dabei ein Mol ATP umgesetzt.

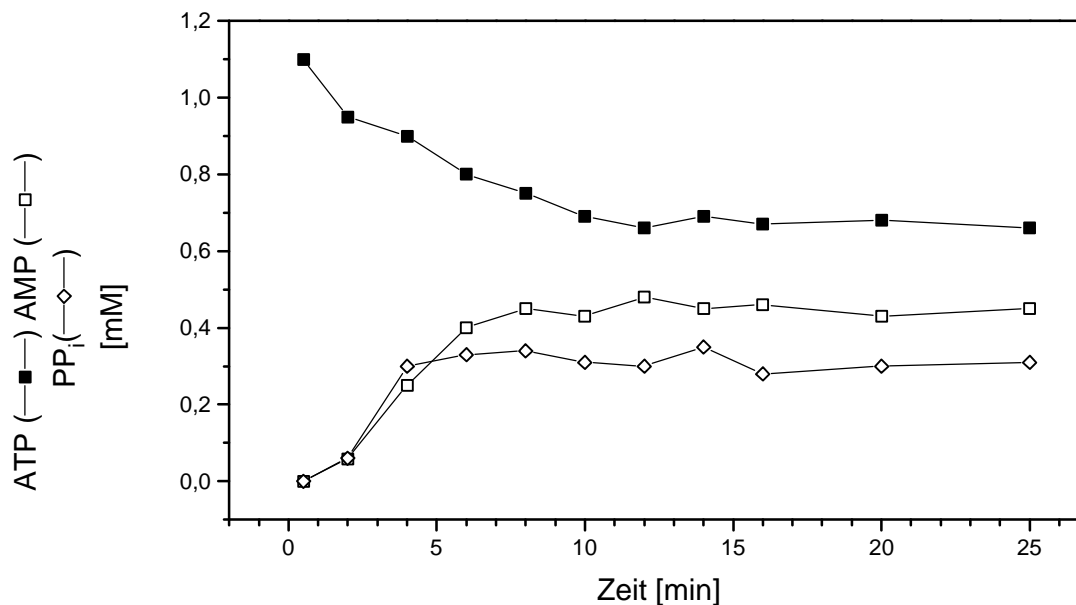
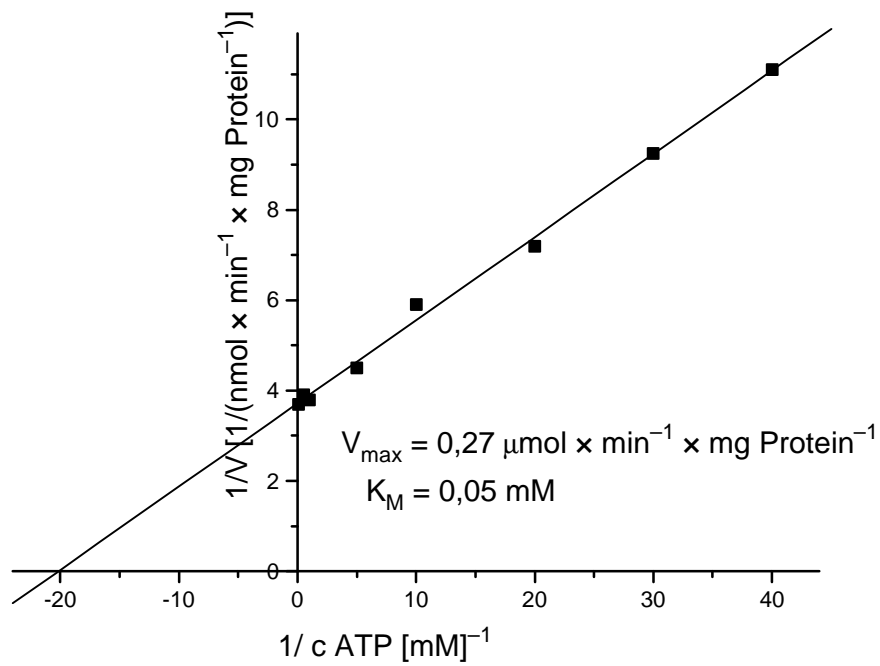
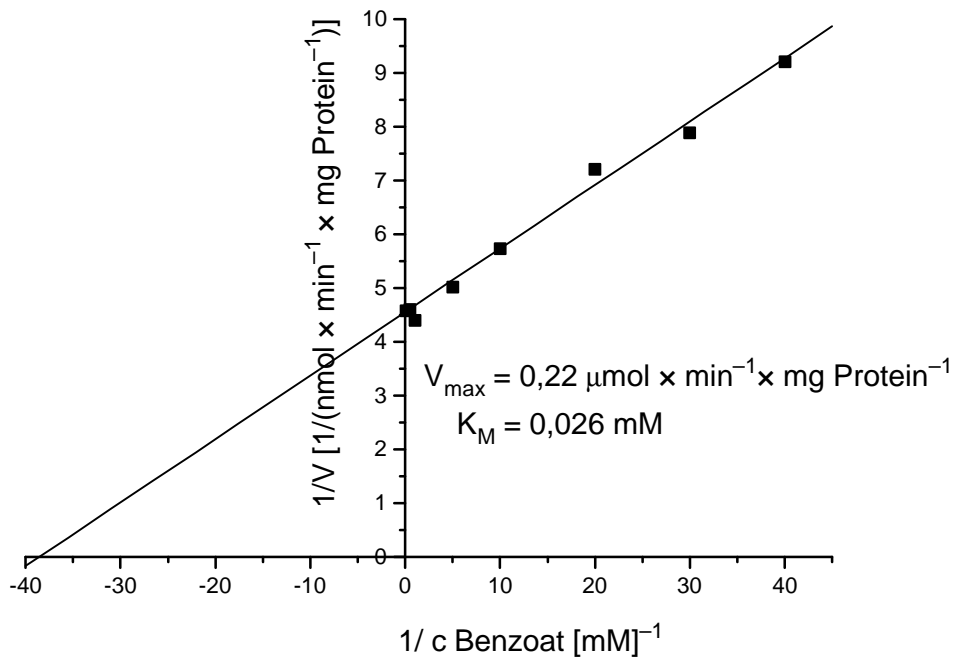


Abb. 11: Die Abbildung verdeutlicht die Abnahme von ATP unter Bildung von AMP und Pyrophosphat bei der Benzoyl-CoA-Ligase-Aktivität im zellfreien Extrakt.

Die Reaktion war über einen Zeitraum von 5-6 min linear. Neben Benzoat wurden auch Gentsiat, Salicylat und 3-Hydroxybenzoat in einer AMP-bildenden CoA-Ligasereaktion aktiviert. Die Umsatzgeschwindigkeiten mit den beiden zuletzt genannten Substraten lagen mit ca. $15 - 20 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ um den Faktor 10 unter den mit den anderen aromatischen Säuren gemessenen Werten. In TABELLE 5 wurden die spezifischen Aktivitäten zusammengefaßt. Der apparente K_M -Wert für Benzoat betrug $2,6 \text{ } \mu\text{M}$ (ABBILDUNG 12), V_{max} betrug $0,22 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Tab. 5: Eigenschaften der Benzoyl-CoA-Ligase in zellfreien Extrakten von *S. gentianae* nach Wachstum in syntropher Kokultur

| Substrat | K_M (mM) | V_{max} ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$) |
|----------|------------|---|
| Benzoat | 0,026 | 0,22 |
| ATP | 0,05 | 0,27 |
| CoA-SH | 0,8 | 0,25 |



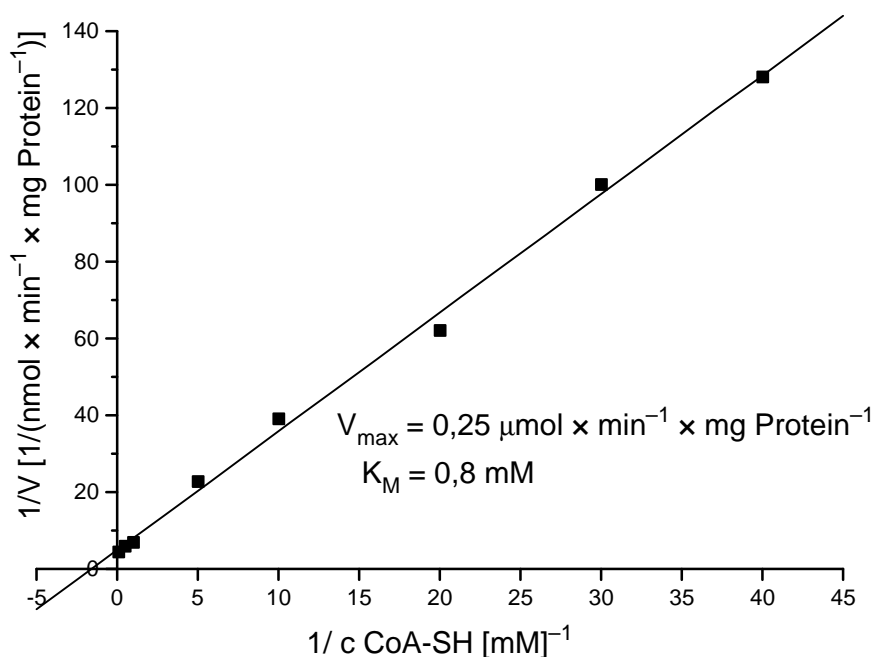


Abb. 12: Michaelis-Menten-Auftragung der Benzoyl-CoA-Ligase-Aktivität aus *Syntrophus gentianae* zur Bestimmung von K_M (Benzoat) und V_{max}

Tab. 6: Spezifische Acyl-CoA-Ligase-Aktivität in zellfreien Extrakten von *S. gentianae* nach Wachstum in syntropher Kokultur

| Enzym | Spezifische Aktivität ¹⁾ [nmol x min ⁻¹ x mg Protein ⁻¹] |
|-----------------------------|---|
| Benzoyl-CoA-Ligase | 210 (5) |
| 2-Hydroxybenzoat-Ligase | 15 (2) |
| 3-Hydroxybenzoat-Ligase | 22 (1) |
| 4-Hydroxybenzoat-Ligase | < 0,2 |
| 2,5-Dihydroxybenzoat-Ligase | 174 (15) |

1) in Klammern: Standardabweichung bei n = 5

3.3.4 Eigenschaften der Pyrophosphatase

3.3.4.1 Membranständigkeit der Pyrophosphatase

Da es sich bei *Syntrophus gentianae* um ein Bakterium handelt, das mit sehr wenig Energie auskommen muß, schien es lohnend zu untersuchen, ob die Energie, die bei der Spaltung von Pyrophosphat frei wird, koserviert werden kann. Es stellte sich also die Frage, ob es eine membrangebundene Pyrophosphatase gibt, die Ionen, z. B. Protonen über die Membran transloziert. Zunächst wurde eine Pyrophosphatase gemessen und ihre Lokalisation bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in TABELLE 7 zusammengefaßt:

Tab. 7: Vergleich der Enzymaktivitäten von *Syntrophus gentianae* nach Trennung des durch lysozymatischen Aufschluß erhaltenen zellfreien Extraktes in cytosolische Fraktion und Membranfraktion

| Aktivität | zellfreier Extrakt | Membranfraktion | cytosolische Fraktion |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------------|
| | % Aktivität | % Aktivität | % Aktivität |
| 3-Hydroxy-butyryl-CoA-Dehydrogenase | 100 | 2,5 | 105,4 |
| Pyrophosphatase | 100 | 63,3 | 17,3 |
| Pyrophosphatase ¹⁾ | 100 | 0 | 78,4 |

1) nach Zugabe von 1% Triton X-100 zum zellfreien Extrakt

Es zeigte sich, daß Pyrophosphatase-Aktivität erwartungsgemäß detektiert werden konnte, und daß diese überwiegend membranständig ist. 3-Hydroxy-butyryl-CoA-Dehydrogenase ist ein cytosolisches Enzym und kann daher als Markerenzym bewertet und verwendet werden. Da es nur in nicht nennenswerten Aktivitäten in der Membranfraktion zu finden war, kann davon ausgegangen werden, daß es keine oder nur sehr geringe cytosolische Verunreinigungen in der Membranfraktion gegeben hat. Durch die Zugabe von Triton X-100 zum zellfreien Extrakt und anschließende Abtrennung der Membranfraktion konnte gezeigt werden, daß die Pyrophosphatase aus der Membran gelöst werden kann und dann folgerichtig in der cytosolischen Fraktion zu finden ist.

Die Membranständigkeit ist Grundvoraussetzung dafür, daß Protonen oder andere Ionen über die Membran transloziert werden können. Es galt also einen Ionen-pumpenden Effekt nachzuweisen. Zunächst wurde versucht, inside-out-Vesikel herzustellen, an deren Außenseite das aktive Zentrum der Pyrophosphatase sitzt. In gleicher Orientierung sollte auch eine ATPase –wenn vorhanden– an der Membran sitzen. Dies stellte sich als problemlos dar. Durch den Lysozym/EDTA-Aufschluß entstanden genügend inside-out-Vesikel, um weitere Messungen an ihnen durchführen zu können.

Über eine Kopplung von Protoneneinschleusung in die Vesikel und Protonenausschleusung durch die ATPase sollte ein Kopplung zwischen Pyrophosphatspaltung und ATP-Bildung möglich sein. Wie ABBILDUNG 13 zeigt, konnte dies tatsächlich nachgewiesen werden.

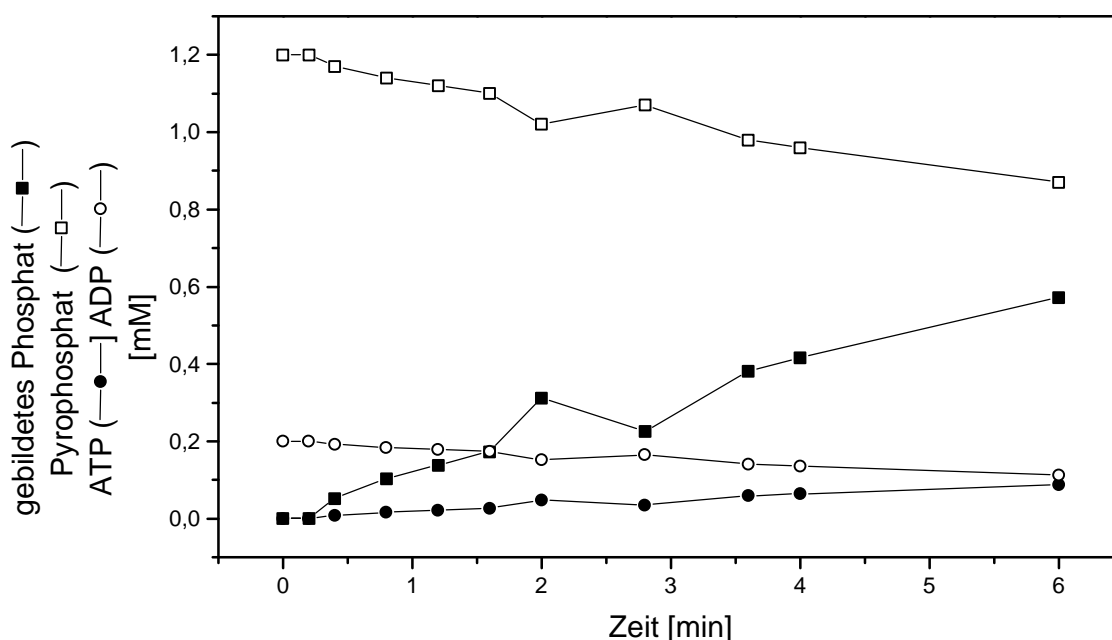


Abb. 13: Durch Zugabe von Pyrophosphat und ADP zu zellfreiem Extrakt von *Syntrophus gentianae* induzierte Bildung von ATP und Phosphat.

Das Verhältnis von gespaltenem Pyrophosphat zu gebildetem ATP liegt dabei in günstigen Fällen (also bei kleinen Verhältnissen) bei ca. 3,7:1. Dieser Wert schwankt allerdings von Vesikelpräparation zu Vesikelpräparation.

Auch die Rückreaktion dieser Reaktion wurde betrachtet. Dabei wurden ATP und Phosphat zu Vesikeln gegeben. Es konnte eine Spaltung von ATP unter Bildung von ADP, sowie eine Bildung von Pyrophosphat beobachtet werden (ABBILDUNG 14).

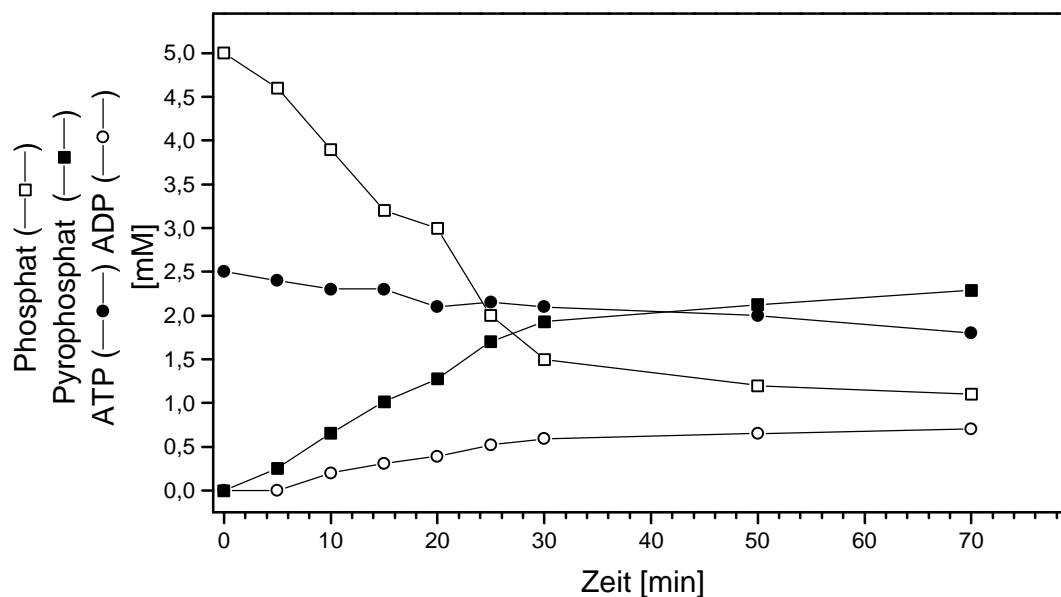


Abb. 14: Durch Zugabe von Phosphat und ATP zu zellfreiem Extrakt von *Syntrophus gentianae* induzierte Bildung von ADP und Pyrophosphat.

Das Verhältnis von gespaltenem ATP zu gebildetem Pyrophosphat liegt bei ca. 1:3,3. Auch dieser Wert schwankt von Vesikelpräparation zu Vesikelpräparation. Deshalb wurden die Hin- wie die Rückreaktion mit derselben Vesikelpräparation gemessen. Sie hatte einen Proteingehalt von $0,05 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$. Damit ergeben sich die in TABELLE 8 dargestellten spezifischen Aktivitäten für die beteiligten Enzyme in den jeweilig betrachteten Reaktionsrichtungen:

Tab. 8: Spezifische Aktivitäten der beteiligten Enzyme aus den in den Abbildungen 13 und 14 dargestellten Versuchen

| Reaktionsrichtung | Pyrophosphatase [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$] | ATPase [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$] |
|------------------------------------|--|---|
| ATP-Spaltung / Pyrophosphatbildung | 0,65 | 0,2 |
| Pyrophosphatspaltung / ATP-Bildung | 1,1 | 0,3 |

Als weiterer Nachweis für die Translokation von Protonen über die Membran durch die Pyrophosphatase wurden Experimente mit zellfreiem Extrakt (Vesikeln) von *Syntrophus gentianae* und dem protonensensitiven Fluoreszenzfarbstoff ACMA durchgeführt. Die Fluoreszenz von ACMA wird durch die Protonierung gequenchet, so daß ein Protonentransport über die Membran in die Vesikel sehr sensitiv detektiert werden kann. Die mit Protonen geladenen Vesikel können dann mit Hilfe des Protonophors CCCP in sehr kurzer Zeit wie-

der entladen werden, was zu einer erneuten Fluoreszenz des Farbstoffes führt. ABBILDUNG 15 zeigt einen entsprechenden Versuch: Die Zugabe von Pyrophosphat bewirkt bei mit ACMA beladenen Membranvesikeln ein Quenching der Fluoreszenz und deutet damit einen Protonentransport der Pyrophosphatase über die Membran an. Die Zugabe des Protonophors CCCP hebt diese Wirkung wieder auf.

