



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

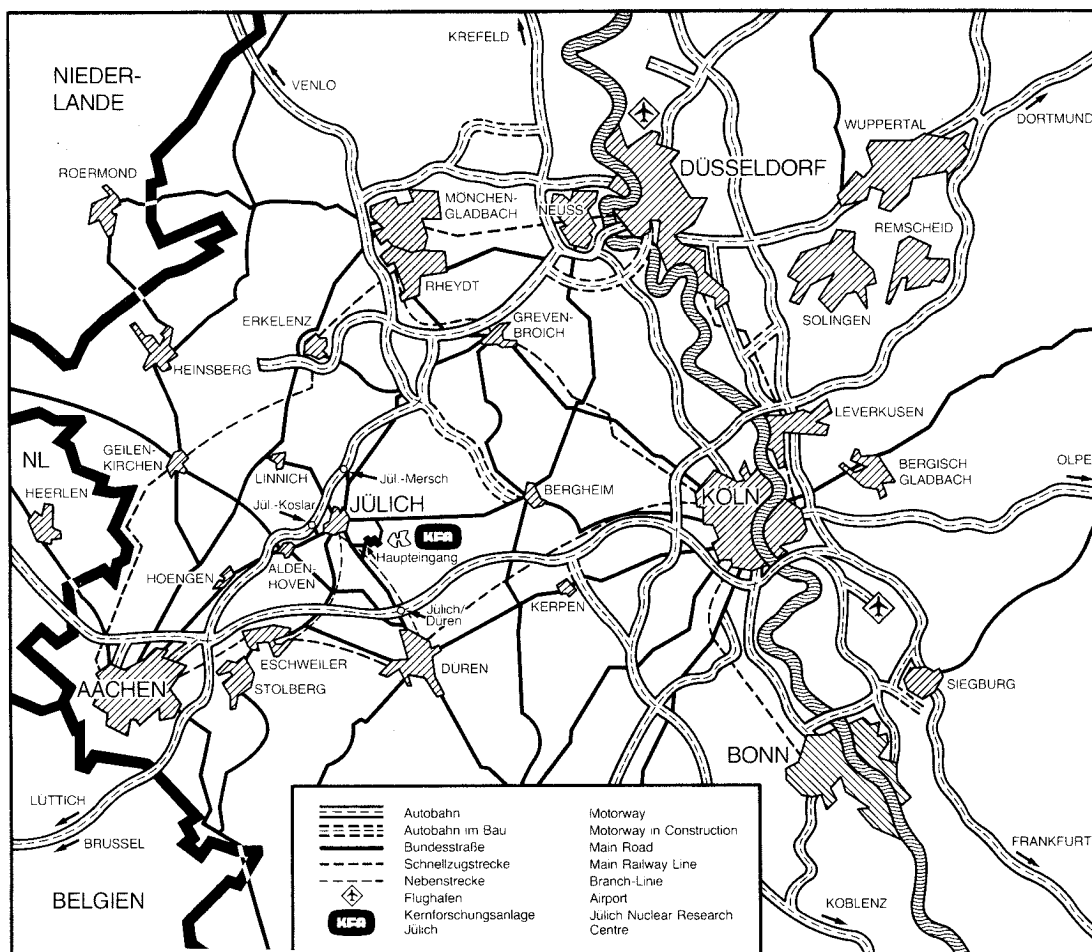
Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zur L-Isoleucinbildung
aus D,L-2-Hydroxybutyrat mit
*Corynebacterium glutamicum***

von

Elisabeth Scheer

Jül-2255
Dezember 1988
ISSN 0366-0885



Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2255
Institut für Biotechnologie Jüli-2255

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

**Untersuchungen zur L-Isoleucinbildung
aus D,L-2-Hydroxybutyrat mit
*Corynebacterium glutamicum***

von

Elisabeth Scheer

D 10 (Diss. Uni. Düsseldorf)

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I	Einleitung.....	1
II	Material und Methoden.....	7
1.	Organismen.....	7
2.	Chemikalien.....	7
3.	Nährmedien und Kulturbedingungen.....	10
4.	Bestimmungen im Kulturfiltrat.....	14
4.1	Bestimmung von Aminosäuren.....	14
4.2	Bestimmung von D,L-2-Hydroxybutyrat.....	16
4.3	Gaschromatographische Bestimmung von Propionaldehyd und Methylbutyraldehyd.....	20
4.4	Bestimmung von 2-Ketobutyrat und 2-Keto- β -methyl- valerat.....	19
4.5	Bestimmung von Glucose.....	20
5.	Herstellung von Rohextrakten.....	21
6.	Bestimmung von Enzymaktivitäten	22
6.1	Bestimmung der Acetohydroxysäuresynthase.....	22
6.2	Bestimmung der NAD-unabhängigen D- und L-Lactat- dehydrogenase.....	23
7.	Gelelektrophoretische Auftrennung des Rohextraktes mit anschließender Aktivitätsfärbung.....	24
8.	Solubilisierung der Lactatdehydrogenasen.....	27
8.1	Herstellung osmotisch sensibler Zellen.....	28
8.2	Solubilisierung der Zellmembranen.....	28
8.3	Proteinbestimmung detergenzhaltiger Proben.....	29

9.	Methoden zur Proteinreinigung.....	30
9.1	Anionenaustauscher.....	30
9.2	Trennung an Hydroxylapatit.....	31
9.3	Gelfiltration.....	32
10.	Anfertigung von SDS-Gelen.....	37
11.	Flavin-Bestimmung.....	38
12.	Schnelle Membranfiltration zur Bestimmung der Aufnahmekinetiken von D- und L-Lactat.....	39
III	Ergebnisse.....	42
1.	Isolierung von Mutanten mit verbesserter Hydroxy- butyrat-Verwertung und deren Charakterisierung.....	42
1.1	Selektion der Mutanten.....	42
1.2	Isoleucinbildung der isolierten Stämme.....	45
1.3	Aktivität der D- und L-Lactatdehydrogenase.....	49
1.4	Einfluß von Leucin und Hydroxybutyrat auf die Aktivität der Acetohydroxysäuresynthase.....	51
2.	Untersuchungen zur Isoleucinbildung.....	53
2.1	Isoleucinbildung bei verschiedenen Hydroxybutyrat- konzentrationen.....	53
2.2	Einfluß der Hydroxybutyrat-Qualität auf die Isoleucinbildung.....	55
2.3	Nachdosierung von Leucin, Glucose und Hydroxybutyrat.....	56
2.4	Nebenprodukte bei der Isoleucinbildung.....	58
3.	Untersuchungen zum Transport von D- und L-Lactat sowie Hydroxybutyrat.....	62
3.1	Aufnahmekinetik.....	62
3.2	Vergleich der Aufnahmeaktivitäten zwischen dem Stamm 14310 und der Mutante DL4.....	64
3.3	Kompetition der Lactat-Aufnahme durch Hydroxybutyrat.....	65

4.	Untersuchungen der NAD-unabhängigen D- und L-Lactat dehydrogenase.....	69
4.1	Einfluß der Kulturbedingungen auf die Bildung der Lactatdehydrogenasen.....	70
4.2	Untersuchungen zur Lokalisation der Enzyme.....	73
4.3	Solubilisierung und Stabilität in Detergenzien.....	74
4.4	Isolierung und Charakterisierung der D-Lactat-dehydrogenase.....	80
4.5	Kinetische Untersuchungen zur L- und D-Lactat-dehydrogenase.....	90
IV	Diskussion.....	96
V	Zusammenfassung.....	109
VI	Literatur.....	111

Abkürzungen

AB	2-Aminobutyrat
AHAS	Acetohydroxysäuresynthase
C.	Corynebacterium
E.	Escherichia
E	Extinktion
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
FAD	Flavinadenindinucleotid (oxidiert)
FMN	Flavinadeninmononucleotid (oxidiert)
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HB	D,L-2-Hydroxybutyrat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
KB	2-Ketobutyrat
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LDAO	N,N-dimethyldodecylamine-N-oxid
LDH	Lactatdehydrogenase
leu ⁻	Leucin-auxotroph
KPP	Kalium-Phosphat-Puffer
MG	Molekulargewicht
min	Minute
NAD	β -Nicotinamid-adenindinucleotid (oxidiert)
n.b.	nicht bestimmt
NMG	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PES	Phenazinethosulfat
rpm	Umdrehungen pro Minute
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

I. EINLEITUNG

In der Natur sind im wesentlichen 20 verschiedene Aminosäuren am Aufbau der Proteine beteiligt und aufgrund der fast unbegrenzten Kombinationsmöglichkeiten dieser Aminosäuren schaffen sie die Voraussetzung für die große Vielfalt der Proteine. Dabei kommen nur α -Aminosäuren vor, welche mit Ausnahme von Glycin mindestens ein asymmetrisches Kohlenstoffatom besitzen und daher in zwei Stereoisomeren, den L- und D-Aminosäuren vorkommen können. Beim Isoleucin, Threonin und Hydroxyprolin sind es zwei Asymmetriezentren, so daß zwei weitere Stereoisomere existieren. Diese beiden, auch als Diastereoisomere bezeichnet, werden als L-allo bzw. D-allo Formen gekennzeichnet. Die Natur nutzt fast ausschließlich L-Aminosäuren. So enthalten Proteine nur L-Aminosäuren, jedoch sind am Aufbau der bakteriellen Mureinschicht auch die D-Aminosäuren D-Alanin und D-Glutamat beteiligt. Von den 20 biogenen Aminosäuren sind acht für höhere Lebewesen essentiell, sie müssen daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Dies weist auf die Bedeutung von Aminosäuren als wichtigen Bestandteil von Infusionslösungen hin (Hirose und Shibai, 1980; Hoppe und Martens, 1983). Die Produktion von Aminosäuren für pharmazeutische Zwecke ist zwar ein bedeutender Bereich der industriellen Aminosäureproduktion (Leuchtenberger, 1984), aber mehr als 90% der produzierten Aminosäuren werden in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie verwendet. Weltweit betrug die Produktion 1982 ca. 450.000 Tonnen (Hoppe und Martens, 1984). In der Nahrungsmittelindustrie ist es vor allem Na-Glutamat, welches als Geschmacksverstärker eingesetzt wird, während D,L-Methionin und Lysin als Futtermitteladditiv zur Erhöhung des Nährwertes vieler Getreidesorten dienen (Hoppe und Martens, 1983).

Isoleucin ist eine der essentiellen Aminosäuren. Es ist nur in geringem Umfang aus Proteinen isolierbar, da die Abtrennung von ebenfalls vorhandenem Leucin im technischen Maßstab schwierig ist. Zudem kann dabei eine teilweise Racemisierung stattfinden, so daß sich die mikrobielle Produktion anbietet, bei der ausschließlich L-Isoleucin entsteht (Kleemann et al., 1985).

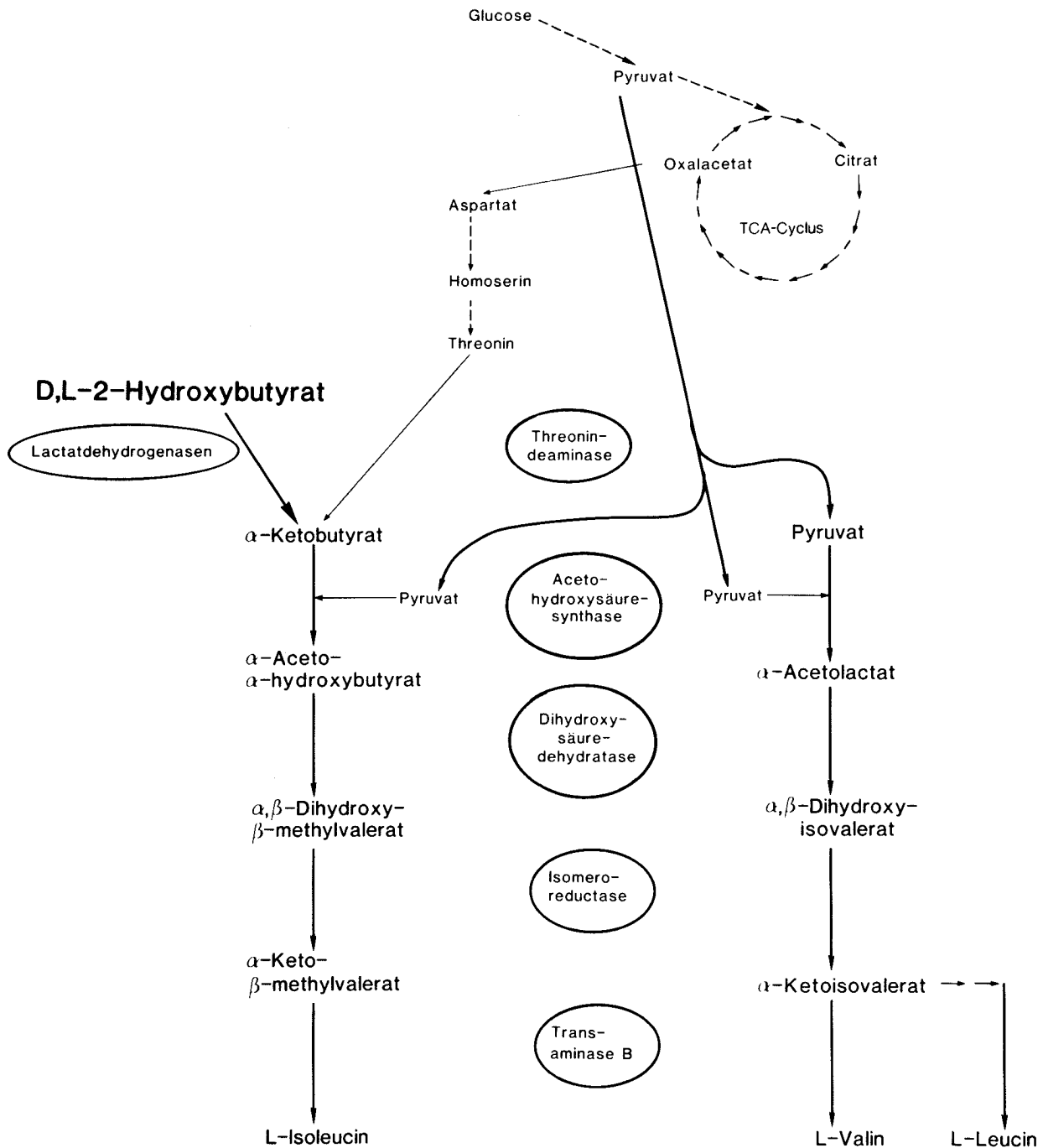


Abb. 1: Biosyntheseweg der verzweigtkettigen Aminosäuren

Isoleucin gehört zusammen mit den Aminosäuren Aspartat, Methionin, Threonin und Lysin zur Aspartat-Familie. Ein gemeinsamer Biosyntheseweg führt zum Aspartat und im Falle von Isoleucin über Homoserin zu Threonin, welches durch die Threonindeaminase zu 2-Ketobutyrat desaminiert wird (Abb.1). Dieses Enzym ist das einzig spezifische der Isoleucinbiosynthese und es unterliegt in allen bislang untersuchten Organismen der Endprodukthemmung durch Isoleucin (Grimminger und Umbarger, 1979; O'Neill und Freundlich, 1972; Horvath und Szentirmai, 1964).

Die nachfolgenden vier Biosyntheseschritte verlaufen parallel zu denen der Valinbiosynthese (Abb.1) und werden durch dieselben Enzyme katalysiert (Umbarger, 1983). Die Acetohydroxysäuresynthase (AHAS) ist das erste dieser gemeinsamen Enzyme und katalysiert die Übertragung eines aktivierten Acetaldehyds auf 2-Ketobutyrat -im Falle von Isoleucin-, während er in der Valinbiosynthese auf Pyruvat übertragen wird.

Die AHAS unterliegt der Regulation durch die verzweigtkettigen Aminosäuren. In *E. coli* K-12 und *Salmonella thyphimurium* liegen zwei Isoenzyme der AHAS vor, wovon eines durch Valin und Leucin, das andere nur durch Leucin reprimiert wird (Umbarger, 1983). In *C. glutamicum* sind keine Isoenzyme vorhanden (Cordes, 1986) und die AHAS unterliegt ebenfalls einer Repression durch Valin und Leucin (Eggeling, 1986). Das letzte Enzym in der Biosynthese ist die Transaminase B, welche die Ketosäuren zu den entsprechenden Aminosäuren aminiert. Dies gilt auch für Leucin, dessen Biosynthese von der Valin-Zwischenstufe Ketoisovalerat abzweigt, aber ebenfalls von der Transaminase B aminiert wird.

Um einen aminosäure-ausscheidenden Stamm zu erhalten, müssen die Regulationsmechanismen, welche sinnvollerweise eine Überproduktion verhindern, ausgeschaltet werden. Für die Bildung von Isoleucin bedeutet dies, daß sowohl die Threoninbildung dereguliert sein muß, als auch die nachfolgenden Isoleucin-spezifischen Schritte. Solche Stämme sind zum einen Analoga-resistente Mutanten (Hirose und Okada, 1979). Im Gegensatz zum Wildtyp können diese Mutanten in Gegenwart eines nicht metabolisierbaren Analogs einer oder mehrerer Aminosäuren, welche die Schlüsselenzyme der Biosynthese hemmen, wachsen. Von solchen Resistenzmutanten ist bekannt, daß die Regulation allosterischer Enzyme verändert

sowie oftmals die Enzymmenge erhöht sein kann, wodurch es zu einer Überproduktion der korrespondierenden Aminosäure kommt (Adelberg, 1958).

Für die Isoleucinproduktion werden Stämme isoliert, welche gegen spezifische Analoga von Isoleucin, Leucin und Valin (z.B. Isoleucinhydroxamat, 4-Azaleucin, Aminohydroxyvaleriansäure) resistent sind (Yoshinaga und Nakamori, 1983). Hierbei kann es sich um Einfach- oder Mehrfachresistenzen handeln. So erhöhte sich die Isoleucinbildung des Stammes *Brevibacterium flavum* No 168, welcher zunächst nur gegen Aminohydroxyvaleriansäure (8 mg/ml) resistent war, von 1.4 g/l auf 9.9 g/l nach Einführung einer weiteren Resistenz gegen Ethionin (20 mg/l). Die Steigerung der Isoleucinausscheidung beruhte auf einer erhöhten spezifischen Aktivität der Threonindeaminase (Ikeda et al., 1976).

Eine andere Gruppe von Mutanten bilden die auxotrophen Stämme (Abe, 1972). Unterliegt die Biosynthese der Aminosäuren einer Endprodukthemmung durch eine oder mehrere Aminosäuren, so kann diese Hemmung weitgehend aufgehoben werden durch die Selektion von Mutanten, welche für die regulierende Aminosäure auxotroph sind. So bildete der Stamm 14309 nach Einführung einer Leucin-Auxotrophie 7.6 g/l Isoleucin aus 1.5 % zugesetztem 2-Aminobutyrat (Kinoshita, 1966).

Im Rahmen der Stammentwicklung hat es sich als günstig erwiesen, Mutanten zu selektionieren, welche sowohl Aminosäure-auxotroph, als auch Analoga-resistent sind (Soda et al., 1983). Bei dem Methionin-auxotrophen Stamm *C. glutamicum* KY 10501 führte die zusätzliche Resistenz gegen Thiaisoleucine zu einer Erhöhung der Isoleucinbildung von 1.9 g/l auf 6 g/l (Kase und Nakayama, 1976).

Auf dem Weg zu Hochleistungsstämmen gewinnt neben diesen klassischen Mutagenesen die rekombinante DNA-Technologie zunehmend an Bedeutung (Yoshihama et al., 1985; Santamaria et al., 1984). Ziel hierbei ist es, durch Genamplifikation geschwindigkeitsbestimmende Engpässe in der Biosynthese aufzuheben. So konnte durch Transformation der Resistenz gegen Aminohydroxyvaleriansäure aus *C. glutamicum* No 11, welcher 0,6 g/l Isoleucin bildete, in einen Nicht-Produzenten, erreicht werden, daß dieser nun 1,2 g/l Isoleucin ausschied (Tsuchida et al., 1984).

Die mikrobielle Isoleucinproduktion kann zum einen durch direkte Fermentation aus Glucose oder anderen verwertbaren Kohlenstoffquellen, zum anderen durch den Zusatz von Vorstufen erfolgen (Tab.1). Als geeignete Vorstufen erwiesen sich D-Threonin, 2-Ketobutytrat, 2-Brombutyrat, 2-Aminobutytrat und D,L-2-Hydroxybutyrat.

Tab.1: Isoleucinproduktion mit verschiedenen Mikroorganismen

Stamm	Vorstufe/ C-Quelle	Isoleucin (g/l)	Literatur
<i>Serratia marcescens</i>	-- / 10% Glucose	11,6	Kisumi et al. (1977)
<i>Serratia marcescens</i>	-- / 15% Sucrose	25	Komatsubara et al. (1980)
<i>Brevibact. flavum</i>	--/ 10% Glucose	14,5	Shio et al. (1973)
<i>Serratia marcescens</i>	2% D-Threonin/ 10% Dextrin	14,8	Kisumi et al. (1970)
<i>Coryneb. glutamicum</i>	1,8% Ketobutytrat/ 4% Glucose	13	Eggeling, (1986)
<i>Coryneb. glutamicum</i>	1,5% Aminobutytrat/ 10% Glucose	14,5	Kinoshita, (1966)
<i>Bifidobact. ruminale</i>	3% Aminobutytrat/ 5% Glucose	9	Crociani et al. (1977)
<i>Brevibact. roseum</i>	3,2% Brombutyrat/ 10% Glucose	12,3	Matsushima & Mase, (1973)
<i>Brevibact. thiogenitalis</i>	3% Hydroxybutyrat/ 10% Glucose	15,8	Updike und Calton, (1982)
<i>Brevibact. ammoniagenes</i>	2% Hydroxybutyrat/ 10% Glucose	7,5	Matsushima & Mase (1973)
<i>Micrococcus varians</i>	2% Hydroxybutyrat/ 10% Glucose	16,3	Sankyo Co. (1967)

Diese Verfahren aus Vorstufen bieten den Vorteil, daß Regulationsmechanismen, welche die Bereitstellung großer Mengen 2-Ketobutyrat verhindern, keine Bedeutung mehr zukommt, denn diese Vorstufen münden nach Threonin in den Biosytheseweg ein. Voraussetzung für ein solches Produktionsverfahren aus Vorstufen ist es jedoch, daß diese von den Organismen gut aufgenommen werden, und, falls es keine natürlichen Intermediärprodukte der Biosynthese sind, zu diesen umgesetzt werden können. So besitzt *Serratia marcescens* eine D- Threonindeaminase, welche nicht der Regulation durch Isoleucin unterliegt und die Vorstufe D-Threonin zu 2-Ketobutyrat umsetzt (Kisumi et al., 1973).

Neben Stämmen der Gattung *Serratia marcescens* werden Brevi- und Corynebakterien für die Produktion von Isoleucin eingesetzt (Tab.1). *C. glutamicum* wurde 1957 von Kinoshita isoliert (Kinoshita et al., 1957). Dieser Stamm zeichnete sich dadurch aus, daß er unter Biotin-Mangel große Mengen Glutamat ins Medium ausschied. Nachfolgende Untersuchungen ergaben, daß coryneforme Bakterien aufgrund der einfachen Enzymregulation sowie ineffizienter Rückhalte-mechanismen besonders gut für die Aminosäureproduktion geeignet sind (Hirose und Okada, 1979; Kinoshita, 1985).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Umwandlung von D,L-2-Hydroxybutyrat zu Isoleucin untersucht werden. Ziel war es zunächst, ausgehend von dem Stamm *C. glutamicum* 14310, der für die Isoleucinbildung aus dieser Vorstufe geeignet war (Scheer, 1985), Mutanten zu selektionieren, welche die Vorstufe vollständig aufnehmen. Bislang konnte dieser Stamm nur das L-Isomer sehr gut verwerten, jedoch das D-Isomer nur wenig. Weiterhin sollte untersucht werden, über welches Transportsystem die Vorstufe aufgenommen werden kann. Da D,L-2-Hydroxybutyrat kein natürliches Intermediärprodukt der Isoleucinbiosynthese ist, sollte zudem die enzymatische Reaktion der Bereitstellung von 2-Ketobutyrat näher untersucht werden. Hierbei ging es zum einen um einen um den Nachweis der daran beteiligten Enzyme, zum anderen um deren Charakterisierung, insbesondere ihrer kinetischen Eigenschaften.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchungen zur Isoleucinbildung wurden mit verschiedenen Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt. Die Eigenschaften dieser Stämme sind in Tab.2 aufgeführt.

Tab.2: Verwendete Stämme und deren Eigenschaften

Stamm	Eigenschaften
<i>C. glut.</i> ATCC 13032	Wildtyp
<i>C. glut.</i> ATCC 13032-102	besserer D-Lactat-Verwerter
<i>C. glut.</i> ATCC 13032-103	besserer D-Lactat-Verwerter
<i>C. glut.</i> ATCC 14310	leu-
<i>C. glut.</i> ATCC 14310-DL3	leu-, besserer D-Lactat-Verwerter
<i>C. glut.</i> ATCC 14310-DL4	leu-, besserer D-Lactat-Verwerter

2. Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt verwendet.

Amersham Buchler, Braunschweig

¹⁴C L-Lactat

¹⁴C D-Lactat

Beckmann, Düsseldorf

Glucose-Reagenz

Glucose-Standard

Benson Co. Reno, USA

Aminosäure-Standard Typ H

Boehringer GmbH, Mannheim β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert), Dinatriumsalz

D-Lactat

Flavin-Adenin-Dinucleotid, Mono-Natriumsalz

Calbiochem, Frankfurt

Genapol

Degussa AG, Hanau

D,L-2-Hydroxybutyrat

D(-)-2-Keto- β -methylvaleriansäure

2-Ketobutyrat, Natriumsalz

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bacto-Agar

Bacto-Pepton

Casaminoacids

Yeast-Extrakt

Fluka AG Buchs, Schweiz

D,L-2-Hydroxybutyrat

N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid

Jansen Chimica, Belgium

2-Methylbutyraldehyd

Packard Instrument, USA

Universal-Szintillatorflüssigkeit

Pharmacia, Freiburg

DEAE-Sepharose CL 6B

Eichproteine

PhastGel Media

Phenylsepharose

Polybuffer

Polybuffer exchanger

Pierce Ltd, Cambridge

O-Phtalaldehyd

Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

Acrylamid

Bernsteinsäure, Natriumsalz

Bisacrylamid

Dichlorphenolindophenol

L-Lactat, Natriumsalz

Triton X-100

Triton X-114

Sigma Chemie, München

2-Aminobutyrat

CHAPS

Lysozym L 6876

n-Octyl β -D-Glucopyranosid

Phenazinethosulfat

O-Phenylendiamin

3. Nährmedien und Kulturbedingungen

Für die Kultivierung der Organismen wurden folgende Medien verwendet:

Medium I: Medium für die Stammhaltung (Claus et al., 1983)

Pepton	10	g/l
Fleischextrakt	10	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
NaCl	3	g/l

Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf 7.2 eingestellt. Zum Verfestigen wurde dem Medium 2% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.

Medium II. Anzuchtmedium (Kase und Nakayama, 1972)

Pepton	10	g/l
Yeast-Extrakt	10	g/l
NaCl	2,5	g/l
Glucose	20	g/l

Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf 7,2 eingestellt; die Glucose wurde getrennt autoklaviert.

Medium III: Minimalmedium

(modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	g/l
KH_2PO_4	10	g/l
Harnstoff	5	g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	g/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
CaCl_2	0,01	g/l
Biotin	0,1	mg/l
Glucose	20	g/l

Zur Verfestigung wurde dem Medium 2% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt und ein pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Kohlenstoffquelle wurde getrennt autoklaviert. Bei den auxotrophen Stämmen, wurde Leucin in einer Konzentration 200 mg/l zugesetzt.

Medium IV: Anzuchtmedium zur Bestimmung von Aufnahmekinetiken
(modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	g/l
Harnstoff	5	g/l
KH_2PO_4	2	g/l
K_2HPO_4	2	g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
CaCl_2	0,01	g/l
Leucin	0,2	g/l
Biotin	0,2	mg/l
Glucose	25	g/l

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und die Kohlenstoffquelle getrennt autoklaviert zugesetzt.

Medium V: Fermentationsmedium
(modifiziert nach Tosaka und Takinami, 1978)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20	g/l
KH_2PO_4	0,5	g/l
K_2HPO_4	0,5	g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	g/l
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,02	g/l
Biotin	0,4	mg/l
CaCO_3	20	g/l
Glucose	40	g/l

Bei den auxotrophen Stämmen wurde dem Medium zusätzlich 0,2 g/l Leucin zugesetzt. Glucose und Hydroxybutyrat wurden getrennt autoklaviert, das CaCO_3 trocken sterilisiert und anschließend dem Medium zugesetzt. Für ein gutes Anwachsen der Kulturen war es entscheidend, daß das Medium bereits 24 h Stunden vor Versuchsbeginn hergestellt wurde.

Medium MMYE: Grundmedium zur Herstellung osmotisch sensibler Zellen

(Santamaria et al., 1985)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	g/l
Harnstoff	3	g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2	mg/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	2	mg/l
NaCl	50	mg/l
Yeast-Extrakt	1	g/l
Casaminoacids	2	g/l

Die Komponenten wurden in 960 ml Aqua dest. gelöst und die Eisen- und Mangansalze als Stammlösungen zugegeben. Das Medium wurde zu je 96 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt und nach dem Autoklavieren wurden pro Kolben folgende sterile Lösungen zugesetzt:

2 ml Glucose	(50g/100 ml)
1 ml K_2HPO_4	(10g/100 ml)
1 ml Biotin/Thiamin	(5 mg Biotin u. 20 mg Thiamin/l)

Medium MMYE-Glycin: Anzuchtmedium

Zu 100 ml MMYE wurden 3,2 ml Natriumglycin (20g/100 ml, pH 7,2) nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Corynebakterien erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Die Füllmenge betrug 100 ml Nährmedium. Die Inkubation erfolgte auf einer Schüttelmaschine bei 130 rpm und 30°C.

Das Anzuchtmedium wurde von einer Vollmediumplatte angeimpft und 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Fermentationsmedium ca. 5% (v/v) mit der Vorkultur beimpft, so daß die optische Dichte 0,5-1,0 betrug.

Für die Anreicherungskultur auf D-Lactat wurden Kulturröhrchen angelegt, welche jeweils 4 ml Mineralsalzmedium (Medium III) mit 0.5% D-Lactat enthielten. Die Inkubation erfolgte bei 30°C in einem Laborschüttler der Fa. New Brunswick Scientific.

Zur Stammhaltung wurden die Stämme auf Vollmediumplatten bei 4°C aufbewahrt und alle 4-6 Wochen auf frische Platten überimpft. Zusätzlich wurden Glyzerinkulturen angelegt, bestehend aus 15% (v/v) sterilem Glyzerin und 85% (v/v) einer Vorkultur. Diese Dauerkulturen wurden bei -20°C aufbewahrt und sind über viele Monate haltbar.

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Bestimmung der optischen Dichte verfolgt. Dazu wurden steril 2 ml Probe entnommen und in einer Heraeus-Kühlzentrifuge (Minifuge RF) sedimentiert. Der klare Überstand diente zur Bestimmung von Aminosäuren und anderen Stoffwechselprodukten. Zur Entfernung von unlöslichem CaCO_3 wurde das Bakterienpellet in 2 ml 1 N HCl aufgenommen. Die optische Dichte der Zellsuspension wurde dann in einem LKB Spektralphotometer (Novospec) bei 600 nm gegen Aqua dest. als Referenz gemessen. Lag die Extinktion höher als 0,3 wurde entsprechend verdünnt.

Mutagenese und Isolierung Leucin-auxotropher Mutanten

Mutagenese:

Zu 4,5 ml einer 12 h in Medium II gewachsenen Zellkultur des Stammes 13032-102 (die Gesamtzellzahl betrug etwa 3×10^9 Zellen/ml) wurden 1,25 mg NMG in 0,5 ml Dimethylformamid gegeben (Endkonzentration 0,25 mg/ml). Nach 6 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert, 2x mit 4,5 ml 0,9% NaCl gewaschen und in 4,5 ml 0,9% NaCl aufgenommen. Unter den genannten Bedingungen erfolgte eine Abtötung um etwa 90%.

Isolierung Leucin-auxotropher Mutanten:

Verschiedene Verdünnungen der mutagenisierten Zellsuspension wurden auf Vollmediumplatten ausplattiert und 2 Tage inkubiert. Ausgehend von diesen Platten wurde auf Minimalmedium (Medium III) ohne und mit 0,2 g/l Leucin überstempelt und für weitere 2 Tage inkubiert. Die als Leucin-auxotroph identifizierten Mutanten wurden auf Vollmediumplatten überimpft und zusätzlich Glycerindauerkulturen angelegt.

