

D478

DE KARAKTERISATIE VAN HET PHENYLALANINE-DEHYDROGENASE VAN
NOCARDIA SP. 239

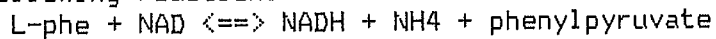
door: Marion van Rijssel

Docteraal verslag: microbiële fysiologie
juli 1986 - feb. 1987
begeleiding: drs L. de Boer
dr L. Dijkhuizen
studieleider: prof dr W. Harder

Rijksuniversiteit Groningen
Bibliotheek Biologisch Centrum
Kerklaan 30 — Postbus 14
9750 AA HAREN

Summary

The inducible catabolic enzyme L-phenylalanine dehydrogenase of *Nocardia* sp. 239 was found to be a NAD dependent enzyme, which catalyses the following reaction:



The pK of this reaction was 17.5, indicating the equilibrium of the reaction to be on the amino acid side. Parahydroxy-phenylpyruvate turned out to be also a substrate for the enzyme, in contrast to D-phenylalanine.

The L-phenylalanine dehydrogenase is a monomer of 42000 Dalton, with a temperature optimum of 50 C and an optimum pH of 10 for the aminating reaction.

The enzyme could be induced by no amino acid other than L- or D-phenylalanine. Growth rate and specific activity were higher by growth on D-phenylalanine than on L-phenylalanine. The enzymes induced by L-phe or D-phe were comparable in affinity, size and behaviour. Therefore a racemase is postulated for growth on D-phenylalanine.

Cofactor regeneration with alcohol-dehydrogenase (AdH) was possible but because of instability of both the AdH and L-phedH the production rate of L-phenylalanine was limited being 5 g/l.h. Conversion of phenylpyruvate was 96%. Maximum activity of the partially purified enzyme was found to be 7.5 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$.

INHOUDSOPGAVE

	blz
HOOFDSTUK 1 INLEIDING	2
1.1 Inleiding	2
1.2 De biosynthese van phenylalanine	2
1.3 Het katabolisme van phenylalanine	3
1.4 De productie van phenylalanine	3
1.5 Doel van dit onderzoek	4
HOOFDSTUK 2 MATERIAAL & METHODEN	6
2.1 De bereiding van celvrij extract	6
2.2 Assays	7
2.3 Zuiveringsmethoden	9
2.4 Bepaling van het molecuulgewicht	10
2.5 Enzymkinetiek	11
2.6 Cofactorregenerering	12
HOOFDSTUK 3 RESULTATEN	13
3.1 Eigenschappen van het phenylalaninedehydrogenase bepaald aan celvrij extract	13
3.2 De Partiële zuivering	15
3.3 Enzymkinetiek	17
3.4 Het door D-phenylalanine geïnduceerde enzym	17
3.5 Cofactorregenerering	18
HOOFDSTUK 4 DISCUSSIE	20
LITERATUURLIJST	22

HOOFDSTUK 1 INLEIDING

1.1 Inleiding

De laatste jaren is de belangstelling voor het essentiële aminozuur phenylalanine toegenomen. De voornaamste oorzaak hiervoor is de vergrote vraag naar phenylalanine voor de productie van de zoetstof aspartaam. (Cosby 1976).

Aspartaam is een zoetstof die 100 tot 150 maal zoeter is dan sucrose. De systematische naam van het molecuul is L-aspartyl-L-phenylalanine-metylester (zie figuur 1). Het is niet mogelijk om het stereoisomeer D-phenylalanine als grondstof te gebruiken omdat deze juist een heel bitter product geeft.

Allereerst zal ingegaan worden op de algemene biosynthetische en katabole routes zoals die beschreven staan in de literatuur. Vervolgens worden de bekende productie methoden voor L-phenylalanine (L-phe.) besproken en daarna zal worden beschreven hoe de biosynthese en het katabolisme van phenylalanine in Nocardia sp. 239 verloopt.

1.2 De biosynthese van phenylalanine

De aromatische aminozuren tryptofaan, phenylalanine en tyrosine hebben een gemeenschappelijk deel met de algemene route naar andere aromatische componenten zoals tetrahydrofolaat en enterocheline. Deze route staat wel bekend onder de naam "common aromatic pathway" of "shikimaat route" (Hermann 1983, figuur 2)

In de eerste stap wordt uit erythrose-4-fosfaat en fosfoenolpyruvaat met behulp van DAHP-synthase, 3-desoxydarabino-heptulosonaat-7-fosfaat gesynthetiseerd. In veel gevallen wordt deze omzetting feedback gereguleerd door de drie aromatische aminozuren, die ieder op een verschillend isoenzym aangrijpen (Escherichia coli, Klebsiella, Salmonella e.a.) .Bij Bacillus subtilis vindt feedback regulatie op het enkele DAHP-synthase door chorismaat en pefenaat plaats. Shikimaat, één van de 5 intermediären die vooraf gaan aan chorismaat, lijkt een aftakpunt te zijn vanwaar een route naar andere aromatische verbindingen begint (Weiss & Edwards 1980). Het is vaak zo dat de repressie door tryptofaan op het trp-gevoelige isoenzym niet volledig is zodat een bepaalde koolstof flow in de richting van deze componenten gewaarborgd blijft (Pittard 1969).

Chorismaat is zowel het eindpunt van de shikimaat route, als het begin van de routes naar de drie afzonderlijke aromatische aminozuren. Ook hier treedt eindproduct remming op.

Er zijn twee routes vanuit chorismaat naar phenylalanine bekend (fig 3). De eerste route verloopt via fenylpyruvaat, deze route is gevonden bij E.coli, B.subtillis e.a. De tweede route die aangetroffen wordt bij cyanobacteriën en Pseudomonas start met een aminatie, waarbij arogeaat wordt gevormd, waarna d.m.v. dehydratatie phenylalanine wordt gevormd. Ook hier treedt eindproduct remming van beide enzymen op (Garner & Hermann 1983).

1.3 het katabolisme van phenylalanine .

De meest voorkomende route, zoals die in Stryer (1975) wordt gegeven, heeft als eerste omzetting de hydroxylatie van fenylpyruvaat naar tyrosine. Dit is tevens de stap waardoor de meeste organismen in staat zijn om vanuit het ene essentiële a.z. het andere te synthetiseren. Tyrosine op zijn beurt wordt omgezet in B-hydroxyfenylpyruvaat waarna via homogentisaat en 4-malenylacetoacetaat, fumaraat en acetoacetaat ontstaat.

Het katabolisme van fenylpyruvaat in Aspargillus niger verloopt niet via tyrosine maar via fenylpyruvaat naar homogentisaat. Opvallend hierbij is dat bij groei op D-phenylalanine een apart enzym de omzetting naar fenylpyruvaat verzorgt (Kishore 1976). In Streptomyces verloopt het katabolisme van L-phenylalanine ook via B-hydroxyfenylpyruvaat (Pometto & Crawford 1985)

In veel gevallen wordt de omzetting van phenylalanine naar fenylpyruvaat gekatalyseerd door een aromatische aminotransferase (Asai 1959, ziehr & Kula 1985 e.a.). Onlangs is echter aangetoond dat het ook mogelijk is dat een phenylalanine-dehydrogenase de omzetting van phenylalanine naar fenylpyruvaat katalyseert. De eerste melding kwam van Hummel (1984) over Brevibacterium. Daarna is een short communication verschenen over een opgezuiverd phenylalanine-dehydrogenase uit Sporosarcina (Asano 1985). Ook is melding gemaakt van een phenylalanine-dehydrogenase in Rhodococcus DSM 3041 en 3040 (Luchtenberger in prep).

1.4 De productie van phenylalanine

In het algemeen worden twee verschillende benaderingen gebruikt om tot productie van primaire metabolieten te komen. Deze voor groei benodigde stoffen worden normaliter niet uitgescheiden, zodat er naar gestreefd wordt om door overproductie in het organisme, uitscheiding te bewerkstelligen (Nakayama 1976).

Het is mogelijk om mutanten te selecteren die auxotroof zijn voor een verbinding die op het eind staat van een aftakking van de route naar het gewenste product. Wanneer deze auxotrofie berust op het missen van het eerste enzym van de aftakking, ontstaat geen ophoping van ongewenste intermediären maar wel een vergrote koolstofstroom richting gewenst eindproduct (bijvoorbeeld doordat de feedback remming op sleutel-enzymen vermindert). De verbinding waarvoor de auxotrofie geldt moet wel altijd aan het medium toegevoegd worden in lage niet remmende concentraties.

Het is ook mogelijk om m.b.v. eindproduct-analogen regulatie-mutanten te verkrijgen. Deze mutanten zijn minder gevoelig voor feedback remming waardoor overproductie mogelijk kan worden.

Met behulp van bovenstaande technieken is al een aantal malen d.m.v. fermentatie tot overproductie van L-phe gekomen (zie tabel 1).

De tweede benadering is niet de fermentatie maar de gerichte omzetting van de ene verbinding naar de andere. Deze zogenaamde bioconversies worden veel gebruikt omdat ze hoge specificiteit en een hoge opbrengst hebben. Voor de productie van phenylalanine zijn verschillende bioconversies bekend die gebruik maken van hele cellen of van (voor)gezuiverde enzympreparaten.

De omzetting van acetamidocinnemaat naar L-phenylalanine kan gekatalyseerd worden door Alcaligenes faecalis S7 en Bacillus sphaericus. (Nakamichi et al 1984). Een soortgelijke omzetting van transcinnemaat met behulp van Rhodotorula glutinis wordt al op grote schaal toegepast (Yamada et al 1981). Fenylypyruvaat kan als precursor gebruikt worden wanneer het organisme een aromatische aminotransferase bezit zoals dat het geval is bij E. coli en Pseudomonas putida (Asai 1959, Ziehr en Kula 1985). Op kleine schaal is ook al geëxperimenteerd met het L-phedH van Brevibacterium en Rhodococcus, waarbij gebruik wordt gemaakt van cofactor regenerering (Hummel 1986, Luchtenberger in prep.)

1.5 Doel van dit onderzoek.

Voor onderzoek aan het metabolisme van aromatische aminozuren, in het bijzonder L-phenylalanine, is als onderzoeksorganisme gekozen voor Nocardia sp. 239 (voorheen Streptomyces sp. 239). Nocardia sp. 239 is geïsoleerd uit een grondmonster van Nieuw Guinea (Kato 1975). Er zijn verschillende gegevens over de fysiologie van het organisme bekend.

Het genus Nocardia maakt onderdeel uit van de groep actinomyceten. Een van de beschrijvingen van actinomyceten werd gegeven door Gottlieb (1973); "Bacteria that tend to form branching filaments which in some families develop into a mycelium". Het filamenteuze voorkomen van een actinomyceet wordt duidelijk geïllustreerd in figuur 4a, terwijl de variabiliteit tot uitdrukking komt in figuur 4b.

Nocardia sp. 239 is in staat om op methanol als enige koolstof en energiebron te groeien m.b.v. de Rump-cyclus (Hazeu 1983, Kato et al 1975a & b). Verder bleek groei op te treden op L-phenylalanine en D-phenylalanine als koolstof en energiebron (De Boer et al 1986). Daarnaast is ook groei mogelijk op de substraten glucose, sorbitol en dextrose (Hutter 1986 personal communication).

Bij onderzoek naar de synthese van aromatische aminozuren is met behulp van b.o.m. metingen aan gewassen celsuspensies, en enzymassays aan celvrij extract(c.v.e.) aangetoond dat Nocardia gebruik maakt van de prephenaat-route. Verder bleek het organisme naast een aromatisch aminotransferase over een induceerbaar phenylalanine dehydrogenase te beschikken (De Boer et al 1986).

Met behulp van di-epoxyoctaan zijn diverse mutanten verkregen waaronder één die geen L-phedH meer bezit. Groei bleek, welliswaar gereduceerd, toch mogelijk doordat het aminotransferase het L-phe kon omzetten. Met behulp van

deze mutatie-methode en het gebruik van aminozuur-analogen wordt gezocht naar een organisme met overproducerende capaciteit.

Dit onderdeel van de studie is opgezet om meer te weten te komen over het phenylalaninedehydrogenase van Nocardia sp. 239. (Interessant hierbij is de mogelijkheid om dit enzym te gebruiken voor de bioconversie van phenylpyruvaat naar L-phenylalanine).

HOOFDSTUK 2 MATERIAAL EN METHODEN.

2.1. De bereiding van ruw celvrij extract.

Nocardia sp. 239 werd gekweekt bij 37 graden Celcius en pH 7.0. Er werd steeds een standaard mineraal medium gebruikt waaraan een koolstof en energiebron toegevoegd werd. Deze koolstof en energiebron is L-phenylalanine in een concentratie van 8 mM. tenzij anders vermeld wordt. Het minerale medium heeft de volgende samenstelling (per liter) :

1.0 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.2 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
1.5 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
4.65 gr K_2HPO_4

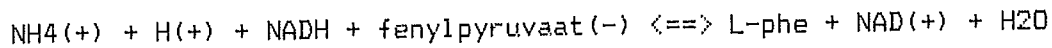
Nocardia heeft de neiging om aggregaten te vormen (ondanks incubatie met 200 rpm in de schudstoof). Het is daarom soms nodig om voor overenten de kweek even te laten bezinken. Als dat niet helpt kan een roestvrijstalen spiraal onderin de erlemeyer uitkomst bieden. Een andere eigenschap van *Nocardia* is dat temperatuursveranderingen de groeisnelheid kunnen beïnvloeden; de culture gaat snel in een korte lag-fase. Voorverwarmen van het kweekmedium is daarom noodzakelijk.

De groei van de culture kon vervolgd worden door bepaling van het verloop van de OD430 in de tijd (vitatron). Wanneer cellen logaritmisch groeiden kon celvrij extract (c.v.e.) gemaakt worden voor de bepaling van enzym-activiteit. De cellen werden geogst door tien minuten te centrifugeren bij 5000 rpm (Sorvall RC-5B). Vervolgens werd 3x gewassen om het groeimedium te verwijderen. In nagenoeg alle gevallen werd gewassen met 0.1 M TRIS\HCL buffer met pH 7.8. Vervolgens werden de cellen gesonificeerd (15 X 15 sec steeds gevolgd door 45 sec rust om verhitting tegen te gaan), waarna celresten afgedraaid werden (30 min 18000 rpm.).

Om steeds vergelijkbaar materiaal te hebben werd gekweekt in een 10 liter fermentor. Deze werd eerste keer tot de helft geogst en bijgevuld en de volgende dag geheel geogst. De cellen werden afgedraaid en gewassen maar niet gesonificeerd. Vervolgens werden de cellen, in kleine hoeveelheden, ingevroren in buffer. Wanneer na ontdooien de procedure voor het maken van c.v.e werd vervolgd zoals hierboven staat beschreven, onstond c.v.e. dat overeenkomstige specifieke activiteit had als vers c.v.e. Er trad dan geen verlies van sp.act. op zoals dat bij invriezen en ontdooien van c.v.e. het geval was.

2.2 Assays

Het enzym phenylalanine dehydrogenase (PhedH) katalyseert de volgende reactie;



Het is mogelijk om zowel de amineringsreactie als de deaminering te vervolgen. Beide assays vervolgen het ontstaan of verdwijnen van NADH bij 340 nm. Het standaard reactiemengsel voor bepaling van de aminerings-activiteit had de volgende samenstelling ;

200 ul 0.5 M TRIS/HCL pH 7.8
100 ul 3 mM NADH
100 ul 2M NH₄Cl
25 ul 0.1 M KCN, wanneer endogene NADH consumptie plaats vond
5 ul monster
100 ul 100 mM fenylypyruvaat (fp.)
500 ul H₂O

De componenten NH₄, NADH, fp, en natuurlijk het enzym zelf bleken alle onontbeerlijk voor de reactie. Het was daarom ook mogelijk om met ieder van deze stoffen de reactie te starten. Toevoeging van een extra hoeveelheid enzym gaf een evenredige toename in activiteit (zie fig. 5). De reactie werd in de regel gestart door toevoeging van fenylypyruvaat, omdat dan daarvoor de endogene NADH consumptie bepaald kon worden. De specifieke activiteit werd als volgt berekend ;

$$\text{sp. act} = \frac{\Delta E - \Delta E (\text{endogeen})}{4.9 * \text{conc. eiwit} * \text{vol. monster} * \text{tijd}}$$

waarin	sp. act.	in umol per miiligram per minuut
	ΔE	verandering in extinctie
	4.9	de molaire extinctie coëfficiënt gemeten voor 1 mM NADH .
	conc. eiwit	mg per ml.
	vol. monster	ml(!) toegevoegd monster,
	tijd	minuten.

Bij het deaminerings assay bestond het standaard reactiemengsel uit de volgende componenten ;

200 ul 0.5 TRIS/HCL pH 7.8
500 ul 3 mM NAD
10 ul monster
165 ul H₂O
25 ul 0.1 M KCN (indien endogene activiteit)
100 ul 80 mM L-phe

Ook hier gold dat zowel enzym als NAD, als L-phe de reactie konden starten. In de regel werd gestart met L-phe na bepaling van endogene NADH

productie. Het is gebleken dat D-phe de reactie niet kon starten maar dat parahydroxyfenylpyruvaat, de precursor van tyrosine, dit wel deed (in bijna gelijke mate als het L-phe zelf).

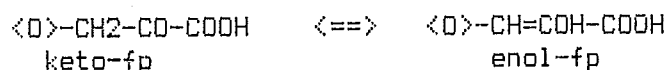
Voor het bepalen van de Eiwitconcentratie is de assay zoals die beschreven is door M. Bradford (1976) in dit onderzoek op twee gemodificeerde manieren toegepast.

De eerste methode werd gebruikt wanneer veel eiwit in het monster werd verwacht (b.v. in 50-100X verdund c.v.e.). Het monstervolume bedroeg 100 uL waaraan 3 ml Bradford reagens werd toegevoegd. Complexering van het eiwit met de Comassie kleurstof geeft een kleurverandering van rood naar blauw die bij 595 nm te meten is (single beam met reagens als blanco fig 6).

De tweede, gevoeligere, methode werd toegepast wanneer weinig eiwit verwacht werd (b.v. bij gezuiverde fracties). Hierbij werd aan 50 uL monster slechts 0.5 ml reagens toegevoegd, zodat het monstervolume klein was maar ook de verdunning door toevoegen van reagens 3 X zo klein was als bij bovenstaande methode (fig 7).

Beide methoden zijn getoetst met een oplossing van ong. 2 mg per ml bovine serum albumine (B.S.A. heeft een E280 van 0.682).

In sommige gevallen was het nodig om naast de NADH af- of toename ook een inzicht te krijgen in absolute concentraties van reagerende stoffen. Aanwezigheid van NAD in de diverse reactie-mengsels maakte het onmogelijk om de concentratie van phenyl-alanine m.b.v. een HPLC Bondapak kolom te bepalen. Het was wel goed mogelijk om de concentratie phenylpyruvaat te bepalen. De hier gebruikte methode is een modificatie van die van Cavallini & Stripe (1957). Deze methode is gebaseerd op het feit dat fp in zowel de enol- als de ketovorm kan voorkomen;



De combinatie van benzeenring en dubbele band in de enolvorm geeft een karakteristieke absorptie bij 318 nm. Fenylpyruvaat is in sterk basisch milieu bijna volledig in de enolvorm aanwezig (in 1 N loog). De concentratie range die gemeten kan worden is tussen 0 en 100 uM (fig 8). De methode is zeer gevoelig en specifiek. In dit onderzoek zijn de concentraties zo hoog dat steeds 10 uL toegevoegd werd aan 1 ml 1N loog (NaOH).

Er kleeft echter een nadeel aan deze methode n.l. de absorptie van NADH. Deze is welliswaar maximaal is bij 340 nm maar ook aanzienlijk bij 318 nm. Wanneer NADH aanwezig is moet als volgt te werk worden gegaan. Allereerst moeten de molaire extincties van fp en NADH bij de verschillende omstandigheden bepaald worden. Vervolgens moet van ieder monster de extinctie bij zowel 318 als 340 nm worden bepaald. Op deze manier ontstaat een stelsel van twee vergelijkingen met twee onbekenden die opgelost kan worden. Vaak blijkt het aandeel van fp in de extinctie bij 340 nm te verwaarlozen.

2.3. Zuiveringsmethoden

Zuiveren met behulp van een ammoniumprecipitatie maakt gebruik van het verschil tussen eiwitten, wat betreft de ionsterkte waarbij het eiwit neerslaat. Het precieze mechanisme is niet helemaal bekend, maar neerslag van eiwitten hangt niet alleen af van de concentratie ammoniumsulfaat maar ook van de incubatietijd bij die concentratie. De ammoniumprecipitatie is daardoor een moeilijk reproduceerbare methode.

