# Untersuchung der anaeroben Spaltung von Ethern am Beispiel des 2-Phenoxyethanol-Abbaus durch *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
an der Universität Konstanz
Fachbereich Biologie

vorgelegt von

**Britta Ursula Müller**

aus Villingen

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2006

1. Referent Prof. Dr. B. Schink
2. Referent Prof. Dr. P. M. H. Kroneck

*Konstanzer Online-Publikations-System (KOPS)*
*URL: http://www.ub.uni-konstanz.de/kops/volltexte/2008/6742/*
*URN: http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:352-opus-67421*

INHALTSVERZEICHNIS

**Inhaltsverzeichnis** ..... I

**Abkürzungen, Symbole und Trivialnamen** ..... IV

**1. EINLEITUNG** ..... 1

**1.1 Vorkommen von Etherverbindungen** ..... 1
1.1.1 Synthetische Etherverbindungen ..... 1
1.1.2 Natürliche Etherverbindungen ..... 2

**1.2 Biologischer Abbau von Ethern** ..... 2
1.2.1 Abbau von Lignin ..... 3
1.2.2 Abbau von 2-Phenoxyethanol - *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 ..... 4

**1.3 Enzymatische Etherspaltung** ..... 5
1.3.1 Mechanismen in aeroben Bakterien ..... 5
1.3.2 Mechanismen in anaeroben Bakterien ..... 6
1.3.2.1 Demethylierungen ..... 7
1.3.2.2 Bildung von Halbacetalen ..... 8

**1.4 Spaltung von Phenoxyethanol durch Acetobacterium Stamm LuPhet 1** ..... 10

**1.5 Radikalreaktionen** ..... 11
1.5.1 Radikalreaktionen zur Spaltung von nicht-aktivierten C—H-Bindungen ..... 11
1.5.2 Radikalenzyme in Anaerobiern ..... 12
1.5.2.1 Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase und Glycerin-Dehydratase ..... 12
1.5.2.2 Nicht-Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase ..... 15
1.5.2.3 Glycylradikalenzyme ..... 15
1.5.2.4 *S*-Adenosylmethionin-abhängige Radikalenzyme ..... 18

**1.6 Aktivierung von C—H-Bindungen in Anaerobiern durch nicht-radikalische Mechanismen?** ..... 19

**1.7 Aufgabenstellung** ..... 20

**2. MATERIAL UND METHODEN** ..... 22

**2.1 Allgemeines** ..... 22
2.1.1 Anoxisches Arbeiten ..... 22
2.1.2 Anaerobenkammer ..... 22
2.1.3 Verwendete Chemikalien und Gase ..... 23

**2.2 Mikrobiologische Methoden** ..... 24
2.2.1 Herkunft des Bakteriums ..... 24
2.2.2 Kultivierung und Kultivierungstechnik ..... 24
2.2.3 Messung von Bakteriumwachstum und Wachstumsparameter ..... 26
2.2.4 Stammhaltung ..... 27

**2.3 Biochemische Methoden** ..... 28
2.3.1 Zellernte und Zelllagerung ..... 28
2.3.2 Aufschließen der Zellen ..... 28
2.3.3 Fraktionierung des Extrakts ..... 29
2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration ..... 29

2.3.5 Zellsuspensionsversuche ... 31
2.3.5.1 Allgemeines Vorgehen ... 31
2.3.5.2 Wirkung von Acetaldehyd ... 32
2.3.5.3 Spezielles Vorgehen beim Umsatz von Lactat ... 32
2.3.5.4 Spezielles Vorgehen beim Umsatz von substituierten Phenoxyethanolen ... 32
2.3.5.5 Vorgehen beim Umsatz von $^{2}H$- und $^{13}C$-markiertem Phenoxyethanol ... 33
2.3.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten ... 34
2.3.6.1 Diskontinuierlicher Test mit Zellextrakt ... 34
2.3.6.2 Kontinuierlicher Photometertest mit Zellextrakt ... 35
2.3.6.2.1 Phenoxyethanol-spaltende Aktivität ... 35
2.3.6.2.2 Diol-Dehydratase-Aktivität ... 40

**2.4 Analytische Methoden ... 40**
2.4.1 Geruchsprüfung ... 40
2.4.2 Spektralphotometrie ... 40
2.4.3 Analytische Gelelektrophorese ... 41
2.4.4 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ... 42
2.4.5 Kernresonanz-Spektren ... 43

**3. ERGEBNISSE ... 44**

**3.1 Wachstum von Stamm LuPhet 1 ... 44**

**3.2 Diol-Dehydratisierung durch Stamm LuPhet 1 ... 47**
3.2.1 Verhältnis der Aktivitäten mit Propandiol bzw. Ethylenglycol ... 47
3.2.2 Einfluss von Coenzym $B_{12}$ ... 48
3.2.3 Einfluss von Titancitrat ... 49
3.2.4 Einfluss des Wachstumssubstrats ... 50
3.2.5 Anzahl der Diol-Dehydratasen ... 50
3.2.6 Zeitlicher Verlauf der Diol-Dehydratase-Aktivität ... 52
3.2.7 Einfluss der Kaliumkonzentration ... 53
3.2.8 Korrelation der Diol-Dehydratase mit einer Gelbande ... 55

**3.3 Phenoxyethanol-Spaltung durch Stamm LuPhet 1 ... 56**
3.3.1 Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat ... 56
3.3.1.1 Lactat-Abbau und Phenoxyethanol-Spaltung werden vermutlich durch verschiedene Enzyme eingeleitet ... 58
3.3.1.2 Gelelektrophoretischer Vergleich verschiedener Zellextrakte von Stamm LuPhet 1 ... 58
3.3.2 Zellsuspensionsversuche ... 62
3.3.2.1 Untersuchungen mit einem diskontinuierlichen Test ... 62
3.3.2.2 Untersuchungen mit einem kontinuierlichen Test ... 72
3.3.3 Vergleich von ganzen Zellen und zellfreiem Extrakt ... 75
3.3.4 Charakterisierung im Zellextrakt ... 77
3.3.4.1 Kontrolle des Testverfahrens ... 78
3.3.4.2 Rate der Phenoxyethanol-Spaltung ... 79
3.3.4.3 Zeitlicher Verlauf der Phenoxyethanol-Spaltung ... 79
3.3.4.4 Suche nach der Ursache der Aktivitätsabnahme während des Umsatzes von Phenoxyethanol ... 80
3.3.4.5 Unterscheidung von Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase und Diol-Dehydratase ... 82
3.3.4.6 Stabilität der Aktivität ... 83
3.3.4.7 Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ... 84
3.3.4.8 Lokalisation ... 87
3.3.4.9 Entsalzen ... 88
3.3.4.10 $K_m$-Wert-Bestimmungen ... 88
3.3.4.11 Einfluss verschiedener Zusätze ... 90
3.3.5 Versuche mit markiertem Phenoxyethanol ... 108

**4. DISKUSSION .....114**

**4.1 Diol-Dehydratase..... 114**

**4.2 Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase..... 117**
4.2.1 Vergleich von Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase und Diol-Dehydratase ..... 117
4.2.2 Expression der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase in Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat ..... 118
4.2.3 Eigenschaften der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase ..... 120
4.2.3.1 Aussagekraft der Versuche..... 120
4.2.3.2 Verschiedenes ..... 121
4.2.3.3 Erliegen und Reaktivieren der Reaktion..... 124
4.2.3.4 Wirkung von Phenoxyethanol-Analoga ..... 127
4.2.4 Möglicher Aufbau der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase ..... 129
4.2.4.1 Hinweise aus den Markierungsexperimenten..... 129
4.2.4.2 Ähnliche Stereochemie bei Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase und verschiedenen Diol-Dehydratasen..... 132
4.2.4.3 Vergleich der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase mit bekannten Proteinradikal-Enzymen..... 133
4.2.4.3.1 Eigenschaften einer $B_{12}$-unabhängigen Diol-Dehydratase aus Cl. glycolicum ..... 134
4.2.4.3.2 Eigenschaften von Glycylradikalenzymen ..... 135
4.2.4.4 Die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase könnte ein Glycylradikalenzym sein..... 136
4.2.5 Möglicher Ablauf der Phenoxyethanol-Spaltung..... 138
4.2.5.1 Wanderung oder direkte Eliminierung? – Energetische Überlegungen ..... 139
4.2.5.2 Möglicher Hintergrund des In- und Reaktivierens..... 141
4.2.5.3 Ein Reaktionsmodell ..... 142

**4.3 Anregungen für weitere Untersuchungen..... 145**

**5. ZUSAMMENFASSUNG .....147**

**6. LITERATURVERZEICHNIS .....149**

# Abkürzungen, Symbole und Trivialnamen

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| AdoCbl | 5´-Desoxyadenosylcobalamin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CoA, CoASH | Coenzym A |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotid |
| DSM | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen |
| $\varepsilon_\lambda$ | Molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge $\lambda$ |
| $E^{0\prime}$ | Redoxpotential unter Standardbedingungen bei pH 7,0 |
| EC # | Kennnummer der Enzyme Commission der International Union of Biochemistry |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESR | Elektronenspinresonanz |
| Ferulasäure | 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure |
| $g$ | Erdbeschleunigung, 9,81 $m/s^2$ |
| $\Delta G^{0\prime}$ | Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen bei pH 7,0 |
| HPLC | Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie |
| $K_m$ | Michaelis-Konstante |
| kDa | Kilodalton |
| KPP | Kaliumphosphatpuffer |
| $\mu$ | Wachstumsrate |
| $M_r$ | Relative Molekularmasse |
| min | Minuten |
| MPa | Mega-Pascal |
| $NAD^+$ | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADH | Reduzierte Form des $NAD^+$ |
| NMR | Kernmagnetische Resonanz |
| NTP | Ribonukleotid |
| $OD_{578}$ | Optische Dichte; scheinbare Extinktion einer Bakteriensuspension bei 578 nm |

| | |
|---|---|
| p. a. | *pro analysi* |
| PEG | Polyethylenglycol |
| Ph | Phenyl |
| PhO | Phenoxy |
| Resazurin | 7-Hydroxy-3*H*-phenoxazin-3-on-10-oxid, Na-Salz |
| RT | Raumtemperatur |
| SAM | *S*-Adenosylmethionin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunden |
| Spez. Akt. | Spezifische Aktivität |
| Syringasäure | 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure |
| $t_d$ | Verdoppelungszeit |
| Tab. | Tabelle |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit [µmol Substrat/min] |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV/Vis | Ultraviolett /Visible |
| $v_{max}$ | theoretische Maximalgeschwindigkeit einer Reaktion bei unendlicher Substratkonzentration |
| Vanillinsäure | 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure |
| % (v/v) | Volumenprozent |
| % (w/v) | Gewichtsprozent |

# 1. Einleitung

In der Natur stehen Auf- und Abbau von Biomasse langfristig miteinander im Gleichgewicht. Auch viele synthetische Substanzen werden je nach Struktur und Standortbedingungen in der Umwelt durch chemische, physikalische und vor allem biologische Prozesse verändert bzw. abgebaut. Die Zahl der verschiedenen Xenobiotika, die sich im Umlauf befinden, dürfte heute größer denn je sein. In den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts ging man davon aus, dass in der damaligen Bundesrepublik Deutschland pro Jahr mindestens 500 neuentwickelte Stoffe für vielfältige Zwecke in den Verkehr gebracht wurden, unter anderem für Kosmetika, Textilhilfsmittel, Farben und Pflanzenschutzmittel (Westheide und Türck, 1977). Zur Zeit sind im Europäischen Verzeichnis kommerziell genutzter Chemikalien EINECS etwa 100.000 Chemikalien erfasst, darunter auch viele Etherverbindungen.

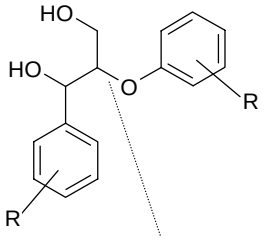
## 1.1 Vorkommen von Etherverbindungen

### 1.1.1 Synthetische Etherverbindungen

Zum Beispiel dienen die Kraftstoffzusätze *tert.*-Butylmethylether (abgekürzt MTBE von Methyltertiärbutylether) und *tert.*-Butylethylether (ETBE von Ethyltertiärbutylether) im Benzin als Ersatz für bleihaltige Antiklopfmittel, außerdem werden sie als Sauerstoffquelle für eine vollständigere Verbrennung zugesetzt. Im Jahr 1997 wurden in der Europäischen Union ca. 2,5 Millionen Tonnen MTBE verbraucht, fast ausschließlich in Form des Benzinbestandteils. Agrochemikalien wie Pestizide, Insektizide, etc. werden in großem Umfang in die Natur ausgebracht; viele dieser Substanzen enthalten Etherfunktionen (White et al., 1996). Von Bedeutung sind auch einfache Polyether, beispielsweise dienen die linearen Polyethylenglycole (PEG) als Schmier-, Löse- und Feuchthaltemittel. PEGs sind z. B. auch in Kosmetika und Medikamenten enthalten, außerdem sind sie Bausteine von zahlreichen Detergentien. In den nicht-ionischen Alkylethoxylaten und Alkylphenylethoxylaten, bzw. den anionischen Alkylethoxy-Sulfaten und Alkylphenylethoxy-Sulfaten sind jeweils hydrophobe Komponenten (langkettige Alkoholen bzw. Alkylphenole) mit den hydrophilen Substanzen PEG oder PEG-Sulfat kovalent verknüpft. Aufgrund ihrer vielfältigen industriellen und häuslichen Anwendungen gelangen Detergentien in beträchtlichen Mengen in die Umwelt.

### 1.1.2 Natürliche Etherverbindungen

Viele natürliche Etherverbindungen sind Methylether.
Auch manche Lipide sind aliphatische Ether, nämlich jene Glycerolipide, in denen Alkylreste über Etherbrücken an das Kohlenstoffgerüst des Glycerins gebunden sind (als Monoalkylmonoether, Dialkyldiether bzw. Dialkyltetraether) (Lengeler et al., 1999; Voet und Voet, 1994), darunter auch Monoalkylmonoether-Glycerolipide, die eine Enoletherfunktion enthalten, die sogenannten Plasmalogene (Voet und Voet, 1994).
In besonders großen Mengen treten Etherbindungen in Lignin auf, dem nach Cellulose häufigsten Biopolymer. Es ist in den Zellwänden von holzigen Pflanzen enthalten. Das Ligninmolekül ist stark verzweigt, sehr groß und unlöslich. Die Struktur ist höchst komplex und unregelmäßig. Es wird durch radikalische, nicht stereospezifische Kopplung von drei verschiedenen Phenylpropanbausteinen (*p*-Cumaryl- bzw. Coniferyl- bzw. Sinapylalkohol) gebildet. Dabei entstehen zwischen den Bausteinen vor allem Kohlenstoff-Kohlenstoff-, Ester- sowie Etherbrücken. Die häufigste Bindung in Lignin ist die Arylglycerin-β-aryletherbindung (Adler, 1977).



Arylglycerin-β-aryletherbindung

## 1.2 Biologischer Abbau von Ethern

Es gibt Enzyme, die in der Lage sind, Etherbindungen zu spalten. Manche etherspaltenden Enzyme greifen auch Xenobiotika an. Erfahrungsgemäß werden Etherverbindungen in der Natur aber relativ schlecht abgebaut (White et al., 1996).
Ether sind im Vergleich zu Estern relativ stabil gegenüber Hydrolyse, auch in Gegenwart von milden Säuren oder Basen. Bei chemischen Synthesen werden Ether deshalb oft auf andere Weise als hydrolytisch gespalten, z. B. als nukleophile Substitution in Gegenwart von Lewis-Säuren (z. B. Burwell, 1954; Kropf et al., 1979; Bhatt und Kulkarni, 1983; Grobelny, 2004).

In den folgenden Abschnitten (1.2 und 1.3) werden verschiedene Beispiele für enzymatische Etherspaltungen erläutert.

### 1.2.1 Abbau von Lignin

Für den Polyether Lignin werden geschätzte Halbwertszeiten von 20 bis 2000 Jahre angegeben (Lengeler et al., 1999), allerdings hängt die lange Lebensdauer nicht allein mit den zahlreichen Etherbindungen sondern auch mit strukturellen Eigenschaften des Polymers wie der hohen Vernetzung und der Unlöslichkeit in Wasser zusammen. Die Mineralisierung von Lignin ist das Ergebnis vielfältiger durch Pilze und Bakterien katalysierter Abbauprozesse, die längst noch nicht alle bekannt und aufgeklärt sind. Als gesichert gelten kann, dass Lignin nur unter Verwendung von Sauerstoff als Cosubstrat effektiv zersetzt werden kann (Zeikus et al., 1982; Kirk und Farell, 1987). Die Depolymerisierung erfolgt anfangs durch Exoenzyme. Peroxidasen und Laccasen, die von aeroben Pilzen ausgeschieden werden, erzeugen radikalische Lignin-Intermediate, und lösen dadurch relativ unspezifische Spaltungsreaktionen aus. Unklar ist bisher, ob zuvor niedermolekulare Oxidantien radikalische Spaltungen einleiten und dadurch den Zutritt von Exoenzymen erst ermöglichen (Lengeler et al., 1999). Es gibt auch Enzyme, die spezifischer agieren als Peroxidasen und Laccasen. Zum Beispiel wurde ein Pilz-Exoenzym beschrieben, welches an hochmolekularem Lignin diejenigen β-Aryletherbindungen spalten kann, die an $C_\alpha$ und in *para*-Position des Arylrests jeweils eine OH-Gruppe enthalten. Pro Spaltung werden bei dieser Reaktion zwei Moleküle Wasser angelagert (Otsuka et al., 2003) (Abb. 1.1). Für niedermolekulare Lignin-Bruchstücke wurde beispielsweise im Bakterium *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 ein Enzymsystem gefunden, welches die β-Aryletherbindung von dimeren Lignin-Komponenten, deren $C_\alpha$ zur Carbonylgruppe oxidiert ist, intrazellulär spalten kann (Masai et al., 2003). Letztendlich entstehen aus Lignin durch die verschiedenen Enzymaktivitäten monomere aromatische Verbindungen (darunter auch Alkylarylether), die durch Bakterien und Archaeen vollständig mineralisiert werden können.

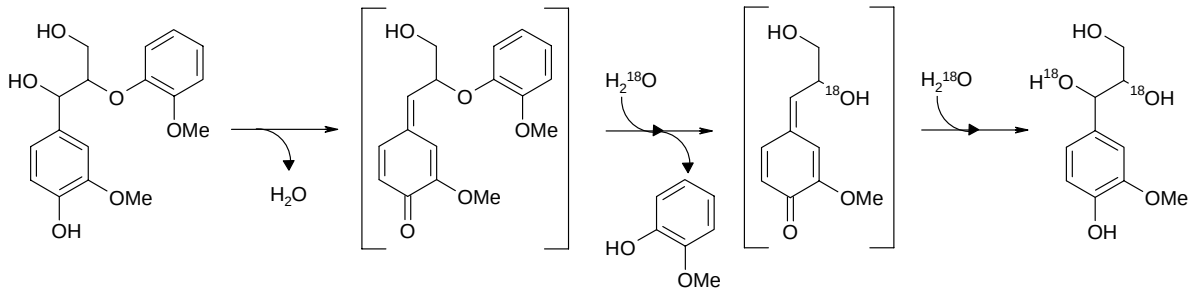



**Abb. 1.1:** Hypothetischer Mechanismus eines Pilz-Exoenzyms, das die Hydrolyse bestimmter Arylglycerin-β-aryletherbindungen katalysiert (Otsuka et al., 2003).

Obwohl für eine effektive Zersetzung von Lignin Sauerstoff gebraucht wird, finden auch unter anoxischen Bedingungen Abbau-Vorgänge an polymerem Lignin bzw. an Lignin-Fragmenten statt. So wurde intaktes Lignin bei anoxischer Inkubation teilweise zu $CO_2$ und $CH_4$ abgebaut (Boruff und Buswell, 1934; Benner et al., 1984). Unter Sauerstoffausschluss fand auch ein weitgehender Abbau von synthetischen Dilignol-Modellsubstanzen bzw. von Lignin-Oligomeren (Molekulargewicht ca. 600 g/mol) statt, folglich wurden dabei auch Arylglycerin-β-aryletherbindungen ohne Einsatz von Sauerstoff gespalten (Zeikus et al., 1982; Colberg und Young, 1985). Eine andere Untersuchung (Kajikawa et al., 2000) legte nahe, dass aus dem Pansen stammende Bakterien unter anoxischen Verhältnissen Benzylether-Bindungen von Lignin-Trimeren und -Polymeren (nur phenolische Benzylether-Bindungen) bzw. von Lignin-Dimeren (auch nicht-phenolische Benzylether-Bindungen) brechen können.
Außerdem konnten Phenylmethylether-Verbindungen wie Syringa-, Vanillin- und Ferulasäure unter strikt anoxischen Bedingungen vollständig abgebaut werden (Healy und Young, 1979; Healy et al., 1980; Kaiser und Hanselmann, 1983).

### 1.2.2 Abbau von 2-Phenoxyethanol - *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1

Der Gram-positive und strikt anaerobe Stamm LuPhet 1 der Gattung *Acetobacterium* wurde mit dem Alkylarylether 2-Phenoxyethanol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle aus Faulschlamm einer kommunalen Kläranlage isoliert (Frings und Schink, 1994). Bislang kennt man keine weiteren anaeroben Bakterien, die 2-Phenoxyethanol verwerten können. 2-Phenoxyethanol wird Kosmetika und Pharmaka zugesetzt, dabei dient es als antibakterielles Konservierungsmittel, lokales Antiseptikum sowie als Fixativ für Parfüm. Außerdem wird es in der Synthese von Weichmachern und als Lösungsmittel für Celluloseacetat, Harze, Farbstoffe und Tinten eingesetzt.
Durch *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 wird 2-Phenoxyethanol zunächst zu Acetaldehyd und Phenol gespalten (Abb. 1.2), Phenol wird nicht weiter umgesetzt. Dem Stamm dient nur Acetaldehyd, welches zu Acetyl-CoA oxidiert wird, als Kohlenstoff- und Energiequelle. Die entstehenden Reduktionsäquivalente fließen in den Reduktiven Acetyl-CoA-Weg, ATP wird durch Substratstufenphosphorylierung gebildet. Als Produkt entsteht jeweils Acetat (Frings und Schink, 1994).

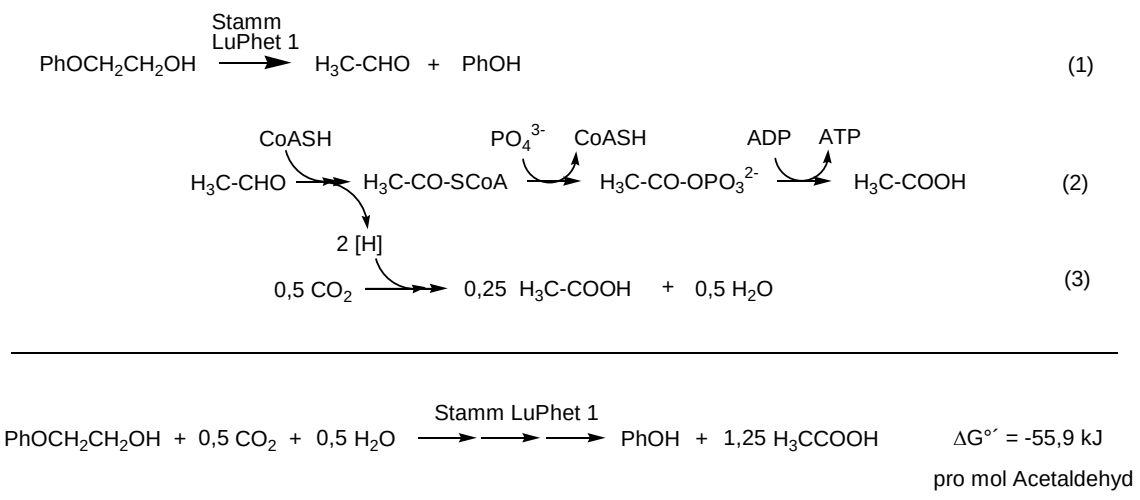



**Abb. 1.2:** Umsatz von 2-Phenoxyethanol durch *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 (Frings und Schink, 1994).

## 1.3 Enzymatische Etherspaltung

Es besteht großes Interesse an den Mechanismen der etherspaltenden Enzyme, auch weil sich daraus möglicherweise Methoden für industrielle oder chemische Verfahren ableiten ließen. Erkenntnisse über den enzymatischen Ether-Abbau könnten weiterhin hilfreich sein, um neue Substanzen, außer für die jeweilige Anwendung, auch im Hinblick auf eine möglichst gute biologische Abbaubarkeit, zu entwickeln.

Bei den bisher bekannten enzymatischen Etherspaltungen handelt es sich selten um Ether-Hydrolysen, vielmehr katalysieren die zugehörigen Enzyme zum Teil sehr unterschiedliche Reaktionen um den Bruch der Etherbindung zu erreichen (White et al., 1996). Viele dieser Enzyme sind sauerstoffabhängig. Die meisten natürlichen und auch viele synthetische Ether können mit Sauerstoff als Cosubstrat gespalten werden. Unter anoxischen Bedingungen dagegen können nur relativ wenige Etherverbindungen gespalten werden, da sie gewisse Strukturvoraussetzungen erfüllen müssen.

### 1.3.1 Mechanismen in aeroben Bakterien

Unter oxischen Bedingungen erfolgt eine Ether-Spaltung gewöhnlich durch Oxygenasen, die eines der Kohlenstoffatome der Etherbrücke hydroxylieren, sodass dadurch Halbacetale bzw. Halbketale entstehen. Diese instabilen Zwischenstufen zerfallen in wässrigen Lösungen zu Alkohol und Aldehyd bzw. Keton. Die Oxygenasen spalten die Etherbindung somit nicht direkt, sondern schwächen sie durch den Einbau des Sauerstoffs so weit, dass sie spontan

bricht (White et al., 1996). Es gibt verschiedene etherspaltende Oxygenase-Enzyme. Die meisten gehören zu den Monooxygenasen, d. h. sie fügen nur eines der beiden Atome von $O_2$ in das Substrat ein. Sie enthalten meist Eisen, in der löslichen Methan-Monooxygenase zum Beispiel als zweikerniges Eisenzentrum (Spaltung von Dimethyl- und Diethylether: Colby et al., 1977), oder in Form von Häm, wie in den P450-Cytochrom-Enzymen (Spaltung von ETBE: Kharoune et al., 2001). Möglicherweise gibt es auch etherspaltende Monooxygenasen, die anstelle des Metallcofaktors ein Flavin enthalten, so wie es für eine Oxygenase aus *Rhodococcus* sp. Stamm DTB vorgeschlagen wurde (Moreno Horn et al., 2003). Durch Monooxygenasen werden zum Beispiel Demethylierungen von methoxylierten Aromaten katalysiert (Cartwright und Smith, 1967; Bernhardt et al., 1975). Weiterhin gibt es Dioxygenasen, sie fügen beide Atome von $O_2$ in das Substrat ein, eines zur Bildung des Halbacetals bzw. Halbketals, das andere in eine benachbarte C—H-Bindung, sie katalysieren vor allem die Spaltung von Diarylethern (Schmidt et al., 1992).

In bestimmten Substanzen wird die Etherspaltung auf andere Weise als durch Oxygenierung erreicht.
Beispielsweise wird die Arylglycerin-β-aryletherbindung in dimeren Lignin-Komponenten durch das aerobe Bakterium *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 im Prinzip reduktiv gebrochen. Zunächst oxidiert eine spezifische Dehydrogenase (LigD) an $C_\alpha$ die OH-Gruppe zur Carbonylgruppe, dann kann die β-Aryletherbindung durch eine nukleophile Substitution mit reduziertem Glutathion gespalten werden. Eine sogenannte β-Etherase (LigE bzw. LigF) katalysiert diese Substitution an $C_\beta$ unter Freisetzung des Aryls als ein substituiertes Phenol und Bildung eines Glutathion-konjugierten Glyceringerüsts. Letzteres wird durch eine Glutathion-Lyase (LigG) mit weiterem reduzierten Glutathion gespalten (Masai et al., 1993; Masai et al., 2003).

### 1.3.2 Mechanismen in anaeroben Bakterien

Wenn kein Sauerstoff zur Verfügung steht, sind Oxygenierungen, wie sie oben beschrieben wurden, nicht mehr möglich.
Nur wenige Enzyme, die unter anoxischen Verhältnissen Ether spalten können, sind bisher charakterisiert worden, und deren Mechanismen sind nicht allgemein anwendbar, da sie sich nur für bestimmte Substrate eignen.

#### *1.3.2.1 Demethylierungen*

Arylmethylether zum Beispiel können ohne Sauerstoff gespalten werden. Bestimmte anaerobe Bakterien, vor allem Homoacetogene, sind in der Lage, die Methylgruppen der Arylmethylether als Kohlenstoff- und Energie-Quelle zu nutzen. Das Sauerstoffatom der Etherbindung bleibt dabei an den aromatischen Ring gebunden (DeWeerd et al., 1988), diese *O*-Demethylierung ist abhängig von Tetrahydrofolat (Doré und Bryant, 1990; Berman und Frazer, 1992) und einem Corrinoid. Eigentlich ist diese Etherspaltung eine mehrstufige Methyltransferreaktion, bei der zunächst das stark nukleophile Cobalt(I)-Corrinoid die Methylgruppe vom Arylmethylether übernimmt. Von dort wird sie in einer weiteren nukleophilen Substitution auf Tetrahydrofolat übertragen. In Form von Methyl-Tetrahydrofolat fließen die Methylgruppen dann in den Acetyl-CoA-Weg und bilden Acetyl-CoA. Am gesamten Methyltransfer sind in der Regel mehrere Enzyme und Proteine beteiligt (eine Übersicht gibt z. B. Ragsdale, 1999). Die Enzymsysteme wurden im Detail untersucht bei *Sporomusa ovata* (Stupperich und Konle, 1993), *Holophaga foetida* (Kreft und Schink, 1994), *Acetobacterium dehalogenans* (Kaufmann et al., 1998) und *Moorella thermoacetica* (Naidu und Ragsdale, 2001). In methanogenen Archaeen gibt es für Methyltransferreaktionen ähnliche Enzymsysteme (Sauer und Thauer, 1999). Mittlerweile wurde eine Tetrahydrofolat-abhängige *O*-Demethylierung von Syringat sogar in einem aeroben Bakterium entdeckt, in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 (Masai et al., 2004). In diesem Fall erfolgt der Methyltransfer vom methoxylierten Aromaten allerdings direkt auf Tetrahydrofolat, ohne dass ein Corrinoid beteiligt sein soll. Auch die entsprechende Aminosäure-Sequenz unterscheidet sich von bekannten Corrinoid-haltigen Transfersystemen.

Ein weiterer Methylether kann unter anoxischen Bedingungen gespalten werden, und zwar *tert.*-Butylmethylether (MTBE) (Schmidt et al., 2004; Prince, 2000; Mormile et al., 1994). Dagegen wurde bisher noch kein Abbau des entsprechenden Ethylethers (ETBE) gefunden (Mormile et al., 1994). Die für den Abbau von MTBE verantwortlichen Bakterien, Enzyme und Mechanismen sind noch unbekannt, aber vielleicht ist das unterschiedliche Abbauverhalten von Methyl- bzw. Ethylether ein Indiz für eine Verwandtschaft der MTBE-Spaltung mit der Corrinoid-abhängigen Demethylierung von Arylmethylethern. Allerdings konnten die Arylmethylether-spaltenden Bakterien *Acetobacterium woodii* und *Eubacterium limosum* MTBE nicht demethylieren (Mormile et al., 1994).

### *1.3.2.2 Bildung von Halbacetalen*

Halbacetale sind in wässriger Umgebung wenig stabil, unabhängig davon ob Sauerstoff präsent ist oder nicht. Folglich sollten sich unter anoxischen Bedingungen im Prinzip jene Ether-Substanzen spalten lassen, die ohne molekularen Sauerstoff in ein Halbacetal überführt werden können.

Substanzen, die an einem der Etherbindungs-Kohlenstoffe eine Doppelbindung tragen, könnten zum Beispiel einfach durch eine Wasseranlagerung an die Doppelbindung zu Halbacetalen werden.

Auch aus Verbindungen, die vicinal zur Etherbindung bereits eine OH-Gruppe enthalten (wie es zum Beispiel bei Polyethylenglycolen der Fall ist), könnte durch eine Verschiebung der OH-Gruppe an das Nachbarkohlenstoffatom ein Halbacetal entstehen. Für Diol-Substrate existieren Enzyme, die solche 1,2-Verschiebungen von OH-Gruppen katalysieren, die Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Eliminasen Diol- bzw. Glycerin-Dehydratase (siehe Abschnitt 1.5.2.1) (Abb. 1.3).

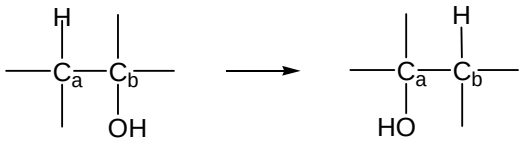



**Abb. 1.3**: Austausch eines Wasserstoffrests mit einer OH-Gruppe zwischen benachbarten Kohlenstoffatomen, wie er von Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Dehydratasen katalysiert wird.

Vorstellbar wäre eine Etherspaltung sogar bei Substraten, die zunächst weder eine Doppelbindung noch eine passende OH-Funktion enthalten, denn es gibt Enzyme, die Sauerstoff-Insertionen in C—H-Bindungen unter anoxischen Bedingungen katalysieren können. So wurden aus Nitratreduzierern Ethylbenzol-Dehydrogenasen isoliert, die Ethylbenzol zu 1-Phenylethanol umsetzen. Es handelt sich dabei jeweils um Mo-Fe/S-Enzyme, die Sauerstoff in eine relativ unpolare, für eine Deprotonierung wenig reaktive C—H-Bindung einfügen, der von ihnen eingebaute Sauerstoff stammt aus Wasser und nicht aus molekularem Sauerstoff (Johnson et al., 2001; Kniemeyer und Heider, 2001). Vielleicht könnte ein solches Mo-Fe/S-Enzym den Sauerstoff so in den zu spaltenden Ether einführen, dass ein Halbacetal entstehen könnte (direkt durch die Sauerstoff-Insertion oder erst durch eine anschließende 1,2-OH-Verschiebung).

*Abbau von Polyethylenglycolen*

Pearce und Heydeman (1980) entdeckten, dass beim Sauerstoff-unabhängigen Abbau von Substraten der Struktur R-O-$CH_2$-$CH_2$-OH (PEGs und ähnliche Glycol-Substrate) durch einen Stamm der obligat aeroben Gattung *Acinetobacter* die Substrate sukzessive verkürzt wurden, indem jeweils die endständige Ethylenoxid-Einheit abgespalten wurde und dabei Acetaldehyd und R-OH entstanden. Sie folgerten daraus, dass erst eine Wasserabspaltung zu einem Vinylether und dann eine Hydrolyse zu Acetaldehyd und Alkohol stattfinden würde. Ihre experimentellen Ergebnisse sind aber auch mit einer damals nicht erwogenen 1,2-OH-Verschiebung vereinbar.

Unter anoxischen Bedingungen wurden Polyethylenglycole beispielweise durch Nitratreduzierer (*Alcaligenes faecalis* var. *denitrificans* Grant und Payne, 1983), Sulfatreduzierer (*Desulfovibrio desulfuricans,* Dwyer und Tiedje, 1986) sowie gärende Bakterien (*Pelobacter venetianus,* Schink und Stieb, 1983; *Bacteroides* sp., Dwyer und Tiedje, 1986; *Pelobacter propionicus,* Wagener und Schink, 1988; *Acetobacterium* sp., Wagener und Schink, 1988; Schramm und Schink, 1991) verwertet. Der strikte Anaerobier *Pelobacter venetianus* wurde mit PEG 20.000 isoliert, er vergor PEG intrazellulär und konnte auch 2-Methoxyethanol und 2-Ethoxyethanol verwerten, dagegen wurden 1,2-Dimethoxyethan sowie Tetraethylenglycoldimethylether, in denen beide endständigen OH-Gruppen als Methylether blockiert waren, nicht abgebaut (Schink und Stieb, 1983; Straß und Schink, 1986; Frings et al., 1992). Als erstes Produkt der PEG-Spaltung wurde in dichten Zellsuspensionen von *P. venetianus* Acetaldehyd identifiziert (Straß und Schink, 1986); als Mechanismus wurde eine 1,2-OH-Verschiebung analog dem Mechanismus der Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Diol-Dehydratase vorgeschlagen (Schink und Stieb, 1983; Straß und Schink, 1986) (siehe Abschnitt 1.5.2.1). Schließlich konnte die PEG-spaltende Acetaldehyd-bildende Enzymaktivität in zellfreiem Zellextrakt gemessen werden, zunächst in der Cytoplasma-Fraktion des strikten Anaerobiers *Acetobacterium* Stamm HA1 (Schramm und Schink, 1991), anschließend auch in der Cytoplasma-Fraktion von *P. venetianus* (Frings et al., 1992) sowie in zellfreien Zellextrakten von *Bacteroides* sp. Stamm PG1 (Frings et al., 1992).

Die verschiedenen Studien sprechen dafür, dass zur Spaltung der Polyethylenglycole jeweils die Strategie der 1,2-OH-Verschiebung angewendet wird (Abb. 1.3), wobei bisher keines der aus einem anaeroben Bakterium stammenden PEG-spaltenden Enzyme isoliert wurde, folglich auch noch nicht geklärt werden konnte, wie der Enzymmechanismus genau aussieht und welche Cofaktoren tatsächlich beteiligt sind.

Für Übersichten zum Polyethylenglycol-Abbau siehe Cox (1978), White et al. (1996) und Kawai (2002).

## 1.4 Spaltung von Phenoxyethanol durch Acetobacterium Stamm LuPhet 1

Wie bereits erwähnt wurde, wird 2-Phenoxyethanol durch *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 zu Acetaldehyd und Phenol gespalten (Abb. 1.2). Anstelle von Phenoxyethanol konnte *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 auch kurze PEGs (Molmasse $\leq$ 300 g/mol) verwerten. Außerdem dienten weitere Dialkylether mit einer freien OH-Gruppe wie 2-Methoxyethanol und 2-Ethoxyethanol als Wachstumssubstrate, während die beidseitig blockierte Substanz Tetraethylenglycoldimethylether nicht verwertet wurde (Frings und Schink, 1994).

Die Spaltung des Ethers Phenoxyethanol durch *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 stellt weder eine Hydrolyse noch eine Redoxreaktion dar. Formal lassen sich die Produkte zum Beispiel mit einer β-Eliminierung von Phenol und einer anschließenden Keto-Enol-Tautomerisierung erklären.

Enzymatische β-Eliminierungen von Wasser, etc. laufen üblicherweise als Heterolysen ab, in deren Verlauf es jeweils zur Deprotonierung eines relativ leicht abstrahierbaren Protons, meist eines α-Protons einer Carbonylfunktion, kommt. Die Wasserstoffe in Phenoxyethanol (wie auch in PEG, Ethylenglycol oder Glycerin) sind jedoch in Bezug auf eine Deprotonierung alle nicht aktiviert. Möglicherweise ist es günstiger solche Wasserstoffe homolytisch als heterolytisch abzuspalten. Jedenfalls erfolgt die Wasserabspaltung aus Ethylenglycol (und anderen Diolen) durch die Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzyme Diol-Dehydratase und Glycerin-Dehydratase (EC 4.2.1.28 und EC 4.2.1.30) als Homolyse, sie wird durch die Abstraktion eines Wasserstoff*atoms* eingeleitet (siehe Abschnitt 1.5.2.1). Für die Phenoxyethanol-Spaltung wurde deshalb (wie zuvor bereits für die anaerobe Spaltung von PEG) vorgeschlagen, dass das Substrat über einen ähnlichen Mechanismus, wie ihn Diol- und Glycerin-Dehydratase katalysieren, zu einem Halbacetal umgelagert würde, aus welchem Phenol leicht abspalten kann (Frings und Schink, 1994).

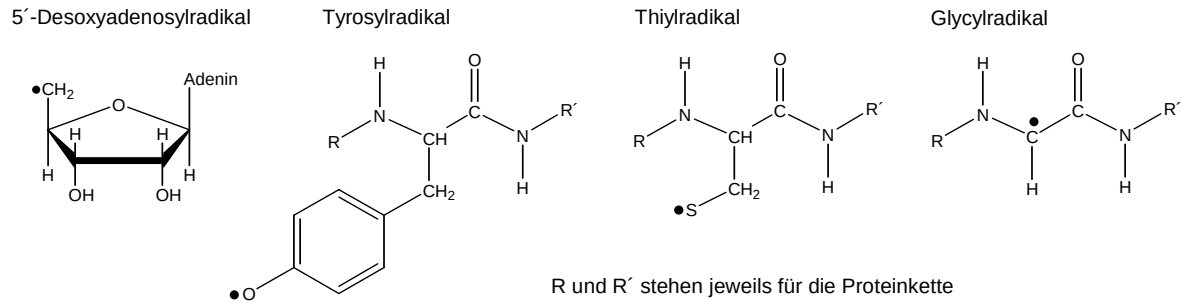
## 1.5 Radikalreaktionen

Erst in jüngerer Zeit wird deutlich, dass gar nicht so wenige Enzymreaktionen über radikalische Zwischenstufen verlaufen (Stubbe, 1988; Frey, 1990; Sinnott, 1998; Buckel und Golding, 1999; Chem. Rev., 2003). Viele dieser Enzyme enthalten Übergangsmetallionen in ihren Cofaktoren. Oft werden diejenigen Reaktionen auf radikalischem Wege katalysiert, die sich mit den heterolytischen Mitteln, die Enzymen zur Verfügung stehen, kaum verwirklichen lassen. Radikale sind in der Regel sehr reaktive Moleküle. Außerdem kann die Reaktivität in den radikalischen Zwischenstufen im Vergleich zum Ausgangsmolekül stark verändert sein. Darauf beruhen zum Beispiel die Kohlenstoffskelett-Umlagerungen, die von Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzymen katalysiert werden (für eine Übersicht siehe z. B. Banerjee, 2003). Andere Beispiele sind Enzyme, die Radikal-Anionen erzeugen, um dadurch das Substrat umzupolen, wodurch Abgangsgruppen aus eigentlich „ungünstigen“ Positionen eliminiert werden können (Buckel und Keese, 1995; Buckel, 1996; Buckel und Golding, 1999). Auf diese Art erreicht z. B. das Enzym (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase eine Abspaltung der α-Hydroxygruppe des Thioesters, es entsteht (E)-Glutaconyl-CoA. Auch die Chorismat-Synthase bewerkstelligt mit diesem Prinzip eine Eliminierung von Phosphat aus zunächst ungünstigen Positionen (Buckel und Golding, 1999). Radikal-Anionen können auf verschiedene Weisen gebildet werden, durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms in Kombination mit einer Deprotonierung oder durch Einelektronenreduktion oder Einelektronenoxidation gefolgt von Deprotonierungen etc. (Buckel und Golding, 1999).

### 1.5.1 Radikalreaktionen zur Spaltung von nicht-aktivierten C—H-Bindungen

Man geht davon aus, dass enzymatische Spaltungen von nicht-aktivierten C—H-Bindungen (d. h. von Alkan-ähnlichen, unpolaren, in Bezug auf eine Deprotonierung wenig reaktiven C—H-Bindungen) stets über radikalische Zwischenstufen erfolgen (Buckel und Golding, 1999), wobei der wahre Charakter bei Monooxygenase-Reaktionen noch unklar ist, und dort wahrscheinlich keine freien Radikale auftreten (Newcomb und Toy, 2000; Mayer, 2000), siehe auch Abschnitt 1.6. In aeroben Organismen werden Reaktionen an nicht-aktivierten C—H-Bindungen vorrangig durch Oxygenasen und Peroxidasen, d. h. durch verschiedene reaktive Sauerstoffspezies (frei bzw. metallgebunden) katalysiert (Sinnott, 1998); außerdem dienen 5´-Desoxyadenosylradikale (aus Coenzym $B_{12}$ hervorgehend), Thiylradikale (aus Cystein) sowie Phenoxylradikale (aus Tyrosin bzw. modifiziertem Tyrosin) zur Abspaltung

von Wasserstoff aus S—H- oder nicht-aktivierten C—H-Bindungen (Stubbe und van der Donk, 1998). Die Bildung der Phenoxylradikale ist meist ein sauerstoffabhängiger Prozess.
In Enzymen anaerober Organismen handelt es sich bei den identifizierten freien Radikalen, die S—H- oder nicht-aktivierte C—H-Bindungen spalten, jeweils um Glycylradikale, Thiylradikale (aus Cystein) oder 5´-Desoxyadenosylradikale (aus Coenzym $B_{12}$ oder *S*-Adenosylmethionin hervorgehend) (Stubbe und van der Donk, 1998; Heider et al., 1999; Frey und Magnusson, 2003). Die Dissoziationsenergien dieser X—H-Bindungen von Tyrosin (O—H), Cystein (S—H), Glycin ($C_{\alpha}$—H) und 5´-Desoxyadenosin (C(5´)—H) entsprechen ungefähr den Dissoziationsenergien der zu spaltenden Substratbindungen (Ochiai, 1994; Stubbe und van der Donk, 1998).




## 1.5.2 Radikalenzyme in Anaerobiern

Neben den bereits mehrfach erwähnten Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzymen existieren unter anoxischen Bedingungen weitere Enzyme, die bei Bedarf freie Radikale erzeugen können oder diese ständig enthalten, um sie zur Spaltung von nicht-aktivierten C—H-Bindungen bzw. von S—H- oder O—H-Bindungen oder für andere Reaktionen einzusetzen.

### *1.5.2.1 Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase und Glycerin-Dehydratase*

Die Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzyme Diol-Dehydratase (*D,L*-1,2-Propandiol-Hydrolyase, EC 4.2.1.28) (Abeles et al., 1960; Lee und Abeles, 1963) bzw. Glycerin-Dehydratase (Glycerin-Hydrolyase, EC 4.2.1.30) (Smiley und Sobolov, 1962; Pawelkiewicz und Zagalak, 1965; Schneider et al., 1970; Stroinski et al., 1974) sind gut untersucht. Sie kommen vor allem in verschiedenen Gattungen der Enterobakterien sowie bei Propionibakterien, Lactobacilli und Clostridien vor.

Diol-Dehydratase und Glycerin-Dehydratase bewirken die Wassereliminierung aus vicinalen Diolen (1,2-Propandiol, Ethylenglycol oder Glycerin) unter Bildung der entsprechenden Aldehyde, indem sie einen Platztausch zwischen einer OH-Gruppe und einem vicinalen Wasserstoff-Rest katalysieren. Dadurch entsteht intermediär ein Halbacetal, welches zu Aldehyd und Wasser zerfällt. Diese Enzyme enthalten 5´-Desoxyadenosylcobalamin (= Coenzym $B_{12}$) als prosthetische Gruppe, darin ist das C(5´)-Atom der Desoxyribose kovalent an Cobalt gebunden. Diese C—Co(III)-Bindung ist relativ schwach (Dissoziationsenergie 109 kJ/mol), sie wird bei Substrat-Präsenz unter Bildung einer Co(II)-Spezies und eines 5´-Desoxyadenosylradikals homolytisch gespalten. Das 5´-Desoxyadenosylradikal leitet die Umlagerung des Diols ein, indem es ein Wasserstoffatom von C-1 des Substrats abstrahiert, wodurch 5´-Desoxyadenosin und ein Substratradikal entstehen. Im solchermaßen aktivierten Substrat wandert die an C-2 gebundene OH-Gruppe von C-2 nach C-1. Anschließend bekommt das Substratradikal an C-2 wieder ein Wasserstoffatom von 5´-Desoxyadenosin zurück (Toraya, 2003, und darin genannte Originalarbeiten). Abbildung 1.4 zeigt den Mechanismus. Hierbei fand kein Austausch des von C-1 nach C-2 wandernden Wasserstoffatoms mit Protonen des Lösungsmittels statt (Brownstein und Abeles, 1961). Die Wanderung der OH-Gruppe im Substratradikal von C-2 an das benachbarte C-1 wurde bei der Diol-Dehydratase durch $^{18}$O-Markierungsexperimente nachgewiesen (Rétey et al., 1966). Die Wasserabspaltung aus dem an C-1 entstandenen Halbacetal erfolgte stereospezifisch (Rétey et al., 1966). Bei Versuchen mit Tritium-markierten Substraten wurde neben intramolekularem auch intermolekularer Transfer von H bzw. T gefunden (Abeles und Zagalak, 1966); man fand außerdem Markierungs-Transfer aus der bzw. in die 5´-Methylengruppe des 5´-Desoxyadenosylcobalamins (Frey und Abeles, 1966). Die zuletzt genannten Beobachtungen erklären sich dadurch, dass es sich beim katalytischen Radikal um das 5´-Desoxyadenosylradikal handelt, bei dem die drei Wasserstoffe der Methylgruppe durch die Rotation der Methylgruppe im Intermediat 5´-Deoxyadenosin äquivalent werden (Frey et al., 1967; Essenberg et al., 1971).

Diese Enzyme enthalten außer 5´-Desoxyadenosylcobalamin als weiteren Cofaktor ein Kaliumion und sind aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut $(\alpha\ \beta\ \gamma \cdot \mathrm{AdoCbl} \cdot K^+)_2$ (Shibata et al., 1999; Yamanishi et al., 2002). Für den Fall der Beschädigung des 5´-Desoxyadenosylcobalamins existieren spezifische Chaperon-ähnliche ATP-abhängige Enzyme, die für eine Reaktivierung der Dehydratase sorgen, indem sie den Ausbau des defekten Cobalamin-Cofaktors katalysieren und so dessen Ersatz durch intakten Cobalamin-Cofaktor ermöglichen (Toraya, 2003, sowie darin genannte Originalarbeiten).

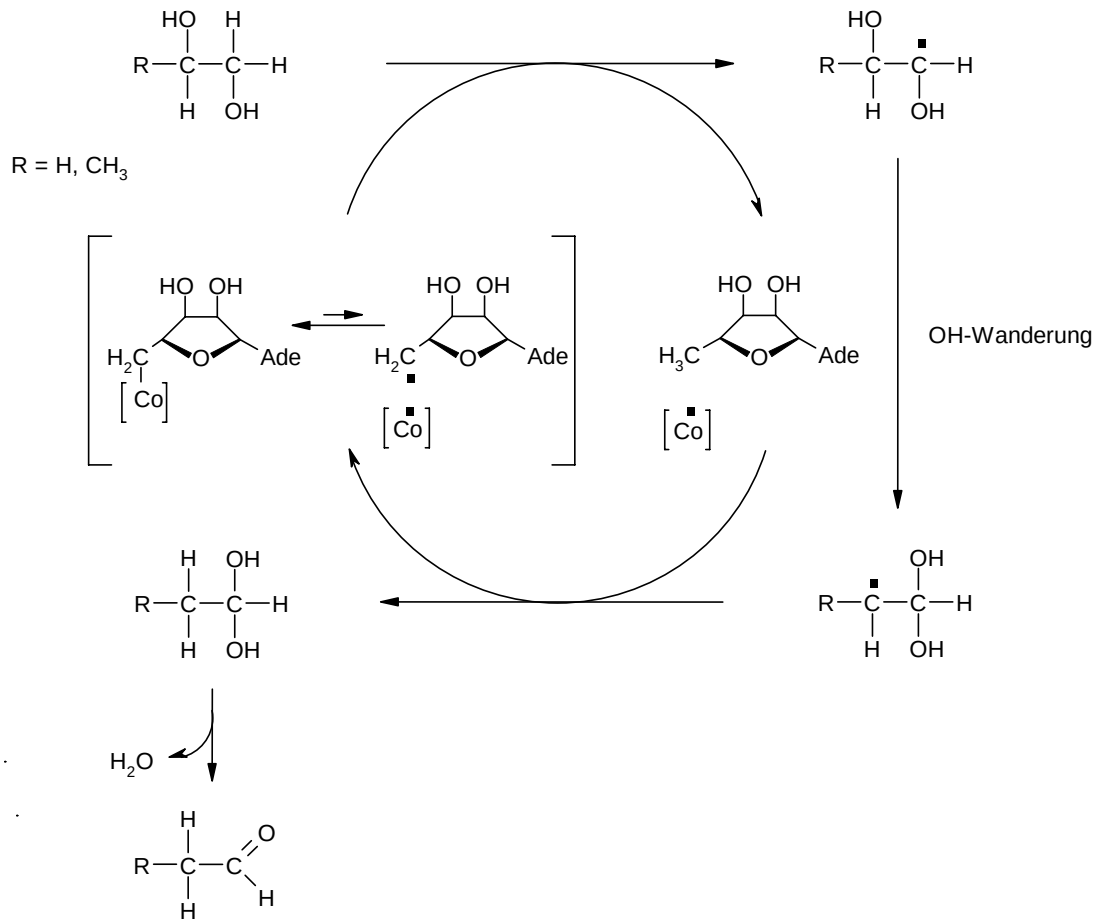



**Abb. 1.4:** Minimal-Mechanismus der Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzyme Diol-Dehydratase (EC 4.2.1.28) und Glycerin-Dehydratase (EC 4.2.1.30).

Neuere Untersuchungen auf der Grundlage von Kristallstrukturen und Rechnungen sowie gezielten Mutationen ergaben, dass die Wanderung der OH-Gruppe (im Substratradikal) von Seiten des Enzyms durch das synergistische Zusammenspiel von Säure- und Base-Katalyse unterstützt wird. Die wandernde Hydroxylgruppe wird partiell protoniert und die an C-1 „zuschauende“ Hydroxylgruppe wird partiell deprotoniert (Shibata et al., 2003; Smith et al., 2001; Toraya, 2003).

In zellfreiem Zellextrakt von *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 war ebenfalls eine aktive Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase gefunden worden, zusätzlich zur Phenoxyethanol-spaltenden Aktivität. Die beiden Aktivitäten unterschieden sich allerdings in ihrer Beeinfluss-barkeit durch zugesetzte Cobalamine, während die Diol-Dehydratisierung durch 5´-Desoxy-

adenosylcobalamin gesteigert bzw. durch Hydroxo- oder Cyanocobalamin oder Licht gehemmt wurde, zeigte dies bei der Phenoxyethanol-Spaltung jeweils keine Wirkung (Frings und Schink, 1994). Das sprach gegen einen Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Mechanismus der Phenoxyethanol-Spaltung. Möglicherweise wird Phenoxyethanol weder mit Hilfe von Coenzym $B_{12}$ noch einem anderen Corrinoid sondern auf alternative Weise gespalten.

#### *1.5.2.2 Nicht-Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase*

Zum Beispiel wurde im strikten Anaerobier *Clostridium glycolicum* eine von Coenzym $B_{12}$ unabhängige Diol-Dehydratase entdeckt, ein integrales Membranprotein, das bei Wachstum auf Ethylenglycol oder 1,2-Propandiol induziert war. Es enthielt weder Coenzym $B_{12}$ noch ein anderes Corrinoid. Die Enzymaktivität war sehr Sauerstoff-empfindlich (Hartmanis und Stadtman, 1986). ESR-Messungen von Membranpräparationen (mit solubilisierter Dehydratase) zeigten ein ungepaartes Elektron (*g*-Wert = 2,02) (Hartmanis und Stadtman, 1987). Das Enzym konnte aufgrund der sehr labilen Aktivität nicht isoliert werden, Aufbau und Mechanismus dieser Dehydratase sind deshalb unbekannt (Hartmanis und Stadtman, 1986; Hartmanis und Stadtman, 1987).

#### *1.5.2.3 Glycylradikalenzyme*

Dagegen konnten vor kurzem Sequenz und Struktur einer neuartigen Glycerin-Dehydratase aufgeklärt werden. Diese Dehydratase war beim Abbau von Glycerin in einem Stamm des Gärers *Clostridium butyricum* induziert und wurde als ein neues Mitglied der Familie der Glycylradikalenzyme identifiziert (Saint-Amans et al., 2001; Raynaud et al., 2003; O´Brien et al., 2004). Genom-Analysen haben angedeutet, dass Glycylradikalenzyme unter obligat und fakultativ anaeroben Bakterien sowie Archaeen weitverbreitet sein könnten (Sawers, 1999). Glycylradikalenzyme enthalten in aktivierter Form ein freies Radikal; ein Glycin der Polypeptidkette liegt als $\alpha$-Kohlenstoffradikal vor, das durch den capto-dativen Effekt der benachbarten Peptidbindungen etwas stabilisiert wird (Sawers, 1999; Duboc-Toia et al., 2003; Himo und Siegbahn, 2003). Sie sind sehr Sauerstoff-empfindlich und nur unter anoxischen Bedingungen funktionsfähig. Durch Sauerstoff wird die Polypeptidkette an der Stelle des Glycylradikals gespalten (Knappe und Sawers, 1990). Den Prototypen der Glycylradikalenzyme bildet die Pyruvat-Formiat-Lyase (EC-Nummer: 2.3.1.54) (Knappe et al., 1969). Sie katalysiert die reversible Reaktion von Pyruvat und Coenzym A zu Acetyl-CoA und Formiat, und spielt bei der anaeroben Glucosefermentation in *E. coli* und anderen Bakterien eine

zentrale Rolle (z. B. Knappe et al., 1984; Knappe und Sawers, 1990 (Übersichtsartikel); Becker et al., 1999). Die Reaktion am Substrat Pyruvat erfolgt nicht durch das Glycylradikal selbst, sondern durch ein damit aus einer Cystein-Seitenkette gebildetes Thiylradikal (Knappe et al., 1993; Parast et al., 1995).

Von den für die DNA-Biosynthese essentiellen Ribonukleotid-Reduktasen gibt es drei verschiedene Klassen, sie verwenden alle jeweils einen radikalischen Cofaktor (Jordan und Reichard, 1998; Fontecave, 1998). Die Reduktasen der Klasse III, die sogenannten Anaeroben Ribonukleotid-Reduktasen (Fontecave et al., 1989; sowie z. B. Ollagnier et al., 1996; Logan et al., 1999) gehören zu den Glycylradikalenzymen; dagegen bilden die Reduktasen der Klasse I mit Sauerstoff in einem autokatalytischen Prozess ein Tyrosylradikal, während jene der Klasse II Coenzym $B_{12}$ als Cofaktor enthalten. Abbildung 1.5 zeigt einen möglichen Mechanismus der Anaeroben Ribonukleotid-Reduktase. Bei allen Ribonukleotid-Reduktase-Klassen wird durch transiente aus einer Cystein-Seitenkette hervorgehende Thiylradikale zunächst das 3´-H-Atom der Ribose homolytisch abgespalten. Anschließend erfolgt aus dem Substratradikal die Abspaltung der 2´-Hydroxygruppe, und zwar anders als bei den Coenzym-$B_{12}$-Diol-Dehydratasen ohne vorherige Halbacetalbildung, ohne Wanderung einer benachbarten OH-Gruppe, obwohl eine entsprechende OH-Gruppe im Substrat vorhanden ist (Stubbe und van der Donk, 1998).

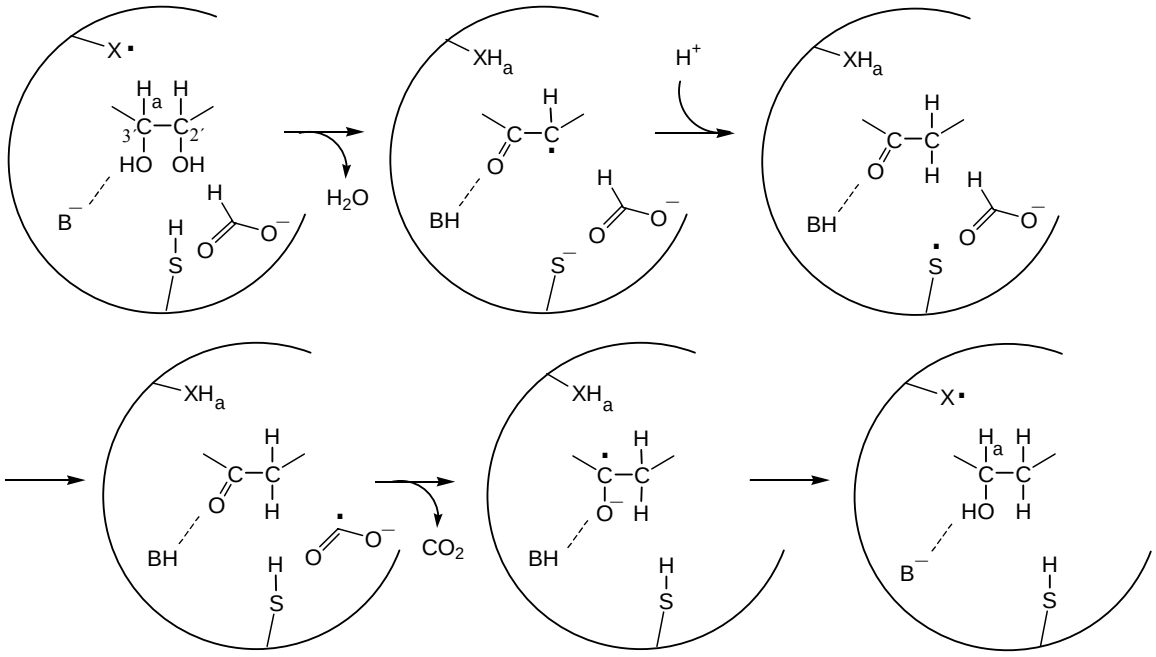



**Abb. 1.5:** Mechanismus der Reduktion von NTPs zu dNTPs durch die Anaerobe Ribonukleotid-Reduktase (aus *E. coli*), wie er von Fontecave und Mulliez (1999) vorgeschlagen wurde. XH steht für einen Cysteinrest.