4. Bestimmungen im Kulturfiltrat

4.1 Bestimmung von Aminosäuren

Aminosäureanalysator

Die Bestimmung verschiedener ins Kulturmedium ausgeschiedener Aminosäuren und von 2-Aminobutyrat erfolgte mit dem automatischen Aminosäureanalysator LC 2000 der Fa. Biotronik, Wissenschaftliche Geräte GmbH. Die Aminosäuren wurden an einem Kationenaustauscher getrennt und mittels Ninhydrin zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wurde.

Probenvorbereitung:

Das Kulturfiltrat wurde mit Probenverdünnungspuffer auf eine Konzentration von maximal 0,3 mM pro Aminosäure verdünnt.

Zusammensetzung des Probenverdünnungspuffers:

tri-Na-Citrat x 2H ₂ O	19,6	g
Phenol, fest	1,92	g
Thiodiäthanol	20	ml
Aqua dest.	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde mit 6 N HCL auf 2,2 eingestellt.

Trennbedingungen:

Trennsäule:	0,6 x 35 cm
Trennharz:	Durrun DC-6A
Probenvolumen:	100 µl
Probenkonzentration:	max. 30 nmol pro Aminosäure und 60 nmol NH ₃ /100 µl Probe
Puffer:	Na-Citrat/Na-Chlorid
Durchflußrate	32 ml/h
Meßbereich:	570 nm 0-1 EE 440 nm 0-1 EE
Betriebstemperatur:	48°C bzw. 58°C
Analysenzeit:	92 min für Aminosäure-Elution 143 min einschl. Regenerieren und Äquilibrieren
Retentionszeiten:	Aminobutyrat ca. 39,0 Minuten Valin ca. 43,5 Minuten Isoleucin ca. 54,0 Minuten Leucin ca. 56.5 Minuten

Die Konzentration der Aminosäuren wurde mit Hilfe eines Integrators (Shimadzu Data Processor Chromatopac C-R 18) berechnet. Zur Eichung wurde ein käuflicher Aminosäurestandard verwendet.

Nachweis mit HPLC

Zur quantitativen Aminosäurebestimmung ist auch die Reversed-Phase-Chromatographie, welche deutlich kürzere Analysenzeiten aufweist, geeignet. Die Bestimmung erfolgte mittels einer HPLC-Anlage vom Typ Hewlett Packard HP 1090 mit automatischer Vorsäulenderivatisierung. Die primären Aminogruppen reagierten dabei mit einem o-Phtalaldehyd/2-Mercaptoethanol-Gemisch zu stark fluoreszierenden thio-substituierten Isoindolen (Sternson, 1984). Diese Aminosäurederivate wurden dann mittels Hochdruck-flüssigkeitschromatographie aufgetrennt.

Zur Probenvorbereitung wurde das Kulturfiltrat mit Aqua dest. (0,01% Na-Azid) auf eine Konzentration von maximal 10 mM pro Aminosäure verdünnt.

Trennbedingungen:

Säule:	Merck Lichrosorb RP 18
Laufmittel:	A: 0,1 M Na-Acetat pH 7,2 B: Methanol
Injektionsvolumen:	2 µl
Durchflußrate:	0,5 ml
Ofentemperatur:	40°C
Druck:	max. 400 bar
Laufzeit:	12 Minuten
Detektion:	250 nm

Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte über externe und interne Standards.

4.2 Bestimmung von D,L-2-Hydroxybutyrat

Kapillar-Isotachophorese

Die Bestimmung von Hydroxybutyrat im Konzentrationsbereich 0,5-10 mM erfolgte mittels Kapillar-Isotachophorese. (Tachophor, LKB, Gräfling). Bei dieser Trenntechnik werden Ionen in einem elektrischen Feld innerhalb einer Kapillare je nach ihrer Ladung

verschieden schnell zur Elektrode transportiert. Die Detektion der getrennten Ionen erfolgt photometrisch bei 254 nm. Als Elektrolytlösungen wurden eingesetzt:

Leitelektrolyt: 257,5 mg Diglycin
 9,1 mg Cetyltrimethylammoniumbromid
 500 mg Triton X-100
 75 ml einer 1%igen Lösung von Hydroxypropyl-
 methylcellulose
 1,75 ml 1N HCl/250 ml H₂O (pH 2,9)

Die Lösung wurde durch 0,002% Chlorhexidinchlorid stabilisiert. Die Berechnung erfolgte durch einen Integrator SP 4270 der Fa. Speetgraphics nach Eichung des Gerätes mit 5mM Eichlösungen. Die Bestimmung von Hydroxybutyrat wurde gestört, wenn die Probe zusätzlich Lactat enthielt, da diese beiden Substanzen nicht voneinander getrennt und somit als Summe bestimmt wurden.

HPLC-Bestimmung

Die Bestimmung von D,L-2-Hydroxybutyrat im Kulturfiltrat kann auch über Ionenausschlußchromatographie mittels HPLC erfolgen. Diese Methode wurde eingesetzt, wenn die Konzentration mehr als 10 mM betrug. Vorteilhaft sind zum einen die sehr kurzen Analysenzeiten, zum anderen konnte Hydroxybutyrat von Lactat getrennt werden. Zur Probenvorbereitung wurde 1 ml Kulturfiltrat mit 0.2 ml TCA (72%) versetzt, 5 Minuten zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge) und der Überstand für die Bestimmungen eingesetzt.

Trennbedingungen:

Säule:	Interaction ORH-801
Laufmittel:	0,1 N H ₂ SO ₄
Injektionsvolumen:	5 µl
Fluß:	0,7 ml/min
Ofentemperatur:	40°C
Detektion:	210 nm
Retentionszeit:	9,6 Minuten

Enzymatische Bestimmung von D- und L-2-Hydroxybutyrat

Die D- und L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenasen (Hic-DH) oxidieren stereospezifisch das D- bzw. L-Isomer von Hydroxybutyrat. Diese Enzyme wurden von Schütte et al. (1984) aus *Lactobacillus confusus* isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Reaktionsansatz:

0,50 ml 0,2 M Tris-HCl Puffer pH 8,2
 0,10 ml 12 mM NAD
 0,29 ml Aqua dest.
 0,01 ml L- bzw. D-Hic-DH (1:10 verdünnt)
 0,1 ml Probe

Nach Mischen wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml Probe gestartet und bei 25°C und 340 nm gemessen.

Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit anhand von Eichkurven (Abb.3).

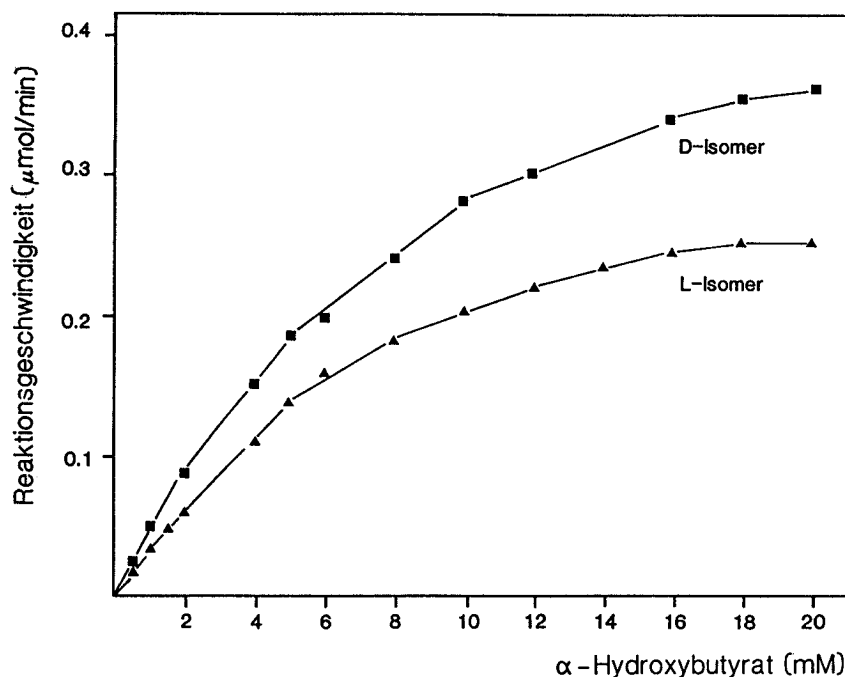


Abb.3: Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von D- und L-2-Hydroxybutyrat mittels der D- und L-Hic-DH.

4.3 Gaschromatographische Bestimmung von Propionaldehyd und 2-Methylbutyraldehyd

Propionaldehyd und 2-Methylbutyraldehyd treten als Nebenprodukte bei der Isoleucin-Fermentation im Kulturfiltrat auf. Die Bestimmung erfolgte gaschromatographisch mit einem Gerät der Fa. Hewlett Packard Typ 5790 mit automatischem Probengeber.

Trennbedingungen:

Säule:	Porapak QS 80-100 mesh
	91,5 cm x 2 mm
Säulentemperatur:	155°C
Injektortemperatur:	200°C
Trägergas:	Stickstoff (30 ml/min)
Injektionsvolumen:	2 µl
Retentionszeit:	Methanol: 0,25 Minuten
	Propionaldehyd: 0,85 Minuten
	Na-Acetat: 1,2 Minuten
	Methylbutyraldehyd: 4,05 Minuten

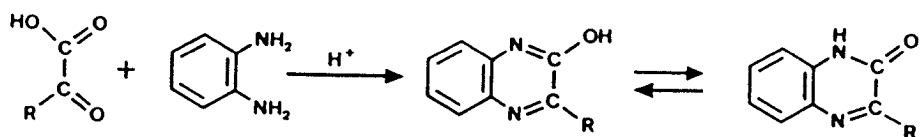
Für die Eichung wurde Methylbutyraldehyd zunächst mit Methanol verdünnt, weitere Verdünnungen erfolgten mit Aqua dest. Als interner Standard diente Methanol.

4.4 Bestimmung von 2-Ketobutyrat und 2-Keto-β-methylvalerat

Prinzip:

2-Ketosäuren reagieren in saurer Lösung mit o-Phenylendiamin zu Quinoxalinen:

Derivatisierung:



R= Rest

Reagenz:

1 g o-Phenylendiamin wurden in 100 ml 3 M H_3PO_4 gelöst (muß täglich frisch angesetzt werden).

Die entstehenden Derivate können mittels HPLC aufgetrennt werden und infolge ihrer Absorption bei 335 nm quantitativ bestimmt werden (Livesey et al., 1985).

Probenvorbereitung:

In einem verschließbaren Reagenzglas wurden 2 ml Reagenzlösung und 0,1 ml Probe sorgfältig gemischt und 30 Minuten bei 45°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz im Eisbad schnell abgekühlt, mit 10 ml Aqua dest. und 5 ml Essigsäureethylester versetzt und 10 Sekunden kräftig geschüttelt. In dieser Form war die Probe über mehrere Stunden stabil. 5 µl der oberen organischen Phase wurden injiziert und unter folgenden Bedingungen getrennt und detektiert:

Säule:	Merck Lichrosorb RP 18		
Fließmittel:	Methanol/ 5 mM Phosphatpuffer pH 3.2		
Methanolanteil:	80% (isokratisch)		
Ofentemperatur:	40°C		
Laufzeit:	5,5 Minuten		
Retentionszeiten:	Ketobutyrat:	3,24	Minuten
	Ketomethylvalerat:	4,97	Minuten
Detektion:	340 nm		

Zur Eichung wurden Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 0,5-50 mM eingesetzt.

4.5 Bestimmung von Glucose

Glucose wurde mit einem Glucose Analysator Typ 2 der Firma Beckmann bestimmt. Die Messung erfolgt enzymatisch mittels Glucoseoxidase, welche die Glucose unter Verbrauch von Sauerstoff zu Gluconsäure und H_2O_2 umsetzt. Dieser Sauerstoffverbrauch ist direkt proportional der Glucosemenge in der Reaktionslösung und wird mit einer O_2 -Elektrode bestimmt. Zur Eichung des Gerätes diente ein käuflicher Glucose-Standard (150 mg Glucose/100 ml).

5. Herstellung von Rohextrakten

Zellernte

Die Bakterienkulturen wurden in der mittleren exponentiellen Phase (OD ca. 15-20) geerntet und in einer Heraeus-Kühlzentrifuge (Minifuge RF) abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 50 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0 wurden die Zellen in einem kleinen Volumen (12-15 ml) desselben Puffers resuspendiert und entweder bei -20°C aufbewahrt oder direkt durch Ultraschall aufgeschlossen.

Für die Messung der Acetohydroxysäuresynthase (AHAS) enthielt der Aufschlußpuffer 30% Glycerin zur Stabilisierung des Enzyms (Kisumi et al., 1971).

Zellaufschluß

Die gewaschenen Zellen wurden mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonifier B 15 der Fa. Branson Sonic Power Co. Danburg, USA) aufgeschlossen. Die Beschalldauer betrug 2 X 3 Minuten mit einer 5 minütigen Pause, wobei die Zellen in einem Eiswasserbad gekühlt wurden. Anschließend wurden die Zelltrümmer in einer Beckmann Kühlzentrifuge J-21 bei 4°C für 30 Minuten bei 25.000 g sedimentiert.

Der Überstand (=Rohextrakt) wurde unmittelbar für die Messung der AHAS eingesetzt. Für die Bestimmung der L- und D-Lactathydrogenase erwies es sich als günstig den Rohextrakt zunächst 24 Stunden bei 4°C aufzubewahren. Anderenfalls kam es bereits ohne die Zugabe von Substrat zur teilweisen Reduktion des Elektronenakzeptors DCPIP.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Rohextrakte wurde nach der Biuret-Methode (Gornall et al., 1949) bestimmt.

Biuret-Reagenz: 4,5 g K-Na-Tartrat
 1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
 2,5 g KJ
 in 200 ml 0,2 N NaOH gelöst und anschließend
 mit 0,2 N NaOH auf 500 ml aufgefüllt

0,5 ml Probe (0,25–2,5 mg/ml Protein) wurden mit 2,5 ml Biuret-Reagenz gut durchmischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten wurde die Extinktion bei 580 nm gegen eine Probe ohne Protein gemessen. Zur Bestimmung der Eichgeraden diente Rinderserumalbumin als Standard.

6. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität der Enzyme ist in U/mg Protein angegeben. Eine Enzymeinheit (U) entspricht hierbei 1 μMol gebildetes Produkt pro Minute.

6.1 Bestimmung der Acetohydroxysäuresynthase-Aktivität

Die spezifische Aktivität der AHAS wurde in einem modifizierten Ansatz nach Umbarger und Brown (1958) bestimmt.

Reaktionsansatz

0,65 ml	0,1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,8
0,10 ml	1 M Na-Pyruvat
0,01 ml	10 mg/ml TPP
0,10 ml	0,1 M MgCl_2
0,09 ml	Aqua dest.
0,05 ml	Rohextrakt

Die Reaktion wurde nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C durch Zusatz von 0,1 ml 6 N H_2SO_4 abgestoppt. Anschließend wurde nochmals 15 Minuten bei 62°C inkubiert, wobei das im Reaktionsansatz

gebildete Acetolactat zu Acetoin decarboxyliert, welches dann nach einer Methode von Westerfeld (1945) bestimmt wurde.

Acetoinbestimmung: 0,25 ml Probe
 0,50 ml 5%ige 2-Naphtollösung
 (frisch gelöst in 2,5 N NaOH)
 0,50 ml 0,5%ige Creatinlösung

Dieser Ansatz wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte bei 530 nm gegen einen Leerwert ohne Acetoin. Die gebildete Acetoinmenge wurde mittels einer Eichkurve ermittelt.

6.2 Bestimmung der NAD-unabhängigen D- und L-Lactatdehydrogenase

Bestimmung im Rohextrakt

(modifiziert nach Molinari und Lara, 1960)

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Lactatdehydrogenasen diente Dichlorphenolindophenol (DCPIP) als künstlicher Elektronenakzeptor. DCPIP ist ein Redoxfarbstoff, welcher in seiner oxidierten Form blau und im reduzierten Zustand farblos ist. Im Enzymtest erfolgte die Reduktion durch die Lactatdehydrogenasen, wobei die Extinktionsabnahme bei 600 nm und 30°C verfolgt wurde.

Reaktionsansatz

0,50 ml	0,2 M K-Phosphatpuffer pH 7,0
0,10 ml	0,5 mM DCPIP
0,02 ml	Rohextrakt (evt. verdünnt)
0,28 ml	Aqua bidest.
0,10 ml	Substrat

Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von Substrat. Die Konzentration im Test betrug für L-Lactat 20 mM, für D-Lactat 10 mM und für D,L-HB 40 mM.

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität betrug der Extinktionskoeffizient für DCPIP $20 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ (Data for Biochemical Research, 1986).

Bestimmung für die löslichen Enzyme

Zur Bestimmung der Enzymaktivität nach Ablösung der Enzyme von der Cytoplasmamembran enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich das Detergenz LDAO und PES als Elektronenmediator (modifiziert nach Tanaka et al., 1976). Darüber hinaus wurde die Substratkonzentration erhöht.

Reaktionsansatz

0,50 ml	0,2 M K-Phosphatpuffer mit 0,5% LDAO pH 7,0
0,10 ml	0,5 mM DCPIP
0,05 ml	0,01 M PES
0,10 ml	Substrat
0,01 ml	Enzympräparation (evt. verdünnt)
0,24 ml	Aqua bidest.

Für die Bestimmung der L-LDH-Aktivität betrug der pH-Wert des Puffers 7,5. Die Substratkonzentration im Test betrug für L-Lactat und D,L-HB 80 mM, für D-Lactat 10 mM.

7. Gelelektrophoretische Auftrennung des Rohextraktes mit anschließender Aktivitätsfärbung

Die gelelektrophoretische Auftrennung eines Rohextraktes mit anschließendem Aktivitätsnachweis für die Lactatdehydrogenasen sollte zeigen, ob Unterschiede hinsichtlich der elektrophoretischen Beweglichkeit der L- und D-LDH vorliegen. Ferner wurde untersucht, inwieweit eine Übereinstimmung zwischen dem Lactat-

und HB-oxidierendem Enzymsystem vorliegt. Die Auftrennung erfolgte in einem diskontinuierlichem nativen Polyacrylamidgel in einer Elektrophoresekammer der Fa. Biorad. Die Stärke des Gels betrug 0,7 mm.

Herstellung des Gels (modifiziert nach Richards et al., 1974)

Reagenzien:	Lösung A	30 g Acrylamid 0,8 g Bisacrylamid ad. 100 ml mit Aqua dest.
	Lösung B	36 g Tris 48 ml 1 N HCl ad. 100 ml mit Aqua dest., pH 8,9
	Lösung C	6 g Tris 48 ml 1N HCL ad. 100 ml mit Aqua dest., pH 6,7
	Lösung D (Laufpuffer)	6 g Tris 28,8 g Glycin 16 ml LDAO (30%) ad. 1000 ml mit Aqua dest.

Ansatz für ein 7,3 %iges Trenngel:

7,6 ml Lösung A
4,0 ml Lösung B
19,6 ml Aqua dest.
0,5 ml LDAO (30%)
30 µl TEMED

Der Ansatz für das Trenngel wurde entgast und diesem anschließend zur Initiierung der Polymerisation 300 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung (muß frisch angesetzt werden) zugesetzt und sofort in die Elektrophoresekammer gegeben.

Ansatz für ein 4%iges Sammelgel:

2,2	ml	Lösung A
4,2	ml	Lösung C
0,25	ml	LDAO (30%)
10,25	ml	Aqua dest.
15	µl	TEMED

Dem entgasten Ansatz wurden 150 µl der 10%igen Ammoniumpersulfatlösung zugesetzt und auf das Trenngel gegeben.

Trennbedingungen:

Probenvolumen:	50 µl	solubilisierter Rohextrakt
	5 µl	Bromphenolblau
Sammelgel:	60	mV
Trenngel:	140	mV
Laufzeit:	ca. 4	Stunden

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurde das Gel 2 Stunden in ein Fixierbad gelegt:

Fixierbad:	0,05 %	w/v	Coomassie Brilliant Blue
	25,0 %	v/v	Isopropylalkohol
	10,0 %	v/v	Essigsäure

Die Entfärbung erfolgte in 10 %iger Essigsäure.

Bestimmung der D- und L-LDH-Aktivität im Gel

Probenvorbereitung

Da die Lactatdehydrogenasen membrangebunden sind, wurde der Rohextrakt zunächst mit dem Detergenz LDAO versetzt (Endkonzentration 2%) und unter Eiskühlung vorsichtig gerührt.

Die Detergenzbehandlung war erforderlich, um die Enzyme von der Cytoplasmamembran abzulösen. Nach 30 Minuten Inkubation wurde der Rohextrakt 1 Stunde in einer Beckmann-Ultrazentrifuge (Typ L8-70 M) bei 4°C und 45.000 rpm zentrifugiert. 0,05 ml des Überstandes wurden dann in die Probentaschen gegeben.

Auswertung des Gels

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel entsprechend der aufgetragenen Proben in ca. 1 cm breite Längsstreifen geteilt. Ein Streifen wurde wie o.a. einer Proteinfärbung unterzogen, die anderen dienten der Bestimmung der Enzymaktivität (modifiziert nach Kohn und Kaback, 1973).

Reaktionsansatz

5,0 ml	0,2 M K-Phosphatpuffer
0,4 ml	0,01 M Nitroblautetrazoliumsalz
0,8 ml	0,01 M Phenazinethosulfat
1,0 ml	Substrat
2,8 ml	Aqua dest.

Die Substratkonzentration betrug für L-Lactat 20 mM, D-Lactat 10 mM, D,L-Lactat 30 mM und für D,L-HB 40 mM. Für jedes Substrat wurde ein Reaktionsansatz in eine Petrischale gegeben und der Gelstreifen ca. 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend konnte die Stelle der Enzymaktivität als dunkle Bande im Gel lokalisiert werden.

8. Solubilisierung der Lactatdehydrogenasen

Die NAD-unabhängigen Lactatdehydrogenasen von *C. glutamicum* sind membrangebunden. Im Hinblick auf eine Proteinreinigung war es daher notwendig Membranfraktionen zu gewinnen. In einem weiteren Schritt wurden die Lactatdehydrogenasen von der Membran abgelöst.

8.1 Herstellung osmotisch sensibler Zellen

(modifiziert nach Menkel, 1987)

Die Vorkultur der Zellen erfolgte in Medium II für ca. 8 h. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml MMYE-Medium + 0,63 % Glycin so beimpft, daß die Kultur nach Inkubation über Nacht eine optische Dichte von 10-13 (4×10^8 Zellen/ml) hatte. Hierzu wurde für *C. glutamicum* eine Verdopplungszeit von 1 Stunde zu Grunde gelegt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 3000 g) geerntet, das Pellet von jeweils zwei Kolben vereinigt, in 10 ml Sucrose-MgCl₂-MMYE resuspendiert und in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Zum Abbau der Zellwand wurden 10 ml einer Lysozymlösung (20 mg/ml Sucrose-MgCl₂-MMYE) zugesetzt und bei schwacher Bewegung in einem Laborschüttler bei 33°C ca. 1,5 bis 2 h inkubiert. Anschließend wurde mikroskopisch geprüft, ob die Zellen bei Zugabe von Aqua dest. lysieren.

<u>Sucrose-MgCl₂-MMYE:</u>	8	ml	1,64 M Sucrose
	0,32	ml	1 M MgCl ₂
	16	ml	MMYE (s.3.)
	7,68	ml	H ₂ O

8.2 Solubilisierung der Zellmembranen

Zur Lyse wurden die Zellen in 200 ml eiskalten 5 mM K-Phosphatpuffer pH 7.0 gegeben. Anschließend wurde zentrifugiert (10 min, 10.000 g), der schwach gelbliche Überstand mit den löslichen Proteinen verworfen und das Pellet mit dem Lyse-Puffer einmal gewaschen. Das Pellet wurde dann entweder bei -70°C eingefroren oder direkt für die Detergenzbehandlung eingesetzt.

Hierzu wurde das Pellet mit dem Solubilisierungspuffer (5 mM KPP pH 7, 2% LDAO) im Verhältnis 4 ml Puffer/g Naßgewicht (ca. 0,4 mg LDAO/mg Protein) versetzt und im Eisbad ca. 1,5 h langsam gerührt, wobei das teilweise sehr feste Pellet zunächst mit einem Spatel vorsichtig zerkleinert wurde. Diese Suspension wurde anschließend in einer Beckmann-Ultrazentrifuge (Typ L8-70 M) für 1,5 h in einem TI-50 Rotor bei 45.000 rpm zentrifugiert.

Der tief gelb gefärbte Überstand enthielt die von der Membran abgelösten Proteine, unlösliche Bestandteile bildeten ein weißliches Pellet. Für die Proteinreinigung wurde dieser Überstand

direkt auf einen DEAE-Anionenaustauscher aufgetragen.

8.3 Proteinbestimmung detergenzhaltiger Proben

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration detergenzhaltiger Proben wurde eine modifizierte Lowry-Methode (Markwell et al., 1978) eingesetzt.

Reagenzien:

Lösung A : 2,0 % Na_2CO_3
 0,4 % NaOH
 0,16 % Na-Tartrat
 1,0 % SDS

Lösung B: 4,0 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Testreagenz: 50 ml Lösung A + 0,5 ml Lösung B

Test: 0,165 ml Probe (10-100 $\mu\text{g/ml}$ Protein) wurde mit 0,5 ml Testreagenz versetzt, gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 50 μl 1:2 verdünnte Folin-Lösung zugegeben, weitere 30 Minuten inkubiert und die Extinktion bei 660 nm gegen Aqua dest. gemessen. Für die Bestimmung der Eichgeraden diente Rinderserumalbumin als Standard.

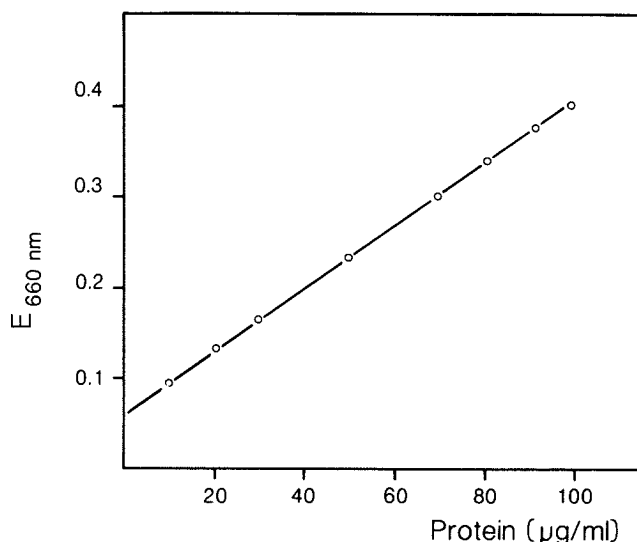


Abb.3: Eichgerade zur Ermittlung der Proteinkonzentration in detergenzhaltigen Proben

9. Methoden zur Proteinreinigung

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der D- und L-Lactatdehydrogenase diente der nach Ultrazentrifugation gewonnene Überstand (s. 8.2), der 2% LDAO enthielt. Wenn nicht anders beschrieben erfolgten die Trennungen bei 4°C, und es wurden Photometer, Schreiber und Fraktionssammler der Fa. LKB, Gräfling eingesetzt.

9.1 Anionenaustauscher

DEAE-Sepharose

Als Trennmateriel wurde DEAE-Sepharose CL 6B der Fa. Pharmacia eingesetzt. 14 ml (4 mg/ml Protein) des Membransolubilisates, welches 2% LDAO enthielt, wurde direkt auf die mit Puffer A equilibrierte Säule aufgetragen und anschließend nochmals mit Puffer A gespült, um nicht gebundene Farbstoffe und Proteine zu entfernen. Die gebundenen Proteine wurden mit 170 ml des Elutionspuffers eluiert, wobei ein NaCl-Gradient von 0-0,4 M NaCl vorlag. Fraktionen zu 2 ml wurden gesammelt. Die genauen Angaben zur Chromatographie sind unter "Trennbedingungen" zusammenfaßt. Diese Trennung an DEAE-Sepharose wurde stets als erster Schritt durchgeführt; bei allen weiteren Reinigungen wurde daher vorgereinigtes und angereichertes Material eingesetzt.

Trennbedingungen:

Säule:	1,5 x 8 cm
Medium:	DEAE-Sepharose CL 6B
Gradient:	0 - 0,4 M NaCl (12 faches Säulenvolumen)
Puffer A:	30 mM Tris-HCl/0,5% LDAO pH 7,5
Puffer B:	Puffer A mit 0,4 M NaCl
Fluß:	20 ml/h
Fraktionsgröße:	2 ml (ca. 7 min)
Laufzeit:	ca. 8 Stunden

Die aktiven Fraktionen (40-50), welche 85% der aufgetragenen D-LDH-Aktivität enthielten, wurden vereinigt, und wenn nötig für

weitere Reinigungsschritte mittels Gelfiltration über G-25 (PD 10 Säulchen, Biorad) entsalzt oder umgepuffert.

Mono Q -Säule des FPLC-Systems

Die Mono Q-Säule des FPLC-Systems von Pharmacia ist ein hochauflösender Anionenaustauscher. Die Probenschleife faßte 0,5 ml Probe, so daß bei größeren Volumina mehrmals aufgegeben wurde (bis zu 8 mal). Nach jedem Auftrag wurde mit 2 ml Puffer A gespült, so daß erneut aufgegeben werden konnte. Die vereinigten Fraktionen der DEAE-Säule (40-50; 0,3 mg/ml Protein) wurden entsalzt (Puffer A) und auf die Säule aufgetragen. Die D-LDH-Aktivität wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-0.35 M NaCl eluiert und Fraktionen zu 1 ml gesammelt. Die Fraktionen 28-31 enthielten ca. 80% der aufgegebenen Enzymaktivität.

Trennbedingungen:

Säule:	Mono Q (HR 5/5)
Gradient:	0,15 M - 0,35 M NaCl, (15% - 35% Puffer B)
Puffer A:	30 mM Tris-HCl/ 0,5% LDAO pH 7,5
Puffer B:	Puffer A mit 1 M NaCl
Fluß:	1 ml/min
Fraktions-	
größe:	1 ml
Laufzeit:	40 Minuten

9.2 Auftrennung über Hydroxylapatit

Für die Trennungen mittels Hydroxylapatit wurde die fertig gepackte Säule der Fa. Pentax (Hamburg) eingesetzt, welche ein hohes Auflösevermögen besitzt und in eine HPLC-Anlage integriert war. Die hier verwendete Anlage bestand aus Komponenten verschiedener Firmen: Pumpen(HPLC Pump 64) und Computer(HPLC Programmer 50) der Fa. Knauer, Berlin, Photometer(7211) der Fa. ERMA, Tokio, Fraktionssammler von Abimed, Düsseldorf. Die Probenschleife faßte ein Volumen von 2 ml, wobei durch zweimaliges

Auftragen maximal 4 ml aufgegeben wurde. Zur Probenvorbereitung wurde die Enzympräparation, welche bereits über DEAE-Sepharose und Mono Q angereichert war, mit 0,01 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,5 entsalzt. Nach dem Auftrag (4 ml = 0,4 mg Protein) wurde die Säule zunächst 5 Minuten mit Puffer A gespült. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit einem Na-Phosphat-Gradienten in 2 Stufen eluiert:

ab 6 min bis 12 min : 0,01 M bis 0,08 M Na-Phosphat
 ab 12 min bis 37 min : 0,08 M bis 0,20 M Na-Phosphat

Fraktionen zu 0,5 ml wurden gesammelt und ca. 70% der aufgetragenen D-LDH-Aktivität konnte in Fraktion 33-37 nachgewiesen werden.

Trennbedingungen:

Säule: Pentax-Säule, 7,5 x 100 mm
 Medium: Hydroxylapatit
 Gradient: 0,01 - 0,4 M Na-Phosphat
 Puffer A: 0,01 M Na-Phosphat/0,01 mM CaCl_2 /0,2% LDAO
 pH 7,5
 Puffer B: 0,4 M Na-Phosphat/0,0025 mM CaCl_2 /0,4% LDAO
 pH 7,5
 Fluß: 0,5 ml/min
 Fraktions-
 größe: 0,5 ml
 Laufzeit: 50 Minuten

9.3 Gelfiltration

Die Bestimmung des nativen, apparenten Molekulargewichtes erfolgte durch Gelfiltration. Hierzu wurde die Superose 12 Säule des FPLC-Systems von Pharmacia eingesetzt. 0,5 ml (0,3 mg/ml Protein) einer bereits über DEAE-Sepharose angereicherten Enzympräparation wurde auf die Säule aufgetragen und entsprechend der aufgeführten Trennbedingungen eluiert. Die Fraktionen 27-31 enthielten 75% der eingesetzten Enzymaktivität. Für die Eichung der Säule wurden 0,5 ml des jeweiligen Eichproteins (0,1 mg/ml

gelöst im u.a. Puffer) appliziert und die Elutionsvolumina bestimmt. Durch die Auftragung der Molekülgröße gegen das Elutionsvolumen wurde die entsprechende Eichgerade ermittelt (Abb.4).

