

**Enzymatische Decarboxylierung von Benzenpolycarbonsäuren:
Isolierung bakterieller Benzenpolycarbonsäure-Decarboxylanten,
vergleichende Untersuchungen des Mellitsäure-Katabolismus,
Erstreinigung und Charakterisierung einer Mellitsäure-Decarboxylase
sowie chemische Untersuchungen der Benzenpolycarbonsäuren.**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jens Rudat

aus

Haltern/Westf.

Bonn, 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: PD Dr. René M. Fakoussa
2. Referent: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Hans G. Trüper

Tag der Promotion: 22. September 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.
Erscheinungsjahr: 2006

Gewidmet allen Sisyphussen, die Tag und Nacht an den Laborbänken dieser Welt den Stein der Weisen ins Rollen bringen, wohl wissend, daß der Gipfel absoluter Weisheit unerreichbar bleiben muß, da die Wissenschaft einer Hydra gleich für jede mühsam errungene Antwort zwei neue Fragen hervorbringt.

„Wenn das geplante Experiment nicht klappt, mach Dir nichts draus; fang an, Dir ein neues auszudenken.“

Frederick Sanger, *13. August 1918;
Nobelpreis für Chemie 1958 und 1980

Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden seit 2002 regelmäßig auf den Jahrestagungen der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) bzw. der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) präsentiert:

Rudat J., Lammerich H.P. and Fakoussa R.M. (2002): Enzymatic decarboxylation of polycarboxylated benzoic acids: Isolation of bacterial strains and characterization of partially purified enzymes for the increasing of the hydrophobicity of coal derived humic acids. 17th meeting of the VAAM, Biospektrum Sonderausgabe, PD023

Rudat J. and Fakoussa R.M. (2003): Enzymatic decarboxylation of polycarboxylated benzoic acids: Comparison of diverging decarboxylation pathways in various bacteria via HPLC. 18th meeting of the VAAM, Biospektrum Sonderausgabe, PJ014

Rudat J. and Fakoussa R.M. (2004): Developing an affinity chromatography method for the purification of the decarboxylases involved in the microbial degradation of benzenhexacarboxylic acid. 19th meeting of the VAAM, Biospektrum Sonderausgabe, PD001

Rudat J. and Fakoussa R.M. (2005): Purification of a novel decarboxylase of polycarboxylated benzoic acids by using a newly developed affinity chromatography method. 2nd joint convention of DGHM and VAAM, Biospektrum Sonderausgabe, STP016

Rudat J. and Fakoussa R.M. (in Vorbereitung): Purification and characterization of a novel decarboxylase cleaving two carboxylic groups off benzenhexacarboxylic acid (mellitic acid) using a newly created ligand affinity chromatography method.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BCS	höhere (= mehrfach carboxylierte) <u>B</u> enz <u>e</u> nc <u>a</u> rbo <u>n</u> säure(n)
bp	Basenpaare
BSA	Rinder- (<u>B</u> ovine) <u>S</u> erum- <u>A</u> lbumin
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CMC	<i>N</i> -Cyclohexyl- <i>N'</i> -(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-methyl- <i>p</i> -toluenesulfonate
Da	Dalton
DAD	Photodiodearraydetektor
dpa	Deutsche Presseagentur
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ε	Extinktions-(Absorptions-) koeffizient
E.1	Interne Stammbezeichnung für den Bakterienstamm <i>Paracoccus spec. nov.</i> (gescreent durch Lammerich, 1998)
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
FPLC	Schnelle Protein-Flüssigchromatographie (Fast Protein Liquid Chromatography)
FT-IR	Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	giga
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HS	Huminsäure
IAC	Ionen-Austausch-Chromatographie
IEA	Internationale Energie-Agentur
IR	Infrarot
k	kilo
L	Liter
LAC	Liganden-Affinitäts-Chromatographie
LFG	Mineralsalzmedium nach Lammerich, Fakoussa und Götz; auch Vorsilbe für mit diesem Medium gescreente Organismen
LFG19a	Interne Stammbezeichnung für den Bakterienstamm <i>Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens</i>
LFR	Mineralsalzmedium nach Lammerich, Fakoussa und Rudat
m	milli
M	mega
MDCase	Mellitsäure-Decarboxylase
MW	Molekulargewicht
μ	mikro
n	nano
OD	Optische Dichte
ODCase	Orotidin-5`-monophosphat-Decarboxylase

OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDCase	Pyromellitsäure-Decarboxylase
PVC	Polyvinylchlorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	tera (10^{12})
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TetraX	Benzencarbonsäure mit vier Carboxylgruppen unbekannter Stellung/Positionierung am Benzenring
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität: $\mu\text{mol}/\text{min}$)
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
Vis	visible
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
W	Watt
X.93	Interne Stammbezeichnung für den Bakterienstamm <i>Alcaligenes piechaudii</i> (gescreent durch Krause, 2000)

1	Einleitung	1
1.1	Die Bedeutung von Braun- und Steinkohle im 21. Jahrhundert	1
1.1.1	Energiehunger in einer globalisierten Welt.....	1
1.1.2	Ein Vergleich potentieller Energieträger.....	2
1.1.3	Einsatzgebiete für Kohle über die Rolle als Energieträger hinaus.....	5
1.2	Kohlegense und –struktur	7
1.2.1	Entstehung fossiler Brennstoffe	8
1.2.2	Inkohlung des Kerogens.....	9
1.2.3	Klassifikation und chemische Eigenschaften von Kohletypen	10
1.3	Mechanismen der mikrobiellen Kohleverflüssigung	11
1.4	Decarboxylierung: Entscheidende Stufe der Kohleveredelung	15
1.4.1	Enzymatische und chemisch-technische Decarboxylierung	17
1.4.2	Benzencarbonsäuren (BCS) als Modellsubstanzen für Huminsäuren.....	19
1.4.3	Enzymatische Decarboxylierung aromatischer Carbonsäuren.....	22
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Chemische Untersuchungen der Benzencarbonsäuren (BCS).....	25
2.1.1	Wasserlöslichkeit und Acidität.....	25
2.1.2	Identifikation der BCS mittels HPLC	25
2.1.3	Infrarot-Spektroskopie (IR).....	25
2.2	Screening der Decarboxylanten	26
2.2.1	Verwendete Medien	26
2.2.2	Screening-Orte und Durchführung des Screenings.....	30
2.3	Differenzierung der Decarboxylanten.....	31
2.3.1	Photographische Aufnahmen	31
2.3.2	Mikroskopisches Bild.....	31
2.3.3	Physiologische und molekulargenetische Differenzierung.....	32
2.4	Anzucht der Decarboxylanten in Flüssigmedien.....	33
2.4.1	Anzucht im Schüttelkolben	33
2.4.2	Anzucht im Kleinfärmenter.....	34
2.5	Zellernte, Zellaufschluß und Zentrifugationsschritte.....	34
2.5.1	Zellernte	34
2.5.2	Zellaufschluß.....	35
2.5.3	Ultrazentrifugation	35
2.6	Proteinbestimmung	35
2.7	Photometrische Bestimmung der Decarboxylase-Aktivität	36
2.7.1	Definition und Nachweis enzymatischer Aktivitäten.....	36
2.7.2	Test auf Benzenhexacarbonsäure-Decarboxylase (nach Lammerich, modifiziert nach Krause und Fakoussa).....	37
2.7.3	Test auf Pyromellitsäure-Decarboxylaseaktivität (nach Rudat, 2000).....	39
2.7.4	Test auf Benzenpentacarbonsäure-Decarboxylaseaktivität (diese Arbeit).....	39
2.8	Hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC)	41
2.8.1	Identifikation von Zwischenprodukten der BCS-Decarboxylierung	41
2.8.2	Bedingungen der HPLC	42
2.9	Anreicherung der Decarboxylasen	42
2.9.1	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.....	43
2.9.2	Ultrafiltration (UF).....	43
2.10	Klassische Reinigungsmethoden zur Reinigung einer Mellitsäure-Decarboxylase	44
2.10.1	Ionenaustausch-Chromatographie (IAC)	44

2.10.2	Weitere Chromatographie-Methoden.....	45
2.11	Entwicklung einer Liganden-Affinitätschromatographie	45
2.11.1	Auswahl eines geeigneten Liganden.....	46
2.11.2	Auswahl einer geeigneten Matrix	46
2.11.3	Kopplungsbedingungen/Vorversuche zur Kopplung von Ligand und Matrix.....	46
2.12	Untersuchung des Erfolges der Kopplung von Mellitsäure	47
2.12.1	Infrarotspektroskopische Untersuchungen.....	47
2.12.2	UV-spektroskopische Untersuchungen.....	47
2.13	Präparation einer geeigneten Decarboxylase für die LAC.....	48
2.13.1	Auswahl des Decarboxylanten.....	48
2.13.2	Anzucht mit verschiedenen C-Quellen und Induktionsversuche.....	48
2.13.3	Präparation des Enzyms für die LAC.....	48
2.13.4	Bestimmung geeigneter Bindungsparameter	49
2.13.5	Bestimmung geeigneter Elutionsbedingungen.....	49
2.14	Durchführung der Protein-Gelelektrophorese.....	49
2.14.1	Präparation des Polyacrylamidgels (nach Laemmli, 1970).....	49
2.14.2	Durchführung der SDS-PAGE.....	50
2.14.3	Native Proteingelelektrophorese	50
2.14.4	Coomassie-Färbung und Trocknung der Gele	50
2.14.5	Silberfärbung.....	51
2.15	Entwicklung einer Aktivitätsfärbung.....	51
2.15.1	Nachweis des abgespaltenen CO ₂ durch Ausfällung als CaCO ₃	51
2.15.2	Nachweis der Änderung des pH-Wertes nach Decarboxylierung.....	52
	Chemikalien	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Chemische Untersuchungen der Benzencarbonsäuren (BCS).....	54
3.1.1	Titrationenkurven, Acidität und Wasserlöslichkeit.....	54
3.1.2	Trennung von BCS-Strukturisomeren durch Modifikationen des Laufmittels.....	59
3.1.3	HPLC-Retentionszeiten und DAD-Spektren	61
3.1.4	Infrarotspektroskopische Untersuchungen der BCS	64
3.2	Ergebnisse der Screening-Versuche	67
3.2.1	Biodiversität der Benzencarbonsäure- (BCS-) Decarboxylanten.....	67
3.2.2	Bestimmung und Charakterisierung des Stammes <i>LFG19a</i>	70
3.2.3	Entdeckung und Charakterisierung einer neuen Art der Gattung <i>Rhizobium</i> bzw. einer neuen Gattung der α -Proteobakterien	71
3.3	Erstmaliger Nachweis der Metabolisierung von Benzenpentacarbonsäure.....	74
3.3.1	Wachstum mit Benzenpentacarbonsäure	74
3.3.2	Nachweis der enzymatischen Decarboxylierung von Benzenpenta-carbonsäure durch die Stämme „Artern“ und X.93 mittels HPLC	75
3.4	Untersuchung des Abbaus der unbekanntes Benzentetracarbonsäure „TetraX“	78
3.4.1	Isolierung von TetraX	78
3.4.2	Untersuchung der Abbaubarkeit von TetraX.....	78
3.5	Vergleich der Decarboxylase-Aktivitäten im Rohextrakt	79
3.5.1	Ultrazentrifugation und Vergleich der Decarboxylase-Aktivitäten für verschiedene BCS.....	79
3.5.2	Ultrafiltration.....	80
3.5.3	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung.....	81
3.6	Vorversuche zur Proteinreinigung mit klassischen Chromatographie- Methoden.....	82

3.6.1	Auswahl eines geeigneten Bakterienstammes.....	82
3.6.2	Ionenaustauschchromatographie (IAC).....	83
3.6.3	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	84
3.6.4	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC).....	85
3.7	Herstellung der Matrix für die Liganden-Affinitäts-chromatographie (LAC)	86
3.7.1	Vorversuche zur Derivatisierung der LAC-Matrix	86
3.7.2	Kopplung von Mellitsäure an EAH Sepharose 4B.....	88
3.8	Proteinreinigung	92
3.8.1	Bestimmung der Optima der Mellitsäure-Decarboxylase aus <i>LFG19a</i>	92
3.8.3	Bindung der Decarboxylase an die Affinitätssäule	94
3.8.4	Bestimmung der idealen (spezifischen) Elutionsbedingungen	94
3.8.5	Vergleich der verschiedenen Elutionsmethoden	98
3.8.6	Anreicherung und Reinigung der Mellitsäure-Decarboxylase.....	99
3.9	Diauxisches Wachstum und differentielle Genexpression	100
3.9.1	Fermentation von <i>LFG19a</i> mit Glucose und Pyromellitsäure	100
3.9.2	Proteinreinigung und vergleichende SDS-PAGE	101
3.10	Differentielle Genexpression bei Anzucht mit unterschiedlichen carboxylierten Aromaten	102
3.10.1	Anzucht	102
3.10.2	Proteinreinigung.....	103
3.11	Nachreinigung und Auftrennung in reduzierendem Puffer	106
3.12	Native Gelelektrophorese	107
3.13	Entwicklung einer Aktivitätsfärbung	108
3.14	Untersuchung der Decarboxylaseaktivitäten für verschiedene Substrate	109
3.14.1	Decarboxylaseaktivitäten bei verschiedenen Reinigungsstufen	109
3.14.2	Decarboxylaseaktivität in Abhängigkeit von der bei der Anzucht verwendeten C-Quelle.....	110
3.15	Untersuchung der enzymatischen BCS-Decarboxylierung durch den Stamm LFG19a mittels HPLC	112
3.15.1	Decarboxylierung von Mellitsäure durch den Rohextrakt von <i>LFG19a</i>	112
3.15.2	Decarboxylierung von Mellitsäure durch die mittels LAC gereinigte Decarboxylase aus <i>LFG19a</i>	113
3.15.3	Decarboxylierung von Pyromellitsäure durch verschiedene Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung.....	113
3.16	Enzymtests mit gereinigter Mellitsäure-Decarboxylase	114
4	Diskussion	116
4.1	Chemische Untersuchung der Benzencarbonsäuren (BCS)	116
4.1.1	Titrationenkurven	116
4.1.2	Untersuchung der BCS mittels HPLC.....	119
4.1.3	Infrarotspektroskopische Untersuchung der BCS	120
4.2	Biodiversität der gescreenten BCS-Decarboxylanten	121
4.2.1	Allgemein	121
4.2.2	Der Stamm „Artern“: Eine neue Art einer neuen Gattung?.....	121
4.3	Reinigung und Charakterisierung der Mellitsäure-Decarboxylase aus LFG19a	123
4.3.1	Vorreinigung der Mellitsäure-Decarboxylasen.....	124
4.3.2	Reinigungsversuche über klassische Methoden.....	127
4.3.3	Herstellung des LAC-Materials	128
4.3.4	Bindung und Elution der Mellitsäure-Decarboxylase aus <i>LFG19a</i>	129
4.3.5	Nachreinigung der Decarboxylase	131

4.3.6	Native PAGE.....	131
4.3.7	Aktivitätsfärbung.....	132
4.4	Induktion und Substratspezifität der Mellitsäure-Decarboxylase	133
4.4.1	Expression der Decarboxylase-Aktivitäten bei Anzucht mit verschiedenen C- Quellen.....	133
4.4.2	Vergleich der Decarboxylase-Aktivitäten für verschiedene Substrate	134
4.5	Untersuchung der Abbauwege der BCS	135
4.5.1	Decarboxylierung der Mellitsäure.....	136
4.5.2	Weiterer Abbau der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure.....	138
4.5.3	Postulierter Abbauweg von Mellitsäure	141
4.6	Reaktionsmechanismus der Mellitsäure-Decarboxylase	143
4.6.1	Die OMP-Decarboxylase als Modell hoch effizienter Katalyse	144
4.6.2	Möglicher Reaktionsmechanismus der Mellitsäure-Decarboxylierung	147
4.7	Mögliche Organisation der für den Mellitsäure-Abbau verantwortlichen Gene	153
4.7.1	Biphenyl-Katabolismus in <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	153
4.7.2	Phtalat-Katabolismus in <i>Arthrobacter keyseri</i>	153
4.7.3	Abspaltung von sechs Ringsubstituenten: Abbau von γ -Hexachlorocyclohexan (Lindan).....	154
4.7.4	Schlüsse für den Mellitsäure-Abbau	155
4.8	Ausblick.....	157
4.8.1	Weitere Aufklärung des Mellitsäure-Stoffwechsels	157
4.8.2	Enzymatische Decarboxylierung von Huminsäuren (HS)	162
5	Zusammenfassung.....	170
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	173
Anhang	190	
1.	Profile der zellulären Fettsäuren (DSMZ).....	190
2.	16S rDNA-Komplettssequenz des Stammes „Artern“ und phylogenetische Einordnung (DSMZ)	192
3.	pKs-Werte der Benzencarbonsäuren	194
Danksagung.....	195	
Lebenslauf	197	

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Braun- und Steinkohle im 21. Jahrhundert

1.1.1 Energiehunger in einer globalisierten Welt

Gegenwärtig leben 6,5 Milliarden Menschen auf der Erde (Stand Januar 2006; <http://de.wikipedia.org>). Bei einem jährlichen weltweiten Bevölkerungswachstum von etwa 1,3% werden es bis zum Jahr 2025 mehr als acht Mrd. sein, deren Grundbedürfnisse sich mit den Stichworten Nahrung – Gesundheit – Energie – Wohnraum zusammenfassen lassen. Dabei ist die ausreichende Versorgung mit Nahrung als entscheidende Voraussetzung für Gesundheit unmittelbar von der Erzeugung von genügend Energie abhängig: So müssen für die Herstellung von 1kg Weißbrot mit einem physiologischen Brennwert von 11.300kJ in den Industrienationen fossile Brennstoffe mit einem Heizwert von 20.400kJ verbrannt werden (Hopp, 2000). Das Verhältnis von physiologisch nutzbarer zu eingesetzter Energie beträgt also nur 0,55; Länder, die nicht langfristig ihre Energieversorgung sichern, programmieren folglich den Hunger für die nächsten Jahrzehnte. Entsprechend gehen Armut und Hunger (und damit auch niedrige Lebenserwartung) weltweit mit einem mangelhaften Zugang der jeweiligen Bevölkerung zu Energiequellen einher (Abb. 1.1).

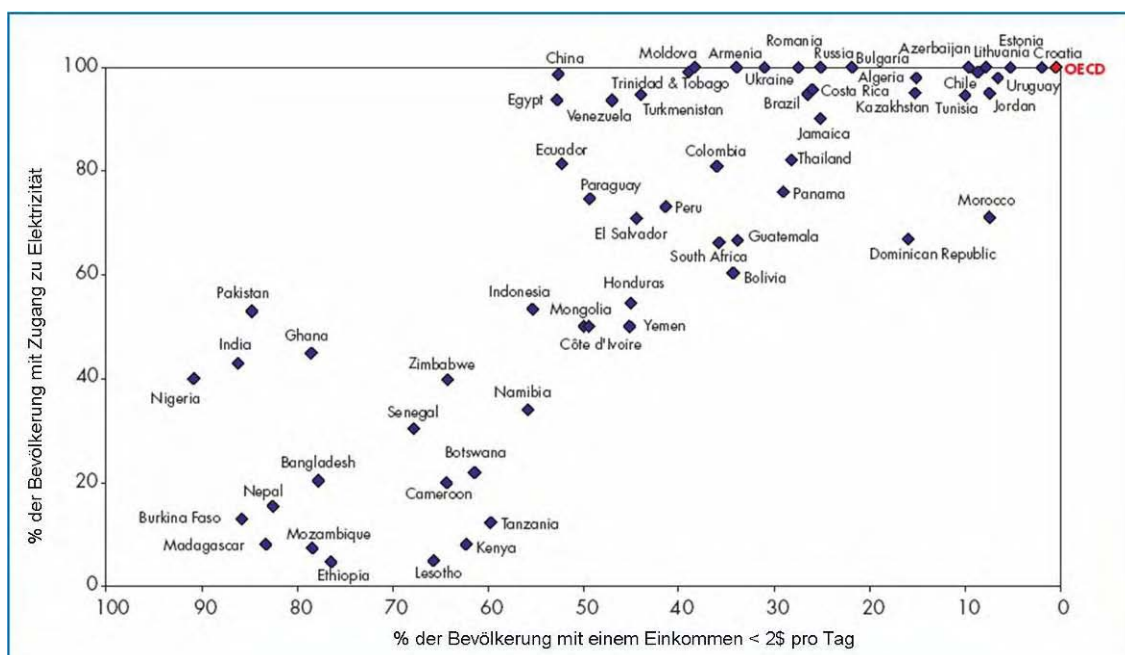


Abb. 1.1: Der Zusammenhang zwischen Armut und dem Zugang zu Energiequellen.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Haushalte mit Stromanschluß (Ordinate) und der als arm definierte Anteil der jeweiligen Bevölkerung (Abszisse). Als Vergleich dient der oben rechts eingetragene Standard der OECD-Länder. (Quelle: IEA, 2002)

In bevorzugten Lebensregionen nimmt die Bevölkerungsdichte immer mehr zu. Orte der Rohstoff-, Energie- und Nahrungsmittelquellen sind nicht identisch mit den Produktionsstandorten und Wohngebieten, die vorwiegend an Küsten, Flüssen oder in fruchtbaren Tälern liegen. Globalisierung bedeutet in diesem Zusammenhang eine Vernetzung der Lagerhaltung, Produktions-, Transport- und Kommunikationssysteme, um Wasser, Energie, Rohstoffe, Produkte und Informationen störungsfrei je nach Bedarf auszutauschen und zu nutzen. Eine effiziente Vorratshaltung an elektrischem Strom ist jedoch praktisch nicht möglich. Die Globalisierung erfordert den Ausbau eines weltweiten Transportnetzes von Pipelines und elektrischen Stromverbundnetzen sowie von Fernstraßen, Fluß- und Bahnnetzen wie auch sicheren Schiffscontainern für den Transport der mengenmäßig größten Massengüter: Der technischen Energieträger.

1.1.2 Ein Vergleich potentieller Energieträger

Die Bedeutung fossiler Brennstoffe spiegelt sich in ihrer Jahresproduktion bzw. –gewinnung wider: Pro Jahr werden zusammen etwa 2 Mrd. Tonnen der mengenmäßig bei weitem überwiegenden Industrieprodukte Rohstahl und Zement hergestellt; die weltweite Ernte von Getreide als wichtigstem landwirtschaftlichem Erzeugnis bewegt sich in der gleichen Größenordnung. Dagegen werden über 5,5 Mrd. Tonnen **Kohle**, knapp 4 Mrd. Tonnen **Erdöl** sowie 2,8 Mrd. m³ **Erdgas** gefördert und verarbeitet (Internationale Energieagentur IEA, 2005). Dies bleibt nicht ohne Folgen: Bei gleich bleibenden Fördermengen werden die bekannten und erschlossenen Öl- und Gasreserven bereits in etwa 30-40 Jahren aufgebraucht sein, wohingegen die Kohlereserven noch knapp 200 Jahre zur Verfügung stehen werden. Durch Erschließung neuer Lagerstätten und ergiebigerer Fördertechniken wird sich dieser Zeitraum natürlich deutlich verlängern (geschätzt: Öl <100, Gas ~200, Kohle >1000 Jahre); um „diese Vorkommen allerdings ausbeuten zu können, werden erhebliche und dauerhafte Kapitalinvestitionen erforderlich sein“ (IEA, 2005). Ökonomisch wirkt sich die Erschöpfung der Lagerstätten dementsprechend bereits heute aus: Dies bekam die Weltwirtschaft vor kurzem in aller Deutlichkeit zu spüren, als durch den Wirbelsturm „Katrina“ die amerikanische Ölförderung und –verarbeitung im Golf von Mexico praktisch lahm gelegt wurde. Der Ölpreis stieg daraufhin auf ein Allzeit-Hoch von 70\$ pro Barrel, so daß die Bundesregierung beschloß, einen Teil der deutschen Notreserven frei zu geben (dpa-Meldung 2005a).

Neben dem erheblichen Unterschied in der Vorratsmenge spricht noch eine zweite Tatsache für eine zunehmende Bedeutung der Kohle als Energieträger: Während sich auf allen Kontinenten nahezu gleichmäßig verteilt weltweit große Kohlevorkommen finden, treten die anderen beiden fossilen Energieträger nur im Nahen Osten sowie im politisch wie wirtschaftlich instabilen Raum der ehemaligen Sowjetunion massiert auf (Abb. 1.2).

Eine Abhängigkeit von diesen Krisenregionen kann nicht im Sinne einer gesicherten Energieversorgung sein, wie z.B. die aktuelle politische Lage im Irak zeigt. Als Konsequenz wurde bereits im Herbst 2001 eine EU-Richtlinie verabschiedet, nach welcher zur Sicherstellung der Autonomie Europas bezüglich der Energieversorgung auch weiterhin eine staatliche Förderung des Kohleabbaus gewährleistet werden soll (DNK, 2001).

Alternativ steht neben den regenerativen Energiequellen Wasser, Wind und Sonne die

Kernenergie zur Verfügung. Diese besteht durch eine extrem hohe Energiedichte ihrer Energieträger (für Uran²³⁵ theoretisch: ca. 20 Mio kWh/kg). Hinsichtlich des Energieinhaltes stellt Uran die weltweit größte Energieressource überhaupt dar (Abb.1.3).

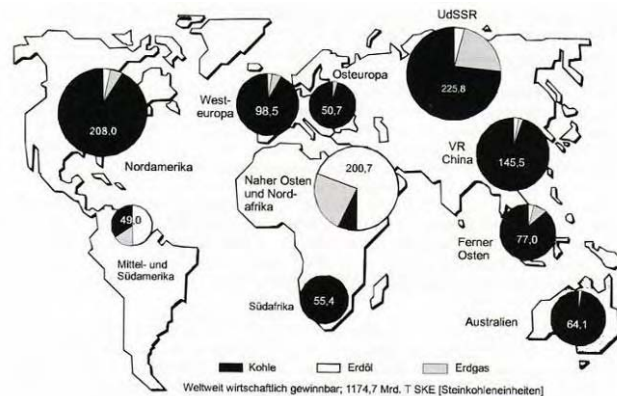


Abb. 1.2: Verteilung der fossilen Brennstoffe in der Welt. 1 SKE entspricht 29.300 Kilojoule [kJ] = 8,141 Kilowattstunden [kWh] bzw. ca. 1kg Steinkohle = 1,9kg Braunkohle = 0,7kg Heizöl = 0,8m³ Erdgas (aus Hopp, 2000).

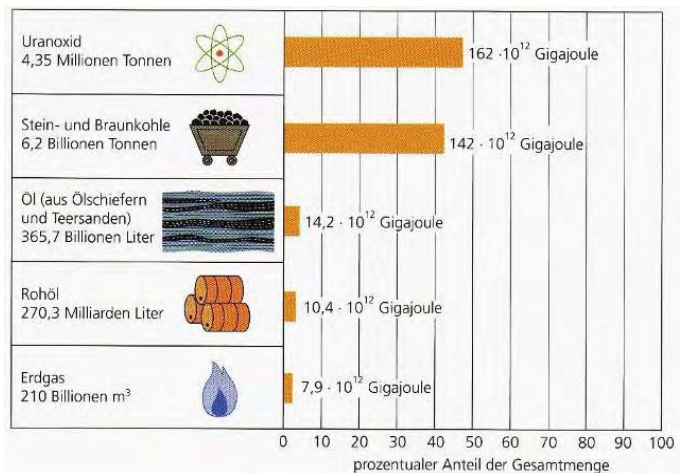


Abb. 1.3: Welt-Energieressourcen (Press & Siever, 2003)

So erzeugt z.B. das Kernkraftwerk Neckarwestheim pro Jahr 17 TWh. Für die Bereitstellung der gleichen Strommenge würde eine Photovoltaikanlage aufgrund des sehr niedrigen Wirkungsgrades heutiger Solarzellen (etwa 6-7%) und der geringen Sonneneinstrahlung in Mitteleuropa eine Solarzellenfläche von über 400km² benötigen (Hopp, 2000)! Es ist offensichtlich, daß die Nutzung von Sonnenenergie beim derzeitigen Stand der Technik in den Industriestaaten nicht als Alternative dienen kann.

Generell wird die Beteiligung regenerativer Energien an der Deckung des weltweiten Energiebedarfes bis 2030 einen Bruchteil von 2% nicht überschreiten, während der Anteil fossiler Brennstoffe mit 85% veranschlagt wird (IEA, 2004). Das geplante Zurückfahren der Kernenergie in Deutschland muß also zwangsläufig zu einem Wiederanstieg des Verbrauchs fossiler Brennstoffe führen (derzeit stammt mehr als jede vierte in Deutschland produzierte kWh aus Kernenergie).

Dabei ist die Rohstoffsituation für Deutschland extrem ungünstig: Unsere Nation hat einen Anteil am Weltverbrauch von Erdgas und Erdöl von etwa 4%, hält aber nur etwa 0,2% der Erdgas- und 0,03% der Erdölreserven. Uran wird überhaupt nicht erzeugt bzw. abgebaut, so daß Deutschland hinter den USA und Japan als drittgrößter Energieimporteur rangiert. Eine positive Bilanz ergibt sich einzig für Kohle: Hier steht bei Steinkohle einem Anteil von etwa 4% an der Gesamtförderung ein Besitz von über 4,5% der Weltvorräte gegenüber; bei der Braunkohle hält Deutschland sogar 20% der Reserven und ist mit rund 17 % am Weltverbrauch beteiligt. Während die Förderung der noch vorhandenen wirtschaftlich nutzbaren Steinkohlereserven technisch schon sehr aufwendig geworden ist, verfügt Deutschland mit der Braunkohle noch über ein gewaltiges Energiepolster (Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, 2005). Dementsprechend wird die öffentliche Stromerzeugung Deutschlands zu knapp 50% von Kohlekraftwerken abgedeckt (Tabelle 1.1), was allerdings mit dem selbstgesteckten (und ökologisch notwendigen) Ziel der Reduktion des CO₂-Ausstoßes kollidiert. Eine Lösung durch Verbesserung des Wirkungsgrades der Kraftwerke ist thermodynamisch begrenzt (realer Carnot-Wirkungsgrad: 45%). Es ist daher erforderlich, die Kohle zu einem ökonomisch attraktiveren Brennstoff zu machen. Diese als Kohleveredelung bezeichneten Maßnahmen zielen u.a. auf eine Erhöhung des spezifischen Brennwertes, welcher insbesondere im Falle der Braunkohle aufgrund ihres hohen Sauerstoff- und Wassergehaltes ganz erheblich unter dem von Erdöl wie auch Erdgas liegt.

Erdöl und Erdgas sind in Deutschland mit zusammen ~60% am Primärenergieverbrauch beteiligt (Tab. 1.1). Gründe hierfür sind neben dem künstlich unverhältnismäßig niedrig gehaltenen Ölpreis sowie neuerdings der steuerlichen Begünstigung von Erdgas-Kraftwerken die beträchtlich höheren Transportkosten des Feststoffes Kohle gegenüber den pumpbaren anderen beiden fossilen Energieträgern, welche sich zudem aschefrei verbrennen lassen. Optimal wäre eine gleichzeitige Behebung beider oben genannten Nachteile, d.h. eine direkte Umwandlung der Kohle in energieeffiziente *flüssige* Brenn- und Treibstoffe.

Energieträger	Anteil Strom- erzeugung [%]	Anteil Primärenergie- verbrauch [%]
Steinkohle	22,0	13,5
Braunkohle	26,0	11,4
Kernenergie	28,0	12,6
Erdgas	10,0	22,4
Erdöl	1,0	36,4
Sonstige	13,0	3,7

Tab. 1.1: Bedeutung der verschiedenen Energieträger für Deutschland.
(Quelle: Verband der Elektrizitätswirtschaft, 2005)

1.1.3 Einsatzgebiete für Kohle über die Rolle als Energieträger hinaus

1.1.3.1 Kohle als Wertstoffquelle

Wie oben erwähnt, werden die nach heutigen Maßstäben „wirtschaftlichen“ Ölquellen der Welt noch in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts versiegen. Damit erschöpft bzw. verteuert sich aber nicht nur der derzeit bedeutendste Treibstoffvorrat, sondern zugleich die preiswerte Grundlage sämtlicher Polymerwerkstoffe („Kunststoffe“) sowie von Schmierstoffen und organischen Lösungsmitteln und darüber hinaus von unzähligen Medikamenten. Diese zentrale Rolle des Erdöls als Kohlenstoffquelle für die chemische Industrie kann und muß in absehbarer Zeit die Kohle übernehmen.

Dabei sind insbesondere Aromaten bereits seit langem ein willkommenes Nebenprodukt der Steinkohlenverkokung (vgl. Abb. 1.4). Aber auch die Herstellung aliphatischer Verbindungen aus Kohle wird schon seit Beginn des vergangenen Jahrhunderts praktiziert: Durch verschiedene Verfahren der Kohleverflüssigung (Hydrierung, Vergasung mit anschließender Fischer-Tropsch-Synthese, Wirbelschicht-Pyrolyse) entsteht eine große Anzahl gasförmiger und flüssiger gesättigter Kohlenwasserstoffe (Abb. 1.5); die katalytische Hydrierung der Kohle liefert unter anderem auch synthetisches Benzin (Fieser u. Fieser, 1968; Ruhrkohle AG, 1980; Breuer, 1991).

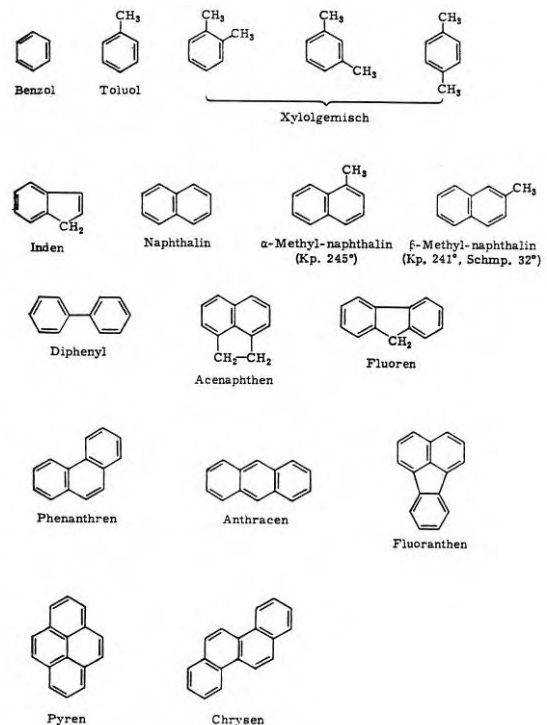


Abb. 1.4: Im Steinkohlenteer vorkommende Kohlenwasserstoffe; nicht gezeigt sind die ebenfalls zahlreichen Heteroaromaten wie Pyridin, Indol oder Acridin; aus Fieser, 1968.

Diese Verfahren sind jedoch aufgrund der extremen Reaktionsbedingungen (Drücke >100bar, Temperaturen >100°C) nur bei fehlendem Zugriff auf Erdöl wirtschaftlich (Südafrika z.B. produziert 150.000 Barrel Synthetikbenzin pro Tag; dpa, 2005). Die Entwicklung effizienterer und kostengünstigerer Verfahren zur

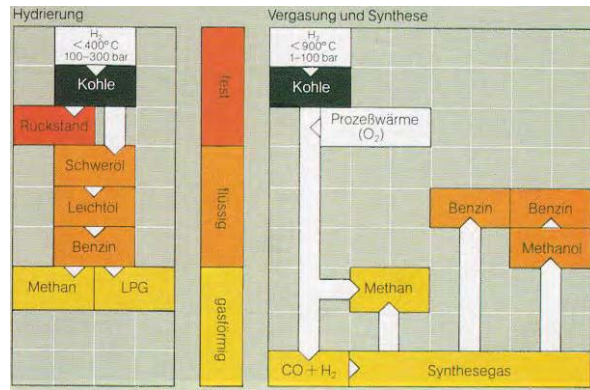


Abb. 1.5: Wege zur Herstellung flüssiger und gasförmiger Produkte aus Kohle (Ruhrkohle AG, 1980).

Kohleverflüssigung ist somit dringend erforderlich. Diese könnten anstatt mit Hilfe chemischer Katalysatoren durch den Einsatz stabiler pilzlicher und bakterieller Enzyme durchgeführt werden, welche bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck arbeiten. Dies hätte zugleich den Vorteil, die Kohle vielen Mikroorganismen (und nicht nur wenigen Spezialisten) als Substrat zugänglich machen zu können. Neben mikrobieller Entschwefelung und Denitrifikation wäre auf diese Art und Weise die Produktion von Einzellerprotein (single cell protein, SCP) aus Kohlesuspensionen durch Fermentation möglich, was für die Ernährung von Nutztieren (als Beimengung zum Futter) eine bedeutende Rolle spielen könnte. Insbesondere in Wüstenländern mit geringer pflanzlicher Primärproduktion könnte dadurch ein wesentlicher Beitrag zur Lösung der dortigen Ernährungsprobleme geleistet werden. Die Gefahr eines hohen Gehaltes an potentiell krebserregenden polycyclischen Aromaten (PCA) wäre bei einer Verwendung von Braunkohle nicht gegeben.

Darüber hinaus könnte Kohle auch die Kohlenstoffquelle der Wahl für die Synthese biologisch abbaubarer Kunststoffe sein (Steinbüchel u. Fuchtenbusch, 1997). Diese sogenannten Polyhydroxyalkanoate (PHA), z.B. die Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB), ein wichtiger bakterieller Speicherstoff (analog zum Glykogen oder zur pflanzlichen Stärke), eignen sich vorzüglich zur Produktion von Polymerwerkstoffen unterschiedlichster Eigenschaften, welche insbesondere als Verpackungsmaterial in Einwegartikeln wie Spritzen, Bechern, Shampoo-Flaschen u.a.m. bereits erfolgreich erprobt wurden, sich aber aus ökonomischen Gründen bisher nicht durchsetzen konnten.

Mit zunehmender Verknappung der Ölreserven sind in den letzten Jahren die gewaltigen weltweiten **Ölschiefer**-Vorkommen in den Vordergrund getreten. Bei einem geschätzten Gehalt von durchschnittlich etwa 100 Liter Öl pro Tonne Schiefer (Dyini, 1994) ergäbe sich ein deutlich höherer Gesamtvorrat als der der bekannten Rohölreserven (Revill et

al., 1994 sowie Abb. 1.3). Aufgrund des höheren Wasserstoffgehaltes (atomares Verhältnis $H/C \geq 1,5$; Braunkohle: 1,0; Steinkohle: 0,5) wäre der Ölschiefer als Kohlenwasserstoff-quelle der Zukunft deutlich besser geeignet als Kohle, die erst noch aufwendig hydriert werden muß. Zur Gewinnung von Öl aus Ölschiefer muß dieser jedoch auf etwa 500°C erhitzt werden (Rullkötter, 1987). Abgesehen von der geringen Wirtschaftlichkeit dieses Verfahrens stellt sich die Frage, wie diese hohe Temperatur erzeugt werden soll; unter Umständen wäre die Kohle nicht trotz, sondern gerade wegen der steigenden Bedeutung des Ölschiefers in zunehmendem Maße an der Gewinnung von Petrochemikalien beteiligt.

1.1.3.2 Kohle als Modell für persistente Substanzen

Seit Beginn des vergangenen Jahrhunderts gelangen beinahe jährlich neue Kunststoffe auf den Markt, über unsere Haushalte in den Abfall und somit in die Umwelt. Zusätzlich zur potentiellen Toxizität einiger dieser Substanzen stellt deren Persistenz sowie die anderer Xenobiotika die Kapazität von Mülldeponien vor große Probleme, so daß häufig die ökologisch bedenkliche Verbrennung als Weg der Abfallbeseitigung gewählt wird. Die Erforschung des mikrobiellen Abbaus der ebenfalls persistenten Kohle verspricht Lösungsansätze zur Bewältigung der oben genannten Entsorgungsproblematik. Wie Kunststoffe, so ist auch Kohle im wesentlichen das Produkt physikalisch-chemischer und nicht enzymatischer Vorgänge. Da es folglich keinen biologischen Syntheseweg für Kohle gibt, kann die Natur auch keinen einheitlichen biologischen Abbauweg vorgesehen haben – ebensowenig wie für Kunststoffe. Hinzu kommt die Hydrophobizität, welche die Kohle mit den Kunststoffen teilt; alles uns bekannte Leben ist untrennbar an Wasser gebunden, Enzyme sind folglich überwiegend hydrophile Proteine (außer Membranproteinen). Dennoch ist seit Beginn der 80er Jahre bekannt, daß Mikroorganismen auf Kohle als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können (Fakoussa, 1981; Cohen und Gabriele, 1982). Das Verständnis der Reaktionsmechanismen der für diesen Effekt verantwortlichen Enzymklassen sollte auch für die mikrobielle bzw. enzymatische Zersetzung von Xenobiotika von Nutzen sein.

1.2 Kohlegenese und –struktur

Zum Verständnis mikrobieller Angriffe auf Braun- und Steinkohle müssen zunächst die strukturellen Eigenschaften dieser überaus heterogenen Substanzen geklärt sein, die eng mit ihrer geologischen Entstehungsgeschichte verknüpft sind.

1.2.1 Entstehung fossiler Brennstoffe

Kohle, Erdöl und Erdgas sind Überreste organischen Materials, welches über Jahrmillionen biologischen, chemischen und physikalischen Umwandlungen unterlag. Die Verbrennung fossiler Energieträger setzt CO_2 und Wasser wieder in die Atmosphäre frei, aus der sie einst entnommen wurden (vgl. Abb. 1.6); die chemische Energie dieser Brennstoffe repräsentiert also letztlich Sonnenenergie vergangener Erdzeitalter, die bis heute bewahrt blieb.

Ausgangspunkt der Entstehung fossiler Brennstoffe war in jedem Fall zellulärer Detritus gleich welcher Herkunft (mengenmäßig überwiegend Sedimente abgestorbener Pflanzen), der bei einhergehendem Verlust funktioneller Gruppen unter Einfluß von Wärme und Druck unter reduzierenden Bedingungen zu unlöslichen Makromolekülen quervernetzt wurde, die man in ihrer Gesamtheit als **Kerogen** bezeichnet; im Gegensatz zur Verwesung ist die Bildung von Kerogen also ein aufbauender Prozeß.

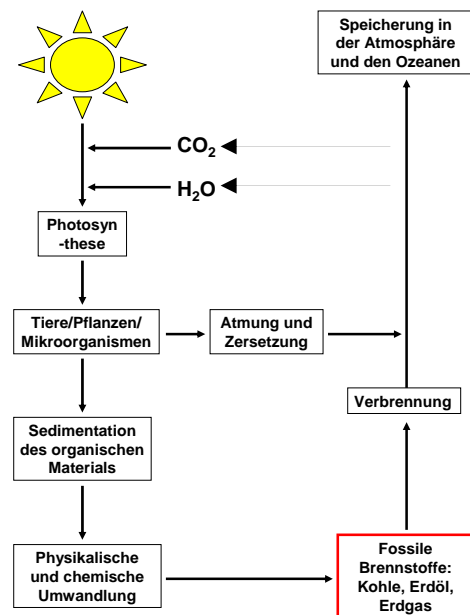


Abb. 1.6: Globaler Kohlenstoff-Kreislauf (nach Press & Siever, 2003)

Welcher Energieträger gebildet wurde, war im wesentlichen vom Ort der Sedimentation und von der Art der sedimentierten Organismen abhängig, was zur Entstehung dreier verschiedener Kerogen-Typen führte (Béhar und Vandenbrouke, 1987):

- Typ I-Kerogen entstand vorwiegend in Ufernähe aus Algen, besitzt das höchste H/C- sowie das niedrigste O/C-Verhältnis und bildet heute den organischen Anteil der meisten Ölschiefer.
- Typ II-Kerogen bildete sich in marinen Sedimenten aus Phyto- und Zooplankton sowie Bakterien, die sich in einem stark reduzierenden Milieu abgelagert haben – Bedingungen, wie wir sie heute etwa im Kaspischen und im Schwarzen Meer vorfinden. Diese Kerogene waren das Ausgangsmaterial fast aller bekannten Öl- und Gasfelder.
- Typ III-Kerogene entstanden fast ausschließlich aus Landpflanzen; Hauptbestandteil ist somit neben Cellulose das Lignin. Diese Verbindung war das Basismaterial für die Entstehung von Kohle, weshalb diese im Gegensatz zu Erdöl einen überwiegend

aromatischen Charakter besitzt und ein geringeres H/C-Verhältnis sowie ein höheres O/C-Verhältnis aufweist.

Beträchtliche Mengen Erdgas entstanden darüber hinaus als Produkt methanogener Archaeobakterien. Dieses Methan läßt sich durch seine charakteristische Isotopensignatur (fast kein $^{13}\text{CH}_4$) von aus Kerogen gebildetem Methan unterscheiden (Schoell, 1983).

1.2.2 Inkohlung des Kerogens

Die Entstehung von Typ III-Kerogen ist gekennzeichnet von der Bildung von Humin- und Fulvinsäuren, die mit steigender Quervernetzung und Verlust funktioneller Gruppen (Carboxylgruppen und Phenol-stämmige Hydroxylgruppen) zu einem unlöslichen Kerogen verschmelzen. Durch Gärungsprozesse entsteht CO_2 , wodurch der Sauerstoffgehalt des Kerogens erheblich sinkt. Das parallel gebildete Methan hat erheblichen Einfluß auf das Redoxpotential und somit auf den weiteren Verlauf der Kohlengeneese. Mit fortschreitender Überschichtung des Kerogens steigen Temperatur und Druck, wobei das organische Material zunehmend zu polycyclischen aromatischen Strukturen kondensiert, während aliphatische Seitenketten gespalten werden (Bustin, 1989). Außerdem nimmt durch Pressen der Wassergehalt ab. Da der relative Kohlenstoffgehalt steigt, bezeichnet man diese Vorgänge zusammenfassend auch als Inkohlung.

Im sog. „Ölfenster“ bei Temperaturen von 50 – 100°C und Drücken zwischen 5–15Mpa entstehen durch Cracking-Prozesse im aliphatischen Teil des Kerogens flüssige Kohlenwasserstoffe; wie oben erwähnt, ist allerdings der Anteil an Aliphaten und damit das Potential zur Ölbildung in den meisten Kohlen sehr gering; eine Ausnahme bilden die Sapropelkohlen, die z.T. aus Algen und Sporen entstanden sind, das höchste H/C-Verhältnis aller Kohlen besitzen und sich dementsprechend durch einen extrem hohen Heizwert auszeichnen (nach Bustin, 1989 sowie Frost, 1996).

Durch diese Cracking-Prozesse entstehen auch große Mengen Methan; dies hat in der Kohle die Bildung von Mikroporen ($\varnothing < 2\text{nm}$) zur Folge, wodurch sich die Oberfläche auf bis zu mehreren hundert Quadratmetern pro Gramm Kohle vergrößern kann (Damberger, 1994). Das entstandene Gas bleibt teilweise an die Kohlenmatrix adsorbiert (bis zu $30\text{m}^3/\text{t}$ Kohle), was einerseits eine willkommene zusätzliche Resource beim Kohleabbau, andererseits ein erhebliches Explosionsrisiko darstellt. Bei Temperaturen $> 200^\circ\text{C}$ werden alle übrigen Aliphaten zu Methan gespalten (Bustin, 1989).

Unter hohem Druck setzen Kristallisationsprozesse ein, die letztlich zur Bildung von Graphit führen. Graphit markiert den Endpunkt der Kohlengeneese. Verschiedene

Zwischenstufen der oben beschriebenen Vorgänge sind in Abb. 1.7 zusammengefaßt. Dabei ist zu beachten, daß die gezeigten Inkohlungsstufen fließend ineinander übergehen. In der sogenannten Telogenese kann es bei erneutem Kontakt der Kohle mit Luftsauerstoff (z.B. durch tektonische Plattenbewegungen) zu einer Reoxidation der Aromaten kommen, wobei Sauerstoff-Funktionen wie Carbonyl- oder Hydroxylgruppen (sekundär) eingeführt werden (Bustin, 1989).

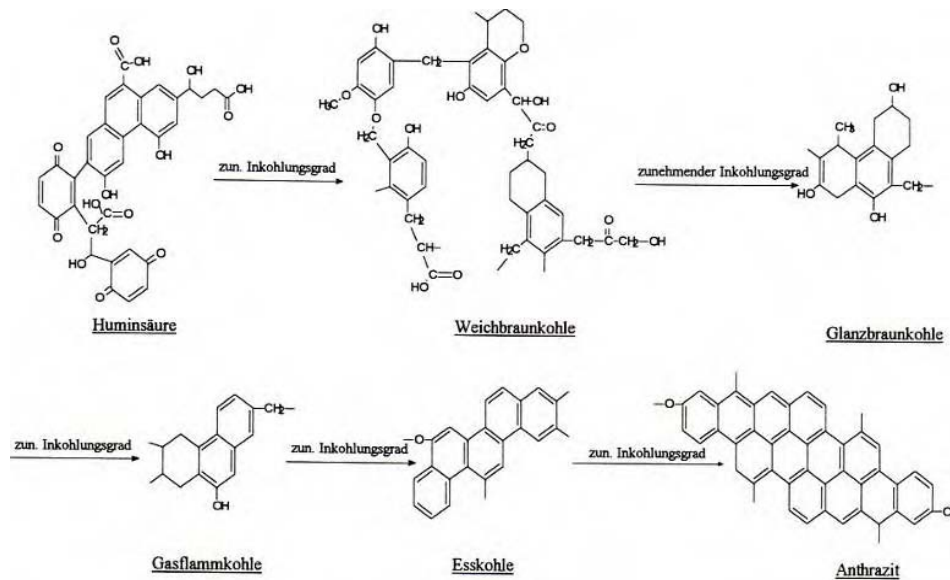


Abb. 1.7: Teilstrukturen verschiedener Inkohlungsstufen (aus: Frost, 1996; modifiziert nach Pätz et al., 1989 und Wender, 1981)

1.2.3 Klassifikation und chemische Eigenschaften von Kohletypen

Auch wenn die Veränderungen der Kohlestruktur kontinuierlich erfolgen, ist schon aus Gründen des wirtschaftlichen Wertes eine Einteilung der Kohle nach ihrem Inkohlungsgrad und damit nach ihrem Heizwert erforderlich, welcher letztlich ihren Marktwert bestimmt. Tabelle 1.2 zeigt eine Übersicht der sich mit steigender Inkohlung verändernden Zusammensetzung.

Kohletyp (Bezeichnung)	C-Gehalt [%] ¹	H-Gehalt [%] ¹	O-Gehalt [%] ¹	Wasseranteil	Heizwert [MJ/kg]
Torf	53 - 62	6 - 10	35	70 - 90	21 - 24
Weichbraunkohle	65 - 70	5 - 8	18 - 30	45 - 60	25 - 31
Hartbraunkohle	70 - 73	5 - 8	16 - 25	30 - 40	“
Glanzbraunkohle	72 - 75	5,5 - 7	12 - 18	8 - 10	“
Flammkohle	75 - 81	5,8 - 6,6	> 9,8	4 - 8	> 32
Gasflammkohle	81 - 85	5,6 - 5,8	7,3 - 9,8	2,5 - 4	“
Gaskohle	85 - 87,5	5,0 - 5,6	4,5 - 7,3	1,2 - 2,5	“
Fettkohle	87,5 - 89,5	4,5 - 5,0	3,2 - 4,5	0,8 - 1,2	“
Eßkohle	89,5 - 90,5	4,0 - 4,5	2,8 - 3,2	< 1	“
Magerkohle	90,5 - 91,5	3,75 - 4,0	2,5 - 2,8	< 1	“
Anthrazit	> 91,5	< 3,75	< 2,5	< 1	34 - 35,5

Tab. 1.2: Veränderungen in der relativen Elementarzusammensetzung m. zunehmendem Inkohlungsgrad
¹ bezogen auf wasser- und aschefreie Kohle (modifiziert nach Haenel, 1992)

1.3 Mechanismen der mikrobiellen Kohleverflüssigung

Die Vorteile einer Solubilisierung der Kohle wurden unter 1.1.2 aufgeführt. Die angeführten Verfahren arbeiten jedoch alle ausgesprochen unwirtschaftlich, insbesondere da sie bei hohen Temperaturen und Drücken stattfinden. Eine enzymatische Kohleverflüssigung hätte demgegenüber den Vorteil, unter Standardbedingungen, d.h. bei Raumtemperatur und Normaldruck abzulaufen.

Die Tatsache, daß Mikroorganismen zur Solubilisierung von Kohle in der Lage sind (vgl. Abb.1.8), ist seit Anfang der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts bekannt. Erstmals weltweit wurde in Bonn 1981 die partielle Verflüssigung von Steinkohle durch Pseudomonaden beschrieben (Fakoussa, 1981); ein Jahr später erfolgte die erste Beschreibung einer vollständigen Verflüssigung amerikanischer Braunkohle durch Pilze (Cohen und Gabriele, 1982).



Abb. 1.8: Braunkohle, verflüssigt durch den Pilz *Phanerochaete chrysosporium* (Willmann u. Fakoussa, 1992)

In den folgenden zwei Jahrzehnten wurden die wesentlichen für dieses Phänomen verantwortlichen Mechanismen aufgeklärt, wenn auch deren genaues Zusammenspiel nach wie vor nicht im Detail bekannt ist. Beobachtet wurde einerseits eine Ausscheidung von alkalischen Substanzen, Chelatoren und Detergenzien; darüber hinaus wurde eine Aktivität verschiedener oxidativer Enzyme sowie von Esterasen festgestellt. Die bakteriellen und pilzlichen Strategien zur Braunkohlesolubilisierung werden als ABCDE-System zusammengefaßt (Fakoussa und Hofrichter, 1999), welches anhand von Abb. 1.9 veranschaulicht und im folgenden näher erläutert werden soll.

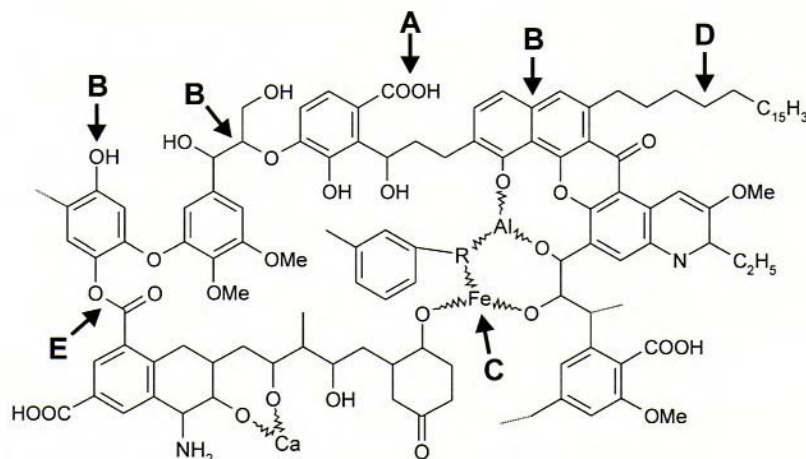


Abb. 1.9: Das ABCDE-System mikrobieller Angriffe auf Braunkohle (aus: Klein, Fakoussa et al., 2001)
A: Alkalische Substanzen **B:** Biokatalysatoren (oxidative Enzyme) **C:** Chelatoren
D: Detergenzien **E:** Esterasen

- A) Die sogenannten Huminsäuren bilden den bei weitem überwiegenden Bestandteil aller Braunkohlen (Fakoussa u. Hofrichter, 1999). Deren Carboxylgruppen liegen in der Kohle vorwiegend im protonierten, chelatierten oder veresterten und damit in einem ungeladenen Zustand vor. Durch Deprotonierung mittels Alkalisierung des Mediums erzeugen die betreffenden Mikroorganismen Carboxylat-Anionen, welche umgehend hydratisiert werden; die Kohle wird also auf diese Weise mit hydrophilen Funktionen versehen. Alkalische Substanzen, insbesondere Ammoniak (Willmann, 1989) wie auch Polyamine (Strandberg und Lewis, 1987) sind offenbar immer an der Kohleverflüssigung (bei Anwesenheit von ausreichend Stickstoff im Nährmedium) beteiligt (Quigley et al., 1989), und nicht selten wird in entsprechenden Kulturmedien ein pH-Wert von über 9 erreicht. Eine zweite Möglichkeit zur Alkalisierung des Mediums besteht in der Verwertung organischer Säuren als C-Quelle. Dieses Phänomen wird z.B. verantwortlich gemacht für eine erheblich verbesserte Kohlesolubilisierung durch *Fusarium oxysporum* bei der Verwendung von Gluconat anstatt von Glucose als C-Quelle (Hölker et al., 1995).
- B) In mikrobiell verflüssigten Braunkohle-Komponenten konnte mittels NQS-Kernresonanzspektren ein Anstieg sauerstoffhaltiger Gruppen gegenüber der jeweiligen Ausgangssubstanz festgestellt werden (Faison et al., 1990; Willmann und Fakoussa, 1991 u. 1997a u. b; Willmann, 1994). Dies weist auf eine Beteiligung oxidativer Enzyme (Biokatalysatoren) hin, welche Sauerstoff-Funktionen in die Kohlestruktur einbringen und diese dadurch hydrophilisieren. Im einzelnen konnte die Aktivität von Phenoloxidasen bzw. Laccasen (Cohen et al., 1987; Pyne et al., 1988; Frost, 1996; Hofrichter und Fritsche, 1997; Fakoussa und Frost, 1999) sowie insbesondere verschiedener Typen von Peroxidasen (Wondrack et al., 1989; Ralph u. Catcheside, 1994 u. 1997; Willmann, 1994; Willmann u. Fakoussa, 1997a,b; Hofrichter u. Fritsche, 1997) nachgewiesen werden. Eine besondere Rolle nehmen hierbei die Manganperoxidasen (MnP) ein. Diese Enzyme oxidieren mit H₂O₂ als Elektronenakzeptor Mn²⁺ zu Mn³⁺. Letzteres kann als Mediator des Enzyms auch in kleine Kohleporen hineindiffundieren und dort äußerst unspezifisch verschiedene Substrate oxidieren (Higuchi, 1989). Die Anwesenheit kohlestämmiger Huminsäuren erhöht den Level an MnP-mRNA in verschiedenen Pilzen (Ludwig et al., 1999; Scheel et al., 2000).

- C) Carboxyl- und Hydroxylgruppen an den Braunkohle-Makromolekülen sind zum Teil über mehrwertige Metallkationen wie Ca^{2+} , Fe^{3+} oder Al^{3+} chelatartig vernetzt. Entsprechend wird eine Kohle, welche viele solcher Metallkationen enthält, durch Entzug derselben mittels Chelatoren zum einen depolymerisiert, zum anderen durch Freilegung deprotonierter Carboxylgruppen erheblich hydrophiler. Der Anteil dieser Metallchelate-Vernetzungen steigt mit der Anzahl sauerstoffhaltiger Gruppen und somit mit dem Oxidationsgrad der jeweiligen Kohle und korreliert wahrscheinlich auch mit dem Aschegehalt. Es verwundert daher kaum, daß die stark verwitterte amerikanische Braunkohle Leonardit durch den Pilz *Trametes (Coriolus) versicolor* allein durch die Ausscheidung hoher Mengen von Ammoniumoxalat vollständig solubilisiert werden kann (Cohen et al., 1990). Ähnliches wurde auch für mit H_2O_2 voroxidierte Kohlen beobachtet (Fakoussa, 1994). Auf unbehandelte wenig oxidierte Kohlen dagegen wie etwa die aschearme Rheinische Braunkohle ist der Einfluß von Chelatoren nur gering.
- D) Detergenzien (Biotenside) können zur Solubilisierung beitragen, indem sie aliphatische hydrophobe Anteile der Braunkohle (Paraffine) in Lösung bringen. Durch Tenside allein kann allerdings nur ein geringer Anteil der Kohle verflüssigt werden (Strandberg u. Lewis, 1987; Fakoussa, 1992). Einen größeren Effekt hat die Anwendung gängiger biochemischer Detergenzien wie SDS, Tween 80 oder TritonX-100 (Breckenridge u. Polman, 1994). Die Konzentrationen gleich welcher Detergenzien mußten jedoch die in der Natur vorliegenden in jedem Falle deutlich übersteigen, um nennenswerte Auswirkungen auf die Kohleverflüssigung zu haben, so daß der Einsatz von Biotensiden *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle bei der Solubilisierung spielen dürfte.
- E) Im Wachsanteil des Bitumens sind Carboxylester vorhanden, und auch eine Verknüpfung von Matrix- und Huminsäureanteilen durch Esterbrücken wird diskutiert (Hölker, 1998); eine Beteiligung von hydrolytischen Enzymen wie z.B. Esterasen kann daher vermutet werden. Für den Deuteromyceten *Trichoderma atroviride* konnte die Aktivität eines teilweise induzierbaren neuen Esterase-Typs gezeigt werden, welcher die Solubilisierung Rheinischer Braunkohle erleichterte (Hölker et al., 1999a u. b). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Esterasen fanden sich bei *Trichoderma spp.* (Laborda et al., 1997 u. 1999).

Dabei unterscheidet man zwei Prinzipien des mikrobiellen Angriffs auf die Kohlestruktur (Abb. 1.10):

- die überwiegend *nicht-enzymatische Solubilisierung* von Braunkohle bei höheren pH-Werten (7-10) zu einer schwarzen Lösung/Suspension von Huminsäuren durch alkalische Substanzen und/oder Chelatoren und Tenside
- die *enzymatische (oxidative) Depolymerisierung* von Braunkohle oder Huminsäuren bei niedrigeren pH-Werten (3-6) bis zu einer gelblichen Lösung von Fulvinsäuren, die oft mit einer Entfärbung einhergeht.

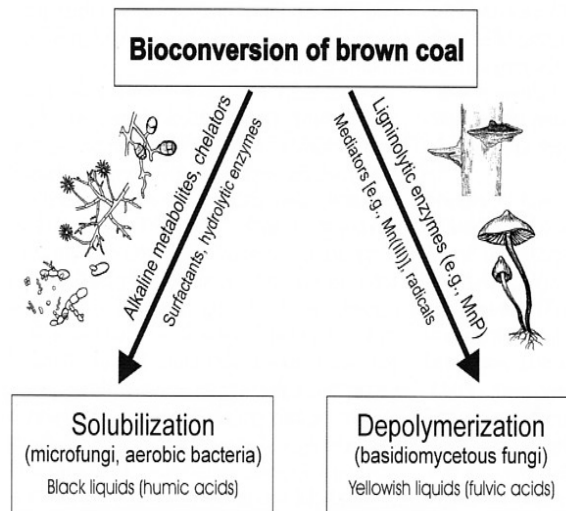


Abb. 1.10: Hauptwege mikrobieller struktureller Modifikationen von Braunkohle. (Klein, Fakoussa et al., 2001)

Insgesamt ist die Kohleverflüssigung kein einheitlicher Prozeß und stark vom jeweiligen Kohletyp abhängig (Abb. 1.11). Sollte sich jedoch die alkalische Solubilisierung als Haupteffekt herauskristallisieren, wären chemische Verfahren den biologischen deutlich überlegen. Auch eine oxidative Vorbehandlung der Kohle könnte mit H_2O_2 deutlich ökonomischer erfolgen als durch oxidative Enzyme, wie auch aus der chemischen Industrie bekannte Chelatoren klar preiswerter einzusetzen wären als ihre natürlichen Äquivalente.

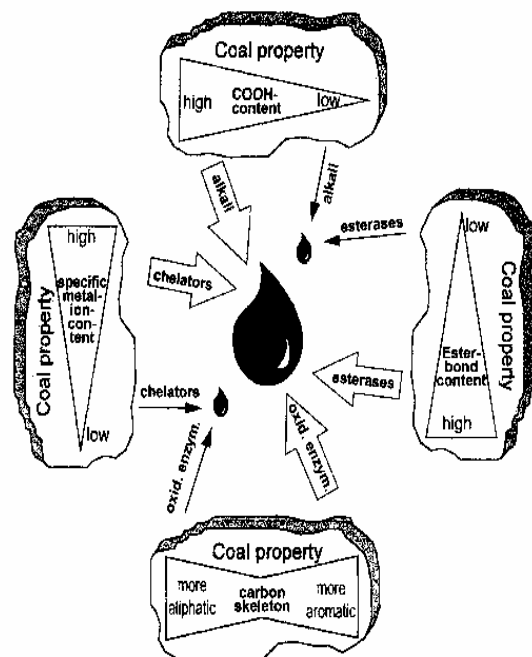


Abb. 1.11: Einfluß verschiedener mikrobieller Wirkstoffe auf die Kohlesolubilisierung (Fakoussa und Hofrichter, 1999)

Ähnliches gilt für die Biotenside, die die Effektivität ihrer chemischen Gegenstücke nicht erreichen und zudem in der Gewinnung erheblich teurer sind; darüber hinaus scheint deren Anteil an der biologischen Kohlesolubilisierung eher gering, was auch für die Beteiligung der Esterasen gilt.

Insgesamt ergab die Erforschung der mikrobiellen Kohlesolubilisierung in den 80er und 90er Jahren eine Vielzahl beteiligter Mechanismen, die in größtenteils noch zu klärendem Maße zusammenwirken.

Seit Beginn der 90er Jahre ist mit einem Dünger aus biologisch solubilisierter Kohle das erste Produkt dieser Forschung auf dem Markt (vgl. Abb. 1.12).

Einige der entdeckten Enzyme, insbesondere die extrazellulären Oxidoreduktasen aus Holz- und Laub-abbauenden Basidiomyceten

könnten bald einer biotechnologischen Anwendung zugeführt werden (Klein et al., 2001).

Wenig vielversprechend erscheint dagegen beim derzeitigen Stand der Forschung eine Umwandlung von Kohle in flüssige Brenn- und Treibstoffe durch das ABCDE-System: Selbst wenn bei weiterer Beforschung dieses Themas (neben einer detaillierteren Untersuchung der Solubilisierungsmechanismen kann auch das mikrobielle Screening nach Kohle verflüssigenden Organismen nicht annähernd als abgeschlossen gelten) mikrobielle Wirkstoffe gefunden werden sollten, die effektiver als ihre chemisch-technischen Pendanten arbeiten und vor allem preiswerter zu gewinnen sind, wäre das Produkt, insbesondere aufgrund seines extrem hohen Wassergehaltes, in dieser Form nicht einsetzbar. Es muß ein weiterer Veredelungsschritt durchgeführt werden, der die wäßrige Kohlelösung erstens nutzbar und zweitens zu einem effektiveren Brennstoff macht.

1.4 Decarboxylierung: Entscheidende Stufe der Kohleveredelung

Auf welchem Weg auch immer die Kohleverflüssigung in Zukunft erfolgen wird, eine direkte Verbrennung des Produktes wäre wie oben erwähnt aufgrund des hohen Wasseranteils kaum möglich, und ein vollständiges Abdampfen desselben wäre infolge der hohen Wärmekapazität des Wassers extrem zeitaufwendig und würde – bei entsprechender Wärmezufuhr – unwirtschaftlich viel Energie verbrauchen. Eine elegantere Lösung wäre eine Hydrophobierung des Kohleanteils, woraus dessen Abscheidung aus der wäßrigen Kohlelösung resultieren würde (Fakoussa et al., 1999b).

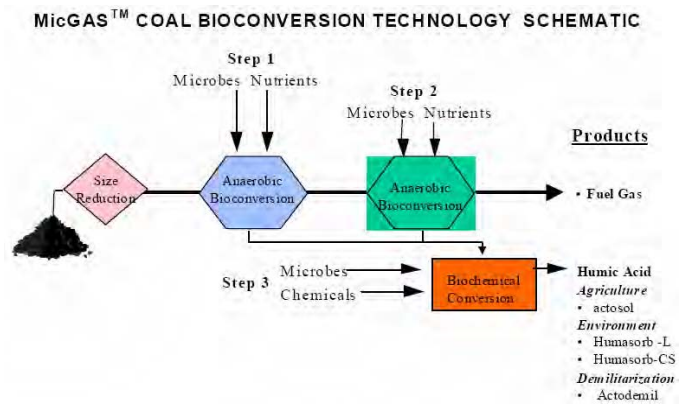


Abb. 1.12: Schema biologischer und biochemischer Kohlekonversion mit Angabe von bereits auf dem Markt befindlichen Produkten ©Arctech, Inc.

Davon ausgehend, daß die vorherige Hydrophilierung der Kohle im wesentlichen auf alkalischer Deprotonierung der Carboxylgruppen der Huminsäuren beruht, könnte eine solche Hydrophobierung durch Abspaltung dieser Carboxylat-Anionen, also durch Decarboxylierung, erfolgen. Diese Idee zur Kohleveredelung wurde patentiert (Fakoussa et al., 1999a). Durch Beteiligung von Chelatoren und Esterasen an der Kohlesolubilisierung entstünden zusätzliche (freie) Carboxylgruppen, so daß dieser Effekt noch verstärkt würde. Gegenüber einer bloßen Reprotonierung der Carboxylgruppen mittels mineralischer Säuren hätte eine Decarboxylierung zudem den Vorteil einer Erhöhung des C/O-Verhältnisses und damit einer Verbesserung des spezifischen Brennwertes der Kohle.

Diese würde somit zu einem wertvolleren Brennstoff, was einen vorherigen Kostenaufwand bei der Solubilisierung rechtfertigen, unter Umständen sogar überkompensieren würde, zumal die zuvor eingebrachten alkalischen Substanzen (im einfachsten Fall Natronlauge) zum größten Teil wiedergewonnen werden könnten (Fakoussa, persönliche Mitteilung, 2000). Darüber hinaus würden Umweltprobleme vermieden, welche im Falle der oben angesprochenen Reprotonierung der Huminsäuren durch Anfallen stark salziger Abwässer aufträten. Mögliche Mechanismen zur Fällung/Hydrophobierung alkalisch solubilisierter Huminsäuren sind in Abb. 1.13 zusammenfassend dargestellt.

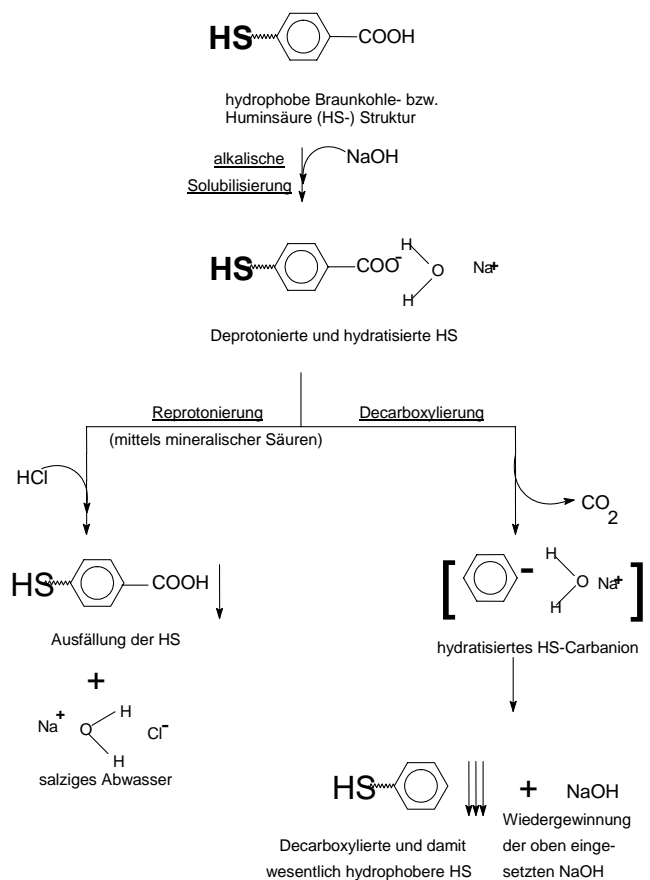


Abb. 1.13: Wiedergewinnung alkalisch solubilisierter Huminsäuren (aus Rudat, 2000).

Eventuell zusätzlich vorhandene Substituenten am Benzenring wurden zugunsten einer übersichtlicheren Darstellung nicht eingezeichnet.

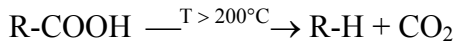
Eine Decarboxylierung der Huminsäuren birgt gegenüber einer Reprotonierung den Vorteil der Recyclisierung (Fakoussa, persönliche Mitteilung, 2000; vgl. auch Text!).

1.4.1 Enzymatische und chemisch-technische Decarboxylierung

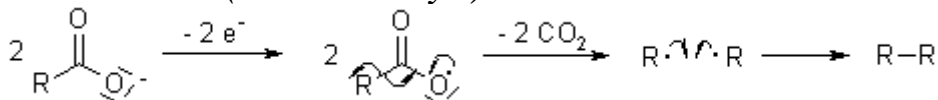
1.4.1.1 Chemische, elektrochemische und thermische Decarboxylierung

Aus der chemischen Industrie sind verschiedene Methoden zur Decarboxylierung bekannt, die theoretisch alle auf Kohle angewendet werden könnten (modifiziert nach Helas; zusammengestellt nach Falbe und Regitz, 1997 sowie nach www.organische-chemie.ch).

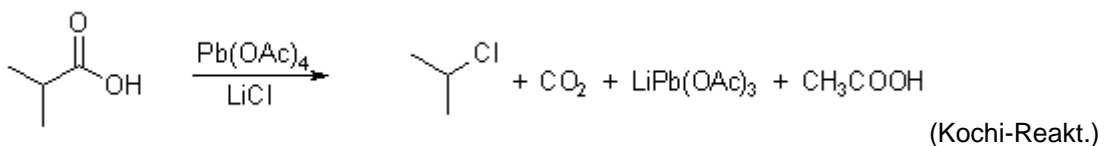
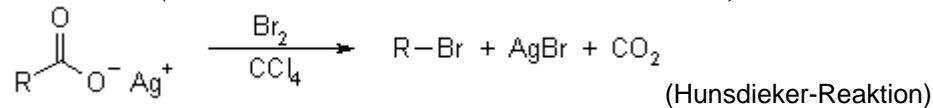
- thermisch:



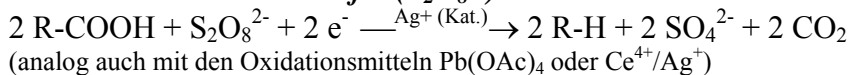
- elektrochemisch (Kolbe-Elektrolyse):



- radikalisch (Hunsdieker-Reaktion und Kochi-Reaktion):



- Oxidation mit Peroxodisulfat ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$):



- Heterogene Katalysatoren:

z.B. Zeolithe, Ton u.a.

Durch elektrochemische Decarboxylierung von Huminsäuren konnte deren Hydrophobierung bewirkt und damit der oben postulierte Effekt der Decarboxylierung solubilisierter Kohle eindeutig nachgewiesen werden (Henning und Fakoussa, unveröffentlichte Daten, 1995). Der Energieaufwand ist jedoch, wie auch bei den anderen oben angeführten chemisch-technischen Verfahren, sehr hoch. Diese Decarboxylierungsmethoden wären somit unwirtschaftlich.

Hier könnte sich die enzymatische Decarboxylierung den chemisch-technischen Verfahren als ökonomisch überlegen erweisen, da die entsprechenden biochemischen Reaktionen bei milden und damit kostengünstigen Bedingungen ablaufen. Die im Verhältnis teurere Produktion des Biokatalysators könnte durch dessen Wiedergewinnung (idealerweise würde die Decarboxylase nicht verbraucht) kompensiert werden (Fakoussa et al., 1999a).

1.4.1.2 Enzymatische Decarboxylierung und ihre Bedeutung in Natur und Industrie

Decarboxylierungsreaktionen aller Art finden sich ubiquitär im Stoffwechsel aller Lebewesen. Decarboxylasen treten häufig in Verbindung mit Coenzymen bzw. prosthetischen Gruppen auf (z.B. Aminosäuredecarboxylasen mit Pyridoxalphosphat, die Pyruvatdecarboxylase mit Thiaminpyrophosphat oder die Methylmalonyl-CoA-decarboxylase mit Biotin).

Die im Laufe der Decarboxylierung auftretenden anionischen Zwischenprodukte (Enolate) müssen durch Coenzyme stabilisiert werden (O`Leary, 1992). Eine Aktivierung bzw. Stabilisierung über Metallionen erfolgt alternativ (β -Ketocarbonsäuren, z.B. Acetoacetat-Decarboxylase) oder zusätzlich (allg. α -Ketocarbonsäure-Decarboxylasen).

Diese Bildung eines anionischen Intermediates stellt eine endotherme Reaktion dar. Diese wird durch eine sich unmittelbar anschließende exotherme Reaktion „gezogen“; dabei handelt es sich im Falle einer Aromaten-Decarboxylierung um die Protonierung des intermediär entstandenen Carbanions.

Von besonderem Interesse für die klinische Forschung sind die Aminosäuredecarboxylasen. Deren Produkte, die biogenen Amine, sind als Vorstufen von Hormonen, Coenzymen und Alkaloiden bekannt. Insbesondere sind sie von Bedeutung als Neurotransmitter wie z.B. Dopamin, Histamin oder γ -Aminobuttersäure/GABA (Schlee u. Kleber, 1991).

Mikrobielle Decarboxylasen haben Eingang in die technische Chemie gefunden (Falbe und Regitz, 1997), beispielsweise bei der Enantiomeren-selektiven Decarboxylierung disubstituierter Malonsäuren (Theil, 1997).

1.4.1.3 Anforderungen an eine potentielle Huminsäure-Decarboxylase

Aufgrund der extremen Heterogenität der Kohlestruktur stellt sich an eine solche Decarboxylase eine für Enzyme ungewöhnliche Anforderung: Sie müßte ausgesprochen unspezifisch arbeiten, während normalerweise gerade die überaus hohe Substratspezifität als typische Enzymeigenschaft bekannt ist.

Zudem wäre die für fast alle enzymatischen Decarboxylierungen beschriebene Abhängigkeit von Cofaktoren (s.o.) für den technischen Einsatz eines Enzyms hinderlich. Erwünscht wäre daher das Aufspüren *extrazellulärer* Enzyme, welche in der Regel unabhängig von anderen Zellkomponenten arbeiten und zudem ein breiteres

Substratspektrum besitzen. Darüber hinaus sind extrazelluläre Enzyme nicht auf spezielle intrazelluläre Arbeitsbedingungen wie etwa einen genauen pH-Wert oder ein bestimmtes Reduktionspotential angewiesen. Außerdem ließe sich eine ins Medium ausgeschiedene Decarboxylase erheblich leichter isolieren und aufreinigen; aufgrund des in der Regel um fast eine Größenordnung geringeren Molekulargewichtes wäre sie auch „handlicher“, d.h. zum einen wäre das zugehörige Gen in Klonierungsexperimenten leichter einsetzbar, zum anderen wäre das exprimierte Protein stabiler und damit im Labor wie auch in der praktischen Anwendung haltbarer. Im Idealfall ließe sich von einem solchen Enzym ein kleines, *in vitro* synthetisierbares Peptid mit unspezifischer Decarboxylase-Aktivität ableiten.

