Arch. Mikrobiol. 83, 17—31 (1972)
© by Springer-Verlag 1972

Die Hydroxylierung von Phenylalanin durch *Hydrogenomonas eutropha H 16*

B. Friedrich und H. G. Schlegel

Institut für Mikrobiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München in Göttingen
und Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Eingegangen am 20. Oktober 1971

Hydroxylation of Phenylalanine by *Hydrogenomonas eutropha H 16*

Summary. The tyrosine requirement of tyrosine-dependent mutants of *Hydrogenomonas eutropha (Alcaligenes eutrophus)* strain *H 16* (ATCC 17699) can be satisfied by L-tyrosine as well as by L-phenylalanine.

Tyrosine is formed from L-phenylalanine by suspensions of intact wild type cells and is excreted into the medium. It is only transiently accumulated in the medium since it is further metabolized by the cells at a rate comparable to that of phenylalanine.

Phenylalanine is converted to tyrosine by cell-free extracts in the presence of $NAD(P)H_2$ and oxygen; the initial rate of tyrosine formation is 20 units per g protein. Tyrosine is degraded at an approximately equal rate. After the addition of L-phenylalanine to the crude extract tyrosine is formed and accumulated up to a 2—3 mM concentration and reaches a steady state concentration of less than 1 mM tyrosine. In addition to the components mentioned, the phenylalanine hydroxylase reaction requires at least one dialysable cofactor which has been separated by chromatography on sephadex-G 25.

In strain *H 16* phenylalanine hydroxylase is induced by L-phenylalanine; it is not induced by L-tyrosine, phenylpyruvate, hydroxyphenylpyruvate or L-tryptophan. Induction occurs only when phenylalanine is added to the growth medium in substrate concentrations (e.g. 0.2%); growth factor concentrations (20 µg/ml) are not effective.

Phenylalanine hydroxylase has been found only in those strains which are able to utilize phenylalanine as a carbon and energy source for growth: *H. eutropha H 16*, *Pseudomonas facilis*, strain *12 X*.

Zusammenfassung. Der Tyrosinbedarf von tyrosinbedürftigen Mutanten von *Hydrogenomonas eutropha (Alcaligenes eutrophus)* Stamm *H 16* (ATCC 17699) läßt sich außer durch L-Tyrosin auch durch L-Phenylalanin befriedigen.

Suspensionen intakter Wildtypzellen setzen Phenylalanin zu Tyrosin um und scheiden es in die Nährlösung aus. Da Tyrosin mit etwa der gleichen Rate umgesetzt wird, kommt es zu einer nur vorübergehenden Akkumulation.

Durch zellfreie Extrakte wird Phenylalanin in Gegenwart von $NAD(P)H_2$ und Sauerstoff unter Bildung von Tyrosin hydroxyliert. Die Anfangsrate beträgt 20 E/g Protein. Tyrosin wird mit etwa der gleichen Rate abgebaut. Im Rohextrakt kommt es nach einer anfänglichen Akkumulation von Tyrosin (2—3 mM) zur

Anschließend wurde die enzymatische Aktivität durch 5 min langes Erhitzen bei 75° C unter Stickstoff zerstört. Das denaturierte Protein wurde 30 min bei 80000 · g abzentrifugiert und der klare, gelbliche Überstand bei −20° C aufbewahrt.

Biochemikalien. NADH und NADPH wurden von Boehringer GmbH Mannheim bezogen. Die verwendeten Aminosäuren stammten von den Firmen Merck AG, Darmstadt, und Serva, Heidelberg.

Experimente und Ergebnisse

Hydrogenomonas eutropha Stamm *H 16* vermag mit den aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin als einzigen Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu wachsen. Die Generationszeit beträgt bei 30°C mit beiden Substraten im Durchschnitt 75 min und entspricht etwa der mit Pyruvat. Tyrosin-bedürftige Mutanten des gleichen Stammes ließen sich mit L-Phenylalanin als Kohlenstoff- und Supplinquelle anziehen. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Zellen in der Lage sind, Phenylalanin in Tyrosin umzuwandeln.

Der Nachweis, daß die Zellen ein hydroxylierendes Enzym enthalten, wurde durch Messung der Tyrosinzunahme und des Phenylalaninverbrauchs erbracht. Das Tyrosin, das sich nach Inkubation der Zellen mit Phenylalanin in dem enteiweißten Überstand befand, wurde mittels einer für p-substituierte Phenole spezifischen Reaktion mit 1-Nitroso-2-naphthol bestimmt. Bei hoher Tyrosinkonzentration erfolgte die Bestimmung colorimetrisch (Udenfriend u. Cooper, 1952), bei niederen Konzentrationen fluorimetrisch (Waalkes u. Udenfriend, 1957). Zu jedem Versuch wurde eine unter Testbedingungen aufgenommene Standardkurve angefertigt.

Phenylalanin-Hydroxylierung durch Suspensionen intakter Zellen

Nach dem von Guroff u. Ito (1965) ausgearbeiteten Verfahren wurden mehrere H_2-oxydierende Bakterien auf die enzymatische Hydroxylierung von Phenylalanin hin untersucht (Tab. 1).

