

Der Biosyntheseweg der RNS-Ribose in *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H 16 und *Pseudomonas facilis*

B. BOWIEN und H. G. SCHLEGEL

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

Eingegangen am 27. März 1972

The Biosynthetic Pathway of RNA Ribose in *Hydrogenomonas eutropha* Strain H 16 and *Pseudomonas facilis*

Summary. The enzymes involved in the degradation of fructose and gluconate via the Entner-Doudoroff-pathway as well as those involved in the oxidative pentose phosphate pathway have been determined in crude extracts of *Hydrogenomonas eutropha* strain H 16 and of *Pseudomonas facilis* after either autotrophic growth or heterotrophic growth on fructose or gluconate as substrates. In *H. eutropha* fructose induces all enzymes of the Entner-Doudoroff-pathway, gluconate induces only glucokinase, 6-phosphogluconate dehydratase and 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase. In contrast, in *P. facilis* both substrates induce the entire set of enzymes. The absence of 6-phosphogluconate dehydrogenase in *H. eutropha* and the presence of a NAD-linked 6-phosphogluconate dehydrogenase in *P. facilis* have been confirmed. Otherwise, the enzyme activities in fully induced fructose grown cells of both species are similar.

Incorporation experiments were performed using both bacterial species and employing U-¹⁴C-, 1-¹⁴C-, and 6-¹⁴C-fructose as well as 1-¹⁴C- and 6-¹⁴C-gluconate as substrates. Ribose was isolated from RNA and fermented by *Lactobacillus plantarum* with the production of acetic and lactic acids. By stepwise degradation of the acids

Abkürzungen: ATP = Adenosin-5'-triphosphat; DAP = Dihydroxyacetonphosphat; E-4-P = Erythrose-4-phosphat; ED = Entner-Doudoroff; EDTA = Äthylen-diamin-tetraessigsäure; FDP(ase) = Fructose-1,6-diphosphat(ase); F-6-P = Fructose-6-phosphat; G-6-P(-DH) = Glucose-6-phosphat(-Dehydrogenase); GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat; GDH = Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase; GK = Gluconokinase; HK = Hexokinase; KDPG = 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat; LDH = Lactat-Dehydrogenase; NAD(H₂) = Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert); NADP(H₂) = Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert); PGI = Phosphoglucose-Isomerase; PP = Pentosephosphat; 6-PG(-DH) = 6-Phosphogluconat(-Dehydrogenase); 6-PG-DHT = 6-Phosphogluconat-Dehydratase; R-5-P = Ribose-5-phosphat; Ru-5-P = Ribulose-5-phosphat; Su-7-P = Seduheptulose-7-phosphat; TA = Transaldolase; TEA = Triäthanolaminhydrochlorid; TIM = Triosephosphat-Isomerase; TK = Transketolase; TPP = Thiaminpyrophosphat; Tris = Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan; Xu-5-P = Xylulose-5-phosphat.

and by quantitative measurement and scintillation counting of the carbon dioxide formed the specific radioactivity of each carbon atom has been determined.

The results demonstrate that in strain *H 16* ribose is formed exclusively via the non-oxidative reactions of the pentose phosphate pathway. Carbon atoms 1 to 3 of gluconate do not significantly contribute to gluconeogenesis.

With *P. facilis* an almost identical labelling pattern was observed, indicating that the oxidative reactions of the pentose phosphate pathway via 6-phosphogluconate dehydrogenase are quantitatively of minor importance for ribose synthesis than the transaldolase-transketolase reactions.

Zusammenfassung. Die am Fructose- und Gluconatabbau über den Entner-Doudoroff-Weg beteiligten Enzyme sowie die Enzyme des oxydativen Pentosephosphat-Weges wurden in Rohextrakten von *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16* und *Pseudomonas facilis*, sowohl nach autotrophen Wachstum als auch nach heterotrophen Wachstum auf Fructose oder Gluconat, bestimmt. Fructose induziert in *H. eutropha* alle Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges, Gluconat nur die Gluconokinase, die 6-Phosphogluconat-Dehydratase und die 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Aldolase. Dagegen induzieren in *P. facilis* beide Substrate den gesamten Enzymsatz. Das Fehlen der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in *H. eutropha* und das Vorhandensein einer NAD-abhängigen 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in *P. facilis* wurden bestätigt. Die Enzymaktivitäten in voll induzierten, auf Fructose gewachsenen Zellen beider Arten sind ähnlich.

Mit beiden Stämmen wurden Einbauexperimente mit U-¹⁴C-, 1-¹⁴C- und 6-¹⁴C-Fructose sowie 1-¹⁴C- und 6-¹⁴C-Gluconat als Substrate durchgeführt. Die Ribose wurde aus der RNS isoliert und durch *Lactobacillus plantarum* fermentativ in Essig- und Milchsäure gespalten. Die spezifische Radioaktivität der einzelnen C-Atome wurde durch schrittweisen Abbau der Säuren, quantitative Bestimmung des dabei entstehenden ¹⁴CO₂ und Messung der darin enthaltenen absoluten Radioaktivität ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Ribose in Stamm *H 16* ausschließlich über die nicht-oxydativen Reaktionen des Pentosephosphat-Weges gebildet wird. Die C-Atome 1,2 und 3 des Gluconats tragen nicht signifikant zur Gluconeogenese bei.

Das Markierungsmuster der Ribose aus *P. facilis* ist mit dem von Stamm *H 16* nahezu identisch. Die oxydativen Reaktionen des Pentosephosphat-Weges über die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase sind von quantitativ geringerer Bedeutung als die Transaldolase-Transketolase-Reaktionen.

Im Zellstoffwechsel werden Pentosen aus Hexosen auf zwei verschiedenen Wegen gebildet: durch oxydative Decarboxylierung von 6-Phosphogluconsäure und durch die Transaldolase-Transketolase-Reaktionen. Die Beteiligung beider Wege an der Ribosesynthese ist in einigen Mikroorganismen und in tierischen Geweben unter Anwendung der Isotopentechnik bereits eingehend bearbeitet worden (Sable, 1966).

Zwei gut charakterisierte Arten von Wasserstoffbakterien unterscheiden sich im Hinblick auf das Schlüsselenzym des oxydativen Pentosephosphat-Weges: *Hydrogenomonas eutropha*, sowohl der Typenstamm ATCC 17697 (Kuehn u. MacFadden, 1968) als auch der Stamm *H 16* ATCC 17699 (Gottschalk et al., 1964), enthält das Enzym 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase nicht; in *Pseudomonas facilis* ATCC 17695

ist das Enzym vorhanden (Ramsey, 1968). *H. eutropha H 16* baut Fructose und Gluconsäure ausschließlich über den Entner-Doudoroff-Weg ab.

Um abschätzen zu können, in welchen relativen Anteilen beide Wege an der Ribosynthese bei diesen Repräsentanten autotropher Bakterien beteiligt sind, empfahl sich eine Paralleluntersuchung an beiden Arten. Wir erfaßten daher die Verteilung der Radioaktivität in der aus RNS isolierten Ribose nach Verfütterung verschiedener positionsmarkierter Fructosen und Gluconsäuren.

Material und Methoden

Organismen und Anzuchtbedingungen. Die vorliegenden Experimente wurden an *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16* ATCC 17699 (Wilde, 1962) und *Pseudomonas facilis* ATCC 17695 (Schatz u. Bovell, 1952) vorgenommen. Die Zellen wurden autotroph in Mineralmedium unter einem Gasgemisch von 80% H_2 , 10% O_2 und 10% CO_2 mit magnetischer Rührung angezogen (Schlegel et al., 1961). Für die heterotrophe Anzucht unter Luft wurden der Nährlösung 0,5% organisches Substrat zugesetzt.