Trennbedingungen:

Säule:	Superose 12 (HR 10/30)
Puffer:	0,05 M K-Phosphat/ 0,15 M NaCl/0,5% LDAO
Fluß:	0,5 ml/min
Fraktionsgröße:	1 ml
Laufzeit:	40 Minuten

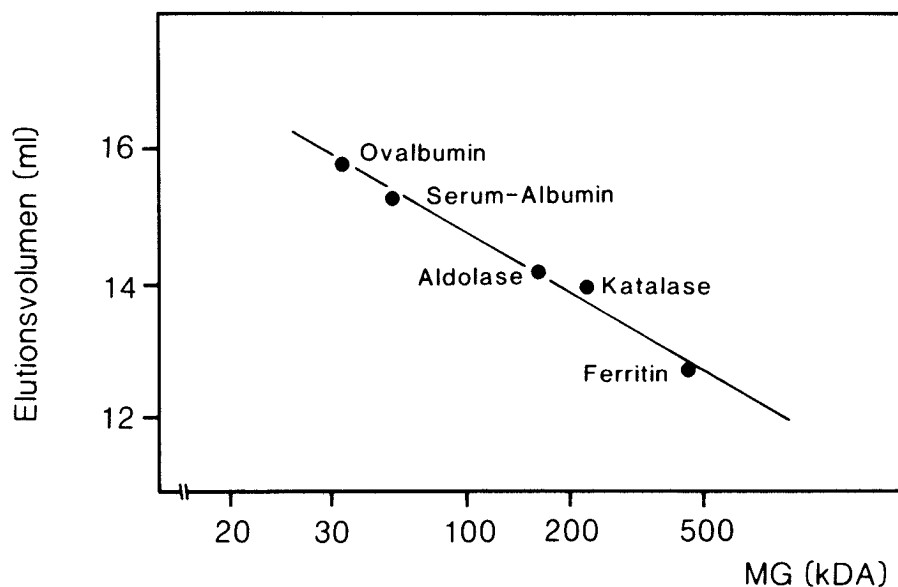


Abb.4: Kalibrierung von Superose 12 mit den angegebenen Eichproteinen

Weitere Methoden

Chromatofokussierung

Für die Chromatofokussierung wurde das System von Pharmacia eingesetzt. Genauere Angaben über das Trennprinzip und die Vorgeh-

ensweise sind in dem Begleitheft erläutert (Chromatofokusing, Pharmacia).

2 ml einer bereits über DEAE-Sepharose vorgereinigten Enzympräparation wurden mittels des unten angegebenen Startpuffers entsalzt und gleichzeitig umgepuffert. Die Säule wurde mit 50 ml des Startpuffer equilibriert, die Probe aufgetragen und mit 30 ml des angegebenen Polypuffers eluiert. Fraktionen zu 1,2 ml wurden gesammelt und mittels pH-Elektrode der Verlauf des pH-Gradienten bestimmt. Die Fraktionen 21-25 enthielten 40% der aufgetragenen D-LDH-Aktivität.

Trennbedingungen:

Säule:	0,8 x 3,5 cm
Medium:	PBE 94
pH-Gradient:	4 - 6
Startpuffer:	0,025 M Histidin-HCl/0,5% LDAO pH 6,2
Polypuffer:	74-HCl (1:8 mit Aqua dest. verdünnt)/ 0,5% LDAO pH 4,0
Elutionsvolumen:	ca. 7 Säulenvolumina
Fluß:	15 ml/h
Fraktionsgröße:	1,2 ml
Laufzeit:	ca. 2 Stunden

Hydrophobe Chromatographie mit Phenylsepharose

Phenylsepharose ist ein Trennmateriale für die hydrophobe Chromatographie ("Hydrophobic interaction chromatography", Fa. Pharmacia).

3 ml einer bereits über DEAE-Sepharose angereicherten Enzympräparation (0,3 mg/ml Protein) wurde auf die Säule aufgetragen, welche mit Puffer A equilibriert war. Die Elution erfolgte mit 40 ml eines Gradienten von 0,05-1% Na-Desoxycholat. Ca. 60% der aufgetragenen D-LDH-Aktivität konnte in den Fraktionen 27-33 nachgewiesen werden.

Trennbedingungen:

Säule:	1,2 x 4,5 cm
Medium:	Phenylsepharose (Fa. Pharmacia, Freiburg)
Gradient:	0,05 - 1% Na-Desoxycholat
Puffer A:	0,05 M K-Phosphat/ 0,05% Na-Desoxych. pH 7,5
Puffer B:	0,05 M K-Phosphat/1% Na-Desoxych. pH 7,5
Gradienten-	
volumen:	8 faches Säulenvolumen
Fluß:	15 ml/h
Fraktionsgröße:	1,2 ml
Laufzeit:	ca. 2 Stunden

Fraktioniertes Aussalzen

Bei dieser Trenntechnik wird die Säule mit einem Puffer hoher Ammoniumsulfat-Konzentration equilibriert (von der Haar, 1976). Der Probe wird ebenfalls Ammoniumsulfat in einer Konzentration zugesetzt, welche gerade unterhalb vom Präzipitationspunkt des zu reinigenden Proteins liegt. Beim Probenauftrag präzipitiert die Probe auf der Geloberfläche und infolge des abnehmenden Salzgradienten werden die Proteine bei einer für sie spezifischen Salzkonzentration wieder gelöst und eluiert. 3 ml einer Enzympräparation (0,3 mg/ml Protein; angereichert über DEAE-Sepharose) wurden mit 4,9 ml einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung pH 7,2 versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 4°C aufbewahrt und anschließend die präzipitierten Proteine abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen und mit 240 ml eines abnehmenden Ammoniumsulfat-Gradienten eluiert. Fraktionen zu 1,8 ml wurden gesammelt und 65% der aufgetragenen D-LDH-Aktivität konnte in den Fraktionen 115-121 nachgewiesen werden.

Trennbedingungen:

Säule: 2,8 cm x 5,5 cm
 Medium: Sepharose CL 4B (Pharmacia, Freiburg)
 Gradient: 65% - 35% Ammoniumsulfat
 Puffer A: 0,1 M KPP/ 65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 0,5% LDAO pH 7,2
 Puffer B: Puffer A jedoch 35% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 Gradienten-
 volumen: 7 faches Säulenvolumen
 Fluß: 20 ml/h
 Fraktionsgröße: 1,8 ml
 Laufzeit: ca. 11,5 Stunden

Farblichandenchromatographie

Bei dieser Methode werden Säulenmaterialien eingesetzt, bei denen Farbliganden mit Coenzym-ähnlicher Struktur an einen Träger gebunden sind. Mit Hilfe eines Test-Sets wurde zunächst das Gel mit dem günstigsten Bindungs- und Elutionsverhalten ermittelt. Die empfohlenen Trennbedingungen wurden dem Handbuch des Herstellers (Farblichanden-Chromatographie, Fa. Amicon) entnommen. Als geeignet erwies sich der Ligand Red A, da die D-LDH sowohl gebunden als auch eluiert werden konnte. Es wurden 4 ml einer entsalzten Probe (0,3 mg/ml Protein) aufgetragen und mit 80 ml eines NaCl-Gradienten (0-0,45 M NaCl) eluiert. Fraktionen zu 1,6 ml wurden gesammelt und 40% der aufgegebenen D-LDH-Aktivität konnten in den Fraktionen 40-49 nachgewiesen werden.

Trennbedingungen:

Säule: 1,2 x 6,5 cm
 Medium: Farbligand Red A (Fa. Amicon)
 Gradient: 0 - 0,45 M NaCl
 Puffer A: 0,01 M Tris-HCl/ 0,2% LDAO pH 7,5
 Puffer B: Puffer A mit 0,45 M NaCl
 Gradientenvolumen: 11 faches Säulenvolumen
 Fluß: 20 ml/h
 Fraktionsgröße: 1,6 ml
 Laufzeit: ca. 4 Stunden

10. Anfertigung von SDS-Gelen

Zur Überprüfung der Reinigungseffizienz wurden die Enzympräparationen nach jedem Chromatographie-Schritt mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Blue angefärbt. Hierzu wurde das PhastSystem der Fa. Pharmacia eingesetzt. Die benötigten Pufferstreifen und Gele wurden von dem Hersteller bezogen. Die Durchführung der Elektrophorese sowie die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Färbung und Entfärbung wurden dem Handbuch des Herstellers entnommen (PhastSystem, Pharmacia).

Probenvorbereitung:

Da die Proben Detergenz enthielten, wurde dieses vor der Elektrophorese extrahiert. Dazu wurde 0,1 ml Probe mit 0,01 ml Na-Desoxycholat (0,15%) versetzt, 10 Minuten inkubiert, anschließend 0,01 ml Trichloressigsäure (72%) zugesetzt und nach weiteren 5 Minuten zentrifugiert (4 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,1 ml 250 mM Tris-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Aceton wurde nochmals für 4 Minuten zentrifugiert und das Pellet in einem kleinen Volumen (ca. 0,02 ml) des Probenpuffers aufgenommen. Gegebenenfalls wurde die Probe noch mit dem Probenpuffer verdünnt, da es sich empfiehlt pro Proteinbande nicht mehr als 20 -30 ng Protein aufzutragen, um eine optimale Anfärbung der Banden zu erzielen. 1 µl dieser Lösung wurde auf ein Gradientengel (8-25%) aufgetragen und getrennt.

Probenpuffer: 10 mM Tris-HCl
 1 mM EDTA
 2,5 % SDS
 5,0 % Mercaptoethanol pH 8,0

11. Flavin-Bestimmung

Für den Nachweis von nichtkovalent gebundenen Flavinen in Enzympräparationen wurden diese zunächst extrahiert und anschließend mittels HPLC aufgetrennt.

Saure Extraktion: (A.Kröger, pers. Mitteilung)

Zu 0,5 ml einer über DEAE-Sepharose, Mono Q und Hydroxylapatit angereicherten Enzympräparation (20 µg/ml Protein) wurden 0,1 ml eiskalter 1 M Perchlorsäure pipettiert, kurz geschüttelt und 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde 30 Sekunden zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, max. g), der Überstand abgetrennt und das Sediment mit weiteren 0,5 ml Perchlorsäure versetzt, geschüttelt und nochmals zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mit 0,05 ml 10 M KOH und 0,05 ml 4 M K_2HPO_4 neutralisiert, 2 Minuten zentrifugiert und direkt für die Flavin-Bestimmung eingesetzt.

HPLC-Bestimmung

Für die Bestimmung wurde die HPLC-Anlage, wie sie bereits unter 4.1 beschrieben wurde, eingesetzt. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde die UV-Detektion durch einen Fluoreszenz-Detektor (Hw.Packard) ersetzt. Die Konzentration der Proben wurde durch den Vergleich mit entsprechenden Eichlösungen ermittelt.

Trennbedingungen:

Säule:	Lichrosorb RP-8 (Merck)
Laufmittel:	Methanol/ 5 mM KH_2PO_4 pH 3,2
Gradient:	0- 5 min 18% Methanol/ 82% KH_2PO_4 6-10 min bis 30% Methanol ansteigend
Injektionsvolumen:	0,02 ml
Fluß:	0,6 ml
Ofentemperatur:	40°C
Anregung:	226 nm
Detektion:	514 nm
Retentionszeit:	FAD: 5,3 Minuten FMN: 6,8 Minuten

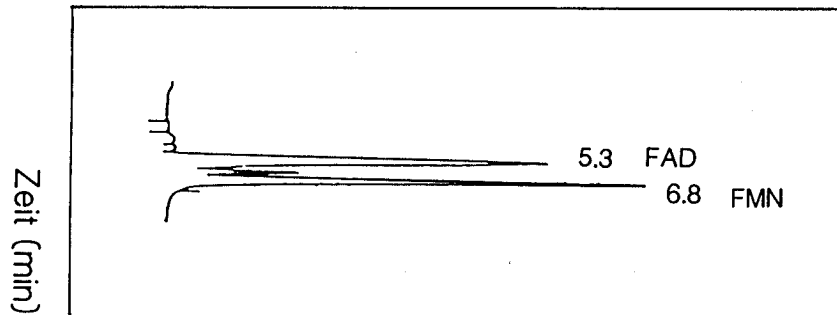


Abb.5: HPLC-Chromatogramm einer Auftrennung eines Gemisches von FAD und FMN

12. Schnelle Membranfiltration zur Bestimmung der Aufnahmekinetiken von D- und L-Lactat

Zur Bestimmung von Aufnahmekinetiken muß gewährleistet sein, daß die Zellen zu definierten Zeitpunkten sehr schnell vom umgebenden Medium abgetrennt werden. Hierzu eignet sich die Methode der schnellen Membranfiltration. Das zugesetzte Substrat ist radioaktiv markiert und über die Menge der inkorporierten Radioaktivität läßt sich die Aufnahmerate berechnen.

Anzucht und Ernte der Zellen:

100 ml Minimalmedium (Medium IV) wurden mit 0,2 ml einer Glycerindauerkultur angeimpft, so daß die Übernachtskultur eine optische Dichte von 10-12 hatte. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 6000 rpm), zweimal mit 30 mM Tris-HCl/10 mM KCl/10 mM NaCl pH 7,5 gewaschen, in einem kleinen Volumen desselben Puffers aufgenommen und unter Eiskühlung aufbewahrt. Die OD₆₀₀ dieser konzentrierten Zellsuspension betrug ca. 80-120 und vor jeder Meßreihe wurde ein Aliquot dieser Suspension 10 Minuten bei 25°C vorinkubiert.

Substratherstellung:

Das radioaktiv markierte Substrat wurde von der Fa. Amersham bezogen, die Aktivität betrug für D-(^{14}C) Lactat 50 $\mu\text{C}/\text{ml}$ und 200 $\mu\text{C}/\text{ml}$ für L-(^{14}C) Lactat. Es wurden konzentrierte Stammlösungen mit unmarkiertem Substrat hergestellt und mit Aqua dest. auf die gewünschte Konzentration verdünnt, wobei folgende Mengen des markierten Substrates zugesetzt wurden:

Lactat (unmarkiert)	L-(^{14}C) Lactat	D-(^{14}C)Lactat
bis 0,05 mM	0,005 ml	0,02 ml
bis 0,15 mM	0,010 ml	--
bis 0,25 mM	0,012 ml	0,04 ml
bis 0,70 mM	0,015 ml	0,06 ml
bis 1,50 mM	0,025 ml	0,10 ml
bis 3,00 mM	--	0,15 ml

Es wurden Portionen zu 0,5 ml des jeweiligen Substrates angesetzt und L-Lactat bei -20°C bzw. D-Lactat bei 4°C aufbewahrt. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Substrates wurden 0,02 ml von jeder Konzentration zu 4 ml Szintillations-Lösung pipettiert und in einem Liquid Scintillation Counter (Rackbeta 1214, LKB) gezählt.

Schnelle Membranfiltration:**Reaktionsansatz:**

0,475 ml	30 mM Tris-HCl/10 mM NaCl/10 mM KCl	pH 7,5
0,050 ml	Substrat (markiertes D- bzw. L-Lactat)	
0,025 ml	konz. Zellsuspension (OD im Ansatz: 4-6)	

Zellsuspension und Puffer ergaben immer ein konstantes Volumen von 0,5 ml, so daß je nach Dichte der Zellsuspension die Menge des Puffers variiert wurde. Alle kinetischen Messungen wurden bei 25°C durchgeführt, wobei die Eppendorfg Gefäße in ein entsprechend temperiertes Wasserbad eintauchten. Der Start der Re-

aktion erfolgte durch Zugabe der Zellen. Nach 30, 90 und 180 Sekunden wurden jeweils 0,1 ml dem Reaktionsansatz entnommen und schnell zu 0,85 ml eiskalten Testpuffers pipettiert. Dieser Puffer enthielt zusätzlich 10 mM D,L-Lactat, um die weitere Aufnahme von markiertem Substrat zu verhindern. Dieser Ansatz wurde dann mit einer Filtrationsanlage (Vakuum Mehrfachfiltrationsanlage, VF 1, Fa.Amicon) filtriert, wobei die Zellen mit dem aufgenommenen Substrat auf dem Filter (Glassfilter GF/F, Whatman) zurückblieben. Anschließend wurde noch zweimal mit 5 ml eiskaltem Puffer gewaschen, um unspezifisch an die Zellen gebundene Radioaktivität zu entfernen. Die Filter wurden dann in Szintillationsgefäße überführt, 20 Minuten im Trockenschrank bei 100°C getrocknet, 8 ml Szintillations-Lösung zugegeben und gezählt.

Auswertung:

Für jeden Testansatz wurde eine Kinetik - Anzahl der Counts gegen die Zeit- aufgetragen. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse gab die Anzahl der Counts an, welche infolge unspezifischer Substratbindung durch die Zellen auftraten. Die Counts der Meßpunkte wurden daher um diesen Betrag korrigiert. Mit den korrigierten Werten und aus der spezifischen Aktivität eines Substrates wurde die Aufnahmerate in nmol/min x mg TG berechnet.

III. ERGEBNISSE

1. Isolierung von Mutanten mit verbesserter Hydroxybutyrat-Verwertung und deren Charakterisierung

D,L-2-Hydroxybutyrat (im folgenden mit Hydroxybutyrat oder HB bezeichnet) eignet sich als Vorstufe für die Isoleucinbildung (Matsushima und Mase, 1973; Updike und Calton, 1982; Scheer, 1985). Analysen des Fermentationsmediums hatten ergeben, daß *C. glutamicum* 14310 fast ausschließlich die L-Form des Racemates umsetzte, wogegen das D-Isomer nur zu einem geringen Teil verwertet wurde (Scheer, 1985). Daher war es das Ziel, einen Stamm zu isolieren, welcher auch das D-Isomer zu 2-Ketobutyrat (im folgenden mit Ketobutyrat bezeichnet) oxidiert und es somit für die Isoleucinbildung zur Verfügung steht.

1.1 Selektion der Mutanten

Nachweis der an der Hydroxybutyrat-Oxidation beteiligten Enzyme

Im Gegensatz zu den NAD-abhängigen Lactatdehydrogenasen katalysieren die NAD-unabhängigen die Bildung von Pyruvat aus Lactat, so daß die Organismen Lactat als Kohlenstoffquelle nutzen können (Garvie, 1980). Für *E. coli* (Futai, 1973) und *Desulfovibrio vulgaris* (Ogata et al., 1981) ist beschrieben, daß die NAD-unabhängige D-LDH auch Hydroxybutyrat zu Ketobutyrat oxidiert. Es lag deswegen nahe anzunehmen, daß eine D-LDH in *C. glutamicum* vorhanden ist, die auch D-HB oxidiert. Um dies zu überprüfen wurde Rohextrakt von Glucose-gewachsenen Zellen mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese aufgetrennt und eine anschließende Aktivitätsfärbung durchgeführt. Dazu wurde das Gel entsprechend zerteilt und in Ansätzen, welche die Lactat-Isomere sowie die Racemate von Lactat und HB enthielten, inkubiert.

Das Ergebnis dieser Analyse (Abb.6) zeigte, daß geringfügige Unterschiede hinsichtlich der elektrophoretischen Beweglichkeit der L- bzw. D-Lactat-Oxidation auftraten. So war die Wanderungsgeschwindigkeit für die L-Lactat-Oxidation etwas geringer und ergab zudem eine schmalere Bande als vergleichsweise für die D-Lactat-Oxidation. Enthielt der Testansatz sowohl L- als auch D-Lactat so ergab der Nachweis der Enzymaktivität eine breitere Bande als nur für eines der Isomere. Dies zeigt, daß genau wie bei *Pseudomonas aeruginosa* (Brown und Tata, 1987), *Acinetobacter calcoaceticus* (Allison et al., 1985) und *Propionibacterium freudenreichii* (Crow, 1986) vermutlich zwei stereospezifische LDH vorhanden sind. Da die HB oxidierende Aktivität das gleiche Laufverhalten zeigt wie die Lactat oxidierende, ist es sehr wahrscheinlich, daß beide Reaktionen von den Lactatdehydrogenasen katalysiert werden.

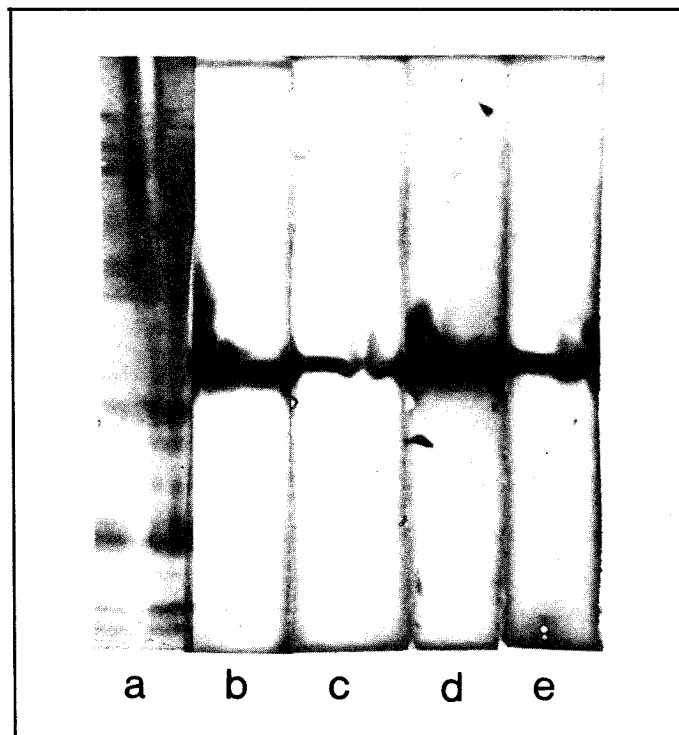


Abb.6: Gelelektrophoretische Auftrennung eines Rohextraktes von *C. glutamicum* nach Wachstum auf Glucose mit anschließender Proteinfärbung (a) und Aktivitätsfärbung für verschiedene Substrate (b-e); b: D-Lactat; c: L-Lactat; d: D,L-Lactat; e: D,L-Hydroxybutyrat

Isolierung von Mutanten mit verbessertem Wachstum auf D-Lactat

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese wiesen darauf hin, daß Mutanten mit erhöhter D-LDH-Aktivität eine vermehrte D-HB-Oxidation bewirken sollten. Als Kriterium zur Isolierung solcher Mutanten wurde verbessertes Wachstum auf D-Lactat gewählt. Hierzu wurden Kulturröhrchen angelegt, welche jeweils 4 ml Mineralsalzmedium mit 0.5% D-Lactat als verwertbare Kohlenstoffquelle enthielten.

Diese Selektion erfolgte sowohl für den Stamm 14310, welcher Leucin-auxotroph ist und bisher die größte Menge Isoleucin aus HB bildete (Scheer, 1985), als auch für den Wildstamm 13032. Gleichzeitig wurden auch Kulturen mit L-Lactat angelegt, da die Organismen diese C-Quelle deutlich besser verwerten, so daß ein Vergleich zum Wachstum auf D-Lactat gegeben war.

Zweimal pro Tag wurde die optische Dichte der Kulturen bestimmt und nach deutlichem Anwachsen in frisches Nährmedium überimpft. Nach anfänglich sehr zögerndem Wachstum auf D-Lactat verbesserte sich dieses zunehmend und die Selektion wurde nach 20 Passagen (ca. 4 Wochen) beendet. Das Wachstumsverhalten der beiden Stämme vor (t_1) und nach der Anreicherung (t_2) ist in Tab.3 zusammengefaßt.

Tab.3: Änderung der optischen Dichte (OD_{600}) innerhalb von 16 Stunden zu Beginn (t_1) und nach Beendigung (t_2) der Selektion für *C. glutamicum* 13032 und 14310.

Stamm	Änderung der OD_{600}			
	<u>D-Lactat</u>		<u>L-Lactat</u>	
	t_1	t_2	t_1	t_2
13032	0,03	0,15	0,38	1,52
14310	0,04	0,16	0,43	1,04

Wie aus der Tabelle hervorgeht, betrug die Zunahme der optischen Dichte für die adaptierten Kulturen nun 0.15 bzw. 0.16 im Gegen-

satz zu 0.03 bzw. 0.04 zu Beginn der Selektion, d.h. D-Lactat konnte von den Organismen nun deutlich besser als Substrat genutzt werden. Darüber hinaus zeigte sich, daß die bereits gute Verwertbarkeit von L-Lactat ebenfalls noch gesteigert werden konnte.

Nach dieser Anreicherung wurden Verdünnungen der D-Lactat-gewachsenen Kulturen auf Minimalmedium mit D-Lactat ausplattiert. Die hochgewachsenen Kolonien waren unterschiedlich groß, neben überwiegend kleinen, gab es einige deutlich größere Kolonien, welche zur weiteren Überprüfung isoliert wurden. Ausgehend vom Stamm 13032 wurden fünf und vom Stamm 14310 vierzehn Einzelkolonien isoliert.

1.2 Isoleucinbildung der isolierten Stämme

Die isolierten Stämme wurden in Fermentationsansätzen auf verbesserte Fähigkeit zur Isoleucinbildung aus HB untersucht. Das verwendete Medium (IV) enthielt 4% Glucose, 150 mM HB und 0,2 g/l Leucin, um das Wachstum der Abkömmlinge des auxotrophen Stammes 14310 zu ermöglichen. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde die gebildete Menge Isoleucin sowie die der verbliebenen Vorstufe bestimmt (Tab.4).

Aus Tab.4 ist zu entnehmen, daß einige der isolierten Mutanten eine deutlich gesteigerte Verwertung der Vorstufe aufwiesen. Dies zeigt, daß das gewählte Selektionssystem geeignet war, um Mutanten mit erhöhter D-HB-Verwertung zu isolieren. Diese erhöhte D-HB-Verwertung führte bei den Abkömmlingen DL3 und DL4 zu einer Steigerung der Isoleucinbildung um 27 bzw.39%.

Bei den Abkömmlingen des Stammes 13032 lagen die Verhältnisse anders, denn obwohl die Vorstufe fast vollständig aufgenommen wurde (102 und 103) blieb die gebildete Menge Isoleucin gering.

Tab.4: Isoleucinbildung und Verbrauch von Hydroxybutyrat der Mutanten von *C. glutamicum* 13032 sowie 14310. Das Medium enthielt zu Beginn 150 mM HB und die Inkubationszeit betrug 72 Stunden.

Stamm	Isoleucin (mM)	Hydroxy- butyrat (mM)	OD ₆₀₀ max
13032	15,9	70,8	52
DL-101	28,8	18,8	58
DL-102	36,6	7,8	56
DL-103	26,7	3,8	53
DL-104	23,3	18,6	56
DL-105	19,6	32,3	55
14310	75,3	42,5	57
DL1	85,7	14,1	58
DL3	96,1	7,3	55
DL4	105,2	2,5	53
DL5	80,3	38,6	63
DL6	74,7	31,4	57
DL7	77,0	33,4	51
DL8	74,5	23,7	42
DL9	74,4	25,5	51
DL10	77,5	34,2	51
DL11	76,8	30,4	62
DL12	76,3	35,1	55
DL13	80,5	32,6	61
DL14	91,1	18,7	57
DL15	91,7	11,5	68

Dieses Ergebnis überraschte zunächst, da erwartet worden war, daß bei gleich guter Verwertbarkeit, auch diese Stämme große Mengen Isoleucin ausscheiden würden. Prinzipiell ist der Stamm

13032 jedoch als Isoleucin-Produzent geeignet, denn er bildet aus 170 mM Ketobutyrat 90-100 mM Isoleucin (Eggeling, 1986). Um nun auszuschließen, daß die Derivate des Wildstammes durch andere Mutationen die Fähigkeit zur Isoleucinproduktion verloren hatten, wurden mit den Stämmen 102-105 Testfermentationen mit Ketobutyrat als Vorstufe durchgeführt. Es ergaben sich keine vom Stamm 13032 abweichenden Ergebnisse, so daß diese Möglichkeit auszuschließen war und eher auf ein Regulationsphänomen hindeuteten. Wie in Abschnitt 1.4 gezeigt werden wird, handelt es sich um die Regulation der Acetohydroxysäuresynthase (AHAS). Erfolgt eine Derepression dieses Enzyms, so bilden auch die Stämme 102 und 103 die gleiche Menge Isoleucin wie der Stamm DL4.

Zeitlicher Verlauf der Abnahme von D- und L-Hydroxybutyrat

Die Mutante DL4 verbrauchte die eingesetzte Vorstufe vollständig, während das D-Isomer vom Stamm 14310 nur zu einem geringen Teil aufgenommen wurde. Zudem nahm der Stamm 14310 D-HB mit einer deutlichen zeitlichen Verzögerung gegenüber dem L-Isomer auf. Zu Verdeutlichung ist die Abhängigkeit der Hydroxybutyrat-Aufnahme von der Inkubationszeit für den Stamm 14310 in Abb.7 dargestellt (Scheer, 1985). Die Analyse des Fermentationsmediums der Mutante DL4 sollte nun zeigen, wie der zeitliche Verlauf der Abnahme des D- bzw. L-Isomers aussah. Hierbei sollte ermittelt werden, ob die Mutante die Isomere gleichzeitig aufnahm, oder für das D-Isomer ebenfalls eine zeitliche Verzögerung zu beobachten war.

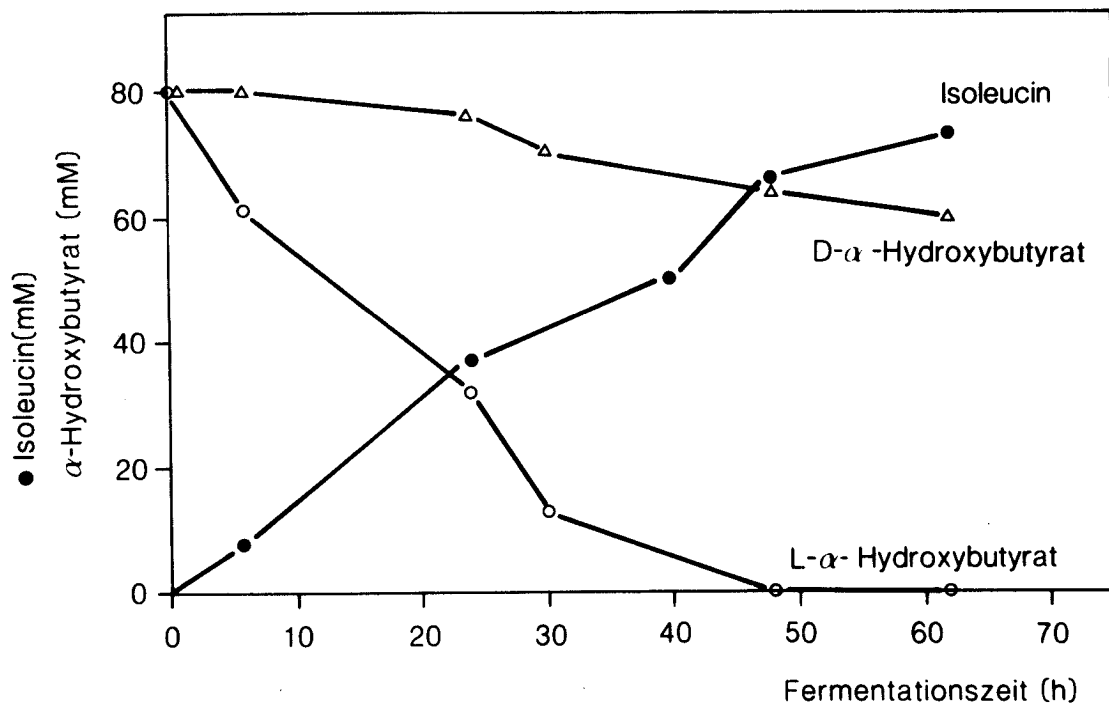


Abb.7: Zeitlicher Verlauf der Abnahme von D- und L-Hydroxybutyrat während einer Fermentation mit *C. glutamicum* 14310

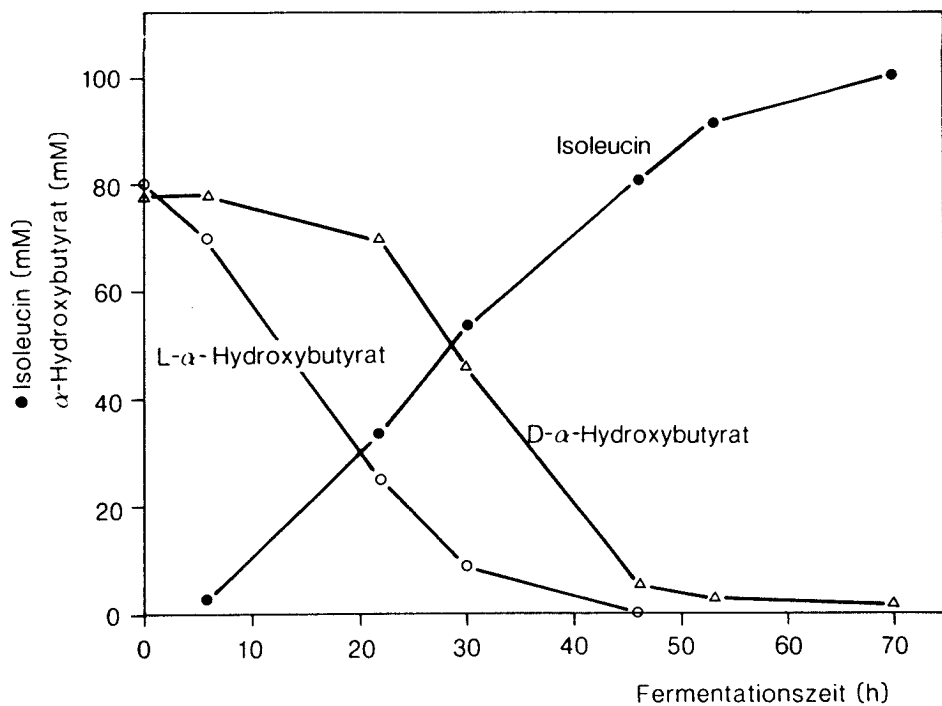


Abb.8: Zeitlicher Verlauf der Abnahme von D- und L-Hydroxybutyrat während einer Fermentation mit dem Stamm 14310-DL4

Wie die Abb.8 zeigt, nahm der Stamm 14310-DL4 (im folgendem mit DL4 bezeichnet) D,L-HB vollständig auf mit Bevorzugung des L-Isomers. Eine deutliche Abnahme des D-Isomers erfolgte erst nach 24 Stunden, es wurde jedoch anschließend ebenso rasch verbraucht wie das L-Isomer und nach 46 Stunden entsprach die verbliebene Menge weniger als 5% der eingesetzten Vorstufe.

