

Zusammenfassung

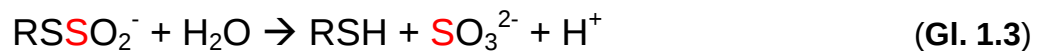
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das von reduziertem Glutathion (GSH) abhängige Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem der acido-mesophilen Laugungsbakterien unter Berücksichtigung der *in vitro* ablaufenden Schwefelchemie untersucht. Ziel war es, den Oxidationsmechanismus im Detail zu verstehen. Dazu wurden die Aktivitäten für die Oxidation von Elementarschwefel in zellfreien Systemen von zwei Stämmen der Art *Acidithiobacillus thiooxidans* (DSM 504 und K6), von einem Stamm der Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* (R1) und zum ersten Mal in diesem Zusammenhang von dem Typstamm der Art *Acidiphilium acidophilum* (DSM 700) analysiert.

Unter aeroben Bedingungen und ohne Zugabe weiterer externer Elektronenakzeptoren wurde nur in Anwesenheit von GSH Elementarschwefel durch Rohextrakte aller 4 untersuchten Schwefeloxidanten enzymatisch abgebaut. Als Oxidationsprodukte wurden überwiegend Thiosulfat und in geringerem Umfang das Glutathion-S-Sulfonat (GSSO_3^-) und Sulfat identifiziert. Des Weiteren traten in diesen Enzymtests neben freiem Sulfid das Disulfid des GSH (GSSG) und dessen höhere Homologe bis zum Bisorganylpentasulfan (GS_5G) auf. Letztere Verbindungen sind das Ergebnis der nicht-enzymatischen Reduktion von Elementarschwefel durch GSH, die über die sehr reaktiven Monoorganylpolsulfane des GSH (GS_nH) verläuft. Durch kinetische Studien zur enzymatischen Oxidation und nicht-enzymatischen Reduktion von Elementarschwefel konnte bewiesen werden, dass allein der Sulfanschwefel der intermediär auftretenden Monoorganylpolsulfane durch das Enzymsystem oxidiert wird. Weder das freie Sulfid noch die höheren Bisorganylpolsulfane konnten als Substrat genutzt werden. Auch mit weiteren Sulfanschwefel enthaltenden Verbindungen wie Tetrathionat oder p-Toluolthiosulfonat konnten keine Oxidationsaktivitäten detektiert werden. Da unter den Versuchsbedingungen die höheren Monoorganylpolsulfane des GSH sehr instabil sind, wird angenommen, dass exklusiv das Monoorganyldisulfan (GSSH), auch als Persulfid bezeichnet, von dem Enzymsystem oxidiert wird.

Als unmittelbares Oxidationsprodukt wurde für alle Stämme einheitlich Sulfid identifiziert, das in den Testansätzen rasch nicht-enzymatisch mit Elementarschwefel zu Thiosulfat weiterreagierte, aber durch Zugaben von GSSG abgefangen werden konnte. Mit GSSG bildet Sulfid dabei das Glutathion-S-Sulfonat. Die geringen Mengen an Sulfat wurden wahrscheinlich durch Autoxidation des Sulfids verursacht.

Unter anaeroben Bedingungen konnte in keinem Fall mit alternativen Elektronenakzeptoren wie Eisen(III)-Komplexen, Quinonen oder Nitrat Elementarschwefel enzymatisch oxidiert werden. Allein GSH wurde durch einen Teil der eingesetzten Elektronenmediatoren oxidiert.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgender Mechanismus für die enzymatische Oxidation von Elementarschwefel bei acido-mesophilen Schwefeloxidanten ableiten: Das S₈-Ringsystem muss zunächst durch eine Thiolverbindung (RSH) aufgebrochen werden, da es nicht direkt als Substrat genutzt werden kann (Gl. 1.1). *In vitro* wird hierzu GSH eingesetzt. Bei dem Aktivierungsschritt entstehen Monoorganylpoly-sulfane, von denen das Persulfid (RSSH) die stabilste Stufe darstellt. Der Sulfan-schwefel des Persulfids wird enzymatisch oxidiert, wobei das S-Sulfinat (RSSO₂⁻) gebildet wird (Gl. 1.2). Abschließend wird Sulfit hydrolytisch abgespalten und somit das Thiol regeneriert (Gl. 1.3).



Oxidiert wird also nur Schwefel, der wie Elementarschwefel die Oxidationsstufe 0 aufweist. Zumindest für die *in vitro* stattfindenden Prozesse kann davon ausgegangen werden, dass der oxidative Schritt eine Dioxygenase-Reaktion ist (Gl. 1.2). Somit enthalten alle 4 untersuchten Stämme eine Elementarschwefel-Dioxygenase. Bei dem *in vivo* aktiven Thiol handelt es sich wahrscheinlich um eine membrangebundene Gruppe, da mit den Rohextrakten, die im Wesentlichen alle löslichen Zellbestandteile enthielten, ohne GSH keine Aktivität beobachtet wurde.

Aktivitäten für die Elementarschwefel-Dioxygenase wurden bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 unabhängig davon gefunden, ob die Zellen mit Elementarschwefel oder mit Eisen(II)-Ionen angezogen worden waren. Dagegen wiesen im Falle von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T heterotrophe Zellen nur 30 % derjenigen Aktivität auf, wie sie bei autotroph mit Elementarschwefel gewachsenen Zellen gemessen wurde. Insgesamt wurden bei pH 6,5 und 30 °C mit Rohextrakten der 4 untersuchten Schwefeloxidanten spezifische Aktivitäten von 1 bis 28 µmol/h/(mg Protein) für den enzymatischen Abbau von Elementarschwefel erhalten. Die K_m-Werte für GSH lagen zwischen 110 und 250 µM. Erwartungsgemäß konnte bei dem ebenfalls getesteten Typstamm von *Leptospirillum ferrooxidans* keine Aktivität für die Elementarschwefel-Dioxygenase beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu wurden mit dem Typstamm der obligat heterotrophen Art *Acidiphilium cryptum* mit 0,2 bis 0,4 µmol/h/mg geringe Aktivitäten nachgewiesen. Das pH-Optimum der Dioxygenase lag für *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T um 7,5, und bei einem pH-Wert ≤ 3,5 war das Enzym inaktiv. Diese Ergebnisse sprechen für eine cytoplasmatische Lokalisierung des Systems.