Anzucht der Zellen mit radioaktiv markierten Substanzen. Das Kulturverfahren entsprach dem oben angeführten. In einem 6 l-Rundkolben mit Begasungsaufsatz wurden 2000 ml Mineralmedium mit 10 ml einer Zellsuspension beimpft. Die Impfkultur wurde wie folgt bereitet: Die Zellen wurden über zwei Passagen in einer 30 ml-Kultur an das betreffende Substrat adaptiert, abzentrifugiert, zweimal in 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und in 12 ml Mineralmedium aufgenommen. 10 ml dieser Suspension dienten als Impfkultur. Nach dem Animpfen wurden dem Medium ca. 0,2% nicht markiertes und 35–50 μ Ci markiertes Substrat zugesetzt (genaue Angaben in Tab. 3), bei 28°C magnetisch gerührt und gut belüftet. Die Ernte der Zellen erfolgte gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Anzuchtdauer für *H 16* auf Fructose 18 Std, auf Gluconat 15 Std und für *P. facilis* 20 bzw. 24 Std.

Isolierung der Ribose. Die RNS-Hydrolysate aus den Zellen wurden nach der von Bernstein (1956) beschriebenen Methode gewonnen. Die eingeeengten Hydrolysate wurden zur Abtrennung und Reinigung der Ribose jeweils der absteigenden Papierchromatographie in einem sauren (Äthylacetat-Eisessig-Wasser 3:1:3 v/v, Papier Schl. & Sch. Nr. 2043 b mg/l) und einem alkalischen Fließmittel (Äthylacetat-Pyridin-Wasser 5:2:5 v/v) unterworfen. Als Vergleichssubstanz diente reine Ribose, die auf den Chromatogrammen durch Besprühen mit Anilinphthalat-Reagens (Partridge, 1949) und anschließendes Erhitzen (10 min, 105–110°C) identifiziert wurde. Nach der zweiten Chromatographie war in allen Fällen ein einheitlicher, symmetrischer Ribosegipfel vorhanden, wie durch die Messung der Radioaktivitätsverteilung mit dem Radiopapierchromatographen FH 452 mit angeschlossenen Schreiber FHK 1/542 (Fa. Friesecke & Hoepfner, Erlangen) nachgewiesen wurde. Der Zucker wurde mit Aqua bidest. eluiert und das Volumen der Lösung auf 3 ml eingestellt. Die quantitative Bestimmung der Ribose erfolgte mit Hilfe der Orcinreaktion (Ashwell, 1957).

Abbau der Ribose. Ribose wurde durch *Lactobacillus plantarum* ATCC 8041 (Bernstein, 1953; Bernstein u. Wood, 1957) in Essigsäure und Milchsäure gespalten. Die Isolierung, Reinigung und Bestimmung der Gärprodukte sowie der chemische Abbau der Säuren erfolgte nach Sakami (1955).

Bestimmung der spezifischen Radioaktivität im $^{14}\text{CO}_2$. Es wurde nach der von Gottschalk u. Barker (1966) angegebenen Methode vorgegangen. Das beim Abbau der Essig- und Milchsäure aus jedem einzelnen C-Atom entstandene $^{14}\text{CO}_2$ wurde in 4 ml 2 N NaOH aufgefangen und gravimetrisch bestimmt. Zur Messung der Radioaktivität wurde der Hauptraum eines Warburggefäßes mit einem 0,5 ml-Aliquot der das radioaktive Kohlendioxid enthaltenden Probe, der Seitenarm mit 0,05 ml konz. H_2SO_4 und der Zentralzylinder mit 0,5 ml 1 M Hyaminlösung (auf Filterpapier) beschickt. Das Gefäß wurde vor dem Verschließen leicht evakuiert; danach wurde die Schwefelsäure gekippt. Durch zweistündiges Schütteln wurde das $^{14}\text{CO}_2$ quantitativ in die Hyaminlösung übergetrieben. Das Filterpapier wurde mit 10 ml Szintillationslösung (Bray, 1960) im Tricarb Szintillationszähler Modell 3375 zur Auszählung gebracht. Die Zählansbeute des Szintillationszählers wurde mit ^{14}C -Benzoessäure bekannter Aktivität bestimmt; sie betrug unter den angewendeten Bedingungen bei optimaler Kanaleinstellung 75%.

Bereitung zellfreier Extrakte. Die in 2 l-Zweihalsrundkolben (1000 ml Mineralmedium + 0,5% organisches Substrat) bei intensiver Belüftung und magnetischer Rührung gewachsenen Zellen wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, zweimal mit 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und in 5 ml 0,05 M TEA-Puffer pH 7,6 aufgenommen. Die Suspension wurde mit einem Ultraschallgerät (Fa. Schoeller & Co., Frankfurt a. M.) beschallt (1 min/ml). Die Temperatur wurde zwischen +4 und +10°C gehalten. Zellrückstände und große Membranpartikel wurden bei $120000 \times g$ 30 min abzentrifugiert. Der verbleibende Überstand diente als Rohextrakt für die Enzymbestimmungen.

Proteinbestimmung. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Biuretmethode (Beisenherz et al., 1953).

Bestimmung von Enzymaktivitäten. Die spezifische Aktivität wurde für jedes Enzym in einem Meßbereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Extraktmenge ermittelt und in Einheiten (E) pro Gramm Protein angegeben. Ein Enzym hat die Einheit der katalytischen Aktivität, wenn es die Umsetzung von 1 μmol Substrat/min katalysiert. Die Extinktionsänderung wurde bei 366 nm im Eppendorf-Photometer bestimmt und über einen Schreiber registriert.

Hexokinase (EC 2.7.1.1), *Phosphoglucose-Isomerase* (EC 5.3.1.9), *Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase* (EC 1.1.1.49) und *FDP-Aldolase* (EC 4.1.2.7) wurden in dem in den Boehringer-Informationen 1961 bzw. 1964 angegebenen Ansatz bestimmt. Die Gesamtaktivitäten der Enzyme des Entner-Doudoroff-Systems [*6-PG-Dehydrogenase* (EC 4.2.1.12) und *KDPG-Aldolase* (EC 4.1.2.14)] wurden in Übereinstimmung mit Gottschalk et al. (1964), die *6-Phosphogluconat-Dehydrogenase* (EC 1.1.1.44) wie bei Blackkolb u. Schlegel (1968) gemessen.

Die Bestimmung der *Gluconokinase* (EC 2.7.1.12) erfolgte nach der Vorschrift von Cohen (1955), *Phosphofruktokinase* (EC 2.7.1.11) nach Ling et al. (1955) und *Fructose-1,6-diphosphatase* (EC 3.1.3.11) nach Racker u. Schroeder (1958).

Transketolase (EC 2.2.1.1). Ansatz: 0,73 ml 0,05 M TEA-Puffer pH 7,6; 0,10 ml 0,1 M MgCl_2 ; 0,10 ml 0,05 M R-5-P; 0,04 ml 0,015 M NADH_2 ; 0,01 ml GDH/TIM (2 mg/ml); 0,02 ml Rohextrakt (1:5 verdünnt).

Transaldolase (EC 2.2.1.2). Ansatz: 0,73 ml 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6; 0,10 ml 0,1 M EDTA; 0,05 ml 0,01 M E-4-P; 0,05 ml 0,1 M F-6-P; 0,04 ml 0,015 M NADH_2 ; 0,01 ml GDH/TIM (2 mg/ml); 0,02 ml Rohextrakt (1:5 verdünnt).

