

11/340

Ivojlov, V.S., Karasević, Ju.N., Surovceva, E.G.

EINE MUTANTE VON *Corynebacterium fascians*, DIE DIE FÄHIGKEIT
VERLOREN HAT, BENZOESÄURE ZU VERWERTEN

Deutsche Vollübersetzung aus:

Mikrobiologija. Moskva, 54 (1985), Nr 3, S. 502 - 504.

Russ.: О МУТАНТЕ *CORYNEBACTERIUM FASCIANS*, УТРАТИВШЕМ
СПОСОБНОСТЬ К УТИЛИЗАЦИИ БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

O mutante *Corynebacterium fascians*, utrativšem
spodobnost' k utilizaciji benzojnoj kisloty

A *Corynebacterium fascians* strain INMI KIS-9 was obtained. The strain utilized
p-fluorobenzoic acid as a carbon source, but could not assimilate its natural analog, ben-
zoic acid because the enzyme catalyzing lactonization of *cis, cis*-muconic acid was
inactivated.

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich Beschreibungen aus der Natur isolierter Mikroorganismen, die als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle halogenhaltige synthetische aromatische Verbindungen verwerten, die aber nicht fähig sind, in der Struktur ähnliche (analoge) natürliche Verbindungen zu verwerten /2, 4, 5/. Darin wird darauf hingewiesen, der wahrscheinlichste Grund für diese Erscheinung bestehe in einer geänderten Spezifität der einzelnen Enzyme des Katabolismus. Experimentell konnte diese Hypothese in keinem einzigen Fall bewiesen werden, weil die Forscher nicht über die ursprünglichen Stämme verfügten. Deshalb ist die experimentelle Gewinnung und Untersuchung derjenigen Mutanten von großer Bedeutung, welche die Fähigkeit zur Verwertung natürlicher Verbindungen während der Adaption an die synthetischen Analoge verloren haben.

Übersetzungstelle
der Universitätsbibliothek Stuttgart

Von uns wurde erstmals ein Stamm *Corynebacterium fascians* erzeugt, der synthetische Verbindungen (p-Fluorbenzoesäure) verwerten kann, aber die Fähigkeit zur Verwertung von seinem natürlichen Analogon (Benzoesäure) als Kohlenstoffquelle verloren hat. Im vorliegenden Bericht werden die Ursachen dieser Erscheinung untersucht.

Als Untersuchungsgegenstand dient der Stamm *C. fascians*, der als Kohlenstoffquelle Benzoesäure (BS) verwendet und auf p-Fluorbenzoesäure (FBS) nicht wächst. Die Adaption an FBS wurde in einem Medium mit folgender Zusammensetzung durchgeführt (in g/l): K_2HPO_4 3; KH_2PO_4 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,15; $(NH_4)SO_4$ 0,5; FBS 0,2; Na_2MoO_4 0,004; $MnSO_4$, H_3BO_3 , $CoSO_4$ 0,0002; $ZnSO_4$, $FeSO_4$, KI 0,0001; $CuSO_4$ 0,0004; Panthotenat Ca, Nikotinsäure, p-Aminobenzoesäure, Pyridoxin, Thiamin 0,002; Inosit 0,004; Biotin 0,000002. Zur Identifizierung der Mutanten wurde die Kultur nach einsetzendem Wachstum auf FBS auf Agar-Nährböden derselben Zusammensetzung ausplattiert, wobei Glukose (0,5 %) bzw. Benzoesäure (0,02 %) als Kohlenstoffquelle diente. Der Sauerstoffbedarf bei der BS- und FBS-Oxidation wurde im Warburg-Apparat bestimmt. Der cis-, cis-Mukonsäure-Gehalt wurde spektrophotometrisch bestimmt ($\lambda_{max} = 257$, $\Sigma = 17\ 300$). Die Aktivität des die cis-, cis-Mukonsäure laktonisierenden Enzyms wurde je nach Konzentrationsabnahme der cis-, cis-Mukonsäure beurteilt. Die Zellextrakte wurden nach der in /1/ beschriebenen Methode gewonnen. Der Katabolismus der BS bei *C. fascians* verläuft völlig klassisch.

Unter unseren Versuchsbedingungen zur Adaption dauert der Prozeß bis zum Erscheinen von FBS-verwertenden Mutanten einige Monate. Plattiert man die Zellen der adaptierten Population auf den Agar-Nährboden mit BS und Glukose, dann zeigt sich, daß die auf dem Glukose-Nährboden heranwachsenden Kolonien fast identische Durchmesser haben, auf den BS-Platten hingegen zeigen sich zwei Kolonie-Typen: große und kleine. Die kleinen Kolonien ihrerseits lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Die erste Gruppe kann auf BS und FBS nicht wachsen, die zweite nicht auf dem BS-Nährboden, benutzt als Kohlenstoffquelle jedoch FBS.

Vertreter beider Gruppen wachsen auf dem Glukose-Nährboden normal.