In dit onderzoek is steeds gewerkt met 0.1M TRIS-buffer (pH 7.8) verzadigd met ammoniumsulfaat, die langzaam aan het monster werd toegevoegd tot een gewenste verzadiging was bereikt. Vervolgens werd drie kwartier geroerd bij 5 graden C. Het ontstane neerslag werd afgedraaid bij 18000 rpm gedurende een half uur. Het supernatant werd verder verzadigd en de pellet werd opgelost in buffer zonder ammoniumsulfaat. Deze opgeloste fractie bevatte nog wel veel ammonium waardoor stimulatie van het enzym kon optreden en binding aan een ionenwisselaar moeilijk werd. Daarom werd voor het opbrengen op een ionenwisselaar of het bepalen van enzymactiviteit altijd eerst een ontzouting met een G-25 kolom uitgevoerd (dialyse bleek grote activiteitsverliezen te geven).

Het is mogelijk om op grond van meer of mindere binding aan een ionenwisselaar scheiding van eiwitten te verkrijgen. Elutie met een vloeistof met oplopende ionsterkte, zorgt dat de electrostatische binding aan de kolom verbroken wordt. De ionsterkte waarbij dit gebeurt is per eiwit verschillend, zodat ook hier scheiding van eiwit optreedt. Er is onderzocht welke opzuivering mogelijk is met een DEAE sephacel ionenwisselaar. De gebruikte kolom had een bedvolume van 70 ml en een capaciteit overeenkomstig aan 11 gram albumine. De kolom werd gegenereerd en geequillibreerd in een koude kamer (5 graden C).

De mogelijkheid om eiwitten te scheiden op groote m.b.v gelfiltratie is onderzocht met een G-200 kolom. Met een G-200 kolom is het mogelijk om eiwitten met een molecuulgewicht tussen 5 en 600 kd te scheiden. De afgelegde weg van een groot molecuul is kleiner dan die van een kleiner molecuul waardoor de eiwitten op grootte geselecteerd worden. De hier gebruikte kolom had een volume van 25 ml.

Affiniteits chromatografie is een verzamelnaam voor methoden van chromatografie die meer specifiek scheiden dan op grootte of binding aan een ionenwisselaar. Er wordt gezocht naar een matrix die liganden bevat die waarschijnlijk een grote affiniteit hebben om aan het eiwit te binden. Bij zulke liganden moet b.v. gedacht worden aan substraten of effectoren. In dit geval is gekeken naar de mogelijkheid om gebruik te maken van L-phe liganden.

Door nog onbekende oorzaken werd op bovenstaande wijze niet voldoende zuivering bereikt. De FPLC heeft de mogelijkheid om in zeer korte tijd gewenste fracties te verkrijgen. Het principe van het apparaat is dat het onder lage druk monsters over (verwisselbare) kolommen kan leiden. Het is daarnaast een apparaat wat erg nauwkeurig afstelbaar is wat de reproduceerbaarheid van diverse runs vergroot. De capaciteit van de bijbehorende

kolommen is slechts 5-10 mg, maar voor studies aan het enzym is dit ruim voldoende.

De superose FPLC kolom is een gelfiltratiekolom die moleculen scheidt van 5-5000 kd. Deze kolom heeft een volume van 25 ml. De meest optimale elutiesnelheid is 0.3 ml per minuut, de maximaal toelaatbare druk is 1.5 mp. Ook hier werden standaard fracties van 0.5 ml opgevangen.

De FPLC ionenwisselaar die gebruikt is, is de mono Q kolom. De loopsnelheid bedroeg 1 ml per minuut en het zoutgradient liep in concentratie op van 0 tot 300 mM NaCl. De capaciteit van de kolom ligt rond 10 mg. eiwit. De maximaal toelaatbare druk is 5 mp (voor verdere informatie omtrent het gebruik van de FPLC verwijs ik naar de handleiding van N. Arfman.)

2.4 Bepaling van het molecuulgewicht.

In dit onderzoek is gebruik gemaakt van SDS/PAA electroforese om het molecuulgewicht van het enzym te bepalen en de verschillende zuiveringstappen te vervolgen. Er is steeds gewerkt met 10% gelen zoals die beschreven staan in de handleiding van biochemie. De gel werd na electroforese gekleurd met comassie brilliant blue en gefixeerd en ontkleurd met 10% azijnzuur. Het gebruikte ijkmengsel was het low molecular weight Bio-rad (85-0031) mengsel. Dit mengsel bevatte de volgende eiwitten;

Lyzosyme	14.4 kd
Soybean trypsin inhibitor	21.5 kd
Carbonic anhydrase	31 kd
Ovalbumine	45 kd
BSA	66.2 kd

De SDS/PAA gel is een denaturerende gel wat inhoud dat het molecuulgewicht van het actieve enzym niet met deze methode bepaald kan worden. Een gelfiltratie kolom zoals de superose kolom scheidt eiwitten op grootte, het moment (aantal ml. eluent) waarop het eiwit van de kolom komt staat in verhouding met de logaritme van het molecuulgewicht. Het is daarom mogelijk om m.b.v. een gelfiltratiekolom het molecuulgewicht van het actieve enzym te bepalen. Noodzaak is wel dat de betreffende kolom gelijkt kan worden met bekende eiwitten. Voor de ijking is het volgende eiwitmengsel gebruikt (ijklijn fig 9):

Thyroglobuline	670 kd
Gamma globuline	158 kd
Ovalbumine (chicken)	44 kd
Myoglobuline (horse)	17 kd
Vitamine B-12	1.4 kd

Volgens de firma Pharmacia moet de superosekolom ten alle tijden, ongeacht de buffer, en ongeacht het enzym reproduceerbare resultaten geven. Bij dit onderzoek is gebleken dat afhankelijk van voorafgaande kolom regeneratie, buffer of ionsterkte het bedvolume varieert en ionische interacties tussen eiwit en kolom mogelijk zijn. De bepaling van het molecuulgewicht kan dan

ook alleen maar worden uitgevoerd wanneer juist voor of na de meeting de kolom geijkt is. Verder werden de beste resultaten bereikt met fosfaatbuffer 0.01 M en 0.05 M NaCl.

2.5 Enzymkinetiek.

Er is een model wat er vanuit gaat dat de katalytische werking van een enzym mogelijk is doordat het enzym een complex vormt met het substraat. Tijdens deze nauwe interactie zou het substraat (S) omgezet worden in product (P) wat weer loslaat van het enzym. Dit is als volgt weer te geven;



Wanneer aangenomen wordt dat er veel meer substraat aanwezig is dan enzym, de hoeveelheid enzymcomplex niet verandert in de tijd en de reactiesnelheid van S + E naar ES toe veel groter is dan vice versa, geldt de volgende Michaelis-Menten vergelijking:

$$V_0 = \frac{V_m * [S]}{K_m + [S]}$$

Deze vergelijking is op drie verschillende manieren te schrijven als de vergelijking van een rechte lijn ($y = ax + b$). Wanneer uit experimenten voor verschillende substraat concentraties de bijbehorende initiële reactie snelheden bekend zijn is door middel van deze vergelijkingen op drie verschillende manieren de K_m en V_{max} te berekenen. Het verschil in de methoden zit voornamelijk in de bepaling van deze constanten omdat bij regressie berekeningen van de lijnen niet alle punten een even groot effect hebben op de richtingscoëfficiënt(a) en constante(b) van de berekende lijn. Bij de Linaweaver-Burk plot bijvoorbeeld, hebben de minst nauwkeurige resultaten, n.l. die bij lage substraatconcentratie, de grootste invloed op de berekening van de regressielijn. In dit onderzoek zijn steeds series van metingen bij verschillende substraatconcentraties bepaald waarbij min of meer willekeurig de substraatconcentratie gevarieerd is. Dit had tot gevolg dat bij de verwerking van de resultaten niet zonder meer altijd een van de methoden de beste was. Voor elke serie waarnemingen werden alle drie berekeningen uitgevoerd. Alleen die resultaten waarbij de resultaten redelijk gespreid lagen en waarbij de correlatiecoëfficiënt groter was dan 0.970 zijn vermeld.

De metingen zijn alle uitgevoerd aan partieel gezuiverd enzym (mono Q) omdat c.v.e. metingen niet voldoende nauwkeurig bleken door diverse storende effecten van het extract. De K_m waarden zijn voor alle substraten bepaald bij pH 7.8 en 37 graden C. De V_{max} waarden zijn niet vermeld omdat deze afhankelijk zijn van de mate van zuivering van het monster. Deze waarden zeggen daarom ook meer over de voorafgaande zuivering dan over een eigenschap van het enzym zelf, tenzij het enzym volledig zuiver is.

2.6 Cofactor regenerering.

Het phenylalanine dehydrogenase heeft voor zijn activiteit de cofactor NAD(H) nodig. Voor de amineringsreactie is NADH nodig voor de omzetting van fenylypyruvaat naar phenylalanine. Wanneer deze reactie op grote schaal uitgevoerd zou moeten worden, is toevoeging van NADH veel te kostbaar. In zo'n geval wordt vaak gezocht naar een (goedkoop) enzym-systeem dat in staat is de cofactor te regenereren. Een ander argument om op zoek te gaan naar een dergelijk systeem kan instabiliteit van de cofactor zijn.

Voor het phenylalanine dehydrogenase van *Brevibacterium* is cofactor regenerering toegepast met formiaat-dehydrogenase (Hummel 1986, fig. 10). De oxidatie van het formiaat naar CO₂ en H₂O leverde het reducerende vermogen om NAD(+) om te zetten in NADH. In dit geval was een gelijke hoeveelheid units activiteit van beide enzymen samen gebracht. Een berekening gaf aan dat bij de productie van een kilo phenylalanine in dit systeem elk NAD molecuul 11400 X de cyclus moest doorlopen.

Voor het partieel gezuiverde phenylalanine dehydrogenase van *Nocardia* sp.239 is een dergelijk experiment opgezet met het formiaatdehydrogenase en alcohol dehydrogenase. De proeven zijn steeds uitgevoerd in een of drie milliliter cuvetten.

HOOFDSTUK 3 RESULTATEN

3.1 Eigenschappen van het phenylalanine-dehydrogenase, bepaald aan celvrij extract.

Nocardia sp. 239 bezit een phenylalanina dehydrogenase dat gerepasseerd kan worden door glucose. Inductie treedt op bij groei op L-phe, D-phe en methanol met L-phe. In dit onderzoek is gekeken of inductie ook door andere aminozuren mogelijk was. Inductie werd niet gevonden bij c.v.e. wat afkomstig was van cellen die gegroeid waren op histidine, maar dit resultaat zou gevolg kunnen zijn van oogsten bij secundaire groei (td > 12 uur). Er is alleen bij groei op de aminozuren L-phe en D-phe inductie gevonden. Opvallend is dat bij groei op D-phe zowel groeisnelheid als specifieke activiteit (td 5 uur, 450 nmol/mg.min), aanzienlijk groter zijn dan op L-phe (td 7 uur, 260 nmol/mg.min). Toch bleek D-phenylalanine geen substraat te zijn van het enzym, sterker nog D-phenylalanine blijkt een remmende invloed te hebben. (fig 11)

Er is verder steeds gewerkt met c.v.e. van cellen die gegroeid zijn op L-phenylalanine. Allereerst is gekeken naar eigenschappen die aan het ongezuiverd enzym konden worden bepaald.

Het pH optimum is bepaald voor de aminerings reactie, bij een temperatuur van 40 graden C. De optimum pH bleek rond de waarde 10 te liggen. Er is gebruik gemaakt van vers c.v.e. in steeds gelijke hoeveelheid. Na afloop van iedere bepaling werd de pH nagemeten. Er is gebruik gemaakt van zowel een tris- als een glycine buffer (0.5 M) De hoogste activiteit, 38 umol/mg.min, lag 13 X hoger dan die bij de groeitemperatuur (fig 12).

Het temperatuur optimum van het L-phedH is bepaald voor de aminerings reactie. De activiteit van een vaste hoeveelheid c.v.e. werd bepaald alsmede de temperatuur in het cuvet (die is namelijk ong. 2 graad lager dan die in het waterbad). De hoogste activiteit werd gemeten bij 50 graden C, bij 64 C werd het enzym irreversibel geïnactiveerd en bij temperaturen rond 30 was nauwelijks activiteit meetbaar. Het optimum is in totaal 3 X bepaald bij verschillende extracten (fig 13).

Bij hogere temperaturen bleek dat zonder toevoeging van c.v.e. een aanzienlijke afname van de OD340 plaats vond (fig 14). Het is mogelijk dat de endogene activiteit toeneemt met toenemende temperatuur, of doordat KCN ontsnapt waardoor er minder remming is van endogene activiteit. Verder is het mogelijk dat fp (wat tenslotte ook absorbeert bij 340), instabiel is bij die temperatuur. Dit laatste is met de methode van fp concentratiebepalingen echter nooit waargenomen, wellicht is fp in combinatie met KCN bij hogere temperaturen niet stabiel. Deze waarnemingen waren mede aanleiding tot de beslissing dat altijd bij de groeitemperatuur zou worden gemeten.

De activerings energie (E_a) van het enzym is te bepalen uit het eerste deel van de temperatuur versus enzymactiviteit curve. Uit de enzymactiviteit is met behulp van de substraat concentraties de rate constante k te bepalen. Voor deze constante k geldt de Arrhenius vergelijking:

$$k = A * e^{-E_a/RT}$$

Deze relatie is ook te schrijven als de vergelijking van een rechte lijn:

$$\ln k = \ln A - E_a/R * 1/T$$

Uit de richtings coëfficiënt van de Arrhenius-plot is de activatie energie van het phenylalanine-dehydrogenase bepaald op 44.2 Kjoule per mol (fig 15).

Om te bepalen aan welke kant het evenwicht van de reactie ligt is gekeken naar de evenwichtsconstante van de reactie;



Drie reactie mengsels zoals die beschreven zijn voor de deaminerings reactie zijn in duplo acht uur lang geïncubeerd met verschillende uitgangshoeveelheden L-phe (5, 10 en 15 mM tabel 2). Uit een voorbereidend experiment was al gebleken dat na drie uur geen toename in NADH kon worden waargenomen waaruit geconcludeerd werd dat het evenwicht zich had ingesteld. De incubatietemperatuur was 37 graden en de pH was 7.8. Ieder reactiemengsel bevatte 0.7 gram c.v.e. en een dubbele hoeveelheid KCN om endogene activiteit uit te sluiten. Na afloop werd de OD318 en OD340 bepaald, hieruit volgde de concentraties voor fp en NADH. Uit de resultaten blijkt dat uit een bepaalde hoeveelheid L-phe evenveel fp als NADH gevormd wordt (zoals op grond van stoichiometrie ook verwacht werd). Op grond van bovenstaande reactie kan de evenwichtsconstante van de reactie worden berekend voor de deaminering bij 37 graden Celcius. De gemiddelde pK waarde is 9.69, het evenwicht ligt heel sterk aan de kant van L-phe. De volledige reactie die door het hydrogenase wordt gekatalyseerd is eigenlijk de volgende:



Het is daarom correct om de meereagerende waterstof-ionen in de berekening te betrekken. In het eerste experiment bijvoorbeeld ontstaan $4.7 * 10^{-6}$ waterstof-ionen. Allereerst moet bepaald worden hoeveel ionen na de reactie aanwezig zijn. Uit $\text{pH} = 8.15 + \log(\text{base/zuur})$ is berekend dat de pH 7.8 blijft, dus na afloop van de reactie zijn $1.5849 * 10^{-8}$ H(+)-ionen aanwezig. Wanneer voor deze aanwezige ionen wordt gecorrigeerd is de pK 17.5. De evenwichtsconstante K is dus heel klein en dat komt doordat de noemer (met L-phe en NAD) heel groot is.

Bij de aminerings reactie bleek dat toevoeging van een hoeveelheid enzym een evenredige toename in enzym activiteit te zien gaf (fig 5). Het enzym lijkt geen extra componenten zoals ionen of waterstofacceptoren nodig te hebben voor de katalytische functie.

Er is onderzocht of laagmoleculaire stoffen invloed kunnen hebben op de enzymactiviteit. Celvrij extract is daartoe over een 5 ml sephadex G-25 kolom geleid (G-25 sephadex scheidt moleculen in de range van 1 tot 5 kd). De activiteit na G-25 behandeling was 70 tot 80% van de opgebrachte activiteit. Onderzocht is of Ca, Mg, Mn, K, Na, of Co ionen (conc van 0 tot 3 mM) de oorspronkelijke activiteit konden herstellen. Het bleek dat dit niet het geval was, cobald en mangaan hebben zelfs een remming tot gevolg (20-30% bij 1 mM).

Naast het effect van toegevoegde ionen is ook gekeken of wegvangen van twee waardige ionen door EDTA op c.v.e. van invloed is. Dit bleek niet het geval te zijn. Wel is het zo dat de remmende werking van Mn en Co volledig door toevoeging van EDTA teniet kan worden gedaan.

Uit bovenstaande resultaten is geconcludeerd dat tweewaardige ionen niet of nauwelijks invloed uitoefenen op de enzym activiteit en dat afgezien van grote concentraties NH₄ ionen (zoals bij een ammoniumprecipitatie) geen ioneffecten te verwachten zijn bij onderzoek aan het L-phedH.

3.2 De partiële zuivering van het phenylalanine dehydrogenase

Er is gekeken naar de resultaten van diverse zuiveringsmethoden op celvrij extract. Bij een ammoniumprecipitatie bleek dat de resultaten niet altijd reproduceerbaar waren. Het grootste deel van het dehydrogenase sloeg neer bij concentraties tussen 30 en 50 % verzadigde oplossing. In de meeste gevallen was de meest actieve fractie de 30-40 of de 40-50 fractie. De bereikte zuivering lag tussen 4-7 X met een opbrengst rond 60 %. Deze zuiveringsstap was dus belangrijk omdat ook meteen een concentratie van het enzym werd bereikt die betere resultaten gaf bij ionenwisselaar en gelfiltratie behandelingen.

Bij de ionenwisselaar (DEAE) is 5 ml c.v.e. met een sp. act. van 210 nmol per min. per mg. opgebracht. Na een kolomvolume buffer werd over 4 kolomvolumes een lineaire NaCl gradiënt aangelegd en fracties opgevangen van 4 ml (fractiecollector met een uvicord). De fracties werden onderzocht op L-phedh activiteit. Door middel van geleidings metingen is de concentratie NaCl van iedere fractie gemeten. Het eiwit bleek van de kolom los te laten bij 180-220 mM NaCl-concentratie. De hoogste specifieke activiteit was 700 nmol/mg*min. (zie figuur 16). Met DEAE behandeling kon dus een opzuivering van 3.5 x bereikt worden met een opbrengst van 70%.

De fracties van de DEAE kolom die de hoogste sp. act. vertoonden zijn op de G-200 kolom gebracht (10.4 ml, sp.act: 280, eiwitconc: 0.78 mg/ml). De kolom had een lengte van 110 cm en een diameter van 2.4 cm, en dus een volume van 0.5 L. De loopsnelheid was 18.8 ml per uur en de fractiegrootte 4 ml. De opbrengst was 96% van de opgebrachte activiteit maar de opzuivering

was slechts 1.2 X (zie figuur 17). Uit bovenstaande resultaten blijkt dat wanneer de beschreven zuiverings stappen na elkaar worden uitgevoerd, hoogstens een totale zuivering van ongeveer 15 maal kan worden bereikt.

Bij affiniteits chromatografie wordt niet zelden een opzuivering van 40X wordt gehaald. Maar bij pH 7.8 bleek het enzym absoluut niet te binden aan de phenylalanine-agarosekolom (fig 18). Daarom is gepoogd om bij verschillende zuurgraad het enzym te binden. Dat is slechts één maal gelukt n.l. bij pH 6.0. Het enzym liet weer van de kolom los bij pH 8.0 (fig. 19). De opzuivering was 24X met een opbrengst van 40%. Herhaalde pogingen om dit resultaat te reproduceren zijn echter mislukt. Oorzaak hiervan zou de instabiliteit van het enzym bij pH 6 kunnen zijn (een paar maand later werden gegevens verkregen die deze veronderstelling steunen).

Zoals in hoofdstuk 2 al is vermeld biedt de FPLC een aantal voordelen t.o.v. kolomchromatografie. De snelheid waarmee gewerkt kan worden was het grootste argument om de zuivering met de FPLC te proberen, immers op die manier wordt inactivatie van het enzym door warmte of proteasen tot een minimum beperkt.