Ribulose-5-phosphat-3-Epimerase (EC 5.1.3.1). Ansatz: 0,62 ml 0,05 M TEA-Puffer, pH 7,6; 0,10 ml 0,1 M MgCl_2 ; 0,05 ml 0,1 M R-5-P; 0,05 ml 0,05 M Ru-5-P; 0,10 ml 0,01 M TPP; 0,02 ml Transketolase (0,47 mg/ml); 0,01 ml GDH/TIM (2 mg/ml); 0,04 ml 0,015 M NADH_2 ; 0,01 ml Rohextrakt (1:30 verdünnt).

Phosphoribose-Isomerase (EC 5.3.1.6). Ansatz: 0,62 ml 0,05 M TEA-Puffer, pH 7,6; 0,10 ml 0,1 M $MgCl_2$; 0,08 ml 0,1 M R 5 P; 0,02 ml Ru 5 P 3 Epimerase (6,53 mg/ml); 0,02 ml Transketolase (0,47 mg/ml); 0,10 ml 0,01 M TPP; 0,01 ml GDH/TIM (2 mg/ml); 0,04 ml 0,015 M $NADH_2$; 0,01 ml Rohextrakt (1:30 verdünnt).

Enzyme und Biochemikalien. Die verwendeten Enzyme und Enzymsubstrate wurden mit Ausnahme der Transketolase, der Ribulose 5-P-3-Epimerase, des E-4-P und des Ru-5-P (Sigma Chemical Comp., St. Louis, Mo., U.S.A.) von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, bezogen. U- ^{14}C -Fructose, 1- ^{14}C - und 6- ^{14}C -Gluconat wurden bei der Fa. The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1- ^{14}C - und 6- ^{14}C -Fructose bei der Fa. Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, Mo., U.S.A., gekauft.

Ergebnisse

Enzyme des Hexoseabbaus und der Pentosesynthese

Für die Knallgasbakterien fehlte bisher eine zusammenfassende Untersuchung, die neben den Enzymen des Hexoseabbaus auch diejenigen der Pentosesynthese einschloß. Zum Gesamtverständnis der Ribosynthese ist es unerlässlich, die Aktivitäten der wichtigsten an der Bildung der Pentosephosphate beteiligten Enzyme zu ermitteln. Das geschah in Rohextrakten nach Anzucht von *Hydrogenomonas H 16* und *Pseudomonas facilis* unter autotrophen Bedingungen und in Fructose- und Gluconatmedium. Besondere Beachtung wurde dabei den Aktivitätsunterschieden einiger Schlüsselenzyme geschenkt.

Untersuchungen an Hydrogenomonas eutropha Stamm H 16. Durch die Testergebnisse (Tab.1) wurde die Induktion der Enzyme des ED-Abbauweges (PGI, G-6-P-DH, ED-Enzymsystem) in Gegenwart von Fructose bestätigt, ebenso die Verwertung des Gluconats über den ED-Weg (Gottschalk et al., 1964; Blackkolb u. Schlegel, 1968). Interessant war ein Vergleich der Enzymaktivitäten im Pentosephosphat-Cyclus nach autotrophen bzw. heterotrophen Wachstum. Die Transaldolase, besonders aber die Transketolase war in autotrophen Zellen beträchtlich aktiver. Entsprachen diese Verhältnisse den Erwartungen aufgrund der außerordentlichen Bedeutung beider Enzyme für die Regenerierung des primären CO_2 -Acceptors, Ribulose-1,5-diphosphat, so überraschten die Aktivitätsunterschiede der Phosphoribose-Isomerase und der Ru-5-P-3-Epimerase, deren Niveau nur in Fructosezellen erhöht war. Erklärungen dafür sind schwer zu geben, da hier das wenig aufgeklärte Gebiet der Regulation der konstitutiven Enzymsynthese berührt wird.

Beim Wachstum auf Gluconat sind die FDP-Aldolase und die FDPase weitere Schlüsselenzyme der Pentosesynthese, da das Substrat der Transketolase, F-6-P, nur über die rückläufigen Reaktionen der Glykolyse (Gluconeogenese) gebildet werden kann. Gluconat erhöhte gegenüber Fructose die Aktivitäten deutlich.

Tabelle 1. *Spezifische Aktivitäten wichtiger Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in H. eutropha Stamm H16 nach Wachstum auf verschiedenen C-Quellen*

Enzyme	Spezifische Enzymaktivität (E/g Protein)		
	autotroph	0,5% Fructose	0,5% Gluconat
Hexokinase	14	18	20
PGI	23	332	31
G-6-P-DH NADP	17	235	30
NAD	15	225	21
ED-Enzymsystem	1	147	151
6-PG-DH NAD(P)	0	0	0
Gluconokinase	1	4	9
Transketolase	252	134	62
Transaldolase	70	52	41
Ru-5-P-3-Epimerase	1420	2120	1000
Phosphoribose-Isomerase	520	1270	475
FDP-Aldolase	41	8	15
FDPase	336	110	177
Phosphofruktokinase	12	6	5

Anzucht und Aufschluß der Zellen sowie die Zusammensetzung der Testansätze sind im methodischen Teil geschildert.

Tabelle 2. *Spezifische Aktivitäten wichtiger Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in P. facilis nach Wachstum auf verschiedenen C-Quellen*

Enzyme	Spezifische Enzymaktivität (E/g Protein)		
	autotroph	0,5% Fructose	0,5% Gluconat
Hexokinase	38	85	106
PGI	16	255	175
G-6-P-DH NADP	15	168	118
NAD	15	225	155
ED-Enzymsystem	1	165	202
6-PG-DH NADP	0	0	0
NAD	1	18	23
Gluconokinase	1	1	8
Transketolase	350	74	111
Transaldolase	105	71	62
Ru-5-P-3-Epimerase	3120	1510	3210
Phosphoribose-Isomerase	1870	1040	1660
FDP-Aldolase	11	4	6
FDPase	264	68	71
Phosphofruktokinase	34	31	28

Untersuchungen an P. facilis. Da ausführliche enzymatische Untersuchungen des Kohlenhydratstoffwechsels in *P. facilis* bisher fehlten, erschien es angebracht, die Induktionsverhältnisse der Enzyme des ED-