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, sind *H. eutropha* Stamm *H 16*, Stamm *12 X* und *P. facilis* in der Lage, aus Phenylalanin Tyrosin zu bilden. Es handelt sich dabei um jene Organismen, die L-Phenylalanin auch als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen können. Alle anderen Stämme, einschließlich *E. coli K 12*, sind zur Hydroxylierung von Phenylalanin nicht befähigt.

Bei *H. eutropha H 16* wurde ferner geprüft, ob das gebildete Tyrosin in der Zelle akkumuliert oder in das Medium ausgeschieden wird. Die Zellen wurden nach der Inkubation abzentrifugiert und das Überstehende auf Tyrosin hin untersucht. Die sedimentierten Zellen wurden in Puffer resuspendiert, mit Trichloressigsäure durchlässig gemacht und gefällt. Nur ein geringer Anteil des Tyrosins ist in dem Zellrückstand

Tabelle 1. *Befähigung wasserstoffoxydierender Bakterien zur Hydroxylierung von Phenylalanin*

Stamm	Anzuchtssubstrat	Wachstum auf Phenylalanin	Tyrosinbildung[a] (µmole/Std)
Hydrogenomonas eutropha H 16	L-Phenylalanin	+	0,234
Stamm *12 X*	L-Phenylalanin	+	0,170
Pseudomonas facilis	L-Phenylalanin	+	0,404
Stamm *1 B*	Fructose + L-Phenylalanin	—	0,016
Stamm *L 11 A*	Fructose + L-Phenylalanin	—	0,020
Stamm *33 X*	Glucose + L-Phenylalanin	—	0,032
Escherichia coli (Referenzorganismus)	Glucose + L-Phenylalanin	—	0,030

[a] In Abweichung zu den Versuchen, bei denen gleichzeitig die Phenylalaninabnahme gemessen wurde, befanden sich in einem Reaktionsansatz von je 3 ml 18 µmole L-Phenylalanin und 1,0 ml einer Zellsuspension von einer Trübung von $E_{540} = 3$.

Tabelle 2. *Ausscheidung von Tyrosin während einer einstündigen Inkubation der Zellen von* H. eutropha *Stamm* H 16 *in Gegenwart von Phenylalanin*

Zelldichte (E_{540} nm)	Tyrosin im Suspensionsmedium (µmole)	Tyrosin in den sedimentierten Zellen (µmole)
3	0,192	0,016
12	0,860	0,071

enthalten; die überwiegende Menge wird von den Zellen vorübergehend in das Medium ausgeschieden (Tab. 2).

Die im Laufe von 1 Std bei 37° C im Reaktionsansatz gebildete Menge Tyrosin ist der eingesetzten Zellmenge direkt proportional (Abb. 1). Unter den gegebenen Bedingungen besteht eine lineare Abhängigkeit bis zu 5 mg Protein pro Reaktionsansatz.

Bei den vorangehend geschilderten Versuchen war die Konzentration an Phenylalanin (18 µmole/3 ml) im Verhältnis zur Konzentration an gebildetem Tyrosin sehr hoch. Um neben der Tyrosinbildung auch die Phenylalaninabnahme messend verfolgen zu können, sollte die Substratkonzentration nach Möglichkeit herabgesetzt werden. Aus Abb. 2 geht hervor, daß die Rate der Tyrosinbildung von der Phenylalaninkonzentration abhängig ist und mit sinkender Konzentration abnimmt. Um die Abnahme der Phenylalaninkonzentration messen zu können, wurden die nachfolgenden Versuche mit 3 µmolen Phenylalanin im Reaktions-

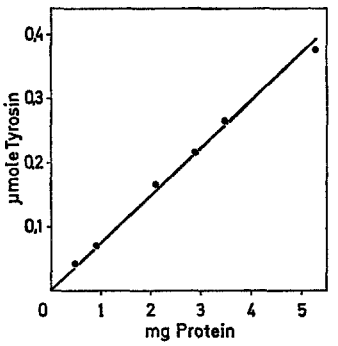

Abb. 1

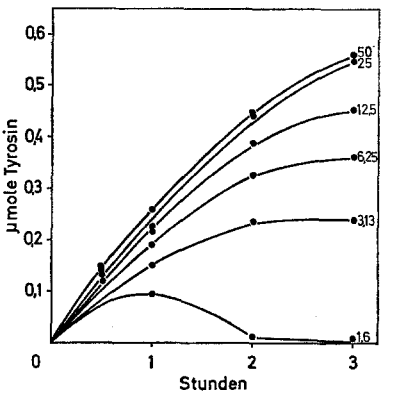

Abb. 2

Abb. 1. Abhängigkeit der Tyrosinbildung von der Zelldichte. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Endvolumen von 3 ml: 18 µmole L-Phenylalanin; 0,5 ml 0,067 M Phosphatpuffer pH 6,8; 1,0 ml Zellsuspension variierter Dichte. Es wurde jeweils 1 Std bei 37° C inkubiert

Abb. 2. Abhängigkeit der Tyrosinbildung von der Phenylalaninkonzentration. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 3 ml: 0,5 ml 0,067 M Phosphatpuffer pH 6,8; 1,0 ml Zellsuspension ($E_{540} = 3$). Die Zahlen an den Kurven geben die Mengen an L-Phenylalanin in µmolen pro Reaktionsansatz an

ansatz durchgeführt, einer Konzentration, bei der die Rate der Tyrosinanhäufung etwa ihre halbe maximale Größe hat.