Het was mogelijk om c.v.e. op de mono Q kolom te brengen tot 16 gram (600 ul c.v.e.). Bij 20 gram bleek dat het enzym niet meer kon binden waarschijnlijk door verdringing van sterker bindende eiwitten. Bij c.v.e. kon met een mono Q behandeling een opzuivering van gemiddeld 10 X worden bereikt. De totale activiteit die van de kolom afkomt (98%) is weer te vinden in 3-4 fracties van 0.5 ml.

Bij dit onderzoek is heel vaak gebruik gemaakt van de mono Q kolom omdat hiermee een snelle tienvoudige zuivering met een hoge opbrengst behaald kon worden. De mono Q fracties waren voldoende zuiver om eigenschappen van het enzym te kunnen onderzoeken. Het voorgezuiverde extract dat op deze manier was verkregen had bij de activiteits-assays ook geen KCN meer nodig omdat er geen endogene NADH consumptie/productie meer optrad.

Wanneer c.v.e. op de superose kolom gebracht werd kon een zuivering van 7X bereikt worden (loopsnelheid 0.3 ml per uur). De opbrengst was 98% van de opgebrachte activiteit meestal verdeeld over twee tot drie fracties van 0.5 ml. In totaal kan niet meer dan 100 ul c.v.e. (ong. 2 mg) opgebracht worden, vandaar dat voor snelle partiële zuiveringen van c.v.e. altijd de mono Q gebruikt is. Wanneer fracties van de mono Q kolom op de superose kolom gebracht werden, werd 96% van de opgebrachte activiteit weergevonden. Maar analoog aan de combinatie van DEAE - en G-200 kolom, was de opzuivering gering n.l. 1.2 X.

Nadat voldoende onderzocht was hoe het enzym reageerde op de verschillende behandelingen, zijn diverse stappen op een dag na elkaar uitgevoerd. Allereerst is een ammoniumprecipitatie uitgevoerd, daarna werd ontzouten m.b.v. een G-25 kolommetje. Vervolgens werd de hoogst actieve fractie op de mono Q kolom gebracht, waarna zuivering met de superose kolom plaats vond. De resultaten staan samengevat in tabel 3. De uiteindelijke specifieke activiteit was 23 X hoger dan de uitgangs activiteit van c.v.e. Er valt op dat de zuivering niet zo groot is. Terwijl toch nog maar twee bandjes te zien zijn op de comassie gekleurde SDS/PAA gel, bevat een zilvergekleurde gel ong. 7 zichtbare bandjes (fig 20 en 21). Het feit dat het enzym in het

c.v.e. al zichtbaar is geeft de indruk dat de cel erg veel van het enzym aanmaakt bij groei op phenylalanine maar nooit meer dan $100/23 = 4\%$ van het totale eiwit)

Nadat er gezuiverde fracties waren verkregen zijn deze direct op een SDS/FAA gel gebracht om het molecuulgewicht van het gedeneureerde eiwit te kunnen bepalen. In totaal is dit vier maal gebeurd en het resultaat was in alle gevallen een grootte van 42 kd. (fig 22).

Het actieve dehydrogenase werd bij de superose kolom-methode altijd tussen albumine 45 en albumine 68 van de kolom geelueerd (intrapolatiewaarde is 41 kd). Dit gold voor zowel c.v.e.-, als ionenwisselaarsfracties. De activiteit werd altijd voor 98% teruggevonden rond de topfractie.

3.3 Enzymkinetiek

Voor de affiniteit bepalingen voor de diverse substraten is gewerkt met celvrij extract. De resultaten bleken niet altijd even reproduceerbaar vandaar dat ook met partieel gezuiverde Q-fracties is gewerkt. Deze fracties werden verkregen door c.v.e. met behulp van de FPLC monoQ kolom tot 10 X te zuiveren.

De affiniteiten voor de verschillende substraten van het door L-phe geïnduceerde enzym komen goed overeen met de waarden die zijn gevonden voor het enzym wat door D-phe werd geïnduceerd. De Km waarden voor ammonium, NAD, fenylpyruvaat en L-phe waren resp. 148, 0.25, 0.06 en 0.75 mM (tabel 4, fig 23). De afwijkende waarden zijn steeds gevonden bij celvrij extract.

3.4 Het door D-phenylalanine geïnduceerde enzym.

Wanneer Nocardia sp. 239 groeit met L-phe als koolstof en energiebron wordt het L-phe dehydrogenase geïnduceerd. De specifieke activiteit is 260 nmol per mg per minuut, maar bij groei op D-phe is op dezelfde manier een specifieke activiteit van 450 gemeten. Behalve het verschil in sp. act. is ook opvallend dat de verdubbelingstijd van Nocardia sp. 239 op L-phe 7 uur is terwijl die bij groei op D-phe (ook 8 mM) slechts 4.5 uur bedraagt. Naar aanleiding van deze gegevens ontstond de vraag of in beide gevallen wel hetzelfde enzym geïnduceerd wordt. Voor de duidelijkheid wordt vanaf nu het L-phe geïnduceerde enzym L-phedH(L) en het D-phe geïnduceerde enzym L-phedH(D) genoemd.

Om antwoord te kunnen vinden op de vraag, zijn de volgende punten onderzocht;

* affiniteit* Het bleek dat zowel het L-phedH(L) als het L-phedH(D) overeenkomstige Km waarden voor L-phe hebben maar totaal geen affiniteit voor D-phe. Dit gold voor FPLC-Q kolom fracties, maar ook voor celvrij extract. Als het catabolisme van de D-phe gegroeide cellen als sleutel enzym het L-phedH(D) heeft om gebruik te kunnen maken van het D-phenylalanine moet er ook een ander enzym betrokken zijn die D-phe omzet in L-phe. Mocht zo'n enzym aanwezig zijn dan was het niet (meer) actief in celvrij extract. Een andere mogelijkheid is dat het een membraangebonden enzym betreft.

* grootte * Op SDS/PAA gel is geen verschil te zien in grootte van beide enzymen. Een mengsel van beiden geeft ook maar één band te zien (fig 24).

* FPLC Q * Bij een concentratie van 140 mM NaCl laten beiden los van de ionenwisselaar.

* remming * D-phe remt beide enzymen zowel bij aminering- als deaminerings reactie (zie fig 11).

* substraatwisseling * Kweekjes die logaritmisches groeiden op L-phe gingen bij overenten op D-phe in een lag-fase die twee tot vijf dagen kon duren. Overenten van D-phe op L-phe gaf nauwelijks een lagfase te zien (ong 1-2 uur), de kweekjes groeiden door met een verdubbelingstijd die hoort bij groei op L-phe. (fig 25).

3.5 Cofactor regenerering.

De pogingen om de cofactor NAD(H) door formiaat dehydrogenase te laten regenereren zijn mislukt. De omstandigheden zoals die aangegeven worden door de fabrikant en ook de omstandigheden zoals die vermeld zijn in het artikel van Hummel (1986) konden niet verhinderen dat het enzym binnen 5 min. volledig irreversibel geïnactiveerd was. De volgende proeven zijn dan ook uitgevoerd met alcohol dehydrogenase (AdH). Dit enzym heeft een veel geringere inactivatie vergeleken met het formiaat dehydrogenase.

In tabel 5 staat de samenstelling van het reactiemedium vermeld, evenals de resultaten. In het eerste experiment zijn ongeveer evenveel equivalenten L-phedH als AdH toegevoegd. Op grond van de vooraf gemeten potentiële activiteit van het L-phedH (overmaat NADH), werd een fenylpyruvaat afname van 0.414 mM per uur verwacht. De gevonden afname is echter veel lager n.l. 0.242 mM per uur (fig 26). Het lijkt er op dat er maar 60 % van het enzym actief is. Een andere verklaring is dat de cofactor regenerering de beperkende stap vormt, want 80 % van de berekende AdH activiteit komt overeen met de gevonden waarde. De omrekeningsfactor die wordt gebruikt voor de berekening van de hoeveelheid omgezet NADH, de molaire extinctie, is hier zelf bepaald op 5700. Een kleine afwijking hierin of in de bepaling van de enzym-activiteiten van het AdH of het PhedH kunnen dan ook al gauw aanleiding geven tot verschillen in berekende en gemeten absolute activiteit.

Het tweede experiment is in duplo uitgevoerd omdat bij de eerste keer na 15 minuten de fenylpyruvaat concentratie niet meer afnam. Op grond van de activiteit van het L-phedH werd een maximale afname van 0.31 mM per uur verwacht. De gevonden waarde bleek slechts de helft van deze waarde te zijn, en 60 % van de waarde die op grond van cofactorregenerering verwacht mocht worden (fig 27). Toch bleek toevoeging van AdH weer een hernieuwde activiteit teweeg te brengen zodat ook hier de beperkende stap de cofactor regenerering lijkt te zijn (fig 28).

In het derde experiment is uitgegaan van een overmaat aan AdH. De initiële afname snelheid bleek overeen te komen met de verwachte waarde. In tegenstelling tot de voorgaande experimenten is hier geen sprake van een lineaire afname maar een afnemende snelheid van omzetting in de tijd (fig 29). Binnen acht minuten is de fenylpyruvaatconcentratie al op een constant laag niveau. Bij toevoeging tot 10 mM fp na anderhalf uur na starten bleek de hernieuwde afname 60 % van de initiële snelheid te zijn. Na deze anderhalf uur kan de

hoeveelheid AdH die nog actief is zoveel afgenomen zijn dat ook hier weer de cofactor regenerering de beperkende stap was, maar inactivatie van het L-phedH kon ook een rol spelen.

In het een na laatste experiment is ook weer duidelijk te zien dat de activiteit voor 95-100 % bepaald wordt door de hoeveelheid AdH (fig 30). het grootste deel van het L-phedH is dan ook actief. Wanneer na verloop van tijd de omzettings snelheid is afgenomen is 2/5 van de initiële hoeveelheid AdH toegevoegd. De afname snelheden blijken zich te verhouden als de hoeveelheid AdH die aanwezig is.

In het laatste experiment is een soortgelijk beeld te zien als bij fig. 27. Een snelle afname in fenylpyruvaat die slechts 60 % van de verwachte afname bedroeg. (fig. 31)

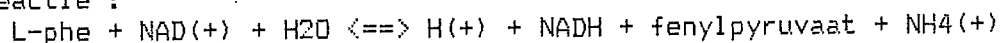
Samenvattend kan opgemerkt worden dat het mogelijk is bij overmaat aan AdH het phenylalanine op maximale snelheid te laten werken. Meestal blijkt de hoeveelheid alcoholdehydrogenase beperkend te zijn. Wanneer de instabiliteiten van beide enzymen beter onderzocht zijn moet het mogelijk zijn om een goede productie van het L-phenylalanine te verkrijgen. Dat betekent een omzetting van 0.1 g/mg*uur (= 7.5 umol/mg.min.).

HOOFSTUK 4 DISCUSSIE

Uit de resultaten van dit onderzoek is gebleken dat in *Nocardia* sp 239 bij groei op L-phenylalanine en D-phenylalanine een phenylalanine dehydrogenase wordt geïnduceerd, zoals eerder beschreven is door de Boer et al. (1986). Verder bleek dat geen van de andere aminozuren in staat was het enzym te induceren. Deze waarneming komt overeen met de inductie van het phenylalanine-dehydrogenase van *Brevibacterium* welke eveneens door L, D, en L,D phenylalanine wordt geïnduceerd maar ook door histidine (Hummel et al. 1985). Het uit *Sporosarcina* geïsoleerde dehydrogenase was verkregen uit cellen die in aanwezigheid van de induceerder L-phenylalanine gegroeid waren (Asano 1986)

Het phenylalanine-dehydrogenase van *Nocardia* sp. 239 bleek in staat om L-phenylalanine m.b.v. de cofactor NAD oxidatief te deamineren tot fenylpyruvaat. Omgekeerd wordt de reductieve aminering van fenylpyruvaat met NH₄ en NADH gekatalyseerd. Behalve fenylpyruvaat bleek parahydroxyfenylpyruvaat, de precursor van tyrosine, een substraat voor de reductieve aminatie te zijn. D-phenylalanine bleek niet als substraat geschikt, bij omzetting van L-phenylalanine bleek het zelfs de reactie te remmen. Voor het *Brevibacterium*-enzym zijn dezelfde substraten gevonden, terwijl bij het *Rhodococcus*-enzym (Luchtenberger 1987) daarnaast ook indolpyruvaat en 2-keto-4(methylmercapto)boterzuur substraat bleken te zijn. Imidazolpyruvaat, de precursor voor histidine, was bij *Brevibacterium* wel induceerder maar geen substraat voor het enzym, voor *Nocardia* is imidazolpyruvaat niet getest.

Bij incubatie van L-phenylalanine en NAD in aanwezigheid van celvrij extract bleek na verloop van tijd (8 uur) evenveel NADH als fenylpyruvaat gevormd te zijn. Dit resultaat toont aan dat de reactie NAD gekoppeld is. Verder ondersteunt deze waarneming de verwachte stoichiometrie van de reactie :



De pK van deze reactie was 17.5 (37 graden C). Dit geeft aan dat het evenwicht sterk aan de kant van het phenylalanine ligt.

Het pH-optimum voor de aminerings reactie ligt rond de waarde 10. Deze waarde ligt hoger dan de waarden 9.0 en 9.3 voor resp. *Brevibacterium* (Hummel et al 1986) en *Rhodococcus*. De deaminerings-pH optima voor laatst genoemde enzymen lagen zelfs hoger dan pH 10.

Het temperatuuroptimum voor het phenylalanine-dehydrogenase van *Nocardia* sp.239 is 50 graden Celcius, overeenkomstig met de optimumtemperatuur van het *Brevibacterium*-enzym. De activeringsenergie bedroeg 44.2 k.joule per mol, twee maal zo hoog als de 21 k.joule per mol die voor *Brevibacterium* is gevonden.

Het phenylalanine-dehydrogenase van Nocardia sp. 239 bestaat uit een monomeer met een grootte van 42000 Dalton. Deze grootte komt overeen met de subunit orde van grootte van het dehydrogenase van Sporosarcina (38000 D.). Het actieve enzym van Sporosarcina bleek echter een octameer te zijn met een grootte van 290000 Dalton. Over de grootte van de enzymen uit Brevibacterium en Rhodococcus is nog niets bekend.

De Km waarden die gevonden zijn voor de verschillende substraten voor het enzym komen het meest overeen met de waarden die gevonden zijn bij de sterk verwante Rhodococcus (tabel 6).

De cofactor regenererings experimenten met alcoholdehydrogenase en phenylalanine-dehydrogenase verliepen door inactivatie van beide enzymen niet altijd optimaal. Aangetoond is dat een productie van 5 g/l. met een conversie van 96% haalbaar is voor de omzetting van fenylypyruvaat naar phenylalanine. Aan de hand van de enzymactiviteit van het partieel gezuiverde dehydrogenase is een mogelijke productie van 7.5 $\mu\text{mol/mg.min}$ te voorspellen. Voor verdere onderzoeken naar een cofactor regeneratie-systeem om phenylalanine te produceren moet vooral aandacht worden besteed aan de oorzaken van inactivatie en eventuele stabilisatie van het phenylalanine dehydrogenase en het cofactor regenererende systeem.

Waarschijnlijk wordt door D-phenylalanine in Nocardia sp. 239 eenzelfde L-phenylalanine dehydrogenase geïnduceerd als door L-phenylalanine. Beide enzymen zijn even groot, vertonen eenzelfde gedrag op de ionenwisselaar en hebben overeenkomstige affiniteit voor de substraten NAD, NH_4^+ en L-phenylalanine. Verder bleek D-phenylalanine voor beide enzymen geen substraat te zijn.

Het katabolisme van D-phenylalanine verloopt waarschijnlijk via een racemase naar L-phenylalanine, vervolgens via het dehydrogenase naar fenylypyruvaat waarna de route via homogentisaat richting citroenzuurcyclus verloopt. Direct bewijs voor het bestaan van de racemase is niet gevonden. Een incubatie gedurende twee uur met NAD en D-phenylalanine gaf geen productie van NADH te zien. Dit betekent dat het onwaarschijnlijk is dat een speciaal D-phenylalanine-dehydrogenase aanwezig is, maar ook dat het racemase, indien aanwezig, niet actief was onder deze condities.

In Aspergillus niger wordt D-phenylalanine door D-aminozuur oxidase- en L-phenylalanine door 2-oxoglutaaraat aminotransferase omgezet (Kishore 1976). Een analoog systeem met twee verschillende enzymen voor de omzettingen van L-phenylalanine en D-phenylalanine naar fenylypyruvaat lijkt voor Nocardia sp. 239 niet waarschijnlijk. Logaritmisch op D-phenylalanine groeiende cellen vertoonden geen lag-fase bij overenten op L-phenylalanine. De enzymen voor groei op L-phenylalanine waren schijnbaar aanwezig. De stagnatie in groei bij overenten van L-phenylalanine naar D-phenylalanine zou veroorzaakt kunnen worden door afwezigheid van de gepostuleerde racemase. Een andere aanwijzing dat D-phenylalanine katabolisme via het L-phenylalanine-dehydrogenase verloopt kwam uit het feit dat L-phenylalaninedehydrogenase(-) mutanten niet in staat waren te groeien op zowel D- als L phenylalanine.

Alleen het aantonen van phenylalanine-racemase lijkt nu nog uitsluitend te kunnen geven over het eerste deel van de katabolische route bij groei op D-phenylalanine. Toch zal aanwezigheid van de racemase nog niet kunnen verklaren waarom Nocardia sp. 239 sneller groeit, en een hogere specifieke activiteit van het phenylalanine-dehydrogenase heeft, bij groei op D-phenylalanine ten opzichte van groei op L-phenylalanine.

LITERATUURLIJST

- Asai T, K Aida, K Oishi. (1959) On the enzymatic preparation of L-phenylalanine. J of gen appl. microbiol.5: 150-152.
- Asano Y, Nakazawa A. (1985) Crystallization of phenylalanine dehydrogenase of Sporosarcina ureae. Agric. biol. chem. 49(12): 3631-3632
- De Boer L, W Clement, L Dijkhuizen, W Harder. (1985) Methanol as a feedstock for the production of L-phe by Nocardia sp. 239. Biol. and biol. chem. and biomed. aspects of actinomycetes. proc. 6th int symp. on actinomycetes biol.1:193-196 (Hungary).
- Bradford M M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochem. 72: 248-254.
- Bulot E, C L Cooney. (1985). Selective production of phenylalanine from phenylpyruvate using growing cells of Corynebacterium glutamicum. Biotechnol. lett. 7: 93-98.
- Cavellini D, F Stripe. (1957). Spectrophotometric studies on phenylpyruvic acid. Giorn. biochem. 6:1-17
- Choi Y J, D E Tribe. (1985) Continuous production of L-phenylalanine using an Escherichia coli mutant. Biotechnol. lett. 4:223-228.
- Crosby G A. (1976). New sweeteners. CRC Crit. rev. food sci. 7:297-323.
- Goodfellow M, M Mordarsky and S T Williams (1984) The biology of the actinomycetes: 28-29. Academic press (London ltd)
- Goto I, M Ishihara, S Sakurai, H Enei, K Takinami. (1981) Production of phenylalanine. Jpn patent nr 59 64 793.
- Hagino H, K Nakayama. (1974). L-phenylalanine production by analog resistant mutants of Corynebacterium glutamicum. Agr. biol. chem. 38(1): 157-161.
- Hazeu W, J C de Bruyn, J F van Dijken. (1983) Nocardia sp. 239, a facultative methanol utilizer with the monophosphate pathway of formaldehyde fixation. Arch. microbiol. 135: 205-210.
- Hermann K M, R L Somerville. (1983) Amino acids: biosynthesis and genetic regulation. Chapter 17 The common biosynthetic pathway, pp 301-317. Chapter 18 Biosynthesis of phenylalanine, pp. 323-335. Addison Wesley Company Inc., London.
- Hummel W, N Weiss and M Kula. (1984) Isolation and characterization of a bacterium possessing L-phe dehydrogenase activity. Arch. microbiol. 137: 47-52.
- Hummel W, E Smidt, C Wandrey and M Kula. (1986) L-phenylalanine dehydrogenase from Brevibacterium sp. for production of L-phenylalanine by reductive amination of phenylpyruvate. Appl. microbiotech. 25: 175-185.
- Hwang S O, G H Gil, Y J Cho, K R Kang, J H Lee, J C Bae. (1985) The fermentation process for L-phenylalanine production using an auxotrophic regulatory mutant of Escherichia coli. Appl. and environ. microbiol biotechnol. 22: 108-113.