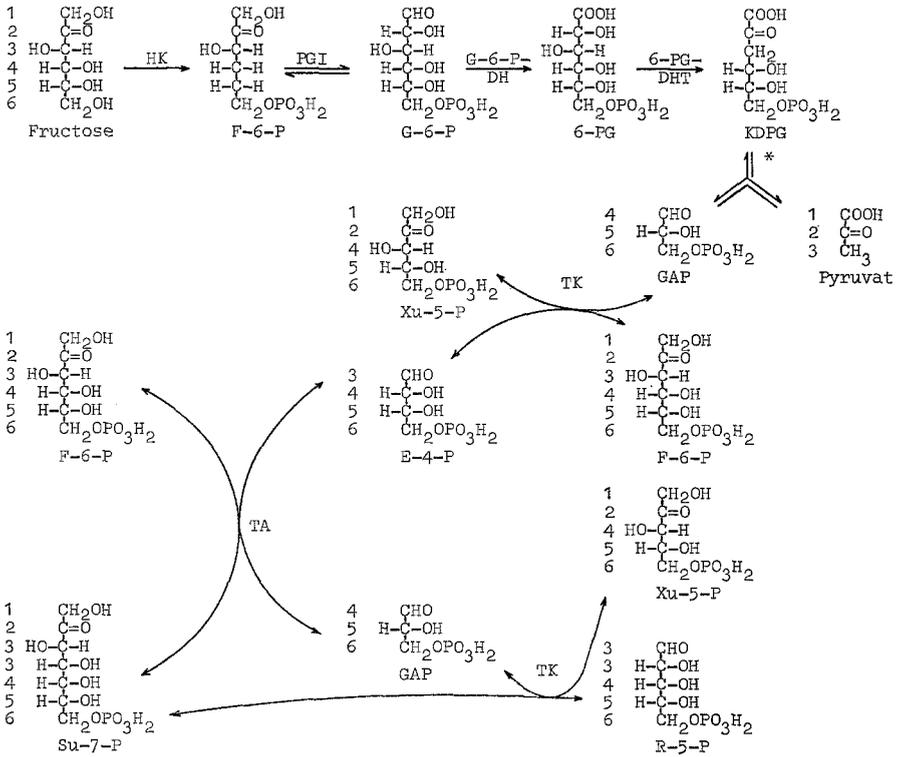
Abbauweges zu überprüfen, wenn die Zellen auf Fructose und Gluconat gezogen wurden. Weiterhin interessierte auch hier das Verhalten der Enzyme der Glykolyse und des PP-Weges. Als Bezugswerte dienten wiederum die Aktivitäten im Rohextrakt autotropher Zellen. Aus Tab. 2 geht hervor, daß Fructose und Gluconat die Enzyme des ED-Weges stark induzieren. Auch die Aktivität der 6-PG-DH war in heterotrophen Zellen deutlich erhöht. Gluconat bewirkte im Gegensatz zu *H 16* in *P. facilis* eine en bloc-Induktion aller Enzyme des Weges, einschließlich Gluconokinase. Die Schlüsselenzyme der Glykolyse (Phosphofruktokinase, FDP-Aldolase) waren vorhanden, ihre Aktivitäten nach Anzucht auf Fructose jedoch zu gering, als daß ein größerer Teil der Hexose über diesen Weg abgebaut werden könnte. Hinzu kam eine relativ starke FDPase. *P. facilis* baut Fructose und Gluconat wahrscheinlich auch überwiegend über den ED-Weg ab; nur kleinere Anteile werden in den PP-Weg eingeschleust.

Unter autotrophen Bedingungen hatten die meisten Enzyme des PP-Weges höhere Aktivitäten als nach heterotrophem Wachstum.

Nachweis des Biosyntheseweges der Ribose mit radioaktiv markierten Substraten

Herkunft der Kohlenstoffatome der Ribose nach Wachstum von H. eutropha Stamm H 16 auf Fructose oder Gluconat. Wenn davon ausgegangen wird, daß der Stamm *H 16* sowohl Fructose als auch Gluconat ausschließlich über den ED-Weg abbaut, kann ein Syntheseweg formuliert werden, der die theoretische Herkunft der Kohlenstoffatome der Pentosen aus beiden Substraten wiedergibt (Abb. 1 und 2). Die Schemata haben nur dann Gültigkeit, wenn die angegebenen Reaktionen ablaufen und die Pentosephosphate für weitere Synthesen genauso schnell verbraucht wie sie gebildet werden. Stehen sie längere Zeit mit den Hexosephosphaten im Gleichgewicht, kommt es zu Veränderungen, die sich bei Anwendung markierter Verbindungen als „Verschmierung“ der Radioaktivität bemerkbar machen.

Anzucht mit radioaktiv markierten Substraten und Isolierung der ^{14}C -Ribose. In die Markierungsversuche wurde neben dem Stamm *H 16* auch *P. facilis* einbezogen, da dieses Bakterium Pentosephosphate vermutlich auch über den oxydativen Teil des PP-Weges bildet. Die Position der Markierung in dem angebotenen Wachstumssubstrat war entscheidend für den Aussagewert der Experimente. Während der Anzucht in Rührkulturen wurden den Zellen folgende spezifisch markierte Verbindungen geboten: 1- ^{14}C - und 6- ^{14}C -Fructose, 1- ^{14}C - und 6- ^{14}C -Gluconat sowie U- ^{14}C -Fructose. Tab. 3 gibt die eingesetzten Substrat- und Radioaktivitätsmengen und die daraus resultierende spezifische Radioaktivität der markierten C-Atome wieder.



* KDPG-Aldolase

Abb. 1. Biosynthese der Pentosephosphate aus Fructose in *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H 16. Die Zahlen beziehen sich auf die Stellung der C-Atome in der Fructose

Tabelle 3. Menge und spezifische Radioaktivität der in die Markierungsexperimente eingesetzten radioaktiven Substrate

Kohlenstoff- quelle	<i>H. eutropha</i> H 16			<i>P. facilis</i>		
	Substrat/ Ansatz (g)	Gesamt- radio- aktivität (μ Ci)	spez. Radio- aktivität ($m\mu$ Ci/ ^a μ mol C)	Substrat/ Ansatz (g)	Gesamt- radio- aktivität (μ Ci)	spez. Radio- aktivität ($m\mu$ Ci/ ^a μ mol C)
U- ¹⁴ C-Fructose	3,80	42,5	0,334	3,90	50	0,374
1- ¹⁴ C-Fructose	4,00	50,0	2,26	4,00	50	2,25
6- ¹⁴ C-Fructose	4,00	48,5	2,18	4,00	50	2,27
1- ¹⁴ C-Gluconat	3,80	49,5	2,84	4,00	42,5	2,32
6- ¹⁴ C-Gluconat	4,00	35,5	1,94	3,80	41,5	2,38

^a Die spezifische Radioaktivität gilt für die jeweils markierten C-Atome.

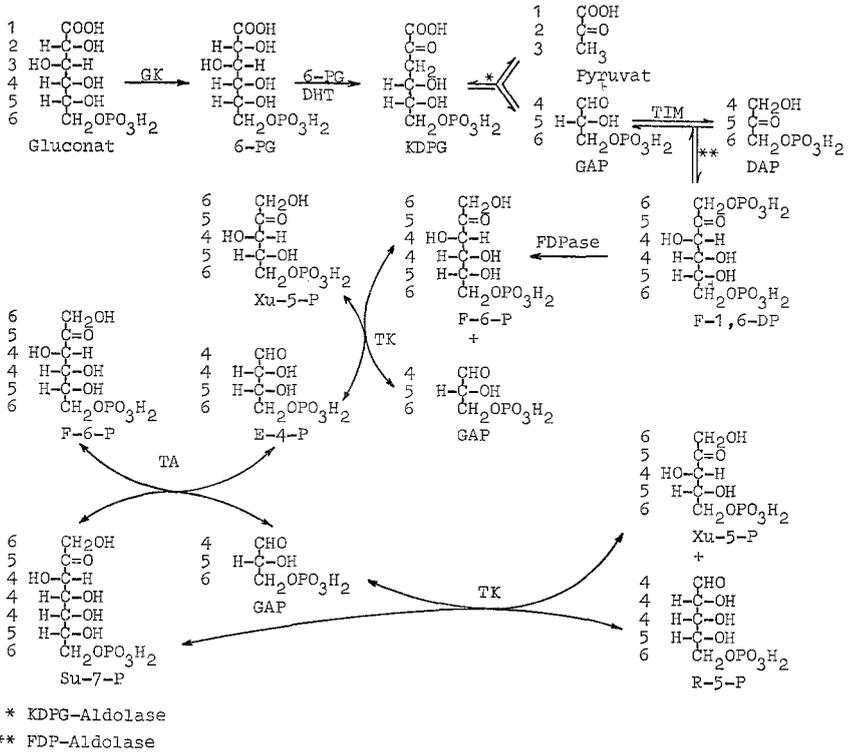


Abb. 2. Biosynthese der Pentosephosphate aus Gluconat in *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16*. Die Zahlen beziehen sich auf die Stellung der C-Atome im Gluconat