1.4.2 Benzencarbonsäuren (BCS) als Modellsubstanzen für Huminsäuren

Mikrobielle Umsetzungen von Huminsäuren sind aufgrund deren extrem heterogener dreidimensionaler Struktur (Abb. 1.14) sehr schwer zu untersuchen.

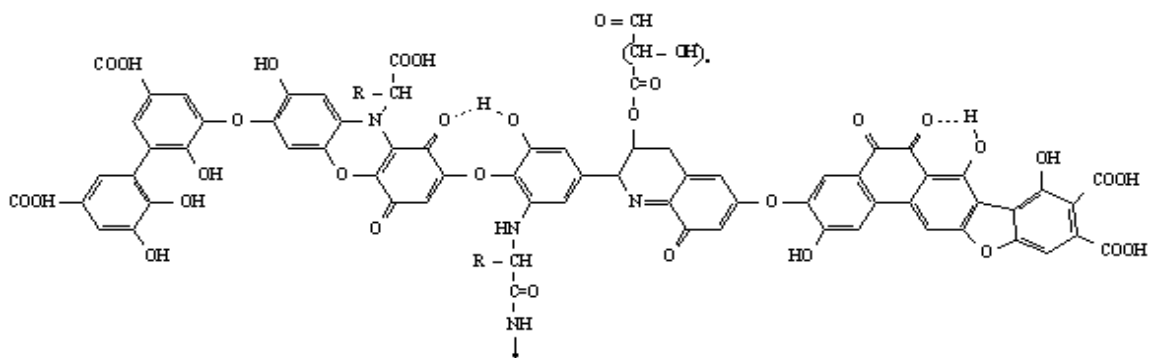


Abb. 1.14: Eines von zahlreichen Strukturmodellen einer Huminsäure (©HumifultateScience, 2005). Gemeinsam ist den Modellen lediglich der überwiegend aromatische Charakter sowie der hohe Anteil an Carboxylgruppen (bis zu 10%).

Huminsäuren als Substrat für bakterielles Wachstum werden zudem nur sehr langsam umgesetzt (Koch, 2000). Daher wurden mehrfach carboxylierte einfache Aromaten als Modellsubstanzen verwendet (Abb. 1.15).

1.4.2.1 Natürliche Vorkommen

Benzenpolycarbonsäuren entstehen bei der Oxidation von Graphit, Ruß u. dergl. und finden sich daher in Spuren auf Klüften von Braun- und Steinkohlenlagern und in bituminösen Sedimenten (Falbe und Regitz, 1997) sowie in Holzkohle. Insbesondere das Aluminiumsalz der Benzenhexacarbonsäure, der Mellit (Honigstein, $\text{Al}_2[\text{C}_6(\text{COO})_6]$) findet sich in z.T. recht großen Kristallen.

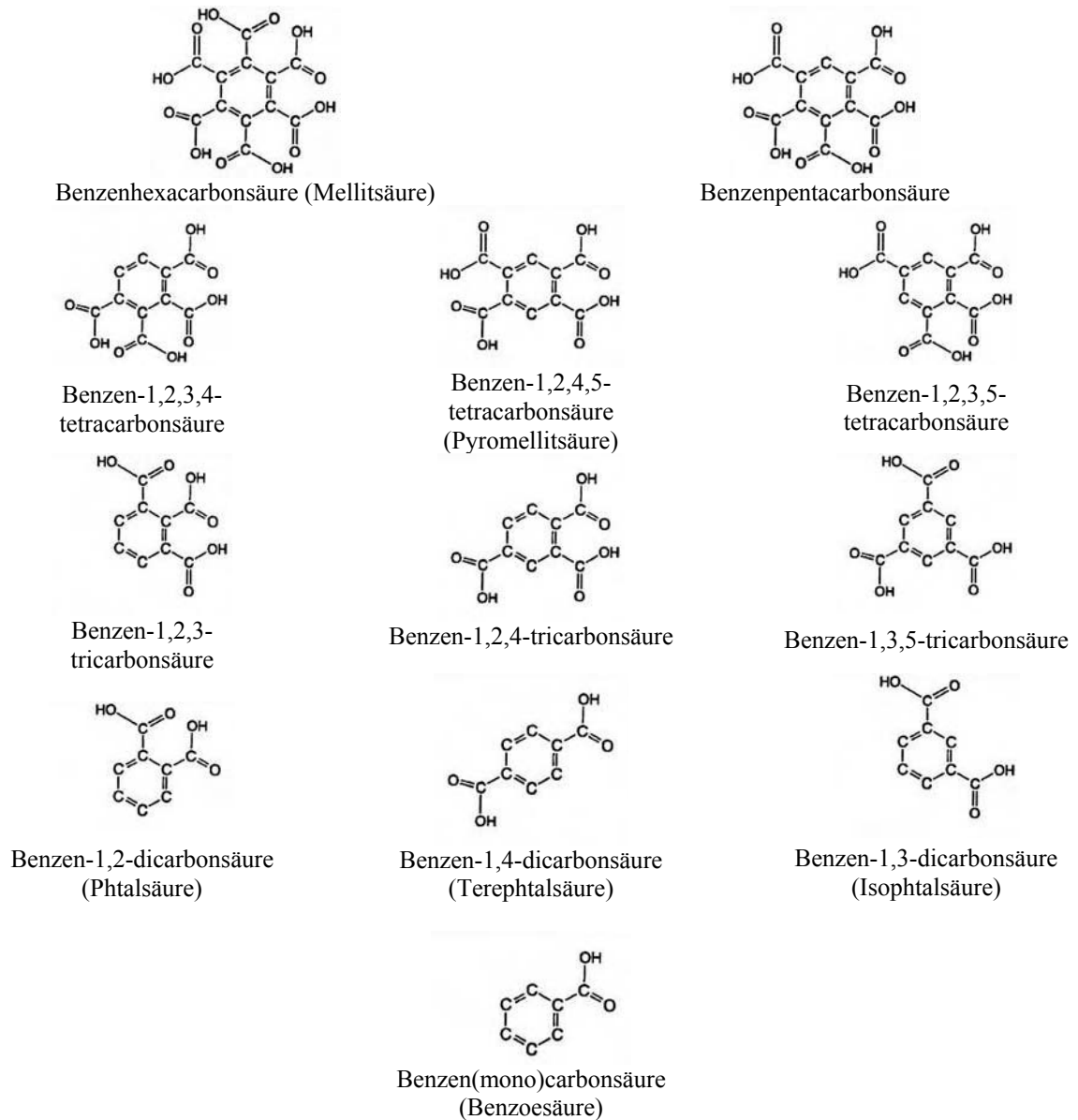


Abb. 1.15: Die möglichen Strukturisomere der verschieden hoch carboxylierten Benzencarbonsäuren.

Der weitaus größte Teil (70 – 95 %) organischer Materie in Meteoriten besteht aus undefiniertem Material, welches aus Kohlenmonoxid, Wasserstoff und Ammoniak durch Prozesse entstanden ist, die der Fischer-Tropsch-Synthese vergleichbar sind (Anders et al., 1973). Diese organischen Polymere ähneln irdischen Huminsäuren (Briggs und Mamikunian, 1963). Unter oxidativen Bedingungen entstehen zu fast 50% Benzencarbonsäuren, und zwar alle von Benzoessäure über sämtliche Benzendi-, tri- und tetracarbonsäuren bis hin zu Benzenpenta- und -hexacarbonsäure (Hayatsu et al., 1980). Benzenpolycarbonsäuren stellen also möglicherweise einen nicht unbedeutenden Teil der extraterrestrischen organischen Materie, wenn diese oxidativen Prozessen ausgesetzt war.

Unlängst wurde gezeigt, daß sich Salze höherer Benzencarbonsäuren, insbesondere der Mellitsäure, in Mengen von mindestens 2kg/m^2 auf der Oberfläche unseres Nachbarplaneten Mars angehäuft haben müßten (Benner et al., 2000). Dabei handelt es sich um metastabile Oxidationsprodukte organischer Materie, welche über Meteoriten die Planetenoberfläche erreicht haben könnte (Flynn, 1996; Hayatsu u. Anders, 1981; Mullie u. Reisse, 1987). Aufgrund ungeeigneter Meßmethoden (GC-MS) konnten diese nicht flüchtigen Verbindungen im Rahmen der letzten Mars-Mission der Viking-Sonde nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis hätte weitreichende Konsequenzen für die Exo- bzw. Astrobiologie und -geologie: Organische Verbindungen (und damit eventuelle Spuren früheren Lebens auf dem Mars wären möglicherweise übersehen worden.

1.4.2.2 Verwendung von Benzencarbonsäuren

Aromaten mit ein bis zwei Carboxylgruppen gehören zu den Hauptprodukten der organochemischen Industrie: Das Anhydrid der Benzen-1,2-dicarbonsäure (Phtalsäureanhydrid) dient als Weichmacher für Kunststoffe. Mit 5 Mill. t/a überschreitet die Weltproduktion dieser industriell bedeutendsten Carbonsäure sogar die von Essigsäure (Breuer, 1991). Terephtalsäure wird zur Polyester-Herstellung verwendet. Die Benzenmonocarbonsäure (Benzoessäure) findet als Konservierungsmittel Verwendung in der Lebensmittel- und Tabakindustrie, während die Acetylsalicylsäure („Aspirin“) als Schmerzmittel das meisteingenommene Medikament überhaupt darstellt.

Dagegen werden höhere Benzencarbonsäuren (mit ≥ 3 Carboxylgruppen) nicht im industriellen Maßstab hergestellt, mit Ausnahme des Benzen-1,2,4-tricarbonsäure-Anhydrids, welches verestert mit Alkoholen als Weichmacher für Polyvinylchlorid Verwendung findet (vergleichbar dem Phtalsäureanhydrid; [www. chemicalLand21.com](http://www.chemicalLand21.com)). Bei den in Deutschland ansässigen Pharmaunternehmen und Chemikalien-Großhändlern ist neben der Benzenhexacarbonsäure (Mellitsäure) und den drei Benzentricarbonsäure-Isomeren als einzige Tetracarbonsäure die Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) erhältlich; Benzenpentacarbonsäure muß aus Frankreich bezogen werden.

Höhere Benzencarbonsäuren erlangten in den späten neunziger Jahren Bedeutung als Liganden für kinetische Enzymstudien: Insbesondere Mellit- und Pyromellitsäure werden aufgrund ihrer symmetrischen Struktur eingesetzt, um die Substratbindestelle(n) von Proteinen zu untersuchen, welche carboxylierte Metaboliten umsetzen (Beispiele: Fumarase, Beckmans & van Driesche 1998 sowie Phosphoglycerat-Mutase, Rigden et al. 1999).

1.4.3 Enzymatische Decarboxylierung aromatischer Carbonsäuren

1.4.3.1 Aromaten mit < 3 Carboxylgruppen

Entsprechend der Anhäufung von Benzencarbonsäuren, insbesondere von Phtalaten in der (vom Menschen verschmutzten) Natur (vgl. 1.4.2.2) wird die Fähigkeit zum Abbau von Benzencarbonsäuren relativ oft angetroffen. Eine Decarboxylierung von 4,5-Dihydroxyphtalsäure wurde schon 1960 beschrieben (Ribbons und Evans), eine Darstellung der Decarboxylierung des Isomers 3,4-Dihydroxyphtalsäure folgte 1982. Ebenfalls bekannt ist die enzymatische Decarboxylierung unterschiedlich substituierter Benzenmonocarbonsäuren (e.g. Aminobenzoat-Decarboxylase, McCullough, 1957; 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoat-Decarboxylase, Mosbach und Schulz, 1971; 6-Methylsalicylat-Decarboxylase, Light und Vogel, 1975; Protocatechuat-Decarboxylase, He und Wiegel, 1996; 4-Hydroxybenzoat-Decarboxylase, Li et al., 2000; Gallussäure-Decarboxylase, Hashidoko et al., 2002).

Die verschiedenen Benzencarbonsäuren werden nach ausreichender Decarboxylierung (bzw. allgemeiner Abspaltung von Substituenten) laut Literatur (Gottschalk, 1986; Fritsche, 1990; Schlegel, 1992; Madigan et al., 2002) an zwei benachbarten Stellen hydroxyliert. In der Regel sind Catechol und Protocatechuat die Schlüsselverbindungen, in welche die meisten aromatischen Verbindungen umgewandelt werden (Stanier u. Ornston, 1973). Anschließend erfolgt deren Abbau, welcher durch oxidative Spaltung des Benzenringes eingeleitet wird.

1.4.3.2 Höhere Benzencarbonsäuren (BCS)

Zur Suche nach einer aromatischen Carbonsäure-Decarboxylase, welche auch eine Aktivität für Huminsäuren besitzen könnte, wurde in vorherigen Arbeiten (Lammerich, 1998; Krause, 2000; Rudat, 2000) die Benzenhexacarbonsäure (Mellitsäure) eingesetzt. Indem diese Verbindung als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle für das (Mineralsalz-) Nährmedium ausgewählt wurde, konnten nur Organismen wachsen, welche zu ihrer Decarboxylierung fähig waren, da diese einer zur Verwertung notwendigen Ringspaltung vorausgehen muß. Hierbei wurden alternativ auch verschiedene Benzen-tricarbonsäuren sowie Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) als C-Quellen verwendet. Ein Wachstum von Mikroorganismen mit Aromaten, welche mehr als zwei Carboxylgruppen besitzen bzw. deren enzymatische Decarboxylierung war zuvor nicht bekannt bzw. ist noch nie beschrieben worden.

In den oben erwähnten Arbeiten konnte die weite Verbreitung der Fähigkeit zur Verwertung höherer Benzencarbonsäuren (BCS) bei morphologisch und physiologisch deutlich verschiedenen Mikroorganismen durch entsprechendes Screening dokumentiert werden (Lammerich, 1998 und Rudat, 2000). Zur Verwertung der Benzenhexacarbonsäure (Mellitsäure) wie auch der Pyromellitsäure war in allen untersuchten Fällen deren zumindest partielle Decarboxylierung erforderlich. Dieses Ergebnis bestätigt die Eignung dieser beiden BCS als Screening-Substanzen bei der Suche nach Decarboxylasen aromatischer Carbonsäuren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß bevorzugt eine Decarboxylierung zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure erfolgt (Abb. 1.16).

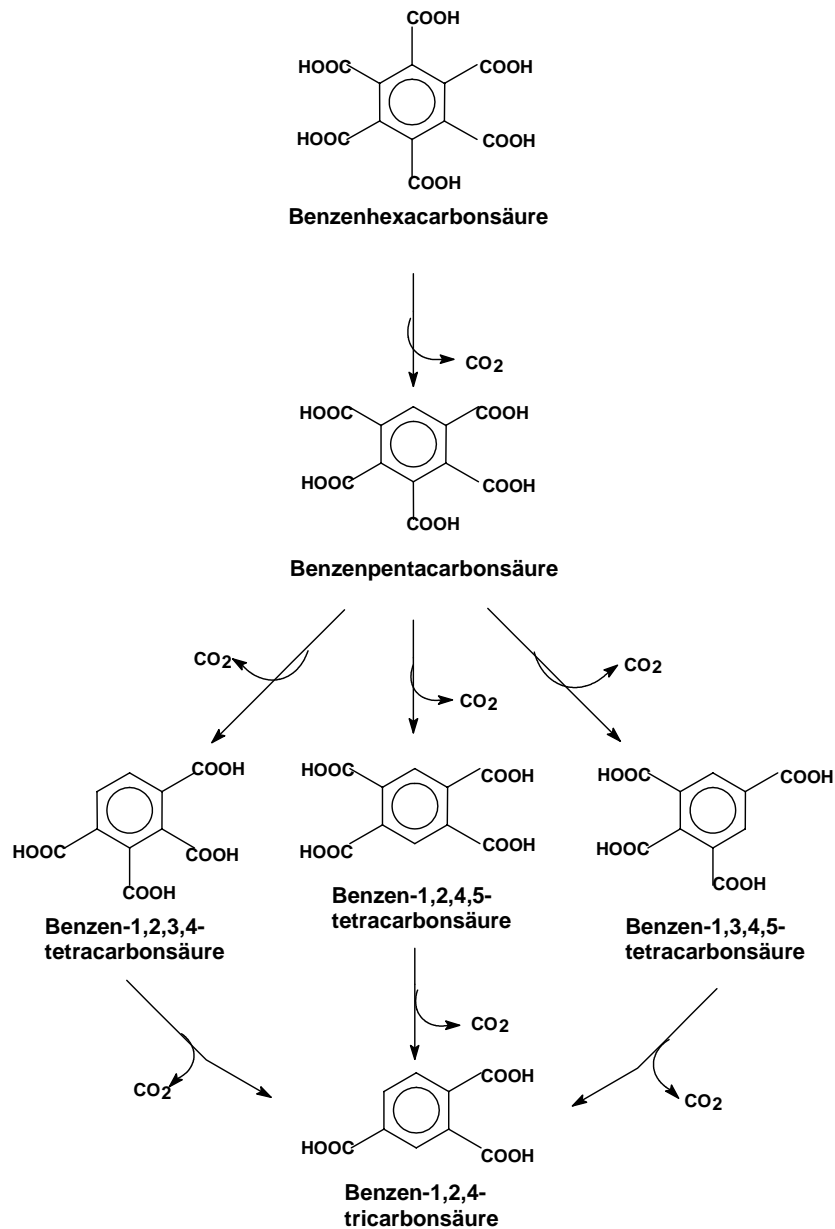


Abb. 1.16: Decarboxylierungsschritte von der Benzenhexacarbonsäure bis zur Benzen-1,2,4-tricarbonsäure. Alle Schritte wurden mittels HPLC nachgewiesen (Lammerich, 1998 und Rudat et al., 2002).

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

In diesem Dissertationsvorhaben sollten Benzenpolycarbonsäure-Decarboxylanten isoliert und die zugehörigen Decarboxylasen untersucht werden. Hierfür war es zwingend erforderlich, Methoden zur Reinigung dieser bislang völlig unbekannt Enzyme zu etablieren. Im einzelnen wurden dabei nachstehende Ziele verfolgt:

- Durch *mikrobiologische* Arbeitsschritte sollten Mikroorganismen isoliert und differenziert werden, welche über das gesuchte Enzym bzw. die gesuchten Enzyme verfügen. Darüber hinaus sollte die Verwertung verschiedener Benzencarbonsäuren (BCS) durch unterschiedliche Mikroorganismen vergleichend untersucht werden. Dabei sollten die interessantesten Stämme näher charakterisiert werden.
- In *biochemischen* Experimenten sollten Methoden entwickelt und angewendet werden, mit deren Hilfe erstmals eine solche BCS-Decarboxylase gereinigt und eindeutig nachgewiesen werden kann. Dabei sollten grundlegende Eigenschaften der isolierten BCS-Decarboxylase erforscht werden. Die enzymatischen Decarboxylierungsschritte zur Einleitung des Abbaus verschiedener BCS sollten mittels hoch auflösender Flüssigchromatographie (HPLC) bzw. anderer Nachweismethoden dokumentiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemische Untersuchungen der Benzencarbonsäuren (BCS)

2.1.1 Wasserlöslichkeit und Acidität

Aus der vorangegangenen Diplomarbeit war bekannt, daß die Benzencarbonsäuren mit Ausnahme der Mellitsäure in protoniertem Zustand nur schlecht wasserlöslich sind (Rudat, 2000). Beim Ansetzen der Stammlösungen für Medien mußte daher stets Natronlauge zugegeben werden, um die Carboxylgruppen quantitativ zu deprotonieren (siehe 2.2). Da der Protonierungszustand der BCS für deren Verwertbarkeit durch die Bakterien wahrscheinlich von Bedeutung ist, wurde die Acidität der Carboxylgruppen mittels Aufnahme von Titrationskurven überprüft

2.1.2 Identifikation der BCS mittels HPLC

Die Aufklärung des Mellitsäure-Abbaus geschah mittels hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC). Um eine sichere Identifikation der einzelnen BCS gewährleisten zu können, erwies sich neben der bisher etablierten Erkennung anhand der Retentionszeiten (Lammerich, 1998) eine zusätzliche Überprüfung mittels Diodenarray-Detektion als hilfreich. Außerdem erforderte die Trennung von BCS-Strukturisomeren eine Modifikation des Laufmittels (Bedingungen der HPLC siehe 2.8).

2.1.3 Infrarot-Spektroskopie (IR)

Die mikrobielle Umsetzung von Huminsäuren, respektive deren enzymatische Decarboxylierung, kann aufgrund ihrer heterogenen Struktur nicht durch einfache Spektralphotometrie vorgenommen werden. Vielmehr sollte ein Nachweis der Modifikation funktioneller Gruppen dieser Makromoleküle durch Infrarotspektroskopie geführt werden.

Vorbereitend wurden zunächst Spektren der Benzencarbonsäuren aufgenommen. Hierzu wurden KBr-Preßlinge aus jeweils 2mg BCS und 200mg KBr hergestellt. Die betreffenden Substanzen sowie das KBr wurden zuvor in einem Achatmörser fein gemahlen und über Nacht im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Nach der Trocknung wurden BCS und KBr zusammengegeben. Zum Vermischen erwies sich ein Vortex-Schüttler als ausreichend, d.h. die Substanzen wurden nicht noch einmal miteinander vermahlen. Dadurch mußten die Proben nicht unmittelbar vor der Messung noch einmal der Luftfeuchtigkeit ausgesetzt werden.

Die zweiminütige Pressung erfolgte unter Vakuum (Schlauchpumpe) bei 8t/cm^2 in einer hydraulischen Presse (Specac 15.011). Die Messung wurde an einem FT-IR-Spektrometer der Fa. Bruker (Tensor 27) durchgeführt (Methode modifiziert nach Günzler und Böck, 1990).

2.2 Screening der Decarboxylanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Mikroorganismen gesucht, die zur Decarboxylierung substituierter Aromaten in der Lage sind. Zu den Screening-Medien wurden daher als einzige Kohlenstoff-(C-)Quelle verschiedene Benzencarbonsäuren (BCS) 0,1-0,4%ig (w/v) gegeben. Diese wurden in Form 10-%iger (w/v) wäßriger Stammlösungen zugegeben, deren pH durch Einwiegen entsprechender Mengen NaOH-Plätzchen auf einen neutralen Wert gebracht wurde, gemäß der Formel:

$$\text{Zugabe von NaOH [g]} = \text{MW(NaOH) [g/mol]} \cdot \text{Anzahl Carboxylgruppen pro jeweiliger BCS} \cdot \text{m(BCS) [g]} / \text{MW(BCS) [g/mol]}$$

[→ Teilt man die einzusetzende Masse m der jeweiligen BCS durch ihr Molekulargewicht MW und multipliziert mit der jeweiligen Anzahl Carboxylgruppen pro BCS, so erhält man die Gesamtzahl an Carboxylgruppen in der angesetzten BCS-Lösung. Zur vollständigen Deprotonierung derselben muß eine äquivalente Menge Hydroxylgruppen (in Form von NaOH) zugegeben werden. Durch Multiplikation dieser Menge mit dem Molekulargewicht MW von NaOH ergibt sich die zuzugebende Masse an Natriumhydroxidplätzchen.]

Bei Verwendung fester Kulturmedien wurde der zur Verfestigung benötigte Agar (Select Agar, Fa. Gibco) gereinigt, um eine Verunreinigung des Mediums mit potentiellen anderen C-Quellen zu minimieren, die zu falsch positiven Screening-Ergebnissen hätten führen können. Hierzu wurde das Agar-Pulver in einem möglichst großen Volumen aqua demin 20-30min aufgerührt. Nach Sedimentation des nun gequollenen Agars wurde der gelbliche Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgenommen. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der Überstand ungefärbt erschien (je nach Reinheitsgrad des eingesetzten Agars 3-5x).

2.2.1 Verwendete Medien

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Nährmedien zum Einsatz gebracht, welche teils auf bereits zuvor bekannten Medien basierten und durch leichte Modifikationen den besonderen Anforderungen angepaßt wurden. Unterschieden werden muß hierbei zwischen Selektivmedien (Minimalmedien) zur Anreicherung der Benzencarbonsäure-Decarboxylanten auf der einen Seite sowie außerdem

Komplexmedien (Vollmedien) zur Vereinzelung derselben und zur Abtrennung von Kontaminanten.

2.2.1.1 Selektivmedien

Zum Decarboxylanten-Screening wurde hauptsächlich folgendes Minimalmedium verwendet:

Medium nach Lammerich/Fakoussa/Rudat (LFR-Medium, modifiziert nach Lammerich, 1998)

Lösung I

KNO ₃	0,489 g/L
KCl	0,593 g/L
MgCl ₂	0,400 g/L
Ca(NO ₃) ₂	0,102 g/L

Lösung II

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,785 g/L
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,186 g/L
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,835 g/L

Lösung III

Vitamin- u. Spurenelementlösung
(Zusammensetzung siehe unten)

Für feste Nährmedien zusätzlich:

gereinigter Agar	20 g/L
------------------	--------

Die Lösungen I und II wurden als zehnfach konzentrierte Stammlösungen angesetzt, durch Zugabe von NaOH-Lsg. jeweils angemessener Konzentration auf pH 7,3 gebracht, getrennt autoklaviert und erst nach Erkalten auf Raumtemperatur zusammengegeben und mit aqua demin auf 1L aufgefüllt (Wasser vorlegen, sonst Ausfällung!).

Als Spurenelement- bzw. Vitaminlösungen wurde eine im Handel erhältliche Vitamin- und Mineralstoff-Tablette (Fa. Tetesept, Typ „classic A-Z >in one<“) gemörsert und aufgelöst (1h Ultraschallbad) und ein Teil dem Medium zugegeben, so daß sich folgende Endkonzentrationen zusätzlicher Elemente und Verbindungen ergaben:

Vitamin A	80,0 µg/L
Beta-Carotin	240,0 µg/L
Vitamin C	6,0 mg/L
Vitamin E	1,0 mg/L
Vitamin B ₁	140,0 µg/L
Vitamin B ₂	160,0 µg/L
Vitamin B ₆	200,0 µg/L

Pantothensäure	600,0 µg/L
Folsäure	20,0 µg/L
Nicotinsäureamid	1,8 mg/L
Biotin	15,0 µg/L
Vitamin B ₁₂	100,0 ng/L
Vitamin D ₃	500,0 ng/L
Vitamin K ₁	8,0 µg/L
Citrus-Bioflavonoide	500,0 µg/L
L-Cystein	900,0 µg/L
Calcium	20,0 mg/L
Magnesium	12,0 mg/L
Kalium	6,0 mg/L
Chrom	6,0 µg/L
Eisen	600,0 µg/L
Kupfer	100,0 µg/L
Mangan	120,0 µg/L
Molybdän	8,0 µg/L
Phosphor	10,3 mg/L
Selen	2,5 µg/L
Silicium	200,0 µg/L
Zink	950,0 µg/L
Chlorid	3,5 mg/L

In der Regel wurde das LFR-Medium zunächst ohne C-Quelle zusammengestellt und die jeweilige BCS erst nach dem Autoklavieren hinzugegeben bzw. im Falle fester Nährmedien mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Nach Bedarf wurde die betreffende BCS aber auch mit einer der LFR-Lösungen mit autoklaviert und so direkt dem Medium zugefügt.

Wegen des auch in Zukunft (d.h. für weiterführende Arbeiten) zu erwartenden großen Umfangs an Screening-Ansätzen wurde als Alternative zum relativ aufwendig herzustellenden LFR-Medium ein denkbar einfaches Minimalmedium entwickelt:

Mineralsalzmedium MMR II

(NH ₄)H ₂ PO ₄	2,300 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,246 g/L
Vitamin- u. Spurenelementlg.	(wie LFR)
KOH (-Plätzchen)	ad pH 7,3

Die gewünschte BCS (pH 7,3 durch Einwiegen von NaOH) kann wahlweise vor oder nach dem (gemeinsamen!) Autoklavieren zugegeben werden.

2.2.1.2 Komplexmedien

Auf den Mineralsalzplatten gewachsene Screening-Ansätze wurden auf verschiedenen Komplexmedien vereinzelt, um eventuelle Kontaminanten ausfindig zu machen. Von dort wurden Einzelkolonien wieder auf LFR-Platten übertragen, bis Reinkulturen von Decarboxylanten vorlagen, die von Kommensalen befreit waren, die lediglich die Ausscheidungsprodukte der Decarboxylanten verwerteten.

Da es sich bei den mit Abstand am häufigsten gefundenen Bakterien um Pseudomonaden-ähnliche handelte, wurde zur Vereinzelnung in erster Linie ein auf Pseudomonaden zugeschnittenes Komplexmedium verwendet:

Pseudomonas-Agar F (PsF), modifiziert nach Merck-Fertignährboden Nr. 10989

Pepton aus Casein	10,0 g/L
Pepton aus Fleisch	10,0 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
Glycerin (87%)	10 mL/L
Agar	15,0 g/L
pH 7,2	

Da einige Bakterien sich als unfähig erwiesen, auf diesem Medium mit relativ hoher Stoffkonzentration zu wachsen, wurde zusätzlich ein verdünntes Komplexmedium entworfen, welches eine Chimäre aus PsF und MMR II darstellt:

Komplexmedium KR

Pepton aus Casein	1,0 g/L
Hefeextrakt	1,0 g/L
Pyromellitsäure	1,0 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,264 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,147 g/L
(Agar	15,0 g/L)
pH 7,2	

Dieses Medium war außerdem bei der Isolierung des Bakterienstammes „Artern“ von großem Nutzen (vgl. 3.2.3). Darüber hinaus wurde festgestellt, daß die lag-Phase bei Animpfung von Flüssigkulturen deutlich kürzer ausfiel als bei Überimpfung von PsF-Platten. Daher wurde dieses Medium fortan bevorzugt verwendet.

2.2.1.3 Weitere Medien

Für die systematische Einordnung des Bakterienstammes „Artern“ wurde ein stickstofffreies Mineralsalzmedium MMR I verwendet, welches bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit entwickelt worden war.

Stickstofffreies Mineralsalzmedium MMR I (Rudat, 2000):

Lösung 1: KCl	0,468g/L
MgSO ₄	0,724g/L
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,091g/L

Lösung 2: KH ₂ PO ₄	1,402g/L
Na ₂ HPO ₄	1,835g/L
Na ₂ MoO ₄	0,010g/L

Lösung 3: FeCl ₂ x 4H ₂ O	0,036g/L
---	----------

Lösung 1 u.2 werden durch Zugabe von NaOH-Lsg. auf pH 7,3 gebracht und getrennt autoklaviert. Nach Erkalten auf Raumtemperatur werden Lösung 3 sowie die Vitamin- und Spurenelementlösung (siehe oben) und die C-Quelle (für den Stamm „Artern“: 0,5% Mannit) zugegeben.

Für die Wachstumsversuche mit dem Stamm „Artern“ kam außerdem Hefeextrakt-Mannitol-Medium zum Einsatz (YEM).

YEM(-Agar), modifiziert nach Norris und Date, 1976:

Mannitol	10,0g/L
K ₂ HPO ₄	0,5g/L
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,8g/L
NaCl	0,2g/L
FeCl ₂ x 4H ₂ O	0,01g/L
Hefeextrakt	1,0g/L
(Agar	15,0g/L)

2.2.2 Screening-Orte und Durchführung des Screenings

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Rudat, 2000) wurde aus zahlreichen mit BCS angereicherten Erdproben bzw. Huminsäure-Lösungen (Lammerich, 1998) eine Decarboxylanten-Stammsammlung angelegt: Es konnten über 60 Bakterien und eine Hefe isoliert werden, welche zum Wachstum mit BCS als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle befähigt waren.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten 22 dieser Stämme in Flüssigkultur mit Pyromellitsäure als einziger C-Quelle zum Wachstum gebracht werden.

Darüber hinaus wurde eine zusätzliche Suche nach Decarboxylanten in einem ehemaligen Braunkohle-Gebiet bei Artern/Thüringen durchgeführt. Auf Klüften in der Braunkohle dieser Region fand sich der Mellit, das Aluminiumsalz der Mellitsäure $[Al_2[C_6(COO)_6] \times 18H_2O]$ als 1-2mm dünner kristalliner Anflug (nach Steinbach, 1982). Nach Schließung des Tagebaus wurde dieser geflutet. Entlang des resultierenden Sees sowie von dessen Grund in Ufernähe wurden Proben genommen und wie oben beschrieben auf LFR-Platten aufgeimpft.

Herr Dr. Thomas Koch aus der Arbeitsgruppe Mikrobiologie / Prof. Dr. Nehkorn an der Universität Bremen stellte uns freundlicherweise seine Stammsammlung aus vier Jahren Huminstoffabbau-Forschung zur Verfügung. Insgesamt waren dies 801 verschiedene Bakterienstämme aus Grundwasserproben, für welche z.T. eine Nutzung von Huminsäuren als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nachgewiesen werden konnte (Koch, 2000). Das Durchscreenen von über 100 dieser Stämme ergab jedoch, daß diese Organismen durchweg extrem niedrige Wachstumsraten selbst auf Komplexmedien zeigten und zu einem Wachstum mit höheren BCS als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nicht in der Lage waren. Diese Ergebnisse sind vermutlich darauf zurückzuführen, daß im nährstoffarmen Grundwasser, aus welchem die Stämme isoliert wurden, überwiegend Organismen der oligotrophen Bakterienfraktion anzutreffen sind. Diesen sind oft Wachstumsraten von mehreren Monaten eigen, so daß eine genauere Untersuchung dieser Stämme bezüglich ihrer Fähigkeit zur Verwertung von BCS im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnte.

2.3 Differenzierung der Decarboxylanten

2.3.1 Photographische Aufnahmen

Einige Bakterienstämme wurden beim Wachstum auf festen Nährmedien mit Hilfe einer Digitalkamera (Canon Powershot G2) photographiert. Mit diesem Modell entstanden auch die Farbaufnahmen des Fermenters sowie der durch Alizarin gelb gefärbten Affinitätsmatrix.

2.3.2 Mikroskopisches Bild

Einige Decarboxylanten wurden lichtmikroskopisch untersucht, um Aussagen über die Zellmorphologie, das Vorhandensein von Zelleinschlüssen, die eventuelle Bildung von

Zellverbänden bzw. -assoziationen sowie über die Beweglichkeit der Zellen machen zu können. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Mikroskop Leica DM LB (Aufsatz: Leica DC 300F); die Bildbearbeitung wurde mit dem Programm PhotoImpact 4.2 durchgeführt

2.3.3 Physiologische und molekulargenetische Differenzierung

Zwei Bakterienstämme („*LFG19a*“ aus der in der Diplomarbeit angelegten Stammsammlung sowie der aus dem gefluteten ehemaligen Braunkohle-Gebiet bei Artern/Thüringen isolierte Stamm (vgl. 2.2.2)) wurden zur näheren Bestimmung von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig untersucht. Im Einzelnen erfolgte eine (Teil-)Sequenzierung der 16S-rDNA, eine Analyse der Fettsäure-Zusammensetzung der Membranen sowie die Erstellung eines Verwertungsprofils für bestimmte Substrate.

Mit dem Stamm „Artern“ wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, die spezifisch für eine Differenzierung von Rhizobien geeignet sind.

2.3.3.1 Wachstum auf YEM-Agar

Eine wichtige Hilfe zur Einteilung der Rhizobien ist das Wachstumsverhalten auf Hefeextrakt-Mannitol- (YEM-) Agar. Schnell wachsende Rhizobien bilden in 3-5 Tagen bis zu 5mm große Kolonien unter Bildung großer Mengen extrazellulären Polysaccharidschleims. Damit einher geht die Produktion von Säure (Kuykendall et al., 2005). Diese Arten werden in den Gattungen *Rhizobium*, *Allorhizobium* und *Sinorhizobium* zusammengefaßt. Auch die nahe verwandten *Agrobacterium*-Arten bilden auf YEM-Agar Polysaccharidschleim und Säure.

Hingegen zeigen die langsam wachsenden Rhizobien, die in der Gattung *Bradyrhizobium* zusammengefaßt werden, erst nach 5-7 Tagen auf YEM-Agar 1-2mm kleine Kolonien ohne Schleimproduktion sowie alkalische Endprodukte (Elkan und Bunn, 1992). Diese Eigenschaften wurden durch Animpfen des Stammes „Artern“ auf mit Bromthymolblau versetzte YEM-Agarplatten getestet.

2.3.3.2 Fixierung von Distickstoff (N₂)

Eine charakteristische Eigenschaft von Rhizobien ist die Fähigkeit zur N₂-Fixierung. Diese wurde durch Animpfen des Stammes „Artern“ in MMR I-Flüssigmedium (vgl. 2.2.1.3) getestet. Als Positivkontrollen wurde ein *Azotobacter*-Stamm im gleichen

Medium angeimpft sowie ein Wachstumsversuch des Stammes „Artern“ in MMR I-Medium mit einem Zusatz von 1g/L NH_4NO_3 durchgeführt.

2.3.3.3 Geißelfärbung

Allen Vertretern der Gattungen *Agrobacterium* und *Rhizobium* ist eine Beweglichkeit über peritriche Begeißelung gemeinsam (Matthysse, 2004). Daher wurde der Stamm „Artern“ einer Geißelfärbung unterzogen (modifiziert nach Leifson, 1960 und Kodaka et al., 1982):

- ✓ Aus einer spät exponentiell/früh stationär wachsenden Flüssigkultur wird ein Mikrozentrifugengefäß befüllt und abzentrifugiert (10min bei 2000 x g).
- ✓ Der Überstand wird dekantiert und das Pellet vorsichtig in Reinstwasser resuspendiert (Gefäß befüllen, 2-3min stehen lassen, anschl. vorsichtig schwenken).
- ✓ Ein kleiner Tropfen der Zellsuspension wird auf einen gründlich entfetteten (Bunsenbrenner) Objektträger gegeben, mit Reinstwasser verdünnt und eintrocknen gelassen (keine Hitzefixierung!).
- ✓ Der eingetrocknete Tropfen wird mit Färbelösung (nach Kodaka, siehe unten) überschichtet.
- ✓ Nach 10min wird die Färbelösung unter einem weichen Leitungswasserstrahl 2-3min abgewaschen.

Geißel-Färbelösung nach Kodaka et al. (1982), zusammengestellt nach Bast, 2001:

Lsg. A (Beizmittel):

Tannin (Gerbsäure)	10g
Phenol (5%)	50mL
gesättigte Alaunlösung (60g/L)	50mL

Lsg. B (Farbstofflösung):

Kristallviolett (13,87g in 96% Ethanol)	10mL
---	------

Lösung A und B mischen. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.

2.4 Anzucht der Decarboxylanten in Flüssigmedien

2.4.1 Anzucht im Schüttelkolben

Die Anzucht der Decarboxylanten erfolgte in zu 40% mit LFR- bzw. MMR II-Medium gefüllten 1000mL-Erlenmeyerkolben, welche sowohl mit Seiten- als auch mit Bodenschikanen ausgestattet waren (insgesamt mind. drei Schikanen), um auch bei dieser großen Füllhöhe eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Die Vorkulturen bestanden aus ebenfalls zu 40% befüllten 250 mL-Erlenmeyerkolben, welche von LFG-Platten aus mit einer Impföse beimpft wurden. Alle Kolben wurden mit Silikonschaumkappen steril verschlossen. Aus der nach ein bis zwei Tagen dicht

bewachsenen Vorkultur ($OD_{600} > 1$) wurden die Hauptkulturen so angeimpft, daß sich eine OD_{600} von mindestens 0,1 ergab. Die OD wurde in einem Novaspec II-Photometer (Pharmacia) gemessen.

Vor- und Hauptkulturen wurden auf einem Rotationsschüttler (Fa. New Brunswick Scientific, Modell G 25) in der Regel bei Raumtemperatur und 240 rpm angezogen.

2.4.2 Anzucht im Kleinfermenter

Zur Gewinnung von mehr Zellmasse erfolgte die Anzucht z.T. in einem improvisierten Kleinfermenter. Der Fermenter wurde zu 2,7L mit LFG-Medium, C-Quelle (0,3% w/v) und 300mL Vorkultur beschickt. Die Belüftung erfolgte über zwei Aquariumspumpen, welche durch sterilisierte Watte gefilterte Luft über einen perforierten Schlauch in den Fermenter pumpten, wo die Luft durch einen Magnetrührer verteilt wurde, welcher parallel für eine Durchmischung des Mediums sorgte. Die Luft wurde zuvor durch eine Waschflasche geleitet und dadurch angefeuchtet, um einem Flüssigkeitsverlust des Fermenters entgegenzuwirken.

Der Fermentationsverlauf wurde anhand der optischen Dichte (OD_{600}) sowie des pH-Wertes (Wachstum mit Glucose geht einher mit einer Ansäuerung des Mediums, ein Aufbrauchen der Pyromellitsäure bewirkt eine Alkalisierung) verfolgt. Die OD_{600} wurde mit einem Photometer (Fa. Pharmacia Biotech, Typ Novaspec II) gegen Luft gemessen, wobei ab einer $OD_{600} > 0,3$ mit aqua demin verdünnt wurde.

2.5 Zellernte, Zellaufschluß und Zentrifugationsschritte

2.5.1 Zellernte

Das Wachstum im Schüttelkolben wurde in der Regel nicht photometrisch verfolgt; die Kolben wurden je nach Schnelligkeit des Wachstums 36-72h nach dem Animpfen geerntet.

Der Kolben- bzw. Fermenterinhalt wurde in einer Sorvall-RC 2B Superspeed 30min bei $13.700 \times g$ und $4^{\circ}C$ abzentrifugiert und der Kulturüberstand nach Überprüfung auf (extrazelluläre) Decarboxylase-Aktivität verworfen. Die Sedimente wurden einmal mit Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 7,5) gewaschen, d.h. suspendiert und erneut abzentrifugiert (wie oben), um noch vorhandene Mediumreste zu entfernen. Die nun gewaschenen Sedimente wurden möglichst direkt im Anschluß wie unten beschrieben aufgeschlossen, um eine Induktion oder Reprimierung bzw. proteolytischen Verdau von Enzymen zu verhindern.

2.5.2 Zellaufschluß

Die gewaschenen Zellen (vgl. 2.5.1) wurden in dreifachem Volumen Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 7,5) suspendiert. Anschließend wurden die Zellen mechanisch durch Ultraschall aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte mit einem Branson Sonifier, Modell Cell Disruptor B15 (Einstellungen: Leistungsstufe 7, Arbeitsweise 50 %, gepulst). Um den Schallgeber (Metallstab) effektiv einzusetzen, wurden jeweils nur 6-8 mL Zellsuspension auf einmal in einem Kunststoffröhrchen (in Eis gekühlt) beschallt, dessen Durchmesser den des Metallstabes nur wenig überstieg. Pro Milliliter Zellsuspension wurde eine Minute beschallt, wobei auf je 10s Beschallungszeit 10s Kühlpause folgte.

Die zertrümmerten Zellwände sowie evtl. nicht aufgeschlossene Zellen wurden in einer Biofuge RS 28 (Heraeus Sepatech) durch 30min Zentrifugation bei 22.800x g und 4°C abgetrennt.

2.5.3 Ultrazentrifugation

Die oben erhaltenen Rohextrakte enthielten neben anderen Zellbestandteilen das gesamte für das Wachstum in LFR-Medium benötigte Proteom der betreffenden Organismen. Dieses wurde mittels Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge der Fa. Beckmann, Modell L5-50; 2h Zentrifugation bei 105.000x g u. 4 °C) in zwei Fraktionen unterteilt, zum einen die membranständige, welche mit den Zellmembranen abzentrifugiert wurde, zum anderen die lösliche, welche im Überstand verblieb. Die Sedimente wurden nach (negativer) Überprüfung auf Decarboxylase-Aktivität verworfen. Die die gesamte Decarboxylase-Aktivität enthaltenden Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.6 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Überstände der Ultrazentrifugation wie auch aller anderen Proben erfolgte zunächst photometrisch an einem Spektralphotometer Cary 1E der Fa. Varian gemäß folgender Formel (nach Warburg und Christian, 1941):

$$(1,55 \times E_{280}) - (0,76 \times E_{260}) = c(\text{Protein}) \text{ [mg/mL]}$$

Die zu messenden Proben wurden jeweils so stark verdünnt, daß der gemessene Extinktionswert sich zwischen 0,1 und 1 bewegte. Diese Methode erwies sich als sehr gut geeignet zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen bis zu $c(\text{Prot}) \geq 10\mu\text{g/mL}$ (bewiesen durch Messung entsprechender BSA-Standards).

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) mit Hilfe des „Standard-Assays“ der Firma Biorad erwies sich als nicht genauer als die wesentlich einfachere Bestimmungsmethode nach Warburg und Christian. Lediglich zur Vermessung der Proteinfractionen der Liganden-Affinitätschromatographie nach Elution mit Mellitsäure (vgl. 2.13) kam diese Methode zum Einsatz, da die hohe UV-Absorption der Mellitsäure eine Proteinbestimmung anhand der Extinktion bei 280 bzw. 260nm unmöglich machte. Zur exakteren Quantifizierung extrem geringer Proteinkonzentrationen ($<10\mu\text{g/mL}$) wurde eine Bestimmung nach Bradford (1976) mit Hilfe des „Micro-Assays“ der Firma Biorad nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Eichstandard diente gelöstes Rinderserumalbumin (BSA) der Firma Pierce.

2.7 Photometrische Bestimmung der Decarboxylase-Aktivität

Wie alle Aromaten, so absorbieren auch die BCS Licht im UV-Bereich, so daß sich für jede dieser Substanzen ein charakteristisches UV-Spektrum ergibt (Krause, 2000). Die Umwandlung einer höheren BCS in eine niedrigere durch Decarboxylierung läßt sich durch spektralphotometrisches Verfolgen der Änderung des Spektrums entsprechender BCS-Lösungen, welche mit BCS-Decarboxylase versetzt wurden, qualitativ und quantitativ nachweisen (Lammerich, 1998; Krause, 2000).

Alle diesbezüglichen Untersuchungen erfolgten mit Hilfe des Spektralphotometers „CARY 1E“ der Fa. Varian (Australien).

2.7.1 Definition und Nachweis enzymatischer Aktivitäten

Unter Enzymaktivität versteht man den enzymatisch katalysierten Substratumsatz pro Zeit. Als Einheit ist die „unit“ (U) gebräuchlich; dieser Begriff bezeichnet diejenige Enzymaktivität, welche die Umsetzung von $1\mu\text{mol}$ Substrat pro Minute katalysiert.

Wenn sich das Absorptionsspektrum des Produktes einer Reaktion von dem des Eduktes deutlich unterscheidet, läßt sich die Konzentrationsänderung einer Substanz mit Hilfe

eines Photometers anhand der Zu- oder Abnahme der Absorption des Reaktionsansatzes bei einer charakteristischen Wellenlänge bestimmen.

Das *Lambert-Beersche Gesetz* beschreibt die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration der absorbierenden Substanz:

$$A = \log I/I_0 = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

- A Absorption
- I_0 Intensität des in die Probenlösung eintretenden Lichtes
- I Intensität des nach Durchlaufen der Probenlösung austretenden Lichtstrahls
- ε Absorptionskoeffizient der absorbierenden Substanz [$\text{mL} \times (\mu\text{mol} \times \text{cm})^{-1}$ bzw. $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$]
- c Konzentration der absorbierenden Substanz [$\mu\text{mol}/\text{mL}$]
- d Schichtdicke der Küvette (im UV-Bereich: Quarz-Küvette, sonst Glas oder Plastik) [cm]

Zur praktischen Anwendung photometrischer Enzymtests wurde die Gleichung in folgender Form verwendet (nach Bergmeyer, 1970):

$$\text{Volumenaktivität (i. d. Probe)} = \Delta c / \Delta t = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{1000 \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \quad [\text{mU}/\text{mL}]$$

- t bzw. Δt (Reaktions-)Zeit [min]
- V Volumen des Testansatzes [μL]
- v Probenvolumen im Testansatz (= Enzymprobe) [μL]

2.7.2 Test auf Benzenhexacarbonsäure-Decarboxylase (nach Lammerich, modifiziert nach Krause und Fakoussa)

Benzenhexacarbonsäure wird bei Abspaltung nur einer Carboxylgruppe zu Benzenpentacarbonsäure decarboxyliert. Bei gleichzeitiger Abspaltung zweier Carboxylgruppen bzw. einer unmittelbar folgenden einfachen Decarboxylierung der Benzenpentacarbonsäure ist die Bildung dreier verschiedener Benzentetracarbonsäuren denkbar (vgl. Abb. 1.16).

Von diesen vier verschiedenen oben aufgeführten Decarboxylierungsprodukten war zunächst nur eines, nämlich die Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) im Handel erhältlich. Beim Vergleich der UV-Spektren dieser beiden Substanzen (Abb. 2.1a) fällt eine deutlich niedrigere Absorption der Pyromellitsäure gegenüber der Mellitsäure im Bereich von 220-250 nm auf.

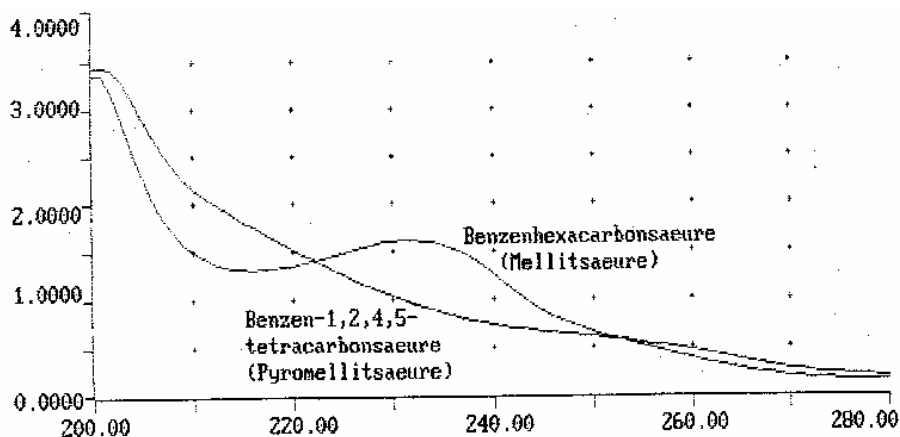


Abb. 2.1a: UV-Spektren von Mellitsäure und Pyromellitsäure in Kaliumphosphatpuffer [50mM]. Aufgetragen sind die Extinktionseinheiten (Ordinate) gegen die Wellenlänge (Abszisse).

Bei einer direkten Decarboxylierung der Mellitsäure zu Pyromellitsäure müßte sich also eine Abnahme der Absorption in diesem Bereich beobachten lassen.

Dieses Phänomen trat bei ausnahmslos jedem daraufhin untersuchten Stamm auf; nach Zugabe von Rohextrakt eines auf Mellitsäure gezogenen Stammes zu einer verdünnten Mellitsäurelösung verschob sich das UV-Spektrum in diesem Bereich nach unten (Abb. 2.1b). Die ebenfalls zu erwartende Zunahme unterhalb von 220nm war nicht zu beobachten, da aufgrund der hohen zuzugebenden Proteinmenge die Absorption der Peptidbindungen in diesem Bereich die Absorption der Mellit- bzw. Pyromellitsäure überlagerte (vgl. hierzu auch 3.16).

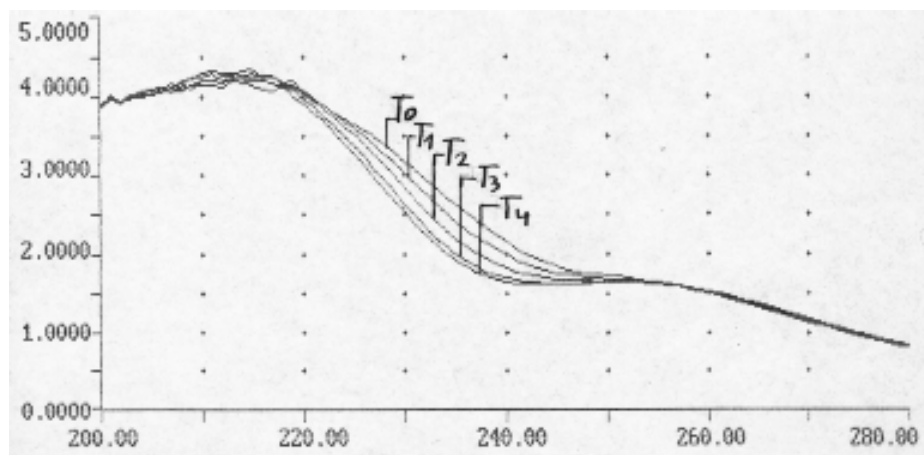


Abb. 2.1b: UV-Spektren einer verdünnten Mellitsäurelösung, zu welcher Rohextrakt eines Decarboxylanten (Stamm E.1, Lammerich, 1998) gegeben wurde (Rudat, 2000). (20µL Mellitsäure 0,1 %ig, 20µL Rohextrakt aus E.1, 960µL Kaliumphosphatpuffer) Die Aufnahme der Spektren erfolgte alle 10min (T₀ → Zugabe des Rohextraktes)

Die stärkste Abnahme erfolgt bei 235nm. Durch Messung der Absorptionsabnahme pro Zeiteinheit kann die Enzymaktivität der Probe berechnet werden (Formel siehe 2.7.1 ; Absorptionskoeffizient der Mellitsäure $\epsilon_{235\text{nm}}$ [Mellitsäure] = 21,4cm²/µmol, nach Lammerich, 1998).

Die Enzymtests wurden in 50mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 durchgeführt.

Enzymtestansatz (nach Lammerich, 1998):

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumen [μL]</u>	<u>c_{End} [mM]</u>
Phosphatpuffer (50mM, pH 7,5)	970 - 990	50
Mellitsäure (0,1 % w/v)	10	0,03
Enzymlösung	1 - 20	nicht bestimmbar

2.7.3 Test auf Pyromellitsäure-Decarboxylaseaktivität (nach Rudat, 2000)

Pyromellitsäure kann infolge ihrer symmetrischen Struktur bei einfacher Decarboxylierung ausschließlich in Benzen-1,2,4-tricarbonsäure umgewandelt werden. Ein Vergleich der UV-Spektren dieser beiden BCS (Abb. 2.2) ergibt, daß eine entsprechende Reaktion eine Abnahme der Absorption um 225nm nach sich ziehen müßte.

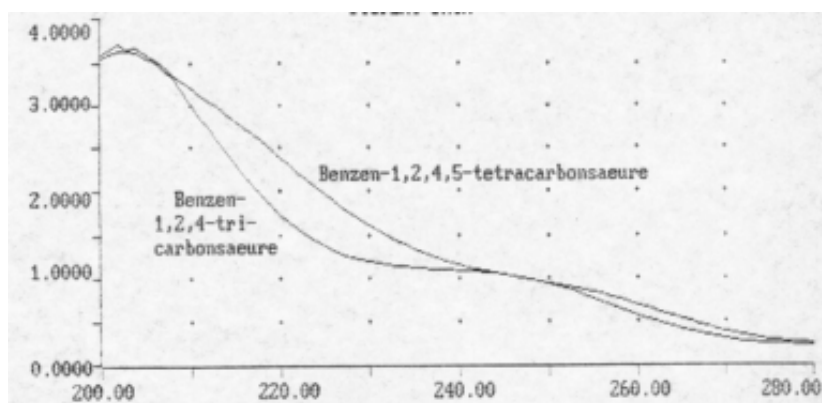


Abb. 2.2: UV-Spektren von Benzen-1,2,4,5-tetra- sowie Benzen-1,2,4-tricarbonsäure

Diese Überlegung wurde durch entsprechende Tests mit Rohextrakten auf Pyromellitsäure angezogener Organismen bestätigt.

Daher wurde der Extinktionskoeffizient der Pyromellitsäure für diese Wellenlänge ermittelt ($\epsilon_{225\text{nm}} = 20,9\text{cm}^2/\mu\text{mol}$; Rudat, 2000) und der Enzymtest wie unter 2.7.2 für Mellitsäure beschrieben durchgeführt.

2.7.4 Test auf Benzenpentacarbonsäure-Decarboxylaseaktivität (diese Arbeit)

Benzenpentacarbonsäure wird bei einfacher Decarboxylierung in eines der drei möglichen Benzentetracarbonsäure-Isomere umgewandelt. Von diesen war jedoch nur eines, nämlich die Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) kommerziell erhältlich. Diese beiden BCS zeigen unterschiedliche UV-Spektren (Abb. 2.3a), welche

im Falle einer Decarboxylierung, wie sie oben beschrieben wurde, eine Abnahme der Absorption im Bereich von 220-240nm sowie eine leichte Zunahme über 210nm erwarten lassen.

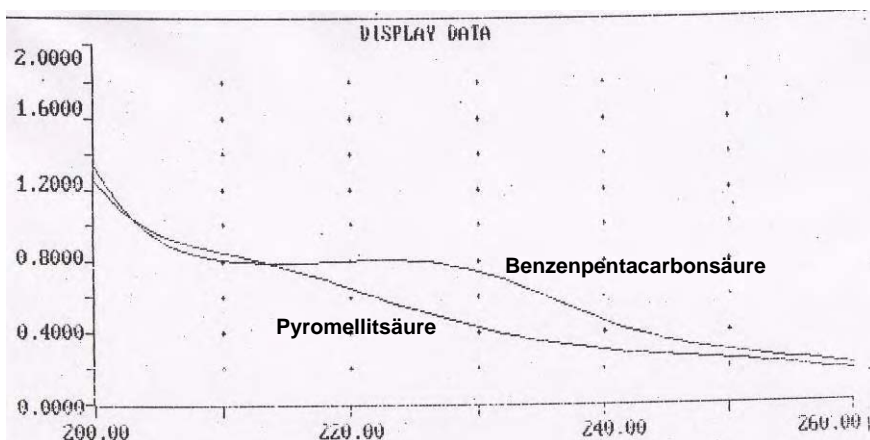


Abb. 2.3a: UV-Spektren von Benzenpentacarbonsäure und Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) in Kaliumphosphatpuffer [50mM]. Aufgetragen sind die Extinktionseinheiten (Ordinate) gegen die Wellenlänge (Abszisse).

Für den *Paracoccus*-Stamm E.1 (interne Stammbezeichnung) wurde diese Decarboxylase-Aktivität mittels hochauflösender Flüssigchromatographie postuliert (Lammerich, 1998) und nachgewiesen (Rudat, 2000). Ein Rohextrakt dieses Stammes, erhalten aus der im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführten Fermentation (Rudat, 2000), wurde daher zu einer verdünnten Benzenpentacarbonsäurelösung gegeben und die Änderung des UV-Spektrums spektralphotometrisch verfolgt (Abb. 2.3b):

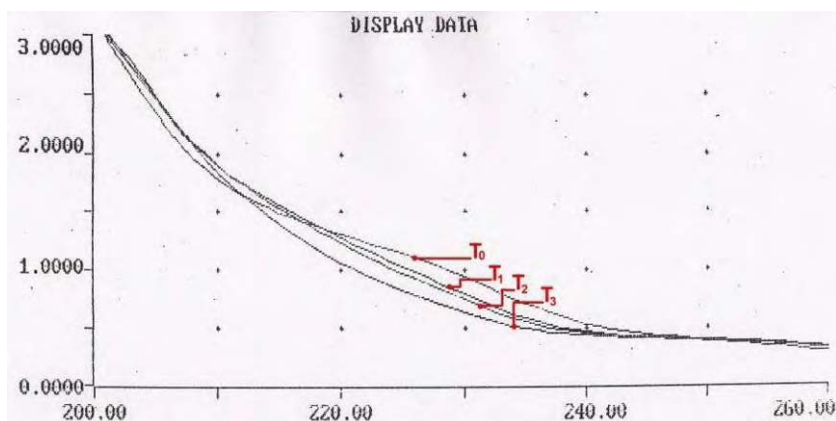


Abb. 2.3b: UV-Spektren einer verdünnten Benzenpentacarbonsäurelösung, zu welcher Rohextrakt des Decarboxylanten E.1 gegeben wurde (20µL Benzenpentacarbonsäure 0,1 % w/v, 20µL durch fraktionierte (NH₄)₂SO₄-Fällung angereicherte Decarboxylase aus E.1, 960µL Kaliumphosphatpuffer). Die Aufnahme der Spektren (T₁-T₃) erfolgte alle 10min (T₀ →Zugabe des Rohextraktes). Deutlich erkennbar ist die starke Abnahme der Absorption im Bereich von 220 - 240nm.

Die postulierten Abnahmen der Absorption im UV-Bereich sind deutlich sichtbar (vgl. auch 3.16). Aus der Messung der Abnahme der Absorption um 230nm kann diese Decarboxylase-Aktivität ermittelt werden. Zur Berechnung ist die vorherige Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten der Benzenpentacarbonsäure bei

dieser Wellenlänge (ϵ_{230}) erforderlich. Dieser konnte gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz durch Messung der Absorption bei 230nm verschieden stark konzentrierter Lösungen dieser BCS bei dieser Wellenlänge ermittelt werden (siehe Abb. 2.4).

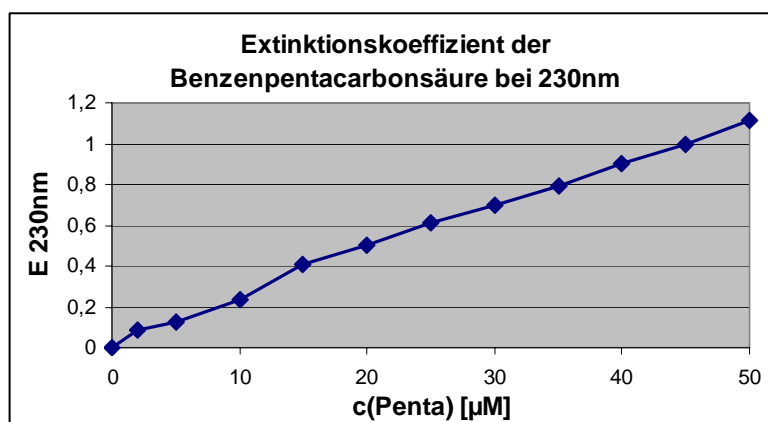


Abb. 2.4: Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten der Benzenpentacarbonsäure (=Penta) in Kaliumphosphatpuffer (50mM) bei 230nm ($\rightarrow \epsilon_{230}$). Die Einzelpunkte stellen Mittelwerte von Dreifachbestimmungen dar.

Die Steigung der Geraden ($\Delta E/\Delta c$) in Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 7,5) betrug 0,0234 L/ μ mol, der Absorptionskoeffizient der Benzenpentacarbonsäure beträgt daher: $\epsilon_{230} = 23,4 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$. Mit Hilfe dieses Absorptionskoeffizienten konnten die Aktivitäten der BCS- Decarboxylasen für Benzenpentacarbonsäure ermittelt und mit denen für Mellit- und Pyromellitsäure verglichen werden.

2.8 Hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC)

2.8.1 Identifikation von Zwischenprodukten der BCS-Decarboxylierung

In den vorhergehenden Arbeiten zum Thema Benzenpolycarbonsäure-Decarboxylasen (Lammerich, 1998; Krause, 2000) wurde das Einleiten des Abbaus von Mellitsäure durch Decarboxylierung anhand der Identifikation auftretender Decarboxylierungsprodukte mittels HPLC verfolgt. Die Methodik hierzu wurde von Dr. K. Henning entwickelt (persönliche Mitteilung) und von H.-P. Lammerich (1998) modifiziert. Hierdurch konnte für die in der Arbeitsgruppe Fakoussa isolierten Stämme *Alcaligenes piechaudii* („X.93“) und *Paracoccus spec.* („E.1“) eine Decarboxylierung der Mellitsäure zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure nachgewiesen werden, welche bei dem Stamm E.1 über Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure), bei *A. piechaudii* wahrscheinlich über Benzen-1,2,3,4-tetracarbonsäure verläuft. In beiden Fällen trat bei der Decarboxylierung der Mellitsäure zur jeweiligen Benzentetracarbonsäure ein Zwischenprodukt auf, welches in der dieser Dissertation vorangegangenen Diplomarbeit als Benzenpentacarbonsäure identifiziert wurde.

2.8.2 Bedingungen der HPLC

Geräte:	HPLC von Merck mit DAD L 4500, Interface D 6000, Pumpe L 6200, Autosampler AS 2000A und D-7000
Software:	HPLC-Manager von Merck für Windos NT
mobile Phase:	Phosphorsäure 0,05% (w/v)
Wellenlänge:	235nm
Säule:	LiChrospher 100 CN (Säulendimensionen: 125mm, I.D.: 4mm; Korngröße 5µm, Fa. Merck, Darmstadt), mit dazu gehöriger Vorsäule (gleiches Material wie Trennsäule) Fa. Merck, Darmstadt
Flußrate:	1mL/min

Für einige Anwendungen wurde das Laufmittel in der Konzentration und damit dem pH-Wert verändert sowie zusätzlich die Einstellung unterschiedlicher Konzentrationen an Methanol erprobt, insbesondere um eine effizientere Trennung der Strukturisomere Benzen-1,2,3- und -1,2,4-tricarbonsäure zu erreichen (vgl. 3.1.2).

Für die Enzymtests wurden 10µL einer 0,01%igen (w/v) Lösung von Benzenpentacarbonsäure in Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 7,5) auf die HPLC-Säule gegeben.

2.9 Anreicherung der Decarboxylasen

Aus den zahlreichen aufgefundenen Decarboxylanten wurden 22 in Schüttelkolben angezogen (wie unter 2.4 beschrieben). Aus diesen sollte ein Stamm ausgewählt werden, für den eine Induktion seiner Decarboxylase mittels Anzucht mit und ohne BCS als einziger C-Quelle sowie anschließender Protein-Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte.

Da die Decarboxylase nur eines unter über tausend Proteinen im Rohextrakt des Decarboxylanten ist, muß für den gelelektrophoretischen Nachweis eine erhebliche Anreicherung dieses Proteins erfolgen (auch wenn zunächst anzunehmen war, daß die Decarboxylase sehr stark exprimiert wird, da ohne diese die einzige im Medium vorhandene Kohlenstoff- und Energiequelle für den Organismus nicht zugänglich ist).

2.9.1 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Zur Anreicherung der Decarboxylasen aus den Rohextrakten wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt (Green und Hughes, 1955). Dabei fallen die im Rohextrakt enthaltenen Proteine je nach dem Grad ihrer Hydrophilie (d.h. nach Anzahl ihrer geladenen bzw. polaren Aminosäuren) bei einer unterschiedlich hohen Sättigung an zugegebenem Salz aus, wobei Ammoniumsulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ aufgrund seiner sehr geringen chaotropen, auf die meisten Proteine sogar stabilisierenden Wirkung das Fällungs-Agens der Wahl ist (Lottspeich u. Zorbas, 1998). Durch diese Fraktionierung nach Hydrophilie läßt sich auch eine Aussage über das Löslichkeitsverhalten der Decarboxylase machen; dieses kann für einen möglichen technischen Einsatz des Enzyms zur Decarboxylierung partiell hydrophober Huminsäuren von entscheidender Bedeutung sein.

Die Zugabe des Ammoniumsulfates erfolgte in Form einer gesättigten Lösung (nach W.I. Wood, 1976) sehr langsam unter ständigem Rühren auf Eis. Nach Erreichen einer bestimmten Sättigungsstufe wurde die (durch Proteinausfällung trübe) Lösung bei $17.540 \times g$ für 30min bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und auf seine Decarboxylase-Aktivität hin untersucht. Das Sediment wurde in einem geringen Volumen Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 7,5) aufgenommen und ebenfalls bezüglich seiner Aktivität vermessen. Befand sich die größte spezifische Aktivität im Überstand, so wurde dieser durch weitere Zugabe von Ammoniumsulfat auf die nächste Sättigungsstufe gebracht, bis sich die Hauptaktivität letztlich im Sediment befand.

2.9.2 Ultrafiltration (UF)

2.9.2.1 UF zur Abschätzung des Molekulargewichtes

Als weiterer Anreicherungsschritt sowie zur Abschätzung der Molekulargewichte der in den Rohextrakten enthaltenen Decarboxylasen wurden die Rohextrakte bzw. die die gesamte Decarboxylase-Aktivität enthaltenden (resuspendierten) Sedimente der Ammoniumsulfatfällung ultrafiltriert. Dieser Schritt erfolgte mit einer Ultrafiltrations-(UF-)Einheit der Fa. Amicon, Witten (Modell 8010) sowie Diaflo-Membranen der Porengrößen 100kDa (YM 100) und 300kDa (XM 300), welche nach Angaben des Herstellers vorbereitet wurden. Zur Filtration wurde die UF-Einheit mit Argon unter

1kp/cm² Überdruck gesetzt. Retentat und Filtrat wurden wie oben beschrieben auf Decarboxylase-Aktivität untersucht.

2.9.2.2 UF für Einengung/Pufferwechsel

Zur Einengung von Proteinextrakten sowie zur Entsalzung wie auch zum Pufferwechsel wurden die betreffenden Fraktionen durch UF-Röhrchen der Firma Millipore (Ausschlußgröße 30kDa) zentrifugiert, nachdem sich ähnliche Röhrchen der Firma Vivascience als ungeeignet erwiesen hatten. Letztere enthielten eine UF-Membran aus Polyethersulfon, die schnell verstopfte und außerdem Decarboxylase-Aktivität adsorbierten. Erstere besaßen eine Cellulose-Membran, die sich durch Filtration von 0,1M NaOH regenerieren ließ.

2.10 Klassische Reinigungsmethoden zur Reinigung einer Mellitsäure-Decarboxylase

Zur Reinigung der Mellitsäure-Decarboxylasen wurden vorab verschiedene Chromatographie-Materialien im Batch-Ansatz getestet (modifiziert nach Roe, 1995 sowie Preneta, 1995).

2.10.1 Ionenaustausch-Chromatographie (IAC)

Zunächst wurden verschiedene Ionentauscherharze auf ihre Eignung zur Anreicherung der Decarboxylasen mittels IAC überprüft. Hierbei sollte neben dem „klassischen“ Mechanismus der Anbindung an das Harz aufgrund der unterschiedlichen Nettoladung noch ein weiterer Effekt zum Tragen kommen: Da viele schwache Kationentauscher als funktionelle Gruppe eine Carboxylgruppe tragen, bestand die Hoffnung, einen zusätzlichen spezifischen Bindungseffekt über die Affinität des aktiven Zentrums der Decarboxylasen zu erhalten.

Folgende Materialien kamen zum Einsatz:

Anionentauscher

Schwache Anionentauscher: DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia)
Fractogel DMD 650 (Merck)
Ecteola 23 (Serva)

Starke Anionentauscher: Dowex 2x8
Dowex 1x4
Dowex 1x2
Biorex (Biorad)

Kationentauscher

Schwache Kationentauscher: CM-Sephadex (Pharmacia)
Amberlite IRC-50 (Supelco)

Starke Kationentauscher: Biorad AG MP-50 (Biorad)

Alle Harze wurden in Mengen von 1-2g in Reagenzgläser gegeben und mehrfach gewaschen, die Anionentauscher mit Tris/HCl-Puffer (50mM, pH 8,0), die Kationentauscher mit Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 6,0), bis der pH-Wert im Reagenzglas dem des zugegebenen Puffers entsprach (bis zu 10 Waschungen nötig).

Nach dem Equilibrieren wurden 500µL der aufgequollenen Materialien in Mikrozentrifugengefäße („Eppis“) überführt.

Anschließend wurden je 100µL Decarboxylase-Lösung (bekannter Protein- und Aktivitätskonzentration) zugegeben und durch „Schnippen“ mit dem Chromatographie-Material vermischt. Nach 30min wurde kurz anzentrifugiert und die Proteinkonzentration sowie die Decarboxylase-Aktivität im Überstand vermessen.

2.10.2 Weitere Chromatographie-Methoden

Als weitere chromatographische Trennverfahren wurden die Molekularsieb-chromatographie (**Gelpermeationschromatographie**, GPC) sowie die **Hydrophobe Interaktions-Chromatographie** (HIC) angewendet.

Für die GPC kamen die Sephadex-Materialien der Größe G50, G100 und G200 zum Einsatz, die zunächst in Wasser aufgequollen und dann mit Phosphatpuffer 50mM pH 7,5 äquilibriert wurden. Auch hier wurden zunächst Bindungsversuche im Batch-Ansatz in Mikrozentrifugengefäßen durchgeführt (vgl. 2.10.1). Mit dem geeignetsten Material G200 wurden Mini-Säulen (auf Basis von Pasteurpipetten) gegossen.

Als lipophile Materialien wurden Sephadex lipophilic und Sephadex LH-60 im Batch-Verfahren erprobt.

2.11 Entwicklung einer Liganden-Affinitätschromatographie

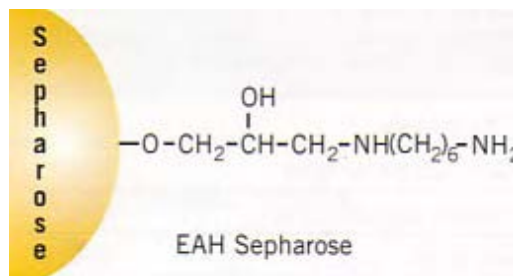
Da die Versuche, eine Mellitsäure-Decarboxylase mit klassischen Chromatographie-Methoden aufzureinigen, nicht zum gewünschten Erfolg führten, wurde als Alternative mit der Entwicklung einer Methode zur Liganden-Affinitätschromatographie (LAC) begonnen.

2.11.1 Auswahl eines geeigneten Liganden

Als Ligand für die LAC wurde Mellitsäure ausgewählt, da auch nach der Kopplung über eine der Carboxylgruppen noch fünf weitere für die Erkennung als Substrat durch die Decarboxylase zur Verfügung stehen. Dies sollte eine hinreichend effiziente Bindung des Enzyms an das Säulenmaterial gewährleisten.

2.11.2 Auswahl einer geeigneten Matrix

Nach anfänglichen Überlegungen, die Mellitsäure als Ester an eine hydroxylierte Matrix zu koppeln, wurde uns empfohlen, stattdessen eine stabilere Peptidbindung zu knüpfen (Engelhardt, persönliche Mitteilung). Als Matrixmaterial bot sich hier die EAH-Sepharose 4B an, welche an einem elf-atomigen Spacer eine Aminogruppe trägt.



©AmershamPharmacia 2002

Abb. 2.5: Die vorderivatisierte Matrix EAH-Sepharose™4B.

2.11.3 Kopplungsbedingungen/Vorversuche zur Kopplung von Ligand und Matrix

Die Kopplung eines carboxylierten Liganden an eine Aminogruppe erfordert dessen vorherige Aktivierung mit Hilfe eines Carbodiimids der allgemeinen Struktur R—N=C=N—R' . Häufig verwendete Carbodiimide sind in Abb. 2.6 gezeigt.

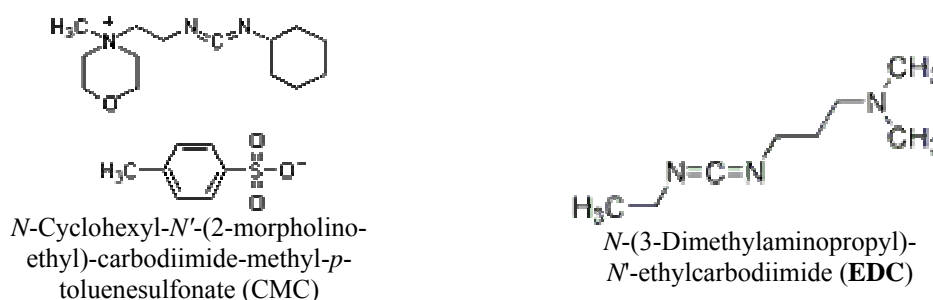


Abb. 2.6: Häufig zur Knüpfung von Peptidbindungen verwendete Carbodiimide

Um das Matrixmaterial besser kennen zu lernen sowie die Kopplungsbedingungen abschätzen zu können, wurde zunächst die Kopplung mehrerer carboxylierter Farbstoffe (vgl. Abb. 2.7) an das Matrixmaterial versucht (Fakoussa, persönliche Mitteilung).

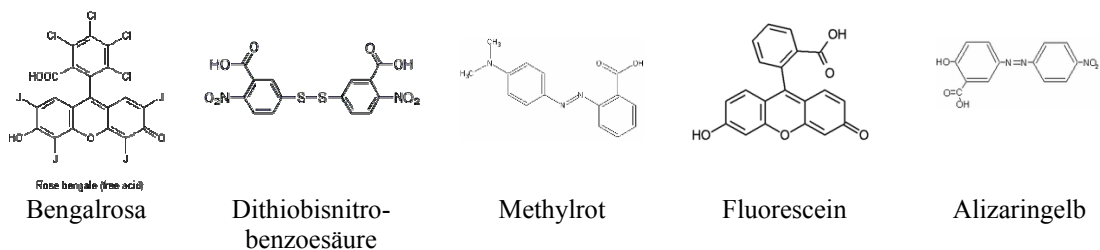


Abb. 2.7: Carboxylierte Farbstoffe, mit deren Hilfe das Resultat einer Änderung der Kopplungsbedingungen „mit bloßem Auge“ verfolgt werden und somit deren Optimierung erheblich vereinfacht werden konnte.

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an Ligand und Carbodiimid eingesetzt und die Kopplung bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Außerdem wurde die Kopplungsdauer variiert (siehe Ergebnisteil).

Die anschließende Waschung der Matrix erfolgte abwechselnd mit je 5x 100mM Essigsäure/Acetat pH 4,0 incl. 0,5mM NaCl und 100mM Tris/HCl pH 8,5 incl. 0,5mM NaCl. Die Waschpufferreste wurden durch dreimaliges Waschen mit Reinstwasser entfernt.

2.12 Untersuchung des Erfolges der Kopplung von Mellitsäure

2.12.1 Infrarotspektroskopische Untersuchungen

Zur Überprüfung der Kopplung von Mellitsäure an die Sepharose-Matrix wurden IR-Spektren von derivatisierter und nicht derivatisierter EAH Sepharose 4B aufgenommen. Da diese vor der Kopplung weder Carboxylgruppen noch C-C-Doppelbindungen enthält, sollte durch Auftreten der zugehörigen charakteristischen Banden eine Identifikation der gebundenen Mellitsäure möglich sein.

Hierzu wurde die Sepharose jeweils vor und nach der Kopplung mit Mellitsäure mittels Gefriertrocknung von Wasser befreit und ein KBr-Preßling hergestellt (Details siehe 2.1.3).

2.12.2 UV-spektroskopische Untersuchungen

Wie schon unter 2.7.2 erwähnt, besitzt Mellitsäure ein charakteristisches UV-Spektrum (vgl. Abb. 2.1a). Nach erfolgreicher Kopplung nahm die nun derivatisierte Matrix eben dieses UV-Spektrum an. Über den molaren Extinktionskoeffizienten der Mellitsäure bei 235nm ($\epsilon_{235} = 21,4 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) konnte die Konzentration des gekoppelten Liganden in der Matrix und damit der Kopplungserfolg quantifiziert werden.

Hierzu wurde die derivatisierte Matrix 1:100 in Reinstwasser aufgerührt und im Zweistrahlphotometer gegen unbehandelte bzw. ohne Carbodiimid derivatisierte Matrix (Negativkontrolle) vermessen.