Neben den beiden seit längerem bekannten und intensiv erforschten Glycylradikalenzymen Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) und Anaerobe Ribonukleotid-Reduktase hat man Enzyme bzw. Gene mit PFL-ähnlicher Aminosäure-Sequenz gefunden, die andere α-Ketosäuren spalten, bzw. deren Funktion bislang unbekannt ist (eine Übersicht gibt Sawers und Watson, 1998). Danach wurden außerdem die Glycylradikalenzyme Benzylsuccinat-Synthase (Leuthner et al., 1998), 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase (Selmer und Andrei, 2001) sowie die zuvor erwähnte Glycerin-Dehydratase (Raynaud et al., 2003) entdeckt. Die Benzylsuccinat-Synthase katalysiert den ersten Schritt des anaeroben Toluol-Abbaus, die Aktivierung des Substrats durch Addition an Fumarat (Biegert et al., 1996; Beller und Spormann, 1997). Aufgrund verschiedener Untersuchungen wurde vorgeschlagen, dass dabei ein Wasserstoffatom der Methylgruppe des Toluols durch ein Proteinradikal abstrahiert wird. Das resultierende Benzylradikal addiert an die Doppelbindung von Fumarat und durch die Rückgabe des eingangs abstrahierten Wasserstoffatoms an das Substratradikal entsteht Benzylsuccinat (Beller und Spormann, 1997; Krieger et al., 2001). Benzylsuccinat-Synthasen wurden mittlerweile in verschiedenen anaeroben Bakterien gefunden (Verfürth et al., 2004). Außerdem scheinen Benzylsuccinat-Synthase-ähnliche Enzyme den anaeroben Abbau anderer Substrate einzuleiten. So werden zum Beispiel *m*- bzw. *p*-Xylol (Müller et al., 1999 und 2001), 2-Methylnaphthalin (Annweiler et al., 2000), Hexan (Rabus et al., 2001) und Ethylbenzol (Kniemeyer et al., 2003) ebenfalls durch Addition an Fumarat aktiviert. Bei Hexan und Ethylbenzol addiert dabei jeweils die subterminale Methylengruppe. Die 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase katalysiert im strikt anaeroben Bakterium *Clostridium difficile* während des Abbaus von Tyrosin zu *p*-Kresol die $CO_2$-Abspaltung von *p*-Hydroxyphenylacetat zu *p*-Kresol. Es wird angenommen, dass dieses Glycylradikalenzym zunächst das Wasserstoffatom der ringständigen Hydroxygruppe abstrahiert, anschließend wird aus dem resonanzstabilisierten Radikal-Anion des Substrats $CO_2$ abgespalten. Das decarboxylierte Substratradikal wird protoniert und erhält das Wasserstoffatom zurück (Selmer und Andrei, 2001; Andrei et al., 2004).

Um die unreife Form der Glycylradikalenzyme in ihre radikaltragende Fom zu überführen, existieren Aktivasen (Sawers, 1999; Hermuth et al., 2002; Andrei et al., 2004; O´Brien et al., 2004). Diese jeweils spezifischen Enzyme werden in der Nähe der Sequenz des Glycylradikalenzyms codiert. Die Anaerobe Ribonukleotid-Reduktase bildet mit ihrer Aktivase einen festen Komplex im Verhältnis 1:1 (Tamarit et al., 1999), dagegen liegen im Zellextrakt von *Thauera aromatica* Benzylsuccinat-Synthase und die entsprechende Aktivase in unter-

schiedlichen Mengen (14:1) und getrennt vor (Hermuth et al., 2002). Die Aktivasen benötigen *S*-Adenosylmethionin als Cosubstrat. Dieses wird während des Aktivierungsvorgangs (mit einem passenden Reduktionssystem) reduktiv zu Methionin und einem 5´-Desoxyadenosylradikal gespalten. Das entstehende 5´-Desoxyadenosylradikal abstrahiert das α-Wasserstoffatom des Glycins (Fontecave et al., 2001). Zur Vorbereitung der Katalyse wird der radikalische Zustand wahrscheinlich vom Glycin auf einen spezifischen Cysteinrest am aktiven Zentrum übertragen. Bei Pyruvat-Formiat-Lyase (Becker et al., 1999) und Anaerober Ribonukleotid-Reduktase (Logan et al., 1999) sprechen viele Fakten für ein solches Thiylradikal als katalytisch kompetente Radikalspezies, bei anderen Beispielen war das entsprechende Cystein in Proteinsequenzen zumindest konserviert (Leuthner et al., 1998; Coschigano et al., 1998; Selmer und Andrei, 2001; Raynaud et al., 2003; O´Brien et al., 2004).

#### *1.5.2.4 S-Adenosylmethionin-abhängige Radikalenzyme*

Es stellte sich heraus, dass die Aktivasen der Glycylradikalenzyme zu einer übergeordneten Familie von *S*-Adenosylmethionin-abhängigen Proteinen gehören, der Superfamilie der „Radikal-SAM-Proteine“ (Sofia et al., 2001). Man nimmt an, dass Enzyme dieser Familie *S*-Adenosylmethionin nicht als elektrophiles Methylierungsagens verwenden sondern es reduktiv spalten, um ein 5´-Desoxyadenosylradikal zu erzeugen. Für diese Aufgabe enthalten die Enzyme einen [4Fe-4S]-Cluster und sind auf ein passendes Reduktionssystem angewiesen. Mit Hilfe des 5´-Desoxyadenosylradikals werden Wasserstoffatome von den Substraten abstrahiert (vor allem aus unreaktiven C—H-Bindungen) und dadurch vielfältige Reaktionen eingeleitet (Sofia et al., 2001; Fontecave et al., 2001; Jarrett, 2003; Frey und Magnusson, 2003).

Bei manchen Enzymen dient *S*-Adenosylmethionin als Cosubstrat, d. h. es wird im Zuge der Reaktion verbraucht, dies ist zum Beispiel bei den Schwefel-einbauenden Enzymen Biotin-Synthase (Berkovitch et al., 2004; Fontecave et al., 2003) und Lipoat-Synthase (Fontecave et al., 2003) der Fall. Dazu zählt auch die Sauerstoff-unabhängige Coproporphyrinogen-III-Oxidase HemN, das erste Protein der „Radikal-SAM-Proteine“, dessen Kristallstruktur gelöst werden konnte (Layer et al., 2003). HemN katalysiert zwei oxidative Decarboxylierungen während der bakteriellen Häm-Biosynthese (von Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen IX) (Layer et al., 2002). Bei zwei anderen Enzymen (Lysin-2,3-Aminomutase und Sporenphotoprodukt-Lyase) wird *S*-Adenosylmethionin nicht verbraucht, sondern als Coenzym verwendet. Es wird nach seiner intermediären Spaltung zum Ende des Katalysezyklus

wiederhergestellt, d. h. es bildet eine reversible 5´-Desoxyadenosylradikal-Quelle, vergleichbar mit der Rolle von Coenzym $B_{12}$ in Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzymen. Die Sporenphotoprodukt-Lyase aus *Bacillus subtilis* repariert Methylen-verbrückte Thymin-Dimere in DNA (Rebeil et al., 1998; Cheek und Broderick, 2002). Die Lysin-2,3-Aminomutase (EC 5.4.3.2) (Chirpich et al., 1970; Frey, 2001; Frey und Magnusson, 2003) katalysiert in manchen Clostridien die reversible Konversion von *L*-Lysin in *L*-β-Lysin. Diese Reaktion weist einige Gemeinsamkeiten mit der Reaktion der Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Ethanolamin-Ammoniak-Lyase (EC 4.3.1.7) auf, die in verschiedenen Enterobakterien und einer Art von *Clostridium* gefunden wurde (Bradbeer, 1965 a; Bradbeer, 1965 b; Kaplan und Stadtman, 1968; zur Übersicht siehe Toraya, 2003), sie benötigt jedoch außer *S*-Adenosylmethionin auch Pyridoxal-5´-phosphat als Coenzym.
Die Enzymaktivitäten der aufgeführten *S*-Adenosylmethionin-abhängigen Beispiele waren alle Sauerstoff-empfindlich.

## 1.6 Aktivierung von C—H-Bindungen in Anaerobiern durch nicht-radikalische Mechanismen?

Es gibt noch andere bakterielle Prozesse, bei denen die anoxische Aktivierung von C—H-Bindungen gelingt. Dazu zählen die bereits erwähnte in Nitratreduzierern entdeckte Hydroxylierung von Ethylbenzol zu 1-Phenylethanol durch Molybdän-haltige Dehydrogenasen (Johnson et al., 2001; Kniemeyer und Heider, 2001), die in sulfatreduzierenden Reinkulturen und Consortien auftretende Carboxylierung von Naphthalin (Zhang und Young, 1997; Galushko et al., 1999; Meckenstock et al., 2000), Phenanthren (Zhang und Young, 1997) bzw. Hexadekan (So et al., 2003) sowie die nach wie vor rätselhafte anaerobe Methanoxidation (z. B. Boetius et al., 2000; Valentine, 2002; Krüger et al., 2003; Hallam et al., 2004). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jeweils noch unbekannt. Im Fall der anaeroben Methanoxidation gibt es allerdings Hinweise, dass diese als Umkehrung der Methanbildung ebenfalls über einen Radikalmechanismus verlaufen könnte (Mitteilung Thauer).

## 1.7 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, zum Verständnis anoxischer Etherspaltungen beizutragen. Für die Untersuchungen wurde der Organismus *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 als Repräsentant der verschiedenen anaeroben PEG-Verwerter ausgesucht, weil er neben Polyethylenglycol auch den Monoether 2-Phenoxyethanol spalten konnte; bei der Phenoxyethanol-Spaltung sind Substrat und Reaktion klar definiert, im Gegensatz zur PEG-Spaltung, bei der die Produkte (die verkürzten PEGs) wiederum Substrate darstellen. Auch lassen sich 2-Phenoxyethanol und Phenol gut mit Hilfe von HPLC quantifizieren.
Die Kernfragen der Arbeit lauteten somit, wie sieht der Mechanismus der Phenoxyethanol-Spaltung von *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 aus, wie wird dieses nicht-aktivierte Substrat angegriffen, von welchen Cofaktoren ist das Enzym abhängig?
Da bei der Spaltung von Phenoxyethanol Acetaldehyd gebildet wird (Frings und Schink, 1994), wurde das entsprechende Enzym in der vorliegenden Arbeit als Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase bezeichnet.

Ausgangspunkt waren frühere Untersuchungen, bei denen im Zellextrakt von Stamm LuPhet1 sowohl die Spaltung von Phenoxyethanol als auch eine Dehydratisierung von vicinalen Diolen (getestet mit EG als Substrat) gemessen werden konnten. Die beiden Aktivitäten unterschieden sich vor allem in ihrer Beeinflussbarkeit durch zugesetzte Cobalamine (Frings und Schink 1994). Das deutete auf zwei verschiedene Enzyme hin. Allerdings konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Aktivitäten nur auf ein Enzym zurückgehen, dessen jeweiligen Eigenschaften stark vom umzusetzenden Substrat abhängen. Somit war eine der Aufgaben dieser Arbeit, sicherzustellen, dass die Phenoxyethanol-Spaltung nicht nur durch eine Seitenaktivität der Diol-Dehydratase zustande kommt.

Da die Phenoxyethanol-Spaltung bis dahin in Zellextrakt nur mit einer Rate von wenigen Prozent der *in-vivo*-Umsatzrate erfasst werden konnte (Frings und Schink 1994), war es vordringlich, Bedingungen oder Zusätze zu finden, durch die mehr der Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität erhalten bleibt. Nachdem es im Laufe dieser Arbeit gelungen war, regelmäßig hohe Anfangsaktivitäten zu messen, die Reaktion aber jeweils nur wenige Minuten anhielt, wurde näher untersucht, womit dieser Aktivitäts-Verlauf zusammenhängen könnte.

Es war geplant, im Rahmen einer Kooperation Mechanismus-Untersuchungen mit Hilfe von $^{2}H$- und $^{13}C$-markierten Phenoxyethanolen durchzuführen.

Weiterhin sollten eventuelle Induktionsunterschiede erfasst werden, um Wachstumssubstrate zu finden, bei denen die Enzyme der Phenoxyethanol-Spaltung nicht exprimiert würden. Es war vorgesehen, diese Zellen als Material für Negativkontrollen (z. B. in Protein-Gelen) zu verwenden. Als sich herausstellte, dass die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität in lactat-gewachsenen Zellen in etwa gleich stark exprimiert war wie bei Kultivierung mit Phenoxy-ethanol, wurde außerdem abgeklärt, ob die initialen Enzyme von Lactat-Abbau und Phenoxy-ethanol-Abbau eventuell identisch sind.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Allgemeines

### 2.1.1 Anoxisches Arbeiten

Für das Herstellen und Handhaben von anoxischen Lösungen wurden Glasgefäße verwendet, die mit Butylgummistopfen verschlossen waren; Butylgummi ist relativ gasdicht. Mit Hilfe von Spritzen, die zuvor mit $N_2$ gespült wurden, konnten Zugaben oder Entnahmen anoxisch durchgeführt werden. Größere Volumina, wie sie während der Kultivierung manchmal transferiert werden mussten, wurden nicht mehr mit Spritzen umgefüllt, sondern im $N_2$-Gasstrom. Alternativ zur Spritzen- bzw. Gegenstromtechnik wurde die Anaerobenkammer genutzt. Sonstige Vorgänge, bei denen die Gasatmosphäre Zutritt zu Zellen oder Zellextrakt hatte, wurden ebenfalls in der Anaerobenkammer durchgeführt.
Sauerstoff in der Gasphase von Gefäßen wurde durch mehrmaliges Evakuieren und Befüllen mit $N_2$ oder durch Spülen mit $N_2$ entfernt. In Flüssigkeiten gelöster Sauerstoff wurde ebenfalls durch mehrmaliges Evakuieren (unter Rühren) und Befüllen mit $N_2$ oder durch Begasen mit $N_2$ ausgetrieben. Bei der Herstellung von Medium und manchen Medienbestandteilen wurden Wasser bzw. Lösungen ausgekocht und unter $N_2/CO_2$ oder $N_2$ abgekühlt.
Aus allen verwendeten Puffern (Erntepuffer, Aufschlusspuffer und Testpuffer) wurde Sauerstoff zunächst nach einer der erwähnten Methoden entfernt, zusätzlich enthielten die Puffer ein Reduktionsmittel, mit Citrat komplexiertes Ti(III) (in der Regel 2,5 mM Ti(III) und das 1,5- bis 2-fache davon an Citrat). Titancitrat wurde nach Möglichkeit schon mindestens einen Tag vor Verwendung des Puffers zugeben.

### 2.1.2 Anaerobenkammer

Viele Arbeitsschritte wurden in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products, Ann Arbor, Michigan, USA) durchgeführt. Darin wurde eine $N_2/H_2$-Atmosphäre (95 % / 5 %; v/v) aufrechterhalten, u. a. durch palladiumaktivierte Aktivkohle, die die Umsetzung eingetragener Sauerstoffspuren mit Wasserstoff zu Wasser katalysierte. Der Kontrolle der Gasphasenzusammensetzung diente ein Sauerstoff- und Wasserstoffdetektor (Coy). Zusätzlich konnte anhand einer alkalischen Lösung von Pyrogallol auch beurteilt werden, ob zwischenzeitlich Sauerstoff in die Kammer eingedrungen war, sie verfärbt sich bei Zutritt von Sauerstoff irreversibel. Die Lösung wurde regelmäßig erneuert. Gegenstände wurden über eine Schleuse

in die Kammer eingeführt, die dafür jeweils dreimal evakuiert und mit $N_2$ bzw. beim dritten Mal mit $N_2/H_2$ (95 % / 5 %; v/v) aufgefüllt wurde. Gefäße wurden vor Gebrauch generell einige Tage in der sauerstofffreien Atmosphäre äquilibriert.

### 2.1.3 Verwendete Chemikalien und Gase

Alle verwendeten Gase und Gasgemische der Reinheitskategorie 5.0 stammten von den Sauerstoffwerken Friedrichshafen. Handelsübliche Chemikalien in p.a.- und Chromatographie-Qualität wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Biomol (Ilvesheim), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. 5-Hydroxyvanillat stammte von Pfaltz & Bauer (Waterbury, Conneticut, USA), die Proteasen-Inhibitoren-Mischung von Roche (Mannheim). Von den Ethylenglycolen wurden die folgenden Qualitäten eingesetzt: Triethylenglycol (Fluka, puriss., > 99 % GC), Tetraethylenglycol (mindestens vom Reinheitsgrad pract., Gehalt mindestens > 97 %) und PEG 300 (Fluka, pract.).

Die Substanzen 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol, 2-(2-Methoxyphenoxy)ethanol, 2-(4-Bromphenoxy)ethanol, 2-(2,4,6-Trimethylphenoxy)ethanol sowie 4-Ferrocenyl-butan-1,2-diol wurden von Herrn Dr. Mukul Lal (Universität Siegen) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Die verschiedenen isotopensubstituierten Phenoxyethanole
2-Phenoxy(1,1-$^2H_2$)ethanol, 2-Phenoxy(2,2-$^2H_2$)ethanol, 2-Phenoxy(1-$^{13}C$,1,1-$^2H_2$)ethanol, 2-Phenoxy(2-$^{13}C$,1,1-$^2H_2$)ethanol, 2-Phenoxy(1,2-$^{13}C_2$,1,1-$^2H_2$)ethanol, (*S*)-2-Phenoxy(1-$^2H_1$)ethanol, (*R*)-2-Phenoxy(1-$^2H_1$)ethanol (Speranza et al., 2002; Speranza et al., 2003) sowie 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol und racemisches 2-Phenoxypropan-1-ol wurden von Frau Dr. Giovanna Speranza und Mitarbeitern (Universität Mailand, Italien) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

*Ti(III)Citrat*-Lösungen wurden nach Zehnder und Wuhrmann (1976) aus 15 %igen $TiCl_3$-Lösungen (Merck, Darmstadt) in der Anaerobenkammer hergestellt. Die Lösungen enthielten jeweils etwa 100 mM Ti(III), welches durch etwa 150 bis 200 mM Citrat komplexiert wurde. Titancitrat-Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf die Konzentration des Ti(III).

Bei Kaliumphosphatpuffern wurde der gewünschte pH-Wert durch Mischen entsprechender Stammlösungen (ggfs. einschließlich 0,5 M Kaliumchlorid) von Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat eingestellt. Bei Tris-Puffern wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure eingestellt, gegebenenfalls nach Lösen des Kaliumchlorids.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Herkunft des Bakteriums

Der *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 (DSM 9077) wurde von Dr. Joachim Frings aus Faulschlamm der kommunalen Kläranlage Tübingen-Lustnau isoliert und charakterisiert (Frings und Schink, 1994).

### 2.2.2 Kultivierung und Kultivierungstechnik

*Medium*

Dieses strikt anaerobe Bakterium wurde in Flüssigkultur im *batch*-Verfahren in einem definierten Süßwassermineralsalzmedium (Widdel und Pfennig, 1981) mit 2-Phenoxyethanol oder *D,L*-Lactat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert, wie von Frings und Schink (1994) beschrieben. Die Versuche der vorliegenden Arbeit ergaben zudem, dass *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 (mit Phenoxyethanol als Substrat) auch in Medium wachsen konnte, welches ohne den Zusatz von Mangan, Selenit und Wolframat hergestellt worden war. Als alternative Wachstumssubstrate wurden Polyethylenglycol 300 (PEG 300), Ethylenglycol, Glycerin, $H_2/CO_2$ (66 % / 33 %, v/v), *D*-Fructose oder 3,4,5-Trimethoxybenzoat verwendet. Von den Aldehyd-bildenden Substraten Phenoxyethanol, Ethylenglycol bzw. Glycerin wurde Kulturen insgesamt nur etwa 10-12 mM zugegeben, möglichst aufgeteilt in Portionen; beim Animpfen enthielt das Medium meist nur 5 mM, weiteres Substrat wurde während des Wachsens nachgefüttert. Von Polyethylenglycol, welches ebenfalls zu Aldehyd führte, wurde mehr eingesetzt, ca. 30 mM. Das Substrat *D,L*-Lactat wurde in Konzentrationen von insgesamt bis zu 50 mM zugegeben.

*Herstellung der Medien*

Die Medienzubereitung erfolgte unter striktem Ausschluss von Luftsauerstoff. Die Technik wurde ausführlich von Widdel und Pfennig (1981) beschrieben. Dafür wurde das Grundmedium (bidestilliertes Wasser und die Mineralsalze) nach dem Autoklavieren unter einem sterilen $N_2/CO_2$-Gemisch (80 % / 20 %; v/v) abgekühlt, und danach im sterilen $N_2/CO_2$-Gegenstrom die weiteren Komponenten (Puffer, Reduktionsmittel, Redoxindikator, Spurenelemente, Vitamine, gegebenenfalls das Substrat) aus sterilen Stammlösungen zugegeben. Als Puffer diente 30 mM Hydrogencarbonat, als Reduktionsmittel wurde Natriumsulfid in einer Konzentration von 1 mM verwendet, außerdem wurde der Redoxindikator Resazurin zugesetzt, in einer Konzentration von ca. 0,13-0,4 mg pro Liter. Spurenelemente erhielt das Medium in Form der Spurenelementlösung SL 10 (Widdel et al., 1983) und einer Selenit-Wolframat-Lösung (Widdel, 1980). Vitamine wurden durch eine 7-Vitamin-Lösung eingebracht (Widdel und Pfennig, 1981), dadurch enthielt das Medium unter anderem ca. 40 nM Cyanocobalamin. Zuletzt wurde der pH-Wert gemessen und mit steriler 1 M HCl bzw. 1 M $Na_2CO_3$-Lösung eingestellt, falls er nicht bereits zwischen 7,2 und 7,6 lag.
Fertig zubereitetes Medium wurde unter einem sterilen Strom von $N_2/CO_2$ in sterile 50-ml-Schraubdeckelflaschen (ohne Gasraum) bzw. in sterile Infusionsflaschen (Müller & Krempel, Bülach, Schweiz) verschiedener Volumina (150, 580, 1260 ml) (mit Gasraum) abgefüllt. Die Infusionsflaschen wurden mit Butylgummisepten verschlossen. Alternativ wurden 10-l- oder 20-l-Steilbrustflaschen (ebenfalls mit einem Gasraum aus $N_2/CO_2$ (80 % / 20 %; v/v) zur Kultivierung im größeren Maßstab verwendet.

Substrate wurden dem Medium aus anoxischen und sterilen Stammlösungen zugesetzt, Phenoxyethanol wurde manchmal auch in Form des Reinstoffs zugegeben. Für die Stammlösungen wurden die Substrate unter Sauerstoffausschluss gelöst und sterilfiltriert (Lösungen von Phenoxyethanol, 3,4,5-Trimethoxybenzoat, Fructose) bzw. autoklaviert (Lactat, PEG 300, Ethylenglycol, Glycerin). Reines Phenoxyethanol wurde mit einer autoklavierten Filtereinheit aus einem Cellulose-Filter in einem Metallhalter sterilfiltriert. Die Zugabe zum Medium erfolgte durch Gießen im sterilen $N_2/CO_2$-Gegenstrom oder mit sterilen Plastikspritzen und Kanülen, die vorher zur Entfernung des Luftsauerstoffs mit sterilem $N_2$ gespült worden waren. $H_2/CO_2$ wurde den Kulturen über Sterilfilter zugeführt.

*Beimpfung und Inkubation*

Es wurde jeweils mit Vorkulturen angeimpft, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, bzw. während dieser kühl gestellt worden waren (d. h. Raumtemperatur oder 4°C). Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischenzeitlich bei 4°C aufbewahrte Vorkulturen zum Zeitpunkt des Animpfens möglichst wieder Raumtemperatur erreicht hatten.

Beim Animpfen wurde in der Regel ein Vorkultur-Volumen übertragen, das ca. 5-10 % (v/v) des frischen Mediums entsprach. Dafür wurde der Vorkultur entweder mit einer sterilen Plastikspritze, die nach Hungate mit sterilem $N_2$ begast wurde, nur ein Aliquot entnommen und in neues Medium überführt, oder die Vorkultur wurde komplett verwendet, indem sie im sterilen $N_2/CO_2$-Gegenstrom in das kurzzeitig geöffnete Kulturgefäß gegossen wurde. Im zweiten Fall wurden dem Medium vorm Wiederverschließen außerdem noch wenige Kristalle Dithionit zugegeben.
Manchmal wurde auch mit weniger Vorkultur angeimpft, so bei Fructose (diese Vorkulturen wiesen jeweils höhere Zelldichten auf) oder bei $H_2/CO_2$ bzw. PEG 300.

Die Kulturen wurden im Dunkeln bei 28°C inkubiert, ohne kontinuierliches Rühren oder Schütteln, die Durchmischung im Zuge der Wachstumskontrolle reichte aus. Nur bei Kulturen auf $H_2/CO_2$ wurde langsam geschüttelt, die Kulturgefäße enthielten außerdem weniger Medium und das gasförmige Substrat wurde regelmäßig nachgefüttert.

Hatte eine Kultur laut Wachstumskurve und mikroskopischer Prüfung (auf Beweglichkeit und Form der Zellen) die späte logarithmische Wachstumsphase erreicht und befand sich außerdem noch nicht in der stationären Phase wurden die Zellen geerntet. War zu diesem Zeitpunkt eine Ernte aus organisatorischen Gründen nicht möglich, wurde die Kultur bis zur späteren Ernte kühl gestellt, oder ihr Wachstum wurde rechtzeitig verlangsamt durch Inkubation bei Raumtemperatur statt bei 28°C.

### 2.2.3 Messung von Bakteriumwachstum und Wachstumsparameter

*Optische Dichte*

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde über Trübungsmessungen mit einem Einstrahl-Spektralphotometer (Hitachi Modell 100-40, Tokyo, Japan) bei einer Wellenlänge von 578 nm als $OD_{578}$ bestimmt. Die Messungen erfolgten in optischem Spezialglas gegen Wasser

als Referenz. Da die Messung unter Luft erfolgte, wurde den Küvetten bei Resazurin-haltigen Proben etwas Dithionit zugesetzt.

*Wachstumsparameter*

Die Wachstumsparameter für Stamm LuPhet 1 waren von Herrn Dr. Joachim Frings ermittelt worden (Frings und Schink, 1994) und wurden für diese Arbeit übernommen. Häufig benutzte Daten waren dabei die $OD_{578}$-Trockenmasse Korrelation, laut der ein Liter Kultur mit einer $OD_{578}$ von 0,1 einer Trockenzellmasse von 24,7 mg entspricht, sowie die *in-vivo*-Umsatzrate, die mit Phenoxyethanol bei 1,04 U/mg Protein liegt.

*Bestimmung von Zellerträgen und Wachstumsparametern*

Näherungswerte für Zellerträge wurden abgeschätzt, indem die gemessene $OD_{578}$ der Kultur in eine Zelltrockenmasse umgerechnet und auf die jeweils maximal zur Verfügung stehende Substratkonzentration bezogen wurde. Allerdings wurde die Restkonzentration des Substrats dabei nicht bestimmt. Die Wachstumsrate $\mu$ wurde aus den Wachstumskurven (Auftragung von lg $OD_{578}$ über die Zeit) anhand der Steigung während der linearen Phase ermittelt.

$$\mu = (\lg e)^{-1} * [\lg x(t) - \lg x(t_0)] / (t-t_0)$$

Die Verdoppelungszeit $t_d$ ergibt sich aus der Beziehung $t_d = \ln 2 / \mu$.

### 2.2.4 Stammhaltung

Zur Stammhaltung (in 50 ml Schraubdeckelfläschchen) wurde eine Stammkultur ungefähr alle zwei Monate in Medium mit 1 mM Sulfid als Reduktionsmittel und 2 mM Phenoxyethanol als Substrat übertragen. Gleichzeitig wurde jeweils eine Arbeitskultur angeimpft. Stamm- und Arbeitskultur wurden möglichst in der exponentiellen Phase aus dem Brutraum genommen. Danach wurden sie bei 4°C aufbewahrt. Die Reinheit wurde durch Phasenkontrastmikroskopie bei 400-facher Vergrößerung überprüft.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Zellernte und Zelllagerung

Die Zellen wurden am Ende des exponentiellen Wachstums durch Zentrifugation unter striktem Ausschluss von Luftsauerstoff geerntet.
10-l- oder 20-l-Kulturen wurden dafür zunächst mit Hilfe einer Abfüllglocke anoxisch in 1-Liter-Infusionsflaschen überführt und verschlossen. Die Kulturen bzw. diese Portionen wurden in die Anaerobenkammer eingeschleust, wo die Kulturlösung in gasdichte Polypropylen-Zentrifugenbecher umgefüllt wurde. Aufgrund der Löslichkeit von Gasen in Polypropylen wurden die Zentrifugenbecher mindestens 2 Tage in der Anaerobenkammer zur Entfernung von Luftsauerstoff vorinkubiert. Die Zellen wurden außerhalb der Anaerobenkammer bei 4°C in einer Sorvall RC 5B-Zentrifuge (Du Pont de Nemours, Bad Homburg) sedimentiert, durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 14.100 × *g* mit einem GSA-Rotor bzw. bei 13.700 × *g* mit einem GS3-Rotor. Das jeweilige Pellet wurde in der Anaerobenkammer in Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen wurden schließlich in einem geringen Puffervolumen aufgenommen und direkt verwendet oder in 8-ml-Serumflaschen, die mit Butylgummisepten verschlossen waren, in flüssigem Stickstoff gelagert. Alternativ wurden die gewaschenen Zellen nicht resuspendiert sondern als Paste eingefroren (ebenfalls in Serumflaschen mit Butylgummisepten). In flüssigem Stickstoff konnten die Zellen für Monate aufbewahrt werden.

Als Puffer zum Waschen und Resuspendieren wurde in der Regel Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,5) mit 2,5 mM Titancitrat verwendet, andere Bedingungen werden explizit angegeben. Die gewaschenen Zellen enthielten neben Titancitrat stets auch noch vom Kultivierungsmedium eingetragenes Eisensulfid.

### 2.3.2 Aufschließen der Zellen

Für den anoxischen Aufschluss der Zellen mit einer *French*-Presse (Aminco, Silver Spring, Maryland, USA) wurde Zellsuspension in der Anaerobenkammer in eine Serumflasche gefüllt und mit einem Stopfen verschlossen. Über eine Kanüle wurde dann die gekühlte *French-Press*-Zelle mit der Zellsuspension in der Serumflasche verbunden. Die Zellen wurden durch

mehrmalige Passage bei 138 MPa aufgeschlossen, die Serumflasche wurde dabei mit Eis gekühlt.
Der Rohextrakt wurde anschließend zentrifugiert, um restliche ganze Zellen abzutrennen.
Dafür wurde der Zellextrakt in der Anaerobenkammer in 3-ml-Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen (Beckman Coulter, München) gefüllt und bei 4°C im gasdicht verschließbaren TLA-100.4-Rotor (Beckman Coulter) mit einer Ultrazentrifuge (Ultrazentrifuge Optima TL, Beckman Coulter) für 20 Minuten bei 30.400 × *g* zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden zur Entfernung von Luftsauerstoff in der Anaerobenkammer vorinkubiert. Der klare Überstand wurde als zellfreier Zellextrakt bezeichnet.
Zellfreier Zellextrakt (unter Sauerstoffausschluss) konnte in der Regel für einen Tag an 4°C aufbewahrt werden, ohne allzu viel von der Phenoxyethanol-spaltenden Aktivität zu verlieren, das Lagern in flüssigen Stickstoff führte meist zum vollständigen Verlust dieser Aktivität. Die Zellen wurden deshalb erst direkt vor einem Versuch aufgeschlossen. Für größere Versuche wurde der Extrakt in mehrere Aliquote aufgeteilt und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.3.3 Fraktionierung des Extrakts

Zellfreier Zellextrakt wurde durch Ultrazentrifugation bei 104.000 × *g* und 4°C für 60 min (Optima TL-Ultrazentrifuge, Beckman Coulter) in lösliche Fraktion und Membranfraktion getrennt. Zum Waschen wurde die Membranfraktion mit Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend im selben Puffer aufgenommen.
Ein Teil des zellfreien Zellextrakts wurde nicht zentrifugiert sondern während dieser Zeit bei 4°C ruhig gelagert, er diente als Kontrolle. Die Auswertung erfolgte anhand von Volumenaktivitäten, hierfür wurden die Zentrifugationsrückstände jeweils in einem Volumen resuspendiert, das genau dem Volumen vor Zentrifugieren entsprach.

### 2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

*Colorimetrische Proteinbestimmung*

Colorimetrisch wurde der Proteingehalt von Zellextrakt oder ganzen Zellen mit Coomassie Brilliant-Blue G-250 (= Serva Blau) mit der Methode der Mikro-Proteinbestimmung von Bradford (1976) bestimmt. Als Standard-Protein wurde Ovalbumin verwendet. Vom Standard wurden 5 verschiedene Verdünnungen angesetzt, von den Proben jeweils 2. Je Verdünnung

wurden 3 Küvetten gemessen. Es wurde das Farbstoff-Reagenz der Proteinbestimmung nach Bradford von Bio-Rad (München; enthält Coomassie Brilliant Blau G-250) verwendet, dieses wurde mit Wasser (Millipore) auf ein Fünftel verdünnt und gefiltert (→Reagenz A). Zunächst wurden 200 µl Suspension bzw. Zellextrakt bzw. Ovalbumin-Standard (mit einem Proteingehalt von maximal 1 mg/ml) mit 50 µl 10 N NaOH versetzt und 15 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Es wurde kurz abzentrifugiert und 200 µl Überstand mit 600 µl dest $H_2O$ verdünnt (→B). Für den Testansatz wurden dann 100 µl von B mit 1 ml Reagenz A versetzt, gemischt, und in Einwegküvetten nach etwa 5 min (aber spätestens nach 1 Stunde) mit einem Einstrahl-Spektralphotometer (Modell U-1100; Hitachi, Tokyo, Japan) $E_{595}$ gegen Luft gemessen.

*Trübungsmessung bei Zellsuspensionen*

Mit Hilfe der $OD_{578}$-Trockenmasse Korrelation und der Faustregel, dass 50 % der Zelltrockenmasse aus Protein bestehen, konnte anhand der Messung der $OD_{578}$ einer Zellsuspension die Proteinkonzentration der Suspension abgeschätzt werden. Der gravimetrisch ermittelte Wert für die Umrechnung von $OD_{578}$ in Trockenmasse wurde Frings und Schink (1994) entnommen. Danach enthält eine 1-Liter-Kultur von LuPhet 1 mit einer $OD_{578}$ von 0,1 eine Zelltrockenmasse von 24,7 mg. Gemessen wurde die $OD_{578}$ mit einem Einstrahl-Spektralphotometer (Modell 100-40; Hitachi, Tokyo, Japan) gegen Wasser. Die Suspensionen wurden gegebenenfalls zuvor mit Wasser verdünnt.

Der Proteingehalt der Zellsuspension wurde auch für den daraus gewonnenen zellfreien Extrakt übernommen, unter der vereinfachenden Annahme, dass durch Aufschließen der Zellen und Abzentrifugieren von restlichen ganzen Zellen keine Verluste auftraten. Dies lieferte zumindest einen guten Richtwert, wobei der Proteingehalt auf diese Art tendenziell überschätzt wurde.

Von einigen Proben wurde die Proteinkonzentration sowohl colorimetrisch als auch anhand des $OD_{578}$-Werts der Zellsuspension ermittelt, dabei wurde festgestellt, dass die Werte ungefähr übereinstimmten. Bei Proben mit weniger Übereinstimmung gingen die Abweichungen in beide Richtungen, d. h. die colorimetrisch gemessenen Werte lagen mal über, mal unter den Werten, die über die Trübung der Suspension erhalten wurden.

Nach der anfänglichen Verwendung der colorimetrischen Methode wurde aufgrund dieser Erfahrung die Proteinkonzentration bald ausschließlich anhand der $OD_{578}$-Trockenmasse-Korrelation abgeschätzt.

*Proteinkonzentration zur Berechnung der spezifischen Aktivität*

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurden die Proteinkonzentrationen anhand der $OD_{578}$-Trockenmasse-Korrelation abgeschätzt, wobei der Wert der jeweiligen Suspension für den Extrakt übernommen wurde.

### 2.3.5 Zellsuspensionsversuche

#### *2.3.5.1 Allgemeines Vorgehen*

Die Versuche wurden unter striktem Ausschluss von molekularem Sauerstoff durchgeführt, in 5-ml-Hungate-Röhrchen, die mit Butylgummistopfen verschlossen waren. Die Gefäße wurden entweder in der Anaerobenkammer verschlossen oder außerhalb der Kammer durch mehrmaliges Evakuieren und Befüllen mit Stickstoff vorbereitet, dementsprechend bestand der Gasraum entweder aus der Atmosphäre der Anaerobenkammer $N_2/H_2$ (95 % / 5 %; v/v) oder aus Stickstoff. Außerhalb der Anaerobenkammer erfolgten die Zugaben mit Hilfe der Hungate-Technik durch gasdichte Spritzen (Unimetrics, Macherey & Nagel, Düren bzw. Hamilton, Bonaduz, Schweiz), zusätzlich waren die Spritzen davor mit Titancitrat-haltigem Puffer inkubiert worden, um Sauerstoff aus dem Teflonstempel zu entfernen. Zur Entnahme von Proben wurden ebenfalls gasdichte Spritzen verwendet, die mit Titancitrat-haltigem Puffer vorinkubiert worden waren.

Es wurden entweder frisch geerntete oder zuvor eingefrorene Zellen verwendet, die vor ihrer Ernte bereits seit mehreren Übertragungen mit dem angegebenen Substrat gewachsen waren. Die Zellen wurden einmal gewaschen und in Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5) mit 2,5 mM Titancitrat resuspendiert. Die Dichte der Zellsuspensionen entsprach Proteingehalten von 0,2 bis 1,8 mg/ml. Die Umsetzung wurde durch Zusetzen des Substrats gestartet (auf etwa 10 mM (9,5 mM bis 11,8 mM)). Soweit nichts anderes vermerkt wird, wurde der vollständige Ansatz bei 28°C inkubiert, in der Regel für 1-2 Stunden. Während der Inkubationszeit wurden etwa 10-12 Proben gezogen, eine davon vor dem Beginn der Umsetzung. Die Intervalle waren zunächst jeweils relativ klein und wurden im Laufe eines Versuchs größer. Es wurden jeweils 50 µl (bzw. 100 µl) entnommen und mit 200 µl (bzw. 400 µl) 0,1 M Phosphorsäure gemischt, um die Reaktionen abzustoppen, die angesäuerten Proben wurden eingefroren. Die darin enthaltenen Konzentrationen von Substrat und Produkten wurden mit Hilfe von HPLC ermittelt. Da die Probe vor Start der Umsetzung in keinem Versuch Phenol enthalten hatte, wurde in den Abbildungen zum Zeitpunkt Null jeweils eine Phenolkonzentration von null eingezeich-

net. Die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität wurde in Form der Phenolbildungs-Rate ermittelt, bei anderen Substraten wurden entsprechende Raten berechnet (jeweils explizit vermerkt). Durch eine einmalige Kontrolle mit hitzedenaturierter Zellsuspension wurde sichergestellt, dass die Phenoxyethanol-Spaltung von Proteinen katalysiert wurde.

#### *2.3.5.2 Wirkung von Acetaldehyd*

In einem Versuch wurden in den Testansätzen vor Beginn der Phenoxyethanol-Spaltung Acetaldehyd-Konzentrationen von 0,2 mM, 1,0 mM bzw. 3,2 mM eingestellt (Zugabe per Acetaldehyd-Stammlösungen). Die bis dahin gekühlten Ansätze wurden nach Aldehyd-Zusatz sogleich in ein 28°C Wasserbad gestellt, nach zwei Minuten wurde jeweils die erste Probe gezogen (als Werte vor Beginn der Phenoxyethanol-Spaltung). Die Spaltung von Phenoxyethanol wurde durch dessen Zugabe gestartet, 3 Minuten nachdem der Acetaldehyd den Zellextrakt-Ansätzen zugefügt worden war.

#### *2.3.5.3 Spezielles Vorgehen beim Umsatz von Lactat*

Bei einer Suspension von lactatgewachsenen Zellen (Proteingehalt während des Tests: 1,5 mg/ml, Proben à 100 µl zu 400 µl 0,1 M $H_3PO_4$) sowie einer Suspension von phenoxyethanolgewachsenen Zellen (Proteingehalt während des Tests: 0,23 mg/ml, Proben à 100 µl zu 250 µl 0,1 M $H_3PO_4$) wurde *D,L*-Lactat (9,7 mM) anstelle von Phenoxyethanol als Substrat zugesetzt. Als Puffer wurde Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0) mit 2,5 mM Titancitrat verwendet. In den Proben wurden die Konzentrationen von Lactat und Acetat bestimmt (durch HPLC). Zum Vergleich wurde parallelen Ansätzen jeweils das übliche Testsubstrat Phenoxyethanol zugegeben, um sicherzustellen, dass Phenoxyethanol von diesen Zellen zügig umgesetzt wird.

#### *2.3.5.4 Spezielles Vorgehen beim Umsatz von substituierten Phenoxyethanolen*

Mit diskontinuierlichen Zellsuspensionstests wurde auch untersucht, ob ganze Zellen die Substanz 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol ähnlich gut umsetzen können wie Phenoxyethanol oder PEG 300. Dafür wurde einer Suspension von PEG-300-gewachsenen Zellen sowie einer Suspension von phenoxyethanolgewachsenen Zellen im üblichen diskontinuierlichen Testansatz jeweils 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol als Substrat zugesetzt anstelle von Phenoxyethanol. Die Proben wurden per HPLC auf Abnahme von 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol und Zunahme von Produkten wie Phenol und Phenoxyethanol sowie Acetat analysiert. Parallele

Kontroll-Ansätze mit Phenoxyethanol bzw. PEG 300 als Substrat stellten sicher, dass diese jeweils abgebaut wurden, wobei in den PEG-300-Kontrollansätzen nur Acetat bestimmt wurde.
Gleichermaßen wurde im Versuch mit der Suspension von phenoxyethanolgewachsenen Zellen auch getestet, ob racemisches 2-Phenoxypropan-1-ol umgesetzt werden kann. In diesem Fall wurden die Konzentrationen von 2-Phenoxypropan-1-ol, Phenol und Propionat gemessen, wobei mit der gleichen Methode auch das Auftreten von Acetat oder Phenoxyethanol erfasst worden wäre.

#### *2.3.5.5 Vorgehen beim Umsatz von $^{2}$H- und $^{13}$C-markiertem Phenoxyethanol*

Eine Reihe von Versuchen wurde mit $^{2}$H- und $^{13}$C-markiertem Phenoxyethanol durchgeführt, mit dem Ziel, das Produkt Acetat zu isolieren und durch NMR-Aufnahmen zu analysieren. Die genaue Aufzeichnung des Reaktionsverlaufs war bei diesen Versuchen dagegen zweitrangig.
Die verschiedenen $^{2}$H- und $^{13}$C-markierten Phenoxyethanole wurden von Frau Dr. Giovanna Speranza und Mitarbeitern (Universität Mailand, Italien) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.
Hierfür wurden ausschließlich Zellen verwendet, die auf Phenoxyethanol gewachsen waren. Die frisch geernteten Zellen wurden nach Waschen mit Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, mit 2,5 mM Titancitrat) in der Anaerobenkammer mit sulfidreduziertem Medium ohne Substrat (0,5 oder 1 mM Sulfid, 30 mM Hydrogencarbonatpuffer) resuspendiert. Der zunächst Kohlendioxid-freie Gasraum des Serumfläschchens wurde ausgetauscht gegen $N_2/CO_2$ (80 % / 20 %; v/v). Die Dichte der Zellsuspensionen entsprach umgerechnet Proteinkonzentrationen von 0,1 bis 0,6 mg/ml. Das Substrat (teilweise bzw. vollständig markiert) wurde in der Anaerobenkammer zugegeben, es ergaben sich Phenoxyethanol-Konzentrationen von 9-17 mM. Die Suspension wurde jeweils bei 28°C inkubiert, vor Licht geschützt. Der Fortgang des Umsatzes wurde anhand von Stichproben verfolgt, darin wurde mit HPLC jeweils Phenol, Phenoxyethanol sowie Acetat quantifiziert. Es wurde dabei genauso verfahren wie es für den diskontinuierlichen Zellsuspensionstest beschrieben wurde. Die Umsetzung wurde möglichst bald nach vollständigem Verbrauch des Substrats, bzw. nach spätestens 28 Stunden (bei nicht-vollständigem Umsatz) beendet, indem die Zellen durch Zentrifugieren (11.000 × *g* für 30 min und bei 4°C ) und anschließendes Filtrieren (Cellulose-acetat-Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm) abgetrennt wurden. Der Überstand wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Mit 2-Phenoxy(1,1-$^2H_2$)ethanol wurde kein Zellsuspensionsversuch durchgeführt, stattdessen wurde das Isotopen-markierte Phenoxyethanol einer Kultur direkt als (einziges) Wachstumssubstrat ins Medium gegeben (4,2 mM Phenoxyethanol, die optische Dichte der Kultur nach Umsatz entsprach einem Proteingehalt von etwa 0,01 mg/ml). In diesem Fall wurde die Kultur mehrere Tage mit dem Substrat inkubiert. Danach wurden die Zellen abgetrennt und das während des Wachstums gebildete Acetat aus dem Überstand in derselben Weise aufgereinigt und analysiert wie bei den Zellsuspensionsversuchen.

Zur Aufreinigung des Acetats wurde der wässrige Überstand zunächst eingeengt und dann dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt um Phenol und restliches Phenoxyethanol zu entfernen, anschließend wurde durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure stark angesäuert (auf pH 1-2) und die Essigsäure mit Diethylether extrahiert (mindestens zweimal, jeweils mit $V_{Etherphase} = 5 \times V_{Wasserphase}$). Um die Phasentrennung zu verbessern wurde in der wässrigen Phase etwas NaCl gelöst. Diese organische Phase wurde bei Unterdruck auf ein paar Milliliter eingeengt und durch die Zugabe einer geeigneten Menge 2-molarer Natronlauge alkalisiert, schließlich gefriergetrocknet und durch $^1$H- und $^{13}$C-NMR-Aufnahmen analysiert.

### 2.3.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Enzymaktivitäten von Zellextrakt wurden entweder diskontinuierlich nach Trennung von Substrat und Produkten mittels HPLC oder spektralphotometrisch in kontinuierlichen Tests gemessen. Beide Tests wurden unter anoxischen Bedingungen durchgeführt.

#### *2.3.6.1 Diskontinuierlicher Test mit Zellextrakt*

In bestimmten Versuchen wurde die Phenoxyethanol-spaltende Enzymaktivität von zellfreiem Extrakt mit dem diskontinuierlichen Test gemessen, dieser wurde im Prinzip genauso durchgeführt wie für Zellsuspensionen beschrieben. Der Ansatz wurde jeweils in der Anaerobenkammer vorbereitet, der Gasraum bestand dementsprechend aus $N_2/H_2$ (95 % / 5 %; v/v). Weitere Zugaben und die Entnahme von Proben wurden am Arbeitsplatz mit gasdichten Spritzen durchgeführt. Für die Versuche waren eingefrorene mit Lactat gewachsene Zellen kurz vor dem Versuch aufgeschlossen worden. Der Reaktionsansatz enthielt in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5, mit 2,5 mM Titancitrat) zwischen 2 und 5 mg Protein pro ml (in Form von zellfreiem Zellextrakt) und etwa 10 mM Phenoxyethanol. Nach Start des Um-

satzes durch die Phenoxyethanol-Zugabe wurde der Ansatz bei 28°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, mit 0,1-molarer Phosphorsäure abgestoppt und bis zur Analyse eingefroren. Die Konzentrationen von Phenoxyethanol und Phenol darin wurden anhand von HPLC-Analyse quantifiziert.

#### *2.3.6.2 Kontinuierlicher Photometertest mit Zellextrakt*

##### 2.3.6.2.1 Phenoxyethanol-spaltende Aktivität

*Allgemeines*

Bei der Spaltung von Phenoxyethanol durch LuPhet 1 entsteht Acetaldehyd, deshalb konnte die Phenoxyethanol-Spaltung anhand der Aldehydbildung in einem kontinuierlichen Testverfahren quantifiziert werden. In der geschwindigkeitsbestimmenden Primärreaktion entsteht aus Phenoxyethanol Acetaldehyd, dieser wird sogleich durch NADH und Hefe-Alkoholdehydrogenase (werden dem Testansatz jeweils zugegeben) reduziert, dabei wird die Absorption bei 365 nm (NADH) aufgezeichnet. Als Maß für die Phenoxyethanol-Spaltung wird die Rate der NADH-Abnahme verwendet ($\varepsilon_{365}$ = 3,4 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$). Der Test wurde mit einer gegenüber Frings und Schink (1994) leicht veränderten Zusammensetzung durchgeführt. Die Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 700 µl normalerweise 30 U Hefe-Alkoholdehydrogenase (berechnet anhand der Herstellerangaben, die sich auf die Oxidation von Ethanol beziehen), 0,2 mM NADH, 3,5 mM Phenoxyethanol als Substrat sowie zellfreien Extrakt von lactatgewachsenen Zellen (in der Regel in einer Konzentration zwischen 36 und 260 µg Protein pro ml). Als Puffer wurde meist Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,5) mit 2,5 mM Titancitrat (d. h. 2,5 mM Ti(III) und 3,75-5 mM Citrat) verwendet, im Folgenden auch als Standardpuffer bezeichnet. Die Stammlösung des NADH (15 mM) wurde in Carbonatpuffer (100 mM, pH 10,6) angesetzt, sie konnte einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden. Die anderen Zusätze wurden jeweils in Wasser gelöst. Alle Lösungen wurden unter Sauerstoffausschluss hergestellt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen waren jeweils für den Test frisch aufgeschlossen und abzentrifugiert worden, der zellfreie Zellextrakt wurde portioniert und die einzelnen Portionen wurden gekühlt, in der Regel wurde nach der Entnahme von Zellextrakt für ca. 36 Küvetten eine neue Portion verwendet.

Der Test wurde wegen der Sauerstoff-Empfindlichkeit der Phenoxyethanol-Spaltung unter Luftausschluss durchgeführt. Dafür wurden Küvetten (aus optischem Spezialglas) mit Normschliff und Naturkautschukstopfen verwendet. Die Küvetten wurden in der Anaeroben-

kammer verschlossen, gegebenenfalls nach teilweiser Befüllung. Alternativ wurde aus den leeren, verschlossenen Küvetten Luftsauerstoff durch sechsmaliges Evakuieren (mit einer Wasserstrahlpumpe) und Befüllen mit $N_2$ entfernt. Außerhalb der Anaerobenkammer stattfindende Zugaben wurden sämtlich mit gasdichten Mikroliter-Spritzen vorgenommen. Diese Spritzen waren zuvor mit Puffer, der Titancitrat (2,5 mM) enthielt, gespült worden, um den restlichen im Teflonstempel gelösten Sauerstoff zu entfernen, bei Zellextrakt wurde die Spritze vor jeder Entnahme mit $N_2$ gespült. Meistens wurden die Küvetten in der Anaerobenkammer bis auf das Substrat komplett befüllt, einschließlich Zellextrakt; aus organisatorischen Gründen ergaben sich für diese fast fertig befüllten Küvetten bis zum Start von Reaktion und Messung Wartezeiten (unter Kühlen bei 4°C) von meistens ca. 30-60 min.
Der Umsatz wurde jeweils durch die Injektion des Substrats gestartet, dann wurde sofort die Absorption aufgezeichnet. Die eigentliche Aktivitätsmessung wurde bei 28°C durchgeführt. Mit Hilfe eines angeschlossenen Wasserbads wurde die Temperatur des Küvettenhalters konstant gehalten. Die Küvetten wurden erst kurz vor ihrer jeweiligen Messung von 4°C auf 28°C erwärmt. Zur Absorptionsmessung wurde ein Einstrahl-Spektralphotometer (Modell 100-40; Hitachi, Tokyo, Japan) verwendet. Die Extinktionsänderungen wurde von einem angeschlossenen SE-120-Metrawatt-Schreiber (ABB, Goerz, Österreich) aufgezeichnet.

Aktivitäten wurden stets aus der Anfangssteigung der $E_{365}$-Kurven ermittelt. Spezifische Aktivitäten beziehen sich immer auf Milligramm Zellextrakt-Protein. Von jeder Testmischung wurden normalerweise jeweils 3 Küvetten angesetzt und direkt nacheinander gemessen. Mit zunehmender Erfahrung wurde außerdem der im Laufe der Messung auftretende Rückgang der Aktivität anhand der regelmäßigen Messung von Standard-Ansätzen besser erfasst und berücksichtigt. Auch der Einfluss von Zusätzen wurde durch Vergleich mit Standard-Ansätzen beurteilt.

Das Funktionieren der enzymatischen Acetaldehyd-Reduktion wurde kontrolliert, indem Acetaldehyd (3,5 mM) zugegeben wurde, vor allem bei Ansätzen bei denen zuvor nach der Zugabe von Substrat keine Aktivität zu messen war.

*Varianten*

Neben dem Standardpuffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, mit 2,5 mM Titancitrat) wurden auch Varianten dieses Puffers verwendet (500 mM Kaliumphosphat statt 50 mM; pH 7,0 statt pH 7,5; 0,5 mM Titancitrat statt 2,5 mM; zusätzlich mit 0,5 M KCl; oder Kombinationen

davon). In speziellen Versuchen wurden verschiedene Titancitrat-Konzentrationen im Messpuffer (0 mM, 0,5 mM oder 2,5 mM) bzw. im Aufschlusspuffer (ca. 125 µM oder 2,5 mM) miteinander verglichen. In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, dass im Zellextrakt neben Titancitrat stets noch vom Kultivierungsmedium eingetragenes Eisensulfid enthalten war.

*Einsatz diverser Substanzen anstelle von Phenoxyethanol*

In einzelnen Versuchen wurden anstelle von Phenoxyethanol andere Substanzen als eventuelle Substrate zugegeben. Zum Teil wurde im Anschluss daran außerdem Phenoxyethanol zugegeben, Näheres wird jeweils im Ergebnisteil beschrieben.

Bei den Substanzen handelte es sich um *D,L*-Lactat, Polyethylenglycol 300, Tetraethylenglycol, Triethylenglycol (alle jeweils 3,5 mM) bzw. um 2-(Phenylsulfanyl)ethanol (1,7 mM), 2-(Ethylsulfanyl)ethanol (2,7 mM, 7 mM), 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol (2,9 mM, 7 mM), racemisches 2-Phenoxypropan-1-ol (3,5 mM); Stammlösungen jeweils in Wasser. Außerdem wurden Derivate von 2-Phenoxyethanol, die am Phenylring substituiert waren, eingesetzt, im Einzelnen waren das 2-(4-Bromphenoxy)ethanol, 2-(2-Methoxyphenoxy)ethanol, 2-(2,4,6-Trimethylphenoxy)ethanol bzw. 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol; Konzentration im Test jeweils 0,53 mM; Stammlösung in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5). Des weiteren wurde die Substanz 4-Ferrocenyl-butan-1,2-diol zugegeben (Konzentration der Substanz im Test 0,016 mM).

*Zusätze*

Von Coenzym $B_{12}$ (= 5′-Desoxyadenosylcobalamin) wurde eine wässrige Stammlösung (2 mM) unter Sauerstoffausschluss angesetzt, vor Licht geschützt (durch Alufolie) und kühl gelagert. Es wurde den Reaktionsansätzen in einer Konzentration von 57 µM zugesetzt.

Küvetten mit Coenzym $B_{12}$ wurden bis zur Messung ebenfalls möglichst gekühlt und vor Licht bewahrt.

In ein paar Fällen wurde das Coenzym $B_{12}$ injiziert, nachdem die Phenoxyethanol-Spaltung bereits begonnen hatte, aber noch innerhalb der ersten Minute seit Start und noch bevor das NADH verbraucht war. Die Absorption wurde sofort weiter aufgezeichnet. Der Verlauf der Aktivität wurde mit einem Ansatz ohne Coenzym $B_{12}$ verglichen. Des weiteren wurde Coenzym $B_{12}$ ein paar Ansätzen erst zugegeben, nachdem die Phenoxyethanol-Spaltung anscheinend beendet war.

Von Sulfid wurden mit anoxischem Wasser und unter Sauerstoffausschluss zwei Stammlösungen (1,4 mM und 70 mM) hergestellt.

Die Lösung von Dithionit war mit anoxischem Wasser und unter Sauerstoffausschluss vor Verwendung frisch hergestellt worden.

Die Toluolkonzentrationen von 10 µM, 100 µM bzw. 500 µM im Testansatz wurden mit Hilfe von Toluol-gesättigtem Wasser eingestellt, dabei wurde mit einer Löslichkeit von 5,6 mM Toluol in Wasser gerechnet.

*Prüfung der Sauerstoffempfindlichkeit*

Die Sauerstoffempfindlichkeit der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase in zellfreiem Extrakt wurde auf verschiedene Weisen überprüft.

Zum einen wurde zellfreier Extrakt (200 µl) (einschließlich 2,5 mM Titancitrat) in einem Luft-gefülltem 5-ml-Hungate-Röhrchen für 20-30 min inkubiert, das Röhrchen wurde dabei einige Male umgeschwenkt. Anschließend wurden Aliquote entnommen und im üblichen reduzierten Testansatz (mit 2,5 mM Titancitrat) auf Phenoxyethanol-spaltende Aktivität untersucht. Der Testansatz enthielt bereits das Substrat, bei diesen Messungen wurde der Extrakt zuletzt zugesetzt.

Zum anderen wurde Luft (einige Mikroliter) in Ansätze injiziert, die in jenem Moment gerade Phenoxyethanol spalteten. Die Ansätze enthielten entweder 2,5 mM Titancitrat oder nur Spuren von Titancitrat. Hierfür wurde Zellextrakt mit 2,5 mM Titancitrat bzw. Zellextrakt mit ca. 125 µM Titancitrat verwendet, dieser wurde in Messpuffer einschließlich 2,5 mM Titancitrat bzw. in Messpuffer ohne Titancitrat getestet.

*Vergleich der spezifischen Aktivität bei verschiedenen Proteinkonzentrationen*

In einem Versuch wurde die spezifische Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung in Abhängigkeit von der zugesetzten Proteinmenge bestimmt. Dafür wurden im Testansatz sechs verschiedene Proteinkonzentrationen eingestellt, von 0,014 bis 0,29 mg/ml. Vier der sechs Endkonzentrationen wurden außerdem auf jeweils zwei Weisen erreicht: einerseits mit einem vorverdünnten Zellextrakt, andererseits mit unverdünntem Zellextrakt. Zellfreier Extrakt war dafür in zwei Portionen aufgeteilt worden, eine enthielt 8 mg Protein pro ml, die andere wurde

daraus mit Titancitrat-haltigem Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 2,5 mM Titancitrat) auf 2 mg Protein pro ml verdünnt, beide Portionen wurden bis zur Verwendung gekühlt (für 4 Stunden bei 4°C).

*$K_m$-Wert-Bestimmung*

Bestimmungen des $K_m$-Wertes für Phenoxyethanol wurden mit zellfreiem Extrakt von lactat-gewachsenen Zellen durchgeführt.

Mit ZE-2 wurden pro Phenoxyethanol-Konzentration (0,8 – 1,5 – 3,7 mM) drei gleiche Ansätze gemessen. $K_m$ wurde aus den Durchschnittswerten nach der Methode von Hanes und Woolf ermittelt.

Mit ZE-1 wurden nacheinander drei unabhängige Bestimmungen durchgeführt. Bei den ersten beiden Bestimmungen wurden vier Phenoxyethanol-Konzentrationen eingestellt (0,7 – 1,4 – 3,57 – 7,1 mM), pro Substratkonzentration wurden drei Küvetten angesetzt. Für die dritte Bestimmung wurden nur drei Phenoxyethanol-Konzentrationen angesetzt (0,7 – 1,4 – 3,57 mM) und jeweils nur zwei Küvetten gemessen. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach Hanes und Woolf.

*Entsalzen des Zellextrakts*

Für einzelne Versuche wurden niedermolekulare Substanzen und Salze aus dem zellfreien Zellextrakt entfernt, durch eine Gelfiltration mit Sephadex G-25M (PD10-Säule von Pharmacia, Freiburg). Zur Vorbereitung war die Fertig-Säule bereits einige Tage vor ihrer Verwendung in die Anaerobenkammer eingeschleust worden. Dort wurde sie nach ein paar Tagen zunächst mit Titancitrat-haltigem Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 2,5 mM Titancitrat) inkubiert und schließlich mit frischem Titancitrat-haltigem Puffer äquilibriert. Der zellfreie Extrakt wurde in einem Volumen von 2,5 ml aufgetragen und anschließend mit 3,5 ml des Puffers wieder eluiert.