Tabelle 4. Zellfeuchtgewicht und isolierte ¹⁴C-Ribose

Kohlenstoffquelle	<i>H. eutropha H 16</i>		<i>P. facilis</i>	
	Zellfeuchtgewicht (g)	¹⁴ C-Ribose (mg)	Zellfeuchtgewicht (g)	¹⁴ C-Ribose (mg)
U- ¹⁴ C-Fructose	6,50	9,28	3,50	3,83
1- ¹⁴ C-Fructose	6,65	8,39	4,90	6,19
6- ¹⁴ C-Fructose	6,35	10,80	4,80	6,09
1- ¹⁴ C-Gluconat	6,15	8,62	3,20	4,83
6- ¹⁴ C-Gluconat	6,45	8,62	3,50	3,88

Die Ribose wurde von einem Papierchromatogramm eluiert und das Volumen auf 3 ml eingestellt. Die Bestimmung mittels Orcinreaktion erfolgte mit einem 0,1 ml-Aliquot, das vorher 1:50 verdünnt wurde. Mit jeder Meßreihe wurden einige Standardwerte mitgeführt.

Aus den noch während der logarithmischen Wachstumsphase geernteten Zellen wurde die RNS extrahiert, hydrolysiert und die freie Ribose papierchromatographisch gereinigt und isoliert. Je nach der eingesetzten Zellmasse gewannen wir zwischen 3,8 und 10,8 mg ^{14}C -Ribose (Tab.4).

Spezifischer Abbau der ^{14}C -Ribose

Fermentation der ^{14}C -Ribose durch Lactobacillus plantarum ATCC 8041. Pentosen werden von *Lactobacillus plantarum* ATCC 8041 zwischen den C-Atomen 2 und 3 in C-2- und C-3-Körper gespalten, die als Essig- bzw. Milchsäure ins Medium ausgeschieden werden (Gest u. Lampen, 1952). Zur Bestimmung der Markierungsverteilung in ^{14}C -Ribose setzte Bernstein (1953) den Organismus erstmalig ein.

Die einzelnen Versuche wurden in Manometriegefäßen durchgeführt, um die mit der Vergärung verbundene CO_2 -Entwicklung aus dem Bicarbonatpuffer (Theorie: 2 mole CO_2 /mol Ribose) zu verfolgen. Jeder Ansatz enthielt 500 μmole ^{14}C -Ribose, die sich aus der isolierten ^{14}C -Ribose und unmarkierter „Trägerribose“ zusammensetzte. Es war zu beachten, daß der endogene Stoffwechsel von *L. plantarum* Essigsäure

Tabelle 5. Vergärung der ^{14}C -Ribose zu ^{14}C -Essigsäure und ^{14}C -Milchsäure durch *L. plantarum*: Ausbeute beider Verbindungen nach Isolierung und Reinigung

Kohlenstoffquelle	^{14}C -Ribose aus <i>H. eutropha</i> H 16		^{14}C -Ribose aus <i>P. facilis</i>	
	isolierte Essigsäure (μmole)	Ausbeute (%)	isolierte Essigsäure (μmole)	Ausbeute (%)
U- ^{14}C -Fructose	508	97	506	96
1- ^{14}C -Fructose	524	98	530	99
6- ^{14}C -Fructose	529	99	531	99
1- ^{14}C -Gluconat	502	95	514	98
6- ^{14}C -Gluconat	515	97	522	98
	isolierte Milchsäure (μmole)	Ausbeute (%)	isolierte Milchsäure (μmole)	Ausbeute (%)
U 14 -C-Fructose	454	91	450	90
1- ^{14}C -Fructose	456	91	460	92
6- ^{14}C -Fructose	454	91	466	93
1- ^{14}C -Gluconat	449	90	453	91
6- ^{14}C -Gluconat	450	90	462	92

Die Vergärung von jeweils 500 μmole ^{14}C -Ribose erfolgte in Manometriegefäßen. Essigsäure wurde durch Wasserdampfdestillation, Milchsäure durch kontinuierliche Ätherextraktion aus dem Gärmedium isoliert. Siehe Material und Methoden für weitere Einzelheiten.

liefert (4–7%), deren Bildung eine zusätzliche, stöchiometrische CO₂-Entwicklung aus dem Bicarbonatpuffer bewirkt. Sie wurde in Kontrollgefäßen ohne Ribose gemessen und bei der Berechnung der Essigsäureausbeute berücksichtigt (Tab. 5).

Essig- und Milchsäureabbau. Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der einzelnen C-Atome wurden Essig- und Milchsäure einem stufenweisen Abbau unterworfen, in dessen Verlauf jedes C-Atom zu CO₂ oxydiert und seine Radioaktivität ermittelt wurde. In Vorversuchen mit Verbindungen bekannter Aktivität wurde der Abbau so lange optimiert, bis CO₂- und Aktivitätsausbeuten übereinstimmten. Die Carboxylgruppe der Essigsäure wurde durch Schmidt-Abbau, die Methylgruppe durch nasse Verbrennung nach van Slyke-Folch in CO₂ überführt. Tab. 6 gibt eine Übersicht der CO₂-Ausbeuten und der gefundenen Radioaktivität.

Der Abbau der markierten Milchsäure vollzog sich in drei Schritten. Zunächst wurde die Carboxylgruppe (C₁) durch KMnO₄-Oxydation in

Tabelle 6. Abbau der ¹⁴C-Essigsäure: Ausbeute der Abbauschritte und Radioaktivität in beiden C-Atomen

Kohlenstoff- quelle	¹⁴ C-Essigsäure aus Ribose von <i>H. eutropha H 16</i>			
	Schmidt- Abbau (C ₁) ^a Ausbeute (%)	van Slyke-Folch- Verbrennung (C ₂) Ausbeute (%)	Radio- aktivität in C ₁ (Ipm)	Radio- aktivität in C ₂ (Ipm)
U- ¹⁴ C-Fructose	88	91	28024	30240
1- ¹⁴ C-Fructose	82	83	1896	102204
6- ¹⁴ C-Fructose	83	85	1464	31072
1- ¹⁴ C-Gluconat	87	86	4296	3064
6- ¹⁴ C-Gluconat	83	80	4563	88912

	¹⁴ C-Essigsäure aus Ribose von <i>P. facilis</i>			
	Schmidt- Abbau (C ₁) Ausbeute (%)	van Slyke-Folch- Verbrennung (C ₂) Ausbeute (%)	Radio- aktivität in C ₁ (Ipm)	Radio- aktivität in C ₂ (Ipm)
U- ¹⁴ C-Fructose	80	85	10008	12248
1- ¹⁴ C-Fructose	82	84	840	77160
6- ¹⁴ C-Fructose	83	84	440	18600
1- ¹⁴ C-Gluconat	84	82	504	880
6- ¹⁴ C-Gluconat	83	80	2512	50696

^a C₁ und C₂ bezeichnen die COOH- bzw. die CH₃-Gruppe der Essigsäure; die Ausbeuten beziehen sich auf die eingesetzte Essigsäuremenge.

CO₂ überführt. Aus C₂ und C₃ der Milchsäure entstand bei dieser Reaktion Acetaldehyd, der mit Dichromat zu Essigsäure oxydiert wurde. Durch weiteren Schmidt-Abbau (C₂) und van Slyke-Folch-Verbrennung (C₃) wurden die beiden restlichen C-Atome bestimmt (Tab. 7).