Damit war es gelungen einen Stamm zu isolieren, der nun auch das D-Isomer vollständig aufnimmt, es bleibt jedoch die Frage offen, aus welchem Grund die beiden Isomere so unterschiedlich verwertet werden. Es besteht die Möglichkeit, daß zum einen das Aufnahmesystem, zum anderen die anschließenden Dehydrogenasen eine höhere Affinität für das L-Isomer aufweisen.

1.3 Aktivität der D-und L-Lactatdehydrogenase

Bislang war für die Stämme DL4 und DL3 gezeigt worden, daß sie die Vorstufe HB besser verwerten und mehr Isoleucin bilden. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten der L- und D-Lactatdehydrogenase sollte zeigen, inwieweit enzymatische Unterschiede zum Elternstamm vorlagen.

Dazu wurden die Stämme in Mineralsalzmedium mit 4% Glucose angezogen und die Enzymaktivitäten im Rohextrakt bestimmt. Die Ergebnisse sind Tab.5 zu entnehmen.

Tab.5: Vergleich der spezifischen Aktivität der D- und L-Lactatdehydrogenase für die Stämme 14310, DL3 und DL4

Stamm	spez. Aktivität (U/mg) für die Substrate		
	L-Lactat	D-Lactat	D,L-HB
14310	0,11	0,11	0,018
DL3	0,11	0,24	0,021
DL4	0,12	0,38	0,030

Der Vergleich der Enzymaktivitäten zeigte, daß die Mutanten eine 2-3 fach erhöhte D-LDH-Aktivität aufweisen, bzw. der Stamm DL4 auch eine verbesserte HB-Oxidation. Hingegen war die spezifische Aktivität der L-LDH unverändert.

Diese Ergebnisse könnten bedeuten, daß die verbesserte D-HB-Verwertung der Mutanten eine Folge der erhöhten D-LDH-Aktivität ist, welche bei dem Stamm 14310 nicht ausreicht, D-HB im Verlauf einer Fermentation zu Ketobutyrat zu oxidieren.

Vergleich der K_m -Werte

Um zu überprüfen, ob neben der erhöhten spezifischen Aktivität die D-LDH auch eine veränderte Affinität aufweist, wurden für den Stamm 14310 und DL4 die K_m -Werte im Rohextrakt verglichen.

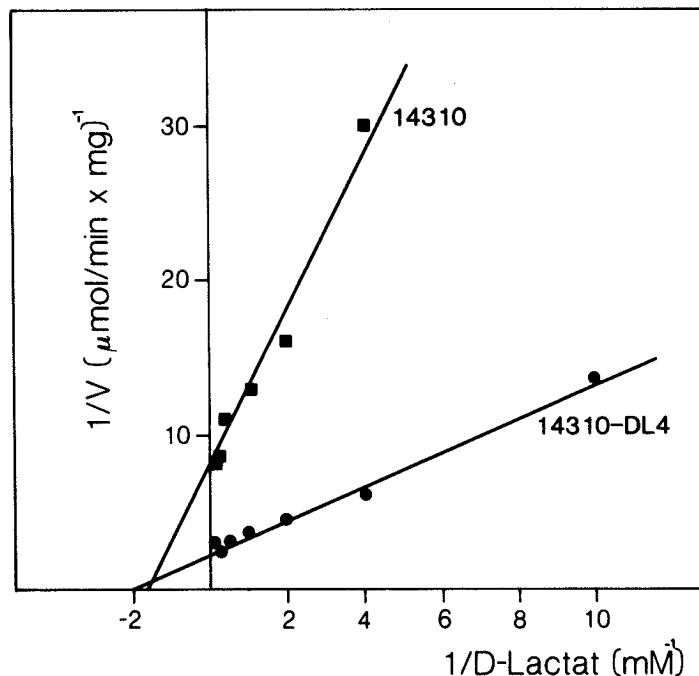


Abb.9: Vergleich der K_m -Werte für die D-Lactatdehydrogenase des Stammes 14310 und DL4 (Lineweaver-Burk-Auftragung)

Wie aus Abb.9 zu ersehen ist, betrug der K_m -Wert für den Stamm 14310 0.59 mMol und für die Mutante DL4 0.53 mMol. Dies bedeutet, daß die Mutante hinsichtlich der Enzymaffinität unverändert ist.

1.4 Einfluß von Leucin und Hydroxybutyrat auf die Aktivität der Acetohydroxysäuresynthase

Trotz der deutlich verbesserten Verwertung von Hydroxybutyrat bildeten die Abkömmlinge des Wildstammes (101-105) nur geringe Mengen Isoleucin. Dies beruhte möglicherweise auf einer geringen spezifischen Aktivität der AHAS. Wie Untersuchungen zur Isoleucinbildung aus Ketobutytrat gezeigt hatten, wurden nur unter Fermentationsbedingungen, welche zu einer Derepression des Enzyms führten, große Mengen Isoleucin gebildet. Diese Derepression erfolgt bei einem internen Mangel an Valin und Leucin, der durch den Zusatz von Ketobutytrat hervorgerufen wird (Baumgarten, 1969; Eggeling et al., 1987).

Da der Stamm 14310 bereits Leucin-auxotroph ist und die Kultivierung unter Leucin-limitierten Bedingungen erfolgt (Scheer, 1985), sollten für diesen Stamm und dessen Abkömmlinge die Voraussetzungen bereits erfüllt sein. Um diese Überlegungen zu überprüfen, wurden der Einfluß der Kulturbedingungen auf die spezifische Aktivität der AHAS vergleichend für den Stamm 13032 und 14310 untersucht.

Wie die Ergebnisse der Tab. 6 zeigen, führte bei dem Stamm 14310 die Kultivierung unter Leucin-Limitierung (1.5 mM) zu einer zweifach erhöhten spezifischen Aktivität der AHAS, welche durch Kultivierung unter Fermentationsbedingungen nochmals deutlich anstieg. Bei dem Stamm 13032 führte der Zusatz von HB ebenfalls zu einer erhöhten Enzymaktivität (0,07 U/mg), jedoch war die spez. Aktivität deutlich niedriger als bei dem Stamm 14310 nach Zugabe von HB. Demnach führte der Zusatz von HB zu einem schwächeren Mangel von Leucin und Valin als im Vergleich zu Kulturbedingungen, bei denen Ketobutytrat dem Medium zugesetzt wurde. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß im Zellinnern nach Zugabe von HB nur eine geringe Konzentration von Ketobutytrat vorliegt, da dieses zunächst aus HB gebildet wird.

Tab.6: Spezifische Aktivität der Acetohydroxysäuresynthase für *C. glutamicum* 13032 und 14310 in Abhängigkeit der Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in Fermentationsmedium mit den angegebenen Zusätzen angezogen und in der mittleren exponentiellen Phase geerntet.

Stamm	Zusatz von	spez. Aktivität (U/mg)
13032	---	0,03
13032	100 mM Hydroxybutyrat	0,07
13032	100 mM Ketobutyrat	0,39
14310	3.0 mM Leucin	0,03
14310	1.5 mM Leucin	0,07
14310	1.5 mM Leucin + 100 mM Hydroxybutyrat	0,17

Eine Überprüfung dieser Ergebnisse sollte möglich sein, durch die Isolierung Leucin-auxotropher Mutanten des Stammes 13032-102. Nach einer Mutagenese mit NMG wurden von diesem Stamm fünf Mutanten isoliert, welche nur in Leucin-supplimentiertem Medium wachsen konnten. Diese Stämme wurden in Fermentationsansätzen mit 150 mM HB kultiviert und die gebildete Menge Isoleucin bestimmt. Alle Stämme bildeten mehr Isoleucin als der Stamm 13032-102. Vier dieser Mutanten schieden 70-80 mM Isoleucin aus, und ein Stamm bildete die gleiche Menge Isoleucin (ca. 100 mM) wie die Mutante DL4.

2. Untersuchungen zur Isoleucinbildung

2.1 Isoleucinbildung bei verschiedenen Hydroxybutyrat-Konzentrationen

Wie bereits aus früheren Untersuchungen zur Isoleucin-Bildung aus Ketobutyrat (Eggeling, 1986) und Hydroxybutyrat (Scheer, 1985) bekannt ist, ist die erzielte Endkonzentration abhängig von der Konzentration der eingesetzten Vorstufe. Die Ausbeute sinkt jedoch bei hohen Konzentrationen, was für die Wirtschaftlichkeit eines Verfahrens nachteilig ist.

Ausgehend von 150-200 mM Hydroxybutyrat, die sich als günstig erwiesen hatten, betrug die Ausbeute bei dem Stamm 14310 ca. 50%. Auch für den nun verbesserten Stamm DL4 sollte die Isoleucinbildung in Abhängigkeit der Hydroxybutyrat-Konzentration bestimmt werden, um die günstigsten Fermentationsbedingungen zu ermitteln. Diese Ergebnisse und die daraus ermittelte Ausbeute und der Umsatz sind in Tab.7 zusammengefaßt.

Tab.7: Isoleucinbildung, Ausbeute und Umsatz in Abhängigkeit der vorgelegten Hydroxybutyrat-Konzentration für den Stamm DL4

Hydroxy- butyrat (mM)	Isoleucin (mM)	Umsatz (%)	Ausbeute (%)	Valin (mM)
39	25	67	64	35
54	34	64	63	34
82	58	72	71	31
96	72	75	76	26
149	104	71	70	16
197	110	60	58	13

Stamm 14310				
153	73	58	43	17
195	82	50	37	16

Wie der Tab.7 zu entnehmen ist, weist die Mutante DL4 eine deutlich verbesserte Ausbeute auf, sie konnte von 43% auf ca. 70% gesteigert werden. Diese Zunahme war darauf zurückzuführen, daß nunmehr die Vorstufe vollständig aufgenommen wurde und somit mehr Ketobutyrat für die Isoleucinbildung zur Verfügung stand. Das erklärt auch, warum die Werte für Umsatz und Ausbeute kaum voneinander abweichen. Bei dem Stamm 14310 war die Ausbeute gegenüber dem Umsatz noch deutlich reduziert gewesen, da der Stamm nur wenig D-HB verwertete. Die Ergebnisse zeigen weiter, daß es empfehlenswert ist, 100-150 mM Hydroxybutyrat vorzulegen. Werden höhere Konzentrationen eingesetzt, so erfolgt eine Reduzierung der Umsätze, bei niedrigeren Konzentrationen entstehen zusätzlich äquimolare Mengen Valin.

In Abb.10 ist nun der Verlauf einer Isoleucin-Fermentation ausgehend von ca. 160 mM Hydroxybutyrat dargestellt.

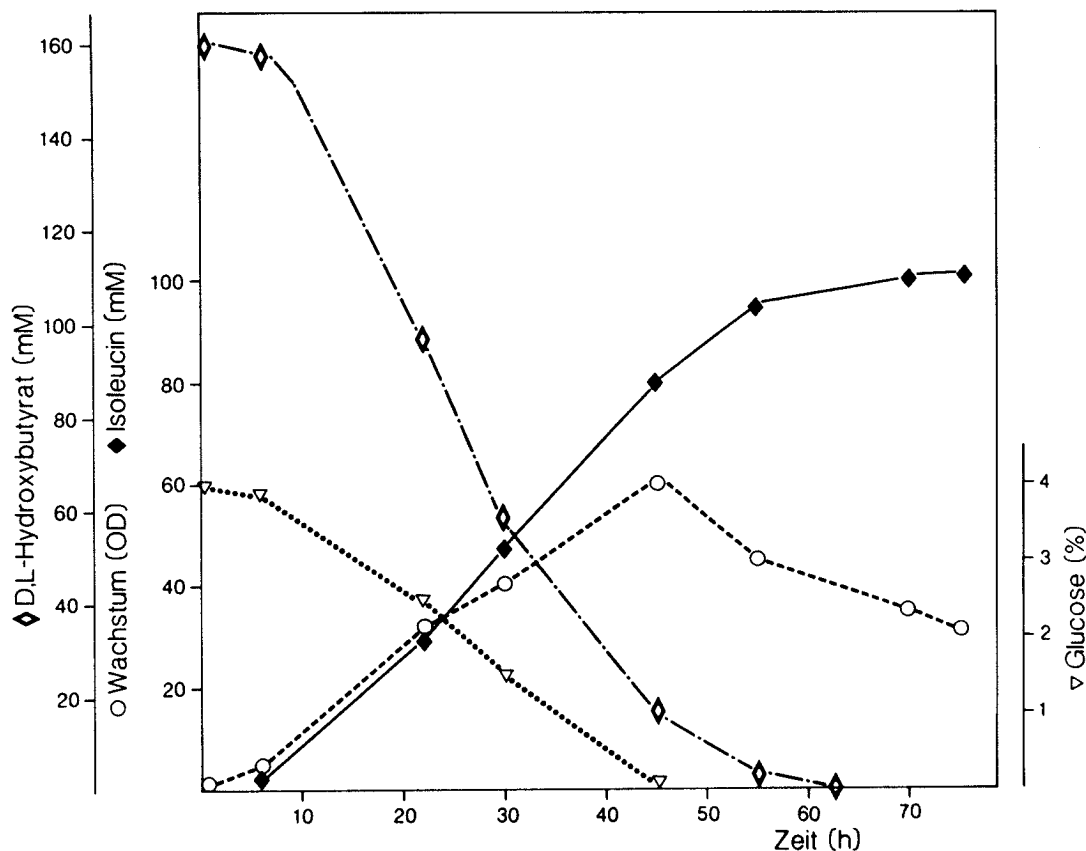


Abb.10: Zeitlicher Verlauf der Isoleucinbildung aus Hydroxybutyrat mit *C. glutamicum* DL4
Das Fermentationsmedium enthielt 160 mM HB, 4% Glucose und 0.2 g/l Leucin.

Die Produktbildung verlief parallel zum Wachstum, welches nach ca. 45 Stunden abgeschlossen war. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Glucose verbraucht und bereits 80% des maximal gebildeten Isoleucins ausgeschieden. Nach weiteren 25 Stunden war die Isoleucinbildung abgeschlossen; die Energie für diese weitere Produktbildung wird vermutlich aus Lactat und Acetat gewonnen, welches nach dem Abbau der Glucose in einer Konzentration von 10 mM im Fermentationsmedium vorliegt, nach 70 Stunden jedoch verbraucht ist.

2.2 Einfluß der Hydroxybutyrat-Qualität auf die Isoleucinbildung

Für die Rentabilität der Aminosäureproduktion aus Vorstufen ist es entscheidend, die Kosten für diese gering zu halten. Das setzt u.a. voraus, daß Produkte eingesetzt werden können, die im Anschluß an die Synthese nur wenig aufgearbeitet werden müssen. Für diese Versuche wurde von der Degussa AG Hydroxybutyrat verschiedener Qualität, d.h. unterschiedlicher Reinheitsstufen, zur Verfügung gestellt und getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab.8 zusammengefaßt.

Es wird deutlich, daß es für eine gute Isoleucinbildung nicht erforderlich ist, sauberes Hydroxybutyrat einzusetzen. Vielmehr wies sogar das Rohprodukt (V), welches zusätzlich hohe Salzkonzentrationen enthielt eine vergleichbare Ausbeute auf und kann daher problemlos eingesetzt werden. Die in diesem Produkt ebenfalls enthaltene hohe Ammoniumkonzentration störte nicht, so daß auch die Zusammensetzung des Fermentationsmediums nicht geändert werden muß.

Tab.8: Isoleucinbildung aus Hydroxybutyrat unterschiedlicher Qualität

Die verschiedenen Produkte wurden, falls nötig, zunächst neutralisiert und anschließend getrennt autoklaviert dem Fermentationsmedium zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 73 Stunden.

Produkt	Hydroxyb. eingesetzt	Hydroxyb. bestimmt (mM)	Isoleucin (mM)	Ausbeute (%)
I (reines Na-Salz)	2 g	183	110	60
II (freie Säure, 98%)	2 g	215	103	48
III) (Rohprodukt, 86%)	2 g	197	111	57
IV (wässrige Lösung, 48%)	2 ml	81	63	78
V (Rohprodukt, 34%; + NH_4Cl)	5 ml	169	109	65

2.3 Nachdosierung von Leucin, Glucose und Hydroxybutyrat

Wie bereits unter 2.1 beschrieben, ist es nicht sinnvoll, zu Beginn der Fermentation mehr als 160 mM Hydroxybutyrat vorzulegen. Daher wurde versucht, durch Nachdosierung der Vorstufe nach dem Anwachsen der Kulturen eine höhere Endkonzentration zu erzielen. Ferner wurde einigen Ansätzen nachträglich Glucose bzw. Leucin zugesetzt, um sicherzustellen, daß für die weitere Produktbildung genügend Energie und Leucin für die Proteinbiosynthese zur Verfügung steht.

Wie aus Tab.9 zu ersehen ist, ergab sich eine Steigerung der Isoleucinbildung um 28%, wenn zweimal jeweils 50 mM Hydroxybuty-

Tab.9: Steigerung der Isoleucinbildung durch Nachdosierung von Hydroxybutyrat, Glucose und Leucin

Das Medium enthielt zu Beginn der Fermentation 160 mM HB, 4% Glucose und 0,2 mg/ml Leucin. Nach 24 bzw. 45 h wurde, wie in der Tabelle angegeben nachdosiert. Die Angaben der Zusätze geben die Endkonzentration im Medium an.

Ansatz	Zusätze	nach (h)	OD ₆₀₀	Isoleucin (mM)	Begleitprodukte ¹ (mM)
1	--	-	42	90	AB: 2/ Val: 11
2	50 mM HB	24	40	94	AB: 4/ Val: 4
3	2 X 50 mM HB	24, 45	40	116	AB: 10/ Val: 4
4	100 mM HB	24	40	98	AB: 9/ Val: 3
5	0,1 mg/ml Leu	24	44	91	AB: 3/ Val: 9
6	0,2 mg/ml Leu	24	46	70	AB: 3/ Val: 8
7	wie 4) + 0,05 mg/ml Leu	24	41	97	AB: 11/ Val: 3
8	wie 7) + 2% Glucose	24	43	121	AB: 5/ Val: 6
					Glutamat: 9

¹ AB: 2-Aminobutyrat Val: Valin

rat nachdosiert wurde, sowie eine Erhöhung um 34% bei zusätzlich gegebenem Leucin und Glucose. Weiterhin zeigte es sich, daß die Zellen nicht Leucin-limitiert waren und darüber hinaus der Zusatz von 0,2 mg/ml die Isoleucinbildung bereits hemmte. Durch die Nachdosierung betrug die erzielte Endkonzentration ca. 16 g/l Isoleucin, jedoch reduzierte sich die Ausbeute von 70% auf 46%. Ferner ergab die Analyse des Fermentationsmediums, daß bei Nachdosierung der Vorstufe mehr 2-Aminobutyrate gebildet wurde. Dies entsteht aus der Transaminierung von Ketobutyrate durch die Transaminase C, welche anstelle von Pyruvat, ihrem eigentlichen Substrat, auch Ketobutyrate akzeptiert und zu 2-Aminobutyrate umsetzt (Tan-Wilson, 1973; Wong et al., 1979).

2.4 Nebenprodukte bei der Isoleucinbildung

Bei der Isoleucinfermentation aus Hydroxybutyrate werden maximal 70% der eingesetzten Vorstufe zu Isoleucin umgesetzt, obwohl der Stamm DL4 die Vorstufe vollständig verbraucht. Da pro Mol eingesetztem HB ein Mol Isoleucin gebildet werden kann, wird demnach ein Teil der Vorstufe nicht zu Isoleucin umgewandelt. Wilhelm (1987) konnte zeigen, daß unter diesen Fermentationsbedingungen im Kulturfiltrat ca. 1 mM Ketobutyrate und 5 mM 2-Keto- β -methylvalerat (Ketoisoleucin) nachweisbar waren. Diese Verbindungen sind natürliche Intermediärprodukte der Isoleucin-Biosynthese, während der ebenfalls bestimmte Methylbutyraldehyd (ca. 10 mM) und Propionaldehyd (max. 2 mM) durch chemische Decarboxylierung aus der entsprechenden Ketosäure entstanden ist (Abb.11). Katalysator dieser Decarboxylierung sind vermutlich Mangan-Ionen, welche als Spurenelemente im Fermentationsmedium enthalten sind (Cooper et al., 1983).

Die durchgeführten Untersuchungen zur Nebenproduktbildung sollten zum Vergleich des Stammes 13032-102 mit dem Wildtyp bzw. der Mutante DL4 herangezogen werden. Dieser Abkömmling des Stammes 13032 nahm die Vorstufe vollständig auf, erreichte jedoch nur eine 24% ige molare Ausbeute für Isoleucin. Daher könnte dieser Stamm zeigen, ob unter den Bedingungen eines Ketobutyrate-Ansatzes (niedrige AHAS-Aktivität) eine verstärkte Nebenproduktbildung erfolgt. Indizien hierfür wären eine erhöhte Konzen-

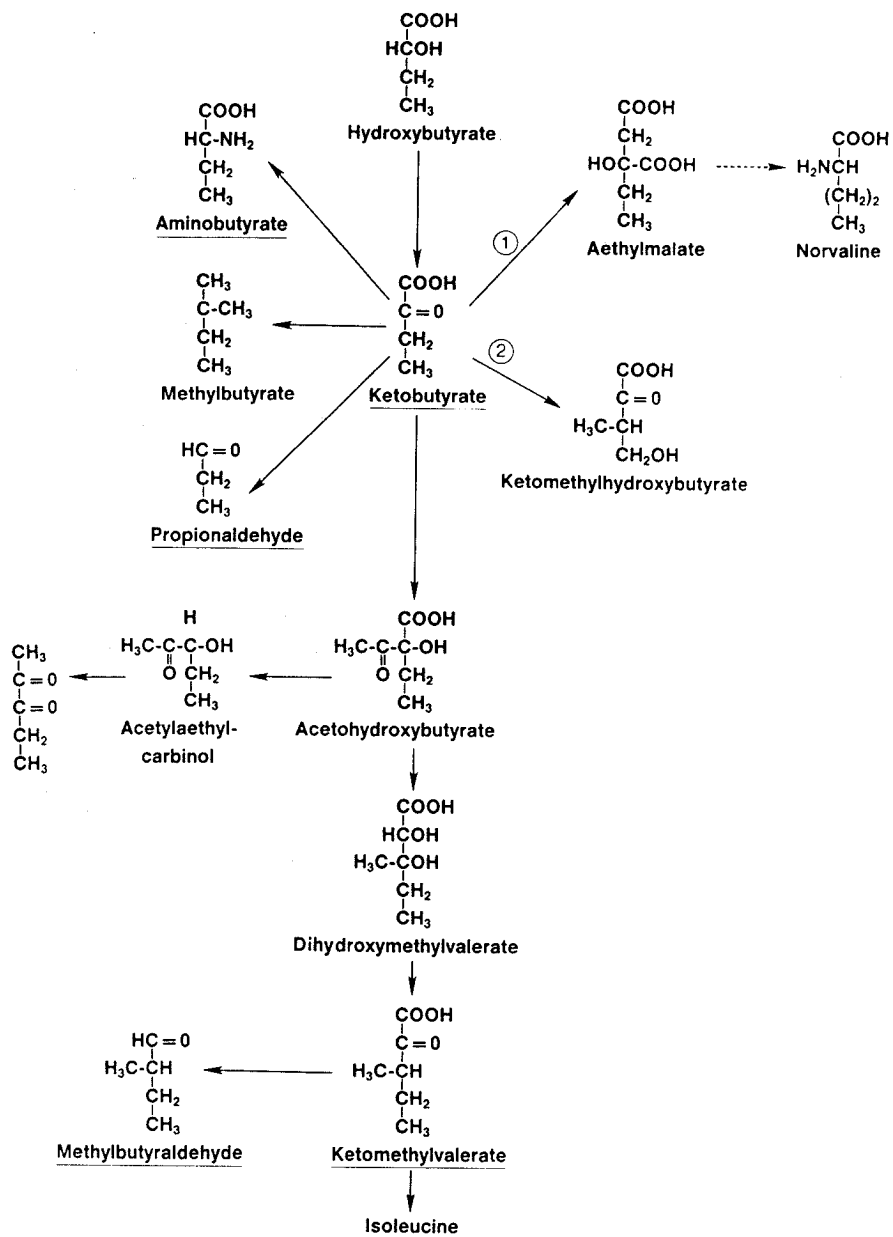


Abb.11: Übersicht über die Entstehung von Nebenprodukten bei der Isoleucinbildung (Mitte)

1: Isopropylmalatsynthase

2: Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase

_____ : Bei der Untersuchung erfaßte Produkte

tration von Ketobutytrat, 2-Aminobutytrat und Propionaldehyd im Kulturfiltrat. Hierzu wurden die Zellen unter Fermentationsbedingungen angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten die in Abb.11 unterstrichenen Produkte quantitativ bestimmt.

Wie der Tab.10 zu entnehmen ist, konnten die von Wilhelm (1987) bestimmten Konzentrationen für Ketoisoleucin und Methylbutyraldehyd nicht bestätigt werden. Dies hatten ebenfalls die Untersuchungen von Nassenstein (1987) ergeben. Als mögliche Ursache käme die schwierige quantitative Bestimmung des Aldehyds in Betracht. Rückstände im Injektor des Gaschromatographen lassen darauf schließen, daß hier bereits ein Teil der Substanz zer setzt wird (Wilhelm, 1987).

Das Kulturfiltrat des Stammes 13032-102 wies erwartungsgemäß erhöhte Mengen Ketobutytrat auf. So wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit 2 mM Ketobutytrat nachgewiesen, während die anderen Stämme ca. 0,5 mM ausschieden. Ebenso enthielt das Filtrat zu diesem Zeitpunkt 3,3 mM 2-Aminobutytrat, welches von den anderen Stämmen nur in einer Konzentration von 0,5-1 mM gebildet wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß im Stamm 13032-102 die Verstoffwechselung von Ketobutytrat limitiert ist.

Überraschend war die erhöhte Konzentration von Ketoisoleucin, da die Ergebnisse von Nassenstein (1987) gezeigt hatten, daß die Transaminase B Reaktion in *C. glutamicum* nicht limitierend ist. Für die Abbauprodukte Propionaldehyd und Methylbutyraldehyd ergaben die Analysen keine deutlichen Unterschiede. Faßt man die Ergebnisse der Nebenproduktanalyse mit denen der Isoleucinbildung dieser Stämme zusammen (Tab.4), so ergibt die Summe der bestimmten Nebenprodukte und der gebildeten Menge Isoleucin keine vollständige Bilanz der Isoleucinbildung. Dies deutet darauf hin, daß bei der Analyse des Kulturfiltrates Substanzen nicht erfaßt wurden oder Zwischenprodukte intrazellulär in andere Stoffwechselwege abfließen.

Tab.10: Übersicht über den Anteil von Nebenprodukten bei der Isoleucinbildung
durch verschiedene Stämme von *C. glutamicum*

Stamm	Ketobutyrat(mM)			Propionaldehyd(mM)			Ketomethylvalerat(mM)			Methylbutyraldehyd(mM)		
	7 h	24 h	48 h	7 h	24 h	48 h	7 h	24 h	48 h	7 h	24 h	48 h
	nach	nach	nach	nach	nach	nach	nach	nach	nach	nach	nach	nach
14310	0,2	0,3	0	0,3	0,6	0,2	0,3	1,0	0	0,2	2,5	2,8
14310-DL4	0	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	1,7	0,3	4,5	1,7
13032	0,7	0,5	0	0,1	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5	0,2	2,0	2,1
13032-102	0,9	2,0	0,8	0,3	0,5	0,7	0,7	4,0	2,0	1,5	1,6	2,3

3. Untersuchungen zum Transport von D- und L-Lactat sowie Hydroxybutyrat

Für die Isoleucinbildung aus Hydroxybutyrat konnte bereits gezeigt werden, daß die Oxidation der Vorstufe durch Lactatdehydrogenasen erfolgt. Es war jedoch bislang ungeklärt, über welches Aufnahmesystem die Vorstufe in die Zelle gelangt. Daher wurde untersucht, welches Transportsystem daran beteiligt ist und welche Spezifität und kinetischen Eigenschaften es besitzt. Für diese Experimente wurden neben dem Stamm 14310 auch die Mutante DL4 eingesetzt. Wie die bisherigen Untersuchungen ergeben hatten, wies der Stamm DL4 eine verbesserte D-HB-Verwertung und Isoleucinbildung auf, sowie eine erhöhte spezifische Aktivität für die Oxidation von Hydroxybutyrat. Darüber hinaus ist auch ein verändertes Aufnahmesystem für D-HB denkbar, welches für den Elternstamm 14310 möglicherweise noch limitierend gewesen war. Direkte Aufnahmestudien für HB konnten nicht erfolgen, da dieses Substrat nicht radioaktiv markiert erhältlich war. Aufgrund der Tatsache jedoch, daß der Stamm DL4 über eine Anreicherungskultur mit D-Lactat als Kohlenstoffquelle isoliert worden war, lag nahe, daß Lactat und Hydroxybutyrat über ein gemeinsames Transportsystem in die Zelle gelangt.

Untersuchungen über das Lactat-Aufnahmesystem sind von Martin(1973) für *E. coli*, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas spec.* durchgeführt worden. Seine Ergebnisse deuten darauf hin, daß D- und L-Lactat über ein gemeinsames Transportsystem aufgenommen werden, welches jedoch keine Affinität zu Dicarbonsäuren zeigte und durch Glucose reprimiert wurde.

3.1. Aufnahmekinetik

Für die Aufnahmestudien wurde die Methode der schnellen Membranfiltration eingesetzt.

Zur Charakterisierung des Lactat-Transports wurde zunächst die Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von der L- und D-Lactat-Konzentration bestimmt. Hierzu wurden gewaschene Zellen des Stammes 14310 nach Anzucht mit Glucose eingesetzt.

Die Untersuchungen ergaben, daß die L-Lactat-Aufnahme kein Dif-

fusionsprozeß war, da die Transportgeschwindigkeit nicht proportional zur Substratkonzentration zunahm, sondern einen Sättigungswert erreichte. Die Kinetik entsprach einer Michaelis-Menten-Beziehung und nach Lineweaver-Burk Auftragung ergab sich ein K_m -Wert von 0.24 mM und V_{max} betrug 4,7 nmol/min x mg TG (Abb.12).

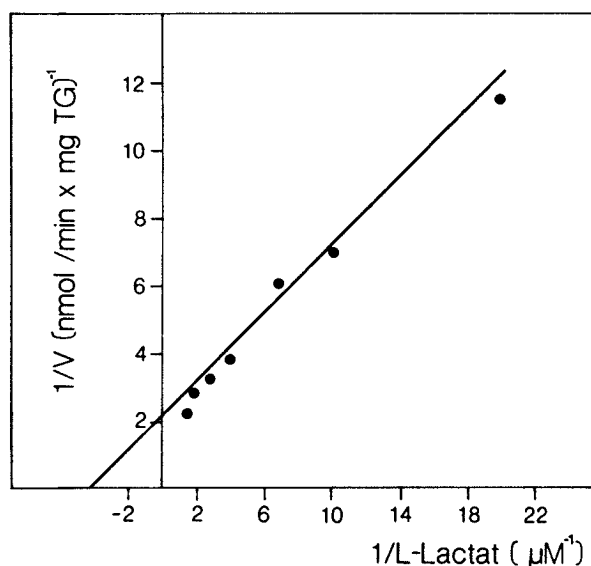


Abb.12: Reaktionsgeschwindigkeit der L-Lactat-Aufnahme in Abhängigkeit der Substratkonzentration bei *C. glutamicum* 14310 (Lineweaver-Burk Auftragung)
Während der Messungen betrug die optische Dichte 5,5 und nach jeweils 30, 90 und 180 Sekunden wurde dem Reaktionsansatz eine Probe entnommen und filtriert.