2.13 Präparation einer geeigneten Decarboxylase für die LAC

2.13.1 Auswahl des Decarboxylanten

Für die Reinigung einer Mellitsäure-Decarboxylase wurde der aus einer mit Pyromellitsäure angereicherten Erdprobe isolierte Stamm *LFG19a* ausgesucht. Bei diesem mittlerweile durch die DSMZ als *Sinorhizobium morelense* bestimmten Stamm (welcher allerdings in *Ensifer adhaerens* umbenannt werden muß; Young, 2003 sowie Trüper, persönliche Mitteilung, 2006) handelt es sich um lebhaft bewegliche, z.T. paarig vorliegende strikt aerobe kleine Stäbchen. *LFG19a* zeichnet sich durch ein breites Verwertungsspektrum polycarboxylierter Aromaten aus. Entscheidend für die Auswahl dieses Stammes war sein hervorragendes Wachstum mit Pyromellitsäure (bis OD > 4 im Schüttelkolben) sowie die sehr hohe Grundaktivität der Decarboxylase (bis 10mU/mg Mellitsäure-Decarboxylase-Aktivität im Rohextrakt). Außerdem ließ sich die Decarboxylase-Aktivität durch fraktioniertes Aussalzen mit Ammoniumsulfat um einen Faktor von 5 und mehr anreichern.

2.13.2 Anzucht mit verschiedenen C-Quellen und Induktionsversuche

Der Stamm *LFG19a* wurde in LFR-Medium in Schüttelkolben sowie im Kleinfermenter angezogen (vgl. 2.3). Hierbei wurden verschiedene mehrfach carboxylierte und z.T. hydroxylierte Verbindungen bei der Anzucht als C-Quelle verwendet (Abb. 2.8).

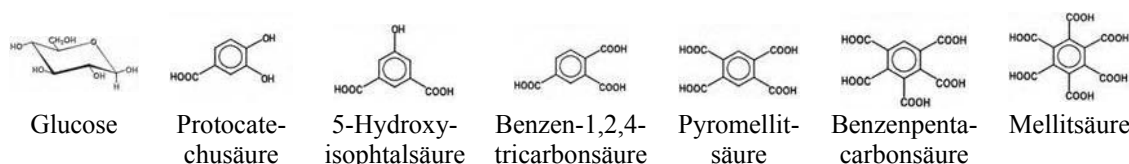


Abb. 2.8: Bei der Anzucht des Stammes *LFG19a* (*S.morelense/E.adhaerens*) verwendete C-Quellen.

Um eine Induzierbarkeit der Mellitsäure-Decarboxylase nachzuweisen, erfolgte zunächst eine Anzucht mit Glucose (Vorkultur); anschließend wurde in sieben Hauptkulturen mit jeweils einer der oben angegebenen C-Quellen überimpft.

Außerdem wurde ein diauxisches Wachstum mit Glucose und Pyromellitsäure im Kleinfermenter durchgeführt (vgl. 2.4.2).

2.13.3 Präparation des Enzyms für die LAC

Zur Vorbereitung auf die LAC wurde der Rohextrakt nach Ultrazentrifugation ausgesalzt (1,8-2,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Die so angereicherte Proteinfraction wurde mittels Ultrafiltration entsalzt (vgl. 2.9.2).

2.13.4 Bestimmung geeigneter Bindungsparameter

Zunächst wurden das pH- und Ionenstärke-Optimum der Mellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a* bestimmt. Hierzu wurde der unter 2.7.2 beschriebene Enzymtest bei pH-Werten von 5,0 bis 8,5 sowie bei Ionenstärken von 500 μ M bis 500mM in Kaliumphosphat-Puffer durchgeführt. Dabei wurde der pH-Wert durch Zusammengeben von Reinstwasserlösungen geeigneter Konzentration von Dikaliumhydrogen- und Kaliumdihydrogenphosphat hergestellt (d.h. keine Einstellung des pH-Wertes durch Säure bzw. Lauge, dadurch Vermeidung der Anwesenheit unerwünschter Na⁺/Cl⁻-Ionen).

Beim so bestimmten Aktivitätsoptimum (pH 6,5/50mM) adsorbierte das Enzym gut an die Affinitätsmatrix.

2.13.5 Bestimmung geeigneter Elutionsbedingungen

Die Decarboxylase ließ sich nach Bindung an die Säule durch pH- wie auch Ionenstärkegradienten vollständig von der Säule ablösen: Eine Bindung erfolgte bis 75mM Phosphatpuffer, pH 6,7. Die Elution bei Erhöhung eines der beiden Parameter führt jedoch auch zur Elution unspezifisch gebundenen Proteins, so daß hier nur Reinigungsfaktoren bis knapp 20 erzielt wurden. Eine spezifischere Elution ließ sich durch Zugabe von Mellitsäure zum Elutionspuffer bewirken. Dieser Effekt wurde wiederum verstärkt, indem gleichzeitig pH und Ionenstärke wieder erniedrigt wurden, so daß unspezifisch adsorbiertes Protein noch fester an die Säule gebunden wurde.

Somit ergaben sich folgende Bindungs- und Elutionsbedingungen:

- ✓ Auftrag auf die Säule in 50mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5
- ✓ Waschung mit 10 Säulenvolumina Phosphatpuffer 75mM/pH 6,7
- ✓ Spezifische Elution mit Phosphatpuffer 50mM/pH 6,0 incl. 300 μ M Mellitsäure

2.14 Durchführung der Protein-Gelelektrophorese

2.14.1 Präparation des Polyacrylamidgels (nach Laemmli, 1970)

<u>Trenngelpuffer:</u>	1,5M Tris/HCl, 0,3% SDS, pH 8,8
<u>Sammelgelpuffer:</u>	0,5M Tris/HCl, 0,4% SDS, pH 6,8
<u>5x Elektrophoresepuffer:</u>	15 g Tris, 72g Glycin, 5g SDS ad 1L (Reinstwasser)

Gelzusammensetzung:

Lösung	Trenngel, 10%	Sammelgel, 4,5%
Acrylamid-Lsg.*	4 mL	0,75 mL
Reinstwasser	5 mL	3 mL
Trenngelpuffer	3 mL	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 mL
APS 10%**	100 µL	100 µL
TEMED***	5 µL	5 µL

Tab. 2.1: Zusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeit gegossenen Polyacrylamidgele

*Acrylamidstock: 37,5% Acrylamid : 1%Bisacrylamid (BIO-RAD)

**Ammoniumpersulfatlsg. 10 % (w/v)

***N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

2.14.2 Durchführung der SDS-PAGE

Die Proteinproben wurden nach Verdünnung auf ca. 1mg/mL mit **Probenpuffer** versetzt (Rotiload 2 (ROTH), nicht-reduzierend, 4x konz. 10% SDS, 20% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau in 125mM Tris/HCL, pH 6,8) und 5min gekocht (alternativ: Rotiload 1 mit Mercaptoethanol). Anschließend erfolgte die Beladung der Geltaschen mit ca. 20µg Protein (d.h. ca. 10-30µL Protein/Puffer-Lösung).

Zur Größenabschätzung wurde ein **Molekulargewichtsmarker** (prestained protein ladder 10-180kD, Fa. Fermentas) mit auf das Gel aufgetragen.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde mit einer Mini-Protean-II-Gelkammer (Fa. Bio-Rad) durchgeführt. Als Stromquelle diente das Power Supply 1000/500 der gleichen Firma. Es wurde nun für ca. 15min eine Spannung von 60V angelegt bis die Proben das Trenngel erreicht hatten; anschließend wurde die Spannung auf 100V erhöht und das Gel so lange laufen gelassen, bis die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel hinaus lief (ca. 1h).

2.14.3 Native Proteingelelektrophorese

Für die native PAGE wurden Trenngel-, Elektrophorese- und Probenpuffer *ohne SDS* angesetzt. Ein Sammelgel wurde nicht gegossen, und die Proben wurden vor dem Auftrag nicht gekocht. Die Elektrophorese erfolgte für 3h bei 100V *auf Eis*.

2.14.4 Coomassie-Färbung und Trocknung der Gele

Nach dem Lauf wurden die Gele 2h in einer Lösung des Proteinfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue geschüttelt (20% MeOH, 10% Essigsäure, 0,25% Farbstoff). Anschließend wurde unspezifisch gebundenes Coomassie Blue ausgewaschen (mehrfaches Schütteln in der gleichen Lösung ohne Farbstoff), bis sich definierte Proteinbanden erkennen ließen.

Anschließend wurden die gefärbten Gele in einem Vakuum-Trockner (Aldo Xer Gelrockner, Fa. Schütt, Göttingen) bei 50°C für 45min auf Whatman-Papier getrocknet.

2.14.5 Silberfärbung

Zum Nachweis von Verunreinigungen nach der Liganden-Affinitätschromatographie wurden einige Gele alternativ mit Silber gefärbt (Sensitivität: ca. 100 Picogramm Protein pro Bande gegenüber 100 Nanogramm bei der Coomassie-Färbung). Z.T. wurden bereits mit Coomassie gefärbte Gele mit Silber nachgefärbt.

Lösungen für die Silberfärbungen (alle in Reinstwasser):

- (1) 10% Essigsäure, 20% Methanol
- (2) 30% Ethanol, 0,5% Glutaraldehyd, 0,2% NaS₂O₃, 0,5M Natriumacetat
- (3) 0,1% AgNO₃, 0,01% Formaldehyd
- (4) 2,5%Na₂CO₃, 0,01% Formaldehyd
- (5) 0,05M EDTA (alternativ: Lösung 1)

Färbungsprotokoll (nach Heukeshoven und Dernick, 1988)

- ✓ mind. 1h Fixieren in Lsg. (1) (entfällt bei vorheriger Coomassie-Färbung)
- ✓ mind. 30 min Reduktion mit Lsg. (2)
- ✓ 3x 5-10 min Waschen mit Reinstwasser
- ✓ 15 min Färben mit Lsg. (3)
- ✓ Gel kurz (20 s) wässern mit Reinstwasser
- ✓ 3-15 min Entwickeln mit Lsg. (4)
- ✓ Färbung abstoppen mit Lsg. (5) oder Lsg. (1)

Fixierung, Reduktion und Waschung erfolgten unter Schütteln in einer Plastikwanne.

2.15 Entwicklung einer Aktivitätsfärbung

2.15.1 Nachweis des abgespaltenen CO₂ durch Ausfällung als CaCO₃

Es wurde versucht, eine Aktivitätsfärbung zu entwickeln, bei der die Decarboxylase nach der nativen Gelelektrophorese spezifisch nachgewiesen werden kann. Hierbei wurde zunächst in Angriff genommen, das nach Zugabe von Substrat (Mellitsäure) frei werdende CO₂ bzw. HCO₃⁻ als CaCO₃ nachzuweisen. Hierbei hätte es in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen zu einer lokalen Ausfällung als weiße Bande kommen sollen (nach Nimmo und Nimmo, 1982).

Leider stellte sich heraus, daß Mellitsäure bereits in niedrigen Konzentrationen ($<100\mu\text{M}$) mit Ca^{2+} ausfällt, vermutlich als Calcium-Mellitat $\text{Ca}_3[\text{C}_6(\text{COO})_6]$. Außerdem führte die Zugabe von Ca^{2+} zu einer Hemmung der Decarboxylase-Aktivität (1mM Ca^{2+} senkte die Decarboxylase-Aktivität auf 20%). Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

2.15.2 Nachweis der Änderung des pH-Wertes nach Decarboxylierung

Die zweifache Decarboxylierung von Mellitsäure zu Pyromellitsäure im neutralen pH-Bereich führt zu einer Alkalisierung des umgebenden Mediums (vgl. Abb. 2.9).

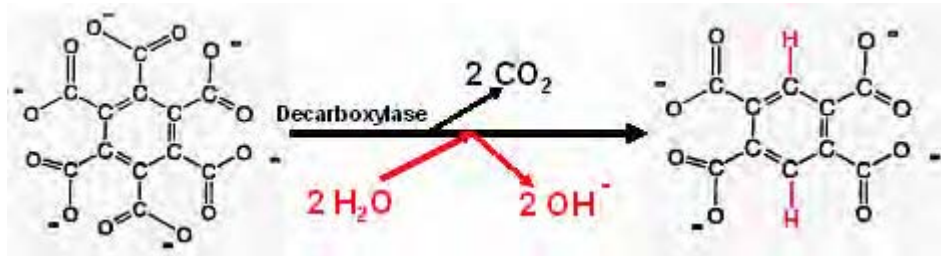
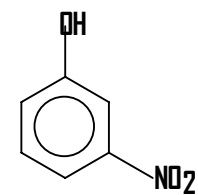


Abb. 2.9: Decarboxylierung von Mellitsäure zu Pyromellitsäure und daraus resultierende Alkalisierung des umgebenden Mediums.

Diese wurde mit Hilfe des pH-Indikators *m*-Nitrophenol nachgewiesen, welcher im Basischen von farblos nach gelb umschlägt. Um die pH-Änderung noch zu forcieren, wurde auf die Pufferung der Reaktion verzichtet bzw. die Pufferung ausschließlich durch das Substrat (10mM Mellitsäure) bewirkt.

Erleichtert wurde der Nachweis durch die Tatsache, daß die entstehende Pyromellitsäure im Gegensatz zu Mellitsäure bei pH-Werten über 6,0 nicht mehr puffert, d.h. die lokale Alkalisierung wird noch verstärkt durch eine lokale Schwächung des Puffersystems (vgl. Titrationskurven unter 3.1.1).



m-Nitrophenol

Reagenzien für die Aktivitätsfärbung:

Lsg.I: 600 mL Phosphatpuffer reinst 50mM pH 6,5 incl. 0,3% *m*-Nitrophenol

Lsg.II: 600 mL 0,3% *m*-Nitrophenol in Reinstwasser

Lsg.III: 60 mL Mellitsäure 10mM pH 6,5 incl. 0,3% *m*-Nitrophenol

Durchführung der Aktivitätsfärbung:

- ✓ Gele nach der PAGE 3 x 5min mit 100mL Lsg.I waschen (für Einstellung des pH-Wertes und Entfernen des Tris-Puffers aus dem Gel).
- ✓ Anschließend 3 x 5min mit 100mL Lsg.II waschen (Entfernung des Phosphatpuffers)
- ✓ 30mL Lösung III zugeben und 30min Schütteln; anschließend fast vollständiges Abgießen der Lösung und nicht mehr Schütteln.
- ✓ Färbung abwarten (2-3h). Anschließend Gel trocknen.

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „p.a.“ oder höher. Die für die Durchführung dieser Arbeit wichtigsten Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Fa. Aldrich: Benzenhexacarbonsäure (Mellitsäure), Benzen-1,2,3-tricarbonsäure
- Fa. Interchim: Benzenpentacarbonsäure
- Fa. Merck: Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure),
Benzen-1,2,4-tricarbonsäure
Benzen-1,2- und -1,3-dicarbonsäure
Benzoessäure
Methanol reinst (LiChroSolv[®])
KBr reinst (UvaSol[®])
- Fa. BioRad: Acrylamid-Stammlösung
APS (Ammoniumpersulfat)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
SDS (Natriumdodecylsulfat)
Fertiglösung zur Proteinbestimmung
- Fa. Fluka: Benzen-1,3,5-tricarbonsäure, Benzen-1,4-dicarbonsäure
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC)
- Fa. Gibco: Select-Agar
- Fa. AmershamPharmacia/General Electrics: EAH Sepharose[®] 4B

3 Ergebnisse

3.1 Chemische Untersuchungen der Benzencarbonsäuren (BCS)

Um die mikrobiologische Umsetzung der Benzencarbonsäuren genauer zu verstehen, wurden vor und parallel zu den biochemisch-mikrobiologischen Experimenten verschiedene Versuche durchgeführt, um die chemischen Eigenschaften dieser Substanzen besser kennen zu lernen, welche ja zuvor kaum Gegenstand biologischer Forschung waren und die auch chemisch relativ wenig untersucht sind. Die Resultate dieser Versuche wurden durch Literaturstudien ergänzt und wo möglich mit diesen verglichen.

3.1.1 Titrationskurven, Acidität und Wasserlöslichkeit

Die Aktivierung der Carboxylgruppen durch Carbodiimide für die Synthese der Ligandenaffinitätschromatographie-Matrix bedingt deren vorherige Deprotonierung sowie nach Angaben des Herstellers der aktivierten Matrix (Pharmacia) einen sauren pH-Wert (vgl. auch 2.11). Es wurden daher Titrationskurven der BCS aufgenommen, um das Verhältnis von protonierten zu deprotonierten Carboxylgruppen bei verschiedenen pH-Werten abschätzen zu können.

3.1.1.1 Benzenhexacarbonsäure (Mellitsäure)

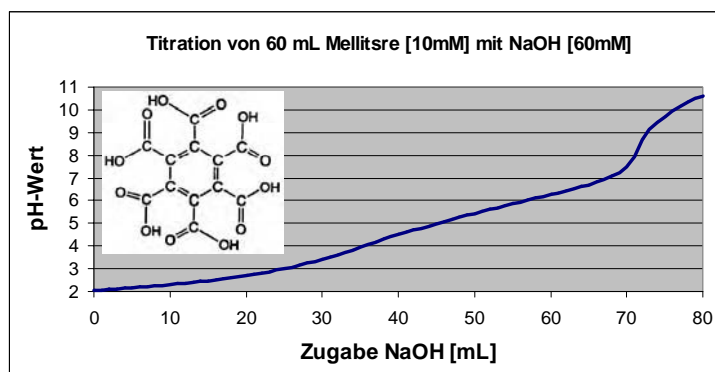


Abb. 3.1a: Titrationskurve von Mellitsäure

Auf Grund seiner sechs Carboxylgruppen ist Benzenhexacarbonsäure hoch polar und entsprechend hervorragend wasserlöslich bis ca. 20% w/v ($\approx 600\text{mM}$; eigene Ergebnisse). Der pH-Wert ändert sich bei Zugabe einer 60mM konzentrierten NaOH nur allmählich und ohne Sprünge; es lassen sich keine klaren Wendepunkte der Titrationskurve erkennen, es ergibt sich hier eher eine Titrationsgerade (Abb. 3.1a). Lediglich um pH 4,5 läßt sich eine kleine Biegung erahnen.

3.1.1.2 Benzenpentacarbonsäure

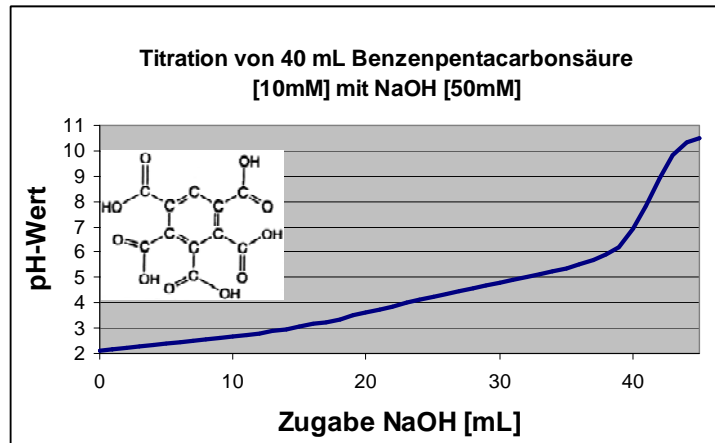


Abb. 3.1b: Titrationskurve von Benzenpentacarbonylacid

Für die Benzenpentacarbonylacid ergibt sich ein ähnliches Bild wie für die Benzenhexacarbonylacid: Es liegt ebenfalls über einen weiten Bereich eine Titrationsgerade vor. Benzenpenta- und -hexacarbonylacid sind die einzigen BCS, die in hohen Konzentrationen ohne vorherige Deprotonierung durch z.B. NaOH wasserlöslich sind (vgl. auch 2.2).

3.1.1.3 Benzen-1,2,4,5-tetracarbonylacid (Pyromellitsäure)

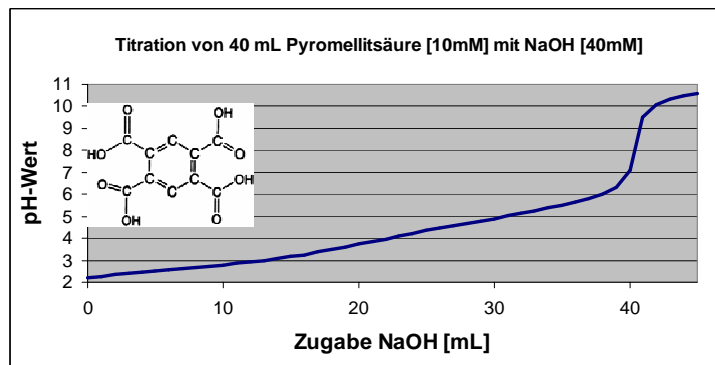


Abb. 3.1c: Titrationskurve von Pyromellitsäure

Die Pyromellitsäure ist deutlich schlechter wasserlöslich als die beiden höher carboxylierten BCS. Laut Vertrieb (Merck) beträgt die Löslichkeit 15g/L ($\approx 60\text{mM}$, d.h. zehnmal weniger als Mellitsäure). Auch die Pyromellitsäure besitzt hervorragende Puffereigenschaften über einen weiten Bereich (pH 2-6; Mellitsäure von 2-7). Entsprechend ergibt sich auch hier ein gleichmäßiger Anstieg des pH-Wertes (Abb. 3.1c).

3.1.1.4 Benzen-1,2,3-tricarbonsäure (Hemimellitsäure)

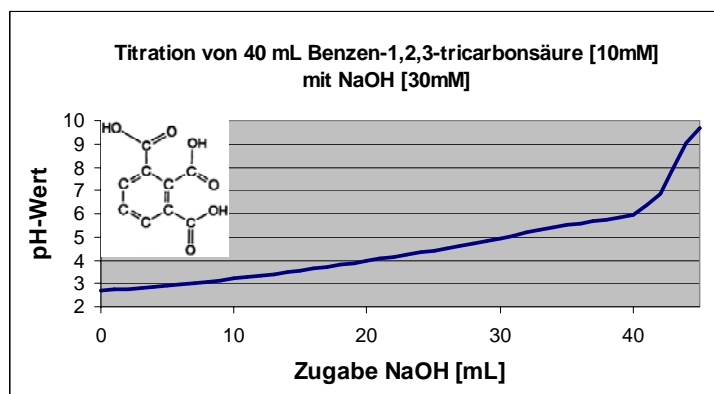


Abb. 3.1d: Titrationskurve von Benzen-1,2,3-tricarbonsäure

Bei dieser Benzencarbonsäure zeigt sich ein nicht ganz so „glatter“ Verlauf der Titrationskurve (Abb. 3.1d). Der dritte pKs-Wert der Benzen-1,2,3-tricarbonsäure zwischen 5,5 und 6,0 lässt sich aus der Kurve durchaus ableiten. Die ersten beiden pKs-Werte um 3,0 bzw. 4,0 lassen sich ebenfalls erahnen, allerdings nur bei Vergrößerung der entsprechenden Kurvenabschnitte.

3.1.1.5 Benzen-1,2,4-tricarbonsäure (Trimellitsäure)

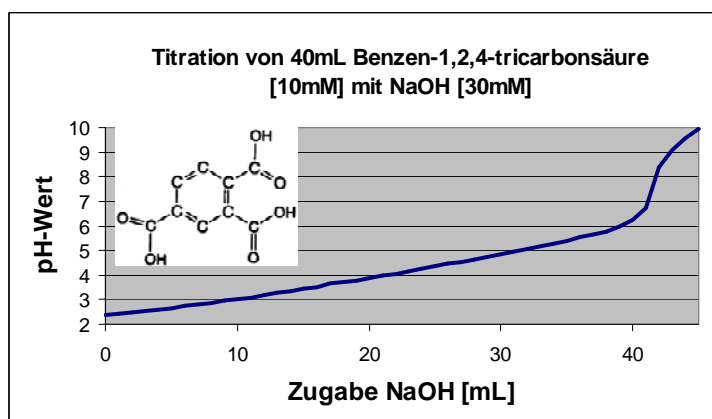


Abb. 3.1e: Titrationskurve von Benzen-1,2,4-tricarbonsäure

Hier liegt wiederum eine „Titrationsgerade“ über einen Bereich von 2,5 bis 6,0 vor (Abb. 3.1e). Auffällig ist die gegenüber den beiden anderen Benzentricarbonsäuren deutlich stärkere Acidität der ersten Carboxylgruppe: Bei gleicher Konzentration (10mM) fällt hier der pH-Wert auf 2,36 (gegenüber 2,68 bei Benzen-1,2,3-tricarbonsäure bzw. 2,77 bei Benzen-1,3,5-tricarbonsäure).

Die vom Hersteller angegebene gute Wasserlöslichkeit (83g/L, d.h. fast 400mM) konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden: Mehr als 1%ig ($\approx 50\text{mM}$) ließ sich diese BCS ohne Zugabe von NaOH nicht lösen.

3.1.1.6 Benzen-1,3,5-tricarbonsäure (Trimesinsäure)

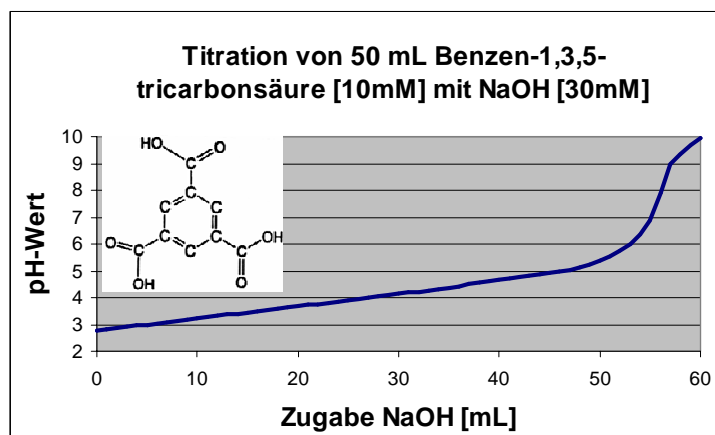


Abb. 3.1f: Titrationskurve von Benzen-1,3,5-tricarbonsäure

Bei dieser BCS lassen sich zwar Unregelmäßigkeiten im Anstieg des pH-Wertes ausmachen (Abb. 3.1f); im Gegensatz zur Benzen-1,2,3-tricarbonsäure läßt sich jedoch keiner der drei pKs-Werte sicher graphisch bestimmen. Die Wasserlöslichkeit liegt mit 15g/L im Bereich der Pyromellitsäure.

3.1.1.7 Benzen-1,2-dicarbonsäure (Phtalsäure)

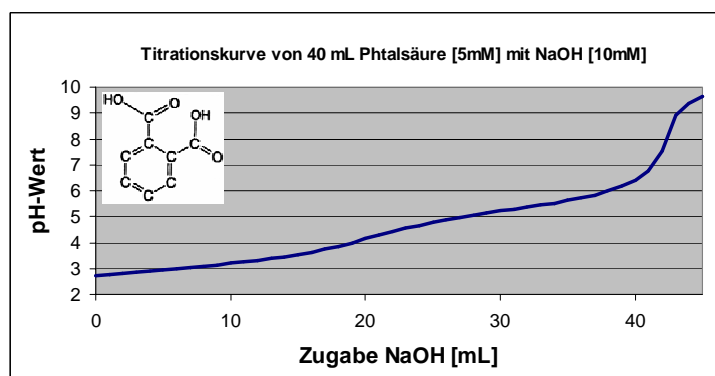


Abb. 3.1g: Titrationskurve von Phtalsäure

Hier zeigt sich eine typische Titrationskurve einer zweiprotonigen schwachen Säure (Abb. 3.1g): Der erste pKs-Wert läßt sich - wenn auch schwach - um 3 ausmachen, den zweiten kann man deutlich bei etwas über 5 bestimmen. Als einziges Isomer der Benzendicarbonsäure ist die *ortho*-Phtalsäure einigermaßen gut wasserlöslich (5,7g/L \approx 35mM).

3.1.1.8 Benzen-1,3-dicarbonsäure (Isophtalsäure)

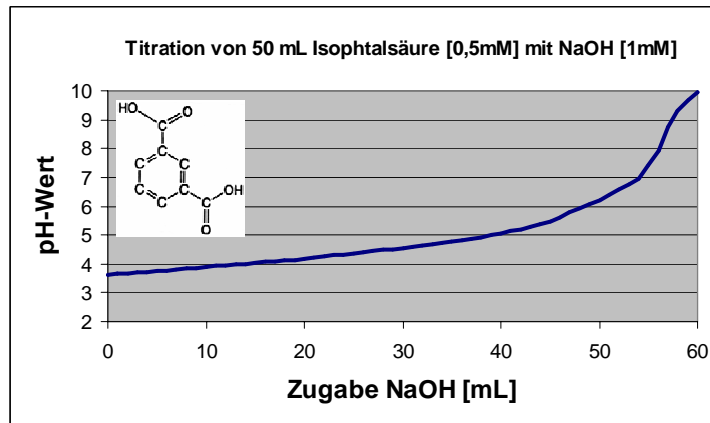


Abb. 3.1h: Titrationskurve von Isophtalsäure

Dieses Isomer der Phtalsäure zeigt ein völlig anderes Verhalten bei der Titration: Hier ergibt sich ein fast völlig regelmäßiger Anstieg des pH-Wertes ohne klar erkennbare Wendepunkte (Abb. 3.1h). Aufgrund der deutlich schlechteren Wasserlöslichkeit gegenüber der *ortho*-Phtalsäure (0,12g/L \approx 0,72mM gegenüber 5,7g/L \approx 35mM) erfolgte die Aufnahme der Titration einer 0,5mM konzentrierten *meta*-Phtalsäure, so daß die Aciditäten der Säuren anhand der Titrationskurven nicht verglichen werden können.

3.1.1.9 Benzen-1,4-dicarbonsäure (Terephtalsäure)

Aufgrund der extrem schlechten Wasserlöslichkeit von Benzen-1,4-dicarbonsäure (15mg/L; Fa. Merck, 2005) konnte von dieser BCS keine Titrationskurve aufgenommen werden.

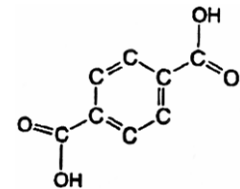


Abb. 3.1i: Terephtalsäure

3.1.1.10 Benzenmonocarbonsäure (Benzoessäure)

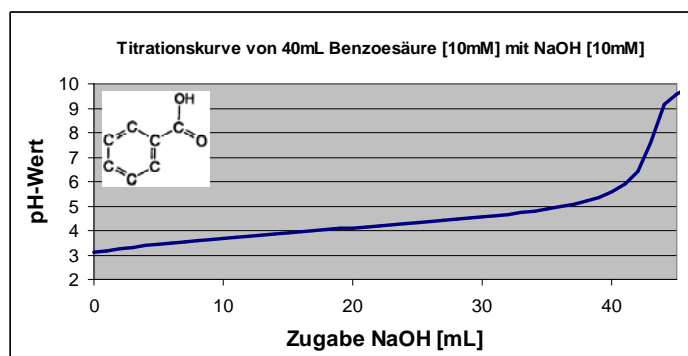


Abb. 3.1j: Titrationskurve von Benzoessäure

Benzoessäure zeigt das charakteristische Verhalten einer schwachen Säure bei der Titration (Abb. 3.1j). Der pKs-Wert kann graphisch recht gut auf knapp über 4 bestimmt werden. Trotz der nur schwachen Acidität und der zu erwartenden Hydrophobizität ist die Benzoessäure relativ gut wasserlöslich (3,4g/L \approx 30mM).

3.1.2 Trennung von BCS-Strukturisomeren durch Modifikationen des Laufmittels

Die Analyse der Decarboxylierungsschritte bzw. der Nachweis der Intermediärmetabolite geschah mittels hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC, vgl. 2.8). Die Identifikation der BCS nach Passieren der Chromatographiesäule erfolgte anhand der Retentionszeiten. Da diese jedoch nach einem Wechsel der Säule mitunter erheblich von den vorherigen abwichen (vgl. Tab. 3.1) und teilweise dicht beieinander lagen, wurde zusätzlich eine Diodenarray-Detektion (DAD) vorgenommen.

Insbesondere bei der Trennung der Strukturisomere Benzen-1,2,3- und -1,2,4-tricarbonsäure sowie Terephtalsäure und Benzen-1,3,5-tricarbonsäure traten Schwierigkeiten auf. Während letztere sich anhand ihrer DAD-Spektren gut unterscheiden ließen, waren die ersten beiden nur schwer zu differenzieren. Ein Gemisch beider Substanzen eluierte als ein „Misch-Peak“ (Abb. 3.2a-c).

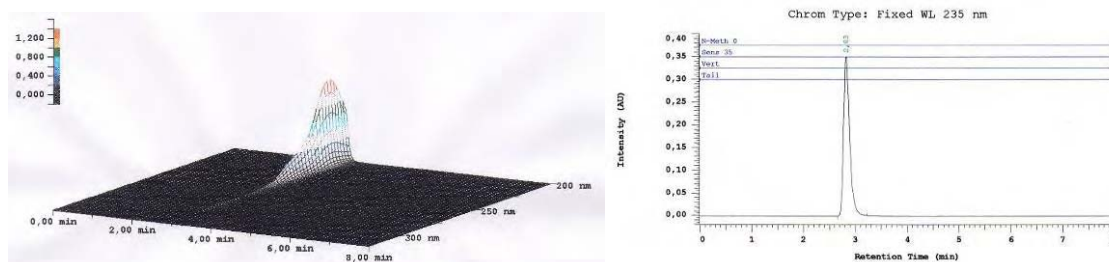


Abb. 3.2a: DAD-Spektrum u. Retentionspeak von Benzen-1,2,3-tricarbonsäure, Laufmittel 0,1% H_3PO_4

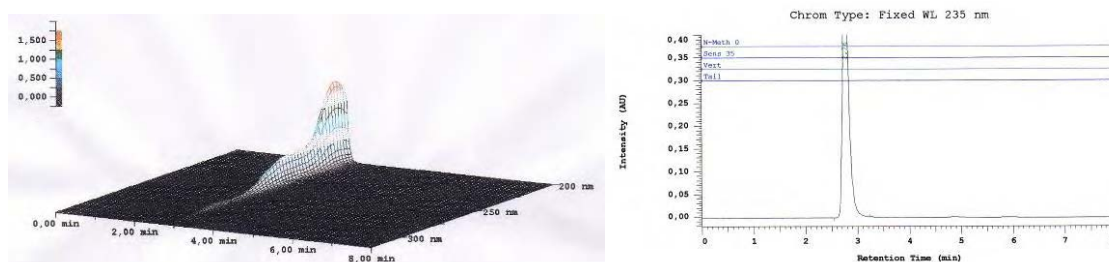


Abb. 3.2b: DAD-Spektrum u. Retentionspeak von Benzen-1,2,4-tricarbonsäure, Laufmittel 0,1% H_3PO_4

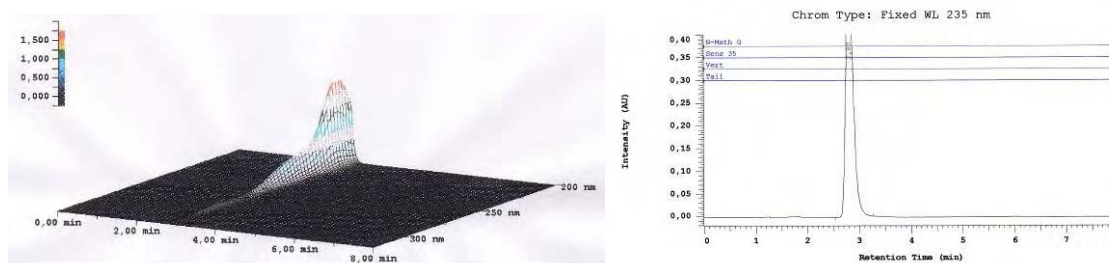


Abb. 3.2c: DAD-Spektrum und Retentions-„Mischpeak“ eines Gemisches von Benzen-1,2,3- und -1,2,4-tricarbonsäure, Laufmittel 0,1% H_3PO_4 , pH 2,0.

Durch Modifikationen des Lösungsmittel bezüglich Polarität (Zugabe verschiedener Mengen Methanol) sowie Konzentration (und dadurch auch pH-Wert) wurde versucht,

eine deutlichere Trennung dieser Substanzen zu erreichen. Erfolgreich war eine Senkung der Phosphorsäure-Konzentration von ursprünglich 0,1% auf 0,05% und damit eine Erhöhung des pH-Wertes von 2,0 auf 2,3:

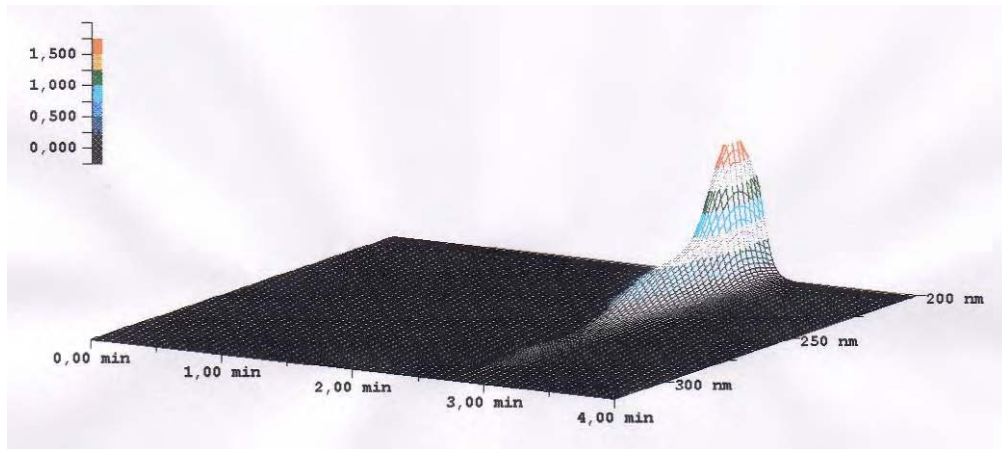


Abb. 3.3a: DAD-Spektrum eines Gemisches von Benzen-1,2,3- und -1,2,4-tricarbonsäure, Laufmittel 0,085% H_3PO_4 , pH 2,1.

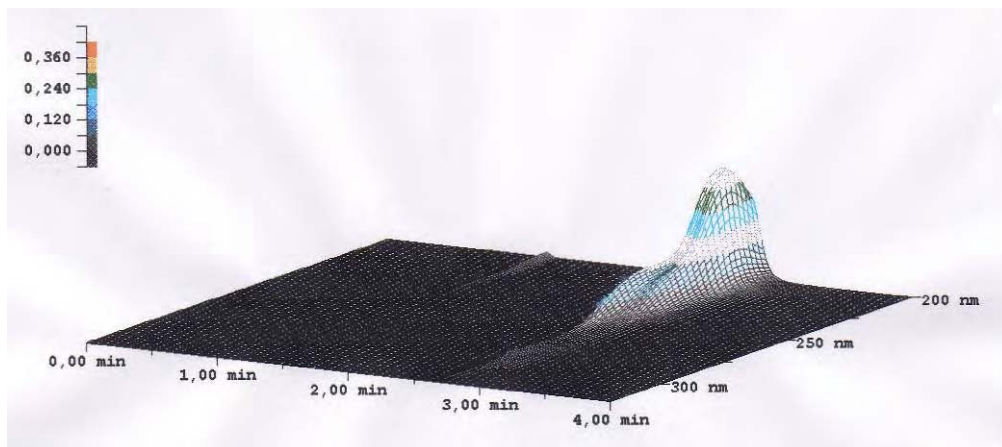


Abb. 3.3b: DAD-Spektrum eines Gemisches von Benzen-1,2,3- und -1,2,4-tricarbonsäure, Laufmittel 0,07% H_3PO_4 , pH 2,2.

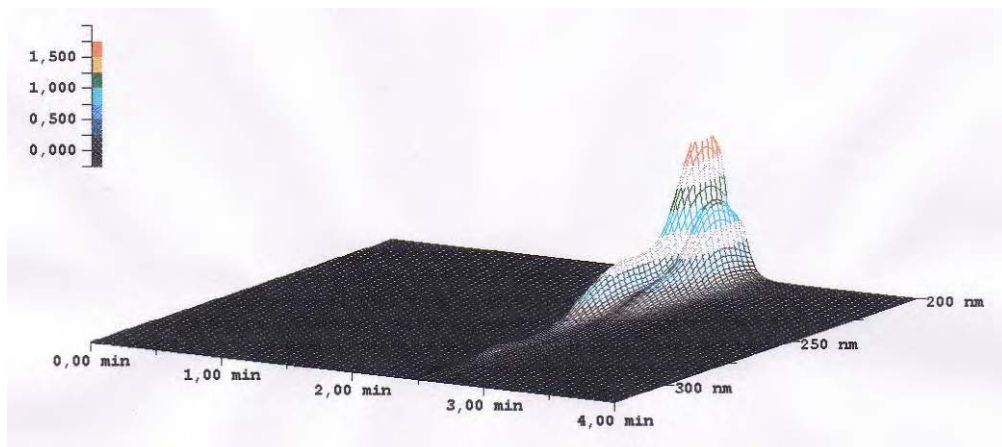


Abb. 3.3c: DAD-Spektrum eines Gemisches von Benzen-1,2,3- und -1,2,4-tricarbonsäure, Laufmittel 0,05% H_3PO_4 , pH 2,3.

Eine weitere Senkung der Konzentration bis zu 0,01% (pH 2,9) sowie eine leichte Senkung der Polarität des Laufmittels durch Beimischung unterschiedlicher Konzentrationen von Methanol führten zu einer noch schärferen Trennung der beiden Benzenricarbonsäure-Isomere. Da unter diesen Bedingungen jedoch Mellitsäure, Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure beinahe gleichzeitig eluierten, erwies sich eine Modifikation des Laufmittels auf 0,05% H₃PO₄ als am sinnvollsten.

Sämtliche im weiteren Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit der HPLC wurden mit diesem Laufmittel durchgeführt.

3.1.3 HPLC-Retentionszeiten und DAD-Spektren

Tabelle 3.1 zeigt die Retentionszeiten der Benzencarbonsäuren vor und nach Änderung der Laufmittelbedingungen sowie nach Einsetzen einer neuen Säule. Während die Mellitsäure anschließend früher eluierte, verblieben die anderen BCS z.T. erheblich länger auf der Säule. Außerdem gab es eine Vertauschung: Benzen-1,3,5-tricarbonsäure eluierte nun erst nach der (*ortho*-)Phtalsäure.

Benzen-carbonsäure	RT 2003 (Rudat) ¹ [min ± 0,05]	RT 1998 (Lammerich) ²
Benzenhexacarbonsäure (Mellitsäure)	1,05	1,21
Benzenpentacarbonsäure	1,24	(nicht bestimmt)
Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure)	1,56	1,49
Benzen-1,2,4-tricarbonsäure (Trimellitsäure)	2,49	1,91
Benzen-1,2,3-tricarbonsäure (Hemimellitsäure)	2,64	2,05
Benzen-1,3,5-tricarbonsäure (Trimesinsäure)	4,36	2,55
Benzen-1,2-dicarbonsäure (Phtalsäure)	3,76	2,68
Benzen-1,4-dicarbonsäure (Terephtalsäure)	4,59	2,72
Benzen-1,3-dicarbonsäure (Isophtalsäure)	5,56	3,25
Benzenmonocarbonsäure (Benzoessäure)	7,37	4,24

Tab. 3.1: Retentionszeiten (RT) der Benzencarbonsäuren
(LiChrospher 100 CN-Säule, , Flußrate 1mL/min)
¹ Laufmittel 0,05% H₃PO₄, ² Laufmittel 0,1% H₃PO₄

Die Trennbarkeit der BCS konnte durch die Modifikation des Laufmittels deutlich verbessert werden; Mellitsäure und ihre drei Decarboxylierungsprodukte Benzenpentacarbonsäure, Pyromellitsäure (sowie TetraX) und Benzen-1,2,4-tricarbonsäure, die zuvor innerhalb von nur 42 Sekunden und daher fast überschneidend von der Säule eluierten, verteilten sich nun über einen Zeitraum von fast anderthalb Minuten. Die überdies genutzte Identifikationsmöglichkeit über das DAD-Spektrum vereinfachte die Unterscheidbarkeit der BCS zusätzlich.

Die folgenden Abbildungen (3.4a bis 3.4i) zeigen die **DAD-Spektren der BCS** bei Verwendung von 0,05%iger H_3PO_4 als Laufmittel. Es wurden jeweils 10 μ L einer 0,01%igen BCS (gelöst in Reinstwasser) auf die Säule aufgetragen.

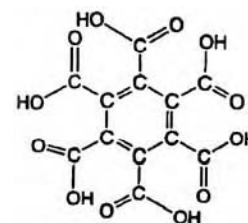
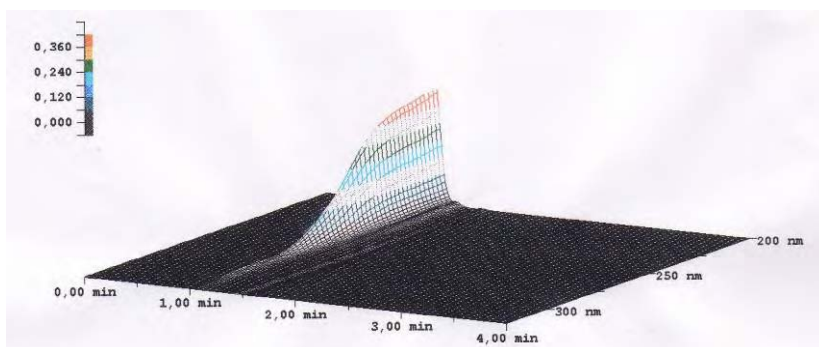


Abb. 3.4a: Benzenhexacarbonsäure (Mellitsäure)

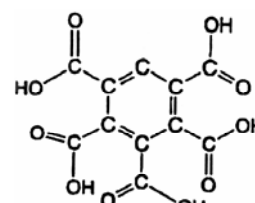
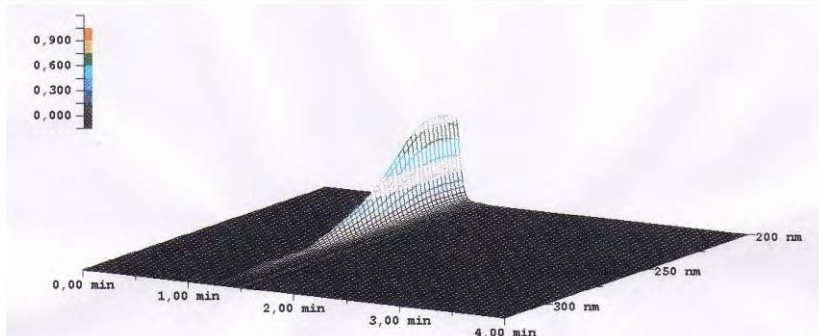


Abb. 3.4b: Benzenpentacarbonsäure

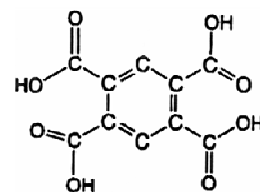
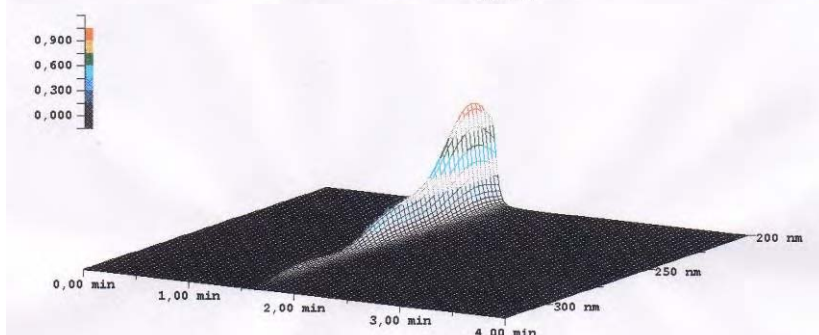


Abb. 3.4c: Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure)

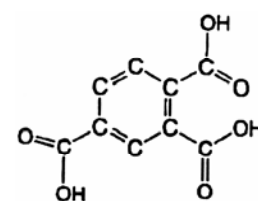
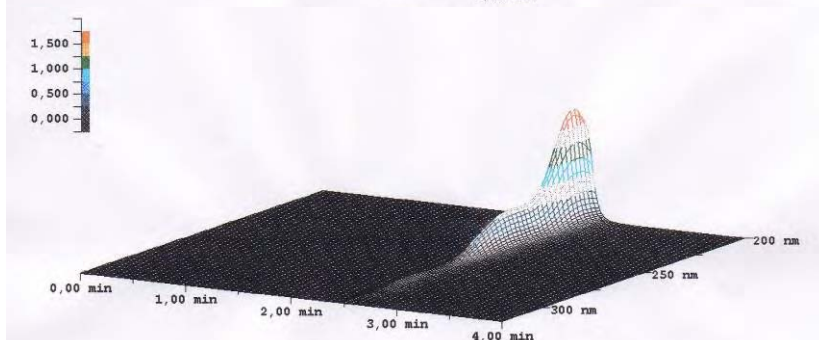


Abb. 3.4d: Benzen-1,2,4-tricarbonsäure (Trimellitsäure)

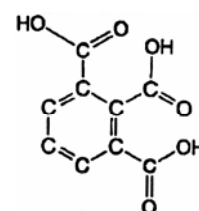
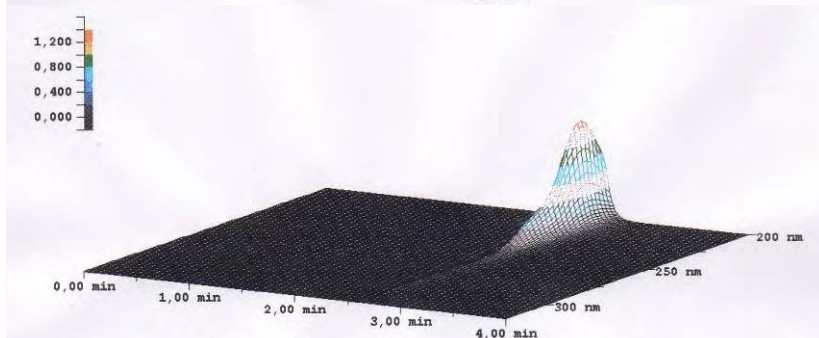


Abb. 3.4e: Benzen-1,2,3-tricarbonsäure (Hemimellitsäure)

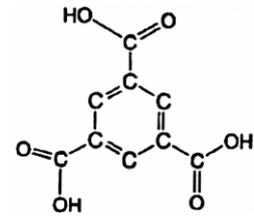
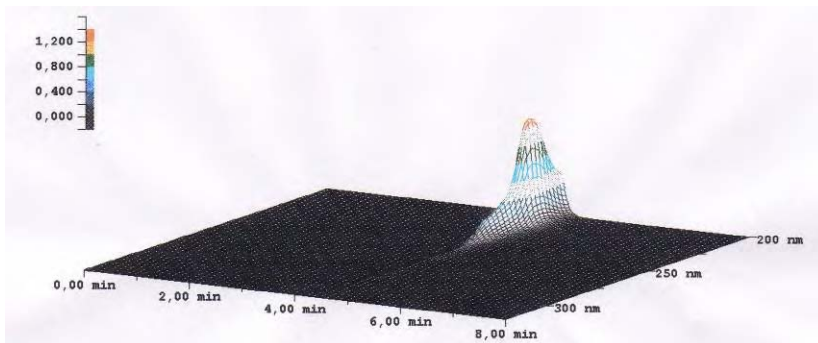


Abb. 3.4f: Benzen-1,3,5-tricarbonsäure (Trimesinsäure)

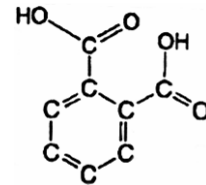
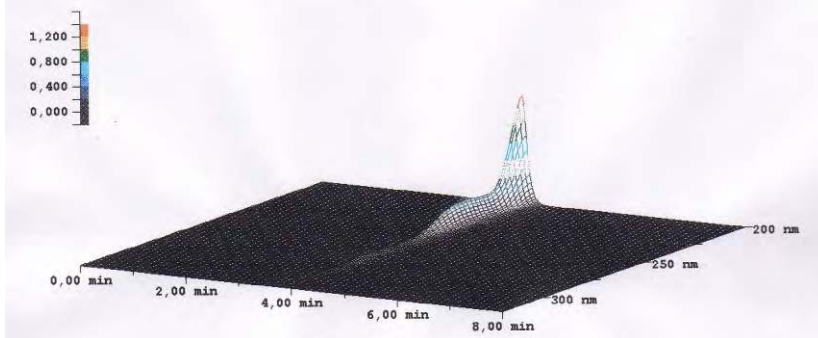


Abb. 3.4g: Benzen-1,2-dicarbonsäure (Phtalsäure)

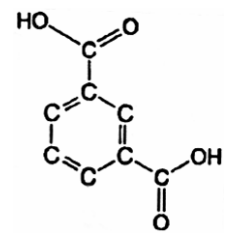


Abb. 3.4h: Benzen-1,3-dicarbonsäure Isophtalsäure

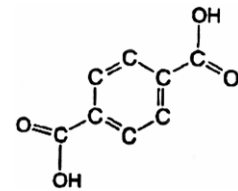
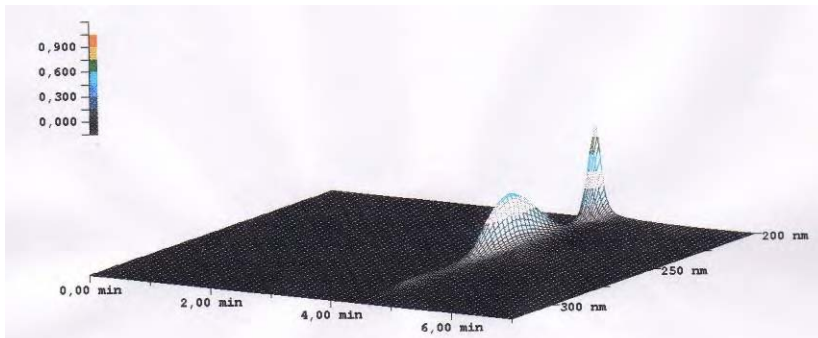


Abb. 3.4i: Benzen-1,4-dicarbonsäure (Terephtalsäure)

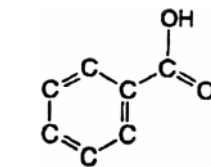
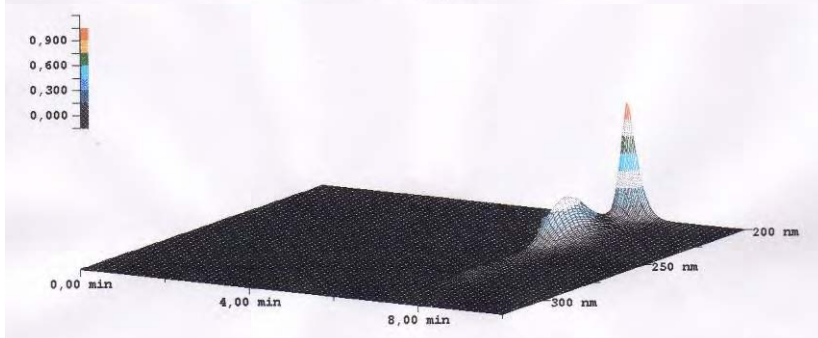


Abb. 3.4j: Benzen-monocarbonsäure (Benzoessäure)

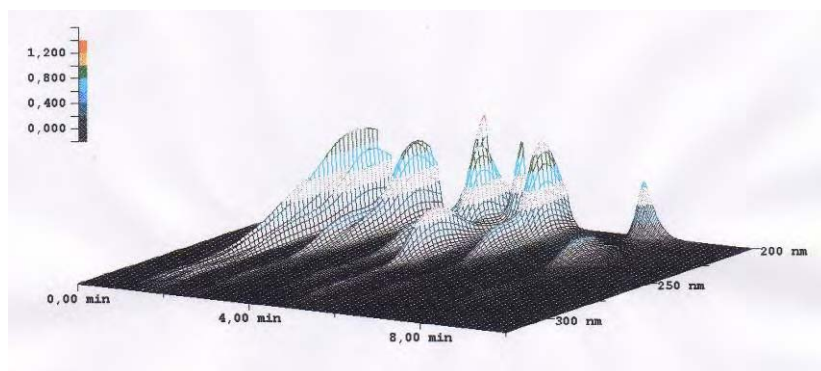


Abb. 3.4k:
DAD-Spektrum
einer Mischung
aller unter 3.4 auf-
geführten Benzen-
carbonsäuren

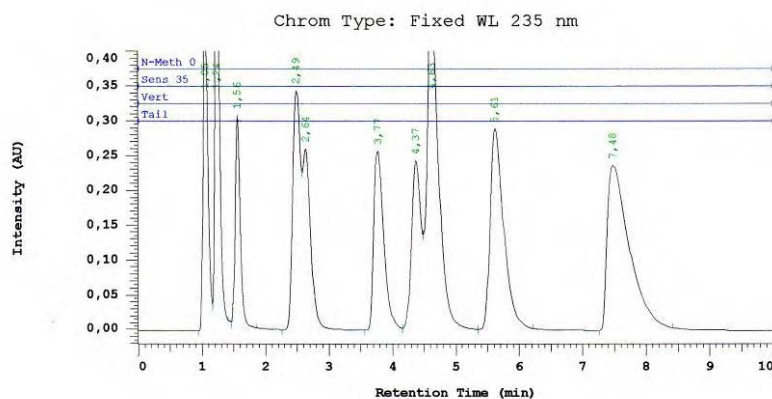


Abb. 3.4l:
Substanzen wie
oben, jedoch De-
tektion nicht über
DAD, sondern über
UV (235nm)

Abb. 3.4: DAD-Spektren der BCS. Die Retentionszeiten lagen z.T. recht nahe beieinander und variierten zudem leicht nach jedem Wechsel der Vorsäule. Daher wurde bei den meisten HPLC-Experimenten das DAD-Spektrum zur sicheren Identifikation der BCS herangezogen.

Insgesamt kann festgehalten werden, daß die Trennung und Identifikation der Benzencarbonsäuren mittels HPLC nun problemlos erfolgen kann und auch Gemische dieser Substanzen sich eindeutig differenzieren lassen.

3.1.4 Infrarotspektroskopische Untersuchungen der BCS

Die Infrarotspektroskopie erlaubt die Identifikation eines bestimmten Moleküls anhand seiner funktionellen Gruppen. Bei der infrarotspektroskopischen Untersuchung der Benzencarbonsäuren zeigte die Mellitsäure aufgrund ihrer Symmetrie das übersichtlichste Spektrum (Abb. 3.5).

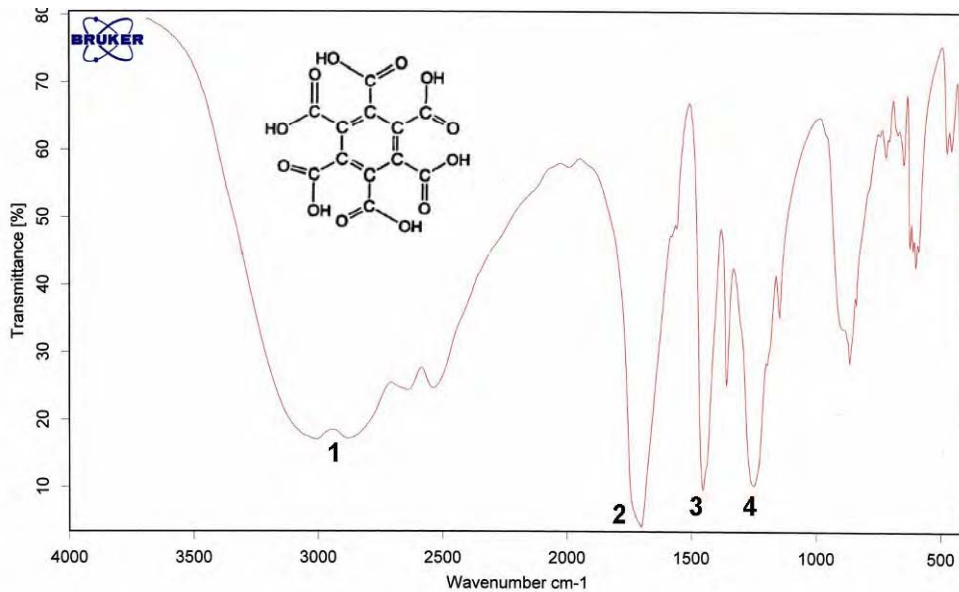


Abb. 3.5: Infrarotspektrum eines Mellitsäure-KBr-Preßlings. Folgende Banden konnten zugeordnet werden:

- 1 breite (O-H)-Schwingung der Carboxylgruppen ($2400\text{-}3400\text{cm}^{-1}$)
- 2 (C=O)-Schwingung der Carboxylgruppen ($1680\text{-}1700\text{cm}^{-1}$)
- 3 Aromatische (C=C)-Schwingung (1475cm^{-1})
- 4 (C-O)-Schwingung der Carboxylgruppen (um 1300cm^{-1})

Die größten Unterschiede hierzu finden sich bei der (unsymmetrischen) Benzoesäure (Abb. 3.6): Neben den deutlichen qualitativen und quantitativen Veränderungen der oben gezeigten Banden fällt insbesondere die Doppelbande im Fingerprint-Bereich um 700cm^{-1} auf. Hierbei handelt es sich um die Aryl-(C-H)-Schwingung, die bei monosubstituierten Aromaten (fünf benachbarte Wasserstoff-Substituenten) als Doppelbande auftritt.

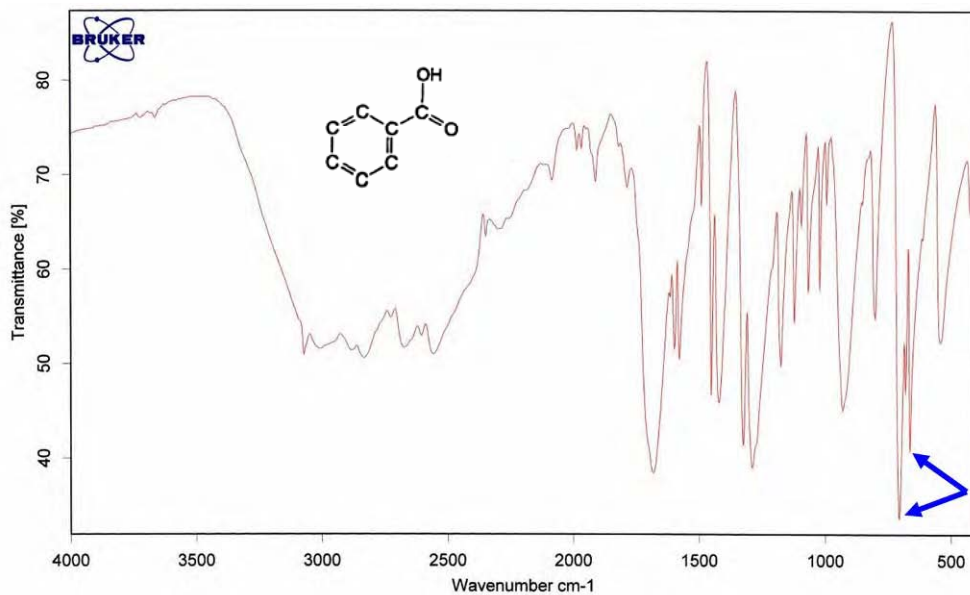


Abb. 3.6: Infrarotspektrum eines Benzoesäure-KBr-Preßlings.
Die Pfeile indizieren die out-of-plane-(C-H)-Schwingung monosubstituierter Aromaten.

Bei geringerer Anzahl unmittelbar benachbarter H-Substituenten verschiebt sich diese Bande laut Literatur (Hesse et al., 2002) in den niederfrequenten Bereich. Einzeln stehende H-Substituenten sind in der Regel durch Infrarotspektroskopie nicht detektierbar, da die resultierende Bande nur sehr schwach ist und daher meist überdeckt wird. Dies konnte für die Benzencarbonsäuren bestätigt werden: Während Benzen-1,2,4-tricarbonsäure wie auch Terephtalsäure eine solche Bande bei knapp 800cm^{-1} erkennen ließen (Abb. 3.7), konnte weder bei Benzenpentacarbonsäure noch bei Pyromellitsäure eine Bande eindeutig als der (C-H)-Schwingung zugehörig benannt werden (Abb. 3.8a und b).

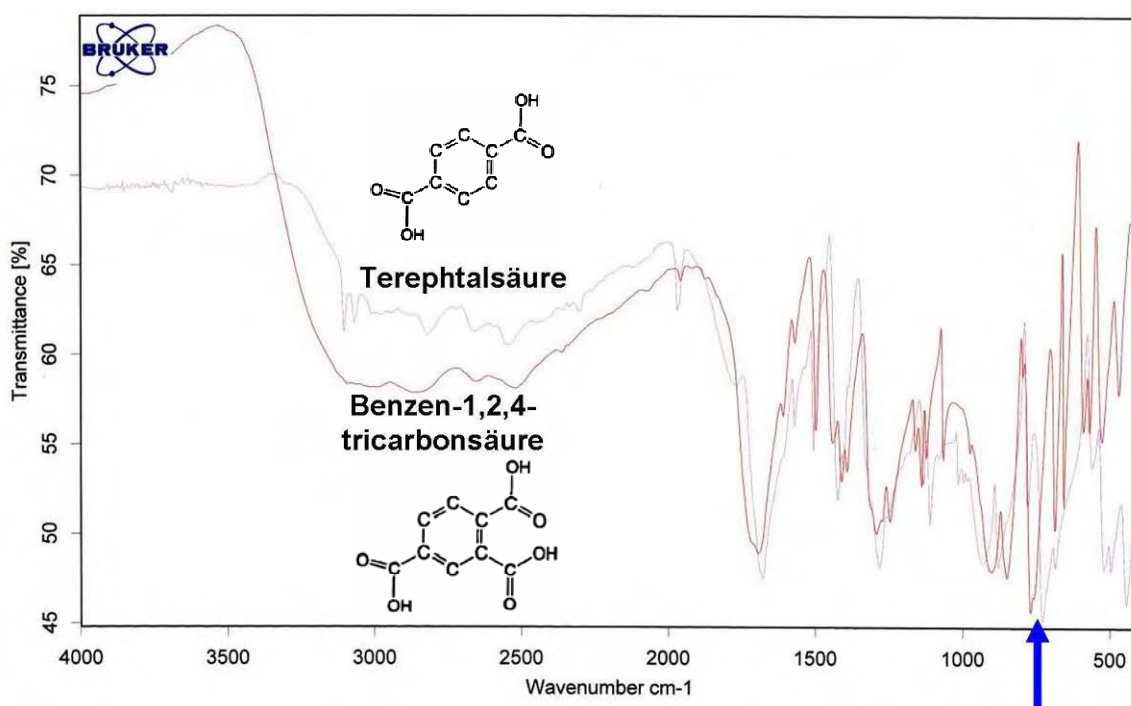


Abb. 3.7: Infrarotspektren von Terephtalsäure und Benzen-1,2,4-tricarbonsäure.

Der Pfeil indiziert die C-H-Schwingung zweier benachbarter H-Substituenten bei 770 bzw. 800cm^{-1} .

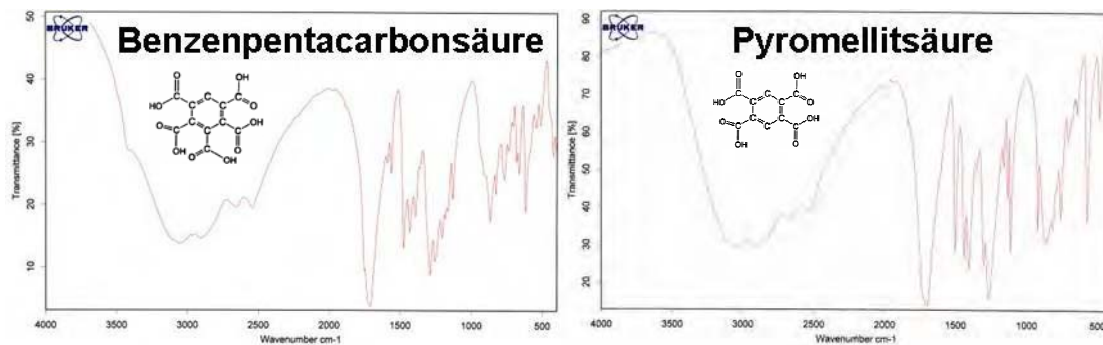


Abb. 3.8a und b: Infrarotspektren von Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure.

Die isoliert stehenden H-Substituenten verursachen lediglich eine schwache Bande zwischen 800 und 900cm^{-1} , die nicht identifiziert werden kann.

Besonders gut wurde die Bedeutung der C-H-Schwingungsbande beim Vergleich der Benzen-1,2,3-tricarbonsäure (Hemimellitsäure) mit der vollständig carboxylierten Mellitsäure sichtbar (Abb. 3.9). Die beiden Spektren fielen über weite Strecken nahezu identisch aus, aber die (C-H)-Bande bei etwa 800cm^{-1} erlaubte auch dem wenig geübten Auge bereits auf den ersten Blick eine klare Differenzierungsmöglichkeit:

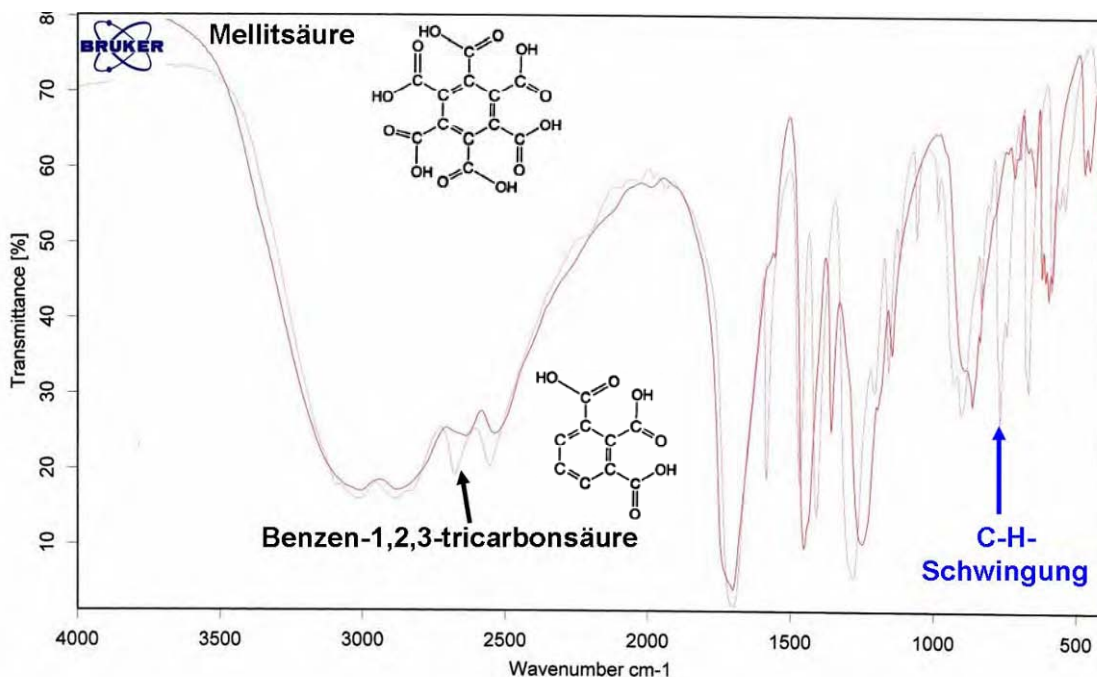


Abb. 3.9: Infrarotspektren von Mellitsäure und Benzen-1,2,3-tricarbonsäure.

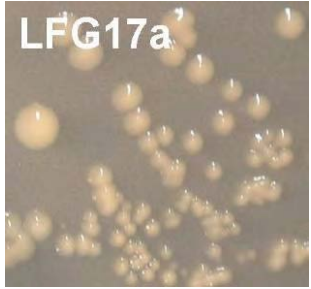

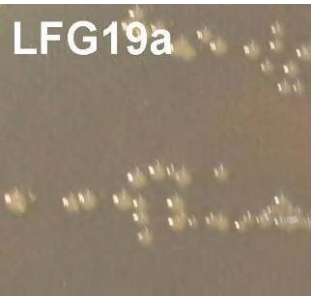



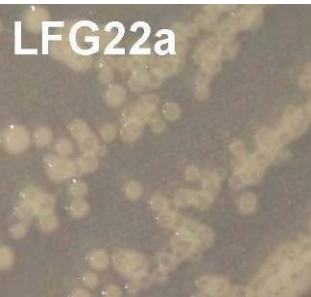



Der blaue Pfeil indiziert die (C-H)-Schwingung dreier benachbarter H-Substituenten bei ca. 800cm^{-1} .

3.2 Ergebnisse der Screening-Versuche





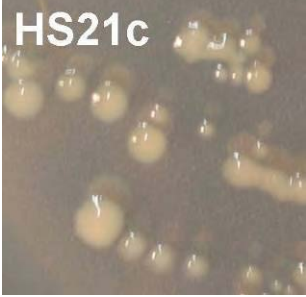

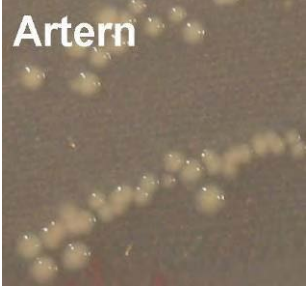

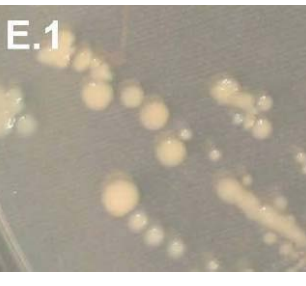

3.2.1 Biodiversität der Benzencarbonsäure- (BCS-) Decarboxylanten

Seit Beginn der Arbeiten an dieser Dissertation konnten 22 Bakterienstämme in größerem Maßstab (d.h. in Zellmassen von mehreren Gramm) in Flüssigkultur mit Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen werden.

Eine morphologische Untersuchung der neu isolierten Stämme ergab für einige so hohe Ähnlichkeiten, daß davon ausgegangen werden kann, daß es sich z.T. um nahe verwandte Arten handelt. Insgesamt konnten aber zehn deutlich verschieden aussehende Stämme differenziert werden, deren morphologische Eigenschaften in Tab. 3.1 aufgeführt sind.

Koloniemorphologie (auf Komplexmedium KR)		Mikroskopisches Bild	
	beige-gelbe, große Kolonien, glänzend, schleimige Konsistenz, flach, glatter Rand		Längere Stäbchen, z.T. paarig; beweglich nur wenn einzeln
	Beige kleine Kolonien, matt, feste Konsistenz, schwach erhaben, glatter Rand ¹		Kurzstäbchen, z.T. paarig; lebhaft beweglich auch als Paar
	Beige kleine Kolonien mit klarem weißen Saum, schwach glänzend, erhaben, glatter Rand		Kurzstäbchen, z.T. paarig; beweglich
	Weißliche, klare mittelgroße Kolonien, schleimig-verlaufene Konsistenz, flach mit Grube in der Mitte, glatter Rand		Sehr kleine Stäbchen, z.T. paarig; beweglich
	Beige kleine Kolonien, matt, erhaben, glatter Rand		Kurzstäbchen, einzeln; unbeweglich

Tab. 3.1a: Morphologische Eigenschaften von zehn BCS-Decarboxylanten.
(Legende siehe unten in Tab. 3.1b).

Koloniemorphologie (auf Komplexmedium KR)		Mikroskopisches Bild	
	Beige, mittelgroße Kolonien, glänzend, schleimige Konsistenz, flach, glatter Rand		Kurzstäbchen, z.T. paarig; lebhaft beweglich
	Beige-gelbe kleine Kolonien, glänzend, relativ feste Konsistenz, erhaben, glatter Rand		Kurzstäbchen, z.T. paarig; lebhaft beweglich nur wenn einzeln
	Beige große Kolonien, glänzend, relativ feste Konsistenz, erhaben, glatter Rand		Kurzstäbchen, einzeln; unbeweglich
	Beige-gelbe kleine Kolonien, matt, feste Konsistenz, flach, glatter Rand ¹		Längere Stäbchen, z.T. paarig; beweglich nur in exponentieller Phase
	Weißliche, klare mittelgroße Kolonien, glänzend, schleimig-verlaufene Konsistenz, flach, glatter Rand ¹		Diplo-Kokken bis -Kurzstäbchen, beweglich (Stamm aus Lammerich, 1998)

Tab. 3.1b: Morphologische Eigenschaften von zehn BCS-Decarboxylanten (selbst isoliert außer E.1). HS21c kennzeichnet ein Huminsäure-Isolat, das Screening des Stammes Artern wird unter 3.2.2 beschrieben. Bei allen übrigen Stämmen handelt es sich um Erdproben, welche in einer Anreicherungskultur mit verschiedenen BCS versetzt wurden (Fakoussa, unveröffentlichte Daten).

¹vergleiche auch Tabelle 3.3

Alle Stämme wuchsen in Flüssigmedium mit Benzenhexa-, -penta-, -1,2,4,5-tetracarbonsäure und -1,2,4-tricarbonsäure unter Bildung einer Mellitsäure-Decarboxylase-Aktivität sowie mit Benzen-1,3-dicarbonsäure (Isophtalsäure), wobei hier die Bildung einer solchen Aktivität nicht nachgewiesen werden konnte. Das Wachstum mit den beiden letztgenannten BCS fiel deutlich schlechter aus als mit den höher carboxylierten BCS (Ausnahmen: *LFG19a* und E.1). Keiner der Stämme war in der Lage, mit Phtal- oder Terephtalsäure (Benzen-1,2- bzw. -1,4-dicarbonsäure) zu wachsen. Auch Benzen-1,3,5-tricarbonsäure konnte nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden, und einzig der Stamm E.1 zeigte sich zur Verwertung von Benzen-1,2,3-tricarbonsäure befähigt. Wachstum mit Benzoesäure wurde nur auf mit Agar verfestigtem LFR-Medium beobachtet. Hierbei kam es nicht zur Expression einer Mellitsäure-Decarboxylase.

Die Verwertung der unterschiedlichen BCS ist in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

C-Quelle	Benzoe*	Phtal	Iso	Tere	1,2,3	1,2,4	1,3,5	Pyro	Penta	Mellit
Stamm										
LFG17a	+++	-	+	-	-	+	-	++++	+++	+++
LFG19a	++	-	++	-	-	++	-	++++	+++	+++
LFG21a	++	-	+	-	-	+/-	-	+++	+	+
LFG22a	++	-	+	-	-	+/-	-	+++	+	+
LFG27a	++	-	+	-	-	+/-	-	+++	+	+
LFG32a	++	-	+	-	-	+/-	-	+++	+	+
LFG33a	++	-	+	-	-	+/-	-	+++	+	+
HS21c	++	-	+	-	-	+	-	+++	+	+
„Artern“	+	-	+/-	-	-	+/-	-	+++	+	+
E.1	+++	-	++	-	+	+++	-	++++	+++	+++

Tabelle 3.2: Verwertung unterschiedlicher Benzencarbonsäuren durch die verschiedenen Bakterienstämme. „+“ bezeichnet ein Wachstum mit dieser BCS in Flüssigmedium (außer *Benzoe, vgl. auch Text), die Anzahl der „+“ quantifiziert das Wachstum.