Verteilung der radioaktiven Markierung in der Ribose. Die spezifische Radioaktivität der einzelnen C-Atome der Ribose wurde aus den Werten der Abbauversuche berechnet. In Tab. 8 ist die Markierungsverteilung in der Ribose beider Stämme nach Wachstum auf verschiedenen markierten Substraten angegeben. Als Maßzahl der Markierung wurde die relative spezifische Radioaktivität (RSR) verwendet. Sie ist definiert als Quotient aus der spezifischen Aktivität des fraglichen C-Atoms der Ribose (in $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol C}$) und der spezifischen Aktivität des markierten C-Atoms der Kohlenstoffquelle (Wachstumssubstrat) multipliziert mit dem Faktor 100. Geht das betreffende C-Atom des Substrates ohne Verdünnung durch

Tabelle 7. *Abbau der ¹⁴C-Milchsäure: Ausbeute der Abbauschritte und Radioaktivität der C-Atome*

Kohlenstoff- quelle	¹⁴ C-Milchsäure aus ¹⁴ C-Ribose von <i>H. eutropha</i> H 16					
	KMnO ₄ - Oxyda- tion (C ₁) ^a	Schmidt- Abbau (C ₂)	van Slyke- Folch-Ver- brennung (C ₃)	Radio- aktivität in C ₁	Radio- aktivität in C ₂	Radio- aktivität in C ₃
	Ausbeute (%)	Ausbeute (%)	Ausbeute (%)	(Ipm)	(Ipm)	(Ipm)
U- ¹⁴ C-Fructose	87	71	75	26120	17976	20928
1- ¹⁴ C-Fructose	85	69	70	3072	1424	2784
6- ¹⁴ C-Fructose	87	69	72	4336	2120	143768
1- ¹⁴ C-Gluconat	85	66	68	7680	1880	1880
6- ¹⁴ C-Gluconat	89	72	69	4080	11505	95920
	¹⁴ C-Milchsäure aus ¹⁴ C-Ribose von <i>P. facilis</i>					
	KMnO ₄ - Oxyda- tion (C ₁)	Schmidt- Abbau (C ₂)	van Slyke- Folch-Ver- brennung (C ₃)	Radio- aktivität in C ₁	Radio- aktivität in C ₂	Radio- aktivität in C ₃
	Ausbeute (%)	Ausbeute (%)	Ausbeute (%)	(Ipm)	(Ipm)	(Ipm)
U- ¹⁴ C-Fructose	88	75	77	10016	8024	8480
1- ¹⁴ C-Fructose	85	67	69	1232	296	2120
6- ¹⁴ C-Fructose	85	65	64	2032	408	69064
1- ¹⁴ C-Gluconat	94	73	72	992	736	784
6- ¹⁴ C-Gluconat	87	68	75	904	344	59904

^a C₁, C₂ und C₃ bezeichnen die -COOH-, die -CHOH- bzw. CH₃-Gruppe der Milchsäure; die Ausbeuten beziehen sich auf die eingesetzte Milchsäuremenge.

Tabelle 8. *Radioaktive Markierungsverteilung in der Ribose aus Hydrogenomonas eutropha H 16 und Pseudomonas facilis nach Wachstum auf spezifisch markierter ¹⁴C-Fructose oder ¹⁴C-Gluconat*

Kohlenstoffquelle	Relative spezifische Radioaktivität									
	<i>Hydrogenomonas eutropha H 16</i>					<i>Pseudomonas facilis</i>				
	C ₁ ^a	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
U- ¹⁴ C-Fructose	100	95	95	81	89	98	78	78	74	76
1- ¹⁴ C-Fructose	60	1	2	1	3	60	1	1	0	2
6- ¹⁴ C-Fructose	14	1	2	1	86	15	0	2	0	76
1- ¹⁴ C-Gluconat	1	2	4	1	1	1	0	1	1	1
6- ¹⁴ C-Gluconat	61	3	3	1	83	62	3	1	1	80

^a C₁ usw. bezeichnen die einzelnen C-Atome der Ribose.

unmarkierten Kohlenstoff in das Syntheseprodukt ein, nimmt die RSR den Wert 100 an. Die Markierungsverteilung in der Ribose des Stammes *H 16* entspricht mit gewissen Abweichungen dem theoretisch zu erwartenden Bild, wenn die Synthese vollständig über den nicht-oxydativen Teil des PP-Cyclus verläuft (Abb. 1 und 2). Die Aktivität der 1-¹⁴C-Fructose geht nicht als CO₂ verloren, sondern markiert das C-1 der Ribose mit einer RSR von 60 (theoretischer Wert: 66).

Eine hinreichende Erklärung findet die geringe Verdünnung der Aktivität im C₁ durch das Experiment mit 6-¹⁴C-Fructose, die nicht nur das C₅ (RSR = 86), sondern auch das C₁ der Ribose deutlich — sogar etwas stärker als erwartet (RSR = 14) — markiert. Über TIM, FDP-Aldolase und FDPase wird aus GAP, das die C-Atome 4, 5 und 6 der Fructose enthält, in den Positionen 1 und 6 markiertes F-6-P gebildet, welches seinerseits für die Pentosephosphatsynthese bereitsteht. Beim Wachstum auf Gluconat spielt diese Reaktionssequenz eine entscheidende Rolle. Die Aktivität des 6-¹⁴C-Gluconats wird im C₁ (RSR = 61) und im C₅ der Ribose (RSR = 83) wiedergefunden, nicht dagegen die Markierung des 1-¹⁴C-Gluconats. Nach der Spaltung des 6-Phosphogluconats durch das ED-Enzymsystem taucht die Aktivität des 1-¹⁴C-Gluconats in der Carboxylgruppe des Pyruvats auf, das über den Tricarbonsäurecyclus abgebaut wird, während GAP außerdem noch für die Pentosesynthese benötigt wird. Bemerkenswert ist jedoch die über dem Grundniveau liegende Markierung des C₃ (RSR = 4) durch 1-¹⁴C-Gluconat. In sehr geringem Umfang scheint auch Pyruvat über die gluconeogenetischen Reaktionen an der F-6-P-Bildung beteiligt zu sein.

Die Versuche mit U-¹⁴C-Fructose wurden unternommen, um die Verdünnung der Aktivitäten durch atmosphärisches CO₂ zu bestimmen.

H 16 verfügt auch nach mehreren Wachstumspassagen auf Fructose noch über Ru-1,5-DP-Carboxylase, die die autotrophe CO₂-Fixierung katalysiert (Gottschalk et al., 1964). Daneben wurden die Enzyme der heterotrophen CO₂-Fixierung nachgewiesen (Frings u. Schlegel, 1971). Um 19 bzw. 11% wurde die RSR der C-Atome 4 und 5 erniedrigt, die der übrigen lag nahe beim Wert 100. Die geringe Verschmierung der Markierungen in allen Experimenten läßt den Schluß zu, daß die Pentosephosphate ebenso schnell gebildet wie sie für weitere Synthesen verbraucht werden und alle drei Pentosephosphate zur Ribosese Synthese beitragen.

Wider Erwarten ist das radioaktive Verteilungsmuster in der Ribose aus *P. facilis* mit dem des Stammes *H 16* weitgehend identisch, auffallend lediglich die erhebliche Erniedrigung der RSR in den C-Atomen 2—5 (22—26%) beim Wachstum auf U-¹⁴C-Fructose. *P. facilis* vermag auch unter heterotrophen Bedingungen viel CO₂ zu fixieren (McFadden u. Tu, 1967). Die Synthese der Pentosephosphate durch die 6-PG-Dehydrogenase hat in diesem Organismus offenbar keine oder nur so geringe Bedeutung, daß ihr Anteil mit der gewählten Methode nicht zu bestimmen ist. Darauf deutet auch die niedrige Aktivität des Enzyms nach Wachstum auf Fructose oder Gluconat hin (Tab. 2).