Vorversuche hatten vermuten lassen, daß das gebildete Tyrosin einem Abbau unterliegt. In parallelen Versuchsansätzen wurden daher nebeneinander die Abnahme von Phenylalanin und die Tyrosinbildung sowie die Abnahme einer vorgegebenen Konzentration an Tyrosin über 3 Std verfolgt (Abb. 3). Das Phenylalanin nahm während der ersten Versuchsstunde linear mit der Zeit ab; das Tyrosin hingegen stieg nur geringfügig an und sank nach einer Zeitdauer, die von Versuch zu Versuch variierte, auf ein Minimum ab. Eine lineare Abhängigkeit der Zunahme der Tyrosinkonzentration von der Zeit ist nur in einem Inkubationszeitraum von 30 min gegeben. Dieser Befund weicht von Ergebnissen ab, die Guroff u. Ito (1965) mit intakten Zellen von *Pseudomonas* sp. erhielten, in denen sie eine Zeitproportionalität feststellten, die sich wenigstens über 60 min erstreckte. Im Parallelansatz wurde Tyrosin etwa mit der gleichen Rate abgebaut wie das Phenylalanin im ersten Ansatz. Das bedeutet, daß das Tyrosin zunächst von der Zelle ausgeschieden, dann wieder aufgenommen und in den katabolischen Stoffwechsel eingeschleust wird. An Suspensionen intakter Zellen läßt sich die

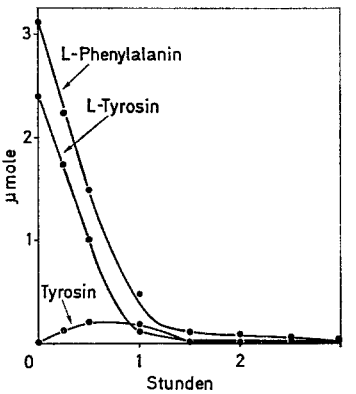

Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Tyrosinanhäufung sowie der Phenylalanin- und Tyrosinabnahme. Die Ansätze enthielten die gleichen Komponenten wie in Abb. 2 genannt; zur Messung der Tyrosinabnahme wurden in einem Parallelansatz 3 µmole L-Tyrosin eingesetzt

Tabelle 3. *Induktion der Phenylalanin-Hydroxylase durch verschiedene aromatische Verbindungen*

Substrat	intakte Zellen[a]		zellfreier Extrakt[b]		
	µmole Tyrosin gebildet		mg Protein	µmole Tyrosin vorhanden	
	ohne Chloramphenicol	mit Chloramphenicol		bei Beginn der Reaktion	nach 20 min Reaktionszeit
L-Phenylalanin	0,252	0,320	5,3	0,116	1,62
Fructose + 0,2%					
L-Phenylalanin	0,282	0,326	—	—	—
Fructose + 20 µg L-Phenylalanin/ml Nährmedium	0,050	0,010	—	—	—
Fructose	0,050	0,020	11,1	0,073	0,104
L-Tyrosin	0,016	0,012	5,1	0,740	0,816
Phenylpyruvat	0,044	0,016	6,1	0,040	0,197
Hydroxyphenylpyruvat	0,020	0,010	3,6	0,011	0,020
L-Tryptophan	0,086	0,020	7,6	0,049	0,067

[a] Jeder Reaktionsansatz enthielt 1 ml einer Zellsuspension von einer Trübung von $E_{540} = 3$. Die Inkubationsdauer betrug 1 Std bei 37° C.

[b] Jeder Reaktionsansatz enthielt Rohextrakt mit der angegebenen Menge Protein und wurde 20 min bei 30° C inkubiert.

Rate der Tyrosinbildung demzufolge nicht exakt bestimmen, da das gebildete Tyrosin weiterreagiert und abgebaut wird.

Die Phenylalanin-Hydroxylase ist kein konstitutives Enzym. Tab. 3 gibt eine Übersicht über die Substrate, auf denen *H. eutropha* Stamm

