

Quantitative Bestimmung primärer aliphatischer Alkohole (C₆—C₁₀) mit Hilfe einer pyridinnukleotidunabhängigen Alkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas putida*

Sibylle Vorberg, Wulfdieter Schöpp* und Hermann Tauchert

Bereich Biochemie der Sektion Biowissenschaften, Karl-Marx-Universität
Leipzig, DDR-7010 Leipzig, Deutsche Demokratische Republik

(Eingegangen 12. Oktober 1982. Angenommen 17. Januar 1983)

*Enzymatic Determination of Primary Aliphatic Alcohols (C₆—C₁₀) with an
NAD(P)-Independent Alcohol Dehydrogenase from Pseudomonas putida*

A new enzymatic method for microdetermination of longer chain alcohols has been established with *NAD(P)*-independent alcohol dehydrogenase from an alkane-oxidizing strain of *Pseudomonas putida*. The alcohols were estimated spectrophotometrically by measuring the formazan formation from the corresponding tetrazolium salt. Amounts of longer chain alcohols up to 3 nmol could be assayed by reading the endpoint of the reaction, even in presence of a 1000-fold excess of ethanol.

(*Keywords*: Longer chain alcohols; *NAD(P)*-Independent alcohol dehydrogenase; *Pseudomonas putida*; Tetrazolium salt)

Einleitung

Enzymatische Alkoholbestimmungen, insbesondere Ethanolbestimmungen, sind seit langem bekannt^{1,2}. Zunächst wurden hierzu ausschließlich die *NAD*⁺-abhängigen Alkoholdehydrogenasen aus Hefe bzw. aus Pferdeleber (EC 1.1.1.1.) eingesetzt. Schwierigkeiten ergaben sich vor allem aus der ungünstigen Gleichgewichtslage. So ist ein befriedigender Umsatz nur bei Einsatz hoher *NAD*⁺-Konzentrationen und in Anwesenheit Carbonylgruppen-bindender Reagenzien zu erzielen. Allerdings sind Bestimmungen auch dann nur unter Zuhilfenahme von Eichkurven möglich. Besser sollten sich *NAD(P)*-unabhängige Enzyme eignen, die eine quantitative Alkohoxydation bewirken. Dies wurde sowohl für pyridinnukleotidunabhängige Alkoholdehydrogenasen (EC

1.1.99.8)³⁻⁶ als auch für Alkoholoxidasen (EC 1.1.3.13)⁷ anhand des Methanol- bzw. Ethanolumsatzes nachgewiesen.

Bisher bestehen praktisch keine Möglichkeiten zur enzymatischen Bestimmung längerkettiger Alkohole. Zwar besitzen alle beschriebenen Alkoholdehydrogenasen auch die Fähigkeit zur Oxydation solcher Alkohole, die Umsatzgeschwindigkeiten liegen aber meistens extrem niedrig, und die Anwesenheit kleinster Mengen kurzkettiger Alkohole würde sich außerordentlich störend auswirken. Solche Bestimmungen sollten jedoch mit einem Enzym möglich sein, das in einem Stamm von *Pseudomonas putida* bei Wachstum auf *n*-Alkanen induktiv gebildet wird^{8,9}. Es katalysiert ausschließlich die Oxydation primärer, aliphatischer Alkohole, wobei die höchsten Geschwindigkeiten beim Umsatz von Hexanol erzielt werden. Demgegenüber wird Ethanol erheblich langsamer, Methanol dagegen überhaupt nicht oxydiert¹⁰. Das Enzym, dessen prosthetische Gruppe noch nicht ermittelt werden konnte, wurde als *NAD(P)*-unabhängige Alkoholdehydrogenase klassifiziert¹⁰. Dadurch sollte es, ähnlich wie entsprechende pyridinnukleotidunabhängige Methanol- bzw. Ethanoldehydrogenasen, für quantitative-Alkoholbestimmungen besonders geeignet sein.

Material und Methoden

Chemikalien

Jodnitrotetrazoliumchlorid, Phenazinmethosulfat (Chemapol; Brno, ČSSR); 2,6-Dichlorphenolindophenol, Hexanol, Heptanol, Octanol, 2,4-Hexadien-1-ol (Ferak; Berlin-West); Nonanol, Decanol (Fluka AG; Buchs, Schweiz); Ethanol, Propanol, Butanol, Pentanol, Gelatine (VEB Laborchemie Apolda, DDR).