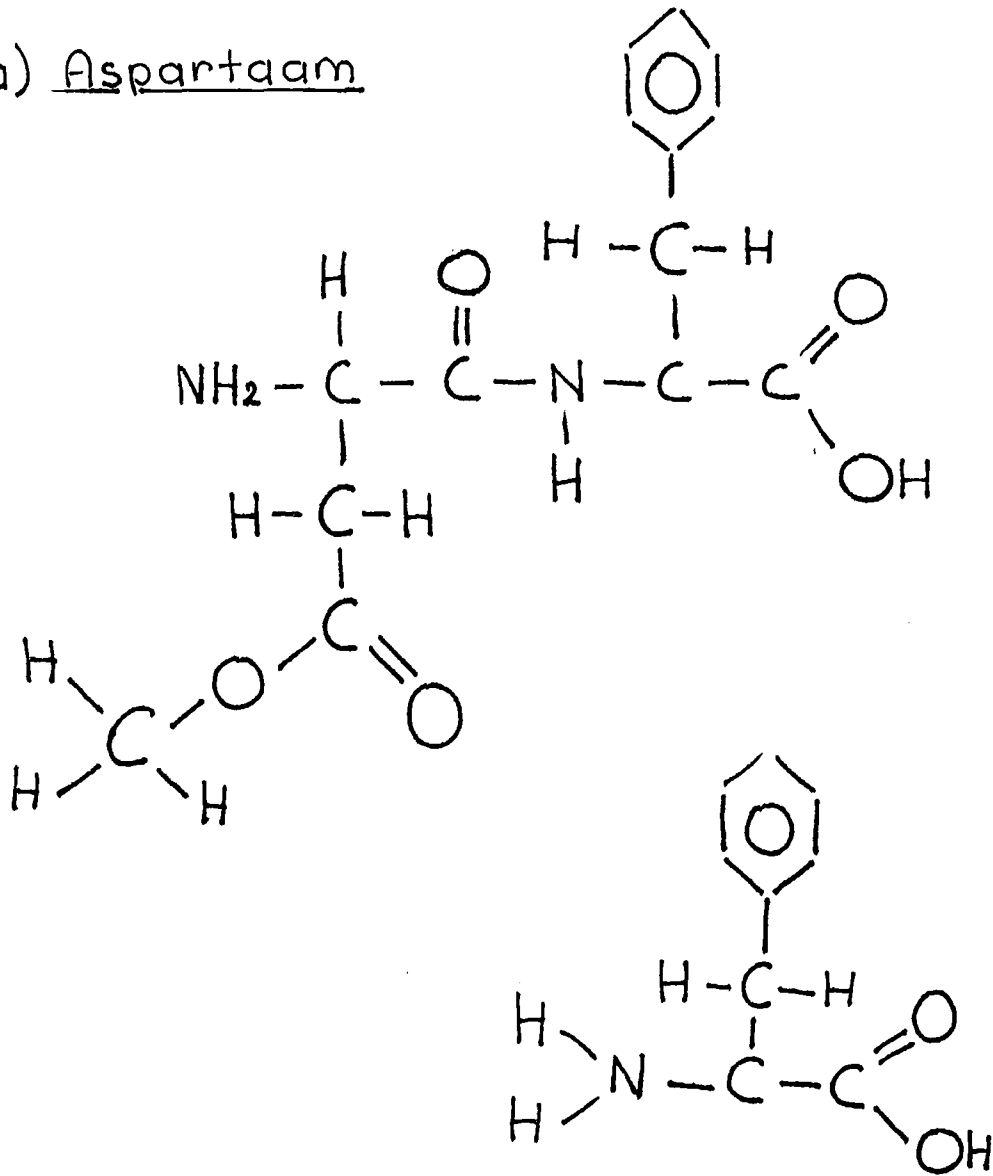
- Kato , K Tsuiji, Y Tani, K Ogata. (1975) Utilisation of methanol by an actinomycete (no 239). Microbial growth on C1-compounds : 91-98.
- Kato N, K Tsuji, H Ohashi, Y Tani, K Ogata. (1977) Two assimilation pathways of C1-compounds in Streptomyces sp. 239 during growth on methanol. Agric. biol. chem. 41(1): 29-34.
- Kishore G, M Sugumaran, C S Vaidyanathan. (1976) Metabolism of DL-(+/-)-Phenylalanine by Aspergillus niger. J of bacteriol. oct: 182-191.
- Leuchtenberger W, M R Kula, W Hummel, H Schütte (in prep.)
- Nakamici K, K Nabe, S Yamada, T Tosa and I Chibata. (1984) L-phenylalanine formation from acetamidocinnamic acid by newly isolated bacteria. Appl. microbiol. biotechnol. 19: 100-105.
- Nakayama K. (1976) The production of amino acids. process biochem. 11: 4-9.
- Pittard J, J Camakaris, B J Wallace (1969) Inhibition of DAHP synthase in Escherichia coli. J of bacteriol 97: 1242-1241.
- Pometto A L III, D L Crawford. (1985) L-phenylalanine and L-tyrosine catabolism by selected Streptomyces species. Appl. environ. microbiol.mar:727-729.
- Shetty K, D Crawford and A L Pometto III. (1986) Production of L-phenylalanine from starch by analog resistant mutants of Bacillus polymyxa. Appl. and environ. microbiol. oct:637-643.
- Shiio I, K Ishii and K Yokozeki. (1973) Production of L-tryptophan by 5-fluorotryptophan resistant mutant of Bacillus subtilis. Agric. biol. chem. 37: 1991
- Sugimoto S, M Nakagawa, T Tsuchida, I Shiio. (1973) Regulation of aromatic amino acid biosynthesis and production of tyrosine and phenylalanine in Brevibacterium flavum. Arg. biol. chem 37(10): 2327-2336.
- Stryer L, Biochemistry 2nd edition. (1976) W H Freeman company San Francisco.
- Tokoro Y, K Oshima, M Okii, K Yamaguchi, K Tanaka and S Kinoshita. Microbial production of L-phenylalanine from N-alkenes. Agr. biol. chem. 34: 1516-1521.
- Weiss U, J M Edwards. (1980) The biosynthesis of aromatic compounds. John Wiley New York.
- Yamada S, K Nabe, N Izuo, K Nakamichi and I Chibata. (1981) Production of L-phenylalanine from transcinnamic acid with Rhodotorula glutinis containing L-phenylalanine ammonia lyase activity. Appl. and environ. microbiol. 42: 773-778.
- Ziehr H, M R Kula. (1985) Isolation and characterization of a highly inducible L-aspartate-phenylpyruvate transaminase from Pseudomonas putida. J of biotechnol. 3: 19-31.

Figuren bijlage behorend bij het doctoraal verslag:

DE KARAKTERISATIE VAN HET PHENYLALANINE DEHYDROGENASE
VAN NOCARDIA SP 239

D478
suppl.

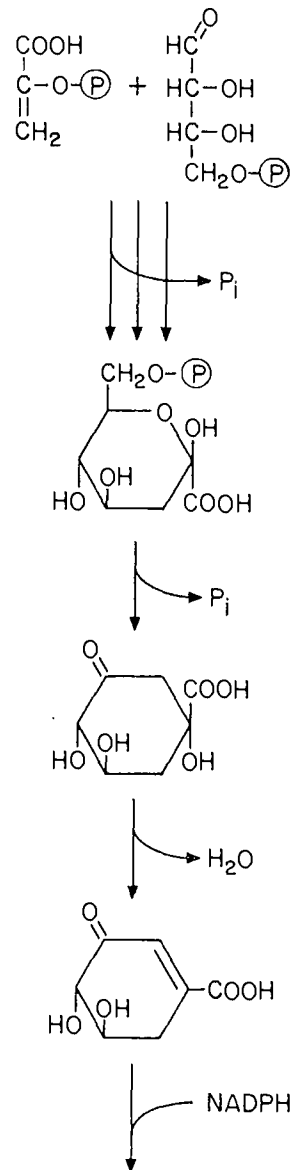
(a) Aspartaam



(b) phenylalanine

Fig. 1 De structuurformule van de zoetstof aspartaam
(L-aspartyl-L-phenylalanine methylester)

Phosphoenol pyruvate + erythrose 4-p



Shikimate

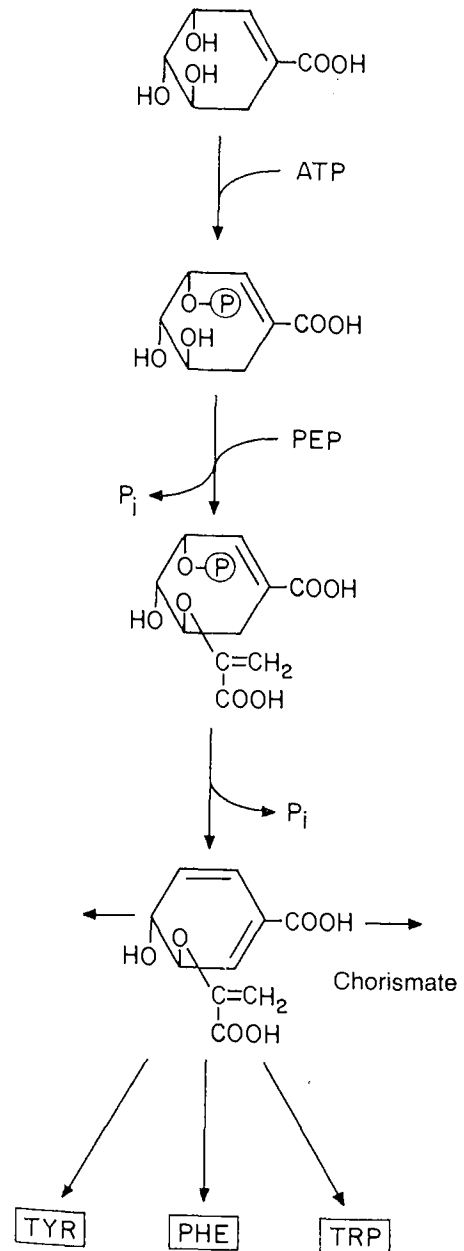


Fig. 2 De "Shikimaatrout", algemeen deel van de routes naar aromatische verbindingen (naar Hermann 1983)

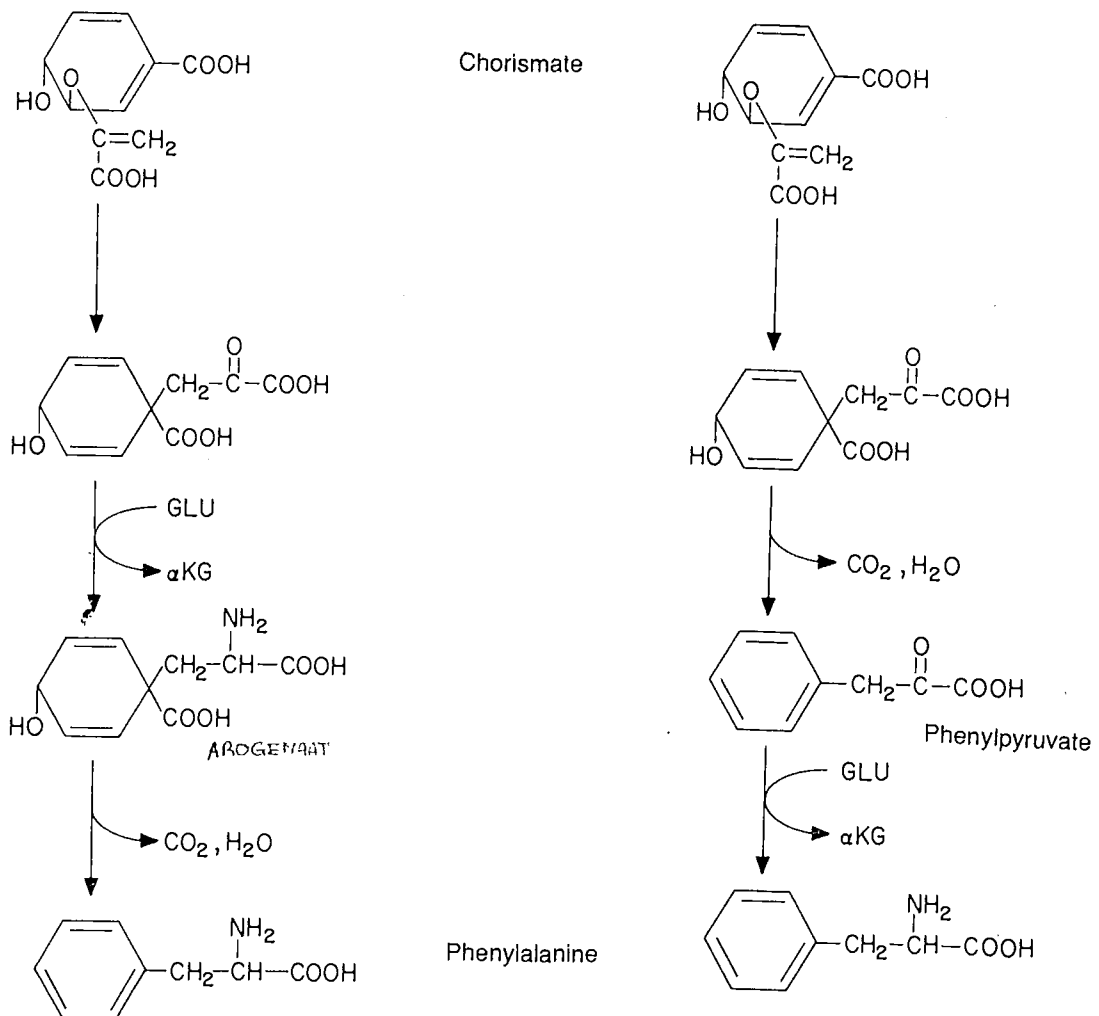


Fig. 3 De fenylpyruvaat- en arogenaat route, de twee manieren om uit chorismaat phenylalanine te synthetiseren (naar Hermann 1983)