3.2.2 Bestimmung und Charakterisierung des Stammes *LFG19a*

Aus unter 2.13 beschriebenen Gründen wurde der Stamm *LFG19a* für die Reinigung der Mellitsäure-Decarboxylase ausgewählt. Da infolgedessen mit diesem Bakterium künftig bevorzugt gearbeitet werden soll (auch molekulargenetisch), wurde eine Bestimmung durch die DSMZ vorgenommen. Aus der systematischen Klassifizierung dieses Bakteriums sollten auch Rückschlüsse auf physiologische Besonderheiten dieses

Stammes möglich sein, die eine Anzucht in technischem Maßstab wie auch molekulargenetische Arbeiten erleichtern könnten.

Die partielle Sequenzierung der 16S-rDNA ergab eine Zuordnung zu 100% zu *Sinorhizobium morelense* (Dr. Verborg/DSMZ, Identifikationsprotokoll 2006). Das Profil der zellulären Fettsäuren war ebenfalls typisch für *Rhizobium* und verwandte Gattungen (siehe Anhang).

Einige physiologische Eigenschaften sind in Tabelle 3.3 (S. 73-74) aufgelistet (vgl. auch Abb. 3.20).

3.2.3 Entdeckung und Charakterisierung einer neuen Art der Gattung *Rhizobium* bzw. einer neuen Gattung der α -Proteobakterien

3.2.3.1 Screening

In einem ehemaligen Braunkohle-Abbaugelände nahe der Stadt Artern/Thüringen konnte ein weiterer Bakterienstamm mit Decarboxylase-Aktivität für höhere BCS isoliert werden (vergleiche 2.2.2). Dieser Stamm unterscheidet sich von allen anderen bisher gefundenen BCS-Decarboxylanten dadurch, daß er als einziger nicht zu einem Wachstum auf dem bisher verwendeten Komplexmedium Pseudomonas-Agar F befähigt ist. Dies unterstreicht einmal mehr die schon in vorherigen Experimenten bestätigte physiologische Vielfalt der BCS-Verwerter. Die Vereinzlung gelang auf dem selbst entworfenen KR-Medium.

3.2.2.2 Physiologische und molekulargenetische Charakterisierung

Nachdem die partielle Sequenzierung der 16S-rDNA des Stammes „Artern“ auf eine neue Gattung innerhalb der α -Proteobakterien hinwies, zeigte die Totalsequenz unterschiedlich gute Übereinstimmungen (von 93,7% mit *Mesorhizobium loti* bis 96,5% mit *Rhizobium radiobacter*) mit verschiedenen Typenstämmen der Rhizobiaceae, darunter Vertretern der Gattungen *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* und *Agrobacterium* (siehe Anhang).

Es wurde daher seitens der DSMZ vorgeschlagen, diesen Stamm als Vertreter einer neuen Art innerhalb der Gattung *Rhizobium* anzusehen (Dr. Spröer/DSMZ, persönliche Mitteilung).

Zur genaueren Einordnung wurden einige physiologische Experimente durchgeführt.

Der Stamm „Artern“ bildete auf YEM-Agar erst nach 4-5 Tagen Kolonien, die nach einer Woche eine maximale Größe von knapp 2mm Durchmesser erreichten. Eine Schleimbildung wurde nicht beobachtet. Es kam zur Produktion von Säure, erkennbar an dem Farbumschlag des Bromthymolblau von grün nach gelb (Abb. 3.10).



Abb. 3.10: Der Stamm „Artern“ nach 7 Tagen Wachstum auf YEM-Agar incl. Bromthymolblau.

Eine Fähigkeit zur N_2 -Fixierung konnte nicht nachgewiesen werden. Der Stamm „Artern“ zeigte sich nicht zu Wachstum im stickstofffreien Mineralsalz-Medium MMR I in der Lage. Nach 7 Tagen erfolgte eine Zugabe von 1g/L NH_4NO_3 . Daraufhin wurde binnen 24h eine OD_{600} von 0,5 erreicht. Der als Positivkontrolle eingesetzte Stamm *Azotobacter vinelandii* wuchs in MMR I über Nacht bis zu einer OD_{600} von $>1,0$.

Die Geißelfärbung erwies sich als schwierig: Der Stamm „Artern“ zeigte nur während der exponentiellen Wachstumsphase in YEM-Flüssigmedium bei 28°C überhaupt Beweglichkeit. Hierbei konnte das Vorhandensein einer Geißel nachgewiesen werden, welche polar inseriert war (monopolar monotrich Begeißelung, vgl. Abb. 3.11)

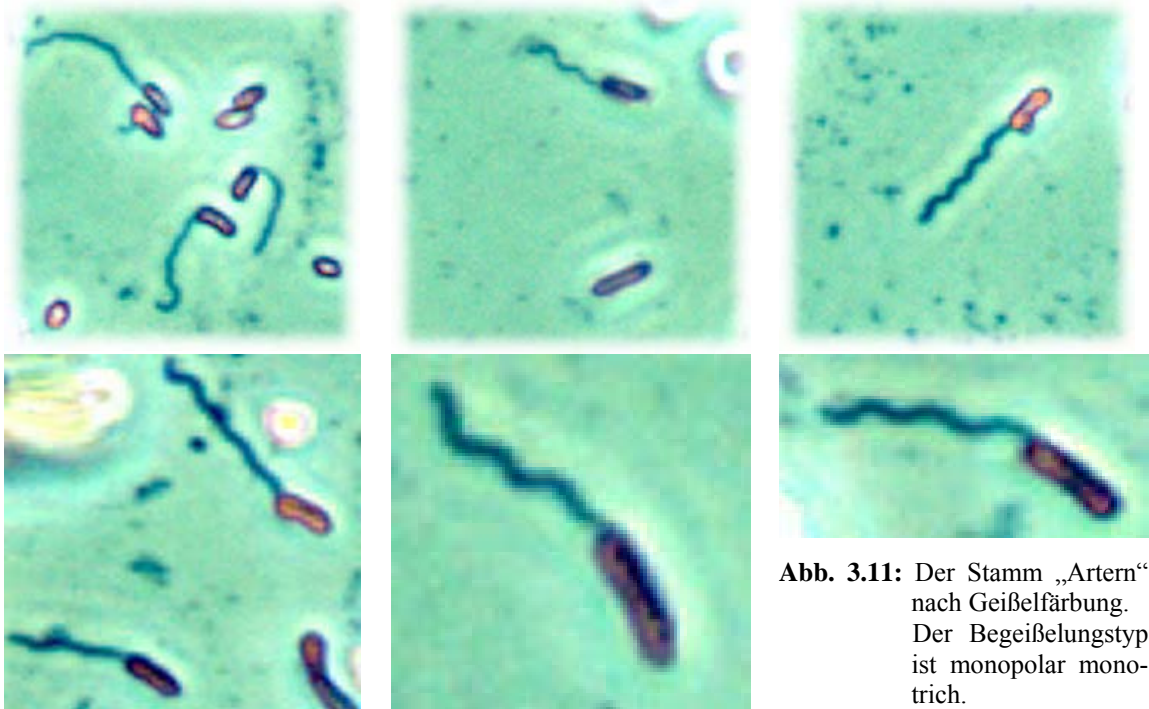


Abb. 3.11: Der Stamm „Artern“ nach Geißelfärbung. Der Begeißelungstyp ist monopolar monotrich.

Eine Zusammenfassung weiterer physiologischer Eigenschaften findet sich in Tab. 3.3.

Stamm	„Artern“ (vor- geschl. <i>Keku- lea arternensis</i>)	<i>LFG19a</i> (<i>S. morelense</i>/ <i>E. adhaerens</i>)	E.1 (<i>Paracoccus</i> <i>spec. nov.</i>)
Eigenschaft			
Zellform	Pleomorphe Stäbchen	Stäbchen	Kokken bzw. kurze pleom. Stäbchen
Durchmesser	0,6-0,9µm	0,6-0,7µm	1,1-1,3µm
Länge	2,0-3,5µm	2,0-3,0µm	1,5-2,0µm
Beweglichkeit	-	+	+
Gram-Reaktion	-	-	-
Pigmente	Cremig-gelb	-	-
Lyse durch 3% KOH	+	+	+
Aminopeptidase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Katalase	+	+	+
Anaerobes Wachstum	-	n.g.	n.g.
ADH	-	-	-
Urease	-	+	+
Hydrolyse v. Esculin	n.g.	+	-
Hydrolyse v. Gelatine	-	-	-
Nitratreduktion	-	+	+
Wachstum bei 2% NaCl	n.g.	+	+
2,5% NaCl	n.g.	+	+
3% NaCl	n.g.	n.g.	+
6% NaCl	n.g.	n.g.	+
12% NaCl	n.g.	n.g.	-
Wachstum bei pH 6,0	+	+	+
Wachstum bei pH 9,0	+	+	+
Verwertung v. Glucose	+	+	+
Arabinose	+	+	n.g.
Mannose	+	+	+
Maltose	+	n.g.	n.g.
Xylose	n.g.	n.g.	+
Fructose	n.g.	n.g.	+
Trehalose	n.g.	n.g.	+
Inositol	n.g.	+	-
Arabitol	n.g.	+	n.g.
Dulcitol	n.g.	+	n.g.

Stamm	„Artern“	LFG19a	E.1
Eigenschaft (Forts.)			
Verwertung v. Mannitol	+	n.g.	+
Sorbitol	n.g.	n.g.	+
Methanol	n.g.	n.g.	+
Malat	+	+	n.g.
Adipat	-	+	n.g.
Citrat	-	-	n.g.
Gluconat	n.g.	-	n.g.
Acetat	n.g.	+/-	n.g.
Phenylacetat	-	n.g.	n.g.
Glycin	n.g.	+/-	n.g.
L-Tryptophan	n.g.	-	n.g.
Methylamin	n.g.	n.g.	+
Trimethylamin	n.g.	n.g.	-

Tab. 3.3: Übersicht und Vergleich zahlreicher morphologischer und physiologischer Eigenschaften der Bakterienstämme „Artern“ (vorgeschlagener Name *Kekulea arternensis spec. nov. gen. nov.*, *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) und E.1 (*Paracoccus spec. nov.*). (Daten größtenteils ermittelt durch DSMZ) n.g. = nicht geprüft

3.3 Erstmaliger Nachweis der Metabolisierung von Benzenpentacarbonsäure

3.3.1 Wachstum mit Benzenpentacarbonsäure

An dem Stamm „Artern“ konnte zum ersten Mal das Wachstum mit Benzenpentacarbonsäure als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nachgewiesen werden. Diese BCS war bisher nur als Zwischenprodukt der Decarboxylierung von Benzenhexa- zu verschiedenen Benzentetracarbonsäuren bekannt (Lammerich, 1998; Rudat, 2000; Rudat et al., 2002).

Es zeigten sich alle der zuvor auf Pyromellitsäure angezogenen Stämme zu einem Wachstum auf Mineralsalzmedium (LFR) mit Benzenpentacarbonsäure befähigt (vgl. auch Abb. 3.12). Das Wachstum erfolgte etwa so gut wie mit Mellitsäure und damit deutlich langsamer als mit Pyromellitsäure. So dauerte es zumeist vier oder mehr Tage, bis sich auf den Agarplatten die ersten Kolonien zeigten (Pyromellitsäure: Zwei Tage).

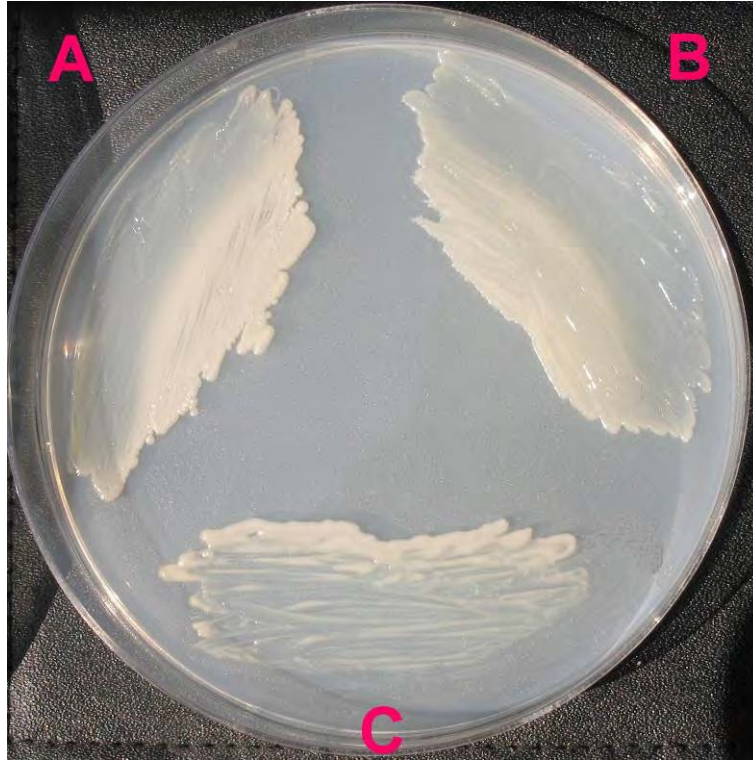


Abb. 3.12: Gradientenplatte: Benzenpentacarbonsäure wurde als einzige C-Quelle (insgesamt 500 μ L 0,1%ige BCS-Lsg. in der Plattenmitte aufgetropft. Die ausgestrichenen Bakterien (**A:** *LFG19a*; **B:** „Artern“; **C:** E.1) wachsen deutlich sichtbar zur Plattenmitte hin am besten und damit in Abhängigkeit von der Konzentration der C-Quelle.

3.3.2 Nachweis der enzymatischen Decarboxylierung von Benzenpentacarbonsäure durch die Stämme „Artern“ und X.93 mittels HPLC

Nachdem die Benzenpentacarbonsäure als Zwischenprodukt identifiziert worden war (Rudat, 2000), stellte sich die Frage, ob diese BCS nur als (u.U. aktiviertes) Intermediat verwertet werden kann, oder auch als native Substanz als Substrat dienen kann.

In diesem Dissertationsvorhaben wurde erstmals die Benzenpentacarbonsäure als Substrat in Flüssigchromatographie-Experimenten (HPLC) eingesetzt. Ein zugegebener Rohextrakt des Bakterienstammes „Artern“ zeigte sich in der Lage, diese BCS zu Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) zu decarboxylieren. Dieses Zwischenprodukt wird umgehend weiter decarboxyliert zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure (Rudat und Fakoussa, 2003).

Der Bakterienstamm X.93 (*Alcaligenes piechaudii*; Krause, 2000) bildet bei der Decarboxylierung von Mellitsäure zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure eine andere Benzentetracarbonsäure als Pyromellitsäure als Zwischenprodukt (Lammerich, 1998). Ein Extrakt dieses Bakterienstammes wurde nun auf seine Fähigkeit überprüft, auch Benzenpentacarbonsäure enzymatisch zu decarboxylieren. Die Decarboxylierungsschritte wurden ebenfalls mittels HPLC verfolgt und mit denen durch den Stamm „Artern“ verglichen (Rudat und Fakoussa, 2003). Es zeigte sich, daß der Extrakt des Stammes X.93 ebenfalls zur Decarboxylierung von Benzenpentacarbonsäure befähigt war; auch hier war Benzen-1,2,4-tricarbonsäure das vorläufige Endprodukt. Dabei trat wiederum eine von der Pyromellitsäure verschiedene Benzentetracarbonsäure als Intermediat auf. Diese wurde im folgenden als „TetraX“ bezeichnet (vgl. 3.4).

Die unterschiedlichen Decarboxylierungswege sind in Abb. 3.13 schematisch dargestellt. Abb. 3.14 zeigt die DAD-Spektren der BCS bzw. deren Änderung während der Decarboxylierung durch die beiden Stämme „Artern“ und X.93.

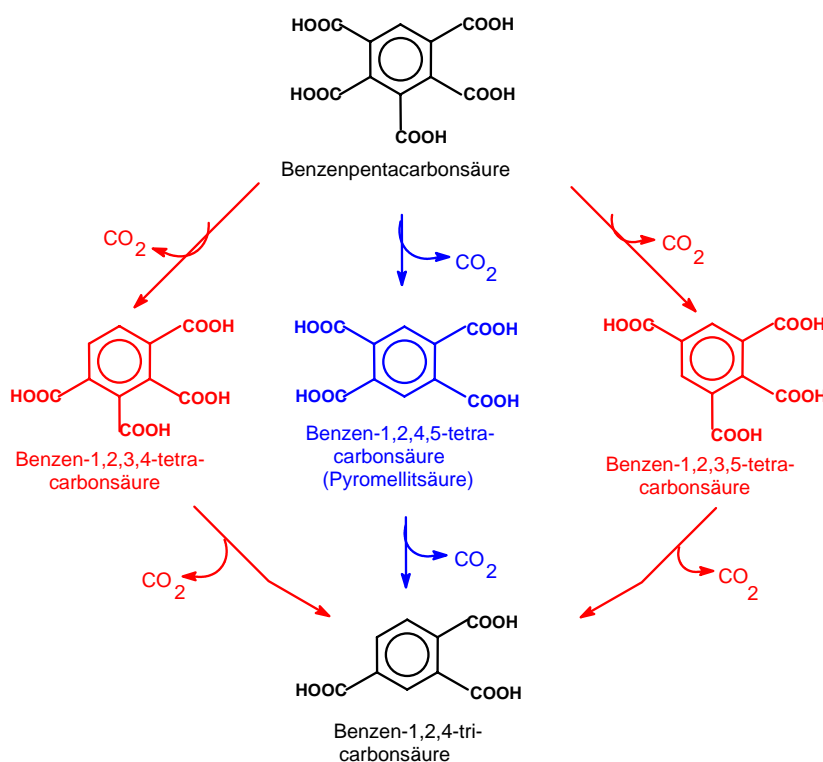


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der enzymatischen Decarboxylierung von Benzenpentacarbonsäure durch die Stämme „Artern“ und X.93 (nach Rudat und Fakoussa, 2003).

Während der Stamm „Artern“ Pyromellitsäure als Zwischenprodukt bildet (blau), tritt im Abbauweg von X.93 eine andere Benzentetracarbonsäure als Intermediat auf (rot).

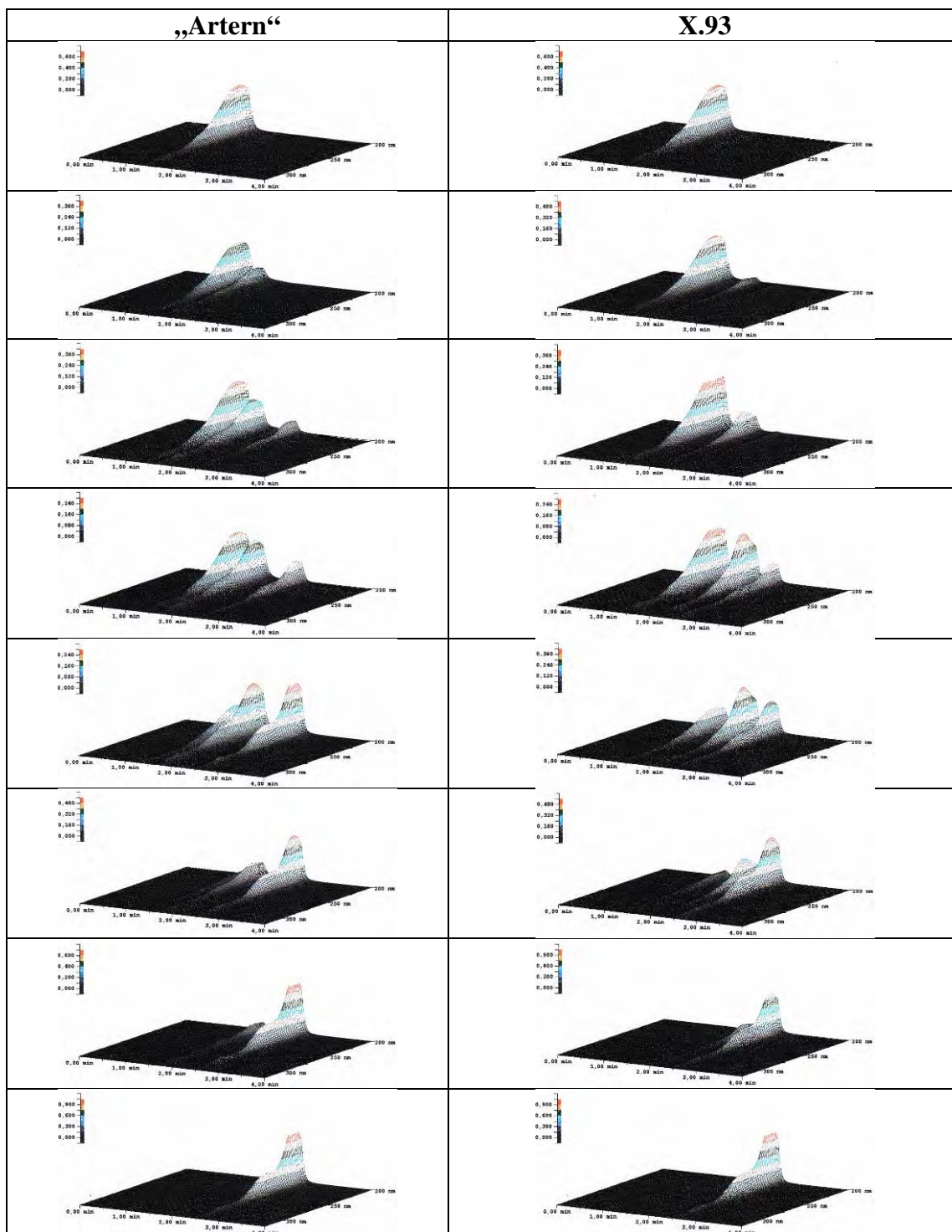


Abb. 3.14: Decarboxylierung von Benzenpentacarbonsäure zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure durch die Stämme „Artern“ und X.93. (Ordinate: UV-Absorption; Abszisse: Retentionszeit in min). Die etwa alle 10min aufgenommenen HPLC-Chromatogramme zeigen die vollständige Umsetzung von Benzenpentacarbonsäure (Retentionszeit: 1,24min) zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure (Retentionszeit: 2,49min) binnen etwa 1,5h. Als Zwischenprodukt wird durch den Stamm „Artern“ die Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Retentionszeit: 1,56min) gebildet, wohingegen bei der Decarboxylierung durch den Stamm X.93 eine andere Benzentetracarbonsäure als Intermediat auftritt (Retentionszeit: 2,00min). Testansatz: 0,01% Benzenpentacarbonsäure in 50mM Phosphatpuffer + BCS-Decarboxylase enthaltender Rohextrakt aus den Stämmen „Artern“ und X.93 (Aktivität im Ansatz: jeweils ca. 20mU/mL).

3.4 Untersuchung des Abbaus der unbekanntes Benzentetracarbonsäure „TetraX“

3.4.1 Isolierung von TetraX

Die Umsetzung von Benzenpentacarbonsäure zu TetraX durch einen ausgesalzten Rohextrakt von X.93 lief erheblich schneller ab als die weitere Decarboxylierung zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure. Daher konnte mittels Inaktivierung der Decarboxylase-Aktivität durch 30minütiges Kochen des Testansatzes die Decarboxylierung auf der Stufe des Intermediates gestoppt werden. Das beim Kochen ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert, so daß TetraX nun als isoliertes Substrat für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand (Abb. 3.15)

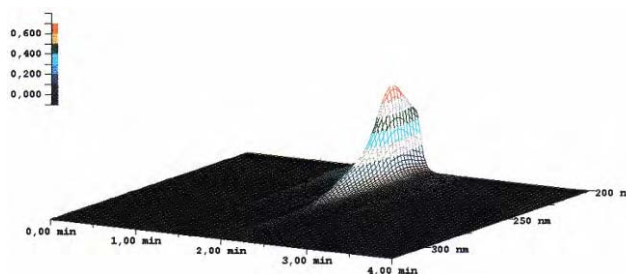
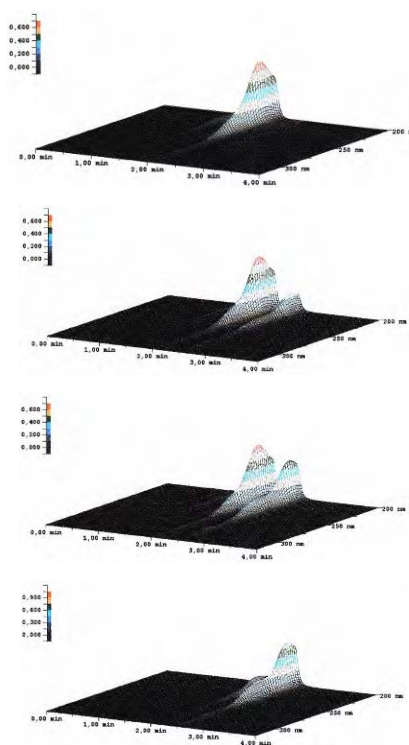


Abb. 3.15: Die isolierte Benzentetracarbonsäure TetraX, Intermediat der enzymatischen Decarboxylierung zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure durch den Bakterienstamm „X.93“.

3.4.2 Untersuchung der Abbaubarkeit von TetraX

Im Folgenden wurde geprüft, ob ein Rohextrakt des Stammes X.93 zur Decarboxylierung von TetraX in der Lage ist. Da diese Benzentetracarbonsäure noch nie als Ausgangssubstrat eingesetzt worden war, konnte dies nicht als selbstverständlich angenommen werden. Wie in Abb. 3.16 dargestellt, lief die Decarboxylierung zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure jedoch genauso ab wie bei der Gabe von Benzenpentacarbonsäure als Substrat.

Abb. 3.16: Decarboxylierung der isolierten BCS „TetraX“ durch einen Rohextrakt aus X.93. Die Aufnahme der Spektren erfolgte alle 10min (Bedingungen vgl. Abb. 3.14).



Nachdem die prinzipielle Decarboxylierbarkeit von TetraX bewiesen worden war, wurde nun untersucht, ob auch die Zellextrakte anderer BCS-Decarboxylanten zur enzymatischen Decarboxylierung dieser Benzentetracarbonsäure in der Lage sind.

Hierdurch hätte unter Umständen auch gezeigt werden können, um welche der beiden möglichen Isomere es sich bei TetraX handelt. Bei einer Decarboxylierung zu Benzen-1,3,5-tricarbonsäure hätte es sich bei TetraX um Benzen-1,2,3,5-tetracarbonsäure handeln müssen, da aus Benzen-1,2,3,4-tetracarbonsäure nur Benzen-1,2,3- oder Benzen-1,2,4-tricarbonsäure gebildet werden kann.

Leider erwies sich keiner der eingesetzten Enzymextrakte als in der Lage, TetraX zu decarboxylieren. Dagegen konnte Pyromellitsäure durch X.93 sehr wohl decarboxyliert werden, was auch zu vermuten war, da dieser Stamm diese Benzentetracarbonsäure auch als C-Quelle nutzen kann.

TetraX konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht in ausreichendem Maßstab hergestellt bzw. isoliert werden, um mit dieser BCS Wachstumsversuche durchzuführen.

3.5 Vergleich der Decarboxylase-Aktivitäten im Rohextrakt

3.5.1 Ultrazentrifugation und Vergleich der Decarboxylase-Aktivitäten für verschiedene BCS

Zur Decarboxylierung heterogener Huminsäure-Gemische wird eine extrem unspezifische Decarboxylase aromatischer Carbonsäuren benötigt, die zudem über eine hohe Stabilität verfügen muß. Günstig wäre daher das Auffinden einer extrazellulären BCS-Decarboxylase. Da jedoch ausschließlich intrazellulär aktive Enzyme detektiert werden konnten, galt es nun, unter diesen immerhin 22 Decarboxylase-Systemen zumindest eine als den geforderten Eigenschaften entsprechend zu charakterisieren. Hierzu wurde zunächst die spezifische Aktivität der ultrazentrifugierten Rohextrakte für die drei BCS Mellitsäure, Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure gemessen, um die jeweilige Substratspezifität zu ermitteln. Dabei ergab sich für fast alle Decarboxylasen eine Reihung nach abnehmender Aktivität von Mellitsäure über Benzenpentacarbonsäure zu Pyromellitsäure, d.h. die am höchsten substituierte BCS wird am schnellsten und besten decarboxyliert (vgl. Abb. 3.17).

Im Schnitt war die Decarboxylase-Aktivität für Benzenpentacarbonsäure etwa 20% geringer als für Mellitsäure, die für Pyromellitsäure betrug nur etwa 30%.

Als weitere Regelmäßigkeit konnte festgestellt werden, daß die spezifische Aktivität durch die Ultrazentrifugation erhöht werden konnte. Bei diesem Schritt werden die Zellmembranen sowie alle in diesen eingeschlossene Proteine entfernt; folglich sind die Decarboxylasen der untersuchten Stämme nicht membranständig, sondern durchweg cytoplasmatisch (löslich).

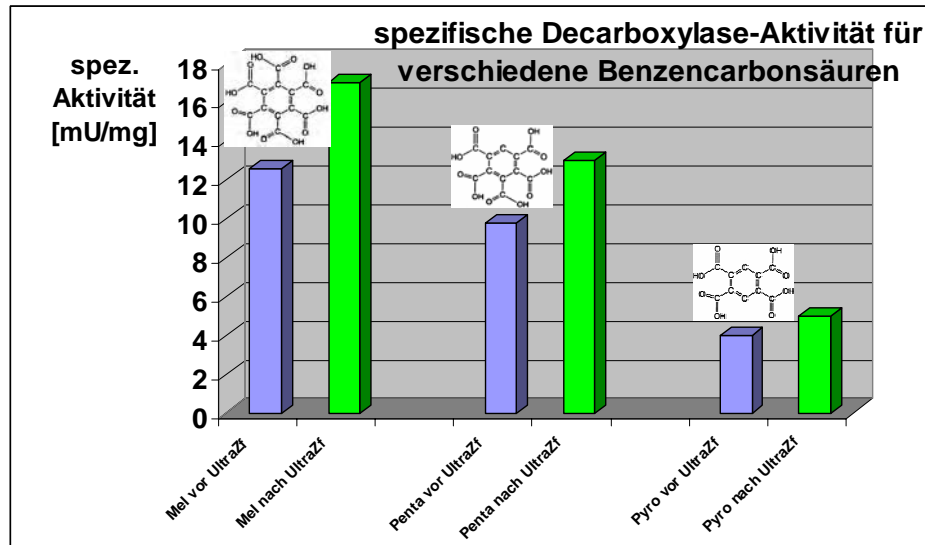


Abb. 3.17: Relative Decarboxylase-Aktivität der cytoplasmatischen Extrakte für Mellitsäure (Mel), Benzenpentacarbonsäure (Penta) und Pyromellitsäure (Pyro) vor und nach Ultrazentrifugation (UltraZf). Die Abbildung zeigt die gemittelten Werte der 22 untersuchten Bakterienstämme.

3.5.2 Ultrafiltration

Als zweites wichtiges Kriterium zur Vorauswahl eines geeigneten intrazellulären Enzyms wurde das Molekulargewicht gewählt und daher eine Ultrafiltration der Rohextrakte durchgeführt. Diese Methode diente neben dem Zweck der Anreicherung dazu, unter den 22 BCS-Decarboxylasen ein möglichst kleines Enzym zu isolieren. Dies geschah aus mehreren Gründen: Zum einen sind kleine Enzyme in der Regel deutlich unspezifischer als große, da sie die relevanten funktionellen Gruppen aus sterischen Gründen leichter erreichen können; zum anderen sind kleine Enzyme meist auch stabiler und verfügen über weniger Regulationseinheiten. Darüber hinaus wäre das zu einem kleineren Protein gehörende Gen kürzer und somit in molekulargenetischen Experimenten leichter zu bearbeiten.

Die Ergebnisse der Ultrafiltration zeigten, daß die BCS-Decarboxylasen der verschiedenen Stämme deutliche Unterschiede im Molekulargewicht aufweisen. Bei neun Stämmen fand sich die Fraktion mit der höchsten Gesamtaktivität im Überstand der Filtrationsmembran mit einer Ausschlußgröße von 300kD. Hingegen war bei sieben Stämmen die BCS-Decarboxylase erheblich kleiner, so daß hier ein Großteil des

Enzyms auch die 100kD-Membran passierte. Zum Teil erfolgte sogar eine quantitative Trennung: Bei zwei Zellextrakten wurde die BCS-Decarboxylase-Aktivität durch die 300kD-Membran vollständig zurückgehalten, während die Aktivität dreier anderer Extrakte fast vollständig die 100kDa-Membran passierten. Diese Werte lassen für die beiden Gruppen einen Molekulargewichts-Unterschied von rund einer Größenordnung vermuten. Die Ergebnisse der Ultrafiltration werden in Abb. 3.18 zusammengefaßt.

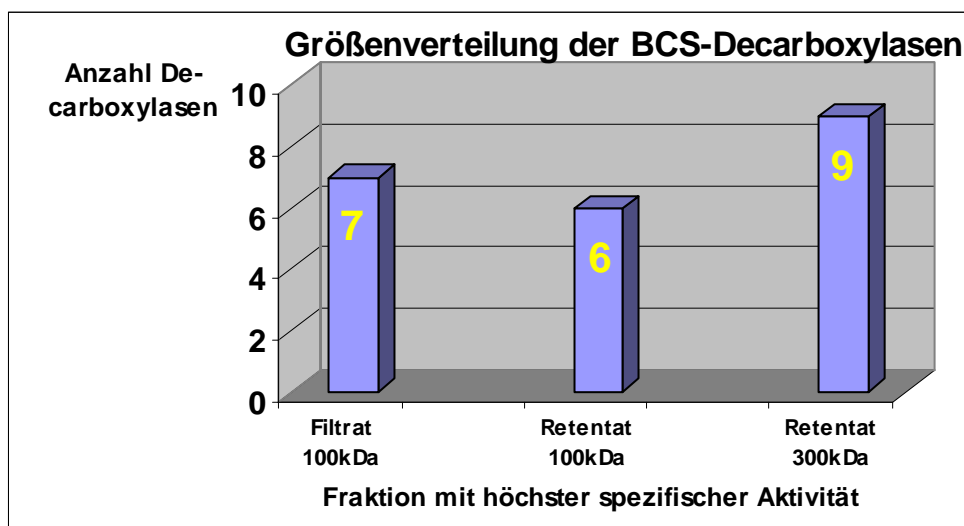


Abb. 3.18: Größenverteilung der BCS-Decarboxylasen bzw. der decarboxylierenden Enzymaktivitäten.
Dargestellt sind die Fraktionen, die nach Ultrafiltration durch Membranen entsprechender Kenngröße die höchste Aktivität aufwiesen.

3.5.3 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die Rohextrakte der Stämme mit den kleinsten Decarboxylasen (gemäß Ergebnissen der Ultrafiltration) wurden durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung angereichert (siehe Abb. 3.19). Gezeigt sind die gemittelten Werte der gemäß den Ergebnissen der Ultrafiltration kleinsten sieben Decarboxylasen ($< 100\text{kD}$). Deutlich tritt hervor, daß der überwiegende Anteil der Decarboxylasen bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen zwischen 1,8M und 2,6M ausfielen, während das übrige Zellprotein erst durch deutlich höhere Konzentrationen ab 2,8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgesalzt wird. Über 90% der eingesetzten Decarboxylase-Aktivität fiel in diesem Bereich aus, während fast 50% des Gesamtproteins bei 2,6M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration noch in Lösung war sowie über 20% schon bei Konzentrationen von 1,6M und darunter ausfiel.

Die BCS-Decarboxylasen der untersuchten Stämme konnten so um Faktoren von 5-8 angereichert werden, bei Ausbeuten zwischen 80-100%.

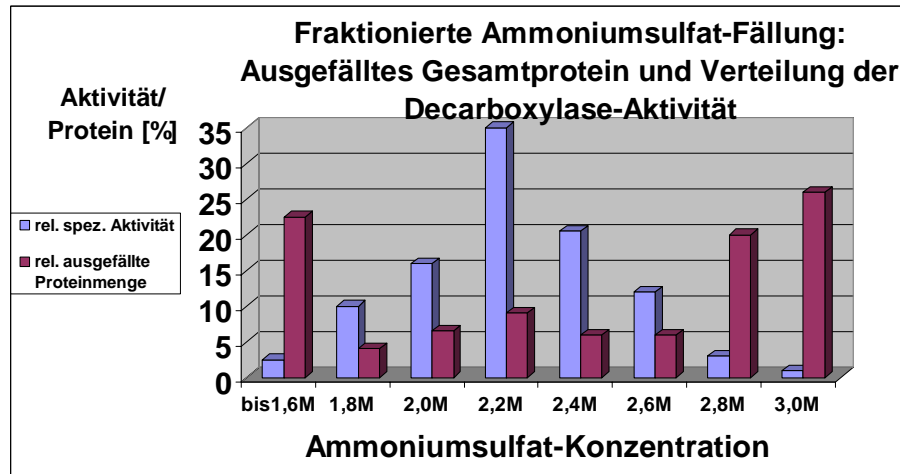


Abb. 3.19: Anreicherung der BCS-Decarboxylasen mittels fraktionierter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung. Gezeigt sind die Durchschnittswerte der gemäß den Ergebnissen der Ultrafiltration sieben kleinsten Decarboxylase-Aktivitäten für Mellitsäure aus sieben verschiedenen Stämmen. Die Mellitsäure-Decarboxylaseaktivität fällt bei Konzentrationen um 2,2M aus, begleitet von nur geringen Mengen Gesamtprotein, so daß mit dieser Methode eine Anreicherung um Faktoren von 5-8 möglich war.

3.6 Vorversuche zur Proteinreinigung mit klassischen Chromatographie-Methoden

3.6.1 Auswahl eines geeigneten Bakterienstammes

Die ersten Vorversuche zur Proteinreinigung wurden mit dem neu isolierten Bakterienstamm „Artern“ (vgl. 3.2.3) sowie dem von Lammerich (1998) gescreenten Stamm E.1 durchgeführt. „Artern“ wuchs jedoch sehr langsam und verfügte nur über eine geringe Decarboxylase-Aktivität im Rohextrakt, welche sich zudem nur mäßig über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung anreichern ließ (Faktor 3). E.1 produzierte bei Wachstum mit Pyromellitsäure sehr viel Schleim, welcher ebenfalls die Reinigung erschwerte. Daher wurde nach einiger Zeit der im Rahmen der Diplomarbeit (Rudat, 2000) isolierte Stamm *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*, vgl. 3.2.2 sowie Tab. 3.3) zur Erstreinigung einer Mellitsäure-Decarboxylase ausgewählt (vgl. auch 2.13.1). Die Charakteristika von *LFG19a* sind neben Abb. 3.20 zusammengefaßt.

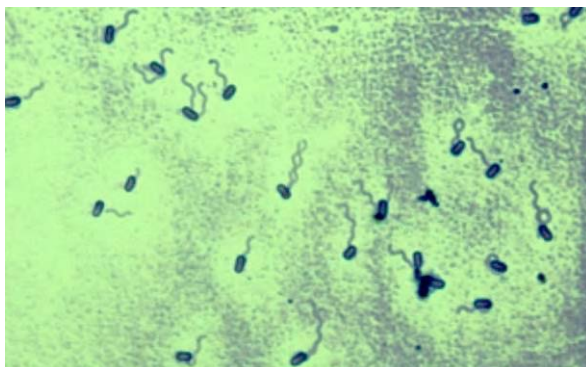


Abb. 3.20: Der Bakterienstamm *LFG19a*.

- ✓ Isoliert aus Erdprobe/Pyromellitsäure
- ✓ kleine Stäbchen, z.T. paarig, lebhaft beweglich durch 1-2 Geißeln
- ✓ breites Substratspektrum (polycarboxylierte Aromaten)
- ✓ „pflegeleicht“: gutes Wachstum im Schüttelkolben bis OD > 4 mit Pyromellitsäure
- ✓ relativ hohe Grundaktivität der Decarboxylase: bis 10mU/mg

3.6.2 Ionenaustauschchromatographie (IAC)

Mit den ausgesalzten Rohextrakten der Stämme „Artern“, E.1 und *LFG19a* (siehe oben) wurden Vorversuche in Ionenaustauschchromatographie (IAC) durchgeführt. Nach ersten Fehlschlägen wurden die weiteren Experimente nur noch mit Extrakten aus *LFG19a* vollzogen. Im Batch-Verfahren (Mikrozentrifugen-Gefäße bzw. kleine Reagenzgläser) wurde die Affinität dieser BCS-Decarboxylase zu acht verschiedenen Ionentauscherharzen überprüft (vgl. 2.10).

In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse der Vermessung der Überstände dieser Batch-Ansätze gezeigt. Es wurden jeweils 100µL einer Decarboxylase-Lösung zu 500µL der jeweiligen Ionentauscherharze gegeben.

Ionentauscher-Material*		c(Prot) [mg/mL]	Ausbeute Protein %	Vol-Akt. [mU/mL]	Ausb. [%] Aktivität	Spez.Akt. [mU/mg]	Anreich.- Faktor
Schwache Anionen- tauscher	1	0,60	46,2	17,0	85	28,3	1,84
	2	0,49	37,7	17,3	86	35,3	2,45
	3	0,40	30,8	18,5	92	46,25	3,0
Starke Anionen- tauscher	4	0,36	27,7	13,0	65	36,1	2,34
	5	0,50	38,5	9,0	45	18	1,17
	6	0,38	29,2	2,6	13	6,84	0,44
	7	0,52	40,0	13,8	69	26,5	1,72
Schw. Kation.	8	0,83	63,8	27,6	86,3	33,25	1,35
	9	0,69	53,1	26,9	84,1	39,0	1,58
St. Kat.	10	0,20	15,4	7,0	21,9	35	1,42

Tab. 3.4: Batch-Ansätze zur Ionenaustauschchromatographie. Hervorgehoben sind die Materialien mit der stärksten Affinität zur Decarboxylase (6) bzw. zum restlichen Protein (3).

Die Ausgangswerte der eingesetzten Proteinlösung waren wie folgt:

Proteinkonzentration: 1,3mg/mL; Volumenaktivität in Tris-Puffer: 20mU/mL; spezifische Aktivität: 15,4mU/mg; Volumenaktivität in Phosphat-Puffer: 32mU/mL; spezifische Aktivität: 24,6mU/mg.

*folgende Materialien wurden verwendet:

- 1 DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia)
- 2 Fractogel DMD 650 (Merck)
- 3 Ecteola 23 (Serva)
- 4 Dowex 2x8 (“)
- 5 Dowex 1x4
- 6 Dowex 1x2
- 7 Biorex (Biorad)
- 8 CM-Sephadex (Pharmacia)
- 9 Amberlite IRC-50 (Supelco)
- 10 Biorad AG MP-50 (Biorad)

Aufgrund dieser Methode wurden zwei Anionentauscherharze ausgewählt, von denen eines die Decarboxylase-Aktivität aus *LFG19a* besonders gut und selektiv adsorbierte (Dowex™ 1x2 Fa. Serva), während das andere kaum Affinität zur Decarboxylase zeigte, jedoch viel Gesamtprotein aus der Probe entfernte (Ecteola 23, Serva). Bei diesen Materialien wäre am ehesten die Möglichkeit einer selektiven Abtrennung der Decarboxylase vom Gesamtprotein zu erwarten gewesen.

Mit diesen beiden Materialien sollte im weiteren Verlauf der Arbeit eine Reinigung via Säulen-Ionenaustauschchromatographie etabliert werden. Leider ließen sich diese Ergebnisse nicht in größerem Maßstab reproduzieren. Bei Anwendung einer selbst aus einer Glaspipette hergestellten Kleinstsäule (5mL) kam es lediglich zu einer Anreicherung um den Faktor 2 bei ca. 65% Ausbeute.

3.6.3 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Des weiteren wurden Vorversuche über Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Materialien vom Typ SephadexTM (Pharmacia/Amersham) durchgeführt. Auch diese Versuche erfolgten zunächst im Batch-Verfahren, wobei jeweils kaum BCS-Decarboxylase in die Poren der verschiedenen Materialien diffundierte. Im Falle des Materials mit dem größten Porendurchmesser gelangte jedoch relativ viel übriges Protein in die Poren, wodurch eine Anreicherung der Decarboxylase im Ausschlußvolumen (Flüssigkeitsvolumen außerhalb der Poren) um den Faktor 2 resultierte (Durchführung wie bei der IAC, Verwendung von Phosphatpuffer 50mM mit pH 7,5).

Gelfiltrations-Material	c(Prot) [mg/mL]	Ausbeute Protein %	Vol-Akt. [mU/mL]	Ausb. [%] Aktivität	Spez.Akt. [mU/mg]	Anreich.-Faktor
Sephadex G 10	1,25	96,2	30,7	95,0	24,55	1,0
Sephadex G 50	1,1	84,6	29,6	92,5	26,9	1,1
Sephadex G 200	0,6	46,1	29,0	90,6	48,4	2,0

Tab. 3.5: Batch-Ansätze zur Gelpermeationschromatographie.

Die Ausgangswerte der eingesetzten Proteinlösung (in Phosphatpuffer 50mM pH 7,5) waren wie folgt: Proteinkonzentration: 1,3mg/mL; Volumenaktivität: 32mU/mL; spezifische Aktivität: 24,6mU/mg.

Die Decarboxylase-Aktivität verblieb in allen drei Fällen im Ausschlußvolumen des Chromatographie-Materials; durch die Diffusion übrigen Proteins in die Gelporen hinein kam es jedoch bei Sephadex G200 zu einer Anreicherung der Decarboxylase im Überstand.

Mit Hilfe einer selbst hergestellten Kleinstsäule (Pasteur-Pipette gefüllt mit Sephadex G200) ließ sich eine Anreicherung des Enzyms um einen Faktor 3 bei einer Ausbeute von 75 % erzielen. Das Elutionsprofil dieses Versuchs ist in Abb. 3.21 dargestellt. Wie schon aus den Batch-Versuchen zu erahnen war, eluierte die Mellitsäure-Decarboxylase direkt durch die Säule, während offenbar viel anderes Protein vom Säulenmaterial länger zurückgehalten wird.

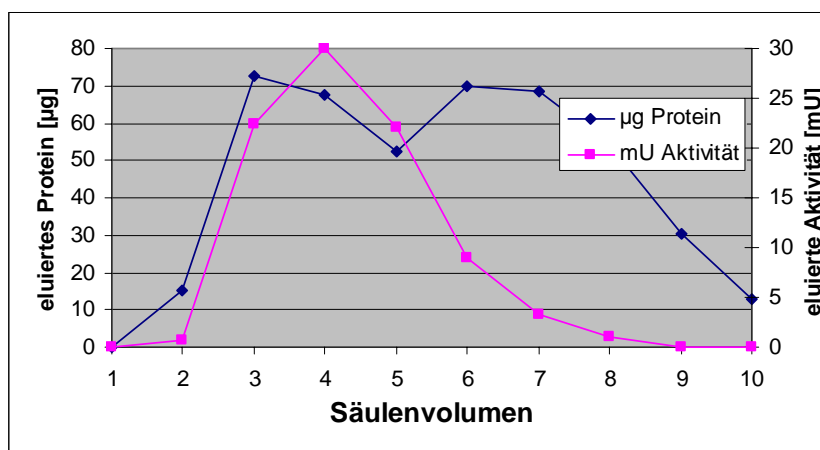


Abb. 3.21: Elutionsprofil der GPC im Kleinstsäulen-Maßstab. Deutlich ist zu erkennen, daß die Mellitsäure-Decarboxylase sich unter den ersten Proteinen befindet, welche von der Säule eluieren.

Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht auf einen größeren Maßstab übertragen; vielmehr kam es zu einer deutlichen Verbreiterung des Decarboxylase-Peaks bzw. -Tableaus. Zudem bewegten sich die Messungen der Decarboxylase-Aktivitäten infolge der Verdünnung bei der GPC hart an der Nachweisgrenze, so daß sich auch diese Methode als ungeeignet zur Reinigung der Mellitsäure-Decarboxylase erwies.

3.6.4 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

Die lipophilen Materialien zur HIC erwiesen sich als völlig ungeeignet. Bei den Batch-Versuchen kam es weder zu einer nennenswerten An- noch zu einer Abreicherung der Decarboxylase-Aktivität im Überstand. Es wurde wiederum in Phosphat-Puffer aufgenommene ausgesalzte Enzymlösung verwendet, d.h. die Volumenaktivität betrug 32mU/mL, die spezifische Aktivität 24,6mU/mg und die Proteinkonzentration 1,3mg/mL. Tabelle 3.6 zeigt die Vermessung der Überstände bzw. des Ausschlußvolumens der Materialien.

Lipophiles Material	c(Prot) [mg/mL]	Ausbeute Protein %	Vol-Akt. [mU/mL]	Ausb. [%] Aktivität	Spez.Akt. [mU/mg]	Anreich.-Faktor
Sephadex lipophilic	1,0	76,9	29,4	91,9	29,5	1,2
Sephadex LH-60	1,0	76,9	27,0	83,6	27,0	1,1

Tab. 3.6: Batch-Ansätze zur Hydrophoben Interaktionschromatographie.

Die Ausgangswerte der eingesetzten Proteinlösung (in Phosphatpuffer 50mM pH 7,5) waren wie folgt: Proteinkonzentration: 1,3mg/mL; Volumenaktivität: 32mU/mL; spezifische Aktivität: 24,6mU/mg.

Weder wurde die Decarboxylase von den Materialien selektiv gebunden, noch kam es zu einer Anreicherung der Decarboxylase-Aktivität im Überstand.

3.7 Herstellung der Matrix für die Liganden-Affinitätschromatographie (LAC)

Da die klassischen Verfahren zur Proteinreinigung sich als wenig geeignet für die Reinigung einer Mellitsäure-Decarboxylase erwiesen hatten, wurde eine Methode entwickelt, bei der die (Bio-)Affinität dieses Enzyms zu seinem Substrat ausgenutzt werden sollte. Hierzu wurde Mellitsäure nach vorheriger Aktivierung durch ein Carbodiimid kovalent an ein vorderivatisiertes Säulenmaterial (EAH Sepharose 4B, vgl. 2.11.2, Abb. 2.5) gebunden.

3.7.1 Vorversuche zur Derivatisierung der LAC-Matrix

Um das Säulenmaterial besser kennen zu lernen und die Kopplungsbedingungen auszuloten, wurde zunächst versucht, verschiedene carboxylierte Farbstoffe an EAH Sepharose 4B zu binden (Fakoussa, pers. Mitteilung; vgl. 2.11.3). Dieses gelang mit Alizarin gelb (Abb. 2.7); hierbei wurde auch EDC (Abb. 2.6) als das (gegenüber CMC) geeignetere Carbodiimid ermittelt, da CMC mit dem Säulenmaterial interagiert (Schleimbildung) und EDC sich zudem in erheblich höheren Konzentrationen lösen ließ.

Die Kopplungseffizienz konnte anhand der Färbung des Matrixmaterials mit bloßem Auge abgeschätzt werden. Zur genaueren Untersuchung erfolgte zudem eine photometrische Quantifizierung: Alizarin gelb besitzt ein Absorptionsmaximum bei 350nm. Mittels einer Eichreihe konnte folgende Beziehung hergestellt werden: $E_{350\text{nm}}/25 = c(\text{Alizarin gelb})[\text{mM}]$.

Tabelle 3.7 zeigt eine Untersuchung des Einflusses der Kopplungsdauer auf die Bindung von Alizarin gelb an EAH-Sepharose 4B. Hierbei wurde Alizarin gelb in unterschiedlichen Konzentrationen jeweils mit und ohne EDC mit dem Matrixmaterial inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Absorption des Überstandes bei 350nm vermessen. Dabei ergab sich, daß die Kopplung mindestens über Nacht erfolgen sollte; eine achtstündige Kopplung erwies sich als nicht ausreichend.

Abb. 3.22 zeigt die Pellets der oben erläuterten Untersuchung bezüglich der Kopplungsdauer.

Zeitpunkt der Probennahme	[Aliz]= 1mM ohne EDC	[Aliz]= 1mM [EDC]=0,4M	[Aliz]= 10mM ohne EDC	[Aliz]= 10mM [EDC]=0,4M
t_0	0,50	0,55	4,0	4,2
8h	0,56	0,38	3,85	3,4
24h	0,49	0,15	4,1	3,0

Tab. 3.7: Konzentrationen von Alizarin gelb [mM] im Ausschlußvolumen verschiedener Kopplungsansätze. Es wurden jeweils 375 μ L Sepharose und Alizarin gelb zusammengegeben. Das Volumen der EDC-Lösung betrug 250 μ L. Deutlich zu sehen ist die Abnahme der Konzentration bei Verwendung des Carbodiimides, während ohne EDC die Konzentration im Überstand ungefähr gleich bleibt.

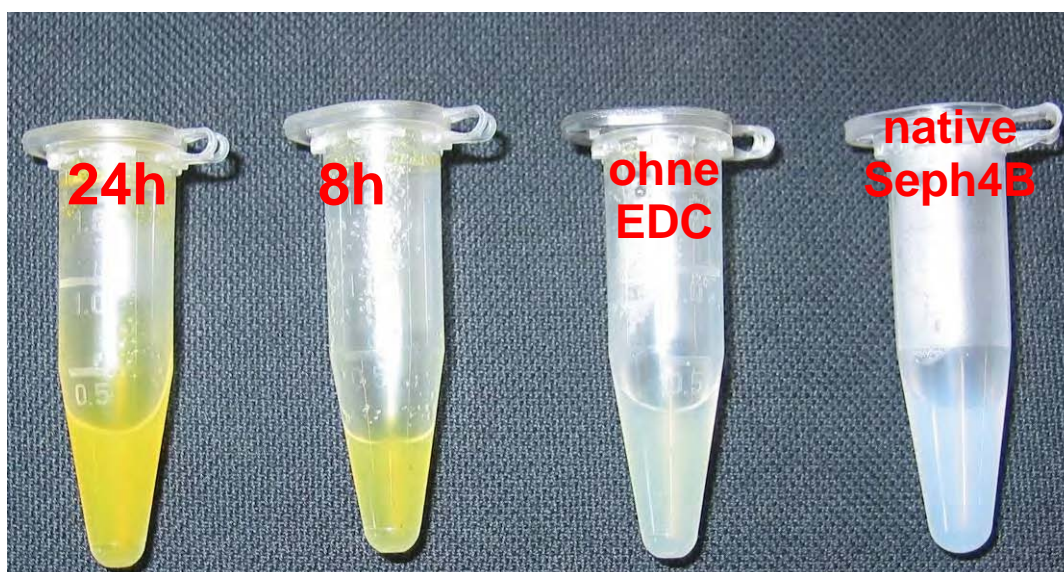


Abb. 3.22: Einfluß der Kopplungsdauer auf die kovalente Kopplung von Alizarin gelb an EAH-Sepharose 4B. Die Färbung im Sediment ist nach 24h deutlich intensiver als nach 8h. Der Kopplungsansatz ohne EDC zeigt die unspezifische Anlagerung geringer Mengen des Farbstoffes. Rechts ist zum Vergleich die unbehandelte Matrix gezeigt.

Anschließend erfolgte die Kopplung von Benzoesäure als dem einfachsten carboxylierten Aromaten. Hierbei wurde eine Hydrophobierung des Materials beobachtet, da durch die kovalente Bindung über die Carboxylgruppe eine Phenyl-Sepharose hergestellt wurde, wie sie ja auch zur HIC eingesetzt wird.

Als höhere Benzencarbonsäuren wurden Benzen-1,2,4-tricarbonsäure sowie Pyromellitsäure gekoppelt. Die Bindung dieser Liganden an die Sepharose ließ sich über die erheblich höhere UV-Absorption des Materials nach der Kopplung nachweisen. Da allerdings nur ein geringer Teil der BCS kovalent gebunden wurde (der Ligand wurde im Verhältnis zur Matrix im zehnfachen Überschuß zugegeben), konnte im Überstand keine Abnahme der Absorption gemessen werden.

3.7.2 Kopplung von Mellitsäure an EAH Sepharose 4B

Es wurden nun zahlreiche Ansätze durchgeführt, bei denen Mellitsäure an EAH Sepharose 4B gekoppelt wurde. Variiert wurden zunächst die Konzentrationen an Ligand und Carbodiimid, anschließend der pH-Wert. Die Quantifizierung der Kopplungseffizienz erfolgte wie unter 2.12.2 beschrieben.

3.7.2.1 Variation der Konzentration von Ligand und Carbodiimid

Die Angaben des Herstellers erlauben einen großen Spielraum bezüglich der Kopplungsbedingungen (AmershamPharmacia, 2002). Empfohlen wurde die Einstellung eines pH-Wertes von 4,5 (säurekatalysierte Aktivierung durch das Carbodiimid). Zunächst wurde überlegt, die Mellitsäurekonzentration etwa so hoch zu halten wie die Konzentration möglicher Bindungsstellen an der Sepharose (etwa 10mM). Außerdem wurde zur Vermeidung von Quervernetzungen durch Aktivierung mehrerer Carboxylgruppen eines einzelnen Mellitsäuremoleküls die Konzentration an Carbodiimid auf 1/6 der Mellitsäure-Konzentration eingestellt (d.h. ein Molekül EDC pro Carboxylgruppe). Insbesondere die zweite Überlegung erwies sich jedoch als unzutreffend; in der Tat bedurfte es eines großen Überschusses an Carbodiimid, um eine ausreichende Zahl Carboxylgruppen zu aktivieren. Auch die Mellitsäurekonzentration wurde letztlich so hoch wie möglich gewählt. Tabelle 3.8 zeigt einige repräsentative Kopplungsergebnisse (modifiziert nach Rudat und Fakoussa, 2003). Bei höheren Konzentrationen von Carbodiimid oder Ligand kam es zu Ausfällungen.

c(EDC)	c(Mellitsäure) im Ansatz		
	15 mM	30 mM	50 mM
100 mM	0,10mM	0,15mM	0,2mM
300 mM	0,24mM	0,50mM	0,54mM
600 mM	0,51mM	1,10mM	2,33mM
	c(Mellitsäure) gebunden an Seph4B		

Tabelle 3.8: Konzentrationen kovalent an EAH Sepharose 4B gebundener Mellitsäure in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen von Ligand und Carbodiimid (nach Rudat und Fakoussa, 2003).

Die Konzentrationen wurden anhand der UV-Absorption des Materials bei 235nm über den Extinktionskoeffizienten der Mellitsäure berechnet. Die hier maximal erreichte Konzentration von 2,33mM entspricht einer Besetzung von über 20% der potentiellen Bindungsstellen der EAH Sepharose 4B.

Bei hoher Kopplungseffizienz zeigte die derivatisierte Matrix zudem das charakteristische UV-Spektrum der Mellitsäure (Abb. 3.23)

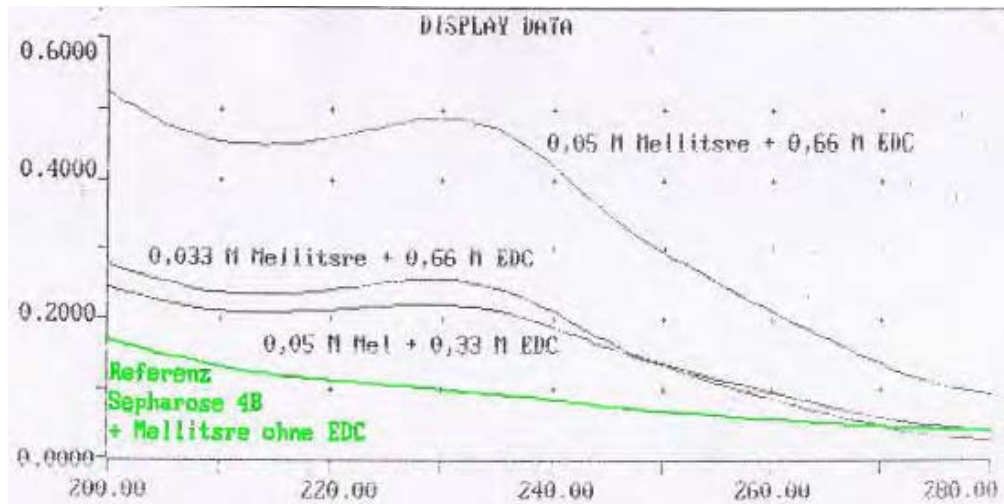


Abb. 3.23: Kopplung von Mellitsäure an EAH Sepharose 4B bei verschiedenen Konzentrationen von Carbodiimid und Mellitsäure. Als Negativkontrolle fungierte ein Kopplungsansatz ohne EDC (grün). Gezeigt sind UV-Spektren der 1:100 verdünnten Matrix in Wasser.

3.7.2.2 Variation des pH-Wertes

Nach Angaben des Herstellers soll die Kopplung am besten im Sauren (pH 4,5) durchgeführt werden. Zur Überprüfung dieser Angaben wurden Kopplungsversuche bei pH-Werten von 4,0-9,0 durchgeführt. Da sich hierbei eine bessere Kopplungseffizienz im neutralen Bereich ergab, wurde der pH-Bereich weiter eingengt. Tatsächlich verlief die Derivatisierung der Matrix mit Mellitsäure bei pH-Werten um 7 deutlich besser (Abb. 3.24).

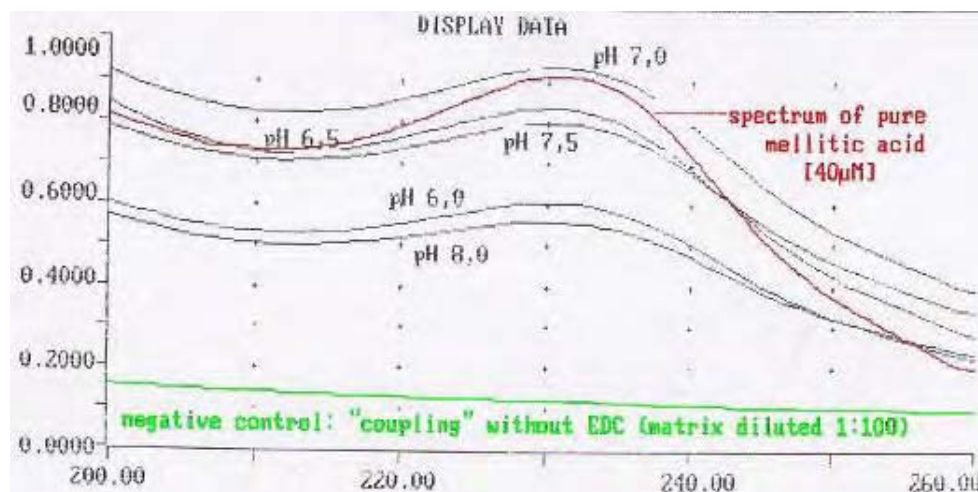


Abb. 3.24 Kopplung von Mellitsäure an EAH Sepharose 4B bei verschiedenen pH-Werten. Als **Negativkontrolle** fungierte ein Kopplungsansatz ohne EDC (grün), als **Positivkontrolle** wurde ein UV-Spektrum von (freier) Mellitsäure aufgenommen (rot). Zur Aufnahme der Spektren wurde wiederum die derivatisierte Matrix 1:100 in Wasser verdünnt.

Durch Kombination der pH- und Konzentrationsoptima (50mM Mellitsäure, 600mM EDC, pH 7,0) konnte der Derivatisierungsgrad der Matrix auf über 5mM Mellitsäure ($\geq 50\%$ Besetzung der Bindungsstellen) verbessert werden (Abb. 3.25a und b).

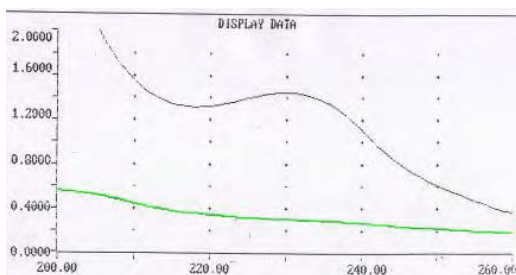


Abb. 3.25a: UV-Spektrum von mit Mellitsäure derivatisierter (schwarz) und nicht derivatisierter (grün) EAH Sepharose 4B (jeweils 1:100 verd. In Wasser).

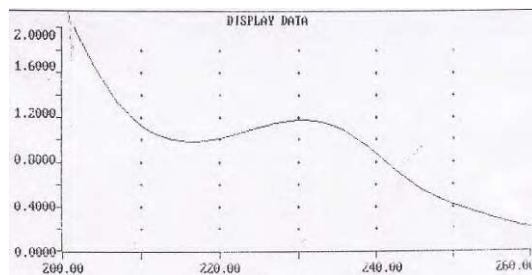


Abb. 3.25b: Differenzspektrum im Zweistrahl-photometer (Substanzen wie Abb. 3.25a)

Mit dieser Matrix wurde im Anschluß die Liganden-Affinitätschromatographie durchgeführt.

3.7.2.3 Nachweis der Kopplung von Mellitsäure über Infrarotspektroskopie

Zur Überprüfung der Kopplung von Mellitsäure an die Sepharose-Matrix wurden zusätzlich IR-Spektren von derivatisierter und nicht derivatisierter EAH Sepharose 4B aufgenommen. Die nativ belassene Sepharose zeigte im wesentlichen die gleichen Banden wie monomere Zucker (vgl. Abb. 3.26), d.h. die verschiedenen (C-O)-, (C-H)-/(C-H₂)-, (C-OH)- und (O-H)-Schwingungen von Alkoholen sowie eine ausgeprägte Ether-Bande um 1100cm⁻¹. Die zusätzliche Bande bei etwa 1650cm⁻¹ könnte auf die Aminogruppe des Spacers zurückzuführen sein.

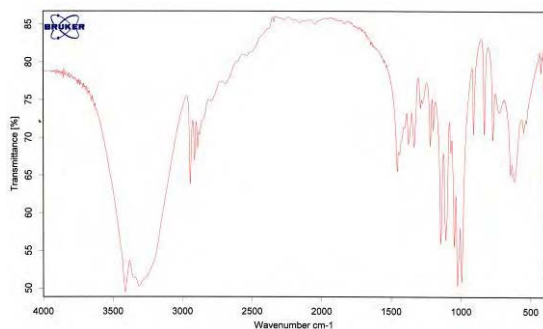


Abb. 3.26a: IR-Spektrum eines KBr-Preßlings von D-Glucose als Vergleich.

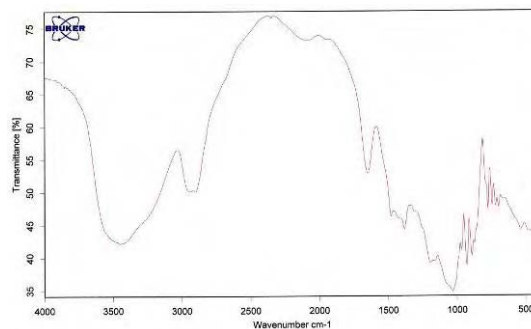


Abb. 3.26b: IR-Spektrum eines KBr-Preßlings von EAH Sepharose 4B.

Funktionelle Gruppe	Bindung	Wellenzahl	Schwingung
Ether	C-O-C	1070-1150	
Alkohole	C-OH	1000-1250	
“	-C-O	1150-1040	(C-O)-Valenzschwingung
“	---O-H	1260-1410	(O-H)-Deformationsschw.
Freies OH	---OH	3650-3590	(O-H)-Valenzschwingung
H-Brücken	---O-H	3200-3600	
(Aliphaten)	--CH ₂ --	2960-2850	(C-H)-Valenzschwingung
(Aliphaten)	--CH ₂ --	1470-1430	(C-H)-Deformationsschw.

Tab. 3.9: Schwingungen von Zucker-Monomeren und des Sepharose-(Agarose-Polymer-)Grundgerüsts (hergeleitet nach Hesse et. al., 2002).

Nach der Kopplung von Mellitsäure finden sich zusätzliche funktionelle Gruppen, die bei folgenden Wellenzahlen charakteristische Schwingungen zeigen (vgl. auch 3.1.4):

Funktionelle Gruppe	Bindung	Wellenzahl	Schwingung
Aryl-Kohlenstoff	C=C	um 1500	(C=C)-Valenzschwingung
Aryl-Carboxylgruppe	Ar-C=O	1680-1700	(C=O)-Valenzschwingung
“	Ar-C-O	um 1300	(C-O)-Valenzschwingung
breite Carboxyl-Hydroxyl	---O-H	2400-3400	(O-H)-Valenzschwingung
Amid (Peptidbdg.)	-CONH-	3070-3460	(O-H)-Valenzschwingung

Tab. 3.10: Charakteristische Absorptionen der funktionellen Gruppen (gekoppelter) Mellitsäure.

Abbildung 3.27 zeigt die IR-Spektren von mit Mellitsäure derivatisierter EAH Sepharose 4B sowie das Differenzspektrum gegen nicht derivatisierte Sepharose. In der Tat lassen sich in genau den erwarteten Bereichen deutliche Abnahmen der Transmission feststellen. Insbesondere der charakteristische Peak der Carbonylgruppen (C=O) um 1700cm^{-1} tritt deutlich hervor (vgl. auch das IR-Spektrum von Mellitsäure in Abb. 3.5).

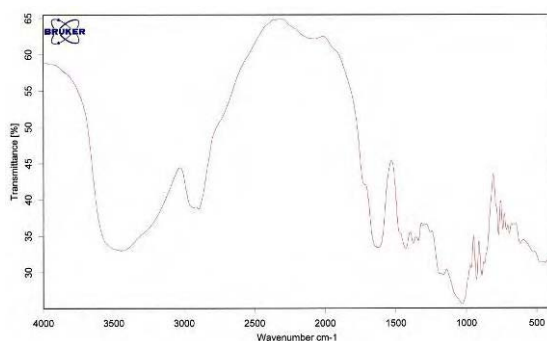


Abb. 3.27a: IR-Spektrum von mit Mellitsäure derivatisierter EAH Sepharose 4B. Der Carbonylgruppen-Peak um 1700cm^{-1} läßt sich bereits erahnen.

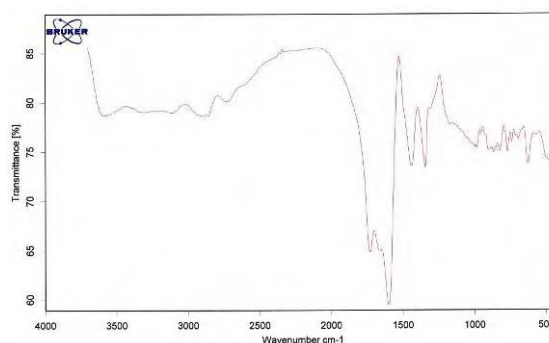


Abb. 3.27b: Differenzspektrum von derivatisierter und nicht derivatisierter Sepharose. Deutlich tritt der (C=O)-Peak um 1700cm^{-1} hervor. Zudem lassen sich der Aryl-C=C-Peak um 1500cm^{-1} , der C-O-Peak der Carboxylgruppen um 1300cm^{-1} sowie die breite Schwingung der Hydroxylfunktion der Carboxylgruppen und der neu geknüpften Peptidbindung ausmachen.

Somit konnte ein zusätzlicher Nachweis der gelungenen Kopplung von Mellitsäure an EAH Sepharose 4B erbracht werden.

3.8 Proteinreinigung

Zur Reinigung einer Mellitsäuredecarboxylase mit Hilfe der oben hergestellten Liganden-Affinitätschromatographiematrix wurde der Stamm *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) ausgewählt (vgl. 3.6.1).

3.8.1 Bestimmung der Optima der Mellitsäure-Decarboxylase aus *LFG19a*

Zur gezielteren Reinigung der Decarboxylase wurden zunächst die Bereiche der optimalen katalytischen Funktion ermittelt.

3.8.1.1 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde eine identische Menge Rohextrakt einer mit Pyromellitsäure als einziger C-Quelle gewachsenen Kultur des Stammes *LFG19a* in Phosphatpuffer unterschiedlichen pH-Wertes mit Mellitsäure versetzt und wie unter 2.7.2 beschrieben die Aktivität gemessen. Es ergab sich ein deutliches Optimum der enzymatischen Aktivität bei pH 6,5 (vgl. Abb. 3.28). Eine Steigerung bzw. Senkung der H_3O^+ -Konzentration um 1,5 pH-Einheiten hatte eine deutliche Reduzierung der Enzymaktivität um 40% bzw. 30% zur Folge.

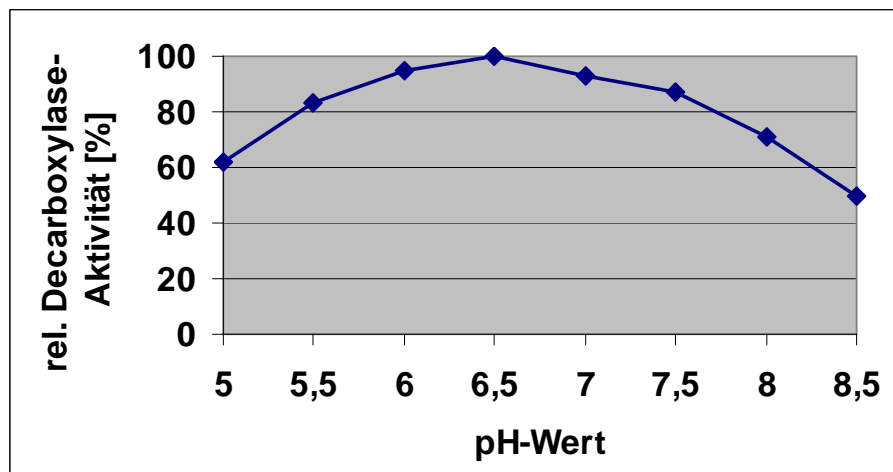


Abb. 3.28 Aktivität der Mellitsäure-Decarboxylase aus *Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens* (*LFG19a*) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Aktivität erreichte ihr Optimum bei pH 6,5.

3.8.1.2 Bestimmung des Ionenstärke-Optimums

Zur Bestimmung des Ionenstärke-Optimums wurde eine identische Menge Rohextrakt einer mit Pyromellitsäure als einziger C-Quelle gewachsenen Kultur des Stammes *LFG19a* in Phosphatpuffer (pH 6,5) unterschiedlicher Ionenstärke mit Mellitsäure versetzt und wie unter 2.7.2 beschrieben die Aktivität gemessen. Hierbei zeigte sich, daß die Decarboxylase über einen extrem weiten Bereich aktiv ist (vgl. Abb. 3.29):

Zwar war die Aktivität bei 50mM deutlich am höchsten. Aber sowohl bei 300mM wie auch bei 0,5mM Ionenstärke waren immer noch 50% der maximalen Aktivität messbar (die Pufferkonzentration von 0,5mM ergab sich durch die Aufnahme von 10 μ L Rohextrakt (gepuffert in 50mM Phosphatpuffer) in 1mL Wasser). Das bedeutet, daß diese Decarboxylase praktisch ohne Pufferung immer noch über eine hohe Aktivität verfügt.

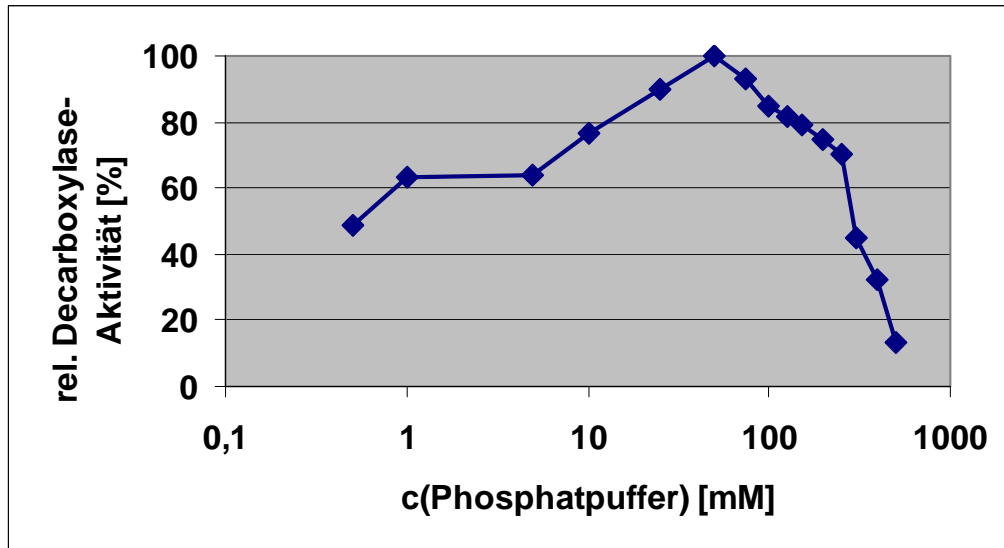


Abb. 3.29 Halblogarithmische Darstellung der Aktivität der Mellitsäure-Decarboxylase des Stammes *LFG19a* in Abhängigkeit von der Ionenstärke in Phosphatpuffer (pH 6,5). Die Aktivität erreichte ihr Optimum bei 50mM.

3.8.2 Vorreinigung der Decarboxylase

Zur Vorbereitung für die Liganden-Affinitätschromatographie wurde die Mellitsäure-Decarboxylase des Stammes *LFG19a* durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (vgl. 2.9.1) angereichert.

Aus Vorversuchen (vgl. 3.5.3) war bekannt, in welchem Bereich mit dem Ausfall der Mellitsäure-Decarboxylase zu rechnen war. Daher wurde die Fällung in nur vier Schritten durchgeführt (Abb. 3.30). Hierbei fiel der größte Teil der Decarboxylase-Aktivität bei Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 2,2M aus. Dies führte zu einer Anreicherung um den Faktor 4,9 (gegenüber dem ultrazentrifugierten Rohextrakt) bei einer Ausbeute von 70%.

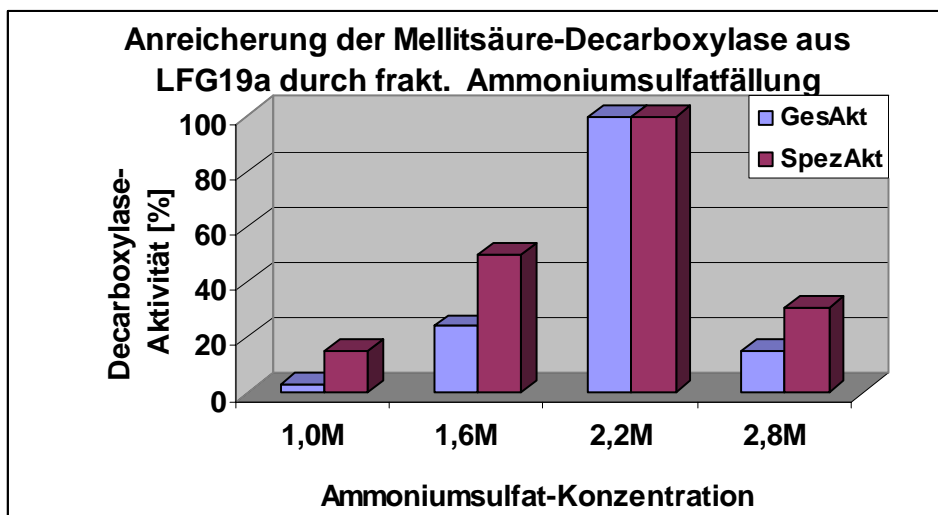


Abb. 3.30: Relative Verteilung der Decarboxylase-Aktivität in den verschiedenen Fraktionen der Ammoniumsulfat-Fällung. Die höchsten Werte der Gesamtaktivität [mU] bzw. spezifischen Aktivität [mU/mg] fanden sich in der Fraktion bei 2,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration. Für die Graphik wurden diese Werte gleich 100% gesetzt und die anderen Werte hierauf bezogen.