Enzymgewinnung

Die pyridinnukleotidunabhängige Alkoholdehydrogenase wurde aus *Pseudomonas putida* ATCC 17633^{8,11-13} gewonnen. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte in einem Medium, das pro l folgende Bestandteile enthielt:

K_2HPO_4 , 7,46 g; NaH_2PO_4 , 0,54 g; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 20 mg; $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 20 mg; $Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6 H_2O$, 10 mg.

Als N-Quelle diente $(NH_4)_2SO_4$ (1 g/l). Als C-Quelle wurde *n*-Hexan in gasförmigem Zustand eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C in einem 10l-Fermentationsgefäß bei einem Füllinhalt von 7l Flüssigkeit (Fermentor Biofer, VR Ungarn).

Die Kultur wurde mit einem konstanten Luft/Hexan-Gemisch (3l Luft/h, 0,015% Hexan enthaltend) bei einer Rührgeschwindigkeit von 800 min⁻¹ versorgt. Nach 20–30 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet. Das erhaltene Sediment wurde in 0,05 mol/l Na-Phosphatpuffer *pH* 7,5 resuspendiert ($E_{600}^{1\text{cm}} \sim 20$) und anschließend durch Ultraschallbehandlung bei 4 °C zerstört⁹. Nach Zentrifugation bei 15 000 × *g* für 30 min befinden sich mindestens 60% der Alkoholdehydrogenase-Aktivität im zellfreien Überstand. Nach

Präzipitation des Enzyms durch Zusatz von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Konzentration von 40% Sättigung wurde zentrifugiert und das Sediment $2 \times$ mit einer Ammoniumsulfatlösung gleicher Konzentration gewaschen. Die Hauptmenge des Enzyms wurde aus dem verbleibenden Präzipitat durch Behandlung mit 20% gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung herausgelöst. Die Lagerung erfolgte nach Dialyse des durch Zentrifugation bei $15\,000 \times g$ erhaltenen Überstandes gegen eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (70% Sättigung). Der Proteingehalt einer solchen Suspension — bestimmt nach der Methode von *Lowry et al.*¹⁴ — beträgt 8–10 mg/ml, die spezifische Aktivität liegt bei 0,15–0,3 U/mg.

Enzymtests

Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgte in einem Standardtest durch Messung der Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol bei 600 nm [$\epsilon = 19$ ($1 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)] und 25°C. Der 2-ml-Testansatz enthielt 0,045 mmol/l 2,6-Dichlorphenolindophenol, 1,63 mmol/l Phenazinmethosulfat und $200 \mu\text{mol/l}$ Hexanol in 0,05 mol/l Na-Pyrophosphatpuffer *pH* 8,7 und das Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Hexanols gestartet. Die quantitative Bestimmung längerkettiger Alkohole (C_6 – C_{10}) erfolgte auf der Basis der Formazanbildung aus Jodnitrotetrazoliumchlorid bei 500 nm [$\epsilon = 14,4$ ($1 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)] und 25°C. Der 3-ml-Testansatz enthielt 0,67 mmol/l Jodnitrotetrazoliumchlorid, 1 – $10 \mu\text{mol/l}$ des Alkohols und ca. 40 mU Enzym in 0,05 mol/l Na-Pyrophosphatpuffer *pH* 8,5 (1 g/l Gelatine enthaltend). Die Reaktion wurde mit Substrat gestartet. Die Messungen erfolgten an einem Photometer Chiratic IX (Chirana, ČSSR) mit digitaler Meßwertanzeige.

Zum Nachweis der Stöchiometrie des Umsatzes wurde 2,4-Hexadien-1-ol als Substrat verwendet. Gemessen wurde sowohl die Abnahme des Alkohols bei 228 nm [$\epsilon = 31$ ($1 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)] als auch die Bildung von 2,4-Hexadien-1-al bei 278 nm [$\epsilon = 29$ ($1 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)] durch zeitabhängige Aufnahme von UV-Differenzspektren an einem Spektrometer DK 2A (Beckman Instruments). Die 2-ml-Testansätze (verwendet wurden Tandemküvetten) enthielten nach Start der Reaktion ca. $10 \mu\text{mol/l}$ 2,4-Hexadien-1-ol und ca. 30 mU des Enzyms in 0,05 mol/l Na-Pyrophosphatpuffer *pH* 8,5.