*Ganze Zellen anstelle von Zellextrakt*

Anstelle von zellfreiem Extrakt wurden in zwei Versuchen ganze Zellen zu Proteingehalten von 5 bis 100 µg/ml eingesetzt. Als alternative Substrate wurden auch Ethylenglycol, Propandiol bzw. Lactat (je 3,5 mM) zugegeben.

*HPLC-Analyse von Küvetteninhalt*

Bei wenigen Ansätzen wurden nach Vermessen im Photometer und anschließendem Inkubieren (gut 60 min bei Raumtemperatur) die Konzentrationen von Phenoxyethanol und Phenol durch HPLC quantifiziert.

2.3.6.2.2 Diol-Dehydratase-Aktivität

Für die Messung der Diol-Dehydratase-Aktivität wurde dasselbe gekoppelte Verfahren verwendet wie für die kontinuierliche Messung der Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität, anstelle von Phenoxyethanol wurden Ethylenglycol oder 1,2-Propandiol als Substrat (je 3,5 mM) eingesetzt. Manchmal war Coenzym $B_{12}$ (57 µM) enthalten. Der Umsatz wurde ebenfalls durch die Substratgabe gestartet.
Coenzym $B_{12}$ und Zellextrakt waren vor Start der Reaktion in der Regel mindestens 15 min meist sogar mehr als 30 min in Kontakt miteinander (bei 4°C). Nur in wenigen Versuchen (jeweils mit Standardpuffer) wurde diese Kontaktzeit unterschritten, dort fand die Dehydratisierung aber gleichfalls statt, und zwar mit konstanter Aktivität ohne Steigerung.

## 2.4 Analytische Methoden

### 2.4.1 Geruchsprüfung

Manchmal konnte bereits eine Geruchsprüfung wichtige Hinweise liefern, denn in Gegenwart von Sulfid-haltigem Medium ließ Acetaldehyd einen intensiven und unangenehmen Geruch entstehen, er erinnerte an brennenden Gummi oder heißen Asphalt.

### 2.4.2 Spektralphotometrie

UV/VIS-Spektren wurden mit dem Zweistrahlphotometer Uvikon 860 (Kontron, Zürich, Schweiz) aufgenommen. Dabei wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm aus optischem Spezialglas oder Quarzglas verwendet, je nach Wellenlängenbereich.

### 2.4.3 Analytische Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem (Sammelgel pH 6,8 und Trenngel pH 8,8) durchgeführt, Gel- und Elektrodenpuffer enthielten 0,1 % SDS. Es wurde eine Mini-Protean-II-Anlage benutzt, Format 7,3 cm × 8 cm × 0,75 mm (Bio-Rad, München). Die Polyacrylamidgele (10 % bzw. 5-20 % Polyacrylamid) wurden jeweils selbst gegossen, die Lösungen wurden aus Stammlösungen stets frisch angesetzt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, zur Ausbildung einer geraden Gel-Oberkante wurde es mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Vor dem Lauf, nach mindestens einer Stunde Polymerisation, wurde das Butanol entfernt und das Sammelgel (4 % Polyacrylamid) gegossen (auch auf das Gradientengel), in das während der Polymerisation (1/2 Stunde) ein Kamm zur Aussparung der Probentaschen (à 20 µl) eingesetzt war.
Zur Kalibrierung wurden zwei Proteinmischungen von Pharmacia (Freiburg) verwendet. Der *Low Molecular Weight Kit*, in den Gel-Abbildungen bezeichnet mit Standards I, bestand aus Phosphorylase b ($M_r$ 94.000), Albumin ($M_r$ 67.000), Ovalbumin ($M_r$ 43.000), Carboanhydrase ($M_r$ 30.000), Trypsin-Inhibitor ($M_r$ 20.100) und α–Lactalbumin ($M_r$ 14.400). Der *High Molecular Weight Kit*, bezeichnet mit Standards II, enthielt Thyroglobulin ($M_r$ 330.000), Albumin ($M_r$ 67.000), Catalase ($M_r$ 60.000), Lactatdehydrogenase ($M_r$ 36.000) und Ferritin ($M_r$ 18.500 bzw. $M_r$ 220.000). Die Zahlen in den Klammern geben die Molmassen der Untereinheiten an.
Die Proben (Zellextrakte oder Marker-Kits) wurden mindestens 1:2 mit dem denaturierenden Probenpuffer (3,6 % SDS, 90 µl β-Mercaptoethanol pro ml, 114 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,045 % Bromphenolblau und 27 % Glycerin) verdünnt und 4 Minuten auf 95°C erhitzt, anschließend wurden sie zentrifugiert. Sie wurden entweder direkt verwendet oder eingefroren. Die aufgetragene Proteinmenge lag bei den Zellextrakten bei ca. 20 µg pro Spur, bei den Marker-Proteinmischungen bei ca. 12-19 µg pro Spur.
Beim 10 %-Gel wurde zu Beginn eine Spannung von 30 Volt angelegt, die Stromstärke lag bei ca. 5-10 mA, später wurde die Spannung auf 50 Volt erhöht. Beim Gradientengel wurde vor Probenauftrag zunächst für ca. 40 min eine Spannung von 30 Volt angelegt. Nach dieser Vorelektrophorese wurden die Proben aufgegeben und 30 Volt angelegt, später wurde auf 45 Volt erhöht, der Stromfluss war kleiner als 5 mA. Der Lauf wurde erst einige Zeit nach Austreten der Lauffront aus dem Gel beendet.
Gefärbt wurden die Gele mit Coomassie Blau nach der Kolloidalfärbemethode von Neuhoff et al. (1988). Die Farbstoff-Stammlösung hatte folgende Zusammensetzung: 0,1 % (w/v) Serva

Blau G, 2 % (w/v) Phosphorsäure, 10 % (w/v) Ammoniumsulfat, diese Suspension wurde nicht filtriert sondern vor Gebrauch nur geschüttelt. Aus dieser Farbstoff-Stammlösung wurde die Färbelösung (80 % (v/v) Farbstoff-Stammlösung und 20 % (v/v) Methanol) vor Verwendung frisch angesetzt. In ihr wurden die Gele mindestens über Nacht, gelegentlich aber auch mehrere Tage geschwenkt. Danach wurden die gefärbten Gele maximal 1 min in 25 % (v/v) Methanol gewaschen und dann in 25 % (w/v) Ammoniumsulfatlösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.
Die molekulare Massen der Proteine wurden anhand einer Eichkurve bestimmt, bei der die relative Beweglichkeit der Standard-Proteine im Gel ($R_f$) gegen den Logarithmus ihrer Molekularmassen aufgetragen wurde. Die $R_f$-Werte wurden ermittelt, indem die Bromphenollinie als Lauffront gewertet wurde, beim Gradientengel wurde hierfür stattdessen die Gellänge herangezogen, da dort die Lauffront bereits aus dem Gel ausgetreten war.

### 2.4.4 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die verwendete HPLC-Anlage System Gold® (Beckman Coulter, München) bestand aus zwei Hochdruck-Pumpen, Modell 116 bzw. 126 und einem UV/VIS-Detektor Modell 166 bzw. 168. Die Proben wurden über einen automatischen Probengeber (Beckman Autosampler Modell 502 oder Abimed-Gilson Modell 234, Langenfeld, Deutschland) aufgegeben. Die Auswertung der Chromatogramme und UV/VIS-Absorptionsspektren erfolgte durch die Software des System Gold®, Version 3.1. Eluierende Verbindungen wurden durch Vergleich mit externen Standards identifiziert und über die *Peak*-Flächen quantifiziert.

Die phenolischen Verbindungen sowie die organischen Säuren Acetat, Propionat und Lactat konnten jeweils im selben Lauf quantifiziert werden, bei Auftrennung über eine *reversed phase* Säule AQ-ODS (4,6 mm × 250 mm) von YMC Europe (Schermbeck, Deutschland) mit einem Gradienten aus Ammoniumphosphatpuffer (100 mM, pH 2,6) und Methanol. Zu Beginn des Laufs wurde jeweils isokratisch mit 5 % Methanol eluiert, dann wurde der Anteil der organischen Phase kontinuierlich auf 60 % erhöht. Die eluierenden Substanzen wurden bei zwei Wellenlängen gleichzeitig detektiert, die phenolischen Verbindungen mit hoher Empfindlichkeit bei 254 nm und die Fettsäuren mit geringerer Empfindlichkeit bei 206 nm.
Die Proben wurden vor der Messung zentrifugiert um Zellen und Partikel zu entfernen.
Im Gegensatz zu den Proben waren die Standards zuvor nicht angesäuert worden. Von Acetat wurden Standards mit 5 mM und 10 mM, von Phenoxyethanol und Phenol jeweils mit den

drei Konzentrationen 0,1 mM, 0,2 mM und 1 mM gemessen. Gegebenenfalls wurden als weitere Standards 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol (0,2 mM und 1 mM; oder 2 mM und 10 mM) oder 2-Phenoxypropan-1-ol (0,1 mM und 0,5 mM) und Propionat (5 mM) analysiert. Bei anderen Fragestellungen wurden zusätzlich Lactat-Standards gemessen (5 mM und 10 mM). Für die Quantifizierung von 3,4,5-Trimethoxybenzoat und Gallat in Kulturüberständen wurde jeweils nur ein Standard analysiert, 0,1 mM 3,4,5-Trimethoxybenzoat und 1 mM Gallat, außerdem wurden hierfür Syringat-, 5-Hydroxyvanillat- und Pyrogallol-Standards gemessen.

Unter den beschriebenen Bedingungen wiesen die einzelnen Substanzen die in Klammern genannten ungefähren Retentionszeiten auf: Lactat (4,5 min), Acetat (4,8 min), Propionat (8,5 min), Pyrogallol (7,9 min), Gallat (9,5 min), 5-Hydroxyvanillat (11,1 min), Syringat (12,0 min), 3,4,5-Trimethoxybenzoat (13,5 min), Phenol (12,4 min), 2-Phenoxyethanol (13,2 min), 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol (13,8 min) und 2-Phenoxypropan-1-ol (14,1 min).

### 2.4.5 Kernresonanz-Spektren

Die Aufnahme der NMR-Spektren ($^{1}$H- sowie $^{13}$C-NMR) und deren Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Giovanna Speranza und Mitarbeiter (Universität Mailand). Das detaillierte Vorgehen wurde in den Artikeln Speranza et al., 2002 und Speranza et al., 2003 beschrieben. $^{13}$C-NMR-Spektren waren stets Protonen-entkoppelt, die Signal-Multiplizitäten basierten auf APT-Spektren (*attached proton test)*. Die Quantifizierung der einzelnen Isotopomere des Acetats beruhte auf Messungen der Peakflächen in $^{1}$H- und $^{13}$C-NMR-Spektren, wobei $^{13}$C-NMR-Spektren für diesen Zweck mit Hilfe des sogenannten *inverse gated decoupling* aufgenommen wurden (Kalinowski et al., 1988).

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Wachstum von Stamm LuPhet 1

Es war bekannt, dass *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 auf relativ vielen verschiedenen Substraten wachsen konnte (Frings und Schink, 1994).

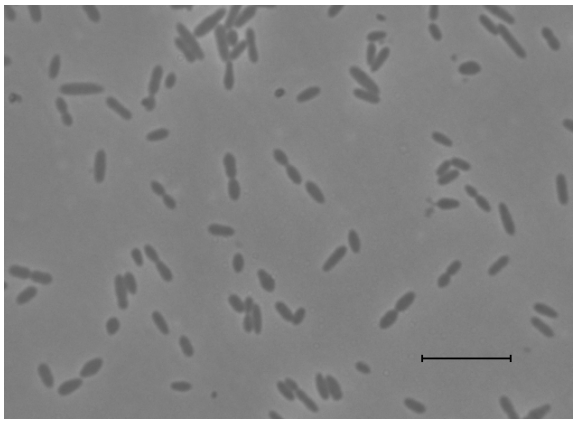


**Abb. 3.1**: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von Zellen von *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 nach Wachstum auf 10 mM Phenoxyethanol. Die Balkenlänge entspricht 10 µm.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit ergaben zudem, dass außer Polyethylenglycol mit einer durchschnittlichen Molmasse von 200 g/mol (PEG 200, etwa 4 Ethylenglycol-Einheiten pro Molekül) auch PEG 300 (durchschnittlich 6-7 Ethylenglycol-Einheiten pro Molekül) als Wachstumssubstrat geeignet war. Außerdem wurde nicht nur *L*-Lactat sondern auch *D*-Lactat vollständig verwertet, wie der mit dem Racemat erhaltene Zellertrag zeigte, siehe Tabelle 1. Lactat wurde deshalb in sämtlichen Versuchen als Racemat eingesetzt.

Mit 2-Phenoxyethanol als Substrat wuchs Stamm LuPhet 1 bis zu einer $OD_{578}$ von ungefähr 0,14. Für ein möglichst sicheres Anwachsen musste mit 10 % des Volumens angeimpft werden. Die Verdoppelungszeit lag bei ungefähr 7,5 Stunden. 10 mM Phenoxyethanol ergab einen $OD_{578}$-Zuwachs von 0,1, das entsprach einem molaren Zellertrag von 2,5 g Zelltrockenmasse pro mol.

Aus ungeklärter Ursache konnten mit Phenoxyethanol keine hohen Zelldichten erzielt werden, auch nicht bei Zufügen des Substrats in kleinen Portionen. Wegen des großen Volumens, mit dem die Kulturen angeimpft wurden, fanden vor der Übertragung bzw. Ernte nur wenige Verdoppelungen statt. Die unterschiedlich langen *lag*-Phasen zusammen mit der im Vergleich dazu kurzen Wachstumsphase machten es schwierig, den richtigen Erntezeitpunkt vorauszusagen. Die Bereitstellung von frischen mit Phenoxyethanol angezogenem

Zellen in ausreichender Menge war deshalb nicht einfach. Mit PEG 300 wuchs Stamm LuPhet 1 ebenfalls nicht sehr zuverlässig, auch hier blieben die Zelldichten meist niedrig. *D,L*-Lactat hingegen führte zu relativ zuverlässig wachsenden Kulturen. Meistens wurde eine $OD_{578}$ von ca. 0,5 erreicht. Auch ließen sich die Zellen damit gut im 10-Liter-Ansatz kultivieren. Da Zellen, die auf *D,L*-Lactat gewachsen waren, die Phenoxyethanol-Spaltung ebenso gut katalysierten wie Zellen, die auf Phenoxyethanol gewachsen waren, wurde für die Anzucht von Zellmaterial zumeist Lactat eingesetzt. So konnten auch mehrere Versuche mit demselben Zellmaterial durchgeführt werden. Die Wachstumskurve einer 10-Liter-Kultur auf *D,L*-Lactat ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

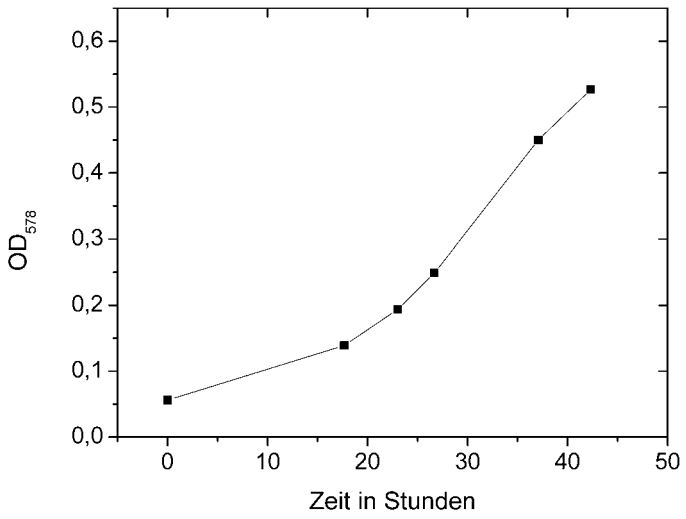



**Abb. 3.2**: Wachstumskurve von Stamm LuPhet 1 auf D,L-Lactat (50 mM).

Die Verdoppelungszeiten mit den Substraten Phenoxyethanol, PEG 300, Ethylenglycol, Glycerin, Lactat bzw. Fructose lagen gewöhnlich im Rahmen von 4,6 bis 12 Stunden, häufig zwischen 7 und 10 Stunden. Mit Fructose wuchs Stamm LuPhet 1 dabei etwas schneller als mit Phenoxyethanol, mit Glycerin tendenziell etwas langsamer. Die Wachstumsraten jedes einzelnen Substrats variierten aber sehr deutlich. In den 10-Liter-Kulturen auf Lactat, bei denen die gesamte Substratmenge bereits zu Beginn zugesetzt wurde und die während des Wachsens nur sporadisch zum Zweck der OD-Messung gerührt wurden, war die Verdoppelungszeit mit ca. 11 Stunden etwas länger.

Lag-Phasen traten seltener auf, wenn zusätzlich zur Verwendung eines hohen Animpfvolumens (5-10 %), das Medium auf 28°C vorgewärmt und mit einer Kultur angeimpft wurde, die

sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befand oder die man in der logarithmischen Wachstumsphase auf Raumtemperatur (ca. 20°C) abkühlen ließ und bis zum Animpfen bei Raumtemperatur aufbewahrte.

In bezug auf die erreichbare Zelldichte ragte Fructose aus den getesteten Substraten (2-Phenoxyethanol, PEG 300, Ethylenglycol, Glycerin, Lactat, Fructose, 3,4,5-Trimethoxybenzoat, $H_2/CO_2$) heraus: damit konnte sogar eine $OD_{578}$ von 1 erhalten werden.

Einige Näherungswerte für molare Zellerträge aus verschiedenen Substraten sind in Tabelle 1 angegeben. Die Zahlen wurden erhalten, indem die gemessene $OD_{578}$ der Kultur in Zelltrockenmasse umgerechnet und auf die jeweils maximal zur Verfügung stehende Substratkonzentration bezogen wurde. Allerdings wurde die Restkonzentration des Substrats dabei nicht bestimmt.

**Tab. 1**: Näherungswerte für molare Zellerträge von Stamm LuPhet 1 bei Wachstum auf verschiedenen Substraten im Vergleich zu einigen von Frings und Schink (1994) ermittelten Erträgen. Abgeschätzt wurden die Werte aus der Optischen Dichte mit Hilfe des Umrechnungsverhältnisses, wonach 24,7 mg Trockenmasse pro Liter einer $OD_{578}$ von 0,1 entsprechen (Frings und Schink, 1994).

| Wachstumssubstrat | abgeschätzte Wachstumserträge [g Trockenmasse/mol] | Wachstumserträge laut Frings und Schink (1994) [g Trockenmasse/mol] |
|---|---|---|
| Phenoxyethanol | ≥ 2,5 | 2,6 |
| PEG 300 | ≥ 2,0 | 5,5 (für Diethylenglycol) |
| Ethylenglycol | ≥ 3,1 | |
| Glycerin | ≥ 5,6 | |
| *D,L*-Lactat | ≥ 3,9 | 4,3 (für *L*-Lactat) |
| Fructose | ≥ 13,7 | 13,0 |

## 3.2 Diol-Dehydratisierung durch Stamm LuPhet 1

Im zellfreien Extrakt von Zellen des Stammes LuPhet 1, die auf Phenoxyethanol gewachsen waren, hatten Frings und Schink (1994) für die Dehydratisierung von Ethylenglycol bei Coenzym-$B_{12}$-Zusatz eine Aktivität von 0,94 U/mg Protein ermittelt (in Kaliumphosphat-puffer (0,5 M, pH 8,0) mit 2,5 mM Titancitrat).

Die Eigenschaften dieser Diol-Dehydratase-Aktivität waren nicht eigentliches Thema der vorliegenden Arbeit, aber in manchen Versuchen wurde außer der Phenoxyethanol-Spaltung auch die Dehydratisierung von Ethylenglycol bzw. 1,2-Propandiol gemessen, vor allem um die Unterschiede zwischen Diol-Dehydratase und Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase herauszustellen.

Mit Hilfe eines Tests, bei dem entstehender Aldehyd mit zugesetztem NADH reduziert wird, wurden für die Dehydratisierung von Ethylenglycol durch intakte Zellen von Stamm LuPhet 1 NADH-Oxidationsraten von 0,30 U/mg Protein erhalten, bzw. von 0,96 U/mg Protein für die Dehydratisierung von Propandiol. Diese Werte sind dabei nur als Näherung zu verstehen, denn möglicherweise wurde ein Teil des durch die Dehydratisierung gebildeten Aldehyds bereits intrazellulär oxidiert, bevor er die Zelle verlassen und nachgewiesen werden konnte. Die Zellen waren auf Lactat gewachsen, folglich besaßen Zellen auch nach Wachstum auf Lactat eine Diol-Dehydratase, und vermutlich in ähnlicher Menge wie Zellen nach Wachstum auf Phenoxyethanol, zumindest legte die Größenordnung der Diol-Dehydratase-Aktivitäten das nahe.

Alle folgenden Daten stammen aus Versuchen mit zellfreiem Extrakt, der aus lactatgewachsenen Zellen hergestellt wurde; wenn die Zellen mit einem anderen Substrat kultiviert wurden, wird dies explizit angegeben. Gestartet wurde die Reaktion mit der Zugabe des Substrats, teilweise war zusätzlich Coenzym $B_{12}$ (57 µM) enthalten.

### 3.2.1 Verhältnis der Aktivitäten mit Propandiol bzw. Ethylenglycol

Die Rate der Dehydratisierung von 1,2-Propandiol war immer höher als die Rate der Dehydratisierung von Ethylenglycol, Abbildungen 3.3 bis 3.5. Das galt sowohl für intakte Zellen

als auch für Zellextrakt. Das Verhältnis der beiden Aktivitäten lag meist zwischen 2 und 3, es gab aber gewisse Schwankungen (Tabelle 2).

**Tab. 2**: Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der Diol-Dehydratisierung mit den Substraten 1,2-Propandiol bzw. Ethylenglycol, ohne Zusatz von Coenzym $B_{12}$ gemessen.

| | Spez. Akt. (mit Propandiol) / Spez. Akt. (mit Ethylenglycol) |
|---|---|
| ganze Zellen lactatgewachsen | **3,2** (n=1) |
| Zellextrakt aus lactatgewachsenen Zellen | **1,8 - 3,3** |
| Zellextrakt aus ethylenglycolgewachsenen Zellen | **2,2** (n=1) |

### 3.2.2 Einfluss von Coenzym $B_{12}$

Mit beiden Substraten war die Aktivität deutlich höher, wenn Coenzym $B_{12}$ (57 µM) zugesetzt wurde, im Vergleich zu Ansätzen, bei denen darauf verzichtet wurde. Die Aktivität wurde durch Coenzym $B_{12}$ immer mindestens verdoppelt, oft war der Zusatz von Coenzym $B_{12}$ notwendig, damit überhaupt Umsatz stattfand, siehe Abbildungen 3.3 bis 3.5 sowie Tabelle 3.

Bei einer Kaliumkonzentrationen von 50 mM war schon nach einer Kontaktzeit von einer Minute zwischen Coenzym $B_{12}$ und mit Zellextrakt (verdünnt im Puffer) eine förderliche Wirkung des Coenzyms $B_{12}$ zu sehen. Auch nach Kontaktzeiten von mehr als einer Stunde wirkte der Zusatz von Coenzym $B_{12}$ aktivitätssteigernd auf die Dehydratisierung. Das Verhältnis der Aktivität mit Propandiol zu jener mit Ethylenglycol blieb im zuvor genannten Rahmen, unabhängig davon ob beide jeweils mit oder ohne Zusatz von Coenzym $B_{12}$ gemessen wurden.

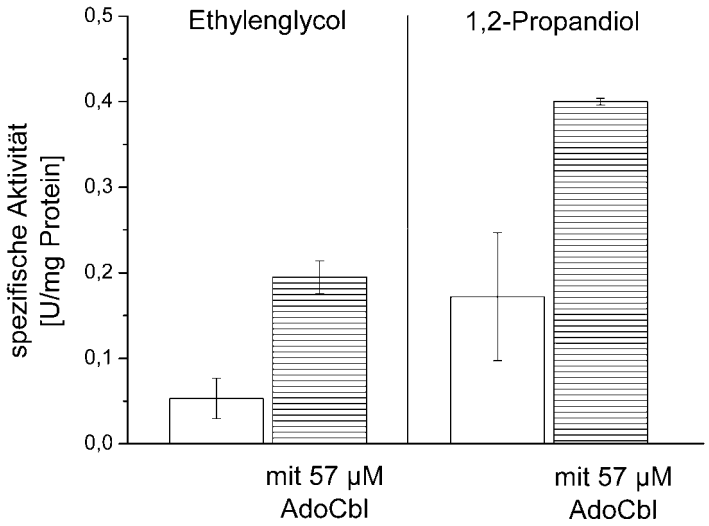



**Abb. 3.3**: Diol-Dehydratase-Aktivität von zellfreiem Extrakt mit Ethylenglycol bzw. 1,2-Propandiol als Substrat sowie der Einfluss von Coenzym $B_{12}$ (57 µM) darauf. Als Messpuffer wurde Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,5) mit 0,5 mM Titancitrat verwendet.

### 3.2.3 Einfluss von Titancitrat

In Tabelle 3 ist zu sehen, dass sich die Präsenz von Titancitrat (2,5 mM Ti(III)) negativ auf die unter Zusatz von Coenzym $B_{12}$ gemessene Propandiol-Dehydratisierung auswirkte, im Ti(III)-freien Messpuffer war die Aktivität um fast 50 % höher. Spektren von Coenzym $B_{12}$ (70 µM) in Puffer mit Titancitrat (2,5 mM Ti(III)) hatten gezeigt, dass eine solche Lösung Anteile von Cob(II)alamin- und Cob(I)alamin-Spezies enthielt. Diese entstanden vermutlich durch reduktive Spaltung von Coenzym $B_{12}$ durch Ti(III).

**Tab. 3**: Einfluss von Titancitrat bei Gegenwart von Coenzym $B_{12}$ (57 µM) auf die Propandiol-Dehydratisierung durch zellfreien Extrakt. Als Puffer (50 mM, pH 7,5) diente Kaliumphosphat mit 0,5 M KCl.

| | Spez. Aktivität der Dehydratisierung von Propandiol [U/mg Protein] | |
|---|---|---|
| | in Puffer ohne Titancitrat | in Puffer mit Titancitrat (2,5 mM Ti(III)) |
| ohne Coenzym $B_{12}$ | **0,004** | **0,004** |
| bei Zusatz von Coenzym $B_{12}$ (57 µM) | **0,43** | **0,29** |

### 3.2.4 Einfluss des Wachstumssubstrats

Als Zusammenfassung der verschiedenen Versuche mit Extrakt von lactatgewachsenen Zellen, zeigt Tabelle 4 die Bereiche der gemessenen spezifischen Aktivitäten der Diol-Dehydratase.

**Tab. 4**: Spezifische Aktivitäten der Diol-Dehydratase mit Ethylenglycol bzw. mit Propandiol in Extrakt von lactatgewachsenen Zellen.

| | Spez. Aktivität der Dehydratisierung [U/mg Protein] | |
|---|---|---|
| | von Ethylenglycol | von Propandiol |
| ohne Coenzym $B_{12}$ | **0 - 0,1** | **0 - 0,2** |
| bei Zusatz von Coenzym $B_{12}$ (57 µM) | **0,1 - 0,2** | **0,2 - 0,6** |

Im Rohextrakt von Zellen, die auf Ethylenglycol gewachsen waren, wurden deutlich höhere Aktivitäten mit Ethylenglycol (0,5 U/mg Protein) und Propandiol (1,1 U/mg Protein) erhalten, als in Extrakten nach Wachstum auf Lactat. Diese Werte waren jeweils ohne Coenzym-$B_{12}$-Zusatz gemessen worden.

### 3.2.5 Anzahl der Diol-Dehydratasen

Zu Beginn dieser Arbeit war völlig offen, ob es verschiedene Diol-Dehydratase-Enzyme für den Umsatz von Ethylenglycol und 1,2-Propandiol in Zellen des Stammes LuPhet 1 gab.
Im Laufe der Untersuchungen wurden diesbezüglich die folgenden Beobachtungen gemacht: Wurde keine Aktivität mit Propandiol gemessen, so war dies auch nicht mit Ethylenglycol möglich. Wurde Ethylenglycol umgesetzt, so wurde auch Propandiol umgesetzt. Bei beiden Substraten ließ sich die Aktivität von Zellextrakt durch Coenzym $B_{12}$ stimulieren, manchmal war dieser Zusatz für die Umsetzung sogar essentiell. Das Verhältnis der Aktivität mit Ethylenglycol zur Aktivität mit Propandiol war etwa konstant und unabhängig davon, ob Ethylenglycol oder Lactat als Wachstumssubstrat verwendet worden waren (siehe Tab. 2).

Ein Experiment mit zellfreiem Extrakt, bei dem Ethylenglycol und Propandiol zusammen eingesetzt wurden, gab weitere Hinweise (Tab. 5).

**Tab. 5**: Diol-Dehydratase-Aktivitäten von zellfreiem Extrakt in Gegenwart eines zweiten Diol-Substrats im Vergleich zur Aktivität bei Gegenwart nur eines Substrats.

| Spez. Aktivität (bei Zusatz von Coenzym $B_{12}$ (57 µM)) [U/mg Protein] | | | Akt. mit Propandiol / Akt. mit Ethylenglycol |
|---|---|---|---|
| Zusatz von zwei Diol-Substraten (nacheinander): | | | |
| I | erst Ethylenglycol: **0,16** | Gesamtwert nach Propandiol-Gabe: **0,37** | (0,37-0,16) / 0,16 = **1,3** ** |
| II* | erst Ethylenglycol: **0,19** | Gesamtwert nach Propandiol-Gabe: **0,38** | (0,38-0,19) / 0,19 = **1** ** |
| Zusatz von nur einem Diol-Substrat: | | | |
| III | nur Ethylenglycol als Substrat: **0,18** | | 0,44 / 0,18 = **2,4** |
| IV | | nur Propandiol als Substrat: **0,44** | |

* dieser Ansatz wurde auch per HPLC analysiert
** Theoretisches Verhältnis, wenn es völlig unabhängige Teilaktivitäten wären

Die Gesamtaktivität nach der sukzessiven Zugabe beider Substrate war jeweils kleiner als die Aktivität eines ausschließlich Propandiol-umsetzenden Ansatzes. Nach Zugabe von Propandiol zu einem Ansatz, der bereits Ethylenglycol dehydratisierte, verdoppelte sich die Rate der NADH-Oxidation (siehe II in Tabelle 5). Die Reaktion wurde nach 63 min abgestoppt und die Zusammensetzung durch HPLC-Messung analysiert. Es sollte ermittelt werden, welcher Anteil der Gesamt-Dehydratisierungsrate den einzelnen Substraten jeweils zuzuschreiben war. Das Verhältnis der theoretischen Umsätze unter Annahme einer Unabhängigkeit der beiden Raten betrug ca. 1. Die HPLC-Messung ergab jedoch, dass während der Inkubationszeit die Konzentration des Ethylenglycols um 0,29 mM und die Konzentration des 1,2-Propandiols um 0,79 mM abnahm, was einem Verhältnis der Einzelraten von 3,2 entsprach (ab der 5. Minute).

Die Abnahme der Konzentration des Ethylenglycol um insgesamt 0,29 mM belegte, dass noch nach 4,3 min, dem Zeitpunkt der Zugabe des zweiten Substrates, Umsatz von Ethylenglycol stattgefunden hatte, beide Substrate waren also parallel umgesetzt worden. Nach dem Propandiol-Zusatz musste sich die Rate des Ethylenglycol-Umsatzes aber verringert haben, da nur 0,29 mM Ethylenglycol und nicht 0,68 mM verbraucht wurden, wie es dem ungebremsten Umsatz entsprochen hätte (d. h. 63 min mit 0,19 U/mg Protein). Propandiol wurde bei Anwesenheit von Ethylenglycol schneller dehydratisiert als Ethylenglycol, aber dennoch langsamer als im ausschließlich Propandiol-enthaltenden Ansatz. Die Raten des Umsatzes der beiden Diol-Substrate waren somit nicht unabhängig voneinander, sondern verringerten sich bei Gegenwart des jeweils anderen Substrats.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der gegenseitigen Abhängigkeit der Raten wäre, dass für jedes Substrat eine spezifische Diol-Dehydratase vorhanden wäre, die jeweils durch das andere Substrat gehemmt würde. Eine andere Erklärung wäre, dass beide Substrate durch dieselbe Diol-Dehydratase umgesetzt werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der Einfachheit halber von „der einen“ Diol-Dehydratase in Stamm LuPhet 1 gesprochen, wenn auch nicht endgültig geklärt werden konnte, ob nur eine einzige Diol-Dehydratase exprimiert wird oder zwei ähnliche Diol-Dehydratase-Enzyme gemeinsam exprimiert werden.

In diesem Zusammenhang soll noch angemerkt werden, dass die Gegenwart von Phenoxyethanol keine Hemmung der Diol-Dehydratisierung verursachte, wie später in Abschnitt 3.3.4.5 gezeigt wird.

### 3.2.6 Zeitlicher Verlauf der Diol-Dehydratase-Aktivität

Die NADH-Oxidation im Zuge der Dehydratisierung von Ethylenglycol oder Propandiol durch zellfreien Extrakt verlief im Prinzip mit konstanter Rate und dauerte viele Minuten an, im Gegensatz zum zeitlichen Verlauf und zur Dauer der NADH-Oxidation bei der Spaltung von Phenoxyethanol (siehe Abschnitt 3.3.3). Manche Ansätze wiesen nach dem Start durch die Substratzugabe allerdings eine Phase auf, in der die Rate der NADH-Oxidation zunächst noch zunahm bevor sie linear wurde, diese soll im Folgenden als Steigerungsphase bezeichnet werden.

### 3.2.7 Einfluss der Kaliumkonzentration

Die gut untersuchte Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase z. B. aus *Klebsiella oxytoca* enthält als Cofaktor ein Kaliumion (Lee und Abeles, 1963; Toraya et al., 1971; Shibata et al., 1999). Für die Diol-Dehydratase-Aktivität aus *Pelobacter venetianus* war als optimale Kaliumchlorid-Konzentration eine Konzentration von 1 M ermittelt worden (Frings et al., 1992). In allen Versuchen der vorliegenden Arbeit zur Diol-Dehydratisierung waren Kaliumionen in Form des Kaliumphosphatpuffers (50 mM) enthalten (→ „niedrige“ $K^+$-Konzentration). In manchen Versuchen wurde die $K^+$-Konzentration darüber hinaus durch den Zusatz von 0,5 M Kaliumchlorid erhöht (→ „hohe“ $K^+$-Konzentration).

Der Einfluss von $K^+$ war nicht einheitlich, sondern hing von der Coenzym-$B_{12}$-Präsenz und dem Substrat ab (Abb. 3.4 und 3.5). Die größte Aktivität mit Propandiol wurde gemessen, wenn bei Zusatz von Coenzym $B_{12}$ (57 µM) auch eine hohe $K^+$-Konzentration herrschte, bei Coenzym-$B_{12}$-Zusatz und niedriger $K^+$-Konzentration wurden kleinere Aktivitäten erhalten.
Ohne den gleichzeitigen Zusatz von Coenzym $B_{12}$ hatte eine hohe Konzentration von $K^+$ dagegen keine positive Wirkung, im Gegenteil, im Vergleich zu den Ansätzen mit der niedrigen $K^+$-Konzentration war meistens eine Verringerung der Aktivität die Folge.

Hauptsächlich bei hoher Kaliumionenkonzentration wiesen die Aktivitätsverläufe Steigerungsphasen auf. Beispielsweise waren in einem Versuch in den Coenzym-$B_{12}$-haltigen Ansätzen bei einer $K^+$-Konzentration von 50 mM die Aktivitäten von Anfang an konstant, dagegen steigerten sie sich jeweils bei 550 mM $K^+$. Während mit Ethylenglycol die Aktivität bei 550 mM $K^+$ nach Steigerung unterhalb der Aktivität bei 50 mM $K^+$ blieb, übertraf mit Propandiol die Aktivität bei 550 mM $K^+$ nach Steigerung die Aktivität bei 50 mM $K^+$ (Abb. 3.4 und 3.5). In einem anderen Versuch kam eine anfängliche Aktivitätszunahme auch bei der niedrigen Kaliumionenkonzentration (50 mM $K^+$) vor.
In Ansätzen, denen kein Coenzym $B_{12}$ zugesetzt worden war, wurden Steigerungsphasen ebenfalls beobachtet (allerdings seltener und nur mit Propandiol als Substrat, nicht mit Ethylenglycol), sie erstreckten sich über einen viel längeren Zeitraum (mehr als 10 min), und die Aktivitäten waren dabei auch nach vielen Minuten noch sehr gering. Bei Coenzym-$B_{12}$-Zusatz war die Steigerung in der Regel innerhalb relativ kurzer Zeit (2 min bei Propandiol, 7 min bei Ethylenglycol) abgeschlossen.

Die Steigerungsphasen dürften wahrscheinlich auf eine Zunahme an Holoenzym zurückzuführen sein. Die Beobachtung, dass sich manchmal sogar dann, wenn kein Coenzym $B_{12}$ zugesetzt wurde, die Aktivität ab dem Moment der Propandiolzugabe erhöhte, könnte bedeuten, dass die Affinität für Coenzym $B_{12}$ stieg, sobald Substrat gegenwärtig war und so zur Re-Assoziation mit ausgewaschenem Cofaktor führte. Die Daten würden dann nahe legen, dass Propandiol diesen Re-Assoziationsprozess stärker unterstützen würde als Ethylenglycol.

Insgesamt zeigt diese Beschreibung, dass viele Faktoren gleichzeitig einen Einfluss auf zeitlichen Verlauf und Höhe der Diol-Dehydratase-Aktivität hatten (Konzentrationen von Coenzym $B_{12}$, Kaliumionen und Titancitrat; deren Kontaktzeiten; Art des Substrats).

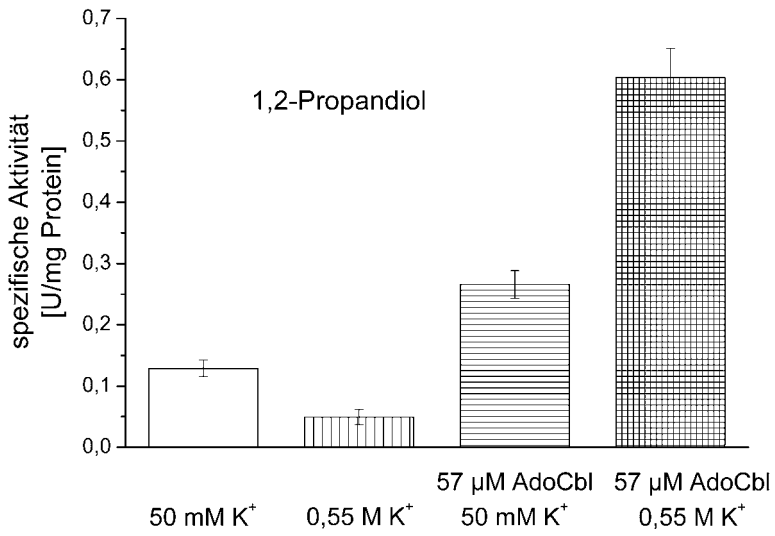



**Abb. 3.4**: Auswirkung von erhöhter Kaliumkonzentration bzw. von Coenzym $B_{12}$ auf die Diol-Dehydratase-Aktivität von zellfreiem Extrakt mit Propandiol. Die Titancitrat-Konzentration betrug 0,5 mM. Ansätze mit Steigerungsphasen sind durch eine Schraffur gekennzeichnet. Die Werte geben die nach Abschluss der Steigerungsphase erreichten Aktivitäten an.

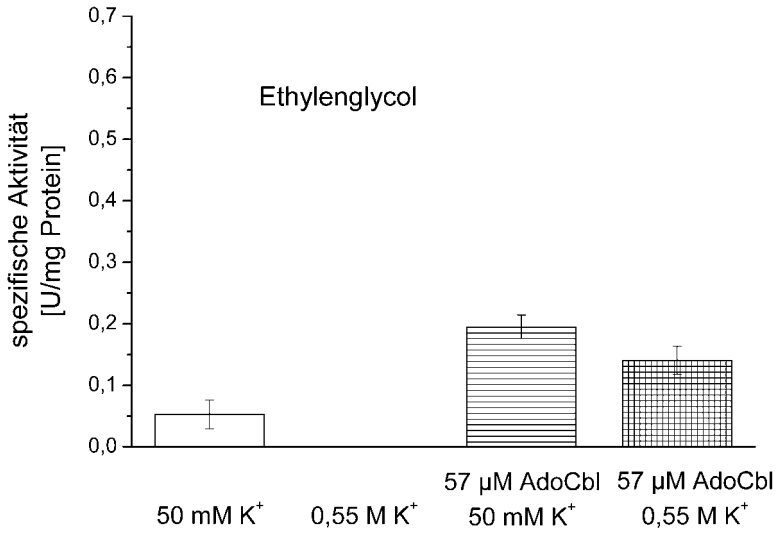



**Abb. 3.5**: Auswirkung von erhöhter Kaliumkonzentration bzw. von Coenzym $B_{12}$ auf die Diol-Dehydratase-Aktivität von zellfreiem Extrakt mit Ethylenglycol. Die Titancitrat-Konzentration betrug 0,5 mM. Ansätze mit Steigerungsphasen sind durch eine Schraffur gekennzeichnet. Die Werte geben die nach Abschluss der Steigerungsphase erreichten Aktivitäten an.

### 3.2.8 Korrelation der Diol-Dehydratase mit einer Gelbande

Nach Wachstum von Stamm LuPhet 1 mit unterschiedlichen Substraten wurde ein Vergleich der Proteinmuster der entsprechenden Zellextrakte in eindimensionalen denaturierenden Elektrophorese-Gelen durchgeführt (siehe noch folgenden Abschnitt 3.3.1.2). Im Extrakt phenoxyethanolgewachsener Zellen waren zwei Banden besonders dick. Es war vermutet worden, dass eine dieser beiden Banden (mit einer Masse von ca. 83 kDa) ein Protein der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase sein könnte. Die andere dicke Bande in der Phenoxyethanol-Spur des 10 %-SDS-Gels bei ca. 63 kDa könnte zur Diol-Dehydratase gehören (Abb. 3.6 und 3.7). Diese Bande war in Ethylenglycol-Zellen intensiver als in Lactat-Zellen. Letzteres passte zu den Aktivitäten mit Ethylenglycol von 0,5 U/mg Protein für Rohextrakt von ethylenglycolgewachsenen Zellen, im Vergleich zu 0,1 U/mg Protein für zellfreien Extrakt von lactatgewachsenen Zellen (jeweils gemessen ohne Coenzym-$B_{12}$-Zusatz).
Auch eine Bande bei knapp unter 30 kDa wies relativ passende Intensitäten auf und könnte somit zur Diol-Dehydratase gehören.

## 3.3 Phenoxyethanol-Spaltung durch Stamm LuPhet 1

### 3.3.1 Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat

Zellen von Stamm LuPhet 1, die auf Phenoxyethanol gewachsen waren, konnten Phenoxyethanol spalten, durch Kochen der Zellsuspension wurde diese Fähigkeit zerstört. Unter den von Stamm LuPhet 1 genutzten Wachstumssubstraten sollten solche ausgewählt werden, bei denen die Enzyme der Phenoxyethanol-Spaltung nicht exprimiert würden. Diese Zellen sollten das Material für Negativkontrollen z. B. in Polyacrylamid-Gelen liefern. Deshalb wurden Zellen nach Wachstum auf den Substraten Phenoxyethanol, PEG 300, Ethylenglycol, Glycerin, *D,L*-Lactat, Fructose, 3,4,5-Trimethoxybenzoat bzw. $H_2/CO_2$ in diskontinuierlichen Zellsuspensionstests auf Phenoxyethanol-Spaltung geprüft. Bei jedem Wachstumssubstrat wurden in der Regel mehrere Zellsuspensionen getestet, wobei pro Wachstumssubstrat jeweils in mindestens einer Zellsuspension Phenoxyethanol-Spaltung stattfand. Die Phenoxyethanol-Spaltung lief dabei nicht nur in den ersten Minuten ab, sondern wurde auch noch nach 3,5 min katalysiert. Bereits mit verschiedenen Zellsuspensionen ein und desselben Wachstumssubstrats wurden ziemlich unterschiedliche Raten erhalten; in Tabelle 6 wurden die jeweils höchsten Aktivitäten aufgeführt. Diese jeweils höchsten Raten der Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität der unterschiedlichen Zellmaterialien lagen maximal etwas mehr als eine Größenordnung auseinander. Zellen, die mit Phenoxyethanol, PEG 300 bzw. Lactat gewachsen waren, wiesen hohe Raten der Phenolbildung aus Phenoxyethanol auf. Mit Trimethoxybenzoat, Ethylenglycol bzw. Glycerin gewachsene Zellen katalysierten die Phenoxyethanol-Spaltung nur langsam. Zellen, die mit $H_2/CO_2$ bzw. mit Fructose gewachsen waren, zeigten mittlere Phenoxyethanol-Spaltungsraten; zweimal jedoch war mit autotrophen Kulturen und einmal mit einer Fructose-Kultur auch keine Aktivität zu messen gewesen.
Bei den gewählten Bedingungen wurde die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase somit bei allen getesteten Wachstumssubstraten exprimiert.

**Tab. 6**: Phenoxyethanol-Spaltungsraten von Zellsuspensionen in Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat. Die Aktivitäten wurden in diskontinuierlichen Tests ermittelt, die Messintervalle unterschieden sich bei den einzelnen Versuchen geringfügig. Alle verwendeten Kulturen waren wenigstens fünfmal in Folge auf das alternative Substrat übertragen worden, bei einem Animpfvolumen von jeweils maximal 10 %, mit Ausnahme der autotrophen Kultur, diese war erst dreimal auf $H_2/CO_2$ übertragen worden. Die Puffer enthielten jeweils 2,5 mM des Reduktionsmittels Titancitrat.

| Wachstumssubstrat | Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung [U/mg Protein] | | zugehörigen Extrakt auf SDS-Gel aufgetragen (Abb. 3.6, 3.7) |
|---|---|---|---|
| | für Intervall 0-30 sec | für Intervall 0-90 sec | |
| *D,L*-Lactat | von **4,7**<br>bis **10,7** | **2,3**<br>— | |
| Phenoxyethanol | von **4,4**<br>bis **9,6** | —<br>**4,4** | |
| PEG 300 | **2,6** | **2,0** (0-1,67 min) | |
| $H_2/CO_2$ | — | **1,2** (RT*) | ja |
| Fructose | **1,9** (0-40 sec) | **1,1** | ja |
| 3,4,5-Trimethoxybenzoat** | **0,7** | | |
| Ethylenglycol | —<br>**0,4** (0-55 sec) | **0,34** (RT*)<br>**0,16** (0-2,5 min) | ja |
| Glycerin | **0,3** (0-40 sec) | 0,15 | ja |

* Messungen wurden bei Raumtemperatur anstelle von 28°C durchgeführt

** Bei Wachstum auf 3,4,5-Trimethoxybenzoat wurde Trimethoxybenzoat nicht vollständig abgebaut sondern nur demethyliert, zu Gallat, als anderes Produkt entstand im Hydrogencarbonat-gepufferten Medium Acetat. Dieser unvollständige Abbau war bereits vermutet worden (Frings und Schink, 1994).

#### *3.3.1.1 Lactat-Abbau und Phenoxyethanol-Spaltung werden vermutlich durch verschiedene Enzyme eingeleitet*

Bei der Kultivierung mit *D,L*-Lactat entstand Acetat, in der 1,5-fachen Menge des verbrauchten *D,L*-Lactats. Die Stöchiometrie von 1,5 Acetat aus 1 Lactat war auch schon für *L*-Lactat beschrieben worden (Frings und Schink, 1994).
Da es etwas überraschend war, dass Zellen von Stamm LuPhet 1 nach Wachstum auf Lactat eine hohe Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität zeigten, wurde auch erwogen, dass es zwischen den Abbauwegen von Lactat und Phenoxyethanol Zusammenhänge geben könnte, dass zum Beispiel die Enzyme für den jeweils initialen Schritt identisch sein könnten.
Einzelne Suspensionen von lactatgewachsenen Zellen wurden auf Lactat-Abbau getestet. Nur bei einem Versuch konnte eine Abnahme des Lactats festgestellt werden, gleichzeitig entstand dabei Acetat. Der Lactatverbrauch erfolgte sehr langsam, mit einer Rate von 0,04 µmol/(min·mg Protein), während Phenoxyethanol durch diese Zellen dagegen sehr schnell gespalten wurde, die Phenolbildungsrate lag hier bei 10,6 µmol/(min·mg Protein). Ebenfalls auf Lactat-Abbau getestet wurde eine Suspension von phenoxyethanolgewachsenen Zellen. In diesem Versuch wurde allerdings nur ca. ein Fünftel der Proteinmenge des vorigen Lactat-abbauenden Versuchs eingesetzt. Es war keinerlei Lactat-Abnahme messbar sowie keine Acetatbildung, hingegen spalteten die Zellen Phenoxyethanol mit hoher Rate, umgerechnet mit 9,6 µmol/(min·mg Protein).
In beiden Fällen war die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase der getesteten Zellsuspensionen in bezug auf die Phenoxyethanol-Spaltung funktionsfähig und sehr aktiv, während Lactat sehr langsam oder gar nicht abnahm. Dagegen waren Wachstumsraten von Kulturen mit Phenoxyethanol ähnlich groß wie jene von Kulturen mit Lactat (ähnlicher Ertrag bei ähnlichen Verdopplungszeiten). Offensichtlich waren die initialen Enzyme des Lactat-Abbaus und des Phenoxyethanol-Abbaus verschieden.

Des weiteren wurde der gekoppelte Enzymtest, der Aldehyd nachweist, mit zellfreien Extrakt von Stamm LuPhet 1 und *D,L*-Lactat als Substrat durchgeführt. Es konnte dabei jedoch keine Aldehydbildung aus Lactat festgestellt werden.

#### *3.3.1.2 Gelelektrophoretischer Vergleich verschiedener Zellextrakte von Stamm LuPhet 1*

Obwohl keinem der getesteten Stamm-LuPhet-1-Zellmaterialien die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase völlig zu fehlen schien (siehe Tab. 6), wurden eindimensionale SDS-Gel-

elektrophoresen durchgeführt, um die verschiedenen Rohextrakte miteinander zu vergleichen. Für Ethylenglycol, Glycerin, Fructose und $H_2/CO_2$ wurde jenes Zellmaterial aufgeschlossen und aufgetragen, mit dem auch die in Tabelle 6 angegebene Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität ermittelt worden war. Da ein Enzym, das einen Abbauweg im Energie- und Kohlenstoffwechsel einleitet, vermutlich in großen Mengen vorhanden sein dürfte, wurde nach dicken Banden gesucht. Gleichzeitig sollten deren Intensitäten den gemessenen Phenoxyethanol-Spaltungsaktivitäten entsprechen, d. h. diese Banden sollten in den PEG-300- und Lactat-Spuren ähnlich dick sein wie in der Phenoxyethanol-Spur.

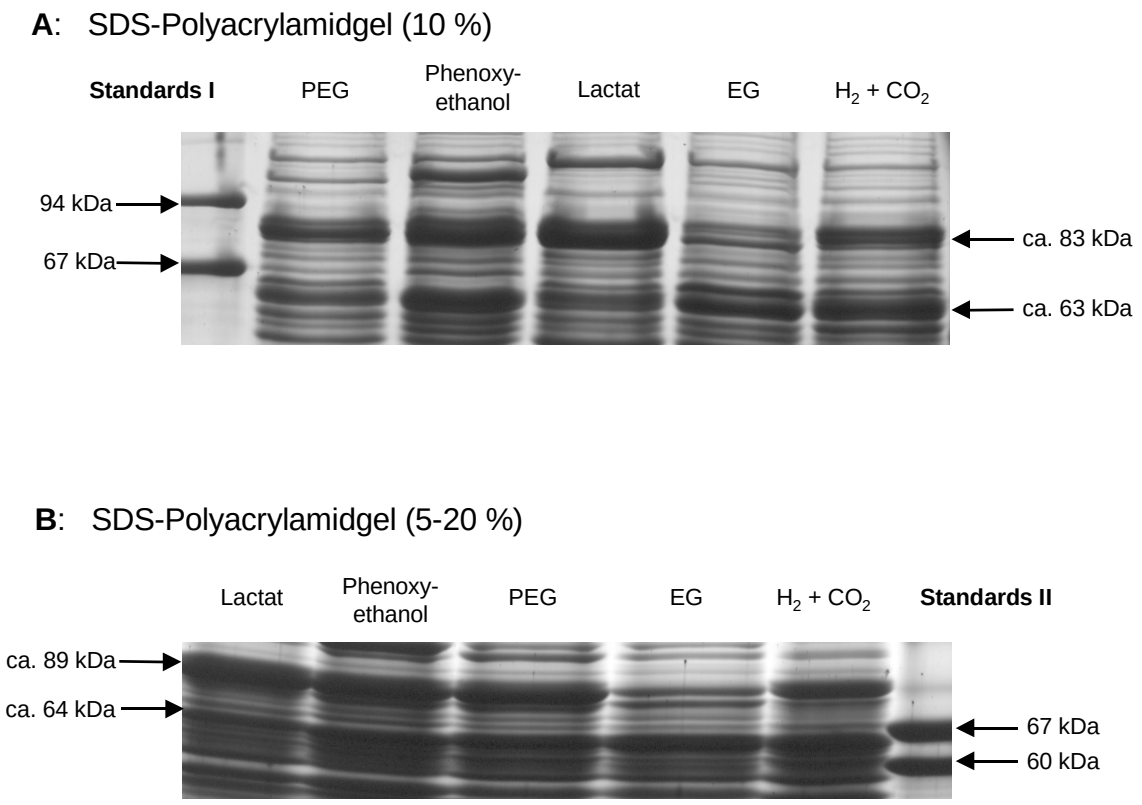
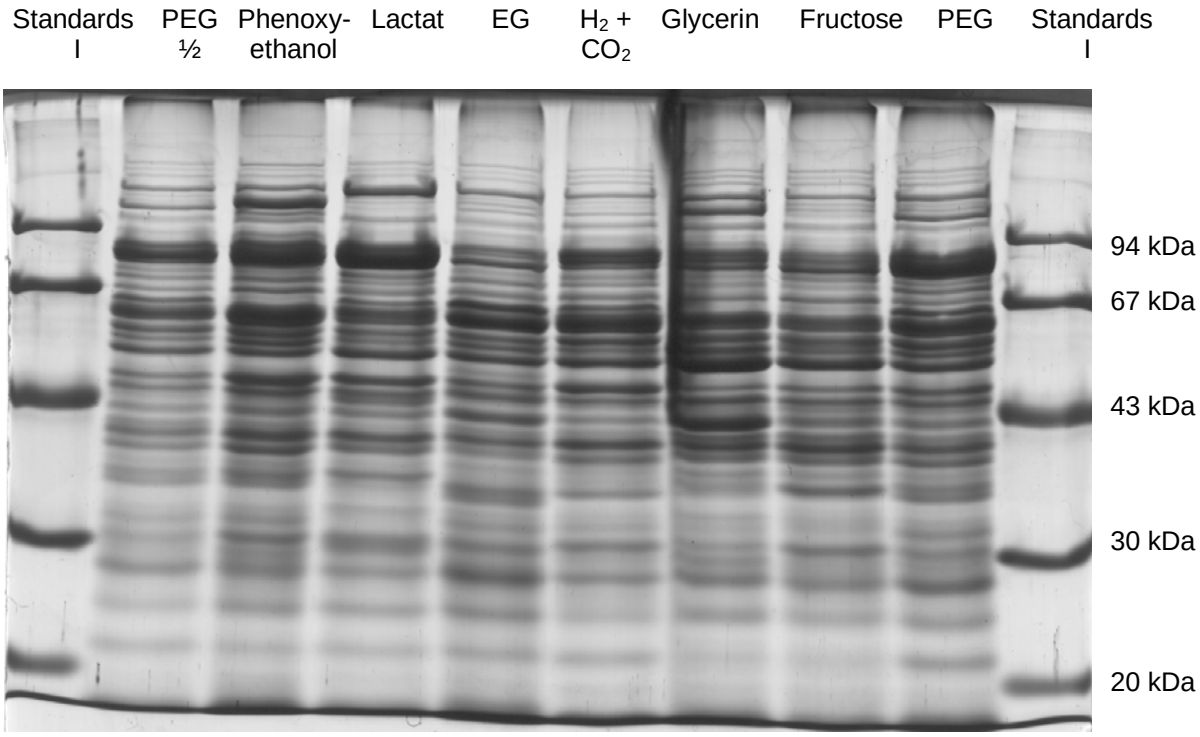



**Abb. 3.7**: Ausschnitte der Gele von Abbildung 3.6.

**A**: SDS-Polyacrylamidgel (10 %), **B**: SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (5-20 %).

A: SDS-Polyacrylamidgel (10 %)




B: SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (5-20 %)

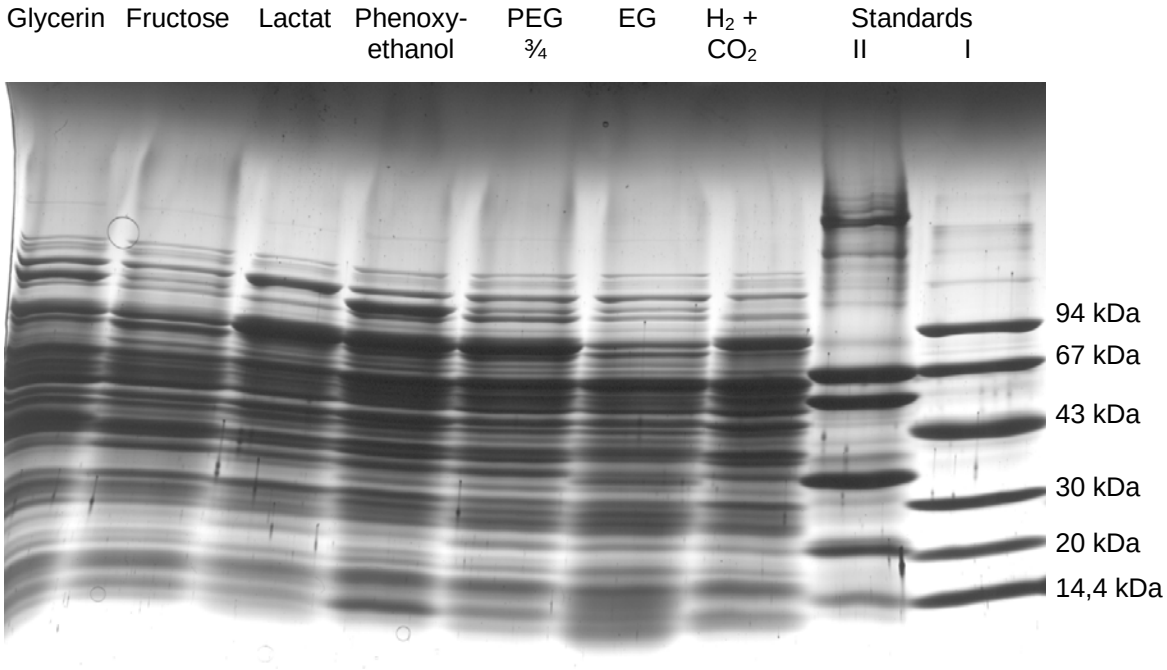



**Abb. 3.6**: Zellextrakte von *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 nach Wachstum auf unterschiedlichen Substraten, aufgetrennt in SDS-Polyacrylamid-Gelen (gefärbt mit Coomassie Blau). Pro Spur wurden etwa 20 µg Protein aufgetragen, bzw. 10 µg bei PEG ½, 15 µg bei PEG ¾ und 12 µg bei Standards I (10 %-Gel).

**A**: SDS-Polyacrylamidgel (10 %), **B**: SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (5-20 %).

Im 10 %-SDS-Gel (Abb. 3.6 A) gab es im Bereich mit Massen unter 43 kDa keine sehr dicken Banden. Im Bereich über 94 kDa waren nur wenige Banden dick, und diese waren nie gleichzeitig in den Spuren von phenoxyethanolgewachsenen und lactatgewachsenen Zellen enthalten. Die intensivsten Banden der Phenoxyethanol-Zellen lagen zwischen 43 kDa und 94 kDa, darunter waren zwei Banden besonders dick: eine bei ca. 83 kDa, eine andere bei ca. 63 kDa. Von diesen beiden intensiven Banden war nur jene bei 83 kDa auch in PEG-300- und Lactat-Zellen ähnlich stark wie in Phenoxyethanol-Zellen, während sie in den anderen Spuren jeweils schwächer ausfiel, siehe auch Abbildung 3.7 A. Sonst schien keine weitere protein-reiche Bande mit den Phenoxyethanol-Spaltungsaktivitäten zu korrelieren, es wäre aber durchaus möglich, dass unter den schwächeren Banden, vor allem im Bereich der Massen kleiner als 43 kDa, welche enthalten wären, die auch zur Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität passende Intensitäten aufweisen würden und somit zur Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase gehören könnten.