Eine entsprechende Kinetik für D-Lactat ergab ebenfalls eine Substratsättigungskurve. Der ermittelte K_m -Wert betrug 0,71 mM und V_{max} 28,6 nmol/min x mg TG (Abb.13). Somit hatte die D-Lactat-Aufnahme bei geringerer Affinität eine 6 fach erhöhte maximale Aufnahmerate.

Bedingt durch diese hohe Aufnahmerate für D-Lactat waren die Kinetiken über den normalen Meßzeitraum nicht linear, so daß nur die Werte nach 30 bzw. 60 Sekunden für eine Auswertung geeignet waren.

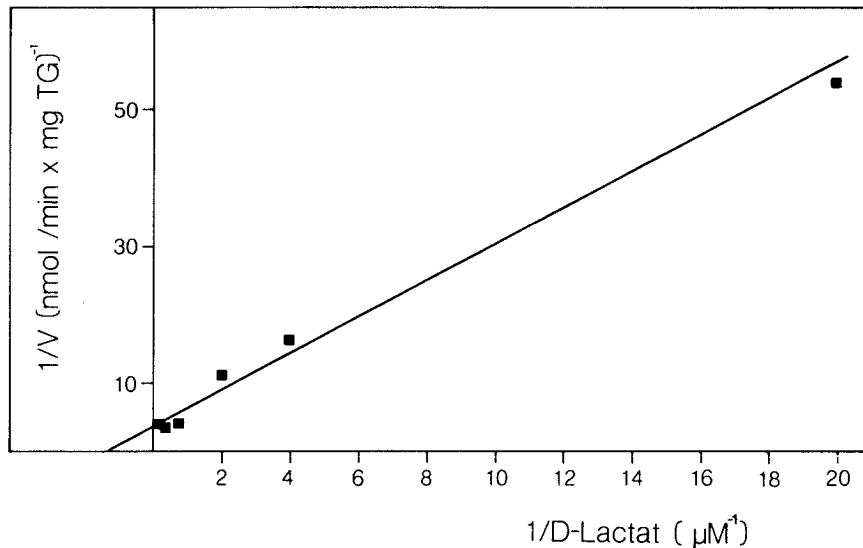


Abb.13: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der D-Lactat-Konzentration bei *C. glutamicum* 14310 (Lineweaver-Burk Auftragung)

Die optische Dichte im Reaktionsansatz betrug 4,0 und nach 30 bzw. 60 Sekunden wurde jeweils eine Probe entnommen und filtriert.

3.2 Vergleich der Aufnahmeaktivitäten zwischen dem Stamm 14310 und der Mutante DL4

Vergleichende Bestimmungen der Lactat-Aufnahmeraten zwischen der Mutante DL4 und dem Elternstamm sollten Aufschluß darüber geben, ob diese über ein verändertes Transportsystem für D-Lactat verfügt.

Wie diese Ergebnisse zeigen (Tab.11) ergaben sich Unterschiede beim Vergleich beider Stämme. So nahm die Mutante DL4 nach Wachstum auf Glucose kein L-Lactat mehr auf, ebenso war die D-Lactat-Aufnahme stark reduziert. Interessanterweise wurde dieser Unterschied durch Wachstum auf D,L-Lactat aufgehoben und für beide Stämme wurden ähnlich hohe spezifische Aufnahmeraten bestimmt. Unter diesen Kulturbedingungen wies die L-Lactat-Auf-

Tab.11: Vergleich der spezifischen Aufnahmerate von D- und L-Lactat für die Stämme 14310 und DL4 in Abhängigkeit der Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in Mineralsalzmedium(IV) unter Zusatz von 2% Lactat bzw. Glucose angezogen. Die Substratkonzentration im Reaktionsansatz betrug 0,7 mM für L-Lactat und 0,5 mM für D-Lactat.

C-Quelle	Stamm	<u>spez. Aufnahmerate (nmol/min x mg TG)</u>	
		L-Lactat	D-Lactat
Glucose	14310	4,5	11,2
	DL4	0	2,8
D,L-Lactat	14310	23,5	16,9
	DL4	20,0	17,1
Glucose/HB	DL4	2,8	8,5

nahme des Stammes 14310 eine 5 fach erhöhte spezifische Aktivität auf, wohingegen die D-Lactat-Aufnahme nur 1,5 fach erhöht war. Im Unterschied dazu war letztere bei dem Stamm DL4 6 fach erhöht im Vergleich zu Glucose gewachsenen Zellen. Der ebenfalls stimulierende Einfluß von Hydroxybutyrat deutet darauf hin, daß das Aufnahmesystem für Lactat sehr wahrscheinlich an dem Transport von Hydroxybutyrat beteiligt ist.

3.3 Konkurrenz der Lactat-Aufnahme

Durch Experimente zur kompetitiven Hemmung der Lactat-Aufnahme ist es möglich zu prüfen, ob Hydroxybutyrat auch über dieses System transportiert werden kann. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob D- und L-Lactat über ein gemeinsames Transportsystem aufgenommen werden. Die vergleichenden Untersuchungen wurden für den Stamm 14310 (Tab.12) und DL4 (Tab.13) durchgeführt, wobei letzterer neben Glucose auch mit Lactat angezogen wurde, um die L-Lactat-Aufnahme messen zu können.

Tab.12: Hemmung der Lactat-Aufnahme durch D- und L-Lactat sowie Hydroxybutyrat bei *C. glutamicum* 14310

Die Zellen wurden mit Glucose angezogen; für die Kompetitionsversuche enthielten die Reaktionsansätze neben 0,7 mM markiertem L- bzw. 0,5 mM markiertem D-Lactat 10 mM unmarkiertes Lactat bzw. 20 mM Hydroxybutyrat.

Zusatz	<u>L-Lactat-Aufnahme</u>		<u>D-Lactat-Aufnahme</u>	
	spez. Akt. (nmol/minxmg TG)	Hemmung (%)	spez. Akt. (nmol/minxmg TG)	Hemmung (%)
ohne	6,0	0	16,4	0
L-Lactat	1,4	77	8,3	49
D-Lactat	1,4	77	5,5	67
D,L-HB	1,5	75	12,7	23

Wie Tab.12 zu entnehmen ist, hemmten die zugesetzten unmarkierten Substrate die Aufnahme des markierten L-Lactat zu 75%. Der Zusatz von 10 mM des nicht markierten L-Lactat diente dabei als Kontrolle, da ein hoher Substratüberschuß den Transport des markierten L-Lactat deutlich hemmen sollte. Diese Hemmung sollte mindestens 90% betragen, jedoch konnte der theoretische Wert durch die Messungen nicht bestätigt werden. Ursache hierfür könnte ein weiteres L-Lactat-Aufnahmesystem sein, welches nur eine geringe Substrataffinität besitzt. Ein solches System wäre bei den Km-Wert Bestimmungen nicht erfaßt worden, da die Substratkonzentration für die Bestimmung der Aufnahmekinetiken maximal 1 mM betrug. Für die zu geringe Hemmung kommt ferner eine Diffusion von Lactat durch die Membran in Betracht, welche bei so hohen Substratkonzentrationen (10,5 mM) auftreten kann. Diese Diffusion wäre ebenfalls aus den bereits oben erwähnten experimentellen Gründen vorher nicht erfaßt worden. Abweichend zu der Aufnahme von L-Lactat wurde die D-Lactat-Aufnahme durch D- und L-Lactat verschieden stark gehemmt und durch die Zugabe von D,L-HB nur zu 23%.

Das Kompetitionsmuster für die L-Lactat-Aufnahme wies darauf hin, daß zumindest ein gemeinsames Transportsystem für L- und D-Lactat vorhanden ist, welches auch eine Affinität zu HB besitzt. Dem widersprach die schlechte kompetitive Hemmung der D-Lactat-Aufnahme durch unmarkiertes D-Lactat (67%) bzw. L-Lactat (49%) nicht, da der Testansatz nur 0,5 mM markiertes D-Lactat enthielt und somit unterhalb des K_m -Wertes gemessen wurde ($K_m = 0,71 \text{ mM}$).

Bei dem Stamm DL4 (Tab.13) konnte die L-Lactat-Aufnahme -nach Wachstum auf D,L-Lactat- zu 89% durch die Zugabe von 10 mM unmarkiertem L-Lactat gehemmt werden und im Unterschied zu dem Stamm 14310 nur zu 19% durch D-Lactat. Somit ergab sich ein deutlicher Hinweis auf ein weiteres spezifischeres L-Lactat-Aufnahmesystem, welches zudem L-HB transportiert (52% Hemmung), jedoch eine schlechte Affinität zu D-Lactat bzw. D-HB (keine Hemmung) besitzt.

Die D-Lactat-Aufnahme konnte durch den Zusatz von 10 mM des unmarkierten Substrates nur zu 40% gehemmt werden. Dies deutete darauf hin, daß der K_m -Wert dieses Systems möglicherweise höher war als der für den Elternstamm ermittelte, so daß die Messungen deutlich unterhalb dieser Konzentration erfolgten, was eine geringere Hemmung zur Folge hat. Als weitere Ursache sind auch hier, ebenso wie bei der L-Lactat-Aufnahme, Diffusionsvorgänge infolge hoher Substratkonzentrationen möglich.

Im Gegensatz zur L-Lactat-Aufnahme ergab sich eine geringe kompetitive Hemmung durch D-HB. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß das Transportsystem für D-Lactat auch D-HB aufnehmen könnte, wenn auch mit schlechterer Affinität.

Tab.13: Hemmung der Lactat-Aufnahme durch D- und L-Lactat sowie Hydroxybutyrat bei dem Stamm DL4

Für die Bestimmung der L-Lactat-Aufnahme wurden die Zellen mit Lactat als C-Quelle angezogen, für die D-Lactat-Aufnahme auch zusätzlich mit Glucose. Die anderen Testbedingungen entsprachen den in Tab.12 angegebenen.

Tab:13a: Hemmung der L-Lactat-Aufnahme

Zusatz	<u>L-Lactat-Aufnahme</u>	
	spez. Aktivität (nmol/minxmg TG)	Hemmung (%)
ohne	18,5	0
L-Lactat	2,0	89
D-Lactat	15,0	19
L-HB	8,8	52
D-HB	18,5	0
D,L-HB	12,4	33

Tab.13b: Hemmung der D-Lactat-Aufnahme

Zusatz	<u>Glucose-gewachsen</u>		<u>Lactat-gewachsen</u>	
	spez. Akt. (nmol/minxmg TG)	Hemmung (%)	spez. Akt. (nmol/minxmg TG)	Hemmung (%)
ohne	4,0	0	17,6	0
L-Lactat	n.b.	n.b.	8,4	53
D-Lactat	n.b.	n.b.	10,5	40
L-HB	1,9	53	3,0	82
D-HB	2,9	28	12,0	28
D,L-HB	2,6	35	8,8	47

n.b. = nicht bestimmt

4. Untersuchungen zur NAD-unabhängigen D- und L-Lactatdehydrogenase

Da Hydroxybutyrat von den NAD-unabhängigen Lactatdehydrogenasen zu 2-Ketobutyrat oxidiert wird, kommt dem Lactat-oxidierendem System eine besondere Bedeutung für die Isoleucinbildung zu. Daher sollten im folgenden die NAD-unabhängigen Lactatdehydrogenasen von *C. glutamicum* näher charakterisiert werden. Zudem sollten kinetische Untersuchungen zeigen, ob möglicherweise Abweichungen bezüglich der Affinitäten zu D- und L-HB gegeben sind.

Insgesamt betrachtet ist bislang über diese Enzyme, welche innerhalb der Bakterien weit verbreitet sind, wenig bekannt (Garvie, 1980). Im Gegensatz zu den NAD-abhängigen Lactatdehydrogenasen, welche als terminale Enzyme durch Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf Pyruvat Lactat bilden, katalysieren sie die Rückreaktion, so daß Lactat als C-Quelle genutzt werden kann. Funktionell gelten sie als primäre Dehydrogenasen der Atmungskette, welche durch Cytochrome reoxidiert werden (Ingledew und Poole, 1984). Die Bestimmungen in vitro erfolgen daher durch Einsatz künstlicher Elektronenakzeptoren wie Dichlorphenolindophenol (DCPIP), Methylenblau oder Phenazinethosulfat.

Isoliert und näher charakterisiert sind die D- und L-Lactatdehydrogenase für die gram-negativen Organismen *E. coli* (Futai, 1973 u. 1977) sowie *Acinetobacter calcoaceticus* (Allison et al., 1985 a), wohingegen für gram-positive Organismen bislang nur einige Untersuchungen an Lactat verwertenden Organismen (Propionibakterien) bekannt sind (Garvie, 1980; Crow, 1986).

Die Vorgehensweise bei der Reinigung der D-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum* kann in drei Abschnitte gegliedert werden. Der erste Schritt (Abschn. 4.1) beinhaltet die Ermittlung der optimalen Kulturbedingungen, bei denen die Zellen zu Beginn der Reinigung über eine hohe spezifische Aktivität des Enzyms verfügen. Als nächstes müssen Präparationsbedingungen erarbeitet werden

(Abschn. 4.3), unter denen nach dem Aufschluß der Zellen die Enzymaktivität erhalten bleibt. Dies gilt insbesondere für ein membrangebundenes Enzym, bei dem die Cytoplasmamembran durch geeignete Detergenzien ersetzt werden muß. Für diese Enzyme gilt, daß eine Methode zur Gewinnung und Solubilisierung der Cytoplasmamembranen erarbeitet werden muß, denn die Ablösung des Enzyms von der Membran ist eine notwendige Voraussetzung für die spätere Reinigung. Nach Erfüllung dieser Vorbedingungen erfolgte die eigentliche Enzymreinigung (Abschn. 4.4).

4.1 Einfluß der Kulturbedingungen auf die Bildung der Lactatdehydrogenasen

Enzymaktivitäten nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Während Allison et al. (1985 a) und O'Brien (1977) für *Acinetobacter calcoaceticus* bzw. *Pseudomonas putida* zeigen konnten, daß die D- und L-LDH durch Lactat induziert wurden, fand Futai (1973), daß bei *E. coli* nur die L-LDH induzierbar war, wohingegen die D-LDH konstitutiv gebildet wurde.

Um den Einfluß der Kulturbedingungen auf die Regulation der Enzymsynthese bei *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden die Organismen mit verschiedenen C-Quellen angezogen. Diese Untersuchungen erfolgten vergleichend für die Stämme 13032, 14310 und DL4.

Wie aus Tab.14 hervorgeht, konnte die L-LDH durch ihr Substrat bis zu 10 fach induziert werden. Die spezifische Aktivität der D-LDH dagegen war unabhängig vom Substrat und das Enzym wird somit konstitutiv gebildet. Dies galt für alle drei untersuchten Stämme, welche nur Unterschiede zeigten in der Höhe der spezifischen Aktivität. Die höchste D-LDH-Aktivität zeigte in allen Fällen die Mutante DL4, sie war 3-4 fach gegenüber den anderen Stämmen erhöht.

Tab.14: Spezifische Aktivität der D- und L-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum* 13032, 14310 und DL4 nach Wachstum auf verschiedenen Substraten.

Die Zellen wurden in Minimalmedium (IV) mit 2% der jeweiligen C-Quelle angezogen und in der mittleren exponentiellen Phase geerntet.

C-Quelle	Stamm	<u>Dehydrogenase-Aktivität (U/mg)</u>		
		L-Lactat	D-Lactat	D,L-HB
Glucose	13032	0.05	0.12	0.01
	14310	0.04	0.12	0.02
	DL4	0.06	0.40	0.04
L-Lactat	13032	0.20	0.14	0.15
	14310	0.35	0.11	0.21
	D14	0.32	0.38	0.30
D,L-Lactat	13032	0.22	0.14	0.14
	14310	0.27	0.10	0.20
	D14	0.28	0.39	0.31
Acetat	13032	0.04	0.13	0.01
	14310	0.02	0.11	0.01
	DL4	0.04	0.41	0.03
Succinat	13032	0.03	0.14	0.01
	14310	0.02	0.12	0.01
	DL4	0.04	0.40	0.03

Auffällig war zudem, daß für HB immer dann eine hohe spezifische Aktivität bestimmt wurde, wenn die L-LDH induziert war; möglicherweise hat sie eine höhere Affinität zu HB. Im Unterschied zu *C. glutamicum* konnte die L-LDH aus *E. coli* noch stärker induziert werden (Futai, 1977). So war nach Wachstum auf Glycerin fast keine Enzymaktivität nachweisbar, wurde dieses jedoch durch L-Lactat ersetzt, konnte eine bis zu 100 fach erhöhte spezifi-

sche Aktivität gemessen werden. Ebenso war die L-LDH von *Pseudomonas putida* 50-100 fach induzierbar (O'Brien, 1977 a).

Aktivität der D- und L-Lactatdehydrogenase während der Isoleucinfermentation

Nach dem Einfluß der Kohlenstoffquelle wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wachstumsphase während der Isoleucinfermentation untersucht. Hierzu wurden Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und die Enzymaktivität bestimmt.

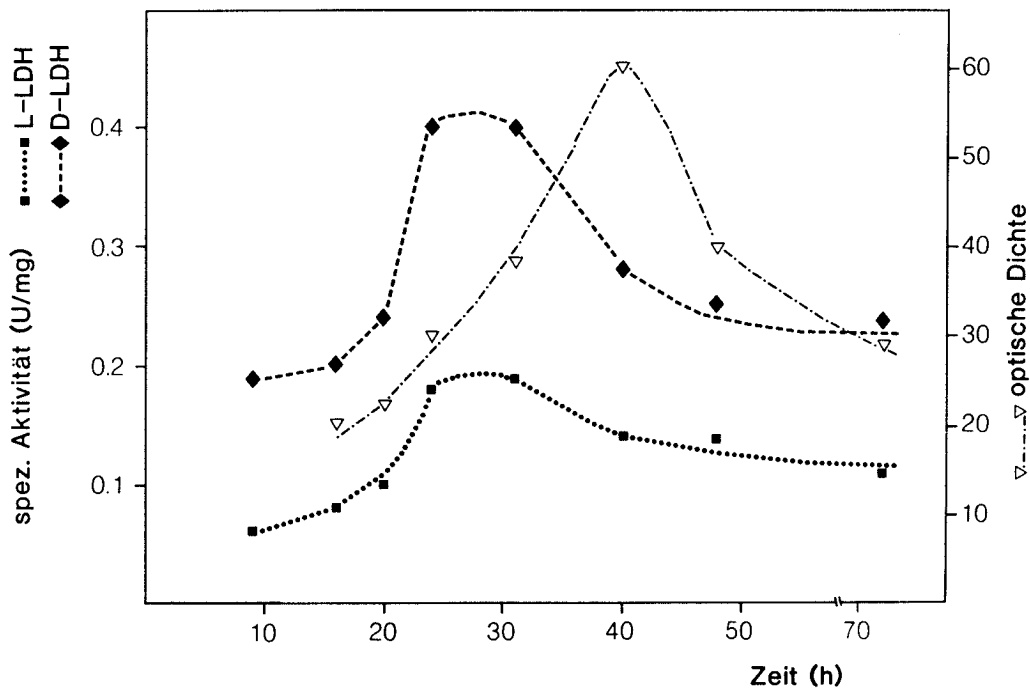


Abb.14: Spezifische Aktivität der D- und L-Lactatdehydrogenase im Verlauf einer Isoleucinfermentation mit *C. glutamicum* DL4

Das Fermentationsmedium enthielt 150 mM HB. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Enzymaktivitäten bestimmt.

Wie aus Abb.14 hervorgeht, waren die spezifischen Aktivitäten abhängig von der Wachstumsphase. Sie erreichten ihr Maximum während der mittleren exponentiellen Phase, nahmen danach ab und blieben konstant bis zum Ende der Fermentation. Bei der D-LDH

ging die spezifische Aktivität auf 63% des maximalen Wertes zurück, bei der L-LDH waren es 75%.

Änderungen der spezifischen Aktivität während des Wachstums wurden auch von Crow (1986) für die L- und D-Lactatdehydrogenase aus *Propionibacterium freudenreichii* beschrieben. Hier wurden die höchsten Aktivitäten für beide Enzyme jedoch erst zu Beginn der stationären Phase erreicht.

4.2 Untersuchungen zur Lokalisation der Lactatdehydrogenase

Nach Garvie (1980) sind die NAD-unabhängigen Lactatdehydrogenasen membrangebundene Enzyme. Eine Ausnahme hiervon bilden nur die Milchsäurebakterien, bei denen diese Enzyme im Cytosol vorkommen (Snoswell, 1963; Brockmann und Wood, 1975).

Zur Lokalisation der Enzyme bei *C. glutamicum* wurden Zentrifugationsexperimente durchgeführt, wobei die Verteilung der Enzymaktivitäten in cytosolischer Fraktion und Pellet (Membranen) untersucht wurde. Hierzu wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen, die Zelltrümmer abzentrifugiert und der zellfreie Überstand für 2 h bei 100.000 g zentrifugiert. Die anschließende Bestimmung der spezifischen Aktivität ergab, daß sowohl die D- wie auch die L-Aktivität im Pellet ca. 2-3 fach angereichert war, jedoch nicht mehr als 40% der Gesamtaktivität sedimentierte. Dies konnte bedingt sein durch die Coexistenz von cytosolischen wie membrangebundenen Enzymen. Zudem war auch möglich, daß die Ultraschallbehandlung zu einer teilweisen Ablösung der membranassoziierten Enzyme führte. Daher wurde eine schonende, enzymatische Aufschlußmethode gewählt. Durch Einwirkung von Lysozym wurden osmotisch sensitive Zellen hergestellt und in hypotonischem Medium lysiert. Nach anschließender Ultrazentrifugation wurde die Verteilung der Enzymaktivitäten bestimmt. Nun war im Überstand keine LDH-Aktivität mehr vorhanden und sie konnte vollständig in der Membranfraktion nachgewiesen werden. In Abb.15 ist die Verteilung der D-LDH-Aktivität in Abhängigkeit der jeweiligen Aufschlußmethode dargestellt.

Es ist klar zu erkennen, daß wenig schonende Aufschlußmethoden wie Ultraschall bzw. French-Press zur Ablösung der D-LDH von der Membran führten. Dies galt sowohl für Zellen, die direkt durch

Ultraschall aufgeschlossen wurden, als auch für Membranen, welche durch Lysozymaufschluß gewonnen worden waren. Ähnliche Beobachtungen beschrieb auch Kemp (1972) für die D-LDH von *Pseudomonas aeruginosa*. Er konnte nachweisen, daß mit zunehmender Beschalldauer weniger Enzymaktivität in der Membranfraktion vorlag, die Gesamtaktivität jedoch nach Lysozymaufschluß vollständig pelletierte.

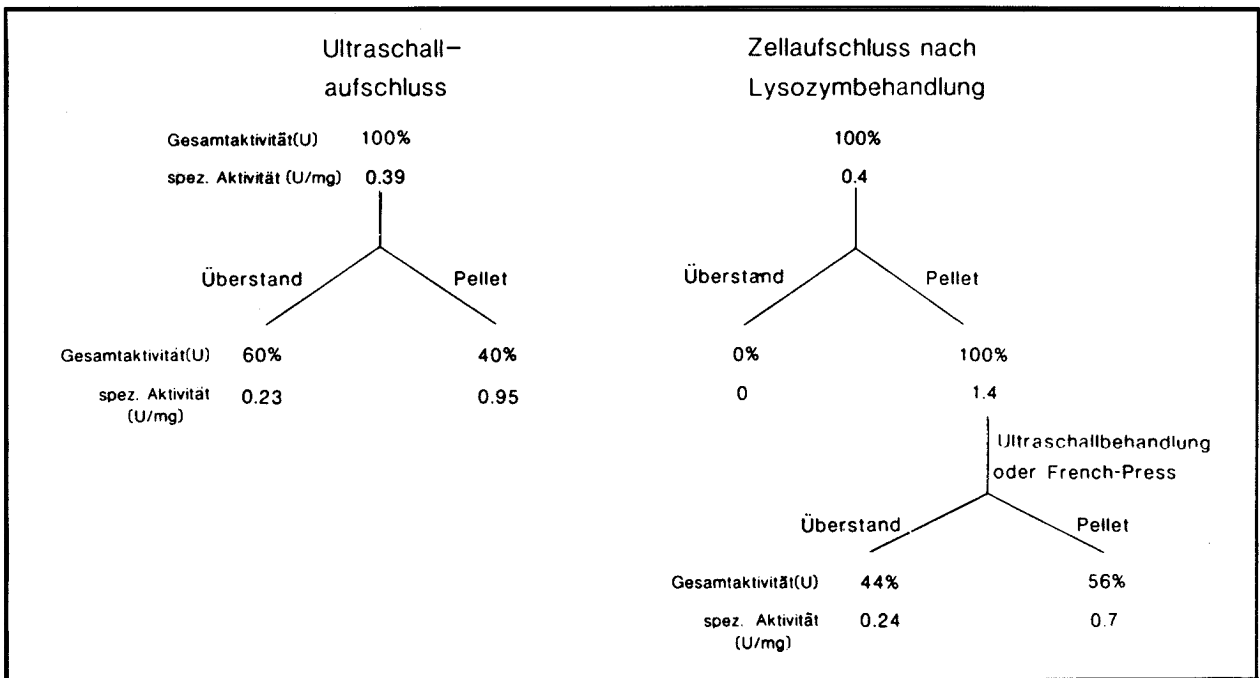


Abb.15: Verteilung der D-LDH-Aktivität von *C. glutamicum* in Cytosol und Membranfraktion nach Ultraschallbehandlung verschieden aufgeschlossener Zellen

4.3 Solubilisierung und Einfluß von Detergenzien auf die Enzymstabilität

Einfluß von Detergenzien auf die Enzymstabilität

Da die D-LDH von *C. glutamicum* ein membrangebundenes Enzym ist, war es notwendig, Detergenzien auszuwählen, welche zum einen die Stabilität des Enzyms gewährleisteten und zum anderen geeignet waren, das Enzym von der Membran abzulösen. Der Einfluß auf die

Enzymaktivität wurde getestet, indem ein Aliquot - durch French-Press abgelöstes Enzym- mit einer Auswahl verschiedener Detergenzien inkubiert wurde. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit ist in Tab.15 dargestellt.

Tab.15: Einfluß von Detergenzien auf die Aktivität der D-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum* DL4

Die in einigen Fällen bestimmten Aktivitäten der L-LDH sind in Klammern angegeben. Die Konzentration der Detergenzien betrug -wenn nicht anders angegeben- 0.5%, gelöst in 50 mM K-Phosphatpuffer pH 7.2.

Detergenz	Enzymaktivität (E ₆₀₀ /min)			
	1 Tag	2 Tage	3 Tage	6 Tage
Kontrolle	0.16 (0.12)	0.18 0.10	0.16 (0.10)	0.16
Tween 80	0.16 (0.07)	0.15 0.08	0.15 (0.07)	0.15
Na-Desoxycholat ¹	0.13	0.10	0.05	0.02
Octylglucosid	0.15	0.13	0.15	0.10
Triton X-100	0.15 (0.06)	0.12 0.05	0.13 0.05	0.12
Triton X-114	0.08	0.09	0.08	0.07
Genapol	0.10	0.10	0.12	0.12
LDAO	0.17 (0.09)	0.18 0.08	0.17 (0.08)	0.14
CHAPS	0.16	0.13	0.14	0.07
C ₁₂ E ₈	0.16 (0.04)	0.15 0.04	0.14 (0.03)	0.14
C ₁₃ E ₁₀	0.06	0.05	0.07	0.07

¹ Konz.: 0.25%

Wie die Tabelle zeigt, eigneten sich vor allem die nichtionischen Detergenzien Tween 80, LDAO und C₁₂E₈, da sie die Enzymaktivität stabilisierten. Am zweckmäßigsten erschien der Einsatz von LDAO, da es im Gegensatz zu Tween 80 keine störenden Verunreinigungen enthält.

Darüber hinaus eignete sich LDAO auch zur Erhaltung der Enzymaktivität der L-LDH.

Auffällig war, daß in den Kontrollansätzen keine Aktivitätsverluste auftraten. Dies war darauf zurückzuführen, daß das Enzym sehr wahrscheinlich noch genügend natürliche Lipide gebunden hatte, welche Aktivitätsverluste verhinderten.

Solubilisierung der Enzyme

Allison et al. (1985 b) konnte für die D-LDH von *Acinetobacter calcoaceticus* zeigen, daß diese durch ionische Detergenzien wie Natriumcholat solubilisiert werden konnte, ohne gleichzeitige Ablösung der L-LDH. Diese Ergebnisse konnten für die Lactatdehydrogenasen von *C. glutamicum* nicht bestätigt werden. Daher wurde getestet, ob eine Solubilisierung durch LDAO möglich war. Dies bot sich an, da sich der positive Einfluß von LDAO auf den Erhalt der Enzymaktivität bereits gezeigt hatte. Hierzu wurde das Pellet, welches nach Zentrifugation der lysierten Zellen aus einer "Zellwand-/Membran-Fraktion" bestand, mit unterschiedlichen Mengen LDAO inkubiert. Als günstig erwies sich ein Verhältnis von 0.4 mg LDAO/mg Protein. Nach anschließender Ultrazentrifugation befanden sich ca. 70% der Enzymaktivität im löslichen Überstand, welcher tief gelb gefärbt war, im Gegensatz zum weißlichen Pellet. In Abb.16 ist die Vorgehensweise zur Gewinnung der löslichen Enzympräparation schematisch zusammengefaßt.

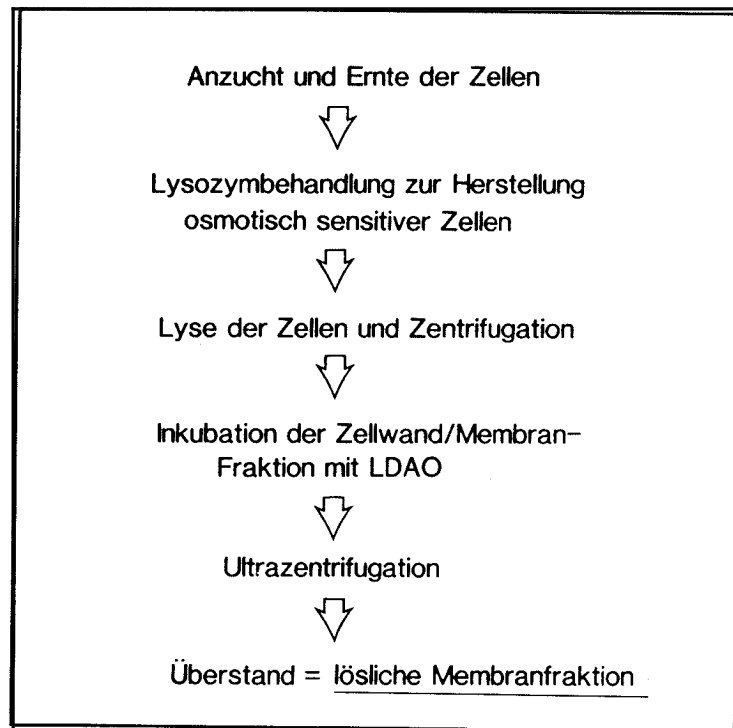


Abb.16: Schematische Übersicht zur Herstellung einer löslichen Membranfraktion von *C. glutamicum*, welche die solubilisier- te D- und L-Lactatdehydrogenase enthält
Detaillierte Angaben sind dem Abschn. I.8. zu entnehmen.

Vergleich der kinetischen Eigenschaften der D- und L-LDH im membrangebundenen und solubilisierten Zustand

Für gelöste Membranproteine ist bekannt, daß der Ersatz der natürlichen Membran durch Detergenzien möglicherweise mit Änderungen der kinetischen Eigenschaften einhergeht. So berichteten Kohn et al. (1973) und Jones et al. (1983) über Änderungen des K_m -Wertes und des pH-Optimums von membrangebundenen Dehydrogenasen nach deren Solubilisierung. Daher wurden auch die K_m -Werte und pH-Optima für die Lactatdehydrogenasen nach der Ablösung von der Membran überprüft.

Für die D-LDH betrug das pH-Optimum 7.0, es ergab sich somit keine Abweichung zu früheren Bestimmungen im Rohextrakt, nur für die L-LDH verschob es sich leicht von pH 7.0 (Scheer, 1985) auf 7.6.

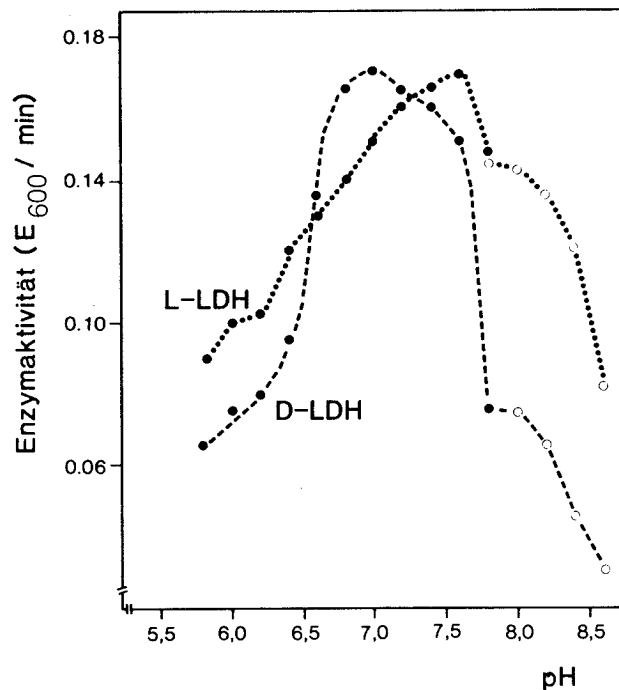


Abb.17: Bestimmung des pH-Optimums für die solubilisierte D- und L-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum*
Hierfür wurde eine bereits über Ionenaustauscher angereicherte Enzympräparation eingesetzt.