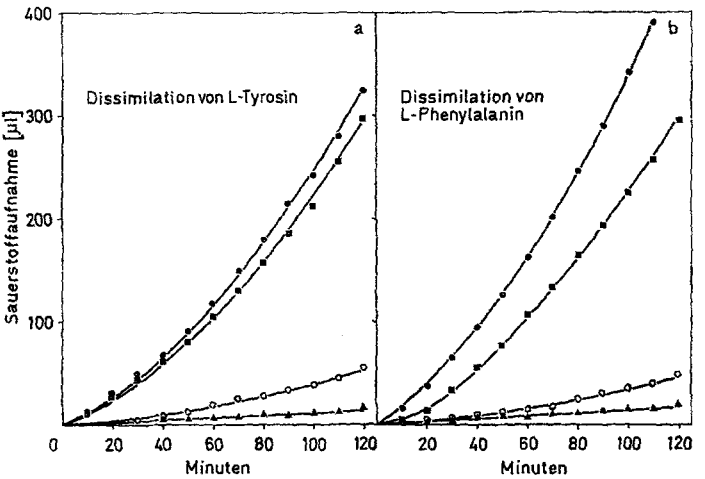

Abb. 4a und b. Sauerstoffaufnahme durch Zellen von *Hydrogenomonas eutropha H 16*, die mit L-Phenylalanin (• • •), L-Tyrosin (■ ■ ■) als Substraten und in einem Komplettmedium (Nutrient Broth) (o o o) angezogen worden waren. Das Reaktionsgefäß enthielt 2 ml Zellsuspension ($E_{540} = 1$); 0,4 ml 0,067 M Phosphatpuffer pH 6,8; a 0,7 ml L-Tyrosin (0,005 M), ohne Puffer; b 0,4 ml L-Phenylalanin (0,01 M). Der Zentralzylinder enthielt 0,2 ml 10% KOH. Die Warburggefäße wurden bei 30° C unter Luft geschüttelt. Die endogene Atmung (▲ ▲ ▲) war gering

H 16 angezogen wurde, um die Induktion der Phenylalanin-Hydroxylase zu prüfen. Bei Versuchen mit intakten Zellen reichte die Inkubationszeit in Gegenwart von Phenylalanin als Substrat aus, um eine leichte Induktion des Enzyms hervorzurufen. Durch Zusatz von Chloramphenicol, das die Proteinsynthese blockiert, ließ sich die während der Inkubation erfolgende Enzymbildung unterdrücken (Tab. 3).

Sowohl die Versuche mit intakten Zellen als auch jene an zellfreien Extrakten ergaben, daß lediglich L-Phenylalanin als Substrat induzierend wirkt (Tab. 3). Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Untersuchungen an *Pseudomonas species* (Guroff u. Ito, 1963) und im Einklang mit Aussagen über *Pseudomonas fluorescens* (Kunita, 1955, 1956) und *Vibrio 01* (Dagley et al., 1953). Bei beiden Organismen ließ sich das Phenylalanin hydroxylierende Enzym durch Tyrosin nicht induzieren.

Messungen der Sauerstoffaufnahme im Warburg-Experiment bestätigten das Ergebnis des Induktionsversuches. Waren die Zellen von Stamm *H 16* auf Phenylalanin oder Tyrosin gewachsen, so oxydierten sie Tyrosin ohne lag-Phase und mit der gleichen Sauerstoffaufnahmerate (Abb. 4a). Hingegen setzte die Phenylalaninoxydation bei den mit Tyrosin angezogenen Zellen erst mit Verzögerung ein (Abb. 4b). Daraus folgt: Phenyl-

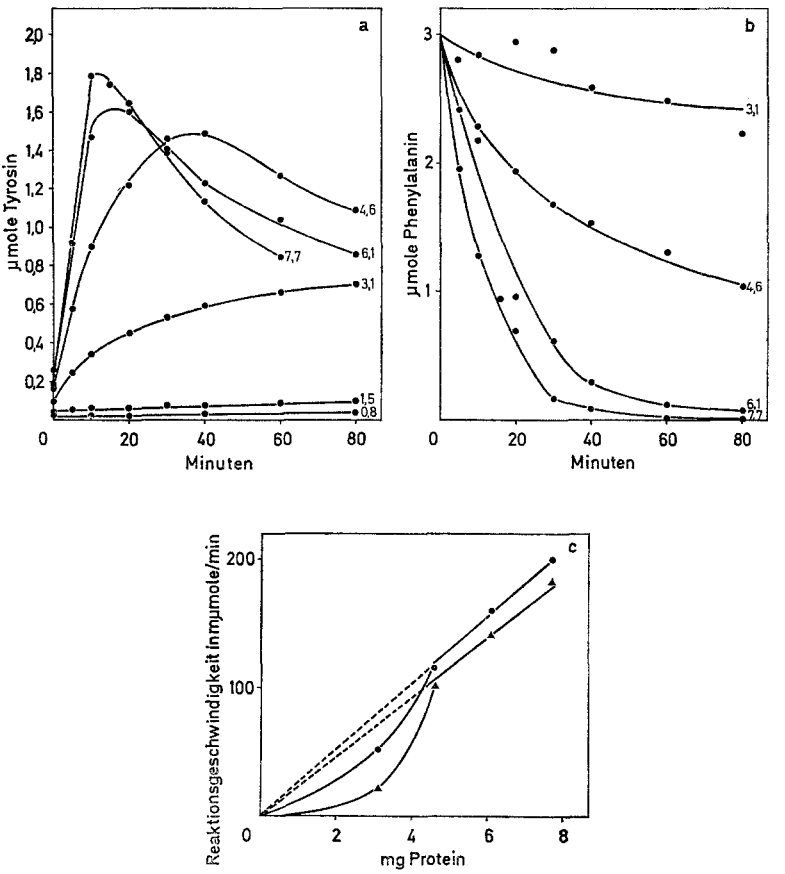

Abb. 5a—c. Tyrosinbildung (a) und Phenylalaninabnahme (b) bei variierten Rohextraktmengen. Die Zahlen geben die Extraktmenge in Milligramm Protein/Ansatz an. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Endvolumen von 0,8 ml: 3 µmole L-Phenylalanin; 2,5 µmole NADH; 0,5 ml Rohextrakt. Die Inkubationstemperatur betrug 30° C. c Abhängigkeit der Rate der Tyrosinanhäufung (• • •) bzw. der Phenylalaninabnahme (▲ ▲ ▲) von der eingesetzten Proteinmenge