Die Banden in diesem Gel waren allerdings nicht sehr gut aufgelöst, vor allem lagen im interessierenden Bereich bei 83 kDa mindestens zwei Banden sehr eng beieinander, was eine Einschätzung der jeweiligen Intensität erschwerte. Die gleichen Proben wurden auch auf ein SDS-Gradienten-Gel (5-20 %) aufgetragen (Abb. 3.6 B und 3.7 B); durch diesen Gradienten in der Porengröße konnte die Bandenschärfe bei Massen von 43-94 kDa erhöht werden. Auch bei dieser höheren Auflösung war eine Bande im Bereich zwischen 67 und 94 kDa sowohl in Phenoxyethanol- als auch in PEG-300- und Lactat-Zellen sehr intensiv, während sie in $H_2/CO_2$-Zellen etwas weniger intensiv und in Ethylenglycol-Zellen nur sehr schwach war. Dies würde gut zu den gemessenen Phenoxyethanol-Spaltungsaktivitäten passen. Die Intensitäten dieser Bande in den Spuren der Fructose- und Glycerin-Zellen korrelierten dagegen nicht so gut mit den Aktivitäten, denn im Vergleich zur Stärke der Bande in $H_2/CO_2$-Zellen war sie in Fructose-Zellen zu schwach, und in Glycerin-Zellen war sie im Vergleich zu Ethylenglycol-Zellen zu dick. Vermutlich handelte es sich um die gleiche Bande wie im 10 %-Gel, diesmal wurde ihre Masse zu ca. 89 kDa bestimmt.

Die Bande mit 83 bzw. 89 kDa könnte Teil der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase sein, da sie von den dicken Banden am besten mit den Phenoxyethanol-Spaltungsaktivitäten in den verschiedenen Zellmaterialien korrelierte. Sie lag allerdings zu dicht an der nächsten Bande, um sie sauber ausschneiden und ansequenzieren zu können.

Die andere dicke Bande der Phenoxyethanol-Spur des 10 %-SDS-Gels bei ca. 63 kDa könnte zur Diol-Dehydratase gehören (siehe Abschnitt 3.2.8).

### 3.3.2 Zellsuspensionsversuche

Die Versuche mit ganzen Zellen wurden unter anoxischen, reduzierenden Bedingungen durchgeführt, alle Puffer enthielten 2,5 mM des Reduktionsmittels Titancitrat (wenn nichts anderes angegeben wurde).

#### *3.3.2.1 Untersuchungen mit einem diskontinuierlichen Test*

Viele Messungen der Phenoxyethanol-Spaltung von ganzen Zellen wurden mit einem diskontinuierlichen Verfahren durchgeführt, davon werden nun einige typische Versuche erläutert.

In Abbildung 3.8 ist beispielsweise ein Zellsuspensionstest dargestellt, der mit frischen während des logarithmischen Wachstums geernteten auf Phenoxyethanol angezogenen Zellen durchgeführt wurde; gestartet wurde mit der Zugabe des Substrates Phenoxyethanol. Gezeigt sind die Verläufe des Phenoxyethanols sowie der Produkte Phenol und Acetat.

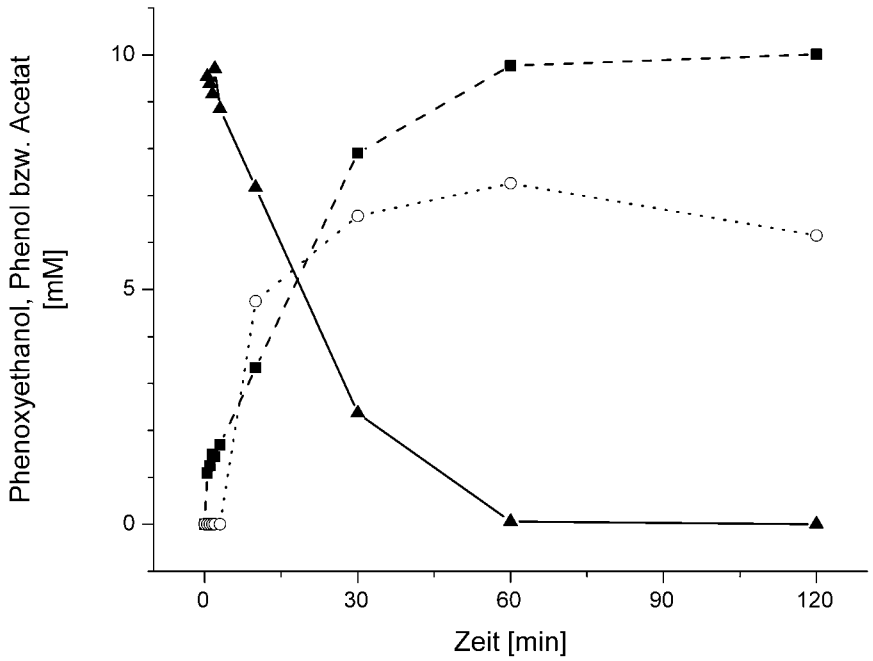



**Abb. 3.8**: Umsetzung von Phenoxyethanol zu Phenol und Acetat, katalysiert durch ganze Zellen von Stamm LuPhet 1, die Zellsuspension wies umgerechnet eine Proteinkonzentration von 0,23 mg Protein pro ml auf. Als Puffer wurde Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0) mit 2,5 mM Titancitrat verwendet. Phenoxyethanol (▲), Phenol (■), Acetat (○).

Nach 60 min war das gesamte zugegebene Phenoxyethanol verbraucht. Daraus ist Phenol in stöchiometrischer Menge entstanden. Zu jeder Zeit verliefen die Konzentrationen von Phenoxyethanol und Phenol spiegelbildlich zueinander. Acetaldehyd, das andere Produkt der Reaktion der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase, konnte mit der UV-Detektion der verwendeten HPLC-Methode nicht gemessen werden. Allerdings konnte Acetat erfasst werden, welches in enzymatischen Folgereaktionen intrazellulär aus Acetaldehyd entstand. Die Oxidation des Aldehyds lief oft verzögert gegenüber der Phenoxyethanol-Spaltung ab, und meistens nur unvollständig. Dies war auch in diesem Beispiel der Fall, die gebildete Acetatmenge war geringer als es dem Verbrauch an Phenoxyethanol entsprechen würde. Theoretisch könnte sogar das 1,25-fache des Phenoxyethanol-Verbrauchs an Acetat freigesetzt werden, wenn alle während der Oxidation entstehenden Reduktionsäquivalente auf $CO_2$ übertragen würden und so weiteres Acetat bildeten. Betrachtet man die Raten der Phenoxyethanol-Spaltung, und zwar jeweils in den einzelnen Intervallen, so fällt auf, dass im ersten Intervall (0 bis 30 sec ab Start) die Aktivität der sehr hoch war (→ Anfangsaktivität), sich aber bereits im nächsten Intervall deutlich verringert hatte, auf einen Wert mit dem dann der Hauptteil der Umsetzung ablief (→ Hauptaktivität). Während die Hauptaktivität mit ca. 1 U/mg Protein sehr gut der *in-vivo*-Aktivität von Zellen bei Wachstum auf Phenoxyethanol entsprach (1,04 U/mg Protein, Frings und Schink, 1994), lief die Reaktion in den ersten 30 Sekunden mit einem Mehrfachen dieser Rate ab (9,6 U/mg Protein). Der Umsatz der ersten 30 Sekunden belief sich in diesem Beispiel auf ungefähr 10 % der eingesetzten Phenoxyethanolmenge, somit kann die hier einsetzendeVerlangsamung nicht durch eine Verknappung des Substrats verursacht worden sein.

Mit Zellen derselben Ernte wurde ermittelt, wie sich eine vorherige Lagerung auf die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität von ganzen Zellen auswirkte. Dafür wurden Aliquote der gewaschenen Zellen als Suspension in Titancitrat-haltigem Erntepuffer unter Sauerstoffausschluss für 4,5 Stunden bei 4°C aufbewahrt bzw. für drei Tage in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Phenolbildung der beiden gelagerten Zellsuspensionen im Vergleich zur direkt nach Ernte und Waschen getesteten Zellsuspension ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

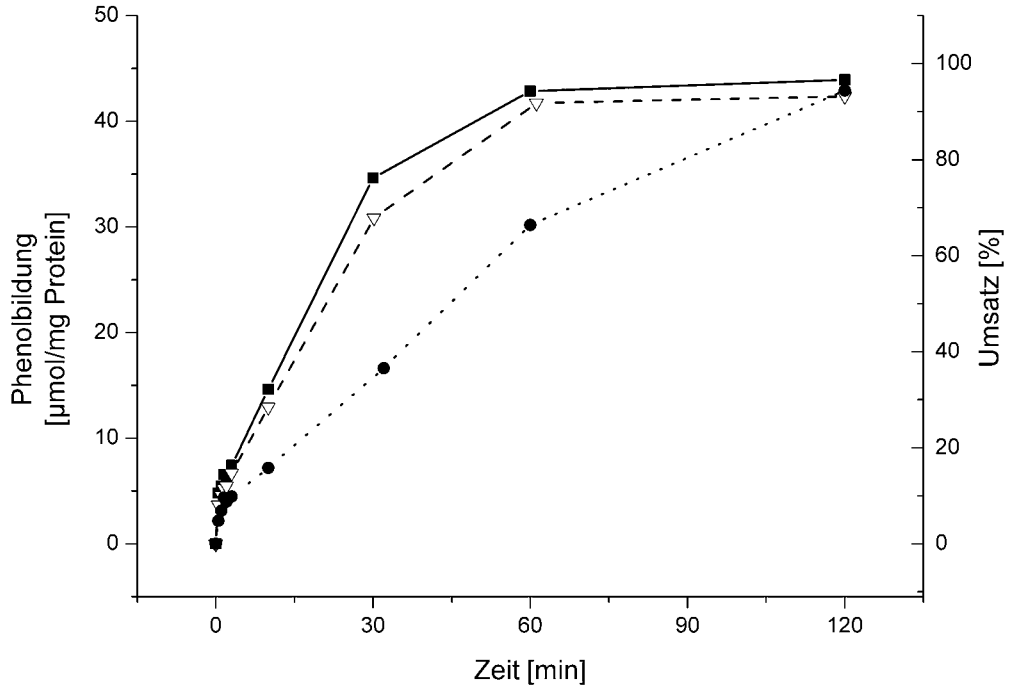



**Abb. 3.9**: Phenolbildung aus Phenoxyethanol durch Zellsuspensionen von Stamm LuPhet 1; zwei gelagerte Zellsuspensionen (für 4,5 Stunden bei 4°C (▽) bzw. für drei Tage in flüssigem Stickstoff (●)) im Vergleich zu einer frischen Zellsuspension (■). Phenoxyethanol wurde in einer Konzentration von 10 mM zugegeben, als Puffer wurde Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0) mit 2,5 mM Titancitrat verwendet, die Zellen wurden in einer Konzentration, die 0,23 mg Protein pro ml entsprach, eingesetzt.

Die nicht gezeigten Phenoxyethanol-Konzentrationen verliefen jeweils spiegelbildlich zu den Phenolkonzentrationen. Auch bei den gelagerten Zellsuspensionen verringerte sich die Rate der Phenoxyethanol-Spaltung nach kurzer Zeit, so dass man zwischen einer Anfangsaktivität und einer Hauptaktivität unterscheiden sollte. Wie an der nahezu gleichen Steigung gut zu sehen ist, war die spezifische Hauptaktivität des gekühlten Ansatzes fast genauso groß (90 %) wie die des frisch verwendeten. Dagegen überstand nur 45 % der Anfangs- und Haupt-Aktivität im Vergleich zum frischen Ansatz das Einfrieren in flüssigem Stickstoff und das anschließende Auftauen. Der Übergang zur Hauptaktivität war vor allem bei der eingefrorenen Zellsuspension weniger abrupt als bei der frischen Zellsuspension, und erstreckte sich über die Zeit zwischen 30 sec und ca. 2 min nach Start. Als weitere Variante wurde ein Teil der Zellen dieser Kultur mit einem anderen Puffer gewaschen, gelagert und getestet, nämlich mit Tris/HCl (50 mM, pH 8,0) statt mit Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0), ebenfalls einschließlich 2,5 mM Titancitrat (Abb. 3.10).

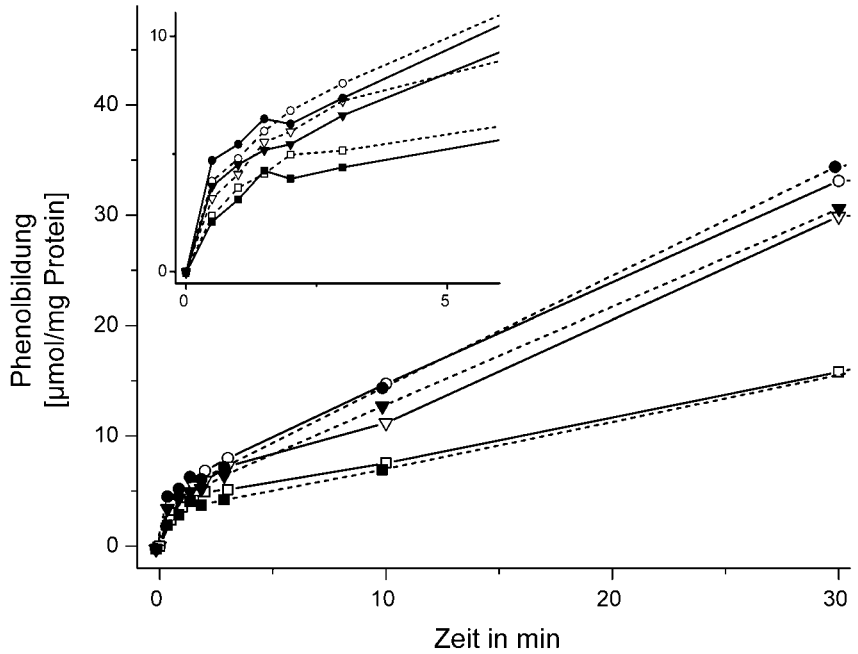



**Abb. 3.10 A**: Phenoxyethanol-Spaltung durch Zellsuspensionen von Stamm LuPhet 1. Die Zellen waren in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0, mit 2,5 mM Titancitrat; gefüllte Symbole) bzw. Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0, mit 2,5 mM Titancitrat; offene Symbole) resuspendiert. Dargestellt sind die Aktivitäten von frischen Zellsuspensionen (■, □) sowie nach Lagerung als Zellsuspension im jeweiligen Puffer, für 4,5 Stunden bei 4°C (▼, ▽) bzw. für drei Tage in flüssigem Stickstoff (●, ○).
Die Konzentration von Phenoxyethanol betrug jeweils 10 mM und die Suspensionen enthielten Zellen in einer Konzentration von umgerechnet 0,28 mg Protein pro ml (bei den Tris-Ansätzen) bzw. von 0,23 mg Protein pro ml (bei den Kaliumphosphat-Ansätzen).
**Abb. 3.10 B**: Ausschnittvergrößerung.

Es ergab sich das gleiche Bild und es wurden gleiche Werte für die Hauptaktivitäten bei den Tris-gepufferten Ansätzen gemessen wie bei den Kaliumphosphat-gepufferten. Nur die Anfangsaktivitäten wichen bei Tris etwas von den Werten bei Kaliumphosphat ab. Der Tausch der puffernden Substanz und des eingestellten pH-Wertes hatte also kaum eine Wirkung auf die Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung und deren Haltbarkeit gehabt. Man kann diesen Beispielen auch entnehmen, dass es zwar Unterschiede zwischen den Einzelansätzen und kleine Schwankungen gab, aber doch eine gute Reproduzierbarkeit der Versuche gegeben war.

Im Hinblick auf die Frage, ob vielleicht Acetaldehyd, Produkt der Phenoxyethanol-Spaltung, einen schädlichen Einfluss auf die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase haben könnte, wurden verschiedene Konzentrationen an Acetaldehyd dem üblichen Zellsuspensions-Testansatz zugegeben und jeweils der Verlauf der Aktivität ermittelt. Die Kultur für diesen Versuch war auf *D,L*-Lactat gewachsen und die Suspension der gewaschenen Zellen vor ihrer Verwendung für 21 Stunden bei 4°C gelagert worden. Es wurden folgende Acetaldehyd-Hintergrundkonzentrationen eingestellt (= zu Beginn der Umsetzung herrschende Konzentration): 0 mM, 0,18 mM, 0,9 mM bzw. 3 mM. Wie in Abbildung 3.11 zu sehen, traten zwischen den einzelnen Bedingungen kaum Unterschiede in Bezug auf Verlauf und Höhe der Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung auf. Auch bei diesem Versuch, wie bei den zuvor beschriebenen Ansätzen, zeigten die Phenolbildungskurven ein Abknicken der Aktivitäten im Bereich 30 bis 90 sec ab Start. Der extrazelluläre Zusatz von bis zu 3 mM Acetaldehyd (zumindest bei einer Proteinkonzentration von 0,8 mg/ml) hatte auf die Reaktion der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase in ganzen Zellen demnach keinen großen Einfluss. Gewisse kleinere Unterschiede schien es in den Werten der Anfangsaktivität und bei der Geschwindigkeit des Übergangs von der Anfangs- zur Hauptaktivität gegeben zu haben. Die Anfangsaktivitäten betrugen das Mehrfache der *in-vivo*-Aktivität, wenn auch nicht ganz so hohe Werte erreicht wurden wie im zuvor beschriebenen Versuch. Die Hauptaktivitäten lagen mit etwa 0,9 bis 1 U/mg Protein wieder sehr gut bei der Umsatzaktivität von auf Phenoxyethanol wachsenden Zellen. Auch in diesem Versuch zeigte sich, dass ganze Zellen von Stamm LuPhet 1 nach Aufbewahren noch Phenoxyethanol spalten konnten, denn trotz vorherigen Kühlens der Zellsuspension für 21 Stunden waren noch recht hohe Hauptaktivitäten messbar. Wegen der höheren Proteinkonzentration im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Versuchen wurde in diesem Beispiel in den ersten 30 sec fast 20 % des zugegebenen Phenoxyethanols gespalten, das gesamte Phenoxyethanol war nach 10-20 min verbraucht. Die Reaktion lief bis mindestens 90 % Umsatz des Substrats mit der konstanten Hauptaktivität ab, d. h. bis zu einer Phenoxyethanol-Restkonzentration von ca. 1 mM. Dies gibt einen Anhaltspunkt für die Konzentration zur Sättigung des Enzyms mit Phenoxyethanol von höchstens ca. 1 mM, bezogen auf ganze Zellen (in einer Proteinkonzentration von 0,8 mg/ml). Außerdem hatte Phenol in einer Konzentration von 9 mM die Phenoxyethanol-Spaltung anscheinend nicht gestört.

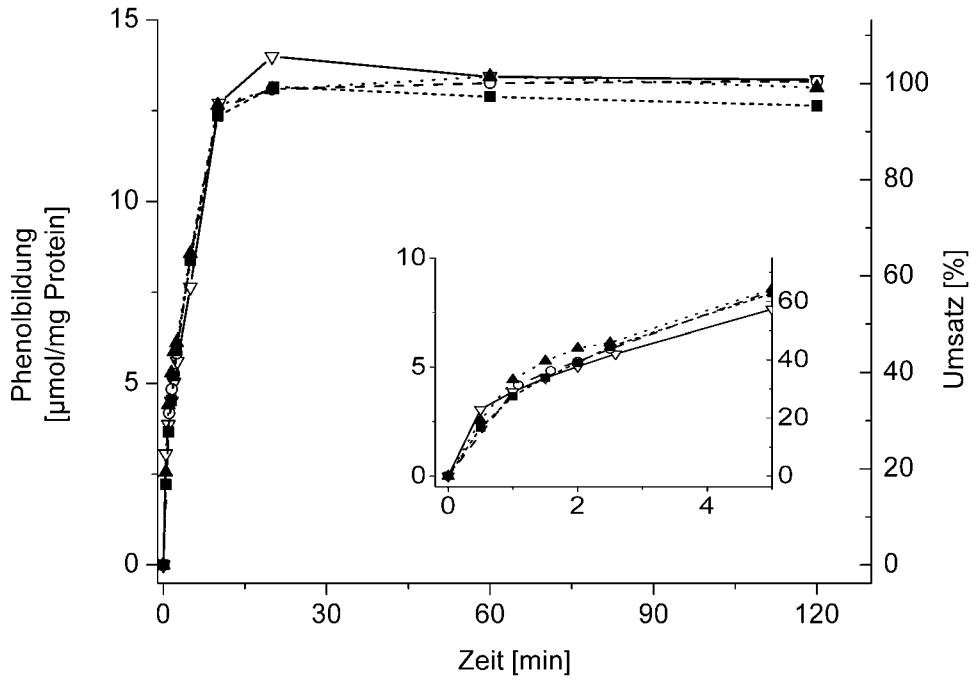



**Abb. 3.11 A**: Phenolbildung aus Phenoxyethanol durch Zellen von Stamm LuPhet 1 in Gegenwart von Acetaldehyd. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 0,8 mg Protein pro ml eingesetzt, als Puffer diente Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0) mit 2,5 mM Titancitrat. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von Phenoxyethanol (10 mM) gestartet. Der Aldehyd wurde jeweils genau 3 min vor Reaktionsstart zugegeben (0 mM ▽; 0,18 mM ○; 0,9 mM ▲; 3 mM ■), gleichzeitig wurde der Ansatz von 4°C auf 28°C erwärmt. Die Nullprobe wurde 2 min nach Zusatz des Aldehyds gezogen.

**Abb. 3.11 B**: Ausschnittvergrößerung.

In Abbildung 3.12 wurden weitere Versuche mit ebenfalls sehr aktiven Zellsuspensionen dargestellt, alle zeigten einen ähnlichen Verlauf der Aktivitäten. Das heißt der kurzen Phase sehr hoher Aktivität (→Anfangsaktivität) folgte die lineare Phase der Umsetzung (→Hauptaktivität) mit einer Rate, die in etwa der Rate wachsender Zellen entsprach. Der Wechsel zwischen beiden Phasen trat dabei unvermittelt ein, etwa 30-90 sec nach Reaktionsstart. Wenn auch die Anfangsaktivitäten streuten, so waren doch die Hauptaktivitäten dieser Versuche recht ähnlich. Die Zellen waren jeweils auf Phenoxyethanol oder Lactat angezogen und für den Zellsuspensionstest frisch geerntet worden, wenn nichts anderes erwähnt wird. Bei einem der Beispiele (◇) war die verwendete Zellsuspension (lactatgewachsen) zuvor bereits für eine Woche in flüssigem Stickstoff eingefroren gewesen. In diesem Versuch wurde mit 1,5 mg/ml eine relativ hohe Proteinkonzentration eingesetzt, so dass hier fast der gesamte

Umsatz bereits im ersten Intervall stattfand, und zwar mit einer spezifischen Aktivität, die ungefähr dem Zehnfachen der Phenoxyethanol-*in-vivo*-Rate entsprach.

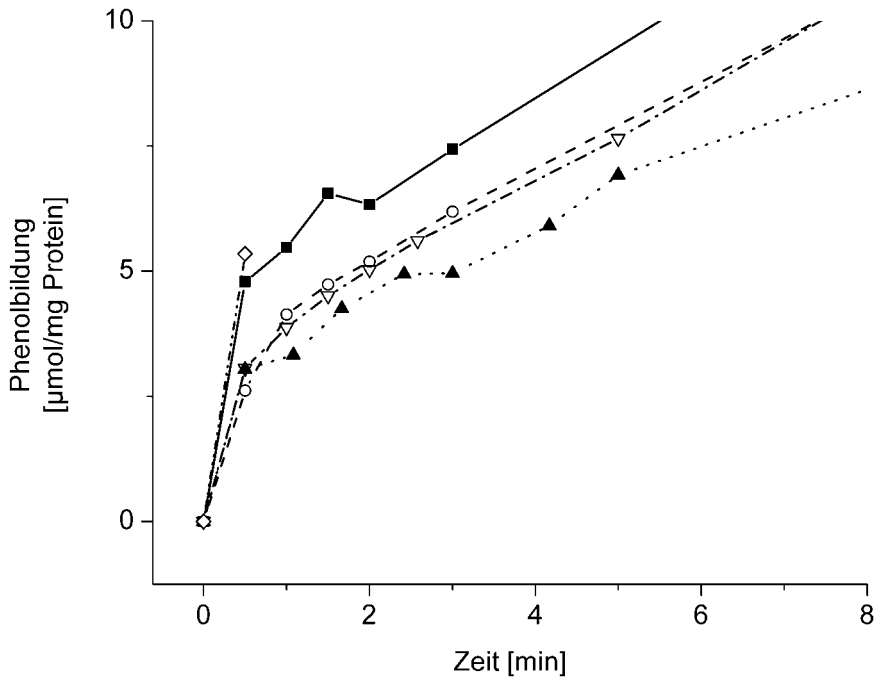



**Abb. 3.12**: Spaltung von Phenoxyethanol durch verschiedene Zellsuspensionen von Stamm LuPhet 1. Phenoxyethanol war jeweils in Konzentrationen von 9-12 mM zugegeben worden und die eingestellten Proteinkonzentrationen lagen im Bereich von 0,2-1,5 mg/ml. Als Puffer wurde Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0 oder pH 7,5) mit 2,5 mM Titancitrat verwendet. Bei diesen Beispielen lagen die spezifischen Aktivitäten, die sich im Anschluss an die sehr aktive 1-2 minütige Anfangsphase einstellten, jeweils im Bereich von 1 U/mg Protein.

Neben den bisher gezeigten Beispielen gab es auch Versuche, bei denen Hauptaktivitäten erhalten wurden, die deutlich unter den Werten für die *in-vivo*-Aktivität lagen. Außerdem verlief die Abnahme der Aktivität nicht immer so abrupt. Beispiele mit allmählich abklingender Phenoxyethanol-Spaltungsrate werden in Abbildung 3.13 gezeigt. Der Aktivitätsverlauf der zwischenzeitlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellsuspension (●) war bereits in den Abbildungen 3.9 und 3.10 zu sehen. Bei der frischen Zellsuspension einer PEG-300-Kultur (▼) nahm die Geschwindigkeit relativ langsam ab, bis der Rest des Umsatzes mit etwa konstanter und verhältnismäßig hoher Aktivität (0,73 U/mg Protein) ablief. Des weiteren handelte es sich um eine frische Zellsuspension einer Lactat-Kultur (△), zum anderen um

eine Phenoxyethanol-Kultur (□), die vor ihrer Ernte fast eine ganze Woche gekühlt worden war.

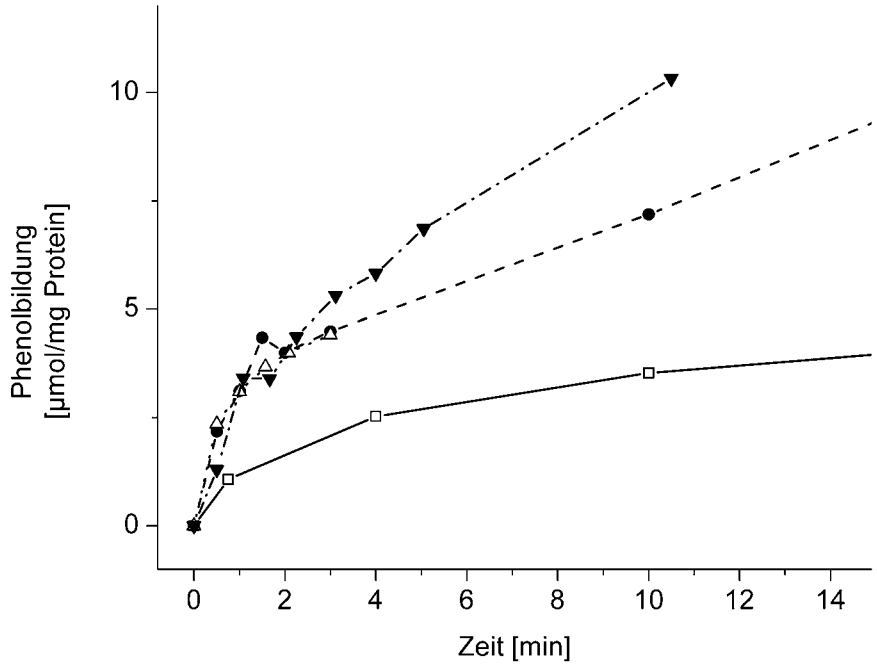



**Abb. 3.13**: Spaltung von Phenoxyethanol durch verschiedene Zellsuspensionen von Stamm LuPhet 1. Phenoxyethanol war jeweils in Konzentrationen von 9-12 mM zugegeben worden, und die eingestellten Proteinkonzentrationen lagen im Bereich von 0,2-1,7 mg/ml. Der Puffer war jeweils Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0 oder 7,5) mit 2,5 mM Titancitrat. Diese Suspensionen katalysierten den Hauptteil der Umsetzung mit spezifischen Aktivitäten, die kleiner als 1 U/mg Protein waren.

Ferner gab es vereinzelt auch Versuche, bei denen keine stabile Hauptaktivität zu ermitteln war (nicht gezeigt), hier haben vermutlich zusätzliche Einflüsse für das anhaltende Verringern der Aktivität gesorgt.

Damit wurde nun ein repräsentativer Querschnitt zur Phenoxyethanol-Spaltung in ganzen Zellen gegeben, wie sie mit Hilfe des diskontinuierlichen Tests erfasst werden konnte. Die Kenndaten der gezeigten Versuche wurden in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tab. 7**: Anfangsaktivitäten und Hauptaktivitäten der Phenoxyethanol-Spaltung von verschiedenen Zellsuspensionen von Stamm LuPhet 1, gegliedert nach dem verwendeten Wachstumssubstrat.

| | Spez. Aktivität in der Anfangsphase (0-30 sec) [U/mg Protein] | Spez. Aktivität in der linearen Phase (Hauptaktivität) [U/mg Protein] | Beginn der linearen Phase | Verhältnis von Anfangs- zu Hauptaktivität |
|---|---|---|---|---|
| mit Phenoxyethanol gewachsene Zellen | | | | |
| ■ (Abb. 3.8, 3.9, 3.10, 3.12) | 9,6 | 1,0 | ab 0,5 min | 10 |
| ● (Abb. 3.9, 3.10, 3.13) | 4,4 | 0,45 | ab 3 min | 10 |
| ○ (Abb. 3.12) | 5,2 | 0,9 | ab 1 min | 6 |
| ▲ (Abb. 3.12) | 6,1 | 0,7 | ab 1,7 min | 9 |
| □ (Abb. 3.13) | 1,4 (0-45 sec) | 0,1 | ab 10 min | 13 |
| mit Lactat gewachsene Zellen | | | | |
| ◇ (Abb. 3.12) | 10,7 | entfällt | | |
| ▽ (Abb. 3.11, 3.12) | 6,1 | 1,0 | ab 0,5 min | 6 |
| △ (Abb. 3.13) | 4,7 | 0,45 | ab 2,1 min | 10 |
| mit PEG 300 gewachsene Zellen | | | | |
| ▼ (Abb. 3.13) | 2,6 | 0,7 | ab 1 min | 3,5 |

Alle dargestellten Zellsuspensionstests wiesen für eine kurze Phase nach Start der Phenoxyethanol-Spaltung eine sehr hohe Aktivität auf (→Anfangsaktivität), die schnell abfiel auf eine Aktivität in der Größenordnung der *in-vivo*-Aktivität oder darunter (→Hauptaktivität). Diese Hauptaktivität blieb in vielen Beispielen über lange Zeit konstant, in anderen Beispielen wurde sie mit der Zeit allmählich kleiner.

Der erste schnelle Rückgang der Aktivität trat immer auf, auch wenn die Versuche in Medium (einschließlich Kohlendioxid, Vitaminen, Salzen, Spurenelementen) durchgeführt wurden (nicht gezeigt), und auch unabhängig davon mit welchem der drei Substrate Phenoxyethanol,

PEG 300 oder Lactat die Zellen angezogen worden waren. Eine vorherige Lagerung schien ebenfalls nicht die Ursache des Aktivitätsrückgangs während der Umsetzung zu sein, denn der Rückgang kam genauso bei frisch geernteten Zellen vor.

Zwischen dem Abfallen der Anfangsaktivität der Phenoxyethanol-Spaltung und dem vollständigen oder unvollständigem Ablaufen der nachfolgenden Aldehyd-Oxidation, bzw. einer Verzögerung dieser Reaktion, ließ sich auch kein Zusammenhang erkennen. Der Rückgang der Anfangsaktivität zur Hauptaktivität trat genauso auf, wenn die Oxidation vollständig und anscheinend synchron ablief (nicht gezeigt).

Die Aktivitätsabnahme in der Anfangsphase wurde in den Reaktionsverläufen immer beobachtet. Außerdem kam es nie vor, dass die Aktivität sich im Laufe der Reaktion wieder steigerte. Hauptaktivitäten in Höhe der *in-vivo*-Rate von 1 U/mg Protein wurden mehrfach gemessen, darüberliegende Werte jedoch nicht. Somit lag die höchste beobachtete Hauptaktivität bei 1,01 U/mg Protein. Im selben Versuch (frisch geerntete Zellen einer phenoxyethanolgewachsenen Kultur) wurde mit 9,6 U/mg Protein (für 0-30 Sekunden nach Start) auch der höchste Wert einer Anfangsaktivität (für phenoxyethanolgewachsene Zellen) gemessen (Abb. 3.12, Symbol ■). Eine sogar noch etwas höhere Anfangsaktivität wurde einmal mit frisch geernteten lactatgewachsenen Zellen gemessen, 10,7 U/mg Protein für das 0-30 Sekunden-Intervall, (Abb. 3.12, Symbol ◇). Hier war aber keine *in-vivo*-Rate bestimmbar, die als Vergleichswert dienen könnte, und evtl. enthalten diese Zellen etwas mehr Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase. Anfangsaktivitäten waren demnach bis zu ca. zehnmal so groß wie die Hauptaktivitäten. In allen Beispielen galt für das Abklingen der Anfangsaktivität, dass spätestens nach 90 Sekunden die Aktivität auf 1 U/mg Protein oder kleinere Werte zurückgegangen war. Auf die verschiedenen Einflüsse schien die Anfangsaktivität sowie die Geschwindigkeit des Abklingens besonders empfindlich zu reagieren, weniger dagegen die Hauptaktivität.

### *3.3.2.2 Untersuchungen mit einem kontinuierlichen Test*

Es wurde geprüft, ob das Abklingen der Anfangsaktivität nur ein Artefakt war, z. B. aufgrund der Randlage des Messintervalls und der Nachweisgrenzen bzw. Mess-Ungenauigkeiten des diskontinuierlichen Testverfahrens. Deshalb wurde zur Messung der Spaltung von Phenoxyethanol durch intakte Zellen in einem Versuch außer dem üblichen diskontinuierlichen Test noch ein anderes Verfahren angewendet. Es konnte auf eine Variante (Frings und Schink, 1994) eines Tests zur Messung der Diol-Dehydratase zurückgegriffen werden. Bei diesem kontinuierlichen gekoppelten Enzymtest wird Acetaldehyd quantifiziert, und zwar indem der NADH-Verbrauch, der während der Reduktion des Acetaldehyds durch eine Alkoholdehydrogenase entsteht, aufzeichnet wird. Die mit diesem Verfahren für ganze Zellen ermittelten Raten der Acetaldehydbildung (d. h. Phenoxyethanol-Spaltungsaktivitäten) sind allerdings mit etwas Vorsicht zu genießen, sie könnten gegenüber den tatsächlichen Werten zu klein sein, aufgrund des intrazellulären Verbrauchs von Acetaldehyd in der konkurrierenden Acetaldehyd-Oxidation. Außerdem sollte man bedenken, dass mit diesem Testverfahren nur der Umsatz der ersten 0,2 mM Substrat erfasst wurde, da der Messbereich durch die vorgelegte NADH-Konzentration begrenzt wurde.

Die parallelen Messungen mit diskontinuierlichem und kontinuierlichem Test (Abb. 3.14) ergaben, dass die erhaltenen spezifischen Anfangsaktivitäten[1] zumindest in ihrer Größenordnung jeweils übereinstimmten (Tab. 8).

Außerdem wurde auch im kontinuierlichen Test ein bereits ab ca. 20 Sekunden nach Start der Reaktion einsetzendes Abnehmen der spezifischen Aktivität festgestellt. Danach (soweit es noch im Aufzeichnungsbereich erfasst werden konnte) lief die NADH-Abnahme mit kleinerer aber konstanter Aktivität weiter, was an die Hauptaktivitäts-Phase im diskontinuierlichen Test erinnerte (Abb. 3.14).

[1] In den diskontinuierlichen Versuchen wurde manchmal das Acetat gegenüber der Phenoxyethanol-Spaltung verzögert gebildet, und nicht immer in der vollen Menge. Vermutlich lief besonders bei Phenoxyethanol-Spaltungsraten von mehreren U/mg Protein die Aldehyd-Oxidation im Vergleich zur Aldehyd-Bildung langsam ab. Deshalb dürfte im kontinuierlichen Test in der Anfangsphase der Phenoxyethanol-Spaltung eine Unterschätzung der Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität aufgrund der intrazellulären Acetaldehyd-Oxidation noch relativ klein ausfallen.

**Tab. 8**: Vergleich der Aktivitätswerte, die in diskontinuierlichen und kontinuierlichen Messungen von mehreren Aliquoten einer Zellsuspension ermittelt wurden. Die Signaturen beziehen sich auf die zugehörigen Kurven in Abbildung 3.14.

| Aliquot | Messverfahren | Spez. Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung (in Anfangsphase) [U/mg Protein] | Proteinkonzentration im Test [mg/ml] |
|---|---|---|---|
| ZS-I (—■—) | diskontinuierlich (Intervall 0-30 sec) | **6,1** | 0,8 |
| ZS-II (·····) | kontinuierlich | **4,8** | 0,064 |
| ZS-III (—) | kontinuierlich | **5,0** | 0,064 |
| ZS-IV (- -) | kontinuierlich | **3,0** | 0,032 |
| ZS-V (-··) | kontinuierlich | **2,1** | 0,064 |

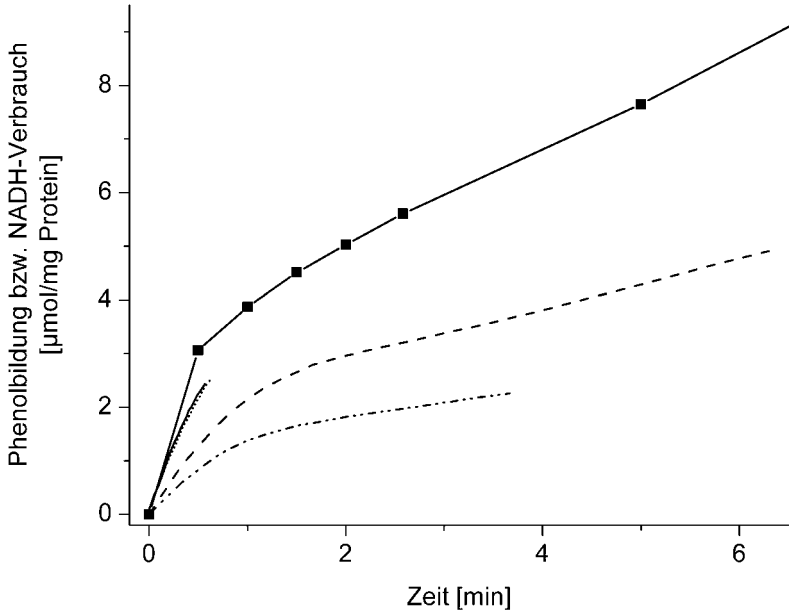



**Abb. 3.14**: Phenoxyethanol-Spaltung durch Zellsuspensionen von Stamm LuPhet 1, ermittelt als Phenolbildung mit einem diskontinuierlichen Test (—■—), bzw. als NADH-Verbrauch mit einem kontinuierlichen Test ((·····), (—), (- -), (-··)). Als Puffer wurde Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,5) mit Titancitrat verwendet (2,5 mM beim diskontinuierlichen bzw. 0,5 mM beim kontinuierlichen Test).

Die Aktivitätsmessungen von Zellsuspension mit Hilfe des NADH-gekoppelten Tests ergaben außerdem, dass es sich beim Aktivitätsrückgang in der Anfangsphase um eine spezifische Eigenschaft der Phenoxyethanol-Spaltung zu handeln schien, denn bei der Dehydratisierung von Ethylenglycol oder Propandiol durch ganze Zellen traten diese Aktivitätsabnahmen nicht auf. Mit diesen Substraten wurden stattdessen sich allmählich steigernde NADH-Abnahmeraten beobachtet.

Wie ausführlich beschrieben wurde, ist bei allen Phenoxyethanol-Spaltungen mit ganzen Zellen von Stamm LuPhet 1 die anfängliche Rate nach kurzer Zeit deutlich kleiner geworden. Es handelte sich um einen offensichtlich unvermeidbaren Aktivitätsrückgang, der an die Substratpräsenz und an das Ablaufen der Reaktion gebunden war, um eine Inaktivierung während der Phenoxyethanol-Spaltungsreaktion. Der typische Aktivitätsverlauf wurde folglich dadurch verursacht, dass durch die Zugabe des Phenoxyethanols zu gewaschenen ruhenden Zellen die Reaktion in allen Zellen gleichzeitig gestartet wurde und auch in vielen Zellen gleichzeitig aufhörte. Eigentlich war das Niveau der Aktivität vor der Inaktivierung unnatürlich hoch, in vielen Versuchen lag die Aktivität nach dem Aktivitätsabfall noch immer ungefähr auf Höhe der *in-vivo*-Aktivität.

Meistens hängt ein einsetzender Aktivitätsrückgang mit dem Auftreten einer Limitierung oder Hemmung zusammen. Bei den Messungen wurde bei beiden Verfahren (diskontinuierlicher bzw. kontinuierlicher Test) ungefähr zur selben Zeit (bei ca. 30 sec) der Rückgang der Anfangsaktivität sichtbar. Aufgrund der jeweils ähnlichen spezifischen Anfangsaktivitäten entsprach dieser Zeitpunkt jeweils einem ähnlichen auf die eingesetzte Proteinmenge bezogenen Substratumsatz. Während der Phenoxyethanol-Spaltung herrschten bei den Messverfahren jedoch relativ unterschiedliche Zellkonzentrationen (Tab. 8). Folglich lag auch ein zweistelliger Faktor zwischen den jeweiligen extrazellulären Konzentrationen von Edukten oder Produkten zum Zeitpunkt des einsetzenden Aktivitätsrückgangs. Dadurch schieden extrazelluläre Konzentrationen als limitierende oder störende Faktoren aus, wie es bereits verschiedene der diskontinuierlichen Versuche nahegelegt hatten. Stattdessen konnte es bedeuten, dass das Enzym nach Erreichen einer gewissen Zahl von Katalysezyklen inaktiv geworden war, sei es, weil sich dann *intra*zellulär eine bestimmte Konzentration von Acetaldehyd oder Phenol aufgestaut hatte und die Lyase geschädigt hatte, oder weil es sich um eine gewissermaßen durch die Enzymkonstruktion bedingte Zahl von Durchgängen handelte, nach der das Enzym von selbst inaktiv wurde.

### 3.3.3 Vergleich von ganzen Zellen und zellfreiem Extrakt

In Abbildung 3.15 sind Messungen dargestellt, die mit Zellen bzw. Zellextrakt einer einzigen Zellernte durchgeführt wurden. Es wurden jeweils beide Testverfahren (diskontinuierlicher und kontinuierlicher Test) angewendet. Die mit intakten Zellen erhaltenen Ergebnisse wurden bereits im vorigen Abschnitt erläutert (Abb. 3.14 und Tab. 8). Der Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5) enthielt jeweils Titancitrat (2,5 mM beim diskontinuierlichen bzw. 0,5 mM beim kontinuierlichen Test).

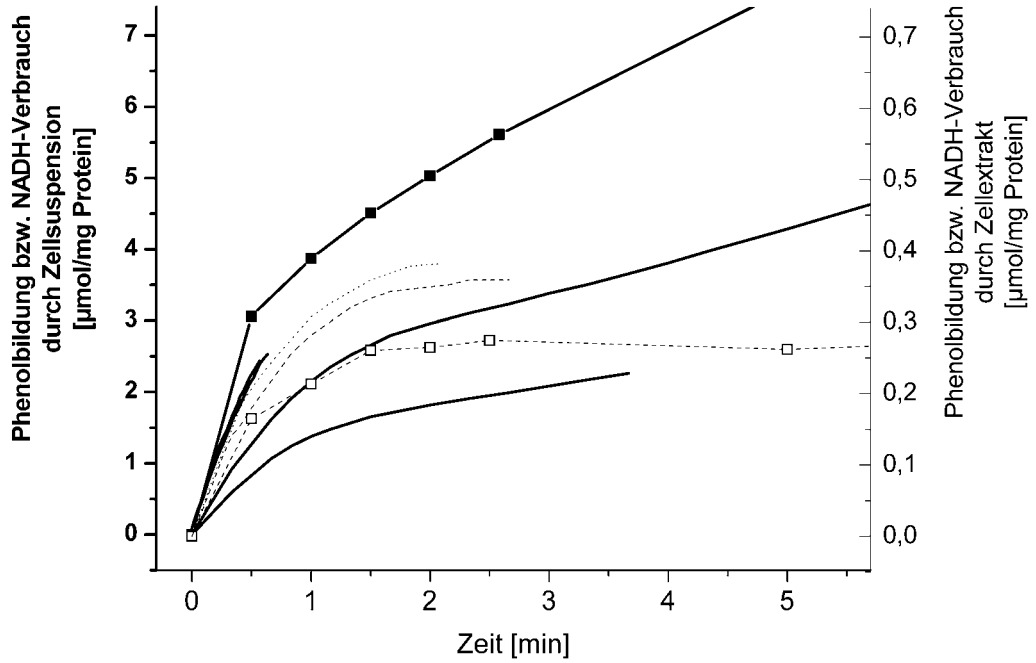



**Abb. 3.15**: Phenoxyethanol-Spaltung durch ganze Zellen (durchgezogene Linien, ■) bzw. durch Zellextrakt (gestrichelte und gepunktete Linien, □) von Stamm LuPhet 1, gemessen als Phenolbildung im diskontinuierlichen Test (■, □) bzw. als NADH-Abnahme im Zuge der Acetaldehyd-Reduktion im kontinuierlichen Test ((—), (·····), (– –), (·····)). Es ist zu beachten, dass sich die Maßstäbe der Aktivitäten für Zellsuspension bzw. Zellextrakt um eine Größenordnung unterscheiden.

Wie sich schon für ganze Zellen gezeigt hatte, ergaben auch für Extrakt beide Messverfahren ungefähr übereinstimmende spezifische Aktivitäten mit 0,33 U/mg Protein im diskontinuierlichen Test (für das Intervall 0-30 sec), bzw. mit 0,42 U/mg Protein und 0,43 U/mg Protein im kontinuierlichen Test. Die mit Zellextrakt gemessenen spezifischen Anfangsaktivitäten

(Tab. 9) waren wesentlich geringer als jene mit der Zellsuspension gemessenen, jedoch höher als die früheren Messungen von Frings und Schink (1994). Wiederum unterschieden sich die bei diskontinuierlichem und kontinuierlichem Verfahren eingesetzten Proteinkonzentrationen deutlich (Faktor 25).

Die Zellextrakt-Aliquote für den kontinuierlichen und den diskontinuierlichen Test waren unterschiedlich lange gelagert worden, da sich dies experimentell nicht vermeiden ließ, dies galt auch für die Aliquote der Suspension.

**Tab. 9**: Vergleich der Aktivitätswerte, die in diskontinuierlichen und kontinuierlichen Messungen von mehreren Aliquoten eines zellfreien Extrakts ermittelt wurden. Die Signaturen beziehen sich auf die zugehörigen Kurven in Abbildung 3.15. Der Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,5) enthielt beim diskontinuierlichen Test 2,5 mM Titancitrat, beim kontinuierlichen Test 0,5 mM Titancitrat.

| Aliquot | Messverfahren | Spez. Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung (in Anfangsphase) [U/mg Protein] | Proteinkonzentration im Test [mg/ml] |
|---|---|---|---|
| ZE-I (—□—) | diskontinuierlich (Intervall 0-30 sec) | **0,33** | 2,3 |
| ZE-II (--) | kontinuierlich | **0,42** | 0,09 |
| ZE-III (·····) | kontinuierlich | **0,43** | 0,09 |

Übereinstimmend mit der viel geringeren Aktivität von Extrakt wurde auch nur ein sehr kleiner Umsatz beobachtet, denn nach ca. 2 Minuten war mit Zellextrakt bei beiden Messverfahren die Aktivität vollständig zum Erliegen gekommen (Abb. 3.15), dabei war im gekoppelten Test noch nicht alles NADH verbraucht worden. Durch anschließende HPLC-Analyse jener Ansätze konnte ausgeschlossen werden, dass weiterhin Phenoxyethanol-Spaltung stattgefunden hatte, die nur nicht als Netto-NADH-Abnahme sichtbar geworden wäre. Wäre das Abnehmen der Reaktionsrate jeweils durch eine Hemmung der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase durch zu hohe intrazelluläre Produktkonzentrationen verursacht worden, sollten sich bei Verwendung von zellfreiem Zellextrakt, anstelle von ganzen Zellen, aufgrund der damit einhergehenden Verdünnung im Testansatz diese hemmenden Konzen-

trationen erst nach viel größeren Umsätzen entwickeln können. Da jedoch die Aktivität bei Verwendung von Zellextrakt, anstelle von ganzen Zellen, bereits nach viel geringeren absoluten wie proteinbezogenen Umsätzen zurückging, sogar völlig zum Erliegen kam, (Abb. 3.15), schied die intrazelluläre Anhäufung von Produkten als Erklärung der Inaktivierung ebenfalls aus.

Die Verlaufskurven der Phenoxyethanol-Spaltung für Zellextrakt und Zellsuspension waren sich recht ähnlich, wenn auch etwa eine Größenordnung zwischen den jeweiligen proteinbezogenen Umsätzen lag und bei der Zellsuspension die Aktivität nicht auf null sondern nur bis auf den stabilen Wert der Hauptaktivität zurückging. Das schnelle Abklingen der anfänglichen Aktivität war also nicht durch die Verwendung ganzer Zellen bedingt gewesen, sondern trat genauso mit Zellextrakt auf. Die Aktivität von Extrakt war nach ungefähr derselben Zeit bei null angelangt, nach der sich bei den Zellsuspensionsversuchen gerade eine konstante Aktivität eingestellt hatte (Abb. 3.15).

### 3.3.4 Charakterisierung im Zellextrakt

Mit ganzen Zellen konnte die Phenoxyethanol-Spaltung gut gemessen werden. Im nächsten Schritt sollte eine zuverlässige Phenoxyethanol-Spaltung im zellfreien System erreicht werden. Bis es gelang, die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase im Zellextrakt so weit aktiv zu halten, dass die Reaktion erfasst werden konnte, erfolgten die Messungen mit dem diskontinuierlichen Verfahren; eine Charakterisierung des Enzyms mit Hilfe des diskontinuierlichen Tests wäre jedoch sehr aufwendig gewesen. Die weiteren Versuche wurden dann hauptsächlich in Form eines kontinuierlichen photometrischen Tests ausgeführt, auch weil sich die Anfangsaktivität damit gut erfassen lassen sollte.
Einen solchen Enzymtest hatten schon Frings und Schink (1994) zur Messung der Phenoxyethanol-Spaltung eingesetzt; in der vorliegenden Arbeit wurde dessen Zusammensetzung noch geringfügig verändert. Bei diesem kontinuierlichen gekoppelten Enzymtest wird an die Acetaldehydbildung im Zuge der Phenoxyethanol-Spaltung eine enzymatische Reduktion des Acetaldehyds zu Ethanol angefügt, durch Zusatz von NADH und Hefe-Alkoholdehydrogenase. Als Maß für die Phenoxyethanol-Spaltung dient die Rate der NADH-Abnahme während der Acetaldehyd-Reduktion. Wegen der Sauerstoff-Empfindlichkeit der Phenoxyethanol-Spaltung wurde der Test immer unter Luftausschluss durchgeführt (Frings und Schink, 1994).

Zur Untersuchung der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase wurde in dieser Arbeit nur zellfreier Extrakt eingesetzt, keine weiter angereicherten Fraktionen, da die Aktivität dieses Enzyms nicht stabil war. Bereits auf dem Weg von der Zellsuspension zur Aktivitätsmessung des Extrakts waren die Verluste an aktivem Enzym jeweils relativ groß. Die Zellen von Stamm LuPhet 1, aus denen die zellfreien Extrakte gewonnen wurden, waren jeweils auf *D,L*-Lactat gewachsen. Sämtliche Präparationen und Messungen wurden unter anoxischen, reduzierenden Bedingungen durchgeführt, Puffer enthielten hierfür grundsätzlich 2,5 mM des Reduktionsmittels Titancitrat (wenn nicht anders angegeben).

#### *3.3.4.1 Kontrolle des Testverfahrens*

Durch verschiedene Kontrollen wurde überprüft, ob der gekoppelte Test beim gewählten Vorgehen und der gewählten Zusammensetzung tatsächlich funktionierte. Die Spaltung von Phenoxyethanol lief nur ab, wenn Stamm-LuPhet-1-Zellextrakt zugegeben wurde, dabei war die absolute Aktivität proportional zur Zellextraktmenge, und die spezifische Aktivität war unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration. Es war unerheblich, ob die Reaktion mit der Zugabe von Zellextrakt oder dem Substrat Phenoxyethanol gestartet wurde, die NADH-Abnahmeraten waren jeweils gleich. Vor dem Start der Reaktion hatten die Ansätze, die bereits alle Komponenten enthielten (bis auf das Substrat oder den Zellextrakt) jeweils keine oder nur eine minimale Änderung der Absorption mit der Zeit gezeigt.

Der Einsatz der halben oder der doppelten ADH-Aktivitätsmenge (bezogen auf 30 U je Küvette) bzw. der halben NADH-Konzentration schien keinen Einfluss auf die Höhe der gemessenen Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität zu haben. Ebenso wenig hatte das 1-tägige Aufbewahren (bei 4°C) des Reaktionsgemischs (ohne Zellextrakt und Phenoxyethanol, aber einschließlich NADH und ADH) eine Auswirkung auf die gemessene Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität.

Als Ansätzen, die eine hohe Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität aufwiesen und in denen die 0,2 mM NADH der normalen Testmischung bereits vollständig oxidiert waren, eine zweite Portion 0,2 mM NADH zugegeben wurde, wurde dieses NADH augenblicklich oxidiert. Seit Verbrauch der ersten 0,2 mM bis zum zweiten NADH-Zusatz war bereits wieder eine entsprechende Menge an Acetaldehyd entstanden. Dies zeigte, dass der Acetaldehyd unabhängig davon gebildet wurde, ob er entfernt wurde oder nicht.

Wenn in der Testmischung weitere Zusätze enthalten waren oder wenn Ansätze nur eine geringe Aktivität gezeigt hatten, wurde anschließend kontrolliert, ob die Nachweisreaktion

funktionierte, sonst erfolgte diese Überprüfung zumindest stichprobenartig. Dabei hatte sich die Alkoholdehydrogenase-Teilreaktion immer als funktionierend erwiesen.
Als Maximalwerte der *absoluten* Anfangsaktivitäten pro Ansatz wurden 1,1 U gemessen. Sonst lagen die Aktivitäten stets unter 1 U pro Küvette, z. T. waren sie sogar sehr viel kleiner. Aus diesen Beobachtungen wurde abgeleitet, dass bei der gewählten Zusammensetzung tatsächlich die Phenoxyethanol-Spaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion war.
Außerdem wurden Ansätze, deren Start durch den Zellextrakt-Zusatz erfolgte, bei denen folglich kein vorheriger Kontakt von ADH und Zellextrakt stattfinden konnte, mit Ansätzen verglichen, bei denen diese Komponenten bereits einige Minuten in Kontakt waren, bevor die Umsetzung durch die Zugabe von Phenoxyethanol gestartet wurde. Die gemessenen Aktivitäten unterschieden sich jedoch nicht.

Das gewählte Verfahren erwies sich insgesamt als geeignet, die Rate der Phenoxyethanol-Spaltung wiederzugeben. Die spezifischen Anfangsaktivitäten bestätigten das, denn die derart mit Zellextrakt gemessenen Maximalwerte (9-11 U/mg Protein) stimmten sehr gut mit den bei ganzen Zellen (aus der selben Anzucht stammend) durch diskontinuierliche Messung erhaltenen Maximalwerten überein (siehe Kapitel 3.3.2).

#### *3.3.4.2 Rate der Phenoxyethanol-Spaltung*

Die mit Lactat-Zellextrakt gemessenen maximalen Werte der spezifischen Anfangsaktivitäten lagen bei 9-11 U/mg Protein. Dabei handelte es sich um Ansätze ohne sonstige Zusätze. Insgesamt wurden Anfangsaktivitäten im Bereich von 10 bis ca. 0,1 U/mg Protein gemessen, oft von etwa 1 U/mg Protein.

#### *3.3.4.3 Zeitlicher Verlauf der Phenoxyethanol-Spaltung*

Die Rate der Phenoxyethanol-Spaltung, genaugenommen die Rate des NADH-Verbrauchs während der Messung der Phenoxyethanol-Spaltung, war nicht konstant, sondern wurde kontinuierlich kleiner, wobei die (ungefähr lineare) Phase der Anfangsaktivität höchstens eine Minute anhielt. Die Reaktionsrate nahm weiter ab, bis nach spätestens 3,5 Minuten kein NADH mehr verbraucht wurde (obwohl noch vorhanden). Diese Zeitspanne bis zum vorzeitigen Stillstand der NADH-Konzentration bei einer Restkonzentration von NADH größer Null, diente als ein ungefähres Maß für die Dauer der Phenoxyethanolspaltung; im

weiteren Verlauf wird die Dauer der Phenoxyethanolspaltung einfach als Aktivitätsdauer bezeichnet. Warum die Zeitspanne bis zum NADH-Minimum möglicherweise nur ungefähr mit der Aktivitätsdauer übereinstimmte, wird im folgenden Abschnitt (3.3.4.4 ) erläutert.

Manchmal wurde in den aufgezeichneten NADH-Verläufen der gesamte Rückgang der Reaktionsrate abgebildet. Der Zusatz einer zweiten Portion Zellextrakt zu solch einem Ansatz bewirkte einen erneuten NADH-Verbrauch mit kontinuierlich abnehmender Rate, dagegen bewirkte der zweite Zusatz von Phenoxyethanol keine NADH-Konzentrationsänderung. Bei einer großen Menge an aktivem Enzym war dagegen das zugesetzte NADH (0,2 mM) innerhalb kurzer Zeit (weniger als 3,5 min) vollständig verbraucht worden, sodass das Erliegen der Aktivität nicht mehr in den aufgezeichneten Bereich fiel. Es hing somit von der im jeweiligen Ansatz vorhandenen Menge an aktiver Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase ab, ob die gesamte Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit oder nur ein Teil davon im NADH-Verlauf sichtbar wurde.

#### *3.3.4.4 Suche nach der Ursache der Aktivitätsabnahme während des Umsatzes von Phenoxyethanol*

Es gab zwischenzeitlich den Verdacht, dass der kontinuierliche Rückgang der Rate des NADH-Verbrauchs durch das Einsetzen einer NADH-regenerierenden Nebenreaktion verursacht worden sein könnte. Enzyme und Coenzyme des Zellextrakts könnten entstehenden Acetaldehyd mit Hilfe des akkumulierenden $NAD^+$ möglicherweise zu Acetat *oxidieren*. Bei einer solchen Disproportionierung von Acetaldehyd würde die NADH-Oxidation die Acetaldehyd-Bildung nicht vollständig abbilden.

Bei der Aktivitätsmessung von entsalztem Zellextrakt verlief die NADH-Oxidation allerdings nach wie vor in typischer Weise abklingend, und die Höhe der Aktivität entsprach etwa der Aktivität von nicht-entsalztem Zellextrakt. Das sprach gegen das Ablaufen einer von der niedermolekularen Fraktion abhängigen, enzymatischen Aldehyd-Oxidationsreaktion als einziger Ursache für das im Zuge des Substratumsatzes stets auftretende kontinuierliche Zurückgehen der NADH-Verbrauchsrate.

In diesem Zusammenhang erwies es sich auch als nützlich, dass mit der Diol-Dehydratase im Zellextrakt eine weitere Acetaldehyd-bildende Aktivität enthalten war. Damit die Dehydratisierung von Ethylenglycol stattfinden konnte, musste den Ansätzen bei sonst gleichbleibender

Testzusammensetzung meist noch Coenzym $B_{12}$ zugegeben werden (siehe Kapitel 3.2.2), während die Phenoxyethanol-Spaltung vom Zusatz des Coenzyms $B_{12}$ unabhängig war (siehe Abschnitt 3.3.4.11). Die Ethylenglycol-dehydratisierenden Ansätze zeigten jeweils eine langanhaltende NADH-Abnahme mit gleichbleibender Rate des NADH-Verbrauchs. Der unterschiedliche Verlauf der NADH-Kurven beim Umsatz von Phenoxyethanol bzw. Ethylenglycol wurde besonders in Ansätzen offensichtlich, denen beide Acetaldehyd-liefernden Substrate nacheinander zugesetzt wurden, siehe Abbildung 3.16. Die gebogene Form der NADH-Kurve bei der Messung der Phenoxyethanol-Spaltung ließ sich also nicht auf die Aldehyd-Nachweisreaktion zurückführen, denn diese war für die beiden Substrate Ethylenglycol und Phenoxyethanol gleich. Eine durch Zellextrakt-Enzyme katalysierte Aldehyd-Oxidation konnte somit nicht die eigentliche Ursache der gebogenen NADH-Kurven sein, wenngleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieser Prozess teilweise stattfand. Der Rückgang der Umsatzrate musste stattdessen bei der Primärreaktion aufgetreten sein, der Reaktion der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase.