- 100 mM K-Phosphatpuffer / 0.5% LDAO
- 100 mM Tris-HCl / 0.5% LDAO

Die Bestimmung der K_m -Werte erfolgte unter zwei Testbedingungen, zum einen diente DCPIP allein als Elektronenakzeptor, zum anderen zusätzlich PES. Letzteres bzw. auch PMS dienen der Elektronenübertragung zwischen Dehydrogenasen und dem Endakzeptor DCPIP und bewirken eine Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit (Allison et al., 1985 a). So werden PES bzw. PMS vorzugsweise in Enzymtests mit geringen Enzymmengen eingesetzt. Gosh und Quayle (1979) wiesen darauf hin, daß nach Möglichkeit PES eingesetzt werden sollte, da es stabiler ist und DCPIP nicht in enzymfreien Ansätzen reduziert.

Die Bestimmung des K_m -Wertes für die solubilisierte D-LDH ist in Abb.18 dargestellt.

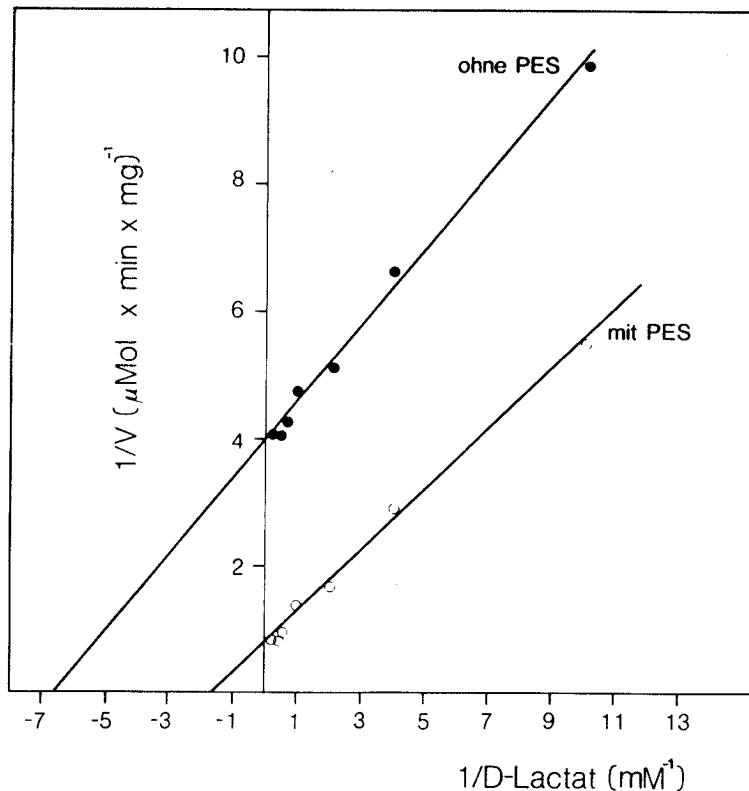


Abb.18: K_m -Wert für die solubilisierte D-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum*

Wie Abb.18 zu entnehmen ist, betrug der K_m -Wert für die D-LDH 0.15 mM und $V_{\max}$ 0.26 $\mu\text{Mol}/\text{min} \times \text{mg}$. Somit wies das solubili-sierte Enzym eine 3.5 fach erhöhte Substrataffinität gegenüber dem Enzym im Rohextrakt auf (s. auch Tab.16). Pratt et al. (1979) berichtete für die D-LDH aus *E. coli* ebenfalls über eine Erniedrigung des K_m -Wertes von 1.8 mM auf 0.35 mM nach deren So-lubilisierung. Weiterhin ist der deutliche Einfluß von PES auf das Testsystem sichtbar, es bewirkte eine Zunahme der Umsatzge-schwindigkeit, verbunden mit einer Erhöhung des K_m -Wertes. Die für die D-LDH gewonnenen Daten sind in Tab.16 denen der L-LDH gegenübergestellt. Wie erkennbar, wurde die Substrataffini-tät der L-LDH in sehr viel stärkerem Maße durch die Solubilisie-rung beeinflusst. So erhöhte sich der apparente K_m -Wert von 0.71 auf 12.5 mM, verbunden mit einer Verdoppelung der Umsatzge-schwindigkeit. Beide Parameter veränderten sich durch Zusatz von PES -ähnlich wie bei der D-LDH- nochmals.

Tab.16: Einfluß der Enzympräparation und des Testsystems auf den apparenten K_m -Wert und V_{max} der D- und L-Lactatdehydrogenase von *C. glutamicum* DL4

Präparation/ Testsystem	K_m -Wert (mM)	V_{max} (μ Mol/min x mg)
<u>D-LDH</u>		
Rohextrakt/DCPIP	0.53	0.50
solubilis./DCPIP	0.15	0.26
solubilis./DCPIP/PES	0.59	1.20

<u>L-LDH</u>		
Rohextrakt/DCPIP	0.71	0.29
solubilis./DCPIP	12.5	0.50
solubilis./DCPIP/PES	28.6	1.11

4.4 Isolierung und Charakterisierung der D-Lactatdehydrogenase

Mit den Untersuchungen zur Solubilisierung und Enzymstabilität waren die Voraussetzungen für die Reinigung der D-LDH geschaffen. Im folgenden wurden daher Verfahren zur Proteinreinigung basierend auf unterschiedlichen Trennprinzipien getestet. Als Kriterien dienten neben dem Erhalt der Enzymaktivität und der Erhöhung der spezifischen Aktivität (=Anreicherung) eine bestmögliche Abtrennung von der L-LDH-Aktivität.

Ausgangspunkt der Reinigung bildete das Membransolubilisat, welches 2% LDAO enthielt. Dieses wurde unverdünnt auf einen DEAE-Anionenaustauscher aufgetragen. Nach der Elution wurden die aktiven Fraktionen vereinigt und diese bereits vorgereinigte Präparation für die Tests der weiteren Trennmethode eingesetzt. Somit beziehen sich die angegebenen Anreicherungsfaktoren auf das bereits angereicherte Protein. Eine Übersicht über die getesteten Methoden und deren Effizienz gibt Tab.17.

Tab.17: Übersicht über die getesteten Chromatographie-Methoden zur Isolierung

der D-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum* DL4

Der Quotient (D/L) gibt das Verhältnis der Enzymaktivität der D-LDH zur L-LDH an.
Genauere Angaben zu den einzelnen Methoden sind dem Abschnitt I.9 zu entnehmen.

Methode	Trenngel	Elutionspuffer ¹	Ausbeute (%)	Anreiche- rung (-fach)	$\frac{D}{L}$
Anionenaustauscher- Chromatographie	DEAE-Sepharose CL 6B MONO Q	Tris-HCl pH 7,5 (0-0,4 M NaCl) Tris-HCl pH 7,5 (0,15-0,35 M NaCl) Na-Phosphat pH 7,5 (0,01-0,4 M Na-P) K-Phosphat pH 7,2 (65-35% (NH ₄) ₂ SO ₄) K-Phosphat pH 7,5 (0,05-1% Na-Desoxych.) K-Phosphat pH 7,0 Histidin-HCl pH 6,2/ 74-HCl pH 4,0 Tris-HCl pH 7,5 (0-0,45 M NaCl)	> 80 > 80 75 65 60 75 45 40	12 4,5 10 5 3 3 2 2 0,7	4/1 6/1 8/1 6/1 4/1 4/1 4/1 6/1 6/1 7/1
Adsorption- chromatographie Fraktioniertes Aussalzen Hydrophobe Chromatographie Gelfiltration Chromatofo- fokussierung Affinitäts- chromatographie					

¹ Die Puffer enthielten jeweils 0,2-0,5% LDAO

Wie dieser Zusammenstellung zu entnehmen ist, waren es vor allem die ersten drei Methoden, welche unter Erhalt der Enzymaktivität zu einer guten Anreicherung führten. Es bot sich somit eine Kombination dieser Schritte (Abb.19-21) an. Ferner ergaben diese Untersuchungen, daß keine der getesteten Methoden geeignet war, die beiden Lactatdehydrogenasen vollständig voneinander zu trennen.

DEAE-Anionenaustauscher

14 ml (40 mg Protein) eines Membransolubilisates wurden auf eine DEAE-Sepharose-Säule aufgetragen und die gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Wie aus Abb.19 hervorgeht, wurde die D-LDH-Aktivität nach der Hauptmasse des Proteins eluiert. Die Fraktionen 40-50, welche 85% der aufgetragenen Enzymaktivität enthielten, wurden vereinigt und über G-25 Säulchen entsalzt.

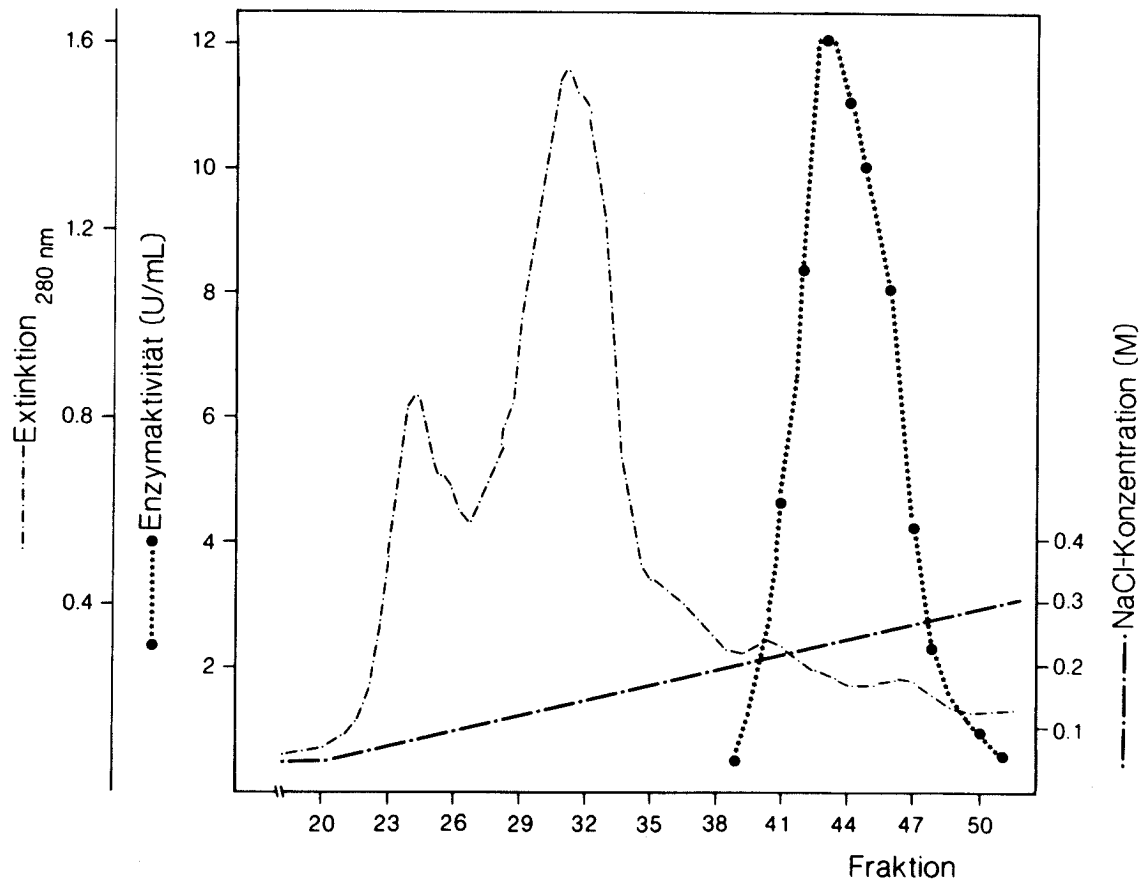


Abb.19: Auftrennung der löslichen Membranpräparation von *C. glutamicum* DL4 über DEAE-Sepharose und Nachweis der Enzymaktivität der D-LDH.

14 ml einer Membranpräparation wurden auf die mit 30 mM Tris-HCl/ 0.5% LDAO pH 7.5 equilibrierte Säule aufgetragen und mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-0.4 M) eluiert. Fraktionen zu 2 ml wurden gesammelt und auf D-LDH-Aktivität getestet.

Mono Q

Die über DEAE-Sepharose angereicherten Fraktionen wurden auf einen Mono Q Anionenaustauscher (FPLC) aufgetragen und die Enzymaktivität mittels eines NaCl-Gradienten eluiert (Abb.20). Die vereinigten Fraktionen 28-31 enthielten ca. 80% der aufgetragenen D-LDH-Aktivität.

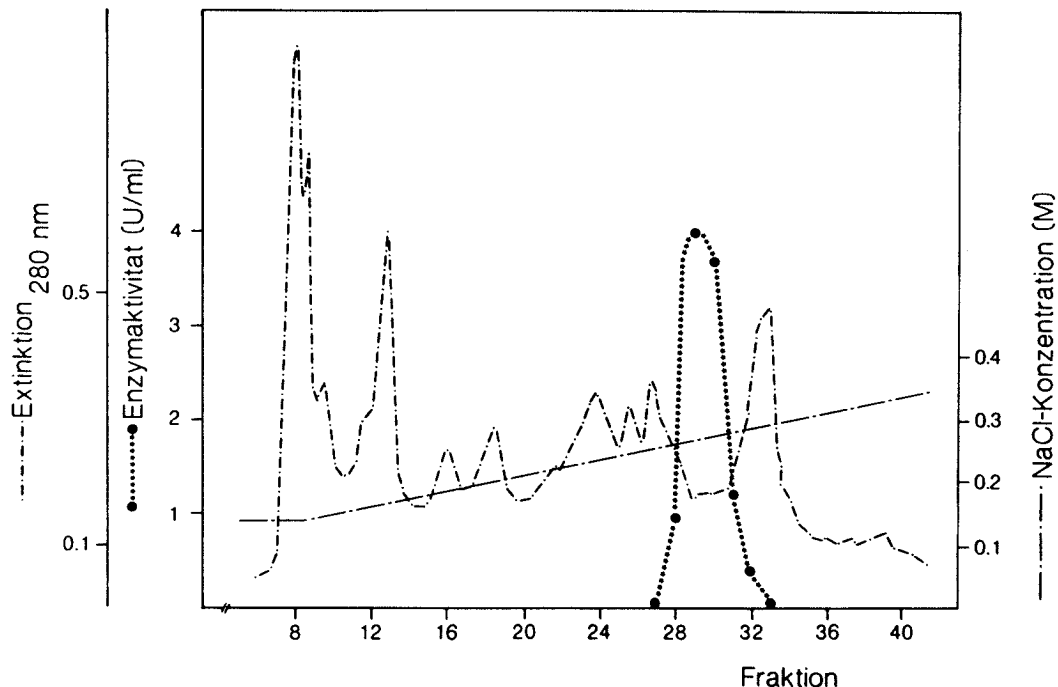


Abb.20: Elutionsprofil der D-LDH nach Trennung mittels der Mono Q-Säule des FPLC-Systems.

Es wurden 4 ml einer entsalzten, bereits über DEAE-Sephrose vorgereinigten Enzympräparation aufgegeben und mit einem Stufengradienten (0.15-0.35 M NaCl in 30 mM Tris-HCL/0.5% LDAO pH 7.5) eluiert. Fraktionen zu 1 ml wurden gesammelt.

Hydroxylapatit

Die weitere Reinigung der Enzympräparation nach Mono Q erfolgte über Hydroxylapatit-Säule (HPLC). Hierzu wurden die aktiven, gepoolten Fraktionen der Mono Q-Säule entsalzt, aufgetragen und die D-LDH über einen optimierten Na-Phosphatgradienten verbunden mit einem Detergenzgradienten eluiert (Abb.21). Die anschließende Bestimmung der Enzymaktivität ergab, daß in den aktiven Fraktionen (33-37) nur ca. 50% der aufgetragenen D-LDH-Aktivität nachweisbar war. Diese Verluste traten jedoch nicht auf, wenn eine Enzympräparation aufgetrennt wurde, die nur über einen Schritt angereichert war. Dies deutete auf den Verlust eines Co-faktors hin. Tatsächlich führte der Zusatz von FAD zum Testan-

satz zur fast vollständigen Reaktivierung des Enzyms. Dabei war eine Konzentration von 0.02 mM FAD im Ansatz ausreichend. Auch die restliche L-Lactat-Aktivität konnte durch FAD in ähnlicher Weise gesteigert werden.

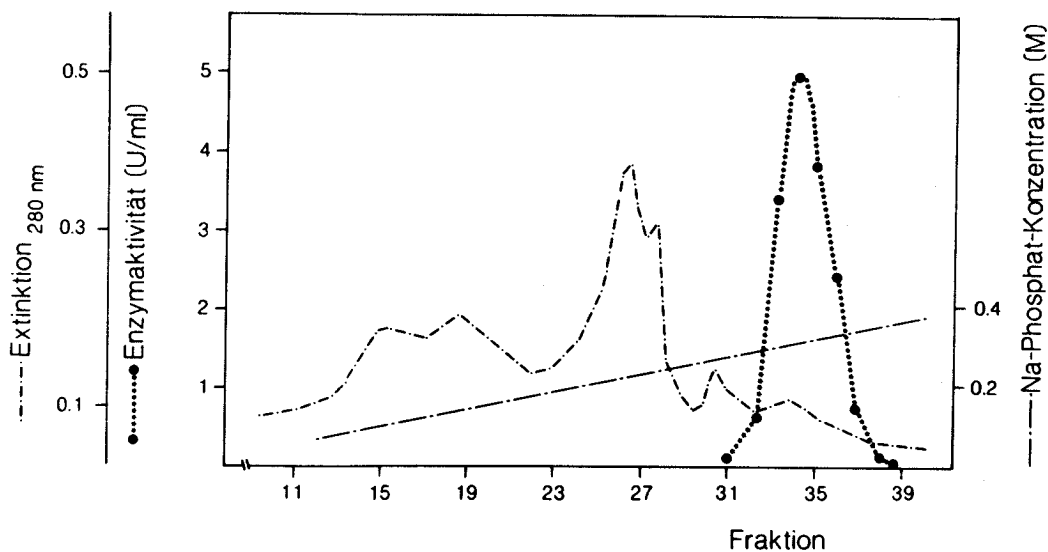


Abb.21: Elutionsprofil der D-LDH nach Trennung an Hydroxylapatit (HPLC).

4 ml der bereits über DEAE-Sepharose und Mono Q angereicherten Enzympräparation wurden auf die Säule aufgetragen und die D-LDH durch einen Na-Phosphat-Gradienten (0.01- 0.04 M) verbunden mit einem Detergenzgradienten (0.2-0.4% LDAO) eluiert und Fraktionen zu 0.5 ml gesammelt.

Eine Übersicht über die Reinigung der D-LDH aus *C. glutamicum* DL4 ist der Tab.18 zu entnehmen. Zusätzlich durchgeführtes fraktioniertes Aussalzen oder hydrophobe Chromatographie ergab an dieser Stelle der Enzymreinigung keine weitere Anreicherung. Die Zusammenfassung zeigt, daß sich die spezifische Aktivität von anfänglich 0,4 auf 310 U/mg erhöhte und die D-LDH somit etwa 775 fach angereichert wurde. Dies galt unter der Voraussetzung, daß dem Testsystem nach drei chromatographischen Schritten FAD zugesetzt wurde. Im Verlaufe der Reinigung verringerte sich der Anteil der L-LDH-Aktivität, wobei dies jedoch auch auf die schlechtere Stabilität des Enzyms zurückzuführen war.

Tab.18: Reinigung der D-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum* DL4

Genauere Angaben über die Durchführung der Reinigungsschritte sind dem Text bzw.

Abschnitt I.9 zu entnehmen. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in Anwesenheit von DCPIP und PES und zusätzlich 20 µM FAD nach der Hydroxylapatit-Säule.

	Proteinkon- zentration (mg/ml)	Gesamt- aktivität (U)	spez. Aktivität (U/mg)	Reinigungs- faktor	Aktivität (%)	<u>D-LDH</u> <u>L-LDH</u>
Osmotisch sensitive Zellen	10,0	202	0,4	1	100	4
LDAO Extrakt	4,0	152	2,5	6	75	4,3
DEAE-Sepharose	0,3	129	27,5	69	64	7,5
Mono Q	0,09	103	82,5	206	51	16,0
Hydroxylapatit	0,02	73	310,0	775	36	30,5

Ganz ähnliche Ergebnisse wie für die D-LDH aus *C. glutamicum* (Tab.18) berichteten Allison et al. (1985 a) für das Enzym aus *Acinetobacter calcoaceticus*. Sie erzielten eine Erhöhung der spezifische Aktivität von 0,4 auf 338 U/mg, was eine 880 fache Anreicherung bedeutete, jedoch betrug die Ausbeute weniger als 10% der anfänglich eingesetzten Enzymmenge.

Das entsprechende SDS-Gel dokumentiert den Verlauf der Reinigung (Abb.22). Nach Anreicherung über DEAE-Sephharose, Mono Q und Hydroxylapatit ergab die Anfärbung durch Coomassie-Blue eine deutliche Proteinbande (Spur d) neben zwei weiteren schwachen Banden. Über den Vergleich mit Eichproteinen ergab sich ein Molekulargewicht von 70.000 Da.

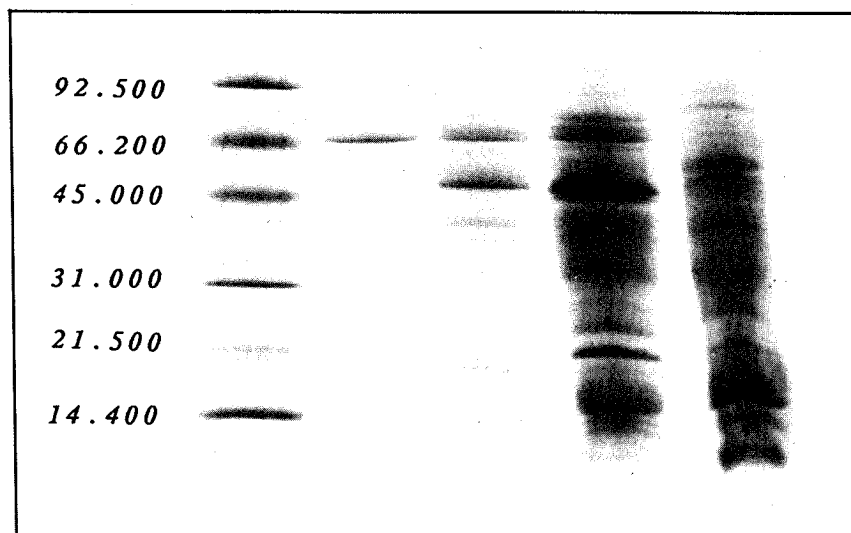


Abb.22: SDS-Gelelektrophorese der D-Lactatdehydrogenase nach verschiedenen Schritten der Reinigung (a-d).

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein Gradientengel (8-25%) des Phast-Systems von Pharmacia eingesetzt und die Proteinbanden durch Coomassie-Blue angefärbt.

- a: Membransolubilisat (LDAO Extrakt)
- b: nach DEAE-Sephharose
- c: nach b) und Mono Q
- d: nach c) und Hydroxylapatit

Die Bestimmung der nativen Molekülgröße erfolgte mittels Gelfiltration (Abb.23).

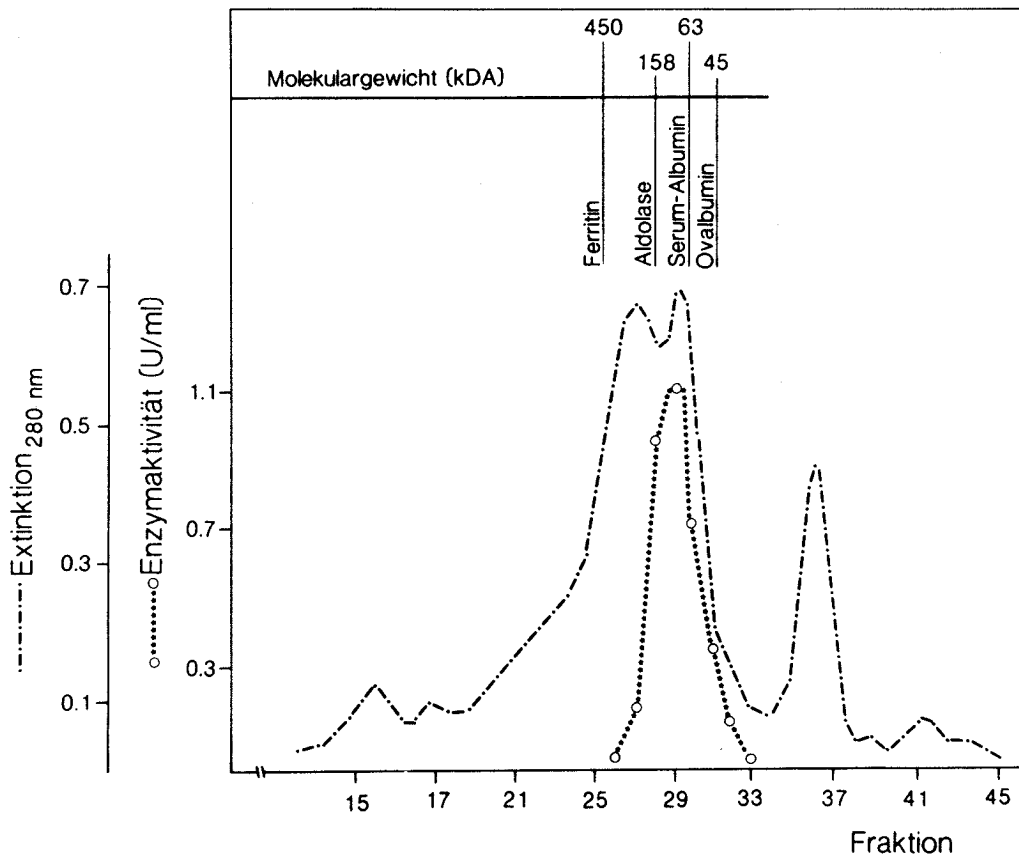


Abb.23: Gelfiltration an Superose 12 zur Bestimmung des apparenten nativen Molekulargewichtes der D-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum* DL4.

Es wurden 0,5 ml einer bereits über DEAE-Sepharose vorgereinigten Enzympräparation aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 0,05 M KPP/0,15 M NaCl/0,5% LDAO und Fraktionen zu 1ml wurden gesammelt und auf Enzymaktivität getestet.

Nach Gelfiltration ergab sich in Anwesenheit von 0,5% LDAO ein apparentes Molekulargewicht von 115.000 ± 5000 Da. Es war somit deutlich größer als nach SDS-Gelelektrophorese. Dieser Unterschied ergibt sich, da die D-LDH als Membranprotein eine bestimmte Menge Detergenz bindet. Ausgehend von einem Molekulargewicht von 70.000 Da läßt sich errechnen, daß die D-LDH 0,5-0,6

mg LDAO/mg Protein bindet. Dies bedeutet eine gute Übereinstimmung mit Untersuchungen von Helenius und Simons (1975) über die Bindung nichtionischer Detergenzien durch solubilisierte Membranproteine.

Untersuchungen zum Coenzym der D-LDH

Die Untersuchungen zur Identifizierung der Coenzyme NAD-unabhängiger Lactatdehydrogenasen hatten ergeben, daß diese Flavine enthalten, welche nicht kovalent gebunden sind (Garvie, 1980). Für die D-LDH aus *E. coli* (Kohn und Kaback, 1973) und *Acinetobacter calcoaceticus* (Allison et al., 1985 a) wurde FAD nachgewiesen, während die L-LDH der o.g. Organismen FMN enthielt (Futai und Kimura, 1977; Allison et al., 1985 a).

Einen deutliche Hinweis auf FAD als mögliches Coenzym der D-LDH bei *C. glutamicum* hatte bereits die Enzymreinigung ergeben. Hier konnten Aktivitätsverluste, welche nach drei chromatographischen Schritten auftraten, durch Zugabe von FAD, jedoch nicht durch FMN, zum Testansatz fast vollständig aufgehoben werden.

Zusätzlich wurde eine Coenzymextraktion durchgeführt. Hierzu wurde eine gereinigte Proteinfraction (20 ug Protein) mit Perchlorsäure versetzt, das präzipitierte Protein abgetrennt und der Überstand analysiert.

Im Überstand der extrahierten Enzympräparation konnte FAD, welches eine Retentionszeit von 5.3 Minuten hatte, nachgewiesen werden. Damit ist bewiesen, daß die D-LDH aus *C. glutamicum* FAD als Coenzym enthält. Bei Annahme eines Molekulargewichtes von 70.000 Da ergibt sich, daß pro Mol Enzym etwa 0,25 Mol FAD gebunden war. Dieses Ergebnis entspricht sicherlich nicht dem tatsächlichen Verhältnis. Der Grund hierfür ist, daß zum einen die eingesetzte Enzympräparation neben der D-LDH noch andere Proteine enthielt. Zum anderen war im Verlaufe der Enzymreinigung bereits FAD abgelöst worden. Ferner ist auch zu berücksichtigen, daß eine geringe Proteinkonzentration eingesetzt wurde und die Extraktion möglicherweise nicht quantitativ verlief. Die

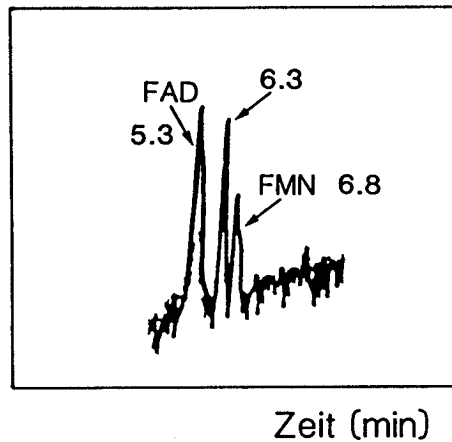


Abb.24: HPLC-Auftrennung eines Perchlorsäure-Extraktes der D-LDH aus *C. glutamicum* DL4

1 ml (20 µg/ml Protein) einer über DEAE-Sepharose/Mono Q und Hydroxylapatit angereicherten Enzympräparation wurden mit Perchlorsäure versetzt und der neutralisierte Überstand mittels HPLC aufgetrennt.

Extraktion durch Perchlorsäure führte vermutlich auch zu einer Artefaktbildung, denn der nicht identifizierte Peak mit einer Retentionszeit von 6.3 Minuten trat auch in Proben mit reinem FAD, zum Teil auch mit FMN auf. Ein kleinerer Peak bei 6.7 Minuten stimmte mit der Retentionszeit von FMN überein. Die Konzentration betrug jedoch nur ca. 1/25 der ermittelten FAD-Menge. Die Peakgröße täuscht eine höhere Konzentration vor, da FMN 10 fach stärker fluoresziert als FAD.

4.5 Kinetische Untersuchungen zur L- und D-Lactatdehydrogenase

Von dem racemischen Gemisch der Hydroxysäure wird das L-Isomer von *C. glutamicum* bevorzugt verwertet. Als mögliche Ursache käme hierfür das Transportsystem in Frage, welches durch eine höhere Affinität zu L-HB dieses schneller aus dem Kulturfiltrat aufnimmt. Neben dem Aufnahmesystem können aber auch die Lactatdehydrogenasen als das oxidierende System aufgrund ihrer kinetischen Eigenschaften eine bessere Oxidation von L-HB katalysieren. Dies kann begründet sein in der unterschiedlichen Affinität der Enzyme zu L- und D-HB. Zudem ist denkbar, daß die D-LDH infolge einer Endprodukthemmung durch Ketobutyrat oder Pyruvat in ihrer

Enzymaktivität reduziert ist.

Einfluß von Pyruvat und Ketobutyrat

Crow (1986) konnte für die L- und D-LDH von *Propionibacterium freudenreichii* zeigen, daß diese unterschiedlich stark durch Pyruvat gehemmt wurden. So beeinflusste der Zusatz von 20 mM Pyruvat die in vitro Aktivität der L-LDH nicht, während er bei der D-LDH zu einer Reduktion um 75% führte. Darüber hinaus korrelierte bei diesem Organismus die bevorzugte Nutzung von L-Lactat- bei Wachstum auf D,L-Lactat- mit einem hohen intrazellulären Pyruvatpool, was vermutlich zu einer Hemmung der D-LDH führte. Erst wenn dieser im Verlauf der Fermentation abnahm, wurde auch D-Lactat verwertet.

