Arch. Mikrobiol. 71, 67—78 (1970)

Eigenschaften der NAD-spezifischen Hydrogenase aus *Hydrogenomonas H 16*

J. Pfitzner, H. A. B. Linke und H. G. Schlegel

Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen und
Institut für Mikrobiologie der Gesellschaft für Strahlenforschung mbH München

Eingegangen am 29. Januar 1970

Properties of the NAD-Specific Hydrogenase from *Hydrogenomonas H 16*

Summary. A soluble hydrogenase from cell-free extracts of *Hydrogenomonas H 16* has been purified 45-fold up to a specific activity of 36,500 units per g protein. The enzyme catalyzes the reduction of NAD with molecular hydrogen. It does not require cofactors. The NAD-reduction catalyzed by this enzyme is influenced to only a small extent by the presence of NADH, ATP, bicarbonate or magnesium ions. The enzyme is free from flavins and pyridine nucleotides, reacts only with NAD and not with oxygen, NADP, FMN, FAD or methylene blue. FMN, FAD and methylene blue are reduced only in the presence of catalytic amounts of NAD. The lag-phase of the reduction of NAD can be eliminated by preincubating the enzyme in the presence of NADH or molecular hydrogen; NAD is ineffective. The inhibition of the hydrogenase reaction by oxygen is negligible. Reducing agents such as mercaptoethanol or sulfide decreased the reaction rate.

The Michaelis constant of the soluble hydrogenase for molecular hydrogen is $K_m^{H_2} = 1.9 \cdot 10^{-4}$ M. Half maximal activity is attained at a NAD-concentration of $[NAD]_{0.5\,(V)} = 1.3 \cdot 10^{-4}$ M. The pH-optimum is 8.5 in 0.05 M potassium phosphate buffer and 7.9 in 0.05 M Tris-HCl-buffer; reaction rates were maximal at 36° C under the conditions employed. The activation energy was calculated to be 10.4 kcal/mol.

Zusammenfassung. Aus zellfreiem Extrakt von *Hydrogenomonas H 16* wurde die lösliche Hydrogenase 45fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 36500 E/g Protein angereichert. Das Enzym katalysiert die Reduktion von NAD mit molekularem Wasserstoff. Ein Cofaktorbedürfnis konnte nicht festgestellt werden. Der Einfluß von NADH, ATP, Bicarbonat und Magnesium auf die hydrogenasekatalysierte NAD-Reduktion war unerheblich. Das angereicherte Enzym ist flavin- und pyridinnucleotidfrei und reagiert mit NAD, nicht mit O_2, NADP, FMN, FAD oder Methylenblau. Die drei letztgenannten Wasserstoff-Acceptoren werden lediglich in Gegenwart katalytischer Mengen NAD reduziert. Die lag-Phase der Reduktion von NAD läßt sich durch Vorinkubation des Enzyms mit NADH oder Wasserstoff, nicht jedoch mit NAD eliminieren. Die Hemmung der Hydrogenasereaktion durch

Abkürzungen: E = Enzymeinheit (μmole Substrat/min); ΔE_x = Extinktionsänderung bei der Wellenlänge x nm; Ext.$_x$ = Extinktion bei der Wellenlänge x nm; KP = Kaliumphosphat (KH_2PO_4-K_2HPO_4-Gemisch); MB = Methylenblau; NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid; NADH = reduziertes NAD; TEAE = Triäthylaminoäthyl; Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Sauerstoff ist gering. Reduzierende Agenzien wie Mercaptoäthanol oder Sulfid setzten die Reaktionsrate herab.

Die Michaeliskonstante der löslichen Hydrogenase für molekularen Wasserstoff beträgt $K_m^{H_2} = 1{,}9 \cdot 10^{-4}$ M. Die NAD-Konzentration, bei der halbmaximale Aktivität erreicht wird, beträgt $[NAD]_{0,5\,(V)} = 1{,}3 \cdot 10^{-4}$ M. Das pH-Optimum wird in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer bei pH 8,5 und in 0,05 M Tris-HCl-Puffer bei pH 7,9 erreicht. Unter den angegebenen Bedingungen lag das Temperatur-Optimum bei 36° C. Die Aktivierungsenergie der löslichen Hydrogenase wurde als 10,4 kcal/mol ermittelt.

Mehrere anaerobe Bakterien entledigen sich der überschüssigen Elektronen durch die Bildung von molekularem Wasserstoff (Gray u. Gest, 1965). Demgegenüber verwenden viele phototrophe Bakterien, Algen sowie aerobe und anaerob-atmende Bakterien molekularen Wasserstoff als Elektronen-Donator. Sowohl die H_2-Bildung als auch der H_2-Verbrauch werden durch Hydrogenase katalysiert.