Ergebnisse und Diskussion

Zielstellung der Untersuchungen war es, eine Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung längerkettiger Alkohole nach der Endwertmethode zu finden. Die Nutzung des zur Aktivitätsbestimmung verwendeten Standardtests auf der Basis von Phenazinmethosulfat und 2,6-Dichlorphenolindophenol ist wegen der leichten Reoxydierbarkeit des reduzierten Farbstoffs hierfür ungeeignet. Besser sollte sich daher der Einsatz eines Tetrazoliumsalzes eignen, wie es zur Sichtbarmachung der Enzymbanden in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet wird. Allerdings muß die sehr geringe Wasserlöslichkeit des gebildeten gefärbten Formazans berücksichtigt werden. Durch Zusatz eines farbstoffbindenden Proteins zum Testansatz kann diese Schwierigkeit jedoch leicht umgangen werden.

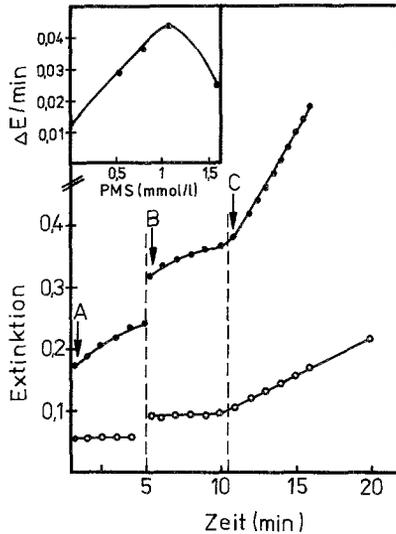


Abb. 1. Nachweis der enzymatischen Hexanolyxidation auf Basis der Formazanbildung bei pH 8,5 und $25^{\circ}C$ in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Phenazinmethosulfat (*PMS*). Zugabe von 0,67 mmol/l Jodnitrotetrazoliumchlorid (A), 40 mU Enzym (B), 0,23 mmol/l Hexanol (C); 1,08 mmol/l *PMS* (●), ohne *PMS* (○)

Abb. 1 zeigt, daß der Nachweis der enzymatischen Alkoholyxidation auf diese Weise möglich ist. Ungünstig, insbesondere für Endwertbestimmungen, ist jedoch das beträchtliche Ausmaß der Farbstoffbildung, die durch Phenazinmethosulfat allein verursacht wird. Die Tatsache, daß nach Enzymzugabe die Situation überraschenderweise günstiger wird, ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit von Superoxiddismutase im Präparat zurückzuführen, die die Bildung reduzierend wirkender O_2 -Radikale verhindert. Aus der Abb. 1 geht hervor, daß eine Formazanbildung auch ohne Zusatz von Phenazinmethosulfat nachweisbar ist. Obwohl die Geschwindigkeit des enzymatischen-Umsatzes erheblich niedriger ist, eignet sich ein solcher Ansatz für quantitative Bestimmungen besser, da hier die Reaktion in Abwesenheit des Substrates kaum eine Bedeutung besitzt. Wir haben daher zunächst versucht, auf dieser Basis aus der gebildeten Formazanmenge die eingesetzte Alkoholmenge zu bestimmen. Am Beispiel der Oxydation des 2,4-Hexadien-1-ol läßt sich zeigen, daß zwischen der Menge an umgesetztem Alkohol und gebildetem Aldehyd bzw. Formazan eine exakte Stöchiometrie besteht (Tab. 1).

Tabelle 1. *Stöchiometrie des Umsatzes von 2,4-Hexadien-1-ol durch Alkoholdehydrogenase aus Ps. putida bei 25°C.* Die Bestimmung von Alkohol- bzw. Aldehydkonzentration erfolgte durch Aufnahme von UV-Differenzspektren (230—300 nm) in Tandemküvetten. Nach Mischen aller Bestandteile enthielt der 2-ml-Testansatz 8 nmol 2,4-Hexadien-1-ol und 30 mU Enzym in 0,05 mol/l Na-Pyrophosphatpuffer *pH* 8,5. Im Referenzstrahlengang verblieben Substrat und Enzym über die gesamte Meßzeit (35 min) in getrennten Kammern. Unter sonst gleichen Bedingungen wurde der Versuch in Anwesenheit von 2 μ mol Jodnitrotetrazoliumchlorid unter Zusatz von Gelatine (1 g/l) durchgeführt