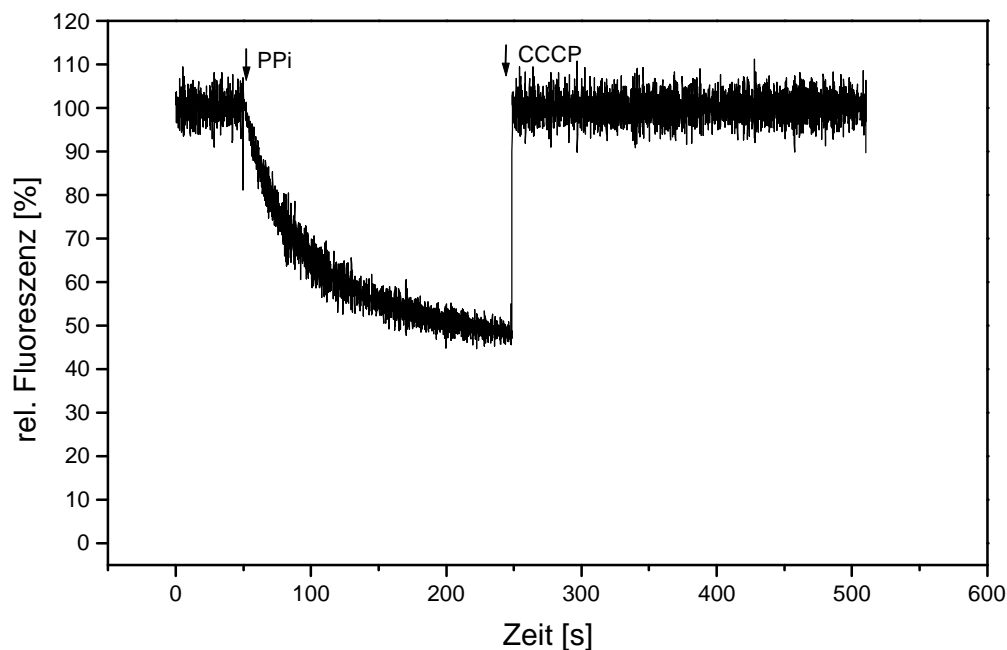


Abb. 15: Effekt der Zugabe von Pyrophosphat und anschließender Zugabe von CCCP zu mit ACMA beladenen Membranvesikeln von *Syntrophus gentianae* im Zeitverlauf

Die Zugabe von 1 mM Pyrophosphat aus einer Lösung mit exakt dem gleichen pH wie dem des Vesikel enthaltenden Puffers zum Reaktionsansatz führt zu einem Quenchen der Fluoreszenz. Dies ist auf einen Protonentransport in die Vesikel zurückzuführen; in den Vesikeln sinkt der pH signifikant und das ACMA in der Membran bzw. in den Vesikeln wird proto-

niert. Es resultiert ein Quenchen der Fluoreszenz. Die Zugabe des Protonophors CCCP führt zu einem Fluß von Protonen über die Membran vom Inneren der Vesikel zum Äußeren, also entlang des durch die Pyrophosphatase aufgebauten Gradienten. Der pH in den Vesikeln gleicht sich wieder dem außerhalb der Vesikel an und ACMA fluoresziert wieder, da es nicht mehr protoniert ist.

Es war von Interesse, ob sich die Pyrophosphat-Spaltungsreaktion durch Verschiebung des Gleichgewichtes (Zugaben von Phosphat) umkehren läßt. Um diese Umkehrreaktion messen zu können, wurde die anfänglich eingesetzte Konzentration an Pyrophosphat im Gegensatz zu üblichen 1 mM auf 0,1 mM herabgesetzt. Nachdem die Hinreaktion eine Zeitlang gelaufen war, wurde 2 mM Phosphat zugesetzt. Eine Aufhebung des Quenching der Fluoreszenz zeigte daraufhin einen Protonentransport aus den Vesikeln in das Medium an (ABBILDUNG 16). Dieser Effekt ist durch ein Zustandekommen der Rückreaktion zu erklären: Die Zugabe von 0,1 mM Pyrophosphat bewirkt bei mit ACMA beladenen Membranvesikeln ein Quenching der Fluoreszenz und deutet damit einen Protonentransport der Pyrophosphatase über die Membran an. Die Zugabe von 2 mM Phosphat hebt diese Wirkung wieder auf, da sie zu einer Umkehrung der Reaktionsrichtung führt.

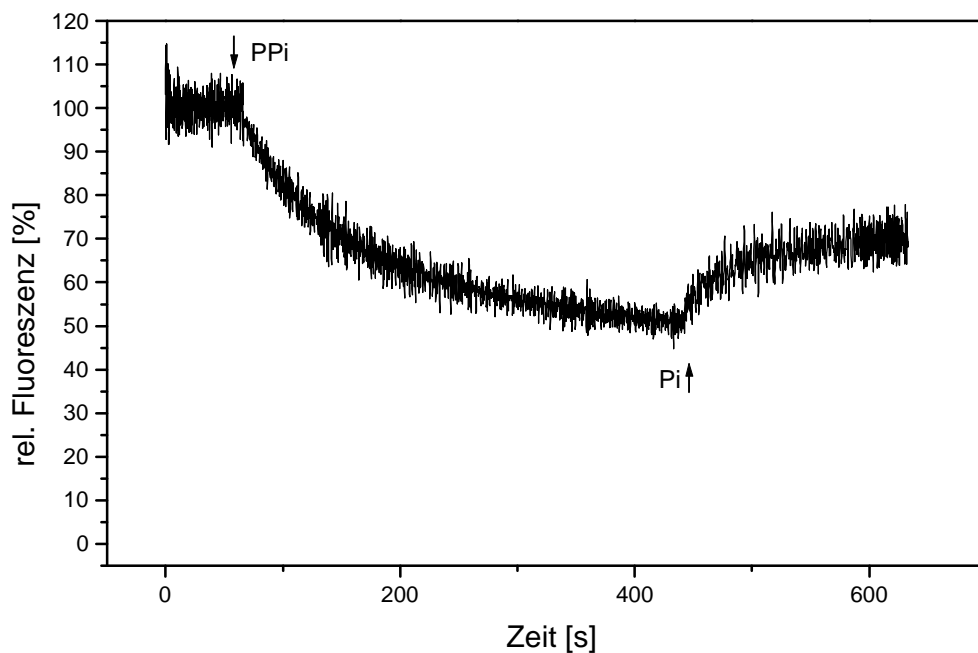


Abb. 16: Effekt der Zugabe von 0,1 mM Pyrophosphat und anschließender Zugabe von 2 mM Phosphat zu mit ACMA beladenen Membranvesikeln von *Syntrophus gentianae* im Zeitverlauf

Das Ergebnis der vorigen Versuche legte die Vermutung nahe, eine membranständige Protonen-translozierende ATPase könne einen Protonengradienten über der Membran zur Synthese von ATP nutzen. Es wurde also ein analoges Experiment angeschlossen, bei dem die Vesikel auf eine Protonen-translozierende ATPase hin untersucht wurden. Dazu wurde ATP zu Vesikeln gegeben und beobachtet, ob sich ein Quenchen der Fluoreszenz ergibt. Das Quenchen konnte durch die Zugabe des Protonophors CCCP wieder aufgehoben werden. ABBILDUNG 17 veranschaulicht das Ergebnis des Versuches: Die Zugabe von ATP bewirkt bei mit ACMA beladenen Membranvesikeln ein Quenchen der Fluoreszenz und deutet damit einen Protonentransport der ATPase über die Membran an. Die Zugabe des Protonophors CCCP (2 μ M) hebt diese Wirkung wieder auf.

Im diskontinuierlichen Enzymtest konnte über die Bestimmung der Konzentrationen des Substrates und der Produkte der ATPase nachgewiesen werden, daß CCCP keinen Einfluß auf die Aktivität der ATPase *per se* hat.

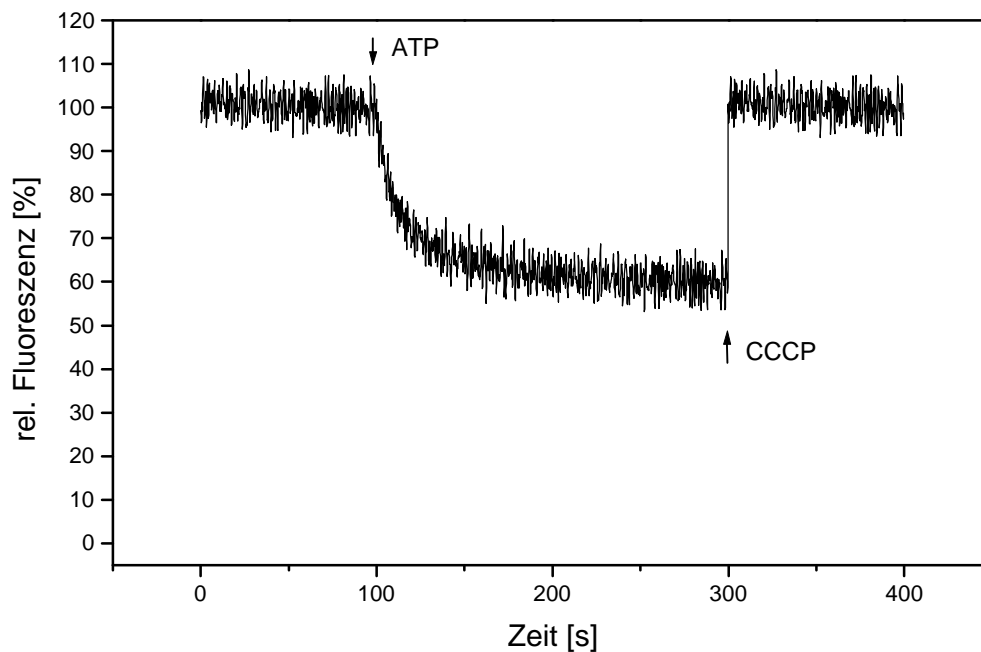


Abb. 17: Einfluß der Zugabe von 1 mM ATP und anschließender Zugabe von 2 μ M CCCP zu mit ACMA beladenen Membranvesikeln von *Syntrophus gentianae* im Zeitverlauf

Des weiteren wurde versucht, durch Zugabe von ADP eine Entladung der durch die von der Pyrophosphatase mit Protonen geladenen Vesikel durch eine ATPase unter Bildung von ATP zu demonstrieren. ABBILDUNG 18 zeigt das Ergebnis des Versuches: Die Zugabe von Pyrophosphat bewirkt bei mit ACMA beladenen Membranvesikeln ein Quenching der Fluoreszenz und deutet damit einen Protonentransport der Pyrophosphatase über die Membran an. Die Zugabe des ADP hebt diese Wirkung teilweise wieder auf, was darauf zurückzuführen ist, daß die Gegenwart von ADP und einer protonenabhängigen ATPase, die Translokation von Protonen in Gegenrichtung zu der der Pyrophosphatase ermöglicht.

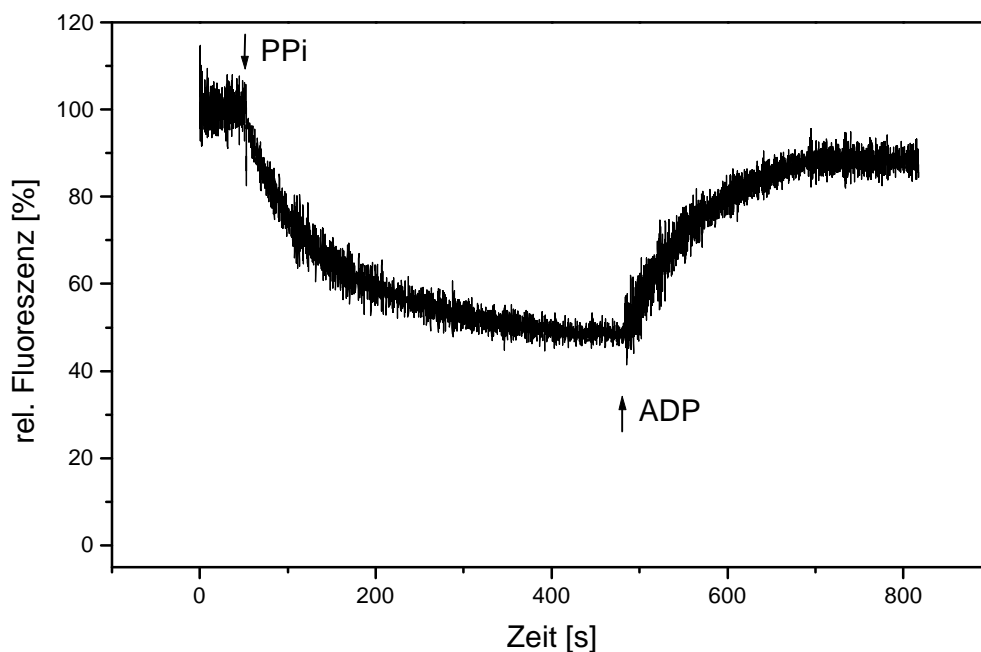


Abb. 18: Effekt der Zugabe von 1 mM Pyrophosphat und anschließender Zugabe von 1 mM ADP zu mit ACMA beladenen Membranvesikeln von *Syntrophus gentianae* im Zeitverlauf

Die Zugabe von ADP zu mit Protonen geladenen Vesikeln führt zu einer erhöhten Fluoreszenz. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Protonen aus dem Innern der Vesikeln durch die protonenabhängige und -translozierende Reaktion der ATPase ins Medium überführt werden. Der Protonengradient wird teilweise aufgehoben. Es läßt sich also die Pyrophosphatasereaktion an die der ATPase koppeln. Es ist zu beobachten, daß es nicht zu einer vollständigen Entladung der Vesikel kommt, was sich in einer im Vergleich zur anfänglichen Fluoreszenz um ca. 10 % erniedrigten Fluoreszenz zeigt.

Zur Kontrolle wurde Puffer ohne Vesikel mit ACMA versetzt. Weder die Zugabe von Pyrophosphat noch die Zugabe von CCCP oder ADP führte zu einer Änderung der Fluoreszenz.

Auch die Rückreaktion wurde betrachtet: Zu Vesikeln wurde ATP gegeben, so daß diese durch die Spaltung des ATP zu ADP und anorganischem Phosphat mit Protonen beladen werden, was durch Abnahme der Fluoreszenz sichtbar werden sollte. Der Arbeitshypothese zufolge müßte dann eine zusätzliche Zugabe von anorganischem Phosphat unter Transport der Protonen aus den Vesikeln ins freie Medium zu einer erhöhten Fluoreszenz führen. ABBILDUNG 19 zeigt das Ergebnis dieses Versuches: Die Zugabe von ATP bewirkt bei mit

ACMA beladenen Membranvesikeln ein Quenching der Fluoreszenz und deutet damit einen Protonentransport der ATPase über die Membran an. Die Zugabe von anorganischem Phosphat hebt diese Wirkung teilweise wieder auf, was darauf zurückzuführen ist, daß die Gegenwart von genügend großen Konzentrationen Phosphat eine protonenabhängige Pyrophosphatase die Translokation von Protonen in Gegenrichtung zu der der ATPase ermöglicht.

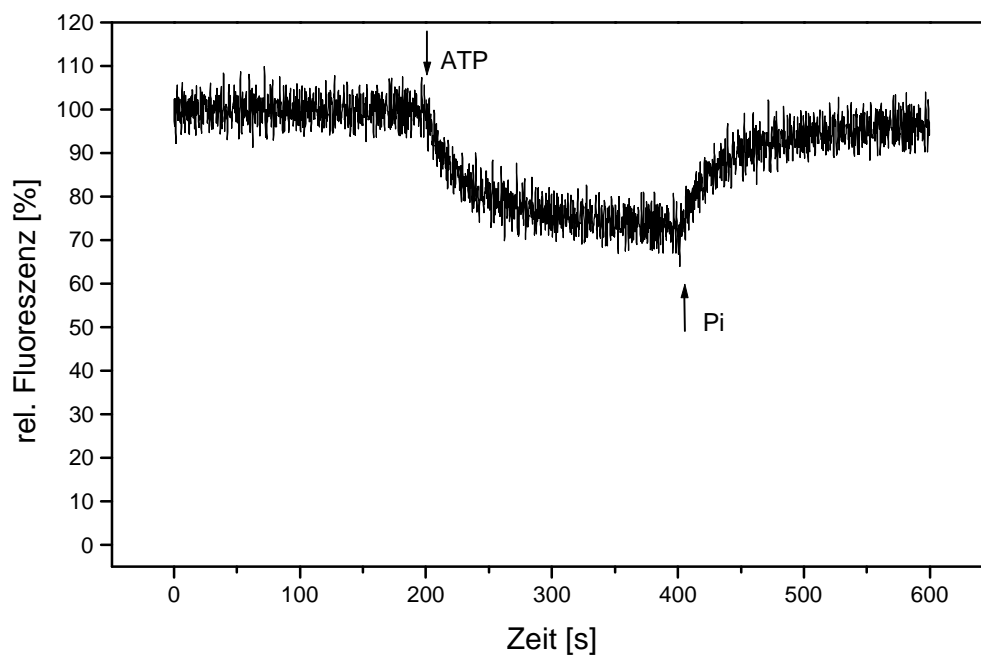


Abb. 19: Effekt der Zugabe von 1 mM ATP und anschließender Zugabe von 2 mM Phosphat zu mit ACMA beladenen Membranvesikeln von *Syntrophus gentianae* im Zeitverlauf.

Eine Zugabe von anorganischem Phosphat oder ADP plus anorganischem Phosphat zu den Vesikeln hatte erwartungsgemäß keinen Einfluß auf die Fluoreszenz.

3.3.4.2 Abhängigkeit der Aktivität von der Pyrophosphatkonzentration

Zur näheren Charakterisierung der Pyrophosphatase wurden weitere Experimente durchgeführt: Zunächst wurde eine Abhängigkeit der Aktivität von der Pyrophosphatkonzentration bestimmt (ABBILDUNG 20). Dabei zeigte sich, daß Pyrophosphat in Konzentrationen höher als 1 mM mit über 90 % der maximalen Geschwindigkeit umgesetzt wird, andererseits aber Pyrophosphat-Konzentrationen über 5 mM hemmend auf die Aktivität wirken.

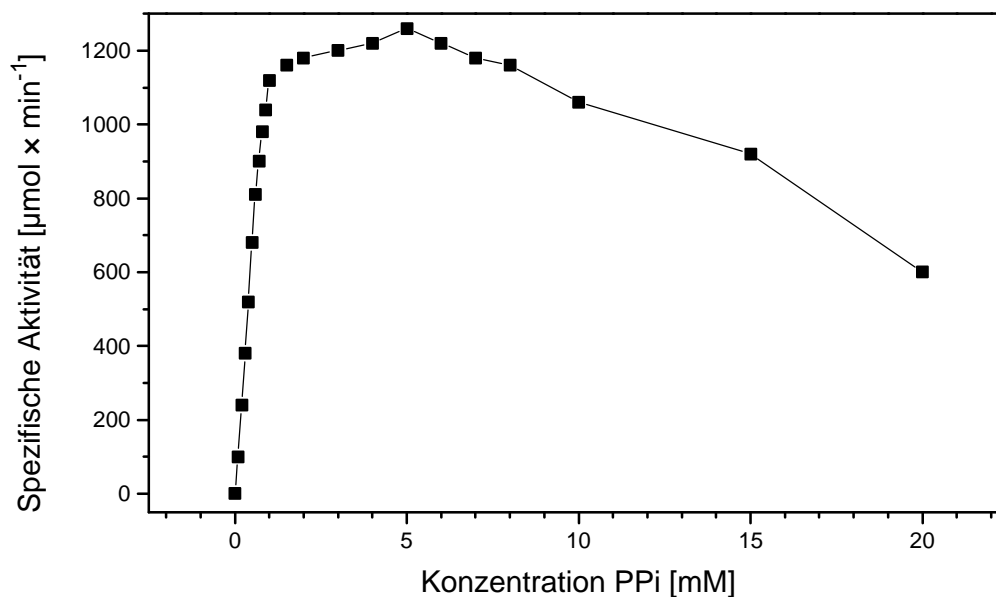


Abb. 20: Abhängigkeit der Pyrophosphatase-Aktivität von der Pyrophosphatkonzentration. Die Aktivität wurde wie in Kapitel 2 beschrieben gemessen.

3.3.4.3 Hitzestabilität der Pyrophosphatase

Desweiteren wurde die Hitzestabilität der Pyrophosphatase untersucht (ABBILDUNG 21). Hierzu wurde das Enzym den jeweiligen Temperaturen für 10 Minuten ausgesetzt und anschließend bei 35 °C gemessen. Es wurde dabei deutlich, daß nach einer Temperatureinwirkung von ≥ 60 °C mindestens 50 % der Aktivität verlorengehen. Niedrige Temperaturen übersteht das Enzym offensichtlich unbeschadet.