Die Hydrogenasen der H_2-oxydierenden Knallgasbakterien unterscheiden sich voneinander in der Reaktionsfähigkeit mit NAD und unphysiologischen Elektronen-Acceptoren (Peck, 1968). In einigen Fällen ließen sich eine lösliche NAD-reduzierende und eine partikelgebundene Hydrogenase im selben Organismus nachweisen (Bone, 1960; Wittenberger u. Repaske, 1961; Bone et al., 1963; Eberhardt, 1966). Bei *Hydrogenomonas H 16* ist die Hydrogenaseaktivität auf zwei Fraktionen verteilt, die sich durch einstündige Zentrifugation bei 100000 g voneinander trennen lassen (Eberhardt, 1966). Die im Überstand befindliche lösliche Hydrogenase reduziert NAD, Methylenblau (MB) und andere Acceptoren. Mit der Partikelfraktion lassen sich zwar MB und andere unphysiologische Acceptoren reduzieren, nicht jedoch NAD.

Die vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der Anreicherung und Charakterisierung der löslichen Hydrogenase aus *Hydrogenomonas H 16*.

Material und Methoden

Der von Wilde (1962) isolierte Stamm *Hydrogenomonas H 16* wurde autotroph, wie bei Schlegel et al. (1961) angegeben, angezogen.

Herstellung des zellfreien Extrakts. Die Zellen wurden mittels einer Cepa-Durchlaufzentrifuge (Fa. C. Padberg, Lahr, Baden) geerntet. Die erhaltene Zellpaste wurde in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer (KP-Puffer) suspendiert. Anschließend wurde mit Ultraschall von 20 kHz bei +5° C aufgeschlossen (Ultraschall-Desintegrator, Fa. Schoeller & Co., Frankfurt a. M.). Der Extrakt wurde durch Zentrifugation bei 7500 g (15 min) und 28000 g (30 min) von restlichen Zellen und großen Partikeln befreit. Das 28000 g-Überstehende wird als Rohextrakt bezeichnet.

Proteinbestimmungen. Für Proben mit einem Proteingehalt von weniger als 1 mg/ml wurde die Extinktion bei 280 nm und 1 cm Schichtdicke bestimmt. $Ext._{280}$ von 1,08 entsprach 1 mg Protein/ml. Protein in der Konzentration von mehr als 1 mg/ml wurde mit 20%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Ansatz: 0,1—0,5 ml Proteinlösung, Wasser ad 4,0 ml, 0,5 ml 20%ige Trichloressigsäure. Messung der

Extinktion bei 578 nm und 2 cm Schichtdicke. $Ext._{578}$ von 0,46 entsprach 1 mg Protein/Ansatz. Im nucleinsäurehaltigen Rohextrakt wurde Protein mit den von Schmidt et al. (1963) verwendeten Biuret-Reagentien bestimmt.

Bestimmung der Enzymaktivität. Die Aktivität der NAD-spezifischen Hydrogenase wurde optisch (Eppendorf-Photometer) bestimmt. Eine Enzymeinheit E setzt 1 μmol Substrat pro Minute (min) um. Die spezifische Aktivität wird als E/g Protein angegeben. 3 ml-Ansatz: 286 μmole Tris-HCl-Puffer (pH 7,8; wasserstoffgesättigt); 2,1 μmole NAD; Start mit 0,04 ml Extrakt. Ermittlung der Extinktionsänderung ΔE/min bei 366 nm und 25° C in 1 cm-Cuvetten, die mit Teflon-Stopfen verschließbar sind. ΔE_{366} von 1,0 entspricht 0,303 μmole NAD- (bzw. H_2-) Umsatz/ml. Außerdem kann die im beschriebenen Ansatz tatsächlich wirksame H_2-Konzentration auf Grund des Extinktionsendwertes bei 366 nm ermittelt werden. Verschiedene H_2-Konzentrationen lassen sich durch Sättigung des Puffers mit Wasserstoff und Argon in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (Fischer & Porter-Zählrohre) erzielen.

Anreicherung der NAD-spezifischen Hydrogenase. Alle Schritte wurden bei 0—5° C durchgeführt.

Protaminsulfat-Fällung. Die Nucleinsäuren des wasserstoffgesättigten Rohextrakts wurden mit $^1/_{10}$ des betreffenden Fraktionsvolumens $1^0/_0$iger Protaminsulfatlösung ausgefällt.

Ammoniumsulfat-Fraktionierung. Das zwischen $25^0/_0$ und $55^0/_0$ Ammoniumsulfat-Sättigung ausgefällte Protein wurde in etwa 10 ml 0,05 M KP-Puffer (pH 7,8) aufgenommen.