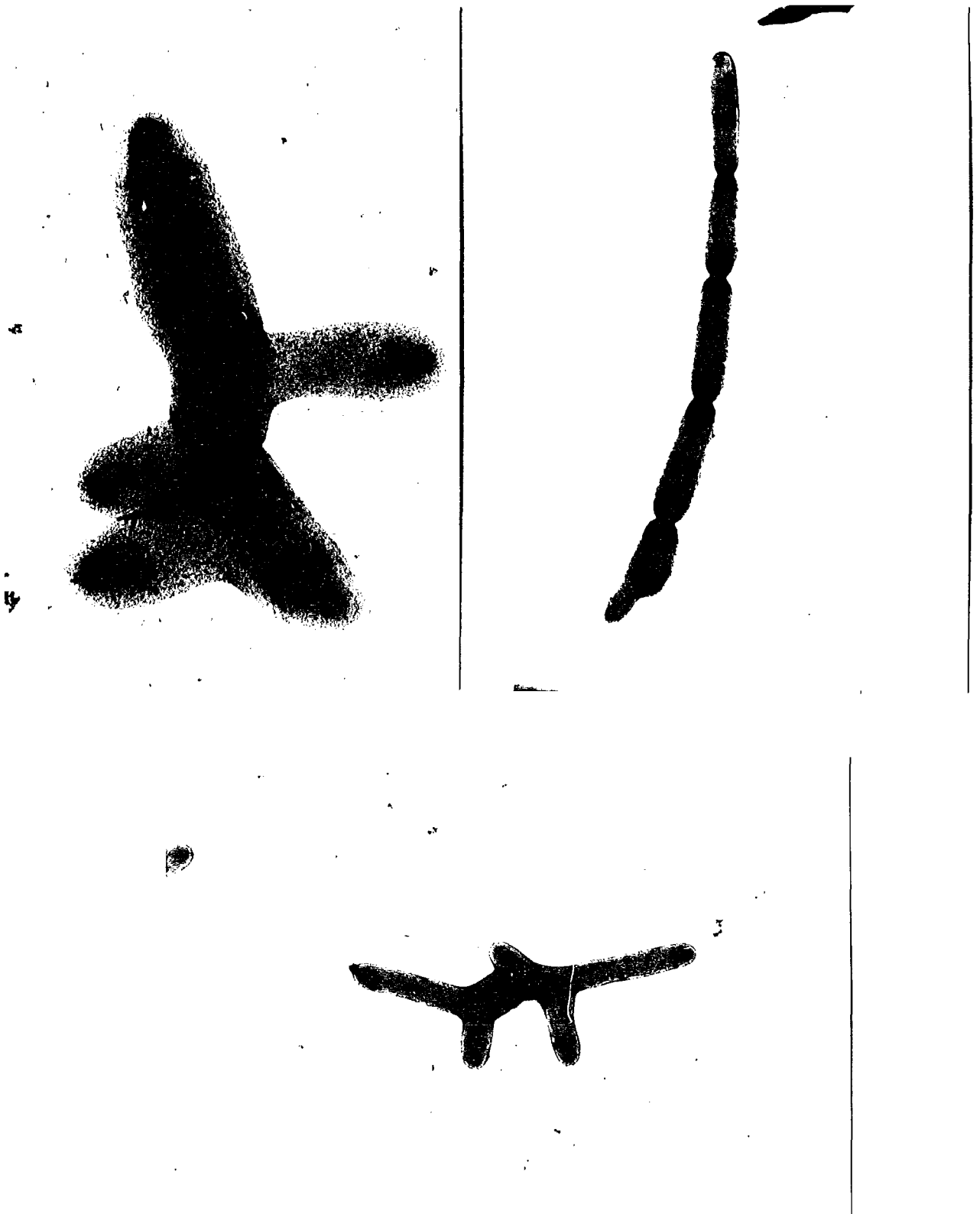


Fig. 4(a) Drie EM opnamen van individuele Nocardia sp.239

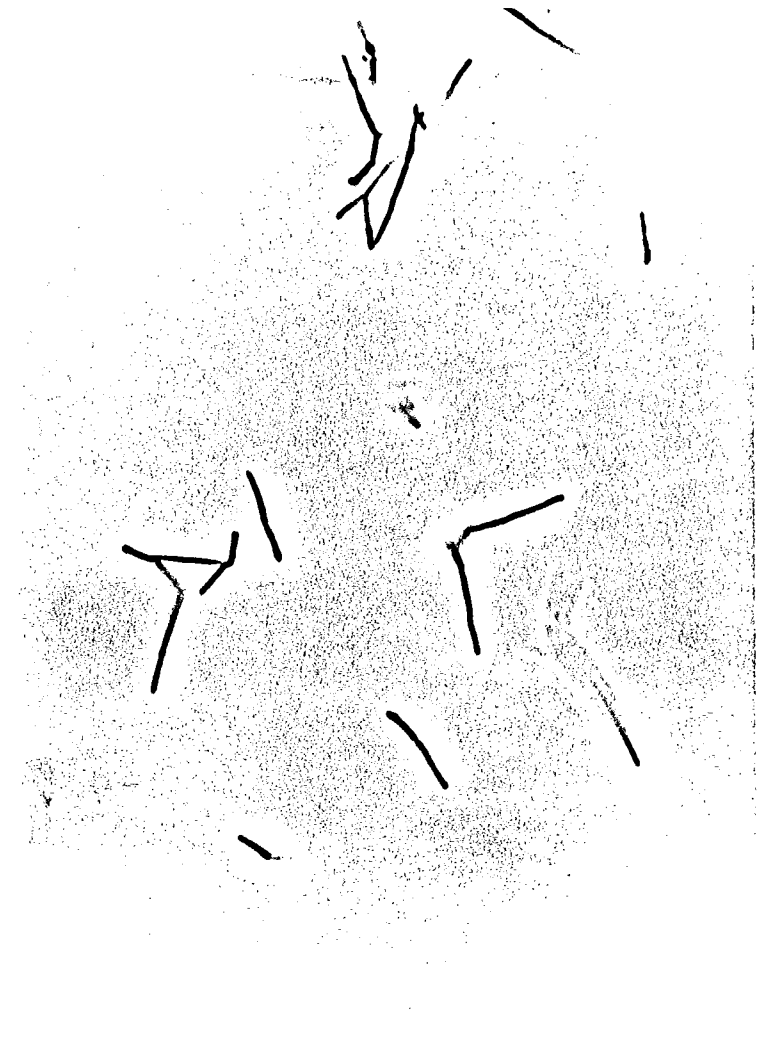
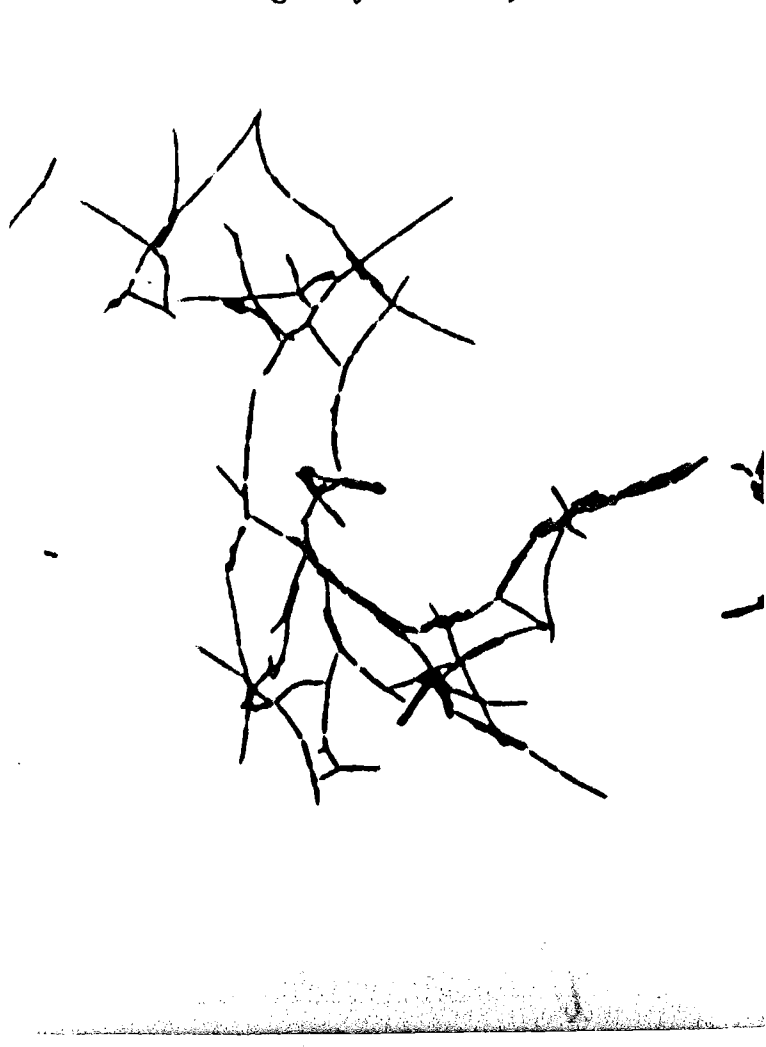
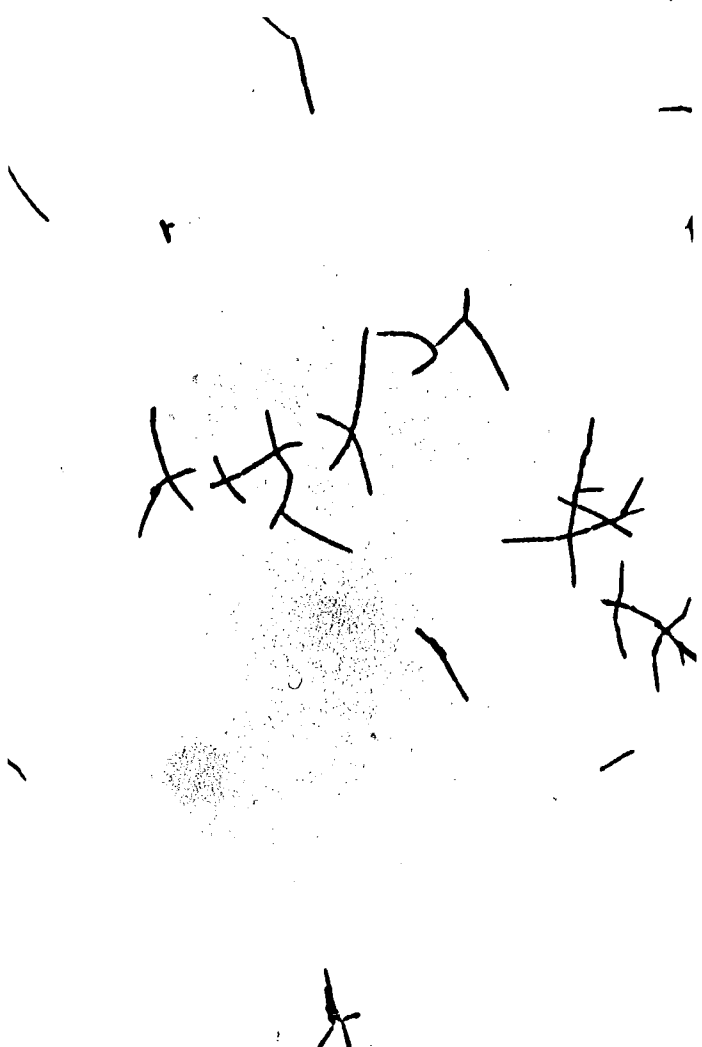


Fig. 4(b) Vier fase-contrast opnamen van logaritmicch groeiende Nocardia sp. 239 (De 2 ondersten 2 yn insedroqd.)



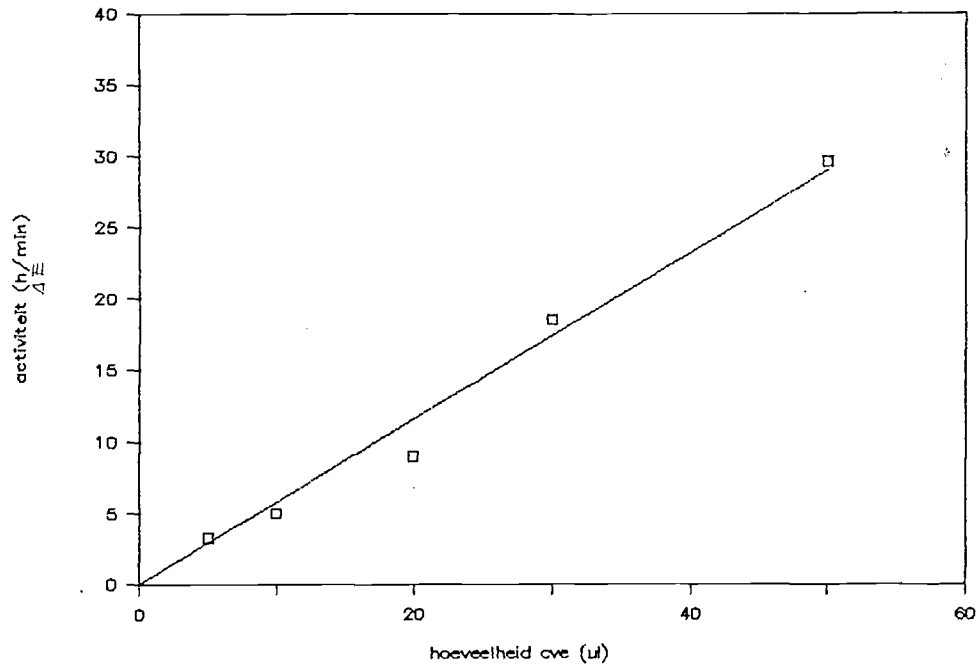


Fig. 5 De rechtevenredige relatie tussen hoeveelheid celvrij extract en de gemeten enzym activiteit.



Fig. 6 De relatie tussen eiwitconcentratie en OD 595 bij toevoeging van 3 ml. Bradford reagens aan 100 ul monster.

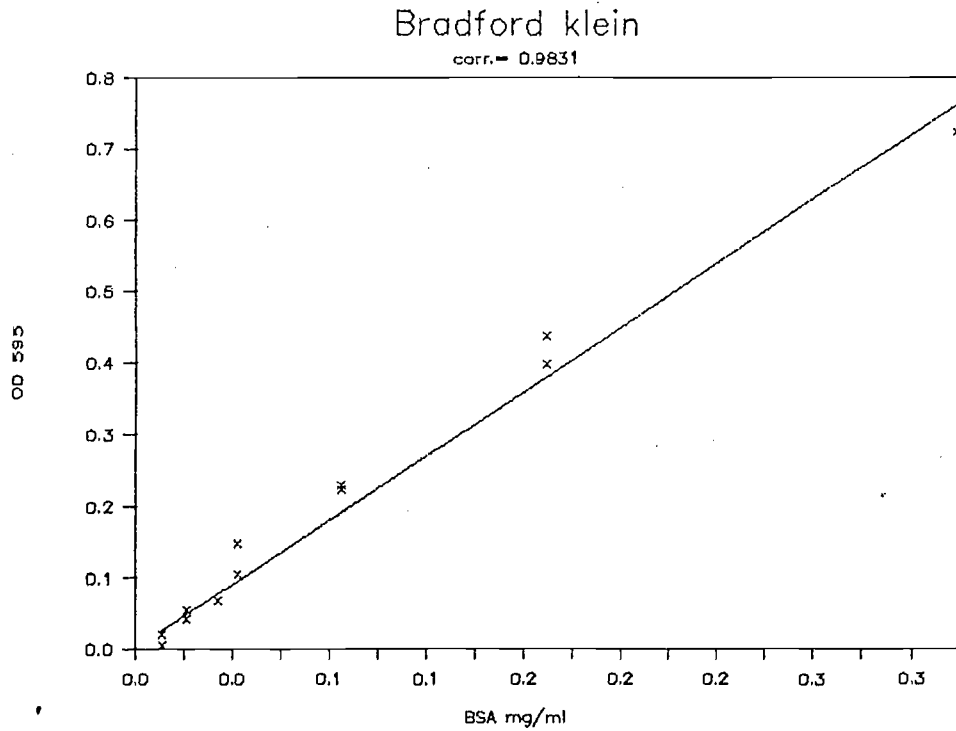


Fig. 7 De relatie tussen eiwitconcentratie en OD 595 bij toevoeging van 0.5 ml Bradford reagens aan 50 μ l monster.

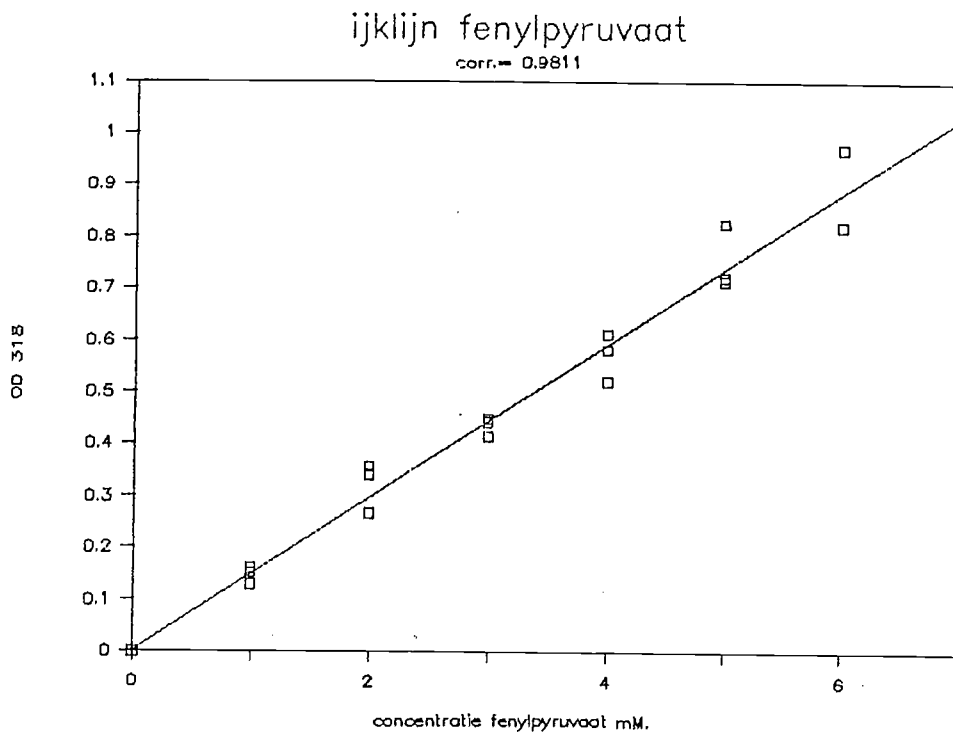


Fig. 8 De relatie tussen fenylpyruvaat concentratie en de OD 318 (10 μ l monster bij 1 ml 1 N NaOH)

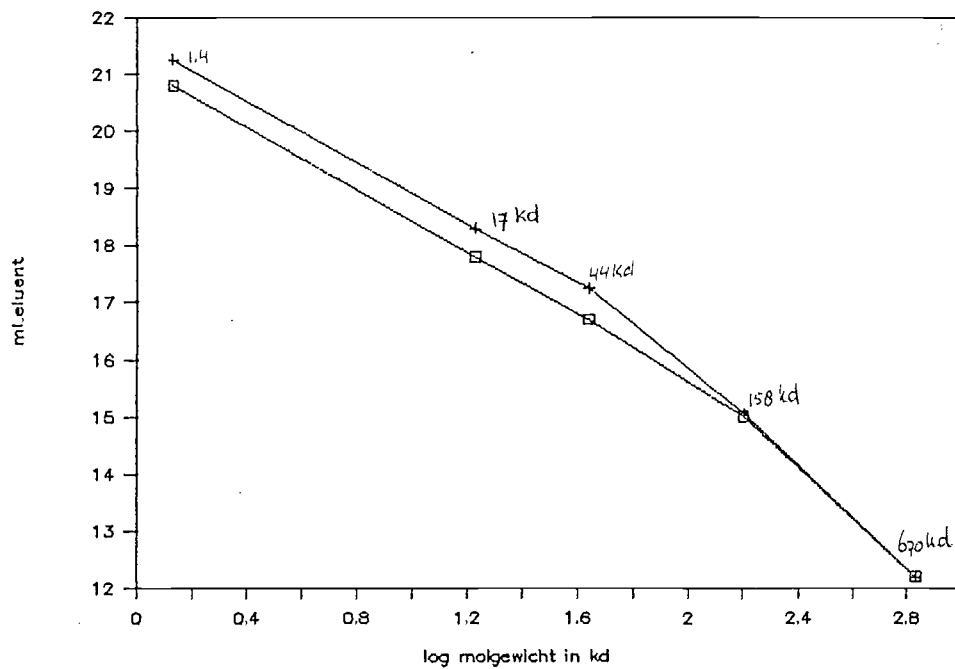


Fig. 9 De ijklijn voor de bepaling van eiwitgrootte m.b.v. gelfiltratie, voor en na regeneratie van de superose kolom.

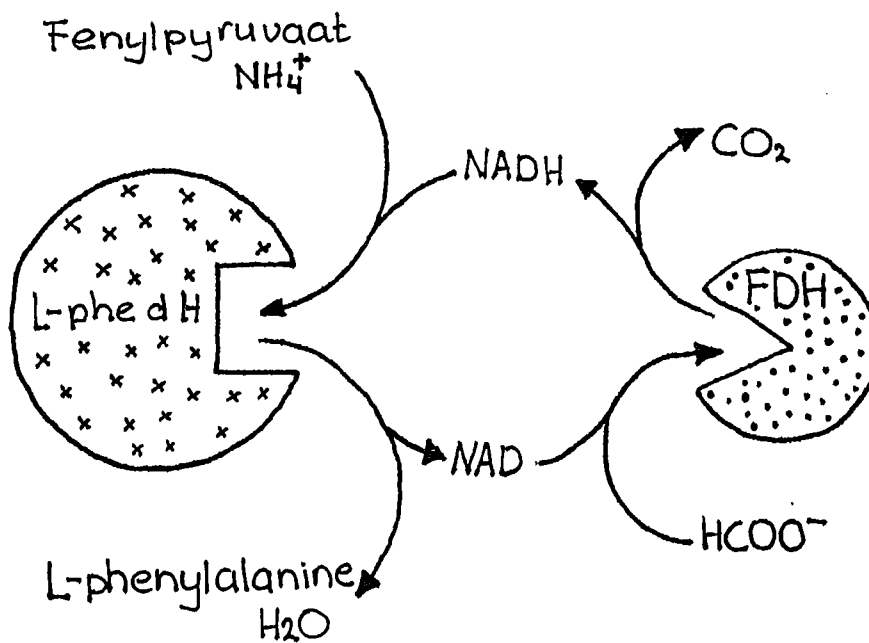
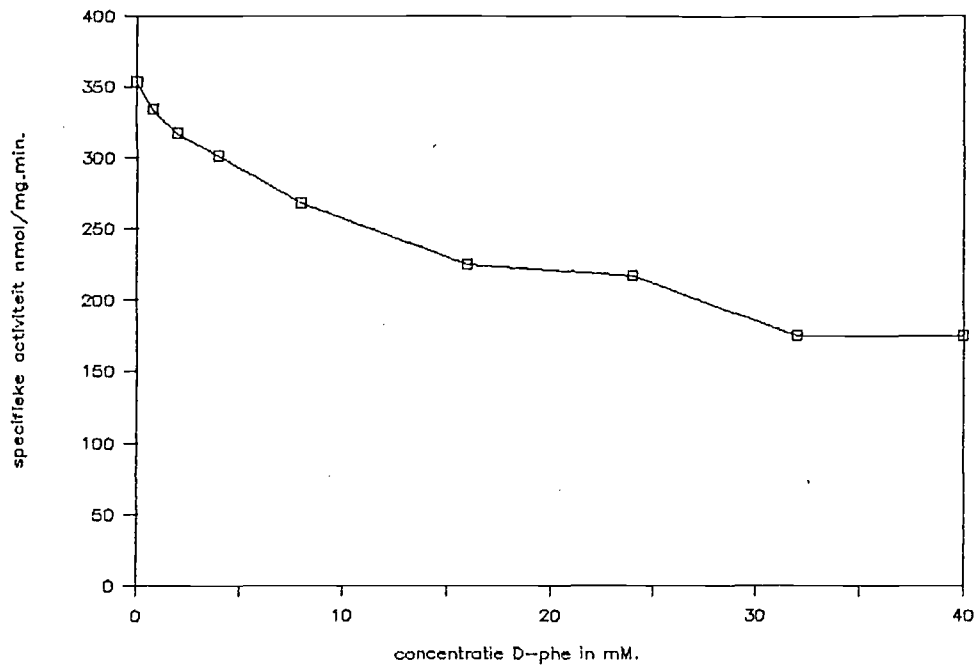
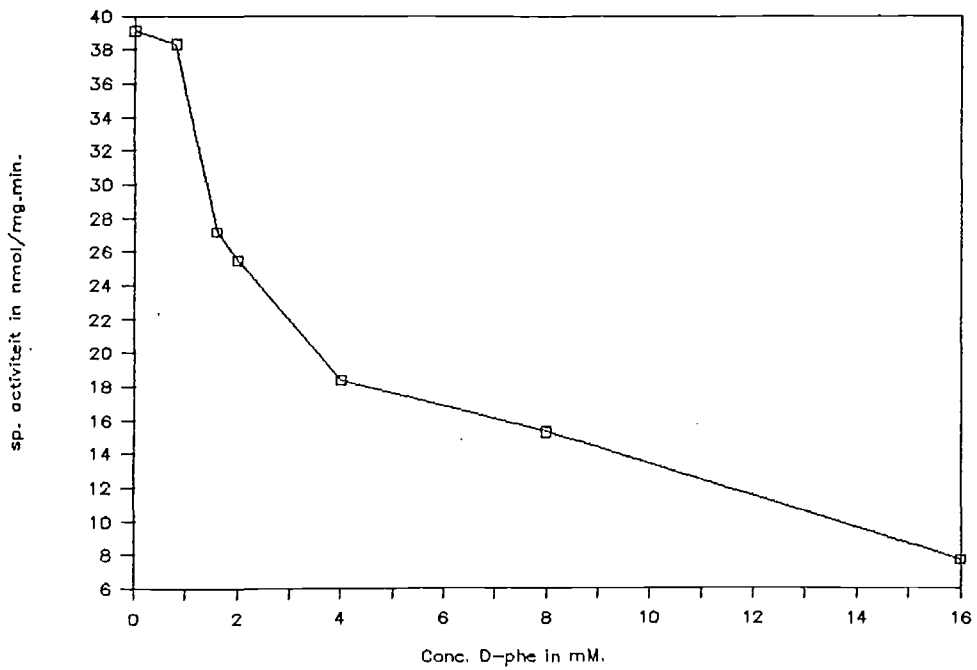


Fig. 10 Schema voor de productie van L-phenylalanine m.b.v. L-phenylalanine-dehydrogenase en het cofactorregenererende formiaat-dehydrogenase (Hummel 1986).