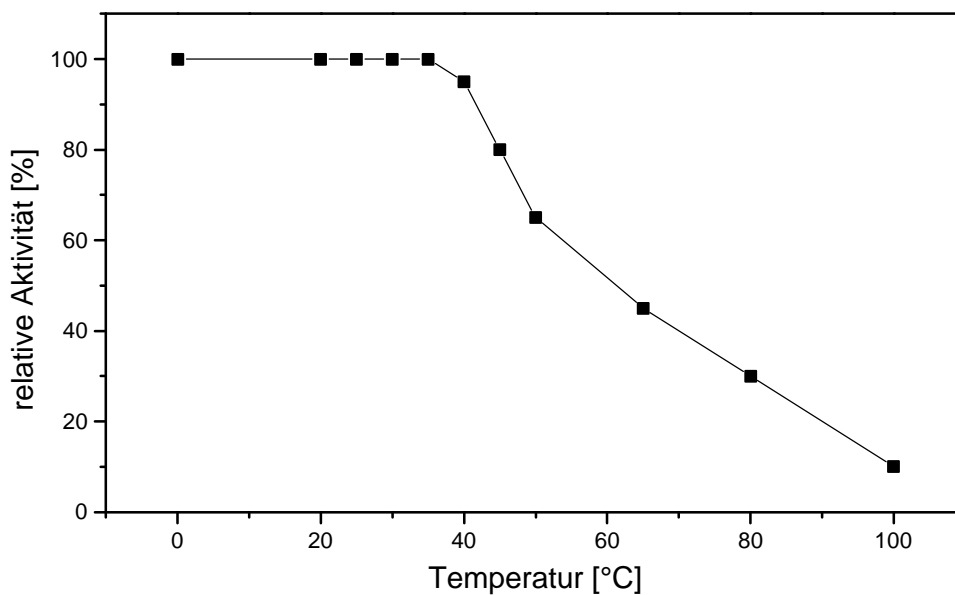


Abb. 21: Hitzestabilität der Pyrophosphatase. Proben von 1 ml (10 µg Protein) wurden für 10 min den angegebenen Temperaturen ausgesetzt. Die Aktivität wurde wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen.

3.3.4.4 Aktivität der Pyrophosphatase bei verschiedenen Temperaturen

Die Untersuchung der Pyrophosphataseaktivität bei verschiedenen Temperaturen zeigte folgendes Ergebnis (ABBILDUNG 22): Das Temperaturoptimum liegt bei ca. 35 °C; bei 20 bzw. 50 °C wird nur noch die halbmaximale Umsatzrate erreicht.

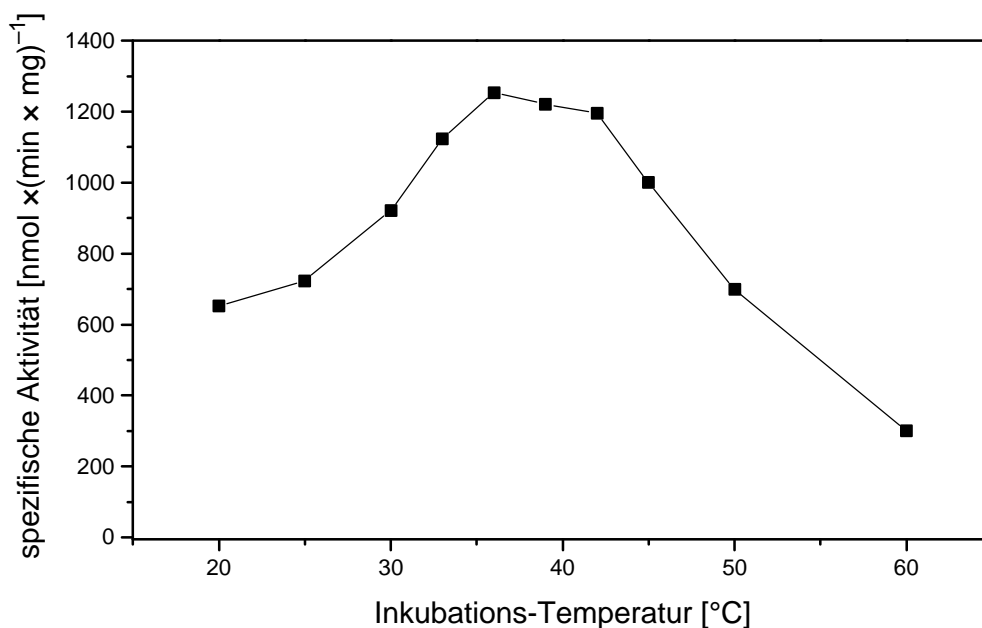


Abb. 22: Abhängigkeit der Aktivität der Pyrophosphatase von der Inkubationstemperatur.

3.3.4.5 Inhibitoren der Pyrophosphatase

Die Pyrophosphatase wurde auch im Hinblick auf mögliche Inhibitoren untersucht. Hierbei stellten sich ATP und EDTA als die wirkungsvollsten Inhibitoren heraus. In beiden Fällen konnte jedoch die Hemmung durch Zugabe von 10 mM Mg^{2+} wieder aufgehoben werden. Die Behandlung mit Druckluft führte zwar zu einer verminderten Aktivität, doch ist dies eher auf eine mechanische Wirkung des Durchblasens als durch den Sauerstoff zurückzuführen, da der gleiche Versuch mit reinem Stickstoff ebenfalls zu einer Minderung der Aktivität von 15 % führte (TABELLE 9). ACMA wurde ebenfalls auf eine mögliche inhibitorische Wirkung untersucht, zeigte aber keinerlei Effekt:

Tab. 9: Inhibitoren der membranständigen Pyrophosphatase aus *Syntrophus gentianae*

| Inhibitor [5 mM] | relative Aktivität [%] |
|-------------------------------|------------------------|
| ohne | 100 |
| ACMA ¹⁾ | 98 |
| Titan(III)-citrat | 87 |
| Sauerstoff ²⁾ | 85 |
| NaN ₃ | 76 |
| Natriumdithionit | 74 |
| KCN | 65 |
| EDTA | 36 |
| EDTA + 10 mM Mg ²⁺ | 88 |
| ATP | 33 |
| ATP + 10 mM Mg ²⁺ | 85 |

1) 5 µM

2) Mit Luft 3 Minuten durchblasen

3.3.4.6 Ertragmessungen bei Kulturen mit exogener Zugabe von Benzoat und Pyrophosphat

Zur Prüfung, ob Pyrophosphat von den Zellen aufgenommen und genutzt werden kann, wurde Kulturen zusätzlich zum Substrat Benzoat 5 mM Pyrophosphat gegeben. Das Impfmateriale war bei allen Ansätzen gleich. Da sich aufgrund der Zugabe von Pyrophosphat bereits eine Trübung einstellte, wurden Kontrollen angesetzt, die zwar Pyrophosphat enthielten, aber steril gehalten wurden. Nach vierwöchiger Inkubation wurde die OD₅₇₈ bei allen Kulturen

gemessen. Nach Abzug der OD der Kontrollen zur Hintergrundbestimmung war kein Unterschied zu erkennen. Die Kulturen, die Pyrophosphat und Benzoat als Substrate enthielten, hatten die gleiche (rechnerische) optische Dichte wie die Kulturen, denen nur Benzoat zugegeben worden war. Auch die Menge an abgebautem Benzoat war identisch; die Endkonzentration an Pyrophosphat entsprach der Anfangskonzentration. Der Proteingehalt der verschiedenen Kulturen war nicht signifikant unterschiedlich (die Zellen wurden nicht-selektiv mit der French-Press aufgeschlössen). Siehe hierzu TABELLE 10.

Tab. 10: Vergleich der Zellerträge aus Kulturen mit Benzoat- oder Benzoat- plus Pyrophosphat-Zugabe.

| Versuchsansatz | OD ₅₇₈ | OD ₅₇₈ korrigiert | Proteingehalt (mg Protein × ml ⁻¹) |
|--|-------------------|------------------------------|--|
| 5 mM Benzoat | 0,24 (0,04) | 0,24 (0,04) | 0,005 |
| 5 mM Benzoat + 5 mM Pyrophosphat | 0,32 (0,05) | 0,22 (0,04) | 0,0049 |
| 5 mM Benzoat + 5 mM Pyrophosphat ¹⁾ | 0,1 (0,03) | – | – |

1) ohne Inokulum

Ein analoges Experiment wurde mit dichten Zellsuspensionen durchgeführt: Nach 48 Stunden war das gesamte Benzoat abgebaut, ein Pyrophosphatabbau konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

3.3.5 Eigenschaften der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase

3.3.5.1 Nachweis im gekoppelten photometrischen Test

In diesem photometrischen Test wurde die Decarboxylaseaktivität an die Reaktion von 5 Hilfsenzymen gekoppelt, die das Substrat Glutaconyl-CoA bereitstellten und eine Reaktionskette bildeten, welche die Decarboxylierung von Glutaconyl-CoA mit einer NADH-Bildung verknüpften, deren Rate der der Decarboxylaseaktivität äquivalent war. Die so bestimmten spezifischen Aktivitäten im Rohextrakt lagen bei 22,5 nmol × min⁻¹ × mg Protein⁻¹. Dabei war 20 mM NaCl im Ansatz.

3.3.5.2 Lokalisation der Decarboxylaseaktivität

Nach einer vorsichtigen Auftrennung des zellfreien Extraktes in eine cytosolische und eine Membranfraktion, befand sich die Aktivität nahezu vollständig in der Membranfraktion. Eine Verunreinigung der Membranfraktion mit cytosolischen Enzymen konnte ausgeschlossen werden, da sich das Markerenzym 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase nahezu ausschließlich in der cytosolischen Fraktion befand. Wurde dem zellfreien Extrakt 1 % Triton X-100 zugegeben, löste sich das Enzym aus der Membran und es befand sich nach Trennung von Membran- und cytosolischer Fraktion nahezu ausschließlich in der cytosolischen Fraktion (TABELLE 11). Als membranständiges Enzym kommt es damit für eine Konservierung von Energie –z. B. durch eine Ionen-Translokation– in Frage.

Tab. 11: Vergleich der Enzymaktivitäten von *Syntrophus gentianae* nach Trennung des durch lysozymatischen Aufschluß erhaltenen zellfreien Extraktes in cytosolische und Membranfraktion

| Aktivität | zellfreier Ex- trakt | Membranfraktion | cytosolische Fraktion |
|--|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| | % Aktivität | % Aktivität | % Aktivität |
| 3-Hydroxy-butaryl- CoA-Dehydrogenase | 100 | 2,5 | 105,4 |
| Glutaconyl-CoA- Decarboxylase | 100 | 96,3 | 0 |
| Glutaconyl-CoA- Decarboxylase ¹⁾ | 100 | 2,3 | 89,4 |

1) nach Zugabe von 1% Triton X-100 zum zellfreien Extrakt

3.3.5.3 Einfluß von Avidin und Biotin auf die Glutaconyl-CoA-Decarboxylaseaktivität

Die Decarboxylaseaktivität in der Membranfraktion wurde durch Avidin ($0,4 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) weitgehend gehemmt. Diese Hemmung konnte aber durch die Zugabe von Biotin teilweise wieder aufgehoben werden. Mit Biotin vorinkubiertes und so abgesättigtes Avidin zeigte keine Wirkung auf die Aktivität der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase (TABELLE 12). Damit konnte gezeigt werden, daß das untersuchte Enzym ein Biotin-abhängiges war. Die Zugabe von geringen Mengen Triton X-100 zur Membranfraktion bewirkt, daß sich die Enzyme

zwar

nicht aus der Membran lösen, wohl aber ihre ursprüngliche Orientierung verlieren können. Daß sich nach oder durch Triton X-100 Behandlung eine geringere Aktivität messen läßt zeigt, daß es sich bei den gebildeten Vesikeln um inside-out Vesikel handelt. Die Mehrzahl der aktiven Zentren der membranständigen Enzyme sitzt bei den entstandenen Vesikeln an der Außenseite. Wird nun durch Triton X-100 eine gleichmäßige Verteilung der aktiven Zentren zur Innen- und Außenseite der Vesikel erreicht, macht sich das in einer geringeren Gesamtaktivität bemerkbar, da weniger Enzyme als vorher mit den Reaktanden in Berührung kommen.

Tab. 12: Einfluß von Triton X-100, Avidin und Biotin auf die Glutaconyl-CoA-Decarboxylaseaktivität in der Membranfraktion

| Zugabe | spezifische Aktivität [nmol \times min ⁻¹ \times mg Protein ⁻¹] | |
|-------------------------------|---|--------------------------|
| | ohne Triton X-100 | mit 0,1% Triton X-100 |
| ohne | 22,5 | 17 |
| Avidin ¹⁾ | 1,8 | 1,0 |
| Avidin + Biotin ²⁾ | 4,3 | 3,1 |
| Avidin + Biotin ³⁾ | 21,3 | 17,7 |

1) Konzentration: 0,4 mg \times ml⁻¹, dem Assay vor Zugabe des zellfreien Extraktes zugegeben

2) Konzentration: 0,8 mM

3) mit Biotin abgesättigtes Avidin

3.3.5.4 Na⁺-Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität

In der Membranfraktion konnte eine Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität von Na⁺-Ionen gezeigt werden (ABBILDUNG 23)

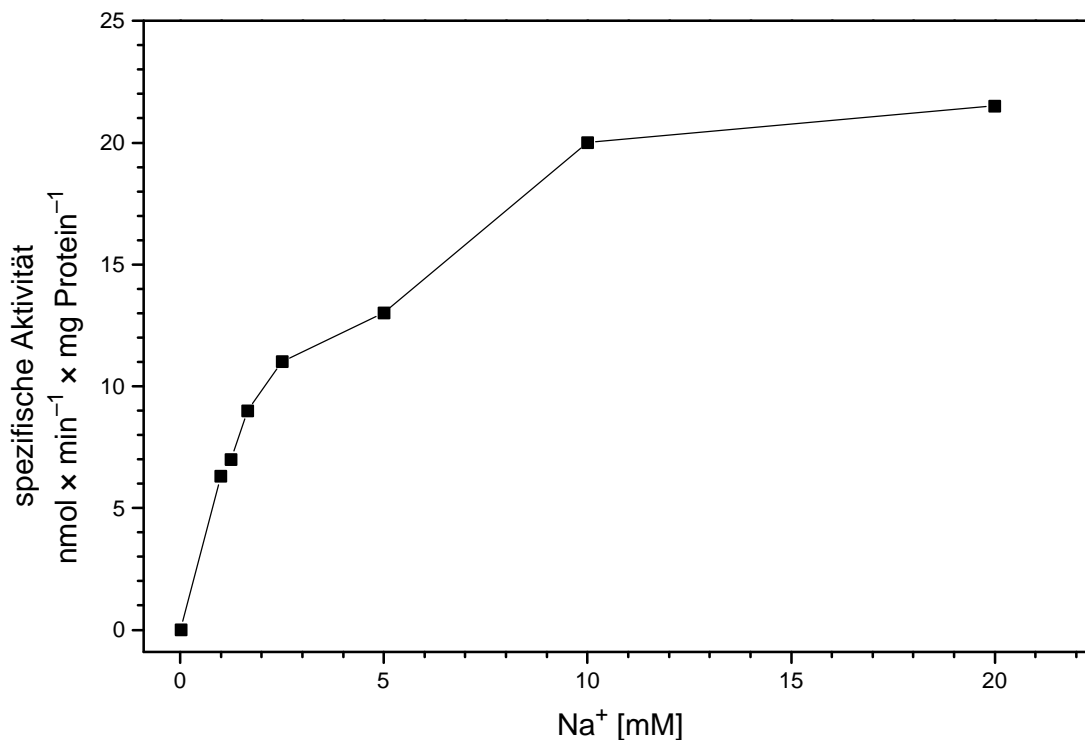


Abb. 23: Abhängigkeit der Glutaconyl-CoA-Decarboxylaseaktivität in der Membranfraktion des zellfreien Extraktes von *Syntrophus gentianae* von der Na⁺-Ionenkonzentration im Testansatz. Ohne Zugabe von Na⁺-Ionen betrug minimale Konzentration an Na⁺-Ionen im Assay 0,017 mM.

Die spezifische Aktivität ließ sich durch Zugabe von 20 mM NaCl zum Testansatz auf das 220-fache steigern. In den Testansätzen geringerer Na⁺-Konzentration wurden die Na⁺-Ionen durch K⁺-Ionen ersetzt, so daß die Osmolarität in allen Ansätzen gleich war. Die Lineweaver-Burk-Auftragung läßt den Schluß zu, daß die Abhängigkeit einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt (ABBILDUNG 24). Aus der doppelt reziproken Auftragung der Daten wurde der K_M-Wert für Na⁺-Ionen mit 2,5 mM bestimmt, V_{max} beträgt 22,5 nmol × min⁻¹ × mg Protein⁻¹.

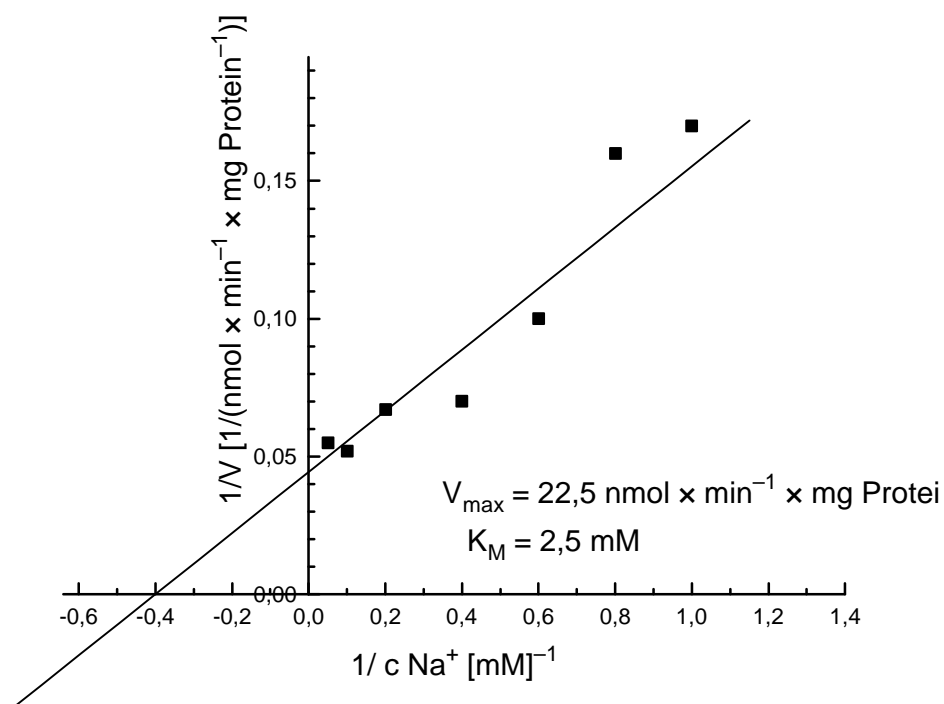


Abb. 24: Lineweaver-Burk-Auftragung des Experimentes in Abbildung 23.

Die Membranständigkeit und die Abhängigkeit der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase von Na^+ -Ionen deutet auf einen vektoriellen Transport von Na^+ -Ionen über die Membran hin. Durch einen Antiporter könnten Na^+ -Ionen gegen Protonen getauscht werden und so zum elektrochemischen Potential über der Membran beitragen. Ein Rückfluß der Protonen in das Cytosol könnte dann zur Synthese von ATP genutzt werden. Um dies zu überprüfen, wurden Membranvesikel mit Monensin (einem Na^+/H^+ -Antiporter) in Anwesenheit von ACMA inkubiert und die Reaktion der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase unter geeigneten Bedingungen gemessen. Es konnte zwar eine Aktivität der Decarboxylase gemessen werden, eine Abnahme der Fluoreszenz aufgrund eines Protonentransports in die Vesikel wurde jedoch nicht gemessen.

3.3.6 Eigenschaften der Hydrogenase und der Formiatdehydrogenase

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei dem Elektronencarrier der syntrophen Mischkultur von *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei* um Wasserstoff oder Formiat handelt, wurden die Aktivitäten der jeweiligen Enzyme (Hydrogenase und Formiatdehydrogenase) bestimmt. Dabei stellte sich eine 30-fach höhere Aktivität der Hydrogenase gegenüber der Formiatdehydrogenase heraus (TABELLE 13).