alanin induziert als Substrat die Enzyme zur Oxydation von Phenylalanin und Tyrosin; Tyrosin induziert nur die Enzyme zur Tyrosinoxydation.

Nachweis der Phenylalanin-Hydroxylase in zellfreien Extrakten

Abb. 5 gibt den zeitlichen Verlauf der Bildung von Tyrosin (a) und der Abnahme von Phenylalanin (b) mit verschiedenen Mengen von Rohextrakt wieder. Die Anfangsgeschwindigkeiten der beiden Reaktionen

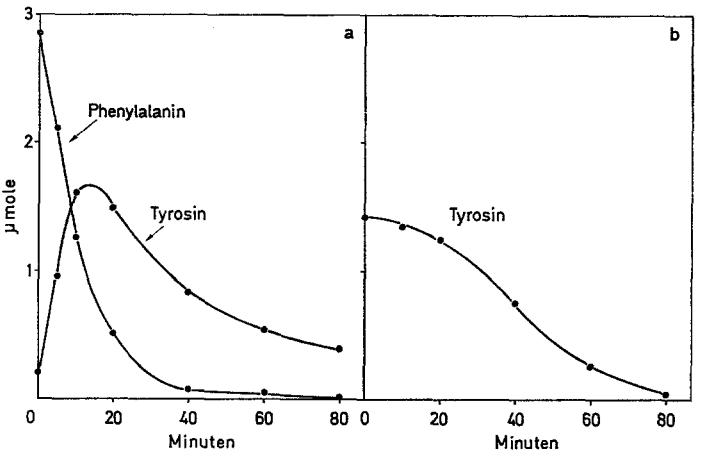

Abb. 6a. und b. Zeitlicher Verlauf der Tyrosinanhäufung und der L-Phenylalaninabnahme (a) sowie der Abnahme von L-Tyrosin (b). Die Ansätze enthielten die gleichen Komponenten wie in Abb. 5. Der Proteingehalt betrug 9 (a) bzw. 10,6 (b) mg/Ansatz. b enthielt an Stelle von L-Phenylalanin 1,5 µmole L-Tyrosin

sind den eingesetzten Proteinmengen annähernd proportional (Abb. 5c) und nahezu gleich groß. Die Disproportionalität im unteren Proteinbereich, die in den Experimenten mit intakten Zellen nicht auftrat (Abb. 1), beruht offenbar auf einem „Verdünnungseffekt". Diese Annahme ist um so wahrscheinlicher, als die Phenylalanin-Hydroxylase von Stamm *H 16* ebenso wie die von *Pseudomonas sp.* (Guroff u. Ito, 1965) cofaktorabhängig ist. Man kann annehmen, daß das Verhältnis Enzym/Cofaktoren bei einem hohen Verdünnungsgrad verschoben wird. Guroff u. Abramowitz (1967) stellten bei der Ausarbeitung einer neuen empfindlichen Meßmethode für die Phenylalanin-Hydroxylase unter Verwendung von para-Tritium-markiertem Phenylalanin fest, daß bei niedrigen Enzymkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit nicht linear verlief. Die Phenylalanin-Hydroxylase aus Leber erwies sich in diesem Konzentrationsbereich als instabil.

Bereits die Abb. 5a läßt erkennen, daß sich während der Umsetzung von Phenylalanin Tyrosin nur vorübergehend anhäuft. Das Produkt der Hydroxylierung von Phenylalanin wird also nicht nur durch intakte Zellen abgebaut, sondern auch durch den zellfreien Rohextrakt umgesetzt. Tyrosin wird bis zu geringen Konzentrationen mit maximaler Geschwindigkeit abgebaut (Abb. 6b). Es fällt jedoch auf, daß die maximale Rate der Abnahme von Tyrosin im Rohextrakt erst nach einer Verzögerung von 20 min erreicht wird. Die auf die anfängliche Akkumulation von Tyrosin folgende rasche Abnahme läßt sich auch durch höhere

Tabelle 4. *Die Bildung von Tyrosin aus L-Phenylalanin durch zellfreie Extrakte*

Reaktionsansatz	µmole Tyrosin gebildet		µmole L-Phenylalanin verbraucht	
	Versuch I	Versuch II	Versuch I	Versuch II
Komplettes System	1,19	1,07	1,28	1,44
— Extrakt	0,0	—	0,0	—
— L-Phenylalanin	0,095	—	0,0	—
— NADH	0,394	0,256	0,89	0,72
— NADH + NADPH	1,15	1,05	1,27	1,39
Vorinkubation des Rohextraktes mit $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	1,36	1,25	1,43	1,67

Das komplette Reaktionssystem enthielt die Komponenten wie in Abb. 5. Versuch I wurde mit einer Proteinkonzentration von 8,95 mg/Ansatz und Versuch II mit 7,75 mg/Ansatz durchgeführt.