(a)



(b)

Fig. 11 De remmende werking van D-phenylalanine op:
 (a) de aminering van fenylpyruvaat en (b) de
 deaminering van L-phenylalanine

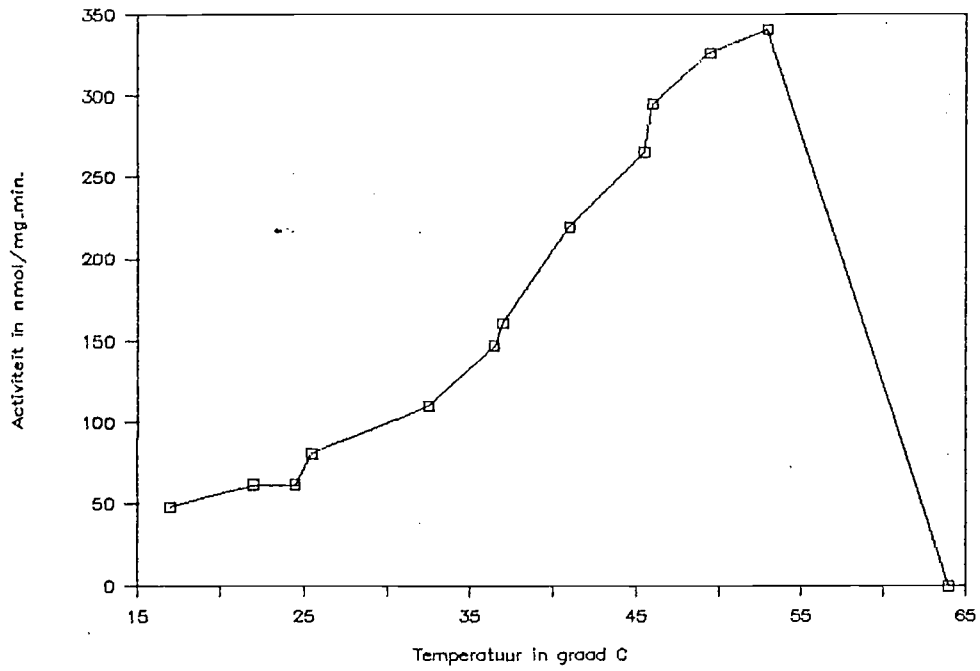


Fig. 12 Het pH-optimum van het L-phenylalanine dehydrogenase van Nocardia sp. 239, bepaald voor de aminerings reactie

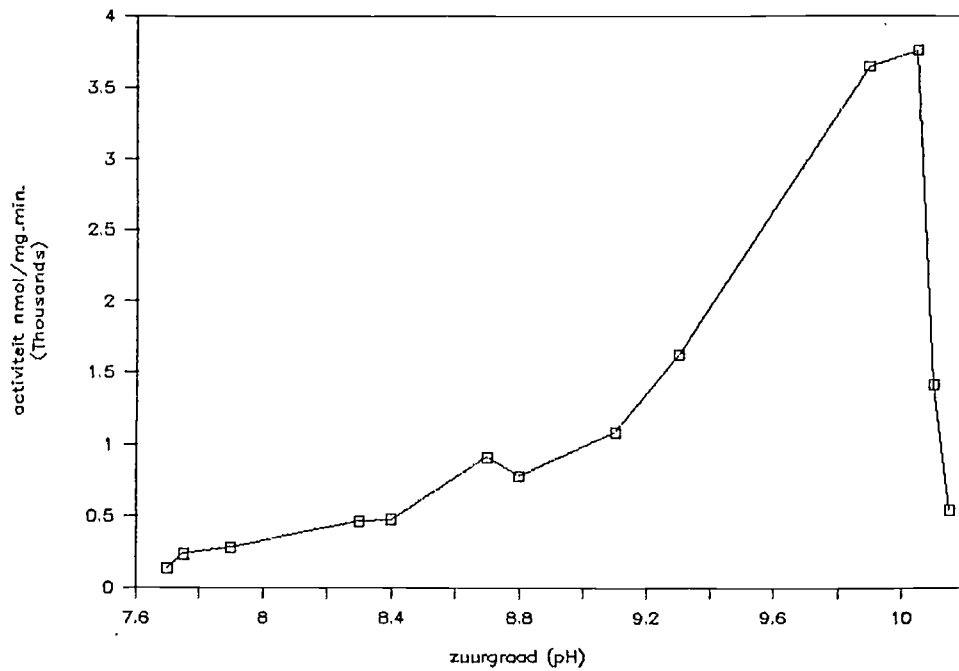


Fig. 13 Het temperatuur optimum van het L-phenylalanine-dehydrogenase van Nocardia sp.239, bepaald voor de aminerings reactie.

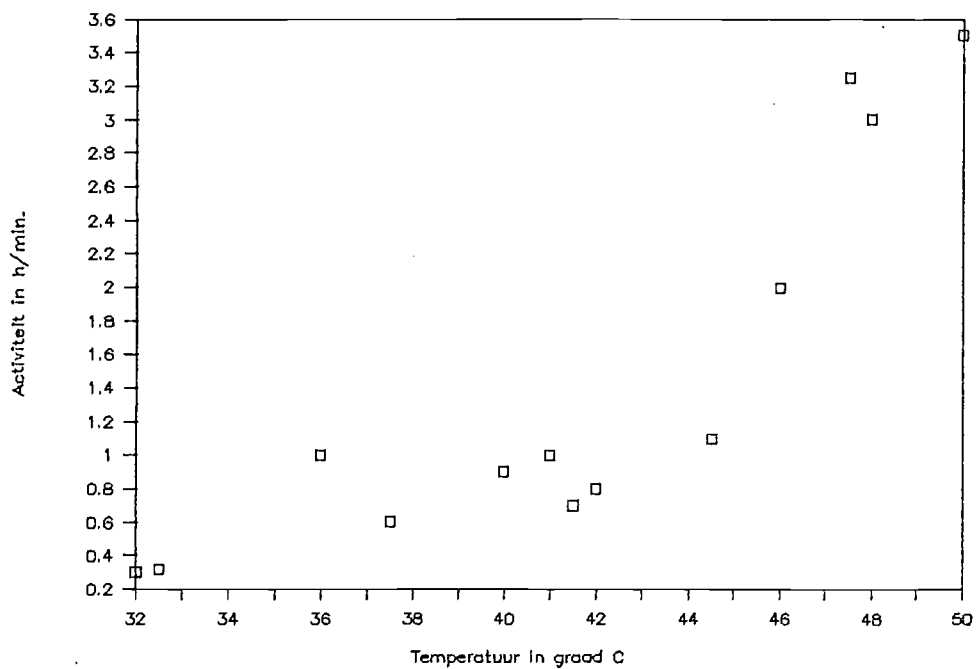


Fig. 14 De invloed van KCN op de OD 340 bij toenemende temperatuur.

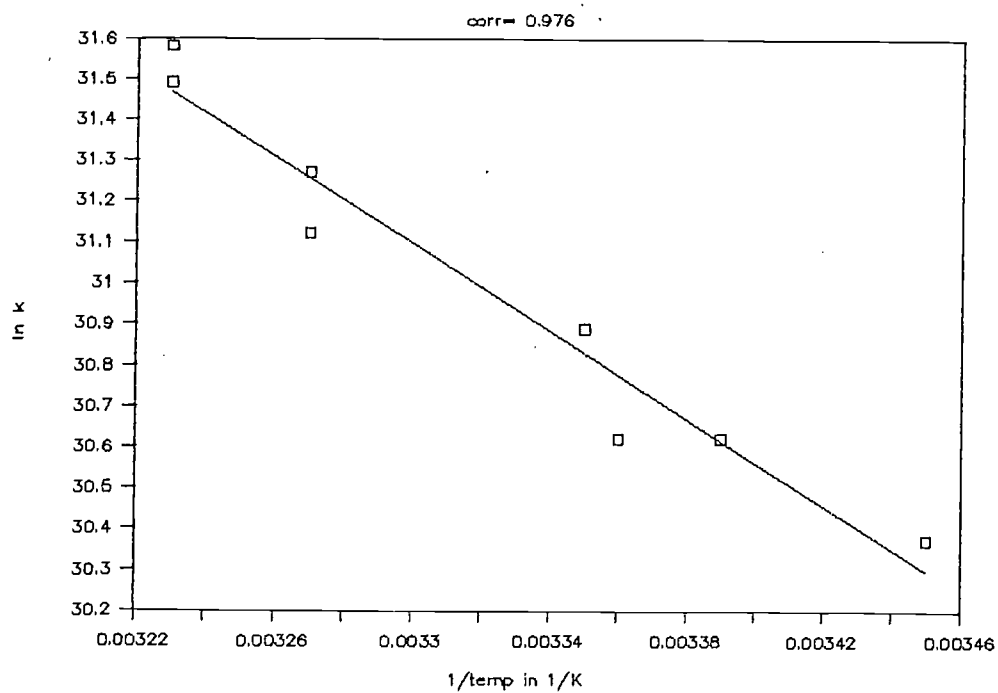


Fig. 15 De Arrhenius vergelijking voor de bepaling van de activeringsenergie van het L-phenylalanine-dehydrogenase van Nocardia sp.239 ($\ln k = 48.6 - 5317 1/T$).

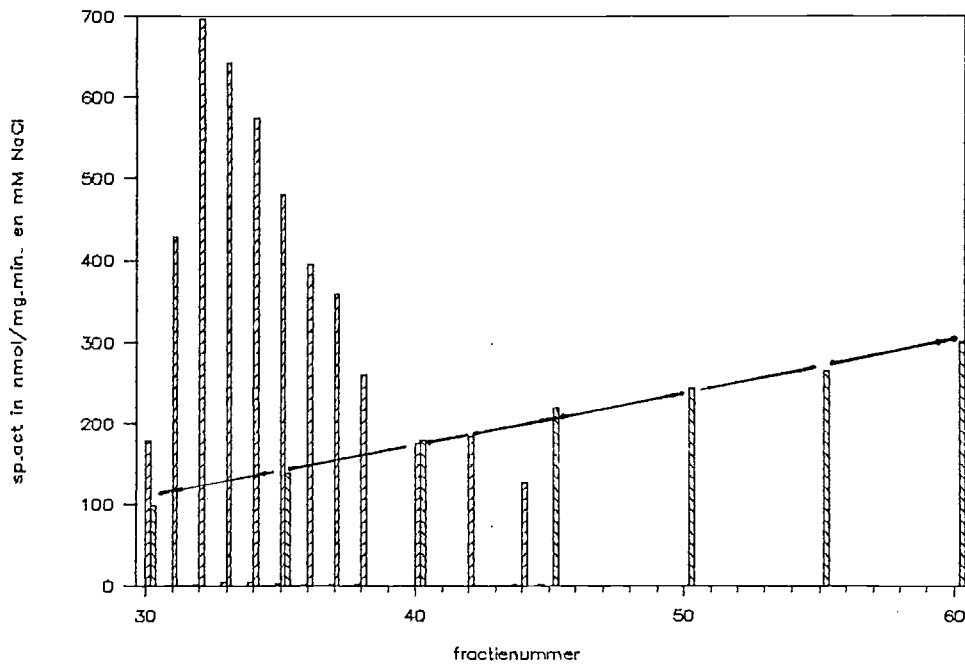
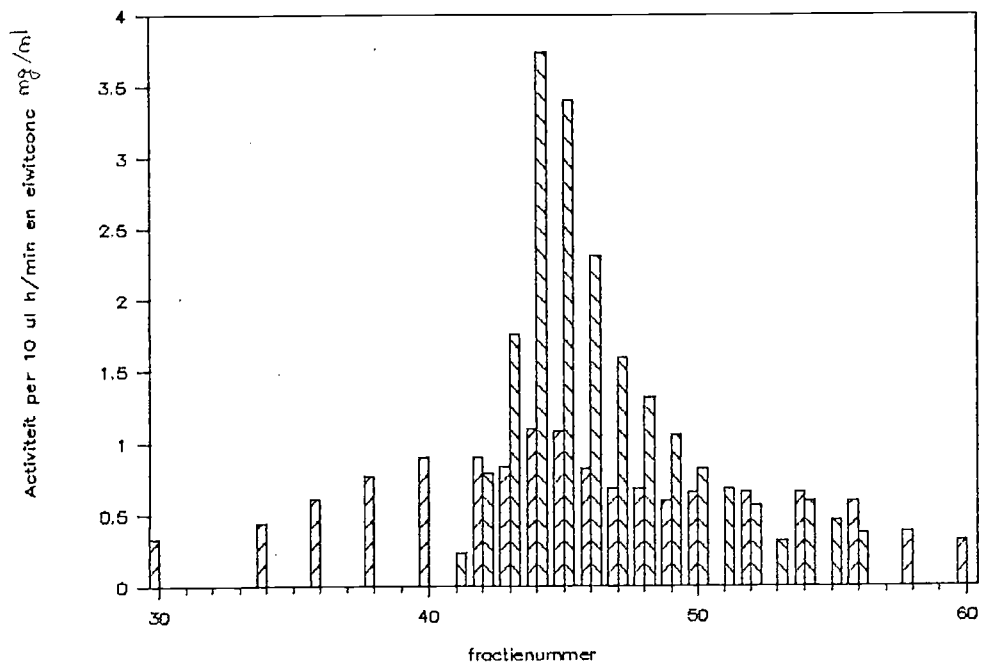


Fig. 16 De zuivering van cve met een DEAE-ionenwisselaar:
 (a) de activiteit en eiwitconcentratie in de fracties
 (b) de zoutconc. en specifieke activiteit van de fracties

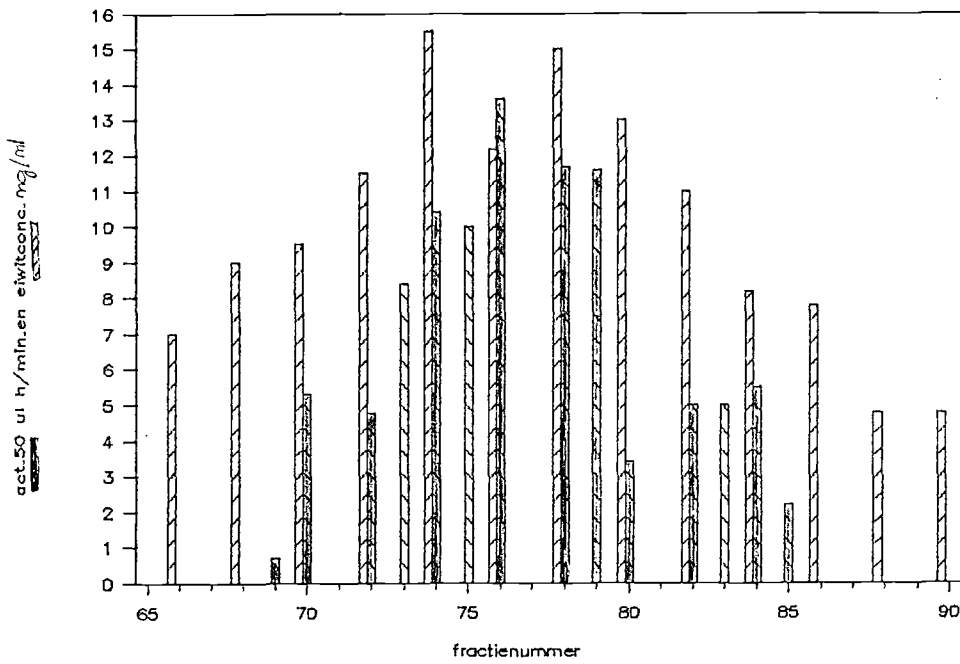


Fig. 17 De zuivering van DEAE-fracties m.b.v. G-200 gelfiltratie: eiwitconcentratie en activiteit van fracties.

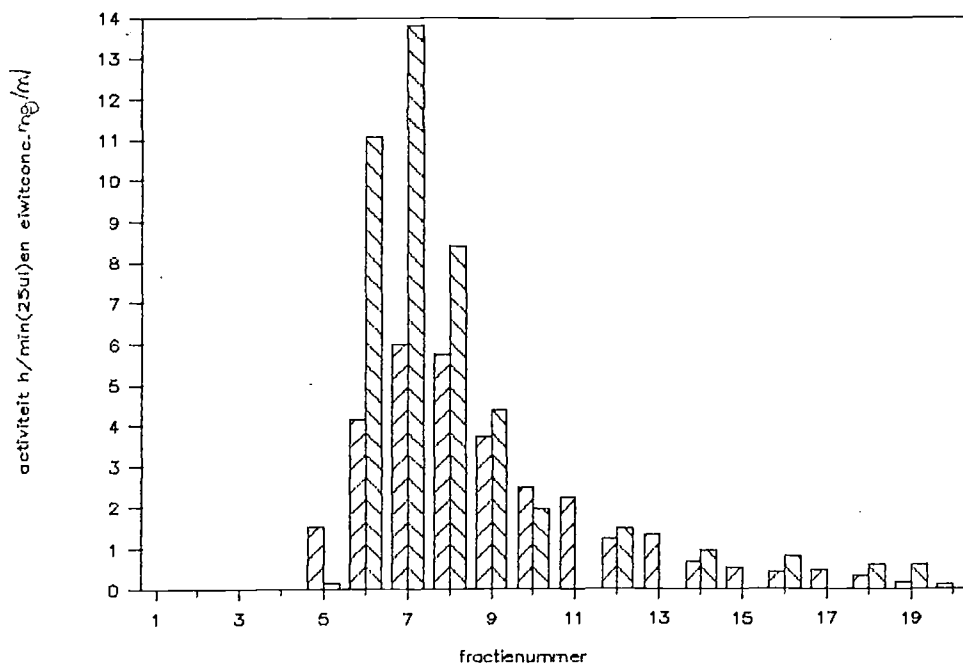


Fig. 18 Het eiwit/activiteit patroon voor een zuiveringspoging waarbij het enzym niet aan de L-phe agarosekolom bond (pH 7.8).

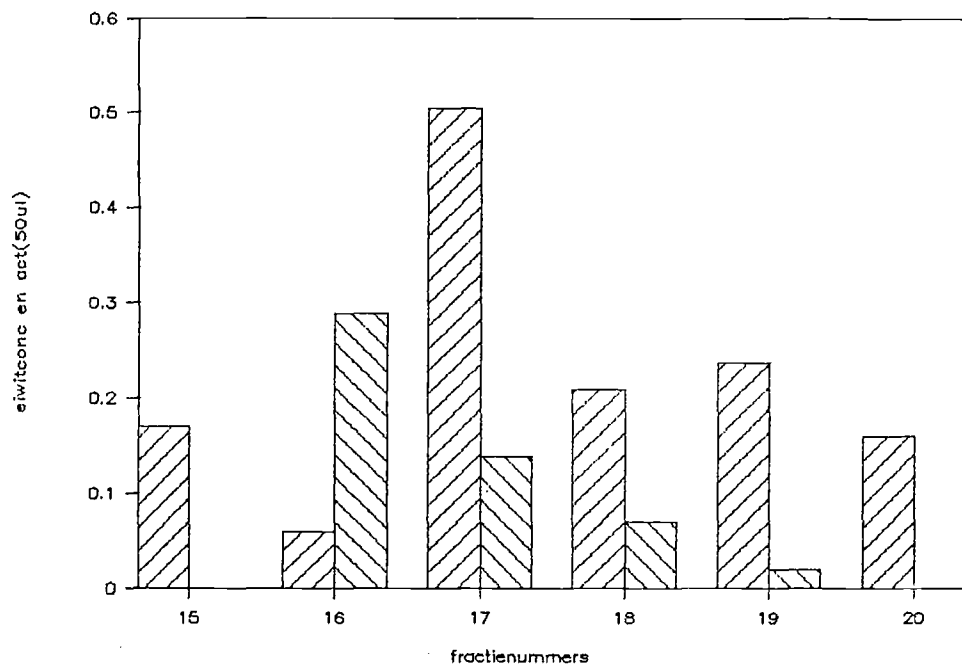
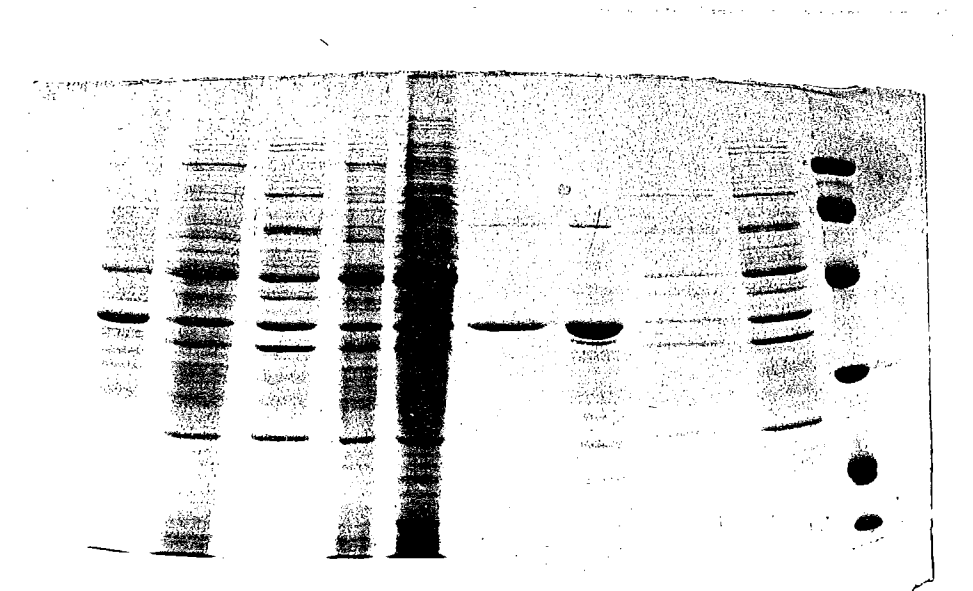


Fig. 19 Het eiwit/activiteit patroon voor de zuivering m.b.v. de L-phenylalanine agarosekolom bij ph 6, elutie pH 8.