Tab. 13: Eigenschaften der Hydrogenase und Formiatdehydrogenase in zellfreien Extrakten von *S. gentianae*.

| Aktivität | K_M (mM) | V_{max} ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$) |
|----------------------|------------|--|
| Hydrogenase | 0,27 | 1,9 |
| Formiatdehydrogenase | 0,3 | 0,066 |

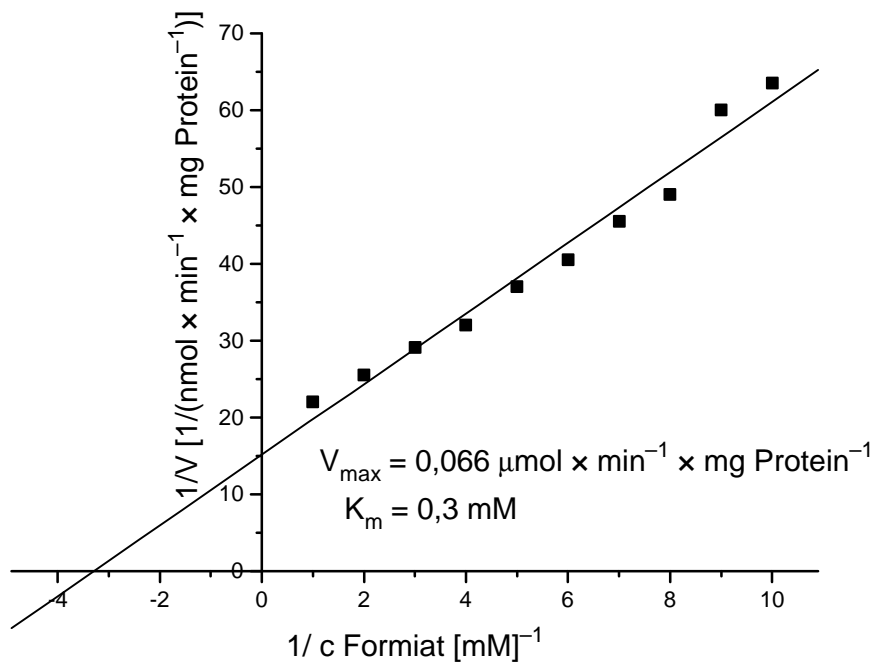
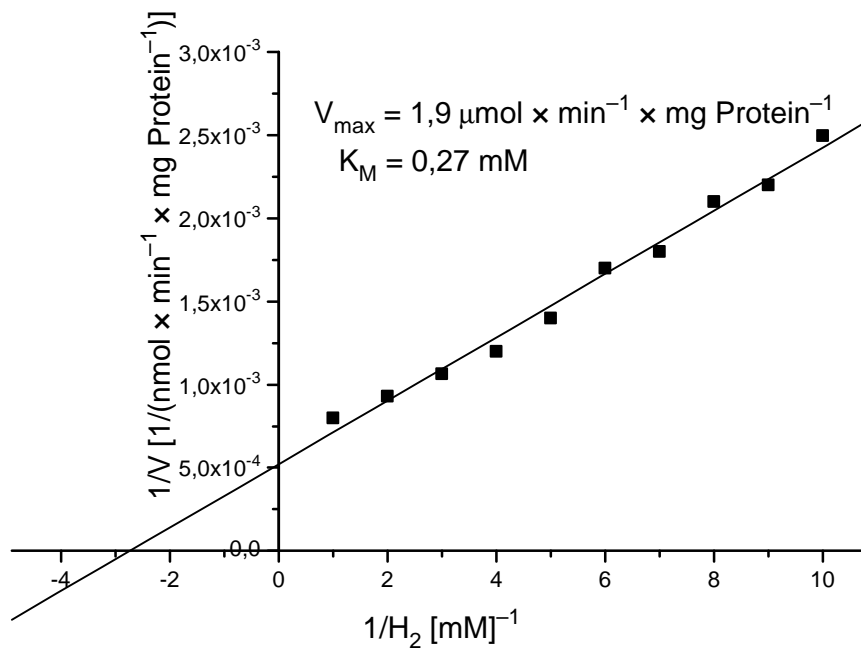


Abb. 25: Lineweaver-Burk Plot zur Bestimmung von V_{\max} und K_M der Hydrogenase und der Formiatdehydrogenase

Formiatdehydrogenase und Hydrogenase waren nach Fraktionierung des zellfreien Extraktes in Membranfraktion und cytosolische Fraktion überwiegend in der Membranfraktion. (TABELLE 14)

Tab. 14: Verteilung von Hydrogenase und Formiatdehydrogenase in Membran- bzw. cytosolischer Fraktion.

| Aktivität | zellfreier Ex- trakt | Membranfraktion | cytosolische Fraktion |
|---|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| | % Aktivität | % Aktivität | % Aktivität |
| Hydrogenase | 100 | 97 | 7 |
| Formiat-Dehydrog- nase | 100 | 76,4 | 17,8 |
| 3-Hydroxy-butyryl- CoA-Dehydrogenase | 100 | 2,5 | 105,4 |

3.3.7 Eigenschaften der Gentisyl-CoA-Reduktase

3.3.7.1 Potentielle artifizielle Elektronen-Donoren für die Gentisyl-CoA-Reduktase

Syntrophus gentianae kann auf Gentisat als Reinkultur wachsen. Dabei entsteht Benzoat als reduziertes Endprodukt; es muß beim Abbau also eine reduktive Eliminierung der Hydroxygruppen erfolgen. Gentisat wurde im diskontinuierlichen Enzymtest als Substrat eingesetzt, wobei Ti(III)-citrat, reduziertes Methylviologen oder Benzylviologen, NAD(P)H, Dithionit oder NaBH₄ als Elektronen-Donoren verwendet wurden. In keinem der durchgeführten Experimente wurde eine Abnahme der Gentisatkonzentration oder Zunahme eines Reaktionsproduktes gemessen. Die Menge des eingesetzten zellfreien Extraktes wurde variiert, so daß die Proteinkonzentration im Enzymassay zwischen 0,3 und 1,8 mg pro ml Testansatz schwankte.

Um eine Reduktion von Gentisyl-CoA zu detektieren, wurde ein Acyl-CoA-Ligasetest mit einer nachgeschalteten Reduktion im diskontinuierlichen System etabliert. Die eigentliche Reaktion wurde durch Zugabe von Dithionit gestartet, das als Elektronendonator für die eingesetzten Viologene diente. In Anwesenheit geeigneter Elektronendonoren wurde eine Abnah-

me der Gentsyl-CoA-Konzentration zugunsten der Bildung einer weiteren CoA-Verbindung gemessen. Die Retentionszeit war mit der von Salicylyl-CoA und Benzoyl-CoA identisch. Im UV-Spektrum wurden weder bei pH 7 noch bei pH 12 zusätzliche Absorptionsmaxima bei 355 nm detektiert. Ein solches Maximum ist jedoch unter den entsprechenden Bedingungen bei Salicylyl-CoA in Folge der Deprotonierung der *o*-ständigen Hydroxylgruppe zu detektieren.

Da die spezifische Aktivität der Gentsyl-CoA-Reduktion mit Dithionit-reduzierten Viologenderivaten nur ca. $10 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ betrug, wurde versucht, durch Zugabe von Formiat oder Wasserstoff die Viologenreduktion an die im zellfreien Extrakt in ausreichender Aktivität vorliegende Formiatdehydrogenase oder Hydrogenase zu koppeln. Dadurch wurde eine Steigerung auf ca. $15 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ erreicht (TABELLE 15). Methyl- oder Benzylviologen konnten nicht durch alternative Elektronen-Donoren wie reduzierte Pyridinnukleotide, Ti(III)-citrat oder reduziertes Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* ersetzt werden.

Die Aktivität der Gentsyl-CoA-Reduktase wurde durch vorsichtige Behandlung des zellfreien Extraktes mit Druckluft für 2 Minuten auf nur 10 % der ursprünglichen Aktivität herabgesetzt. Diese Schädigung des Enzyms erwies sich als irreversibel, da die Aufnahme in DTE-reduziertem Phosphatpuffer, der in einer Anaerobenkammer durchgeführt wurde, nicht zur Wiederherstellung der Ausgangsaktivität führte. Eine vorsichtige Durchspülung mit Stickstoff zeigte keine signifikante Verringerung der Aktivität, so daß eine mechanische Schädigung des Enzyms ausgeschlossen werden konnte.

Tab. 15: Spezifische Aktivität der Gentsyl-CoA-Reduktase in zellfreien Extrakten von *Syntrophus gentianae* nach Wachstum in syntropher Kokultur mit verschiedenen Elektronendonoren

| Elektronendonor | Spezifische Aktivität ¹⁾ [nmol × min ⁻¹ × mg Protein ⁻¹] |
|---|---|
| Methylviologen ²⁾ | 15 (2) |
| Methylviologen ³⁾ | 11(3) |
| Benzylviologen ²⁾ | 8,7 (3) |
| Ti(III)-citrat | 2 |
| NADH/H ⁺ | n.d. ⁴⁾ |
| NADPH/H ⁺ | n.d. |
| Ferredoxin ³⁾ (<i>C. pasteurianum</i>) | n.d. |

1) in Klammern: Standardabweichung bei n = 5

2) reduziert mit Formiat

3) reduziert mit Dithionit

4) n.d. = nicht detektierbar

3.3.7.2 Lokalisation der Gentsyl-CoA-Reduktase

Wie üblich erfolgte die Auftrennung des zellfreien Extraktes aus *Syntrophus gentianae* in eine cytosolische und eine Membranfraktion durch Ultrazentrifugation nach Aufschluß mit der Lysozym/EDTA-Methode. Durch Einsatz der jeweiligen Fraktion im Enzymtest wurde diese auf ihre Aktivität hin untersucht. TABELLE 16 zeigt zwar, daß sich die meiste Aktivität in der Membranfraktion befindet, aber auch, daß ein Teil der Aktivität in der cytosolischen Fraktion zu finden ist. Dabei sind die Markerenzyme für die Membranfraktion (Hydrogenase) und die cytosolische Fraktion (3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase) sauber aufgetrennt.

Tab. 16: Vergleich der Enzymaktivitäten von *Syntrophus gentianae* nach Trennung des durch lysozymatischen Aufschluß erhaltenen zellfreien Extraktes in cytosolische und Membranfraktion

| Aktivität | zellfreier Ex- trakt | Membranfraktion | cytosolische Fraktion |
|--|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| | % Aktivität | % Aktivität | % Aktivität |
| Gentisyl-CoA-Reduk- tase | | 60,3 | 17 |
| Hydrogenase | 100 | 97 | 7 |
| 3-Hydroxybutyryl- CoA-Dehydrogenase | 100 | 2,5 | 105,4 |

Das Aufteilen des zellfreien Extraktes in eine cytosolische und eine Membranfraktion führte immer zu einem Verlust an Gesamtaktivität, der in günstigen Fällen ca. 20 % betrug.

3.4 Teil 4: Experimente zum Benzoatabbau durch *Desulfobacterium anilini*

3.4.1 Experimente zur Bestimmung von Zwischenprodukten mittels [Ring-¹⁴C]-Benzoat

Analog zu den entsprechenden Experimenten mit *Syntrophus gentianae* wurde zu dichten Zellkulturen von *Desulfobacterium anilini* [Ring-¹⁴C]-Benzoat als einzige Kohlenstoffquelle gegeben. In Vorversuchen bei Raumtemperatur konnte jedoch auch hier trotz minimalen zeitlichen Abstands zwischen den einzelnen Probenahmen keine zeitliche Auflösung erreicht werden. Schon in der ersten Probe wurden mehrere radioaktiv markierte Zwischenprodukte gefunden. Daraufhin wurde die Versuchstemperatur auf 10 °C erniedrigt. Bei dieser Temperatur konnte eine zeitliche Auflösung der Zwischenprodukte erreicht werden. Hierbei wurde die Probe zum Abstoppen der Reaktion in einem HPLC-Vial mit NaOH versetzt, und dieses wurde in flüssigen Stickstoff gegeben. Zur Freisetzung der Säuren aus den Thioestern wurden diese anschließend alkalisch hydrolysiert. In den ABBILDUNGEN 26a und 26b sind die Autoradiogramme nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der Produkte vergleichend dargestellt. Nach Umsatz von [Ring-¹⁴C]-Benzoat wurde in verschiedenen Ansätzen

ein für *Desulfobacterium anilini* typisches Produktmuster gefunden. Dieses setzte sich aus weniger polaren (höhere R_f -Werte als Benzoesäure) Produkten und polarerer (niedrigere R_f -Werte) Produkten zusammen. Erstere entstehen, wie oben erwähnt, bei der Reduktion von Benzoyl-CoA, letztere sollten aus den polaren Produkten durch Wasseranlagerung, anaerobe Oxidation und hydrolytische Ringöffnung entstehen. Zum Vergleich wurden zellfreie Extrakte aus *Thauera aromatica* aus *in vivo* Versuchen und Zwischenprodukte aus *in vitro* Versuchen mit [Ring- ^{14}C]-Benzoat auf die DC aufgetragen.

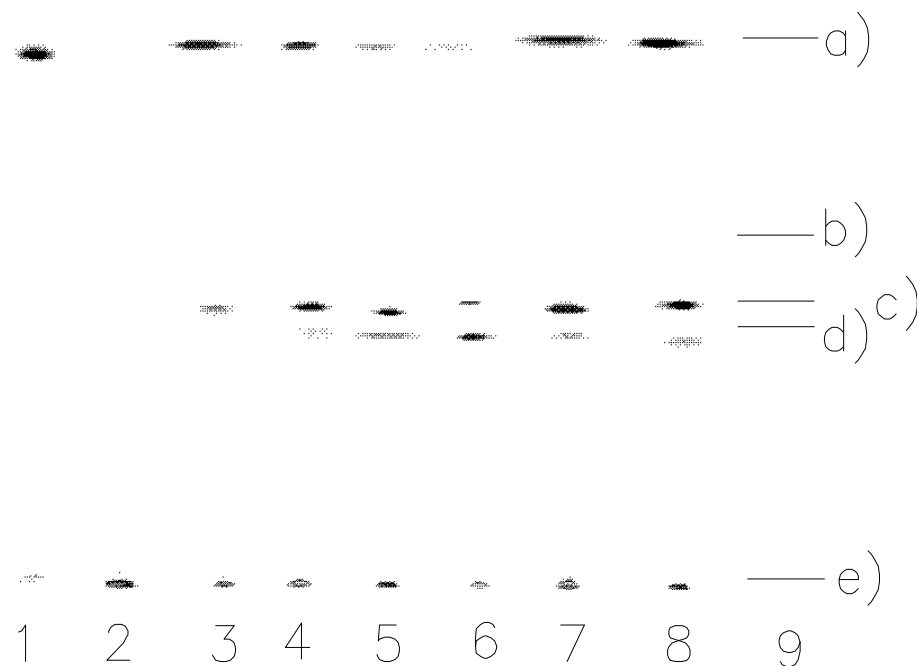


Abb. 26a: Autoradiogramm der durch DC (Laufmittel A, Diisopropylether/Butanol, 75:25, %, v/v) aufgetrennten Zwischenprodukte des Benzoatabbaus durch *Desulfobacterium anilini* im Vergleich zu dem von *Thauera aromatica*. Aufgetragen wurde auf den jeweiligen Bahnen: 1) Benzoesäure-Standard; 2) – 6): Zwischenprodukte aus *D. anilini*, 2) nach 7 min, aber nicht hydrolytisch gespalten, 3) nach 0,5 min, 4) nach 2 min, 5) nach 4 min, 6) nach 7 min; 7) – 8): Zwischenprodukte aus *T. aromatica*, 7) *in vivo*, nach 7 min, 8) *in vitro*, nach 5 min. Bahn 9 gibt schematisch die R_f -Werte folgender Substanzen wieder: a) Benzoesäure, b) Pimelinsäure, c) *cis*-2-Hydroxycyclohexancarboxylsäure, d) *trans*-2-Hydroxycyclohexancarboxylsäure, e) Starlinie. Die R_f -Werte stammen aus: Koch und Fuchs, 1992.

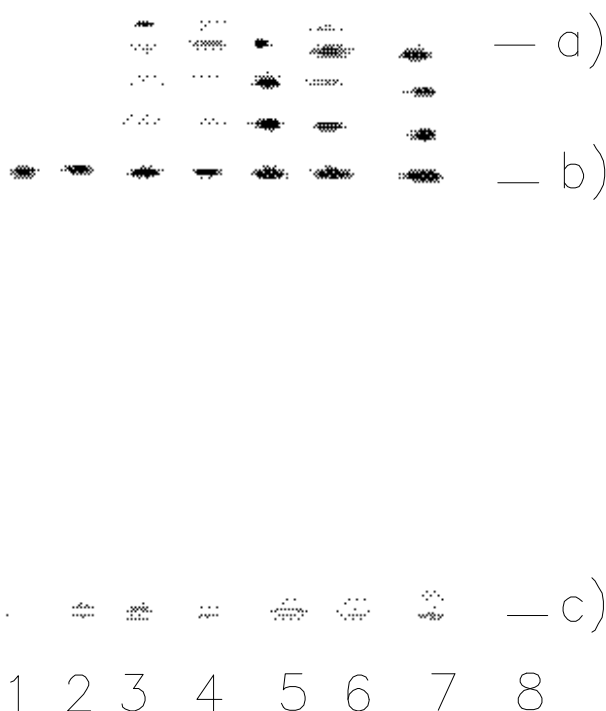


Abb. 26b: Autoradiogramm der durch DC (Laufmittel B, Toluol/Dioxan/Essigsäure, 8/1/1, %, v/v) aufgetrennten Zwischenprodukte des Benzoatabbaus durch *Desulfobacterium anilini* im Vergleich zu dem von *Thauera aromatica*. Aufgetragen wurde auf den jeweiligen Bahnen: 1) Benzoesäurestandard; 2) nach 7 min, aber mit für 10 min auf 100 °C erhitzten Zellen von *D. anilini*; 3) – 5): Zwischenprodukte aus *D. anilini*, 3) nach 0,5 min, 4) nach 2 min, 5) nach 7 min; Zwischenprodukte aus Zellen bzw. zellfreien Extrakten aus *Thauera aromatica* 6) *in vivo*, nach 7 min, 8) *in vitro*, nach 5 min.; Bahn 8 gibt schematisch die R_f -Werte folgender Substanzen wieder: a) Cyclohex-1-encarboxylsäure, b) Benzoesäure, c) Startlinie

Auffällig ist die Entstehung eines Produktes aus Benzoat, das deutlich unpolarer ist als Cyclohex-1-encarbonsäure (ABBILDUNG 26b). Es ist bei den Vergleichsubstanzen, die durch *Thauera aromatica* in zellfreien Extrakten produziert wurden, nicht vorhanden. Dies deutet, wie auch die Ergebnisse des Parallelversuches mit *Syntrophus gentianae*, auf einen Unterschied im Stoffwechsel der beiden Bakterienarten hin. Weiterhin ist es interessant, daß diese sehr unpolare Substanz, die den gleichen R_f -Wert hat wie kommerzieller Cyclohexancarboxylsäure, offenbar als erstes Abbauprodukt (Reduktionsprodukt) im Benzoatabbau auftaucht. Neben dieser hochgradig unpolaren Substanz entstehen zwei weitere Zwischenprodukte, die unpolarer sind als Benzoat, wohl aber polarer als das unpolarste Zwischenprodukt. Zwischenprodukte mit gleichen R_f -Werten wurden auch bei den Versuchen mit *Thauera aromatica* gefunden. Bei den Zwischenprodukten aus *Syntrophus gentianae*, die polarer als Benzoat sind, wurden gleiche R_f -Werte gefunden, wie bei denen aus *Thauera aromatica*,

was

darauf

schlie-

ßen läßt, daß es sich um identische Produkte handelt. Sie sind identisch mit denen von den Vergleichsubstanzen *cis*-2-Hydroxycyclohexan-carboxylsäure und *trans*-2-Hydroxycyclohexan-carboxylsäure. Pimelinsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

3.4.2 Messung einzelner Enzyme in zellfreien Extrakten

3.4.2.1 Übersicht über die gemessenen Enzyme

Im weiteren sind die Ergebnisse aus Versuchen, bei denen einzelne Enzyme gemessen wurden, dargestellt. Der zellfreie Extrakt wurde dabei mittels Aufbruch der Zellen durch mehrmalige (3-5 malige) Passage einer French Press hergestellt (s. Material und Methoden, 2.2.3.1). TABELLE 17 gibt eine Übersicht:

Tab. 17: Übersicht über Enzymaktivitäten von *Desulfobacterium anilini*, der in Reinkultur auf Benzoat gezogen wurde

| Enzym | Spezifische Aktivität ¹⁾ [nmol × min ⁻¹ × mg Protein ⁻¹] |
|------------------------------------|---|
| Acetat Kinase | 25 (4) |
| Benzoyl-CoA-Transferase | n. d. ²⁾ |
| Benzoyl-CoA-Ligase | 180 (7) |
| Glutaryl-CoA-Dehydrogenase | 182 (19) |
| Glutaconyl-CoA-Decarboxylase | 18 (2) |
| Pyrophosphatase | 958 (63) |
| 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase | 4270 (53) |

1) in Klammern: Standardabweichung bei n = 5

2) n. d. = nicht detektierbar

3.4.2.2 Eigenschaften der Acyl-CoA-Ligase

Im zellfreien Extrakt der auf Benzoat gewachsenen Zellen von *Desulfobacterium anilini* wurden Acyl-CoA-Ligaseaktivitäten gemessen. Benzoat wurde dabei zum Benzoyl-CoA-Ester umgesetzt (ABBILDUNG 27). Die Ligasereaktion war ATP-abhängig. Es wurde pro Mol umgesetzten Benzoats ein Mol ATP zu je einem Mol AMP und Pyrophosphat umgesetzt.