2,4-Hexadien-1-ol verbraucht ($\Delta E_{228\text{ nm}}$)	2,4-Hexadien-1-al gebildet ($\Delta E_{278\text{ nm}}$)	Formazan gebildet ($\Delta E_{500\text{ nm}}$)
7,8 nmol	7,6 nmol	7,8 nmol

Die Reaktion ist unter den angegebenen Bedingungen nach maximal 25 min beendet. Bemerkenswert ist, daß sich auch bei weiterer Inkubationszeit über einen Zeitraum von 3 h die Extinktion bei 278 nm nicht ändert. Da sich das Absorptionsmaximum der korrespondierenden Säure bei 253 nm befindet, kann eine Weiterreaktion des gebildeten Aldehyds ausgeschlossen werden. Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, als die Versuche mit einem nur grob gereinigten Enzympräparat durchgeführt wurden.

Ähnlich wie in diesem Fall läßt sich auch am Beispiel der Hexanoloxidation nachweisen, daß innerhalb von 20 min genau die Menge Formazan entsteht, die sich bei quantitativem Umsatz des eingesetzten Alkohols bilden dürfte (Abb. 2). Dies gilt auch dann, wenn man mehrfach Hexanol in den gleichen Testansatz gibt. Im untersuchten Konzentrationsbereich verhält sich die gebildete Farbstoffmenge zur eingesetzten Hexanolmenge eindeutig proportional.

In Abb. 3 ist ausgewiesen, daß unter den oben gewählten Testbedingungen die Reaktion optimal abläuft (*pH* 8,5; ca. 0,67 mmol/l Jodnitrotetrazoliumchlorid; ca. 40 mU Enzym). Ein Zusatz von NH_4 -Ionen bewirkt — im Gegensatz zur *NAD(P)*-unabhängigen Methanoldehydrogenase — keinerlei Aktivitätssteigerung. In ähnlicher Weise wie Hexanol wurden im Konzentrationsbereich von 1—10 μ mol/l auch Heptanol, Octanol, Nonanol und Decanol innerhalb von 20 min quantitativ umgesetzt, wobei mit Kettenverlängerung des Substrates eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit festzustellen ist. Untersucht man dagegen die Reaktion kurzkettiger Alkohole (C_2 — C_5), findet man im Konzentrationsbereich 10 μ mol/l bei gleicher Meßzeit keinerlei Formazanbildung. Erst bei Einsatz sehr viel höherer Alkoholkonzen-

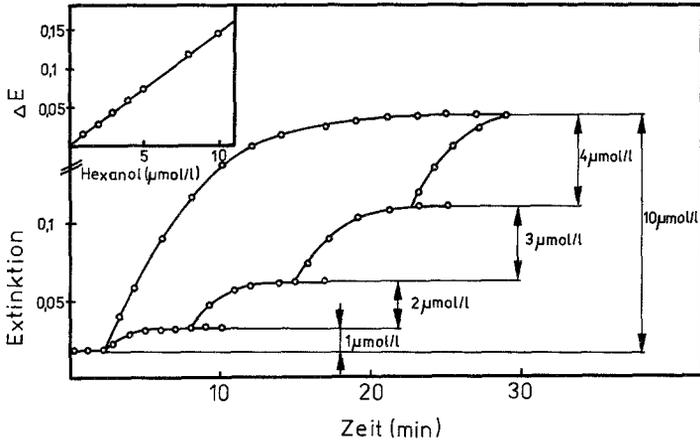


Abb. 2. Quantitativer Umsatz von Hexanol durch pyridinnukleotid unabhängige Alkoholdehydrogenase (40 mU) aus *Pseudomonas putida* bei pH 8,5 und $25^{\circ}C$ in Anwesenheit von $0,67$ mmol/l Jodnitrotetrazoliumchlorid. Die Reaktion wurde mit Hexanol gestartet, das in Konzentrationen von 1, 2, 3 und $4 \mu\text{mol/l}$ nacheinander in den gleichen Testansatz gegeben wurde. In einem getrennten Testansatz wurde die Reaktion in Anwesenheit von $10 \mu\text{mol/l}$ Hexanol gemessen