Die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität ($c[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 1,6\text{-}2,2\text{M}$) wurde durch Ultrafiltration mit UF-Röhrchen der Firma Microcon bei einer Ausschlußgröße von 30kDa entsalzt und eingengt (vgl. 2.9.2). Z.T. wurde hierbei auch ein Pufferwechsel durchgeführt. Durch Entfernung kleinerer Proteine und Peptide (<30kDa) kam es hierbei auch zu einer Anreicherung der Decarboxylase um einen Faktor 1,5-1,8.

3.8.3 Bindung der Decarboxylase an die Affinitätssäule

Zur Adsorption der Mellitsäure-Decarboxylase wurden die optimalen Bedingungen der katalytischen Aktivität ausgewählt, d.h. die Säule wurde mit 50mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 equilibriert. Vor dem Auftrag der (ausgesalzten) Decarboxylase-Probe wurde diese mittels Ultrafiltration eingengt, entsalzt und anschließend ebenfalls in diesem Puffer aufgenommen.

Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen bis zu 1U Decarboxylase-Aktivität pro mL Matrixmaterial gebunden werden konnte. Allerdings adsorbierte hierbei auch 1/3 des aufgetragenen Gesamtproteins, so daß über die Bindung nur eine Anreicherung um den Faktor 3 gelang.

3.8.4 Bestimmung der idealen (spezifischen) Elutionsbedingungen

Da relativ viel aufgetragenes Protein unspezifisch an die Säule adsorbierte, mußte die eigentliche Reinigung der Mellitsäure-Decarboxylase über eine möglichst spezifische Elution erfolgen. Hierzu wurden mehrere Ansätze durchgeführt, in denen verschiedene Parameter variiert wurden.

3.8.4.1 Elution durch Erhöhung des pH-Wertes

Nach Auftrag der Decarboxylase-Probe bei pH 6,5 (50mM) wurde der pH-Wert schrittweise um 0,1 Einheiten erhöht. Vor jeder Änderung des pH-Wertes wurden jeweils fünf Säulenvolumina Phosphatpuffer zugegeben. Es zeigte sich, daß die Decarboxylase-Aktivität ab pH 6,8-6,9 zu eluieren beginnt (vgl. Elutionsprofil in Abb. 3.31a). Bei pH 7,3 ist der Hauptteil der Decarboxylase von der Säule gewaschen. Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes um je 0,5 pH-Einheiten eluieren jeweils nur noch Spuren von Decarboxylase und Gesamtprotein.

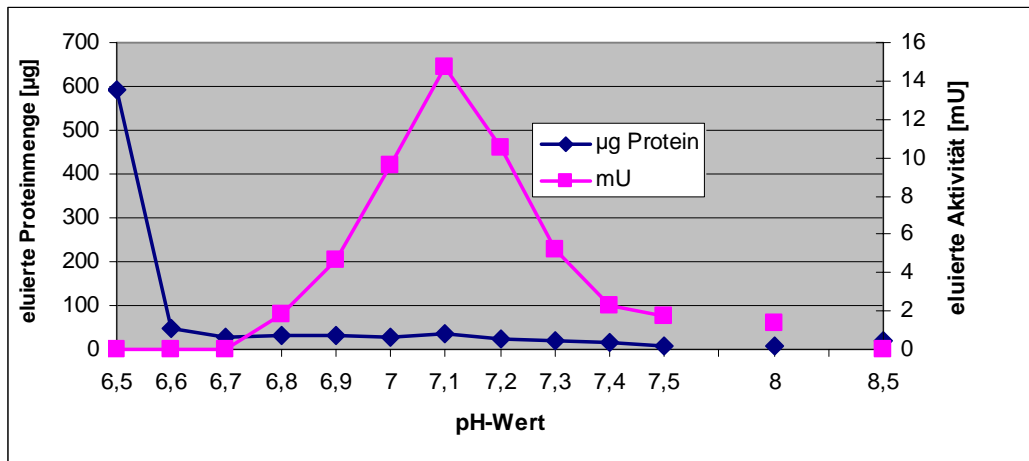


Abb. 3.31a: Elutionsprofil der Liganden-Affinitätschromatographie bei Elution durch Erhöhung des pH-Wertes (Kaliumphosphatpuffer 50mM). Die aufgefangenen Fraktionen (fünf Säulenvolumina je pH-Wert) wurden spektralphotometrisch auf ihre Decarboxylase-Aktivität untersucht. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Warburg und Christian.

Im Folgenden wurde dieser Versuch als Einschritt-Elution durchgeführt: Der Auftrag erfolgte bei pH 6,7, die Elution bei pH 7,3 (die Ionenstärke betrug jeweils 50mM). Auf diese Weise wurde eine Anreicherung um den Faktor 9 erreicht.

3.8.4.2 Elution durch Erhöhung der Ionenstärke

Nach Auftrag der Decarboxylase-Probe bei einer Ionenstärke von 50mM (pH 6,7) wurde diese schrittweise um 50mM erhöht. Vor jeder Änderung der Ionenstärke wurden jeweils fünf Säulenvolumen Puffer zugegeben. Die Decarboxylase-Aktivität eluiert bereits bei geringer Erhöhung der Ionenstärke (vgl. Elutionsprofil in Abb. 3.31b). Bei 150mM ist der Hauptteil der Decarboxylase von der Säule gewaschen. Bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke eluieren nur noch geringe Mengen an Decarboxylase und Gesamtprotein.

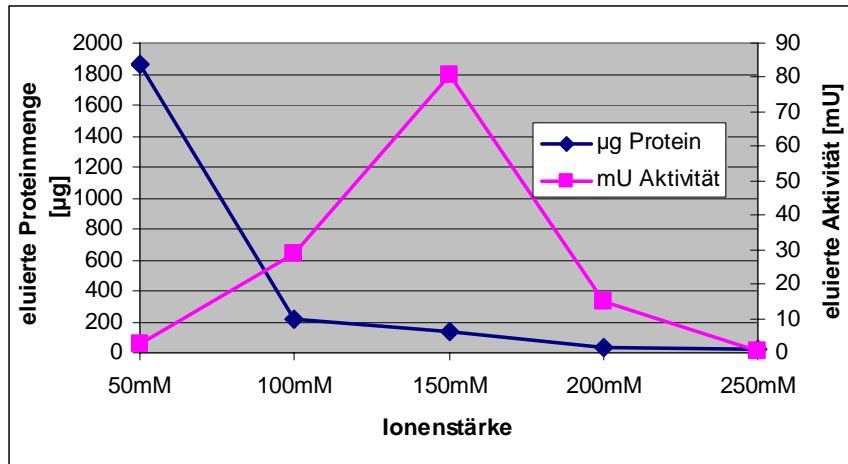


Abb. 3.31b: Elutionsprofil der Liganden-Affinitätschromatographie bei Elution durch Erhöhung der Ionenstärke (Kaliumphosphatpuffer pH 6,7). (Zur Erstellung des Profils vgl. Abb. 3.31a)

Auch diese Elutionsmethode wurde als Einschritt-Elution vereinfacht: Der Auftrag erfolgte bei einer Ionenstärke von 75mM, die Elution bei 150mM (der pH-Wert betrug jeweils 6,7). Auf diese Weise wurde ein Anreicherungsfaktor 11 erzielt.

3.8.4.3 Kombination beider Elutionsverfahren

Das Eluat einer über Erhöhung des pH-Wertes angereicherten Decarboxylase wurde eingeeengt und erneut auf die (inzwischen gereinigte) Säule aufgetragen. Anschließend wurde über Erhöhung der Ionenstärke eluiert. Auf diese Weise wurden beide Elutionsmethoden kombiniert (beide Methoden wurden als Einschritt-Elutionen durchgeführt). Insgesamt wurde so ein Reinigungsfaktor von 17 erreicht.

3.8.4.4 Spezifische Elution durch Zugabe von Mellitsäure zum Elutionspuffer

Durch Zugabe des Enzymsubstrates Mellitsäure in unterschiedlichen Konzentrationen zur adsorbierten Decarboxylase wurde versucht, diese spezifisch abzulösen. Der Probenauftrag erfolgte in 75mM Phosphatpuffer, pH 6,7. Die Elution erfolgte im selben Puffer, dessen Mellitsäure-Konzentration nach jeweils fünf Säulenvolumen um je 25µM erhöht wurde. Ab einer Konzentration von 50µM Mellitsäure kam es zu einer Elution der Decarboxylase (vgl. Elutionsprofil in Abb. 3.31c).

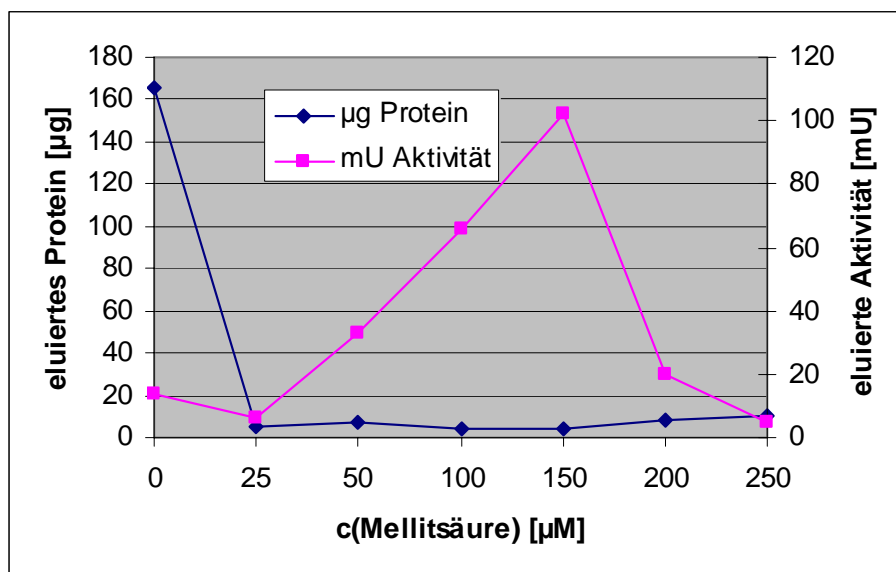


Abb. 3.31c: Elutionsprofil der Liganden-Affinitätschromatographie bei Elution durch Zugabe von Mellitsäure zum Elutionspuffer (Kaliumphosphatpuffer 75mM, pH 6,7). Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford, da die UV-Absorption der Mellitsäure in den aufgefangenen Fraktionen eine Bestimmung nach Warburg und Christian unmöglich machte.

Hierbei ergab sich ein interessanter Nebeneffekt: Die zugegebene Mellitsäure wurde beim Säulendurchlauf zu Pyromellitsäure decarboxyliert (gezeigt über UV-Spektrum der Eluate), und zwar auch dann, wenn kaum oder gar keine Decarboxylase von der Säule eluierte ($c[\text{Mel}] = 25\mu\text{M}$).

Diese Elutionsmethode wurde wiederum als Einschritt-Elution vereinfacht: Der Auftrag erfolgte in 75mM Phosphatpuffer bei pH 6,7 ohne Mellitsäure, die Elution wurde im gleichen Puffer durchgeführt, welcher zusätzlich 250 μM Mellitsäure enthielt. Die aufgefangenen Fraktionen enthielten zusammen 50-70% der aufgetragenen Mellitsäure-Decarboxylaseaktivität, welche um Faktoren von 40-60 angereichert vorlag.

3.8.4.5 Erhöhung der Spezifität durch Senkung von pH-Wert und Ionenstärke

Parallel zur spezifischen Elution der Mellitsäure-Decarboxylase eluierte auch immer unspezifisch weiteres Protein. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde die Affinitäts-Elution dahingehend modifiziert, daß pH-Wert und Ionenstärke des Elutionspuffers erniedrigt wurden (40mM, pH 6,0). Dadurch sollte unspezifisch an die Matrix adsorbiertes Protein fester an diese gebunden werden. In der Tat konnte so der Anreicherungsfaktor weiter erhöht werden, und zwar auf Werte bis zu 175. Wie im Elutionsprofil deutlich zu sehen ist (Abb. 3.31d), befand sich nach der spezifischen Elution noch eine beträchtliche Menge Protein auf der Säule, welches durch Phosphatpuffer 100mM, pH 8,5 eluiert werden konnte. In allen vorherigen

Elutionsversuchen wurde durch diesen zweiten Elutionspuffer so gut wie kein Restprotein mehr von der Säule gewaschen (vgl. auch 3.8.4.1.); folglich eluierte dieses zuvor zeitgleich mit der Decarboxylase. Dies erklärt die weitere deutliche Erhöhung des Anreicherungsfaktors.

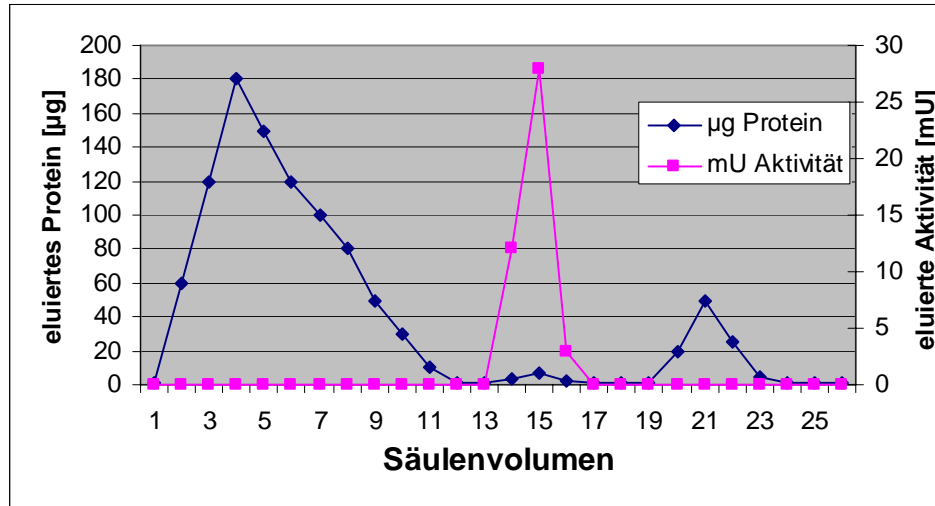


Abb. 3.31d: Elutionsprofil der Liganden-Affinitätschromatographie bei Elution durch Zugabe von Mellitsäure [300µM] zum Elutionspuffer (Kaliumphosphatpuffer 75mM, pH 6,7) bei gleichzeitiger Senkung von pH-Wert und Ionenstärke (auf pH 6,0 / 40mM). Die Proteinbestimmung erfolgte wiederum nach Bradford.

3.8.5 Vergleich der verschiedenen Elutionsmethoden

Durch Zugabe von Mellitsäure zum Elutionspuffer konnte die Anreicherung der Mellitsäure-Decarboxylase gegenüber den „klassischen“, unspezifischen Elutionsmethoden (Erhöhung von pH-Wert und/oder Ionenstärke) um einen Faktor 3-5 verbessert werden. Die zusätzliche Senkung von pH-Wert und Ionenstärke führt zu einer zusätzlichen Steigerung um einen Faktor 3. Insgesamt konnten dadurch Reinigungsfaktoren erzielt werden, die im dreistelligen Bereich lagen.

Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden sind in Abb. 3.32 vergleichend dargestellt.

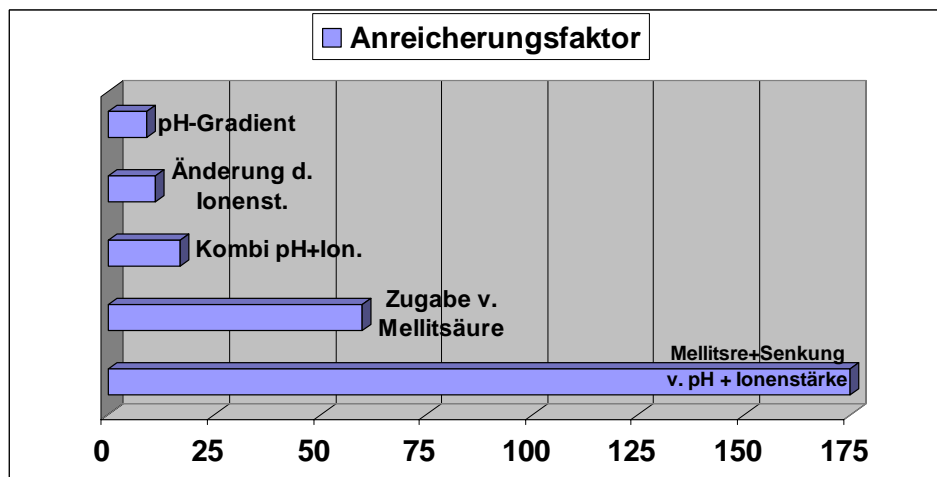


Abb. 3.32: Vergleich der verschiedenen Elutionsmethoden. Gezeigt sind jeweils die maximal erreichten Anreicherungsfaktoren.

3.8.6 Anreicherung und Reinigung der Mellitsäure-Decarboxylase

Der Stamm *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense*) wurde wie unter 2.4.1 beschrieben in Mineralsalzmedium mit Pyromellitsäure als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen. Nach Zellernte und -aufschluß wurden die Zelltrümmer sowie die Zellmembranen mittels Ultrazentrifugation abgetrennt (Fraktion 1). Die Mellitsäure-Decarboxylase wurde durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung angereichert (Überstand 1,6M gefällt mit 2,2M → Fraktion 2). Durch Ultrafiltration wurde das Pellet der Ammonium-sulfatfällung entsalzt, eingengt und im Equilibrierungspuffer (Kaliumphosphatpuffer 75mM, pH 6,7) aufgenommen (Fraktion 3). Diese Probe wurde auf die LAC-Säule aufgetragen. Nach Spülen mit 10 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer wurde die Mellitsäure-Decarboxylase mit 10 Säulenvolumen Elutionspuffer (Kaliumphosphat-puffer 40mM, pH 6,0 incl. 300µM Mellitsäure) spezifisch eluiert. Dieses Eluat wurde durch erneute Ultrafiltration durch eine 30kDa-Membran eingengt und von Mellitsäure befreit (da diese die photometrische Messung der Enzymaktivität stören würde) → Fraktion 4.

Insgesamt wurde das Enzym hierdurch um den Faktor 407 angereichert. In Abb. 3.33 ist die schrittweise Anreicherung der Decarboxylase dargestellt.

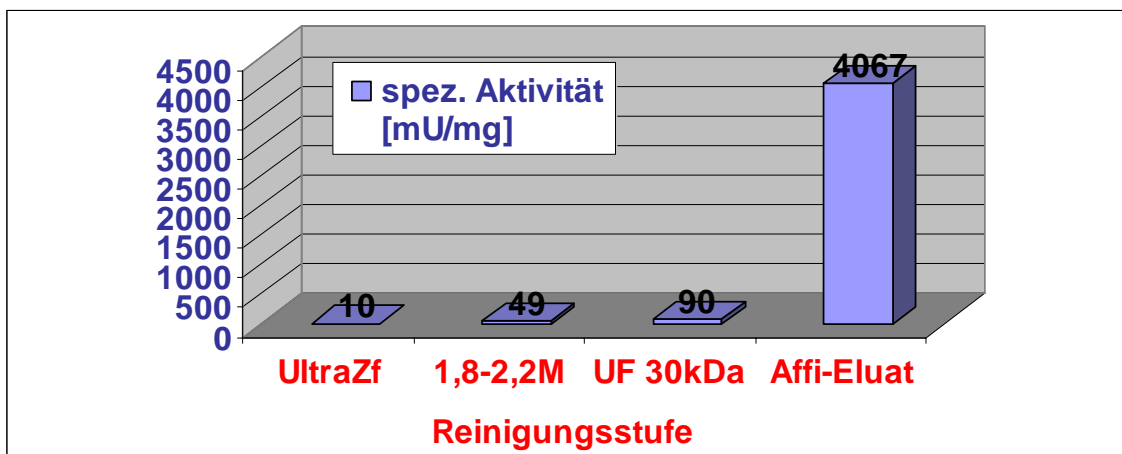


Abb. 3.33: Reinigung der Mellitsäure-Decarboxylase aus *S. morelense*/*E. adhaerens* (*LFG19a*). Die Zahlenwerte geben die spezifische Aktivität der Proteinfractionen der jeweiligen Reinigungsstufe wieder. Die Anzucht erfolgte mit Pyromellitsäure als C-Quelle. (1,8-2,2M: Vereinigte Sedimente der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung bei diesen Konzentrationen; UF: Retentat d. Ultrafiltration; Affi-Eluat: Eluat d. Liganden-Affinitätschromatographie).

Mit den vier oben beschriebenen Fraktionen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, um die fortschreitende Reinigung zu dokumentieren (Abb. 3.34). Hierzu wurden jeweils etwa 15µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die Anreicherung der Decarboxylase ist bereits nach der Ammoniumsulfatfällung zu erkennen. Deutlich ist auch zu erkennen,

daß durch die Ultrafiltration das Gros der kleineren Proteine und Peptide entfernt werden konnte. Nach der Liganden-Affinitätschromatographie ist nur noch eine Bande deutlich zu sehen.

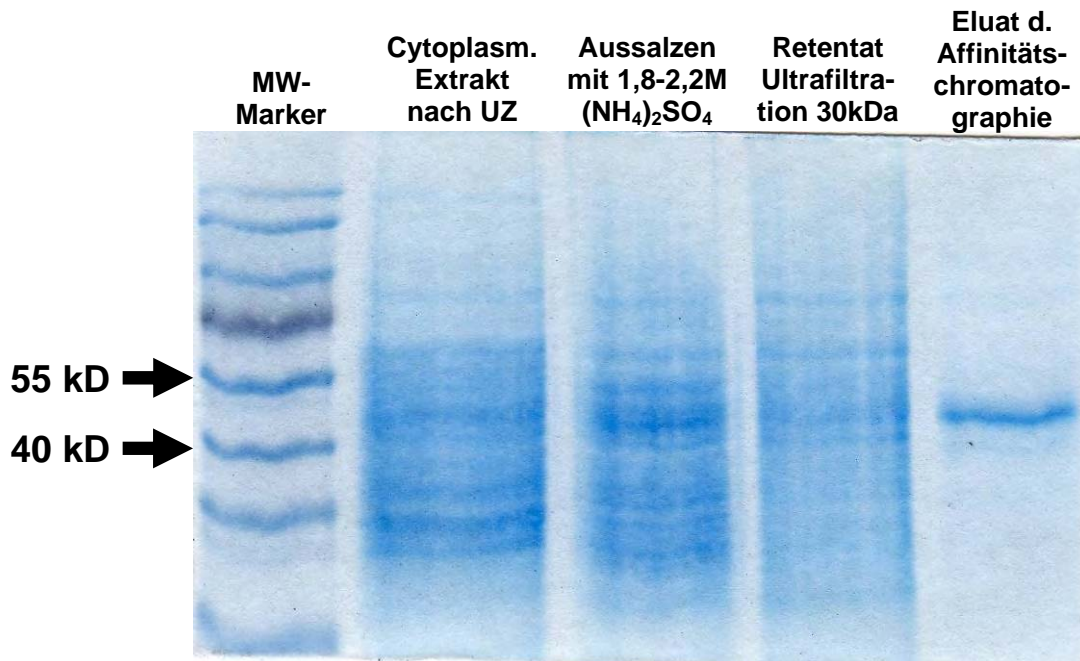


Abb. 3.34 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen der verschiedenen Reinigungsstufen der Mellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a*.

3.9 Diauxisches Wachstum und differentielle Genexpression

3.9.1 Fermentation des Stammes *LFG19a* mit Glucose und Pyromellitsäure

Im Folgenden sollte die Induzierbarkeit der Mellitsäure-Decarboxylase gezeigt werden. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen an Pyromellitsäure (0,02 bis 0,1%) zu mehreren mit Glucose in Mineralsalzmedium LFR wachsenden Kulturen des Stammes *LFG19a* gegeben und zu unterschiedlichen Zeiten (1h, 2h, 4h und 8h nach Zugabe) Zellernten durchgeführt. Es konnte jedoch keine Decarboxylase-Aktivität in den Zellextrakten nachgewiesen werden.

Stattdessen wurde bei Anzucht in einem improvisierten Kleinfermenter ein diauxisches Wachstum beobachtet: Nach Aufbrauchen der Glucose kam es zu einer Umstellung des Stoffwechsels, anschließend wuchs der Stamm mit Pyromellitsäure weiter (vgl. Wachstumskurve in Abb. 3.35). Dies spiegelte sich auch in der pH-Wert-Entwicklung wieder: Bei Wachstum mit Glucose kam es zu Säurebildung, wohingegen die Decarboxylierung der Pyromellitsäure eine Alkalisierung des Mediums zur Folge hatte.

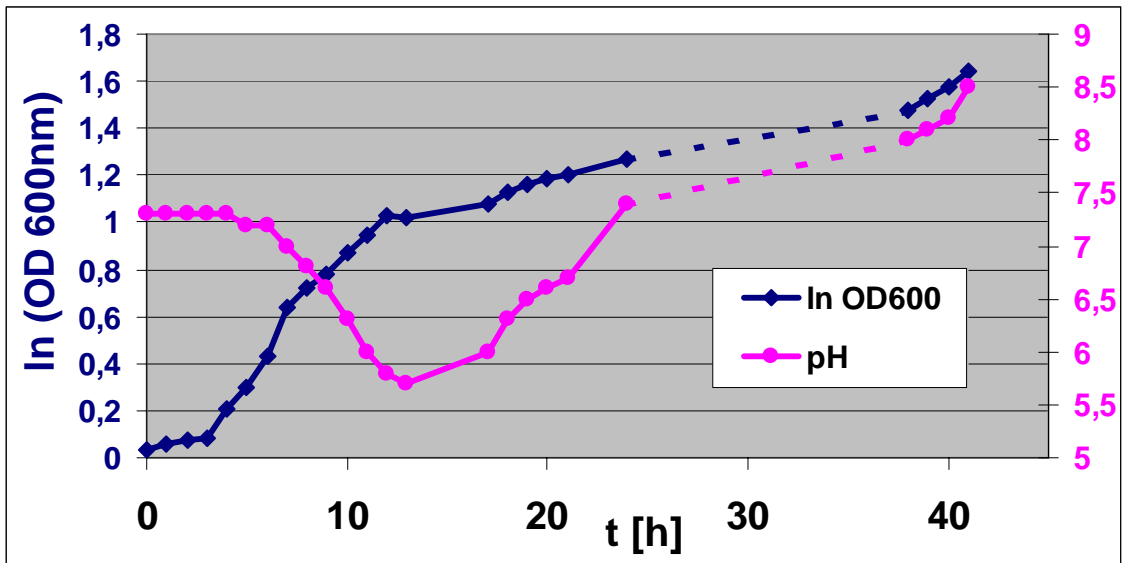


Abb. 3.35: Halblogarithmische Wachstumskurve des Stammes *LFG19a* in LFR-Medium mit den C-Quellen Glucose und Pyromellitsäure (je 3g/L). Nach einer gut dreistündigen lag-Phase kommt es zu exponentiellem Wachstum, welches knapp 10h anhält. Danach kam es zu einer stationären Phase von einigen Stunden, an welche sich ein erneutes exponentielles Wachstum anschloß. Die diauxische Form des Wachstums läßt sich auch an der pH-Kurve erkennen: Zunächst führt die Verwertung der Glucose zu einer Ansäuerung des Mediums, anschließend bewirkt die Decarboxylierung der Pyromellitsäure eine Alkalisierung bis weit über den Ausgangs-pH-Wert hinaus.

Durch Zugabe eines pH-Indikators (Phenolrot, 3mL/L einer 1mg/mL konzentrierten Stammlösung) konnte die Diauxie auch mit bloßem Auge verfolgt werden (vgl. Abb. 3.36).

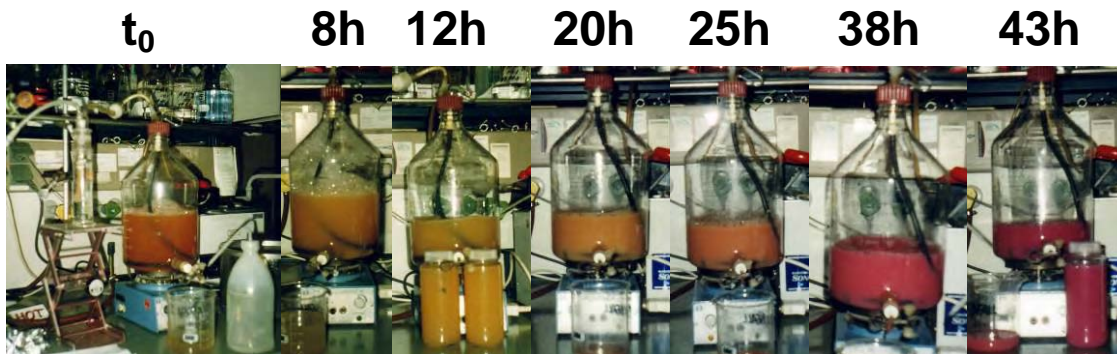


Abb. 3.36: Visualisierung der pH-Entwicklung bei diauxischem Wachstum des Stammes *LFG19a*. Der zugegebene pH-Indikator Phenolrot schlug zunächst von orange (neutral) nach gelb um (8 u. 12h), was die Säurebildung bei Wachstum mit Glucose dokumentiert. Nach Beginn der zweiten Wachstumsphase färbte sich der Indikator wieder orange (20 u. 25h) und schließlich pink (38h), was eine Alkalisierung des Mediums bei Wachstum mit Pyromellitsäure anzeigt.

3.9.2 Proteinreinigung und vergleichende SDS-PAGE

Jeweils in der exponentiellen Wachstumsphase wurde ein Teil des Fermenters geerntet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und aufgeschlossen; die Proteinreinigung erfolgte wie oben beschrieben. Die Proteinfractionen vor und nach der Ligandenaffinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.37). Dabei zeigte sich eine große Ähnlichkeit des Proteinbandenmusters der Rohextrakte nach Wachstum mit

Glucose und Pyromellitsäure. Dagegen war nach der Liganden-Affinitätschromatographie nur im Extrakt nach der zweiten Wachstumsphase eine Bande zu sehen. Im Extrakt der ersten Wachstumsphase ließ sich auch spektralphotometrisch keine Decarboxylase-Aktivität nachweisen.

Vergleichende Proteinreinigung nach diauxischem Wachstum

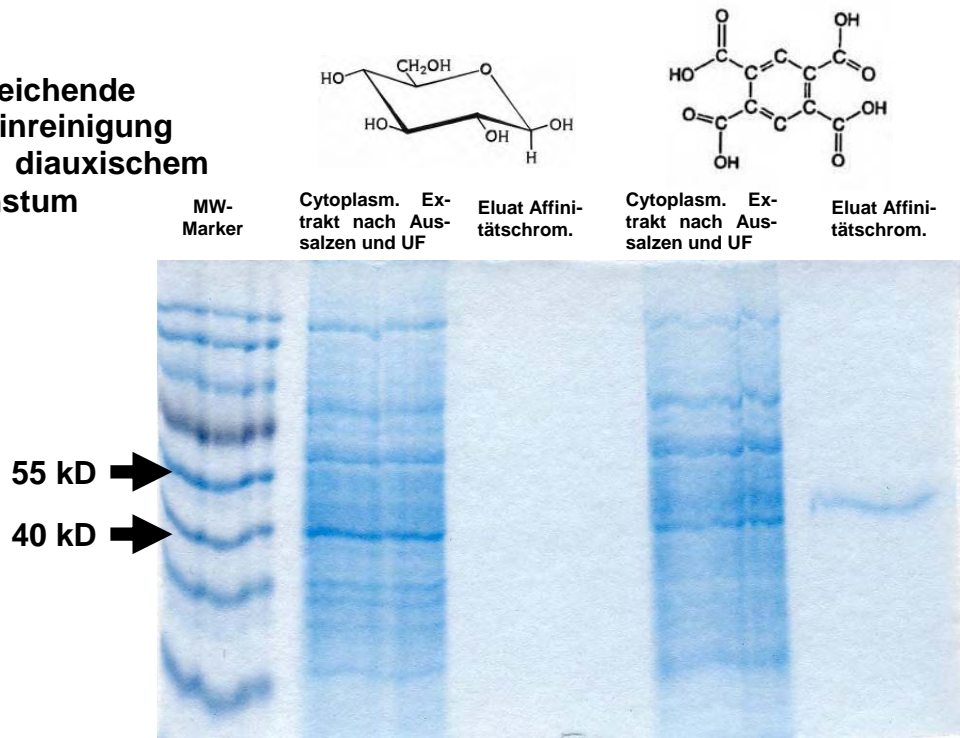


Abb. 3.37: Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen aus dem Stamm *LFG19a* nach diauxischem Wachstum mit Glucose (Spuren 2 u. 3) und Pyromellitsäure (Spuren 4 u. 5). Während die Bandenmuster im Rohextrakt sich stark ähneln, läßt sich nur im LAC-Eluat der in der zweiten Wachstumsphase geernteten Fraktion eine Bande ausmachen.

3.10 Differentielle Genexpression bei Anzucht mit unterschiedlichen carboxylierten Aromaten

3.10.1 Anzucht

Um herauszufinden, ob die Mellitsäure-Decarboxylase generell bei Wachstum mit Aromaten oder nur mit polycarboxylierten Aromaten exprimiert wird, wurde der Stamm *LFG19a* nach Vorkultur in LFR-Mineralsalzmedium mit 3g/L Glucose in sechs verschiedene Hauptkulturen überimpft, welche als C-Quelle Aromaten mit einer bis sechs Carboxylgruppen enthielten (vgl. Abb. 3.38). Als Kontrolle diente eine siebte Hauptkultur mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Konzentration der C-Quellen in den Hauptkulturen betrug ebenfalls 3g/L.

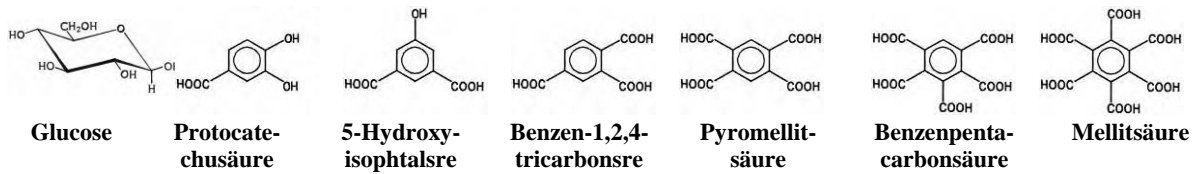


Abb. 3.38: Bei der differentiellen Anzucht des Stammes *LFG19a* verwendete Kohlenstoffquellen.

Die Hauptkulturen wuchsen nach dem Animpfen unterschiedlich schnell und gut. Während die Glucose-Kultur wie erwartet sofort weiter wuchs, stellte sich in den anderen Kolben eine lag-Phase ein. Die Kulturen mit Protocatechusäure und Pyromellitsäure überwandern diese am schnellsten (über Nacht), die Kultur mit 5-Hydroxyisophtalsäure benötigte rund 24h. Mit Benzen-1,2,4-tricarbonsäure sowie Benzenpentacarbonsäure und Mellitsäure beanspruchten die Kulturen über 2 Tage für ein weiteres erkennbares Wachstum. Auch die letztlich erreichte optische Dichte unterschied sich erheblich:

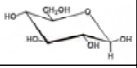
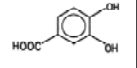
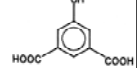
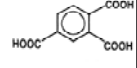
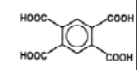
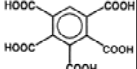
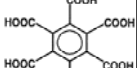
C-Quelle	Glucose	Protocatechusäure	5-Hydroxyisophtalsäure	Benzen-1,2,4-tricar.	Pyromellit-säure	Benzenpentacarb.	Mellit-säure
OD _{End}	>6,0	3,5	2,1	0,6	3,8	0,8	1,1

Tab. 3.11: Mit verschiedenen C-Quellen (3g/L) im Schüttelkolben in LFR-Medium erreichte optische Dichten.

3.10.2 Proteinreinigung

Jeweils gegen Ende des bakteriellen Wachstums wurden die Kolben geerntet. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen; die Proteinreinigung erfolgte wie oben beschrieben (vgl. 3.8.6). Hierbei stellte sich heraus, daß es bei einem Wachstum mit einer Kohlenstoffquelle mit mehr als zwei Carboxylgruppen zu einer Induktion der Mellitsäure-Decarboxylase kam, wobei die Expression bei Anzucht mit Benzen-1,2,4-tricarbonsäure allerdings sehr gering ausfiel. Das Enzym konnte über Liganden-Affinitätschromatographie bis über 1000fach angereichert werden. Tabelle 3.12 zeigt die gemessenen Decarboxylase-Aktivitäten nach Anzucht mit den oben erwähnten Kohlenstoffquellen sowie die spezifischen Aktivitäten und Reinigungsfaktoren bei den verschiedenen Reinigungsstufen.

Die Proteinfractionen vor und nach der Liganden-Affinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die nach der LAC deutlich hervortretende Bande bei 45kDa (Abb. 3.39b) nach Anzucht mit Benzentri-, -tetra-, -penta-, und -hexacarbonsäure ließ sich auch vor der LAC bereits in den betreffenden vier Spuren des Proteingels ausmachen (Abb. 3.39a).

Substrat	Reinigungsstufe	spez. DeCO ₂ ase-Aktivität [mU/mg]	Reinigungsfaktor
Glucose 	UltraZf frakt. Aussalzen UF 30kD Affi-Eluat	- - - -	- - - -
Protocatechu- säure 	UZ frakt. Aussalzen UF 30kD Affi-Eluat	- - - -	- - - -
5-Hydroxy- isophtalsäure 	UZ frakt. Aussalzen UF 30kD Affi-Eluat	- - - -	- - - -
Benzen-1,2,4- tricarbonsäure 	UZ frakt. Aussalzen UF 30kD Affi-Eluat	1,0 5,4 7,7 1352	- 5,4 7,7 1352
Pyromellitsäure 	UZ frakt. Aussalzen UF 30kD Affi-Eluat	10,0 49 90 4067	- 4,9 9,0 406
Benzenpenta- carbonsäure 	UZ frakt. Aussalzen UF 30kD Affi-Eluat	2,2 10,0 11,2 1105	- 4,5 5,3 502
Mellitsäure 	UZ frakt. Aussalzen UF 30kD Affi-Eluat	4,5 17,5 17,8 1119	- 3,9 4,0 249

Tab. 3.12: Ergebnisse der Aktivitätstests für Mellitsäure-Decarboxylierung und erzielte Reinigungsfaktoren bei Anzucht des Stammes *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) mit verschiedenen C-Quellen.

Ab drei Carboxylgruppen am Ring wurde die Expression einer Mellitsäure-Decarboxylase induziert. Diese ließ sich über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung anreichern und mittels LAC spezifisch reinigen. Insgesamt wurden dabei Reinigungsfaktoren von einigen Hundert bis über 1000 erzielt.

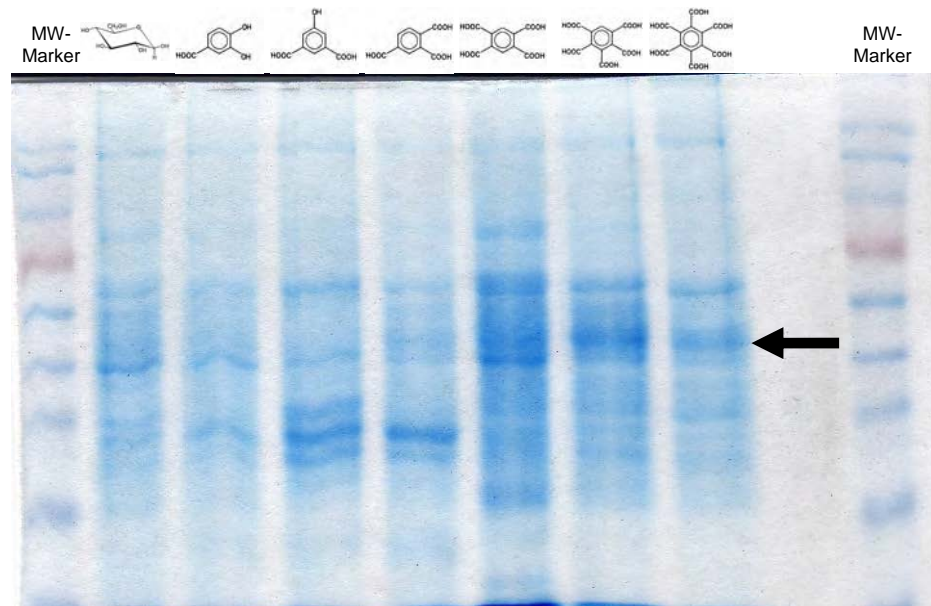


Abb. 3.39a: Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen *vor* der Liganden-Affinitätschromatographie nach differentieller Anzucht mit den oben aufgeführten C-Quellen.

Der Pfeil indiziert die Decarboxylase-Bande, welche in den rechten vier Spuren zu sehen ist, wohingegen bei Anzucht mit Glucose, Protocatechusäure sowie 5-Hydroxyisophtalsäure keine solche Bande hervortritt.

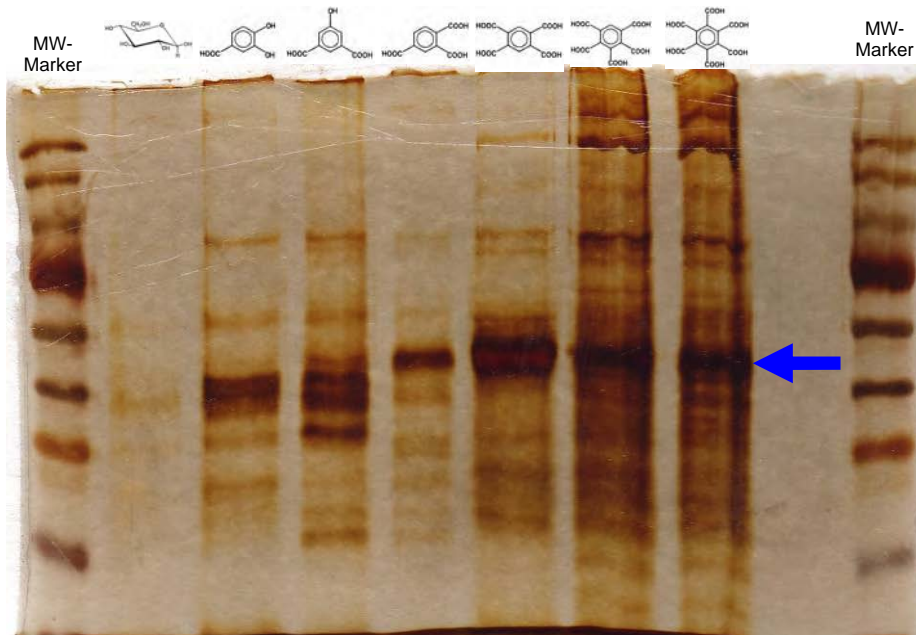


Abb. 3.39b: Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen *nach* der Liganden-Affinitätschromatographie nach differentieller Anzucht mit den darüber dargestellten C-Quellen.

Der Pfeil indiziert wiederum die Decarboxylase-Bande, welche nach Anzucht mit einem Aromaten substituiert mit ≥ 3 Carboxylgruppen auftritt.

Zu beachten ist, daß hier im Gegensatz zu oben (Abb. 3.39a) die deutlich empfindlichere Silberfärbung durchgeführt wurde.

Um noch eindeutiger zu belegen, daß das Bandenmuster bei Anzucht mit allen vier polycarboxylierten Aromaten identisch ausfällt, wurde ein zusätzliches Proteingel mit nur fünf Taschen gegossen, in welchem nur die Eluate der LAC dieser vier Zellextrakte aufgetrennt wurden. In Abb. 3.40 kann man deutlich sehen, daß hier nicht nur in allen vier Fällen eine gleich große Decarboxylase exprimiert wird, sondern daß offenbar insgesamt ein sehr ähnliches Proteom vorliegt.

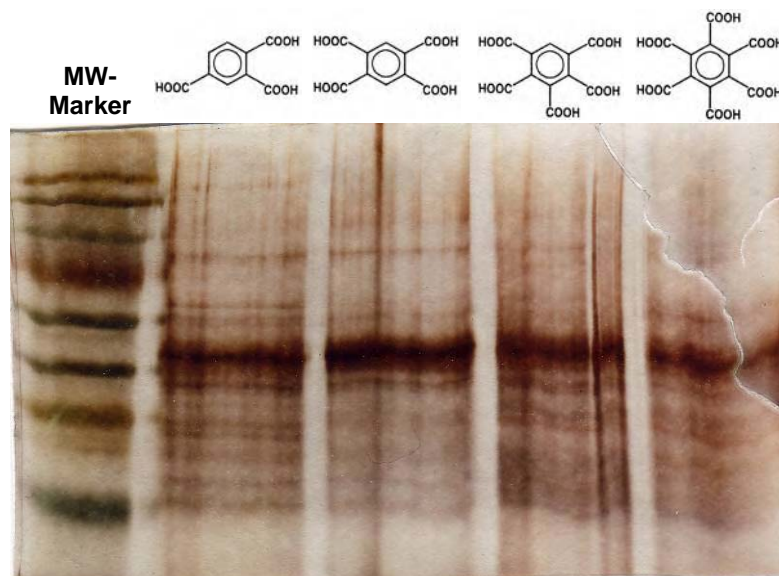


Abb. 3.40: Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen nach der LAC nach differentieller Anzucht mit den darüber dargestellten C-Quellen. Die Decarboxylase-Bande liegt in allen Fällen auf gleicher Höhe.

Für eine in allen vier Fällen identische Mellitsäure-Decarboxylase spricht auch, daß sich das Enzym in den vier Ansätzen (d.h. nach Anzucht mit den vier verschiedenen BCS) mit denselben Methoden gleich gut reinigen ließ (vgl. Abb. 3.41).

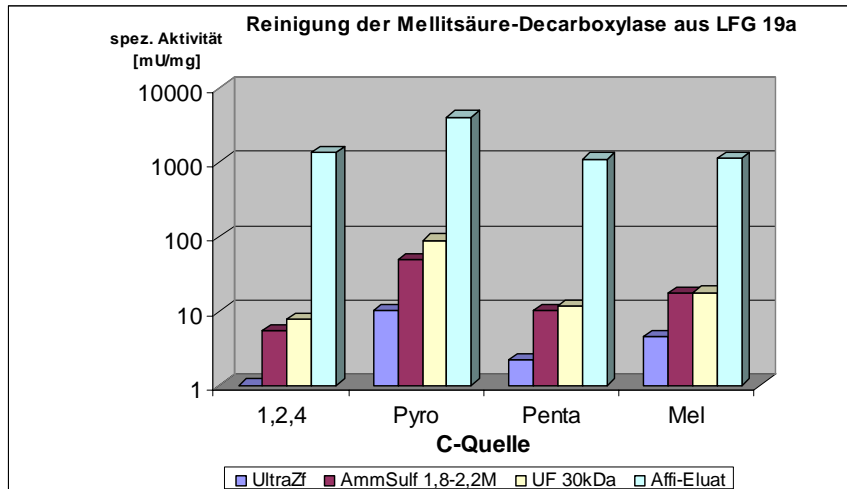


Abb. 3.41: Logarithmische Darstellung der Reinigung der Mellitsäure-Decarboxylase des Stammes *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*).

Trotz erheblich unterschiedlicher Ausgangsaktivität in den Rohextrakten lag die spezifische Aktivität nach der LAC in der gleichen Größenordnung. Der sehr ähnliche Verlauf der Reinigung legt (wie auch die gleiche Position der Bande) die Annahme nahe, daß es sich in allen vier Fällen um das identische Enzym handelt.

(Mel: Mellitsäure; Penta: Benzenpentacarbonsäure; Pyro: Pyromellitsäure; 1,2,4: Benzen-1,2,4-tricarbonsäure).

3.11 Nachreinigung und Auftrennung in reduzierendem Puffer

Um die in Abb. 3.40 zu erkennenden verbliebenen Verunreinigungen mit anderen Proteinen zu entfernen, wurde das Eluat der LAC (nach Anzucht mit Pyromellitsäure) ein zweites Mal über LAC gereinigt. Das Eluat wurde erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde ein Teil der Probe in reduzierendem Probenpuffer aufgeköcht (vgl. 2.14.2), um eine eventuelle Auftrennung in Untereinheiten durch Spaltung von Disulfidbrücken zu bewirken.

Die zweite Reinigung mittels LAC führte zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität auf über 11 U/mL (vorher 4,06 U/mL), d.h. eine weitere Anreicherung um den Faktor drei. Die gelelektrophoretische Auftrennung (Abb. 3.42) zeigte eine vollständige Reinigung der Decarboxylase bis zur Homogenität; auch nach Silberfärbung waren keine weiteren Banden im Gel erkennbar. Die Reduktion mittels Mercaptoethanol blieb ohne sichtbare Folgen; es kam zu keiner Aufspaltung des Proteins in Untereinheiten.



Abb. 3.42: Gelelektrophoretische Auftrennung des Eluates der zweiten LAC. Außer der Decarboxylase ist keine weitere Proteinbande im Gel erkennbar. Die Reduktion mit Mercaptoethanol blieb ohne Auswirkung auf das Verhalten des Proteins bei der SDS-PAGE.

3.12 Native Gelelektrophorese

Mit der zweifach über Liganden-Affinitätschromatographie gereinigten Mellitsäure-Decarboxylase wurde nun eine native Gelelektrophorese durchgeführt, um das eventuelle Vorliegen funktioneller Di- bzw. Multimere des Enzyms sichtbar zu machen, welche in der (denaturierenden) SDS-PAGE zerlegt worden wären. Außerdem sollte als Vorbereitung für eine Aktivitätsfärbung die Position der Decarboxylase-Bande im nativen Gel bestimmt werden.

Das native Gel zeigte in der Tat das Auftreten mehrerer Banden auch bei Coomassie-Färbung (Abb. 3.43), obwohl im SDS-Gel auch nach Silberfärbung keine zusätzlichen Banden mehr erkennbar waren. Diese lagen in regelmäßigen Abständen übereinander. Offenbar ist die Decarboxylase in der Tat zur Ausbildung von Multimeren befähigt, wenn auch eine Bande deutlich am stärksten vertreten war. Diese befand sich direkt unterhalb der rot vorgefärbten Markerbande (72kDa) und damit in einer anderen Position (relativ zum Marker) als im SDS-Gel.

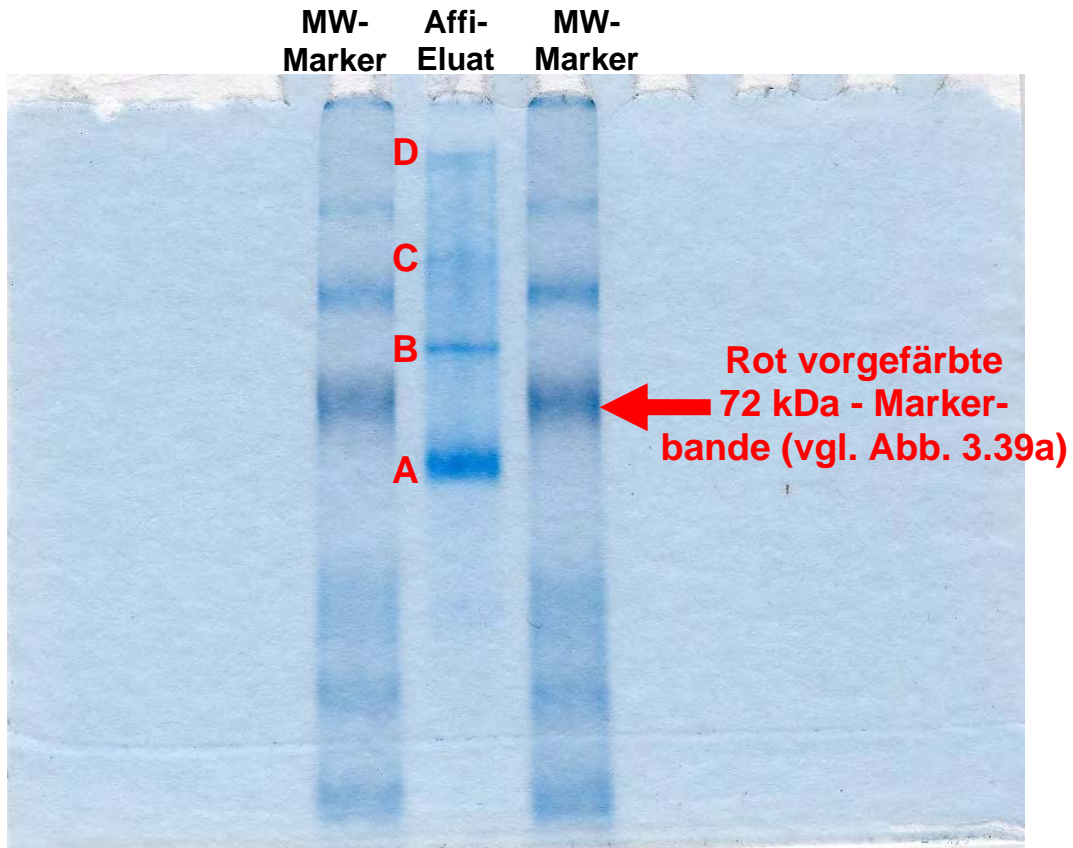


Abb. 3.43: Native PAGE der zweifach LAC-gereinigten Mellitsäure-Decarboxylase. Das Gel zeigt eine Bande (A) der Decarboxylase unterhalb der vorgefärbten Markerbande (vgl. Abb. 3.39a) sowie in regelmäßigen Abständen noch weitere drei Banden darüber (B-D).

3.13 Entwicklung einer Aktivitätsfärbung

Um die Funktionalität des Enzyms nach der Elektrophorese zu überprüfen, wurde eine Aktivitätsfärbung entwickelt, basierend auf dem Nachweis der Alkalisierung des Mediums durch Decarboxylierung von Mellitsäure zu Pyromellitsäure (vgl. 2.15.2).

Hierzu wurden ca. 300mU Decarboxylase auf das Gel aufgetragen.

Die Färbung dauerte fast 3h. Dabei kam es durch den Umschlag des pH-Indikators *m*-Nitrophenol zur Entwicklung einer leuchtend gelben Bande (Abb. 3.44) in exakt derselben Position knapp unterhalb der rot vorgefärbten Markerbande, an welcher sich die stärkste Bande in der nativen PAGE (vgl. Abb. 3.43) befunden hatte. Die beiden nativen Gele gleichen sich nicht exakt, da für die Aktivitätsfärbung nur zwei Stunden Elektrophorese bei 80V durchgeführt wurden (statt bei der anderen nativen PAGE 3h bei 100V), um die Aktivität des Enzyms möglichst wenig zu beeinträchtigen (außerdem: Durchführung der Elektrophorese auf Eis).

**MW-
Marker Affi-
Eluat MW-
Marker**

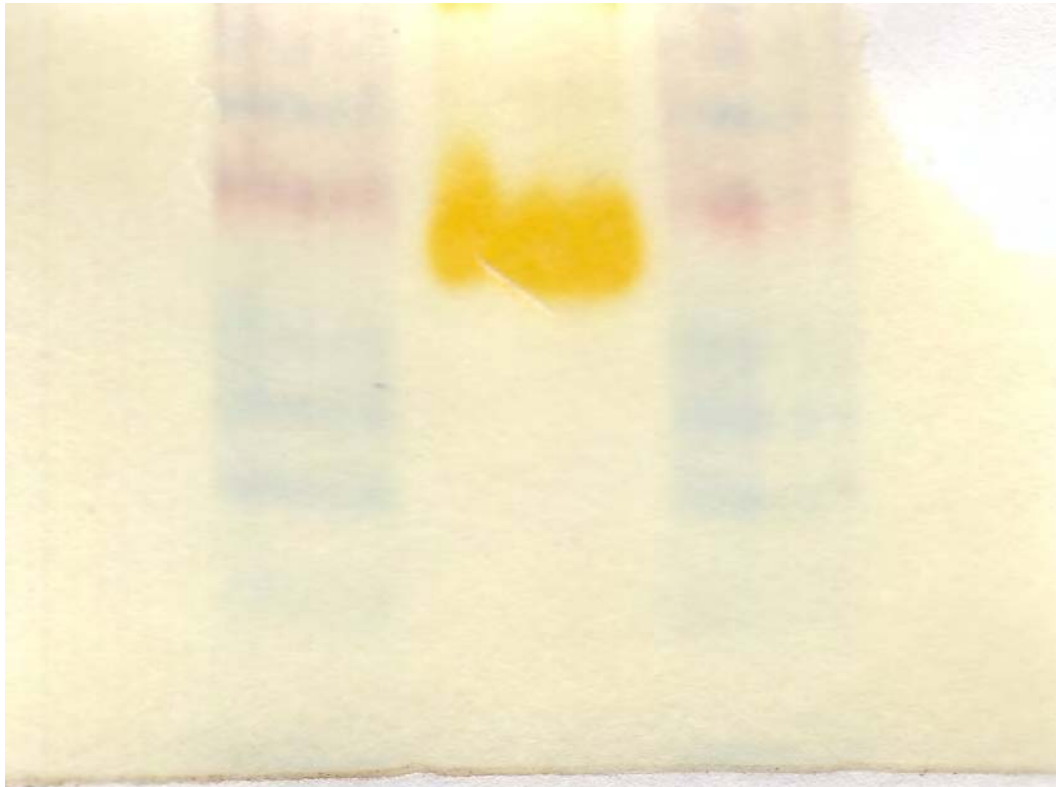


Abb. 3.44: Aktivitätsfärbung der Decarboxylase nach nativer PAGE.
Deutlich ist die aus dem Farbumschlag des pH-Indikators resultierende gelbe Bande knapp unterhalb der rot vorgefärbten Markerbande zu sehen.

3.14 Untersuchung der Decarboxylaseaktivitäten für verschiedene Substrate

3.14.1 Decarboxylaseaktivitäten bei verschiedenen Reinigungsstufen

Um die Substratspezifität der gereinigten Decarboxylase zu prüfen, wurde die Aktivität für die Decarboxylierung von Mellitsäure, Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure vergleichend untersucht.

Hierzu wurden Proben der verschiedenen Reinheitsstufen des Enzyms nach Anzucht mit Pyromellitsäure zu den jeweiligen Substraten gegeben und die Decarboxylierung mittels der unter 2.7 beschriebenen Enzymtests spektralphotometrisch quantifiziert.

Hierbei zeigte sich, dass unabhängig von der Reinheitsstufe die relative Aktivität für die Umsetzung von Mellitsäure und Benzenpentacarbonsäure nahezu identisch war (Abb. 3.45). Hingegen zeigte sich für Pyromellitsäure mit zunehmender Reinheit des Enzyms eine erhebliche Abnahme der Aktivität: Während im Rohextrakt die Aktivität etwa 50%

der Aktivität für die beiden höher carboxylierten Aromaten betrug, sank dieses Verhältnis nach der Ammoniumsulfatfällung zu Ungunsten der Pyromellitsäure-Decarboxylaseaktivität auf nur noch etwa 5%, d.h. die relative Aktivität für dieses Substrat wurde durch diesen Anreicherungs-schritt um eine Größenordnung gesenkt. Nach der Liganden-Affinitätschromatographie war keine Decarboxylase-Aktivität für Pyromellitsäure mehr detektierbar.

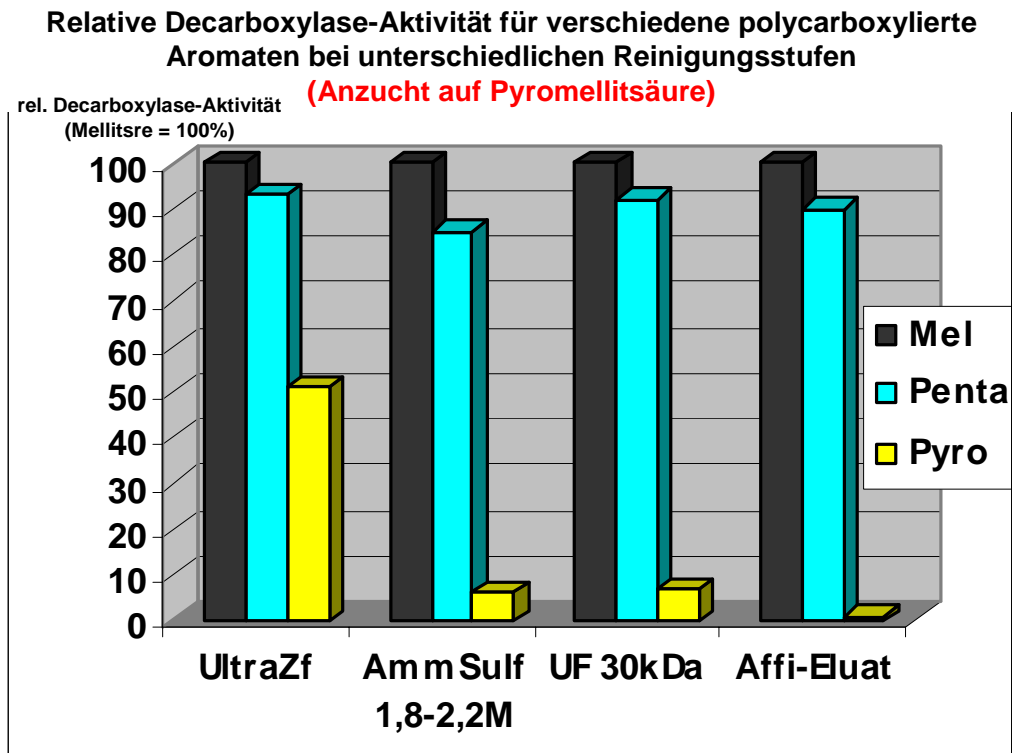


Abb. 3.45: Aktivitätsverteilung der Decarboxylase des Stammes *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) für verschiedene Substrate.

Während das Verhältnis der Aktivität für Mellitsäure und Benzenpentacarbonsäure unabhängig von der Reinigungsstufe nahezu gleich bleibt, sinkt die relative Aktivität für Pyromellitsäure durch die Ammoniumsulfatfällung um 90%; nach der LAC ist keine Decarboxylase-Aktivität für dieses Substrat mehr meßbar.

(Mel: Mellitsäure; Penta: Benzenpentacarbonsäure; Pyro: Pyromellitsäure; 1,2,4: Benzen-1,2,4-tricarbonsäure).

3.14.2 Decarboxylaseaktivität in Abhängigkeit von der bei der Anzucht verwendeten C-Quelle

Der oben beschriebene Vergleich der Decarboxylase-Aktivitäten bei unterschiedlichen Reinheitsstufen wurde nun in Abhängigkeit von der bei der Anzucht verwendeten C-Quelle wiederholt. Dabei zeigte sich bei Anzucht mit Mellitsäure und Benzenpentacarbonsäure das gleiche Bild wie oben für die Anzucht mit Pyromellitsäure beschrieben: Während das Verhältnis der Aktivität für Mellitsäure und Benzenpentacarbonsäure unabhängig von der Reinigungsstufe nahezu gleich blieb, sank

die relative Aktivität für Pyromellitsäure durch die Ammoniumsulfatfällung auf 10% des ursprünglichen Verhältnisses; nach der LAC war in allen Fällen keine Decarboxylase-Aktivität für dieses Substrat mehr meßbar (Abb. 3.46). Bei allen drei Ansätzen war zudem nach der Ultrafiltration eine leichte Zunahme der spezifischen Decarboxylase-Aktivität für Pyromellitsäure zu verzeichnen.

Die relative Decarboxylase-Aktivität für Pyromellitsäure war bei Anzucht mit Pyromellitsäure am höchsten.

Bei Anzucht mit Benzen-1,2,4-tricarbonsäure verhielt sich die Aktivität für die beiden höher carboxylierten Aromaten analog zur Anzucht mit Pyromellitsäure, Benzenpentacarbonsäure und Mellitsäure. Allerdings war hier keine Aktivität für Pyromellitsäure detektierbar.

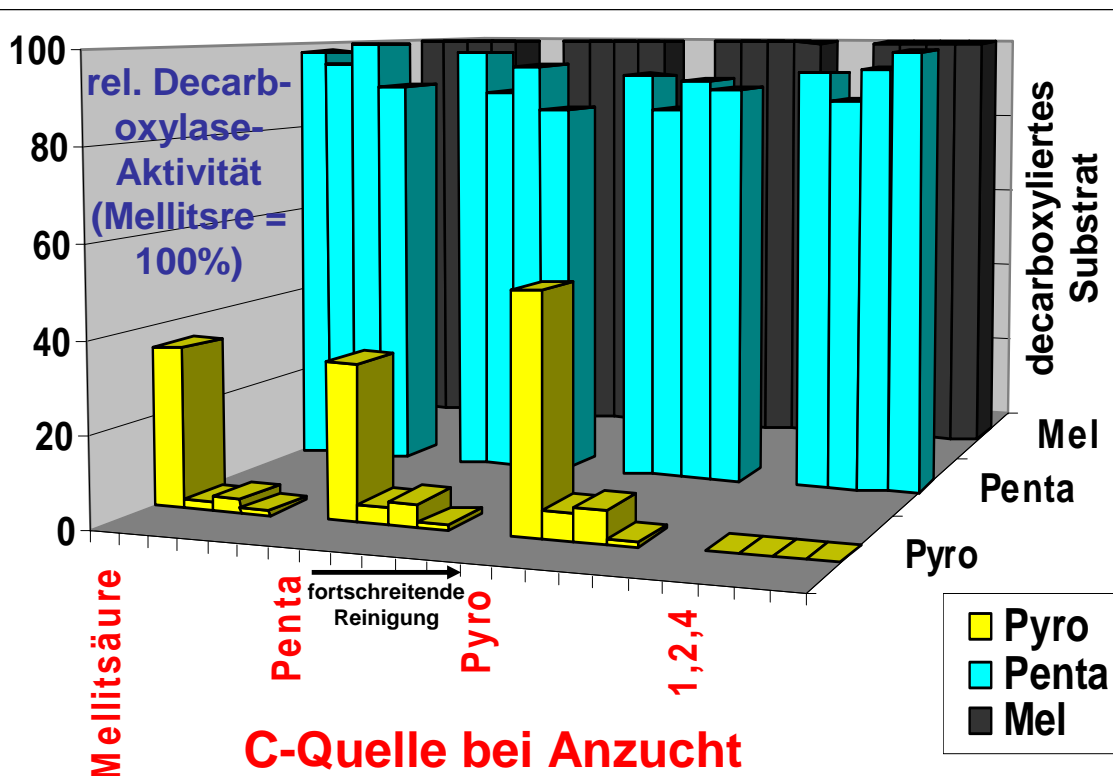


Abb. 3.46: Vergleich der Decarboxylase-Aktivitäten für verschiedene Substrate bei Anzucht von *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) auf verschiedenen Benzencarbonsäuren.

Während das Verhältnis der Aktivität für Mellitsäure und Benzenpentacarbonsäure unabhängig von der Reinigungsstufe nahezu gleich bleibt, sinkt die relative Aktivität für Pyromellitsäure durch die Ammoniumsulfatfällung um 90%; nach der LAC ist keine Decarboxylase-Aktivität für dieses Substrat mehr messbar. Die Aktivität für Pyromellitsäure ist bei Anzucht mit Pyromellitsäure relativ am höchsten. Bei Anzucht mit Benzen-1,2,4-tricarbonsäure hingegen ist gar keine Aktivität für diese BCS nachweisbar.

(Abkürzungen wie Abb. 3.45; „fortschreitende Reinigung“ entspricht den vier Reinigungsstufen in Abb. 3.45).

3.15 Untersuchung der enzymatischen BCS-Decarboxylierung durch den Stamm *LFG19a* mittels HPLC

3.15.1 Decarboxylierung von Mellitsäure durch den Rohextrakt des Stammes *LFG19a*

Die enzymatische Decarboxylierung von Mellitsäure durch den Stamm *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) wurde mit Hilfe der Hochauflösenden Flüssigchromatographie (HPLC) verfolgt. Dabei konnte eine dreifache Decarboxylierung der Mellitsäure über Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure dokumentiert werden (Abb. 3.47).

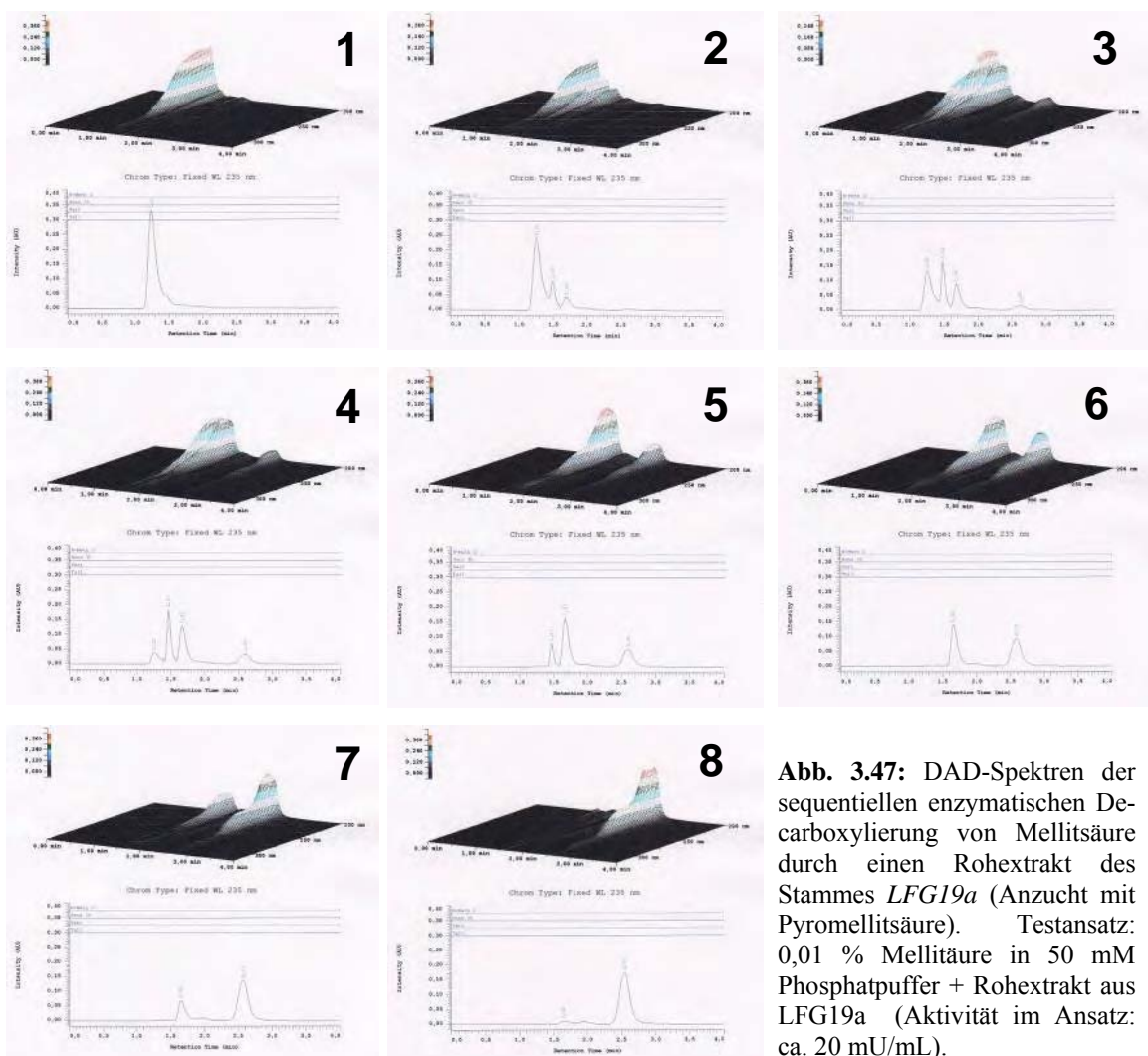


Abb. 3.47: DAD-Spektren der sequentiellen enzymatischen Decarboxylierung von Mellitsäure durch einen Rohextrakt des Stammes *LFG19a* (Anzucht mit Pyromellitsäure). Testansatz: 0,01 % Mellitsäure in 50 mM Phosphatpuffer + Rohextrakt aus *LFG19a* (Aktivität im Ansatz: ca. 20 mU/mL).

Deutlich ist das Auftreten zweier Zwischenprodukte (Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure) zu erkennen, bevor schließlich Benzen-1,2,4-tricarbonsäure als stabiles Endprodukt der Decarboxylierung entsteht (Aufnahme ca. alle 10min).

3.15.2 Decarboxylierung von Mellitsäure durch die mittels LAC gereinigte Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a*

Die gereinigte Decarboxylase war nur zu einer zweifachen Decarboxylierung der Mellitsäure über Benzenpentacarbonsäure zu Pyromellitsäure befähigt (Abb. 3.48). Die Entstehung von Benzen-1,2,4-tricarbonsäure konnte nicht detektiert werden. Pyromellitsäure wurde durch die gereinigte Decarboxylase nicht umgesetzt.

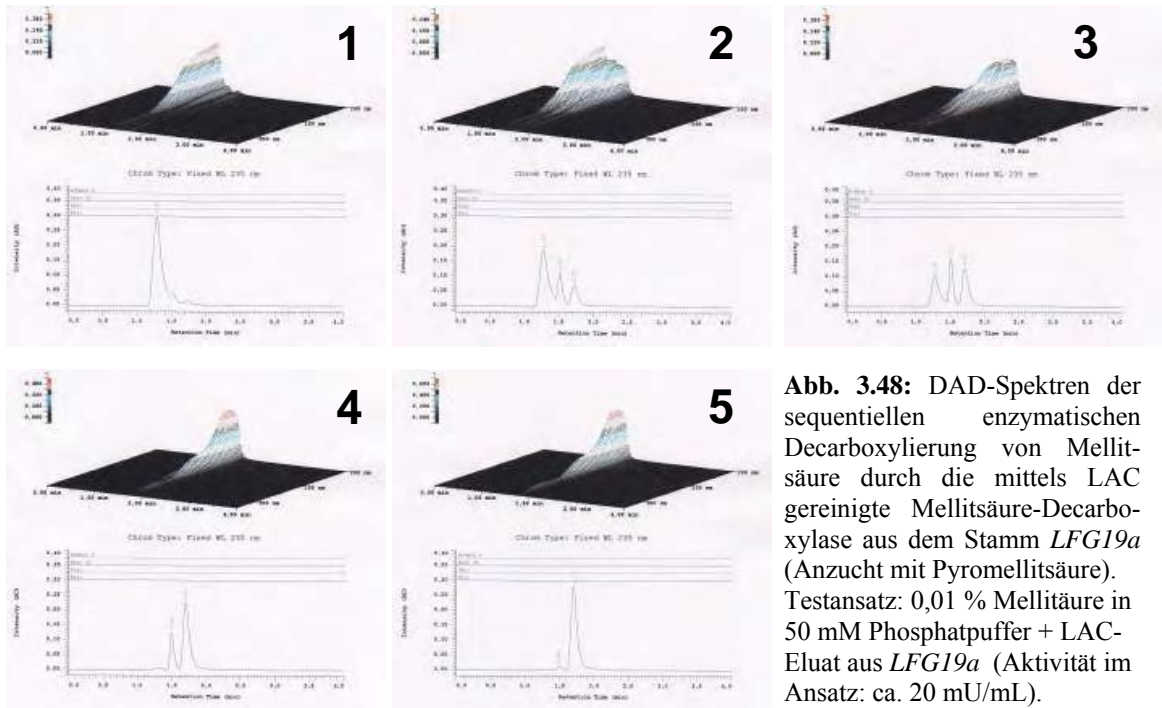


Abb. 3.48: DAD-Spektren der sequentiellen enzymatischen Decarboxylierung von Mellitsäure durch die mittels LAC gereinigte Mellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a* (Anzucht mit Pyromellitsäure). Testansatz: 0,01 % Mellitsäure in 50 mM Phosphatpuffer + LAC-Eluat aus *LFG19a* (Aktivität im Ansatz: ca. 20 mU/mL).

Es erfolgt eine zweifache Decarboxylierung der Mellitsäure über Benzenpentacarbonsäure zu Pyromellitsäure. (Aufnahme ca. alle 10min)

3.15.3 Decarboxylierung von Pyromellitsäure durch verschiedene Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung

Da die Decarboxylase-Aktivität für Pyromellitsäure im zur weiteren Reinigung verwendeten Pellet der Ammoniumsulfatfällung (1,8-2,2M) nur noch 10% der Ausgangsaktivität betrug (siehe Abb. 3.45 u. 3.46), wurden die verschiedenen Fraktionen der Fällung mittels HPLC auf diese Aktivität hin untersucht (Abb. 3.49). Es zeigte sich, daß die meiste Aktivität für diese BCS erst bei höheren Salzkonzentrationen ausfiel (2,4-2,8M) als die Aktivität für Mellitsäure (1,8-2,2M).



Abb. 3.49: Decarboxylierung von Pyromellitsäure durch verschiedene Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung eines Rohextraktes von *LFG19a* (0,01% Pyromellitsäure in Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 6,5); Zugabe von je 1mg Proteinlösung zu 1mL Testansatz.
Die höchste Decarboxylaseaktivität für Pyromellitsäure befindet sich in der Fraktion 2,4-2,8M Ammoniumsulfat.

3.16 Enzymtests mit gereinigter Mellitsäure-Decarboxylase

Die bisher durchgeführten spektralphotometrischen Enzymtests für Mellitsäure- und Benzenpentacarbonsäure-Decarboxylaseaktivität hatten folgenden Nachteil: Durch den geringen Anteil der Mellitsäure-Decarboxylase (MDCase) am Gesamtprotein mußte immer relativ viel Rohextrakt zur BCS gegeben werden, um in kurzer Zeit eine Decarboxylierung in nennenswertem Umfang zu erzielen. Dadurch kam es zu einer Verzerrung der UV-Spektren im kurzwelligen Bereich unterhalb von 220nm (vgl. Abb. 2.1b).