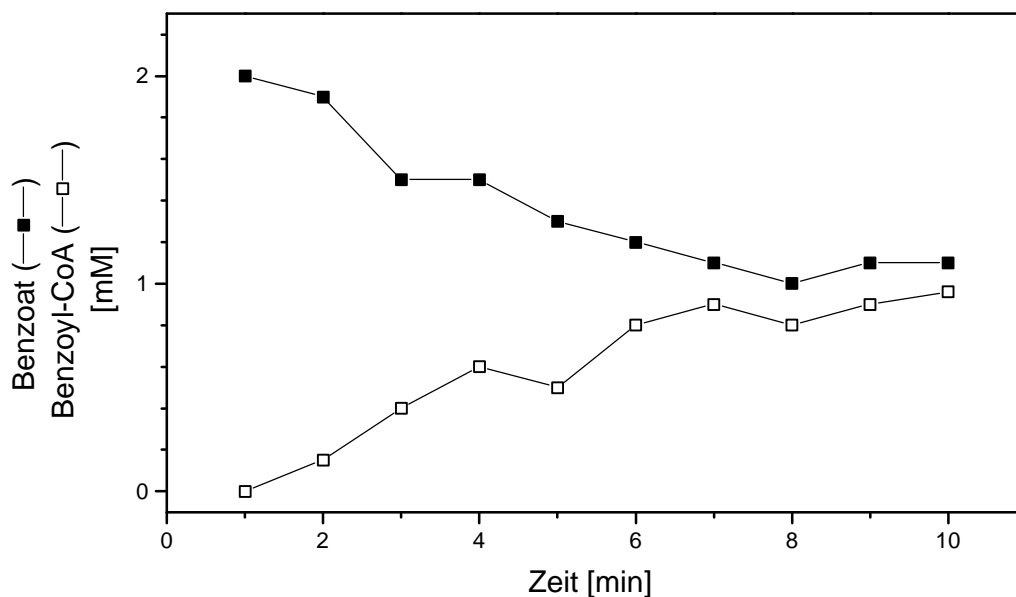


Abb. 27: Die Abbildung zeigt das Verhältnis von Benzoat Abnahme zu Benzoyl-CoA Zunahme in zellfreien Extrakten von *Desulfobacterium anilini* bei für die Benzoyl-CoA-Ligase günstigen Bedingungen. Die Identifikation des CoA-Esters erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.3.1.2 beschrieben.

Die spezifische Aktivität lag dabei mit ca. $320 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ ca. 1,5 mal so hoch, wie die der Benzoyl-CoA-Ligase aus *Syntrophus gentianae*, siehe TABELLE 18 und 19.

Tab. 18: Spezifische Aktivität der Benzoyl-CoA-Ligase aus *Desulfobacterium anilini*

| Enzym | Spezifische Aktivität ¹⁾ [nmol × min ⁻¹ × mg Protein ⁻¹] |
|--------------------|---|
| Benzoyl-CoA-Ligase | 324 (17) |

1) in Klammern: Standardabweichung bei n = 5

Tab. 19: Eigenschaften der Benzoyl-CoA-Ligase in zellfreien Extrakten von *Desulfobacterium anilini* nach Wachstum auf Benzoat

| | K_M (mM) | V_{max} ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$) |
|--------------------|------------|--|
| Benzoyl-CoA-Ligase | 0,026 | 0,32 |

3.4.2.3 Eigenschaften der Pyrophosphatase

Da sich herausgestellt hatte, daß die Pyrophosphatase von *Syntrophus gentianae* membranständig ist und durch die Translokation von Protonen über die Membran energiereiches Pyrophosphat in chemisch verwertbare Energie umwandelt, stellte sich die Frage, ob es sich bei dem analogen Enzym aus *Desulfobacterium anilini* ebenfalls um eine membrangebundene Pyrophosphatase handelt, die ebenso Ionen (Protonen) über die Membran transloziert. Zunächst wurde eine Pyrophosphatase gemessen und ihre Lokalisation bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in TABELLE 20 zusammengefaßt:

Tab. 20: Vergleich der Enzymaktivitäten von *Desulfobacterium anilini* nach Trennung des durch nicht-selektiven Aufschluß erhaltenen zellfreien Extraktes in cytosolische und Membranfraktion

| Aktivität | zellfreier Ex- trakt | Membranfraktion | cytosolische Fraktion |
|---|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| | % Aktivität | % Aktivität | % Aktivität |
| Pyrophosphatase | 100 | 0 | 83,7 |
| 3-Hydroxy-butyryl- CoA-Dehydrogenase | 100 | 2,5 | 105,4 |

Es zeigte sich hierbei, daß Pyrophosphatase-Aktivität erwartungsgemäß detektiert werden konnte, daß diese jedoch nicht membranständig ist. Damit läßt sich eine protonen-translozierende Aktivität zwar nicht ausschließen, es läßt sie jedoch nicht sehr wahrscheinlich sein. *Desulfobacterium anilini* kann also durch die Spaltung von Pyrophosphat keine Energie in Form eines erhöhten Protonengradienten konservieren. 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase diente hier wiederum als Markerenzym für Verunreinigungen der Membranfraktion mit Enzymen des Cybols.

3.4.2.4 Eigenschaften der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase

3.4.2.4.1 Nachweis im gekoppelten photometrischen Test

Der photometrische Test wurde analog zu dem Test der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase von *Syntrophus gentianae* durchgeführt. Die so bestimmten spezifischen Aktivitäten im Rohextrakt lagen bei $18,5 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$. Dabei waren 20 mM NaCl im Ansatz.

3.4.2.5 Lokalisation der Decarboxylaseaktivität

Nach einer vorsichtigen Auftrennung des zellfreien Extraktes in eine cytosolische und eine Membranfraktion (Material und Methoden), befand sich die Aktivität nahezu vollständig in der Membranfraktion. Eine Verunreinigung der Membranfraktion mit cytosolischen Enzymen konnte ausgeschlossen werden, da sich das Markerenzym 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase nahezu ausschließlich in der cytosolischen Fraktion befand. Wurde dem zellfreien Extrakt 1 % Triton X-100 zugegeben, löste sich das Enzym aus der Membran und es befand sich nach Trennung von Membran- und cytosolischer Fraktion nahezu ausschließlich in der cytosolischen Fraktion (TABELLE 21). Als membranständiges Enzym kommt es damit für eine Konservierung von Energie –z. B. durch eine Ionen-Translokation– in Frage (s. u.).

Tab. 21: Vergleich der Enzymaktivitäten von *Desulfobacterium anilini* nach Trennung des durch nicht-selektiven Aufschluß erhaltenen zellfreien Extraktes in cytosolische und Membranfraktion

| Aktivität | zellfreier Ex- trakt | Membranfraktion | cytosolische Fraktion |
|--|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| | % Aktivität | % Aktivität | % Aktivität |
| 3-Hydroxy-butyryl-CoA-Dehydrogenase | 100 | 1,5 | 93,4 |
| Glutaconyl-CoA-Decarboxylase | 100 | 82,3 | 0 |
| Glutaconyl-CoA-Decarboxylase ¹⁾ | 100 | 3,4 | 78,7 |

1) nach Zugabe von 1% Triton X-100 zum zellfreien Extrakt

Durch die Auftrennung des zellfreien Extraktes in cytosolische und Membranfraktion kam es zu einem Verlust von ca. 20 % der Aktivität, der nicht verhindert werden konnte.

3.4.2.6 Einfluß von Avidin und Biotin auf die Glutaconyl-CoA-Decarboxylase-Aktivität

Wie bei der Glutaconyldecarboxylase aus *Syntrophus gentianae*, konnte die Decarboxylaseaktivität in zellfreien Extrakten von *Desulfobacterium anilini* in der Membranfraktion durch Zusatz von Avidin (0,4 mg × ml⁻¹) zum Enzymassay weitgehend gehemmt werden. Durch die Zugabe von Biotin wurde die Hemmung teilweise wieder aufgehoben. Eine Zugabe von mit Biotin vorinkubiertem Avidin zum Enzymassay zeigte keine hemmende Wirkung (TABELLE 22). Damit konnte gezeigt werden, daß das untersuchte Enzym Biotin-abhängig ist

Tab. 22: Einfluß von Avidin und Biotin auf die Glutaconyl-CoA-Decarboxylaseaktivität in der Membranfraktion von *Desulfobacterium anilini*

| Zugabe | spezifischeAktivität [nmol × min ⁻¹ × mg Protein ⁻¹] |
|-------------------------------|--|
| ohne | 18 |
| Avidin ¹⁾ | 2,5 |
| Avidin + Biotin ²⁾ | 7,1 |

Avidin + Biotin³⁾ 17,9

- 1) Konzentration: $0,4 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$
- 2) Konzentration: $0,8 \text{ mM}$
- 3) mit Biotin abgesättigtes Avidin

3.4.2.7 Na^+ -Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität

In der Membranfraktion konnte eine Abhängigkeit der Decarboxylaseaktivität von Na^+ -Ionen gezeigt werden (ABBILDUNG 28)

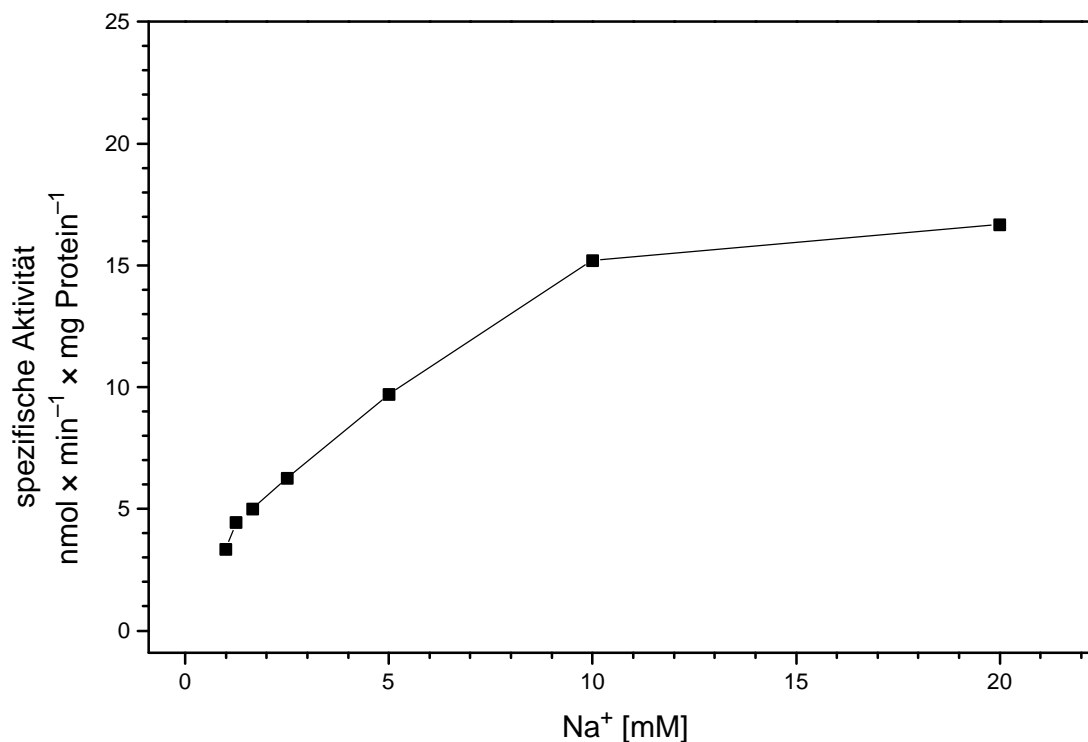


Abb. 28: Abhängigkeit der Glutaconyl-CoA-Decarboxylaseaktivität in der Membranfraktion des zellfreien Extraktes von *Desulfobacterium anilini* von der Na^+ -Ionenkonzentration im Testansatz. Die minimale Konzentration an Na^+ -Ionen betrug $0,019 \text{ mM}$.

Die spezifische Aktivität ließ sich durch Zugabe von 20 mM NaCl zum Testansatz auf das 180-fache steigern. In den Testansätzen geringerer Na^+ -Konzentration wurden die Na^+ -Ionen durch K^+ -Ionen ersetzt, so daß die Osmolarität in allen Ansätzen gleich war. Der K_M -Wert für Na^+ -Ionen beträgt $4,6 \text{ mM}$, V_{max} beträgt $18,5 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$.

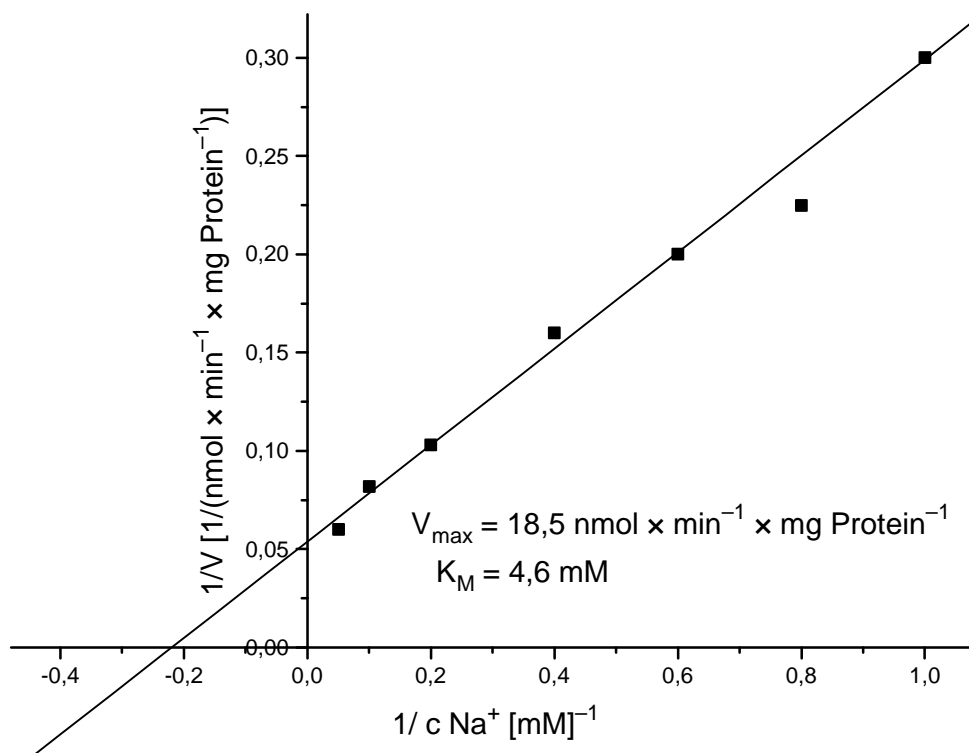


Abb. 29: Lineweaver-Burk-Auftragung des Experimentes in Abbildung 28.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Energiestoffwechsel eines syntrophen Benzoat-Vergärers zu verstehen. Erkenntnisse über den Energiestoffwechsel sollten auf der Ebene der syntrophen Beziehung zu einem methanogenen Partner und auf subzellulärer Ebene erarbeitet und ein möglicher Abbauweg vorgestellt werden. Ein Vergleich mit veröffentlichten Daten von benzoatabbauenden nitratreduzierenden Bakterien und mit in dieser Arbeit ermittelten Daten eines benzoatabbauenden sulfatreduzierenden Bakteriums sollte angestellt werden.

4.1 Teil 1: Energetik des Benzoatabbaus auf der Ebene der syntrophen Beziehung zu einem methanogenen Partnerorganismus

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte erstmalig gezeigt werden, daß der Benzoatabbau durch methanogene Cokulturen zu meßbaren Restkonzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) an Benzoat führt. Sowohl in wachsenden Kulturen, als auch in dichten Zellsuspensionen konnte nicht-abgebautes Benzoat nachgewiesen werden. In den Experimenten mit *Syntrophus gentianae* und *Methanospirillum hungatei* lagen die Benzoat-Restkonzentrationen über $10 \mu\text{M}$. Warikoo *et al.* (1996) fanden in sulfatreduzierenden Cokulturen Benzoat-Restkonzentrationen höher als $0,2 \mu\text{M}$ nur dann, wenn Acetat extern zugegeben wurde. Als Grund für diese Ergebnisse ist thermodynamische Limitierung wahrscheinlich:

1. Wasserstoff akkumulierte in BES-gehemmten methanogenen Cokulturen zu Partialdrücken, die 12,5 mal so hoch waren wie in nicht gehemmt. Die Benzoat-Restkonzentrationen waren (thermodynamisch entsprechend) höher.
2. Zugaben von *Desulfovibrio desulfuricans* zu BES-gehemmten methanogenen Cokulturen hatten einen weiteren Abbau des noch vorhandenen Benzoats zur Folge. Dieser trat zeitgleich mit dem Sinken des Wasserstoff-Partialdrucks auf.

Eine thermodynamische Begrenzung des Benzoatabbaus durch Wasserstoff konnte auch in sulfatreduzierenden Cokulturen gezeigt werden. Auch in diesem Falle hemmten erhöhte Wasserstoff-Partialdrücke (erreicht durch Hemmung der Wasserstoffoxidation) den Benzoatabbau und führten zu meßbaren Benzoat-Restkonzentrationen. Diese Ergebnisse zeigen

eindeutig, daß der Benzoatabbau durch sich anstauende Wasserstoff-Partialdrücke thermodynamisch limitiert ist.

Da sowohl Wasserstoff als auch Acetat in einer Stöchiometrie von jeweils drei Mol pro Mol verwertetem Benzoat produziert werden, sollte eine thermodynamische Hemmung durch Acetat genauso wahrscheinlich sein wie eine durch Wasserstoff. So konnte ein Wiedereinsetzen des Benzoatabbaus in methanogenen Cokulturen, die ins thermodynamische Gleichgewicht gelaufen waren, durch die Entfernung von Acetat aus dem Gleichgewicht erreicht werden. Dies war bei methanogenen und sulfatreduzierenden Cokulturen der Fall. Bei sulfatreduzierenden Cokulturen konnte dieser Effekt gezeigt werden, indem der Sulfatreduzierer durch Molybdat gehemmt wurde und deshalb Benzoat in meßbaren Konzentrationen nicht weiter abgebaut wurde.

Die bis hier diskutierten Ergebnisse zeigen also, daß der Benzoatabbau sowohl durch Wasserstoff, als auch durch Acetat thermodynamisch limitiert ist.

Nach Auslaufen des Benzoatabbaus hing die für den Gärer verbleibende Gibbssche Freie Reaktionsenthalpie von der Acetatkonzentration ab, die sich im Laufe des Benzoatabbaus gebildet hatte. Dieser Effekt steigender Acetatkonzentrationen im Medium kann dadurch erklärt werden, daß die nicht-dissoziierte Essigsäure entkoppelnd auf den ΔpH als Teil des elektrochemischen Protonengradienten wirkt (Herrero *et al.*, 1985; Krulwich, 1987; Fukuzaki *et al.*, 1990). Menzel und Gottschalk (1985) maßen den intrazellulären pH in wachsenden Kulturen von *Acetobacterium wieringae* und *Acetobacter aceti* und fanden einen erniedrigten intrazellulären pH in Abhängigkeit von einer erhöhten extrazellulären Konzentration an Acetat. Sie zeigten weiterhin, daß weder der Anaerobier noch der Aerobier in der Lage war, einen deutlichen ΔpH bei Anwesenheit hoher äußerer Konzentrationen an Acetat zu erhalten. Es ist jedoch überraschend, daß in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten ein vergleichbarer Effekt schon bei weitaus geringeren Acetatkonzentrationen festgestellt wurde. Da die Substratumsatzrate beim Benzoat-vergärenden Bakterium viel geringer und die energetische Situation viel empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen ist, läßt sich vermuten, daß auch weitaus geringere Entkopplungseffekte meßbar werden.

Zugaben des Protonophors CCCP zu methanogenen Mischkulturen, die durch BES gehemmt waren, resultierten in einem weiteren Benzoatabbau. Dieses Ergebnis deutet darauf

hin, daß die Benzoatverwertung bei *S. gentianae* an den Aufbau eines Protonengradienten gekoppelt ist. Deshalb ist zu erwarten, daß eine Erniedrigung des elektrochemischen Gradienten $\Delta\mu\text{H}^+$ eine Stimulierung des Benzoatabbaus und einen Anstieg des Wasserstoff-Partialdruckes bewirkt. Wenn die verbleibende Energie zu klein wird ($< -45 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$), um diesen Prozess voranzutreiben, können keine weiteren Protonen transloziert werden und der Benzoatabbau schreitet nicht weiter fort. Experimentelle Erniedrigung des $\Delta\mu\text{H}^+$ durch Einsatz von CCCP ermöglicht weitere Protonentranslokation und Benzoatabbau und Wasserstoffproduktion beginnen wieder. Dennoch lief nach Zugabe von CCCP die Reaktion nicht in ihr thermodynamisches Gleichgewicht ($\Delta G' = 0$). Dies kann mit einem Bedarf an ATP für die anfängliche Aktivierung von Benzoat und einer partiellen Hydrolyse von ATP aufgrund des erniedrigten Protonengradienten erklärt werden.

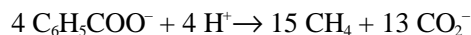
Die Korrelation zwischen $\Delta G'$ und der Konzentration von Acetat im System legt für Acetat eine ähnlich depolarisierende Wirkung wie die des Protonophors CCCP nahe. Ein weiteres Indiz für diese Annahme liegt in dem Befund, daß der Effekt von CCCP und der vorgeschlagene Entkopplungs-Effekt von Acetat zu einem weiteren Abbau von Benzoat führten. Der fortgesetzte Abbau endete, wenn für den Gärer ein $\Delta G'$ von nur noch $-30 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ verfügbar war. Um den minimalen Betrag an Gibbsscher Freier Energie, der für *S. gentianae* zum Benzoatabbau mit parallellaufender Energiekonservierung zur Verfügung stehen muß, bestimmen zu können, mußte eine entkoppelnde Wirkung von Acetat ausgeschlossen werden. Versuche mit Acetatabbau durch *M. concilii* ergab einen Grenzwert von $\Delta G' = -45,8 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$. Dieser Betrag ist anscheinend der minimale Betrag an Gibbsscher Freier Energie, der dem syntrophen Gärer *S. gentianae* zur Verfügung stehen muß, um unter Energiekonservierung Benzoat abzubauen zu können. Der gleiche Betrag wurde als Restenergie zum Endpunkt des Benzoatabbaus durch Stamm SB in sulfatreduzierender Cokultur mit *Desulfovibrio* sp. Stamm G-11 von Warikoo *et al.* (1996) gefunden.