Konzentrationen von Phenylalanin nicht verhindern. Wie bei intakten Zellen sind auch im Rohextrakt die Raten der Hydroxylierung von Phenylalanin und der Oxydation von Tyrosin nahezu gleich. Daß sich die Anfangsrate der Bildung von Tyrosin überhaupt messen läßt und gut erfaßbare Konzentrationen an Tyrosin vorübergehend auftreten (Abb. 6a), ist wohl auf die Verzögerung zurückzuführen, mit der die Tyrosinoxydation effektiv wird.

Cofaktoren der Phenylalaninhydroxylierung durch den Rohextrakt sind $NADH_2$ oder $NADPH_2$; beide Pyridinnucleotide sind gleichermaßen wirksam (Tab. 4). Im Laufe einer 2tägigen Lagerung bei 4° C geht die Aktivität des Rohextrakts um etwa 20 % zurück. Durch eine 5 min lange Vorinkubation des Rohextraktes mit Eisenammoniumsulfat läßt sich die Rate der Tyrosinbildung um etwa 15 % erhöhen.

Durch Dialyse oder durch Chromatographie an einer Sephadex-G 25-Säule verlor der Rohextrakt seine katalytische Aktivität völlig. Durch Zusatz von hitzebehandeltem Extrakt oder von Säuleneluat ließ sich die Aktivität teilweise wiederherstellen (Tab. 5, Abb. 7). Der in Anlehnung an das Verfahren von Guroff und Rhoads (1969) hergestellte hitzebehandelte Extrakt komplettierte das System. Ein auf 100° C erhitztes Zellhomogenat hatte keine nennenswerte Wirkung. Ein 3 min auf 60° C erhitztes Zellhomogenat verfügte noch über eine mittlere enzymatische Aktivität, ein 5 min auf 75° C erhitztes Zellhomogenat hatte nur noch die Wirkung des Cofaktors.

Die durch Chromatographie an der Sephadex-G 25-Säule abgetrennten niedermolekularen Fraktionen stellten die Aktivität des dialysierten

Tabelle 5. *Tyrosinbildung und Phenylalaninabnahme in dialysierten und cofaktorfreien Rohextrakten*

Extrakt	Protein/Ansatz (mg)	µmole Tyrosin gebildet	µmole Phenylalanin verbraucht
undialysiert	9,7	1,52	1,84
dialysiert	9,4	0,034	0,022
dialysiert + 0,5 ml hitzebehandelter Extrakt	9,4	0,667	1,05
dialysiert + 0,5 ml Säulenfraktion 21	9,4	0,388	0,66
nicht chromatographiert	9,4	1,63	1,97
Proteinfraktionen 9—17 vereinigt	8,7	0,027	0,072
Proteinfraktionen 9—17 + 0,5 ml hitzebehandelter Extrakt	8,7	1,02	1,27
Proteinfraktionen 9—17 + 0,5 ml Säulenfraktion 21	8,7	1,22	1,45
0,5 ml hitzebehandelter Extrakt	1,03	0,098	0,53

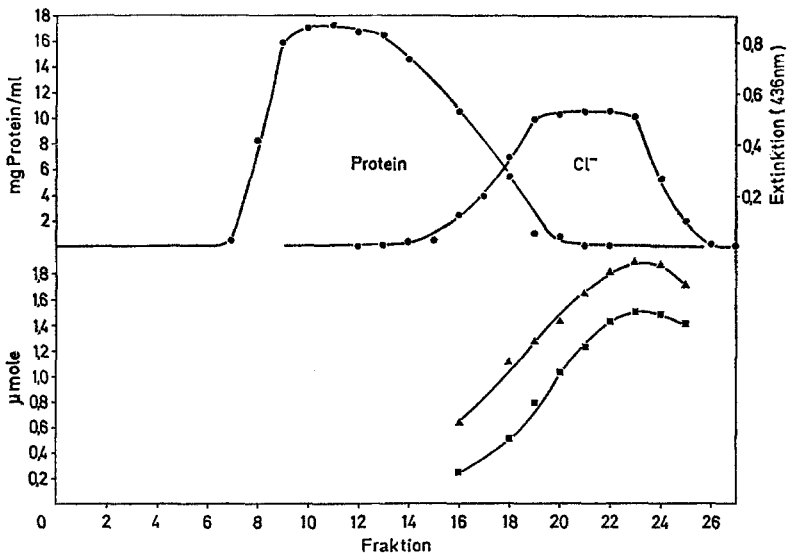

Abb. 7. Die komplettierende Wirkung niedermolekularer Fraktionen eines Sephadex-Eluats auf den cofaktorfreien Extrakt. Der obere Teil der Darstellung gibt den Protein- sowie den Chloridgehalt (Extinktion der AgCl-Suspension) der einzelnen Fraktionen wieder. Im unteren Teil sind die Tyrosinanhäufung (■ ■ ■) und die Menge des umgesetzten L-Phenylalanins (▲ ▲ ▲) durch Extrakte der vereinigten Proteinfraktionen 9—17, denen niedermolekulare Fraktionen zugesetzt wurden, aufgeführt (nähere Erklärung s. Text). Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml: 3 µmole L-Phenylalanin, 2,5 µmole NADH, 0,5 ml Extrakt und 0,5 ml der bezeichneten niedermolekularen Fraktionen. Die Inkubationszeit betrug 20 min bei 30° C