Erwärmung. Die maximal mit 4 ml Enzymlösung in einem kurzen, dünnwandigen Reagensglas durchgeführte Erwärmung auf 47° C (4 min) ließ einen Teil des Begleitproteins denaturieren. Der Zentrifugationsüberstand wurde anaerob 10 Std gegen 1 l wasserstoffgesättigten 0,02 M KP-Puffer (pH 7,5) dialysiert.

Calciumphosphatgel-Adsorption. Das nach der Vorschrift von Keilin u. Hartree (1938) hergestellte Calciumphosphatgel war 2—4 Monate alt und enthielt 23,8 mg Trockensubstanz/ml Gelsuspension. Zunächst wurden bei niedriger Gel-Konzentration (0,7 ml/10 mg Protein) inaktive Proteine entfernt. Anschließend wurde bei höherer Gel-Konzentration (1,2 ml/10 mg Protein) das Enzym adsorbiert. Nach dem Waschen ließ sich das Enzym mit 0,16 M KP-Puffer (pH 7,8) in 1 Std unter Rühren eluieren. Das Gel wurde abzentrifugiert und der aktive Überstand wie oben anaerob dialysiert.

TEAE-Cellulose-Säulenchromatographie. Auf die mit dem Startpuffer äquilibrierte TEAE-Cellulose-Säule (20 cm Länge; 1,8 cm ⌀) wurde das Dialysat gegeben und mit 200 ml wasserstoffgesättigtem Kaliumphosphat-Kaliumchlorid-Puffer (pH 7,8), mit einem linear ansteigenden Konzentrationsgradienten (0,05 bis 0,1 M an Kaliumphosphat sowie an Kaliumchlorid) 10 Std unter Druck von Wasserstoffgas eluiert (Durchflußgeschwindigkeit 25 ml/Std). Die aufgefangenen 5 ml-Fraktionen wurden sofort bezüglich ihres Proteingehalts, ihrer Aktivität und ihrer Leitfähigkeit untersucht.

Ergebnisse

Nach dem unter „Methoden" beschriebenen Anreicherungsverfahren ließ sich die NAD-reduzierende Hydrogenase aus *Hydrogenomonas H 16* 45fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 36500 E/g Protein anreichern. Die einzelnen Anreicherungsstufen sind in Tab. 1 aufgeführt. Nur die aktivsten Fraktionen der TEAE-Cellulose-Säulenchromatographie (mindestens 15000 E/g Protein) wurden für die nachfolgenden

Tabelle 1. *Anreicherung der löslichen Hydrogenase aus einem Rohextrakt von* Hydrogenomonas H 16

Fraktion	Gesamtprotein (mg)	Spez. Akt. (E/g Prot.)	Gesamtanreicherungsfaktor	Gesamtaktivität (%)
Rohextrakt	1200	817	1,0	100
Protaminsulfat-Überstehendes	1084	982	1,2	101
Ammoniumsulfat (25—55%)	479	2010	2,5	98
Überstehendes nach Erwärmung, dialysiert	252	3000	3,7	77
Ca-Phosphatgel-Eluat, dialysiert	63,5	8380	10,3	54
TEAE-Cellulose-Eluat Frakt. 14	1,62	36500	45	5,5

Versuche verwendet. Sie erlitten in der Regel nach 10tägiger Aufbewahrung bei —16° C einen Aktivitätsverlust von nahezu 30%. Durch Ausfällung des Enzymproteins in 80% gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung und Wiederauflösung in 0,05 M KP-Puffer (pH 7,5), dem 25 μM Mn^{++}, Fe^{++} und Mg^{++} zugesetzt waren, ließ sich der Aktivitätsverlust auf 18% vermindern.

Das Absorptionsspektrum der angereicherten löslichen Hydrogenase (Abb. 1, gestrichelte Kurve) weist bei 272 nm eine für pyridinnucleotidabhängige Dehydrogenasen charakteristische Proteinbande auf. Durch Reduktion des Enzympräparats mit molekularem Wasserstoff erfolgte keine Veränderung des Absorptionsspektrums. Danach ist die angereicherte Hydrogenase frei von Pyridinnucleotiden und Flavinen. Um 400 nm sind zwei kleinere Banden sichtbar (Abb. 1, durchgezogene Kurve), die möglicherweise durch ein Nichthäm-Eisenprotein hervorgerufen werden (Beinert, 1965). Es ist nicht sicher, ob diese Banden dem Hydrogenase-Protein zuzuordnen sind.