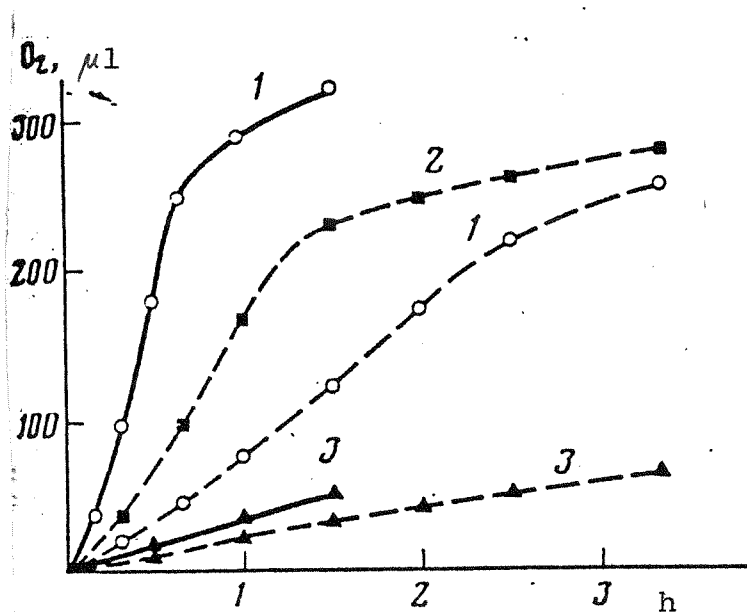


Abb. 1. Oxidation von Benzoesäure und p-Fluorbenzoesäure mit *C. fascians*-Zellen. Inkubationsgemisch: 30 μ mol Substrat, Zellen (4 mg Trockenbiomasse des ursprünglichen Stammes oder 8 mg des mutierten Stammes), 2,8 ml 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2. Durchgehende Linie: ursprünglicher Stamm, auf Benzoesäure gezüchtet. Gestrichelte Linie: mutierter Stamm, auf p-Fluorbenzoesäure gezüchtet. 1) Benzoesäure; 2) p-Fluorbenzoesäure; 3) ohne Substrat.

Nach mehrmaligem Überimpfen auf Agar-Nährboden mit BS und FBS wurde unter den Mutanten der zweiten Gruppe eine Mutante ausgewählt, bei der Reversionen zur Verwertung der BS äußerst selten vorkommen. Die Mutante erhielt die Bezeichnung *C. fascians* INMI KIS-9. In Abb. 1 sind die Versuchsergebnisse der Oxidation von BS und FBS durch *C. fascians* im Warburg-Apparat dargestellt. Es wurde festgestellt, daß bei BS-Oxidation durch den Stamm INMI KIS-9 weniger Sauerstoff verbraucht wird als bei der BS-Oxidation durch den ursprünglichen Stamm. Diese Tatsache kann eine Folge davon sein, daß der mutierte Stamm

eines der Enzyme des Katabolismus verloren hat, was zur Ausscheidung irgendwelcher nicht oxidierbarer Verbindungen führen muß.

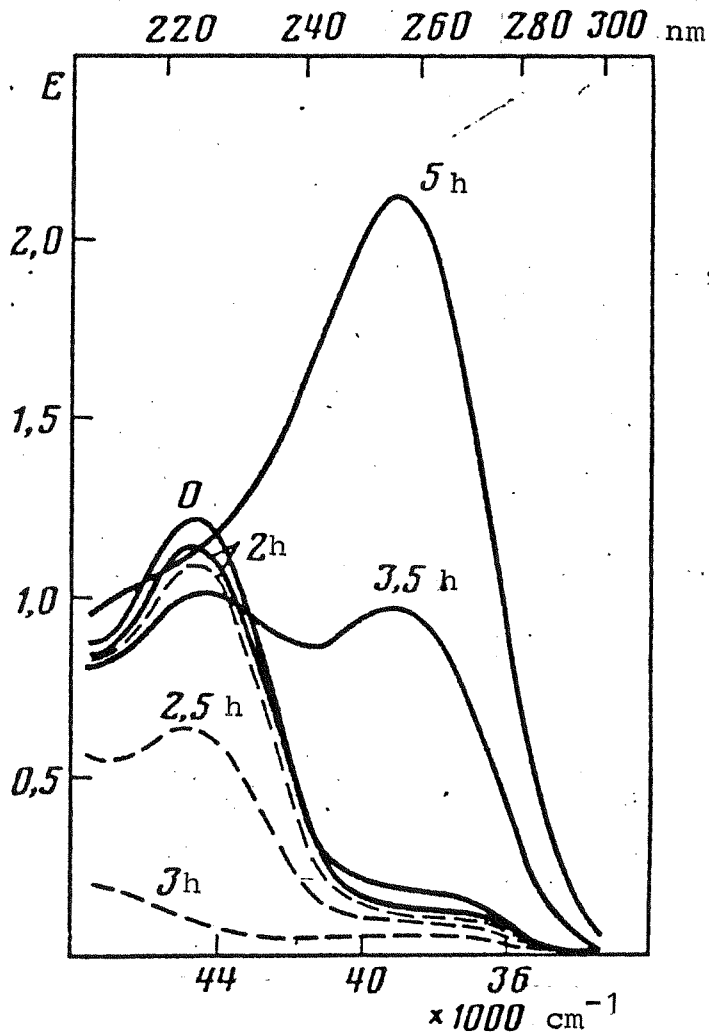


Abb. 2. Transformation von Benzoesäure durch den ursprünglichen Stamm (gestrichelte Linie) und den mutierten Stamm (durchgehende Linie) von *C. fascians*, gezüchtet auf Bernsteinsäure.