Daher wurde der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Ketobutyrat, dem Oxidationsprodukt der Vorstufe, sowie von Pyruvat als Intermediärprodukt der Glycolyse, auf die Aktivität der Lactatdehydrogenasen aus *C. glutamicum* untersucht (Abb.25).

Die Aktivität der D- und L-LDH wurde durch Ketobutyrat und Pyruvat unterschiedlich gehemmt, wobei kaum Unterschiede zwischen den beiden Inhibitoren auftraten. So reduzierte der Zusatz von 5 mM die Aktivität der L-LDH um 50%, während es bei der D-LDH nur 13% waren. Höhere Konzentrationen beider Inhibitoren bewirkten eine zunehmende Aktivitätsminderung, jedoch war diese für die L-LDH stets ausgeprägter, so daß eine Endprodukthemmung der D-LDH als Ursache der verzögerten D-HB-Verwertung nicht anzunehmen ist.

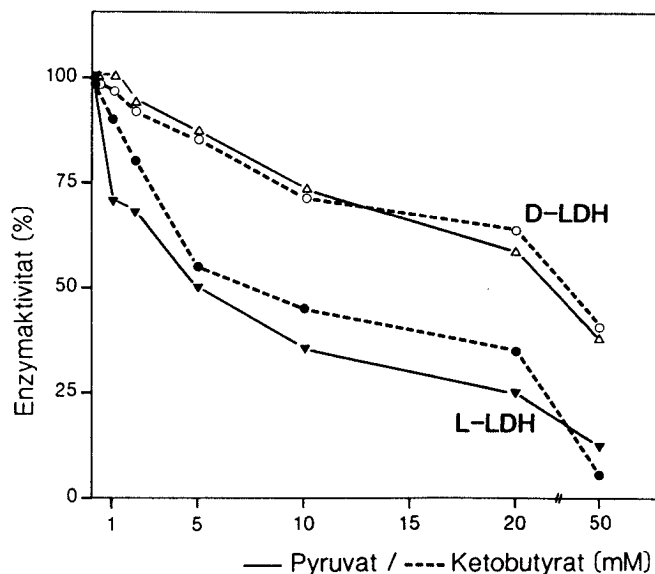


Abb.25: Einfluß von Pyruvat und Ketobutyrat auf die Aktivität der L- und D-Lactatdehydrogenase

Für die Bestimmungen wurde entsalzter Rohextrakt eingesetzt und der jeweilige Testansatz 5 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert.

Umsetzung von D- und L-Hydroxybutyrat

Hydroxybutyrat ist nur als racemisches Gemisch erhältlich, jedoch wurden kleinere Mengen des jeweiligen Isomers durch Prof. Simon (TU München-Garching) zur Verfügung gestellt, was getrennte kinetische Messungen für beide Substrate erlaubte. Für die Bestimmungen wurde die gereinigte D-LDH-Präparation eingesetzt. Diese enthielt noch geringe Mengen der L-LDH, so daß diese Untersuchungen auch für L-HB möglich waren (Abb.26).

Für D-HB betrug der apparente K_m -Wert 4,5 mM, dieser war somit 7 fach erhöht gegenüber dem Substrat D-Lactat (Tab.19). Abweichend hierzu wurde für L-HB ein K_m -Wert von 11.1 mM bestimmt. Dies bedeutete eine 2.5 fach erhöhte Affinität der L-LDH zu L-HB im Vergleich zu L-Lactat (Tab.16).

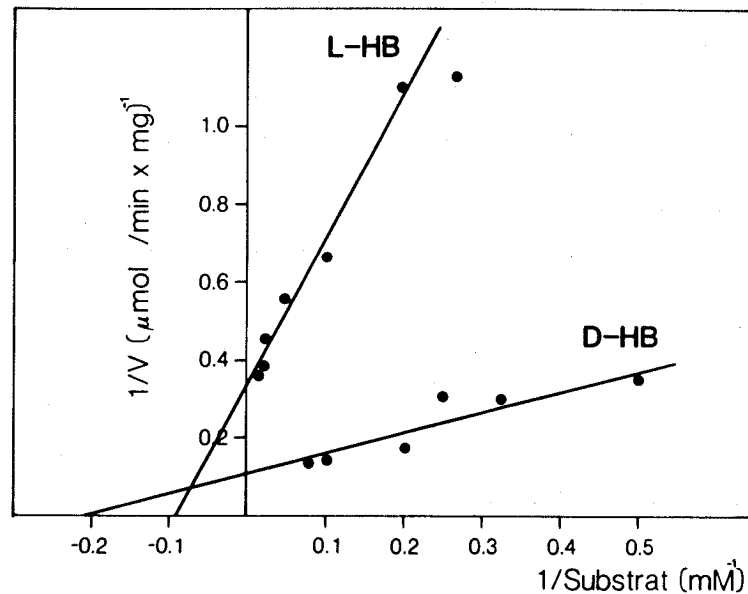


Abb.26: Lineweaver-Burk Diagramm zur Oxidation von D- und L-HB

Für die Bestimmungen wurde eine Enzympräparation eingesetzt, welche entsprechend Tab.18 gereinigt war. Der Testansatz enthielt DCPIP und PES.

Diese Untersuchungen bezogen sich auf die solubilisierten Enzyme, welche in ihrem kinetischen Verhalten, wie bereits unter 4.3 dargestellt, stark vom membrangebundenen Zustand abweichen können. Daher wurden diese Bestimmungen auch zusätzlich mit Rohextrakt durchgeführt (Tab.19).

Die D-LDH zeigte im Rohextrakt (7,1 mM) eine geringfügig verminderte Affinität zu D-HB als es die Bestimmungen für das solubilisierte Enzym (4,5 mM) ergeben hatten. Dagegen war die Affinität der L-LDH im Rohextrakt deutlich höher, denn der K_m -Wert für L-HB betrug 1,9 mM im Vergleich zu 11,1 mM für das lösliche Enzym. Neben diesen Untersuchungen ergab der Vergleich der spezifischen Aktivitäten ein interessantes Ergebnis. Die spezifische

Tab.19: Zusammenstellung der Km-Werte und der spezifischen Aktivitäten für die Oxidation von D- und L-Hydroxybutyrat und -Lactat im Rohextrakt sowie für die gereinigte D-Lactatdehydrogenase aus *C. glutamicum* DL4

Für die Rohextraktmessungen enthielt der Enzymtest DCPIP, für das gereinigte Enzym zusätzlich PES.

Substrat	Km-Wert (mM)	spez. Aktivität (U/mg)
<u>Gereinigte D-Lactatdehydrogenase</u>		
D-Lactat	0,59	71,7
D-HB	4,5	2,5
<u>Rohextraktbestimmung</u>		
D-Lactat	0,53	0,39
D-HB	7,1	0,03 (0,018) ¹
L-Lactat	0,71	0,10
L-HB	1,9	0,07 (0,07) ¹

¹ spez. Aktivität für den Stamm 14310

Aktivität für L-HB war 2.3 mal höher als für D-HB. Dies zeigt, daß die L-LDH das L-Isomer von HB deutlich besser umsetzt, denn trotz 4 fach erhöhter D-LDH-Aktivität ist die spezifische Aktivität für D-HB geringer. Durch diese Untersuchungen wurde auch der Unterschied der verbesserten Mutante DL4 zum Stamm 14310 deutlich. So betrug die spezifische Aktivität für die Oxidation von D-HB 0,018 U/mg für den Stamm 14310, im Gegensatz zu 0,03 U/mg für die Mutante DL4. Die spezifische Aktivität für L-HB war unverändert, so daß gezeigt werden konnte, daß die erhöhte D-LDH-Aktivität des Stammes DL4 eine vermehrte Oxidation von D-HB bewirkt.

Dieses Ergebnis weist ferner darauf hin, daß die Oxidation von D- und L-HB stereospezifisch von den Lactatdehydrogenasen katalysiert wird. Unterstützt werden konnte dies durch die Untersuchungen zum Einfluß von Pyruvat und Ketobutyrat. So hemmte der Zusatz von 5 mM Ketobutyrat bzw. Pyruvat die Oxidation von L-HB zu 50%, wohingegen die von D-HB nur um 12% reduziert war. Somit ergab sich eine völlige Übereinstimmung mit den Ergebnissen über die Aktivitätsminderung der D- und L-Lactat-Oxidation.

IV. DISKUSSION

In der Isoleucinbiosynthese wird 2-Ketobutyrat durch die Desaminierung von Threonin bereitgestellt. Dieser Schritt wird von der Threonindeaminase katalysiert, welche der Endprodukthemmung durch Isoleucin unterliegt (Burns und Zagero, 1968; Calhoun et al., 1973; Miyajima und Shiio, 1972). Die Isoleucinbildung aus Vorstufen bietet den Vorteil diese Regulation zu umgehen, was durch den Einsatz von Hydroxybutyrat gelingt. Im Vergleich zu Ketobutyrat als Vorstufe (Eggeling et al., 1984) kommt auf diese Weise jedoch der enzymatische Schritt der Oxidation von Hydroxybutyrat zu Ketobutyrat hinzu (s. Abb. 1).

Für die Isoleucinbildung aus Hydroxybutyrat hatte es sich gezeigt, daß *C. glutamicum* 14310 eine Leucin-auxotrophe Mutante des Wildstammes 13032, das D-Isomer des racemischen Hydroxybutyrats nur wenig umsetzte. Deswegen sollte eine entsprechend verbesserte Mutante isoliert werden. Alle Befunde sprachen dafür, daß NAD-unabhängige Lactatdehydrogenasen die Oxidation zu 2-Ketobutyrat katalysieren, also neben Lactat auch Hydroxybutyrat als Substrat umsetzen. Es gab Hinweise, daß die mangelnde Umsetzung von Hydroxybutyrat auf eine zu geringe D-LDH-Aktivität zurückzuführen war. Mutanten mit erhöhter Lactatdehydrogenase-Aktivität konnten von *Pseudomonas aeruginosa* isoliert werden (Brown und Tata, 1987). Im Unterschied zu *C. glutamicum*, wo die L-LDH ein induzierbares, die D-LDH jedoch ein konstitutives Enzym ist, sind bei diesem Organismus beide Enzyme induzierbar. Das Selektionssystem für *Pseudomonas aeruginosa* bestand darin, Spontanmutanten zu isolieren, die mit Lactat in Anwesenheit von Glycolat wachsen können. Der Wildtyp kann dies nicht, da Glycolat die Lactatdehydrogenasen reprimiert. Auf diese Weise konnten Mutanten isoliert werden, welche die Enzyme nun konstitutiv bildeten und teilweise eine erhöhte Enzymaktivität aufwiesen. Auch mit Vinylglycolat, welches die D- und L-LDH aus *E. coli* inaktiviert (Walsh et al., 1972) wären Selektionsverfahren denkbar.

Für *C. glutamicum* wurde allerdigs ein Anreicherungsverfahren mit

verbessertem Wachstum mit D-Lactat als Kohlenstoffquelle gewählt. Dies hat den Vorteil, daß es spezifisch auf erhöhte Verwertung gerichtet ist und damit dem Ziel der vollständigen HB-Verwertung am nächsten kommt. Die Mehrzahl der so von *C. glutamicum* isolierten Stämme mit erhöhter Wachstumsrate auf D-Lactat zeigte tatsächlich eine verbesserte HB-Verwertung. Insbesondere die Stämme *C. glutamicum* 13032-102 und DL4 verbrauchten die Vorstufe vollständig. Gleichzeitig schied der Stamm DL4 39% mehr Isoleucin aus als der Ausgangsstamm 14310 und aus 150 mM eingesetztem Hydroxybutyrat wurden nun 105 mM Isoleucin -entsprechend 13.8 g/l- gebildet.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten ergab, daß dieser Stamm über eine 3-4 fach erhöhte D-LDH-Aktivität verfügte, wobei der Km-Wert für D-Lactat mit dem des Ausgangsstammes identisch war. Unverändert hinsichtlich der Substrataffinität waren auch die Lactatdehydrogenasen der Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa*, welche bezüglich der Enzymregulation verändert waren (Brown, 1987). Die erfolgreiche Selektion des Stammes DL4 ist eine weitere Evidenz für die Identität des Lactat- und HB-oxidierenden Systems in *C. glutamicum* und zeigt ferner, daß im Stamm 14310 eine Limitation im Fluss von zugegebenem D-HB zu 2-Ketobutyrat als Intermediärprodukt der Isoleucinbiosynthese vorlag.

Zum Verständnis des Transportsystems, welches HB in die Zelle einschleust, wurden Untersuchungen zur Charakterisierung des Aufnahmesystems für Lactat und HB durchgeführt. Dazu wurden zunächst die kinetischen Eigenschaften des Lactat-Aufnahmesystems für den Ausgangsstamm 14310 ermittelt. Für die L-Lactat-Aufnahme betrug der Km-Wert 0,24 mM bei einer maximalen Aufnahmegeschwindigkeit von 4,7 nmol/min x mg TG. Eine geringere Affinität mit einem Km-Wert von 0,71 mM ergab sich für das D-Isomer, wobei die spezifische Aufnahmerate mit 28,6 nmol/min x mg TG deutlich höher war. Martin und Konings (1973) hatten für *E. coli* und *Bacillus subtilis* höhere Affinitäten bestimmt. So betrug der Km-Wert für L-Lactat bei *E. coli* und *Bacillus subtilis* 0,02 mM bzw. 0,06 mM und 0,03 mM bzw. 0,02 mM für das D-Isomer. Weniger affin war jedoch das Transportsystem von *Saccharomyces cerevisiae*, hier wurde für beide Isomere ein Km-Wert von 0,13 mM ermittelt (Cassio et al., 1987).

Bei *C. glutamicum* war die spezifische Aufnahmerate zudem abhängig von den Kulturbedingungen. So führte die Anzucht mit D,L-Lactat bei dem Stamm 14310 zu einer 5 fach erhöhten spezifischen Aufnahmeaktivität für L-Lactat und zu einer 1.5 fachen erhöhten für D-Lactat. Diese unterschiedliche Zunahme ergab den ersten Hinweis darauf, daß unter diesen Bedingungen ein zusätzliches L-Lactat-Aufnahmesystem vorhanden ist, welches eine schlechtere Affinität zu D-Lactat besitzt, so daß die Erhöhung der Aufnahmeaktivität für D-Lactat geringer ist.

Um weitere Aussagen über die Regulation der Lactat-Aufnahme im Sinne der Enzymsynthese bei *C. glutamicum* machen zu können, wären zusätzliche Bestimmungen erforderlich. Hierzu müßten die Zellen auf anderen Substraten angezogen werden. Dies könnte z.B. Succinat sein, welche als Dicarbonsäure vermutlich nicht über das Lactat-System aufgenommen wird und daher keinen regulatorischen Einfluß ausübt. Ghei und Kay (1972) hatten für *E. coli* und *Bacillus subtilis* gezeigt, daß unterschieden werden kann zwischen einem Transportsystem für kleinere Monocarbonsäuren und einem für kleinere Dicarbonsäuren. Dies wurde auch von Leao und van Uden (1986) für *Candida utilis* bestätigt.

Ein weiterer Hinweis auf ein zusätzliches, spezifischeres L-Lactat-Aufnahmesystem ergaben auch die Untersuchungen zur Kompetition der L-Lactat-Aufnahme. Nach Wachstum auf Glucose konnte die Aufnahme des markierten Substrates nur zu 77% durch einen Überschuß von unmarkiertem L-Lactat gehemmt werden, jedoch zu 89% bei Lactat-gewachsenen Zellen. Den Wettbewerbsversuchen zufolge, besitzt *C. glutamicum* demnach ein Transportsystem welches gleichermaßen D- wie L-Lactat akzeptiert, sowie ein spezifischeres für L-Lactat, welches nur eine geringe Affinität zu D-Lactat aufweist.

Abweichend dazu hatten Martin und Konings (1973) bei *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spec.* sowie *E. coli* ein gemeinsames Transportsystem für D- und L-Lactat nachgewiesen. Ebenfalls nicht stereospezifisch verlief die Lactat-Aufnahme bei *Saccharomyces cerevisiae* (Cassio et al., 1987), für die zudem gezeigt werden konnte, daß ein elektroneutraler Proton-Lactat Symport (1:1) vorlag.

Die Hemmung der Lactat-Aufnahme durch Hydroxybutyrat zeigte, daß dieses System auch Hydroxybutyrat akzeptiert.

Die L- und D-Lactataufnahme bei den Glucose-gewachsenen Zellen des Stammes 14310 konnte zu 75% bzw. 23% durch 20 mM D,L-HB gehemmt werden. Die Hemmung der D-Lactat-Aufnahme ist jedoch höher anzunehmen, da aus experimentellen Gründen die Substratkonzentration im Ansatz unterhalb des K_m -Wertes lag. Diese Ergebnisse würden bedeuten, daß das gemeinsame Transportsystem für D- und L-Lactat auch die Isomeren des Hydroxybutyrats aufnimmt. Wurden die Isomeren getrennt für die kompetitive Hemmung eingesetzt, so ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede in der Wirkung von L- und D-HB. Die L-Lactat-Aufnahme Lactat-gewachsener Zellen der Mutante DL4 wird jedoch durch einen Überschuß von L-Lactat (89%) und L-HB (52%) gehemmt, durch D-HB jedoch nicht. Dies zeigt, daß das induzierbare System konfigurationsspezifisch ist und dieses vorwiegend das L-Isomere des HB aufnimmt. In Einklang damit steht, daß die D-Lactat-Aufnahme unabhängig vom Wachstums-substrat jeweils zu 28% gehemmt wird, also ausschließlich das unspezifische Transportsystem D-HB aufnimmt.

Diese geringe Konkurrenz der Lactat-Aufnahme durch D-HB legt nahe, daß der Stamm 14310 in der D-HB-Aufnahme limitiert gewesen sei, die Mutante DL4 aber nicht. Direkte Aufnahmestudien mit ^{14}C D-HB waren nicht möglich. Es kann jedoch durch die orientierenden Untersuchungen folgendes festgehalten werden:

Unter der Voraussetzung, daß D-HB nur über das Lactat-System aufgenommen wird, sollte eine Limitation bei dem Ausgangsstamm nicht vorgelegen haben, denn die Mutante weist weder für L- noch für D-Lactat eine erhöhte spezifische Aufnahmerate auf; sie ist sogar noch reduziert. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß D-HB hauptsächlich über ein anderes, nun verbessertes Transportsystem für 2-Hydroxysäuren aufgenommen wird, welches D-Lactat nicht transportiert und daher durch die Messungen nicht erfaßt wurde. Dagegen spricht, daß die Mutante DL4 über eine Anreicherungskultur mit D-Lactat isoliert wurde, also dieses Aufnahmesystem auch D-Lactat akzeptieren sollte; anderenfalls trüge der Stamm DL4 dann -neben der D-Lactatdehydrogenase- eine weitere Mutation, die mit keinem Selektionsvorteil verbunden war.

Da aber die Mehrzahl der isolierten Spontanmutanten eine verbesserte D-HB-Aufnahme zeigten, macht es eher unwahrscheinlich, daß zusätzlich ein Aufnahmesystem betroffen wurde, welches D-Lactat nicht transportiert. Es läßt sich also feststellen, daß die Lactat-Aufnahme bei der Mutante DL4 erkennbar verändert ist, aber keine Hinweise auf eine verbesserte HB-Aufnahme bzw. Limitation beim Ausgangsstamm vorliegen.

Eine andere Möglichkeit, warum die Aufnahme von L- und D-HB in Fermentationen so unterschiedlich abläuft, auch wenn das Transportsystem nicht limitiert, wäre gegeben, wenn Aufnahme und anschließende Oxidation nicht unabhängig voneinander sind, und die mangelnde Dehydrogenase-Aktivität eine rasche Aufnahme verhindert. Zwar besteht kein Zweifel, daß Transportsystem und Oxidationssystem (= Dehydrogenasen) verschieden sind, diese sich jedoch gegenseitig beeinflussen können (Matin und Konings, 1973; O'Brien, 1977b; Hong und Kaback, 1972). So konnten Kay und Kornberg (1971) zeigen, daß bei Mutanten von *E. coli*, welche in der Succinat-Dehydrogenase defekt waren, die Succinat-Aufnahme stark reduziert war, obwohl das Transportsystem unverändert war. Auf die Gegebenheiten bei *C. glutamicum* übertragen, würde dies bedeuten, daß die L-LDH L-HB besser umsetzt als die D-LDH D-HB. Dies kann bedingt sein durch:

- A) Geringe spezifische Aktivität für D-HB
- B) Die Affinität der L-LDH zu L-HB ist deutlich höher als die der D-LDH zu D-HB
- C) Die D-LDH unterliegt einer Endprodukthemmung
- D) Die D-LDH wird durch L-HB gehemmt

zu A) Aussagekräftige Untersuchungen zum Umsatz waren möglich, da die Isomere D- und L-HB zur Verfügung standen. Die Messungen erfolgten zunächst im Rohextrakt, da die Enzyme dann noch mit der Cytoplasmamembran assoziiert sind und diese Bedingungen am ehesten mit denen in vivo vergleichbar sind, denn durch die Ablösung von der Membran kommt es zu Veränderungen der kinetischen Eigenschaften. Die spez. Aktivität für die Oxidation von L- und D-HB im Rohextrakt zeigte deutliche Unterschiede. So betrug die spez. Aktivität für L-HB 0.07 U/mg und für D-HB 0.018 U/mg bei

dem Stamm 14310, während die Mutante DL4 mit 0,03 U/mg eine erhöhte spez. Aktivität für D-HB aufwies. Die Untersuchungen für die solubilisierete D- und L-LDH zeigten die gleiche Tendenz. Ein Vergleich der relativen Umsatzraten ergibt, daß die Oxidationsrate für D-HB nur 3.5 beträgt, wenn die Rate für D-Lactat bzw. L-Lactat gleich 100 gesetzt wird, während sie für L-HB jedoch 43 beträgt. Ähnliches berichtete Futai (1973; 1977) für die gereinigte D- und L-LDH aus *E. coli*, hier betrug die relative Umsatzrate von HB nur 12 für die D-LDH, während das Substrat von der L-LDH mit gleicher Geschwindigkeit wie L-Lactat oxidiert wurde. Somit zeigten auch die LDH aus *E. coli* eine sehr unterschiedliche spezifische Aktivität für D- und L-HB.

zu B) Darüber hinaus war der Km-Wert für L-HB mit 1.9 mM deutlich geringer als für D-HB mit 7.1 mM, so daß die L-LDH bereits bei geringerer Substratkonzentration die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht, wohingegen die D-LDH diese erst bei höheren Substratkonzentrationen erreicht. So konnten also zwei Faktoren -geringe spez. Aktivität für D-HB und schlechte Affinität- basierend auf den kinetischen Eigenschaften der D-LDH aufgezeigt werden, welche eine gegenüber L-HB verminderte Umsetzung erklären. Faßt man dieses Ergebnis mit dem Befund von Kay und Kornberg (1971) zusammen, welche eine Reduktion der Succinat-Aufnahme infolge mangelnder Dehydrogenase-Aktivität feststellten, so ist die geringe Oxidationsgeschwindigkeit in der Zelle möglicherweise für die verzögerte Umsetzung von D-HB während der Fermentation verantwortlich.

zu C) Die in vitro Aktivität der D- und L-LDH unterliegt der Endprodukthemmung durch 2-Ketobutyrat bzw. Pyruvat. Bei der D-LDH führt erst eine Konzentration von 5 mM der beiden Endprodukte zu einer 10 %igen Aktivitätsminderung, während sie für die L-LDH unter diesen Bedingungen bereits 50% beträgt. Daher kann eine verzögerte D-HB-Umsetzung infolge einer Endprodukthemmung durch intrazelluläres Pyruvat bzw. 2-Ketobutyrat ausgeschlossen werden, da sie wesentlich stärker die L-LDH betrifft. Die Lactatdehydrogenasen von *C. glutamicum* differieren somit gegenüber denen aus *Propionibacterium freudenreichii* (Crow, 1986). Hier

hemmte bereits der Zusatz von 5 mM Pyruvat die Aktivität der D-LDH zu mehr als 50%, während die L-LDH unbeeinflusst blieb. Die Hemmung der D-LDH durch Pyruvat machte Crow dafür verantwortlich, daß bei Wachstum auf D,L-Lactat das D-Isomer stark verzögert aufgenommen wurde.

zu D) Allison et al. (1985 a) berichteten, daß die D-Mandelatdehydrogenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* in vitro durch das L-Isomer gehemmt wurde, jedoch konnte entsprechendes für die D-LDH nicht festgestellt werden. Markwell und Lacelles (1978) berichteten, daß die L-LDH aus *Rhodopseudomonas sphaeroides* kompetitiv durch D-Lactat mit einem K_i von 22 mM gehemmt wurde. Inwieweit eine solche Hemmung der D-LDH durch L-HB bei *C. glutamicum* eine Rolle spielen könnte, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Hierzu wäre es unabdingbar, neben der Bestimmung des K_i , vor allem durch detaillierte Poolbestimmungen für D- und L-HB die tatsächlichen Verhältnisse in der Zelle zu ermitteln. Gegen eine solche gegenseitige Beeinflussung sprechen die Ergebnisse von Martin und Konings (1973), welche Poolmessungen nach Aufnahme von Lactat bzw. Succinat durchführten und nur deren Oxidationsprodukte nachweisen konnten. Dieses würde bedeuten, daß es intrazellulär zu kaum nachweisbarer Anreicherung von HB kommt.

Durch die Ausarbeitung eines Verfahrens zur Isolierung der D-LDH aus *C. glutamicum* konnte diese nahezu frei von Fremdproteinen dargestellt werden. Trotz des Einsatzes verschiedenster Trennprinzipien wurde die L-LDH nicht vollständig von der D-LDH abgetrennt, jedoch wurde das Verhältnis der D- zur L-Aktivität von anfänglich 4:1 auf 30:1 reduziert. Allison et al. (1985 a) gelang es diese beiden Enzyme von *Acinetobacter calcoaceticus* mittels Ionenaustauscherchromatographie zu trennen, wohingegen die L-LDH aus *E. coli* (Futai, 1977) durch Gelchromatographie von der D-LDH getrennt werden kann. Dies ist möglich, da die L-LDH im solubilisierten Zustand als Oligomer mit einem Molekulargewicht von 320.000 Da vorliegt, während die D-LDH unter diesen Bedingungen nur eines von 72.000 Da aufweist (Futai, 1973). Obgleich für *C. glutamicum* bislang kein solch eindeutiges Trenn-

prinzip vorliegt, kann sicher angenommen werden, daß es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt:

Die D-LDH erwies sich als konstitutives Enzym, die L-LDH war induzierbar; der Stamm DL4 zeigte eine erhöhte D-LDH-Aktivität bei unveränderter L-LDH; nach der Solubilisierung zeigte die L-LDH eine geringere Stabilität gegenüber Detergenzien sowie höhere Aktivitätsverluste während der Reinigung. Dies berichteten auch Markwell und Lascelles (1977) für die L-LDH aus *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Zudem führte bei diesem Organismus die Ablösung von der Membran zu einer erhöhten Substrataffinität der D-LDH, während der K_m -Wert für die L-LDH von 0,71 mM auf 28,6 mM anstieg. Weiterhin wurde die Aktivität der beiden Enzyme unterschiedlich durch Ketobutyrat und Pyruvat gehemmt. Dies galt sowohl für Lactat wie Hydroxybutyrat als Substrat, was zudem auf eine hohe Stereospezifität hinweist.

Eine vergleichende Gegenüberstellung der Eigenschaften der D-LDH aus *C. glutamicum* mit dem Enzym aus *E. coli* und *Acinetobacter calcoaceticus* ist Tab.19 zu entnehmen. Bislang war nur die D-LDH dieser beiden gram-negativen Organismen isoliert worden, so daß die Charakterisierung des Enzyms aus *C. glutamicum* erste Angaben für einen gram-positiven Organismus darstellen.

Wie dieser Aufstellung zu entnehmen ist, bestehen große Ähnlichkeiten zwischen den drei Enzymen aus den unterschiedlichen Organismen.

Die D-LDH aus *E. coli* und *A. calcoaceticus* enthält nichtkovalent gebundenes FAD als Coenzym. Mit hoher Wahrscheinlichkeit trifft dies auch für *C. glutamicum* zu, denn im Extrakt der hochangereicherten Fraktion wurde FAD nachgewiesen. Zudem gelang durch Zugabe von FAD bei Aktivitätsverlusten durch die Reinigung die Reaktivierung des Enzyms. Dieser Coenzym-Verlust muß bei der Berechnung des Verhältnisses Coenzym/Polypeptidkette berücksichtigt werden. Ausgehend von der tatsächlich bestimmten Menge ergibt sich ein Verhältnis von 0.25/1, jedoch ist dies sicherlich zu gering. Da auch die D-LDH von *C. glutamicum* als Monomer vorliegt ist anzunehmen, daß ebenso wie bei den in der Tabelle angegebenen Organismen pro Mol Enzym ein Mol FAD gebunden ist.

Tab.19: Kennzeichen der NAD-unabhängigen D-Lactatdehydrogenase aus *E. coli*,
Acinetobacter calcoaceticus und *C. glutamicum*

Kennzeichen	<i>E. coli</i> (Futai ¹ , Pratt ²)	<i>A. calcoaceticus</i> (Allison et.al., 1985a)	<i>C. glutamicum</i> (diese Arbeit)
Lokalisierung	Alle liegen membrangebunden vor.		
Regulation	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
Solubilisierung durch	Cholat ² /D-Chol. 1/3	Triton X-100	LDAO
Molekulargewicht nach	72.000 Da ¹		70.000 Da
SDS-Gelelektrophorese	75.000 Da ²	63.000 Da	
Molekulargewicht nach	71.000 ± 3000 Da	101.000 Da in	115.000 ± 5000 Da
Gelfiltration	in 0,5 % Cholat ¹	0,1 % Triton X-100	in 0,5 % LDAO
pH-Optimum (solub.)	8-9	7,7	7,0
pI	k.A.	5,8	4,8
Coenzym (nichtkovalent gebunden)	FAD	FAD	FAD
Km-Wert für D-Lactat (mM)	2,2 / 0,72	k.A. / 0,31	0,53 / 0,15
(membrangeb./solub.)			
Km-Wert für Hydroxyb. (mM)	3,9 / 1,2 (D,L-HB)	k.A.	7,1 / 4,5 (D-HB)
(membrangeb./solub.)			
relative Rate zu HB			
(D-Lactat=100)	12	k.A.	3,5 (7,7)*

1 Futai, 1973 2 Pratt et al., 1979 3 Desoxycholol * membrangebunden

Die Flavinbestimmung ergab auch den Nachweis einer geringen Menge FMN. Dieses ist das Coenzym der L-LDH aus *E. coli* (Futai, 1977) und *A. calcoaceticus* (Allison et al., 1985a); möglicherweise rührt das gefundene FMN von der in der D-LDH Präparation noch vorhandenen L-LDH her. Dagegen spricht jedoch der Befund, daß die L-Aktivität ebenfalls nur durch FAD, nicht aber durch FMN gesteigert werden konnte. Abweichend von diesen beiden Organismen wäre auch das native Molekulargewicht der L-LDH. Denn gegenüber 320.000 Da (Oligomer) von *E. coli* hätte die L-LDH aus *C. glutamicum* eines von ca. 100.000 Da, was jedoch mit der L-LDH aus *Rhodopseudomonas sphaeroides* übereinstimmen würde (Markwell und Lascelles, 1978).

Zu der membrangebundenen D-LDH aus *E. coli* sollte angemerkt werden, daß diese in den 70iger Jahren Gegenstand zahlreicher Publikationen gewesen ist (Kaback und Milner, 1970; Kaback und Barnes, 1971; Short und Kaback, 1974). Vor allem Kaback und seine Mitarbeiter untersuchten dieses Enzym in Hinblick auf seine Rolle bei Transportvorgängen. Sie postulierten, daß die bei der Oxidation von D-Lactat freiwerdenden Elektronen die funktionellen Sulfhydrylgruppen eines Carrier reduzieren, der daraufhin Aminosäuren oder Zucker ins Zellinnere transportiert. Nachfolgend sollte der Carrier durch Cytochrome der Atmungskette wieder reoxidiert werden. Als treibende Kraft für diese Transportvorgänge wird heute jedoch die Protonen-treibende Kraft nach der chemioosmotischen Hypothese von Mitchell angenommen (Lehninger, 1979).