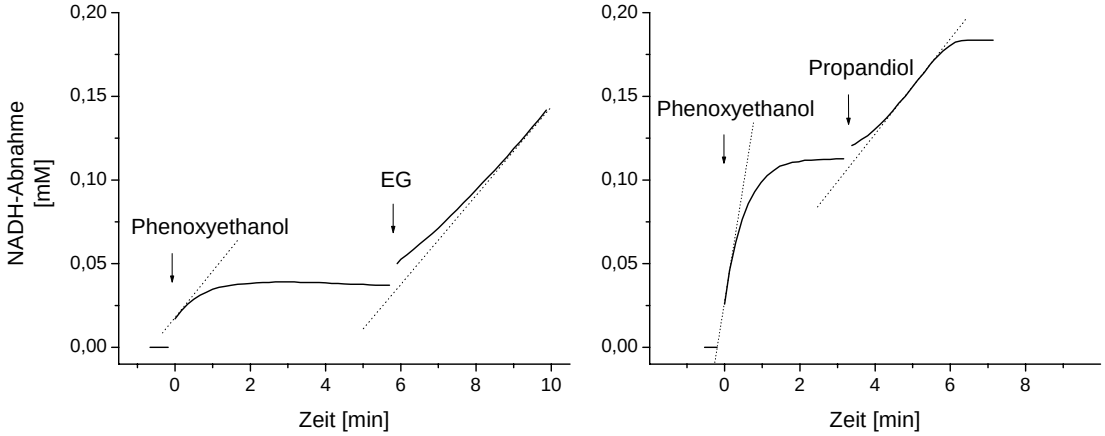



**Abb. 3.16**: Verlauf der NADH-Konzentration im gekoppelten Enzymtest, gemessen anhand der Abnahme von $E_{365}$. Die Ansätze enthielten 57 µM Coenzym $B_{12}$ in Titancitrat-reduziertem (0,5 bzw. 2,5 mM) Puffer (50 mM Kaliumphosphat mit 0,5 M KCl, pH 7,5). Zum Zeitpunkt Null waren außer dem Substrat alle erforderlichen Testkomponenten einschließlich Zellextrakt bereits enthalten.

Die Unvermeidbarkeit des Rückgangs der Umsatzrate und der in sämtlichen Versuchen mit Extrakt ähnliche Zeitverlauf der Reaktionsrate wiesen darauf hin, dass die Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung stets von sich aus innerhalb weniger Minuten bis auf null abnahm, dass also im Zuge des Substratumsatzes durch Extrakt ein vollständiger Aktivitätsverlust eintrat. Dieses Inaktivieren der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase während der Reaktion

war bereits durch die Versuche mit ganzen Zellen und die diskontinuierlichen Tests mit Zellextrakt nahegelegt worden (Abschnitte 3.3.2 und 3.3.3). Im Unterschied zu intakten Zellen wurde das Enzym in Extrakt anscheinend nicht mehr reaktiviert (Abschnitt 3.3.3 und Diskussion, Abschnitt 4.2.3.1).

#### *3.3.4.5 Unterscheidung von Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase und Diol-Dehydratase*

Anhand der unterschiedlichen Verläufe der Aldehydbildung bei Phenoxyethanol-Spaltung bzw. Diol-Dehydratisierung (Abb. 3.16) konnte auch gezeigt werden, dass die Diol-Dehydratisierungsreaktion und die Phenoxyethanol-Spaltungsreaktion unabhängig voneinander abliefen. In einem Coenzym-$B_{12}$-haltigen Ansatz katalysierte Zellextrakt zum Beispiel eine mit konstanter Rate ablaufende Aldehydbildung aus Propandiol. Bei Zusatz von Phenoxyethanol zu dieser Reaktion verstärkte sich die Aldehydbildung für kurze Zeit, fiel aber bald wieder auf eine konstante Rate ab, auf jene Rate, mit der die Reaktion vor der Zugabe von Phenoxyethanol abgelaufen war. Bei umgekehrter Reihenfolge der Substrat-Zugaben lief nach Phenoxyethanol-Zusatz zunächst für kurze Zeit eine Aldehydbildung ab, deren Rate kontinuierlich kleiner wurde und bis auf null zurückging. Danach wurde Propandiol zugegeben, woraus Aldehyd in einer anhaltenden Reaktion mit gleichbleibender Rate gebildet wurde. In diesen Beispielen haben jeweils beide Reaktionen stattgefunden, die Phenoxyethanol-Spaltung und die Diol-Dehydratisierung. In einem anderen Ansatz war Zellextrakt mit Phenoxyethanol nicht aktiv; es erfolgte keine Aldehydbildung. Auch der Zusatz von Coenzym $B_{12}$ änderte nichts daran. Nach Zusatz von Propandiol stellte sich dann eine konstante anhaltende Aldehydbildung ein. In einem weiteren Ansatz, der ebenfalls Coenzym $B_{12}$ enthielt, katalysierte Zellextrakt eine Aldehydbildung aus Ethylenglycol, ebenfalls mit konstanter Rate. Die Rate der Aldehydbildung änderte sich nicht, nachdem Phenoxyethanol als weiteres Substrat zugesetzt wurde. In diesen beiden Beispielen lief jeweils nur die Dehydratisierung aber keine Phenoxyethanol-Spaltung ab. Das Gleichbleiben der Aktivität zeigte zudem, dass die Präsenz von Phenoxyethanol keine Hemmung der Dehydratisierungsaktivität verursachte. Umgekehrt gab es auch Ansätze, ohne zugesetztes Coenzym $B_{12}$, bei denen keine Reaktion mit Ethylenglycol oder Propandiol erfolgte, die jedoch bei anschließender Zugabe von Phenoxyethanol für kurze Zeit eine Aldehydbildung mit kontinuierlich abnehmender Rate katalysierten.

Es kam bei den Versuchen somit vor, dass in einem Ansatz beide Reaktionen katalysiert wurden, oder dass nur eine von beiden ablief, mal nur die Phenoxyethanol-Spaltung, mal nur die Diol-Dehydratisierung. Phenoxyethanol wurde von der Diol-Dehydratase-Aktivität nicht

gespalten, und die Substrate Ethylenglycol und Propandiol wurden von aktivem, Phenoxyethanol-spaltendem Enzym nicht umgesetzt. Diese Unabhängigkeit der beiden Reaktionen war ein deutlicher Beleg dafür, dass es sich um verschiedene Enzyme handelte.

#### *3.3.4.6 Stabilität der Aktivität*

Die Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase nahm nicht nur während des Substratumsatzes ab. Aktivität ging auch in Abwesenheit von Substrat verloren (während des Aufbewahrens von Zellen oder Zellextrakt), trotz Sauerstoffausschluss und Zusatz von Reduktionsmittel, wenn auch wesentlich langsamer als bei Umsatz. Diese Verluste im Ruhezustand fielen von Mal zu Mal sehr unterschiedlich aus; es zeigten sich aber die folgenden Tendenzen.

Normalerweise blieb von der ursprünglichen Enzymaktivität mehr übrig, wenn nicht Zellextrakte sondern intakte Zellen aufbewahrt wurden. Nach mehrtägigem Lagern (in flüssigem Stickstoff oder bei 4°C) enthielten Zellsuspensionen noch häufig Phenoxyethanol-spaltende Aktivität, während zellfreie Extrakte diese Aktivität dadurch meistens verloren hatten.

Bei Versuchen mit zellfreien Extrakten (sie enthielten jeweils 2,5 mM Titancitrat), bei denen keine Zwischenentnahmen durchgeführt wurden, war nach 8-stündigem Aufbewahren bei Raumtemperatur z. B. nur noch knapp 20 % der ursprünglichen Aktivität enthalten, dagegen war nach 8 Stunden Kühlen bei 4°C noch ca. 90 % übrig. Nach 24 Stunden bei 4°C war in der Regel zwischen 1/3 und 2/3 der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Kühlen war bei diesen Zeitspannen günstiger als Einfrieren, gemessen an der restlichen Aktivität nach eintägigem Kühlen überstand nochmals ein bis zwei Drittel weniger das eintägige Tiefkühlen in flüssigem Stickstoff. Ähnliches galt für Zellsuspensionen. Dort waren eine für 4,5 Stunden gekühlte und eine in flüssigem Stickstoff für 3 Tage eingefrorene Zellsuspension verglichen worden (Abb. 3.9). Die Phenoxyethanol-Spaltung wurde von der vormals eingefrorenen Zellsuspension halb so schnell katalysiert wie von der zwischenzeitlich gekühlten Portion.

Entsalzen verbesserte die Lagerfähigkeit: die Aktivität von entsalztem zellfreiem Extrakt ging durch 2 Tage Lagern bei 4°C ohne Zwischenentnahmen nur auf ca. 85 % zurück, während sie ohne vorheriges Entsalzen auf 50 % zurückging.
Der Zusatz einer kommerziell erhältlichen Proteinase-Inhibitor-Mischung wirkte schädlich (EDTA-haltig, sonstige Zusammensetzung unbekannt). Zellfreier Extrakt, dem die Mischung zugesetzt wurde (Konzentration laut Herstellerempfehlung), zeigte nach einem Tag Lagern

bei 4°C ohne Zwischenentnahmen nur noch knapp 10 % der Aktivität im Vergleich zu zellfreiem Extrakt ohne diesen Zusatz.

Wurden Zwischenentnahmen getätigt, waren in der Regel auch die Verluste größer: In Tabelle 10 ist zum Beispiel die Abnahme der Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität im Laufe eines Messdurchgangs dargestellt. Die letzten Messungen des Durchgangs erreichten hier noch knapp 80 % der Aktivität der ersten Messungen, welche ca. anderthalb Stunden früher stattgefunden hatten. Sonst kann als eine Faustregel gelten, dass innerhalb eines Durchgangs die Phenoxyethanol-Spaltungsrate des Extrakts auf ca. die Hälfte der Ausgangsaktivität zurückging.

**Tab. 10**: Aktivitätsverlust von zellfreiem Extrakt im Laufe eines Messdurchgangs, erfasst anhand der regelmäßigen Messung von Standardansätzen. Die gesamte Messung dauerte etwa 1,5 Stunden und umfasste 36 Küvetten. Angegeben wurden nur die Aktivitäten dieser Standardansätze, als Mittelwerte aus jeweils 3 Küvetten.

| Nummer der Standardansätze innerhalb der Messfolge | Spez. Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung [U/mg Protein] |
|---|---|
| 1-3 | **1,86** |
| 10-12 | **1,62** |
| 19-21 | **1,66** |
| 34-36 | **1,45** |

### *3.3.4.7 Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration*

Um zu prüfen, ob die spezifische Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängig war, wurden in einer Versuchsreihe die Aktivitäten bei 6 verschiedenen Proteinkonzentrationen gemessen. Gleichzeitig sollte auch geprüft werden, ob die Lagerung bei einer geringeren Proteinkonzentration die Phenoxyethanol-Spaltung stärker beeinträchtigen würde als bei einer höheren Proteinkonzentration, weil dadurch z. B. der Verlust von lose gebundenen Cofaktoren oder ein Zerfallen des Enzyms in Untereinheiten gefördert werden könnte.

Hierfür wurde die Proteinkonzentration in einem Teil des zellfreien Extrakts mit Puffer auf ein Viertel der Ausgangsproteinkonzentration verdünnt. Verdünnter und unverdünnter Extrakt wurden vor der eigentlichen Messung jeweils 4 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Die mittleren Proteinkonzentrationen der verschiedenen Konzentrationen im Test wurden sowohl von unverdünntem als auch von verdünntem Zellextrakt ausgehend angesetzt. Es wurden auch zwei verschiedene Arten der Zellextrakt-Zugabe angewandt (Zugabe in der Anaerobenkammer oder mit Hilfe einer gasdichten Spritze am Arbeitsplatz).
Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Bei jedem Ansatz der Versuchsreihe endete die NADH-Oxidation bereits vor dem vollständigen Umsatz der verfügbaren 0,2 mM NADH. Die Abbildungen 3.17 A und 3.17 B zeigen jeweils, dass es keine Aktivitätsunterschiede gab, die auf die unterschiedlichen Zugabe-Verfahren zurückzuführen waren. Es wurden deshalb Durchschnittswerte aus den Zahlen der beiden Verfahren gebildet und in Abbildung 3.17 C aufgetragen. Man kann erkennen, dass die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen im Test keinen wesentlichen Einfluss auf die spezifische Aktivität hatten. Die spezifischen Aktivitäten, die ausgehend vom verdünnten Extrakt erhalten wurden, waren jeweils etwas größer als jene, die mit dem unverdünnten Extrakt erhalten wurden. Es schien jedoch keinen Zusammenhang in der Art einer Abnahme der spezifischen Aktivität mit zunehmender Verdünnung der Proteinkonzentration zu geben.

Die absolute Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase war folglich proportional zur eingesetzten Zellextrakt-Menge, und die spezifische Aktivität war unabhängig von der im Test herrschenden Proteinkonzentration.
Diese Befunde sprachen somit nicht für das Vorhandensein von lose gebundenen Cofaktoren bei der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase, denn besonders die spezifische Aktivität in den Ansätzen mit geringerer Proteinkonzentration, die aus dem vorverdünnten Zellextrakt angesetzt wurden, waren nicht kleiner als die spezifischen Aktivitäten bei den höheren Proteinkonzentrationen, die von unverdünntem Zellextrakt ausgehend eingestellt wurden.

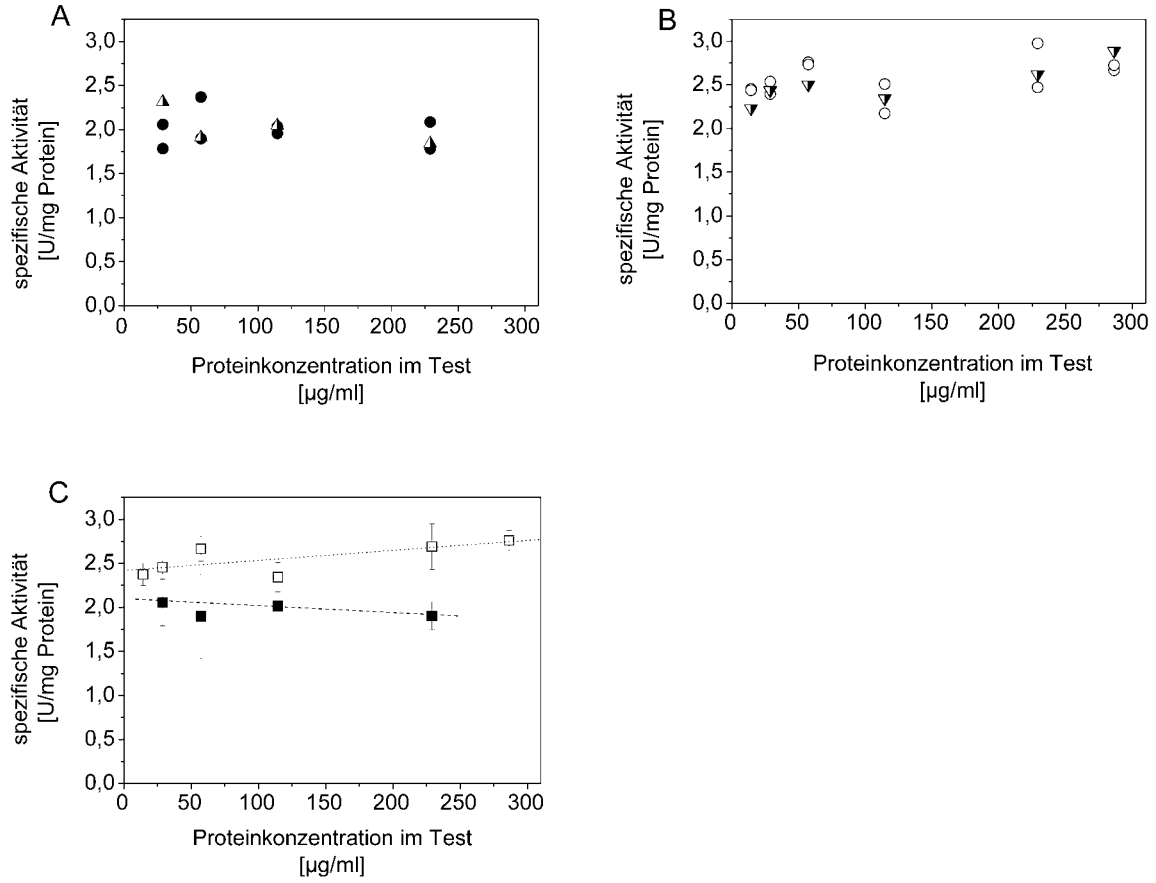



**Abb. 3.17**: Die spezifische Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellextraktmenge

**A**: ausgehend von unverdünntem Extrakt
Zugabe des Extrakts mit gasdichter Spritze● , bzw. in Anaerobenkammer ◭

**B**: ausgehend von verdünntem Extrakt
Zugabe des Extrakts mit gasdichter Spritze ○, bzw. in Anaerobenkammer ▼

**C**: Mittelwerte der spezifischen Aktivität (ungeachtet der Art der Zugabe gemittelt) sowie deren gewichtete lineare Regression. Ausgefüllte Quadrate (■) zeigen die Ansätze, bei denen unverdünnter Extrakt verwendet wurde, offene Quadrate (□) zeigen die Ansätze, bei denen vorverdünnter Extrakt verwendet wurde.

#### *3.3.4.8 Lokalisation*

Die Lokalisation der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase sollte mit Hilfe der Auftrennung des zellfreien Extrakts in Cytosol- und Membranfraktion (durch Zentrifugation) aufgeklärt werden. Beim ersten Versuch wurde 20 % der wiedergefundenen Aktivität in der Membranfraktion gemessen. Der verwendete Puffer (50 mM Kaliumphosphat mit 2,5 mM Titancitrat) hatte eine relativ geringe Ionenstärke, sodass unspezifische Assoziationen von löslichen Proteinen an die Membranen für den Aktivitäts-Anteil in der Membranfraktion verantwortlich gewesen sein könnten (Deutscher, 1990). Als Salzkonzentration, die die Membran-Bindung von peripheren Membranproteinen konservieren soll, werden isoosmotische Bedingungen empfohlen (Deutscher, 1990). In einem zweiten Versuch mit zellfreiem Extrakt, der diesmal in 50 mM Kaliumphosphat mit 2,5 mM Titancitrat einschließlich 0,15 M NaCl aufgenommen war, wurde 97 % der wiedergefundenen Aktivität im Rohcytosol gemessen und nur knapp 3 % in der noch ungewaschenen Membranfraktion (Abb. 3.18 A). Die Aktivität im Kontrollansatz (während der Zentrifugation gelagerter zellfreier Zellextrakt) lag bei ungefähr 2,5 U/mg Protein. In Membran- und Cytosolfraktion zusammengenommen wurde 88 % davon wiedergefunden. Beim anschließenden Re-Zentrifugieren (Waschschritt) wurde ebenfalls etwa 15 % im Vergleich zur Referenzaktivität verloren. Danach war in der gewaschenen Membranfraktion keine Aktivität mehr zu finden (Abb. 3.18 B). Angesichts des relativ hohen Wiederfundes der eingesetzten Aktivität bedeutete die geringe Aktivität in der Membranfraktion, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase kein integrales Membranprotein sein konnte. Vermutlich ist sie auch kein peripheres Membranprotein, dagegen sprach die Erhöhung der Aktivität in der cytosolischen Fraktion bei Verwendung eines Puffers, der die periphere Bindung an die Membran erhalten sollte. Wahrscheinlich ist die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase ein cytosolisches Enzym.

Des weiteren hatte das Entfernen der Membranfraktion nichts an der kurzen Aktivitätsdauer der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase geändert.

Außerdem wurden die Cytosolfraktion sowie unfraktionierter zellfreier Extrakt für eine Nacht bei 4°C aufbewahrt und ihre Phenoxyethanol-Spaltungsaktivitäten am nächsten Tag nochmals bestimmt. Dies ergab in beiden Fraktionen jeweils ähnliche Verluste; das Fraktionieren hatte die Lagerbarkeit nicht verbessert.

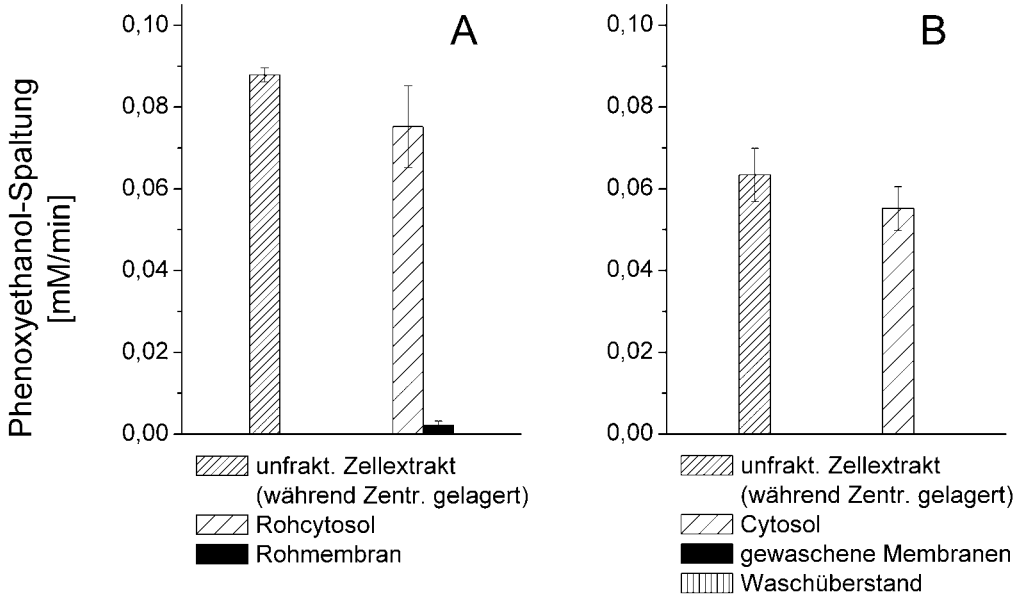



**Abb. 3.18**: Verteilung der Phenoxyethanol-spaltenden Aktivität auf Cytosol- und Membranfraktion nach Fraktionieren von zellfreiem Extrakt, der in 50 mM Kaliumphosphat mit 0,15 M NaCl und 2,5 mM Titancitrat vorlag. Das Waschen der Membranfraktion erfolgte ebenfalls mit diesem Puffer.
**A**: Nach Rohfraktionierung, **B**: nach Waschen.

### *3.3.4.9 Entsalzen*

Wie bereits erwähnt, hatte ein Entsalzen des Zellextrakts mittels Gelfiltration keine Erhöhung der Aktivität bewirkt. Auch hatte das Entsalzen nicht verhindert, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase im Zuge des Umsatzes inaktiviert wurde.
Die gemessenen Aktivitäten von entsalztem Zellextrakt und nicht-entsalztem Zellextrakt verringerten sich im Laufe des Messtages in etwa gleichem Maße. Einzig der Verlust aufgrund der 2-tägigen Lagerung bei 4°C fiel bei der entsalzten Zellextrakt-Portion etwas kleiner aus als beim nicht-entsalzten Zellextrakt.

### *3.3.4.10 $K_m$-Wert-Bestimmungen*

Der $K_m$-Wert für Phenoxyethanol in Zellextrakt (aus lactatgewachsenen Zellen) von Stamm LuPhet 1 wurde mit Hilfe der Auftragung nach Hanes und Woolf ermittelt. Dabei wurden je nach Zellextrakt oder Alter des Zellextrakts leicht unterschiedliche Werte erhalten. Bei drei nacheinander mit dem selben zellfreien Extrakt durchgeführten $K_m$-Bestimmungen ergaben sich die folgenden Werte: $K_m$ = 1,7 mM bzw. 3,3 mM bzw. 0,7 mM, siehe Abbildung 3.19,

während mit einem anderen Zellextrakt der $K_m$-Wert 1,5 mM erhalten wurde. Tabelle 11 enthält eine Zusammenstellung der Werte.

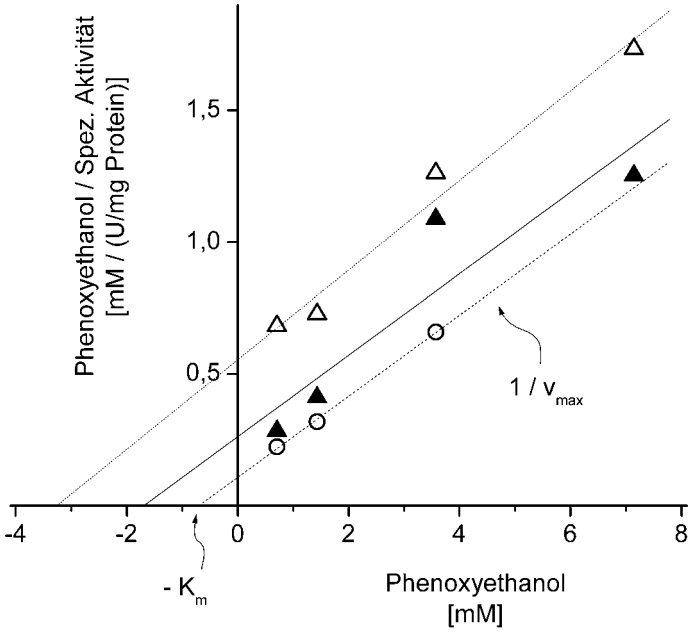



**Abb. 3.19**: Ermittlung des $K_m$-Werts für Phenoxyethanol in zellfreiem Extrakt von Stamm LuPhet 1. Die spezifischen Aktivitäten bei verschiedenen Phenoxyethanol-Konzentrationen wurden nach Hanes und Woolf aufgetragen. Die drei $K_m$-Wert-Bestimmungen wurden nacheinander mit verschiedenen Portionen des selben zellfreien Extrakts durchgeführt.
Erste Bestimmung, mit Zellextrakt-Portion A (▲), zweite Bestimmung, mit Zellextrakt-Portion A (△), dritte Bestimmung, mit Zellextrakt-Portion B (○).

**Tab. 11**: $K_m$- und $v_{max}$-Werte der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase in Zellextrakt, nach Hanes und Woolf ermittelt.

| Extrakt-Charge | $K_m$-Wert [mM] | $v_{max}$ [U/mg Protein] |
|---|---|---|
| ZE-1 Portion A | 1,7 | 6,5 |
| ZE-1 Portion A | 3,3 | 5,9 |
| ZE-1 Portion B | 0,7 | 6,5 |
| ZE-2 | 1,5 | 11,5 |

Die Weiterverwendung der Extrakt-Portion A in der zweiten Bestimmung führte zu einem höheren Wert im Vergleich zur ersten Bestimmung (3,3 mM *versus* 1,7 mM). Während der Einsatz einer bislang unangetasteten Portion B des selben Extrakts in der dritten Bestimmung mit 0,7 mM wieder einen niedrigen $K_m$-Wert ergab, ähnlich dem Wert 1,7 mM aus der ersten Bestimmung.

Die höchsten in zellfreiem Extrakt gemessenen Raten der Phenoxyethanol-Spaltung lagen bei 9-11 U/mg Protein. Diese Erfahrungswerte für maximale Raten stimmten gut mit dem für ZE-2 ermittelten Wert von $v_{max}$ = 11,5 U/mg Protein überein. Die Extrakte, mit denen die genannten Maximalraten gemessen wurden, und ZE-2 gingen auf dieselbe Zellanzucht zurück, während die Zellen für ZE-1 zu einer anderen Zellcharge gehörten.

Die normalerweise im Aktivitätstest eingesetzte Phenoxyethanol-Konzentration von 3,5 mM entsprach ungefähr dem $K_m$-Wert für Phenoxyethanol und gewährleistete folglich keine maximalen Umsatzraten, mindestens jedoch halbmaximale.

#### *3.3.4.11 Einfluss verschiedener Zusätze*

Auf der Suche nach stabilisierenden bzw. störenden Substanzen wurden die folgenden Verbindungen zum Zellextrakt bzw. zum Zellextrakt-haltigen Testansatz gegeben.

*KCl, NaCl, verschiedene Puffer*

Wie bereits erwähnt, hatte bei ganzen Zellen der Einsatz von Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) für Präparation und Test anstelle von Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) nicht zu nennenswerten Unterschieden der Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität geführt, Abschnitt 3.3.2.1. Die Aktivitäten, die mit zellfreiem Extrakt für die Phenoxyethanol-Spaltung gemessen werden konnten, reichten zum Teil an die mit intakten Zellen gemessenen maximalen Aktivitäten, von etwa dem Zehnfachen der *in-vivo*-Rate, heran. Die Höchstraten bei Zellextrakt wurden jeweils mit 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,0 oder 7,5) einschließlich 2,5 mM Titancitrat erhalten. Somit hatte sich dieser Testpuffer bereits als geeignet erwiesen, weshalb nicht in großem Umfang nach alternativen Puffern gesucht wurde. Allerdings wurde geprüft, welchen Einfluss Konzentration und pH-Wert des Puffers sowie der Zusatz von KCl bzw. NaCl hatten. Als weitere Puffersubstanz wurde nur Tris getestet.

In Abbildung 3.20 sind Aktivitäten der Phenoxyethanol-Spaltung bei Zusatz von KCl bzw. NaCl dargestellt. Zellextrakt und Puffer (jeweils pH 7 und ggfs. mit KCl oder NaCl) waren mindestens eine Stunde vor Reaktionsstart zusammengegeben worden. In den Ansätzen mit Chlorid-Zusatz wurden deutlich kleinere Aktivitäten gemessen als in Ansätzen ohne, wobei es unerheblich war, welches Kation der Zusatz enthielt. Die Höhe der Aktivität war also möglicherweise von der Ionenstärke abhängig.

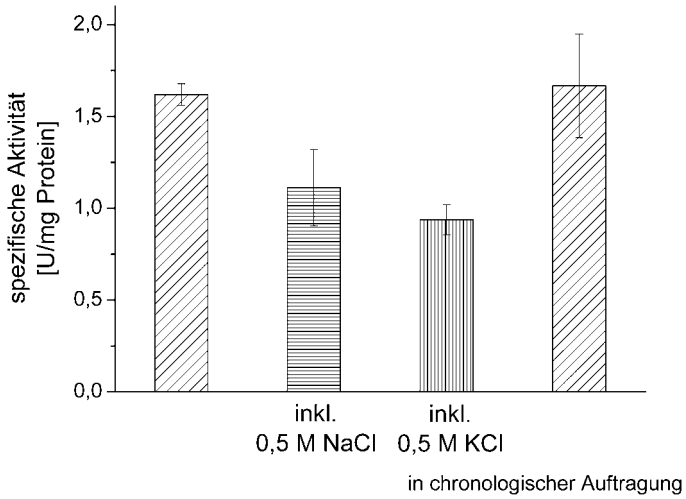



**Abb. 3.20**: Einfluss von 0,5 M NaCl bzw. KCl auf die Phenoxyethanol-spaltende Aktivität von Zellextrakt, im Vergleich zu Ansätzen ohne Salzzusatz. Als Puffer wurde Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0) mit 2,5 mM Titancitrat verwendet.

In Tabelle 12 wurden die Aktivitäten der Phenoxyethanol-Spaltung aufgeführt, die bei Messung in verschiedenen Puffern erhalten wurden. Die jeweiligen Puffer und der Zellextrakt hatten vor Reaktionsstart mindestens 20 Minuten Kontakt.

**Tab. 12**: Phenoxyethanol-Spaltung durch zellfreien Extrakt: Vergleich von verschiedenen Messpuffern, alle enthielten jeweils 2,5 mM Titancitrat.

| Puffersubstanz und pH | Spez. Aktivität [U/mg Protein] | | |
|---|---|---|---|
| | Pufferkonzentration | | |
| | 50 mM | 50 mM mit 0,5 M KCl | 0,5 M |
| Kaliumphosphat (pH 7,0) | 5,8 | 5,2 | 2,5 |
| Kaliumphosphat (pH 7,5) | 8,4 | 5,9 | 5,7 |
| Tris/HCl (pH 8,0) | 5,6 | 5,3 | 3,2 |

Die höchste Aktivität wurde mit 50 mM Kaliumphosphat bei pH 7,5 ohne KCl erhalten. In 500 millimolarem Puffer fiel die Aktivität jeweils deutlich niedriger aus als in 50 millimolarem Puffer ohne KCl. In Tris/HCl (50 mM, pH 8,0) ohne Kaliumionen-Zusatz wurde etwa die gleiche Aktivität gemessen wie in Kaliumphosphat (50 mM, pH 7,0); diese Aktivität änderte sich auch kaum, wenn jeweils 0,5 M KCl enthalten war. Bei pH 7,5 jedoch wirkte der Zusatz von 0,5 M KCl deutlich aktivitätsmindernd, in etwa gleichem Maße wie die Erhöhung der Pufferkonzentration auf 0,5 M. Der Effekt des Zusatzes von KCl bei pH 7,0 war in diesem Versuch weniger groß als beim zuvor erwähnten Vergleich von NaCl und KCl (Abb. 3.20).
Die Konzentration der Kaliumionen hatte keinen eindeutigen Einfluss auf die Höhe der Aktivität, vergleiche z. B. 5,8 U/mg Protein (bei 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) mit 5,2 U/mg Protein (bei 50 mM Kaliumphosphat mit 0,5 M KCl, pH 7,0) und mit 2,5 U/mg Protein (bei 500 mM Kaliumphosphat, pH 7,0). Die Ionenstärke korrelierte nur teilweise mit den beobachteten Aktivitätsunterschieden. Eventuell spielte neben dem pH-Wert auch die Art der Ionen eine Rolle.
Im Prinzip wäre es stattdessen auch möglich, dass Aktivitätsunterschiede bei den jeweiligen Puffern ganz oder teilweise durch unterschiedlich starkes Ablaufen von NADH-regenerierenden Prozesse zustande kamen.

*Coenzym $B_{12}$*

Es wurde versucht, in Anlehnung an die bekannte Stimulation der Diol-Dehydratase durch Coenzym $B_{12}$, auch die Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase durch den Zusatz von Coenzym $B_{12}$ zu steigern oder zu stabilisieren.
Zellextrakt, Coenzym $B_{12}$ und der jeweilige Puffer wurden vor Start der Reaktion mindestens eine Stunde inkubiert. Während der Zusatz von 57 µM Coenzym $B_{12}$ die Diol-Dehydratase-Aktivität des Zellextrakts immer mindestens verdoppelte, wie bereits ausführlich in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde, hatte dieser Zusatz auf die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität in Zellextrakt keinen positiven Effekt (Abb. 3.21).

Bei der Propandiol-Dehydratisierung hatte die Kombination von Coenzym $B_{12}$ mit einer erhöhten $K^+$-Konzentration im Küvettenpuffer (50 mM Kaliumphosphat mit 0,5 M KCl) zu besonders hohen Aktivitäten geführt. Dagegen wurden bei der Phenoxyethanol-Spaltung durch die Kombination von Coenzym $B_{12}$ (57 µM) mit 0,5 M KCl keine höheren Aktivitäten gemessen, im Gegenteil, gegenüber Ansätzen ohne KCl-Zusatz (egal ob mit oder ohne Coenzym $B_{12}$) war die NADH-Oxidationsrate halbiert (Abb. 3.21). Die gleiche negative Wirkung

hatte auch die Kombination von Coenzym $B_{12}$ mit 0,5 M Natrium- statt Kaliumchlorid. Der Aktivitätsrückgang dürfte dabei vor allem auf den Effekt des Salzes zurückzuführen sein, denn wie zuvor in Abbildung 3.20 gezeigt wurde, verringerte allein 0,5 M NaCl bzw. KCl die Aktivität bereits auf weniger als 70 %.

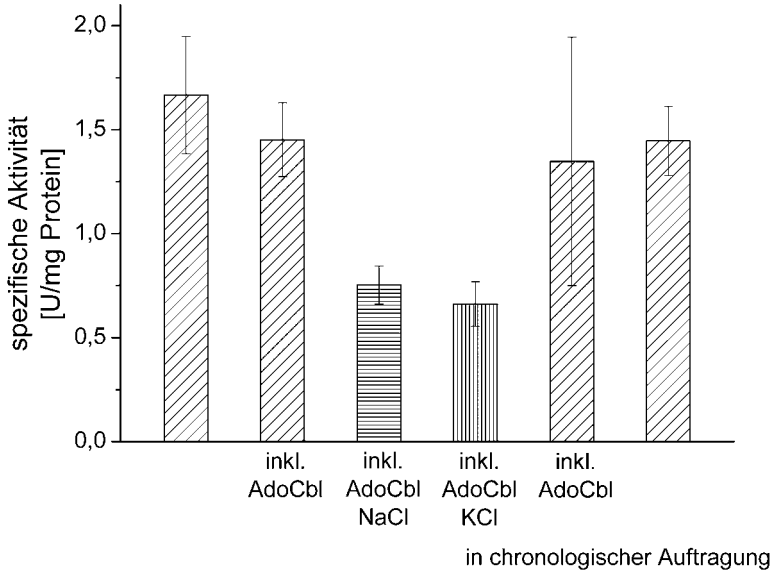



**Abb. 3.21**: Einfluss von Coenzym $B_{12}$ (57 µM) sowie von Coenzym $B_{12}$ (57 µM) zusammen mit 0,5 M NaCl bzw. KCl auf die Phenoxyethanol-spaltende Aktivität von Zellextrakt. Die Basiszusammensetzung der Puffer (pH 7,0) bestand jeweils aus Kaliumphosphat (50 mM) mit 2,5 mM Titancitrat.

Auch die Aktivitätsdauer der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase wurde durch den Zusatz von Coenzym $B_{12}$ nicht verlängert, stets verlangsamte sich die Rate der Phenoxyethanol-Spaltung wie üblich innerhalb weniger Minuten bis auf null.
Erfolgte der Zusatz von Coenzym $B_{12}$ später, nachdem die Phenoxyethanol-Spaltung bereits abgelaufen und zum Erliegen gekommen war, bewirkte Coenzym $B_{12}$ auch kein Wiedereinsetzen der Reaktion. In anderen Ansätzen (bei hoher als auch niedriger $K^+$-Konzentration) wurde Coenzym $B_{12}$ unmittelbar nach Start der Reaktion zugesetzt, solange die Spaltung von Phenoxyethanol noch im Gange war. Aber auch in diesen Fällen hatte der Zusatz keinen Einfluss auf Höhe oder Dauer der Aktivität.

Es kann also zusammengefasst werden, dass in keinem der Versuche der vorliegenden Arbeit durch Coenzym $B_{12}$ die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität von Zellextrakt erhöht noch stabilisiert oder wieder hergestellt wurde.

*Titancitrat*

Alle Präparationen und Aktivitätsmessungen wurden unter anoxischen, reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dies wurde dadurch erreicht, dass sämtliche Puffer grundsätzlich das Reduktionsmittel Titancitrat enthielten (2,5 mM Ti(III), wenn nicht anders angegeben), sodass es auf jeder Stufe eines Versuchs, von der Zellsuspension bis zur Aktivitätsmessung im Zellextrakt, gegenwärtig war. Dieses Vorgehen war von den Vorgängerarbeiten übernommen worden. Auch bei meinen Versuchen hatte sich gezeigt, dass anoxische Verhältnisse für den Erhalt der Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase entscheidend waren. Möglicherweise wurde das Reduktionsmittel ausschließlich benötigt, um stets sauerstofffreie Verhältnisse zu gewährleisten. Es könnte zusätzlich gebraucht worden sein, um Enzym oder Cofaktoren zu reduzieren. Im Zusammenhang mit dieser Möglichkeit war der Verdacht aufgekommen, dass das frühe Anbieten des Reduktionsmittels die Instabilität sogar erst geschaffen haben könnte, indem die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase durch Ti(III) eventuell vorzeitig reaktionsbereit und damit einhergehend vielleicht empfindlicher geworden wäre. Daher sollte der Einfluss von Ti(III) näher untersucht werden. Gleichzeitig mit dem reduzierend wirkenden Ti(III) wurde jeweils auch das Komplexierungsmittel Citrat eingetragen; im verwendeten Titancitrat betrug die Konzentration des Citrats jeweils das 1,5-fache der Konzentration des Ti(III).

Zunächst wurde nur während des Aktivitätstests auf den Zusatz von Titancitrat verzichtet, d. h. der Messpuffer war anoxisch, wurde aber nicht mit Titancitrat versetzt. Durch den nach wie vor Titancitrat-enthaltenden zellfreien Extrakt wurde dennoch etwas Titancitrat in den Aktivitätstest eingetragen (0,036 mM Ti(III)). Die Versuche zeigten, dass Zellextrakt im Messpuffer ohne Titancitrat teilweise deutlich kleinere Aktivitäten aufwies als in Titancitrat-reduziertem Messpuffer mit 0,5 mM bzw. 2,5 mM Ti(III). Den prozentual größten Effekt gab es in diesem Beispiel: ohne Titancitrat-Zusatz wurde eine Aktivität von 1,0 U/mg Protein gemessen, im Titancitrat-reduzierten Puffer (2,5 mM Ti(III)) dagegen von 2,8 U/mg Protein. Aber nicht immer war die positive Wirkung von Titancitrat so deutlich. Bei anderen Beispielen schien es relativ unerheblich zu sein, ob der Messpuffer Titancitrat enthielt oder nicht: z. B.: 1,82 U/mg Protein im Messpuffer mit 2,5 mM Ti(III) im Vergleich zu 1,71 U/mg Protein im Messpuffer ohne Titancitrat.

In einem weiteren Versuch wurde bereits ab einem früheren Zeitpunkt der Präparation auf das Reduktionsmittel verzichtet. Dabei wurde ein sogenannter Ti(III)-freier Extrakt erhalten, dieser enthielt dennoch eine geringfügige Menge an Titancitrat (schätzungsweise maximal 125 µM Ti(III)), welche im Aktivitätstest weiter verdünnt wurde, auf entsprechend maximal

2 µM Ti(III). Für Kontroll-Ansätze wurde außerdem wie üblich Extrakt mit Ti(III) hergestellt. Die Aktivitäten beider Extrakte wurden in Messpuffer mit als auch ohne Titancitrat gemessen, Tabelle 13. Mit 1,2 U/mg Protein blieb die Aktivität des Ti(III)-freien Extrakts unter der Aktivität des Ti(III)-haltigen Extrakts von 1,8 U/mg Protein, jeweils gemessen im Titancitrat-reduzierten Messpuffer (2,5 mM Ti(III)). Bei Messung in Messpuffer ohne Titancitrat lag die Aktivität des Ti(III)-freien Extrakts im Vergleich dazu bei nur 0,44 U/mg Protein.
In allen diesen Beispielen sah es nicht nach einer verringerten Aktivität infolge einer durch Titancitrat gesteigerten Empfindlichkeit der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase aus. Im Gegenteil, der Zusatz des Reduktionsmittels zu Messpuffer oder Extrakt hatte sich wenigstens neutral, meist jedoch positiv auf die Phenoxyethanol-Spaltung ausgewirkt.

Ein etwas verändertes Bild ergab sich, nachdem diese Extrakte einen Tag bei 4°C gelagert worden waren. Die beiden Extrakte schienen die Lagerung unterschiedlich gut überstanden zu haben, während die Aktivität des Ti(III)-freien Extrakts nach Lagerung sogar höher ausfiel als am Vortag, hatte sie beim Ti(III)-haltigen Extrakt etwas abgenommen. Die höchste Aktivität wurde nun mit dem Ti(III)-freiem Extrakt erhalten, bei Verwendung des reduzierten Messpuffers, siehe Tabelle 13.

**Tab. 13**: Einfluss des Reduktionsmittels Titancitrat. Vergleich der Phenoxyethanol-Spaltungsaktivitäten von Ti(III)-freiem bzw. Ti(III)-haltigem Zellextrakt, gemessen in Ti(III)-freiem bzw. Ti(III)-haltigem Puffer.

| | Konzentration von Ti(III) | | Spez. Aktivität [U/mg Protein] | |
|---|---|---|---|---|
| | im Extrakt [mM] | im Messpuffer [mM] | am Aufschlusstag | am nächsten Tag* |
| ohne Ti(III) | ~ 0,13 | 0 | **0,44** | **1,1** |
| nur im Test mit Ti(III) | ~ 0,13 | 2,5 | **1,2** | **1,7** |
| mit Ti(III) | 2,5 | 2,5 | **1,8** | **1,6** |

* mit den Extrakten vom Vortag

Eine mögliche Erklärung für diese Werte wäre, dass eine Ruhepause bei 4°C und bei einer hohen Proteinkonzentration für zellfreien Extrakt förderlich war, zumindest im Fall des

Ti(III)-freien Zellextrakts, allerdings war eine solche Verbesserung der Extrakt-Aktivität duch Lagerung bei anderen Versuchen nicht aufgetreten bzw. nicht bemerkt worden.
Andererseits könnten die Aktivitätsunterschiede auch mit den individuellen zufälligen Einflüssen auf die beiden Extraktportionen zusammenhängen, verbunden mit zufällig besseren Messbedingungen am zweiten Messtag.

Weiterhin wurde mit dem Ti(III)-freien Extrakt gemessen, wie sich das Verkürzen der Kontaktzeit zwischen zellfreiem Extrakt und dem Titancitrat des Messpuffers auswirkte: Das Titancitrat für eine Endkonzentration von 2,5 mM Ti(III) wurde dem Ansatz erst beim Reaktionsstart gleichzeitig mit dem Substrat zugegeben, um ein vorzeitiges Reduzieren der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase ausschließen zu können. Diese Ansätze waren weniger aktiv als Ansätze mit Kontaktzeiten (zwischen Extrakt und Titancitrat-haltigem Puffer) von 10-22 Minuten. Für Ansätze, denen das Titancitrat genau 2 Minuten vor Reaktionsstart zugegeben wurde, ergaben sich Werte, die zwischen diesen beiden Aktivitäten lagen. Siehe Tabelle 14.

**Tab. 14**: Einfluss der Konzentration von Titancitrat bzw. der Einwirkzeit von Titancitrat auf zellfreien Extrakt. Angegeben ist die Kontaktzeit zwischen zellfreiem Extrakt und der Titancitrat-haltigen Aktivitätstestmischung (bis Start der Reaktion durch Zugabe von Phenoxyethanol). Es wurde der sogenannte Ti(III)-freie Zellextrakt verwendet, der allerdings noch ca. 125 µM Ti(III) enthielt.

| Konzentration von Ti(III) | Vorwirkzeit von Titancitrat mit Extrakt | Spez. Aktivität [U/mg Protein] |
|---|---|---|
| 2,5 mM | ca. 10-22 min | **1,73** |
| 2,5 mM | 2 min | **0,69** |
| 2,5 mM | kein Vorwirken | **0,56** |
| 0,5 mM | 2 min | **0,97** |
| 4 mM | 2 min | **0,42** |

In Tabelle 14 ist außerdem die Wirkung verschiedener Titancitrat-Konzentrationen im Messpuffer dargestellt. Die NADH-Oxidationsrate (nach einer Kontaktzeit von 2 Minuten von

Extrakt und Titancitrat) war bei 0,5 mM Ti(III) größer als bei 2,5 mM, bei 4 mM dagegen kleiner als bei 2,5 mM.

Während die positive Wirkung von Titancitrat größer war, wenn es länger mit der Testmischung und dem Extrakt in Kontakt war (d. h. wenn Titancitrat schon während der gesamten Vorbereitungen und nicht erst im Messpuffer in millimolarer Konzentration zugegen war, oder wenn Titancitrat und Zellextrakt wenigstens einige Minuten vor Beginn der Messung Kontakt hatten und nicht erst ab dem Start der Phenoxyethanol-Spaltung), trat bei noch längerem Kontakt (Lagern des zellfreien Extrakts bei 4°C für einen Tag, Tab. 13) oder noch höherer Konzentration (Tab. 14) möglicherweise eine negative Wirkung auf.

Der Effekt von Titancitrat kann folgendermaßen zusammengefasst werden: Der Zusatz von Titancitrat zu Extrakt bzw. Messpuffer bewirkte fast immer eine Erhöhung der Rate der Phenoxyethanol-Spaltung. Die während der vorliegenden Arbeit erhaltenen Höchstraten für die Phenoxyethanol-Spaltung in zellfreiem Extrakt von 9-11 U/mg Protein wurden ebenfalls unter der ständigen Gegenwart von Titancitrat (2,5 mM Ti(III)) erreicht. Die Phenoxyethanol-Spaltung lief aber auch bei Gegenwart von maximal 2 µM Ti(III) ab. Dieses Beispiel, in dem der Phenoxyethanol-Umsatz größer war als die maximal vorhandene Konzentration an Titancitrat, zeigte, dass das Reduktionsmittel während der Phenoxyethanol-Spaltung nicht in einer zum Umsatz stöchiometrischen Menge verbraucht wurde. Unabhängig von Präsenz oder Abwesenheit von Ti(III) betrug die Aktivitätsdauer aber in sämtlichen Versuchen nach wie vor nur wenige Minuten. Wenn auch ein gleichzeitig schädlicher Effekt nicht völlig ausgeschlossen werden kann, überwog in der Regel die positive Wirkung von Titancitrat. Die genaue Funktion des Titancitrats bleibt dabei ungeklärt.
Vielleicht wird durch Ti(III) ein möglicherweise enthaltenes Proteinradikal einfach vor Oxidationen geschützt, siehe Diskussion.

*Dithiothreitol, Dithionit, Hydrogensulfid*

Es sollte geprüft werden, ob eventuell andere Reduktionsmittel die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase besser aktivieren, reaktivieren oder stabilisieren konnten als Titancitrat (E°´= - 480 mV; Zehnder und Wuhrmann, 1976). Um nicht auf das bewährte Titancitrat verzichten zu müssen, wurden die anderen Reduktionsmittel jeweils zusätzlich zu den 2,5 mM Titancitrat eingesetzt.

Falls der Mangel an Stabilität zumindest teilweise durch oxidationsempfindliche Cysteine verursacht würde, könnten eventuell Thiole für eine erhöhte Stabilität bzw. für die Reduktion von bereits oxidierten Cysteinen sorgen. Deshalb wurde Extrakt[2] direkt nach dem Aufschließen der Zellen mit 9 mM Dithiothreitol versetzt; aufgrund der Verdünnung in der Küvette lag die Konzentration beim anschließenden Aktivitätstest theoretisch bei 0,26 mM Dithiothreitol. Die Wirkung des Dithiothreitols (E°′= - 330 mV; Cleland, 1964) war nicht positiv: der Dithiothreitol-haltige Zellextrakt zeigte keinerlei Aktivität mehr, während Zellextrakt ohne Thiol-Zusatz sehr wohl aktiv war.

Ein anderes Reduktionsmittel, das eingesetzt wurde, war Dithionit, auch aufgrund der Hoffnung, dass Dithionit (E°′= - 527 mV; Loach, 1976) mit möglicherweise vorhandenen Spuren von Luft vielleicht schneller reagieren würde als Titancitrat, also besseren Schutz böte. Dithionit wurde erst den Test-Ansätzen zugegeben, in einer Konzentration von 1 mM, wiederum zusätzlich zu den 2,5 mM Titancitrat. Vor Start der Reaktion durch Phenoxyethanol waren Zellextrakt und Dithionit nur einige Minuten in Kontakt gewesen. Der Dithionit-Zusatz bewirkte jeweils einen völligen Aktivitätsverlust, während Ansätze ohne Dithionit-Zusatz Phenoxyethanol spalteten.

Schließlich wurde noch die Wirkung von Hydrogensulfid (E°′= - 243 mV; Loach, 1976) auf die Phenoxyethanol-Spaltung untersucht. Dieses Reduktionsmittel wurde ebenfalls nicht dem Extrakt sondern erst den Mess-Ansätzen zugegeben, jeweils wiederum ergänzend zu den bereits enthaltenen 2,5 mM Titancitrat, einerseits in geringen Konzentrationen, nämlich 20 µM und 100 µM, andererseits höher dosiert mit 1 mM und 5 mM. Hydrogensulfid und Zellextrakt hatten jeweils eine Stunde bis anderthalb Stunden Kontakt bevor die Phenoxyethanol-Spaltung gestartet wurde. In den niedrigen Konzentrationen hatte Hydrogensulfid keinen Einfluss auf die Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung durch Zellextrakt. Bei Zusatz von 1 mM Hydrogensulfid war jedoch nur noch 10 % der Kontrollaktivität zu messen, und bei 5 mM zeigte der Test keinerlei NADH-Oxidation mehr an.

Weder der Dithiothreitol- noch der Dithionit-Zusatz hatte also die erhoffte positive Wirkung auf die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität. Vielmehr verringerten diese Zusätze die Aktivität. Allerdings waren jeweils (zumindest zwischenzeitlich) relativ hohe Konzentrationen der Zusätze eingestellt worden. Auch Hydrogensulfid war in den hohen Konzentrationen anschei-

[2] Ausnahmsweise mit PEG-300-Zellextrakt statt Lactat-Zellextrakt.

nend schädlich für die Aktivität, während es in niedriger Konzentration keinen Einfluss hatte. Die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase war folglich nicht nur gegenüber Oxidationsmitteln (Luft) empfindlich sondern reagierte auch gegenüber höheren Konzentrationen an reduzierenden Schwefelverbindungen empfindlich. Dabei waren entweder speziell die verwendeten Substanzen schädlich oder das dadurch entstandene niedrige Redoxpotential (vor allem beim Dithionit-Zusatz). Im Prinzip könnte im Aktivitätstest die Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase auch gänzlich überdeckt worden sein durch eine chemische NADH-Regeneration, aufgrund des in der Küvette herrschenden niedrigen Redoxpotentials. Es sei aber daran erinnert, dass in einem anderen Versuch bei Einsatz von 4 mM Titancitrat im Messpuffer noch Aktivität gemessen werden konnte, wenn auch die entsprechenden NADH-Oxidationsraten geringer waren als mit 2,5 mM Titancitrat im Messpuffer (Siehe Tab. 14).

*Luft*

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase Luft-empfindlich war.

Zum einen wurde Zellextrakt (mit 2,5 mM Titancitrat) (der in Kontrollen die Phenoxyethanol-Spaltung katalysierte) 20 bis 30 min der Luft ausgesetzt. Beim anschließenden Test hatten der Luft-versetzte Extrakt und das Ti(III) des Messpuffers (2,5 mM) erst Kontakt, als der Ansatz durch die Zugabe des Extrakts vervollständigt wurde; die Absorption wurde für bis zu 4 min aufgezeichnet, dabei war keinerlei Phenoxyethanol-Spaltung festzustellen.

Zum anderen wurde zu bereits Phenoxyethanol-spaltenden Ansätzen ein kleines Volumen Luft (50 µl, 20 µl) in die Flüssigphase gespritzt. Dieser Zusatz von Luft führte zum sofortigen Verlust der Phenoxyethanol-spaltenden Aktivität. Im Vergleich zur typischen Aktivitätsdauer wurde die Aktivitätsdauer durch den Luftzusatz also verkürzt. Dabei war unerheblich, ob Zellextrakt und Messpuffer jeweils 2,5 mM Titancitrat enthielten oder ob der Zellextrakt ca. 125 µM und der Messpuffer kein Titancitrat enthielten.

Luft beeinträchtigte die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase somit unabhängig davon, ob die Phenoxyethanol-Spaltung im Moment des Zutritts katalysiert wurde oder noch nicht.

*Weitere Zusätze*

Während der Suche nach stabilisierenden oder destabilisierenden Faktoren wurden auch die folgenden Substanzen dem zellfreien Extrakt bzw. dem Testansatz (inkl. zellfreiem Extrakt) zugesetzt (siehe Tab. 15). Die Effekte dieser Zusätze ließen sich jedoch nur ganz grob

abschätzen, weil im Laufe der entsprechenden Messungen jeweils starke Aktivitätsverluste bereits bei den Kontrollansätzen aufgetreten waren. Andererseits wurden diese Substanzen nicht wiederholt zugesetzt, da sie zumindest keine großen Wirkungen zeigten, weder in bezug auf die Anfangsaktivität noch auf den Verlauf der Aktivität, sie also vor allem keine Stabilisierung brachten bzw. nicht Ursache des Erliegens zu sein schienen.

**Tab. 15**: Einfluss verschiedener Zusätze auf die Phenoxyethanol-spaltende Aktivität im Extrakt. Manche Zusätze wurden dem zellfreien Extrakt zugegeben, andere dem Testansatz, in dem der zellfreie Extrakt bereits verdünnt vorlag.

| | Konzentration des Zusatzes | | Restliche Aktivität relativ zur Aktivität ohne Zusatz* |
|---|---|---|---|
| | im Extrakt | im Test | |
| $Mg^{2+}$/ATP | | 200/100 µM | **ca. 100 %** |
| *S*-Adenosylmethionin | | 100 µM | **ca. 100 %** |
| Citrat | 3,8 mM | 3,8 mM | **n. b.** |
| EDTA | 10 mM | im Test verdünnt auf 0,3 mM | **> 70 %** |
| Phenol | | 0,84 mM<br>4,2 mM | **> 70 %**<br>**> 50 %** |
| Toluol | | 10 µM<br>100 µM<br>500 µM | **> 75 %**<br>**> 70 %**<br>**> 50 %** |

* Es kann nur ein relativ grober Rahmen der Auswirkung des Zusatzes angegeben werden, weil der allgemeine Aktivitätsrückgang während dieser Versuche bereits ziemlich ausgeprägt war.
n. b.: nicht bestimmt

ATP und $Mg^{2+}$ (100 µM und 200 µM) bzw. *S*-Adenosylmethionin (100 µM) wurden dem Testansatz als mögliche Cosubstrate der Phenoxyethanol-Spaltung selbst oder einer eventuellen Aktivierungsreaktion der Lyase zugegeben. Bis zum Start mit dem Substrat Phenoxyethanol wurden Extrakt und Cofaktoren für einige Minuten inkubiert, dabei herrschte eine Proteinkonzentration von 0,11 mg/ml. Diese Zusätze hatten aber jeweils weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität von zellfreiem Extrakt.

Wie schon erwähnt wurde, enthielten die Puffer in der Regel Titancitrat (2,5 mM Ti(III)); dadurch wurde außer dem reduzierend wirkenden Ti(III) auch ein Komplexbildner, das Citrat, eingetragen. Im verwendeten Titancitrat betrug die Konzentration des Citrats jeweils das 1,5-fache der Konzentration des Ti(III). Im zellfreien Extrakt wurden mit Citrat-haltigen Puffern genauso hohe maximale Phenoxyethanol-Spaltungsraten gemessen wie in Zellsuspensionen. Also dürfte Citrat in einer Konzentration von 3,8 mM für die Lyase nicht schädlich gewesen sein. Auch die Aktivität von Zellextrakt, auf den mindestens eine halbe Stunde 10 mM EDTA eingewirkt hatte, war nicht sehr viel kleiner als die Aktivität der Kontrollansätze; sie betrug mehr als 70 %. Somit scheint die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase keine, zumindest keine relativ schwach gebundenen, mehrwertigen Metallionen zu enthalten.

Phenol wurde einigen Testansätzen zugesetzt, um zu prüfen, ob eventuell das Produkt der Phenoxyethanol-Spaltung die Reaktion beeinträchtigte. Phenolkonzentrationen dieser Höhe (0,84 bzw. 4,2 mM) wurden während der Messungen mit Extrakt sonst allerdings nicht erreicht, da der Messbereich durch die Konzentration des NADH auf 0,2 mM Umsatz begrenzt war. Die Aktivität bei 4,2 mM Phenol im Hintergrund (2,9 U/mg Protein) war etwas niedriger als die zuvor bei Präsenz von 0,84 mM Phenol gemessene Aktivität (3,6 U/mg Protein). Gleichzeitig war aber der allgemeine Aktivitätsrückgang aufgrund der Instabilität des Enzyms während dieser Versuche relativ stark, sodass mögliche Beeinträchtigungen im Vergleich zu den späteren Normalansätzen[3] (2,8 U/mg Protein) nicht mehr sehr groß scheinen, während sich die Zahlen der Tabelle auf die vorausgehenden Normalansätze (5,0 U/mg Protein) beziehen.

Es wurde getestet, ob es durch Zusatz von Toluol möglich war, die Stabilität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase zu erhöhen. Dies ging auf die Idee zurück, dass Toluol ein bindendes inaktives Analogon zu Phenoxyethanol darstellen könnte und dass es das Enzym vor oxidativen Schäden schützen könnte, indem es den Zutritt zum aktiven Zentrum erschweren würde. Bei Zusatz von Toluol zu Testansätzen, die den zellfreien Extrakt bereits enthielten, und Kontaktzeiten von Extrakt mit Toluol von nur einigen Minuten schienen 10 µM und 100 µM Toluol kaum einen Effekt zu haben. Der Zusatz von 500 µM Toluol könnte die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität eher etwas verringert haben. Auch bei längeren Kontaktzeiten zwischen Extrakt und Toluol zeigte sich keine förderliche Wirkung. Die

[3] Referenz-Ansätze, mit gleicher Zusammensetzung wie die verschiedenen Testansätze nur ohne den speziellen Zusatz, hier Phenol. Im Laufe des Durchgangs wurden wiederholt Ansätze mit dieser Basiszusammensetzung gemessen, um den unspezifischen Aktivitätsverlust zu erfassen.