Die Hydrogenase reagiert lediglich mit NAD als Wasserstoff-Acceptor. MB, FMN und FAD werden nur reduziert, wenn katalytische Mengen NAD anwesend sind (Abb. 2). NADP und molekularer Sauerstoff werden auch unter diesen Bedingungen nicht reduziert. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Acceptorspezifitäten des Rohextrakts. In Gegenwart von Wasserstoff reduzieren Rohextrakte und lösliche Fraktionen aus *H 16* FMN, FAD und MB auch ohne NAD-Zusätze (Eberhardt, 1966).

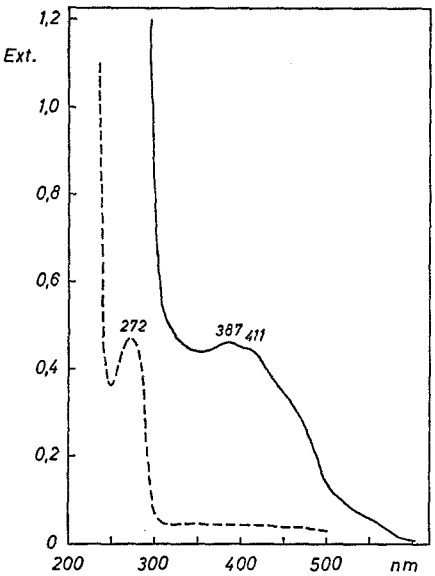

Abb. 1

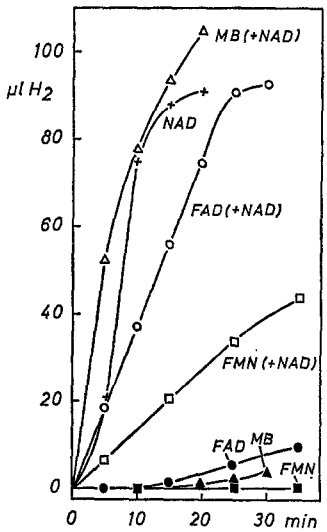

Abb. 2

Abb. 1. Absorptionsspektrum der NAD-reduzierenden Hydrogenase. Durchgezogene Kurve: unverdünntes Enzym (25700 E/g Protein), 0,68 mg Protein/ml; gestrichelte Kurve: 1 zu 10 mit 0,05 M KP-Puffer (pH 7,6) verdünntes Enzym

Abb. 2. Hydrogenaseaktivität mit verschiedenen Wasserstoff-Acceptoren in An- und Abwesenheit katalytischer Mengen NAD. Die Enzymaktivität wurde manometrisch an der Aufnahme von H_2 gemessen. Die Warburggefäße enthielten in 2,2 ml Flüssigkeitsvolumen 20 µg Enzymprotein, 160 µmole Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) und jeweils 4 µmole des Wasserstoff-Acceptors (NAD, FAD, FMN oder MB); die (in Klammern angegebene) katalytische Menge NAD betrug 2 mµmole; H_2-Atmosphäre; 30° C

Für die Reaktionskinetik der NAD-spezifischen Hydrogenase aus *H 16* ist eine lag-Phase charakteristisch (Ahrens, 1966). Durch 15minütiges Vorinkubieren des Enzymproteins mit NADH oder H_2, nicht jedoch mit NAD, ließ sich die Anlaufphase ausschalten. Die Geschwindigkeit der NAD-Reduktion hängt von der Konzentration des molekularen Wasserstoffs im Reaktionsgemisch ab. Es erwies sich als gleichgültig, ob Stickstoff oder Argon als Verdünnungsgase verwendet wurden (Abb.3). Sauerstoff erniedrigte die Reaktionsrate besonders bei geringen H_2-Konzentrationen. Der Effekt des Sauerstoffs war jedoch unerwartet gering.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrogenase von der Konzentration an gelöstem Wasserstoff ist für zwei NAD-Konzentrationen (0,2 mM und 0,7 mM) in Abb. 4a dargestellt. Es ist ersicht-

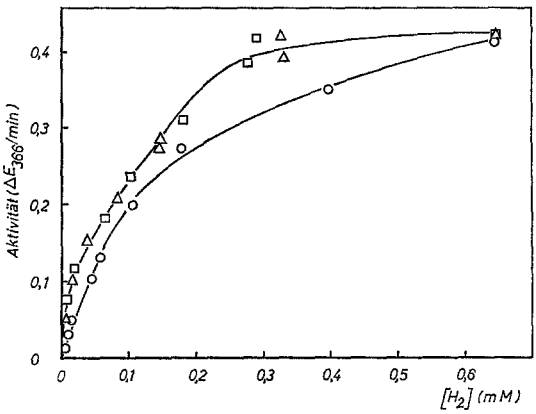

Abb. 3. Substratsättigungskurve der löslichen Hydrogenase für H_2 unter dem Einfluß verschiedener Füllgase. Die Hydrogenaseaktivität wurde an der Extinktionszunahme bei 366 nm in einem 3 ml-Reaktionsansatz bei 25° C gemessen: 290 μmole Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) und 2,1 μmole NAD, beides mit verschiedenen Gasgemischen gesättigt; gestartet wurde die Reaktion durch den Zusatz von 9 μg Enzymprotein. Gasgemische: Molekularer Wasserstoff mit Argon (△), Stickstoff (□) oder Sauerstoff (○) als Füllgase