Die berechneten Werte für die Gibbssche Freie Energie, die dem Gärer sowohl in wachsenden Kulturen als auch in dichten Zellsuspensionen zur Verfügung steht, ist mit $-45,8 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ doppelt so groß, wie die für Bakterien, die Butyrat in methanogenen Systemen oxidieren (Schink und Thauer, 1988). Ein Wert von $-45,8 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ entspricht energetisch 2/3 einer ATP-Einheit und sind damit doppelt so hoch, wie die Werte,

| | | |
|-----|-----------|----------|
| die | syntrophe | Butyrat- |
|-----|-----------|----------|

Gärer für ihre Energiekonservierung benötigen ($-23\text{kJ} \times \text{mol}^{-1}$; Wallrabenstein und Schink, 1994).

In natürlichen (Sedimente) oder naturnahen Habitaten (Faultürme) wird Benzoat durch ein Zusammenwirken dreier metabolisch verschiedener Mikroorganismen zu Methan und CO_2 mineralisiert. Hierzu sind 19 Teilreaktionsschritte für vier Mol Benzoat nötig:



$$\Delta G' = -672,4 \text{kJ} \times (4 \text{ mol Benzoat})^{-1}$$

Unter Berücksichtigung der hier wiedergegebenen Ergebnisse muß angenommen werden, daß für den ersten ablaufenden Reaktionsschritt jeweils ein Betrag von $-45 \text{kJ} \times \text{mol}^{-1}$ benötigt wird. Demnach bleibt eine Restenergie von $-29,5 \text{kJ} \times \text{mol}^{-1}$ für jeden weiteren der verbleibenden restlichen 15 Teilreaktionsschritte. Selbst unter der Annahme, daß die Benzoatkonzentration im Bereich von 10^{-8}M liegt, verbleiben dem Gärer noch $-45 \text{kJ} \times \text{mol}^{-1}$, wenn man einen Energiebetrag von $<-20 \text{kJ} \times \text{mol}^{-1}$ für jeden durch einen methanogenen Partner katalysierten Reaktionsschritt. Dieser Betrag repräsentiert den minimalen Betrag an Energie, der für ATP-Bildung durch Bakterien benötigt wird (Schink, 1990). Demnach ist der Benzozabbau unter methanogenen Bedingungen bis herunter zu Konzentrationen von 10^{-8}M nicht thermodynamisch limitiert. Bis jetzt wurden noch keine Werte für Konzentrationen von freiem Benzoat in natürlichen Ökosystemen oder Faultürmen veröffentlicht. Eine Kenntnis der Konzentrationen von Benzoat in solchen Ökosystemen kann weitere Hinweise auf die Energetik des syntrophen Benzozabbaus liefern und ist deshalb erstrebenswert.

4.2 Teil 2: Identifizierung von Zwischenprodukten

Erste Studien an Reinkulturen zum anaeroben Photometabolismus von Benzoat bei *Rhodospseudomonas palustris* führten zur Formulierung der Hypothese, daß die anaerobe Dearomatisierung des Benzolkerns über einen reduktiven Mechanismus verläuft (Dutton und Evans, 1969). In Zellsuspensionsversuchen wurden mehrere Abbauprodukte von ^{14}C -markiertem Benzoat nachgewiesen. Dies waren ^{14}C -Cyclohexancarboxylat, ^{14}C -Cyclohex-1-en-1-carboxylat, ^{14}C -2-Hydroxycyclohexan-1-carboxylat sowie ^{14}C -Pimelat, welches als primäres Produkt nach der Öffnung des Cyclohexanringes aufgefaßt wurde. Der Nachweis des

anaeroben Abbaus von Benzoat durch einen denitrifizierenden *Pseudomonas*-Stamm bewies, daß sich der anaerobe Aromatenabbau nicht ausschließlich auf phototrophe Bakterien beschränkt. Von Taylor *et al.* (1970) wurde eine oxidative Ringspaltung mit H_2O oder NO_3^- als möglichen Sauerstoffdonoren favorisiert. Aspekte der Energetik und der Mechanistik ließen diese Vorschläge jedoch wenig plausibel erscheinen. In der Folgezeit wurden immer mehr Ergebnisse erarbeitet, die eine reduktive Dearomatisierung des Benzolkerns sehr wahrscheinlich erscheinen ließen. Eine oxidative Ringspaltung unter anoxischen Bedingungen wurde kaum mehr diskutiert. Das von Dutton und Evans (1969) für den Abbau radioaktiv markierten Benzoats durch *Rhodospseudomonas palustris* erstmals beschriebene Produktmuster wurde auch bei denitrifizierenden Reinkulturen (Williams und Evans, 1975) und methanogenen Mischkulturen (Balba und Evans, 1977) wiedergefunden. Bei verschiedenen anaeroben Bakterien könnten also ähnliche Mechanismen der Ringspaltung verwirklicht sein.

Da ein Abbau von Benzoat durch zellfreie Extrakte von *Syntrophus gentianae in vitro* nicht nachgewiesen werden konnte, wurden Zwischenprodukte des Abbaus von [Ring- ^{14}C]-Benzoat durch *S. gentianae* aus den Zellen isoliert.

Das erste Zwischenprodukt ist deutlich weniger polar als Benzoesäure. Es kann sich somit nur um ein reduziertes Benzoesäurederivat handeln. Da es außerdem auch unpolarer als Cyclohex-1-encarboxylsäure ist, ist zu vermuten, daß es sich um ein Dien oder um Cyclohexancarbonsäure handelt. Dieses Zwischenprodukt entsteht nicht bei *in vitro* Parallel-Versuchen mit *Thauera aromatica*. Es ist jedoch in geringen Mengen bei *in vivo* Versuchen mit *T. aromatica* zu sehen.

Für die Reduktion des Benzoyl-CoA-Esters sind mehrere verschiedene Möglichkeiten denkbar: Es könnte sich um einen Zwei-, Vier- oder Sechs-Elektronenschritt handeln, bei denen die Elektronen einzeln oder als Paare übertragen werden. Für *T. aromatica* ist für die *in vitro* Situation ein Eins-plus-eins Elektronenschritt nachgewiesen, bei dem das Cyclohex-1,5-dien-1-carboxyl-CoA entsteht (Boll und Fuchs, 1995). Diese Reaktion ist ATP-abhängig: Pro Mol Benzoesäure werden 2 Mol ATP benötigt. Es ist zweifelsfrei, daß die Carbonylgruppe des CoA-Esters der Benzoesäure das mittlere Redoxpotential der Reduktion des Benzolrings im Vergleich zur freien oder dissoziierten Säure deutlich senkt. Nach Heider und Fuchs (1997) liegt beim Ethylthioester der Benzoesäure das mittlere Redoxpotential für die Übertragung

des ersten Elektrons in den Benzolring bei ca. $-1,8$ Volt. Dies wurde durch Messungen mit dem Thioethylester der Benzoesäure bestimmt. Als natürlicher Elektronen-Donor für die *in vivo* Reduktion von Benzoyl-CoA durch *T. aromatica* wurde ein Ferredoxin mit einem Redoxpotential von $-0,4$ V angegeben (Heider und Fuchs, 1997). Demnach ist für die Reduktion ein mittleres Gesamtpotential von $-1,4$ V für das erste übertragene Elektron unter Energieaufwand zu überwinden. Diese Gesamtenergie wird durch einen Energieäquivalentenaufwand von 2 ATP geleistet. Für einen syntrophen Gärer, dessen Energiebudget enge Grenzen hat, ist ein solcher Aufwand nicht möglich. Aus dieser und den folgenden Überlegungen ist ein Vier- oder Sechs-Elektronenschritt wahrscheinlicher: Die Reduktion des aromatischen Ringes zum vollständig gesättigten mit Wasserstoff als Elektronendonator ist exergon, wie ABBILDUNG 30 verdeutlicht.

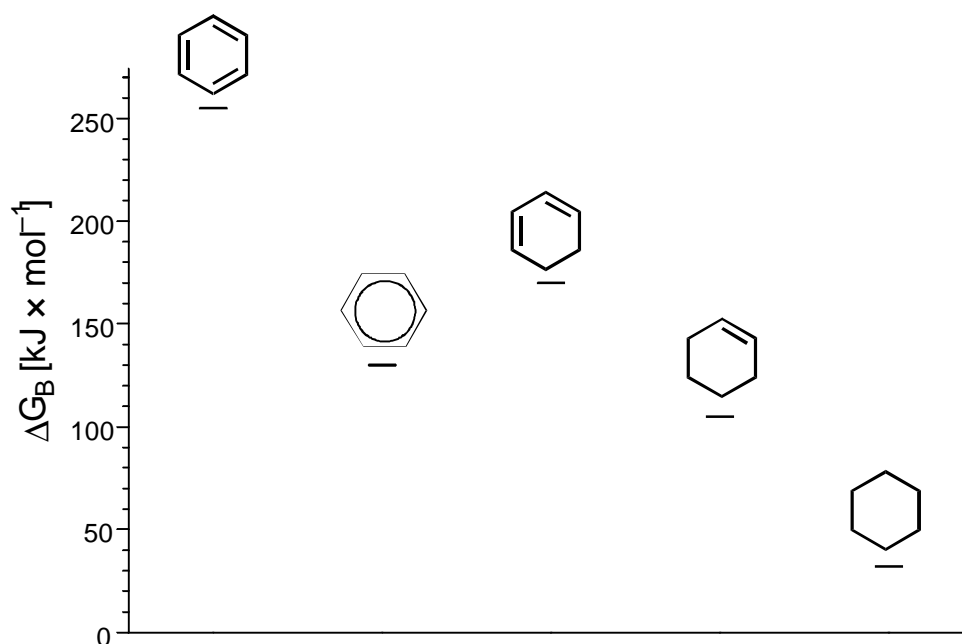


Abb. 30: Schematische Darstellung der molaren freien Bildungsenthalpie (ΔG_B) von Cyclohexatrien (theoretisch), Benzol, Cyclohexadien, Cyclohexen und Cyclohexan (nach D'Ans und Lax, 1983).

Das Redoxpotential des Redoxpaares Benzol/Cyclohexan liegt bei -250 mV (berechnet mit den Werten für die molaren freien Bildungsenthalpien (D'Ans und Lax, 1983) der beteiligten Redoxpartner; TABELLE 22). Das Redoxpotential für das Redoxpaar Benzol/Cyclohexen liegt bei -360 mV. Der Benzolring sollte sich also unter Voraussetzung geringer Aktivierungsenergie ohne Energieaufwand z. B. durch ein Ferredoxin zum einfach ungesättigten oder vollständig gesättigten Ring reduzieren lassen.

Tab. 22: Standard Redoxpotentiale verschiedener Redoxpaare

| Redoxpaar | E° [mV] |
|----------------------|------------------|
| Benzol/Cyclohexadien | -628 |
| Benzol/Cyclohexen | -356 |

| | |
|---------------------------------|--------------------|
| Benzol/Cyclohexan | -252 |
| Ferredoxin ox/red ¹⁾ | -398 |
| Flavodoxin ox/red | -370 ²⁾ |
| NAD/NADH | -320 |
| Flavodoxin ox/red | -120 ³⁾ |

1) aus *Clostridium pasteurianum*

2) Potential für das erste übertragene Elektron

3) Potential für das zweite übertragene Elektron

Das Standardredoxpotential für Benzoessäure/Cyclohexancarboxylsäure bzw. deren CoA-Ester dürfte in einem ähnlichen Bereich liegen. Durch die elektronenziehenden Kräfte der Carbonylgruppe ist sogar ein noch positiveres Redoxpotential zu erwarten. Damit dürfte die Reduktion mit Elektronendonoren wie Pyridinnukleotiden ohne Energieaufwand möglich sein. Die Reduktion kann aber auch, wie oben angedeutet, mit einem Vier-Elektronenschritt erfolgen. Auch hier ist, abgesehen von eventuell nötiger Aktivierungsenergie, ein Energieaufwand nicht nötig, wie ein Vergleich mit der Reduktion von Benzol zu Cyclohex-1-en mit 2 Molekülen Wasserstoff zeigt. Diese Reaktion ist mit $\Delta G^{\circ} = -25 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ exergon. Sie ist auch mechanistisch möglich, wie mit Pentaaminomonium(II) als Katalysator nachgewiesen werden konnte (Harman und Taube, 1988). In Zellsuspensionsversuchen wurden bis 1992 nur einfach ungesättigte und vollständig gesättigte zyklische Verbindungen als Produkte der Ringreduktion gefunden (Evans und Fuchs, 1988). Gibson und Gibson konnten dann 1992 in Zellsuspensionsversuchen zum Benzoat-Abbau bei *Rhodopseudomonas palustris* erstmals zyklische Diene als Produkte der Ringreduktion nachweisen. Dabei wurden nach alkalischer Hydrolyse und Methylierung über kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie Cyclohexa-2,5-dien-1-carboxymethylester und Cyclohexa-1,4-dien-1-carboxymethylester

in

zellfreien Extrakten nachgewiesen. Cyclohexa-2,5-dien-1-carbonsäure wäre auch als Produkt bei der chemischen Birch-Reduktion des Benzols in ethanolisch-ammoniakalischer Lösung mit elementarem Natrium als Reduktionsmittel erwartet worden (Birch und Smith, 1958). Koch und Fuchs (1992) gelang es erstmals *in vitro*, die Bildung von Produkten aus [Ring-¹⁴C]-Benzoessäure bei einem denitrifizierenden *Pseudomonas*-ähnlichen Stamm nachzuweisen. Dieser wurde später als neue Art *Thauera aromatica* K 172 beschrieben (Anders *et al.*, 1995). Das Testsystem enthielt neben zellfreien Extrakten radioaktiv markiertes Benzoat, Coenzym A und MgATP zur Bildung von Benzoyl-CoA durch die in den Extrakten endogen vorhandene Benzoyl-CoA-Ligase, sowie Ti(III)-Citrat als Elektronendonator für die Ringreduktion. Nach alkalischer Hydrolyse der CoA-Thioester und dünnstschichtchromatographischer Auftrennung der resultierenden Säuren konnten über Autoradiographie drei im Verhältnis zur Benzoessäure weniger polare, radioaktiv markierte Verbindungen nachgewiesen werden. Während die am wenigsten polare dieser Substanzen über Co-Chromatographie vorläufig als Cyclohex-1-en-1-carbonsäure identifiziert wurde, zeigten die beiden anderen ein Laufverhalten, wie es für Cyclohexadiencarbonsäuren erwartet wurde. Weitere Hinweise auf das Entstehen von Cyclohexadiencarbonsäuren als physiologischen Zwischenprodukten wurden schließlich über den Einsatz von ¹³C-markierter Benzoessäure im gleichen Testsystem (Koch *et al.*, 1993) erhalten. Durch Nachweis der Produkte über NMR-spektroskopische Methoden konnte dabei auf eine möglicherweise zu Artefakten führende alkalische Hydrolyse verzichtet werden. Eine Reihe von ¹³C-markierten Verbindungen konnte als CoA-Thioester identifiziert werden, wobei als postuliertes primäres Produkt der Ringreduktion ¹³C-Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA identifiziert wurde. Dies wurde dadurch bestätigt, daß die Substanz sich im Testansatz früh bildete und anschließend durch nachfolgende (vermutlich enzymatische) Umsetzungen wieder abnahm. ¹³C-Cyclohex-1-en-1-carboxyl-CoA, das erwartete Produkt bei einer Vierelektronenreduktion, wurde erst spät in geringen Mengen gebildet, während ¹³C-Cyclohexancarboxyl-CoA überhaupt nicht nachgewiesen werden konnte. Ein weiteres wichtiges Indiz für die Eins-plus-eins-Elektronenreduktion von Benzoyl-CoA zu Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA durch zellfreie Extrakte von *T. aromatica* war die Identifizierung von 6-Hydroxycyclohex-1-en-1-carboxyl-CoA und 3-Hydroxypimelyl-CoA, welches das Hauptprodukt der Umsetzung darstellte. Erstere Verbindung resultiert aus einer Wasseranlagerung an

Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA, und letztere ist als das Produkt einer hydrolytischen Ringöffnung nach Oxidation einer Hydroxylgruppe aufzufassen.

2-Hydroxycyclohexan-1-carboxy-CoA wurde erst spät im Reaktionsansatz nachgewiesen, während Pimelyl-CoA überhaupt nicht detektiert werden konnte. Beide Substanzen wären als Intermediate bei einer Reduktion von Benzoyl-CoA zu Cyclohex-1-en-1-carboxyl-CoA (also mit vier Elektronen) erwartet worden.

Das von Koch *et al.* (1993) gefundene Produktmuster steht damit im Widerspruch zu den Ergebnissen von Gibson und Gibson (1992).

Bei der Umsetzung von [Ring-¹⁴C]-Benzoat mit zellfreien Extrakten von *T. aromatica* und *Rhodopseudomonas palustris* wurden nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der freien Säuren sehr ähnliche Produktmuster erhalten (Koch und Fuchs, 1992). Daher wird in beiden Bakterienarten ein gleicher oder sehr ähnlicher Mechanismus postuliert. Es wird diskutiert, daß dieser analog zur chemischen Birch-Reduktion ist (Koch *et al.*, 1993), bei der der aromatische Ring in zwei Einelektronenschritten zum zyklischen Dien reduziert wird. Daß das bei der chemischen Birch-Reduktion der Benzoesäure erwartete Cyclohexa-2,5-dien nicht detektiert wurde, steht nicht unbedingt im Widerspruch zu dieser Annahme. Vielmehr könnte die Thioestergruppe den Reaktionsverlauf in Richtung der Bildung des 1,5-Diens begünstigen (Buckel und Keese, 1995).

Versuche, den *in vitro* Test, der zur Aufklärung der Reduktionsreaktion vom Benzoyl-CoA zum Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA durch zellfreie Extrakte von *T. aromatica* geführt hat, mit *Syntrophus gentianae* durchzuführen, schlugen fehl. Dabei wurden als Kontrolle des Test-systems zellfreie Extrakte von *T. aromatica* erfolgreich eingesetzt. Möglicherweise ist dies zusammen mit dem von *T. aromatica* verschiedenen Produktmuster ein Hinweis darauf, daß die Benzoyl-CoA-Reduktase von *T. aromatica* deutlich verschieden von der von *S. gentianae* reagiert.