Aktivitätsdauer blieb nach wie vor kurz, und beim gezielten Zusatz von Luft bot Toluol keinen Schutz, denn es trat der sofortige Verlust der Phenoxyethanol-spaltenden Aktivität ein, wie bei Luftinjektion in Kontrollansätzen.

*Substrat-Analoga*

Um Hinweise auf den Mechanismus bzw. die Substratspezifität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase zu bekommen, wurde mit dem gekoppelten Enzymtest geprüft, ob verschiedene Phenoxyethanol-ähnliche Substanzen von Zellextrakt in gleicher Weise wie Phenoxyethanol umgesetzt werden können. In einigen Versuchen wurde dem Ansatz im Anschluss an die Reaktion mit dem Analogon außerdem noch das Originalsubstrat Phenoxyethanol zugegeben, um zu sehen, ob das Analogon die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase nachhaltig beeinträchtigt hatte. Die Analoga wurden in einer ähnlichen Konzentration wie Phenoxyethanol eingesetzt, im Bereich von 0,1 mM bis 3,5 mM. Das Verhältnis der Konzentration von Phenoxyethanol zur Konzentration des Analogons lag zwischen ca. 0,5 und 2. Dies traf nur auf das Ferrocenderivat nicht zu, welches in wesentlich geringerer Konzentration eingesetzt wurde, entsprechend lag hier das Verhältnis von Phenoxyethanol zu Analogon bei fast 500. Siehe Tabellen 16, 17, 18 und 19.
Die begrenzte Aktivitätsdauer der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase äußerte sich im gekoppelten Enzymtest meist durch Übrigbleiben von NADH, welches sonst bei anhaltender Aktivität für die Reduktion des Aldehyds verbraucht worden wäre. Die Zeitspanne bis zum Erreichen des NADH-Endpunkts bzw. -Minimums diente als ungefähres Maß für die Aktivitätsdauer. Sie variierte von Versuch zu Versuch, z. B. 1,8 min im Vergleich zu 3,5 min (jeweils nur Phenoxyethanol, ohne Hemmstoff), siehe auch Tabelle 16 und 18.

PEG 300 (enthält im Schnitt ca. 6,4 Ethylenglycoleinheiten), Tetraethylenglycol und Triethylenglycol wurden von zellfreiem Extrakt gespalten, aber unterschiedlich schnell, Tabelle 16. Wie weit der Abbau der Poly- bzw. Oligomere erfolgte, ist unbekannt, da das erhaltene Produktspektrum nicht untersucht wurde. Bei jeweils gleicher molarer Konzentration der Substrate wurde aus PEG 300 langsamer Aldehyd freigesetzt als aus Phenoxyethanol. Allerdings hielt die Aktivität mit PEG 300 für ca. 12 min an, und damit über längere Zeit als die Spaltung von Phenoxyethanol, welche in keinem der Zellextrakt-Versuche der vorliegenden Arbeit länger als 3,5 min lief. Aus Triethylenglycol wurde Acetaldehyd sehr viel schneller gebildet als aus Phenoxyethanol, auch hier hielt die Umsetzung etwas länger an (ca. 4,5 min) als mit dem Substrat Phenoxyethanol.

**Tab. 16**: Umsatz von Phenoxyethanol-ähnlichen Verbindungen durch Zellextrakt. Diese Substanzen wurden im Aktivitätstest der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase (Nachweis des Produkts Acetaldehyd) anstelle von Phenoxyethanol eingesetzt. Die Daten stammen aus verschiedenen Experimenten, deshalb wurden auch die Werte der jeweiligen Phenoxyethanol-Referenz-Ansätze aufgeführt; innerhalb eines Experiments wurde jeweils die gleiche Menge Zellextrakt eingesetzt. Als Näherungswerte der Aktivitätsdauern wurden außerdem die Zeitspannen bis zum NADH-Minimum angegeben*.

| Substanz | Aktivität mit der Substanz<br><br>relativ zur Aktivität mit Phenoxyethanol | Zeitspanne bis zum NADH-Minimum* | NADH-Verbrauch beim NADH-Minimum* |
|---|---|---|---|
| **Phenoxyethanol** | **100 %** | **1,5 min** | **15 nM** |
| Triethylenglycol | 180 %, 160 % | 4,5 min | 34 nM, 26 nM |
| Tetraethylenglycol | 6 % | >12 min | |
| **Phenoxyethanol** | **100 %** | **1,8 min** | **82 nM** |
| PEG 300 | 8 % | 11,7 min | 44 nM |
| **Phenoxyethanol** | **100 %** | **n. b.** | |
| Triethylenglycol | 570 %, 300 %, 190 % | n. b. | |
| PEG 300 | 16 %, 16 % | n. b. | |

* Die Zeitpunkte der NADH-Minima entsprachen möglicherweise wegen NADH-Regenerationsprozessen nicht exakt den tatsächlichen Zeitpunkten des Erliegens der Aktivität. Die tatsächliche Dauer bis zum Erliegen wäre dann etwas größer als die Zeit bis zum NADH-Minimum, gleichfalls wäre dann der Gesamt-Umsatz etwas größer.
n. b.: nicht bestimmt

Eingesetzt wurde auch 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol, das gewissermaßen ein Hybrid aus Phenoxyethanol und PEG darstellt. Diese Substanz wurde von ganzen Zellen überraschenderweise nicht gespalten, weder von solchen, die mit Phenoxyethanol gewachsen waren, noch von welchen, die mit PEG 300 gewachsen waren. Auch von zellfreiem Extrakt wurde 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol nicht gespalten (Tab. 17). Gleichzeitig bewirkte diese Substanz bei Zellextrakt, dass eine anschließende Umsetzung von Phenoxyethanol viel langsamer ablief als in Ansätzen, die diese Substanz nicht enthielten, Tabelle 19.

Ein anderes modifiziertes Phenoxyethanol, racemisches 2-Phenoxypropan-1-ol, wurde ebenfalls weder von ganzen Zellen (mit Phenoxyethanol angezogen) umgesetzt, noch von zellfreiem Extrakt gespalten, Tabelle 17. Auch diese Substanz bewirkte im Versuch mit Zellextrakt, dass eine anschließende Phenoxyethanol-Spaltung langsamer ablief als in Ansätzen ohne die Substanz, Tabelle 19.

Stamm LuPhet 1 konnte außer 2-Phenoxyethanol auch 2-Ethoxyethanol spalten (Frings und Schink, 1994). Im Test mit Extrakt wurden die davon abgeleiteten Schwefel-Verbindungen 2-(Phenylsulfanyl)ethanol bzw. 2-(Ethylsulfanyl)ethanol angeboten. Es fand keine Aldehydbildung aus diesen Thioethern statt, Tabelle 17. Wiederum verringerte sich bei einer anschließenden Phenoxyethanol-Spaltung aber die Aktivität im Vergleich zu Ansätzen ohne diese Substanzen, Tabelle 19.

**Tab. 17**: Phenoxyethanol-ähnliche Verbindungen, die von Zellextrakt nicht umgesetzt wurden. Die aufgeführten Substanzen wurden im Aktivitätstest der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase (zum Nachweis der potentiellen Produkte Acetaldehyd bzw. Propionaldehyd) anstelle von Phenoxyethanol eingesetzt.

| Substanz | Umsatz dieser Substanz |
|---|---|
| 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol<br>Ph-O-$[CH_2]_2$-O-$[CH_2]_2$OH | nicht messbar* |
| *rac*. 2-Phenoxypropan-1-ol<br>Ph-O-$CH(CH_3)CH_2$OH | nicht messbar* |
| 2-(Phenylsulfanyl)ethanol<br>Ph-S-$[CH_2]_2$OH | nicht messbar* |
| 2-(Ethylsulfanyl)ethanol<br>$CH_3CH_2$-S-$[CH_2]_2$OH | nicht messbar* |

* Raten kleiner als ca. 1 % der Aktivität mit Phenoxyethanol konnten in diesen Versuchen nicht mehr erfasst werden.
Ph in den Formeln steht für Phenyl

Schließlich wurden Derivate von Phenoxyethanol eingesetzt, die am Phenylring substituiert waren. Während 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol nicht merklich gespalten wurde, wurden die anderen dieser Substanzen umgesetzt, wenn auch deutlich langsamer als Phenoxyethanol (siehe Tab. 18). Die höchste Rate wurde mit 2-(4-Bromphenoxy)ethanol erhalten, vergleichbar der Rate mit PEG 300, jeweils bezogen auf die Rate der Kontrolle mit Phenoxyethanol.

Die Aktivitätsdauern bei Umsatz dieser Derivate waren länger als bei Umsatz von Phenoxyethanol.

**Tab. 18**: Umsatz von Phenoxyethanol-ähnlichen Verbindungen durch Zellextrakt. Diese Substanzen wurden im Aktivitätstest der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase anstelle von Phenoxyethanol eingesetzt. Als Näherungswerte der Aktivitätsdauern wurden außerdem die Zeitspannen bis zum NADH-Endpunkt angegeben.

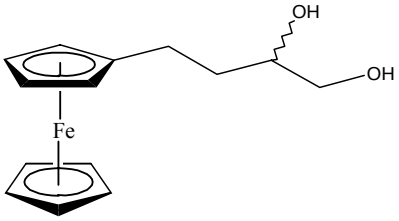
| Substanz | Aktivität mit der Substanz<br><br>relativ zur Aktivität mit Phenoxyethanol | Zeitspanne bis zum NADH-Endpunkt |
|---|---|---|
| **Phenoxyethanol** | **100 %** | **3,5 min** |
| 2-(4-Bromphenoxy)ethanol | 14 % | >9 min |
| 2-(2-Methoxyphenoxy)ethanol | 7 % | ≥ 10 min |
| 2-(2,4,6-Trimethylphenoxy)ethanol | 0,71 % | ≥ 6 min |
| 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol | 0 (nicht messbar) | entfällt |

Für die Phenoxyethanol-Spaltung in Gegenwart von Substanzen, die nicht umgesetzt wurden, jedoch eine Hemmung verursachten, wurden verschiedene Aktivitäts-Verläufe erhalten. Das zeigte sich zum Beispiel bei den Ansätzen mit 2-(Ethylsulfanyl)ethanol bzw. 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol (beide enthielten Aliquote des gleichen Zellextrakts). Nach einer kurzen Kontaktphase von Hemmstoff und Zellextrakt wurde in beiden Fällen Phenoxyethanol zugegeben. Die Anfangsaktivität der Phenoxyethanol-Spaltung war jeweils deutlich niedriger als bei den Ansätzen ohne Hemmstoff. Während die Aktivität des Phenoxyethanol-Umsatzes in Gegenwart von 2-(Ethylsulfanyl)ethanol ungefähr in der Zeit auf null zurückging (linear für ca. 1 min), wie es für die Ansätze ohne den Hemmstoff der Fall war, lief der Phenoxyethanol-Abbau in Gegenwart von 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol für mindestens 3 Minuten mit konstanter Rate ab. Die Präsenz von 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol verlängerte somit die lineare Phase und damit auch die Aktivitätsdauer, Tabelle 19.

Wie im Beispiel mit 2-(Ethylsulfanyl)ethanol wurde auch durch die Hemmstoffe 2-(Phenylsulfanyl)ethanol bzw. 2-Phenoxypropan-1-ol nur die Höhe der Aktivität, nicht aber die Aktivitätsdauer verändert. Berücksichtigt man jeweils die eingesetzten Konzentrationen an Analogon, Phenoxyethanol und Zellextrakt, so kann man diese drei Substanzen nach ihrer

Wirksamkeit als Hemmstoff ordnen. Am wirksamsten war 2-(Phenylsulfanyl)ethanol, dann kam 2-(Ethylsulfanyl)ethanol, die geringste Wirkung hatte *rac.* 2-Phenoxypropan-1-ol (siehe Tab. 19).

Des weiteren wurde eine sterisch anspruchsvollere Substanz eingesetzt: 4-Ferrocenyl-butan-1,2-diol. Diese Substanz enthielt keine Ether-Gruppe, konnte also gar nicht in einer zur Phenoxyethanol-Spaltung analogen Weise gespalten werden. Sie wurde jedoch als möglicher Hemmstoff zugegeben, bevor die Ansätze durch Phenoxyethanol gestartet wurden. Dabei zeigte sich, gemessen an der nur geringen verwendeten Konzentration des 4-Ferrocenyl-butan-1,2-diols, tatsächlich eine relativ starke Hemmwirkung, Tabelle 19.




Auch die Substanz 1,2-Propandiol wurde von der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase nicht umgesetzt, hemmte die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase aber leicht. In Ansätzen, die sowohl Propandiol als auch Phenoxyethanol enthielten, fiel die Aktivität mit Phenoxyethanol geringer aus als in ausschließlich Phenoxyethanol enthaltenden Ansätzen, das Ausmaß der Hemmung war dabei auch von der Kontaktzeit abhängig, Tabelle 19.

Es lässt sich zusammenfassen, dass von Zellextrakt manche der eingesetzten Phenoxyethanol-ähnlichen Substanzen in einer zur Phenoxyethanol-Spaltung analogen Weise umgesetzt wurden. Diese Substanzen wurden alle langsamer gespalten als Phenoxyethanol, mit Ausnahme von Triethylenglycol, aus welchem Acetaldehyd deutlich schneller (und anhaltender) freigesetzt wurde als aus Phenoxyethanol. Von den Phenoxyethanol-ähnlichen Substanzen, die nicht messbar umgesetzt wurden, wirkten einige negativ auf die Phenoxyethanol-Spaltung, siehe Tabelle 19.

**Tab. 19**: Hemmung der Phenoxyethanol-Spaltung in Zellextrakt durch Phenoxyethanol-ähnliche Substanzen. Bei diesen Messungen wurde jeweils erst der Hemmstoff und danach das Phenoxyethanol zugegeben.

| Substanz | Konz. der Substanz [mM] | Konz. des Phenoxyethanols (im gehemmten Ansatz und im Referenz-Ansatz) [mM] | Kontakt-zeit von Zellextrakt und Substanz | Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung (relativ zum ungehemmten Ansatz) | Aktivitäts-dauer der Phenoxy-ethanol-Spaltung |
|---|---|---|---|---|---|
| **ungehemmt** | | 3,5 | | **100 %** | |
| $PhO[CH_2]_2O[CH_2]_2OH$ | 2,9 | 3,5 | 1,8 min | **6 %** | verlängert |
| *dito* | 2,9 | 3,5 | 3 min | **7 %** | verlängert |
| $PhOCH(CH_3)CH_2OH$ | 3,5 | 3,5 | 1 min | **63 %** | nicht verlängert |
| *dito* | 3,5 | 3,5 | 2 min | **54 %** | nicht verlängert |
| *dito* | 3,5 | 3,5 | 4 min | **43 %** | nicht verlängert |
| $PhS[CH_2]_2OH$ | 1,7 | 3,5 | 0,5 min | **13 %** | nicht verlängert |
| *dito* | 1,7 | 3,5 | 0,8 min | **10 %** | nicht verlängert |
| *dito* | 1,7 | 3,5 | 2,5 min | **1 %** | nicht verlängert |
| $CH_3CH_2S[CH_2]_2OH$ | 2,7 | 3,5 | 2,5 min | **10 %** | nicht verlängert |
| *dito* | 2,7 | 3,5 | 2,5 min | **12 %** | nicht verlängert |
| 2-(4-Bromphenoxy)ethanol | 0,53 | 0,72 (Hemm-Ansatz)<br>0,53 (Referenz) | 3,8 min | **71 %** | n. b. |
| 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol | 0,53 | 0,72 (Hemm-Ansatz)<br>0,53 (Referenz) | 1 min | **inaktiv** | entfällt |
| 4-Ferrocenyl-butan-1,2-diol | 0,016 | 7 | mind. 3 min | **20 %** | n. b. |
| 1,2-Propandiol | 3,5 | 3,5 | 2,3 min | **79 %** | n. b. |
| *dito* | 3,5 | 3,5 | 5,2 min | **53 %** | n. b. |

n. b.: nicht bestimmt
Ph in den Formeln steht für Phenyl

### 3.3.5 Versuche mit markiertem Phenoxyethanol

Um Einsichten in den Reaktionsablauf zu bekommen, wurden Versuche mit verschiedenen $^{2}H$- und $^{13}C$-markierten 2-Phenoxyethanolen durchgeführt. Dabei wurde das markierte Substrat zu Stamm-LuPhet-1-Zellsuspensionen gegeben, von diesen umgesetzt und anchließend das gebildete Acetat isoliert und auf den Verbleib der Markierung untersucht (Speranza et al., 2002; Speranza et al., 2003). Sowohl die Synthesen der markierten Phenoxyethanole als auch die NMR-analytischen Untersuchungen des Acetats und deren Auswertung wurden von Frau Dr. Giovanna Speranza und Mitarbeitern (Universität Mailand) durchgeführt.

Es wurden ausschließlich Zellen verwendet, die auf Phenoxyethanol gewachsen waren. Die frisch geernteten und einmal gewaschenen Zellen wurden in Sulfid-reduziertem Medium (mit Hydrogencarbonat gepuffert) resuspendiert; die Proteinkonzentration während der Umsetzung lag im Bereich von 0,1 bis 0,6 mg/ml. Das Phenoxyethanol wurde in Konzentrationen von 9-17 mM zugesetzt und mit den Zellen inkubiert, bis es gespalten war; der Fortgang der Reaktion wurde jeweils anhand von stichprobenhaften HPLC-Messungen (Phenoxyethanol, Phenol und Acetat) verfolgt. In einigen Fällen war die Reaktion bereits nach teilweisem Umsatz praktisch zum Erliegen gekommen, um Austauschreaktionen am Acetat durch andere Enzyme zu vermeiden, wurde in diesen Fällen trotz unvollständigem Umsatz die Inkubation beendet. Insgesamt ergaben sich Inkubationsdauern von 2 bis 28 Stunden und Umsätze von jeweils mindestens 50 %, bis auf einen Fall mit einem Umsatz von nur ca. 25 %. Mit Verbindung **1** wurde kein Zellsuspensionsversuch durchgeführt; stattdessen wurde in diesem Fall das markierte Phenoxyethanol direkt der Kultur als Substrat zugesetzt (anfängliche Phenoxyethanol-Konzentration von 4,2 mM). In diesem Versuch erstreckte sich die Inkubation über einige Tage und die Proteinkonzentration nach Wachstum lag bei nur ca. 0,01 mg/ml. In allen Versuchen wurden die Zellen nach Wachstum bzw. Inkubation aus dem Reaktionsansatz abgetrennt, danach wurde aus dem Reaktionsansatz das Acetat durch ein Extraktionsverfahren, das sich in Vorversuchen als praktikabel erwiesen hatte, aufgereinigt und durch $^{1}H$ und $^{13}C$-NMR-Aufnahmen analysiert.

Zunächst wurden Deuterium-markierte Phenoxyethanole eingesetzt. Zum einen war dies Verbindung **1** mit zwei Deuteriumatomen am Alkohol-Kohlenstoff, zum anderen Verbindung **2** mit zwei Deuteriumatomen an C-2, der Gehalt der $^{2}H_2$-Moleküle lag jeweils über 98 %, siehe Abbildung 3.22.

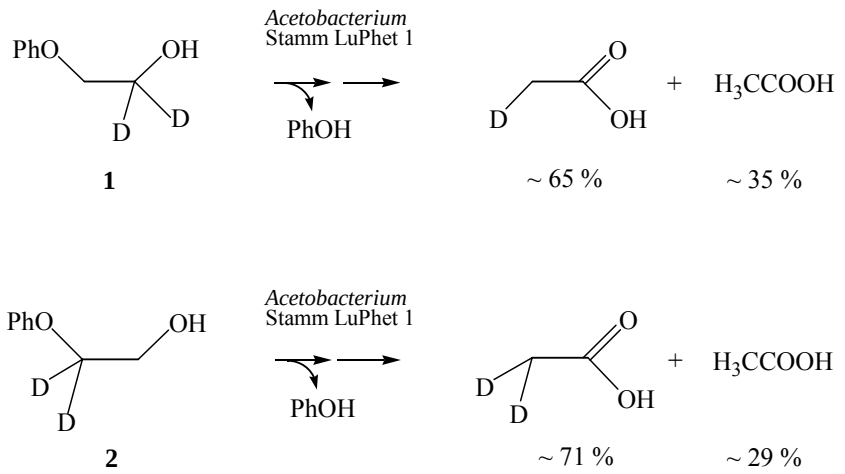



**Abb. 3.22**: Umsatz der deuterierten Phenoxyethanole 2-Phenoxy(1,1-$^2H_2$)ethanol (**1**) bzw. 2-Phenoxy(2,2-$^2H_2$)ethanol (**2**) durch ganze Zellen von Stamm LuPhet 1.

Aus **1** wurde eine Mischung aus einfach-deuteriertem und ca. 35 % nicht-deuteriertem Acetat erhalten. Aus **2** wurde eine Mischung aus zweifach-deuteriertem und ca. 29 % nicht-deuteriertem Acetat erhalten. Der Vergleich der $^1$H-Spektren mit ihren für die $CH_2D$- bzw. die $CHD_2$-Gruppe typischen Signalen und der $^{13}$C-Spektren mit ihren für die $^{13}CH_2D$- bzw. die $^{13}CHD_2$-Gruppe typischen Signalen hatte eindeutig das jeweilige Fehlen des doppelt-deuterierten Acetats bei **1** bzw. des einfach-deuterierten Acetats bei **2** ergeben. Das unmarkierte Acetat dürfte aus Reduktionsäquivalenten und $CO_2$ über den Reduktiven Acetyl-CoA-Weg entstanden sein (im Folgenden kurz als *de-novo*-Acetat bezeichnet). Im Falle des Umsatzes von **1** konnte somit ein gewisser Verlust von Deuterium an das Medium nicht ausgeschlossen werden; dieses Experiment war als einziges als Wachstums- und nicht als Zellsuspensionsversuch durchgeführt worden. Die Daten zeigten, dass keine zufällige Verteilung der Deuteriumatome auf die beiden Kohlenstoffatome des Acetats stattgefunden hat, sondern die Reaktion einheitlich abgelaufen war. Während bei Deuterierung von Phenoxyethanol an C-1 (Verbindung **1)** nur eines der beiden Deuteriumatome im Produkt verblieb, waren beide Methylen-Deuteriumatome bei Deuterierung an C-2 (Verbindung **2**) auch noch im daraus gebildeten Acetat enthalten.

Die weiteren Versuche wurden mit Phenoxyethanolen durchgeführt, die gleichzeitig $^2$H und $^{13}$C enthielten.

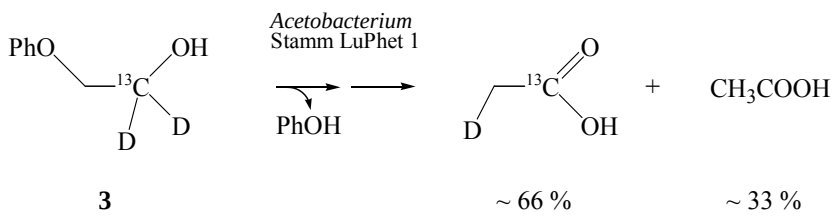



**Abb. 3.23**: Umsetzung von 2-Phenoxy(1-$^{13}$C,1,1-$^{2}$H$_2$)ethanol (**3**) durch ganze Zellen von Stamm LuPhet 1.

In Verbindung **3** war der Kohlenstoff C-1 komplett durch $^{13}$C ersetzt und zudem zweifach deuteriert (intramolekulare Isotopensubstitution > 98 %). Diese Verbindung wurde direkt, d. h. ohne Verdünnung mit unmarkiertem Phenoxyethanol, eingesetzt (Abb. 3.23). Es entstand eine Mischung aus ca. 66 % monodeuteriertem Acetat, welches jeweils gleichzeitig $^{13}$C in der Carboxygruppe enthielt, und ca. 33 % undeuteriertem Acetat. Die Abwesenheit des Isotopomers $^{12}CH_2D$-$^{12}CO_2^-$ erlaubte es, einen Austausch der Carbonylgruppe mit dem Medium auszuschließen.

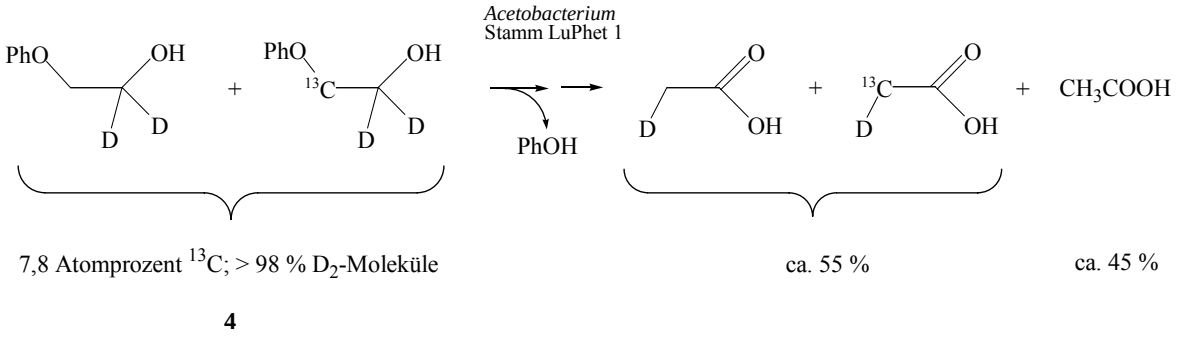
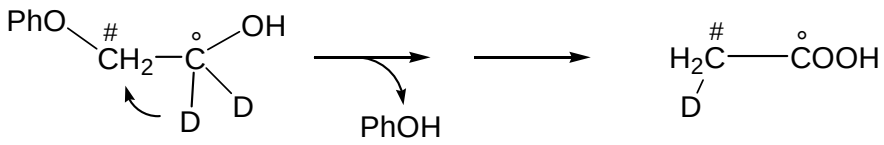



**Abb. 3.24**: Umsetzung einer Mischung (**4**) aus 2-Phenoxy(1,1-$^{2}$H$_2$)ethanol und 2-Phenoxy(2-$^{13}$C,1,1-$^{2}$H$_2$)ethanol durch ganze Zellen von Stamm LuPhet 1.

Im nächsten Versuch wurde Mischung **4** aus zwei unterschiedlich markierten Phenoxyethanolen eingesetzt (Abb. 3.24); die Mischung bestand zum einen aus Phenoxyethanol, bei dem C-1 doppelt deuteriert und das Kohlenstoffatom C-2 durch $^{13}$C ersetzt war, zum anderen aus Phenoxyethanol, welches nur die doppelte Deuterierung an C-1 enthielt. Das Acetat nach Umsatz von **4** war zu ca. 45 % unmarkiert und zu ca. 55 % monodeuteriert (aus dem Verhältnis der Signale von $^{12}CH_3$ zu $^{12}CH_2D$ im Protonen-Spektrum berechnet). Mit ca. 45 % war der Anteil des unmarkierten am gesamten erhaltenen Acetat relativ groß, im Rahmen der experimentellen Fehlergrenzen entsprach aber der $^{13}$C-Gehalt der undeuterierten Methylgruppe dem natürlichen $^{13}$C-Gehalt. Wäre das Deuterium teilweise verloren gegangen, hätte dieser $^{13}$C-Gehalt erhöht sein sollen. Im Protonenspektrum waren außerdem $^{13}CH_2D$-Satelliten zu

erkennen (mit einer höheren Intensität als die Signale der $^{13}CH_3$-Satelliten). Die Intensitäten der Signale (1:16:3), die im $^{13}C$-NMR-Spektrum für die $^{13}CH_3$-Gruppe (Singulett, $^{13}C$-haltiges *de-novo*-Acetat (natürlicher $^{13}C$-Gehalt)), für die $^{13}CH_2D$-Gruppe (Triplett hochfeldverschoben, Acetat aus Phenoxyethanol entstanden) bzw. für die $^{13}COO^-$-Gruppe (Singulett, durch den natürlichen $^{13}C$-Gehalt des gesamten isolierten Acetats) erhalten wurden, zeigten ungefähr die zu erwartenden Verhältnisse[4].

Die Befunde der Versuche mit **1**, **2**, **3** und **4** passten zueinander und standen im Einklang mit einem Wasserstofftransfer (intra- oder intermolekular) von C-1 nach C-2 und einer Umformung des C-1 von Phenoxyethanol in die Carboxygruppe des markierten Acetats und entsprechend des C-2 in die Methylgruppe (siehe Schema 1).




Schema 1

Anhand der Versuche mit Verbindung **3** bzw. Mischung **4** war es nicht möglich zu unterscheiden, ob die 1,2-Verschiebung des Wasserstoffs intra- oder intermolekular verlief. Ein intermolekularer Transfer könnte zum Beispiel auftreten, wenn das Wasserstoffatom abstrahiert würde und im Enzym verbliebe, bis es auf eines der nächsten Substratmoleküle übertragen würde, während das erste Substratmolekül ein anderes Wasserstoffatom zurück bekäme.

Geklärt werden konnte die Frage durch Einsatz von Mischung **5** aus 82 % unmarkiertem Phenoxyethanol und 18 % des gemischt markierten Phenoxyethanols 2-Phenoxy(1,2-$^{13}C_2$,1,1-$^2H_2$)ethanol, in dem beide Kohlenstoffe des Glycolgerüsts aus $^{13}C$

[4] Intensität 3 für $^{13}COO^-$ (durch natürlichen Gehalt von $^{13}C$ im gesamten isolierten Acetats) im Vergleich zu Intensität 1 für $^{13}CH_3$ (durch natürlichen Gehalt von $^{13}C$ im *de-novo*-Acetat) bedeutet: Der Anteil des *de-novo*-Acetats am gesamten isolierten Acetat beträgt etwa 1/3, die anderen 2/3 Acetat stammen aus Phenoxyethanol (ein Teil aus dem $^{13}C$-markierten Phenoxyethanol, der andere Teil aus nicht-$^{13}C$-markiertem Phenoxyethanol).
Das Drittel des Acetats mit natürlichem $^{13}C$-Gehalt in der Methylgruppe (aus *de-novo*-Synthese) verursacht ein Signal der Stärke 1. Die anderen zwei Drittel des Acetats stammen aus Phenoxyethanol, ihnen entspricht ein Signal der Stärke 16 (für den $^{13}C$-haltigen Anteil = $^{13}CH_2D$-Gruppe), der mittlere $^{13}C$-Gehalt des Acetats aus Phenoxyethanol beträgt somit das 8-fache des natürlichen Gehalts! Das entspricht etwa dem mittleren $^{13}C$-Gehalt des eingesetzten Phenoxyethanols.

bestanden und beide Wasserstoffe an C-1 durch Deuterium ersetzt waren (intramolekulare Isotopensubstitution > 98 %) (Abb. 3.25).

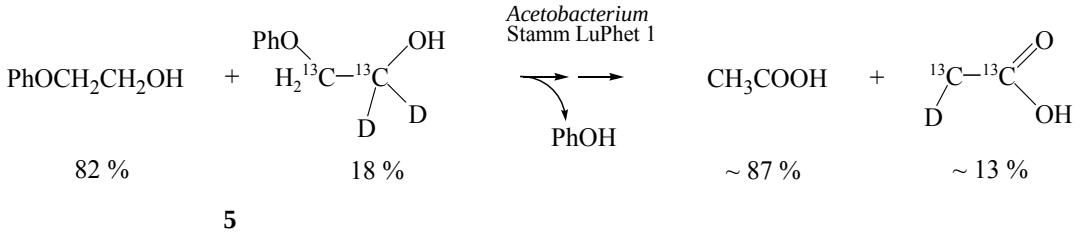



**Abb. 3.25**: Umsetzung von verdünntem 2-Phenoxy(1,2-$^{13}C_2$,1,1-$^{2}H_2$)ethanol (**5**) durch ganze Zellen von Stamm LuPhet 1.

Das Protonenspektrum nach Umsetzung von **5** zeigte, dass nur undeuteriertes (ca. 87 %) und monodeuteriertes Acetat (ca. 13 %) gebildet wurde. Das monodeuterierte Acetat enthielt zugleich an jeweils beiden Kohlenstoff-Positionen $^{13}$C-Kerne, es gab keine Signale einer $^{12}CH_2D$-Gruppe. Das undeuterierte Acetat, welches zum Teil aus dem unmarkierten Phenoxyethanol und zum Teil aus der *de-novo*-Synthese hervorging, wies in C-1 und C-2 ungefähr den natürlichen $^{13}$C-Gehalt auf, wie das Verhältnis der Isotopomeren im $^{13}$C-Spektrum ergab. Die Konzentrationen, die für $^{13}CH_2DCO_2^-$ bzw. $^{13}CH_3{}^{13}CO_2^-$ aus dem $^{13}$C-Spektrum abgeschätzt wurden, waren mit maximal je 1 % aller $^{13}$C-haltigen Acetat-Moleküle sehr gering; sie könnten aus H- und CO-Austauschreaktionen hervorgegangen sein.
Dieser Versuch ergab eindeutig, dass die 1,2-Wasserstoff- bzw. Deuterium-Wanderung nicht inter- sondern intramolekular verlief, weil dabei kein Deuterium von markiertem zu unmarkiertem Phenoxyethanol verschleppt wurde.

Des weiteren wurde noch die verborgene Stereospezifität der Phenoxyethanol-Spaltung untersucht. Um die beiden enantiotopen Wasserstoffe der primären Alkohol-Gruppe des Phenoxyethanol unterscheiden zu können, wurden die Enantiomere (*R*)- und (*S*)-2-Phenoxy(1-$^{2}$H)ethanol (jeweils $^{2}$H-Moleküle > 98 % und Enantiomerenüberschuss > 99 %) in den Versuchen getrennt eingesetzt, siehe Abbildung 3.26. Aus dem (*S*)-Enantiomer wurde eine Mischung aus ca. 29 % undeuteriertem und ca. 71 % monodeuteriertem Acetat erhalten, während aus dem (*R*)-Enantiomer nur undeuteriertes Acetat gebildet wurde. Somit wanderte ausschließlich der pro-*S*-Wasserstoffrest des enantiotopen Paares.

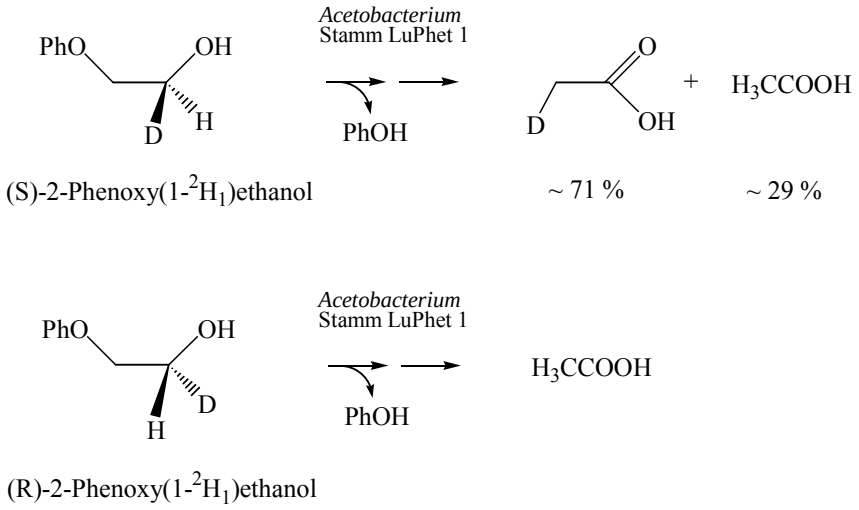



**Abb. 3.26**: Umsetzung von (R)- bzw. (S)-2-Phenoxy(1-$^2$H)ethanol durch ganze Zellen von Stamm LuPhet 1.

Die Versuche mit **1** und **2** hatten die Hypothese nahegelegt, dass C-1 von Phenoxyethanol zur Carboxygruppe des Acetats wurde (und C-2 entsprechend zur Methylgruppe), und dass im Zuge der Phenoxyethanol-Spaltung die Wanderung eines H bzw. D von C-1 nach C-2 stattfand. Die Versuche mit **3** und **4** bestätigten diese Hypothese. Zudem ergaben die Umsetzungen von **3, 4** sowie von **5**, dass kein Verlust des wandernden Deuteriums durch Austausch mit dem Medium auftrat. Diese drei Versuche belegten weiterhin, dass während der Biotransformation die Integrität des Glycolgerüsts erhalten blieb: aus **5** entstand nur Acetat mit keinem oder mit zwei $^{13}$C-Kernen im Glycolgerüst. Der Versuch mit **5** ergab außerdem, dass die 1,2-Wasserstoff- bzw. Deuterium-Wanderung intramolekular verlief. Und schließlich wurde gezeigt, dass der Angriff an die Methylengruppe C-1 des Phenoxyethanols stereospezifisch erfolgte, da nur der pro-*S*-Wasserstoffrest von C-1 des Phenoxyethanols im C-2 des Acetats landete.

Es soll in diesem Zusammenhang noch angemerkt werden, dass bei der Umsetzung von Verbindung **3**, die im Versuch mit einem Isotopengehalt von 98 % [1-$^{13}$C, 1,1-$^2$H$_2$] eingesetzt wurde (Abb. 3.23), kein merklicher Isotopeneffekt festzustellen war. Für das Intervall 0-3,5 min wurde mit Verbindung **3** nämlich eine Phenolbildungsrate von ca. 7,7 U/mg Protein gemessen, ein typischer Wert für unmarkiertes Phenoxyethanol (siehe Kapitel 3.3.2).

# 4. Diskussion

Im Zellextrakt von *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 fand sowohl eine Dehydratisierung von vicinalen Diolen (getestet mit Ethylenglycol als Substrat) als auch eine Spaltung von 2-Phenoxyethanol statt; die unterschiedlichen Eigenschaften dieser Aktivitäten legten nahe, dass die Reaktionen durch verschiedene Enzyme katalysiert werden (Frings und Schink, 1994).
Experimente der vorliegenden Arbeit bestätigten diese Vermutung (siehe 4.2.1). Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass die Phenoxyethanol-Spaltung nur durch eine Seitenaktivität der Diol-Dehydratase katalysiert wurde.

## 4.1 Diol-Dehydratase

In Zellextrakt von *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 konnte unter den üblichen anoxischen Bedingungen im gekoppelten Enzymtest mit Ethylenglycol bzw. 1,2-Propandiol eine langanhaltende Diol-Dehydratisierungsreaktion gemessen werden. Diese Aktivität war konstant, wobei ihr gelegentlich Anlaufphasen voraus gingen, in denen sie sich zunächst noch steigerte. Im Vergleich zur Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase war die Dehydratase-Aktivität wesentlich besser und zuverlässiger zu messen (kleinere Fehlerbalken), weil die Dehydratisierung über viele Minuten mit konstanter Rate ablief, aber auch weil die Aktivität im Laufe eines Versuchs kaum abnahm (bei zugesetztem Coenzym $B_{12}$).

Es konnte gezeigt werden, dass Coenzym $B_{12}$ eine wichtige Rolle bei der Dehydratisierung spielte; durch den Zusatz von Coenzym $B_{12}$ wurde die Aktivität zumindest verdoppelt, manchmal fand die Dehydratisierung überhaupt nur bei Zusatz von Coenzym $B_{12}$ statt. Sehr wahrscheinlich war Coenzym $B_{12}$ auch *in vivo* Cofaktor der Reaktion. In diesem Zusammenhang dürfte sich auch die leicht negative Wirkung von Titancitrat erklären, denn durch Ti(III) wurde ein Teil des Coenzyms $B_{12}$ reduktiv gespalten, was die Konzentration an intaktem Coenzym $B_{12}$ verringerte und wodurch zugleich andere Cobalamine entstanden, die möglicherweise hemmend wirkten.

Verschiedene Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass für den Umsatz von Ethylenglycol und Propandiol wahrscheinlich jeweils dieselbe Dehydratase verantwortlich war. Zum Beispiel betrug mit racemischem 1,2-Propandiol die spezifische Aktivität in Zellextrakt

jeweils das 1,8- bis 3,3-fache der spezifischen Aktivität mit Ethylenglycol. Dieses Verhältnis war unabhängig davon, ob jeweils mit oder ohne Coenzym-$B_{12}$-Zusatz gemessen worden war sowie unabhängig davon, ob die Zellen auf Lactat oder Ethylenglycol angezogen waren. Dieser Wert stimmte außerdem gut überein mit dem Verhältnis der Wechselzahlen der aus *K. oxytoca* gereinigten Diol-Dehydratase von ca. 1,7 bei Zusatz von Coenzym $B_{12}$ (Bachovchin et al., 1977). Außerdem ergab der Vergleich von Ansätzen, die beide Diol-Substrate enthielten, mit Ansätzen, die jeweils nur ein Substrat enthielten, dass die gemessene Gesamtaktivität bei Gegenwart beider Substrate zwar größer als die Einzelaktivität mit Ethylenglycol aber geringer als die Einzelaktivität mit Propandiol war. Wären zwei verschiedene Enzyme für die Wasserabspaltung aus Ethylenglycol bzw. Propandiol zuständig gewesen, hätte die Gesamtaktivität ungefähr so hoch sein sollen wie die Summe der einzeln gemessenen Aktivitäten; es sei denn beide Enzyme wären jeweils durch das andere Diol-Substrat etwas gehemmt worden.

Zellen enthielten mehr Diol-Dehydratase-Aktivität, wenn sie mit Ethylenglycol angezogen worden waren als nach Wachstum auf Lactat. Mit diesem Verhältnis korrelierte die Intensität einer Proteinbande bei ca. 63 kDa in SDS-Gelen von Zellextrakten von Stamm LuPhet 1 insofern, als sie in der Spur des Ethylenglycol-Zellextrakts stärker war als in Lactat-Zellextrakt. Diese Masse von 63 kDa wäre dem Wert der $\alpha$-Untereinheiten der Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* von 60 kDa recht ähnlich (Toraya, 1999). Ob bei Stamm LuPhet 1 eventuell auch entsprechend β- und γ-Untereinheiten mit apparenten Massen von 30 und 19 kDa vorhanden waren, ließ sich anhand dieser Gele nicht beurteilen.

Für die Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca* ist bekannt, dass sie bei Abwesenheit von Substrat relativ leicht zerfällt und dabei ihre Aktivität verliert. Durch Re-Assoziieren, gefördert durch den Zusatz von Substrat, kann die Aktivität wiederhergestellt werden (Toraya, 1999). Der $K_m$-Wert für racemisches 1,2-Propandiol ist kleiner als der für Ethylenglycol (Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca:* $K_m$(rac. Propandiol) = 0,03 mM, $K_m$(Ethylenglycol) = 0,66 mM (Bachovchin et al., 1977)). Für den Zusammenhalt des Enzyms spielt auch $K^+$ eine wichtige Rolle. Der $K_m$-Wert für $K^+$ liegt bei 0,67 mM (*K. oxytoca*, ermittelt mit 1,2-Propandiol als Substrat) (Toraya et al., 1971). Wie Kristallstruktur-Untersuchungen ergaben, wird das $K^+$-Ion im tief verborgenen aktiven Zentrum gebunden, die OH-Gruppen des Substrats koordinieren direkt daran. Im Komplex mit Propandiol scheint dieses $K^+$ für andere monovalente Ionen wie $NH_4^+$ nicht mehr zugänglich zu sein (Shibata et al., 1999). In der Literatur

finden sich außerdem Hinweise darauf, dass das Binden von Coenzym $B_{12}$ an die Diol-Dehydratase bzw. an die Ethanolamin-Ammoniak-Lyase kein sehr schneller Prozess ist, sondern möglicherweise in den ersten Minuten die Umsatz-Rate limitieren könnte (Frey et al., 1967; Toraya et al., 1997 (Diol-Dehydratase aus *K. oxytoca);* Sauvageot et al., 2002 (Diol-Dehydratase aus *L. collinoides);* Hollaway et al., 1978 (Ethanolamin-Ammoniak-Lyase aus *Clostridium* sp.); Bandarian und Reed, 2000 (Ethanolamin-Ammoniak-Lyase aus *Salmonella typhimurium*)).

Mit solchen Eigenschaften bzw. Vorgängen könnten vielleicht auch die beim Diol-Dehydratase-Enzym aus Stamm LuPhet 1 aufgetretenen Anlaufphasen sowie die differenzierten Wirkungen der $K^+$-Konzentration erklärt werden. In Versuchen mit diesem Bakterienstamm wirkte sich nämlich eine erhöhte $K^+$-Konzentration von 550 mM im Vergleich zu 50 mM uneinheitlich aus. Ohne gleichzeitigen Zusatz von Coenzym $B_{12}$ wurde durch die hohe Kaliumkonzentration die Aktivität meistens verringert. Wurde jedoch auch Coenzym $B_{12}$ zugesetzt, war die Wirkung abhängig vom verwendeten Substrat. Mit Propandiol erhöhte sich die Aktivität, mit Ethylenglycol ging sie etwas zurück. Dies könnte mit unterschiedlichen Affinitäten für die beiden Substrate zusammenhängen, wobei das mit Propandiol im Vergleich zu Ethylenglycol häufigere Auftreten von Anlaufphasen andeutete, dass die Affinität des Enzyms für Propandiol größer sein könnte als für Ethylenglycol, wie dies auch beim Enzym aus *K. oxytoca* der Fall ist. Die Menge an Holoenzym könnte nach Start der Reaktion (= Zusatz des Substrats) anfangs noch zugenommen haben, durch ein Zusammenlagern von zerfallener Diol-Dehydratase mit Coenzym $B_{12}$, ausgelöst (oder verstärkt) durch die Gegenwart des Substrats. Dieser Prozess würde vermutlich jeweils vom Grad des Zerfalls, der Konzentration des Coenzyms $B_{12}$, der Kaliumkonzentration und der Affinität des jeweiligen Substrats zum Enzym abhängen.

Die Vorgänge bis zur Ausbildung der konstanten Diol-Dehydratase-Aktivität waren somit vermutlich relativ komplex und sollen hier nicht weiter diskutiert werden.

Die Eigenschaften dieser Diol-Dehydratase aus *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1, wie

- die Abhängigkeit von Coenzym $B_{12}$
- das Verhältnis der Aktivitität mit Propandiol zur Aktivität mit Ethylenglycol
- die Aktivitätssteigerung durch erhöhte Kaliumionenkonzentration (mit Propandiol)
- das offenkundige Auftreten von Zerfallen und Re-Assoziationssvorgängen
- eine augenscheinlich höhere Affinität für Propandiol als für Ethylenglycol

sind den entsprechenden Eigenschaften der Diol-Dehydratase beispielsweise aus *K. oxytoca* ziemlich ähnlich. Außerdem stimmt eventuell die Masse (einer Untereinheit) überein.

Es dürfte sich bei der Diol-Dehydratase aus Stamm LuPhet 1 folglich ebenfalls um eine „klassische“ Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase (EC 4.2.1.28) handeln.

## 4.2 Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase

### 4.2.1 Vergleich von Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase und Diol-Dehydratase

Diol-Dehydratase und Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase wurden unterschiedlich exprimiert, denn bei Rohextrakt von Zellen, die auf Ethylenglycol gewachsen waren, wurden deutlich höhere Diol-Dehydratase-Aktivitäten (mit Ethylenglycol und Propandiol) erhalten als bei Extrakten nach Wachstum auf Lactat, während es sich bezüglich der Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase gerade umgekehrt verhielt. Die spezifische Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung bei Extrakt aus lactatgewachsenen Zellen war höher als bei Extrakt aus ethylenglycolgewachsenen Zellen.

Während für die Diol-Dehydratase-Aktivität der Zusatz von Coenzym $B_{12}$ zum Teil essentiell war, zumindest jedoch für eine deutlich höhere Aktivität sorgte, blieb der Coenzym-$B_{12}$-Zusatz für die Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase jeweils wirkungslos.

Die Diol-Dehydratisierung wurde jeweils mit gleichbleibender Rate und langanhaltend katalysiert, während die Spaltung von Phenoxyethanol mit abklingender Rate und insgesamt nur für kurze Zeit ablief. Ähnliches war auch für *Acetobacterium* Stamm HA1 und *Pelobacter venetianus* beschrieben worden, dort wiesen die jeweiligen Diol-Dehydratisierungen ebenfalls anhaltende Aktivitäten auf, während die PEG-spaltenden Aktivitäten jeweils schnell abfallende Aktivitäten zeigten (Schramm und Schink, 1991; Frings et al., 1992). Die je nach Substrat unterschiedlichen Aktivitäts-Verläufe sind für sich genommen noch kein sicheres Indiz für

verschiedene Enzyme. Es könnte sich dabei auch um ein einziges Enzym handeln, welches mit manchen Substraten inaktiviert wird, wie es zum Beispiel für die Diol-Dehydratase mit Glycerin als Substrat bekannt ist (Toraya et al., 1976).
Experimente mit zellfreiem Extrakt, bei denen die verschiedenen Substrate nacheinander und in unterschiedlicher Reihenfolge zugesetzt worden waren, zeigten allerdings, dass im Anschluss an das Erliegen der Phenoxyethanol-Umsetzung weiterhin Ethylenglycol oder Propandiol dehydratisiert wurde, diese Reaktion somit unbeeinträchtigt blieb. Versuche dieser Art ergaben zusammengenommen, dass die Phenoxyethanol-Spaltung unabhängig von einer funktionierenden Dehydratisierung war und dass umgekehrt die Dehydratisierung nicht von einer funktionierenden Phenoxyethanol-Spaltung abhing. Ferner setzte die Diol-Dehydratase Phenoxyethanol nicht um und wurde durch Phenoxyethanol auch nicht gehemmt. Gleichfalls setzte die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase Ethylenglycol und Propandiol nicht um. Sie wurde durch Propandiol allerdings etwas gehemmt; für Ethylenglycol wurde das nicht untersucht.

Letztendlich konnte mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Reaktionen der Dehydratisierung von Ethylenglycol und Propandiol bzw. die Spaltung von Phenoxyethanol durch verschiedene Enzym(system)e katalysiert wurden.

### 4.2.2 Expression der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase in Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat

Überraschenderweise war die Fähigkeit Phenoxyethanol zu spalten, nicht auf Zellen beschränkt, die auf Phenoxyethanol oder PEG 300 gewachsen waren, sondern war genauso ausgeprägt in Zellen, die seit vielen Generationen auf *D,L*-Lactat wuchsen.
Bei Wachstum auf Lactat wurde Lactat in den Zellen mit einer ähnlichen Rate umgesetzt wie Phenoxyethanol bei Wachstum auf Phenoxyethanol. Bei Zellsuspensionsversuchen dagegen wurde Phenoxyethanol jeweils sehr schnell gespalten, Lactat aber wurde nicht oder nur sehr langsam umgesetzt, unabhängig davon, ob die Zellen auf Lactat oder Phenoxyethanol gewachsen waren. Vermutlich ist das den Lactat-Abbau einleitende Enzym also nicht identisch mit der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase.
*D*- und *L*-Lactat werden wahrscheinlich durch Lactat-Dehydrogenasen zu Pyruvat oxidiert und Pyruvat wird anschließend durch eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Erst bei den nachfolgenden Reaktionen dürften beide Abbauwege

zusammenlaufen: vermutlich entsteht auch beim Lactat-Abbau aus Acetyl-CoA unter ATP-Synthese Acetat, und die jeweils anfallenden Reduktionsäquivalente bilden mit $CO_2$ über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg weiteres Acetat.

Auch Zellen, die mit anderen Substraten angezogen worden waren, konnten Phenoxyethanol spalten, zum Teil mit geringerer Aktivität als auf Phenoxyethanol oder Lactat gewachsene Zellen. Allerdings wurden nur relativ wenige Zellsuspensionen untersucht, und dabei gab es bereits große Unterschiede zwischen den jeweils für ein bestimmtes Wachstumssubstrat erhaltenen Aktivitätswerten. Vielleicht waren außerdem bei $H_2/CO_2$ und möglicherweise auch bei Glycerin noch zu wenige Generationen auf dem jeweiligen Substrat durchlaufen worden, als dass sich eine verringerte Exprimierung der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase hätte einstellen können. Insgesamt lagen die verschiedenen ermittelten Aktivitäten nur um ca. eine Größenordnung auseinander. Dies legt den Schluss nahe, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase konstitutiv exprimiert wurde. Die ursprüngliche Hoffnung auf eine klare Induzierbarkeit der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase und damit auf eine einfache Identifizierung der zugehörigen Proteine in Elektrophorese-Gelen hatte sich somit zerschlagen.

Trotzdem wurden die Proteinmuster nach Wachstum auf verschiedenen Substraten in eindimensionalen SDS-Gelen verglichen. Hierbei wurden nur proteinreiche Banden mit Massen von mindestens 30 kDa berücksichtigt; die Banden unter 30 kDa waren zu schwach angefärbt. Die Intensitäten einer proteinreichen Bande bei 83 bzw. 89 kDa korrelierten ungefähr mit den Phenoxyethanol-Spaltungsaktivitäten der jeweiligen Zellen. Diese Bande schien zwar bei Glycerin zu dick und bei Fructose zu dünn zu sein im Vergleich zu den Messwerten, jedoch waren auch die Schwankungsbreiten der Messwerte ziemlich groß. Andere dicke Banden stimmten weniger gut mit den gemessenen Anfangsaktivitäten überein. Die Proteinbande mit einer apparenten Masse von 83/89 kDa in den denaturierenden Elektrophorese-Gelen könnte folglich zur Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase gehören.

Für den Nachweis von radikalischen Zwischenstufen bieten sich Elektronenspinresonanz-Untersuchungen an (Mason, 1996; Swartz und Swartz, 1983). Solche Messungen sind im Prinzip auch mit Zellextrakt (Duboc-Toia et al., 2003; Verfürth et al., 2004), sogar mit intakten Zellen möglich (Duboc-Toia et al., 2003). Obwohl von Anfang an vermutet wurde, dass die Phenoxyethanol-Spaltung radikalisch initiiert werden könnte, wurden aus folgenden Gründen noch keine Elektronenspinresonanz-Messungen durchgeführt. Da die Phenoxy-

ethanol-Acetaldehyd-Lyase offensichtlich konstitutiv exprimiert wurde, konnte für Vergleichsmessungen kein nicht-induzierter Zellextrakt als Negativkontrolle herangezogen werden. Des weiteren war die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase sehr empfindlich und somit die Schwankungsbreite der Aktivitätswerte ziemlich groß. Außerdem hatte die Aktivität in Zellextrakt nach Substratzugabe nur eine Lebensdauer von wenigen Minuten. Letztlich wäre jegliche Quantifizierung nur sehr ungenau möglich gewesen und damit erschien die Zuordnung eines eventuellen Signals zur Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase bislang als zu unsicher.

### 4.2.3 Eigenschaften der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase

#### *4.2.3.1 Aussagekraft der Versuche*

Die Versuche zur Charakterisierung der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase wurden mit zellfreiem Extrakt durchgeführt. Das Inaktivieren führte bei Extrakt stets innerhalb weniger Minuten zum vollständigen Erliegen der Phenoxyethanol-Spaltung (unabhängig vom Testverfahren); ein Reaktivieren fand nur in ganzen Zellen statt (siehe 3.3.3 und 4.2.3.3). Untersuchungen mit Extrakt geben deshalb nur Auskunft über die aktivierte Lyase, nicht aber über den Reaktivierungsvorgang.

Das vollständige Erliegen der Phenoxyethanol-Spaltung würde beim gekoppelten Alkohol-Dehydrogenase-Testverfahren ein entsprechendes Abklingen des NADH-Verbrauchs nach sich ziehen. Wie im Ergebnisteil (Abschnitt 3.3.4.4) dargelegt wurde, könnten außerdem NADH-regenerierende oder andere Acetaldehyd-verbrauchende Prozesse abgelaufen sein. Die jeweils aufgezeichnete Absorptionskurve war das Abbild sämtlicher ablaufender Reaktionen. Da die Aktivitätswerte generell nur aus der Anfangsphase der Kurve ermittelt wurden, dürfte der Einfluss dieser potentiellen Nebenreaktionen allerdings eher klein geblieben sein. Zu Beginn können diese Vorgänge im Vergleich zur Spaltung von Phenoxyethanol nur langsam ablaufen: einerseits fehlt es noch an $NAD^+$, andererseits begünstigen die Konzentrationsverhältnisse zunächst das Ablaufen der Reduktion des Acetaldehyds. Letztendlich würden diese Nebenreaktionen zu einer Unterschätzung der Aktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase führen. In der Tat wurden mit dem gekoppelten Alkohol-Dehydrogenase-Testverfahren für Zellextrakt aber zum Teil relativ hohe spezifische Anfangsaktivitäten erhalten. Hohe spezifische Anfangsaktivitäten bedeuten außerdem, dass für das Ablaufen der Phenoxyethanol-Spaltung das *in-vitro*-Testsystem aus Kaliumphosphatpuffer mit Titancitrat,

Zellextrakt und Phenoxyethanol (sowie NADH und Alkohol-Dehydrogenase für die Nachweisreaktion) funktionstüchtig gewesen ist.

#### *4.2.3.2 Verschiedenes*

Die maximalen Aktivitäten von ca. 10 U/mg Protein, die mit zellfreiem Extrakt erreicht wurden, stimmten mit den maximalen Aktivitäten von Suspensionen intakter Zellen überein. Hohe spezifische Anfangsaktivitäten wurden bei Zellextrakt-Versuchen (gekoppelter Enzymtest) sowohl mit kleinen als auch mit großen Proteinkonzentrationen erhalten. Im direkten Vergleich ergab sich keine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der absoluten Proteinmenge (getestet im Bereich von 0,01-0,29 mg Protein pro ml). Ferner wiesen nach eintägigem Lagern sowohl der Zellextrakt mit 2 mg Protein pro ml als auch der Zellextrakt mit 8 mg Protein pro ml noch knapp 90 % der Aktivität des Vortages auf. Diese Befunde legen nahe, dass während der eigentlichen Spaltung von Phenoxyethanol nicht mehrere Proteine zusammentreffen müssen, sondern dass die Reaktion durch ein einzelnes Enzym katalysiert wird. Sie sprechen auch gegen einen leichten Zerfall dieses Enzyms in inaktive Untereinheiten oder den leichten Verlust eines Cofaktors.
Speziell gegen die Beteiligung eines mehrwertigen Metallkations an der Reaktion spricht auch, dass der Zusatz der Komplexierungsmittel EDTA und Citrat (als Titancitrat) bei der Phenoxyethanol-Spaltung keinen Aktivitätsrückgang verursachte.

Frühere Versuche (Frings und Schink, 1994) hatten gezeigt, dass sich die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase in Zellextrakt durch den Zusatz von Coenzym $B_{12}$ nicht fördern bzw. durch Hydroxo- oder Cyanocobalamin nicht hemmen ließ. Auch bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit - bei deutlich höheren Enzymaktivitäten - hatte der Zusatz von Coenzym $B_{12}$ keinen Effekt. Des weiteren war die Aktivität in Tris-Puffer mit oder ohne den Zusatz von 0,5 M Kaliumchlorid jeweils gleich groß; allerdings enthielt der Tris-Puffer auch ohne zugesetztes Kaliumchlorid bereits etwa 0,7 mM Kaliumionen, die noch aus dem Aufschlusspuffer stammten. Auf die Diol-Dehydratase von Stamm LuPhet 1 wirkte sich dagegen der Zusatz von Coenzym $B_{12}$ deutlich positiv, der von 0,5 M Kaliumchlorid je nach Substrat und Coenzym-$B_{12}$-Präsenz positiv oder negativ aus. Die neuen Versuche bestätigten die früheren Ergebnisse, beide Untersuchungen zeigten, dass Stamm LuPhet 1 sowohl eine Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase als auch eine nicht von Coenzym $B_{12}$ abhängige Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase enthält. Diese Konstellation erinnert an *Acetobacterium* Stamm HA1, einen anderen PEG-Abbauer. Dessen Diol-Dehydratase-Aktivität wurde eben-

falls durch den Zusatz von Coenzym $B_{12}$ gesteigert (andere Cobalamine wie Hydroxo- und Cyanocobalamin wirkten hemmend) während eine separate PEG-Acetaldehyd-Lyase-Aktivität durch alle diese Cobalamine gehemmt wurde (Schramm und Schink, 1991). Letzteres könnte ebenfalls ein Hinweis auf eine Unabhängigkeit der PEG-Acetaldehyd-Lyase von Stamm HA1 von Cobalaminen sein.

Die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase war im Cytosol lokalisiert und wies nur eine mäßige Affinität für Phenoxyethanol auf, d. h. im Zellextrakt lag $K_m$ bei Werten von 0,7-3,3 mM. Durch diese relativ geringe Affinität für das Substrat dürfte vermieden werden, dass die entstehenden Konzentrationen der Produkte Phenol und Acetaldehyd die Zelle vergiften.