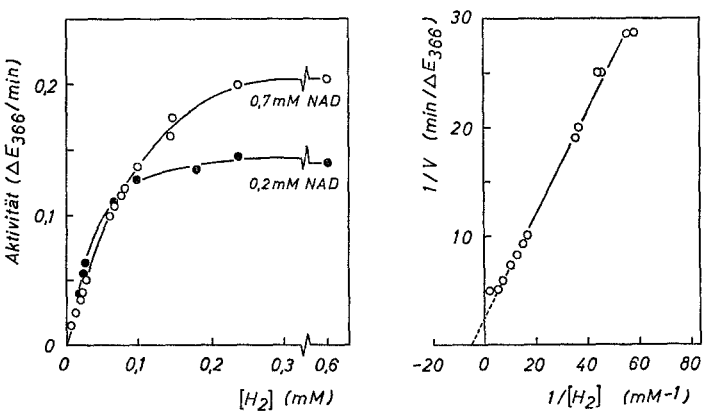

Abb. 4. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der löslichen Hydrogenase von der Wasserstoffkonzentration (*a* Substratsättigungskurve; *b* Lineweaver-Burk-Auftragung bei NAD-Sättigung). Das 3 ml-Reaktionsgemisch enthielt 95 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) und 0,7 bzw. 0,2 mM NAD, beides gesättigt mit verschiedenen Gemischen von H_2 und Argon; Start der Reaktion durch 9 μg Enzymprotein

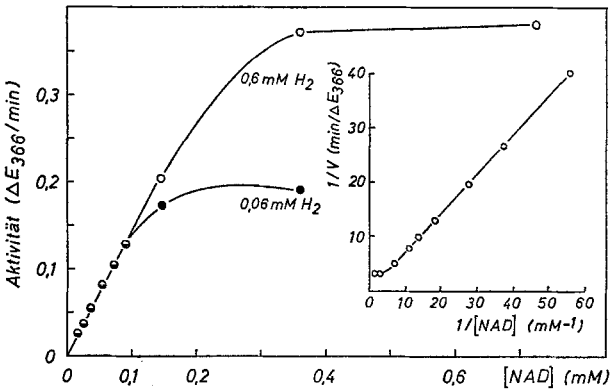

Abb. 5. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der löslichen Hydrogenase von der NAD-Konzentration (Substratsättigungskurve und doppelt-reziproke Darstellung bei H_2-Sättigung). Das 3 ml-Reaktionsgemisch enthielt 95 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,8), der entweder wasserstoffgesättigt (0,6 mM H_2 im Ansatz) oder wasserstoff-argon-gesättigt (0,06 mM H_2 im Ansatz) verwendet wurde; die NAD-Konzentrationen wurden variiert; Start der Reaktion durch 9 μg Enzymprotein

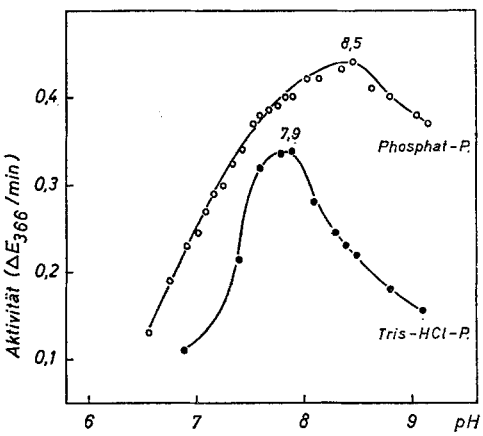

Abb. 6. pH-Optimum der Hydrogenaseaktivität in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer und 0,05 M Tris-HCl-Puffer. Der 3 ml-Reaktionsansatz enthielt 95 mM wasserstoffgesättigten Puffer des entsprechenden pH-Wertes und 0,7 mM NAD; Start der Reaktion mit 6 μg Enzymprotein

lich, daß die Löslichkeit des molekularen Wasserstoffs bei 25° C ausreicht, um die Hydrogenaseaktivität bei H_2-Sättigung messen zu können. Bei nichtsättigender NAD-Konzentration (0,2 mM) wurden bei geringen Wasserstoffkonzentrationen etwas höhere Aktivitäten bestimmt als bei NAD-Sättigung (0,7 mM). Aus der doppelt-reziproken Darstellung