Die in Zellen von *S. gentianae* gefundenen Zwischenprodukte deuten nicht auf eine Zwei-Elektronenreduktion des Benzoyl-CoA hin. Das erste auftretende Reduktionsprodukt ist weniger polar als Cyclohex-1-encarboxylsäure. Es handelt sich vermutlich um Cyclohexancarboxylsäure. Diese Vermutung wird dadurch gestärkt, daß Cyclohexancarboxylsäure den gleichen R_f-Wert hat. Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß Cyclohexancarboxylsäure

durch Reduktion von Cyclohex-1-encarboxylsäure (das Produkt einer Vier-Elektronen-Reduktion) als ein u. U. unphysiologisches Nebenprodukt entsteht, kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß der aromatische Ring beim physiologischen Abbau zweifach oder gar vollständig gesättigt wird. Cyclohex-1-encarboxylsäure wird offensichtlich gebildet, es entsteht ein Zwischenprodukt, welches den gleichen R_f -Wert hat und daher co-chromatographiert. Dabei kann nicht entschieden werden, ob zweimal zwei Elektronen oder aber vier Elektronen gleichzeitig übertragen werden. Desweiteren ist interessant, daß Substanzen gebildet werden, die den gleichen R_f -Wert haben wie *trans*-2-Hydroxycyclohexancarboxylsäure und *cis*-2-Hydroxycyclohexancarboxylsäure. 2-Hydroxycyclohexancarboxylsäure ist bei einer Vier-Elektronen-Ringreduktion ein sehr wahrscheinliches Zwischenprodukt und schwer in einem Reaktionsschema vorstellbar, dessen primäre Reaktion eine Zwei-Elektronen-(oder Eins-plus-eins-) Reduktion des Benzoyl-CoA darstellt. ABBILDUNG 31 zeigt einen möglichen Abbauweg, der die gefundenen Ergebnisse berücksichtigt:

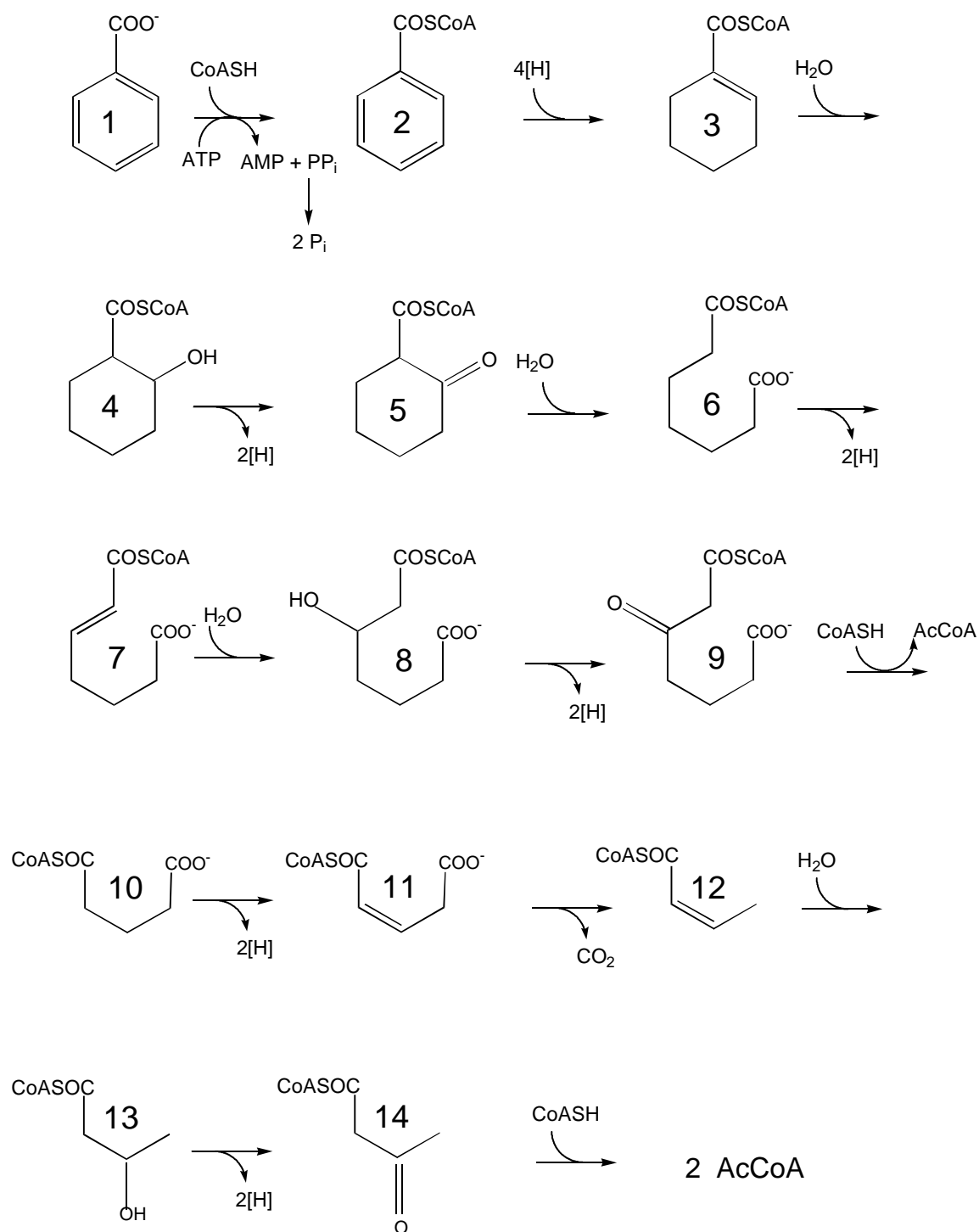


Abb. 31: Darstellung des Benzoatabbauweges von *Syntrophus gentianae* unter Berücksichtigung der gefundenen Zwischenprodukte aus *in vivo* Versuchen mit dichten Zellsuspensionen und [Ring- ^{14}C]-Benzoat. Substanz 1) Benzoat, 2) Benzoyl-CoA, 3) Cyclohex-1-encarboxyl-CoA, 4) 2-Hydroxycyclohexancarboxyl-CoA, 5) Oxocyclohexan-carboxyl-CoA, 6) Pimelyl-CoA, 7) Pimelyl-2-en-CoA, 8) 2-Hydroxypimelyl-CoA, 9) Oxopimelyl-CoA, 10) Glutaryl-CoA, 11) Glutaconyl-CoA, 12) Crotonyl-CoA, 13) 3-Hydroxybutyryl-CoA, 14) Acetoacetyl-CoA

4.3 Teil 3: Messung einzelner Enzyme in zellfreien Extrakten

Die Beteiligung von CoA-Thioestern am anaeroben Abbau von Benzoat wurde erstmals von Guyer und Hege- man (1969) vorgeschlagen und konnte von Whittle *et al.* (1976) *in vitro* gezeigt werden. Bis heute wurden mehrere CoA-Thioester Ligasen gereinigt und charakterisiert, welche unter Hydrolyse von ATP zu AMP und PP_i die Veresterung einer aromatischen Säure mit Coenzym A katalysieren (Geissler *et al.*, 1988; Altenschmidt und Fuchs, 1991; Biegert *et al.*, 1993). In dieser energieverbrauchenden Reaktion war die aus energetischen Gründen erwartete Aktivierung des aromatischen Substrats zu sehen. Darüber hinaus wurde von Harwood und Gibson (1986) der Veresterung eine Rolle beim unidirektionalen Transport von aromatischen Säuren über die Cytoplasmamembran zugeordnet. Nach passiver Diffusion, so die Autoren, sollte eine bereits an der Innenseite der Cytoplasmamembran stattfindende Veresterung mit Coenzym A die Rückdiffusion aus der Zelle verhindern. Ein ähnlicher Aufnahmemechanismus ist für die langkettigen Fettsäuren bei Enterobakterien gezeigt worden (Clark und Crona, 1996).

Zunächst wurde aufgrund der geringen Energie, die *Syntrophus gentianae* zur Verfügung steht, vermutet, daß er im Gegensatz zum Nitratreduzierer *T. aromatica* die Aktivierung des Benzoats durch eine Transferasereaktion erreicht. Denkbar war auch eine Spaltung von Pyrophosphat als energieliefernde Reaktion für die Aktivierungsreaktion. Da im zellfreien Extrakt jedoch keine Transferasereaktion gemessen werden konnte, wurde auf eine Benzoyl-CoA-Ligase hin untersucht. Die gefundene Aktivität war recht hoch, und erstaunlicherweise ging sie mit der Spaltung von ATP zu AMP und Pyrophosphat einher. Für einen Gärer ist dies ein recht hoher Energieaufwand. Die Überlegung, ob die im Pyrophosphat gespeicherte Energie unter Umständen genutzt werden kann, führte zu einer genaueren Untersuchung der Pyrophosphataseaktivität im zellfreien Extrakt. So konnte erstmalig eine membranständige, protonentranslozierende Pyrophosphatase bei einem strikt anaeroben Bakterium beschrieben werden. Dabei konnte in Kopplungsversuchen gezeigt werden, daß pro 3-4 Pyrophosphatspaltungen ein ATP gebildet wird. Bezieht man in die Überlegungen mit ein, daß die Vesikel im Bezug auf Protonen aufgrund der artifiziellen Präparation nicht ganz undurchlässig sind, kann man davon ausgehen, daß das Verhältnis 3 : 1 ist. Dies bedeutet, daß pro gespaltenem Pyrophosphat ein Proton über die Membran transloziert wird. Die Spaltung von

Pyrophosphat stellt ca. $-22 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ zur Verfügung (Thauer *et al.*, 1977), was ungefähr dem Energiebedarf der Translokation eines Protons über die Membran entspricht. Die Annahme, daß es zur Bildung eines ATP-Moleküls der Spaltung dreier Pyrophosphatmoleküle bedarf, wird dadurch erhärtet, daß in der umgekehrten Reaktionsrichtung pro gespaltenem Mol ATP ca. drei Mol Pyrophosphat aus sechs Mol Phosphat gebildet werden.

Daß eine relativ hohe exogene Konzentration an Pyrophosphat offensichtlich nicht zur Energiegewinnung genutzt werden kann, steht hierzu nicht im Widerspruch. Dies kann durch das Fehlen eines Pyrophosphat-Aufnahmesystems erklärt werden.

In den Chromatophoren phototropher Bakterien wurden membranständige, protonen-translozierende Pyrophosphatasen beschrieben, deren Funktion in der Aufrechterhaltung der „protonmotive force“ unter Bedingungen geringer Energieversorgung besteht (Nyren und Strid, 1991). Diese „Bedingungen geringer Energieversorgung“ bestehen für den syntrophen Gärer permanent.

Die Pyrophosphatase aus *S. gentianae* ist Mg^{2+} -abhängig, wie auch die Pyrophosphatasen aus *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* (Lahti, 1983). Die Beziehung zwischen der Mg^{2+} -Konzentration und der Konzentration an Pyrophosphat ist ausführlich für *E. coli* und *S. cerevisiae* beschrieben (Baykov *et al.*, 1990; Josse, 1966; Lahti, 1983; Smirnova *et al.*, 1989). Als tatsächliches Substrat wird MgPP_i^- vorgeschlagen (Josse, 1966; Lahti, 1983). Wie auch für Enzyme aus *E. coli*, *S. cerevisiae* und *Methanosaeta soehngenii* beschrieben, hemmen hohe Konzentrationen an Pyrophosphat die Pyrophosphataseaktivität (Lahti, 1983; Jetten *et al.*, 1992). Wie für die Pyrophosphatase anderer gram-negativer Bakterien beschrieben, ist auch das Enzym von *S. gentianae* in Gegenwart von Magnesium bemerkenswert hitzestabil (Blumenthal *et al.*, 1967; Lahti, 1983; Tominaga und Mori, 1977)

Die Glutaconyl-Decarboxylase aus *S. gentianae* ist ein membranständiges, Biotin-haltiges Protein. Die Membranständigkeit und die strikte Na^+ -Abhängigkeit deuten auf eine Funktion als Natrium-Pumpe hin. Auch wenn es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang, über einen durch Monensin ermöglichten Austausch von Na^+ -Ionen gegen Protonen einen weiteren indirekten Hinweis auf eine Funktion als Natrium-Pumpe zu etablieren, so kann doch davon ausgegangen werden, daß die Decarboxylierungsreaktion an eine Konservierung von Energie

durch einen vektoriellen Natriumionen-Transport über die Membran gekoppelt ist. Eine strikte Abhängigkeit von Natriumionen wie die hier gefundene läßt sich sonst kaum erklären.

Der Vergleich der im Testansatz gefundenen spezifischen Aktivitäten von Hydrogenase und Formiatdehydrogenase zeigt mit einer 30-fach höheren Aktivität der Hydrogenase eindeutig an, daß mit dem überwiegenden Anteil der Elektronen Protonen reduziert werden. Ein „interspecies formate transfer“ wie von Thiele und Zeikus (1988) für den syntrophen Abbau von Ethanol oder Laktat in mikrobiellen Aggregaten vorgeschlagen, kann also für die hier vorgefundene Situation ausgeschlossen werden.

Die Reduktion von Gentsyl-CoA durch zellfreie Extrakte von *S. gentianae* führt zu Benzoyl-CoA. Neben Benzoyl-CoA wurden keine weiteren Produkte gemessen. Damit wurde eine enzymatisch katalysierte reduktive Eliminierung von *o*- und *m*-ständigen Hydroxygruppen am aromatischen Ring gezeigt. Dabei konnten keine Zwischenprodukte gefunden werden. Dehydroxylierungen sind für die *p*-Stellung, Desaminierungen für die *p*- und *o*-Stellung zu einer mit CoA veresterten Carboxylgruppe beschrieben (Glöckler *et al.*, 1989; Schnell und Schink, 1991; Rudolphi *et al.*, 1991; Lochmeyer *et al.*, 1992). Da sich mit den Monohydroxyderivaten 2- und 3-Hydroxybenzoyl-CoA keine dehydroxylierenden Aktivitäten messen ließen, handelt es sich bei der Reduktion von Gentsyl-CoA vermutlich um einen Vier-Elektronen-Schritt. Dies ist auch vor dem Hintergrund interessant, daß die Wahrscheinlichkeit eines Zwei- oder Eins-plus-eins-Elektronenschrittes bei der Reduktion von Benzoyl-CoA für *S. gentianae* aufgrund des dabei nötigen Energieaufwandes nicht sehr hoch ist.

Während die Reduktion von Protonen mit Elektronen, die von 3-Hydroxybutyryl-CoA stammen, bei einem Wasserstoff-Partialdruck von 10^{-5} bar aus energetischer Sicht möglich ist, ist die Reduktion von Protonen mit Elektronen, die aus der Oxidation von Pimelyl-CoA zu Oxopimelyl-CoA oder von Glutaryl-CoA zu Glutaconyl-CoA stammen, ein problematischer Schritt. Unter der Annahme, daß die Redoxpotentiale der Redoxpaare Oxopimelyl-CoA/Pimelyl-CoA, Glutaconyl-CoA/Glutaryl-CoA und Crotonyl-CoA/Butyryl-CoA in einem ähnlichen Bereich liegen (für das Redoxpaar Crotonyl-CoA/Butyryl-CoA wurde ein Potential von -126 mV bestimmt; Gustafson *et al.*, 1986), ist für diese Reaktionen ein revertierter Elektronentransport zu fordern. Experimentelle Hinweise für einen solchen revertierten Elektronenfluß wurden in Zellen von *Syntrophomonas wolfei* gefunden (Wallrabenstein und

Schink, 1994). Wenn die Energie für einen solchen Prozeß durch den Rückfluß von zwei Protonen in den cytoplasmatischen Raum bereitgestellt wird, läßt sich für die Berechnung der energetischen Bilanz des syntrophischen Benzoatstoffwechsels von *Syntrophus gentianae* eine Investition von $2 \times 2/3$ ATP veranschlagen.

In der Summe müssen also zunächst zwei ATP-Äquivalente für die Aktivierung des Benzoats investiert werden und im weiteren Verlauf des Stoffwechsels weitere $2 \times 2/3$ ATP-Äquivalente für den revertierten Elektronenfluß. Unter der Annahme eines Vier-Elektronen-Schrittes zur Reduktion des Benzoyl-CoA braucht hier kein ATP-Äquivalent investiert werden.

Die in den drei entstehenden Acetyl-CoA konservierte Energie entspricht drei ATP-Äquivalenten, ein weiteres Drittel ATP-Äquivalent pro umgesetzten Benzoat wird durch die Pyrophosphatasereaktion „rückgewonnen“. Zusätzlich kann postuliert werden, daß ein Drittel ATP-Äquivalent aus der Glutaconyl-CoA-Decarboxylasereaktion rückgewonnen wird.

Es werden also insgesamt $3 \frac{1}{3}$ ATP investiert und $3 \frac{2}{3}$ ATP gewonnen. Unter der Annahme einer Vier-Elektronen-Ringreduktion des Benzoyl-CoA ohne ATP-Aufwand steht *Syntrophus gentianae* also netto $1/3$ Mol ATP pro Mol umgesetztem Benzoat zur Verfügung.

4.4 Teil 4: Experimente zum Benzoatabbau durch *Desulfobacterium anilini*

Der Benzoatabbau durch *Desulfobacterium anilini* zeigte bei den Untersuchungen viele Parallelen zu dem durch *Syntrophus gentianae*. Wie auch bei *S. gentianae* konnte ein *in vitro* Abbau von Benzoat durch zellfreie Extrakte von *D. anilini* nicht nachgewiesen werden. Auch hier wurden Zwischenprodukte des Abbaus von [Ring- ^{14}C]-Benzoat durch *D. anilini* aus den Zellen isoliert, da sich diese Methode beim Parallelversuch mit *S. gentianae* bewährt hatte.

Wie bei *S. gentianae* war das erste Zwischenprodukt deutlich weniger polar als Benzoesäure. Es kann sich also auch hier nur um ein reduziertes Benzoesäurederivat handeln. Da es ausserdem unpolarer als Cyclohex-1-encarboxylsäure ist, handelt es sich vermutlich um Cyclohexancarbonsäure, welche den gleichen R_f -Wert hat wie das gefundene Produkt. Ob es physiologisch oder artifiziell entsteht, kann (wie oben erklärt) nicht unterschieden werden. Die-

ses Zwischenprodukt entsteht nicht bei *in vitro* Parallel-Versuchen mit *Thauera aromatica*. Es ist jedoch in geringen Mengen bei *in vivo* Versuchen mit *T. aromatica* zu sehen.

Davon ausgehend, daß *D. anilini* Acetat mit ähnlichem Energiegewinn, wie für andere Sulfat-reduzierende Bakterien beschrieben, oxidieren kann ($2/3$ ATP pro Mol Acetat; Widdel und Hansen, 1992), steht ihm im Vergleich zum Gärer *S. gentianae* $3 \times 2/3$ Mol ATP pro Mol Benzoat mehr ATP zur Verfügung. Dies setzt voraus, daß beim Abbau vom Benzoat bis hin zum Acetat gleich viel Energie gewonnen wird. Da mit den freiwerdenden Elektronen nicht Protonen sondern Sulfat reduziert wird und diese Reduktion um ca. 170 mV (bei Standardbedingungen) positiver ist, ist somit ein Energieaufwand in einen revertierten Elektronenfluß nicht nötig. Unter Umständen können die freiwerdenden Elektronen aufgrund ihres Potentials sogar in die Elektronentransportkette einfließen und somit Energie konserviert werden. *D. anilini* braucht also im Vergleich zu *S. gentianae* $2 \times 2/3$ ATP weniger in den Abbau von Benzoat zu Acetat investieren. Damit stehen ihm insgesamt mindestens $3 \frac{1}{3}$ ATP mehr zur Verfügung als *S. gentianae*. *D. anilini* hat bei Wachstum auf 4-Aminobenzoat einen Wachstumsertrag von $30,6 \text{ g} \times \text{mol (4-Aminobenzoat)}^{-1}$ (Schnell, 1991). Unter der Annahme, daß ein ähnlicher Wachstumsertrag auf Benzoat erreicht wird und daß insgesamt $3 \frac{2}{3}$ Mol ATP beim Abbau von einem Mol Benzoat gebildet werden beträgt der Ertragskoeffizient Y_{ATP} 9 g Trockenzellmasse und liegt damit im Bereich von gemessenen Ertragskoeffizienten ($5-10 \text{ g} \times \text{Mol ATP}^{-1}$; Stouthamer, 1979)

Bei *D. anilini* ist die gefundene Pyrophosphatase nicht membranständig und kann also keine Protonen über die Membran translozieren. Es kann demnach die im Pyrophosphat gespeicherte Energie nicht durch eine Protonentranslokation in eine chemisch verwertbare Form umgewandelt werden.

Wie die Glutaconyl-CoA-Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans* (Buckel, 1986), ist die Glutaconyl-CoA-Decarboxylase aus *D. anilini* membranständig. Sie ist außerdem wie die von *S. gentianae* Biotin-abhängig. Daß sie außerdem Na^+ -abhängig ist, deutet auf eine Funktion als Na^+ -Pumpe hin. Hier besteht also die Möglichkeit Energie zu konservieren.

Die Spezifische Aktivität der Benzoyl-CoA-Ligase aus *D. anilini* liegt zwar mit $324 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ um den Faktor 1,5 höher als bei *S. gentianae* ($210 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$

Protein⁻¹), doch befinden sich beide in der gleichen Größenordnung. Hier ist also kein wesentlicher Unterschied feststellbar.