Die Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung war sehr Sauerstoff-empfindlich. Sauerstoff war für die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase sowohl während der Reaktion als auch im Ruhezustand schädlich: Bei Zusatz von Luft zu Ansätzen, die bereits Phenoxyethanol spalteten, brach die Aktivität sofort ab, auch dann, wenn der Ansatz 2,5 mM Ti(III) enthielt. Wurde Zellextrakt vor Reaktionsstart mit Luft inkubiert, war bei der anschließenden Messung ebenfalls keine Aktivität mehr zu messen, obwohl der Zellextrakt Titancitrat (2,5 mM Ti(III)) enthalten hatte. Sie wurde danach auch nicht durch das Titancitrat des Küvettenpuffers (2,5 mM Ti(III)) wieder hergestellt, d. h. es fand (zumindest unter diesen Bedingungen) keine schnelle reduktive Reaktivierung statt. Sauerstoff verursachte somit offensichtlich eine irreversible Schädigung.
Die relativ schlechte Haltbarkeit der Aktivität während der Lagerung könnte ebenfalls vor allem auf eine Empfindlichkeit gegenüber Oxidation zurückgehen.

Der Zusatz von Titancitrat sorgte meist für eine Erhöhung der Anfangsaktivität der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase, so war die Aktivität in Gegenwart von 0,5 mM oder 2,5 mM Ti(III) deutlich höher als bei einer Konzentration von ca. 2 µM. Die Aktivitätsdauer blieb trotz Titancitrat allerdings jeweils unverändert kurz. Das Reduktionsmittel wurde während der Phenoxyethanol-Spaltung nicht verbraucht, zumindest nicht in einer dem Substrat-Umsatz äquivalenten Menge.
Die Kontaktzeit von Titancitrat und Puffer war ebenfalls von Bedeutung. Es zeigte sich zum Beispiel bei Zellaufschlüssen, dass es günstiger war, wenn Titancitrat dem Puffer bereits am Vortag oder noch früher zugesetzt wurde. Es wirkte anscheinend nicht allzu schnell. So wird auch verständlich, warum Titancitrat nicht verhinderte, dass die Aktivität bei Zusatz von Luft

geschädigt wurde (siehe oben). Die mit Titancitrat erhaltene Aktivitätserhöhung beruhte vermutlich darauf, dass restlicher Sauerstoff und sonstige Oxidationsmittel, die andernfalls die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase geschädigt hätten, durch Titancitrat reduziert wurden. Es ist anzunehmen, dass der Gehalt an Oxidationsmitteln in Puffer und Zellextrakt von Versuch zu Versuch schwankte, wodurch sich möglicherweise auch der unterschiedlich starke Effekt bei Verzicht auf Titancitrat erklären ließ.
Versuche ohne jegliches Reduktionsmittel wurden nicht durchgeführt, Ti(III) und FeS waren in sämtlichen Versuchen gegenwärtig, wenn auch zum Teil nur in geringen Konzentrationen, durch den Eintrag aus dem FeS-haltigen Anzuchtmedium und durch die Verwendung von reduziertem Zellernte-Puffer. Es ist möglich, dass die Reduktionsmittel dabei auch dafür gesorgt haben, dass manche Gruppen des Enzyms eventuell in eine im aktiven Enzym benötigte Form überführt wurden, z. B. Cystin zu Cysteinen.

Interessanterweise hatten die Zusätze von Dithiothreitol (E°´= - 330 mV; Cleland, 1964), Hydrogensulfid (E°´= - 243 mV; Loach, 1976) bzw. Dithionit (E°´= - 527 mV; Loach, 1976) zu Ansätzen noch während der Ruhephase, allerdings in relativ hohen Konzentrationen und zusätzlich zu 2,5 mM Titancitrat, keine positive Wirkung. Im Gegenteil, Dithiothreitol (zunächst 9 mM, im Test verdünnt auf 0,26 mM) und Dithionit (1 mM) verursachten jeweils einen völligen Rückgang der Aktivität. Von Hydrogensulfid wurden verschiedene Konzentrationen eingesetzt; hier lag bei 5 mM der Aktivitätsrückgang ebenfalls bei 100 %, und bei 1 mM blieb nur 10 % der Kontrollaktivität übrig. Es ist grundsätzlich möglich, dass der Eindruck des Aktivitätsrückgangs jeweils nur durch eine verstärkte NADH-Regeneration zustande gekommen ist, allerdings konnte in einem anderen Versuch bei Einsatz von 4 mM Titancitrat im Messpuffer noch Aktivität gemessen werden, wenn auch die entsprechenden NADH-Oxidationsraten geringer waren als mit 2,5 mM Titancitrat im Messpuffer (siehe Tab. 14). Bei Dithiothreitol war außerdem die Konzentration während der Messung mit 0,26 mM relativ gering. Daher erscheint es plausibler, dass mit 9 mM Dithiothreitol tatsächlich eine Schädigung der Enzymaktivität erfolgte, die wahrscheinlich irreversibel war, denn der Schaden wurde durch Verdünnen auf 0,26 mM nicht wieder aufgehoben. Die negativen Effekte könnten eventuell auf Veränderungen der räumlichen Struktur beruhen (durch Reaktion mit Cystinen und Cysteinen). Es könnte aber auch sein, dass ein wichtiger Rest des Enzyms durch diese Substanz (zu weit) reduziert wurde oder mit dieser Substanz ein kovalentes Addukt (ggfs. inkl. Weiterreaktion) bildete. Ähnliches könnte auch die Ursache der negativen Wirkung von Hydrogensulfid und Dithionit sein (siehe auch Abschnitt 4.2.4.4).

Folglich gibt es in der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase sehr Sauerstoff-empfindliche Strukturen oder Reste sowie Strukturen oder Reste, die gegenüber reduzierenden Schwefelverbindungen empfindlich sind. In beiden Fällen sieht es aus, als ob die Schädigung jeweils irreversibel wäre. Es könnte sich um verschiedene Strukturen bzw. Reste handeln, oder jeweils um dieselben.
Die Beobachtungen wären zum Beispiel in Einklang mit der Präsenz eines freien Proteinradikals, siehe auch weitere Diskussion.

Luft, Dithionit, Dithiothreitol und Hydrogensulfid verursachten sehr deutliche Aktivitätsabnahmen; die anderen getesteten Zusätze (Protease-Inhibitor-Mischung, KCl, NaCl, Coenzym $B_{12}$, $Mg^{2+}$/ATP, *S*-Adenosylmethionin, Phenol, Toluol oder EDTA) oder Behandlungen (Entsalzen, Entfernen der Membranfraktion) wirkten leicht negativ bis neutral auf die Phenoxyethanol-Spaltungsaktivität. Einzig Titancitrat sorgte für eine Erhöhung der Aktivität, und durch Entsalzen wurde immerhin eine gewisse Verbesserung der Lagerungsfähigkeit erreicht. In keinem Fall aber wurde die Aktivitätsdauer durch die Zusätze oder Behandlungen verlängert.

Insgesamt deuten diese Befunde darauf hin, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase keinen schwach gebundenen Cofaktor enthält.

#### *4.2.3.3 Erliegen und Reaktivieren der Reaktion*

Die Spaltung von Phenoxyethanol durch Suspensionen ganzer Zellen vom Stamm LuPhet 1 verlief jeweils in zwei Phasen, der Anfangs- und der Hauptphase. Während in der kurzen Anfangsphase die Aktivität kontinuierlich abnahm, war die anschließende Hauptphase durch einen fortwährenden Umsatz mit fast gleichbleibender Aktivität gekennzeichnet. Die zu Beginn der Anfangsphase gemessenen Aktivitäten (mit Werten bis zu 10 U/mg Protein) lagen in der Regel deutlich über der *in-vivo*-Aktivität von 1 U/mg Protein. Die Aktivitäten während der Hauptphase lagen üblicherweise etwas unterhalb von 1 U/mg Protein.
Auch für aufgeschlossene Zellen wurden meist Anfangsaktivitäten gemessen, die größer als 1 U/mg Protein waren, wiederum wurden Werte bis zu 10 U/mg Protein erreicht. Frings und Schink (1994) hatten dagegen für die Phenoxyethanol-Spaltung durch Zellextrakt wesentlich niedrigere Aktivitäten ermittelt, nur ca. 0,05 U/mg Protein. Im Gegensatz zu Zellsuspensionen stellte sich bei Zellextrakt keine zweite Phase mit gleichbleibender Aktivität ein, die Aktivität wurde weiterhin kleiner, bis nach wenigen Minuten keine Aktivität mehr

festzustellen war. Nach etwa der gleichen Zeitspanne war in Zellsuspensionen jeweils gerade die Phase der konstanten Phenoxyethanol-Umsetzung (Hauptphase) erreicht worden. Dieser ähnliche Zeitpunkt wies auf eine gemeinsame Ursache für den jeweiligen Aktivitätsrückgang in ganzen Zellen und in Zellextrakt hin. Der Übergang zur Hauptaktivität (in Suspensionen) bzw. das Erliegen der Aktivität (in Zellextrakt) waren dabei nicht an das Erreichen eines bestimmten prozentualen Umsatzes oder an das Überschreiten einer bestimmten Produktkonzentration bzw. das Unterschreiten einer bestimmten Eduktkonzentration gebunden, wie Vergleiche der verschiedenen Experimente zeigten. Diese bei allen Experimenten ähnliche Zeitspanne schien eher eine charakteristische, von der Umgebung relativ unabhängige Eigenschaft des Enzyms zu sein (anoxische Verhältnisse vorausgesetzt).

Das vollständige Erliegen der Aktivität im Zellextrakt in einer bestimmten Zeitspanne könnte dadurch zustande kommen, dass die eingesetzte Menge Lyase nach Erreichen einer bestimmten Zahl von Katalysezyklen quasi aufgebraucht, d. h. defekt bzw. inaktiv war. Ursache könnte das relativ regelmäßige Auftreten von Fehlreaktionen sein, zum Beispiel ausgehend von einer hochreaktiven Zwischenstufe. Die Zeitspanne könnte man als Lebensdauer oder Aktivitätsdauer der Lyase (bei Umsatz) bezeichnen. Sie wäre im Grunde bestimmt durch die Wahrscheinlichkeit, mit der anstatt der gewünschten eine andere, zur Inaktivierung führende Reaktionsfolge ablaufen würde.

Und wie erklärt sich in diesem Zusammenhang, dass bei intakten Zellen schließlich eine anhaltende Hauptaktivität zustande kam? Das ließe sich mit einer kontinuierlichen Reaktivierung von inaktivierter Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase durch ein reaktivierendes Enzym verstehen, die konstante Rate würde ein Gleichgewicht aus Inaktivieren und Reaktivieren widerspiegeln. Auch nach Wachstum auf anderen Substraten als Phenoxyethanol zeigten die ganzen Zellen eine Hauptaktivitätsphase mit konstantem Umsatz; basierend auf dieser Erklärung würde das bedeuten, dass auch dort jeweils das reaktivierende Enzym exprimiert worden ist. Bei Abwesenheit des Substrats könnte die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase (solange sie sich in intakten Zellen befindet) vollständig oder zu einem höheren Anteil (re)aktiviert werden, da aufgrund von fehlendem Substratumsatz kein Inaktivieren auftreten würde, wodurch sich die zu Beginn der Umsetzung sehr hohen Aktivitäten (bis zum Zehnfachen der *in-vivo*-Aktivität) erklären würden (wenn die postulierte Reaktivierung auch bei Abwesenheit von Phenoxyethanol funktionieren würde). In Zellextrakt würde die Reaktivierung wahrscheinlich nicht mehr funktionieren, da an einem solchen Reaktivierungsvorgang vermutlich mehrere Komponenten beteiligt sind, die nach dem Aufbrechen der Zellen in zu großer Verdünnung vorliegen würden.

Die Inaktivierung eines Enzyms im Zuge des Umsatzes ist bei Reaktionen, die radikalische Zwischenstufen beinhalten, kein unbekanntes Phänomen. Zum Beispiel kann eine Mechanismus-gestütze Inaktivierung (*suicide inactivation*) durch das Entstehen von allzu stabilen Intermediaten verursacht werden. Dabei wird durch relativ stabile radikalische Substrat-Zwischenstufen der Reaktionszyklus unterbrochen, weil diese zu energiearm sind, um vom Enzym wieder ein Wasserstoffatom homolytisch abzuspalten, wie es dem normalen Verlauf entspräche; das Enzym verbleibt im nicht-aktivierten Zustand, und die Reaktion kann nicht beendet werden (Frey, 2001). Beispielsweise wird die Lysin-2,3-Aminomutase mit *trans*-4,5-Dehydro-*L*-Lysin (statt mit *L*-Lysin) aufgrund der Bildung eines relativ stabilen Allylradikals blockiert (Wu et al., 2000). Ebenso führen die Angriffe der Enzyme Ethanolamin-Ammoniak-Lyase bzw. der Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Diol-Dehydratase auf Glycolaldehyd (statt auf 2-Amino-1-alkanol bzw. auf ein 1,2-Alkandiol) jeweils zur Bildung des relativ stabilen *cis*-Ethansemidion-Radikals und damit zur Inaktivierung (Abend et al., 2000).

Bei den Coenzym-$B_{12}$-Enzymen Diol-Dehydratase und Glycerin-Dehydratase tritt mit Glycerin jeweils auch eine Mechanismus-gestütze Inaktivierung auf; Glycerin ist dabei gleichzeitig Substrat und Hemmstoff (Toraya et al., 1976; Bachovchin et al., 1977; Pawelkiewicz und Zagalak, 1965; Poznanskaya et al., 1977). Es wird angenommen, dass es zwei unterschiedliche Binde-Konformationen des Glycerins gibt. Während eine vorwiegend zum Produkt führt, führt die andere in erster Linie zu inaktivem Enzym (Bachovchin et al., 1977). Dabei bleibt der Schaden auf den Cobalamin-Cofaktor beschränkt und kann durch ein spezifisches Enzym wieder behoben werden. Diese Reaktivase entfernt, angetrieben durch die Hydrolyse von ATP, den defekten und fest bindenden Cofaktor, so dass das Enzym nach Binden von intaktem Coenzym $B_{12}$ wieder aktiv ist (Mori und Toraya, 1999). Das spezifische Reaktivierungssystem funktioniert in ganzen Zellen sowie in permeabilisierten Zellen bei Zusatz von ATP, $Mg^{2+}$ und Coenzym $B_{12}$, nicht jedoch in zellfreiem Extrakt (Honda et al., 1980), sofern es nicht überexprimiert wurde. Mittlerweile wurden auch für andere Coenzym-$B_{12}$-Enzyme Reaktivasen bzw. Sequenzen potentieller Reaktivasen entdeckt (Toraya, 2003 und dort genannte Literatur).

Während die Reaktivasen der Coenzym-$B_{12}$-Enzyme möglicherweise ausschließlich zur Rückführung von inaktiviertem Enzym bestimmt sind, gibt es andere Enzyme, die als inaktive Vorstufe gebildet werden und zur Aktivierung grundsätzlich durch eine Aktivase modifiziert werden müssen. Dazu gehören die Glycylradikalenzyme (Sawers, 1999; Frey und Magnusson, 2003). Bei diesen erfolgt die Aktivierung durch eine jeweils spezifische Aktivase

zusammen mit einem Reduktionssystem und *S*-Adenosylmethionin als Cosubstrat (Jarrett, 2003). Falls Glycylradikalenzyme durch manche Substrate inaktiviert werden sollten, könnten ihre Aktivasen möglicherweise auch als Reaktivasen wirken, je nach Ursache des Inaktivierens.

#### *4.2.3.4 Wirkung von Phenoxyethanol-Analoga*

Ebenso wie mit Phenoxyethanol wurden auch beim Umsatz von PEG 300 bzw. Triethylenglycol durch Zellextrakt stets abklingende Aktivitätsverläufe erhalten. Vermutlich werden alle drei Substrate jeweils von der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase umgesetzt. Obwohl sich PEG 300 und Triethylenglycol nur um ca. drei bis vier Ethylen-Einheiten unterscheiden und somit in der Nähe der zu spaltenden endständigen Etherbindung identisch sind, wurde aus Triethylenglycol Acetaldehyd wesentlich schneller gebildet als aus PEG 300 (mit mindestens 10-facher Rate). Die mit den drei Substraten erhaltenen Aktivitäten unterschieden sich nicht nur in der Rate sondern auch in der jeweiligen Dauer bis zum Erliegen des Umsatzes (Tab. 16). Mit einer bestimmten Menge Extrakt wurde bei jedem Substrat eine andere Zahl an Reaktionszyklen durchlaufen, mit Triethylenglycol wurden wesentlich mehr Zyklen katalysiert als mit PEG 300 oder Phenoxyethanol, bevor der Extrakt inaktiv wurde (vergleiche NADH-Verbrauch beim NADH-Minimum). Wenn alle drei Reaktionen tatsächlich ausschließlich durch das Enzym Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase katalysiert werden, würde somit mit PEG 300 (und mit Phenoxyethanol) die zum Ausscheiden führende Reaktion häufiger auftreten als mit Triethylenglycol.

Die verschiedenen Phenoxyethanol-Derivate 2-(2,4,6-Trimethylphenoxy)ethanol), 2-(2-Methoxyphenoxy)ethanol und 2-(4-Bromphenoxy)ethanol wurden im Vergleich zu Phenoxyethanol langsamer gespalten, und die Aktivitätsdauer mit diesen Substraten war jeweils verlängert gegenüber dem Umsatz von Phenoxyethanol (Tab. 18). Entsprechend wurde bei Gegenwart von 2-(4-Bromphenoxy)ethanol die Aktivität der Phenoxyethanol-Spaltung etwas verringert (Tab. 19).
Mit dem stark elektronenziehend substituierten Derivat 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol fand keine erkennbare Umsetzung statt, 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol hemmte dennoch eine anschließende Phenoxyethanol-Spaltung (Tab. 19). 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol bindet vielleicht nur besonders gut an das Enzym. Es könnte aber auch sein, dass bei 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol die Reaktion eingeleitet wird, wie bei 2-(2-Methoxyphenoxy)ethanol, nur dass im Gegensatz zu

2-(2-Methoxyphenoxy)ethanol, welches vom Enzym erfolgreich umgesetzt wurde, bei 2-(2-Nitrophenoxy)ethanol eine Mechanismus-gestütze Inaktivierung ausgelöst wird.

Auch andere Phenoxyethanol-ähnliche Substanzen, die selbst nicht (zumindest nicht merklich) umgesetzt wurden, verursachten bei einer anschließenden Spaltung von Phenoxyethanol eine Hemmung; dazu gehörten z. B. die Thioether 2-(Ethylsulfanyl)ethanol und 2-(Phenylsulfanyl)ethanol sowie die Ether 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol und racemisches 2-Phenoxypropan-1-ol. Die Aktivitätsverläufe unterschieden sich dabei allerdings. Diese Substanzen verringerten jeweils die Aktivität, aber während die Aktivitätsdauer der Phenoxyethanol-Spaltung bei Präsenz von 2-(Ethylsulfanyl)ethanol, 2-(Phenylsulfanyl)-ethanol und 2-Phenoxypropan-1-ol unverändert kurz blieb, verlängerte sie sich durch 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol. Bei 2-(Phenylsulfanyl)ethanol bzw. 2-Phenoxypropan-1-ol wurden die Kontaktzeiten von Zellextrakt und Analogon variiert; je länger der Kontakt war, desto geringer war die restliche Aktivität (Tab. 19).

Eventuell beeinträchtigen in diesem Kontaktzeit-abhängigen (d. h. relativ langsamen) Vorgang 2-(Phenylsulfanyl)ethanol bzw. 2-Phenoxypropan-1-ol (und vermutlich genauso 2-(Ethylsulfanyl)ethanol) einen Teil der Lyase-Moleküle irreversibel, so dass diese Enzyme nicht mehr für die anschließende Phenoxyethanol-Spaltung zur Verfügung stehen, während der Rest der Lyase-Moleküle die Reaktion ungehindert katalysiert; das wäre in Einklang mit der beobachteten gleichbleibenden Aktivitätsdauer bei insgesamt geringerer Aktivität. Vielleicht bleibt das Enzym nach dem Binden dieser Analoga blockiert, beschädigt oder deaktiviert zurück, möglicherweise aufgrund einer am Analogon eingeleiteten Katalyse im Sinne einer Mechanismus-gestützen Inaktivierung.

Im Unterschied dazu könnte die Verlängerung der Aktivitätsdauer durch 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol auf einem nur vorübergehenden Binden von 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol an die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase beruhen, im Sinne einer kompetitiven Hemmung, wobei kein Angriff am Analogon erfolgen würde und die Lyase nicht beschädigt würde, so dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase nach Dissoziieren des Analogons wieder in der Lage wäre, Phenoxyethanol zu spalten. Dadurch ergäbe sich insgesamt eine Verzögerung der Umsetzung aber auch des Inaktivierens.

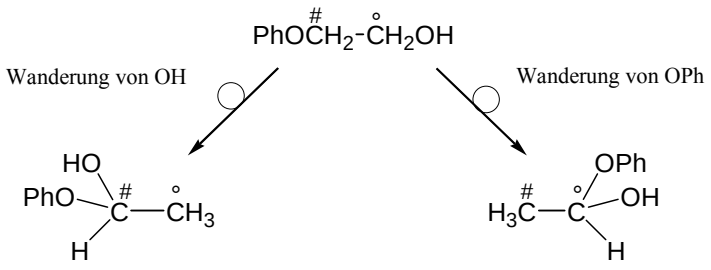
Vielleicht kann aufgrund einer falschen Ausrichtung von 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol im aktiven Zentrum, nämlich passend für einen Angriff an die innere statt an die OH-tragende Ethylenglycol-Einheit, keine Reaktion eingeleitet werden; möglicherweise diktiert der Phenylrest diese Anordnung. Das zeitweilige Auftreten solcher nicht zielführenden Substrat-

Enzym-Komplexe könnte eventuell auch für die unterschiedlichen Raten mit den Substraten Triethylenglycol, Tetraethylenglycol und PEG 300 (mit)verantwortlich sein.

### 4.2.4 Möglicher Aufbau der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase

#### *4.2.4.1 Hinweise aus den Markierungsexperimenten*

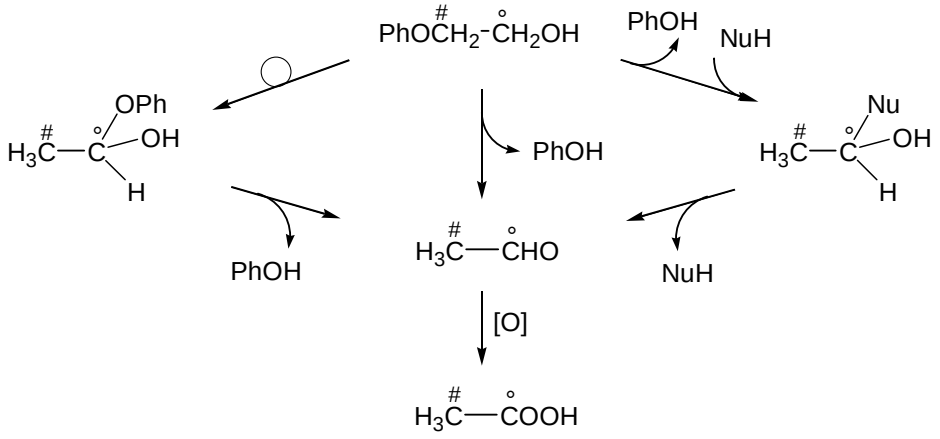
Frings und Schink (1994) hatten vermutet, dass der Mechanismus der Phenoxyethanol-Spaltung über eine Halbacetal-Zwischenstufe verlaufen würde, ähnlich dem Mechanismus der Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Diol-Dehydratase (siehe 1.5.2.1). Im Unterschied zu den Diol-Substraten gäbe es mit Phenoxyethanol zwei unterschiedliche Möglichkeiten (Schema 2), ein intermediäres Halbacetal zu bilden, zum einen durch Wanderung der Hydroxid-Gruppe, zum anderen durch Wanderung der Phenoxid-Gruppe.




Schema 2

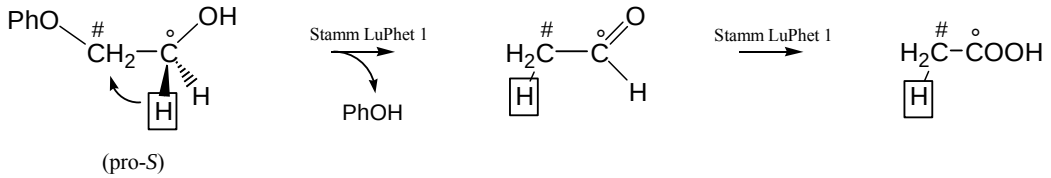
Zur Aufklärung des Reaktionsverlaufs wurden Zellsuspensionsversuche mit $^{2}H$- und $^{13}C$-markiertem 2-Phenoxyethanol durchgeführt. Der Umsatz des markierten Substrats führte jeweils zu einer Mischung aus markiertem und unmarkiertem Acetat (Abschnitt 3.3.5). Die Bildung von unmarkiertem Acetat wurde auf eine parallel ablaufende *de-novo*-Acetatbildung (über den Reduktiven Acetyl-CoA-Weg) (siehe 1.2.2) zurückgeführt.

Anhand der im Acetat markierten Positionen konnte gefolgert werden, dass das C-1 des Phenoxyethanols zur Carboxygruppe des Acetats und C-2 zu dessen Methylgruppe umgeformt wurde. Dies ließ sich mit einer Wanderung der OH-Funktion nicht in Einklang bringen. Es passte aber zu einer Wanderung des Phenoxid-Rests oder zu dessen direkter Eliminierung (als Phenolat bzw. Phenol). Genauso gut möglich war eine direkte Eliminierung des Phenoxids (als Phenolat bzw. Phenol) zusammen mit einer intermediären Anlagerung eines Nukleophils (z. B. $OH^-$) an C-1. Diese drei Möglichkeiten sind in Schema 3 dargestellt.




Schema 3

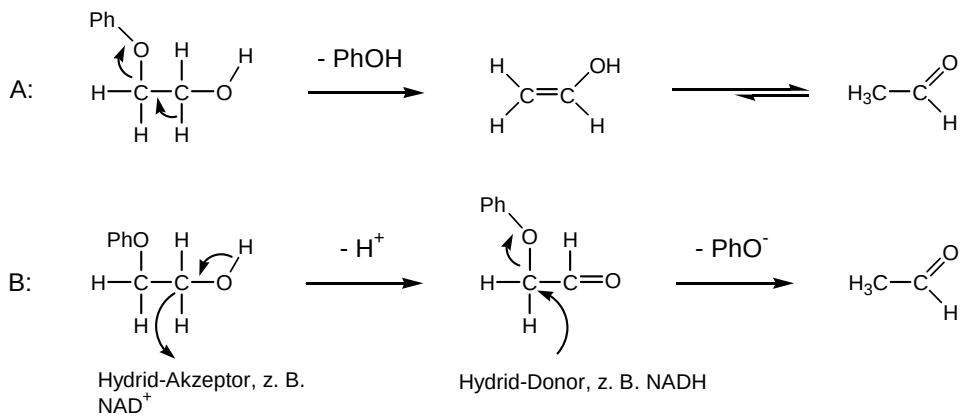
In den beschriebenen Versuchen (Abschnitt 3.3.5) lief jeweils ein 1,2-Transfer von Wasserstoff ab, und zwar ohne dass ein nennenswerter Austausch mit dem Lösemittel beobachtet wurde. Dieser Wasserstofftransfer erfolgte intramolekular, denn im Experiment mit 2-Phenoxy[1,2-$^{13}C_2$,1,1-$^{2}H_2$]ethanol, welches mit unmarkiertem Phenoxyethanol verdünnt worden war, wurden keine Isotopomere gefunden, die auf einen intermolekularen Transfer schließen ließen. Der Wasserstoff wurde von C-1 stereospezifisch abstrahiert (pro-*S* H) und an C-2 des Substrats zurückgegeben. Diese Befunde mit markiertem Phenoxyethanol sind zusammenfassend dargestellt in Schema 4.




Schema 4

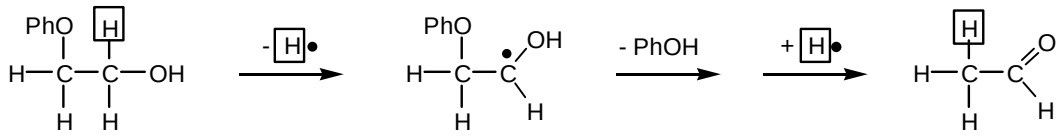
Wie kann hierfür der chemische Reaktionsmechanismus aussehen? Lässt man zunächst die Reaktivität des Substrats außer Acht, kann man unter anderem auch Wege formulieren, die mit Protonenabstraktion oder Hydridabstraktion beginnen (Schema 5). Diese Wege wären allerdings nicht so einfach mit der beobachteten Intramolekularität des Wasserstofftransfers in Einklang zu bringen. Bei Weg A würde das von C-1 abstrahierte Proton im weiteren Verlauf der Reaktion (Keto-Enol-Tautomerisierung) normalerweise mit dem Lösemittel austauschen und nicht mehr an das Substrat zurückgegeben werden, wobei auch Enzyme für Wasser-Eliminierungen existieren, bei denen ein Proton intramolekular zurückgegeben wird, so z. B. bei der Aconitase (z. B. Silverman, 2000). Eine andere Möglichkeit (Weg B) wäre ein intramolekularer Hydridtransfer mit Hilfe eines reversiblen Hydrid-Akzeptors, z. B. $NAD^+$.

Es gibt einzelne Enzyme, die $NAD^+$ während der Reaktion nur intermediär reduzieren und bei denen das Hydrid intramolekular übertragen wird, z. B. bei der UDP-Glucose-4-Epimerase (z. B. Silverman, 2000). Außerdem könnte man auch einen Weg über radikalische Zwischenstufen mit separaten Protonen- und Elektronentransferschritten formulieren (ebenfalls beginnend mit der Deprotonierung von C-1), aber wiederum wäre es sehr wahrscheinlich, dass das von C-1 abstrahierte Proton mit dem Lösemittel austauschen würde und somit nicht im Produkt an C-2 enthalten wäre. Vor allem aber wäre für alle diese genannten Wege das Substrat wahrscheinlich nicht ausreichend reaktiv, weder in Bezug auf den abzuspaltenden Wasserstoffrest noch auf die Phenoxid-Abgangsgruppe.




Schema 5

Die Befunde mit markiertem Phenoxyethanol (Schema 4) wären allerdings gut vereinbar mit einem Mechanismus über radikalische Zwischenstufen, bei dem einer der Wasserstoffe, die in Bezug auf eine Deprotonierung alle wenig reaktiv sind, homolytisch abstrahiert würde und nach einer Umlagerung oder Eliminierung des Phenoxids an das benachbarte Kohlenstoffatom zurückgegeben würde (Schema 6). Auf die (möglicherweise erhöhte) Reaktivität des Substratradikals bezüglich einer Eliminierung wird an späterer Stelle (4.2.5.1) noch eingegangen.




Schema 6

Die Ergebnisse (Schema 4) stimmen tatsächlich weitgehend überein mit Ergebnissen von bestimmten Enzymen, die die Spaltung von Alkan-ähnlichen C—H-Bindungen mit Hilfe von Radikalen katalysieren: bei den Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzymen Diol-Dehydratase (1.5.2.1) und Ethanolamin-Ammoniak-Lyase erfolgte jeweils nach einer homolytischen stereospezifischen Wasserstoffabstraktion von C-1 ein 1,2-Wasserstoff-Transfer (Zagalak et al., 1966; Babior, 1969; Toraya, 2003 und dort genannte Literatur) ohne Verluste an das Lösemittel (Brownstein und Abeles, 1961; Babior, 1969).
Im Unterschied zu Diol-Dehydratase (Abeles und Zagalak, 1966; Frey et al., 1967) und Ethanolamin-Ammoniak-Lyase (Babior, 1969), bei denen (neben intramolekularem) auch intermolekularer H-Transfer auftrat, landete bei den Versuchen zur Phenoxyethanolspaltung der vom Substrat abstrahierte Wasserstoff wieder im jeweiligen Substrat-Molekül (nur intramolekularer H-Transfer).
Wenn also die Phenoxyethanol-Spaltung ebenfalls durch eine homolytische Wasserstoffabstraktion eingeleitet wird, ergibt sich aus diesem Unterschied, dass der Rest, der das katalytische Radikal der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase bildet, nicht wie im 5´-Desoxyadenosin drei äquivalente abstrahierbare Wasserstoffatome, sondern nur ein abstrahierbares Wasserstoffatom enthalten kann. Damit wäre der mit 2-Phenoxyethanol ablaufende Reaktionsweg nicht identisch mit dem beschriebenen Reaktionsweg der bekannten Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzyme Diol-Dehydratase, Glycerin-Dehydratase und Ethanolamin-Ammoniak-Lyase, er wäre diesem jedoch ähnlich.

#### *4.2.4.2 Ähnliche Stereochemie bei Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase und verschiedenen Diol-Dehydratasen*

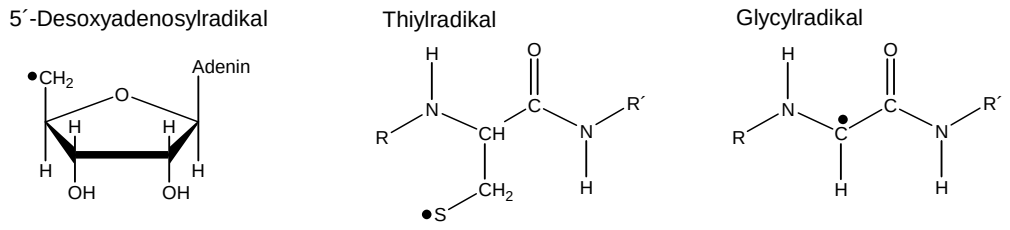
Bei 2-Phenoxyethanol wurde durch die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase von C-1 ausschließlich der pro-*S*-Wasserstoffrest abstrahiert und die (möglicherweise nur formal) wandernde Gruppe eliminiert (Speranza et al., 2003). Damit würde die Reaktion der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase eine verborgene Stereochemie aufweisen, die der Stereochemie der Dehydratisierung von (*S*)-1,2-Propandiol durch die Coenzym-$B_{12}$-abhängige Diol-Dehydratase ähnlich wäre. Bei jenem Enzym wird aus (*S*)-Propandiol nach Abstraktion des pro-*S*-Wasserstoffs die wandernde Gruppe abgespalten; bei (*R*)-Propandiol wird dagegen nach Abstraktion des pro-*R*-Wasserstoffs letztendlich die stationäre OH-Gruppe eliminiert (Rétey et al., 1966; Zagalak et al., 1966; Shibata et al., 2003).

Eventuell besteht auch Übereinstimmung mit der Stereochemie des Glycylradikalenzyms Glycerin-Dehydratase aus *Clostridium butyricum* (Raynaud et al., 2003; O´Brien et al., 2004; Abschnitt 1.5.2.3). Bei diesem Enzym wurde bisher zwar nicht untersucht, ob eine OH-Wanderung stattfindet, allerdings wurde aus der Kristallstruktur abgeleitet, dass sie abläuft. Die Struktur wurde zum einen mit gebundenem Glycerin, zum anderen mit gebundenem 1,2-Propandiol aufgeklärt. Aus der räumlichen Lage des potentiellen katalytischen Thiylradikals bezüglich der gebundenen Substrate folgern die Autoren, dass von beiden Substraten (Glycerin und 1,2-Propandiol) jeweils das pro-*S*-Wasserstoffatom abstrahiert würde, allerdings wurde nicht angegeben welches Enantiomer des 1,2-Propandiols zugegeben wurde bzw. in den Kristallpräparaten an das Enzym gebunden hat, oder ob bei beiden Enantiomeren jeweils das pro-*S*-Wasserstoffatom angegriffen würde (O´Brien et al., 2004).

#### *4.2.4.3 Vergleich der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase mit bekannten Proteinradikal-Enzymen*

Der mit der Phenoxyethanol-Spaltung verbundene Wasserstofftransfer lief intramolekular und ohne merklichen Verlust des wandernden Wasserstoffs an das Lösemittel ab, wie die Experimente mit markierten Phenoxyethanolen ergaben. Es ist deshalb relativ unwahrscheinlich, dass die Wasserstoff-Abstraktion dabei durch separate Transfers von Proton und Elektron zustande kommt. Diese Ergebnisse weisen stattdessen auf einen Mechanismus hin, der durch eine homolytische H-Abstraktion initiiert wird.

Chinone oder Flavine (in Semichinonform) sind zu stabil, um nicht-aktivierte C—H-Bindungen homolytisch zu spalten (Frey, 1990). Als freie Radikale, die dafür ausreichend reaktiv sind, wurden in Anaerobiern bisher nur 5´-Desoxyadenosyl-, Thiyl- (aus der Seitenkette von Cystein) und Glycylradikale sowie ein nicht-identifiziertes Radikal der Coenzym-$B_{12}$-unabhängigen Diol-Dehydratase aus *Cl. glycolicum* (Hartmanis und Stadtman, 1987) beschrieben. Thiylradikale kommen in Glycylradikal-tragenden Enzymen intermediär vor (Parast et al., 1995), sie können aber auch durch Coenzym $B_{12}$ bzw. *S*-Adenosylmethionin intermediär gebildet werden.



Aufgrund der Versuche mit den markierten Phenoxyethanolen konnte außerdem ein intermolekularer H-Transfer ausgeschlossen werden, und so kommt als katalytisches Radikal nur ein Rest mit einem einzigen abstrahierbaren Wasserstoff in Frage (d. h. ein Thiyl- bzw. Glycylradikal), nicht aber ein 5´-Desoxyadenosylradikal.

Es gibt 5´-Desoxyadenosylradikal-abhängige Enzyme (Coenzym-$B_{12}$- bzw. SAM-abhängig), bei denen nicht das 5´-Desoxyadenosylradikal am Substrat angreift, sondern ein daraus gebildetes Thiylradikal (durch H-Abstraktion von einer Cysteinseitenkette). Dazu gehört beispielsweise die Coenzym-$B_{12}$-abhängige Ribonukleotid-Reduktase (Booker et al., 1994; Licht et al., 1996). Auch beim SAM-abhängigen Enzym Coproporphyrinogen-III-Oxidase aus *E. coli* (HemN) wird angenommen, dass ein intermediär gebildetes Thiylradikal als katalytisches Radikal fungiert (Layer et al., 2003). Obwohl solch ein indirekt 5´-Desoxyadenosylradikal-abhängiger Mechanismus mit den Ergebnissen der Markierungsversuche in Einklang stehen würde, scheint er aufgrund von anderen experimentellen Befunde unwahrscheinlich: Es gab keine Hinweise, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase von schwach gebundenen Cofaktoren abhängig wäre. Außerdem spricht gegen einen Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Reaktionsweg, dass der Zusatz von Coenzym $B_{12}$ keine Wirkung hatte. Die beobachtete Unempfindlichkeit gegen EDTA und Citrat ist ein Indiz gegen die Möglichkeit, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase in ähnlicher Weise wie die Enzyme Lysin-2,3-Aminomutase oder Sporenphotoprodukt-Lyase eine reversible Spaltung von *S*-Adenosylmethionin katalysieren könnte und dadurch die Phenoxyethanol-Spaltung initiieren würde. Jene Enzyme enthalten dafür nämlich einen empfindlichen [4Fe-4S]-Cluster (Frey und Magnusson, 2003; Frey und Booker, 2001; Rebeil und Nicholson, 2001; Cheek und Broderick, 2002).

#### 4.2.4.3.1 Eigenschaften einer $B_{12}$-unabhängigen Diol-Dehydratase aus Cl. glycolicum

Vor einiger Zeit wurde eine von Coenzym $B_{12}$ unabhängige Diol-Dehydratase aus dem strikten Anaerobier *Cl. glycolicum* beschrieben (Hartmanis und Stadtman, 1986; Abschnitt 1.5.2.2). Dieses integrale Membranprotein war induzierbar. Es wurde nicht isoliert, sondern im Zellextrakt bzw. in der solubilisierten Membranfraktion untersucht. Die Aktivität war sehr Sauerstoff-empfindlich. Bei Zusatz von 1 mM Dithiothreitol wurde die höchste Aktivität erhalten, bei 10 mM Dithiothreitol wurde noch 57 % davon gemessen. Das Enzym war verdünnungsempfindlich, außerdem wurde es durch verschiedene Komplexierungsmittel gehemmt, wobei diese Hemmung durch den Zusatz von Fe(II) teilweise wieder aufgehoben werden konnte (Hartmanis und Stadtman, 1986).

Die entsprechenden Eigenschaften der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase (siehe Ergebnisse) waren mit Ausnahme der Sauerstoffempfindlichkeit und der Unabhängigkeit von Coenzym $B_{12}$ jeweils gegenteilig (cytosolisch, konstitutiv exprimiert, empfindlich gegenüber hoher Konzentration an Dithiothreitol, unempfindlich gegenüber Verdünnung, unempfindlich gegenüber Komplexierungsmitteln).

Es wurde vermutet, dass die Coenzym-$B_{12}$-unabhängige Diol-Dehydratase ein Protein-gebundenes Radikal enthält, denn in ESR-Messungen wurde ein Signal erhalten, dessen Intensität mit der Aktivität korrelierte, und zwar bei Abwesenheit von Substrat und nur in Präparationen (Membranfraktion bzw. solubilisierte Membranpräparationen) von induzierten Zellen. Das Radikal konnte jedoch nicht identifiziert werden. Der *g*-Wert 2,02 war verschieden von den *g*-Werten der Glycylradikalenzyme (Unkrig et al., 1989; Wagner et al., 1992; Mulliez et al., 1993; Duboc-Toia et al., 2003; Verfürth, 2004), er war auch verschieden vom *g*-Wert des Tyrosylradikals der aeroben (Klasse I) Ribonukleotid-Reduktase von 2,0047 (Reichard und Ehrenberg, 1983). Vielleicht enthält diese Coenzym-$B_{12}$-unabhängige Diol-Dehydratase ein anderes Radikal als ein 5´-Desoxyadenosyl-, Glycyl-, Thiyl- oder Tyrosylradikal.

#### 4.2.4.3.2 Eigenschaften von Glycylradikalenzymen

Manche Glycylradikalenzyme (Abschnitt 1.5.2.3) katalysieren Reaktionen, die der Spaltung von Phenoxyethanol ähnlich sind. So spaltet eine erst kürzlich beschriebene Coenzym-$B_{12}$-unabhängige Glycerin-Dehydratase aus Glycerin bzw. 1,2-Propandiol Wasser ab (Raynaud et al., 2003; O´Brien et al., 2004). Ein anderes Glycylradikalenzym, die Anaerobe Ribonukleotid-Reduktase, eliminiert aus Nukleotiden an C-2´ eine Hydroxylgruppe nach vorangehender Wasserstoff-Abstraktion an C-3´, vermutlich wird dies erleichtert durch die Protonierung der zu eliminierenden OH-Gruppe (sowie durch die Deprotonierung der OH-Gruppe an C-3´, dabei findet, anders als bei Coenzym-$B_{12}$-Dehydratasen, keine intermediäre Halbacetalbildung statt, um den Austritt der OH-Gruppe zu bewirken (Fontecave und Mulliez, 1999; Himo und Siegbahn, 2003).

Einige Glycylradikalenzyme benötigen für die von ihnen katalysierten Reaktionen keine weiteren Cofaktoren, z. B. 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase (Selmer und Andrei, 2001; Andrei et al., 2004) und Glycerin-Dehydratase (O´Brien et al., 2004).

Glycylradikalenzyme sind jeweils ähnlich aufgebaut (Knappe und Wagner, 1995; Sawers, 1999; Frey und Magnusson, 2003). Alle enthalten, ggfs. neben anderen Untereinheiten, mindestens ein Homodimer mit einem spezifischen Glycin-haltigen Motiv (Wagner et al.,

1992; Sun et al., 1996; Leuthner et al., 1998; Sawers und Watson, 1998; Selmer und Andrei, 2001; Raynaud et al., 2003), wobei jeweils nur in einer der beiden Dimer-Proteinketten der Glycylrest als Radikal vorliegt (Unkrig et al., 1989). Dieser Aufbau führt in SDS-Gelen zum Auftreten von charakteristischen Doppelbanden mit einem 1:1 Intensitätsverhältnis für dieses Glycylradikal-tragende Homodimer, denn an der Luft wird die Proteinkette an der Position des radikalischen Glycylrests oxygenolytisch gespalten (Wagner et al., 1992; Mulliez et al., 1993; King und Reichard, 1995; Leuthner et al., 1998). Die Massen der Glycylradikal-tragenden Proteinkette bei den bislang bekannten Glycylradikalenzymen betragen ca. 80-100 kDa; das konservierte Glycin liegt jeweils relativ nahe am C-Terminus, weshalb sich die Massen der entsprechenden Doppelbande im Gel nur um ca. 3-4 kDa unterscheiden.
Alle Glycylradikalenzyme sind wegen dieses permanenten Proteinradikals sehr Sauerstoff-empfindlich (Knappe et al., 1984; Leuthner et al., 1998; Selmer und Andrei, 2001).
Das Glycylradikal wird mit Hilfe eines jeweils spezifischen Aktivierungsenzyms (siehe Einleitung) in einem posttranslationalen Aktivierungsprozess erzeugt.

#### *4.2.4.4 Die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase könnte ein Glycylradikalenzym sein*

Die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase benötigte für die Reaktion keine weiteren Cofaktoren, wie dies auch bei manchen der genannten Glycylradikalenzyme der Fall war.
Eine weitere Parallele bilden die posttranslationale Aktivierung der Glycylradikalenzyme bzw. die bei der Phenoxyethanol-Spaltung in ganzen Zellen beobachtete Reaktivierung.
Wie die Glycylradikalenzyme wies auch Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff auf, wobei der Zusatz des Reduktionsmittels Titancitrat einen gewissen Schutz bot. Aber auch die schädliche Wirkung der reduzierenden Schwefelverbindungen auf die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase würde angesichts der Gegenwart eines Glycylradikals (oder eines anderen freien Proteinradikals) verständlich werden. Die eingesetzten relativ hohen Konzentrationen von Dithiothreitol, Dithionit oder Hydrogensulfid hätten ein Glycylradikal vermutlich reduzieren können (Wong und Kozarich, 1994; Frey, 2001); nach anschließender Aufnahme eines Protons wäre damit das Enzym in den Zustand vor Aktivierung zurückversetzt worden.
Weiterhin enthielten Zellextrakte von Stamm LuPhet 1 nach Wachstum auf verschiedenen Substraten jeweils ein Protein mit einer Masse von ca. 89 kDa, welches möglicherweise zur Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase gehörte (aufgrund der Korrelation der Aktivität mit der Bandenstärke).

Einzelne Glycylradikalenzyme zeigen weitere Ähnlichkeiten mit der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase. So klang z. B. die Aktivität der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase aus bislang ungeklärter Ursache jeweils schnell ab (Selmer und Andrei, 2001).

Die im Cytosol lokalisierte Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase in *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 war unter anderem gekennzeichnet durch

- Unabhängigkeit von zugesetzten Cofaktoren
- Unempfindlichkeit gegenüber Komplexierungsmitteln
- Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff (irreversible Schädigung)
- Empfindlichkeit gegenüber hohen Konzentrationen der Reduktionsmittel Dithionit, Dithiothreitol und Hydrogensulfid
- Auftreten von Inaktivierung und Reaktivierung
- einen Reaktionsmechanismus, der Homolysen von C—H-Bindungen beinhaltet, und zwar durch einen Rest, der am Radikalzentrum keine äquilibrierenden Wasserstoffe trägt (also ein anderer Rest als 5´-Desoxyadenosyl).

Diese Eigenschaften zusammen sprechen dafür, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase zur wachsenden Gruppe der Glycylradikalenzyme gehört.
Speziell die Unempfindlichkeit gegenüber EDTA und Citrat und die Unabhängigkeit von Cofaktoren sind Indizien gegen ein System, wie es in der Coenzym-$B_{12}$-unabhängigen Diol-Dehydratase aus *Cl. glycolicum* enthalten ist. Gegen heterolytische Mechanismen (Schema 5), wie sie in Abschnitt 4.2.4.1 erwähnt wurden, sprechen die geringe Reaktivität des Substrats sowie die Intramolekularität des 1,2-Wasserstofftransfers. Aber auch die hohe Sauerstoffempfindlichkeit der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit gegen EDTA und Citrat (dadurch werden empfindliche Eisen-Schwefel-Cluster unwahrscheinlich) und ihre Unabhängigkeit von Cofaktoren (ein eventueller Hydrid-Akzeptor müsste somit fest gebunden sein) passen nicht zu solchen Wegen.

Wenn auch bisher erst wenige Glycylradikalenzyme bekannt sind, so haben doch Genom-Analysen ergeben, dass Glycylradikalenzyme unter obligat und fakultativ anaeroben Mikroorganismen (einschließlich der Archaeen) weit verbreitet sein könnten (Sawers, 1999).

### 4.2.5 Möglicher Ablauf der Phenoxyethanol-Spaltung

Vermutlich wird auch in der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase intermediär ein Thiylradikal gebildet, das als katalytisches Radikal dient, wie dies in den bisher untersuchten Glycylradikalenzymen jeweils der Fall ist. Ein zugehöriges Aktivierungs-Enzym zur Einführung des Glycylradikals läge wahrscheinlich als separates Enzym vor. In Abbildung 4.1 ist der hypothetische Ablauf der Phenoxyethanol-Spaltung in *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 dargestellt. Ein früher Schritt der Reaktion der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase wäre das Abstrahieren eines Wasserstoff-Atoms vom Substrat (3 in Abb. 4.1), sehr wahrscheinlich durch ein proteingebundenes Thiylradikal (X• in Abb. 4.1). Anschließend wäre das Substrat aktiviert (Substratradikal I) und könnte den Phenoxid-Rest zum *gem*-Diol-Radikal umlagern bzw. direkt eliminieren (4 in Abb. 4.1); das ergäbe Substratradikal II. Dieses Radikal bekäme das Wasserstoffatom vom Cystein des Enzyms zurück (5 in Abb. 4.1), wodurch Acetaldehyd entstünde; gleichzeitig läge das Enzym wieder in aktivierter Form vor.

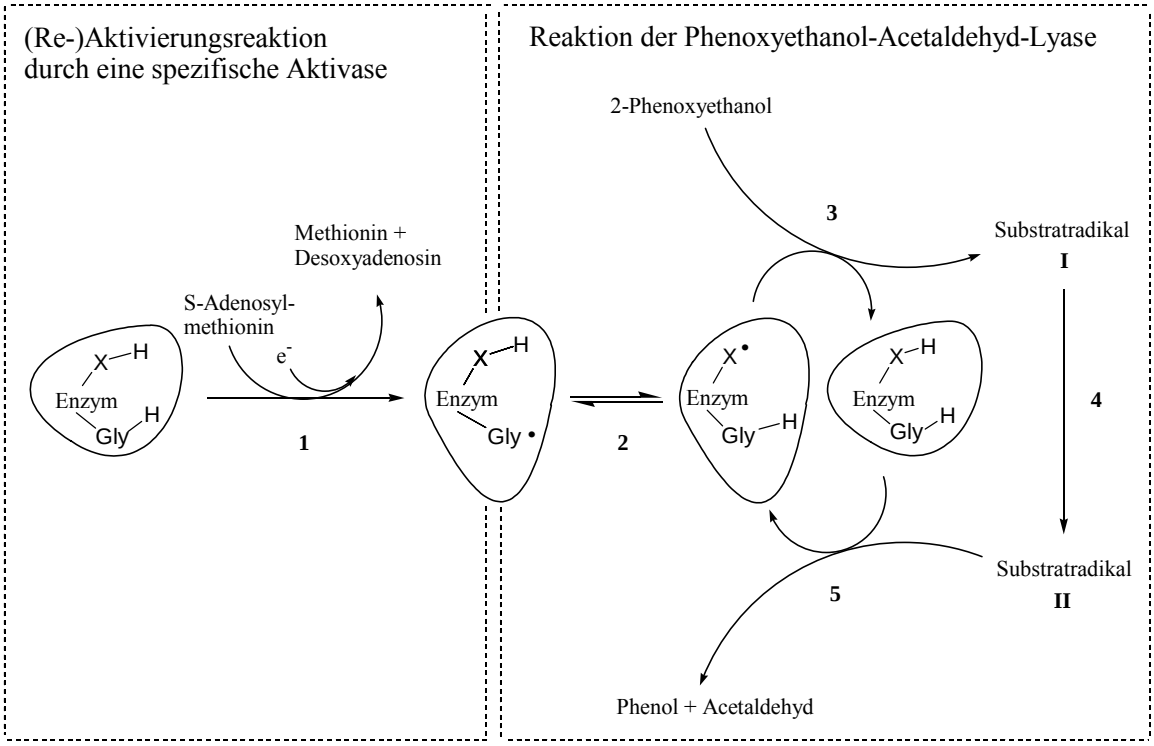



**Abb. 4.1**: Hypothetisches Schema der Phenoxyethanol-Spaltung durch *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1. Das Proteinradikal des mutmaßlichen Glycylradikalenzyms Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase wird dabei mit Hilfe einer spezifischen Aktivase aus einem Glycin der unreifen (evtl. auch der inaktivierten) Form gebildet.

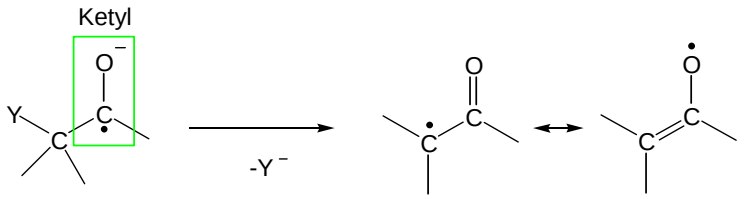
#### *4.2.5.1 Wanderung oder direkte Eliminierung? – Energetische Überlegungen*

Lässt sich auch etwas über den Verlauf der Reaktion nach Abstraktion des Wasserstoffatoms von C-1 aussagen? Wie könnte das Substratradikal II aussehen, wandert der Phenoxid-Rest an C-1 oder tritt er direkt von C-2 aus?

Für die Reaktion der Coenzym-$B_{12}$-Diol-Dehydratase wurde die Aktivierungsenergie des geschwindigkeits-bestimmenden Schritts über die experimentell ermittelte Geschwindigkeitskonstante auf 55-70 kJ/mol (für Ethylenglycol) geschätzt (George et al., 1997; Smith et al., 2001). Der große kinetische Isotopeneffekt ($k_H/k_D$ = 10 für die Gesamtreaktion der Diol-Dehydratase mit Propandiol) (Zagalak et al., 1966), deutet darauf hin, dass das Brechen einer C—H-Bindung geschwindigkeitsbestimmend ist. Es ist bisher nicht geklärt, welchem Reaktionsschritt das entspricht, dies könnte sich auch je nach Substrat unterscheiden. Die Barriere für die 1,2-Wanderung einer OH-Gruppe im Substratradikal kann durch das Enzym sehr stark abgesenkt werden; Berechnungen mit Ethylenglycol als Substrat haben unter anderem einen Weg ermittelt, für den die Aktivierungsenergie nur noch 7,5 kJ/mol beträgt (Smith et al., 2001).

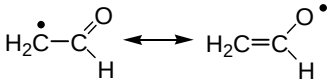
Im Fall der Phenoxyethanol-Spaltung durch *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1, in dem bisher keine Beweise für die Bildung von Halbacetal-Intermediaten erhalten wurden, wäre prinzipiell auch eine Eliminierung von Phenolat (als Phenol) aus dem Substratradikal ohne vorangehende Wanderung denkbar (Speranza et al., 2002), dargestellt in Abbildung 4.2b. Diese Reaktion entspräche der durch Ribonukleotid-Reduktasen katalysierten Eliminierung einer OH-Gruppe von C-2′ der Ribonukleotide (siehe Einleitung). Bei Phenoxyethanol könnte die Reaktion ebenso wie bei Ribonukleotiden durch Deprotonierung der benachbarten OH-Gruppe und durch Protonierung der Abgangsgruppe (hier: des Phenoxids) unterstützt werden. Es gibt eine ähnliche Reaktion in wässriger Lösung. Aus dem Radikal von Ethylenglycol (1,2-Diol-1-Radikal) lief in wässrigen Medien die Eliminierung von Wasser spontan und sehr schnell ab (Bansal et al., 1973). Golding und Buckel (1998) erklären diese Reaktivität folgendermaßen: Im Radikal des Ethylenglycols wird der $pK_a$-Wert der OH-Gruppe, die an das Kohlenstoffatom mit dem ungepaarten Elektron gebunden ist, im Vergleich zur OH-Gruppe in Ethylenglycol um ca. 5 pH-Einheiten erniedrigt (Hayon und Simic, 1974; Golding und Radom, 1976). Aufgrund dieser relativ sauren OH-Funktion kann durch Deprotonierung ein Radikal-Anion entstehen. Diese Art von Radikal-Anionen werden Ketyle genannt und haben die Eigenschaft, Abgangsgruppen in β-Position zu eliminieren (Schema 7), wie durch die

leichte Reduktion von 2-Hydroxyketonen zu unsubstituierten Ketonen mit Einelektronendonoren gezeigt wurde, z. B. mit Chrom(II) (Molander und Hahn, 1986).




Schema 7

Zur direkten Eliminierung von Wasser aus dem 1,2-Diol-1-Radikal des Ethylenglycols wurden auch quantenchemische Rechnungen durchgeführt, die diese Möglichkeit bestätigen (George et al., 1995; George et al., 1997; George et al., 1999). Bei einer solchen direkten Eliminierung der OH-Gruppe aus dem Substratradikal ohne vorherige Wanderung würde kein *gem*-Diol-Radikal, sondern ein resonanzstabilisiertes Acetaldehyd-Radikal (α-Carbonyl-Radikal ↔ Enoxy-Radikal) (Schema 8) entstehen. Die Resonanzstabilisierung wurde auf ca. 33 kJ/mol geschätzt (Speranza et al., 2002; Egger und Cocks, 1973).



Schema 8

Zum Teil wird bezweifelt, dass diese resonanzstabilisierten Acetaldehyd-Radikale reaktiv genug sind, um nicht-aktivierte Wasserstoffatome (wie zum Beispiel C(5´)—H in 5´-Desoxyadenosin) schnell genug abstrahieren zu können (d. h. entsprechend der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeit) (Finke et al., 1984; Golding und Buckel, 1998). Neuere Berechnungen zur selben Frage im Zusammenhang mit der Ethanolamin-Ammoniak-Lyase ergaben allerdings, dass die dort beobachtete Reaktionsrate auch mit der direkten Eliminierung über ein resonanzstabilisiertes Acetaldehyd-Radikal möglich wäre (Semialjac und Schwarz, 2002) bzw. dass eine direkte Eliminierung nicht ausgeschlossen werden kann (Wetmore et al., 2002).

Die Energetik der Reaktion hängt jedoch nicht nur von der Stabilität der Substrat-Intermediate ab, sondern auch von der Stabilität der Enzym-Intermediate, also der katalytischen Radikale (X• in den Abbildungen 4.1 bzw. 4.2). Möglicherweise stellt die Wasserabspaltung aus Glycerin ein Beispiel für diesen Zusammenhang dar. Die Enzyme $B_{12}$-Glycerin-Dehydratase aus *K. pneumoniae* und Glycylradikal-Glycerin-Dehydratase aus *Cl. butyricum* katalysieren

beide jeweils die Dehydratisierung von Glycerin. Aus der Kristallstruktur der Glycylradikal-Glycerin-Dehydratase wurde abgeleitet, dass hier ebenso wie im Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzym eine 1,2-Wanderung einer OH-Gruppe stattfindet. Bei beiden Katalysen dürfte somit das *gem*-Diol-Radikal entstehen. Die Enzyme unterscheiden sich in ihren katalytischen Radikalen: in der $B_{12}$-Glycerin-Dehydratase ist dies ein 5´-Desoxyadenosylradikal bzw. im Glycylradikalenzym ein Thiylradikal. Die Wechselzahl des Glycylradikalenzyms ist schätzungsweise 20mal so groß wie die des Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Enzyms[5]. Dieser Unterschied der Wechselzahlen könnte auf den Unterschied der Dissoziationsenergien von 5´-Desoxyadenosin bzw. S—H zurückgehen. Die Rückbildung des katalytischen Radikals durch H-Abspaltung aus Cystein benötigt weniger Energie als aus 5´-Desoxyadenosin. Für 5´-Desoxyadenosin liegt die Dissoziationsenergie bei 419 kJ/mol (Fontecave et al., 2001), für Cystein dagegen nur bei 342 kJ/mol (Himo und Siegbahn, 2003), für Glycin wird jeweils 330 kJ/mol angegeben; an anderer Stelle werden für H—SR Dissoziationsenergien von 368-385 kJ/mol genannt (Stubbe und van der Donk, 1998).

Möglicherweise wäre das relativ stabile Acetaldehyd-Radikal (Schema 8) gegenüber Cystein sogar ausreichend reaktiv in bezug auf eine H-Rückabstraktion (Speranza et al., 2002) (geringere Dissoziationsenergie von Cystein im Vergleich zu 5´-Desoxyadenosin), so dass mit einem Thiylradikal anstelle eines 5´-Desoxyadenosylradikals eine Wanderung (zur Vermeidung des Acetaldehyd-Radikals) nicht mehr unbedingt erforderlich wäre. Die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase mit einem mutmaßlichen Thiylradikal könnte deshalb vielleicht die Etherspaltung ohne eine vorangehende Wanderung eines Phenoxid-Rests katalysieren, nämlich als direkte Eliminierung von Phenol über ein Acetaldehyd-Radikal (Speranza et al., 2002).