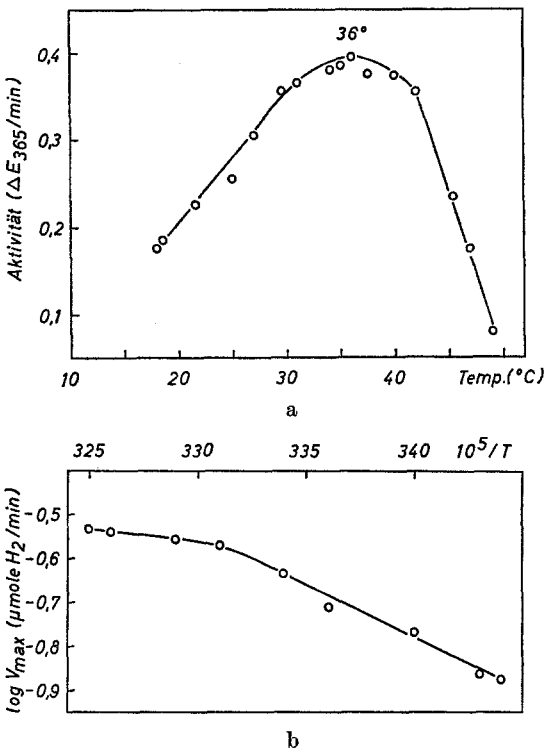

Abb. 7. Temperaturabhängigkeit der Hydrogenaseaktivität (*a* Optimumskurve; *b* Arrhenius-Auftragung). Das 3 ml-Reaktionsgemisch für den photometrischen Test bei 365 nm enthielt im temperierbaren Cuvettenraum 278 µmole wasserstoffgesättigten Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) und 2,4 µmole NAD, beides auf Versuchstemperatur gebracht; die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,02 ml Enzymlösung (6 µg Enzymprotein) gestartet. Der Aktivitätsbestimmung liegt die zwischen der 1. und 2. min gemessene Extinktionszunahme zugrunde. Die Temperaturbestimmung wurde innerhalb des Reaktionsgemischs sofort nach Reaktionsablauf vorgenommen

(Abb. 4b) ergibt sich für die Abhängigkeit von der Wasserstoffkonzentration bei NAD-Sättigung eine Michaeliskonstante $K_m^{H_2} = 1{,}9 \cdot 10^{-4}$M.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrogenase von der NAD-Konzentration folgt einer hyperbolischen Substratsättigungskurve (Abb. 5). Aus der Darstellung ist ersichtlich, daß bei niedrigen NAD-Konzentrationen der Wasserstoffpartialdruck ohne Einfluß auf die Hydrogenaseaktivität ist. Dies besagt, daß die NAD-Bindung an das Enzymprotein der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt ist. Die doppelt-reziproke Auftragung ermöglicht keine graphische Ermittlung der Michaeliskonstanten für NAD. Statt dessen kann

Tabelle 2. *Der Einfluß verschiedener Cofaktoren und Hemmstoffe auf die Aktivität der löslichen Hydrogenase*

Zusätze	Endkonzentration (mM)	Aktivität (%)
ohne		100
NADH	0,1	115
ATP	0,1	128
$NaHCO_3$	1,0	100
$MgCl_2$	0,1	124
o-Phenanthrolin	0,1	164
Mercaptoäthanol	5	98
Mercaptoäthanol	10	93
Mercaptoäthanol	20	82
Na_2S	0,1	45

Das 3 ml-Reaktionsgemisch enthielt 93 mM wasserstoffgesättigten Tris-HCl-Puffer (pH 7,8); 0,5 mM NAD; Zusätze in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen; Start der Reaktion durch 12 μg Enzymprotein.

nach Atkinson (1966) die NAD-Konzentration angegeben werden, bei der halbmaximale Aktivität erreicht wurde: $[NAD]_{0,5\,(V)} = 1{,}3 \cdot 10^{-4}$ M.

In 0,05 M KP-Puffer und 0,05 M Tris-HCl-Puffer wurde die Aktivität der löslichen Hydrogenase bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen bestimmt (Abb. 6). In Phosphat-Puffer wurden stets höhere Reaktionsraten erzielt als in Tris-HCl-Puffer gleicher pH-Stufe. Die Hydrogenase besitzt ihr Aktivitätsoptimum im Alkalischen, und zwar in Tris-HCl-Puffer bei pH 7,9 und in KP-Puffer sogar bei pH 8,5.