oder chromatographierten Rohextraktes ebenfalls teilweise wieder her. Die proteinhaltigen Fraktionen 9—17 des Sephadex-G 25-Eluats wurden vereinigt und durch den hitzebehandelten Extrakt oder durch die im Nachlauf der Säule erscheinenden niedermolekularen Fraktionen (erkennbar an ihrem Chloridgehalt) komplettiert (Abb. 7, Tab. 5). Im unteren Teil der Abb. 7 sind die Tyrosinproduktion und die Phenylalaninabnahme aufgetragen. Wurden je 0,5 ml der vereinigten Proteinfraktion 9—17 mit je 0,5 ml der niedermolekularen Fraktionen versetzt und in Gegenwart von $NADH_2$ und L-Phenylalanin 20 min lang inkubiert, so wurde Tyrosin angehäuft. Der zur Tyrosinbildung notwendige Cofaktor ist in den letzten Fraktionen des Sephadex-Eluats enthalten.

Diskussion

Mit den aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan als Substraten wächst *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16* sehr gut (Blackkolb u. Schlegel, 1968). Darüber hinaus werden von allen Isolaten dieser Species auch Benzoesäure, p- und m-Hydroxybenzoesäure, Phenol, Kynurenin, Nicotinsäure und Benzoylameisensäure verwertet; Benzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure werden über den β-Ketoadipinsäure-Weg abgebaut (Johnson u. Stanier, 1971). Über den Abbauweg von Phenylalanin und Tyrosin durch *H. eutropha* liegen bislang keine Untersuchungen vor. Da die Bildung der Phenylalanin-Hydroxylase induziert wird, wenn Phenylalanin in Substratkonzentration in der Nährlösung geboten wird, ist anzunehmen, daß dieses Enzym in den Abbau von Phenylalanin eingeschaltet ist. Mit der Annahme, daß das Enzym vorwiegend katabolische Funktionen hat, steht der Befund im Einklang, daß die Aktivität der Phenylalanin-Hydroxylase mit abnehmender Konzentration von Phenylalanin im Wachstumsmedium sinkt und verschwindend klein ist, wenn Phenylalanin im Nährmedium die Konzentration eines Supplins erreicht. Die vorgelegten Ergebnisse besagen nicht, daß Phenylalanin möglicherweise auch unter Umgehung von Tyrosin abgebaut wird. Parallele Abbauwege werden für *Vibrio O1* postuliert (Dagley et al., 1953).

Der Tyrosinbedarf auxotropher Mutanten von *H. eutropha H 16*, deren Tyrosinsyntheseweg unterbrochen ist, läßt sich durch Tyrosin oder Phenylalanin befriedigen; die Mutanten wachsen mit Phenylalanin als Supplin, wobei zu dessen Hydroxylierung das in „basal level"-Mengen vorhandene Enzym ausreicht. Die durch höhere Konzentrationen von Phenylalanin induzierte Phenylalanin-Hydroxylase hydroxyliert Phenylalanin, und vorübergehend kommt es zur Ausscheidung von Tyrosin und dessen Anhäufung in der Nährlösung. Über die Möglichkeit, Phenylalanin zu hydroxylieren, verfügen entsprechende Mutanten von *Escheri-*

chia coli K 12 nicht (Simmonds, 1950). Inwieweit der Wildstamm *H 16* Phenylalanin als Tyrosinquelle in Anspruch nimmt, bleibt Versuchen über die enzymatische Regulation der Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin vorbehalten. Daß das durch Hydroxylierung von Phenylalanin entstandene Tyrosin direkt in das Protein eingebaut wird, ist unter Verwendung von ^{14}C-Phenylalanin an *Pseudomonas* sp. (ATCC 11299 a) nachgewiesen worden (Guroff u. Ito, 1965).

Im Überschuß gebildetes Tyrosin wird von Stamm *H 16* wie von *Bacillus subtilis* (Champney u. Jensen, 1970) ausgeschieden. Das im Medium akkumulierte Tyrosin wird von den Zellen wieder aufgenommen und rasch abgebaut. Auch durch Rohextrakte wird das Tyrosin weiter umgesetzt. Nach der Zugabe von Phenylalanin und $NADH_2$ zu einem Rohextrakt von Stamm *H 16* wird Tyrosin vorübergehend bis zu einer Konzentration von 2—3 mM im Reaktionsansatz angehäuft (Abb. 5a), dann aber — nach 20 min — beginnt sich eine steady state-Konzentration einzustellen, die unter 1 mM liegt. Die Aktivität der Phenylalanin-Hydroxylase kann daher nur aus der Anfangsgeschwindigkeit der Tyrosinproduktion gemessen werden.