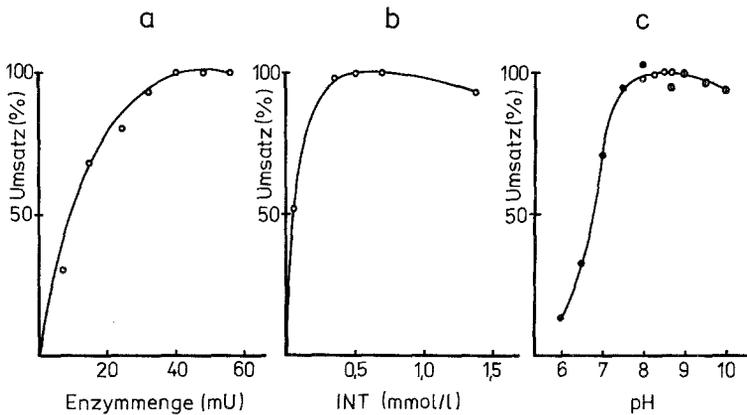


Abb. 3. Abhängigkeit des enzymatischen Hexanolumsatzes von der Enzymmenge (a), der Konzentration an Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT) (b) und dem pH -Wert (c). Die 3-ml-Testansätze enthielten jeweils $10 \mu\text{mol/l}$ Hexanol sowie $0,67$ mmol/l INT (a, c) bzw. 40 mU Enzym (b, c) in Na-Pyrophosphatpuffer $0,05$ mol/l pH 8,5 (a, b). Bei Variation des pH -Wertes wurden Na-Pyrophosphat- (○), Na-Phosphat- (●), und Na-Glycinat- (⊖) puffer, jeweils in einer Konzentration von $0,05$ mol/l verwendet. Die Reaktionszeit betrug 20 min

Tabelle 2. Umsatz der primären, aliphatischen Alkohole (C₂—C₁₀) durch Alkoholdehydrogenase aus *Ps. putida* bei 25 °C (Testansatz siehe Material und Methoden)

Alkohol	µmol/3 ml Testansatz	Umsatz nach 20 min in (%)
Ethanol	30—300	0,02
1-Butanol	0,1—1	5
1-Pentanol	3,6—45	0,1
1-Hexanol	0,003—0,03	100
1-Heptanol	0,003—0,03	100
1-Octanol	0,003—0,03	100
1-Decanol	0,003—0,03	100

trationen läßt sich ein geringer Umsatz nachweisen (Tab. 2). Es ist daher ohne weiteres möglich, kleinste Mengen langkettiger Alkohole bei gleichzeitiger Anwesenheit eines 100—1000-fachen Überschusses von Ethanol enzymatisch zu bestimmen. Der Meßfehler der Methode liegt — abhängig von der eingesetzten Alkoholmenge — zwischen 5—10%.

Literatur

- ¹ Kaplan N. O., Ciotti M. M., *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., Hrsg.), Vol. III, S. 253. New York: Academic Press. 1957.
- ² Berni E., Gutmann I., *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer H. U., Hrsg.), S. 1457. Berlin: Akademie-Verlag. 1970.
- ³ Van der Linden A. C., Huybregtse R., *Antonie van Leeuwenhoek* **35**, 344 (1969).
- ⁴ Sperl G. T., Forrest H. S., Gibson D. T., *J. Bacteriol.* **118**, 541 (1974).
- ⁵ Patel R. N., Hoare D. S., *J. Bacteriol.* **107**, 187 (1971).
- ⁶ Ameyama M., Tayama K., *Agric. Biol. Chem.* **42**, 11, 2063 (1978).
- ⁷ Baratti J., Couderc R., Cooney C. L., Wang D. I. C., *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 333 (1978).
- ⁸ Grund A., Shapiro J., Fennewald M., Leahy J., Bacha P., Markbreiter K., Nieder M., Toepfer M., *J. Bacteriol.* **123**, 546 (1975).
- ⁹ Tauchert H., Aurich H., Grunow M., *Z. Allg. Mikrobiol.* **18**, 699 (1978).
- ¹⁰ Tauchert H., Schöpp W., Aurich H., *Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-Naturwiss. R.* **27**, 25 (1978).
- ¹¹ Baptist J. N., Gholson R. K., Coon M. J., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 40 (1963).
- ¹² Chakrabarty A. M., Chou G., Gunsalus J. C., *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **70**, 1137 (1973).
- ¹³ Stanier R. Y., Palleroni N. J., Doudoroff M., *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159 (1966).
- ¹⁴ Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).