#### *4.2.5.2 Möglicher Hintergrund des In- und Reaktivierens*

Für Reaktionen mit hochreaktiven Zwischenstufen hat Rétey das Konzept der negativen Katalyse formuliert (Rétey, 1990). Es besagt, dass die Rolle des Enzyms hierbei hauptsächlich darin besteht, das aktivierte Substrat daran zu hindern, auf ein niedrigeres Energieniveau abzufallen und stattdessen dieses Intermediat ausschließlich in der gewünschten Weise zur Reaktion kommen zu lassen; d. h. vor allem, andere Reaktionsmöglichkeiten, die normaler-

[5] ermittelt aus den spezifischen Aktivitäten der gereinigten Enzyme von 120 U/mg bei 37°C für die Coenzym-$B_{12}$-abhängige Glycerin-Dehydratase ($M_r$ = 200 kDa), bzw. von 1560 U/mg bei 25°C für die Glycylradikal-Glycerin-Dehydratase, die vermutlich als Homodimer aufgebaut ist ($M_r$ = 2 x 88 kDa) (Yamanishi et al., 2002; O´Brien et al., 2004) und unter Berücksichtigung des Temperaturunterschieds.

weise in Lösung oder in der Gasphase niedrigere Aktivierungsenergien haben, zu unterbinden. Durch Verlängern der Lebensdauer kann das hochreaktive Intermediat untypische Reaktionen mit relativ großen Aktivierungsenergien eingehen, die ohne negative Katalyse unterdrückt würden, z. B. Umlagerungen unter 1,2-Wanderungen.

Ein radikalischer Phenoxyethanol-Spaltungsmechanismus würde hochreaktive Intermediate beinhalten. Nach Wasserstoff-Abstraktion vom Substrat, durch das katalytische Radikal des Enzyms, wäre nicht mehr das Enzym hochreaktiv, sondern das Substrat. Im Sinne der negativen Katalyse müsste vor allem in dieser Phase das Enzym verhindern, dass das Substratradikal seine Energie verliert. Erst durch die Wasserstoff-Rückabstraktion vom Enzym, durch das dem Produkt nahestehende Substratradikal (Substratradikal II), würde sich der Kreis schließen, und das Enzym läge wieder in aktivierter Form vor (Abb. 4.1). Die Substanzen, die in den dargestellten Experimenten für eine irreversible Hemmung gesorgt haben, sind in ihrer Struktur dem Phenoxyethanol eventuell so ähnlich, dass sie an das aktive Zentrum der Phenoxyethanol-Acetalaldehyd-Lyase binden können. Die Schädigung des Enzyms könnte dadurch zustande kommen, dass die Reaktion an den Substratanaloga zwar wie üblich (durch Wasserstoffabstraktion) eingeleitet, aber nicht vollendet wird (keine Rückabstraktion), sodass das Enzym in der nicht-aktivierten Form verbleibt.
Möglicherweise lässt sich so auch das Erliegen der Reaktion beim Umsatz von Phenoxyethanol erklären. Vielleicht kann manchmal die Reaktion nicht abgeschlossen werden, weil das aktivierte Phenoxyethanol mitunter in einer anderen als der vorgesehenen Weise reagiert und die negative Katalyse des Enzyms sozusagen nicht vollständig funktioniert, wodurch irgendwann alle Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase-Moleküle in der nicht-aktivierten Form vorliegen (→Erliegen der Aktivität).
So könnte auch die in ganzen Zellen ablaufende kontinuierliche Reaktivierung von inaktiviertem Enzym als neuerliche Aktivierung von nicht-(mehr)-aktiviertem Enzym durch die zugehörige Aktivase erklärt werden (Abb. 4.1). Mechanistisch würde es sich jeweils um genau dieselbe Reaktion handeln.

#### *4.2.5.3 Ein Reaktionsmodell*

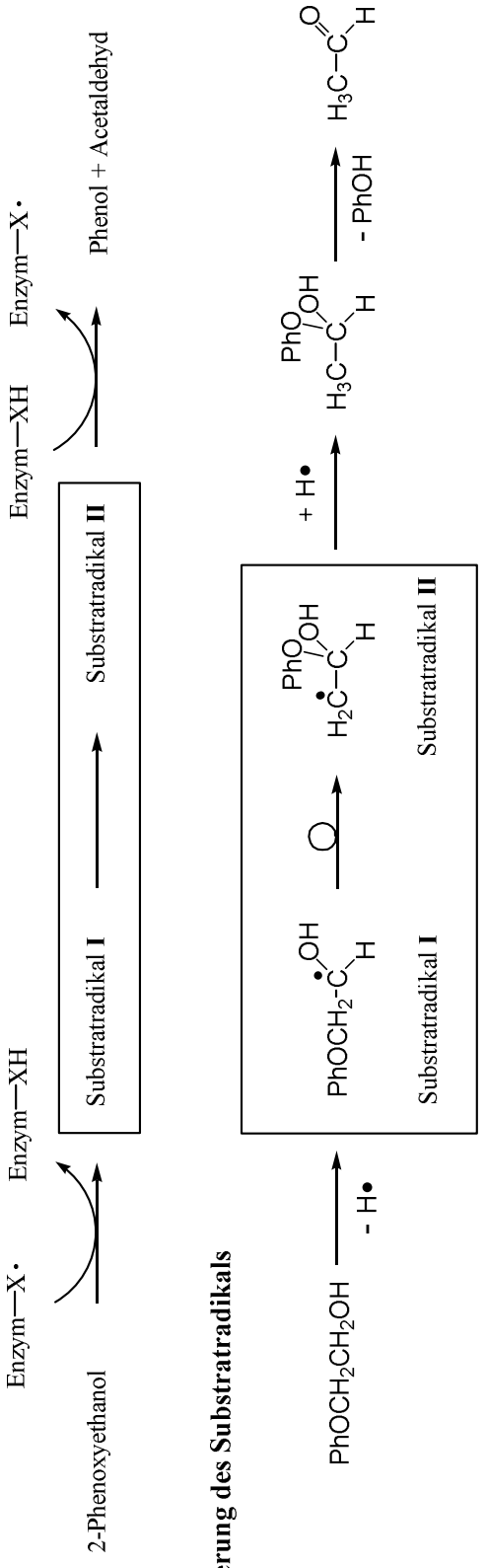
Der Reaktion und dem Inaktivieren der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase könnte der folgende hypothetische Reaktionsablauf zu Grunde liegen:
Die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase abstrahiert mit Hilfe eines Proteinradikals, vermutlich eines Thiylradikals, ein Wasserstoffatom von C-1 des Phenoxyethanols. Während der

normalen Reaktion würde der Phenoxid-Rest im aktivierten Phenoxyethanol an das benachbarte Kohlenstoffatom wandern (Abb. 4.2a). Nach Rückgabe des Wasserstoffs an das umgelagerte Substrat würde aus dem intermediären Halbacetal Phenol eliminieren.
Gelegentlich würde der Phenoxid-Rest direkt eliminieren ohne zu wandern (Abb. 4.2b), wodurch das relativ stabile Acetaldehyd-Radikal entstünde. Die Rückabstraktion des Wasserstoffs vom Protein würde dadurch vielleicht so stark verlangsamt, dass das Acetaldehyd-Radikal deshalb anders abgefangen würde (z. B. vom Solvens).

Entsprechendes könnte auch mit PEG 300, Triethylenglycol etc. anstelle von Phenoxyethanol auftreten. Auch die Hemmung durch Nitro-Phenoxyethanol bzw. die Thioether-Analoga würde gut zu dieser Hypothese passen. Diese Reste dürften jeweils im Vergleich zu Phenolat bessere Abgangsgruppen sein und deshalb im Substratradikal zu einem höheren Anteil direkt eliminieren.
Da es möglicherweise schwer fällt sich vorzustellen, dass ein und dasselbe Enzym die 1,2-Verschiebung von relativ unterschiedlichen und dabei relativ großen Resten katalysieren soll, noch folgende Anmerkung. Vielleicht handelt es sich hierbei weniger um eine Bewegung des „wandernden“ Rests, sondern vielmehr um eine Bewegung der jeweils identischen Ethylengruppe relativ zum stationär bleibenden Rest. So etwas scheint auch bei der Coenzym-$B_{12}$-Diol-Dehydratase der Fall zu sein (Shibata et al., 2003).
Eine ähnliche Erklärung zum Inaktivieren wäre denkbar, falls die reguläre Phenoxyethanol-Spaltung nicht über eine Wanderung des Phenoxids verliefe, sondern über eine an die direkte Eliminierung von Phenolat/Phenol anschließende Hilfsanlagerung eines Nukleophils (wie z. B. $OH^-$) erfolgen würde (Abb. 4.2c). Bei diesem Szenario könnte das Inaktivieren durch das gelegentliche Fehlschlagen der Hilfsanlagerung verursacht werden.

**Abb. 4.2** auf folgender Seite
Hypothetische Mechanismen der Phenoxyethanol-Spaltung:
a) Umlagerung des Substratradikals und Zerfall des entstehenden Halbacetals
b) direkte Eliminierung von Phenolat/Phenol aus der β-Position
c) direkte Eliminierung von Phenolat/Phenol und Anlagerung eines Nukleophils

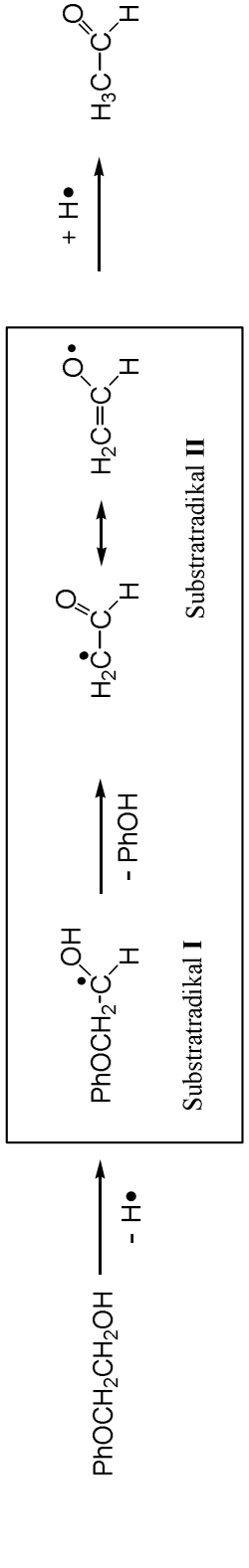
**allgemeines Reaktionsschema**



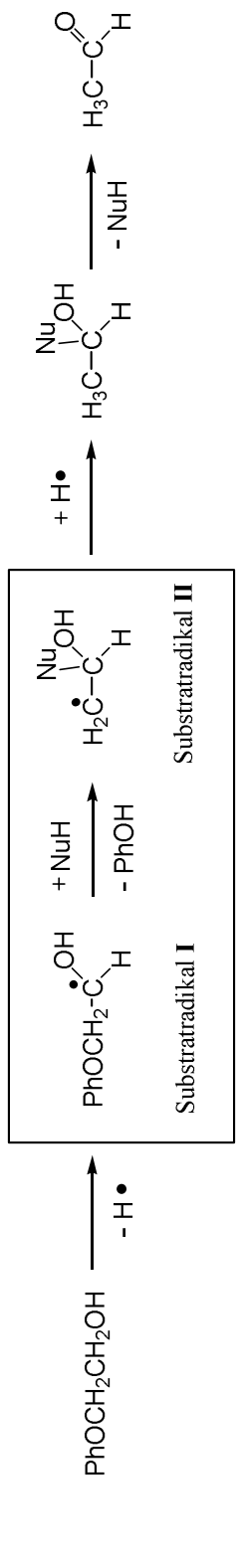

**a) Umlagerung des Substratradikals**




**b) Eliminierung von PhO⁻ aus der β-Position**




**c) Eliminierung von PhO⁻ aus der β-Position und Anlagerung eines Nukleophils**



## 4.3 Anregungen für weitere Untersuchungen

Die bisher noch unbestätigte Annahme, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase auch für die Spaltung von PEG verantwortlich ist, dürfte relativ einfach durch Versuche mit zellfreiem Extrakt, ähnlich den Experimenten zur Unterscheidung von Diol-Dehydratase und Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase, zu belegen bzw. widerlegen sein (v. a. durch Vergleich der Gesamtumsätze von Phenoxyethanol bzw. PEG in Einzel- und Doppelsubstrat-Ansätzen).

Die Zellextrakt-Versuche mit verschiedenen Phenoxyethanol-ähnlichen Verbindungen als Substrate bzw. Hemmstoffe könnten fortgesetzt werden und weitere Hinweise auf den Mechanismus geben, zum Beispiel durch Bestimmungen von Hemm-Typ und Inhibitor-Konstante. Eventuell wäre es dabei zweckmäßig, wesentlich längere Inkubationen von Extrakt und Substanz durchzuführen, um auch sehr geringe Aktivitäten zu erfassen, möglicherweise müssten die Versuche auch durch andere Analysetechniken ergänzt werden, mit denen sich gegebenenfalls Veränderungen an den Hemmstoffen bzw. Substraten feststellen ließen.

ESR-Messungen könnten vielleicht den noch ausstehenden Beweis erbringen, dass es sich bei der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase tatsächlich um ein Glycylradikalenzym handelt. Vorversuche haben ergeben, dass Stamm LuPhet 1 auch auf Mangan-freiem Medium wachsen konnte. Ein Glycylradikalenzym (in der aktivierten Form) würde ein permanentes Radikal enthalten, das in ESR-Messungen ein Glycylradikal-Signal bzw- Thiylradikal-Signal ergeben würde. Messungen wären vielleicht sogar mit ganzen Zellen oder zellfreiem Extrakt möglich, wobei man nachweisen müsste, dass ein eventuelles Signal tatsächlich durch die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase verursacht würde, z. B. durch verschiedene Experimente in Zellsuspensionen und Extrakt, bei denen jeweils der Verlauf der Signalintensität der gemessenen Aktivitätskurve entsprechen müsste (d. h. im Extrakt: Verschwinden des Signals innerhalb von 3,5 min nach Phenoxyethanolzugabe, Verlängern der Signal-Lebensdauer durch Zusatz von 2-(2-Phenoxyethoxy)ethanol zusammen mit Phenoxyethanol; Verschwinden des Signals nach Zusatz von Sauerstoff, aber auch nach Zusatz von hohen Konzentrationen an reduzierenden Schwefelverbindungen; etc.).

In ganzen Zellen ist die Reaktivierung des Enzyms jeweils mit hoher Rate abgelaufen, dies könnte bedeuten, dass das Aktivierungsenzym relativ stark exprimiert ist, z. T. vielleicht stärker als bei anderen Glycylradikalenzymen. Es könnte deshalb vielleicht sogar gelingen, diese Reaktivierungsreaktion in Zellextrakt oder permeabilisierten Zellen nachzuweisen, durch Zusetzen von *S*-Adenosylmethionin und Reduktionssystemen, wie sie für die *in-vitro*-Aktivierungsreaktion der Anaeroben Ribonukleotid-Reduktase eingesetzt werden (z. B. Tamarit et al., 1999).

Protein-biochemische bzw. molekularbiologische Beweise dafür, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase ein Glycylradikalenzym ist, setzen in der Regel die Reinigung des Proteins voraus.
Für die Detektion des Enzyms während einer Proteinreinigung müsste es jeweils aktiv sein; aufgrund der großen Sauerstoffempfindlichkeit des Enzyms wäre eine Reinigung wahrscheinlich nicht einfach.

# 5. Zusammenfassung

Alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit ganzen Zellen oder mit Zellextrakt von *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 durchgeführt. *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 katalysiert die Dehydratisierung von vicinalen Diolen wie Ethylenglycol, außerdem die Verkürzung von Polyethylenglycolen unter Bildung von Acetaldehyd sowie die Spaltung von Phenoxyethanol zu Acetaldehyd und Phenol; der Acetaldehyd dient dem Bakterium jeweils als Energie- und Kohlenstoffquelle (Frings und Schink, 1994).
In Übereinstimmung mit den früheren Arbeiten zeigte sich, dass die Dehydratisierung von vicinalen Diolen wie Ethylenglycol durch ein Coenzym-$B_{12}$-abhängiges Enzym katalysiert wurde, das den bekannten Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Diol-Dehydratasen (EC 4.2.1.28 bzw. EC 4.2.1.30) ähnlich ist. Bei den Enzymen für Diol-Dehydratisierung bzw. Phenoxyethanol-Spaltung handelte es sich um voneinander unabhängige Enzyme, letzte Zweifel an ihrer Verschiedenheit wurden ausgeräumt. Außerdem wurde ausgeschlossen, dass die einleitenden Enzyme des Lactat-Abbaus und der Phenoxyethanol-Spaltung identisch sind.

Für die Phenoxyethanol-Spaltung wurden mit ganzen Zellen Anfangsaktivitäten von ca. 5-10 U/mg Protein, mit zellfreiem Extrakt oft von ca. 1 U/mg Protein erhalten; letzteres ist deutlich mehr als zuvor für Extrakt berichtet wurde (Frings und Schink, 1994). Die Umsatzrate verringerte sich aber nach der Substratzugabe kontinuierlich, sodass bei zellfreiem Extrakt nach maximal 3,5 min kein weiterer Umsatz mehr stattfand. Bei ganzen Zellen nahm die Aktivität während der ersten ca. 1-3 min ebenfalls ab, danach wurde die weitere Umsetzung jedoch mit einer gleichbleibenden Aktivität, die etwa der *in-vivo*-Aktivität von 1 U/mg Protein entsprach, fortgesetzt. Nach genauerer Untersuchung der Aktivitätskurven von zellfreien Extrakten und Zellsuspensionen wurde gefolgert, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase nach einer bestimmten Zahl von Zyklen aus dem Kreislauf ausscheidet (Inaktivierung), und dass dies bei ganzen Zellen durch eine kontinuierliche Rückführung von inaktivierter Lyase in den Katalysekreislauf (Reaktivierung) aufgefangen wird.
Jedes Substrat (Phenoxyethanol und verschiedene Phenoxyethanol-ähnliche Substanzen) zeigte charakteristische Werte der Aktivitätsdauer und der spezifischen Aktivität, dabei unterschieden sich diese Werte auch zwischen PEG 300, Tetraethylenglycol und Triethylenglycol. Einige Phenoxyethanol-ähnliche Substanzen wurden nicht merklich umgesetzt, verursachten aber verschiedene Hemmungen der Phenoxyethanol-Spaltung.

Die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase war bei allen getesteten Kultursubstraten induziert, sie war im Cytosol lokalisiert und weder abhängig von Coenzym $B_{12}$ noch gab es Hinweise auf eine Abhängigkeit von anderen schwach gebundenen Cofaktoren. Die Enzymaktivität war sehr sauerstoffempfindlich. In ehemals oxischen Ansätzen konnte sie durch Zusatz von Reduktionsmittel (Titancitrat) nicht wieder hergestellt werden. Vermutlich gingen auch Aktivitätsverluste während der Lagerung auf diese Oxidationsempfindlichkeit zurück. Die Präsenz des Reduktionsmittels Titan(III)citrat (meist 2,5 mM) war deshalb wichtig, sie sorgte für höhere Aktivität bzw. besseren Erhalt der Aktivität. Dagegen wirkten millimolare Konzentrationen von reduzierenden Schwefelverbindungen (Dithionit, Dithiothreitol bzw. Hydrogensulfid, jeweils zusätzlich zu 2,5 mM Titancitrat) schädlich.

Zur Erklärung der Ergebnisse, die in Zellsuspensionsversuchen mit isotopenmarkiertem Phenoxyethanol erhalten wurden, kommen vor allem radikalische Enzym-Mechanismen in Frage. Es wurden Mechanismen vorgeschlagen, die ähnlich dem Mechanismus der Coenzym-$B_{12}$-abhängigen Dehydratasen jeweils mit der Abstraktion eines Wasserstoffatoms von C-1 des Substrats beginnen, dabei jedoch nicht über ein 5´-Desoxyadenosylradikal sondern über ein anderes Radikal ablaufen. Die postulierten Reaktionswege beinhalten eine Umlagerung des Substratradikals und nachfolgende Halbacetalbildung (analog den $B_{12}$-Dehydratasen, wobei allerdings nicht das Hydroxid sondern das Phenoxid wandert) (Weg I) bzw. eine Abspaltung von Phenoxid direkt aus dem Substratradikal, ohne vorherige Umlagerung und Halbacetalbildung (Weg II).
Diese Befunde und Überlegungen wurden ergänzt durch die anderen Ergebnisse wie das Auftreten von Inaktivieren und Reaktivieren, die Unabhängigkeit von Coenzymen und die Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff bzw. reduzierenden Schwefelverbindungen, die gut zu einem Mechanismus passen, der durch ein Proteinradikal (z. B. ein Glycyl- bzw. Thiylradikal) ausgelöst wird. Insgesamt sprechen die verschiedenen Ergebnisse dafür, dass die Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase zur Gruppe der Glycylradikalenzyme gehört. Dementsprechend enthält *Acetobacterium* Stamm LuPhet 1 vermutlich auch ein SAM-abhängiges Aktivierungsenzym zur Aktivierung der Phenoxyethanol-Acetaldehyd-Lyase.
Aufgrund theoretischer Überlegungen und den Ergebnissen mit alternativen Substraten wird schließlich die Hypothese aufgestellt, dass die erfolgreiche Phenoxyethanol-Spaltung über Weg I (Umlagerung mit Halbacetalbildung) verläuft und die Inaktivierung des Enzyms durch gelegentliches Einschlagen von Weg II verursacht wird.

# 6. Literaturverzeichnis

(2003). Chem. Rev. **103** (Nr. 6).

**Abeles R. H., Brownstein A. M. und Randles C. H.** (1960) β-Hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-propanediol by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta **41**: 530-531.

**Abeles R. H. und Zagalak B.** (1966) The nature of the hydrogen transfer in the dimethylbenzimidazolylcobamide coenzyme-catalyzed conversion of 1,2-propanediol to propionaldehyde. J. Biol. Chem. **241**: 1245-1246.

**Abend A., Bandarian V., Reed G. H. und Frey P. A.** (2000) Identification of *cis*-ethanesemidione as the organic radical derived from glycolaldehyde in the suicide inactivation of dioldehydrase and of ethanolamine ammonia-lyase. Biochemistry **39**: 6250-6257.

**Adler E.** (1977) Lignin chemistry-past, present, and future. Wood Sci. Technol. **11**: 169-218.

**Andrei P. I., Pierik A. J., Zauner S., Andrei-Selmer L. C. und Selmer T.** (2004) Subunit composition of the glycyl radical enzyme *p*-hydroxyphenylacetate decarboxylase. A small subunit, HpdC, is essential for catalytic activity. Eur. J. Biochem. **271**: 2225-2230.

**Annweiler E., Materna A., Safinowski M., Kappler A., Richnow H. H., Michaelis W. und Meckenstock R. U.** (2000) Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 5329-5333.

**Babior B. M.** (1969) The mechanism of action of ethanolamine deaminase. I. Studies with isotopic hydrogen and oxygen. J. Biol. Chem. **244**: 449-456.

**Bachovchin W. W., Eagar R. G., Jr. , Moore K. W. und Richards J. H.** (1977) Mechanism of action of adenosylcobalamin: Glycerol and other substrate analogues as substrates and inactivators for propanediol dehydratase-Kinetics, stereospecificity, and mechanism. Biochemistry **16**: 1082-1092.

**Bandarian V. und Reed G. H.** (2000) Isotope effects in the transient phases of the reaction catalyzed by ethanolamine ammonia-lyase: Determination of the number of exchangeable hydrogens in the enzyme-cofactor complex. Biochemistry **39**: 12069-12075.

**Banerjee R.** (2003) Radical carbon skeleton rearrangements: Catalysis by coenzyme $B_{12}$-dependent mutases. Chem. Rev. **103**: 2083-2094.

**Bansal K. M., Patterson L. K., Henglein A. und Janata E.** (1973) Polarographic and optical absorption studies of radicals produced in the pulse radiolysis of aqueous solutions of ethylene glycol. J. Phys. Chem. **77**: 16-19.

**Becker A., Fritz-Wolf K., Kabsch W., Knappe J., Schultz S. und Wagner A. F. V.** (1999) Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase. Nature Struct. Biol. **6**: 969-975.

**Beller H. R. und Spormann A. M.** (1997) Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. J. Bacteriol. **179**: 670-676.

**Benner R., MacCubbin A. E. und Hodson R. E.** (1984) Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. Appl. Environ. Microbiol. **47**: 998-1004.

**Berkovitch F., Nicolet Y., Wan J. T., Jarrett J. T. und Drennan C. L.** (2004) Crystal structure of biotin synthase, an *S*-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. Science **303**: 76-79.

**Berman M. H. und Frazer A. C.** (1992) Importance of tetrahydrofolate and ATP in the anaerobic *O*-demethylation reaction for phenylmethylethers. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 925-931.

**Bernhardt F.-H., Pachowsky H. und Staudinger H.** (1975) A 4-methoxybenzoate *O*-demethylase from *Pseudomonas putida*. A new type of monooxygenase system. Eur. J. Biochem. **57**: 241-256.

**Bhatt M. V. und Kulkarni S. U.** (1983) Cleavage of Ethers. Synthesis: 249-282.

**Biegert T., Fuchs G. und 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.

**Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C. J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jorgensen B. B., Witte U. und Pfannkuche O.** (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. Nature **407**: 623-626.

**Booker S., Licht S., Broderick J. und Stubbe J.** (1994) Coenzyme $B_{12}$-dependent ribonucleotide reductase: Evidence for the participation of five cysteine residues in ribonucleotide reduction. Biochemistry **33**: 12676-12685.

**Boruff C. S. und Buswell A. M.** (1934) The anaerobic fermentation of lignin. J. Am. Chem. Soc. **56**: 886-888.

**Bradbeer C.** (1965 a) The clostridial fermentations of choline and ethanolamine. I. Preparation and properties of cell-free extracts. J. Biol. Chem. **240**: 4669-4674.

**Bradbeer C.** (1965 b) The clostridial fermentations of choline and ethanolamine. II. Requirement for a cobamide coenzyme by an ethanolamine deaminase. J. Biol. Chem. **240**: 4675-4681.

**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.

**Brownstein A. M. und Abeles R. H.** (1961) The mechanism of conversion of 1,2-propanediol to propionaldehyde: A reaction requiring a vitamin $B_{12}$ coenzyme. J. Biol. Chem. **236**: 1199-1200.

**Buckel W.** (1996) Unusual dehydrations in anaerobic bacteria: Considering ketyls (radical anions) as reactive intermediates in enzymatic reactions. FEBS Lett. **389**: 20-24.

**Buckel W. und Golding B. T.** (1999) Radical species in the catalytic pathways of enzymes from anaerobes. FEMS Microbiol. Rev. **22**: 523-541.

**Buckel W. und Keese R.** (1995) One-electron redox reactions of CoASH esters in anaerobic bacteria - A mechanistic proposal. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **34**: 1502-1506.

**Burwell R. J.** (1954) The cleavage of ethers. Chem. Rev. **54**: 615-685.

**Cartwright N. J. und Smith A. R. W.** (1967) Bacterial attack on phenolic ethers. An enzyme system demethylating vanillic acid. Biochem. J. **102**: 826-841.

**Cheek J. und Broderick J. B.** (2002) Direct H atom abstraction from spore photoproduct C-6 initiates DNA repair in the reaction catalyzed by spore photoproduct lyase: Evidence for a reversibly generated adenosyl radical intermediate. J. Am. Chem. Soc. **124**: 2860-2861.

**Chirpich T. P., Zappia V., Costilow R. N. und Barker H. A.** (1970) Lysine 2,3-aminomutase. Purification and properties of a pyridoxal phosphate and *S*-adenosylmethionine-activated enzyme. J. Biol. Chem. **245**: 1778-1789.

**Cleland W. W.** (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. Biochemistry **3**: 480-482.

**Colberg P. J. und Young L. Y.** (1985) Aromatic and volatile acid intermediates observed during anaerobic metabolism of lignin-derived oligomers. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 350-358.

**Colby J., Stirling D. I. und Dalton H.** (1977) The soluble methane-mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Its ability to oxygenate n-alkanes, n-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds. Biochem. J. **165**: 395-402.

**Coschigano P. W., Wehrman T. S. und Young L. Y.** (1998) Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: Putative role of a glycine free radical. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 1650-1656.

**Cox D. P.** (1978) The biodegradation of polyethylene glycols. Adv. Appl. Microbiol. **23**: 173-194.

**Deutscher M. P.** (Hrsg) (1990) Guide to protein purification. In: Methods in Enzymology, Band **182**. Acadamic Press, San Diego [u.a.].

**DeWeerd K. A., Saxena A., Nagle D. P. und Suflita J. M.** (1988) Metabolism of the $^{18}$O-methoxy substituent of 3-methoxybenzoic acid and other unlabelled methoxybenzoic acids by anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 1237-1242.

**Doré J. und Bryant M. P.** (1990) Metabolism of one-carbon compounds by the ruminal acetogen *Syntrophococcus sucromutans*. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 984-989.

**Duboc-Toia C., Hassan A. K., Mulliez E., Ollagnier-de-Choudens S., Fontecave M., Leutwein C. und Heider J.** (2003) Very high-field EPR study of glycyl radical enzymes. J. Am. Chem. Soc. **125**: 38-39.

**Dwyer D. F. und Tiedje J. M.** (1986) Metabolism of polyethylene glycol by two anaerobic bacteria, *Desulfovibrio desulfuricans* and a *Bacteroides* sp. Appl. Environ. Microbiol. **52**: 852-856.

**Egger K. W. und Cocks A. T.** (1973) Homopolar- and heteropolar bond dissociation energies and heats of formation of radicals and ions in the gas phase. I. Data on organic molecules. Helv. Chim. Acta **56**: 1516-1536.

**Essenberg M. K., Frey P. A. und Abeles R. H.** (1971) Studies on the mechanism of hydrogen transfer in the coenzyme $B_{12}$ dependent dioldehydrase reaction II. J. Am. Chem. Soc. **93**: 1242-1251.

**Finke R. G., Schiraldi D. A. und Mayer B. J.** (1984) Towards the unification of coenzyme $B_{12}$-dependent diol dehydratase stereochemical and model studies: The bound radical mechanism. Coord. Chem. Rev. **54**: 1-22.

**Fontecave M.** (1998) Ribonucleotide reductases and radical reactions. Cellular and Molecular Life Sciences **54**: 684-695.

**Fontecave M., Eliasson R. und Reichard P.** (1989) Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphate reductase is present in anaerobic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 2147-2151.

**Fontecave M. und Mulliez E.** (1999) Ribonucleotide reductases. In: Banerjee R. (Hrsg) Chemistry and biochemistry of $B_{12}$. John Wiley & Sons, New York. S. 731-756.

**Fontecave M., Mulliez E. und Ollagnier-de-Choudens S.** (2001) Adenosylmethionine as a source of 5´-deoxyadenosyl radicals. Curr. Opin. in Chemical Biology **5**: 506-511.

**Fontecave M., Ollagnier-de-Choudens S. und Mulliez E.** (2003) Biological radical sulfur insertion reactions. Chem. Rev. **103**: 2149-2166.

**Frey P. A.** (1990) Importance of organic radicals in enzymatic cleavage of unactivated C-H bonds. Chem. Rev. **90**: 1343-1357.

**Frey P. A.** (2001) Radical mechanisms of enzymatic catalysis. Annu. Rev. Biochem. **70**: 121-148.

**Frey P. A. und Abeles R. H.** (1966) The role of the $B_{12}$ coenzyme in the conversion of 1,2-propanediol to propionaldehyde. J. Biol. Chem. **241**: 2732-2733.

**Frey P. A. und Booker S. J.** (2001) Radical mechanisms of *S*-adenosylmethionine-dependent enzymes. Adv. Protein Chem. **58**: 1-45.

**Frey P. A., Essenberg M. K. und Abeles R. H.** (1967) Studies on the mechanism of hydrogen transfer in the cobamide coenzyme-dependent dioldehydrase reaction. J. Biol. Chem. **242**: 5369-5377.

**Frey P. A. und Magnusson O. T.** (2003) *S*-Adenosylmethionine: A wolf in sheep´s clothing, or a rich man´s adenosylcobalamin? Chem. Rev. **103**: 2129-2148.

**Frings J. und Schink B.** (1994) Fermentation of phenoxyethanol to phenol and acetate by a homoacetogenic bacterium. Arch. Microbiol. **162**: 199-204.

**Frings J., Schramm E. und Schink B.** (1992) Enzymes involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by *Pelobacter venetianus* and *Bacteroides* strain PG1. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2164-2167.

**Galushko A., Minz D., Schink B. und Widdel F.** (1999) Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. Environ. Microbiol. **1**: 415-420.

**George P., Glusker J. P. und Bock C. W.** (1995) *Ab initio* study of protonated radical species that may be involved in the enzyme-coenzyme $B_{12}$ catalyzed dehydration of 1,2-dihydroxyethane. J. Am. Chem. Soc. **117**: 10131-10132.

**George P., Glusker J. P. und Bock C. W.** (1997) An *ab initio* computational molecular orbital study of radical, protonated radical (radical cation), and carbocation species that have been proposed in mechanisms for the transfer process in the enzyme-coenzyme $B_{12}$-catalyzed dehydration of 1,2-dihydroxyethane. J. Am. Chem. Soc. **119**: 7065-7074.

**George P., Siegbahn P. E. M., Glusker J. P. und Bock C. W.** (1999) The dehydration step in the enzyme-coenzyme-$B_{12}$ catalyzed diol dehydrase reaction of 1,2-dihydroxyethane utilizing a hydrogen-bonded carboxylic acid group as an additional cofactor: a computational study. J. Phys. Chem. B **103**: 7531-7541.

**Golding B. T. und Buckel W.** (1998) Corrin-dependent reactions. In: Sinnott M. (Hrsg) Radical reactions and oxidation/reduction. Comprehensive Biological Catalysis, Band **3.** Academic Press, San Diego [u. a.]. S. 239-259.

**Golding B. T. und Radom L.** (1976) On the mechanism of action of adenosylcobalamin. J. Am. Chem. Soc. **98**: 6331-6338.

**Grant M. A. und Payne W. J.** (1983) *Alcaligenes faecalis* var. *denitrificans* ability to degrade free ether glycols and other non-ionic detergents-growing anaerobically as a denitrifier. Biotechnol. Bioeng. **25**: 627-630.

**Grobelny Z.** (2004) Chemical methods for ether-bond cleavage by electron-transfer reagents. Eur. J. Org. Chem. **2004**: 2973-2982.

**Hallam S. J., Putnam N., Preston C. M., Detter J. C., Rokhsar D., Richardson P. M. und DeLong E. F.** (2004) Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. Science **305**: 1457-1462.

**Hartmanis M. G. N. und Stadtman T. C.** (1986) Diol metabolism and diol dehydratase in *Clostridium glycolicum*. Arch. Biochem. Biophys. **245**: 144-152.

**Hartmanis M. G. N. und Stadtman T. C.** (1987) Solubilization of a membrane-bound diol dehydratase with retention of EPR $g$ = 2.02 signal by using 2-(*N*-cyclohexylamino)ethanesulfonic acid buffer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 76-79.

**Hayon E. und Simic M.** (1974) Acid-base properties of free radicals in solution. Accounts of Chemical Research **7**: 114-121.

**Healy J. B., Jr. und Young L. Y.** (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. **38**: 84-89.

**Healy J. B., Jr., Young L. Y. und Reinhard M.** (1980) Methanogenic decomposition of ferulic acid, a model lignin derivative. Appl. Environ. Microbiol. **39**: 436-444.

**Heider J., Spormann A. M., Beller H. R. und Widdel F.** (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS Microbiol. Rev. **22**: 459-473.

**Hermuth K., Leuthner B. und Heider J.** (2002) Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. Arch. Microbiol. **177**: 132-138.

**Himo F. und Siegbahn P. E. M.** (2003) Quantum chemical studies of radical-containing enzymes. Chem. Rev. **103**: 2421-2456.

**Hollaway M. R., White H. A., Joblin K. N., Johnson A. W., Lappert M. F. und Wallis O. C.** (1978) A spectrophotometric rapid kinetic study of reactions catalysed by coenzyme-$B_{12}$-dependent ethanolamine ammonia-lyase. Eur. J. Biochem. **82**: 143-154.

**Honda S., Toraya T. und Fukui S.** (1980) *In situ* reactivation of glycerol-inactivated coenzyme $B_{12}$-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase. J. Bacteriol. **143**: 1458-1465.

**Jarrett J. T.** (2003) The generation of 5´-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes. Curr. Opin. in Chemical Biology **7**: 174-182.

**Johnson H. A., Pelletier D. A. und Spormann A. M.** (2001) Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. J. Bacteriol. **183**: 4536-4542.

**Jordan A. und Reichard P.** (1998) Ribonucleotide reductases. Annu. Rev. Biochem. **67**: 71-98.

**Kaiser J.-P. und Hanselmann K.** (1983) Fermentative metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. Arch. Microbiol. **133**: 185-194.

**Kajikawa H., Kudo H., Kondo T., Jodai K., Honda Y., Kuwahara M. und Watanabe T.** (2000) Degradation of benzyl ether bonds of lignin by ruminal microbes. FEMS Microbiol. Lett. **187**: 15-20.

**Kalinowski H.-O., Berger S. und Braun S.** (1988) $^{13}C$ NMR spectroscopy. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

**Kaplan B. H. und Stadtman E. R.** (1968) Ethanolamine deaminase, a cobamide coenzyme-dependent enzyme. I. Purification, assay, and properties of the enzyme. J. Biol. Chem. **243**: 1787-1793.

**Kaufmann F., Wohlfarth G. und Diekert G.** (1998) *O*-demethylase from *Acetobacterium dehalogenans* - Substrate specificity and function of the participating proteins. Eur. J. Biochem. **253**: 706-711.

**Kawai F.** (2002) Microbial degradation of polyethers. Appl. Microbiol. Biotechnol. **58**: 30-38.

**Kharoune M., Kharoune L., Lebeault J. M. und Pauss A.** (2001) Isolation and characterization of two aerobic bacterial strains that completely degrade ethyl *tert*-butyl ether (ETBE). Appl. Microbiol. Biotechnol. **55**: 348-353.

**King D. S. und Reichard P.** (1995) Mass spectrometric determination of the radical scission site in the anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **206**: 731-735.

**Kirk T. K. und Farell R. L.** (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. **41**: 465-505.

**Knappe J., Elbert S., Frey M. und Wagner A. F. V.** (1993) Pyruvate formate-lyase mechanism involving the protein-based glycyl radical. Biochemical Society Transactions **21**: 731-734.

**Knappe J., Neugebauer F. A., Blaschkowski H. P. und Ganzler M.** (1984) Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 1332-1335.

**Knappe J. und Sawers G.** (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: The anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. **75**: 383-398.

**Knappe J., Schacht J., Möckel W., Höpner T., Vetter H., Jr. und Edenharder R.** (1969) Pyruvate formate-lyase reaction in *Escherichia coli*. The enzymatic system converting an inactive form of the lyase into the catalytically active enzyme. Eur. J. Biochem. **11**: 316-327.

**Knappe J. und Wagner A. F.** (1995) Glycyl free radical in pyruvate formate lyase: Synthesis, structure characteristics, and involvement in catalysis. In: Klinman J. P. (Hrsg) Redox active amino acids in biology. Methods in Enzymology, Band **258**. Academic Press, San Diego [u. a.]. S. 343-362.

**Kniemeyer O., Fischer T., Wilkes H., Glöckner F. O. und Widdel F.** (2003) Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of sulfate-reducing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 760-768.

**Kniemeyer O. und Heider J.** (2001) Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. J. Biol. Chem. **276**: 21381-21386.

**Kreft J.-U. und Schink B.** (1994) *O*-Demethylation by the homoacetogenic anaerobe *Holophaga foetida* studied by a new photometric methylation assay using electrochemically produced cob(I)alamin. Eur. J. Biochem. **226**: 945-951.

**Krieger C. J., Roseboom W., Albracht S. P. J. und Spormann A. M.** (2001) A stable organic free radical in anaerobic benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T. J. Biol. Chem. **276**: 12924-12927.

**Kropf H., Thiem J. und Nimz H.** (1979) Cleavage of open chain ethers. In: Houben-Weyl. Methoden der organischen Chemie, Band **6/1a part 1**. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S. 309-338.

**Krüger M., Meyerdierks A., Glöckner F. O., Amann R., Widdel F., Kube M., Reinhardt R., Kahnt J., Böcher R., Thauer R. K. und Shima S.** (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. Nature **426**: 878-881.

**Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

**Layer G., Moser J., Heinz D. W., Jahn D. und Schubert W.-D.** (2003) Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes. The EMBO Journal **22**: 6214-6224.

**Layer G., Verfürth K., Mahlitz E. und Jahn D.** (2002) Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **277**: 34136-34142.

**Lee H. A., Jr. und Abeles R. H.** (1963) Purification and properties of dioldehydrase, an enzyme requiring a cobamide coenzyme. J. Biol. Chem. **238**: 2367-2373.

**Lengeler J. W., Drews G. und Schlegel H. G.** (Hrsg) (1999) Biology of the Prokaryotes. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

**Leuthner B., Leutwein C., Schulz H., Hörth P., Haehnel W., Schiltz E., Schägger H. und Heider J.** (1998) Biochemical and genetic characterisation of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: A new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. Mol. Microbiol. **28**: 615-628.

**Licht S., Gerfen G. J. und Stubbe J.** (1996) Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. Science **271**: 477-481.

**Loach P. A.** (1976) Oxidation-reduction potentials, absorbance bands and molar absorbance of compounds used in biochemical studies. In: Fasman G. D. (Hrsg) CRC Handbook of biochemistry and molecular biology. 3. Auflage. Vol. I. Physical and chemical data. CRC Press, Cleveland. S. 122-130.

**Logan D. T., Andersson J., Sjöberg B.-M. und Nordlund P.** (1999) A glycyl radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. Science **283**: 1499-1504.

**Masai E., Ichimura A., Sato Y., Miyauchi K., Katayama Y. und Fukuda M.** (2003) Roles of the enantioselective glutathione *S*-transferases in cleavage of *beta*-arylether. J. Bacteriol. **185**: 1768-1775.

**Masai E., Katayama Y., Kubota S., Kawai S., Yamasaki M. und Morohoshi N.** (1993) A bacterial enzyme degrading the model lignin compound *beta*-etherase is a member of the glutathione-*S*-transferase superfamily. FEBS Lett. **323**: 135-140.

**Masai E., Sasaki M., Minakawa Y., Abe T., Sonoki T., Miyauchi K., Katayama Y. und Fukuda M.** (2004) A novel tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase gene is essential for growth of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 with syringate. J. Bacteriol. **186**: 2757-2765.

**Mason R. P.** (1996) *In vitro* and *in vivo* detection of free radical metabolites with electron spin resonance. In: Punchard N. A. und Kelly F. J. (Hrsg) Free Radicals - A practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford. S. 11-24.

**Mayer J. M.** (2000) Thermodynamic Influences on C-H Bond Oxidation. In: Meunier B. (Hrsg) Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes. Imperial College Press, London.

**Meckenstock R. U., Annweiler E., Michaelis W., Richnow H. H. und Schink B.** (2000) Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 2743-2747.

**Molander G. A. und Hahn G.** (1986) Lanthanides in organic synthesis. 2. Reduction of α-heterosubstituted ketones. J. Org. Chem. **51**: 1135-1138.

**Moreno Horn M., Garbe L.-A., Tressl R., Adrian L. und Görisch H.** (2003) Biodegradation of bis(1-chloro-2-propyl) ether via initial ether scission and subsequent dehalogenation by *Rhodococcus* sp. strain DTB. Arch. Microbiol. **179**: 234-241.

**Mori K. und Toraya T.** (1999) Mechanism of reactivation of coenzyme $B_{12}$-dependent diol dehydratase by a molecular chaperone-like reactivating factor. Biochemistry **38**: 13170-13178.

**Mormile M. R., Liu S. und Suflita J. M.** (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates: Extrapolation of Information to multiple sites and redox conditions. Environ. Sci. Technol. **28**: 1727-1732.

**Müller J. A., Galushko A. S., Kappler A. und Schink B.** (1999) Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. Arch. Microbiol. **172**: 287-294.

**Müller J. A., Galushko A. S., Kappler A. und Schink B.** (2001) Initiation of anaerobic degradation of *p*-cresol by formation of 4-hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum*. J. Bacteriol. **183**: 752-757.

**Mulliez E., Fontecave M., Gaillard J. und Reichard P.** (1993) An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **268**: 2296-2299.

**Naidu D. und Ragsdale S. W.** (2001) Characterization of a three-component vanillate *O*-demethylase from *Moorella thermoacetica*. J. Bacteriol. **183**: 3276-3281.

**Neuhoff V., Arold N., Taube D. und Ehrhardt W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis **9**: 255-262.

**Newcomb M. und Toy P. H.** (2000) Hypersensitive radical probes and the mechanisms of cytochrome P450-catalyzed hydroxylation reactions. Accounts of Chemical Research **33**: 449-455.

**O´Brien J. R., Raynaud C., Croux C., Girbal L., Soucaille P. und Lanzilotta W. N.** (2004) Insight into the mechanism of the $B_{12}$-independent glycerol dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary biochemical and structural characterization. Biochemistry **43**: 4635-4645.

**Ochiai E.-I.** (1994) Free radicals and metalloenzymes: General considerations. In: Sigel H. und Sigel A. (Hrsg) Metalloenzymes involving amino acid-residue and related radicals. Metal Ions in Biological Systems, Band **30**. Marcel Dekker, New York. S. 1-24.

**Ollagnier S., Mulliez E., Gaillard J., Eliasson R., Fontecave M. und Reichard P.** (1996) The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center. J. Biol. Chem. **271**: 9410-9416.

**Otsuka Y., Sonoki T., Ikeda S., Kajita S., Nakamura M. und Katayama Y.** (2003) Detection and characterization of a novel extracellular fungal enzyme that catalyzes the specific and hydrolytic cleavage of lignin guaiacylglycerol *beta*-aryl ether linkages. Eur. J. Biochem. **270**: 2353-2362.

**Parast C. V., Wong K. K., Kozarich J. W., Peisach J. und Magliozzo R. S.** (1995) Electron paramagnetic resonance evidence for a cysteine-based radical in pyruvate formate-lyase inactivated with mercaptopyruvate. Biochemistry **34**: 5712-5717.

**Pawelkiewicz J. und Zagalak B.** (1965) Enzymic conversion of glycerol into β-hydroxypropionaldehyde in a cell-free extract from *Aerobacter aerogenes*. Acta Biochim. Polon. **12**: 207-218.

**Pearce B. A. und Heydeman M. T.** (1980) Metabolism of di(ethylene glycol) [2-(29-hydroxyethoxy)ethanol] and other short poly(ethylene glycol)s by gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol. **118**: 21-27.

**Poznanskaya A. A., Yakusheva M. I. und Yakovlev V. A.** (1977) Study of the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. The inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. Biochim. Biophys. Acta **484**: 236-243.

**Prince R. C.** (2000) Biodegradation of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) and other fuel oxygenates. Crit. Rev. Microbiol. **26**: 163-178.

**Rabus R., Wilkes H., Behrends A., Armstroff A., Fischer T., Pierik A. J. und Widdel F.** (2001) Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: Evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. J. Bacteriol. **183**: 1707-1715.

**Ragsdale S. W.** (1999) The acetogenic corrinoid proteins. In: Banerjee R. (Hrsg) Chemistry and biochemistry of $B_{12}$. John Wiley & Sons, New York. S. 633-653.

**Raynaud C., Sarçabal P., Meynial-Salles I., Croux C. und Soucaille P.** (2003) Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**: 5010-5015.

**Rebeil R. und Nicholson W. L.** (2001) The subunit structure and catalytic mechanism of the *Bacillus subtilis* DNA repair enzyme spore photoproduct lyase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 9038-9043.

**Rebeil R., Sun Y., Chooback L., Pedraza-Reyes M., Kinsland C., Begley T. P. und Nicholson W. L.** (1998) Spore photoproduct lyase from *Bacillus subtilis* spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases. J. Bacteriol. **180**: 4879-4885.

**Reichard P. und Ehrenberg A.** (1983) Ribonucleotide reductase - A radical enzyme. Science **221**: 514-519.

**Rétey J.** (1990) Reaktionsselektivität von Enzymen durch negative Katalyse oder wie gehen Enzyme mit hochreaktiven Intermediaten um? Angew. Chem. **102**: 373-379.

**Rétey J., Umani-Rouchi A., Seibl J. und Arigoni D.** (1966) Zum Mechanismus der Propandioldehydrase-Reaktion. Experientia **22**: 502-503.

**Saint-Amans S., Girbal L., Andrade J., Ahrens K. und Soucaille P.** (2001) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. J. Bacteriol. **183**: 1748-1754.

**Sauer K. und Thauer R. K.** (1999) The role of corrinoids in methanogenesis. In: Banerjee R. (Hrsg) Chemistry and biochemistry of $B_{12}$. John Wiley & Sons, New York. S. 655-679.

**Sauvageot N., Pichereau V., Louarme L., Hartke A., Auffray Y. und Laplace J.-M.** (2002) Purification, characterization and subunits identification of the diol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*. Eur. J. Biochem. **269**: 5731-5737.

**Sawers G.** (1999) Biochemistry, physiology and molecular biology of glycyl radical enzymes. FEMS Microbiol. Rev. **22**: 543-551.

**Sawers G. und Watson G.** (1998) A glycyl radical solution: Oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase. Mol. Microbiol. **29**: 945-954.

**Schink B. und Stieb M.** (1983) Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, non-sporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. **45**: 1905-1913.

**Schmidt S., Wittich R.-M., Fortnagel P., Erdmann D. und Francke W.** (1992) Metabolism of 3-methyldiphenyl ether by *Sphingomonas* sp. SS31. FEMS Microbiol. Lett. **96**: 253-258.

**Schmidt T., Schirmer M., Weiss H. und Haderlein S. B.** (2004) Microbial degradation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-butyl alcohol in the subsurface. J. Contam. Hydrol. **70**: 173-203.

**Schneider Z., Larsen E. G., Jacobson G., Johnson B. C. und Pawelkiewicz J.** (1970) Purification and properties of glycerol dehydrase. J. Biol. Chem. **245**: 3388-3396.

**Schramm E. und Schink B.** (1991) Ether-cleaving enzyme and diol dehydratase involved in anaerobic polyethylene glycol degradation by a new *Acetobacterium* sp. Biodegradation **2**: 71-79.

**Selmer T. und Andrei P. I.** (2001) *p*-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of *p*-cresol. Eur. J. Biochem. **268**: 1363-1372.

**Semialjac M. und Schwarz H.** (2002) Computational exploration of rearrangements related to the vitamin $B_{12}$-dependent ethanolamine ammonia lyase catalyzed transformation. J. Am. Chem. Soc. **124**: 8974-8983.

**Shibata N., Masuda J., Tobimatsu T., Toraya T., Suto K., Morimoto Y. und Yasuoka N.** (1999) A new mode of $B_{12}$ binding and the direct participation of a potassium ion in enzyme catalysis: X-ray structure of diol dehydratase. Structure **7**: 997-1008.

**Shibata N., Nakanishi Y., Fukuoka M., Yamanishi M. und Yasuoka N.** (2003) Structural rationalization for the lack of stereospecificity in coenzyme $B_{12}$-dependent diol dehydratase. J. Biol. Chem. **278**: 22717-22725.

**Silverman R. B.** (2000) The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions. Academic Press, San Diego [u. a.].

**Sinnott M.** (Hrsg) (1998) Radical reactions and oxidation/reduction. In: Comprehensive Biological Catalysis, Band **3**. Academic Press, San Diego [u. a.].

**Smiley K. L. und Sobolov M.** (1962) A cobamide-requiring glycerol dehydrase from an acrolein-forming *Lactobacillus*. Arch. Biochem. Biophys. **97**: 538-543.

**Smith D. M., Golding B. T. und Radom L.** (2001) Understanding the mechanism of $B_{12}$-dependent diol dehydratase: A synergistic retro-push-pull proposal. J. Am. Chem. Soc. **123**: 1664-1675.

**So C. M., Phelps C. D. und Young L. Y.** (2003) Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 3892-3900.

**Sofia H. J., Chen G., Hetzler B. G., Reyes-Spindola J. F. und Miller N. E.** (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: Functional characterization using new analysis and information visualization methods. Nucleic Acids Research **29**: 1097-1106.

**Speranza G., Mueller B., Orlandi M., Morelli C. F., Manitto P. und Schink B.** (2002) Mechanism of anaerobic ether cleavage. Conversion of 2-phenoxyethanol to phenol and acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. J. Biol. Chem. **277**: 11684-11690.

**Speranza G., Mueller B., Orlandi M., Morelli C. F., Manitto P. und Schink B.** (2003) Stereochemistry of the conversion of 2-phenoxyethanol into phenol and acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. Helv. Chim. Acta **86**: 2629-2636.

**Strass A. und Schink B.** (1986) Fermentation of polyethylene glycol via acetaldehyde in *Pelobacter venetianus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **25**: 37-42.

**Stroinski A., Pawelkiewicz J. und Johnson B. C.** (1974) Allosteric interactions in glycerol dehydratase. Purification of enzyme and effects of positive and negative cooperativity for glycerol. Arch. Biochem. Biophys. **162**: 321-330.

**Stubbe J.** (1988) Radicals in biological catalysis. Biochemistry **27**: 3893-3900.

**Stubbe J. und van der Donk W. A.** (1998) Protein radicals in enzyme catalysis. Chem. Rev. **98**: 705-762.

**Stupperich E. und Konle R.** (1993) Corrinoid-dependent methyl transfer reactions are involved in methanol and 3, 4-dimethoxybenzoate metabolism by *Sporomusa ovata*. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 3110-3116.

**Sun X., Ollagnier S., Schmidt P. P., Atta M., Mulliez E., Lepape L., Eliasson R., Gräslund A., Fontecave M., Reichard P. und Sjöberg B.-M.** (1996) The free radical of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* is at glycine 681. J. Biol. Chem. **271**: 6827-6831.

**Swartz H. M. und Swartz S. M.** (1983) Biochemical and Biophysical Applications of Electron Spin Resonance. Methods of Biochemical Analysis **29**: 207-323.

**Tamarit J., Mulliez E., Meier C., Trautwein A. und Fontecave M.** (1999) The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The small protein is an activating enzyme containing a $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ center. J. Biol. Chem. **274**: 31291-31296.

**Toraya T.** (2003) Radical catalysis in coenzyme $B_{12}$-dependent isomerization (eliminating) reactions. Chem. Rev. **103**: 2095-2127.

**Toraya T.** (1999) Diol dehydratase and glycerol dehydratase. In: Banerjee R. (Hrsg) Chemistry and biochemistry of $B_{12}$. John Wiley & Sons, New York. S. 783-809.

**Toraya T., Shirakashi T., Kosuga T. und Fukui S.** (1976) Substrate specificity of coenzyme $B_{12}$-dependent diol dehydrase: Glycerol as both a good substrate and a potent inactivator. Biochem. Biophys. Res. Commun. **69**: 475-480.

**Toraya T., Sugimoto Y., Tamao Y., Shimizu S. und Fukui S.** (1971) Propanediol dehydratase system. Role of monovalent cations in binding of vitamin $B_{12}$ coenzyme of its analogs to apoenzyme. Biochemistry **10**: 3475-3484.

**Toraya T., Yamanishi M., Muguruma H., Ushio K., Yamauchi J. und Kawamura T.** (1997) An electron paramagnetic resonance study on the mechanism-based inactivation of adenosylcobalamin-dependent diol dehydrase by glycerol and other substrates. Biochim. Biophys. Acta **1337**: 11-16.

**Unkrig V., Neugebauer F. A. und Knappe J.** (1989) The free radical of pyruvate formate-lyase. Characterisation by EPR spectroscopy and involvement in catalysis as studied with the substrate-analogue hypophosphite. Eur. J. Biochem. **184**: 723-728.

**Valentine D. L.** (2002) Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: A review. Antonie Van Leeuwenhoek **81**: 271-282.

**Verfürth K., Pierik A. J., Leutwein C., Zorn S. und Heider J.** (2004) Substrate specificities and electron paramagnetic resonance properties of benzylsuccinate synthases in anaerobic toluene and *m*-xylene metabolism. Arch. Microbiol. **181**: 155-162.

**Voet D. und Voet J. G.** (1994) Biochemie. 1. korr. Nachdruck der 1. Auflage von 1992. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.

**Wagener S. und Schink B.** (1988) Fermentative degradation of nonionic surfactants and polyethylene glycol by enrichment cultures and by pure cultures of homoacetogenic and propionate-forming bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 561-565.

**Wagner A. F. V., Frey M., Neugebauer F. A., Schäfer W. und Knappe J.** (1992) The free radical in pyruvate formate lyase is located on glycine-734. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 996-1000.

**Westheide E. und Türck R.** (1977) Umwelt-Chemikalien müssen überwacht werden. Umschau in Wissenschaft und Technik **77**: 718-721.

**Wetmore S. D., Smith D. M., Bennett J. T. und Radom L.** (2002) Understanding the mechanism of action of $B_{12}$-dependent ethanolamine ammonia-lyase: Synergistic interactions at play. J. Am. Chem. Soc. **124**: 14054-14065.

**White G. F., Russell N. J. und Tidswell E. C.** (1996) Bacterial scission of ether bonds. Microbiol. Rev. **60**: 216-232.

**Widdel F.** (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neuisolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen.

**Widdel F., Kohring G. W. und Mayer F.** (1983) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. Arch. Microbiol. **134**: 286-294.

**Widdel F. und Pfennig N.** (1981) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. Arch. Microbiol. **129**: 395-400.

**Wong K. K. und Kozarich J. W.** (1994) *S*-Adenosylmethionine-dependent radical formation in anaerobic systems. In: Sigel H. und Sigel A. (Hrsg) Metalloenzymes involving amino acid-residue and related radicals. Metal Ions in Biological Systems, Band **30**. Marcel Dekker, New York. S. 279-313.

**Wu W., Booker S., Lieder K. W., Bandarian V., Reed G. H. und Frey P. A.** (2000) Lysine 2,3-aminomutase and *trans*-4,5-dehydrolysine: Characterization of an allylic analogue of a substrate-based radical in the catalytic mechanism. Biochemistry **39**: 9561-9570.

**Yamanishi M., Yunoki M., Tobimatsu T., Sato H., Matsui J., Dokiya A., Iuchi Y., Oe K., Suto K., Shibata N., Morimoto Y., Yasuoka N. und Toraya T.** (2002) The crystal structure of coenzyme $B_{12}$-dependent glycerol dehydratase in complex with cobalalmin and propane-1,2-diol. Eur. J. Biochem. **269**: 4484-4494.

**Zagalak B., Frey P. A., Karabatsos G. L. und Abeles R. H.** (1966) The stereochemistry of the conversion of *D* and *L* 1,2-propanediols to propionaldehyde. J. Biol. Chem. **241**: 3028-3035.

**Zehnder A. J. B. und Wuhrmann K.** (1976) Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. Science **194**: 1165-1166.

**Zeikus J. G., Wellstein A. L. und Kirk T. K.** (1982) Molecular basis for the biodegradative recalcitrance of lignin in anaerobic environments. FEMS Microbiol. Lett. **15**: 193-197.

**Zhang X. und Young L. Y.** (1997) Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4759-4764.

Die vorliegende Dissertation wurde an der Universität Konstanz, Fachbereich Biologie, am Lehrstuhl Mikrobielle Ökologie von Prof. Dr. B. Schink angefertigt.

Ergebnisse wurden bereits publiziert in

**Speranza G., Mueller B., Orlandi M., Morelli C. F., Manitto P. und Schink B.** (2002) Mechanism of anaerobic ether cleavage. Conversion of 2-phenoxyethanol to phenol and acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. J. Biol. Chem. **277**: 11684-11690.

**Speranza G., Mueller B., Orlandi M., Morelli C. F., Manitto P. und Schink B.** (2003) Stereochemistry of the conversion of 2-phenoxyethanol into phenol and acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. Helv. Chim. Acta **86**: 2629-2636.

Viele Menschen haben auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders herzlich danken möchte ich...

...Herrn Prof. Dr. B. Schink für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen.

...Herrn Prof. Dr. P. Kroneck für die Übernahme des Zweitgutachtens.

...Frau Dr. Giovanna Speranza (Universität Mailand) für die gelungene Kooperation durch Synthese von isotopenmarkierten Phenoxyethanolen, NMR-Messungen und deren Auswertungen.

...Herrn Dr. Mukul Lal (Universität Siegen) für die Synthese von Phenoxyethanol-Derivaten und seiner Mithilfe bei deren Verwendung in ersten Messreihen.

...Oliver Retz und Elmar Mross (jeweils LS Schmidt, Fachbereich Chemie) für Beratung in chemischen Fragen und die Benutzung ihres Rotationsverdampfers.

...Henning Beckmann für seine engagierte und wertvolle Mitarbeit als Praktikant und HiWi.

...allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, vor allem meinen langjährigen Laborkollegen Bodo Philipp, Jochen Müller, Kristina Straub und Alexander Galushko sowie Karin Denger (AG Cook) für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die Zusammenarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre, außerdem für verschiedene Aktivitäten außerhalb der Arbeit.

...allen, die mich während der Zeit des Zusammenschreibens ertragen haben.

...meinen Eltern, die mich in all den Jahren mit viel Geduld und Verständnis unterstützt haben.