$NADH_2$ läßt sich durch $NADPH_2$ ersetzen. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Phenylalanin-Hydroxylase aus *H 16* von dem Enzym aus *Pseudomonas sp.*, das für $NADH_2$ streng spezifisch ist und durch $NADPH_2$ sogar gehemmt wird (Guroff u. Ito, 1963).

Daß die Phenylalanin-Hydroxylase aus *H. eutropha H 16* außer $NAD(P)H_2$ noch eines weiteren oder mehrerer niedermolekularer Cofaktoren bedarf, ist durch Dialyse und Chromatographie des Rohextraktes an einer Sephadex G 25-Säule nachgewiesen worden. Der cofaktorfreie Rohextrakt gewinnt durch Zusatz von hitzebehandeltem, enzymatisch inaktivem Zellextrakt oder durch Zusatz von Säuleneluaten, die niedermolekulare Komponenten enthalten, seine katalytische Aktivität wieder. Ob es sich bei den Cofaktoren um Pteridin-Derivate handelt, ist nicht geprüft worden. Ein Cofaktor der Phenylalanin-Hydroxylase von *Pseudomonas sp.* ist wahrscheinlich L-Threoneopterin (Guroff u. Rhoads, 1967).

Für die sorgfältige Hilfe bei vielen Experimenten danken wir Frl. H. Grotkasten. Die Untersuchungen wurden abschnittsweise durch die Akademie der Wissenschaften in Göttingen gefördert.

Literatur

Beisenherz, G., Bolze, H. J., Bücher, T. H., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfleiderer, G.: Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. **8b**, 555—577 (1953).

Blackkolb, F., Schlegel, H. G.: Katabolische Repression und Enzymhemmung durch molekularen Wasserstoff bei *Hydrogenomonas*. Arch. Mikrobiol. **62**, 129—143 (1968).

Champney, W. S., Jensen, R. A.: Metabolic influences on tyrosine excretion in *Bacillus subtilis*. J. Bact. **104**, 351–359 (1970).
Cohen, G. N.: Biosynthesis of small molecules. New York: Harper and Row 1967.
Dagley, S., Fewster, M. E., Happold, F. C.: The bacterial oxidation of aromatic compounds. J. gen. Microbiol. **8**, 1–7 (1953).
Davis, B. D.: In: Amino acid metabolism, p. 799. W. D. McElroy and H. B. Glass, ed. Baltimore: John Hopkins Press 1955.
Eberhardt, U.: Über das Wasserstoff aktivierende System von *Hydrogenomonas H 16*. Diss., Göttingen 1965.
Guroff, G., Abramowitz, A.: A simple radioisotope assay for phenylalanine hydroxylase. Analyt. Biochem. **19**, 548–555 (1967).
— Ito, T.: Induced, soluble phenylalanine hydroxylase from *Pseudomonas sp.* grown on phenylalanine or tyrosine. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **77**, 159–161 (1963).
— — Phenylalanine hydroxylation by *Pseudomonas species* (ATCC 11299a). J. Bact. **240**, 1175–1184 (1965).
— Rhoads, C. A.: Phenylalanine hydroxylation by *Pseudomonas species* (ATCC 11299a): Nature of the cofactor. J. biol. Chem. **244**, 142–146 (1969).
Johnson, B. F., Stanier, R. Y.: Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. J. Bact. **107**, 468–475 (1971).
Kunita, N.: Zit. nach G. Guroff und T. Ito. Med. J. Osaka Univ. **6**, 703 (1955).
— Zit. nach G. Guroff und T. Ito. Med. J. Osaka Univ. **7**, 203 (1956).
McCaman, M. W., Robins, E.: Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. J. Lab. clin. Med. **59**, 885–890 (1962).
Miller, D. A., Simmonds, S.: Phenylalanine and tyrosine metabolism in *E. coli* strain *K-12*. Science **126**, 445–446 (1957).
Mitoma, C., Leeper, L. C.: Enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. Fed. Proc. **13**, 266 (1954).
Schlegel, H. G., Kaltwasser, H., Gottschalk, G.: Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. **49**, 209–222 (1961).
Schmidt, K., Liaaen Jensen, S., Schlegel, H. G.: Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von *Chromatium okenii* Perty. Arch. Mikrobiol. **46**, 117–126 (1963).
Simmonds, S.: The metabolism of phenylalanine and tyrosine in mutant strains of *Escherichia coli*. J. biol. Chem. **185**, 755–762 (1950).
Udenfriend, S., Cooper, J. R.: The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine. J. biol. Chem. **194**, 503–511 (1952).
Waalkes, T. P., Udenfriend, S.: A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. J. Lab. clin. Med. **50**, 733–736 (1957).
Wilde, E.: Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. Arch. Mikrobiol. **43**, 109–157 (1962).

Dipl.-Biol. Bärbel Friedrich
Prof. Dr. H. G. Schlegel
Institut für Mikrobiologie
D-3400 Göttingen, Grisebachstr. 8
Deutschland