Mit der gereinigten MDCase des Stammes *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) konnte nun erstmals gezeigt werden, daß bei Zugabe des Enzyms zum Substrat tatsächlich eine vollständige Umwandlung des UV-Spektrums der höher carboxylierten BCS zur geringer carboxylierten erfolgte (Abbildungen 3.50 und 3.51).

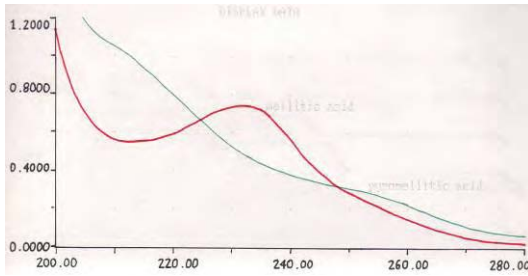


Abb. 3.50a: UV-Spektren von Mellitsäure (rot) und Pyromellitsäure (grün) ($c[\text{BCS}]=30\mu\text{M}$) in Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 6,5).

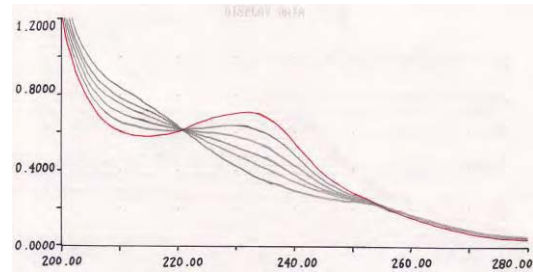


Abb. 3.50b: Decarboxylierung von Mellitsäure zu Pyromellitsäure durch 4mU gereinigte MDCase aus *LFG19a*. Die Spektrenaufnahme erfolgte 0, 1, 2, 3, 5 und 7min nach Enzymzugabe.

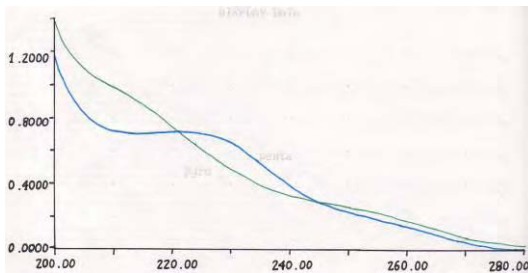


Abb. 3.51a: UV-Spektren von Benzenpentacarbonsäure (blau) und Pyromellitsäure (grün) in Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 6,5; $c[\text{BCS}]=30\mu\text{M}$).

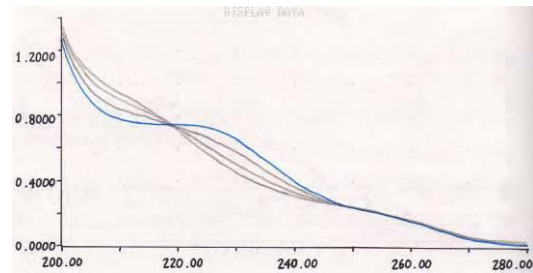


Abb. 3.51b: Decarboxylierung von Benzenpentacarbonsäure zu Pyromellitsäure durch 2mU gereinigte MDCase aus *LFG19a*. Die Spektrenaufnahme erfolgte 0, 2, 4, 6 und 10min nach Enzymzugabe.

Als Glücksfall für die spektralphotometrischen Enzymtests erwies sich die Tatsache, daß das UV-Spektrum von Benzenpentacarbonsäure gewissermaßen ein „Übergangsspektrum“ von Mellitsäure zu Pyromellitsäure darstellt (vgl. Abb. 3.52).

Andernfalls hätte es zu Beginn der Tests unter Umständen zunächst zu einer Zunahme der Absorption bei der beobachteten Wellenlänge oder anderen Effekten kommen können. Dies war bei der Etablierung und Optimierung des Enzymtests für die MDCase (Lammerich, 1998 und Krause, 2000) nicht bekannt.

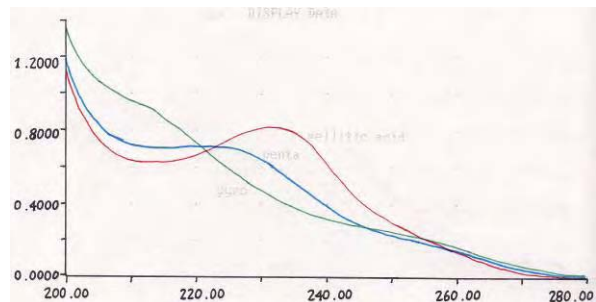


Abb. 3.52: UV-Absorptionsspektren von Mellitsäure (rot), Benzenpentacarbonsäure (blau) und Pyromellitsäure (grün) ($c[\text{BCS}]=30\mu\text{M}$) in Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH 6,5). Die Spektren gehen gewissermaßen „fließend“ ineinander über.

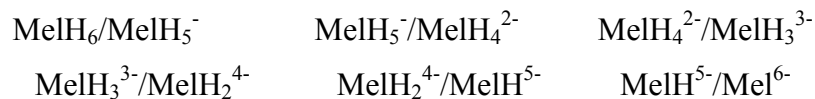
4 Diskussion

4.1 Chemische Untersuchung der Benzencarbonsäuren (BCS)

4.1.1 Titrationskurven

Die Benzencarbonsäuren erwiesen sich als ausgezeichnete Puffersysteme. Ab drei Carboxylgruppen am aromatischen Ring kam es zu einer gleichmäßigen Verteilung der negativen Ladung, so daß es in den Titrationskurven zu keinen erkennbaren Unregelmäßigkeiten im Anstieg des pH-Wertes kam. Es ergaben sich regelrechte „Titrationsgeraden“. Grund hierfür ist, dass die Dissoziationsgleichgewichts-Systeme der jeweiligen Carboxylgruppen am Ring sehr nahe beieinander liegen. Die pKs-Werte der Mellitsäure sind: 2,08 2,46 3,24 4,44 5,50 6,59 (PETRIK Library, 2004 bzw. www.petrik.com).

Aufgrund dessen liegen bei der Titration von z.B. Mellitsäure die Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexacarboxylate nicht rein vor. Die Lösung enthält über weite Bereiche der Titration vermutlich sowohl vollständig protonierte Mellitsäure als auch alle sechs Anionentypen. Dadurch entsteht ein kompliziertes, dicht überlappendes Puffersystem, das aus sechs Gleichgewichten zusammengesetzt ist:



Erst am Äquivalenzpunkt der sechsten Dissoziationsstufe, wenn in der Lösung nur noch das sechsfach deprotonierte Mellitat vorliegt und damit das Puffersystem verbraucht ist, ist bei weiterer Zugabe von Natronlauge eine plötzliche und recht starke Änderung des pH-Wertes zu erkennen (vgl. 3.1.1).

Aus demselben Grund ist auch die Citronensäure mit ihren Anionen ein sehr effektives und technisch gern genutztes Puffersystem im pH-Bereich von 2-6, da hier (im Gegensatz z.B. zu Phosphorsäure)

keine großen Sprünge in der Titrationskurve auftreten (vgl. Abb. 4.1).

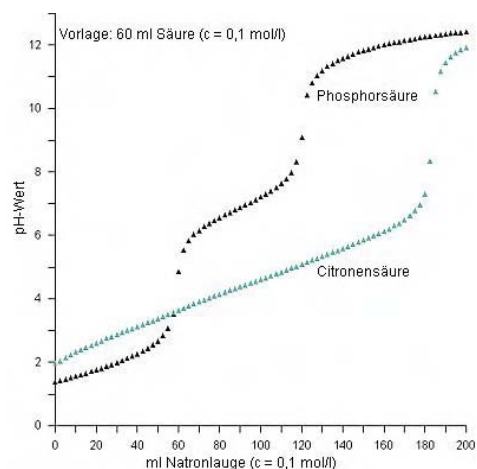


Abb. 4.1: Titrationskurven von Phosphorsäure und Citronensäure. Aus: Bildungserver für Chemie/Uni Bielefeld: <http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/index>.

Hier könnte insbesondere die relativ preiswerte Pyromellitsäure als Alternative für spezielle Anwendungen dienen, z.B. in Bakterienkulturen, die in einem weiten pH-Bereich (bzw. bei stark verschiedenen pH-Werten) vergleichend untersucht werden sollen. Wenn in diesen Experimenten immer dasselbe Puffersystem verwendet werden soll, die Bakterien aber Citronensäure als Kohlenstoffquelle nutzen können, würde sich die alternative Verwendung von Pyromellitsäure anbieten (vorausgesetzt natürlich, daß von dieser Substanz keine toxische Wirkung für die jeweiligen Bakterien ausgeht).

Auffallend ist der Unterschied der Titrationskurven von *ortho*- und *meta*-Phtalsäure (3.1.1.7 und 3.1.1.8). Während man bei ersterer die pKs-Werte an der graphischen Darstellung ablesen kann, zeigt sich bei letzterer eine Titrationsgerade. Grund dafür ist, daß die pKs-Werte der Dicarbonsäuren (Phtalsäuren) wesentlich durch den elektronenziehenden Effekt der zweiten Säuregruppe bestimmt werden. Dieser ist wiederum abhängig von Distanz zwischen den beiden Carboxylgruppen, d.h. stärker in Phthalsäure als in Isophthalsäure oder Terephthalsäure.

Allgemein gilt, daß zwei nebeneinander stehende COOH-Gruppen Wasserstoffbrücken untereinander ausbilden:

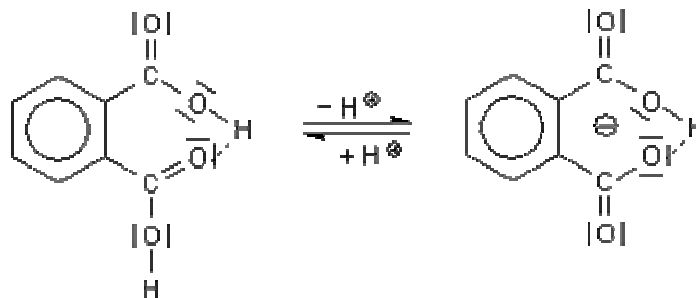


Abb. 4.2: Wechselwirkungen benachbarter Carboxylgruppen.

Damit lockern sie zunächst eine O-H-Bindung. Das Proton dissoziiert leichter ab als bei einer Monocarbonsäure oder bei einer Dicarbonsäure ohne Wechselwirkung wie der *m*-Phthalsäure (Isophthalsäure) oder der *p*-Phthalsäure (Terephthalsäure).

Danach tritt aber der gegenteilige Effekt ein, daß die nun entstehende H-Brücke stärker fixiert ist. Das geschieht einmal durch die negative Ladung. Außerdem entsteht ein planarer und weitgehend spannungsfreier, symmetrischer Ring. Alle Kohlenstoffe und Sauerstoffe sind sp^2 -hybridisiert. Die Planarität ermöglicht somit eine Mesomerie, die das System noch zusätzlich stabilisiert. Als Folge dissoziiert das zweite Proton bei deutlich höherem pH-Wert als bei den "normalen" Dicarbonsäuren ab (Entnommen aus Bildungsserver für Chemie/Uni Bielefeld).

Das zeigt der Vergleich der pKs-Werte:

<i>o</i> -Phthalsäure	$pK_1 = 2,90$	$pK_2 = 5,35$
<i>m</i> -Phthalsäure	$pK_1 = 3,52$	$pK_2 = 4,55$
<i>p</i> -Phthalsäure	$pK_1 = 3,51$	$pK_2 = 4,82$

Entsprechend treten bei der Mellitsäure durch die unmittelbare Nachbarschaft von sechs Carboxylgruppen beide Effekte auf, daß nämlich die Deprotonierungsreaktionen wechselseitig sowohl gefördert wie auch gehemmt werden. Demzufolge müßte nach der ersten Deprotonierung als nächstes eine Carboxylgruppe deprotoniert werden, die nicht an der entstandenen Wasserstoffbrücke beteiligt ist. Dies ist begünstigt bis zum Tricarboxylat. Danach treten die stabilisierenden Effekte einer weiteren Deprotonierung entgegen. Vermutlich liegen deshalb die ersten drei pKs-Werte sehr nahe beieinander (2,08; 2,46; 3,24), während die übrigen drei pKs-Werte deutlich weiter auseinander und zudem erheblich höher liegen (4,44; 5,50; 6,59; PETRIK Library, 2004).

Bei Benzenpentacarbonsäure wird nur die Abspaltung der ersten zwei Protonen begünstigt. Entsprechend liegen hier nur die ersten beiden pKs-Werte niedrig und nahe beieinander (2,34; 2,95). Die dritte Carboxylgruppe wird von den anderen Carboxylgruppen relativ unbeeinflusst deprotoniert ($pK_3 = 3,94$). Bei den letzten beiden Carboxylgruppen merkt man den stabilisierenden Effekt der in den ersten zwei Deprotonierungsreaktionen gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen ($pK_4 = 5,07$; $pK_5 = 6,25$). Hier lassen sich also auch Aussagen zur Reihenfolge der Deprotonierung machen (vermutlich zuerst begünstigt Position 1/2 sowie 4/5, anschließend Position 3 und zuletzt gehemmt die anderen Carboxylgruppen der Positionen 1/2 und 4/5).

Analog verhält es sich bei der Pyromellitsäure: Die ersten beiden pKs-Werte liegen mit 2,42 und 3,13 sehr niedrig und nahe beieinander, pK_3 und pK_4 mit 4,44 und 5,61 deutlich höher und weiter voneinander (und von pK_2) entfernt.

Dies erklärt auch das unterschiedliche Verhalten der Benzentricarbonsäuren bei der Titration: Da bei der Benzen-1,3,5-tricarbonsäure keine unmittelbar benachbarten Carboxylgruppen vorliegen, wird hier weder eine frühe Deprotonierung begünstigt noch eine späte gehemmt. Entsprechend liegt der pK_1 dieser BCS mit 3,14 am höchsten (relativ zu den anderen Tricarbonsäuren), der pK_3 hingegen mit 4,85 am niedrigsten. Bei der Benzen-1,2,3-tricarbonsäure dagegen liegen alle drei Carboxylgruppe in unmittelbarer Nachbarschaft. Daher liegen hier die pKs-Werte so weit auseinander, daß man in der Titrationskurve Wendepunkte ausmachen kann. Insbesondere der dritte pKs-

Wert liegt mit 5,87 sehr hoch (und mit einer Differenz von 1,62 deutlich über dem pK_2), vermutlich weil das Dicarboxylat von zwei Seiten stabilisiert wird. Bei der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure ist die Abspaltung des ersten Protons begünstigt; die des zweiten erfolgt „neutral“, d.h. weitgehend unabhängig von den anderen Carboxylgruppen. Hier kann zur Reihenfolge der Deprotonierung postuliert werden, daß zunächst eine der Carboxylgruppen an Position 1 oder 2 deprotoniert wird, danach die an Position 4 und zuletzt die (durch eine Wasserstoffbrücke stabilisierte) an Position 1 bzw. 2. Auch hier liegen die pK_s -Werte deutlich weiter auseinander als bei der Benzen-1,3,5-tricarbonsäure, allerdings ohne daß man es der Titrationskurve ansieht. Wahrscheinlich führt bei der Benzen-1,2,3-tricarbonsäure die elektrostatische Abstoßung zwischen den unmittelbar benachbarten anionischen Carboxylaten zu einer zusätzlichen Hemmung der Abspaltung des dritten Protons, so daß nur hier ein Einfluß auf die Titrationskurve sichtbar ist.

Generell gilt, daß eine BCS umso stärker als Säure wirken kann, je mehr Carboxylgruppen sich am Ring befinden, da die Säurerest-Anionen durch den negativen mesomeren Effekt stabilisiert werden; im Idealfall wird so die entstehende negative Ladung über das ganze Molekül verteilt.

Eine vollständige Auflistung der pK_s -Werte aller BCS ist im Anhang gezeigt.

4.1.2 Untersuchung der BCS mittels HPLC

Die BCS wurden vor Anfertigung dieser Arbeit ausschließlich anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert (Lammerich, 1998 sowie Krause, 2000). Diese Identifizierung erwies sich oft als ungenau und mitunter schwer reproduzierbar, da bei einem Wechsel der Säule wie auch schon bei einem relativ häufig durchzuführenden Vorsäulenwechsel die Retentionszeiten manchmal erheblich von den zuvor bestimmten abwichen. Gründe hierfür liegen z.T. im spekulativen Bereich; es gilt allgemein, daß man eine neue Säule (und demnach wohl in geringerem Maße auch eine Vorsäule) erst „einfahren“ muß (Galinski, persönliche Mitteilung).

Ein weiteres Problem war, daß die Retentionszeiten einiger BCS so nahe beieinander lagen (Benzen-1,2,3- und -1,2,4-tricarbonsäure sowie Benzen-1,3,5-tricarbonsäure und Benzen-1,4-dicarbonsäure), daß eine Unterscheidung allein anhand der Retentionszeit kaum möglich war. Dies erforderte eine Modifikation des Laufmittels, was eine weitere Verschiebung sämtlicher Retentionszeiten mit sich brachte.

Durch Hinzuziehung des Diodenarray-Detektors (DAD) konnten die oben geschilderten Probleme gelöst werden. Jeder BCS konnte ein charakteristisches DAD-Spektrum zugeordnet werden, anhand dessen diese Verbindungen nun eindeutig identifiziert werden können. Die Aufklärung der Decarboxylierungswege konnte somit erheblich vereinfacht werden.

Interessant war, daß die DAD-Spektren der BCS Mellitsäure, Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure sowie das Spektrum des Decarboxylierungsproduktes Benzen-1,2,4-tricarbonsäure nahezu fließend ineinander übergehen (vgl. Abb. 3.4a-d). Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Vielleicht begünstigt die Elektronenverteilung im Ring durch die unterschiedlich angeordneten Carboxylgruppen, aus der ja letzten Endes die charakteristische UV-Absorption resultiert, genau diese Reihenfolge der Decarboxylierungsschritte, wie sie in 21 von 22 Fällen (mit Ausnahme des Stammes X.93) vorgefunden wurde (zusätzlich zur wohl eindeutigen Begünstigung durch die Stabilität der im Gegensatz zu den anderen Benzentetracarbonsäuren symmetrischen Pyromellitsäure).

4.1.3 Infrarotspektroskopische Untersuchung der BCS

Es läßt sich festhalten, daß die unterschiedlich ausgeprägten Banden der (C-H)-Schwingung in Abhängigkeit von der Anzahl benachbarter H-Substituenten am besten zur Differenzierung der IR-Spektren der ansonsten recht ähnlichen Benzencarbonsäuren geeignet waren (vgl. insbesondere Abb. 3.9).

Hierdurch ergibt sich eventuell eine Möglichkeit zur Identifizierung der unbekanntes Benzentetracarbonsäure (TetraX): Sollte es sich hierbei um Benzen-1,2,3,4-tetracarbonsäure handeln, müßten die (C-H)-Schwingungen der beiden unmittelbar benachbarten H-Substituenten eine deutlich identifizierbare Bande um 800cm^{-1} verursachen (wie Terephtalsäure und Benzen-1,2,4-tricarbonsäure; vgl. Abb. 3.7). Hingegen wären die beiden isolierten H-Atome der Benzen-1,2,3,5-tetracarbonsäure nicht zur Ausbildung einer deutlichen Bande befähigt (wie Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure; vgl. Abb. 3.8a und b).

Anhand ihres IR-Spektrums sollte sich TetraX daher als Benzen-1,2,3,4- bzw. Benzen-1,2,3,5-tetracarbonsäure identifizieren lassen. Erforderlich wäre hierfür allerdings die Produktion größerer Mengen der reinen BCS durch gereinigte Mellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm X.93 (*Alcaligenes piechaudii*).

4.2 Biodiversität der gescreenten BCS-Decarboxylanten

4.2.1 Ausgangslage

Zu Beginn der Arbeiten an dieser Dissertation konnten 22 Bakterienstämme in größerem Maßstab (d.h. in Zellmassen von mehreren Gramm) in Flüssigkultur mit Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen werden. Aus dem Rohextrakt dieser Zellen wurden mit unterschiedlichen Methoden (vgl. 3.5) die Benzencarbonsäure- (BCS-) Decarboxylasen angereichert. Die Tatsache, daß sich in jedem der 22 Rohextrakte eine BCS-Decarboxylase-Aktivität für Benzenhexacarbonsäure (Mellitsäure), Benzenpentacarbonsäure und für Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) fand, bestätigt die aus vorherigen Experimenten (Rudat, 2000) resultierende Annahme, daß zum Wachstum auf Pyromellitsäure die Expression der betreffenden Decarboxylasen erforderlich ist; eine Spaltung des Benzenringes ohne dessen zumindest partielle vorherige Decarboxylierung wurde in keinem Fall beobachtet und kann angesichts der Vielfalt der gescreenten Mikroorganismen praktisch ausgeschlossen werden.

Alle 22 der zuvor auf Pyromellitsäure angezogenen Stämme zeigten sich zum Wachstum auf Mineralsalzmedium (LFR) mit Benzenpentacarbonsäure befähigt. Dieses Resultat ist bemerkenswert, da diese Substanz den untersuchten Organismen noch nie als Substrat vorgelegt worden war. Das Ergebnis zeigt, daß nicht nur die Decarboxylierung höherer BCS, sondern auch deren Transport ins Zellinnere sehr flexibel und keineswegs hochspezifisch auf nur eine BCS zugeschnitten erfolgt. Diese flexible Metabolisierung belegt einmal mehr die Eignung der BCS als Testsubstanzen für die Verwertung der sehr heterogenen Huminsäuren und damit letztlich auch der verschiedenen Braunkohle-Typen, die sich nur durch extrem unspezifische Mechanismen angreifen lassen.

4.2.2 Der Stamm „Artern“: Eine neue Art einer neuen Gattung?

Anhand der Totalsequenz der 16S-rDNA des Stammes „Artern“ wurde seitens der DSMZ vorgeschlagen, diesen Stamm als Vertreter einer neuen Art innerhalb der Gattung *Rhizobium* anzusehen (Dr. Spröer/DSMZ, Identifizierungsprotokoll, 2003).

Zur genaueren Einordnung wurden einige physiologische Experimente durchgeführt (vgl. 3.2.2.2).

Hierbei ergaben sich jedoch erhebliche Zweifel an der Berechtigung dieser Zuordnung. Mit Koloniegrößen $<2\text{mm}$ nach 7 Tagen Inkubation bei 28°C auf Hefeextrakt-Mannitol-Agar (YEM, Norris und Date, 1976) gehört dieses Bakterium zu den langsam wachsenden Rhizobien, was auch durch die Koloniemorphologie auf dem gleichen Medium bestätigt wird (keine Bildung von Polysaccharid-Schleim). Diese Bakterien der Ordnung *Rhizobiales* werden in der Gattung *Bradyrhizobium* zusammengefaßt (Jordan, 1982; Elkan und Bunn, 1992 sowie Kuykendall et al., 2005). Zu Vertretern dieser Gattung findet sich jedoch keine Ähnlichkeit bzw. kaum Übereinstimmung auf 16S-rDNA-Ebene (siehe Anhang). Außerdem bilden *Bradyrhizobium*-Arten auf YEM-Agar alkalische Endprodukte (Elkan und Bunn, 1992), wohingegen der Stamm „Artern“ Säure bildet (nachgewiesen durch Zugabe von Bromthymolblau, vgl. Abb. 3.10).

Darüber hinaus konnte für diesen Stamm keine Fähigkeit zur Fixierung von Distickstoff (N_2) nachgewiesen werden. Im in Anlehnung an das LFR-Medium entworfenen stickstofffreien Mineralsalz-Medium MMR I (Rudat, 2000) war dieses Bakterium nicht zu Wachstum in der Lage, während nach Zugabe von $1\text{g/L NH}_4\text{NO}_3$ über Nacht eine OD_{600} von 0,5 erreicht wurde. Daher ist eine Zuordnung zu gleich welcher Art der N_2 -fixierenden Gattung *Rhizobium* wohl nicht berechtigt.

Die nächsten Verwandten innerhalb der Familie der *Rhizobiaceae* stellen die Arten der Gattung *Agrobacterium* dar. Diesbezüglich wird seit einigen Jahren heftig diskutiert, ob sich beide Gattungen vereinigen lassen, bzw. ob alle *Agrobacterium*-Arten sowie *Allorhizobium undicola* zur Gattung *Rhizobium* gerechnet werden sollten (Young et al., 2001; Farrand et al., 2003; Young et al., 2003).

In der Tat ergab sich für den Stamm „Artern“ eine Ähnlichkeit auf 16S-rRNA-Ebene zu einem als *Agrobacterium tumefaciens* hinterlegten Stamm (Dr. Spröer/DSMZ, Identifizierungsprotokoll; vgl. auch Anhang). Hierbei handelt es sich jedoch nicht um einen Typenstamm; es scheint nicht einmal gewährleistet, daß es sich bei diesem Bakterium überhaupt um einen Vertreter der Gattung *Agrobacterium* handelt (Dr. Tindall/DSMZ, persönliche Mitteilung). Auch die physiologischen Tests lassen in wichtigen Punkten keine Zuordnung zur Gattung *Agrobacterium* zu, da diese im Gegensatz zum Stamm „Artern“ Urease-positiv und zur Citratverwertung befähigt sind (Kuykendall et al., 2005).

Allen Vertretern der Gattungen *Agrobacterium* und *Rhizobium* ist eine Beweglichkeit über peritriche Begeißelung gemeinsam (Matthysse, 2004 sowie Sadowsky und Graham, 2004). Der Stamm „Artern“ hingegen zeigte nur bei exponentiellem

Wachstum in YEM-Flüssigmedium bei 28°C überhaupt Beweglichkeit, und dies durch eine einzelne polare Geißel (vgl. Abb. 3.11). Auch bezüglich seiner Morphologie paßt dieses Bakterium also in keine der beiden Gattungen.

Zuguterletzt spricht auch die Fettsäure-Analyse der DSMZ gegen eine Zuordnung zu *Agrobacterium* oder *Rhizobium*. Zwar ist das Profil zellulärer Fettsäuren typisch für α -Proteobakterien (Dr. Verburg/DSMZ, Identifizierungsprotokoll; siehe Anhang 1.3). Insbesondere das Vorkommen der ungesättigten Fettsäure 18:1 ω 7c als Hauptlipid ist charakteristisch für diese Klasse (Lauer, 2001), wenn auch der Gehalt mit fast 80% exorbitant hoch ausfällt (*Rhizobium*: 21-67%; *Sinorhizobium*: 57-71%; *Agrobacterium*: 35-68%; nach Jarvis et al., 1996). Die größte Übereinstimmung bezüglich des Fettsäureprofils findet sich jedoch weder mit *Agrobacterium* noch mit *Rhizobium*, sondern mit verschiedenen Vertretern der Gattung *Methylobacterium* sowie *Paracoccus denitrificans* (siehe Anhang). Insbesondere spricht der dreifach höhere Gehalt an Stearinsäure (18:0) gegenüber Palmitinsäure (16:0) klar gegen eine Zuordnung zu den *Rhizobiaceae*. Bei allen daraufhin untersuchten Gattungen dieser Familie ist dieses Verhältnis umgekehrt, bei *Agrobacterium* oder *Bradyrhizobium* sogar um den Faktor 10 (Jarvis et al., 1996 und Graham et al., 1995). Der verschwindend geringe Gehalt an 16:0 3OH (0,31%) spricht ebenfalls gegen eine Zugehörigkeit zur Gattung *Agrobacterium*, bei der diese Fettsäure mit 2,3-5,3% relativ häufig vertreten ist (Jarvis et al., 1996).

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß der Stamm „Artern“ mit hoher Wahrscheinlichkeit als Vertreter einer neuen Gattung innerhalb der α -Proteobakterien anzusehen ist, wie ja auch ursprünglich seitens der DSMZ festgestellt wurde. Zu Ehren des in Bonn tätigen Aufklärers der Konstitution aromatischer Verbindungen August Friedrich Kekulé von Stradonitz (1829-1896) schlagen wir aufgrund der Verstoffwechslung ungewöhnlicher Aromaten durch dieses Bakterium den Namen *Kekulea arternensis* vor.

4.3 Reinigung und Charakterisierung der Mellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm LFG19a

Zum ersten Mal wurde eine Mellitsäure-Decarboxylase bis zur Homogenität gereinigt. Dies war umso schwieriger, als daß es zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Anhaltspunkte bezüglich der Eigenschaften eines solchen Enzyms gab, die bei der Entwicklung einer Reinigungsstrategie hätten helfen können.

Zwar sind einige Aromaten-Decarboxylasen beschrieben worden, von denen jedoch nur neun unterschiedliche bekannt sind, die direkt den Benzolring decarboxylieren, d.h. unmittelbar am Ring befindliche Carboxylgruppen abspalten (BRENDA, 2005). Deren Vielfalt ist bezüglich Größe, IEP, sowie pH- und Temperaturoptima sehr groß. Von diesen Decarboxylasen allgemein gültige Aussagen über Aromaten-Decarboxylasen zu treffen, war folglich unmöglich. Gemeinsam ist den beschriebenen Enzymen lediglich die Unabhängigkeit von Cofaktoren (Smith & Ferry, 2000).

Von der Struktur her ähnelt die 4,5-Dihydroxyphthalsäure durchaus der Pyromellitsäure:

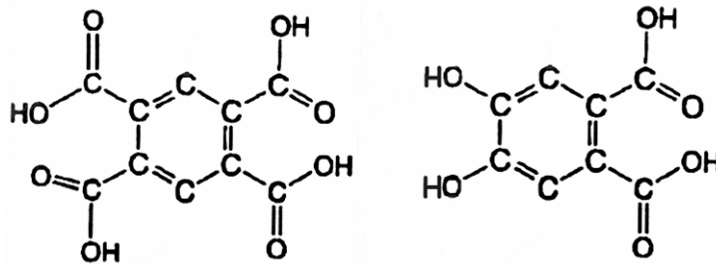


Abb. 4.3: Strukturen von Pyromellitsäure (links) und 4,5-Dihydroxyphthalsäure.

Doch allein für dieses Substrat sind derart unterschiedliche Decarboxylasen beschrieben worden, daß Hinweise zur Reinigung einer Mellitsäure-Decarboxylase nicht abgeleitet werden konnten. Das Molekulargewicht variiert von 150.000 (Nakazawa und Hayashi, 1978) bis 420.000kDa (Pujar und Ribbons, 1985), der K_m -Wert von $10\mu\text{M}$ (Pujar und Ribbons, 1985) bis über 1mM (Nakazawa und Hayashi, 1978), das pH-Optimum von 6,0 (Ribbons und Evans, 1960) bis 7,5 (Nakazawa und Hayashi, 1978).

Über Decarboxylasen höher carboxylierter Aromaten (d.h. ≥ 3 Carboxylgruppen) existieren bisher noch gar keine Veröffentlichungen. Ein Protokoll zur Reinigung einer Mellitsäure-Decarboxylase mußte daher völlig neu konzipiert werden.

4.3.1 Vorreinigung der Mellitsäure-Decarboxylasen

4.3.1.1 Ultrazentrifugation

Nach der Ultrazentrifugation fanden sich die Decarboxylase-Aktivitäten für Mellitsäure, Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure sämtlicher untersuchter Bakterienstämme im Überstand. Somit konnte es sich bei der Mellitsäure-Decarboxylase nur um ein cytoplasmatisches Enzym bzw. um cytoplasmatische Enzyme handeln. Alternativ wäre ein Membran-assoziiertes Proteinkomplex möglich gewesen, welcher die Mellitsäure bereits während des Transportes durch die Zellmembran teilweise hätte decarboxyliert.

können. Auch eine periplasmatische Lokalisation der Decarboxylase wäre denkbar gewesen: Durch die Abspaltung einiger Carboxylgruppen hätte die hoch polare Mellitsäure hydrophobiert und dadurch membrangängiger gemacht werden können. Es kam jedoch in allen Fällen zu einer leichten Erhöhung der spezifischen Decarboxylase-Aktivität im Überstand der Ultrazentrifugation gegenüber dem Rohextrakt, so daß die Decarboxylierungsreaktionen bei allen Stämmen folglich im Cytoplasma lokalisiert sein müssen.

4.3.1.2 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration in Rührzellen durch Membranen unterschiedlichen Porendurchmessers offenbarte eine umfangreiche Bandbreite der Größe der Mellitsäure-Decarboxylasen. Als Extremwerte fallen ein vollständiges Zurückhalten der Decarboxylasen der Stämme *LFG22a* und *LFG27a* (interne Stammbezeichnungen) durch die 300 kD-Membran auf der einen Seite ins Auge, auf der anderen eine Passage von zwei Drittel und mehr der Aktivität durch die 100 kD-Membran bei den Stämmen *HS21c* und *LFG19a*. Diese Werte lassen für die beiden Gruppen einen Molekulargewichts-Unterschied von rund einer Größenordnung vermuten. Im Gegensatz zum nahezu identischen Verhalten bei der Ammoniumsulfatfällung (siehe unten) erscheint die Größe der Mellitsäure-Decarboxylasen also sehr variabel.

Ein weiteres interessantes Ergebnis der Ultrafiltration war, daß die Gesamtaktivität der Decarboxylase-Proben in jedem Fall weitgehend erhalten blieben. Hier ergab sich ein erster Hinweis darauf, daß die Decarboxylierungsreaktionen unabhängig von Cofaktoren ablaufen könnten, da diese wesentlich kleineren Moleküle (im Verhältnis zu den Decarboxylasen) vollständig durch die verwendeten Membranen filtriert worden wären.

4.3.1.3 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung erwies sich als hervorragend geeignet zur Anreicherung der Mellitsäure-Decarboxylasen. Mit dieser einfachen Methode konnte die spezifische Aktivität um Faktoren von 5-8 erhöht werden, während üblicherweise nur eine Anreicherung eines gesuchten Proteins um den Faktor 2-3 erzielt werden kann (Rehm, 2000).

Erstaunlich war vor allem, daß die Decarboxylasen aller untersuchten Bakterienstämme im gleichen Bereich (um 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ausfielen. Da der Großteil des Gesamtproteins

erst bei höheren Konzentrationen ausfiel, scheint es sich bei den Mellitsäure-Decarboxylasen offenbar durchweg um relativ hydrophobe Proteine zu handeln (bzw. um Proteine, die gefaltet an ihren Außenbereichen überdurchschnittlich viele hydrophobe Seitenketten tragen). Für eine genauere Klärung dieser Frage bedürfte es allerdings einer Bestimmung der Aminosäuresequenz dieser Proteine und eines anschließenden Hydrophobizitätsplots (nach Kyte und Doolittle, 1982). Letztliche Gewißheit kann allerdings nur die Kristallisierung einer Mellitsäure-Decarboxylase mit anschließender Röntgenstruktur-Analyse geben.

Eine Ausnahme von dieser Regel bildete die Mellitsäure-Decarboxylase des Stammes X.93, die erst bei Ammoniumsulfat-Konzentrationen um 3M ausfiel. Interessanterweise ist dieses Bakterium auch das einzige, welches als Intermediat nicht die Pyromellitsäure bildet, sondern eine andere Benzentetracarbonsäure („TetraX“). Hier wäre eine Reinigung und vergleichende Analyse also nicht nur aus physiologischen Gründen interessant, sondern könnte auch Aufschlüsse bezüglich der strukturellen Anforderungen an ein solches Enzym geben.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der Vorreinigung der Mellitsäure-Decarboxylasen folgende Schlüsse zu (publiziert in Rudat et al., 2002):

- Die Decarboxylase-Aktivitäten für Mellitsäure, Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure sind in allen untersuchten Bakterienstämmen im Cytoplasma lokalisiert.
- Die Größe der Mellitsäure-Decarboxylasen variiert in den untersuchten Bakterienstämmen um mindestens eine Größenordnung.
- Die Mellitsäure-Decarboxylasen arbeiten offenbar unabhängig von Cofaktoren.
- Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung eignet sich hervorragend als Anreicherungsmethode für Mellitsäure-Decarboxylasen (Anreicherungsfaktoren von 5-8). Alle untersuchten Enzyme ähneln sich in ihrem Verhalten bei diesem Arbeitsgang, d.h. hier wurde eine allgemeine Eigenschaft dieser noch weitgehend unerforschten Enzyme gefunden.
- Die Mellitsäure-Decarboxylasen erweisen sich als relativ hydrophobe Proteine (bezüglich ihrer Außenbereiche).

4.3.2 Reinigungsversuche über klassische Methoden

Zunächst wurde versucht, die Decarboxylase mit Hilfe etablierter Reinigungsmethoden wie Gelpermeationschromatographie (GPC), Ionenaustauschchromatographie (IAC) sowie Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) zu reinigen.

Dies führte jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. Zwar konnte mit Hilfe eines IAC- wie auch eines GPC-Materials im batch-Verfahren bzw. mittels einer Kleinstsäule eine geringfügige Anreicherung (Faktor 3) erzielt werden; dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht in größeren Maßstab übertragen und war z.T. von erheblichen Verlusten an enzymatischer Aktivität begleitet.

Dies liegt zum einen begründet in der Tatsache, daß die Mellitsäure-Decarboxylase nur einen sehr geringen Teil des Gesamtproteins ausmacht. Zum anderen könnte insbesondere im Falle der IAC eine nicht ausreichende Entsalzung der Proteinprobe negativen Einfluß auf die Reinigung gehabt haben. Es wurden überwiegend ausgesalzte Rohextrakte des Stammes *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) verwendet, die möglicherweise noch hohe Konzentrationen an Ammoniumsulfat enthielten. Dies senkte zum einen den pH-Wert der Proben, zum anderen bleibt dies natürlich nicht ohne Einfluß auf die Ionenstärke. Für eine vorherige Entsalzung z.B. durch Ultrafiltration in Rührzellen war jedoch zu wenig Enzymmaterial vorhanden (um dasselbe Material in verschiedenen batch-Ansätzen mehrfach zu verwenden).

Zudem mußte bei der GPC eine Verdünnung der Aktivität bis hart an die Nachweisgrenze in Kauf genommen werden (vgl. außerdem 4.3.6).

Die Vorversuche mit den lipophilen Materialien blieben gänzlich erfolglos. Dies überraschte, da die durch die vorausgegangene Ammoniumsulfatfällung erhöhte Ionenstärke hier eigentlich zu einer stärkeren Bindung hätte führen sollen. Problematisch war hier eventuell eine physikalisch-chemische Veränderung der verwendeten Materialien infolge Alterung.

Diese Versuche sollten gegebenenfalls mit einer frischen Phenylsepharose wiederholt werden. Allerdings ist die HIC meist mit hohen Verlusten verbunden (60-90%; Rehm, 2000), so daß angesichts der geringen Ausgangsmenge die Decarboxylase-Aktivität nach der HIC wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze gelegen hätte. Zuvor sollte also die Anzucht des Stammes *LFG19a* optimiert bzw. in größerem Maßstab durchgeführt werden, um mehr Ausgangsmaterial zu erhalten (vgl. hierzu auch 4.8.1.2). Grundsätzlich würde sich die HIC im Anschluß an die zuvor durchgeführte Ammoniumsulfatfällung am ehesten als zusätzliche Reinigungsmethode anbieten.

4.3.3 Herstellung des LAC-Materials

Da die klassischen Methoden zur Proteinreinigung sich als ungeeignet für die Anreicherung einer Mellitsäure-Decarboxylase erwiesen hatten, wurde eine Liganden-Affinitätschromatographie-Methode entwickelt, bei der eine spezifische Reinigung dieses Enzyms mit höheren Anreicherungsfaktoren ermöglicht werden sollte. Hierzu wurde Mellitsäure nach vorheriger Aktivierung durch ein Carbodiimid kovalent an ein vorderivatisiertes Säulenmaterial (EAH-Sepharose™ 4B) gebunden. Die Anregung hierzu gab ein Reinigungsprotokoll der 4,5-Dihydroxyphtalsäure-Decarboxylase aus *Pseudomonas fluorescens* (Pujar und Ribbons, 1985). Dieses Enzym wurde durch Affinitätschromatographie an immobilisierter Protocatechusäure gereinigt, welche ebenfalls an EAH Sepharose 4B gekoppelt worden war.

Als sehr nützlich erwiesen sich die Vorversuche, bei denen zunächst der Farbstoff Alizarin gelb anstatt des eigentlichen Enzymliganden (Mellitsäure) an das Matrixmaterial gebunden wurde. So konnte das Carbodiimid EDC als wesentlich geeigneter (gegenüber CMC) bestimmt werden. Auch die Kopplungsbedingungen konnten abgeschätzt und zudem die Handhabung der Materialien besser kennen gelernt werden, beispielsweise das Entfernen von unspezifisch gebundenem Liganden mittels der unter 2.11.3 angegebenen Waschlösung.

Als sehr vorteilhaft zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Kopplungserfolges erwies sich das charakteristische UV-Spektrum der Mellitsäure, welches sich nach der Kopplung auch an der derivatisierten EAH-Sepharose 4B messen ließ; offenbar hat die kovalente Anbindung keinen großen Einfluß auf die Elektronenverteilung im Aromaten. So ließen sich die Kopplungsbedingungen gegenüber der generellen Synthesevorschrift der Firma Pharmacia erheblich verbessern. Zum einen wurde die Konzentration von Ligand und Carbodiimid bis kurz unterhalb der Ausfallgrenze erhöht, was eine Verbesserung der Kopplungseffizienz um einen Faktor >20 bewirkte (vgl. Tab. 3.8). Außerdem wurde statt des empfohlenen pH-Wertes von 4,5 letztlich ein neutraler pH-Wert von 7,0 gewählt, was eine weitere Effizienzsteigerung um einen Faktor >2 zur Folge hatte (vgl. Abb. 3.24). Insgesamt ergab sich so eine Steigerung der Kopplungseffizienz um etwa den Faktor 50.

Die erfolgreiche Kopplung konnte überdies mittels Infrarot-Spektroskopie nachgewiesen werden.

4.3.4 Bindung und Elution der Mellitsäure-Decarboxylase aus *LFG19a*

Zur Bindung an die Liganden-Affinitätschromatographie-Matrix wurden zunächst die Aktivitätsoptima der Mellitsäure-Decarboxylase des Stammes *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß dieses Enzym offenbar fast keiner Pufferung bedarf (vgl. Abb. 3.29). Diese Eigenschaft wurde später für die Entwicklung einer Aktivitätsfärbung genutzt. Für einen möglichen technischen Einsatz einer (modifizierten) Mellitsäure-Decarboxylase wäre dies von großem Vorteil, da eine Pufferung im großtechnischen Maßstab vermutlich unwirtschaftlich wäre.

Die Enzymoptima (pH 6,5 und Ionenstärke 50mM) erwiesen sich als geeignete Parameter, um eine gute Bindung der Decarboxylase an die Matrix zu gewährleisten. Allerdings adsorbierten unter diesen Umständen auch zahlreiche andere Proteine. Dies ist vermutlich auf den polyanionischen Charakter der gebundenen Mellitsäure bei annähernd neutralem pH-Wert zurückzuführen. Der Ligand liegt vier- bis fünffach negativ geladen vor (vgl. Titrationskurve in 3.1.1.1); somit hat das Säulenmaterial bis zu einem gewissen Grad die Eigenschaft eines (schwachen) Kationentauschers, an welchen Proteine mit positiv geladenen Gruppen (z.B. protonierte Lysin- oder Glutaminreste) über elektrostatische Wechselwirkungen binden können. Entsprechend ließen sich diese unspezifisch gebundenen Proteine durch Erhöhung des pH-Wertes (und die daraus resultierende Deprotonierung der oben genannten Gruppen) von der Säule eluieren. Denselben Effekt hatte eine Erhöhung der Ionenstärke, da hier die Ionen des Laufmittels (des Elutionspuffers) mit den Proteinen um die aktiven Zentren an der stationären Phase konkurrieren (Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und gebundener Mellitsäure).

Die mittels „klassischer“ Elutionsmethoden erzielten Reinigungsfaktoren waren jedoch ausgesprochen niedrig, da es bei einer Erhöhung von pH-Wert und Ionenstärke auch zu einer teilweisen Ablösung des gesuchten Enzyms von der Säule kam; auch durch Kombination der Elutionsmethoden ließ sich nur eine Anreicherung um den Faktor 17 erzielen. Als wesentlich effizienter erwies sich eine spezifische Elution mit freier Mellitsäure. Bei gleichzeitiger Senkung von pH-Wert und Ionenstärke (und damit einer Erhöhung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Ligand und unspezifisch gebundenem Protein, siehe oben) ließ sich so die Mellitsäure-Decarboxylase in einer Einschnitt-Elution um Faktoren bis zu 175 anreichern.

Offensichtlich bindet die Mellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a* gut an die synthetisierte Säulenmatrix, d.h. trotz der kovalenten Anbindung ist Mellitsäure für

das Enzym als Substrat erkennbar. Die Bindung ist jedoch relativ locker, so daß unspezifische Elutionsmethoden wie Änderung des pH-Wertes oder Erhöhung der Ionenstärke zur Ablösung des gesuchten Enzyms von der Säule ausreichen. Eine spezifischere Elution durch Zugabe des freien Liganden bekräftigt diesen Eindruck: Obwohl die Mellitsäure-Konzentration im Elutionspuffer wesentlich niedriger war als in der Säulenmatrix (300 μ M : 5mM), war die Affinität des Enzyms zum freien Liganden so viel höher als zur Matrix, daß es zur vollständigen Elution der Decarboxylase kam.

Möglicher Grund hierfür ist eine sterische Behinderung des Enzyms bei der Bindung der an der Matrix befindlichen Mellitsäure durch den Spacer, obwohl dieser mit elf Atomen relativ lang gewählt wurde. Andererseits hat dieser Umstand auch einen positiven Effekt: Die gebundene Mellitsäure (bzw. die vom Spacer ins Medium ragende Benzenpentacarbonsäure) kann offenbar nicht enzymatisch umgesetzt werden. Wäre dies der Fall gewesen, wäre es zu einer Decarboxylierung des Liganden gekommen, was die sehr aufwendig hergestellte Matrix zu einem Einwegmaterial degradiert hätte. Unter Umständen wäre es hierdurch trotz im Grunde optimaler Bindungskonditionen schon nach kurzer Zeit zu einer Ablösung der Decarboxylase von der Säule gekommen. Mittels UV-spektralphotometrischer Vermessung mehrfach benutzten Säulenmaterials konnte gezeigt werden, daß das Material nicht decarboxyliert wurde: Das charakteristische UV-Spektrum der Mellitsäure blieb erhalten, und es kam auch nicht zu einer Abnahme der Absorption bei 235nm.

Eine interessante Beobachtung war die partielle Decarboxylierung der zum Elutionspuffer gegebenen Mellitsäure ohne Elution der Decarboxylase (bei geringer $c[\text{Mel}]$ im Elutionspuffer). Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen:

- ✓ Die Decarboxylase wird durch die Mellitsäure im Puffer kurzfristig von der Säule gelöst. Nach einer Decarboxylierung der freien Mellitsäure ist die Affinität zur so entstandenen Pyromellitsäure niedriger als zur an die Säulenmatrix gebundenen Mellitsäure, so daß das Enzym wieder an die Säule adsorbiert. Dies ist nicht mehr der Fall, wenn die Konzentration der Mellitsäure im Elutionspuffer so hoch gewählt wird, daß das Enzym bereits mit dem Puffer von der Säule gespült wurde, bevor alle Mellitsäuremoleküle im Elutionspuffer umgesetzt werden konnten.
- ✓ Die Decarboxylase verfügt über (mindestens) eine zusätzliche Substratbindestelle (z.B. zu regulatorischen Zwecken; Fakoussa, persönliche Mitteilung) und bindet mit dieser an die mit Mellitsäure derivatisierte Säulenmatrix. Somit

bliebe das aktive Zentrum frei, um die Mellitsäuremoleküle im Elutionspuffer umzusetzen. Das Enzym könnte auch als Multimer vorliegen (vgl. auch 4.3.6), so daß mehrere aktive Zentren vorlägen. In diesem Fall würde eine Erhöhung der Mellitsäurekonzentration im Elutionspuffer allerdings nur dann zu einer Elution der Decarboxylase führen, wenn $c[\text{Mel}]_{\text{Elutionspuffer}} > [\text{Mel}]_{\text{Säule}}$ gewählt wird (was nicht der Fall war) oder wenn die Affinität des Enzyms zur freien Mellitsäure deutlich höher ist als zur gebundenen (was zu vermuten ist; siehe oben).

Die beiden Erklärungen müssen nicht unvereinbar sein. Aufschluß über die Details der enzymatischen Bindung von Mellitsäure kann letztlich nur eine Strukturanalyse geben.

4.3.5 Nachreinigung der Decarboxylase

Eine zweite Durchführung der Liganden-Affinitätschromatographie mit bereits einmal mittels LAC gereinigter Mellitsäure-Decarboxylase führte zu einer nahezu völligen Entfernung sämtlicher Verunreinigungen aus der Proteinlösung; auch nach Silberfärbung ließen sich im Proteingel keine weiteren Banden mehr erkennen (Nachweisgrenze etwa 100pg/Bande; Rehm, 2000). Dies läßt vermuten, daß eine Übertragung dieser Methode in einen größeren Maßstab sowie ggf. FPLC-Unterstützung bereits bei einmaliger Anwendung zu einer vollständigen Reinigung führen könnte.

Die Auftrennung im SDS-Gel nach Kochen in reduzierendem Puffer zeigte ebenfalls nur eine Bande; offenbar beinhaltet die Proteinstruktur keine durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten, welche sonst durch die Zugabe von Mercaptoethanol reduziert und gespalten worden wären.

4.3.6 Native PAGE

Bei nativer PAGE der gereinigten Decarboxylase zeigten sich bei Coomassie-Färbung mehrere Banden, obwohl im SDS-Gel auch nach der um drei Größenordnungen empfindlicheren Silberfärbung keine zusätzlichen Banden mehr erkennbar waren. Diese lagen in regelmäßigen Abständen übereinander. Dies weist auf die Tendenz des Enzyms hin, im nativen Zustand Multimere auszubilden. Zur Verifizierung dieser Schlußfolgerung würde sich eine Gelpermeationschromatographie des gereinigten Proteins anbieten: Trotz des mittels SDS-PAGE eindeutig ermittelten Monomers mit einer Größe von etwa 45kDa könnten hier unter Umständen mehrere aktive Fraktionen auftreten (falls die multimeren Formen ebenfalls über Decarboxylase-Aktivität

verfügen). Eventuell ist dies sogar ein Grund dafür, weshalb mit der GPC keine guten Trennergebnisse erzielt werden konnten, nachdem die ersten Vorversuche ja eine deutlich höhere Größe der Mellitsäure-Decarboxylase suggerierten (vgl. 3.6.3).

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis eventuell nativ vorhandener Di- und Multimere ist deren Stabilisierung durch die Zugabe von Formaldehyd (Sahl, persönliche Mitteilung). Bei einer anschließenden SDS-PAGE müßten im Gel mehrere Banden zu sehen sein.

4.3.7 Aktivitätsfärbung

Die Aktivitätsfärbung zeigte deutlich die Funktionalität der Mellitsäure-Decarboxylase auch nach zweistündiger Gelelektrophorese bei 80V. Dies beweist einmal mehr die hohe Stabilität der Mellitsäure-Decarboxylase. Außerdem ist dies ein weiterer Beleg dafür, daß dieses Enzym völlig unabhängig von Cofaktoren arbeitet.

Von den in Abb. 3.43 zu erkennenden Banden im nativen Gel zeigte nur eine die gewünschte Farbreaktion. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder ist tatsächlich nur das mutmaßliche Monomer der Decarboxylase aktiv, oder die Sensitivität der Methode ist nicht ausreichend, um die Aktivität der Di- bzw. Multimere sichtbar zu machen. Die Sensitivität der Methode stellt in der Tat ein Problem dar, da der entstehende pH-Gradient sich sehr schnell wieder abbaut: Die gebildeten OH⁻-Ionen geben einfach ihre Ladung an das umliegende Wasser ab, während neues Substrat durch Diffusion viel langsamer zum Enzym gelangt. Bei Vorversuchen mit Enzym-Substrat-Lösungen in Reagenzgläsern trat der Farbumschlag z.T. erst über Nacht ein. Da während einer solch langen Zeit wohl auch das Enzym aus dem Gel diffundieren würde, muß entsprechend viel Aktivität aufgetragen werden (ca. 300mU), um eine vorherige Farbreaktion zu gewährleisten.

Günstiger wäre die Bildung eines Produktes, welches ausfällt und sich so lokal akkumuliert. Hierzu wurden Versuche durchgeführt, bei denen das abgespaltene CO₂ als Calciumcarbonat ausgefällt werden sollte (vgl. 2.15.1). Die störende Interaktion der Ca²⁺-Ionen mit der Mellitsäure könnte minimiert werden, indem man das native Proteingel, welches die Decarboxylase enthält, mit dem Substrat versetzt und das entstehende CO₂ in einem zweiten Gel auffängt, welches Ca²⁺ enthält („gel overlay“). Durch eine ähnliche Methode gelang die Aktivitätsfärbung einer Lipase, indem die aus Olivenöl abgespaltene freie Ölsäure in einem zweiten Gel mit einem pH-Indikator interagierte (Snellman et al., 2002).

4.4 Induktion und Substratspezifität der Mellitsäure-Decarboxylase

Durch Anzucht mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen wurde die Induzierbarkeit der Mellitsäure-Decarboxylase-Aktivität im Bakterienstamm *LFG19a* überprüft. Außerdem wurde die Substratspezifität des Enzyms bzw. der Enzyme für verschiedene polycarboxylierte Aromaten getestet.

4.4.1 Expression der Decarboxylase-Aktivitäten bei Anzucht mit verschiedenen C-Quellen

Die Mellitsäure-Decarboxylase wird in dem Stamm *LFG19a* nicht konstitutiv exprimiert; bei Anzucht mit Glucose oder bereits z.T. oxidierten Aromaten wie Protocatechusäure oder 5-Hydroxyphtalsäure ließ sich im Zellextrakt keine Decarboxylase-Aktivität nachweisen. Dieses Phänomen der Katabolitrepression findet sich ubiquitär bei Bakterien: Wenn eine leichter verwertbare Kohlenstoffquelle vorhanden ist, werden die Enzyme zur Verwertung spezieller Substrate häufig reprimiert bzw. nicht induziert (z.B. Jacob et al., 1960).

Für fast alle beschriebenen Aromaten-Decarboxylasen wurde deren Induzierbarkeit nur in Anwesenheit ihres jeweiligen Substrates nachgewiesen, z.B. für die Gallussäure-Decarboxylase aus *Pantoea agglomerans* (Zeida et al., 1998), die Coumarsäure-Decarboxylase aus *Lactobacillus plantarum* (Cavin et al., 1997), die Ferulasäure-Decarboxylase aus *Bacillus pumilus* (Degrassi et al., 1995) sowie die 4,5-Dihydroxyphtalat-Decarboxylase aus *Pseudomonas fluorescens* (Pujar und Ribbons, 1985). Eine konstitutive Expression der Mellitsäure-Decarboxylase wäre also sehr unwahrscheinlich gewesen. Allerdings ist die Anwesenheit des Substrates (bzw. eines ähnlichen Aromaten) nur notwendiges und kein hinreichendes Kriterium für die Induktion der Mellitsäure-Decarboxylase; zur Expression der Decarboxylase kam es nur dann, wenn die betreffenden polycarboxylierten Aromaten die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle im Medium darstellten. Dies war in den oben angegebenen Literaturstellen nur bei der Expression der 4,5-Dihydroxyphtalat-Decarboxylase der Fall: Hier wurde *o*-Phtalsäure als einzige C-Quelle verwendet. Dies erklärt auch, warum die Induktionsversuche von Lammerich (1998) nicht zum Erfolg führten; hier wurde (vergeblich) versucht, durch Zugabe von Mellitsäure zu einer in Komplexmedium wachsenden Kultur eine Induktion der Mellitsäure-Decarboxylase zu bewirken.

Durch die differentielle Anzucht mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen konnte außerdem gezeigt werden, daß es zweier Decarboxylasen bedarf, um Mellitsäure zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure zu decarboxylieren. Interessanterweise wurde die Pyromellitsäure-Decarboxylase erst induziert, wenn die C-Quelle mindestens vier Carboxylgruppen am Ring trug. Die Mellitsäure-Decarboxylase hingegen, die eigentlich erst ab fünf Carboxylgruppen benötigt wird, wird auch bei Wachstum mit Pyromellitsäure und sogar mit Benzen-1,2,4-tricarbonsäure exprimiert. Dies konnte durch Enzymtests nachgewiesen sowie gelelektrophoretisch visualisiert werden (Abb. 3.39 und 3.40).

Das Proteingel zeigt außerdem ein sehr ähnliches Bandenmuster bei Anzucht mit Aromaten mit drei, vier, fünf und sechs Carboxylgruppen, während bei Anzucht mit Protocatechusäure und 5-Hydroxyisophtalsäure andere Banden den wesentlichen Teil des Proteinspektrums ausmachen. Unter anderem erfordern die höher carboxylierten Aromaten wahrscheinlich besondere Oxygenasen sowie möglicherweise andere Transportsysteme (welche allerdings u.U. in diesem Gel (nach Affinitätschromatographie) gar nicht sichtbar wären: Zwar sollten diese Proteine eine hohe Affinität zur Mellitsäure besitzen, aber als Transportproteine wären sie wahrscheinlich Membran-assoziiert und bereits durch die Ultrazentrifugation vom Zellextrakt abgetrennt worden).

4.4.2 Vergleich der Decarboxylase-Aktivitäten für verschiedene Substrate

Die Mellitsäure-Decarboxylase setzt mit annähernd gleicher Aktivität neben der Mellitsäure auch die Benzenpentacarbonsäure um. Offenbar ist die Substratbindestelle wie auch das aktive Zentrum hinreichend unspezifisch, beide BCS zu erkennen und zu decarboxylieren. Da die Benzenpentacarbonsäure mittels HPLC als Zwischenprodukt identifizierbar ist, erfolgt nach einfacher Decarboxylierung der Mellitsäure zunächst eine Dissoziation des Intermediats vom Enzym. Anschließend kommt es zu einer Neubindung der gerade gebildeten Benzenpentacarbonsäure. Wahrscheinlich ist diese BCS bei ihrer Bildung so ungünstig am Enzym gelegen, daß eine sofortige zweite Decarboxylierung nicht möglich ist. Vielleicht erfordert das aktive Zentrum die unmittelbare Nachbarschaft mindestens zweier weiterer Carboxylgruppen zu beiden Seiten der abzuspaltenden Carboxylgruppe (vgl. auch 4.6.2). Für eine zuverlässige

Aussage hierzu wäre eine Röntgenstrukturanalyse des Enzym-Substrat-Komplexes erforderlich.

Ein Vergleich mit anderen Decarboxylasen polycarboxylierter Aromaten war nicht möglich, da ein solches Enzym noch nie beschrieben wurde (vgl. jedoch 4.6). Grundsätzlich ergeben sich jedoch Parallelen zum relativ gut untersuchten Abbau polychlorierter Aromaten und Cycloalkane. Hier konnte z.B. ein 17kDa großes Polypeptid isoliert werden, welches eine dreifache Dehydrochlorierung von γ -Hexachlorcyclohexan zu 1,2,4-Trichlorbenzen durchführt (Imai et al., 1991). Hierbei wird ebenfalls das erste Zwischenprodukt, das Pentachlorcyclohexen, freigesetzt und ist über Gaschromatographie nachweisbar (Imai et al., 1989). Anschließend setzt dasselbe Enzym diese Verbindung zu Tetrachlorcyclohexadien um, welches eine spontane Dechlorierung zu 1,2,4-Trichlorbenzen erfährt (Nagata et al., 1999). Auch hier wird also ein pentasubstituiertes Zwischenprodukt vom Enzym freigesetzt und neu gebunden, anstatt beide Reaktionsschritte gleichzeitig oder mit gebundenem Substrat durchzuführen. Interessant ist auch, daß hier ebenfalls ein 1,2,4-trisubstituiertes Intermediat entsteht.

4.5 Untersuchung der Abbauwege der BCS

Polysubstituierte Aromaten müssen in der Regel zumindest teilweise von Substituenten befreit werden, bevor der Benzenring als Kohlenstoffquelle verwertet werden kann. Unter Umständen (insbesondere unter Abwesenheit von Sauerstoff) können Bakterien den Aromaten auch für verschiedene Zwecke nutzen, ohne den Kern anzugreifen: Ringsubstituenten können z.B. als Elektronenakzeptor dienen, wie etwa im Falle der Dehalorespiration, und so am Energiestoffwechsel partizipieren (Gibson und Harwood, 2002). Außerdem können extrazelluläre Chinone die Aktivitäten verschiedener Mikroorganismen zusammenführen, indem sie als Elektronen-„Shuttle“ (unlösliche) Elektronen aus der Atmungskette eines Bakteriums auf einen (ebenfalls unlöslichen) Elektronenakzeptor eines anderen Bakteriums übertragen („interspecies transfer“; Lovley et al., 1999). Ein generelles Schema zur mikrobiellen Umsetzung von Substituenten aromatischer Ringe ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

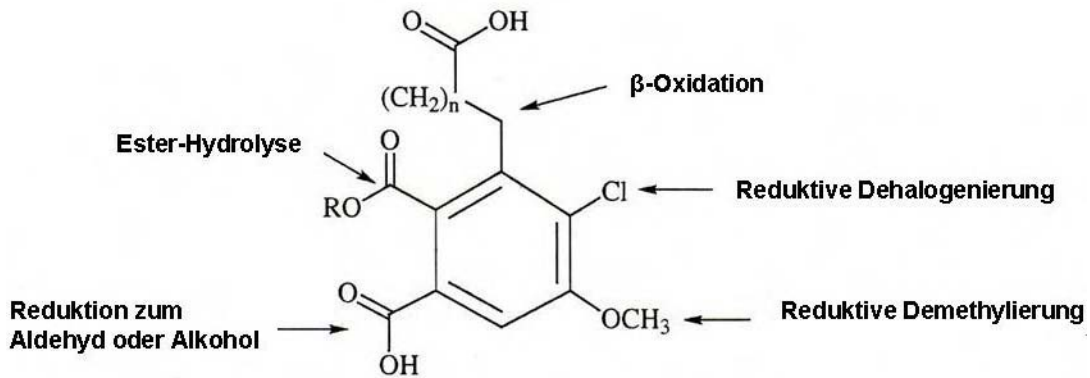


Abb. 4.4: Üblicherweise vorgefundene bakterielle Angriffe auf Substituenten aromatischer Verbindungen (nach Gibson und Harwood, 2002).

Wird ein polysubstituierter Aromat als *einzig*e Kohlenstoff- und Energiequelle angeboten, muß zunächst ein Teil des Ringes freigelegt werden; es ist kein Mikroorganismus bekannt, der einen substituierten Aromaten spaltet, ohne ihn vorher Oxygenasen zugänglich zu machen. Im Falle der vollständig substituierten Mellitsäure müssen mehrere Carboxylgruppen abgespalten werden. Die Einleitung des Abbaus von Mellitsäure sowie von Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure durch enzymatische Decarboxylierung wurde mittels HPLC verfolgt. Die Untersuchung der weiteren Verstoffwechslung (Ringspaltung) war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Aufgrund der bekannten Abbauege anderer Aromaten können jedoch einige hypothetische Aussagen hierzu getroffen werden (4.5.2).

4.5.1 Decarboxylierung der Mellitsäure

Für alle Stämme ergab sich eine dreifache Decarboxylierung zur Benzen-1,2,4-tricarbonsäure. Mit einer Ausnahme entstand als Zwischenprodukt die Pyromellitsäure; lediglich das Isolat X.93 (*Alcaligenes piechaudii*) bildete eine andere Benzentetracarbonsäure als Zwischenprodukt.

Die bevorzugte Decarboxylierung zu Pyromellitsäure dürfte in deren symmetrischer Struktur liegen. Die Standardbildungsenthalpie dieser Benzentetracarbonsäure müßte deutlich niedriger liegen als die beiden anderen Strukturisomere. Entsprechend war auch nur dieses Isomer kommerziell erhältlich, eine Synthese der beiden anderen aus den (ebenfalls nur schwer erhältlichen) Vorstufen 1,2,3,4- bzw. 1,2,3,5-Tetramethylbenzen (Prehniten bzw. Isoduren) ist extrem aufwendig (dreimonatige (!) langsame Oxidation mit KMnO₄; Barrio, 1993). Außerdem begünstigt die symmetrische Struktur wahrscheinlich die weitere Decarboxylierung, da das Molekül in verschiedenen

Orientierungen als Substrat erkannt werden kann. Aufgrund dieser Symmetrie kann als Decarboxylierungsprodukt einzig die Benzen-1,2,4-tricarbonsäure entstehen, egal welche Carboxylgruppe abgespalten wird. Da diese Benzentricarbonsäure offenbar ohne Schwierigkeiten weiter abgebaut werden kann (auch von Bakterien, die nicht über eine Mellit- und Pyromellitsäure-Decarboxylase verfügen, z.B. durch den Stamm *Arthrobacter ureafaciens*, vgl. auch 4.8.2.4), bietet sich eine Decarboxylierung der Mellitsäure mit Pyromellitsäure als Zwischenprodukt an.

Interessanterweise führt die Dehalogenierung polychlorierter Aromaten ebenfalls bevorzugt zum 1,2,4-substituierten Isomer (Rippen, 2003 sowie Endo et al., 2005): Bei der reduktiven Dehalogenierung von Hexachlorbenzen kommt es zur sequentiellen Abspaltung von Chlorid über Pentachlorbenzen und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzen (analog zur Pyromellitsäure) zum 1,2,4-Trichlorbenzen (Fathepure et al., 1988 sowie Jayachandran et al., 2003; vgl. Abb. 4.5).

Pentachlorphenol wird in *para*-Stellung zur Hydroxylgruppe oxidativ dechloriert, anschließend erfolgt eine reduktive Dechlorierung zu 1,2,4-trichlor-3,6-dihydroxybenzen (bzw. 2,3,6-Trichlor-*p*-hydrochinon), so daß auch in diesem Fall die Abspaltung der Chlor-Substituenten analog zur Abspaltung der Carboxylgruppen der Mellitsäure verläuft (Abb. 4.6).

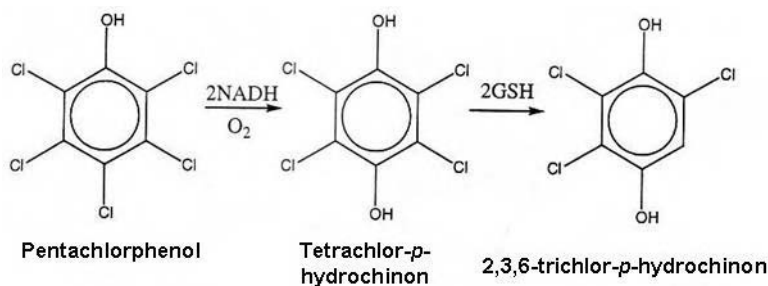


Abb. 4.6: Dechlorierung von Pentachlorphenol (nach Cai und Xun, 2002).

Das früher als Insektizid eingesetzte γ -Hexachlorcyclohexan (Lindan) erfährt zur Einleitung seines Abbaus eine Dehydrohalogenierung - ebenfalls zum 1,2,4-Trichlorbenzen (Abb. 4.7, Imai et al., 1991).

Eventuell ist das 1,2,4-Isomer für Oxygenasen leichter zugänglich.

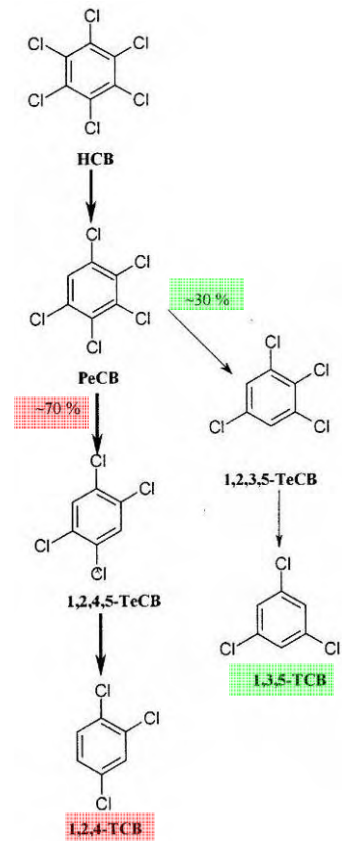


Abb. 4.5: Der Abbau von Hexachlorbenzen durch *Dehalococcoides sp.* verläuft bevorzugt über 1,2,4-Trichlorbenzen, welches von Aerobiern oxidativ gespalten und verwertet werden kann, wohingegen das 1,3,5-Isomer nicht weiter abgebaut wird (nach Jayachandran et al., 2003).

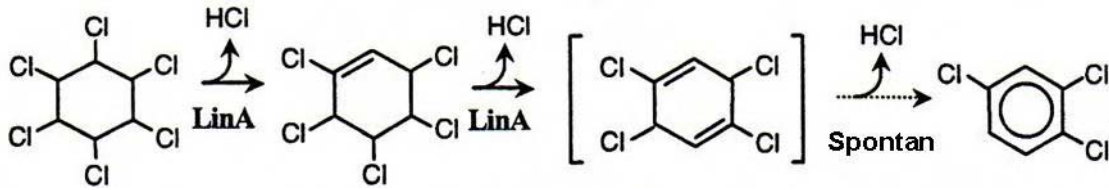


Abb. 4.7: Die Einleitung des Abbaus von γ -Hexachlorcyclohexan durch *Sphingomonas paucimobilis* verläuft über eine dreifache Dehydrohalogenierung zum 1,2,4-Trichlorbenzen. Wie bei der enzymatischen Decarboxylierung von Mellitsäure durch das Bakterium *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) erfolgt die Abspaltung der ersten beiden Substituenten nur durch ein einziges Enzym (γ -Hexachlorcyclohexan-Dehydrochlorinase, LinA). Zwischenstufe ist ebenfalls das symmetrische 1,2,4,5-Tetraomer, welches spontan zum 1,2,4-Trichlorbenzen dehydrohalogeniert wird (Endo et al., 2005).

4.5.2 Weiterer Abbau der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure

Nach der Entstehung der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure kann *in vitro* kein weiteres Abbauprodukt beobachtet werden: Weder ändert sich das UV-Spektrum der entstandenen Tricarbonsäure (Spektralphotometer), noch können weitere Abbauprodukte detektiert werden (HPLC). Offenbar findet als nächster Schritt keine weitere Abspaltung von Carboxylgruppen durch eine Decarboxylase statt. Sehr wahrscheinlich kommt es zu einem oxidativen Angriff auf den Ring, genauer gesagt zu einer Hydroxylierung durch Monooxygenasen, welche *in vitro* wahrscheinlich nicht abläuft (siehe unten).

In der Regel werden Aromaten vor ihrer Spaltung an zwei benachbarten Stellen hydroxyliert. Ob dabei zwei oxidative Decarboxylierungen der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure in 1- und 2-Stellung zu Protocatechusäure erfolgt oder eine Hydroxylierung an einem nicht substituierten C-Atom des Ringes wurde nicht untersucht.

Bei allen beschriebenen Decarboxylierungen von Benzenmono- und -dicarbonsäuren erfolgte die Abspaltung von CO_2 von hydroxylierten Ringen (bzw. von aminierter Benzoessäure; McCullough, 1957). Der Abbau der unterschiedlichen Phtalsäure-Isomere sowie von Phtalat-Estern wurde zwar schon häufig unter Nitrat- bzw. Sulfat-reduzierenden (Nozawa und Maruyama, 1988a u. b; Eaton und Ribbons, 1982) sowie methanogenen (Kleerebezem et al., 1999a u. b) Bedingungen beobachtet (Gibson und Harwood, 2002); aber eine nicht-oxidative Decarboxylierung von Iso- und Terephtalsäure wurde bisher nur postuliert (Afring u. Taylor, 1981). Die Decarboxylierung von *o*-Phtalsäure wurde bisher nur indirekt aufgrund der Akkumulation von Benzoessäure nachgewiesen (Nozawa u. Maruyama, 1988a u. b) bzw. an einer Mischkultur gezeigt, wobei zunächst eine Reduktion des Moleküls zu 1,2-Dihydrophtalsäure stattfindet, wonach eine oxidative Decarboxylierung zu Benzoessäure

folgt (Taylor u. Ribbons, 1983). Ein Enzym, welches Phtalsäure direkt zu Benzoesäure decarboxyliert, wurde bis heute nicht isoliert. Ebenso unbekannt ist eine enzymatische Decarboxylierung der Benzoesäure zu Benzol, vermutlich aufgrund dessen cytotoxischer Eigenschaften.

Aufgrund dieser Ausführungen ist zu vermuten, daß zunächst eine Hydroxylierung des Ringes an einem oder mehreren Ring-C-Atomen erfolgt, bevor die restlichen Carboxylgruppen abgespalten werden (bzw. beide Vorgänge parallel ablaufen durch oxidative Decarboxylierungen mittels Monooxygenasen). Der Nachweis hydroxylierter Zwischenstufen war nicht möglich, wahrscheinlich wegen des Cofaktorbedarfes (insbesondere Flavine; Beadle u. Smith, 1982) der verantwortlichen Oxygenasen (es wurden keine Cofaktoren zu den Testansätzen gegeben) sowie aufgrund der z.T. sehr hohen Sauerstoffempfindlichkeit dieser Enzyme. Sehr wahrscheinlich kommt es zur Bildung des mehr oder weniger obligatorischen Zwischenproduktes Protocatechusäure, bevor der Ring unter Mitwirkung einer Dioxygenase oxidativ gespalten wird. Ob diese Linearisierung durch *ortho*- oder *meta*-Spaltung erfolgt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da nur die Decarboxylierungsschritte von Interesse waren.

Auch hier lassen sich Parallelen zum Abbau polychlorierter Aromaten aufzeigen. Am Beispiel des Bakteriums *Sphingomonas paucimobilis* wurde gezeigt, daß 1,2,4-Trichlorbenzen (entstanden durch Dehydrohalogenierung von γ -Hexachlorcyclohexan; Imai et al., 1991) durch eine Hydrolase zunächst dearomatisiert und in 5-Stellung hydroxyliert wird (Nagata et al., 1993). Anschließend erfolgt eine oxidative Dechlorierung in 2-Stellung durch eine Monooxygenase. Es folgt eine Rearomatisierung des Ringes (Nagata et al., 1994), gefolgt von einer reduktiven Dechlorinierung zu Chlorohydrochinon (Miyachi et al., 1998). Dieses wird durch eine Dioxygenase gespalten (*ortho*-Spaltung) und dabei oxidativ dechloriert zu Maleylacetat (Miyachi et al., 1999). Dieses wird oxidiert zu 3-Oxoadipat, welches den üblichen Abbauweg aromatischer Verbindungen über Succinat in den Tricarbonsäurecyclus einschlägt und letztlich zu CO₂ oxidiert wird.

Ein analoger Abbauweg für Pentachlorphenol wurde oben bereits angesprochen und wird hier nun vollständig gezeigt (Abb. 4.8; Cai und Xun, 2002):

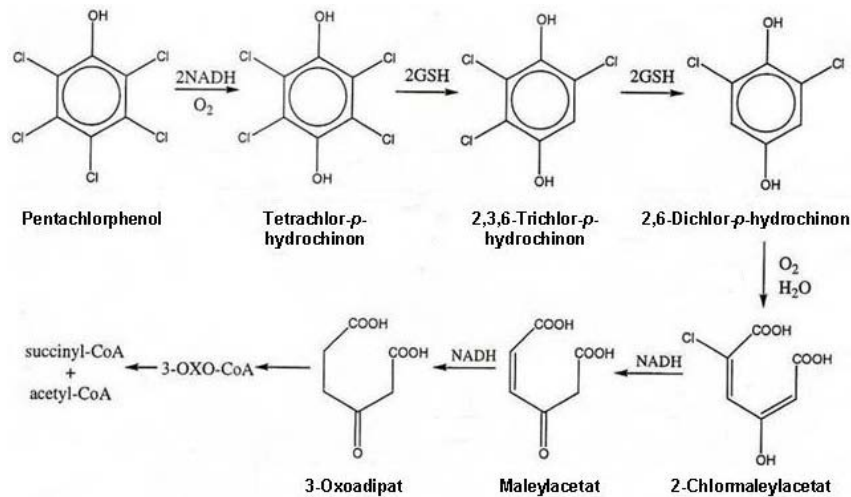


Abb. 4.8: Vollständige Mineralisierung von Pentachlorophenol durch *Sphingobium chlorophenolicum* mittels oxidativer und reduktiver Dehalogenierung, Ringspaltung und -oxidation zu Succinyl- und Acetyl-CoA, welche in den Tricarbonsäurecyclus eingeschleust werden (nach Cai u. Xun, 2002).

Es ist sehr wahrscheinlich, daß der weitere Abbau der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure ebenfalls durch mehrfache Hydroxylierung (darunter wohl eine oxidative Decarboxylierung durch eine Monooxygenase) eingeleitet wird. Mutmaßliches Intermediat wäre hierbei eine zweifach hydroxylierte Phtalsäure (üblicherweise 4,5-Dihydroxyphtalsäure in Gram-negativen Bakterien, Habe et al., 2003), welche nicht-oxidativ zu Protocatechuat decarboxyliert werden dürfte (gezeigt für *Pseudomonas spec.* durch Grifoll et al., 1994; *Ps. fluorescens*, Pujar und Ribbons, 1985; *Ps. testosteroni*, Taylor und Ribbons, 1983 sowie Nakazawa und Hayashi, 1978). Dafür spricht das gute Wachstum des Bakteriums *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) mit Protocatechuat; ein Wachstum mit 4,5-Dihydroxyphtalsäure wurde nicht getestet. Vermutlich kommt es an dieser Stelle zur oxidativen Ringspaltung durch eine Dioxygenase. Zwar wäre auch eine nicht-oxidative Decarboxylierung zu Catechol (Brenzcatechin) denkbar; ein solches Enzym wurde für verschiedene Anaerobier beschrieben (*Sedimentibacter hydroxybenzoicus* (*Clostridium hydroxybenzoicum*), He und Wiegel, 1996; *Klebsiella aerogenes* und *Rhodopseudomonas sp.*, Grant und Patel, 1969). Allerdings zeigte sich der Stamm *LFG19a* nicht zum Wachstum mit Catechol befähigt. Hingegen wurde eine Protocatechuat-3,4-Dioxygenase aus zahlreichen Aerobiern isoliert (u.a. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*; Brown et al. 2004), so daß diese Abbauvariante (Intradiol-Spaltung) durch das aerobe Bakterium *LFG19a* (*S. morelense/E. adhaerens*) wahrscheinlicher anmutet.

Zur Untersuchung des oxidativen Abbaus der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure wäre die Zugabe von Flavinen (FAD) und NAD(P)H zum Zellextrakt erforderlich (Abhängigkeit der Monooxygenasen (Balashova et al., 2001) wie auch einiger Dioxygenasen (Wolfe et

al., 2002) von diesen Coenzymen); für die Ringspaltung müßte außerdem Eisen hinzugegeben werden (üblicher Cofaktor der Protocatechuat-4,5-Dioxygenase ist Fe^{2+} , Chen und Lovell, 1994; Cofaktor der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase ist Fe^{3+} , Brown et al., 2004). Unter Umständen müßte aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit dieser Enzyme der Zellaufschluß anaerob erfolgen; zumindest aber wäre die Zugabe reduzierender Agentien wie z.B. Ascorbat oder Dithionit zum Ansatz erforderlich (Hayaishi et al., 1975).