Zusammenfassung

1. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *Syntrophus gentianae* in methanogenen Cokulturen Benzoat vergären konnte, bis Restkonzentrationen erreicht wurden, die mit einer Energie von $-31,8$ bis $-45,8 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ für *S. gentianae* korrelierten.
In methanogenen Cokulturen korrelierte die verbleibende Gibbsche Freie Energie wenn kein weiteres Benzoat abgebaut wurde mit der Acetatkonzentration, die während des Abbaus des eingesetzten Benzoats anstieg; höhere Konzentrationen resultierten in positiveren Werten für DG' . Die Entfernung von akkumuliertem Acetat durch *Methanosaeta concilii* aus methanogenen oder Molybdat-gehemmten sulfatreduzierenden Cokulturen führte zu einem Abbau des verbliebenen Benzoates und resultierte in einem RestEnergiebetrag (DG') von $-45,8 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ für *S. gentianae*. Der Protonophor CCCP ermöglichte einen weiteren Benzoatabbau in methanogenen Cokulturen, die durch BES gehemmt waren, bis ein Wert für DG' von $-31 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ für *S. gentianae* erreicht war. Daraus läßt sich schließen, daß der minimale Energiebetrag für Wachstum und Energiekonservierung für das syntroph benzoatabbauende Bakterium *Syntrophus gentianae* im Bereich von $-45 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ liegt und damit einem Energiequantum von $2/3$ ATP entspricht. Sowohl Wasserstoff als auch Acetat hemmten den Bezoatabbau thermodynamisch, Acetat entkoppelt zusätzlich aber auch den Substratabbau teilweise von der Energiekonservierung.
2. Versuche mit [Ring- ^{14}C]-Benzoat gaben Hinweise auf ein erstes Reduktionsprodukt, das nach thiolytischer Spaltung weniger polar als Cyclohex-1-ncarboxylsäure ist. Es könnte sich um Cyclohexancarboxylsäure handeln. Es wurden keine Hinweise auf einen Zwei- oder Eins-plus-eins-Elektronenschritt zur Reduktion des Benzolrings des Benzoyl-CoA gefunden. Eine Reduktion zum Cyclohexencarboxyl-CoA oder Cyclo-hexancarboxyl-CoA ist im Gegensatz zu einer Reduktion zum Cyclohexadiencarboxyl-CoA, nicht energieaufwendig.
3. In *S. gentianae* und *Desulfobacterium anilini* wurde AMP-bildende Acyl-CoA-Ligase-Aktivität, jedoch keine Acyl-CoA-Tranferase-Aktivität gefunden. In beiden Organismen wurde Pyrophosphatase-Aktivität gefunden, in *S. gentianae* war diese membranständig. Die Pyrophosphatase aus *S. gentianae* transloziert ein Proton pro gespaltenem Pyrophosphat über die Membran. Zugaben von Pyrophosphat zu Benzoat-vergärenden methanogenen Cokulturen von *S. gentianae* hatten keinen Einfluß auf den Zellertrag.
4. In *S. gentianae* und *D. anilini* wurden membranständige, Na^{+} -abhängige Glutaconyl-CoA-Decarboxylasen gemessen, die durch Avidin hemmbar waren. Sie könnten durch Transport von Na^{+} -Ionen über die Membran Energie konservieren.
5. Für *S. gentianae* wurde ein Benzoatabbauweg vorgeschlagen, der zwei Schritte beinhaltet, bei denen ein revertierter Elektronenfluß unterstellt wird. Benzoyl-CoA wird bei dem vorgeschlagenen Abbauweg mit vier Elektronen reduziert. Dies ist wahrscheinlich nicht energieaufwändig wie Vergleiche mit Modellsubstanzen zeigten. Unter der Annahme einer nichtenergieaufwendigen Reduktion des Benzolrings des Benzoyl-CoA, ist für *S. gentianae* ein Energiegewinn von $1/3$ Mol ATP pro mol Benzoat möglich.
6. Es wurden keine Hinweise darauf gefunden, daß der für *S. gentianae* vorgeschlagene Abbauweg nicht auch bei *D. anilini* realisiert ist. Da die freiwerdenden Elektronen auf Sulfat und nicht auf Protonen übertragen werden, ist hier kein revertierter Elektronenfluß unterstellt. Da das entstehende Acetat weiter oxidiert werden kann, ist ein Ertrag von $3 \frac{2}{3}$ Mol ATP pro abgebautem Mol Benzoat möglich.

Anregungen für weitere Arbeiten

Zur weiteren Bestätigung des hier vorgeschlagenen Stoffwechselweges und der Energetik des Benzoatabbaus durch *Syntrophus gentianae* bzw. durch *Desulfobacterium anilini* sollten die Zwischenprodukte durch eine Methode identifiziert werden, bei der diese nicht hydrolytisch gespalten werden müssen. So ließe sich die Entstehung von Artefakten vermeiden. Hier bietet sich ^{13}C -NMR an.

Die Entwicklung eines *in vitro* Tests zur Messung der Benzoyl-CoA-Reduktase aus *Syntrophus gentianae* sollte vorangetrieben werden. Nur so können weitere wichtige Aussagen über einen Reduktionsmechanismus gemacht werden, der sich vermutlich von dem bis jetzt bekannten Mechanismus zur Reduktion von Benzoyl-CoA unterscheidet.

Über Ertragsmessungen von *S. gentianae* bei Wachstum auf Benzoat sollten weitere Hinweise auf den Energiegewinn pro Mol Benzoat ermittelt werden. Dies könnte den in dieser Arbeit vorgeschlagenen Ertrag von $1/3 \text{ ATP} \times \text{Mol Benzoat}^{-1}$ bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

- Altenschmidt, U. & Fuchs, G.** (1991). Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Arch Microbiol* 156: 152–158
- Anders, A., Kaetzke, A., Kampfer, P., Ludwig, W. & Fuchs, G.** (1995). Taxonomic position of aromatic degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, *T. aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, *A. evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subdass of Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 45: 327– 333
- Bache, R. & Pfennig, N.** (1981). Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch Microbiol* 130: 255–261
- Balba, M. T. & Evans, W. C.** (1970). The methanogenic fermentation of aromatic compounds. *Biochem Soc Trans* 7: 403–405
- Barik, S., Brulla, W. J. & Bryant, M. P.** (1985). PA-1, a versatile anaerobe obtained in pure culture, catabolizes benzenoids and other compounds in syntrophy with hydrogenotrophs, and P-2 plus *Wolinella* sp. degrades benzenoids. *Appl Environ Microbiol* 56: 977–983
- Barker, H. A.** (1940). Studies upon the methane fermentation. IV. The isolation and culture of *Methanobacterium omelianskii*. *Antonie Leeuwenhoek* 6: 201–220.
- Baykov, A. A., Shestakov, A. S., Kasho, V.V., Verner, A. V. & Ivanov, A. H.** (1990). Kinetics and thermodynamics of catalysis by the inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* in both directions. *Eur J Biochem* 194: 879–887
- Bergmeyer, H.U.** (1983). Methods of enzymatic analysis. Vol. I-III. (3. Aufl.). Verlag Chemie, Weinheim.
- Biegert, T., Fuchs G. & Heider J.** (1996). Evidence that oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur J Biochem* 238: 661–668
- Biegert, T., Altenschmidt, U., Eckerskorn, C. & Fuchs, G.** (1993). Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoate-CoA ligase from a denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem* 213: 555–561
- Birch, A. J., Hinde, A. L. & Radom, L.** (1980). A theoretical approach to the Birch reduction. Structures and stabilities of the radical anions of substituted benzenes. *J Am Chem Soc* 102: 3370–3376

- Birch, A. J. & Smith, H.** (1958). Reduction by metal-amine solutions: application in the synthesis and determination of structure. *Q Rev Chem Soc Lond* 12: 17–33
- Blumenthal, B. J. M., Johnson, M. K. & E. J. Johnson** (1967). Distribution of heat-labile and heat-stable inorganic pyrophosphatases among some bacteria. *Can J Biochem* 13: 1695–1699
- Boll, M. & Fuchs, G.** (1995). Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatising), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem* 234: 921–933
- Bonting, C. F. C. & Fuchs, G.** (1996). Anaerobic metabolism of 2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid) by a denitrifying bacterium. *Arch Microbiol* 165: 402–408
- Boone, D. R. & Bryant, M.P.** (1980). Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 40: 626–632
- Boone, D. R., Johnson, R. L. & Y. Liu, Y.** (1989). Diffusion of the interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems, and implications in the measurement of K_M for H₂ or formate uptake. *Appl Environ Microbiol* 55: 1735–1741
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
- Brune, A., & Schink, B.** (1990). Pyrogallol-to-phloroglucinol conversion and other hydroxyl-transfer reactions catalyzed by cell extracts of *Pelobacter acidigallici*. *J Bacteriol* 172: 1070–1076
- Brune, A & Schink, B.** (1992). Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch Microbiol* 157: 417–424
- Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J. & Wolfe, R. S.** (1967). *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch Mikrobiol* 59: 20–31.
- Buckel, W.** (1986). Biotin-dependent decarboxylases as bacterial sodium pumps: Purification and reconstitution of glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*. pp. 547–558. In: S. Fleischer und B. Fleischer (Hrsg.): *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, USA.
- Buckel, W. & Keese, R.** (1995). Einelektronen-Redoxreaktionen von Coenzym-A-Estern in anaeroben Bakterien – ein Vorschlag für einen neuen Mechanismus. *Angew Chemie* 107: 1595–1598
- Clark, D. P. & Crona, J. E. Jr.** (1996). Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. pp. 343–357. In: Neidhardt, F. C. (Hrsg.): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimorium*. ASM press, Washington, USA

- D'Ans, J. & Lax, E.** (1983). Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Vol. II. Organische Verbindungen. (4. Aufl.). Springer-Verlag, Berlin.
- Dagley, S.** (1985). Microbial metabolism of aromatic compounds. pp 483–505. In: Moo-Young, M. (ed.) *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press, Oxford
- Diekert, G. & Thauer, R. K.** (1978). Carbon monoxide oxidation by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium formicoaceticum*. *J Bacteriol* 136: 597–606
- Dolfing, J. & Tiedje, J. M.** (1988). Acetate inhibition of methanogenic, syntrophic benzoate degradation. *Appl Environ Microbiol* 54: 1871–1873
- Dutton, P. L. & Evans, W. C.** (1969). The metabolism of aromatic compounds by *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem J* 113: 525–535
- Evans, W. C. & Fuchs, G.** (1988). Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* 42: 289–317.
- Ferry, J. G. & Wolfe, R. S.** (1976). Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. *Arch Microbiol* 107: 33–40
- Fuchs, G., Mohamed, M. E., Altenschmidt, U., Koch, J., Lack, A., Brackmann, R., Lochmeyer, C. & Oswald, B.** (1994). Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds. pp 513–553. In: Ratledge, C. (Hrsg.): *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande
- Fukuzaki, S., Nichio, N., Shobayashi, M. & Nagai, S.** (1990). Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. *Appl Environ Microbiol* 56: 719–723
- Geissler, J. F., Harwood, C.S. & Gibson, J.** (1988). Purification and properties of benzoate-coenzyme A ligase: a *Rhodospirillum rubrum* enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *J Bacteriol* 170: 1709–1714.
- Gibson, K. J. & Gibson, J.** (1992). Potential early intermediates in anaerobic benzoate degradation by *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol* 58: 696–698
- Glöckler, R., Tschuch, A. & Fuchs, G.** (1989). Reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA to benzoyl-CoA in a denitrifying, phenol degrading *Pseudomonas* species. *FEBS Microbiol Lett* 251: 237–240
- Gorny, N. & Schink, B.** (1993). Hydroquinone degradation via reductive dehydroxylation of gentisyl-CoA by a strictly anaerobic fermenting bacterium. *Arch Microbiol* 161: 25–32

Gustafson, W. G. Feinberg, B. A. & McFarland, J. T. (1986). Energetics of β -oxidation. Reduction potentials of general fatty acyl-CoA dehydrogenase, electron transfer flavoprotein, and fatty acyl-CoA substrates. *J Biol Chem* 261: 7733–7741

Guyer, M. & Hegemann, G. (1969). Evidence for a reductive pathway of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreductans* G-41. *J Biol Chem* 264: 4423–4427

Haddock, J. D. & Ferry, J. G. (1989). Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41. *J Biol Chem* 264: 4423–4427

- Harayama, S., Kok, M. & Neidle, E. L.** (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol* 46: 656–601
- Harman, W. D. & Taube, H.** (1988). The selective hydrogenation of benzene to cyclohexene on Pentaammineosmium(II). *J Am Chem Soc* 110: 7906–7907
- Harwood, C. S. & Gibson, J.** (1986). Uptake of benzoate by *Rhodospseudomonas palustris* grown anaerobically in light. *J Bacteriol* 165: 504–509
- Heider, J. & Fuchs, G.** (1997). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* 243: 577–596
- Herrero, S. R., Gomez, R. F., Snedecor, B., Tolman, C. J. & Roberts, M. F.** (1985). Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 22: 53–62
- Jetten, M. S. M., Tineke, J. F., Stams, A. J. M. & Zehnder A. J. B.** (1992). A fluoride-insensitive inorganic pyrophosphatase isolated from *Methanotheroxobacter soehngenii*. *Arch Microbiol* 157: 284–289
- Josse, J.** (1966). Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. (II) Nature and binding of active substrate and the role of magnesium. *J Biol Chem* 241: 1948–1957
- Kluge, C., Tschuch, A. & Fuchs, G.** (1990). Anaerobic metabolism of resorcylic acids (*m*-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1, 3 -benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. *Arch Microbiol* 155: 68–74
- Koch, J. & Fuchs, G.** (1992). Enzymatic reduction of benzoyl-CoA to alicyclic compounds, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur J Biochem* 205: 195–202
- Koch, J., Eisenreich, W., Bacher, A. & Fuchs, G.** (1993). Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key intermediate in anaerobic aromatic metabolism. *Eur J Biochem* 211: 649–661
- Kristjansson, J. K., Schönheit, P. & Thauer, R.K.** (1982). Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: An explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch Microbiol* 131: 278–282
- Krulwich, T. A., Clejan, S., Falk, L. H. & Guffanti, A. A.** (1987). Incorporation of specific exogenous fatty acids into membrane lipids modulates protonophore resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 169: 4479–4485
- Lack, A. & Fuchs, G.** (1992). Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. *J Bacteriol* 174: 3629–3636
- Lahti, R.** (1983). Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol Rev* 47: 169–179

- Lee, M. J. & Zinder, S. H.** (1988). Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H₂-CO₂. *J Appl Environ Microbiol* 54: 124–129.
- Litters, N. & Schmelzeisen-Redeker, G.** (1989): Experience with fast HPLC in the routine analytical laboratory. *GIT* 33: 81–83
- Lochmeyer, C., Koch, J. & Fuchs, G.** (1992). Anaerobic degradation of 2-aminobenzoic acid (antranilic acid) via benzoyl-coenzyme A (CoA) and cyclohex-1-ene-carboxyl-CoA in a denitrifying bacterium. *J Bacteriol* 174: 3621–3625
- Lynen, F. & Ochoa, S.** (1953). Enzymes of fatty acid metabolism *Biochim Biophys Acta* 12: 299–314.
- Menzel, U. & Gottschalk, G.** (1985). The internal pH of *Acetobacterium wieringae* and *Acetobacter aceti* during growth and production of acetic acid. *Arch Microbiol* 143: 47–51
- Mountfort, D. O. & Bryant, M. P.** (1982). Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge *Arch Microbiol* 133: 249–256
- Magdy, S. M., Seyfried, B., Tschsch, A. & Fuchs, G.** (1993). Anaerobic oxidation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-CoA and CO₂ in denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch Microbiol* 159: 563–573
- McInerney, M. J., Bryant, M. P. & Pfennig, N.** (1979). Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch Microbiol* 122: 129–135
- Menzel, U. & Gottschalk, G.** (1985). The internal pH of *Acetobacterium wieringae* and *Acetobacter aceti* during growth and production of acetic acid. *Arch Microbiol* 143: 47–51
- Mountfort, D. O. & Bryant, M. P.** (1982). Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge *Arch Microbiol* 133: 249–256
- Nyren, P., Nore, B. F. & Strid, A.** (1991). Proton-pumping N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, characterization, and reconstitution. *Biochemistry* 30: 2883–2887
- Nyren, P. & Strid, A.** (1991). Hypothesis: the possible role of the membrane bound proton translocating pyrophosphatase in some phototrophic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 77: 265–270
- Pfennig, N.** (1978). *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. sp. nov., a ring-shaped, vitamin B₁₂-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 28: 283–288.
- Pfennig, N. & Biebl, H.** (1976). *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium *Arch Microbiol* 110: 3–10

- Reichenbecher, W., Brune, A. & Schink, B.** (1994). Transhydroxylase of *Pelobacter acidigallici*: a molybdoenzyme catalysing the conversion of pyrogallol to phloroglucinol. *Biochim Biophys Acta* 1204: 217–224
- Reichenbecher, W., Rüdiger, A., Kroneck, P. M. H. & Schink, B.** (1996). One molecule of molybdopterin guanine dinucleotide is associated with each subunit of the heterodimeric MoFe-S protein transhydroxylase of *Pelobacter acidigallici* as determined by SDS/PAGE and mass spectroscopy. *Eur J Biochem* 237: 406–413
- Robinson, J. A. & Tiedje, M. J.** (1984). Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. *Arch Microbiol* 145: 142–147
- Rudolphi, A., Tschech, A. & Fuchs, G.** (1991). Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 155: 238–248
- Schink, B.** (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 262–280
- Schink, B.** (1992). Syntrophism among prokaryotes. pp 276–299. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (Hrsg.): *The Prokaryotes*. 2nd edn. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin
- Schink, B.** (1990). Conservation of small amounts of energy in fermenting bacteria. pp 63–89. In: R. K. Finn & P. Präve (Hrsg.): *Biotechnology*, Vol 2. Hanser Publishers, München, Germany
- Schink, B., Brune, A. & Schnell, S.** (1992). Anaerobic degradation of aromatic compounds, pp 219–242. In: G. Winkelmann (Hrsg.): *Microbial degradation of natural products*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany
- Schink, B. & Thauer, R. K.** (1988). Energetics of syntrophic methane formation and the influence of aggregation. pp 5–17. In: G. Lettinga, A. J. B. Zehnder & L. W. Hulshoff Pol (Hrsg.): *Granular anaerobic sludge; microbiology and technology*. Pudoc, Wageningen, Niederlande
- Schnell, S.** (1991). Der anaerobe Abbau von Anilin und anderen aromatischen Aminen. Thesis. Universität Tübingen
- Schnell, S. & Schink, B.** (1991). Anaerobic anilin degradation via reductive deamination of 4-amino-benzoat in *Desulfobacterium anilini*. *Arch Microbiol* 155: 511–516
- Smirnova, I. N., Sheatakov, E. B., Dubnova, E. B. & Baykov, A. A.** (1989). Spectral and kinetic studies of phosphate and magnesium ion binding to yeast inorganic pyrophosphatase. *Eur J Biochem* 182: 451–456
- Schöcke, L. & Schink, B.** (1997). Energetics of methanogenic benzoate degradation by *Syntrophus gentianae* in syntrophic coculture. *Microbiology* 143: 2345–2351

Stams, A. J. M., Kremer, D. R., Nicolay, K., Weenk, G. H. & Hansen, T. A. (1984). Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch Microbiol* 139: 167–173

Stern, J. R. (1956). Optical properties of acetoacetyl-S-coenzyme A and its metal chelates. *J Biol Chem* 221: 33–44

- Stieb, M. & Schink, B.** (1986). Anaerobic degradation of isovalerate by a defined methanogenic coculture. *Arch Microbiol* 144: 291–295.
- Stouthamer, A. H.** (1979). The search for correlation between theoretical and experimental growth yields. pp 1–47. In: J. R. Quayle (Hrsg.): International review of biochemistry, microbial biochemistry, vol. 21. University Park Press, Baltimore, USA
- Suflita, J. M., Horowitz, A., Sgelton, D. R. & Tiedje, J. M.** (1982). Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds. *Science* 218: 1115–1117
- Szewzyk, U. & Schink, B.** (1989). Degradation of hydroquinone, gentisate, and benzoate by a fermenting bacterium in pure or defined mixed culture. *Arch Microbiol* 151: 541–545
- Tarvin, B. F. & Buswell, A. M.** (1934). The methane formation from organic acids and carbohydrates. *J Am Chem Soc* 56: 1751–1755
- Taylor, B. F., Campbell, W. L. & Chinoy, I.** (1970). Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultative anaerobic microorganism. *J Bacteriol* 102: 430–437
- Tauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K.** (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41: 100–180
- Thiele, J. H. & Zeikus, J. G.** (1988). Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. *Appl Environ Microbiol* 54: 20–29.
- Tominaga, N. & Mori, T.** (1977). Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Thiobacillus thiooxidans*. *J Biochem* 81: 477–483
- Tschech, A.** (1989). The anaerobic degradation of aromatic compounds. *Forum Mikrobiol.* 12: 251–264
- Tschech, A. & Schink, B.** (1985). Fermentative degradation of resorcinol and resorcylic acids. *Arch Microbiol* 143: 52–59
- Wallrabenstein, C. & Schink, B.** (1994). Evidence of reversed electron transport in syntrophic butyrate or benzoate oxidation by *Syntrophomonas wolfei* and *Syntrophus buswellii*. *Arch Microbiol* 162: 136–142
- Warikoo, V., McInerney, M. J., Robinson, J. A. & Suflita, J. M.** (1996). Interspecies acetate transfer influences the extent of anaerobic benzoate degradation. *Appl Environ Microbiol* 62: 26–32
- Whittle, P. J., Lunt, D. O. & Evans, W. C.** (1976). Anaerobic photometabolism of aromatic compounds by *Rhodospseudomonas* sp. *Biochem Soc Trans* 4: 490–491

- Widdel, F.** (1980). Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Thesis, Universität Göttingen
- Widdel, F. & Hansen, T. A.** (1992). The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. pp 583–624. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (Hrsg.): *The Prokaryotes*. 2nd edn. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin
- Widdel, F., Kohring, G.W. & Mayer, F.** (1983). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III: Characteristics of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Arch Microbiol* 134: 286–294
- Williams, R. J. & Evans, W. C.** (1975). The metabolism of benzoate by *Moraxella* sp. through anaerobic nitrate respiration. *Biochem J* 143: 1–10
- Young, L. Y.** (1984). Anaerobic degradation of aromatic compounds. pp 487–523. In: D. T. Gihson, (Hrsg.): *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker Inc., New York, USA
- Zehnder, A. J. B., Ingvorsen, K. & Marti, T.** (1982). Microbiology of methane bacteria. pp 45–68. In: D. E. Hughes (Hrsg.): *Anaerobic digestion*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Niederlande
- Zinder, S. H. & Koch, M.** (1984). Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch Microbiol* 138: 263–272.