Diskussion

Es existieren zwei quantitativ bedeutende Biosynthesewege der Pentosen aus den Hexosen; der oxydative und der nicht-oxydative Teil des Pentosephosphat-Cyclus. Bei der Umsetzung von 1 mol Hexose über den oxydativen Weg (G-6-P-DH + 6-PG-DH) entstehen neben 1 mol Pentose 2 mole NAD(P)H₂ und 1 mol CO₂. Das CO₂ stammt aus dem C-1 der Hexose. Die nicht-oxydativen Reaktionen (Transketolase + Transaldolase) liefern 6 mole Pentose aus 5 molen Hexose. Ausschließlich in tierischen Geweben kommt ein weiterer Weg des Hexosestoffwechsels, der Glucuronat-Weg, vor (Utter, 1958). In dieser Sequenz wird Glucose über Glucuronsäure in Pentosephosphate überführt. Eine Bedeutung in der Ribosese Synthese scheint dem Weg nicht zuzukommen (Hiatt u. Lareau, 1958).

Chemolithoautotrophe Bakterien, die wie *H. eutropha* Stamm *H 16* in der Lage sind, CO₂ über den reduktiven PP-Cyclus (Calvin-Cyclus) zu fixieren, sollten den gesamten für die Nucleotidsynthese benötigten Pentosebedarf durch diesen Cyclus decken können. Der Pentosesynthese durch die 6-PG-DH-Reaktion käme keine quantitative Bedeutung zu, lediglich der NADPH₂-Synthese durch dieses Enzym. So stellen Organismen, sowohl autotrophe als auch heterotrophe, welche über den oxydativen Teil des PP-Weges nicht verfügen, die Ausnahme dar, z. B. Knallgasbakterien vom Typ des Stamm *H 16*. Andererseits isolierte Fraenkel

(1968) von *Escherichia coli* eine 6-PG-DH-negative Mutante, die auf Glucose genauso schnell wie der Wildtyp wuchs; ein Beweis dafür, daß selbst Organismen, die normalerweise einen oxydativen PP-Weg aufweisen, ohne erkennbare Nachteile auf ihn verzichten können.

Die in der RNS-Ribose von Stamm *H 16* und von *P. facilis* gefundenen radioaktiven Markierungsmuster sprechen für eine gut regulierte Pentosephosphatsynthese. Der Einbau von Radioaktivität aus der spezifisch markierten Kohlenstoffquelle in Positionen der Ribose, die theoretisch nicht markiert werden dürften, ist sehr gering. Käme es zu einer relativen Überproduktion von Pentosephosphaten, d.h. würden sie schneller gebildet als für Synthesen verbraucht, stünden sie längere Zeit mit dem Hexosephosphatpool im Gleichgewicht. Die Folge wäre eine stärkere unspezifische Verteilung der Radioaktivität auf alle C-Atome der Ribose („Verschmierung“). Die Markierungsverteilung in der Ribose nach Anzucht beider Stämme auf 1-¹⁴C- und 6-¹⁴C-Fructose sowie 1-¹⁴C- und 6-¹⁴C-Gluconat läßt keinen Zweifel, daß die Pentosen ausschließlich über den nicht-oxydativen Mechanismus gebildet werden. Unter den gegebenen Bedingungen nehmen an der Gluconeogenese und Riboseseintthese nur die C-Atome 4, 5 und 6 der verfütterten Gluconsäure teil; die C-Atome 1, 2 und 3, die nach der KDPG-Aldolase-Spaltung als Pyruvat vorliegen, sind an der Riboseseintthese nahezu nicht beteiligt. Diese aus dem nach Verfütterung von 1-¹⁴C-Gluconat erhaltenen Markierungsmuster zu ziehende Folgerung bedeutet, daß Pyruvat weitgehend oxydiert wird. In *P. facilis* scheint die 6-PG-DH für die Riboseseintthese keine Rolle zu spielen. Die Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit den Befunden von Fossitt u. Bernstein (1963), die bei entsprechenden Versuchen mit *Pseudomonas saccharophila* — der Organismus baut Glucose ausschließlich über den an ihm entdeckten ED-Weg ab (Entner u. Doudoroff, 1952) — in der Ribose eine sehr ähnliche Aktivitätsverteilung erhielten. Eine Erklärung für die Markierung des C₁ durch 6-¹⁴C-Glucose bzw. Gluconat fanden sie jedoch nicht, weil keine FDP-Aldolase nachgewiesen wurde. *P. saccharophila* wurde aber als Knallgasbakterium isoliert (Doudoroff, 1940) und ist daher während der autotrophen CO₂-Fixierung auf die Aktivität dieses Enzyms angewiesen.

An einer ganzen Reihe anderer Stämme ist bisher die Pentosebiosynthese bereits untersucht worden. Brenneman et al. (1960) forderten aufgrund von Markierungsexperimenten mit ¹⁴C-Acetat eine „C-3 plus C-2“-Kondensation in *Alcaligenes faecalis*, aber keine Beteiligung von Hexosevorläufern an der Synthese. Einen genauen Mechanismus konnten sie nicht formulieren. Dagegen lassen die Versuche von Decker et al. (1966) den eindeutigen Schluß zu, daß *Clostridium kluyveri* aus Äthanol, Acetat und Crotonat die Pentosen über die Transketolase-Transaldolasereaktionen bildet.

Die von verschiedenen Gruppen angestellten intensiven Untersuchungen an *E. coli* zielten auf die Ermittlung der relativen Beteiligung der beiden Sequenzen des PP-Weges ab. Nach Wachstum auf 1-¹⁴C-Glucose veranschlagte Bernstein (1956) den Anteil des nicht-oxydativen Weges an der Ribose-Synthese auf 10–30%. Dieser Anteil erhöht sich auf 65–80%, wenn *E. coli* auf Acetat angezogen wird (Bagatell et al., 1958, 1959). Das deutet auf eine Abhängigkeit des Syntheseweges von dem jeweiligen Wachstumssubstrat und der vorherigen Anzucht hin. Es konnte bestätigt werden, daß in Acetat-Zellen die Ribose zu 20–35%, nach mehrfacher Glucosepassage solcher Zellen zu ca. 80% über den oxydativen Weg gebildet wird (Szykiewicz et al. 1961; Sable u. Cassisi, 1962). Aufgrund ihrer Experimente mit 1-¹⁸O-Glucose, deren markierter Sauerstoff ausschließlich in der 5'-Position der Nucleoside wiedergefunden wurde, berechneten Caprioli u. Rittenberg (1969) den Anteil des oxydativen Weges dagegen nur mit 30%. Der Einbau von 2-¹⁸O- und 6-¹⁸O-Glucose untermauerte die Schlußfolgerungen. Die Hauptaufgabe dieses Weges sehen die Autoren in der Bereitstellung von NADPH₂.