Da die den Decarboxylierungen nachfolgenden Schritte für diese Arbeit nicht relevant waren, wurden keine diesbezüglichen Experimente durchgeführt.

4.5.3 Postulierter Abbauweg von Mellitsäure

Aus den beobachteten Decarboxylierungsreaktionen und vergleichenden Literaturstudien kann ein vorläufiger hypothetischer Abbauweg für Benzenhexacarbonsäure skizziert werden (Abb. 4.9). Nach dreifacher nicht-oxidativer Decarboxylierung durch die Mellitsäure- bzw. Pyromellitsäure-Decarboxylase erfolgt vermutlich eine oxidative Decarboxylierung der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure zu 4-Hydroxyphtalsäure. Von dieser Verbindung aus wird durch eine oxidative Decarboxylierung, gefolgt von einer nicht-oxidativen Decarboxylierung (oder umgekehrt) über eines der drei angegebenen möglichen Intermediate sehr wahrscheinlich Protocatechusäure gebildet, der Standardmetabolit der Verstoffwechslung (carboxylierter) aromatischer Verbindungen. Welcher der drei aufgeführten Aromaten als Zwischenstufe auftritt, könnte durch Fütterungsexperimente getestet werden; sollte sich eine (am besten ausschließliche) Präferenz des Bakterienstammes *LFG19a* für eine der drei Substanzen abzeichnen, so wäre diese Verbindung wahrscheinlich das gesuchte Intermediat (vgl. jedoch 4.8.1.4!).

Der weitere Katabolismus ausgehend vom Protocatechuat ist gut untersucht (Brown et al., 2004). Nach der bei Aerobiern üblichen oxidativen (Intradiol-) Ringspaltung durch eine Protocatechuat-3,4-Dioxygenase kommt es nach Laktonisierung des β -Carboxy-cis,cis-muconat zu einer weiteren nicht-oxidativen Decarboxylierung. Es handelt sich hierbei um die insgesamt sechste Decarboxylierung; an dieser Stelle sind also alle Carboxylgruppen der Mellitsäure vom Ring entfernt worden. Der weitere Abbau über 3-Oxo adipat führt letztlich zu Acetyl-CoA, welches im Tricarbonsäurecyclus (TCC) vollständig zu CO_2 oxidiert wird, sowie Succinat, welches anaplerotisch den TCC auffüllt. Somit gelangt höchstwahrscheinlich der gesamte innere Ring der Mellitsäure in den TCC.

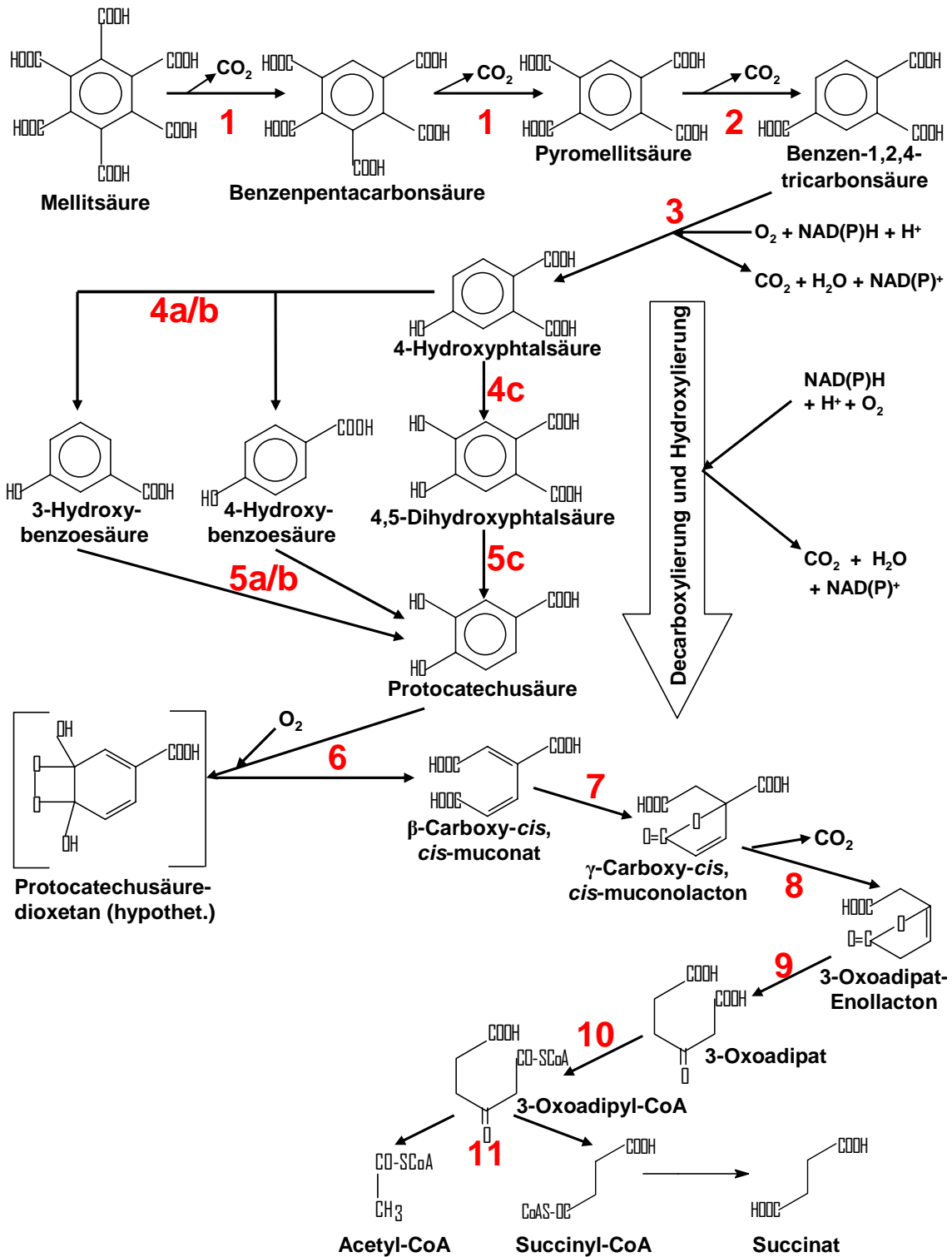


Abb. 4.9: Mineralisierung von Mellitsäure – hypothetischer Abbauweg polycarboxylierter Aromaten.

Es werden alle sechs Carboxylgruppen der Mellitsäure abgespalten, davon vermutlich nur eine durch oxidative Decarboxylierung (3), die anderen fünf durch „echte“ (nicht-oxidative) Decarboxylasen (C-C-Lyasen). Die Spaltprodukte Acetyl-CoA und Succinat gelangen letztlich in den Tricarbonsäure-Cyclus.

1 Mellitsäure-Decarboxylase; **2** Pyromellitsäure-Decarboxylase; **3** hypothetische Benzen-1,2,4-tricarbonsäure-Hydroxylase (Monooxygenase, decarboxylierend); **4a/b** 4-Hydroxyphthalsäure-1/2-Decarboxylase; **4c** 4-Hydroxyphthalsäure-5-Hydroxylase; **5a/b** 3/4-Hydroxybenzoessäure-4/3-Hydroxylase; **5c** 4,5-Dihydroxyphthalsäure-Decarboxylase **6** Protocatechusäure-3,4-Dioxygenase; **7** β-Carboxy-cis,cis-muconsäure laktonisierendes Enzym; **8** γ-Carboxymuconolacton-Decarboxylase; **9** 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase; **10** 3-Oxadipat-Succinyl-CoA-Transferase; **11** 3-Oxadipyl-CoA-Thiolase.

4.6 Reaktionsmechanismus der Mellitsäure-Decarboxylase

Die aus *Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens* (LFG19a) isolierte Mellitsäure-Decarboxylase ist ein ungewöhnliches Enzym: Es ist bisher kein anderes Enzym bekannt, welches zwei Carboxylgruppen von einem Aromaten abspaltet. Außerdem spalten alle bisher bekannten Benzencarbonsäure-Decarboxylasen Carboxylgruppen von einem zuvor hydroxylierten Ring ab; einzige Ausnahme ist die zwar schon vor einem halben Jahrhundert beschriebene, aber bis heute nie isolierte 4-Aminobenzoat-Decarboxylase (McCullough, 1957), die allerdings ebenfalls einen mit einem +M-Substituenten versehenen Aromaten decarboxyliert.

Allen Aromaten-Decarboxylasen, die direkt den Kern decarboxylieren, ist gemeinsam, daß sie die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Lyse ohne Cofaktoren durchführen (Smith & Ferry, 2000). Dabei ist die nicht-oxidative Decarboxylierung chemisch betrachtet keinesfalls eine triviale Reaktion, insbesondere im wäßrigen Milieu. Eigentlich wird hier ein radikalischer Mechanismus in einem organischen Lösungsmittel oder einer starken Säure/Lauge oder die Zuführung elektrischer oder thermischer Energie benötigt (vgl. auch 1.4.1.1).

Bisher wurde erst eine Decarboxylase aromatischer Carbonsäuren kristallisiert, welche direkt am Ring angreift. Hierbei handelt es sich um die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase (ODCase), welche im Nucleotidstoffwechsel den letzten Schritt der Biosynthese von Uridinmonophosphat (der Uracil-Vorstufe UMP) durchführt (Abb. 4.10).

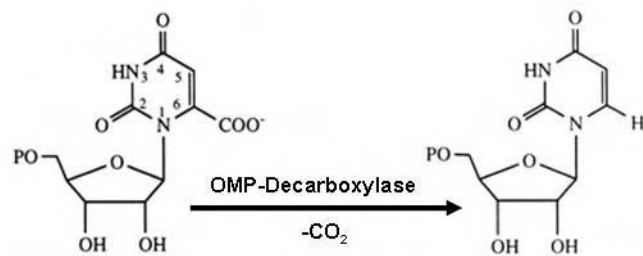


Abb. 4.10: Enzymatische Decarboxylierung von OMP zu UMP.

Die Kristallisierung dieses Enzyms im Jahre 2000 war und ist von großer Bedeutung für die gesamte Enzymologie, da hier völlig neue bzw. bisher nur vermutete Mechanismen der enzymatischen Reaktionsbeschleunigung erstmals dokumentiert werden konnten. Sequenz- und Strukturvergleiche der ODCasen aus verschiedenen Mikroorganismen ergaben große Übereinstimmungen bzw. zahlreiche hoch konservierte Regionen. Unter Umständen können hieraus allgemeine Schlüsse für Aromaten-Decarboxylasen und somit auch für die Mellitsäure-Decarboxylase abgeleitet werden. Daher soll im folgenden der Reaktionsmechanismus dieses Enzyms erläutert werden.

4.6.1 Die OMP-Decarboxylase als Modell hoch effizienter Katalyse

Die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase (ODCase) wurde erstmals Anfang der 70er Jahre beschrieben (Murray und Ross, 1971; Fyfe et al., 1973). Dieses Enzym katalysiert die Decarboxylierung von OMP zu UMP. Der Reaktionsmechanismus dieses Enzyms war von großem Interesse: Während alle anderen zuvor beschriebenen Decarboxylasen das bei der Decarboxylierung intermediär entstehende Carbanion in einen Thiamin-, Pyridoxal- oder Pyruvoyl-Cofaktor delokalisieren (O'Leary, 1992), arbeitet dieses Enzym völlig ohne Coenzyme (Radzicka und Wolfenden, 1995); stattdessen wird das Carbanion in einem sp^2 -Hybrid-Orbital senkrecht zum π -Elektronensystem des Pyrimidinringes lokalisiert (Appleby et al., 2000). Offenbar arbeiten alle Aromatendecarboxylasen, die direkt am Ring angreifen, ohne Cofaktoren (Smith und Ferry, 2000), wie ja auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen.

Die ODCase wurde im Jahre 2000 als erste Aromaten-Decarboxylase überhaupt kristallisiert, und zwar aus verschiedenen Mikroorganismen aller drei Domänen Bacteria, Archaea und Eucarya (Appleby et al., 2000 aus *Bacillus subtilis*; Wu et al., 2000 aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* sowie Miller et al., 2000 aus *Saccharomyces cerevisiae*). Bei allen drei Enzymen handelt es sich um Homodimere mit hochkonservierter Aminosäureabfolge und Struktur.

Die ODCase nutzt dabei verschiedene Mechanismen, um die Reaktion von OMP zu UMP zu beschleunigen (zusammengestellt nach Antoniou et al., 2002):

- ✓ Weitgehender Ausschluß des Lösungsmittels Wasser durch hydrophobe Abschirmung des Substrats bzw. der reaktiven Gruppe
- ✓ Destabilisierung des Grundzustandes
- ✓ Stabilisierung des Übergangszustandes
- ✓ „protein dynamics“: Ideale Positionierung des Substrates für die Reaktion; anschließend Konformationsänderung des Enzyms und dadurch Verdrängung der Produkte

Das Zusammenspiel dieser Mechanismen macht die ODCase zum effizientesten bekannten Enzym überhaupt (Radzicka und Wolfenden, 1995): Die Beschleunigung der Decarboxylierung gegenüber der unkatalysierten Reaktion beträgt den enormen Faktor 10^{17} !

Entscheidend für die Destabilisierung des Grundzustandes und damit für die Decarboxylierung ist die elektrostatische Abstoßung zwischen der Carboxylgruppe des Substrats und dem Carboxylat eines Aspartatrests des Enzyms (Appleby et al., 2000).

Durch die gleichzeitige Stabilisierung des Enzyms mit Hilfe zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen werden die beiden Carboxylgruppen in einer sonst hydrophoben Tasche einander auf nur 3,5nm Abstand angenähert (Wu et al., 2000).

Abbildung 4.11 zeigt die Verankerung des Substrates OMP in einem „Bett“ aus Wasserstoffbrückenbindungen durch die ODCase aus *Bacillus subtilis*. Allein der Phosphatrest ist über mindestens neun H-Brücken stabilisiert; seine Entfernung führt zu einer Verlangsamung der Katalyse um 10^8 (Miller et al., 2000).

Diese gleichzeitige Anziehung und Abstoßung des Substrates im Grundzustand durch das Enzym wurde

von Jencks als genereller katalytischer Mechanismus vorgeschlagen und als „Circe-Effekt“ bezeichnet. (Jencks, 1975). Der in Abb. 4.11 gezeigte „Anker-Effekt“ würde auch mitbegründen, warum Enzyme trotz ihres in der Regel nur wenige Aminosäurereste umfassenden aktiven Zentrums fast immer eine Größe von mehreren hundert Aminosäuren besitzen: Um die reaktive Gruppe in die optimale Position zu bringen (welche in der Regel eine thermodynamisch ungünstige und somit sehr unwahrscheinliche ist), bedarf es einer hohen Energiezufuhr aus spezifischen Bindungs-Interaktionen zwischen Enzym und Substrat, wofür wiederum eine hoch geordnete dreidimensionale Struktur und ein großer Reaktionsraum vonnöten ist (nach Miller und Wolfenden, 2002).

Die oben beschriebene elektrostatische Abstoßung zwischen den beiden Carboxylgruppen wird im Übergangszustand reduziert durch Übertragung der negativen Ladung vom Carboxylat des OMP auf das C₆-Atom des Pyrimidins, welcher sich nahe einem protonierten Lysinrest befindet (in Abb. 4.11 gekennzeichnet als Lys62). Durch die Decarboxylierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, wodurch die negative Ladung (also das entstehende Carbanion) weiter entfernt vom Aspartat-Carboxylat und näher am Lysinrest zu liegen kommt: Durch Versuche mit Übergangszustands-Analoga konnte gezeigt werden, daß der Lysinrest sich um 2Å in

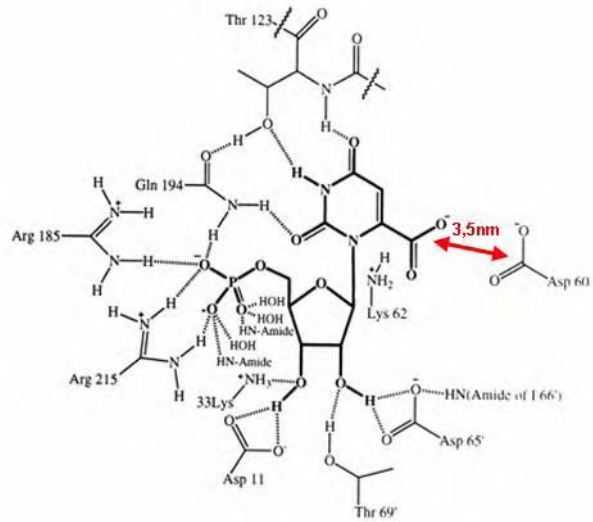


Abb. 4.11: Die OMP-Decarboxylase aus *B. subtilis* mit gebundenem Substrat (nach Appleby et al., 2000).

Richtung des Carbanions bewegt und so mit diesem ein Ionenpaar bilden kann (Wu et al., 2000).

Die Protonierung des Pyrimidins im Anschluß an die (bzw. einhergehend mit der) Decarboxylierung wird ebenfalls durch genau diesen Lysinrest bewirkt. Darüber hinaus gibt es Anzeichen für eine Beteiligung dieses Lysins bei der Direktion der Carboxylgruppe des Substrats ins aktive Zentrum (Miller et al., 2000). Dieser Lysinrest ist hochkonserviert (Lys62 in *B. subtilis*, Lys72 in *Methanobacterium thermoautotrophicum* und Lys93 in *S. cerevisiae*); ein Austausch dieses Lysinrestes führt in allen Fällen zu einem inaktiven Enzym (Appleby et al., 2000 sowie Smiley und Jones, 1992). Abb. 4.12 verdeutlicht die Rolle des Lysinrestes bei der Stabilisierung des intermediären Carbanions.

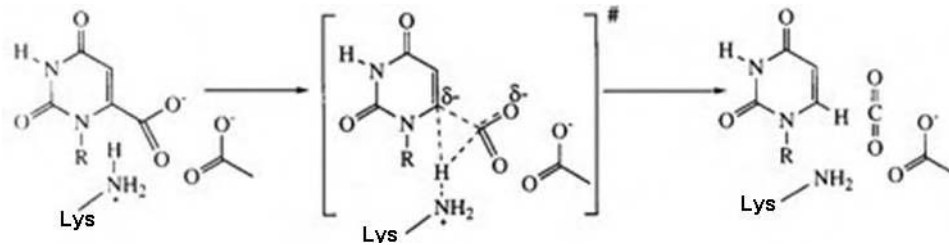


Abb. 4.12: Wahrscheinlicher Mechanismus der ODCase (nach Appleby et al., 2000).

Die Abspaltung des unpolaren CO_2 wird durch einen ebenfalls hochkonservierten hydrophoben Schirm („*hydrophobic umbrella*“, Miller et al., 2000) begünstigt, welcher aus Valin und Leucin bzw. Isoleucin besteht und die Atome O_4 und C_5 des Pyrimidins bedeckt (Appleby et al., 2000).

Die Deprotonierung (und damit Neutralisierung) des Lysins hat zur Folge, daß es zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen dem für die Decarboxylierung verantwortlichen Asp und einem weiteren Asp des Enzyms kommt. Beide Carboxylate waren zuvor durch zwei Salzbrücken mit dem positiv geladenen Lysinrest verbunden (vgl. Abb. 4.13). In der Folge kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, wodurch die Produkte aus der Substrat-Bindetasche entlassen werden („*electrostatic expulsion*“, Wu et al., 2000).

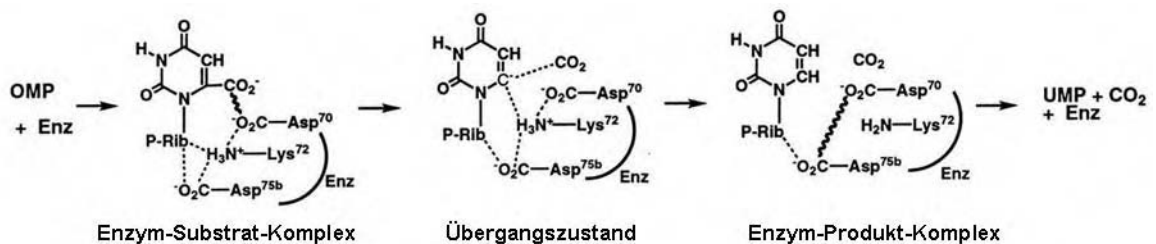


Abb. 4.13: Decarboxylierung und Produkt-Freisetzung durch die ODCase (nach Wu et al., 2000).

Nach anschließender Reprotonierung des Lysinrestes (durch Wasser, resultierend in einer Alkalisierung des Mediums) kann der katalytische Zyklus von Neuem beginnen.

4.6.2 Möglicher Reaktionsmechanismus der Mellitsäure-Decarboxylierung

Prinzipiell können alle oben beschriebenen katalytischen Mechanismen der Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase auf die Mellitsäure-Decarboxylase übertragen werden. Die zahlreichen Carboxylgruppen der Mellitsäure erlauben eine feste Einbindung in eine Substrat-Bindetasche über Wasserstoffbrücken. Der deprotonierte Zustand der Carboxylgruppen würde außerdem eine Stabilisierung über Salzbrücken/Ionenbindungen zulassen. Ein der abzuspaltenden Carboxylgruppe gegenüber liegender deprotonierter Aspartat- (oder Glutamat-) Rest würde die notwendige Destabilisierung des Grundzustandes bewirken. Dieser Asp-Rest könnte über einen Lysinrest mit einer der abzuspaltenden Carboxylgruppe benachbarten Carboxylgruppe der Mellitsäure über Salzbrücken verbunden sein. Hierdurch käme es zu einer extremen Annäherung der abzuspaltenden Carboxylgruppe an die katalytisch aktive Carboxylgruppe des Aspartat (vgl. Abb. 4.14a).

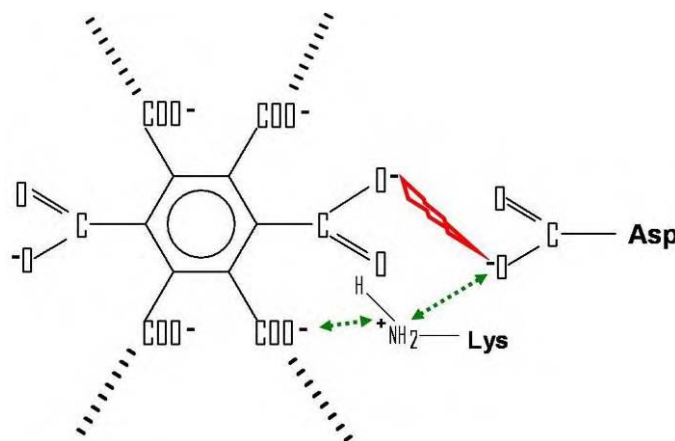


Abb. 4.14a: Hypothetische Positionierung der Mellitsäure im aktiven Zentrum der Mellitsäure-Decarboxylase. Die von den Carboxylgruppen ausgehenden gestrichelten Linien kennzeichnen die Einbettung des Substrats in das Enzym über Wasserstoffbrücken (evtl. auch über Salzbrücken möglich). Die grünen gestrichelten Pfeile zeigen die elektrostatische Anziehung zwischen dem katalytischen Lysinrest und den beiden Carboxylaten von Substrat und Enzym. Der rote Blitz verdeutlicht die elektrostatische Abstoßung zwischen der abzuspaltenden Carboxylgruppe und dem Aspartatrest des Enzyms.

Der „Circe-Effekt“ (siehe 4.6.1) bewirkt eine Destabilisierung des Eduktes, weshalb es zur Decarboxylierung kommt. Hierbei erfolgt eine Verschiebung der negativen Ladung vom Carboxylat der Mellitsäure zum Ring, so daß intermediär ein Carbanion entsteht. Dieses wird durch den positiv geladenen Lysinrest stabilisiert. An dieser Stelle erfolgt also eine Stabilisierung des Übergangszustandes. Anschließend kommt es zu einer Protonierung des Aryl-Carbanions durch eben diesen Lysinrest (vgl. Abb. 4.14b).

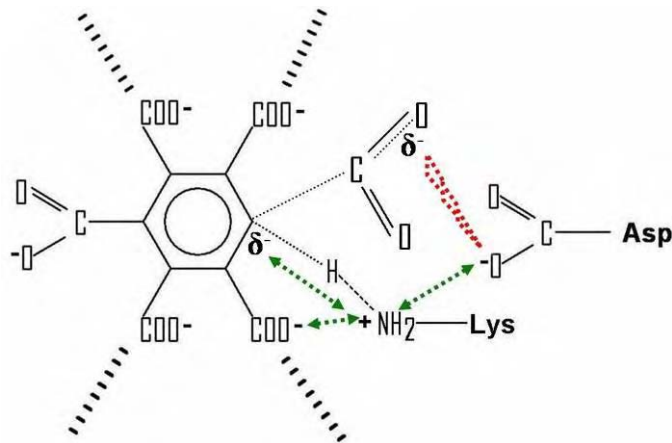


Abb. 4.14b: Hypothetischer Übergangszustand der Decarboxylierung: Die elektrostatische Abstoßung zwischen der abzusplattendenden Carboxylgruppe der Mellitsäure und dem Aspartatrest des Enzyms wird durch Verschiebung der negativen Ladung zum Ring hin vermindert. Das intermediäre Carbanion wird durch den positiv geladenen Lysinrest stabilisiert. Es kommt zur Protonenübertragung vom Lysin an den Ring.

Nach Abspaltung des unpolaren CO_2 , eventuell begünstigt durch eine hydrophobe Abschirmung durch das Enzym, kommt es zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen Substrat und Enzym, da der nun deprotonierte (und damit neutralisierte) Lysinrest nicht mehr als „Puffer“ die beiden Carboxylate über Salzbrücken verbinden kann (Abb. 4.14c).

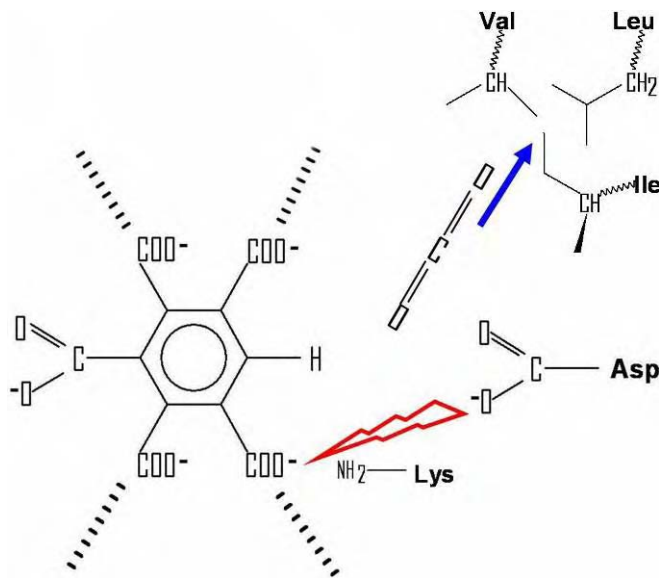


Abb. 4.14c: Die Decarboxylierung wird möglicherweise durch eine hydrophobe Abschirmung seitens des Enzyms begünstigt (in der Abbildung rechts oben angedeutet). Die Protonierung des Ringes durch den Lysinrest resultiert letztlich in einer elektrostatischen Abstoßung zwischen Substrat und Enzym.

Die Abspaltung des CO_2 führt in Verbindung mit der oben beschriebenen elektrostatischen Abstoßung zwischen Substrat und Enzym wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung des Enzyms, die in der Freisetzung der neu entstandenen Benzenpentacarbonsäure resultiert (vgl. Abb. 4.14d).

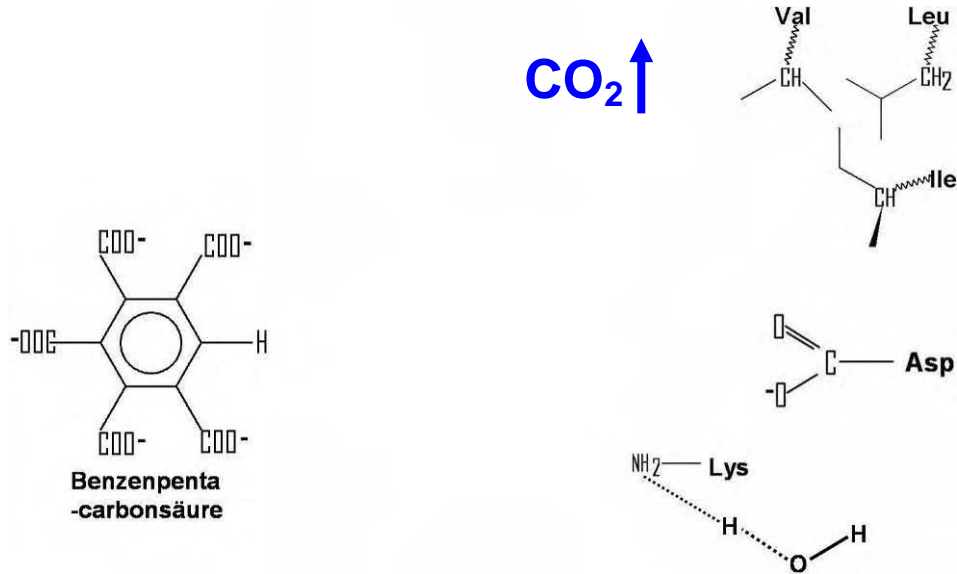


Abb. 4.14d: Freisetzung der Benzenpenta-carbonsäure, resultierend aus einer Konformationsänderung des Enzyms. Es kommt zur Reprotonierung des Lysins, und der katalytische Kreislauf setzt erneut ein.

Die Reprotonierung des Lysins durch das wäßrige Medium führt zu einer Alkalisierung, wie sie *in vivo* und *in vitro* beobachtet werden konnte (vgl. 3.9.1 bzw. 3.13). Anschließend kann der katalytische Zyklus von Neuem beginnen.

Dabei erlaubt der vorgeschlagene Mechanismus neben der Decarboxylierung eines weiteren Mellitsäure-Moleküls alternativ die Verwendung von Benzenpenta-carbonsäure als Substrat:

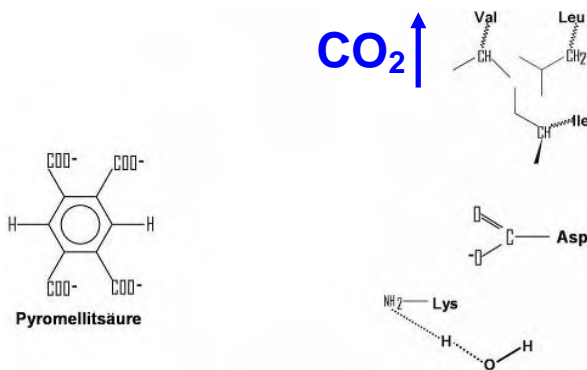
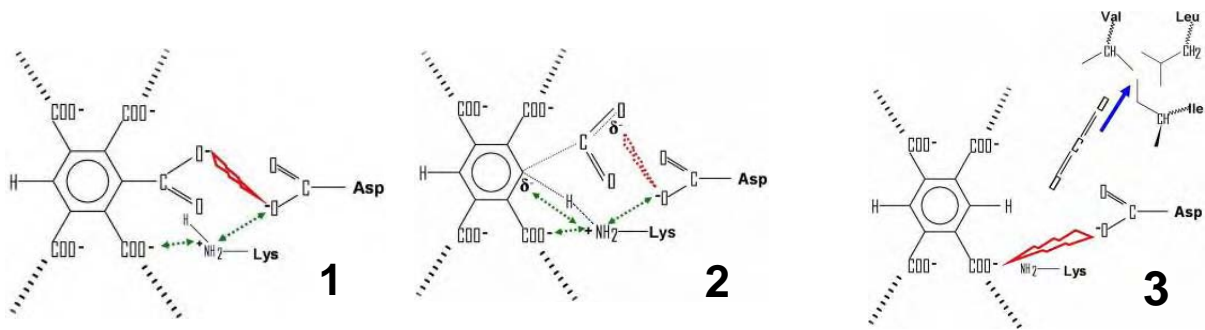


Abb. 414e-h: Hypothetischer Mechanismus der Decarboxylierung von Benzenpenta-carbonsäure durch die Mellitsäure-Decarboxylase (oben). Es kommt letztlich zur Freisetzung von Pyromellitsäure (links).

Der postulierte Mechanismus erklärt, wieso bei der Untersuchung der Decarboxylierung von Mellitsäure durch LAC-gereinigte Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a* mittels HPLC die Produkte Benzenpentacarbonsäure und Pyromellitsäure parallel und nicht nacheinander entstehen (vgl. 3.15.2): Zwar ist die Affinität des Enzyms zur Mellitsäure vermutlich leicht höher (da die Mellitsäure völlig symmetrisch ist und daher in jeder Orientierung ins aktive Zentrum paßt); aber die Benzenpentacarbonsäure entsteht unmittelbar am Enzym und liegt somit nach ihrer Entstehung in direkter Nähe zur Decarboxylase vor und kann dementsprechend gleich weiter umgesetzt werden.

Der Mechanismus ist ebenfalls geeignet, die Affinität des Enzyms zu beiden Substraten zu erklären, so daß nacheinander zwei Carboxylgruppen von der Mellitsäure abgespalten werden können. Insbesondere kann hiermit begründet werden, warum zwei *gegenüberliegende* Carboxylgruppen abgespalten werden und folglich Pyromellitsäure entsteht.

Allerdings müßte im oben beschriebenen Modell eine Bindung der Pyromellitsäure über deren vier Carboxylgruppen *ohne* Decarboxylierung möglich sein; hierbei käme es zu einer Blockierung des aktiven Zentrums, da das Substrat nicht umgesetzt werden kann (kompetitive Hemmung; vgl. Abb. 4.15a).

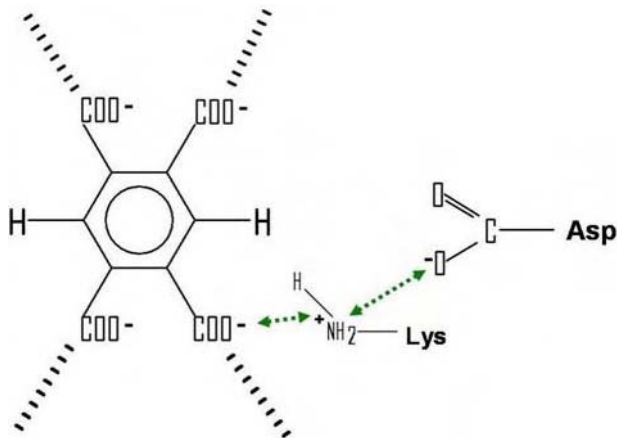


Abb. 4.15a: Kompetitive Hemmung der Mellitsäure-Decarboxylase durch Pyromellitsäure.

Es erscheint physiologisch nicht gerade sinnvoll, daß ein Enzym seinen eigenen kompetitiven Inhibitor produziert. Jedoch spielt möglicherweise der Lysinrest eine zusätzliche Rolle bei der Substratbindung, und zwar dergestalt, daß eine Carboxylgruppe (nämlich die abzuspaltende) über eine Salzbrücke in die Nähe des Aspartatrestes geleitet wird.

Da diese Salzbrücke stärker wäre als die Wasserstoffbrücken zu den anderen Carboxylgruppen, kann möglicherweise die Pyromellitsäure nur mit einer Carboxylgruppe „voran“ ins aktive Zentrum gelangen, so daß eine Bindung aller vier Carboxylgruppen mittels H-Brücken nicht möglich ist. Wie oben bereits erwähnt, wird in der Tat eine solche dirigierende Funktion des katalytischen Lysinrestes für die ODCase diskutiert (Miller et al., 2000; Miller und Wolfenden, 2002; Callahan und Wolfenden, 2004).

Die resultierende Anordnung mit einer Carboxylgruppe gegenüber dem Asp-Carboxylat bei nur zwei über H-Brücken stabilisierten weiteren Carboxylgruppen erlaubt keinen weiteren Verbleib der Pyromellitsäure am Enzym (vgl. Abb. 4.15b u. c). Somit kann nun auch erklärt werden, warum Pyromellitsäure *nicht* durch die MDCase umgesetzt werden kann: Die Verankerung dieses potentiellen Substrats im Enzym kann nicht stabil genug erfolgen, da höchstens zwei weitere Carboxylgruppen für eine Stabilisierung mittels Wasserstoff- bzw. Salzbrücken zur Verfügung stehen. Offenbar ist dies nicht ausreichend, um die abzuspaltende Carboxylgruppe in kritische Nähe zum Aspartatrest zu bringen.

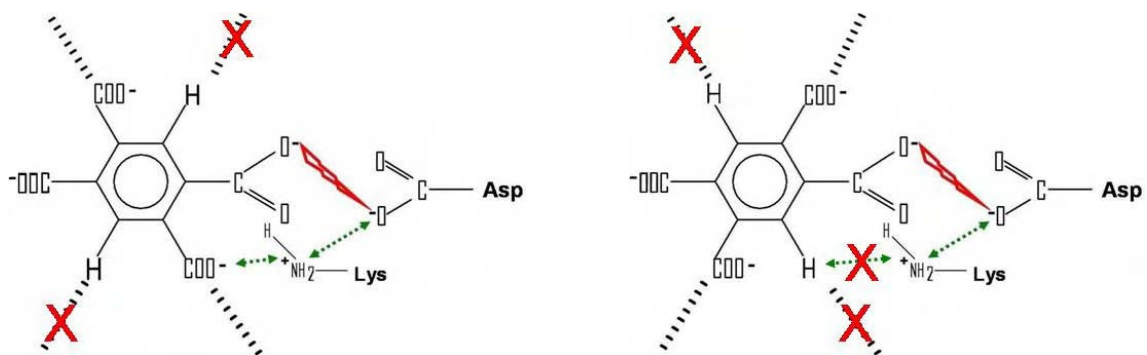


Abb. 4.15b u. c: Möglicherweise dirigiert der Lysinrest (oder andere Bestandteile des Enzyms) die zu decarboxylierenden Benzencarbonsäuren so ins aktive Zentrum, daß die abzuspaltende Carboxylgruppe immer in Richtung des Aspartatrestes positioniert wird. In diesem Fall ergäbe sich für die Pyromellitsäure keine ausreichende Verankerung im Enzym.

In vivo tritt dieses Problem vermutlich gar nicht in Erscheinung, da die entstehende Pyromellitsäure umgehend durch die Pyromellitsäure-Decarboxylase dem Gleichgewicht entzogen wird, welche wahrscheinlich eine höhere Affinität zur Pyromellitsäure besitzt als die Mellitsäure-Decarboxylase. Dies müßte durch entsprechende kinetische Studien an den gereinigten Enzymen untersucht werden.

Der postulierte Reaktionsmechanismus erfordert, daß der katalytisch aktive Lysinrest der Mellitsäure-Decarboxylase protoniert vorliegt. Der Aspartatrest hingegen muß deprotoniert vorliegen, ebenso die abzuspaltende Carboxylgruppe (evtl. auch die anderen Carboxylgruppen der Mellit- bzw. Benzenpentacarbonsäure, um die Verankerung des Substrats im Enzym zu gewährleisten). Dies erfordert einen pH-Wert, der in etwa im neutralen Bereich liegt, was sich mit dem ermittelten pH-Optimum des Enzyms von 6,5 gut deckt.

Interessanterweise liegen die pH-Optima sämtlicher beschriebener Aromaten-Decarboxylasen im Bereich zwischen 5,5 und 8,0 – sogar die ODCase des extrem

acidophilen Archaeons *Sulfolobus acidocaldarius* (Maiorano und Grogan, 1999). Hingegen liegen die pH-Bereiche anderer am Aromatenstoffwechsel beteiligten Enzyme breit gestreut: Insbesondere die ringspaltenden Dioxygenasen bevorzugen ein alkalisches Milieu (Protocatechuat-3,4-Dioxygenase aus *Ps. putida*: pH 10, Bull et al., 1981; Protocatechuat-4,5-Dioxygenase aus *Rhizobium leguminosarum*: pH 9,5, Chen und Lovell, 1994; Catechol-1,2-Dioxygenase aus *Nocardia spec.* bis pH 10, Smith et al., 1990). Auch oxidativ decarboxylierende Enzyme wie die Salicylat-1-monooxygenase vertragen deutlich höhere pH-Werte (bei *Pseudomonas spec.* immerhin 50% der Aktivität bei pH 10; Yamamoto et al., 1965). Dies gilt auch für weitere die Ringsubstituenten modifizierende Enzyme auch aus dem Pflanzenreich, z.B. die Shikimat-Dehydrogenase aus Pfeffer (*Capsicum annuum*), deren pH-Optimum bei 10,5 liegt (Diaz und Merino, 1997).

Hingegen scheint bei den Decarboxylasen die unbedingt erforderliche Protonierung des katalytisch unverzichtbaren Lysinrestes (bzw. allgemein eines basischen Aminosäurerestes zur Stabilisierung des intermediär entstehenden Carbanions) den pH-Bereich nach oben zu begrenzen.

Es spricht also vieles dafür, daß sich von den für die ODCase gefundenen Reaktionsmechanismen generelle Prinzipien für alle Aromaten-Decarboxylasen ableiten lassen, die auch für die Mellitsäure-Decarboxylase gelten könnten. Letztlich bewiesen werden kann dies jedoch nur durch die Kristallisation eines solchen Enzyms mit anschließender Röntgenstrukturanalyse, am besten mit gebundenem Substrat bzw. einem stabilen Übergangszustandsanalogon. Für eine solche Analyse müßten in anschließenden Experimenten größere Mengen der Mellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a* (oder einem anderen Bakterium) gereinigt werden.

4.7 Mögliche Organisation der für den Mellitsäure-Abbau verantwortlichen Gene

Im Rahmen dieser Dissertation wurden keine molekulargenetische Arbeiten unternommen. Folglich können nur hypothetische Aussagen zur genetischen Organisation des Mellitsäure-Abbaus getroffen werden.

Gene für den Aromatenabbau liegen fast immer geclustert vor (Peng et al., 2002 sowie Eaton, 2001), d.h. die verantwortlichen Gene befinden sich auf dem Chromosom in unmittelbarer Nachbarschaft. Zumeist sind diese Cluster in wenigen Operons organisiert, die von wenigen, z.T. sogar einem einzigen Schlüsselmetaboliten induziert werden. Dies soll anhand einiger Beispiele veranschaulicht werden.

4.7.1 Biphenyl-Katabolismus in *Sphingomonas paucimobilis*

Der Biphenyl-Katabolismus als Modell des Lignin-Abbaus von *Sphingomonas paucimobilis* ist auf molekularer Ebene gut untersucht. Hier findet im Genom eine Konzentrierung der vier Gene für den Abbau von 5,5'-Dehydrodivanillat über zwei weitere dimere Komponenten zu Vanillat in einem 18kb-Operon statt; in fast unmittelbarer Nachbarschaft befinden sich die Gene für den Abbau verschiedener β -Arylether, ebenfalls typischer Lignin-Komponenten. Hier liegt also eine Clusterung der Gene für den Abbau aromatischer Dimere vor. Separiert hiervon liegen in einem zweiten Cluster die für den weiteren Katabolismus des Monomers Vanillat verantwortlichen Gene, beginnend mit einer Vanillat-Demethylase, welche den Schlüsselmetaboliten Protocatechuat herstellt. Neben einer Protocatechuat-Dioxygenase finden sich in der Nachbarschaft weitere Gene, die für Enzyme codieren, welche ungewöhnliche aromatische Monomere wie etwa 2-Pyron-4,6-dicarbonsäure in Protocatechuat überführen. Alle Cluster werden induziert durch die Zugabe des Schlüsselmetaboliten 5-Carboxyvanillat. Diese Verbindung wird durch das letzte Gen im ersten Cluster zu Vanillat decarboxyliert. Dieses induziert wiederum das zweite Cluster für den Abbau der Monomere (Peng et al., 2002).

4.7.2 Phtalat-Katabolismus in *Arthrobacter keyseri*

Ein besonders extremes Beispiel für Clusterung findet sich bei *Arthrobacter keyseri* (früher *Micrococcus spec.*): Hier befinden sich sämtliche für den Abbau von Phtalat-Estern benötigten Gene auf einem einzigen 130kb (!) großen Plasmid, welches durch

die Zugabe von Phtalsäure zum Medium induziert wird. Dies umfaßt sowohl die benötigten Transporter sowie die Esterasen zur Phtalat-Esterspaltung als auch die Enzyme zur Umsetzung der Monomere, insbesondere die Phtalsäure-Dioxygenase, 3,4-Dihydroxyphtalat-Decarboxylase und Protocatechuat-4,5-Dioxygenase (Eaton, 2001). Das bedeutet, daß die gesamte Information zur Verstoffwechslung dieser weltweit im Millionen-Tonnen-Maßstab produzierten Kunststoff-Bestandteile (insbesondere Weichmacher für PVC) von der Aufnahme über die Monomerisierung bis zur Linearisierung extrachromosomal lokalisiert ist und bei Bedarf abgelesen wird. Da Phtalatester ein rein menschliches Produkt sind, kann dies als eine gewaltige Anpassung der Mikrowelt an die anthropogene Umweltverschmutzung interpretiert werden.

4.7.3 Abspaltung von sechs Ringsubstituenten: Abbau von γ -Hexachlorocyclohexan (Lindan)

Von besonderem Interesse ist hier die gut untersuchte Verstoffwechslung von Lindan. Die polychlorierten Verbindungen sind die einzigen in der Literatur ausführlich beschriebenen Beispiele für den mikrobiellen Abbau polysubstituierter Moleküle.

Am Modellorganismus *Sphingomonas paucimobilis* wurde festgestellt, daß hier ein sogenannter „*upstream pathway*“ von einem „*downstream pathway*“ unterschieden werden kann. Hierbei wird zunächst das Lindan durch drei Enzyme (LinA, LinB und LinC) vierfach dechloriert, zweifach oxidiert, dabei aromatisiert und somit für den weiteren Abbau vorbereitet. An dem so entstandenen 2,5-Dichlorohydrochinon bewirken die Enzyme LinD, LinE und LinF eine weitere zweifache (und damit vollständige) Dechlorierung sowie die oxidative Ringspaltung zu 2-Oxoadipat (Endo et al., 2005).

Hier liegt also auf den ersten Blick prinzipiell eine ähnliche Situation vor wie beim Biphenyl-Katabolismus (interessanterweise untersucht am gleichen Modellorganismus). Die molekulargenetische Organisation ist jedoch extrem uneinheitlich: die „*upstream pathway*“-Gene *linA*, *linB* und *linC* liegen über das Genom verstreut und werden konstitutiv exprimiert (Nagata et al., 1999).

Die Gene *linD* und *linE* hingegen liegen als Operon vor und werden in Anwesenheit von chlorierten Hydrochinonen durch den Transcriptionsregulator LinR induziert.

Dabei können im „*downstream pathway*“ alternativ auch andere chlorierte aromatische und aliphatische Verbindungen verwertet werden. Entsprechend liegt das hier verantwortliche Gen *linF* in Nachbarschaft mehrerer ORFs, die eine hohe Ähnlichkeit

zu den Genen für den Abbau von Pentachlorophenol durch *Sphingobium chlorophenicum* (früher *Sphingomonas chlorophenolica*) aufweisen. Bis auf die konstitutiv exprimierte reduktive Dechlorinase PepC (vgl. Abb. 4.8) werden alle Gene durch Pentachlorophenol induziert (Cai und Xun, 2002). Entsprechend liegen diese Gene alle recht nahe beieinander innerhalb eines 24kb-Abschnitts. Allerdings werden alle Gene von unterschiedlichen Promotoren aus transkribiert. Die Organisation in einem Operon, welche zu erwarten gewesen wäre, liegt folglich nicht vor.

4.7.4 Schlüsse für den Mellitsäure-Abbau

Wie oben beschrieben, ist die molekulargenetische Organisation des Aromatenabbaus zu heterogen, als daß allgemeine Rückschlüsse für die Anordnung der für den Mellitsäure-Abbau verantwortlichen Gene gezogen werden könnten. Aus den Induktionsversuchen mit unterschiedlichen C-Quellen (vgl. 3.10) können jedoch einige Folgerungen getroffen werden.

Bei Aromaten mit vier oder mehr Carboxylgruppen wurden MDCase und PDCase induziert. Dies erscheint verwunderlich, da die Mellitsäure-Decarboxylase ja erst ab fünf Carboxylgruppen am Ring benötigt wird. Allerdings war die relative Decarboxylase-Aktivität für Pyromellitsäure (verglichen mit der für Mellit- und Benzenpentacarbonsäure) bei Anzucht mit dieser C-Quelle doppelt so hoch wie bei Wachstum mit Mellit- und Benzenpentacarbonsäure (vgl. 3.14.2/Abb. 3.46). Offenbar erfolgt die Induktion dieser Enzyme also nicht nach dem „alles-oder-nichts“-Prinzip, sondern ist zumindest teilweise durchaus den Erfordernissen des Stoffwechsels angepaßt. Nichtsdestotrotz ist es bemerkenswert, daß die MDCase durch das Produkt der von ihr katalysierten Reaktion induziert wird, während bei vielen Enzymen eine *Produkthemmung* bekannt ist.

Für die Umsetzung der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure wird eigentlich keines der beiden Enzyme benötigt. Trotzdem kommt es zur Induktion der Mellitsäure-Decarboxylase (MDCase) jedoch nicht zur Induktion der Pyromellitsäure-Decarboxylase (PDCase). Dieser Wachstumsversuch belegt, daß die MDCase unabhängig von der PDCase induziert wird. Diese beiden Enzyme sind folglich nicht in einem Operon zusammengefaßt. Auch hier konnte beobachtet werden, daß die Expression der MDCase den physiologischen Erfordernissen dahingehend angepaßt ist, daß sie deutlich niedriger ausfällt als bei Verwendung von höher carboxylierten BCS. Die Benzen-1,2,4-tricarbonsäure ist folglich ein schlechterer Induktor der MDCase.

Die Induktion der MDCase erfolgt unspezifischer als die der PDCase (und zwar ab drei Carboxylgruppen am Ring). Unter Umständen wird die PDCase bei Verwendung von Mellitsäure und Benzenpentacarbonsäure auch erst nach dem ersten intrazellulären Auftreten ihres Substrates infolge Decarboxylierung dieser beiden C-Quellen durch die Mellitsäure-Decarboxylase induziert; in diesem Fall würde die PDCase hochspezifisch nur durch ihr eigenes Substrat induziert. Dies könnte das deutlich langsamere Wachstum des Bakteriums *LFG19a* mit diesen beiden C-Quellen (gegenüber Wachstum mit Pyromellitsäure) erklären. Allerdings könnte dieser Unterschied auch in unterschiedlich effizienten Transportmechanismen für diese unterschiedlichen Benzencarbonsäuren begründet sein: Die deutlich hydrophobere Pyromellitsäure läßt sich u.U. leichter durch die Membran schleusen. Ob für den Transport der verschiedenen BCS unterschiedliche Transportkomponenten benötigt werden, wurde jedoch nicht untersucht.

MDCase, PDCase sowie die hypothetische (oxidativ decarboxylierende) Benzen-1,2,4-tricarbonsäure-Monooxygenase (vgl. Abb. 4.9) gehören (analog zum Modell des Lindan-Abbaus) zum „*upstream pathway*“, welcher die polycarboxylierten Aromaten für den weiteren oxidativen Abbau vorbereiten.

Die weiteren für den (Pyro-)Mellitsäure-Abbau („*downstream pathway*“) benötigten Gene könnten durch das Auftreten der ersten hydroxylierten Verbindung (vermutlich 4-Hydroxyphtalsäure) induziert werden, ähnlich wie im Lindan-Abbau die Gene *linD* und *linE* gemeinsam als Operon in Anwesenheit von chlorierten Hydrochinonen induziert werden. Von hier bis zur Ringspaltung wären mindestens drei Enzyme erforderlich, deren Clusterung und gemeinsame Induzierbarkeit (idealerweise durch Organisation in einem Operon, ggf. mit anderen Enzymen des Phtalsäure-Stoffwechsels) physiologisch sinnvoll wäre, jedoch zur Zeit nicht belegt werden kann. Einen ersten Hinweis hierauf liefert das ähnliche Protein-Bandenmuster nach Anzucht mit 5-Hydroxyisophtalsäure sowie Protocatechusäure (vgl. 3.10.2/Abb. 3.39a u.b).

Für genauere Aussagen würden sich quantitative Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophoresen anbieten, bei denen die Protein-Expressionsmuster nach Anzucht mit unterschiedlichen polycarboxylierten und unterschiedlich hydroxylierten Aromaten verglichen werden. Bei ähnlichen Studien an *Rhodococcus spec.* wurde festgestellt, daß bei Anzucht mit Phenylacetat von 1430 Proteinflecken 75 mindestens doppelt so stark vorlagen wie bei Verwendung von Pyruvat als C-Quelle und außerdem 71 Proteine zusätzlich auftraten (Llorens et al., 2005).

4.8 Ausblick

Im Folgenden sollen künftige Versuchsansätze vorgeschlagen werden, die die im Rahmen dieser Dissertation unternommen Experimente und die aus ihnen resultierenden Ergebnisse aufgreifen, fortführen und sinnvoll ergänzen. Dabei werden auch langfristige Strategien erörtert, die das Fernziel der enzymatischen Decarboxylierung von Huminsäuren in Angriff nehmen.

4.8.1 Weitere Aufklärung des Mellitsäure-Stoffwechsels

4.8.1.1 Ermittlung der Gen- und Proteinsequenz der Mellitsäure-Decarboxylase

Durch Ansequenzierung der gereinigten Mellitsäure-Decarboxylase könnten Gensonden bzw. geeignete Primer zur Vervielfältigung eines zugehörigen Genabschnitts abgeleitet werden. Die Kenntnis der Sequenz von 15-20 Aminosäuren ist in der Regel ausreichend für die Klonierung des für das Protein codierenden Gens (Brown, 2002). Nach Sequenzierung dieses Gens kann der Rest der Aminosäuresequenz mit Hilfe des genetischen Codes abgeleitet werden (indirekte Proteinsequenzierung).

Alternativ oder ergänzend kann nach Ermittlung der Teilsequenz eine Proteinsequenzierung und -identifizierung mittels Massenspektrometrie (MALDI/TOF) nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgen (Aebersold und Mann, 2003). Neben der Zuordnung von Disulfidbrücken sowie weiterer Strukturmerkmale könnte hierdurch auch eine Identifikation eventueller Aminosäure- und Proteinmodifikationen erfolgen, die aus der DNA-Sequenz nicht ersehen werden können.

Durch Abgleich der experimentellen Daten mit Sequenz-Datenbanken können die erhaltenen Gen- bzw. Proteinfragmente mit anderen Decarboxylasen verglichen werden. Insbesondere durch Vergleich mit der bekannten Sequenz der Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase kann überprüft werden, ob der für die Mellitsäure-Decarboxylase postulierte Reaktionsmechanismus dem der ODCase ähnlich sein kann. Insbesondere müßten sich der charakteristische Lysinrest (bzw. ein positiv geladener Aminosäurerest) sowie ein fast unmittelbar benachbarter negativ geladener Aminosäurerest (in *Bacillus subtilis* Asp60 und Lys62) wieder finden lassen. Auf diese Art ließe sich eventuell aus der Proteinsequenz das aktive Zentrum des Enzyms ableiten.

Interessant wäre auch der Vergleich mit anderen Mellitsäure-Decarboxylasen, die sich ebenfalls über Liganden-Affinitätschromatographie an immobilisierter Mellitsäure reinigen lassen dürften. Insbesondere ein Vergleich mit der MDCase des Bakterienstammes X.93, welcher nicht Pyromellitsäure, sondern eine andere

Benzentetracarbonsäure als Intermediat bildet, könnte Aufschluß über den Mechanismus der Decarboxylierung geben.

4.8.1.2 Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Mellitsäure-Decarboxylase

Eine wesentlich genauere, allerdings auch erheblich aufwendigere Methode zur Verifizierung des postulierten Reaktionsmechanismus wäre eine Röntgenstrukturanalyse der kristallisierten Mellitsäure-Decarboxylase, am besten mit gebundenem Substrat bzw. Substratanalogon. Auf diese Weise könnte die Einbettung der Mellitsäure ins aktive Zentrum des Enzyms visualisiert werden. Allerdings erfordert eine solche Strukturanalyse die Verfügbarkeit mehrerer Milligramm hochreinen Proteins (Branden und Tooze, 1999). Die erforderliche Reinheit von $\geq 97\%$ müßte nach zweifacher Liganden-Affinitätschromatographie gewährleistet sein (vgl. Abb. 3.42). Mehr als 50-100 μ g Protein können jedoch unter Beibehaltung des Kleinstmaßstabs (d.h. Anzucht des Stammes *LFG19a* im Kleinfärmenter und Verwendung von Kleinstsäulen) nicht gewonnen werden. Mehrere Maßnahmen würden hier Abhilfe leisten:

- ✓ Optimierung der Anzuchtbedingungen von *LFG19a*, dadurch höhere Zelldichten
- ✓ Upscaling der Reinigung in größeren Säulen und Erhöhung der Binde-Kapazität für die Mellitsäure-Decarboxylase
- ✓ Klonierung des Decarboxylase-Gens in einen Expressionsvektor und Überexpression der MDCase in einem „pflegeleichteren“ Produktionsstamm

Insbesondere der letzte Punkt würde einen wesentlichen Fortschritt bedeuten, da nicht nur mit einem Schlag erheblich mehr Enzym zur Verfügung stünde, sondern dieses bereits in einer erheblich höheren Reinheit vorläge (bzw. einen um mindestens eine Größenordnung höheren Anteil am Gesamtprotein ausmachen würde). Durch Verknüpfung mit einem entsprechenden Peptid ließe sich die Decarboxylase auch durch den Stamm ins Medium ausscheiden, was die Reinigung weiter vereinfachen würde.

4.8.1.3 Reinigung der Pyromellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a*

Es würde sich anbieten, das nächste im Mellitsäure-Katabolismus aktive Enzym, nämlich die Pyromellitsäure-Decarboxylase (PDCase) zu reinigen und zu untersuchen. Dieses Enzym vollführt wie die MDCase eine nicht-oxidative Decarboxylierung. Der Reaktionsmechanismus dürfte sehr ähnlich sein, entsprechend läßt sich für das aktive Zentrum eine ähnliche Struktur erwarten, die sich aus der (in diesem Bereich wahrscheinlich sehr ähnlichen) Aminosäuresequenz vorhersagen lassen könnte. Zur

Reinigung müßte zunächst die vorab erfolgende fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung für dieses Enzym optimiert werden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, fällt die PDCase bei höheren Salzkonzentrationen aus als die MDCase (vgl. 3.15.3).

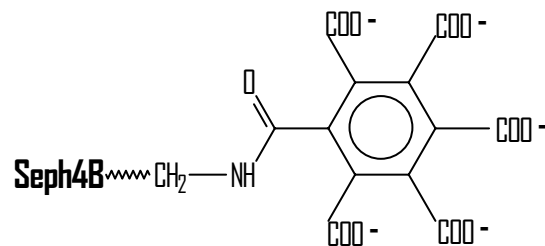
Für die weitere Reinigung würde sich auch hier eine Liganden-Affinitätschromatographie anbieten, und zwar mit Pyromellitsäure als immobilisiertem Liganden. Hierbei könnten sich allerdings folgende Probleme bei der Herstellung des Säulenmaterials als hinderlich erweisen:

- Zum einen ist die Pyromellitsäure mindestens zehnfach schlechter wasserlöslich (vgl. 3.1.1), so daß zur Kopplung erheblich geringere Konzentrationen an Ligand zur Verfügung stünden.
- Des weiteren können nur vier statt sechs Carboxylgruppen aktiviert und gekoppelt werden; die Kopplungseffizienz wäre vermutlich klar schlechter.
- Drittens verfügt die Pyromellitsäure nicht über ein so charakteristisches UV-Spektrum wie die Mellitsäure; der Nachweis der Kopplung (und damit letztlich auch deren Optimierung) wird dadurch erschwert.

Auch die Durchführung der Chromatographie wäre unter Umständen weniger effizient: Die enzymatische Erkennung der kovalent gebundenen Pyromellitsäure ist wahrscheinlich deutlich schwieriger als die der kovalent gebundenen Mellitsäure.

Nach Anbindung der Mellitsäure an Sepharose 4B ragt gewissermaßen Benzenpentacarbonsäure ins Medium.

Abb. 4.16: Struktur kovalent an EAH Sepharose 4B (Seph4B) gebundener Mellitsäure.



Während die MDCase auch diese als Substrat erkennt und entsprechend binden kann, ist die PDCase wahrscheinlich nicht zur Bindung von Benzen-1,2,4-tricarbonsäure befähigt, welche analog als Ligand zur Verfügung stünde, wenn Pyromellitsäure kovalent mit dem Säulenmaterial verknüpft vorliegt (vgl. Abb. 4.17a und b).

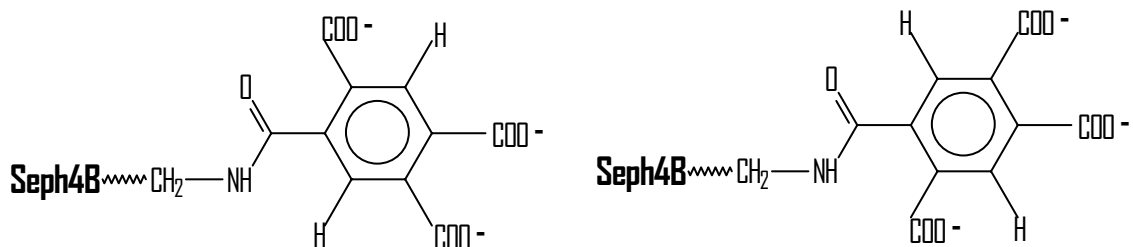


Abb. 4.17a und b: Mögliche Strukturen kovalent an EAH Sepharose 4B (Seph4B) gebundener Pyromellitsäure. Der ins Medium ragende Ligand ähnelt eher der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure als dem Substrat der PDCase.

Die Effizienz der LAC könnte daher deutlich schlechter sein als die der MDCase mit Mellitsäure als immobilisiertem Liganden.

Die Verwendung von Benzenpentacarbonsäure als Ligand wäre keine Alternative, da nicht gesagt werden kann, über welche Carboxylgruppe diese an Seph4B binden würde. Der ins Medium ragende Ligand würde zwar vier Carboxylgruppen tragen, wäre jedoch nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 20% der Pyromellitsäure ähnlich (vgl. Abb. 4.18a-e).

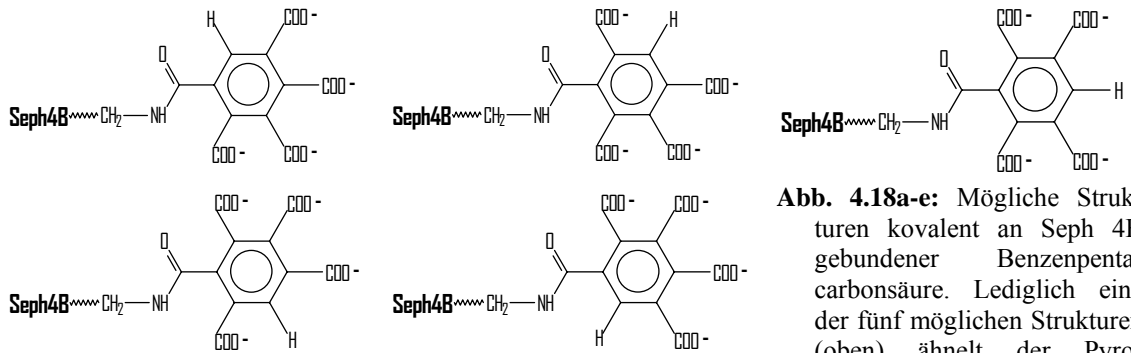


Abb. 4.18a-e: Mögliche Strukturen kovalent an Seph 4B gebundener Benzenpentacarbonsäure. Lediglich eine der fünf möglichen Strukturen (oben) ähnelt der Pyromellitsäure.

Wie gezeigt, gestaltet sich diese LAC vermutlich schwieriger als die mit der MDCase durchgeführte. Eventuell sollte in Betracht gezogen werden, nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung zunächst eine weitere Vorreinigung der PDCase durchzuführen, am besten mittels Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC, vgl. 4.3.2).

Unter Umständen könnte das für die Pyromellitsäure-Decarboxylase codierende Gen sich in der Nähe des MDCase-Gens befinden. Dies würde auch ohne Klonierung und Überexpression durch einen Expressionsstamm die Proteinreinigung der PDCase erheblich vereinfachen, da aus der Aminosäuresequenz einige Eigenschaften des Proteins abgeleitet werden könnten. Z.B. ließe sich das Molekulargewicht exakt ermitteln, so daß eine Gelpermeationschromatographie vereinfacht würde. Der IEP könnte ebenfalls vorausgesagt werden, was eine Isoelektrische Fokussierung ermöglichen würde. Und auch die Eigenladung der PDCase bei verschiedenen pH-Werten wie auch die Hydrophobizität wären deduzierbar; eine Reinigung über Ionenaustauschchromatographie bzw. HIC würde hierdurch erleichtert.

Auch unter diesem Gesichtspunkt hätte folglich die Ermittlung der MDCase-Sequenz wie auch eine Sequenzierung der Umgebung dieses Gens Priorität.

Vergleichende Studien der unterschiedlichen MDCasen aus den Bakterientämmen *LFG19a* und X.93 sowie der PDCase aus *LFG19a* und der Benzentetracarbonsäure-Decarboxylase aus X.93 würden das Verständnis der Aromaten-Decarboxylierung erheblich verbessern.

4.8.1.4 Untersuchung des weiteren Abbauweges von Mellit- und Pyromellitsäure

Die weitere Aufklärung des Mellitsäure-/Pyromellitsäure-Katabolismus würde mit dem Nachweis verschiedener oxidativer Enzyme des Aromaten-Stoffwechsels beginnen. Insbesondere der Weg von der Benzen-1,2,4-tricarbonsäure zum höchst wahrscheinlichen Intermediat Protocatechusäure (vgl. Abb. 4.9) ist von Interesse; der weitere Abbau dieser Verbindung ist gut untersucht.

Erste Hinweise könnten hier Wachstumsversuche mit den möglichen Intermediaten als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle geben (vgl. hierzu auch 4.5.2). Da jedoch nicht für jedes abbaubare Intermediat auch ein Transportmechanismus in die Zelle hinein vorliegen muß (was ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein könnte), lassen diese Ergebnisse nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf den bevorzugten Abbauweg zu. So erwiesen sich beileibe nicht alle (Pyro-) Mellitsäure abbauenden Bakterien als zu gutem Wachstum mit Benzen-1,2,4-tricarbonsäure befähigt, obwohl diese Verbindung bei allen Bakterien als Decarboxylierungsprodukt nachgewiesen werden konnte.

Genauer wären spektralphotometrische Enzymassays, die die unterschiedlichen UV-Spektren der zu erwartenden Verbindungen zur Detektion von Entstehung und Abbau der diversen Intermediate nutzen. Viele dieser Tests wurden bei der Erforschung des Benzoe- und Phtalsäurekatabolismus etabliert und könnten mit leichten Modifikationen wohl auch für die Untersuchung des Abbaus von Benzen-1,2,4-tricarbonsäure verwendet werden. Beispiele solcher Enzymtests finden sich für 4-Hydroxyphtalsäure-Decarboxylase (Nakazawa und Hayashi, 1978), 4,5-Dihydroxyphtalsäure-Decarboxylase (Nakazawa und Hayashi, 1977) sowie für die unterschiedlichen möglichen Protocatechuat-Dioxygenasen (Crawford et al., 1979; Ornston und Stanier, 1966; Ribbons und Evans, 1962).

Diese Assays sollten durch Nachweis der Metabolite mittels HPLC abgesichert werden. Die entstehenden teilweise hydroxylierten und carboxylierten Verbindungen von der postulierten 4-Hydroxyphtalsäure bis zur Protocatechusäure müßten prinzipiell unter denselben Bedingungen zu trennen sein wie die Benzencarbonsäuren, da ihre Polarität zwischen Benzoe- und Mellitsäure liegt. Die Detektion kann ebenfalls über einen Diodenarray-Detektor erfolgen, da alle Verbindungen aromatisch sind und über ein charakteristisches UV-Spektrum verfügen, ebenso wie das mittels oxidativer Spaltung durch eine Protocatechuat-Dioxygenase linearisierte mögliche Abbauprodukt der Protocatechusäure (vermutlich β -Carboxy-*cis*, *cis*-muconat; Grifoll et al., 1994).

Zweidimensionale Protein-Gelelektrophorese nach differentieller Anzucht mit verschiedenen Aromaten und anschließende vergleichende Massenspektrometrie (MALDI/TOF; nach Aebersold und Mann, 2003; vgl. auch 4.8.1.1) könnte die Identifikation gleich mehrerer verantwortlicher Enzyme wie auch zugehöriger Transportkomponenten ermöglichen.

4.8.2 Enzymatische Decarboxylierung von Huminsäuren (HS)

4.8.2.1 Eignung der Mellitsäure-Decarboxylase zur HS-Decarboxylierung

Die isolierte Mellitsäure-Decarboxylase ist das erste bekannte Enzym, welches zwei Carboxylgruppen von einem Aromaten abspaltet. Dennoch ist die Substratspezifität zu hoch, um eine Decarboxylierung von Huminsäuren in nennenswertem Umfang erwarten zu lassen, insbesondere angesichts des postulierten Reaktionsmechanismus.

Darüber hinaus wäre die Verwendung dieses intrazellulären Enzyms aufgrund des hohen Aufwandes bei der Reinigung auch ausgesprochen unwirtschaftlich. Bemerkenswert ist allerdings die hohe Stabilität der MDCase; u. U. könnten sich prinzipiell auch intrazelluläre Enzyme für einen technischen Einsatz als geeignet erweisen, insbesondere wenn sie wie die MDCase aus dem Stamm *LFG19a* unabhängig von Cofaktoren arbeiten. Von Vorteil ist auch die offenbar kaum erforderliche Pufferung (vgl. 3.8.1). Wünschenswert wäre allerdings ein breiteres pH-Spektrum insbesondere im alkalischen Bereich, wenn wie in 1.4 vorgeschlagen die zu decarboxylierende Huminsäurelösung basisch vorliegt. Um alle Carboxylgruppen eines Huminsäuremoleküls erreichen zu können, wäre zudem ein Enzym erforderlich, welches deutlich kleiner ist als das 45kD-Monomer der MDCase aus *LFG19a*.

4.8.2.2 Potentielle Eignung weiterer Decarboxylasen

Die Carboxylgruppen der Huminsäuren liegen z.T. nicht direkt am Ring, sondern sind Teil aliphatischer Seitenketten (vgl. Abb. 1.14). Daher wären neben den Benzencarbonsäure-Decarboxylasen auch andere Enzyme prinzipiell zur teilweisen Huminsäure-Decarboxylierung befähigt, wenn sie über ein hinreichend breites Substratspektrum verfügen. So zeigte sich eine aus *Pseudomonas fluorescens* isolierte Ferulasäure-Decarboxylase auch zur Decarboxylierung von *p*-Cumarsäure (4-

Hydroxyzimtsäure) befähigt (Huang et al, 1994). Eine aus *Bacillus subtilis* isolierte Decarboxylase konnte mit Ferula-, *p*-Cumar- und Kaffeesäure (siehe Abb. 4.19) gleich drei unterschiedliche Aromaten zum entsprechenden Hydroxy- bzw. Methoxystyren decarboxylieren (Cavin et al., 1998). Beide Enzyme arbeiten wie die Mellitsäure-Decarboxylase unabhängig von Cofaktoren.

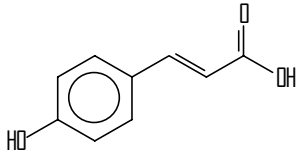


Abb. 4.19a: *p*-Cumarsäure

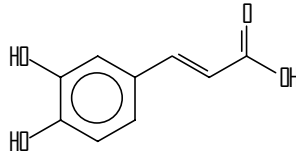


Abb. 4.19b: Kaffeesäure

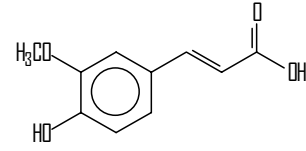


Abb. 4.19c: Ferulasäure

Insbesondere die *p*-Cumar- und die Ferulasäure sind Hauptbestandteile pflanzlichen Lignins und maßgeblich an dessen Quervernetzung beteiligt (Richter, 1997). Eine Eignung dieser Decarboxylasen sollte also ebenfalls untersucht werden, insbesondere unter dem Gesichtspunkt einer diskutierten Beteiligung von Esterasen an der mikrobiellen Kohleverflüssigung; hier würden nämlich durch Spaltung der Esterverknüpfungen aus Ferula- und *p*-Cumarsäure mit dem Arabinosesubstituenten der Lignin-Komponente Arabino-Glucurono-Xylan (Scalbert et al., 1985) zusätzliche Carboxylgruppen freigelegt, so daß eine Decarboxylierung in diesem Falle besonders effizient wäre.

Beim Einsatz der bisher bekannten Decarboxylasen wäre wahrscheinlich ein Gemisch dieser Enzyme am wirkungsvollsten. Eine hohe Reinheit der verantwortlichen Biokatalysatoren wäre vermutlich nicht erforderlich, was die Wirtschaftlichkeit einer enzymatischen Huminsäure-Decarboxylierung erheblich verbessern würde. Analog hierzu werden Gemische (allerdings extrazellulärer) nicht gereinigter pilzlicher Enzyme zur Nutzbarmachung heterogenen pflanzlichen Materials für Biogasanlagen erprobt (Hölker, persönliche Mitteilung).

4.8.2.3 Enzymdesign als Möglichkeit zur Optimierung von Decarboxylasen für HS

Durch ungerichtete Mutagenese der zugehörigen Gene können Enzyme modifiziert, auf bestimmte Eigenschaften hin selektiert und somit gewissermaßen eine Molekülevolution im Labor nachgestellt werden. Bei Kenntnis des Reaktionsmechanismus und der entscheidenden strukturellen Komponenten kann dieser Prozeß durch gerichtete Mutationen erheblich beschleunigt und verbessert werden. Auf diese Weise können Reaktionen forciert werden, die vom nativen Enzym gar nicht oder nur langsam katalysiert werden („*directed evolution*“).

So gelang beispielsweise kürzlich die Herstellung von Varianten der Naphtalin-Dioxygenase aus *Ralstonia spec.*, die eine im Wildtyp-Enzym nicht vorhandene Aktivität für die Oxidation von Nitroaromaten besaßen (Keenan et al., 2005). Hier wurde in einem ersten Ansatz unter Zuhilfenahme degenerierter Primer ein offenbar für die Substraterkennung essentieller Phenylalaninrest (Phe350) modifiziert. Bei Austausch gegen Threonin, Glutamin oder Lysin ergab sich eine katalytische Aktivität für 2,6-Dinitrotoluen sowie 2-Amino-4,6-dinitrotoluen. Einen ähnlichen Effekt ergab der Austausch eines Lysinrestes (Lys225) gegen Arginin, ebenso eine Mutation von Glycin407 zu Serin, Cystein und Threonin, wodurch eine Aktivität für *o*- und *p*- Cresol erzeugt werden konnte. Durch Kombination dieser Mutanten entstanden in der zweiten Generation Enzyme, die für die jeweiligen Substrate eine bis zu 24fach gesteigerte Aktivität besaßen (Keenan et al., 2005).

Analog hierzu könnte man durch gerichtete Mutation und Kombination verschiedener Aromaten-Decarboxylasen Enzyme mit gesteigerter und relativ unspezifischer Aktivität für die enzymatische Decarboxylierung von Huminsäuren erzeugen.

Dabei könnten computergestützte Modelle die gerichtete Evolution solcher Enzyme erleichtern. Auf diese Weise konnten Mutationen vorausgesagt werden, die in ein katalytisch inaktives Ribose-Bindeprotein eingeführt werden müßten, um eine Triosephosphat-Isomerase-Aktivität zu erlangen (Dwyer et al., 2004). Die so erzeugten Enzyme enthielten 18-22 Mutationen und beschleunigten die oben beschriebene Reaktion um einen Faktor $10^5 - 10^6$.

Eine weitere Möglichkeit zur Erlangung katalytischer Aktivitäten für bestimmte Substrate ist die Herstellung **katalytischer Antikörper (Abzyme)**. Dabei wird ein Tier mit einem hypothetischen Übergangszustands-Analogon einer bestimmten Reaktion immunisiert. Es kommt zur Produktion von Antikörpern, die im Idealfall auch gegen den realen Übergangszustand binden, diesen so stabilisieren und auf diese Weise die gewünschte Reaktion beschleunigen.

Vor einigen Jahren wurde mit diesem Verfahren ein Abzym mit einer Aromaten-Decarboxylase-Aktivität hergestellt (Hotta et al., 2000). Dieser Antikörper beschleunigt die Decarboxylierung von 5-Nitro-3-carboxybenzisoazol (Abb. 4.20a) um den Faktor $>10^4$. Zur Immunisierung wurde ein Derivat des Naphtalindisulfonats verwendet (Abb. 4.20b). Die katalytische Aktivität beruht hierbei neben der Stabilisierung des Übergangszustandes auf der Schaffung einer hydrophoben Mikroumgebung, welche das

Substrat durch Desolvatisierung destabilisiert und die Abspaltung des unpolaren CO_2 erleichtert. Zudem erfolgt so eine bessere Stabilisierung des intermediären Carbanions.

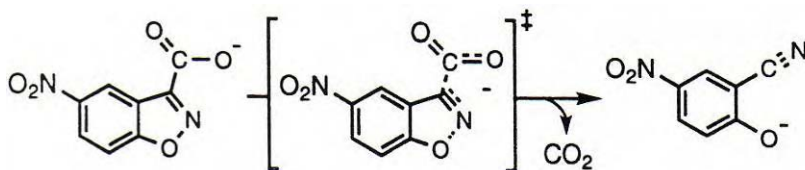


Abb. 4.20a: Die Decarboxylierung von 5-Nitro-3-carboxybenzoxazol zu Salicylonitril verläuft über einen Übergangszustand (ÜZ; Abb. 4.20b), in welchem die Ladung delokalisiert vorliegt.

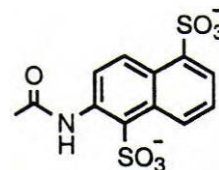


Abb. 4.20b: Das zur Immunisierung eingesetzte Analogon des ÜZ.