Das Temperatur-Optimum der Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrogenase wurde unter den angegebenen Bedingungen bei 36° C erreicht (Abb. 7a). Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie ΔH kann die Arrhenius-Konstante E_A herangezogen werden ($\Delta H = E_A - RT$). E_A wird durch Auftragung von log V_{max} gegen $1/T$ (Abb. 7b) aus der Steigung der Kurve im linearen Bereich ermittelt. Der Steigung $-2{,}4 \cdot 10^3$ ist $-0{,}219\ E_A$ gleichzusetzen. Daraus ergibt sich für die Aktivierungsenergie 10,4 kcal/mol. Bei einer Temperaturerhöhung im üblichen Meßbereich von 18—28° C muß daher mit einer 1,9fachen Zunahme der NAD-spezifischen Hydrogenaseaktivität gerechnet werden.

Es konnte für das angereicherte Enzym kein Cofaktorbedürfnis festgestellt werden. Der Einfluß von NADH, ATP, HCO_3^- und Mg^{++} auf die Hydrogenaseaktivität war gering (Tab. 2). Lediglich die Stabilität des Enzyms wurde durch den Zusatz zweiwertiger Metallionen wie Mg^{++}, Mn^{++} und Fe^{++} erhöht. Während des Anreicherungsganges wurde auch die nach Fry und San Pietro (1962) bestimmte Eisenkonzentration auf das 3,6fache, und zwar auf 9,2 μg Fe^{++}/mg Protein erhöht. Eine Kon-

zentration von 0,1 mM o-Phenanthrolin im Reaktionsansatz verringerte jedoch die Hydrogenaseaktivität nicht, sondern erhöhte sie im Gegenteil auf das 1,6fache. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einer Änderung der Enzymproteinkonformation. Reduzierende Agenzien wie Mercaptoäthanol und Sulfid setzten die Reaktionsrate herab (Tab. 2).

Diskussion

Hydrogenomonas H 16 verfügt über zwei Hydrogenasen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle, ihrer Acceptorspezifität, ihrer Induktion und wahrscheinlich auch ihrer Funktion im Zellstoffwechsel (Eberhardt, 1966; Pfitzner, 1969). Die lösliche Hydrogenase reduziert NAD und wird auch während des heterotrophen Wachstums, beispielsweise mit Pyruvat oder Fructose, gebildet. Demgegenüber ist die an Partikeln gebundene, Methylenblau-, nicht jedoch NAD-reduzierende Hydrogenase lediglich nach autotrophem Wachstum vorhanden. Die von Blackkolb (1968) isolierten hydrogenasedefekten Mutanten besitzen keine Hydrogenaseaktivität, wenn sie auf Pyruvat oder Fructose gewachsen waren. Da die partikelgebundene Hydrogenase unter diesen Bedingungen nicht induziert wird, betrifft der Enzymdefekt aller Wahrscheinlichkeit nach die lösliche, NAD-spezifische Hydrogenase. Bei diesen Mutanten übt molekularer Wasserstoff keine reprimierende Wirkung mehr auf die Verwertung von Fructose aus; es ist daher anzunehmen, daß NADH selbst oder Folgeprodukte der NAD-spezifischen Hydrogenasereaktion die Repression auslösen.

Die angereicherten NAD-spezifischen Hydrogenasen aus *H 16* und aus *Hydrogenomonas ruhlandii* (Bone et al., 1963; Bone, 1963) weisen mehrere übereinstimmende Merkmale auf: NAD ist alleiniger Wasserstoff-Acceptor, ein Cofaktorbedürfnis ist nicht feststellbar, beide Enzyme sind wenig sauerstoffempfindlich und werden durch 0,1 mM Sulfid stark gehemmt. Die lag-Phase in der Reaktionskinetik läßt sich durch Präinkubation des Enzyms mit NADH oder H_2 eliminieren. Mit der Hydrogenase aus *H. eutropha* war dies nicht möglich.

Während die löslichen Hydrogenasen aus *H 16* und *H. ruhlandii* offensichtlich einen Hydrogenase-Typ verkörpern, weicht die lösliche Hydrogenase aus *H. eutropha* von diesem wesentlich ab. Letztere ist ausgesprochen sauerstoffempfindlich und der Zusatz reduzierender Agenzien wie Mercaptoäthanol oder Sulfid steigert sowohl die Stabilität wie die Aktivität des Enzyms (Repaske, 1962). Die NAD-Reduktionsrate einer 6fach angereicherten *H. eutropha*-Hydrogenase ließ sich durch FMN ($6{,}7 \cdot 10^{-7}$ M) 10fach steigern (Repaske u. Dans, 1968). Auf die mit Methylenblau gemessene Aktivität war FMN ohne Einfluß. Durch Auftrennung eines Rohextrakts an Sephadex G-100 erhielten die Autoren

u. a. eine Fraktion, deren Hydrogenaseaktivität auf ein Mehrfaches durch Zusatz von ATP, Magnesium-Ionen und von einem noch unbekannten Faktor gesteigert werden konnte. Das Vorliegen eines Hydrogenase-Multienzymkomplexes bei *H. eutropha* wird von den Autoren für möglich gehalten.