(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10)

Fig. 20 SDS/PAA-gel met eiwitpatronen die bij verschillende zuiverings fasen behoren. De gel is gekleurd met comassie brilliant blue

- (1) na ammoniumprecipitatie
- (2), (4), (5) celvrij extract
- (3) na DEAE
- (6) na monoQ en Superose
- (7) na mono Q
- (8), (9) ander onderzoek
- (10) ijkmengsel

PLC
MONO Q

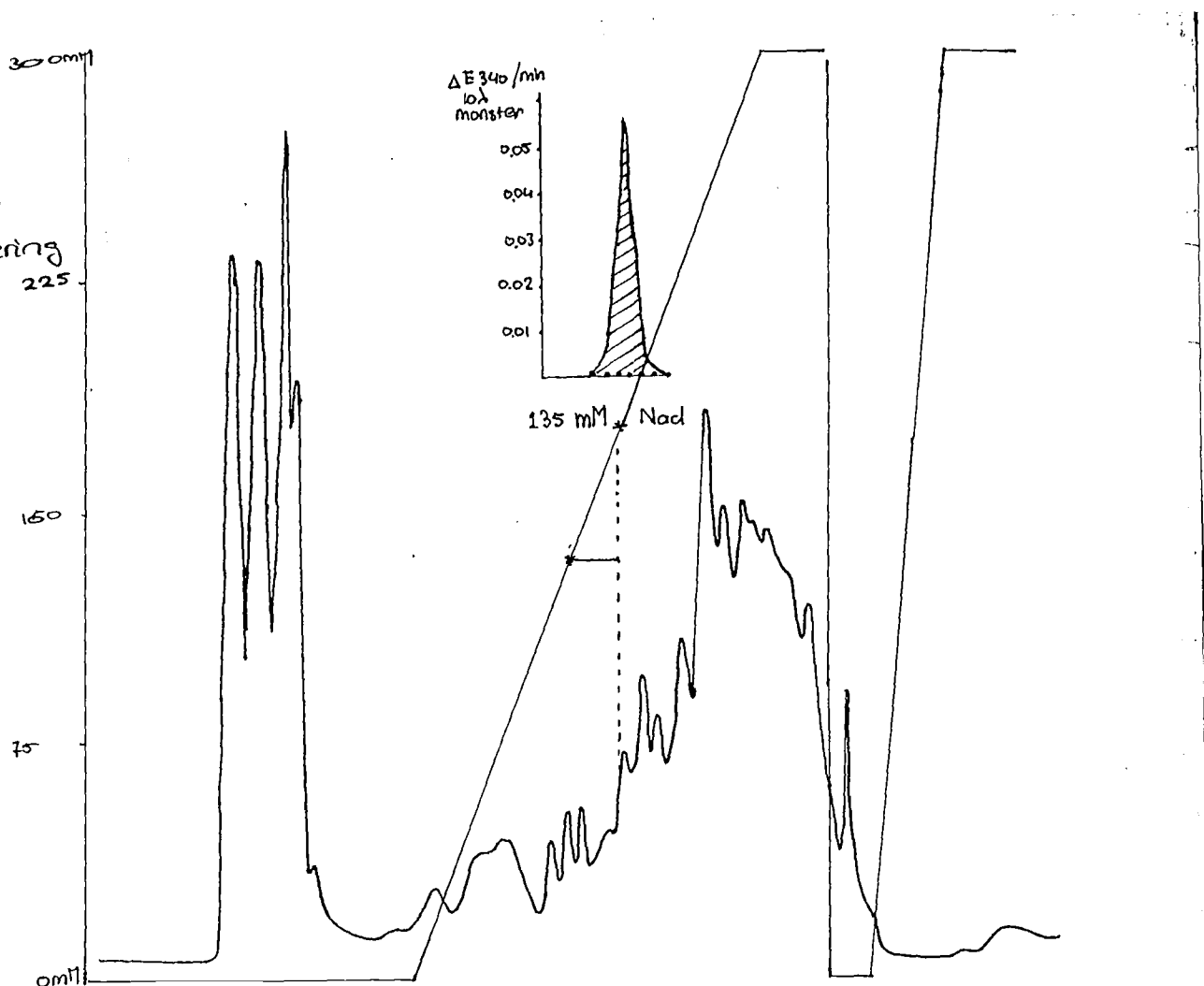
dry extract
voldige zuivering

300 ml
225
150
75
0 ml

$\Delta E_{340} / \text{min}$
10 λ
monster

0.05
0.04
0.03
0.02
0.01

135 mM NaCl



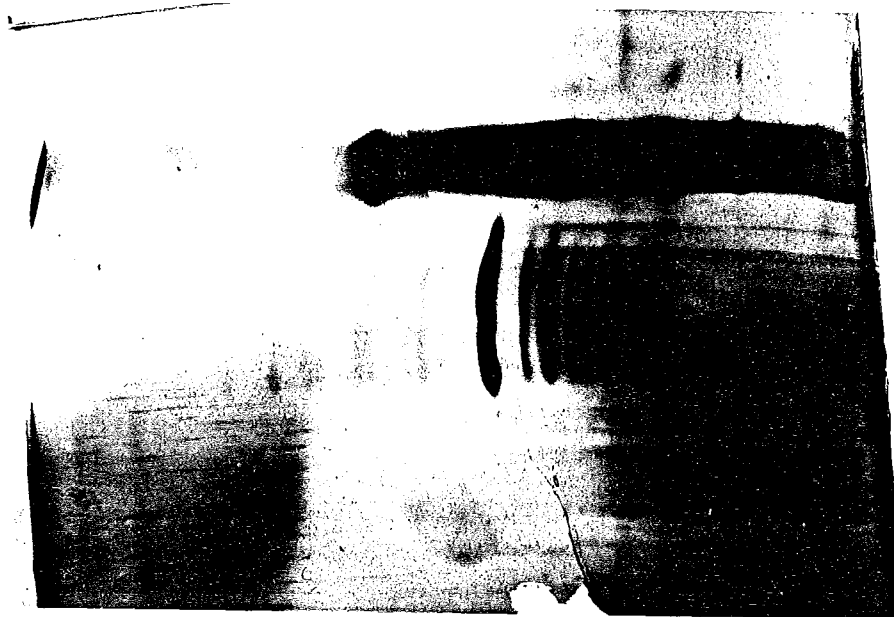


Fig. 21 SDS/PAA-gel van het partieel gezuiverde enzym (zilverkleuring)

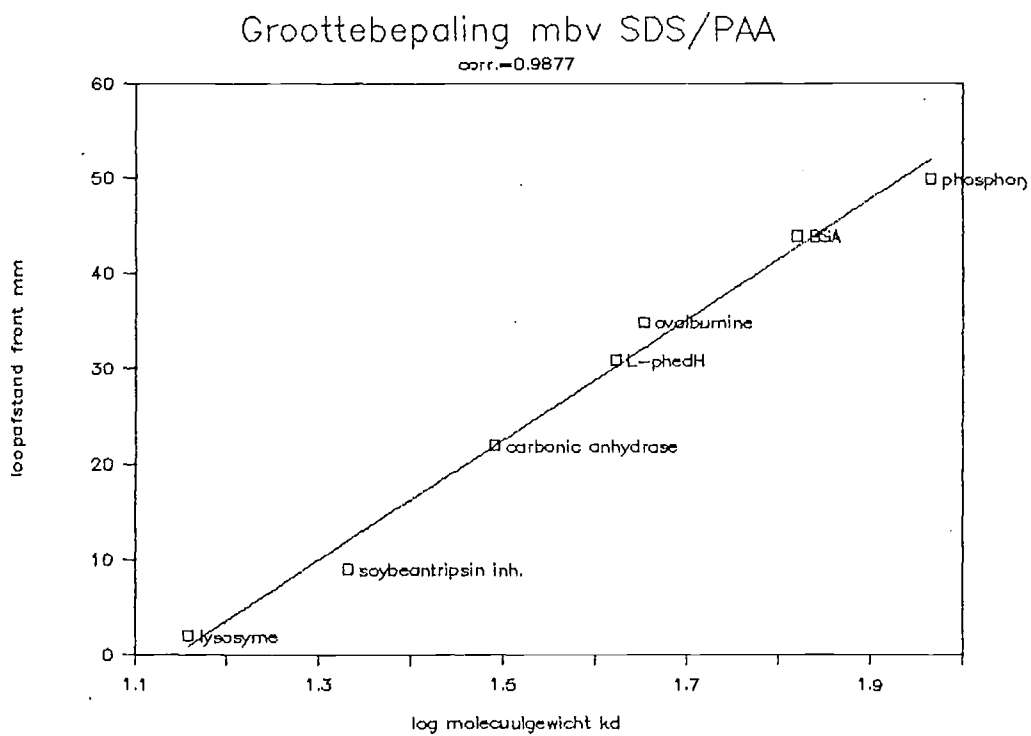


Fig. 22 Molecuulgewicht van het L-phenylalanine-dehydrogenase van Nocardia sp.239 m.b.v. SDS/PAA gelelectroforese.

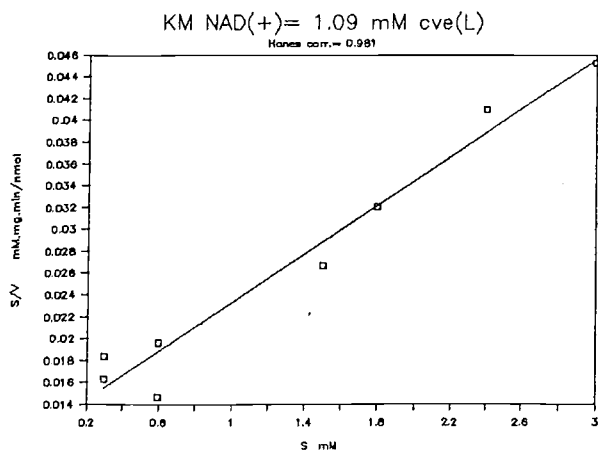
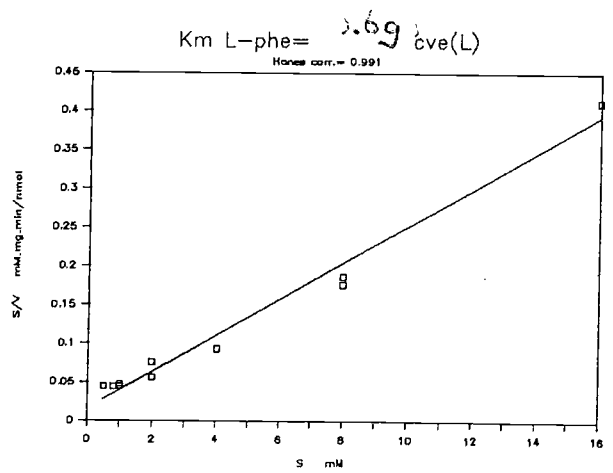
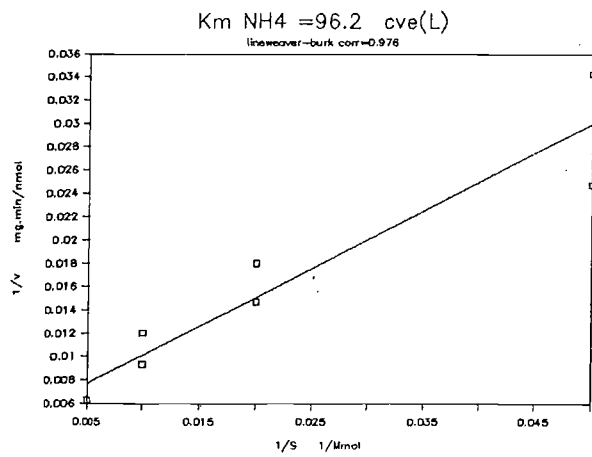


Fig. 23(a) Km waarden bepaald aan c.v.e.(L)

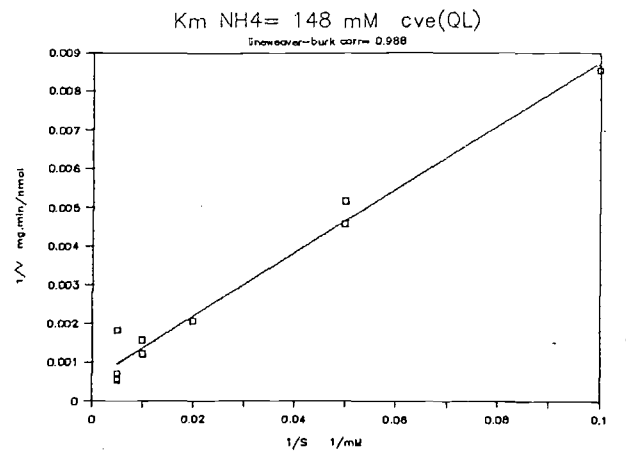
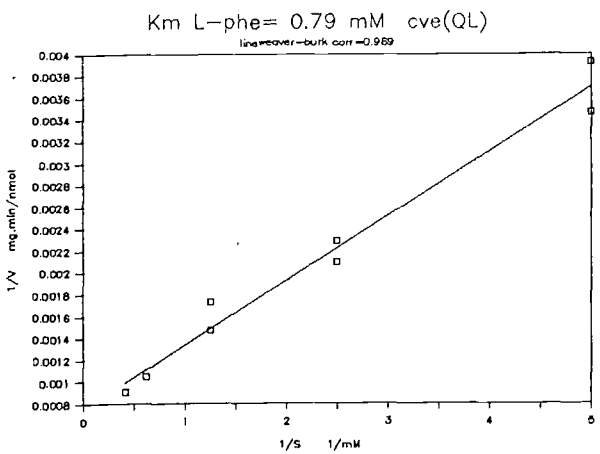
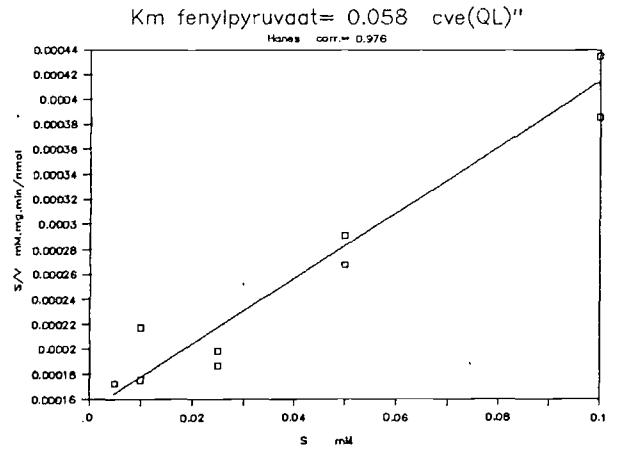
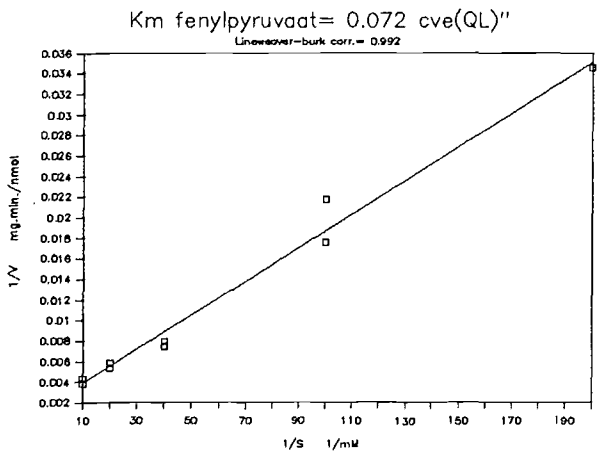
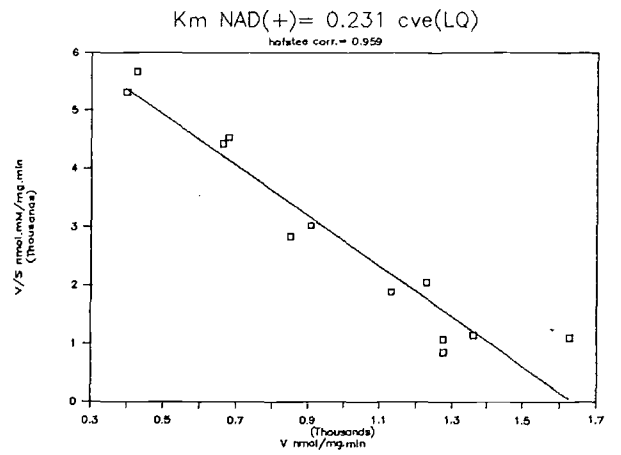
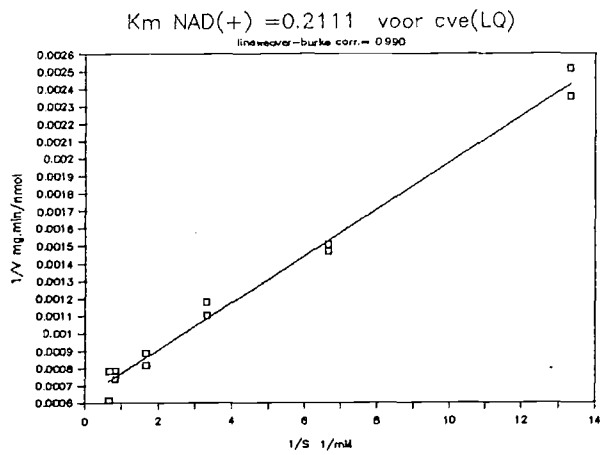


Fig. 23(b) Km waarden bepaald aan c.v.e.(QL)