Die Isoleucinbildung mit *C. glutamicum* verläuft wachstumsgekoppelt wie auch bei allen in der Literatur beschriebenen Verfahren (Kisumi et al., 1970; Wada, 1980; Shimura, 1972; Matsushima, 1976) und ist nach 70 -80 Stunden beendet. In dieser Zeit bildet die Mutante DL4 bis zu 16 g/l Isoleucin. Bei den meisten vergleichbaren Verfahren ist die erzielte Ausbeute etwas geringer (s. Tab.1). Zudem zeichnet sich der Stamm dadurch aus, daß für die Fermentation Hydroxybutyrat eingesetzt werden kann, welches noch hohe Konzentrationen von Salz und andere Verunreinigungen enthält, was die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens verbessert. Die Ausbeute beträgt bei Vorlage von 150-200 mM HB ca. 70% und

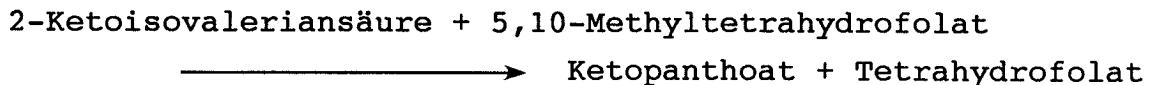
nimmt dann mit steigender Konzentration ab. Dieser Effekt wird noch deutlicher bei Nachdosierung von HB während der Fermentation. Zwar führt dies zu einer höheren Endkonzentration, jedoch wird maximal 30% der nachträglich zugesetzten Vorstufe zu Isoleucin umgesetzt. Diese Verschiebungen weisen auf die Bedeutung der Nebenproduktbildung hin. Aus Literaturdaten läßt sich ebenfalls berechnen, daß in keinem Fall vollständige Umsetzungen stattfinden (Matsushima und Mase, 1973; Updike und Calton, 1982).

Die einzigen Untersuchungen von Eggeling (1986) und Wilhelm (1987) hierzu hatten gezeigt, daß die Verzweigungspunkte für biochemische Seitenreaktionen zum einen Ketobutyrat, zum anderen Ketomethylvalerat (Ketoisoleucin) sind.

Für die Ausscheidung von Ketoisoleucin war eine unzureichende spezifische Aktivität der Transaminase B angenommen worden (Eggeling, 1986). Dies konnte durch die Ergebnisse von Nassenstein nicht bestätigt werden, denn die Klonierung des entsprechenden Gens aus *E. coli* in *C. glutamicum* führte zur Erhöhung der spez. Aktivität, jedoch nicht zu vermehrter Isoleucin-Ausscheidung.

In dieser Arbeit wurde auch die Mutante 13032-102 isoliert, welche HB vollständig verbrauchte, jedoch nur wenig Isoleucin bildete. Da eine Leucin-auxotrophe Mutante dieses Stammes ebenso viel Isoleucin bildete wie der Stamm DL4, legt dies nahe, daß wohl eher Konkurrenzreaktionen um 2-Ketobutyrat als um Ketoisoleucin für den unvollständigen Umsatz von HB eine Rolle spielen. Darüber hinaus konnten im Kulturfiltrat des Stammes 13032-102 nur leicht erhöhte Mengen von Nebenprodukten nachgewiesen werden, was den Schluß einer Verstoffwechselung von 2-Ketobutyrat zuläßt. Als Konkurrenz zur AHAS kommen drei Reaktionen in Betracht:

- 1) Bildung von Ketomethylhydroxybutyrat
 - 2) Transaminierung zu 2-Aminobutyrat
 - 3) Zellexterne und -interne Decarboxylierung von 2-Ketobutyrat
- Bei der ersten Möglichkeit handelt es sich um die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase, welche den ersten Schritt in der Biosynthese von Pantothenat katalysiert:



Powers et al.(1976) und Primerano et al.(1982) konnten für *E. coli* und *Salmonella typhimurium* zeigen, daß dieses Enzym neben dem eigentlichen Substrat ebenso gut 2-Ketobutyrat umsetzt. Es wäre denkbar, daß dieses auch für das Enzym aus *C. glutamicum* gilt. Aussagen hierüber sind jedoch nicht möglich, da weder die Substratspezifität des Enzyms bekannt ist, noch die Reaktionsprodukte bislang im Kulturfiltrat nachgewiesen wurden.

Die zweite Möglichkeit, die Aminierung von 2-Ketobutyrat zu 2-Aminobutyrat ist eine Reaktion die sicherlich bei einem 2-Ketobutyrat-Anstau abläuft, denn der Stamm 13032-102 bildete ca. 3 mM 2-Aminobutyrat gegenüber 0.5 mM bei den anderen Stämmen. Deutlicher wird dieser Effekt jedoch durch die Experimente zur Nachdosierung von HB, hier konnten nach zusätzlicher Gabe von 100 mM HB ca. 10 mM 2-Aminobutyrat nachgewiesen werden. 2-Aminobutyrat wurde auch von LaRossa et al.(1987) im Kulturfiltrat von *Salmonella thyphimurium* nachgewiesen, bedingt durch einen 2-Ketobutyrat-Anstau infolge reduzierter AHAS-Aktivität. Auch Kisumi et al. (1970) berichtet über die Entstehung von 2-Aminobutyrat aus 2-Ketobutyrat bei *Serratia marcescens* während der Isoleucinfermentation. Entsteht 2-Aminobutyrat als Nebenprodukt, so ist dieses nicht zwangsläufig für die Isoleucinbildung verloren, sondern kann wieder zu 2-Ketobutyrat desaminiert werden. Dies ist bekannt, da 2-Aminobutyrat auch als Vorstufe für die Isoleucin-Fermentation geeignet ist. (Kisumi et al., 1973 ; Scheer, 1975).

2-Ketobutyrat kann jedoch auch decarboxyliert werden und steht dann für die Isoleucinbildung nicht mehr zur Verfügung. Ausgeschiedenes 2-Ketobutyrat kann chemisch zu Propionaldehyd umgesetzt werden (Wilhelm, 1987).

Zellintern könnte durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex 2-Ketobutyrat zu Propionyl-CoA umgesetzt werden. So wurde im zellfreien Extrakt von *Salmonella typhimurium* Propionyl-CoA nachgewiesen, wenn unter Einwirkung des Herbizids Methylsulfuron die

AHAS gehemmt wurde und sich intern 2-Ketobutyrate anhäufte (van Dyk und LaRossa, 1987). Zudem konnte gezeigt werden, daß Propionyl-CoA vermutlich weiter zu Propionat umgesetzt wurde. Diese Schritte können durch die Phosphotransacetylase bzw. Acetatskinase katalysiert werden.

Propionsäure wurde im Kulturfiltrat von *C. glutamicum* nicht nachgewiesen, es wäre jedoch möglich, daß Propionyl-CoA weiter zu Succinyl-CoA umgesetzt wird und in den TCA-Cyclus eingeht. Über diesen Reaktionsweg läuft der Abbau von Methionin, Valin und Isoleucin (Lehninger, 1979).

Zum Abschluß der Diskussion sollen auf der Grundlage dieser Arbeit einige Ansätze aufgezeigt werden, welche zur weiteren Klärung von Konkurrenzreaktionen um 2-Ketobutyrate beitragen. Zunächst liegt es nahe, weitere Untersuchungen des Kulturfiltrates und zudem Poolbestimmungen durchzuführen, um die o.g. möglichen Produkte zu erfassen. Zur Erleichterung der experimentellen Durchführung empfiehlt es sich, die Bestimmungen unter Fermentationsbedingungen durchzuführen, bei denen größere Mengen von 2-Ketobutyrate entstehen. Dies gelingt zum einen durch Nachdosieren von HB, zum anderen durch die Zugabe höherer Leucin-Mengen, was zur Hemmung der AHAS und damit zum Ketobutyrate-Anstau führt, so daß Effekte klarer erkennbar werden.

Ein genetischer Ansatz wäre die Klonierung der Gene des Isoleucin-Biosyntheseweges. Mit Hilfe dieser gentechnischen Methoden können Plasmide konstruiert werden, welche jeweils eines der betreffenden Gene tragen. So kann nach Transformation in die entsprechenden Stämme eine Erhöhung der Enzymmenge erreicht werden. Dies liefert den direkten Nachweis, ob an dieser Stelle ein limitierender Schritt vorliegt und zur Nebenproduktbildung führt. Möglicherweise könnte dann durch den Einsatz rekombinanter Stämme eine stöchiometrische Umsetzung von Hydroxybutyrate zu Isoleucin erreicht werden.

Diese Überlegungen gelten jedoch nur unter der Voraussetzung, daß der Efflux von Isoleucin keine zusätzliche Limitierung darstellt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Vorstufe D,L-2-Hydroxybutyrat ist kein natürliches Intermediärprodukt der Isoleucinbiosynthese. Die Oxidation zu 2-Ketobutyrat, der natürlichen Vorstufe, wird in *C. glutamicum* durch die NAD-unabhängige D- und L-Lactatdehydrogenase katalysiert. Die D-LDH wird in *C. glutamicum* konstitutiv gebildet, während die L-LDH induzierbar ist.

2. Ausgehend von dem Leucin-auxotrophen Stamm 14310 und dem Wildstamm 13032 wurden Mutanten, die ein verbessertes Wachstum mit D-Lactat als Kohlenstoffquelle zeigten, isoliert. Im Gegensatz zu den Ausgangsstämmen verwerteten zwei Mutanten auch D-HB vollständig.

3. Die Mutante 14310-DL4 hat gegenüber dem Ausgangsstamm 14310 eine 3-4 fach erhöhte D-Lactatdehydrogenase-Aktivität, wobei die Substrataffinität des Enzyms unverändert war. Ebenso unverändert war die spezifische Aktivität für die L-Lactatdehydrogenase.

4. Der Stamm 14310-DL4 bildete in einem Mineralsalzmedium mit 4% Glucose, 0,2 g/l Leucin und 150 mM Hydroxybutyrat ca. 105 mM (=13,8 g/l) Isoleucin. Dies entsprach einer molaren Ausbeute von 70%. Die Analyse des Kulturfiltrates ergab, daß L-HB unmittelbar nach Beginn des Wachstums von den Zellen aufgenommen wurde, während die Aufnahme des D-Isomers erst nach 24 Stunden begann.

5. Die Mutante 13032-102 nahm die Vorstufe ebenfalls vollständig auf und bildete unter den gleichen Fermentationsbedingungen, jedoch ohne Zusatz von Leucin, nur ca. 38 mM Isoleucin. Es konnte gezeigt werden, daß die Ursache hierfür eine zu geringe spez. Aktivität der Acetohydroxysäuresynthase war. Da im Kulturfiltrat nicht entsprechend erhöhte Mengen von Nebenprodukten der Isoleucinbiosynthese nachweisbar waren, deutete dies darauf hin, daß 2-Ketobutyrat auch in andere Stoffwechselwege eingeschleust werden kann.

6. Die Vorstufe Hydroxybutyrat kann über das Lactat-Transportsystem aufgenommen werden, wobei die Affinität bezüglich L-HB deutlich höher ist als zu D-HB.

C. glutamicum 14310 hat mindestens zwei Lactat-Aufnahmesysteme, wovon eines sowohl D- und L-Lactat transportiert und als auch D,L-HB. Das zweite System ist stereospezifisch und besitzt eine hohe Affinität zu L-Lactat und L-HB. Das spezifischere Aufnahmesystem wird erst nach Wachstum der Zellen auf Lactat exprimiert und die spezifische Aufnahmerate für L-Lactat erhöht sich von 4,5 auf 23,5 nmol/min x mg TG.

Die Mutante DL4 ist in ihrem Lactat-Aufnahmesystem gegenüber dem Stamm 1430 verändert. Nach Wachstum auf Glucose nahmen die Zellen kein L-Lactat mehr auf, ebenso war die D-Lactat-Aufnahme um 75% reduziert. Der Stamm wies jedoch nach Wachstum auf Lactat eine ähnlich hohe spezifische Aufnahmerate für L- und D-Lactat auf wie der Stamm 14310.

7. Die NAD-unabhängigen Lactatdehydrogenasen sind membrangebundene Enzyme, welche sich durch das nichtionische Detergenz N,N-dimethyldodecylamine-N-oxid von der Membran ablösen lassen. Ferner stabilisiert dieses Detergenz die Enzymaktivität. Ein Reinigungsverfahren, in welchem die D-LDH über DEAE-Sephadex, Mono Q und Hydroxylapatit gereinigt wurde, führte zu einer 775 fachen Anreicherung des Enzyms. Dies entspricht einer Erhöhung der spezifischen Aktivität von 0,4 auf 310 U/mg. Nach SDS-Gelelektrophorese ergab sich ein Molekulargewicht von 70.000 Da, während die Bestimmung der nativen Molekülgröße mittels Gel-filtration 115.000 ± 5000 Da ergab. Das Coenzym der D-LDH ist nichtkovalent gebundenes FAD.

8. Kinetische Untersuchungen im Rohextrakt des Stammes 14310-DL4 ergaben für die Oxidation von L-HB einen Km-Wert von 1.9 mM, während er für D-HB 7.1 mM betrug. Die spezifische Aktivität für das L-Isomer betrug 0.07 U/mg und für das D-Isomer 0.03 U/mg. So wurde trotz der erhöhten D-LDH-Aktivität der Mutante DL4 D-HB schlechter umgesetzt. Dies weist darauf hin, daß die schlechtere Verwertung von D-HB eine Folge der geringeren Affinität und geringeren spezifischen Aktivität der D-LDH für dieses Substrat ist.

VI. LITERATUR

Abe, S. (1972):

Mutants and their utilization. In "The Microbial Production of Amino Acids"; Yamada, K.; Kinoshita, S.; Tsunoda, T.; Aida, K. (eds.); Kodansha Ltd. Tokyo, Japan; John Wiley & Sons Inc. New York, USA

Adelberg, E.A. (1958):

Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites
J. Bact. 76 : 326-328

Allison, N.; O'Donnell, M.; Fewson, Ch.A. (1985 a):

Membrane-bound lactate-dehydrogenases and mandelate dehydrogenases of *Acinetobacter calcoaceticus*
Biochem. J. 231 : 407-416

Allison, N.; O'Donnell, M.; Hoey, M.E.; Fewson, Ch.A. (1985 b):

Membrane-bound lactate dehydrogenase of *Acinetobacter calcoaceticus*
Biochem. J. 227 : 753-757

Baumgarten, J. (1969):

Die Regulation der Synthese von Isoleucin, Valin und Leucin bei *Arthrobacter* St 23
Dissertation, Universität Göttingen

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974):

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. et al. (eds.),
The Williams & Wilkins Company, Baltimore

O'Brien, R.W. (1977):

Metabolism of D- and L-Lactate by *Pseudomonas putida*
Austr. J. Biol. Science 30 : 553-558

Brockmann, H.L.; Wood, W.A. (1975):

D-Lactate-dehydrogenase of *Peptostreptococcus elsdenii*
J. Bacteriol. 124 (3) :

Brown, P.R.; Tata R. (1987):

Glycollate inhibition of growth of *Pseudomonas aeruginosa* on lactate medium
J. Gen. Microbiol. 133 : 1521-1526

Burns, R.O. and Zarlengo, M.H. (1968) :

Threonine deaminase from *Salmonella typhimurium*
J. Biol. Chem. 243 : 178-185

Calhoun, D.H.; Rimerman, R.A.; Hatfield, G.W. (1973):

Threonine deaminase from *E. coli*

I. Purification and properties

J. Biol. Chem. 248 : 3511-3516

Cassio, F.; Leao, C.; van Uden, N. (1987):

Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Appl. and Environ. Microbiol. 53 (3) : 509-513

Chromatofokusing

Handbuch der Fa. Pharmacia, Freiburg

Claus, D.; Lack, P.; Neu, B. (1983):

Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen, Catalogue of

Strains; Bacteria, Filamentous Fungi, Yeasts

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig

Cooper, A.J.L.; Ginos, J.Z.; Meister, A. (1983):

Synthesis and properties of the 2-keto acids

Chem. Rev. 83 : 321-358

Cordes, Ch. (1986):

Untersuchungen zur Regulation der Isoleucin-biosynthetischen Enzyme bei *Corynebacterium glutamicum*

Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

Crociani, F.; Emaldi, O.; Matteuzzi, D. (1977):

Increase in isoleucine accumulation by 2-aminobutyric acid-resistant mutants of *Bifidobacterium ruminale*

Europ. J. Appl. Microbiol. 4 : 177-179

Crow, V.L. (1886):

Utilization of lactate-isomers by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanni*: Regulatory role for intracellular pyruvate

Appl. and Environ. Microbiol. 52 (2) : 352-358

Data for Biochemical Research (1986):

Dawson, R.M.C.; Elliott, D.C.; Elliott, W.H.; Jones, K.M. (eds.); Clarendon Press, Oxford

Dyk, van T. K.; LaRossa, R.A. (1987):

Involvement of ack-pta operon products in 2-ketobutyrate metabolism by *Salmonella typhimurium*

Molec. & Gen. Genet. 207 (2-3) : 435-440

Eggeling, I. (1986):

Untersuchungen zur Umsetzung von 2-Ketobutyrat zu L-Isoleucin
mit *Corynebacterium glutamicum*
Dissertation, Universität Düsseldorf

Eggeling, I.; Cordes, C; Eggeling, L.; Sahm, H (1987):

Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of 2-ketobutyric acid to L-Isoleucin
Appl. Microbiol. Biotechnol. 25 : 346-351

Farbliganden-Chromatographie

Handbuch der Fa. Pharmacia, Freiburg

Futai, M. (1973):

Membrane D-lactate dehydrogenase from *E. coli*. Purification and properties
Biochem. 12 (13) : 2468-2474

Futai, M.; Kimura, H. (1977):

Inducible membran-bound L-lactate-dehydrogenase from *E. coli*
J. Biol. Chem. 252 (16) : 5820-5827

Garvie, E.J. (1980):

Bacterial lactate dehydrogenases
Microbiol. Rev. 44 (1) : 106-139

Ghei, K.; Kay, W.W. (1972):

A dicarboxylic acid transport system in *Bacillus subtilis*
FEBS Letters 20 : 137-140

Gornall, A.G.; Bardawill, C.J.; Maxima, M.D. (1949):

Determination of serum proteins by means of the biuret reaction
J. Biol. Chem. 177 : 751-766

Ghosh, R.; Quayle, J.R. (1979):

Phenazine ethosulfate as a preferred electron acceptor to phenazine methosulfate in dye-linked enzyme assays
Anal. Biochem. 99 : 112-117

Grimminger, H.; Umbarger, H.E. (1979):

Acetohydroxy acid synthase I of *E. coli*: Purification and properties
J. Bact. 137 : 846-853

- Haar, von der F.** (1976):
Purification of proteins by fractional interfacial salting out on unsubstituted Agarose Gels
Biochem. Biophys. Research Communic. 70 (3) : 1009-1013
- Helenius, A.; Simons, K.** (1975):
Solubilization of membranes by detergents
Biochimica et Biophysica Acta 415 : 29-79
- Hirose, Y.; Okada, H.** (1979):
Microbial production of amino acids. In "Microbial Technology" 2nd Ed. Peppler, H.J., Perlman, D. (eds.), New York, Vol.I: 211-240
- Hirose, Y.; Shibai, H.** (1980):
Amino acid fermentation
Biotech. and Bioengineering 22 suppl.1 : 111-125
- Hong, J.Sh.; Kaback, H.R.** (1972):
Mutants of *Salmonella thyphimurium* and *E. coli* pleiotropically defective in active transport
Proc. Nat. Acad. Science 69 (11) : 3336-3340
- Hoppe, B.; Martens, J.** (1983):
Aminosäuren - Bausteine des Lebens
Chemie in unserer Zeit 17 (2) : 41-53
- Hoppe, B.; Martens, J.** (1984):
Aminosäuren-Herstellung und Gewinnung
Chemie in unserer Zeit 18 : 73-86
- Horvath, I.; Varga, J.M.; Szentirmai, A.** (1964):
Control of valine and isoleucine metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli*
J. Gen. Microbiol. 34 : 241-248
- Hydrophobic interaction chromatography**
Handbuch der Fa. Pharmacia, Freiburg
- Ikeda, Sh.; Fugita, I.; Yoshinaga, F.** (1976):
Screening of L-isoleucine producers among ethionine resistant mutants of L-threonine producing bacteria
Agric. Biol. Chem. 40 (3) : 511-516
- Inglelew, W.J.; Poole, R.K.** (1984):
The respiratory chains of *E. coli*
Microbiol. Reviews 48 (3) : 222-271

Jones H., W.A. Venables (1983):

Effects of solubilization on some properties of the membrane-bound respiratory enzyme D-amino acid dehydrogenase of *E. coli*
FEBS Letters 151 (2) : 189-192

Kaback, H.R.; Milner, L.S. (1970):

Relationship of a membrane-bound D-(-)-lactic dehydrogenase to amino acid transport in isolated bacterial membrane preparations
Proc. Nat. Acad. Sciences 66 (3) : 1008-1015

Kaback, H.R.; Barnes, E.M. (1971):

Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles
J. Biol. Chem. 246 (17) : 5523-5531

Kase, H.; Nakayama, K. (1972):

Production of L-threonine by analog-resistant mutants
Agric. Biol. Chem. 36 (9) : 1611-1621

Kase, H.; Nakayama, K. (1977):

L-Isoleucine production by analog-resistant mutants derived from threonine-producing strains of *C. glutamicum*
Agric. Biol. Chem. 41 (1) : 109-116

Kay, W.W.; Kornberg, H.L. (1971):

The uptake of C₄-dicarboxylic acids by *E. coli*
Europ. J. Biochem. 18 : 274-281

Kemp, M.B. (1972):

D- and L-lactate dehydrogenases of *Pseudomonas aeruginosa*
Biochem. J. 130 : 307-309

Kinoshita, S.; Udaka, S.; Shimino, M. (1957):

Studies on the amino acid fermentation
I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms
J. Gen. Appl. Microbiol. 3 : 193-205

Kinoshita, S. (1966):

US Patent 3. 262. 861

Kinoshita, S. (1985):

Glutamic acid bacteria. In "Biology of Industrial Microorganisms"; Demain, A.L.; Salomon, N.A. (eds.);
The Benjamin/Cummings Publishing Company : 115-142

- Kisumi, M.; Kato, J.; Komatsubara, S.; Chibata, I. (1970):**
Increase in isoleucine accumulation by 2-aminobutyric acid resistant mutants of *Serratia marcescens*
Appl. Microbiol. 21 (4) : 569-574
- Kisumi, M.; Komatsubara, S.; Chibata, I. (1971):**
Valine accumulation by 2-aminobutyric acid resistant mutants of *Serratia marcescens*
J. Bact. 106 (2) : 493-499
- Kisumi, M.; Kato, J.; Komatsubara, S.; Chibata, I. (1973):**
Production of isoleucine, valine and leucine by regulatory mutants of *Serratia marcescens*
In: Genetics of Industrial Microorganisms
Vanek, Z.; Haslake, Z.; Cudlin, J. (eds)
- Kisumi, M.; Komatsubara, S.; Chibata, I. (1977):**
Enhancement of isoleucine hydroxamate-mediated growth inhibition and improvement of isoleucine-producing strains of *Serratia marcescens*
Appl. Environ. Microbiol. 34 : 647-653
- Kleemann, A.; Leuchtenberger, W.; Hoppe, B.; Tanner, H. (1985)**
Amino acids.
In " Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry"
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim A2 : 57-97
- Kohn, L.D.; Kaback, H.R. (1973):**
Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles
J. Biol. Chem. 248 (20) : 7012-7017
- Komatsubara, S.; Kisumi, M.; Chibata, I. (1980):**
Transductional construction of an isoleucine-producing strain of *Serratia marcescens*
J. Gen. Microbiol. 119 : 51-61
- LaRossa, R.A.; van Dyk T.K.; Smulski, D.R. (1987):**
Toxic accumulation of 2-ketobutyrate caused by inhibition of the branched chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*
J. Bact. 169 (4) : 1372-1378
- Leao, C.; van Uden, N.; (1986):**
Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Candida utilis*
Appl. Microbiol. Biotechnol. 23 : 389-393

Lehninger, A.L. (1979):
 Biochemie
 3. Auflage, Verlag Chemie

Leuchtenberger, W. (1984):
 Enzymatische und mikrobielle Herstellung von L-Aminosäuren
 CLB Chemie für Labor und Betrieb 35 (6) : 278-283

Livesey, G., Edwards, W.T.E. (1985):
 Quantification of branched-chain 2-ketoacids as quinoxalins; importance of excluding oxygen during derivatization
 J. Chromatography 337 : 98-102

Markwell, J.P.; Lascelles, J. (1978):
 Membrane-bound, pyridine nucleotide independent L-lactate dehydrogenase of *Rhodopseudomonas sphaeroides*
 J. Bacteriol. 133 (2) : 593-600

Markwell, M.A.K.; Haas, S.M.; Bieber, L.L.; Tolbert, N.E.
 (1978):
 A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples
 Analyt. Biochem. 87 : 206-210

Matin, A.; Konings, N.W. (1973):
 Transport of lactate and succinate by membrane vesicles of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and a *Pseudomonas* species
 Europ. J. Biochem. 34 : 58-67

Matsushima, H.; Mase, Y. (1973):
 Screening of microorganisms for production of L-isoleucine from D,L-2-Hydroxybutyric acid or D,L-2-Bromobutyric acid
 J. Ferment. Technol. 51 (7) : 443-451

Matsushima, H. (1976):
 Studies on the microbial production of L-isoleucine
 J. Ferment. Technol. 54 (5) : 340-349

Menkel, E. (1987):
 Einfluß von Fumarat auf die Lysinbildung bei *Corynebacterium glutamicum* -Stämmen mit dem Aspartase-Gen aus *Escherichia coli*
 Dissertation, Universität Düsseldorf

Miyajima R.; Shio, I. (1972):
 Regulation of aspartate family amino acids
 VI. Effects of isoleucine and valine on threonine dehydratase activity and its formation
 J. Biochem. 71 (6) : 951-960

- Molinari, R.; Lara, F.J.S. (1960):**
The lactic dehydrogenase of *Propionibacterium pentosaceum*
Biochem. J. 75 : 57-65
- Nakamori, S.; Ishida, M.; Takagi, H.; Ito, K.; Miwa, K. (1987):**
Improved l-threonine production by the amplification of the
gene encoding homoserine dehydrogenase in the *Brevibacterium*
lactofermentum
Agric. Biol. Chem. 51 (1) : 87-91
- Nassenstein, A. (1987):**
L-Isoleucinproduktion mit genetisch modifizierten
Corynebakterien
Diplomarbeit, RWTH Aachen
- O'Neill, J.P.; Freundlich, M. (1972):**
Two forms of biosynthetic acetohydroxy acid synthetase in
Salmonella typhimurium
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48 : 437-443
- Ogata, M.; Arihara, K.; Yagi T. (1981):**
D-lactate-dehydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris*
J. Biochem. 89 : 1423-1431
- PhastSystem (1985):**
Bedienungsanleitung der Fa. Pharmacia, Freiburg
- Powers, S.G.; Snell, E.E. (1976):**
Ketopantoate hydroxymethyl-transferase
II. Physical, catalytic and regulatory properties
J. Biol. Chem. 251 : 3786-3793
- Pratt, E.A.; Fung, L.W.-M.; Flowers, J.A.; Ho C. (1979):**
Membrane bound D-lactate-dehydrogenase from *E. coli*:
purification and properties
Biochem. 18 (2) : 312-316
- Primerano, D.A.; Burns, R.O. (1982):**
Metabolic basis of the isoleucine pantothenate or methionine
requirement of the ilv G strains of *Salmonella typhimurium*
J. Bacteriol. 150 (3) : 1202-1211
- Richards, E.G.; Lecanidou, R. (1974):**
In "Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide
gels"; Allen, R.C. and Maurer, H.R., de Gruyter, Berlin: 16-20

- Santamaria, R.; Gil, J.A.; Mesas, J.M.; Martin, J.F. (1984):**
Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*
J. Gen. Microbiol. 130 : 2237-2246
- Santamaria, R; Gil, J.A.; Martin, J.F. (1985):**
High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA
J. Bacteriol. 162 (1) : 463-467
- Sankyo (1967):**
French Patent 1.495.318
- Scheer, E. (1985):**
Mikrobielle Umwandlung von chemisch synthetisierten Vorstufen zu L-Isoleucin
Diplomarbeit, RWTH Aachen
- Schütte, H.; Hummel, W.; Kula, M.R. (1984):**
L-2-hydroxyisocaproate-dehydrogenase- a new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids
Appl. Microbiol. Biotechnol. 143 (3) : 1509-1512
- Shio, J.; Sasaki, A.; Nakamori, S.; Sano, K. (1973):**
Production of L-Isoleucine by AHV resistant mutants of *Brevibacterium flavum*
Agr. Biol. Chem. 37 : 2053-2061
- Shimura, K. (1972):**
Isoleucine. In " The Microbial Production of Amino Acids"
Yamada, K.; Kinoshita, S.; Tsunoda, T.; Aida, K. (eds.);
Kodansha Ltd. Tokyo, Japan; John Wiley & Sons Inc. New York
USA : 491-513
- Short, St.A.; Kaback, H.R. (1974):**
Mechanisms of active transport in isolated membran vesicles
J. Biol. Chem. 249 (13) : 4275-4281
- Soda, K.; Tanaka, H.; Esaki, N. (1983):**
Amino Acids. In: "Biotechnology 3"; Rehm, H.J.; Reed, G.; Dellweg, H. (eds); Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße :
479-530
- Sternson, L.A.; Stobaugh, J.F.; Repta, A.J. (1985):**
Rational design and evaluation of improved o-phthalaldehyde-like flourogenic reagents
Anal. Biochem. 144 : 233-246

- Tanaka, Y.; Anaraku, Y.; Futai, M. (1976):**
E. coli membrane D-lactate-dehydrogenase : Isolation of the Enzyme in aggregated form and its activation by Triton X-100 and Phospholipids
 J. Biochem. 80 (4) : 821-830
- Tosaka, O.; Takinami, K. (1978):**
 Pathway and regulation of lysine biosynthesis in *Brevibacterium lactofermentum*
 Agric. Biol. Chem. 42 (1) : 95-100
- Tsuchida, T.; Miwa, K.; Nakamori, S. (1984):**
 Method for producing L-isoleucine by fermentation
 Us Patent 4. 442. 208
- Tan-Wilson A.L. (1983):**
 Alanine biosynthesis and the general transaminases. In "Amino Acids Biosynthesis and Genetic Regulation"; Hermann, K.M.; Somerville, R.L. (eds); Addison-Weshley Pub. Comp. London : 19-34
- Umbarger, H.E.; Brown, B. (1958):**
 Isoleucine and valine metabolism in *Escherischia coli* VIII. The formation of acetolactate
 J. Biol. Chem. 233 : 1156-1160
- Umbarger, H.E. (1983):**
 The biosynthesis of isoleucine and valine and its regulation. In "Amino Acids Biosynthesis and Genetic Regulation"; Herman, K.M.; Somerville, R.L. (eds.); Addison-Wesely Publishing Company : 245-266
- Updike, MH.; Calton, G.J. (1982):**
 Fermentative preparation of L-Isoleucine
 Us Patent 4. 329. 427
- Wada, M.; Uchid, R.; Kato, J.; Chibata, I. (1980):**
 Continius production of l-isoleucine using immobilized growing *Serratia marcescens* cells
 Biotech. Bioeng. XXII : 1175-1188
- Walsh, C.T.; Abeles, H.R.; Kaback, H.R. (1972):**
 Mechanisms of active transport in isolated membrane vesicles
 J. Biol. Chem. 247 (24) : 7858-7863

Westerfeld, W.W. (1945):

A colorimetric determination of blood acetoin
J. Biol. Chem. 161 : 495-502

Wilhelm, C. (1987):

Analyse von Nebenprodukten bei der Bildung von L-Isoleucin aus
2-Hydroxybutyrat sowie 2-Ketobutyrat durch *C. glutamicum*
Diplomarbeit, FH Jülich

Wong, H.C.; Lessie T.G. (1979):

Branched chain amino acid aminotransferase isoenzymes of
Pseudomonas cepacia
Arch. Microbiol. 120 : 223-229

**Yoshihama, M.; Higashiro, K.; Rao, E.A.; Akedo, M.; Shanabruch,
W.G.; Follettie, M.T.; Walker, G.C.; Sinskey, A.J. (1985):**

Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*
J. Bact. 162 (2) : 591-597

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 der Kernforschungsanlage Jülich durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.H.Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, für die großzügige Unterstützung der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen Anregungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof.Dr.R.Krämer für die Übernahme des Korreferates, sowie für seine Unterstützung, wertvollen Tips und Ratschläge bei der Proteinisolation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.L.Eggeling für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und seine vielen Ratschläge, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr.H.Ebbighausen und Ch.Hoischen möchte ich danken für die nette Anleitung und große Hilfsbereitschaft bei der Bestimmung der Aufnahmekinetiken.

Bei Christiana Cordes, Elke Menkel und Bärbel Schrumpf bedanke ich mich für die sehr schöne Atmosphäre in unserem Labor. Allen Mitarbeitern des Institutes gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme, Aufgeschlossenheit und stets gewährte Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof.Dr.Simon für die Herstellung der beiden Hydroxysäuren.

Herrn Prof.Dr.Kneifel und Frau Schölgens danke ich für die Durchführung der Isotachophorese, sowie Herrn Peters und Frau Bräker für die Ausführung der photographischen Arbeiten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei Familie Reinartz, deren Computer ich für das Schreiben dieser Arbeit benutzen konnte und die dabei auch immer für das leibliche Wohl sorgten.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie und der Degussa AG, Hanau finanziert.