Im Umsatzversuch zur BS-Oxidation mit den *C. fascians*-Zellen und dem Stamm INMI KIS-9 wurde festgestellt, daß die BS-Oxidation durch den INMI KIS-9-Stamm langsamer vonstatten geht. Damit einher geht die Ausscheidung einer Verbindung, die das charakteristische Spektrum der cis-, cis-Mukonsäure

besitzt (Abb. 2). Die Oxidation von 1,6 μmol BS wird begleitet von einer Ausscheidung von 1,2 μmol cis-, cis-Mukonsäure ins Inkubationsgemisch, d.h. bei der Mutante geht die BS praktisch völlig in cis-, cis-Mukonsäure über. Daß keine weitere Transformation der cis-, cis-Mukonsäure durch *C. fascians* INMI KIS-9 vorhanden ist, hängt mit der Inaktivierung des die cis-, cis-Mukonsäure laktonisierenden Enzyms zusammen. Festgestellt wurde, daß die Aktivität des cis-, cis-Mukonsäure laktonisierenden Enzyms in den *C. fascians*-Zellextrakten laktonisiert, die aus den auf Bernsteinsäure gezüchteten und mit BS induzierten Zellen gewonnen wurden, gleich 0,1 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ Protein ist. Eine Aktivität in den *C. fascians* INMI KIS-9-Extrakten wurde unter denselben Bedingungen nicht festgestellt.

Die direkte Ursache für den Verlust der Fähigkeit, Benzoesäure als Kohlenstoffquelle zu verwerten, ist beim Stamm *C. fascians* INMI KIS-9 somit der Aktivitätsverlust des Enzyms, das die cis-, cis-Mukonsäure laktonisiert. Bekanntlich bildet sich in den analogen Abbauschritten der FBS Fluormukonsäure /3/, deren weitere Transformation durch ein spezifisches Enzym katalysiert wird. Das Vorhandensein von ähnlichen, für halogenhaltige Verbindungen spezifischen Enzymen macht die Existenz von Organismen in der Natur möglich, die synthetische halogenhaltige Verbindungen verwerten, ihre natürlichen Analoge als Kohlenstoffquellen jedoch nicht nutzen können. Somit ist eine der direkten Ursachen für die Adaption von Mikroorganismen an synthetische Verbindungen die Entwicklung eines alternativen Abbauweges.

Literatur

1. *Зайцев Г. М., Карасевич Ю. Н.* Микробиология, 1981, т. 50, вып. 3, с. 423.
Zajcev, G.M., Karasević, Ju.N.! Podgotovitel'nyj metabolizm 4-chlorbenzoičnoj kisloty u *Arthrobacter globiformis*.
In: Mikrobiologija. Moskva, 50 (1981), Nr 3, S. 423 - 428.
Engl.: Preparative metabolism of 4-chlorobenzoic acid in *Arthrobacter globiformis*.
In: Microbiology. Washington, DC., 50 (1981), Nr 3, S. 287 - 291.

2. Crawford, Ronald L., Olson, P.E., Frick, T.D.: Catabolism of 5-chlorosalicylate by a bacillus isolated from the Mississippi river.
In: Applied an environmental microbiology. Baltimore, Md., 38 (1979), Nr 3, S. 379 - 384.
3. Harper, D.B., Blakley, E.R.: The metabolism of p-fluorobenzoic acid by a Pseudomonas sp.
In: Canadian journal of microbiology. Ottawa, 17 (1971), Nr 8, S. 1015 - 1023.
4. Keil, Heinrich, Klages, Uwe, Lingens, Franz: Degradation of 4-chlorobenzoate by Pseudomonas sp. CBS3: Induction of catabolic enzymes.
In: FEMS /Federation of European microbiological societies/ microbiology letters. Amsterdam, 10 (1981), Nr 4, S. 213 bis 215.
5. Vandenbergh, Peter, A., Olsen, Ronald H., Colaruotolo, Joseph F.: Isolation and genetic characterization of bacteria that degrade chloroaromatic compounds.
In: Applied and environmental microbiology. Baltimore, Md., 42 (1981), Nr 4, S. 737 - 739.

Institut für
Mikrobiologie der
Akad.d.Wiss.d.UdSSR

Redaktionseingang
2.7.1984

Stuttgart, den 4. Oktober 1988

übersetzt von

Ottmar Pertschi
(Ottmar Pertschi)
Dipl.-Übersetzer