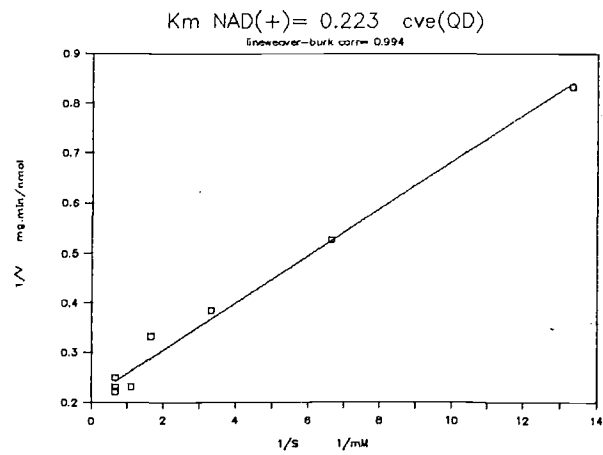
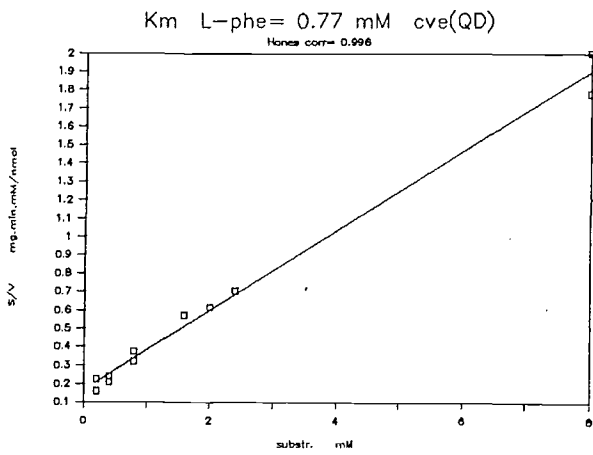
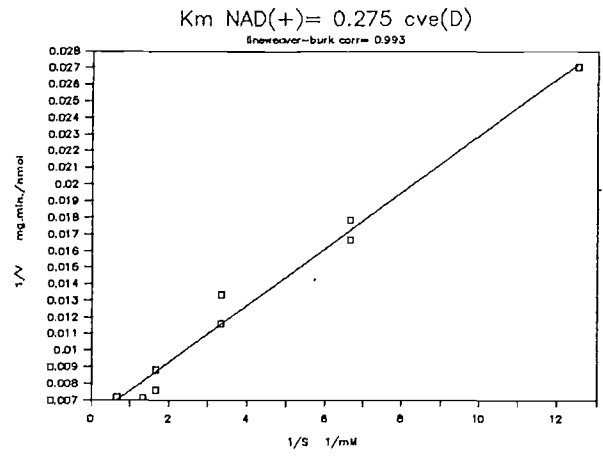
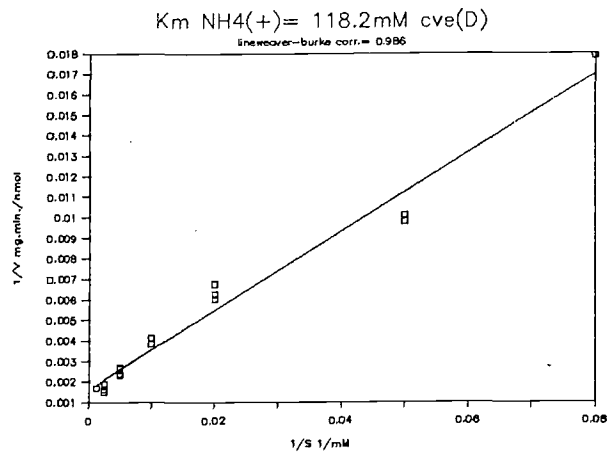
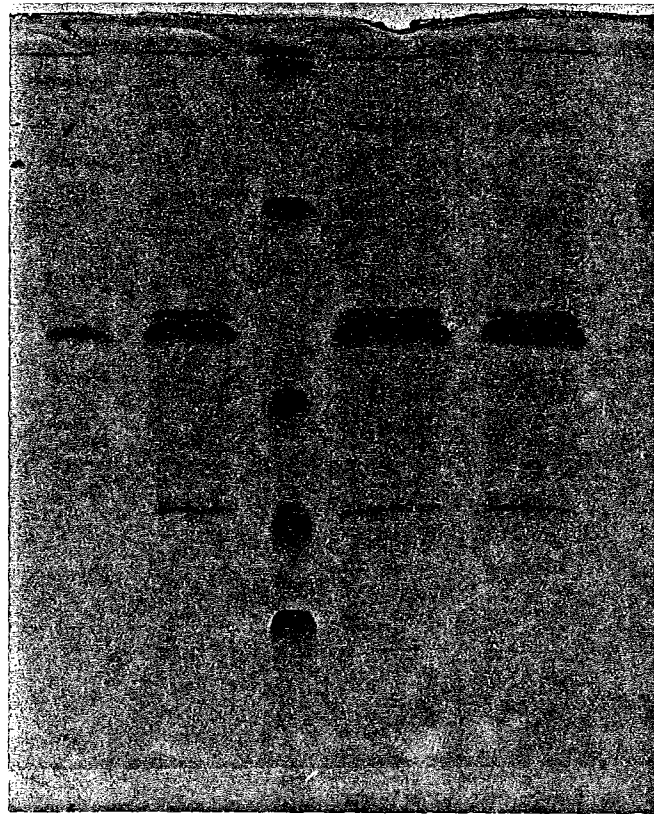


Fig. 23(c) Km waarden bepaald aan c.v.e(D) en c.v.e.(QD)



(a) (b) (c) (d) (e)

Fig. 24 De overeenkomst in grootte van het dehydrogenase geïnduceerd door L-phe en D-phe.
 (a) mono QL fractie
 (b), (d) mengsel van mono QL en mono QD fracties
 (c) marker eiwitten
 (e) mono QD fractie

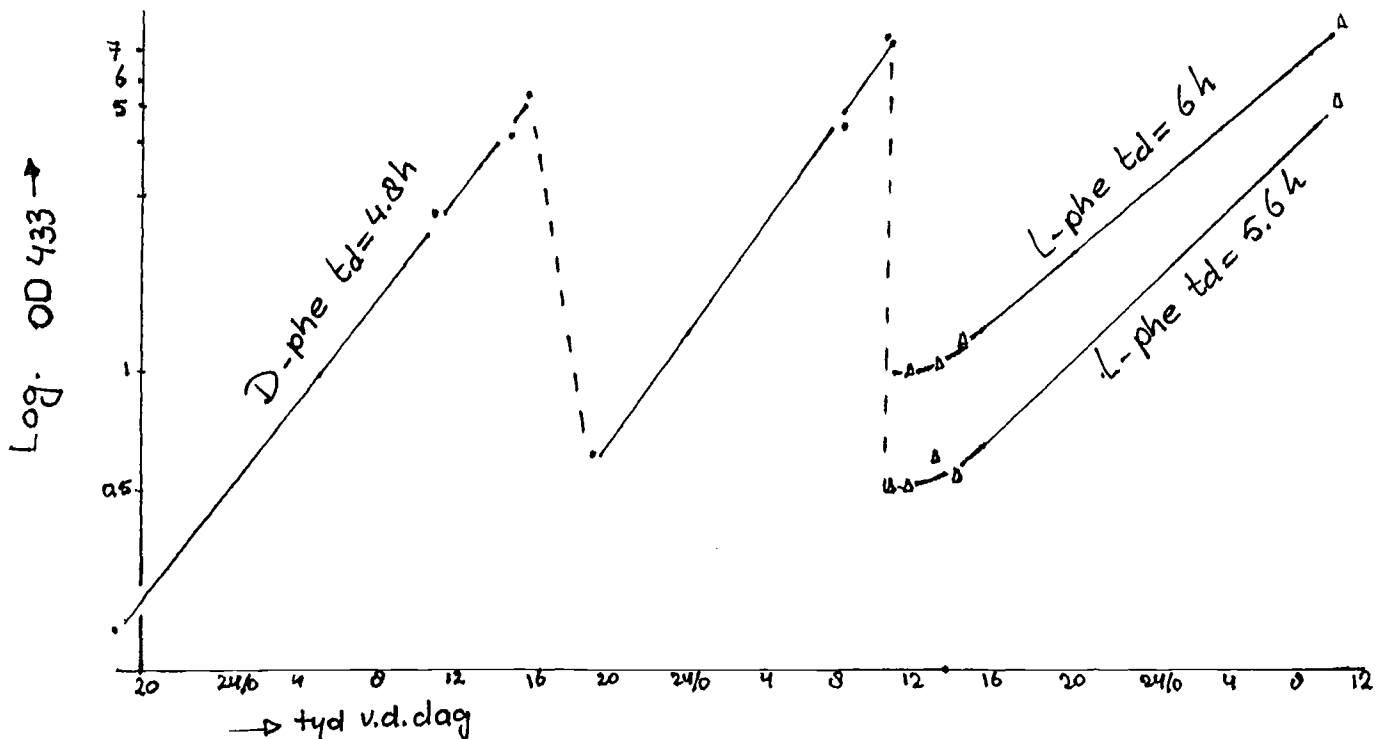


Fig. 25 Het verloop van de OD430 wanneer logaritmisches groeiende cellen worden overge"nt van D-phenylalanine naar L-phenylalanine.

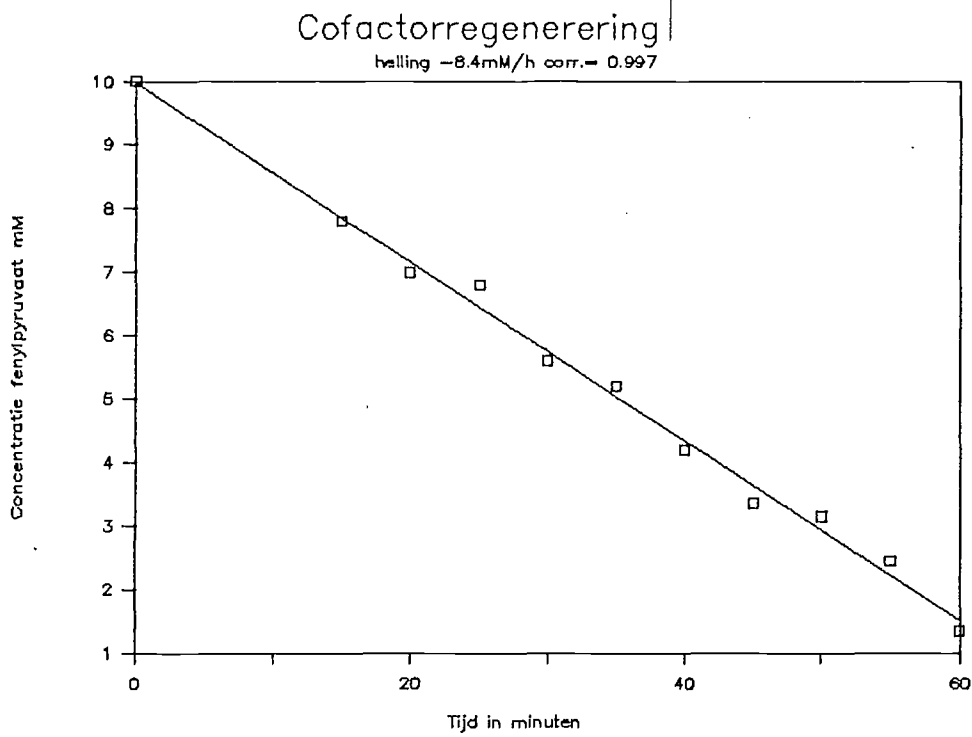


Fig. 26 Cofactorregenerering experiment 1

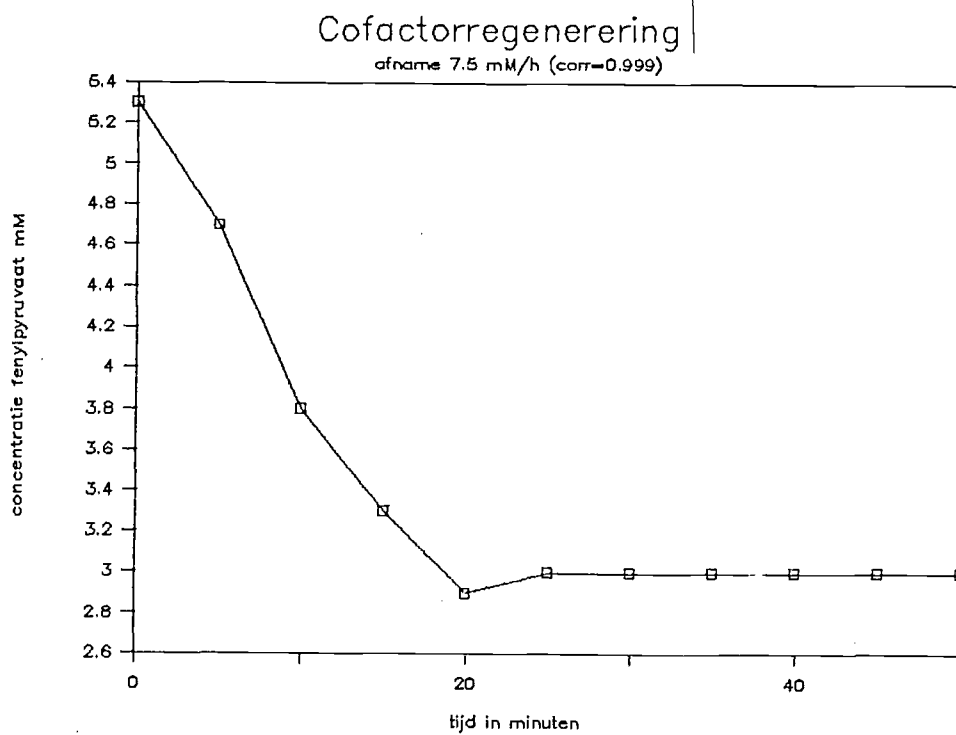


Fig. 27 - Cofactorregenerering experiment 2

Cofactorregenerering

afname 7.5 mM/h

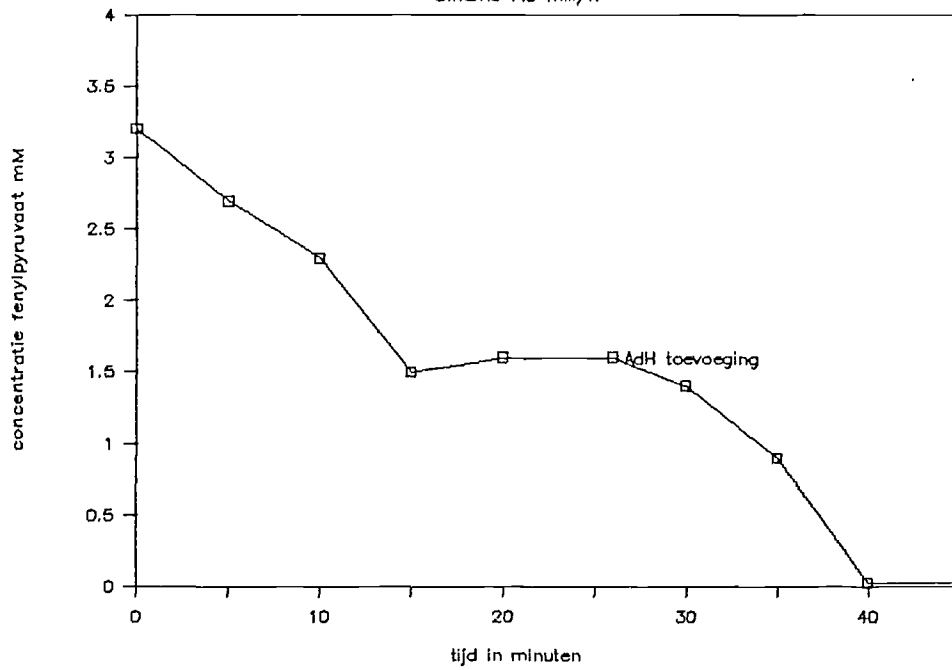


Fig. 28 Cofactorregenerering experiment 3

Cofactorregenerering

initiele afname 104mM/h

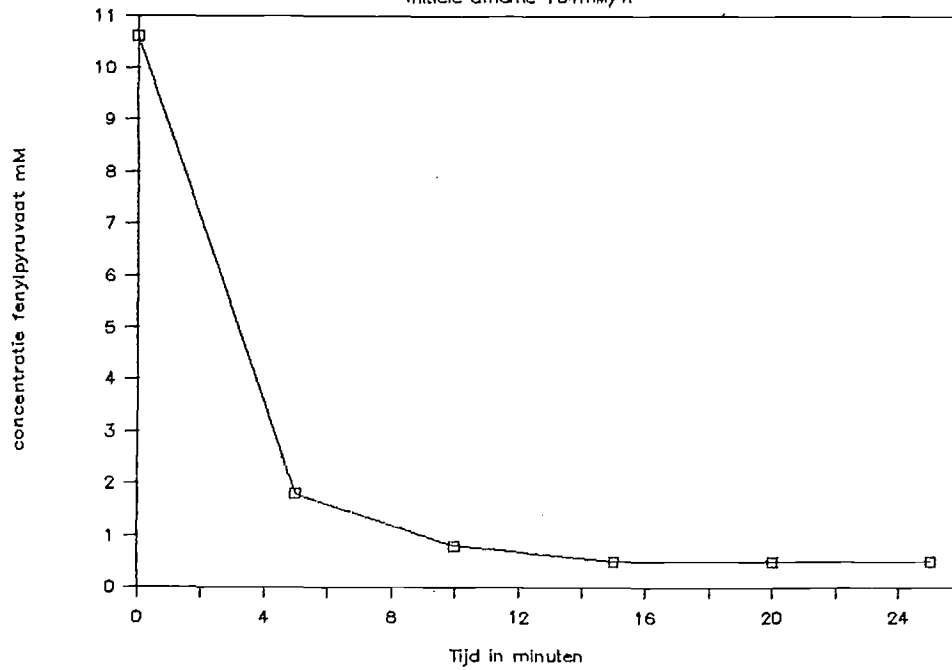


Fig. 29 Cofactorregenerering experiment 4

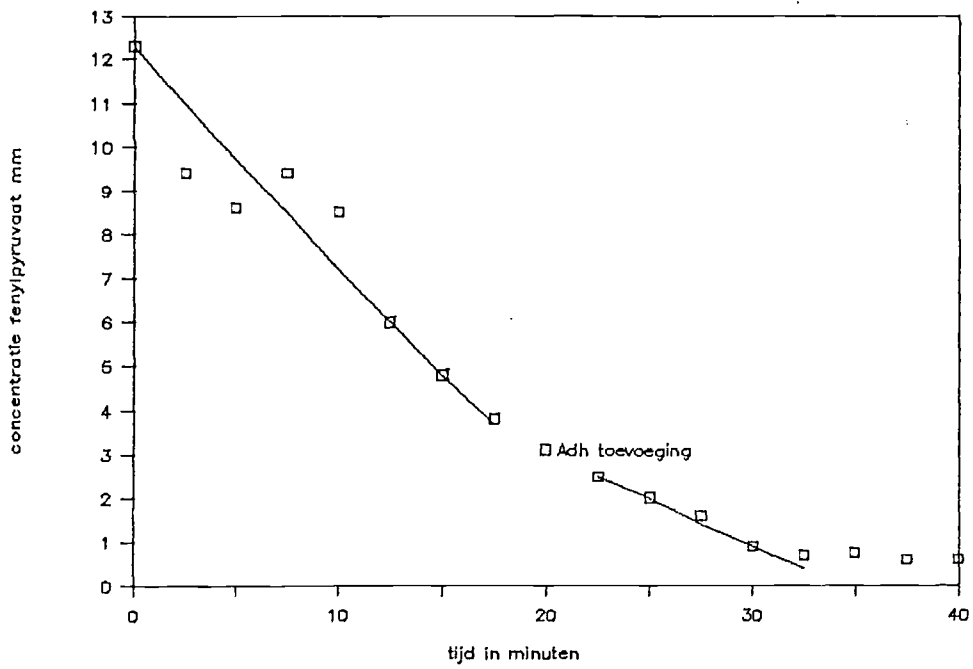


Fig. 30 Cofactorregenerering experiment 5

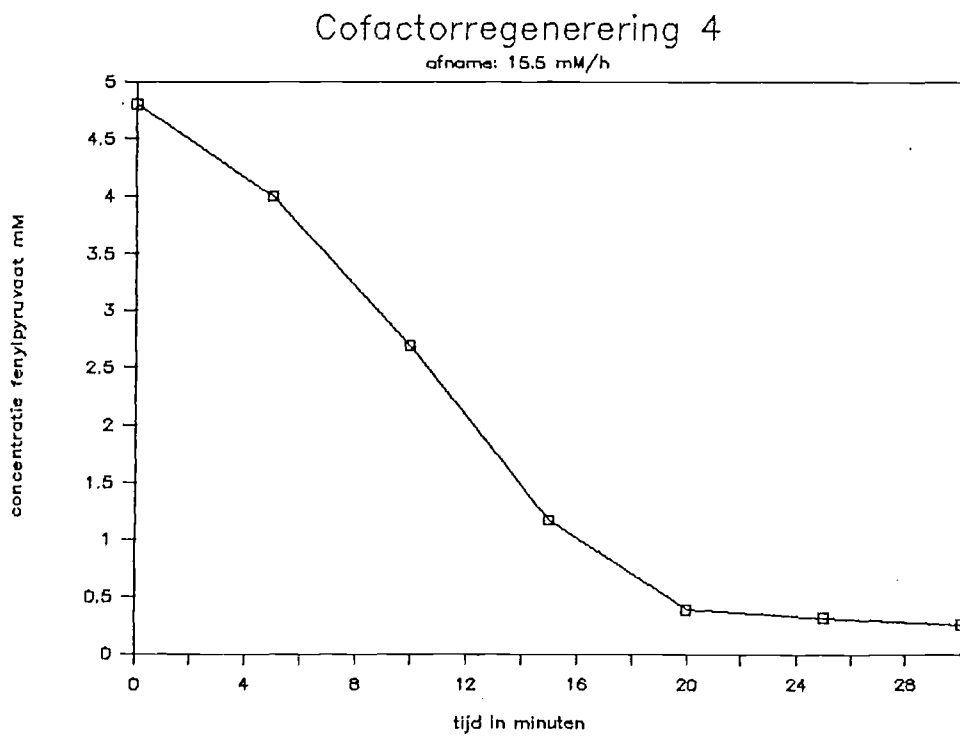


Fig. 31 Cofactorregenerering experiment 6