Solche teilweise unterschiedlichen Ergebnisse haben ihre Ursache in der Unsicherheit bei der Beurteilung der Markierungsverhältnisse. Wood et al. (1963) bezweifelten die meisten Berechnungen, da die Reversibilität der Transketolase- und der Transaldolasereaktionen nicht berücksichtigt wurde. Danach würde der Weg des Markierungseinbaues dem tatsächlichen Syntheseweg der Ribose nicht entsprechen. Wie Katz u. Rognstad (1967) zeigten, verläuft die Nettosynthese der Pentosen zumindest in *E. coli* immer über den oxydativen Weg. Nur ein sehr kleiner Teil der durch die oxydativen Reaktionen gebildeten Pentosephosphate wird in Phosphoribosylpyrophosphat umgewandelt. Der Überschuß wird in Hexosephosphate recycliert, so daß im nicht-oxydativen Zweig der Kohlenstoff von den Pentosen zu den Hexosen fließt. Demnach dient der Gesamtzyclus also der Regenerierung von NADPH₂. Mit gewissen Einschränkungen gelten diese Vorbehalte auch für die Auswertung der Ergebnisse bei *P. facilis*. Die 6-PG-DH ist jedoch NAD-spezifisch und wenig aktiv (Tab. 2), und die G-6-P-DH hat im Gegensatz zu *E. coli* vor allem eine katabolische Funktion. Im Stamm *H 16* sind die Wege der Ribosesynthese und des Radioaktivitätseinbaues identisch, da die 6-PG-DH fehlt.

Literatur

- Ashwell, G.: Colorimetric analysis of sugars. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan. *Methods in enzymology*, Vol. 3, pp. 87–90. New York: Academic Press 1957.
- Bagatell, F. K., Wight, E. M., Sable, H. Z.: Biosynthesis of ribose and deoxyribose in *Escherichia coli*. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) **28**, 216–217 (1958).
- — — Biosynthesis of ribose and deoxyribose in *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.* **234**, 1369–1374 (1959).

- Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G.: Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* **8b**, 555—577 (1953).
- Bernstein, I. A.: Fermentation of ribose- C^{14} by *Lactobacillus pentosus*. *J. biol. Chem.* **205**, 309—316 (1953).
- Biosynthesis of ribose in *Escherichia coli* grown on C^{14} -labeled glucose. *J. biol. Chem.* **221**, 873—878 (1956).
- Wood, H. G.: Determination of isotopic carbon patterns in carbohydrate by bacterial fermentation. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: *Methods in enzymology*, Vol. 4, pp. 561—584. New York: Academic Press 1957.
- Blackkolb, F., Schlegel, H. G.: Katabolische Repression und Enzymhemmung durch molekularen Wasserstoff bei *Hydrogenomonas*. *Arch. Mikrobiol.* **62**, 129—143 (1968).
- Boehringer-Informationen (1961, 1964).
- Bray, G. A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Analyt. Biochem.* **1**, 279—285 (1960).
- Brenneman, F. N., Vishniac, W., Volk, W. A.: Ribose synthesis in *Alcaligenes faecalis*. *J. biol. Chem.* **235**, 3357—3362 (1960).
- Caprioli, R., Rittenberg, D.: Pentose synthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **8**, 3375—3384 (1969).
- Cohen, S. S.: Gluconokinase. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: *Methods in enzymology*, Vol. 1, pp. 350—354. New York: Academic Press 1955.
- Decker, K., Thauer, R. K., Jungermann, K.: Die Kohlenhydratsynthese in *Clostridium kluyveri*. I. Isotopenversuche zur Biosynthese der Ribose. *Biochem. Z.* **345**, 461—471 (1966).
- Doudoroff, M.: The oxidative assimilation of sugars and related substances by *Pseudomonas saccharophila*. *Enzymologia* **9**, 59—72 (1940).
- Entner, N., Doudoroff, M.: Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J. biol. Chem.* **196**, 853—862 (1952).
- Fossitt, D. D., Bernstein, I. A.: Biosynthesis of ribose and deoxyribose in *Pseudomonas saccharophila*. *J. Bact.* **86**, 1326—1331 (1963).
- Fraenkel, D. G.: Selection of *Escherichia coli* mutants lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase or gluconate-6-phosphate dehydrogenase. *J. Bact.* **95**, 1267—1271 (1968).
- Frings, W., Schlegel, H. G.: Zur Synthese der C_4 -Dicarbonsäuren aus Pyruvat durch *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16*. *Arch. Mikrobiol.* **79**, 204—219 (1971).
- Gest, H., Lampen, J. O.: Fermentation of $1-^{14}C$ -xylose by *Lactobacillus pentosus*. *J. biol. Chem.* **194**, 555—562 (1952).
- Gottschalk, G., Barker, H. A.: Synthesis of glutamate and citrate by *Clostridium kluyveri*. A new type of citrate synthase. *Biochemistry* **5**, 1125—1133 (1966).
- Eberhardt, U., Schlegel, H. G.: Verwertung von Fructose durch *Hydrogenomonas H 16* (I). *Arch. Mikrobiol.* **48**, 95—108 (1964).
- Hiatt, H. H., Lareau, J.: Studies of ribose metabolism. *J. biol. Chem.* **233**, 1023—1024 (1958).
- Katz, J., Rognstad, D.: The labeling of pentose phosphate from glucose- ^{14}C and estimation of the rates of transaldolase, the contribution of the pentose cycle, and ribose phosphate synthesis. *Biochemistry* **6**, 2227—2247 (1967).
- Kuehn, G. D., McFadden, B. A.: Enzymes of the Entner-Doudoroff path in fructose-grown *Hydrogenomonas eutropha*. *Canad. J. Microbiol.* **14**, 1259—1260 (1968).

- Ling, K. H., Byrne, W. L., Lardy, H.: Phosphohexokinase. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan: *Methods in enzymology*, Vol. 1, pp. 306—310. New York: Academic Press 1955.
- McFadden, B. A., Tu, C. L.: Regulation of autotrophic and heterotrophic carbon dioxide fixation in *Hydrogenomonas facilis*. *J. Bact.* **93**, 886—893 (1967).
- Partridge, S. M.: Anilin hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature (Lond.)* **164**, 443 (1949).
- Racker, E., Schroeder, E. A. R.: The reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C₁-phosphatases for fructose-1,6-diphosphate and seduheptulose-1,7-diphosphate. *Arch. Biochem.* **74**, 326—344 (1958).
- Ramsey, H. H.: Autotrophic and heterotrophic metabolism in *Hydrogenomonas facilis*. *Antonie v. Leeuwenhoek* **34**, 71—80 (1968).
- Sable, H. Z.: Biosynthesis of ribose and deoxyribose. *Advanc. Enzymol.* **28**, 391—460 (1966).
- Cassisi, E. E.: Biosynthesis and biosynthetic pathways of pentoses in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **84**, 1169—1172 (1962).
- Sakami, W.: *Handbook of isotope tracer methods*. Cleveland: Western Reserve University 1955.
- Schatz, A., Bovell, C.: Growth and hydrogenase activity of a new bacterium, *Hydrogenomonas facilis*. *J. Bact.* **63**, 87—98 (1952).
- Schlegel, H. G., Kaltwasser, H., Gottschalk, G.: Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* **39**, 209—222 (1961).
- Szynkiewicz, Z. M., Sable, H. Z., Pflueger, E. M.: Biosynthesis of pentoses in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **81**, 837—844 (1961).
- Utter, M. F.: Carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* **27**, 245—284 (1958).
- Wilde, E.: Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. *Arch. Mikrobiol.* **43**, 109—137 (1962).
- Wood, H. G., Katz, J., Landau, B. R.: Estimation of pathways of carbohydrate metabolism. *Biochem. Z.* **338**, 809—847 (1963).

Dr. B. Bowien
Prof. Dr. H. G. Schlegel
Institut für Mikrobiologie der GSF
D-3400 Göttingen, Grisebachstraße 8
Deutschland