Für eine direkte Immunisierung mit einem modifizierten Huminsäuremolekül wäre dieses natürlich zu groß und zu heterogen; vermutlich käme es eher zu einem toxischen Schock als zur Produktion eines generellen Antikörpers, der eine Vielzahl von Aromatendecarboxylierungen katalysiert. Es wäre jedoch möglich, mit den hypothetischen Übergangszustandsanaloga z.B. der Ferulasäure-Decarboxylierung Abzyme herzustellen, die ähnlich strukturierte Carboxylgruppen in Huminsäuremolekülen abspalten. Aufgrund ihres recht hohen Molekulargewichts (ca. 150kDa; Voet & Voet, 2005) wären diese Abzyme für die Umsetzung von Braunkohlstämmigen Huminsäure-Molekülen allerdings vermutlich nicht besser geeignet als die nativen Enzyme, zumal ihre Stabilität in der Regel gering ist.

Eine neue Möglichkeit zur Katalyse eröffnet sich durch katalytisch aktive RNA-Moleküle. Aus kombinatorischen RNA-Bibliotheken konnten zahlreiche solcher (künstlicher) *Ribozyme* isoliert werden, die chemische Reaktionen wie etwa N- und S-Alkylierungen und Aminoacylierungen oder Diels-Alder-Reaktionen katalysieren (Schwarz und Famulok, 2001).

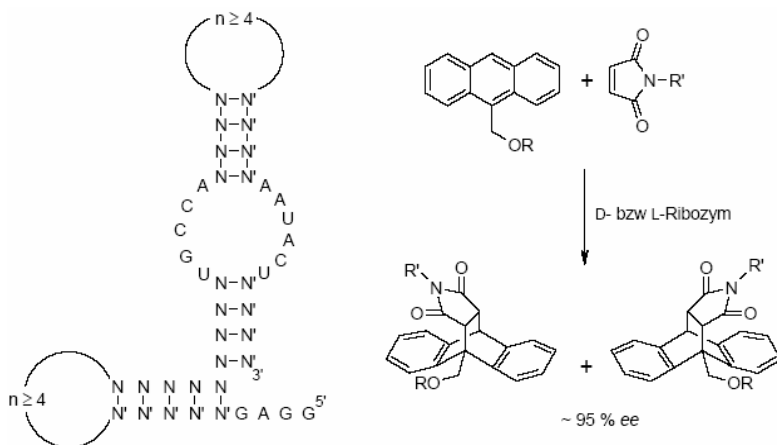


Abb. 4.21: Beispiel einer RNA-katalysierten enantioselektiven Diels-Alder-Reaktion (Seelig und Jäschke, 2000).

Allerdings sind die Nachteile der Ribozyme mit denen der katalytischen Antikörper identisch, nämlich geringe Aktivität und Stabilität. Diese Einschränkungen lassen praktische Anwendungen beim derzeitigen Stand der Technik ungewiß erscheinen.

4.8.2.4 Screening nach einer extrazellulären Huminsäure-Decarboxylase

Wie bereits unter 1.4.1.3 angesprochen, wäre für den technischen Einsatz eines Enzyms zur Huminsäure-Decarboxylierung ein extrazelluläres Enzym deutlich geeigneter. Zur Detektion eines solchen Enzyms könnten Modifikationen eines selbst entwickelten Bioassays geeignet sein, der das Vorhandensein eines extrazellulären Enzyms mit der Fähigkeit zur Decarboxylierung von Pyromellitsäure zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure bereits auf einer mit dem das Enzym produzierenden Stamm beimpften Agarplatte anzeigt (Rudat, 2000 sowie Rudat et al., 2002). Dieser Assay soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Im Verlauf des Screenings wurde ein Bakterium isoliert, welches als einzige höhere BCS die Benzen-1,2,4-tricarbonsäure verwerten kann. Die Bildung einer Decarboxylase konnte für diesen Organismus (durch die DSMZ als *Arthrobacter ureafaciens* identifiziert) bei Anzucht auf Benzen-1,2,4-tricarbonsäure nicht festgestellt werden, so daß hier vermutlich eine direkte oxidative Spaltung des dreifach substituierten Ringes erfolgt.

A. ureafaciens wird nun als Rasen auf LFR-Medium ausplattiert, welches Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure als einzige C-Quelle enthält; *A. ureafaciens* kann mit dieser C-Quelle nicht wachsen. Benzen-1,2,4-tricarbonsäure ist das obligatorische Decarboxylierungsprodukt der Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure, gleich welche Carboxylgruppe von dieser symmetrischen BCS abgespalten wird. Wird nun im Rahmen des Screenings ein Organismus auf diese Platte aufgeimpft, welcher über eine extrazelluläre (Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure-) Decarboxylase verfügt, wird diese C-Quelle für *A. ureafaciens* zugänglich (durch Decarboxylierung zu Benzen-1,2,4-tricarbonsäure), und dieser Organismus kann wachsen. Dieser Vorgang ließe sich infolge der intensiven gelben Färbung von *A. ureafaciens* gut verfolgen; um den aufgeimpften extrazellulär decarboxylierenden Organismus müßte es zur Bildung eines gelben Hofes durch Wachstum von *A. ureafaciens* kommen.

Um das Funktionieren dieser Methode zu überprüfen, wurde ein Extrakt des *Paracoccus*-Stammes E.1 auf eine der oben beschriebenen Platten gegeben, für den die benötigte Decarboxylase-Aktivität nachgewiesen worden war (Lammerich, 1998).

Der zugegebene Rohextrakt von E.1 zeigte sich offensichtlich in der Lage, genügend Pyromellitsäure zu decarboxylieren und damit in eine für *A. ureafaciens* nutzbare Form zu überführen. Dessen Wachstum erfolgte sogar in einem stärkeren Maße als bei einem Auftropfen der als Positivkontrolle zugegebenen Benzen-1,2,4-tricarbonsäure, obwohl lokal weniger Pyromellitsäure vorlag (Abb. 4.22).

Um auszuschließen, daß sich *A. ureafaciens* lediglich von dem zugegebenen Rohextrakt selbst ernährt, wurde als Negativkontrolle auch Rohextrakt zugegeben, welcher zuvor 30min bei 100°C erhitzt worden war, so daß keine Decarboxylase-Aktivität mehr vorlag (spektralphotometrisch überprüft). Bei Zutropfen des solcherart denaturierten Rohextraktes erfolgte kein Wachstum; allein von der Verwertung des Rohextraktes kann *A. ureafaciens* also nicht gewachsen sein. Damit sollte die Funktionsfähigkeit dieser Methode hinreichend bewiesen sein.

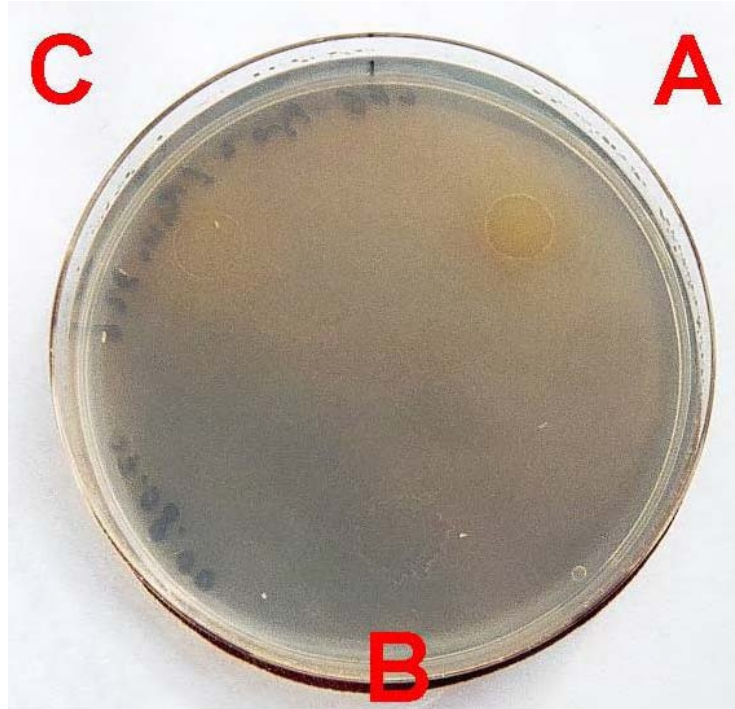


Abb. 4.22: Rasenbildung von *A. ureafaciens* auf LFR/Pyromellitsäure (0,1% w/v) -Medium (Rudat, 2000 sowie Rudat et al., 2002).

Folgende Lösungen wurden auf diese Platte aufgetropft:

A → 20 µl Rohextrakt E.1 nach Ultrazentrifugation

B → 20 µl Rohextrakt E.1, hitzedenaturiert (Negativkontrolle)

C → 20 µl Benzen-1,2,4-tricarbonsäure, 10 % w/v (Positivkontrolle)

Das beste Wachstum zeigte sich bei Zugabe des nativen Rohextraktes von E.1.

Mit Hilfe dieser Methode wurde versucht, ein extrazellulär Pyromellitsäure decarboxylierendes Bakterium zu finden. Infolge der Konzentrierung dieser Arbeit auf die Mellitsäure-Decarboxylierung und die Reinigung der MDCase wurde dieser Ansatz allerdings nicht sehr intensiv verfolgt. Analog zu diesem Verfahren könnten weitere Bioassays entwickelt und durchgeführt werden, mit deren Hilfe eine extrazelluläre Decarboxylase aufgespürt werden kann. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß auch Substrate Verwendung finden, die zu groß sind, um ins Zellinnere transportiert werden zu können. Andernfalls besteht keine Notwendigkeit zur Ausscheidung einer extrazellulären Decarboxylase, da dies ja letztlich dazu führt, das betreffende Molekül auch Nahrungskonkurrenten als C-Quelle zugänglich zu machen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die räumliche Trennung von Mikroorganismus und Substrat durch eine hydrophobe Barriere, wodurch das Bakterium (bzw. der Pilz) gezwungen wäre, das Molekül zur Nutzbarmachung durch Decarboxylierung zu hydrophobieren (Fakoussa, persönliche Mitteilung).

In Anbetracht der enormen Vorteile der Verwendung extrazellulärer Enzyme sollte das Screening nach extrazellulären Decarboxylasen in jedem Falle ausgedehnt werden. Im Idealfall ließe sich von einem solchen Enzym ein kleines, *in vitro* synthetisierbares Peptid mit unspezifischer Decarboxylase-Aktivität ableiten.

In den letzten Jahren hat die **Organokatalyse** zunehmend Eingang in die chemische Synthese gefunden. Einige Reaktionen können durch 20 oder weniger Aminosäuren kurze Peptide bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck stereoselektiv durchgeführt werden (Westermann, 2003). Offenbar ist für „einfache“ Reaktionen nicht immer eine gewisse Mindestgröße eines Enzyms erforderlich. Vor wenigen Jahren gelang die erste intermolekulare Aldolkondensation lediglich mit Hilfe katalytisch wirksamen Prolins (List et al, 2000), und bald darauf wurde entdeckt, daß die Verwendung unterschiedlicher Prolinderivate sich zur stereoselektiven Herstellung enantiomerenreiner Produkte nutzen läßt (Abb. 4.23a u. b; Cheong et al., 2004).

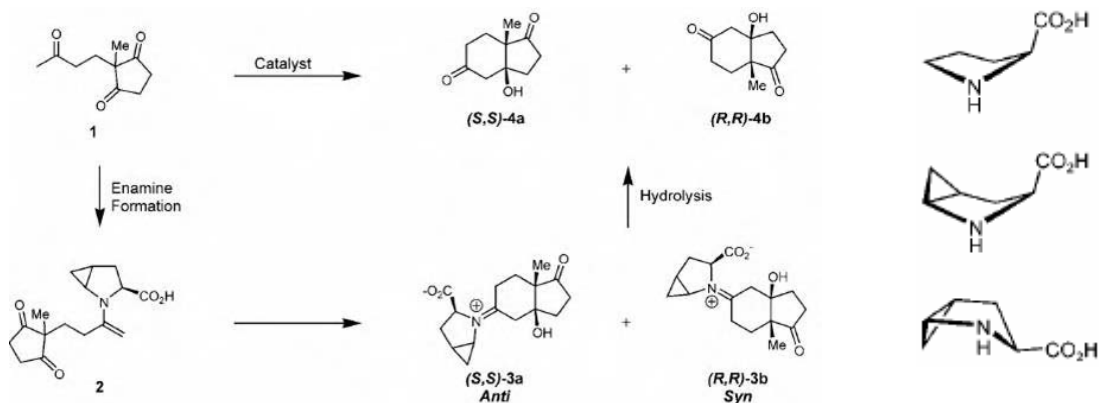


Abb. 4.23a: Intramolekulare Aldolkondensation durch Prolinderivate.
Die Verwendung des cis-Isomers führt zur Bildung der S,S-Konformation.

Abb. 4.23b: Prolin (oben) sowie cis- (Mitte) und trans-4,5-methanoproline.

Eine derart extrem kleine katalytische Einheit wäre bezüglich der technischen Anwendbarkeit natürlich jedem Enzym überlegen.

4.8.2.5 **Schlußbetrachtung**

Die enzymatische Decarboxylierung von Huminsäuren halte ich prinzipiell für möglich. Die Hoffnung, daß eine einzelne Decarboxylase polycarboxylierter Aromaten wie z.B. eine Mellitsäure-Decarboxylase dies in großtechnischem Maßstab quantitativ bewerkstelligen kann, wird jedoch nur schwer erfüllbar sein. Vermutlich kann nur eine Kombination der oben beschriebenen Ansätze zur Lösung des Problems führen. Bevor der Mensch die Natur zu seinem Vorteil nutzen und in Teilbereichen sogar übertreffen kann, muß (oder vielmehr sollte) er sie zunächst einmal verstehen. In diesem Fall ist unser Verständnis der Natur enzymatischer Decarboxylierungsreaktionen zweifellos noch ausbaufähig. Vielleicht kann diese Arbeit hierzu einen kleinen Beitrag leisten.

5 Zusammenfassung

In dieser Dissertation gelang erstmals die Reinigung einer Benzenhexacarbonsäure-(Mellitsäure-) Decarboxylase. Durch mikrobiologische und biochemische Experimente konnte die Verstoffwechslung polycarboxylierter Aromaten durch verschiedene Bakterien vergleichend untersucht werden. Dabei wurden neben der Isolierung neuer Bakterienstämme methodische Grundlagen geschaffen bzw. entscheidend verbessert, die in Zukunft eine vollständige Aufklärung des Mellitsäure-Katabolismus ermöglichen können.

Im Einzelnen wurden im Verlauf dieser Arbeit folgende Ergebnisse erzielt:

- ✓ Es gelang die Anzucht von insgesamt 22 selbst isolierten Bakterienstämmen mit Benzen-1,2,4,5-tetracarbonsäure (Pyromellitsäure) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Herstellung des hierzu verwendeten Mineralsalzmediums konnte erheblich vereinfacht werden. Darüber hinaus wurde ein modifiziertes Komplexmedium entwickelt, das die lag-Phase nach Überimpfung der Bakterien von Voll- auf Minimalmedium deutlich verkürzte.
- ✓ Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine neue Bakterienart entdeckt und beschrieben, die wahrscheinlich eine neue Gattung innerhalb der α -Proteobakterien repräsentiert (vorgeschlagener Name: *Kekulea arternensis*).
- ✓ Die verwendeten Benzencarbonsäuren (BCS) wurden mittels verschiedener chemischer Methoden analysiert (Infrarotspektroskopie, Trennung und Identifizierung mittels Hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC), Titrationskurven u.a.), wodurch sich ihre künftige Handhabung als (Bio-) Chemikalien bzw. als Substrate berechenbarer gestaltet. Hervorzuheben ist die Entdeckung der Einsetzbarkeit von Pyromellitsäure als Puffersubstanz über einen weiten pH-Bereich (ca. 2 – 6), die für spezielle Anwendungen eine Alternative zu Citronensäure darstellen könnte.
- ✓ Durch Modifikation des HPLC-Laufmittels und die zusätzlich genutzte Identifikationsmöglichkeit über den Dioden-Array-Detektor konnte die Trennbarkeit und die Unterscheidbarkeit der einzelnen BCS erheblich verbessert werden. Hierdurch wurde die Aufklärung der mikrobiellen Abbauwege dieser Substanzen deutlich vereinfacht.
- ✓ Erstmals gelang der Nachweis des mikrobiellen Wachstums mit Benzenpentacarbonsäure als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle unter Verwendung des neu isolierten Bakteriums „*Kekulea arternensis*“ sowie anderer Bakterienstämme.

- ✓ Die Einleitung des Abbaus der Benzenpentacarbonsäure durch zweifache enzymatische Decarboxylierung wurde mittels HPLC nachgewiesen und dabei die intermediäre Bildung zweier unterschiedlicher Benzentetracarbonsäuren durch verschiedene Bakterienstämme beobachtet.
- ✓ Durch einen in dieser Arbeit entwickelten spektralphotometrischen Enzymtest kann die enzymatische Decarboxylierung von Benzenpentacarbonsäure neuerdings quantitativ erfaßt werden.
- ✓ Für alle detektierten BCS-Decarboxylase-Aktivitäten wurde deren intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen. Für die Mellitsäure-Decarboxylasen (MDCasen) der 22 untersuchten Stämme wurde ein Molekulargewichts-Unterschied von rund einer Größenordnung mittels Ultrafiltration belegt. Keine der MDCasen benötigte die Zugabe von Cofaktoren zur Entfaltung enzymatischer Aktivität.
- ✓ Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung eignet sich hervorragend als Anreicherungsmethode für MDCasen: Es wurden Anreicherungsfaktoren von 5-8 erzielt. Alle untersuchten Enzyme zeigten bei diesem Arbeitsgang ein ähnliches Verhalten. Dies deutet auf die Entdeckung einer allgemeinen Eigenschaft dieser noch weitgehend unerforschten Enzyme hin, nämlich eine relativ hohe Hydrophobizität bezüglich ihrer Außenbereiche.
- ✓ Mellitsäure konnte mit hoher Effizienz (ca. 50% d. Bindungsstellen) an EAH Sepharose[®] 4B gekoppelt und somit ein neuartiges Material zur Liganden-Affinitätschromatographie (LAC) hergestellt werden. Die Kopplung wurde mittels Infrarotspektroskopie und UV/Vis-Spektralphotometrie qualitativ und quantitativ nachgewiesen.
- ✓ Die MDCase des selbst isolierten Bodenbakteriums *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) konnte mit Hilfe dieser neu entwickelten LAC bis zu einem Gesamt-Reinigungsfaktor >1000 gereinigt werden.
- ✓ Das Molekulargewicht des Monomers der gereinigten MDCase aus dem Stamm *LFG19a* konnte mittels SDS-PAGE mit ca. 45kDa bestimmt werden; das Enzym wird durch Reduktionsmittel (Mercaptoethanol) nicht in weitere Untereinheiten zerlegt.
- ✓ Die MDCase aus dem Stamm *LFG19a* bildet offenbar Di- und Oligomere, was durch native Gelelektrophorese nach der Reinigung dokumentiert werden konnte.
- ✓ Durch eine neu entwickelte Aktivitätsfärbung konnte das mutmaßliche Monomer als aktive Form der MDCase nachgewiesen werden. Hierbei wurde außerdem endgültig bewiesen, daß dieses Enzym unabhängig von Cofaktoren funktioniert.

- ✓ Bei Anzucht des Bakterienstammes *LFG19a* (*Sinorhizobium morelense/Ensifer adhaerens*) mit Mellitsäure, Benzenpentacarbonsäure, Pyromellitsäure und Benzen-1,2,4-tricarbonsäure wird unabhängig von der Kohlenstoffquelle jeweils eine identische Mellitsäure-Decarboxylase (MDCase) exprimiert.
- ✓ Mellitsäure und Benzenpentacarbonsäure werden in dem Stamm *LFG19a* durch dasselbe Enzym decarboxyliert. Für die Decarboxylierung der Pyromellitsäure wird in diesem Stamm eine weitere Decarboxylase benötigt; diese wird bei Wachstum mit Benzen-1,2,4-tricarbonsäure nicht exprimiert.
- ✓ Anhand der Ergebnisse differentieller Anzucht mit unterschiedlichen Aromaten als C-Quelle sowie vergleichender Literaturstudien konnte ein vollständiger (hypothetischer) Abbauweg für polycarboxylierte Aromaten im Allgemeinen und Mellitsäure im Speziellen skizziert werden.
- ✓ In Anlehnung an die unlängst kristallisierte und mittels Röntgenstrukturanalyse untersuchte Orotidin-5`-monophosphat-Decarboxylase konnte ein Reaktionsmechanismus für die MDCase aus dem Stamm *LFG19a* postuliert werden. Dieser erklärt die enzymatische Abspaltung zweier Carboxylgruppen der Mellitsäure in genau der beobachteten Reihenfolge. Des Weiteren wird hierdurch begründet, warum für die Decarboxylierung der dabei entstehenden Pyromellitsäure ein zusätzliches Enzym erforderlich ist.
- ✓ Somit wurde mit der Mellitsäure-Decarboxylase aus dem Stamm *LFG19a* das erste Enzym isoliert, das zwei Carboxylgruppen von einem Aromaten abspaltet.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Aebersold R. and Mann M. (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207

Afring R.P. and Taylor B.F. (1981): Degradation of phthalic acid by a nitrate-respiring bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1177-1183

Alley J.F. and Brown L.R. (2000): Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 439-442

AmershamPharmacia Biotech (2002): Affinity Chromatography, principles and methods (handbook).

Anders E., Hayatsu R. and Studier M.H. (1973): Organic compounds in meteorites. *Science* 182, 781-790

Anderson N.G. (1970): Weights of cell and cell constituents. In: Sober (Hrsg.): Handbook of Biochemistry - Selected data for Molecular Biology, 2nd edition: K-29, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio

Antoniou D., Caratzoulas S., Kalyanaraman C., Mincer J.S. and Schwartz S.D. (2002): Barrier passage and protein dynamics in enzymatically catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* 269, 3103-3112

Appleby T.C., Kinsland C., Begley T.P. and Ealick S.E. (2000): The crystal structure and mechanism of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Biochemistry* 97, 2005-2010

Balashova N.V., Stolz A., Knackmuss H.J., Kosheleva I.A., Naumov A.V. and Boronin A.M. (2001): Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1. *Biodegradation* 12, 179-188.

Barrio C., García-Granda S. and Gómez-Beltrán F. (1993): Structures of 1,2,3,4-benzenetetracarboxylic acid and 1,2,3,5-benzenetetracarboxylic acid dihydrate. *Acta Cryst.* 49, 253-257

Bast E. (2001): Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum Akademischer Verlag.

Beadle C. A., and Smith A. R. W. (1982): The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species. *Eur. J. Biochem.* 123, 323-332.

Beeckmans S. and van Driesche E. (1998): Pig Heart Fumarase contains two distinct substrate-binding sites differing in affinity. *J. Biol. Chem.* 273, 31661-31669

Béhar F. and Vandenbrouke M. (1987): Chemical modelling of the structure of kerogens and asphaltenes as a function of their origin and evolution stage. *Org. Geochem.* 11, 15-24

Bender W., Spierer P. and Hogness D.S. (1983): Chromosome walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *Rosy* loci and the Bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 168: 17-33

Benner S.A., Devine K.G., Matveeva L.N. and Powell David H. (2000): The missing organic molecules on Mars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 97, No. 6, 2425-2430

Bergmeyer H.U., Bernt E., Graßl M. and Michal G. (1970): Ermittlung von Meßergebnissen. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.): *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band I, Verlag Chemie Weinheim, 2. Auflage

Bildungsserver für Chemie/Uni Bielefeld: <http://dc2.uni-bielefeld.de/dc2/index.html>.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Branden C. and Tooze J. (1999): Introduction to protein structure. 2nd edition, Garland Publishing Inc., NY

Brecht C. et al. (1996): Bergbau, Erdöl und Erdgas - Petrochemie, Elektrizität, Umweltschutz. Jahrbuch 1996, Verlag Glückauf, Essen, pp 1109-1152

Breckenridge C.R. and Polman J.K. (1994): Solubilization of bituminous and lignite coals by chemically and biologically synthesized surfactants. *J. Chem. Tech. & Biotech.* 61, 11-17

BRENDA (2005): The Comprehensive Enzyme Information System (www.brenda.uni-koeln.de)

Bretherick (1990): Handbook of reactive chemical hazards, Nr. 0518, London Butterworths

Breuer, H. (1991): Atlas zur Chemie, Deutscher Taschenbuch Verlag, 3. Aufl., pp 303-305

Briggs M.H. and Mamikunian G. (1963): Organic substances in carbonaceous chondrites. *Space Science Review* 1, 647.

Brown C.K., Vetting M.W., Earheart C.A. and Ohlendorf D.H. (2004): Biophysical analyses of designed and selected mutants of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 555-585.

Brown T.A. (2002): Gentechnologie für Einsteiger. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.

Bull C. and Ballou D.P. (1981): Purification and properties of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida*. A new iron to subunit stoichiometry. *J. Biol. Chem.*, 256, 12673-12680

Bull C., Ballou D.P. and Otsuka S. (1981): The reaction of oxygen with protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida*. Characterization of a new oxygenated intermediate. *J. Biol. Chem.* 256, 12681-12686.

Bustin R.M. (1989): Diagenesis of kerogen. In GAC/MAC Short course – burial diagenesis, Vol. 15 (Ed. I. Hutchinson), 1-38

Cai, M and Xun L. (2002): Organization and regulation of pentachlorophenol-degrading genes in *Sphingobium chlorophenicum* ATCC 39723. J. Bacteriol. 184, 4672-4680.

Callahan B.P. and Wolfenden R. (2004): Charge development in the transition state for decarboxylations in water: spontaneous and acetone-catalyzed decarboxylation of aminomalonate. J. Am. Chem. Soc. 126, 4514-4515

Campbell J.A., Stewart D.L., McCullouch M., Lucke R.B. and Bean R.M. (1988): Biodegradation of coal-related model compounds. Am. Chem. Soc., Div. Fuel. Chem. Prep. 33, 514-423

Cavin J.-F., Barthelmebs L., Guzzo J., van Beeumen J., Samyn B., Travers J.F. and Diviés C. (1997a): Purification and characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiol.Lett. 147, 291-295

Cavin J.-F., Barthelmebs L. and Diviés C. (1997b): Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: Gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification and characterization. Appl. Env. Microbiol. 63, 1939-1944

Cavin J.-F., Dartois V. and Divies C. (1998): Gene cloning, transcriptional analysis, purification and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1466-1471

Chen Y.P. and Lovell C.R.. (1994): Purification and properties of a homodimeric protocatechuate 4,5-dioxygenase from *Rhizobium leguminosarum*. Archives of Microbiology 161,191-195

Cheong P., Houk K.N., Warriar J.S. and Hanessianb, S. (2004): Catalysis of the Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert Reaction by cis- and trans-4,5-Methanoprolines: Sensitivity of Proline Catalysis to Pyrrolidine Ring Conformation. Adv. Synth. Catal. 346, 1111 –1115

Cohen M.S., Bowers W.C., Aronson H. and Grey E.T. (1987): Cell-free solubilization of coal by *Polyporus versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2840-2844

Cohen M.S., Feldmann K.A., Brown C.S. and Grey E.T. (1990): Isolation and identification of the coal-solubilization agent produced by *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3285-3290

Cohen M.S. and Gabriele P.D. (1982): Degradation of coal by the fungi *Polyporus versicolor* and *Poria monticolar*. Appl. Environ. Microbiol. 44, 23-27

Crawford R.L., Bromley J.W. and Perkins-Olson P.E. (1979): Catabolism of protocatechuate by *Bacillus macerans*. Appl Environ Microbiol. 37, 614–618

CRC Handbook of Chemistry and Physics (1992). 73rd edition by The Chemical Rubber Company, CRC Press, Florida.

- Dagley S. and Patel M.D. (1957):** Oxidation of p-cresol and related compounds by a *Pseudomonas*. *Biochem J.* 66, 227–233.
- Damberger H. (1994):** Coal. In: *Encyclopedia of Earth Sciences*, Macmillian Publishing Co., New York. 1994
- Degrassi G., Polverino de Laureto P. and v. Bruschi C. (1995):** Purification and characterization of ferulate and p-coumarat decarboxylase from *Bacillus pumilus*. *Appl. Environ. Microbiology* 61, 326-332
- Diaz J. and Merino, F. (1997):** Shikimate dehydrogenase from pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. Purification and properties. *Physiol. Plant.* 100, 147-152
- Dingermann T. (1999):** Einführen von Mutationen durch PCR. In: Dingermann T. (Hrsg.): *Gentechnik, Biotechnik: Prinzipien und Anwendungen in Pharmazie und Medizin*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- DNK (Deutsches Nationales Komitee des Weltenergieerates) (2001):** Globale Verfügbarkeit von Energieressourcen – Schlussfolgerungen für die europäische und nationale Energiepolitik.
- dpa (Deutsche Presseagentur) (2005a):** Teil der deutschen Ölreserven freigegeben. (Quelle: www.gmx.net, 06.09.2005).
- dpa (Deutsche Presseagentur) (2005b):** Südafrika profitiert von flüssiger Kohle. (Quelle: *Generalanzeiger*, 21.11.2005)
- Dwyer M.A., Looger L.L. and Hellinga H.W. (2004):** Computational design of a biologically active enzyme. *Science* 304, 1967-1971..
- Dyni J.R. (1994):** Reserves and resources of oil and gas. In: *Encyclopedia of Earth Sciences*, Macmillian Publishing Co., New York. 1994
- Eaton R. W. (2001):** Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* 183, 3689–3703
- Eaton R.W. and Ribbons D.W. (1982):** Utilization of phthalate esters by micrococci. *Arch Microbiol.* 132, 185–188
- Elkan G.H. and Bunn C.R. (1992):** The Rhizobia. In: (Balows, Trüper, Dworkin, Harder und Schleifer (Eds.): *The Prokaryotes*. 2nd Edition, Springer Verlag, New York.
- Endo R., Kamakura M., Miyauchi K., Fukuda M., Ohtsubo Y., Tsuda M. and Nagata Y. (2005):** Identification and Characterization of Genes Involved in the Downstream Degradation Pathway of γ -Hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J. Bacteriol.* 187, 847-853.
- Falbe J. & Regitz M. (Hrsg.) 1997:** RÖMMP Lexikon Chemie, Band 2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart,

Falbe J. & Regitz M. (Hrsg.) 1998: RÖMMP Lexikon Chemie, Band 4, Georg Thieme Verlag, Stuttgart,

Faison B.D., Woodward C.A. and Bean R.M. (1990): Microbial solubilization of a peroxidized subbituminous coal: product characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24, 831-842

Fakoussa R.M. (1981): Kohle als Substrat für Mikroorganismen: Untersuchungen zur mikrobiellen Umsetzung nativer Steinkohle. Dissertation, Universität Bonn

Fakoussa R.M. (1992): Mikroorganismen erschließen Kohle-Ressourcen. *Bioengineering* 4, 21-28

Fakoussa R.M. (1994): The influence of different chelators on the solubilization/liquefaction of different pretreated and natural lignites. *Fuel Process. Technol.* 40, 183-192

Fakoussa R.M. and Frost P.J. (1999): In vivo-decolourization of coal-derived humic acids by laccase excreting fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 60-65

Fakoussa R.M. and Hofrichter M. (1999): Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 25-40

Fakoussa R.M., Lammerich H.P. & Götz G. (1999a): Behandlung von Braunkohlebestandteilen zum Zwecke der Veredelung. Deutsche Patentanmeldung Nr. 19945975.4

Fakoussa R.M., Lammerich H.P., Götz G., and Tesch S. (1999b): Increasing the hydrophobicity of coal-derived humic acids enzymatically. In: Fifth International Symposium on Biological Processing of Fossil Fuels, September 1999, Madrid; Abstract band

Farrand S.K., van Berkum P.B. and Oger P. (2003): *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rizobiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1689-1695.

Fathepure, B.Z., J.M. Tiedje, and S.A. Boyd. (1988): Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 327-330.

Fieser L. & M. (1968): Organische Chemie, Verlag Chemie Weinheim, 2. Aufl., pp 774-780

Fredrickson J.K., Stewart D.L., Campbell J.A., Powell M.A., McMulloch M., Pyne J.W. and Bean R.M. (1990): Biosolubilization of low-rank coal by *Trametes versicolor* siderophore-like product and other complexing agents. *J. Ind. Microbiol.* 5, 401-406

Flamm W.G. and Crandall D.I. (1963): Purification of mammalian homogentisate oxidase and evidence for the existence of ferrous mercaptans in the active center. *J. Biol. Chem.* 238, 389-396

Flynn, G.J. (1996): The delivery of organic matter from asteroids and comets to the early surface of Mars. *Earth Moon Planets* 72, 469-474,

Fritsche W. (2003): Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena 3.Aufl.

Frost P.J. (1996): Untersuchung zum Mechanismus der mikrobiellen Verflüssigung Rheinischer Braunkohle durch Pilze. Dissertation, Universität Bonn

Fyfe J.A., Miller R.L. and Krenitsky T.A. (1973): Kinetic Properties and Inhibition of Orotidine 5'-Phosphate Decarboxylase. Effects of some allopurinol metabolites on the enzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 3801-3809

Gesamtverband des deutschen Steinkohlebergbaus (1991): Steinkohle - Daten und Tendenzen. Verlag Glückauf, Essen

Gibson J.S. and Harwood C. (2002): Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 345-69

Gottschalk G. (1986): Bacterial metabolism. Second edition, Springer-Verlag, New York pp 157-162

Goyal A.K. and Zylstra G.J. (1996): Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 230-236

Graham P.H., Sadowsky M.J., Tighe S.W., Thompson J.A., Date R.A., Howieson J.G. and Thomas R. (1995): Differences among strains of Bradyrhizobium in fatty acid-methyl ester analysis. *Can. J. Microbiol.* 41, 1038-1042.

Grant D.J. and Patel J.C. (1969): The non-oxidative decarboxylation of p-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid and gallic acid by *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*). *Antonie Van Leeuwenhoek.* 35, 325-343.

Green A.A. and Hughes W.L. (1955): Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: Colowick S.P. und Kaplan N.O. (Hrsg.): *Methods in enzymology* Vol. I: 67-138, Academic Press, New York

Grifoll M., Selifonov S.A. and Chapman P.J. (1994): Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274. *Appl Environ Microbiol.* 60, 2438-2449.

Günzler H. and Böck H. (1990): IR-Spektroskopie. 2. Auflage bei Verlag Chemie, Weinheim

Habe, H., Miyakoshi, M., Chung, J., Kasuga, K., Yoshida, T., Nojiri, H. and Omori, T. (2003): Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 44-54

Haenel M.W. (1992): Aspects of coal structure. 3rd symposium on biotechnology of coal and coal derived substances. DGMK-Bericht 9106, 139-170

Hashidoko Y., Itoh E., Yokota K., Yoshida T. and Tahara S. (2002): Characterization of five phyllosphere bacteria isolated from *Rosa rugosa* leaves, and their phenotypic and metabolic properties. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66, 2474-8.

Hayaishi O., Nozaki M. and Abbott M.T. (1975): Oxygenases: Dioxygenases. In: The Enzymes vol. XII: 119-151, Academic Press, New York

Hayatsu R., Winans R. E., Scott R. G., McBeth R. L., Moore L. P. and Studier M. H. (1980): Reports discovery of various phenolic acids and other organic acids in the Murchison carbonaceous chondrite. *Science* 207, 1202–1204.

Hayatsu R. and Anders E. (1981): Organic compounds in meteorites and their origins. *Topics Curr. Chem.* 99, 1–37

He Z. and Wiegel J. (1996): Purification and characterization of an oxygen-sensitive, reversible 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. *J. Bacteriol.* 12, 3539-3543

Healy M.J. and Christen P (1973): Mechanistic probes for enzymatic reactions. Oxidation-reduction indicators as oxidants of intermediary carbanions (Studies with Aldolase, Aspartate Aminotransferase, Pyruvate Decarboxylase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase). *Biochemistry* 12, 35-41

Heitkamp M.A., Franklin W. and Cerniglia C.E. (1988): Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterisation of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2549-2555

Henecka H. (1952): Decarboxylierung von Carbonsäuren. In: Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band VIII, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Hesse M., Meier H. and Zeeh B. (2002): Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 6. Aufl. bei Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Heukeshoven J. and Dernick R. (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32

Higuchi T. (1989): Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. In.: Lewis, N. G.; Paice, M. G. (Ed.). Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 482-502. (ACS Symposium Series, 399).

Hölker, U., Fakoussa, R. M. and Höfer, M. (1995): Growth substrates control the ability of *Fusarium oxysporum* to solubilize low-rank coal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 351-355.

Hölker U. (1998): Mechanismen der Verflüssigung von rheinischer Braunkohle durch Pilze - ein Vergleich der Deuteromyceten *Fusarium oxysporum* und *Trichoderma atroviride*. Dissertation, Universität Bonn

Hölker U., Ludwig S., Scheel T. and Höfer M. (1999a): Mechanisms of coal solubilization by the deuteromycetes *Trichoderma atroviride* and *Fusarium oxysporum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 57-59.

Hölker, U., Polsakiewicz, M., Scheel, T., Ludwig, S., Schinke, S. and Höfer, M. (1999b): Coal as inductor of esterases in the deuteromycete *Trichoderma atroviride*. Proc. Seventh International Symposium on Biological Processing of Fossil Fuels. Madrid, Spain.

Hofrichter M. and Fritsche W. (1997): Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. Teil I: Screening for low-rank coal depolymerization activities. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 220-225

Hommel (1995): Handbuch der gefährlichen Güter. Band 3, Springer-Verlag Berlin, Merkblatt Nr. 982

Hopp V. (2000): Grundlagen der Life Sciences. Wiley-VCH, Weinheim

Hotta K., Lange H., Tantillo D.J., Houk K.N., Hilvert D. and Wilson I.A. (2000): Catalysis of decarboxylation by a preorganized heterogeneous microenvironment: Crystal structures of abzyme 21D8. J. Mol. Biol. 302, 1213-1225

Huang Z., Dostal L. and Rosazza J.P.N. (1993a): Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. J. Biol. Chem. 268, 23954-23958

Huang Z., Dostal L. and Rosazza J.P.N. (1993b): Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2244-2250

Huang Z., Dostal L. and Rosazza J.P.N. (1994): Purification and characterization of a ferulic acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. J. Bac. 176, 5912-5918

Imai R., Nagata Y., Senoo K., Wada H., Fukuda M., Takagi M. and Yano K. (1989): Dehydrochlorination of γ -hexachlorocyclohexane (γ -BHC) by γ -BHC-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. Agric. Biol. Chem. 53, 2015-2017

Imai R., Nagata Y., Fukuda M., Takagi M. and Yano K. (1991): Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton peptide that eliminates HCL molecules from γ -hexachlorocyclohexane. J. Bac. 173, 6811-6819

Internationale Energieagentur (International Energy Agency IEA) 2002: World Energy Outlook 2002: Energy and Poverty

Internationale Energieagentur (International Energy Agency IEA) 2004: Energy to 2050: Scenarios for a sustainable future

Internationale Energieagentur (International Energy Agency IEA) 2005: World Energy Outlook 2005

Jacob, F., Perrin D., Sanchez C., and Monod J. (1960) : L'operon: groupe de gène à expression par un operateur. C. R. Acad. Sci. 250, 1727-1729.

Jarvis B.D.W., Sivakumaran S., Tighe S.W. and Gillis M. (1996) : Identification of Agrobacterium and Rhizobium species based on cellular fatty acid composition. Plant and Soil 184, 143-158.

Jayachandran G., Görisch H. and Adrian L. (2003): Dehalorespiration with hexachlorobenzene and pentachlorobenzene by *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. Arch Microbiol. 180, 411- 416.

Jencks W.P. (1975): Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the Circe effect. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 43: 219-410

Jordan D.C. (1982): Transfer of *Rhizobium japonicum* (Buchanan, 1980) to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 136-139.

Jordan D.C. (1984): Family III, *Rhizobiaceae*. In Krieg u. Hold (Ed.): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pp 234-256.

Kästner M., Breuer-Jammali M. and Mahro B. (1994): Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA). Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 267-273

Karlsson P. (1972): Kurzes Lehrbuch der Biochemie. 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Keenan B.G., Leungsakul T., Smets B.F., Mori. M, avid Henderson D.E. and Wood T.K. (2005): Protein engineering of the archetypal nitroarene dioxygenase of *Ralstonia* sp. strain U2 for activity on aminonitrotoluenes and dinitrotoluenes through alpha-subunit residues Leucine 225, Phenylalanine 350, and Glycine 407. J. Bac. 187, 3302–3310

Kimura Y., Yasuda N., Tanigaki-Nagae H., Nakabayashi T., Matsunaga H., Kimura M. and Matsuoka A. (1986): Acetoacetate decarboxylase and a peptide with similar activity produced by *Bacillus polymyxa* A-57. Agri. Biol. Chem. 50, 2509-2516

Kirk T.K., Schulz E., Connors W.J., Lorenz L.F. and Zeikus J.G. (1978): Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanaerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117, 277-285

Kiyohara H., Nagao K. and Yana K. (1982): Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 43, 454-457

Kleerebezem R., Hulshoff Pol L. and Lettinga G. (1999a): Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. Appl. Env. Microbiol. 65, 1152-1160

Kleerebezem R., Hulshoff Pol L. and Lettinga G. (1999b): The role of benzoate in anaerobic degradation of terephthalate. Appl. Env. Microbiol. 65, 1161-1167

Klein J., Fakoussa R.M., Hölker U., Hofrichter M., Schmiers H., Sinder C. and Steinbüchel A. (2001): Biotechnology of Coal. In Biotechnology Vol. 10 Rehm, H.J, Reed Eds. ISBN 3-527-28320-X, 153-189.

Kluger R. (1992): Mechanisms of enzymic carbon-carbon bond formation and cleavage. In: Sigman D.S. (Hrsg.): The Enzymes, vol. XX: 271-315, Academic Press, New York

Koch T. (2000): Bakterielle Besiedlungsmuster unter Huminstoff-Einfluß in Grundwasser-Simulationsfiltern. Dissertation, Uni Bremen

Kodaka H, Armfield A.Y., Lombard G.L. and Dowell V.R. (1982): Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *J. Clin. Microbiol.* 16, 948-952.

Kojima Y., Itada N. and Hayaishi (1961): Metapyrocatachase: a new catechol-cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* 236, 2223-2228

Korn-Wendisch F. and Kutzner H.J. (1992): The family *Streptomycetaceae*. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. und Schleifer K.-H. (Hrsg.): *The Prokaryotes*, vol. I, 2nd Edition, pp 921-995, Springer-Verlag, New York

Krause, Roswitha (2000): Screening und Isolierung von Bakterien zur enzymatischen Decarboxylierung von Benzolpolycarbonsäuren am Beispiel Mellitsäure als kohlerelevantes Struktur analogon und gelelektrophoretische Analytik von Braunkohle-Huminsäuren. Dissertation, Universität Bonn

Kuykendall L.D., Young J.M., Martinez-Romero E., Kerr A. and Sawada H. (2005): The family *Rhizobiaceae*. In: Brenner D.J., Krieg N.R. und Staley J.T. (Eds.): *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*, 2nd Edition, Springer Verlag, NY

Kyte J. and Doolittle R. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

Laborda F., Fernandez M., Luna N. and Monistrol I.F. (1997): Study of the liquefaction/solubilization of spanish coals by microorganisms. In: Ziegler A. et al. (Hrsg.): *Proceedings of the 9th International Conference on Coal Science*; 7-12 September 1997, Essen vol. III P&W, Essen, pp 1607-1610

Laborda F., Monistrol I.F., Luna N. and Fernández M. (1999): Processes of liquefaction/solubilization of Spanish coals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 49-56

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

Lammerich H.-P. (1998): Benzenpolycarbonsäure-Decarboxylasen: Screening und Isolierung neuer Stämme sowie vergleichende Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Enzymklasse. Diplomarbeit, Universität Bonn

Lauer A. (2001): Diversität und Dynamik nitratreduzierender und denitrifizierender Bakteriengruppen eines Ackerbodens. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Leifson E. (1960): Atlas of bacterial flagellation. Academic Press, New York.

Li T., Juteau P., Beaudet R., Lepine F., Villemur R. and Bisailon J.G. (2000): Purification and characterization of a 4-hydroxybenzoate decarboxylase from an anaerobic coculture. *Can. J. Microbiol.* 46, 856-859

- Light R.J. and Vogel G. (1975):** 6-Methylsalicylic acid (2,6-cresotic acid) decarboxylase. *Methods Enzymol.* 43, 530-540
- List B., Lerner A. and Barbas C.F. (2000):** Proline-catalyzed direct asymmetric aldol reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2395
- Llorens J., Patrauchan M., Stewart G., Davies J., Eltis L. and Mohn W. (2005):** Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus sp.* strain RHA1: A central pathway for degradation of aromatic compounds. *J.Bac.* 187, 4497-4504
- Lottspeich F. & Zorbas H. (Hrsg.) 1998:** Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag
- Lovley D.R., Fraga J.L., Coates J.D., Blunt-Harris E.L. (1999):** Humics as electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 1:89-98
- Ludwig S., Schinke S., Scheel T., Höfer M. and Hölker, U. (1999):** Differential analysis of fungal extracellular enzymes induced by lignite on protein and mRNA level. Proc. Seventh International Symposium on Biological Processing of Fossil Fuels. Madrid, Spain.
- Madigan M.T., Martinko J.M. and Parker J. (Hrsg.) 2002:** BROCK Biology of microorganisms. Prentice Hall International
- Maiorano J.N. and Grogan D.W. (1999):** Extremely thermostable orotidine-5'-monophosphate decarboxylase from the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEMS Microbiology Letters* 174, 81-87.
- Matthyse A.G. (2004):** The genus *Agrobacterium*. In: The Prokaryotes. An evolving electronic resource for the Microbiological Community. Springer, New York.
- McCullough W.G., Piligian J.T. and Daniel I.J. (1957):** Enzymatic decarboxylation of the aminobenzoates. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 628-630
- Miller B.G., Hassell A.M., Wolfenden R., Milburn M.V. and Short S.A. (2000):** Anatomy of a proficient enzyme: The structure of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase in the presence and absence of a potential transition state analog. *Biochemistry* 97, 2011-2016
- Miller B.G. and Wolfenden R. (2002):** Catalytic proficiency: The unusual case of OMP decarboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 847-885 .
- Miyauchi K., Suh S., Nagata Y. and Takagi M. (1998):** Cloning and sequencing of a 2,5-dichlorohydroquinone reductive dehalogenase gene whose product is involved in degradation of γ -hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bac.* 180, 1354-1359
- Miyauchi K., Suh S., Nagata Y. and Takagi M. (1999):** Cloning and sequencing of a novel meta-cleavage dioxygenase gene whose product is involved in degradation of γ -hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bac.* 181, 6712-6719
- Mosbach K. and Schulz J. (1971):** Studies on lichen enzymes: Purification and properties of orsellinate decarboxylase obtained from *Lasallia pustulata*. *Eur. J. Biochem.* 22, 485-488
- Mullie F. and Reisse J. (1987):** *Topics Curr. Chem.* 139, 85-117.

Murray M. and Ross C. (1971): Development of Pyrimidine-metabolizing Enzymes in Cotyledons of Germinating Peas. *Plant Physiol.* 48, 626–630.

Nagata Y., Nariya T., Ohtomo R., Fukuda M., Yano K. and Takagi M. (1993): Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane by *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bac.* 175, 6403-6410

Nagata Y., Nariya T., Ohtomo R., Fukuda M., Yano K. and Takagi M. (1994): Cloning and sequencing of a 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase gene involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane by *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bac.* 176, 3117-3125

Nagata Y., Miyauchi K. and Takagi M. (1999): Complete analysis of genes and enzymes for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 380-390

Nakazawa T. and Hayashi E. (1977): Phtalate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: Accumulation of 4,5-dihydroxyphtalate by a mutant strain. *J. Bac.* 131, 42-48

Nakazawa T. and Hayashi E. (1978): Phtalate and 4-hydroxyphtalate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: Purification and properties of 4,5-dihydroxyphtalate decarboxylase. *Appl. Env. Microbiol.* 36, 264-269.

Nazareth S. and Mavinkurve S. (1986): Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol by *Fusarium solani*. *Can. J. Microbiol.* 32, 494-497

Nimmo H.G. and Nimmo G.A. (1982): A general method for the localization of enzymes that produce phosphate, pyrophosphate, or CO₂ after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 121, 17-22

Norris D.O. and Date R.A. (1976): Legume bacteriology. In: Shaw N.H. und Bryan W.W. (Eds.): Tropical pasture research. Bulletin Commonwealth bureau of pasture field crops (CSIRO) 51, 134-174.

Nozawa N. and Maruyama Y. (1988b): Denitrification by a soil bacterium with phtalate and other aromatic compounds as substrates. *J. Bacteriol.* 170, 2501-2505

Nozawa N. and Maruyama Y. (1988a): Anaerobic metabolism of phtalate and other aromatic compounds by a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* 170, 5778-5784

O`Leary M.H. (1992): Catalytic strategies in enzymatic carboxylation and decarboxylation. In: Sigman D.S. (Hrsg.): The Enzymes, Vol. XX: 235-269, Academic Press, New York

Ornston L.N. and Stanier R.Y. (1966): The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 241, 3776–3786

Pätz H., Rascher J. and Seifert A. (1989): Kohle – ein Kapitel aus dem Tagebuch der Erde. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig

Peng X., Masai E., Kitayama H., Harada K., Katayama Y and Fukuda M. (2002): Characterization of the 5-Carboxyvanillate Decarboxylase Gene and Its Role in Lignin-Related Biphenyl Catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bac.* 68, 4407-4415

PETRIK Library (2004): Glossary of Organic Chemistry (www.petrik.com).

Preneta, A.Z. (1995): Separation on the basis of size: Gel Permeation Chromatography. In: Protein Purification Methods (Ed. Harris E.L.V. und Angal S.), The practical approach series, Oxford University Press.

Press F. and Siever R. (2003): Allgemeine Geologie. Einführung in das System Erde. Spektrum-Akademischer Verlag, 3.Aufl.

Pujar B.G. and Ribbons D.W. (1985): Phtalate metabolism in *Pseudomonas fluorescens* PHK: Purification and properties of 4,5-Dihydroxyphtalate Decarboxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 374-376

Pyne J.W., Stewart D.L., Linehan J.C., Bean R.M., Powell M.A. Lucke.R.B., Thomas B.L., Campbell J.A. and Wilson B.W. (1988): Enzymatic degradation of low-rank coals by a cell-free enzymatic system from *Coriolus versicolor*. *Res. Conserv. Recycl.* 1, 185-195

Quigley D.R., Ward B., Crawford D.L., Hatcher H.J. and Dugan P.R. (1989): Evidence that microbially produced alkaline materials are involved in coal biosolubilization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20/21, 753-763

Radzicka A. and Wolfenden R. (1995): A proficient enzyme. *Science* 267, 90-93

Rahouti M., Seigle-Murandi F., Steinman R. and Eriksson K.-E. (1989): Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2391-2398

Ralph J.P. and Catcheside D.E.A. (1994): Decolourization and depolymerization of solubilized low-rank coal by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 536-542

Ralph J.P. and Catcheside D.E.A. (1997): Transformations of low-rank coal by *Phanerochaete chrysosporium* and other wood-rot fungi. *Fuel Process. Technol.* 52, 79-93

Rathore R., Lin Z. and Kochi J.K (1993): Facile preparation of α -Nitroketones from enol silyl ethers. *Tetrahed. Lett.* 34, 1859-1862

Rehm H. (2000): Proteinbiochemie/Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Aufl.

Revoll A. T., Volkman J. K., O'Leary T., Summons R. E., Boreham C. J., Banks M. R., and Denwer K. (1994): Depositional setting, hydrocarbon biomarkers and thermal maturity of tasmanite oil shales from Tasmania, Australia. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 3803-3822.

Ribbons D.W. and Evans W.C. (1960): Oxidative metabolism of phthalic acid by soil pseudomonads. *Biochem J.* 76, 310-318.

Ribbons D.W. and Evans W.C. (1962): Oxidative metabolism of protocatechuic acid by certain soil pseudomonads: a new ring-fission mechanism. *Biochem J.* 83, 482–492.

Richter G. (1997): Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Thieme Verlag, 6. Aufl.

Rigden D.J., Walter R.A., Phillips S.E. and Fothergill-Gilmore L.A. (1999): Sulphate ions observed in the 2.12 Å structure of a new crystal form of *S. cerevisiae* phosphoglycerate mutase provide insights into understanding the catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 286, 1507-1517

Riordan J.F., Sokolovsky M. and Vallee B.L. (1966): Tetranitromethan: A reagent for the nitration of Tyrosine and Tyrosyl residues of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 4104-4105

Rippen G. (2003): Handbuch Umweltchemikalien 5. Auflage. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landberg/ Lech.

Roe, S. (1995): Separation based on structure. In: Protein Purification Methods (Ed. Harris E.L.V. und Angal S.), The practical approach series, Oxford University Press.

Rudat J. (2000): Screening nach höhere Benzencarbonsäuren decarboxylierenden Bodenbakterien sowie vergleichende mikrobiologische und biochemische Charakterisierung dieser Organismen bzw. der zugehörigen Enzyme. Diplomarbeit, Universität Bonn

Rudat J., Lammerich H.P. and Fakoussa R.M. (2002): Enzymatic decarboxylation of polycarboxylated benzoic acids: Isolation of bacterial strains and characterization of partially purified enzymes for the increasing of the hydrophobicity of coal derived humic acids. 17th meeting of the VAAM, Biospektrum Sonderausgabe, PD023

Rudat J. and Fakoussa R.M. (2003): Enzymatic decarboxylation of polycarboxylated benzoic acids: Comparison of diverging decarboxylation pathways in various bacteria via HPLC. 18th meeting of the VAAM, Biospektrum Sonderausgabe, PJ014

Rudat J. and Fakoussa R.M. (2004): Developing an affinity chromatography method for the purification of the decarboxylases involved in the microbial degradation of benzenhexacarboxylic acid. 19th meeting of the VAAM, Biospektrum Sonderausgabe, PD001

Rudat J. and Fakoussa R.M. (2005): Purification of a novel decarboxylase of polycarboxylated benzoic acids by using a newly developed affinity chromatography method. 2nd joint convention of DGHM and VAAM, Biospektrum Sonderausgabe, STP016

Ruhrkohle AG (1980): Geschäftsbericht der Ruhrkohle Oel und Gas GmbH

Rullkötter J. (1987): Organic Geochemistry. In: The Encyclopedia of Physical Science and Technology (Meyers, R.A., ed.), Vol. 6 Academic Press, Orlando 53-77

Scalbert A., Monties B. Lallemand J.Y., Guittet E. and Roland C. (1985): Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24, 1359-1362.

- Sadowsky M.J. and Graham P.H. (2004):** The root and stem nodule bacteria of legumes. In: The Prokaryotes. An evolving electronic resource for the Microbiological Community. Springer, New York.
- Scheel T., Höfer M., Ludwig S. and Hölker U. (2000):** Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 54, 686-691
- Schlee D. and Kleber H.-P. (1991):** Wörterbuch der Biotechnologie in zwei Bänden. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Schlegel H.G. (1992):** Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart pp 464-469
- Schoell M. (1983):** Genetic Characterization of Natural Gases. *Bull. Am. Assoc. Petr. Geol.*, 67, 2225-2238.
- Schulten H.R. and Schnitzer M. (1993):** A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften* 80, 29-30
- Schwarz A. & Famulok M. (2001):** Aptamere und Ribozyme aus kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliotheken. *Biospektrum* 7, 111-114.
- Schwienhorst A. (1998):** Evolutive Methoden im Enzymdesign. *Biospektrum* 02/98
- Seelig B., Keiper S. Stuhlmann F. and Jäschke A. (2000):** Enantioselective ribozyme catalysis of a bimolecular cycloaddition reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 4576-4579.
- Singer M. und Berg P. (1992):** Größe und Gestalt von Proteinen. In: Singer M. und Berg P. (Hrsg.): Gene und Genome. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Smiley J. and Jones M. (1992):** A unique catalytic and inhibitor-binding role for Lys93 of yeast orotidylate decarboxylase. *Biochemistry* 31, 12162-12168
- Smith M. R. (1990):** The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* 1, 191-206
- Smith K.S. and Ferry J.G. (2000):** Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Revs.* 24, 335-366
- Smith D.B. and Johnson K.S. (1988):** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Glutathion-S-Transferase. *Gene* 67, 31-40
- Snellman E. A., Sullivan E. R. and Colwell R. R. (2002):** Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter sp.* RAG-1. *FEBS J.* 269, 5771-5779
- Stanier R.Y. and Ornston L.N. (1973):** The β -keto adipate pathway. *Adv. Microbial Physiol.* 9, 89-149
- Steinbach G. (Hrsg.) 1982:** Die farbigen Naturführer: Mineralien. Mosaik Verlag, München

Steinbüchel A. and Fuchtenbusch A. (1997): PHA from coal? In: Ziegler et al. (Hrsg.): Proceedings of the 9th International Conference on Coal Sciences, 7-12 September 1997, Essen, vol. III P&W, Essen pp 1673-1676

Strandberg G.W. and Lewis S.N. (1987): The solubilization of coal by an extracellular product from *Streptomyces setonii* 75Vi2. J. Ind. Microbiol. 1, 371-376

Suelter C. (1990): Experimentelle Enzymologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Taylor B.F. and Ribbons D.W. (1983): Bacterial Decarboxylation of *o*-Phthalic Acids. Appl. Env. Microbiol. 46, 1276–1281

Theil F. (1997): Enzyme in der organischen Synthese. Spektrum Akademischer Verlag.

Verband der Elektrizitätswirtschaft, 2005: Strom-Daten. Herausgeber: Verband der Elektrizitätswirtschaft – VDEW– e.V.

Voet D. and Voet J.G. (2005): Biochemistry. 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York

Warburg O. and Christian W. (1941): Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. Biochem. Z. 310, 384-421

Wender I., Heredy L.A., Neuworth M.B. and Dryden I.G.C. (1981): Chemical Reactions and the Constitution of Coal. In Elliott, M.A., ed., Chemistry of Coal Utilization, Second Supplementary Volume: New York, John Wiley and Sons, Inc., p. 425-495.

Westermann B. (2003): Organokatalyse – die Suche nach dem kleinsten Enzym. Nachrichten aus der Chemie 51, 802-805

Willmann G. (1989): Untersuchungen zum Mechanismus der Braunkohleverflüssigung durch Mikroorganismen. Diplomarbeit, Universität Bonn

Willmann G. (1994): Abbau und Verwertung von verschiedenen Braunkohlen durch Pilze und Bakterien: Charakterisierung der Mikroorganismen und deren Abbauprodukte. Dissertation, Universität Bonn

Willmann G. and Fakoussa R.M. (1991): Liquefaction/Solubilization of brown coal by a fungus. In: Reuss M. et al. (Hrsg.) Biochemical engineering/Fischer Verlag, Stuttgart, pp 429-432

Willmann G. and Fakoussa R.M. (1992): Investigations into the bioconversion of brown coal. Poster, Frühjahrstagung der VAAM und DGHM, P 324

Willmann G. (1994): Abbau und Verwertung von verschiedenen Braunkohlen durch Pilze und Bakterien: Charakterisierung der Mikroorganismen und Abbauprodukte. Dissertation, Universität Bonn

Willmann G. and Fakoussa R.M. (1997a): Biological bleaching of water-soluble coal macromolecules by a basidiomycete strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 95-101

- Willmann G. and Fakoussa R.M. (1997b):** Extracellular oxidative enzymes of coal-attacking fungi. *Fuel Process. Technol.* 52, 27-41
- Wolfe M.D., Altier D.J., Stubna A., Popescu C.V., Munck E. and Lipscomb J.D. (2002):** Benzoate-1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida*: single turnover kinetics and regulation of a two-component Rieske dioxygenase. *Biochemistry* 40, 9611-9626.
- Wondrack L., Szanto M. and Wood W.A. (1989):** Depolymerization of water soluble coal polymer from subbituminous coal and lignite by lignin peroxidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20/21, 765-780
- Wood W.I. (1976):** Tables for the preparation of ammonium sulfate solutions. *Anal. Biochem. Anal. Biochem.* 73, 250-257.
- Wu R. and Grossmann L. (Hrsg.) 1987:** Expression vectors. In: *Methods in Enzymology* 153, pp 385-563
- Wu N., Mo Y., Gao J. and Pai E.F. (2000):** Electrostatic stress in catalysis: Structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase. *Biochemistry* 97, 2017-2022
- Yamamoto S., Katagiri M., Maeno H. and Hayaishi, O. (1965):** Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide. I. Purification and general properties. *J. Biol. Chem.* 240, 3408-3413.
- Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A. and Sawada H. (2001):** A revision of the genus *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 89-103.
- Young J.M. (2003):** The genus name *Ensifer* takes priority over *Sinorhizobium*, and *Sinorhizobium morelense* is a later synonym of *Ensifer adhaerens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 2107-2110.
- Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A. and Sawada H. (2003):** Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1689-1695.
- Zeida M., Wieser M., Toyokazu Yoshida T., Tsuyoshi Sugio T. and Nagasawa T. (1998):** Purification and Characterization of Gallic Acid Decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71. *Appl. Env. Microbiol.* 64, 4743-4747

Anhang

1. Profile der zellulären Fettsäuren (DSMZ)

1.1 LFG19a (*Sinorhizobium morelense*/*Ensifer adhaerens*)

Sample ID: UN-V-05-1060-LFG19a-FAKOUSSA

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.847	3.521E+8	0.027	----	7.024	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.945	6206	0.022	----	7.218		----	< min rt	
2.034	321	0.013	----	7.395		----	< min rt	
3.991	659	0.027	1.119	10.917	Sum In Feature 2	0.39	ECL deviates 0.003	12:0 ALDE ?
6.046	498	0.033	1.027	12.931	13:1 AT 12-13	0.27	ECL deviates -0.005	
8.700	382	0.034	----	14.776		----		
8.970	686	0.035	0.967	14.950	unknown 14.959	0.35	ECL deviates -0.009	
9.853	11041	0.043	0.955	15.482	Sum In Feature 2	5.62	ECL deviates 0.002	16:1 ISO I/14:0 3OH
10.411	6644	0.043	0.948	15.816	Sum In Feature 3	3.36	ECL deviates -0.006	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.719	12973	0.042	0.945	16.000	16:0	6.54	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
11.586	853	0.045	0.936	16.498	15:0 3OH	0.43	ECL deviates -0.005	
12.094	1144	0.045	0.931	16.790	17:1 w8c	0.57	ECL deviates -0.002	
12.459	1811	0.040	0.928	17.000	17:0	0.90	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
13.368	3712	0.045	0.921	17.514	16:0 3OH	1.82	ECL deviates -0.005	
13.915	146356	0.047	0.917	17.823	18:1 w7c	71.61	ECL deviates 0.000	
14.228	6856	0.046	0.915	18.000	18:0	3.35	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
14.370	4551	0.045	0.914	18.081	11 methyl 18:1 w7c	2.22	ECL deviates 0.000	
15.162	669	0.043	0.909	18.531	17:0 3OH	0.32	ECL deviates -0.005	
15.622	554	0.042	----	18.792		----		
16.606	1778	0.048	0.900	19.355	19:0 10 methyl	0.85	ECL deviates -0.013	
16.934	2903	0.050	0.898	19.544	18:0 3OH	1.39	ECL deviates -0.006	
----	11700	----	----	----	Summed Feature 2	6.02	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	----	----	----	----	----	----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	6644	----	----	----	Summed Feature 3	3.36	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0.005

Total Response: 204070

Percent Named: 99.54%

Reference ECL Shift: 0.003

Total Named: 203135

Total Amount: 187453

Number Reference Peaks: 3

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0.490	Rhizobium-radiobacter (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
	0.436	Roseomonas-fauriae
	0.429	Zoogloea-ramigera
	0.353	Gluconobacter-asaii/cerinus/oxydans
	0.339	Phyllobacterium-myrsinacearum
	0.332	Sphingomonas-paucimobilis (<i>Pseudomonas paucimobilis</i>)
	0.327	Rhizobium-rubi (<i>Agrobacterium</i>)
	0.308	Phyllobacterium-rubiacearum

1.2 E.1 (*Paracoccus spec.*)

Sherlock Version: 3.10

DATA:E00823489A 24-AUG-00 07:54:06

ID: 25120 UN-V-00-487-E/1-UNI BONN Date of run: 23-AUG-00 13:44:01
 Bottle: 11 SAMPLE [TSBA40]

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.919	327733248	0.029	7.128	SOLVENT PEAK	< min rt	
2.083	496	0.022	7.498	< min rt	
2.151	824	0.028	7.651	< min rt	
4.184	2976	0.029	11.447		
4.495	2448	0.029	11.822		
8.880	1040	0.052	15.274		
9.221	2776	0.046	0.953	15.487	Sum In Feature 2	3.67	ECL deviates -0.001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10.046	5800	0.050	0.947	16.000	16:0	7.62	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
13.141	66312	0.046	0.935	17.821	18:1 w7c	86.04	ECL deviates -0.002	
13.450	2056	0.055	0.935	18.000	18:0	2.67	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
*****	2776	SUMMED FEATURE 2	3.67	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
*****	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
327733248	83408	76944	92.25	72066	2	0.001	0.002

TSBA40 [Rev 4.10]	Paracoccus	0.781
	P. denitrificans*	0.781
	Methylobacterium	0.659 (48h)
	M. organophilum*	0.659 (48h)
	M. zatmanii	0.615 (48h)
	M. radiotolerans*	0.590 (48h, Pseudomonas radiora)

1.3 „Artern“ (vorgeschlagener Name: *Kekulea arternensis*)

Sample ID: UN-V-02-1142-FAKOUSSA

Profile:

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.709	2.328E+8	0.026	---	7.035	SOLVENT PEAK	---	< min rt	
1.812	20825	0.022	---	7.224		---	< min rt	
1.914	5049	0.020	---	7.412		---	< min rt	
1.996	519	0.025	---	7.562		---	< min rt	
5.053	430	0.033	1.123	12.000	12:0	0.22	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
10.128	15491	0.045	0.947	15.486	Sum In Feature 2	6.77	ECL deviates -0.002	14:0 3OH/16:1 ISO I
10.693	2356	0.049	0.935	15.817	Sum In Feature 3	1.02	ECL deviates -0.005	16:1 w7c/15 iso 2OH
11.005	3897	0.045	0.929	16.000	16:0	1.67	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
12.416	1027	0.064	0.904	16.801	17:1 w8c	0.43	ECL deviates 0.009	
13.687	766	0.052	0.884	17.517	16:0 3OH	0.31	ECL deviates -0.002	
13.846	3282	0.050	---	17.606		---		
14.124	1705	0.043	0.878	17.762	18:1 w9c	0.69	ECL deviates -0.007	
14.238	196939	0.046	0.877	17.826	18:1 w7c	79.69	ECL deviates 0.003	
14.548	10614	0.048	0.873	18.000	18:0	4.27	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
14.690	2794	0.051	0.871	18.081	11 methyl 18:1 w7c	1.12	ECL deviates 0.000	
16.945	1814	0.045	0.845	19.364	19:0 10 methyl	0.71	ECL deviates -0.004	
17.268	6026	0.050	0.842	19.548	18:0 3OH	2.34	ECL deviates -0.002	
17.763	1972	0.050	0.837	19.832	20:1 w7c	0.76	ECL deviates 0.001	
19.268	202	0.049	---	20.697		---	> max rt	
19.555	5684	0.031	---	20.861		---	> max rt	
19.701	1295	0.058	---	20.945		---	> max rt	
19.797	235	0.041	---	21.000		---	> max rt	
---	15491	---	---	---	Summed Feature 2	6.77	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
---	---	---	---	---	---	---	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
---	2356	---	---	---	Summed Feature 3	1.02	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0.004

Reference ECL Shift: 0.001

Number Reference Peaks: 3

Total Response: 249113

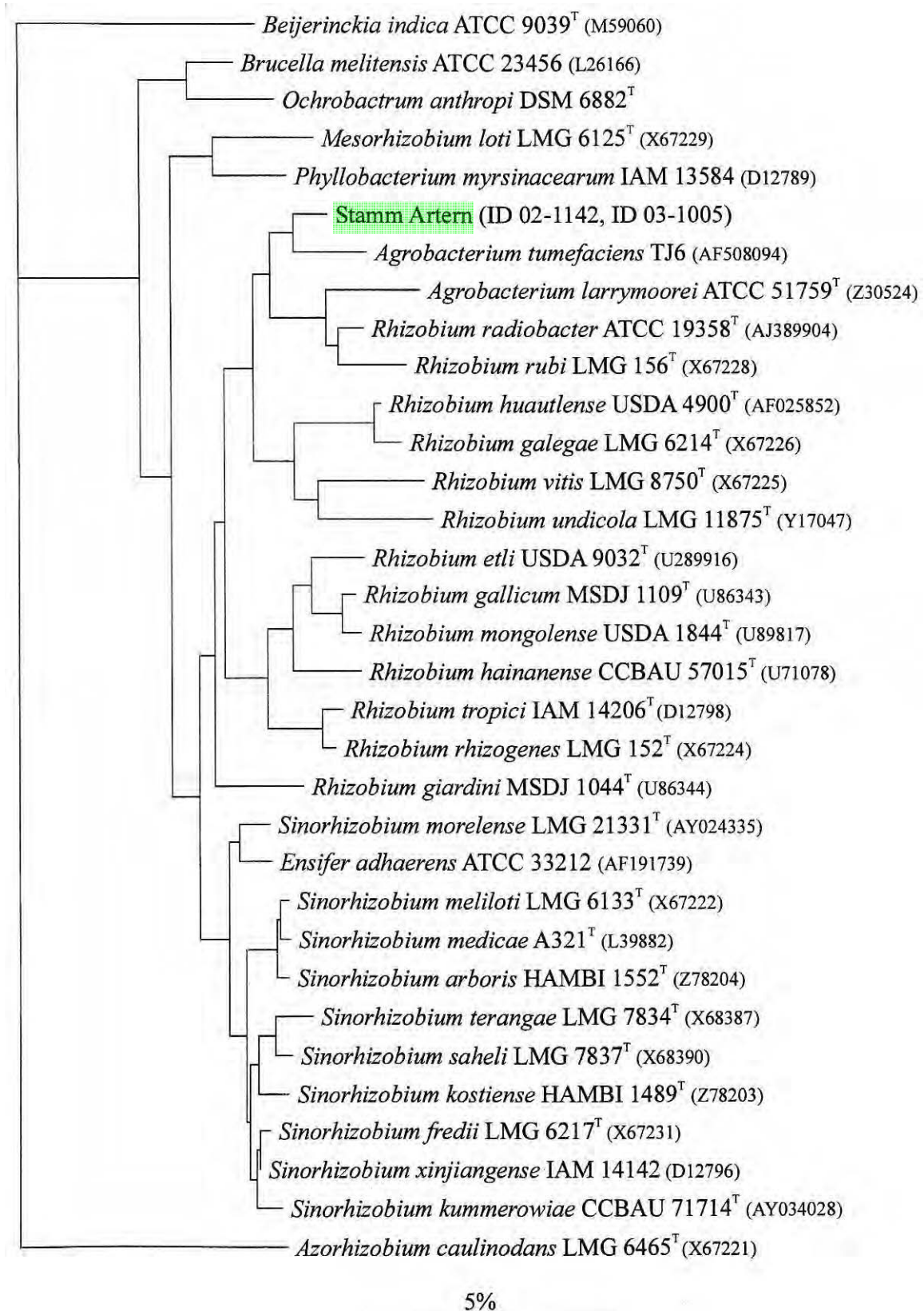
Total Named: 245831

Percent Named: 98.68%

Total Amount: 216728

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA40 4.10	0.418	Methylobacterium-organophilum* (48h)
	0.338	Methylobacterium-zatmanii (48h)
	0.300	Paracoccus-denitrificans*
	0.254	Methylobacterium-extorquens* (48h, Protomonas extorquens)
	0.225	Methylobacterium-fujisawaense* (48h)



Phylogenetische Einordnung des Stammes „Artern“ aufgrund vergleichender 16S-rRNA-Sequenzanalyse. Bei dem gemäß 16S-rRNA ähnlichsten *Agrobacterium tumefaciens*-Isolat handelt es sich nicht um einen Typenstamm, so daß dieses Bakterium nicht als der nächste Verwandte anzusehen ist (Dr. Tindall/DSMZ, persönliche Mitteilung).

3. pKs-Werte der Benzencarbonsäuren

BCS	pKs1	pKs2	pKs3	pKs4	pKs5	pKs6
Mellitsäure	2,08	2,46	3,24	4,44	5,50	6,59
Benzenpentacarbonsäure	2,34	2,95	3,94	5,07	6,25	-
Pyromellitsäure	2,43	3,13	4,44	5,61	-	-
Benzen-1,2,3-tricarbonsäure	2,98	4,25	5,87	-	-	-
Benzen-1,2,4-tricarbonsäure	2,40	3,71	5,01	-	-	-
Benzen-1,3,5-tricarbonsäure	3,16	3,98	4,85	-	-	-
Phtalsäure	2,89	5,51	-	-	-	-
Isophtalsäure	3,54	4,60	-	-	-	-
Terephtalsäure	3,51	4,82	-	-	-	-
Benzoessäure	4,20	-	-	-	-	-

Tabelle zusammengestellt nach PETRIK Library, 2004, Fieser u. Fieser, 1968 sowie CRC-Handbook of Chemistry and Physics, 1992.

Danksagung

Herrn PD Dr. René M. Fakoussa danke ich besonders herzlich für die Überlassung des fesselnden Themas, sein großes Interesse an der Bearbeitung desselben und die Ansprechbarkeit zu allen Tages- und Nachtzeiten trotz schwerer chronischer Erkrankung sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts. Überaus verbunden bin ich ihm darüber hinaus für das Vorleben wissenschaftlicher Neugier, die moralische Unterstützung, die Beibehaltung des Humors, kurz: Die Beachtung der menschlichen Komponente.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Hans-Georg Trüper bin ich für die Übernahme des Korreferates, das fortlaufende Interesse insbesondere am phylogenetischen Teil meiner Arbeit und die Erstellung mehrerer fachlicher und persönlicher Gutachten außerordentlich dankbar.

Der Graduiertenförderung des Landes Nordrhein-Westfalen danke ich für ein Stipendium, welches die Finanzierung dieser Arbeit über 2 ½ Jahre ermöglichte. Darüber hinaus danke ich dem Land NRW für die Bereitstellung von Geräten aus dem Forschungsprojekt Kohle-Biotechnologie.

Bei allen Dozenten des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie bedanke ich mich für die Möglichkeit, in ihren Kursen als Betreuer fachliche, didaktische und pädagogische Erfahrungen sammeln zu dürfen. Hier möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. Jobst-Heinrich Klemme hervorheben, der es mir ermöglichte, meinen wissenschaftlichen Kenntnisstand um molekulargenetische Arbeitstechniken sowie die Arbeit mit anoxygenen phototrophen Bakterien zu erweitern, und der mir darüber hinaus vorlebte, wie man sich in der Lehre engagieren kann.

Herrn Prof. Dr. Erwin A. Galinski danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Gelegenheit, im Rahmen des internationalen Studienganges „Master of Biotechnology“ selbst ein Versuchsprogramm für den Kurs „Enzyme Technology“ konzipieren und Erfahrung als Kursleiter sammeln zu können.

Den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Erwin Galinski und Frau PD Dr. Christiane Dahl bin ich für das „Geräte-Sharing“ und den gegenseitigen wissenschaftlichen Austausch ausgesprochen dankbar. Insbesondere danke ich Frau Dr. Yvonne Lübke und Herrn Dr. Daniel Burdziak für die fruchtbaren Diskussionen über Proteinreinigung, Gelelektrophoresen und Aktivitätsfärbung von Enzymen.

Ein großes Dankeschön geht in diesem Zusammenhang auch an Frau Marlene Stein für die Einführung in das Infrarotspektrometer sowie das permanente Versprühen von Tatendrang und guter Laune, außerdem an Frau Dipl.-Biol. Elisabeth Witt für die schöne Aufnahme des Bakterienstammes *LFG19a*.

Bei Herrn Dr. Daniel Goebel von der RheinEnergie AG bedanke ich mich für die kompetente Beratung bezüglich energiewirtschaftlicher Grundsatzfragen, die mir einen Eindruck von der potentiellen Bedeutung der Kohlebiotechnologie vermittelte.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie sowie der Abteilungen Lebensmittel-Mikrobiologie und Pharmazeutische Mikrobiologie (insbesondere Frau Dipl.-Biol. Sonja Burak) danke ich ganz besonders herzlich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die mich häufig die Tatsache vergessen ließ, daß meine Arbeitsgruppe über weite Strecken im Grunde eine „Ich-AG“ darstellte. Vor allem danke ich diesbezüglich der „AG Burdziak“ und Herrn Elmar Kopp für die gemeinsame Après-Forschung (und Frau Birgit Amendt für die Beseitigung der Folgen...).

Nicht missen möchte ich dabei auch die ständig wechselnde Besetzung des „Biotech-Quartetts bis -Oktetts“, die mir bei meinen Bemühungen geholfen hat, stets den richtigen Ton zu treffen.

Last not least ein großes finales Danke! an alle, die in den vergangenen Jahren für mich da waren: Meine Eltern, die Turnfamilie (*mens sana in corpore sano*), Alex und Sierk (Sonderforschungsbereich Schwermetall-Influx), Lutz und Tim (ohne Euch hätte ich die Arbeit wahrscheinlich handschriftlich eingereicht) und natürlich Birgit, ohne die gar nichts gegangen wäre; neben den zahllosen anderen Dingen, deren Aufzählung diese Danksagung länger als die eigentliche Arbeit werden ließe, danke ich Dir vor allem für Dein Verständnis für die Notwendigkeit flexibler Arbeitszeiten – chemotrophe Bakterien haben nun mal keinen circadianen Rhythmus.

Vielen Dank Ihnen und Euch allen!

Lebenslauf

Name: Jens Rudat
Geburtsdatum: 1975
Geburtsort: Haltern/Westf.

Schulische Ausbildung

1981-1985 Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Sieglar in Troisdorf
1985-1994 Besuch des Städtischen Gymnasiums „Zum Altenforst“ in Troisdorf;
Abitur am 31. Mai 1994

Wehrdienst

1994-1995 Grundwehrdienst bei Nachschubkompanie/Sicherungs- und
Versorgungsregiment im Bundesministerium der Verteidigung

Hochschulausbildung und wissenschaftliche Tätigkeiten

1995-2000 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn

1999 Mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie
(Hauptfach), Genetik und Biochemie

1999-2000 Anfertigung der Diplomarbeit bei Herrn PD Dr. René M. Fakoussa im
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie mit dem Thema:
„Screening nach höhere Benzencarbonsäuren decarboxylierenden
Bodenbakterien sowie vergleichende mikrobiologische und
biochemische Charakterisierung dieser Organismen bzw. der
zugehörigen Enzyme.“
Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen an der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn am 28.
September 2000

seit April 2001 Promotionsstudium bei Herrn PD Dr. René M. Fakoussa

04/2001-09/2003 Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Nordrhein-Westfalen

11/2000-10/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie und
Biotechnologie

seit 11/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie und
Biotechnologie