Sowohl mit Rohextrakten als auch mit löslichen Fraktionen aus *H. facilis* gelang keine hydrogenasekatalysierte NAD-Reduktion (Atkinson u. McFadden, 1954; Ahrens, 1966). Ob es sich bei der löslichen Hydrogenase aus *H. facilis*, die an der Reduktion von Methylenblau leicht nachzuweisen ist, um ein Enzym handelt, das zwar in vivo NAD reduziert, diese Fähigkeit aber durch den Zellaufschluß verliert, oder ob der Wasserstoff tatsächlich primär auf einen anderen Acceptor übertragen wird, bleibt zu prüfen.

Literatur

Ahrens, J.: Über die Komponenten des Elektronentransportsystems bei *Hydrogenomonas H 16*. Diss., Göttingen 1966.

Atkinson, D. E.: Regulation of enzyme activity. Ann. Rev. Biochem. **35**, 85—125 (1966).

— McFadden, B. A.: The biochemistry of *Hydrogenomonas*. I. The hydrogenase of *Hydrogenomonas facilis* in cell-free preparations. J. biol. Chem. **210**, 885—893 (1954).

Beinert, H.: Role in energy conversion. In: Non-heme iron proteins, p. 23—42, ed. A. San Pietro. Yellow Springs, Ohio: Antioch Press 1965.

Blackkolb, F.: Zur Regulation des Entner-Doudoroff-Abbauweges in *Hydrogenomonas* durch molekularen Wasserstoff. Diss., Göttingen 1968.

Bone, D. H.: Localization of hydrogen activating enzymes in *Pseudomonas saccharophila*. Biochem. biophys. Res. Commun. **3**, 211—214 (1960).

— Inhibitor, isotopic and kinetic studies on hydrogen dehydrogenase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **67**, 589—598 (1963).

— Bernstein, S., Vishniac, W.: Purification and some properties of different forms of hydrogen dehydrogenase. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **67**, 581—588 (1963).

Eberhardt, U.: Über das Wasserstoff aktivierende System von *Hydrogenomonas H 16*. I. Verteilung der Hydrogenase-Aktivität auf zwei Zellfraktionen. Arch. Mikrobiol. **53**, 288—302 (1966).

Fry, K. T., San Pietro, A.: Studies on photosynthetic pyridine nucleotide reductase. Biochem. biophys. Res. Commun. **9**, 218—226 (1962).

Gray, C. T., Gest, H.: Biological formation of molecular hydrogen. Science **148**, 186—192 (1965).

Keilin, D., Hartree, E. F.: On the mechanism of the decomposition of hydrogen peroxide by catalase. Proc. roy. Soc. B **124**, 397—405 (1938).

Peck, H. D.: Energy-coupling mechanism in chemolithotrophic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **22**, 489—518 (1968).

Pfitzner, J.: Die NAD-spezifische Hydrogenase und das Elektronentransportsystem von *Hydrogenomonas H 16*. Diss., Göttingen 1969.

Repaske, R.: The electron transport system of *Hydrogenomonas eutropha*. I. Diphosphopyridine nucleotide reduction by hydrogen. J. biol. Chem. **237**, 1351 to 1355 (1962).

— Dans, C. L.: A factor for coupling NAD to hydrogenase in *Hydrogenomonas eutropha*. Biochem. biophys. Res. Commun. **30**, 136—141 (1968).

Schlegel, H. G., Kaltwasser, H., Gottschalk, G.: Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. **38**, 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).

Wilde, E.: Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. Arch. Mikrobiol. **43**, 109—137 (1962).

Wittenberger, C. L., Repaske, R.: Studies on hydrogen oxidation in cell-free extracts of *Hydrogenomonas eutropha*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **47**, 542—552 (1961).

Dr. J. Pfitzner und
Prof. Dr. H. G. Schlegel
Institut für Mikrobiologie der Universität
D-3400 Göttingen, Goßlerstraße 16

Dr. H. A. B. Linke
Allied Chemical Corp.
Central Research Laboratory
Morristown, N. J. 07960 (U.S.A.)