

DIE PRODUKSIE VAN L-MALAAT DEUR MIKRO-ORGANISMES

DEUR

FREDERICK JOHANNES MULLER

B. Sc

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die graad Magister Scientiae in Mikrobiologie in die Fakulteit Natuurwetenskappe aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Studieleier: Prof. P. J. Pretorius

Potchefstroom

November 1996

*“ Here, U is my lewe, U sorg vir my.
Wat ek ontvang, kom alles van U af. “*

- Psalm 16:5 -

Aan my ouers en familie vir hulle liefde, bystand en ondersteuning.

INHOUDSOPGAWE

	Bladsy
ABSTRACT	1
OPSOMMING	3
BEDANKINGS	5
HOOFSTUK 1: INLEIDING	6
HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG	8
2.1 Inleiding	8
2.2 Die belangrikheid van stereospesifisiteit	9
2.3 Belangrikheid en gebruike van L-malaat	9
2.3.1 Kommersiële gebruik	9
2.3.2 Farmaseutiese gebruik	10
2.3.3 Rol van malaat in die selmetabolisme	10
2.3.3.1 Sitroensuursiklus	10
2.3.3.2 Malaat-aspartaatsiklus	11
2.3.3.3 Glioksalaatweg	12
2.4 Bereiding van L-malaat	12
2.5 Biokatalitiese omsettings vir die bereiding van spesifieke verbindings	15
2.5.1 Voordele van ensieme teenoor konvensionele chemiese kataliste vir die bereiding van spesiale verbindings	15
2.5.2 Klassifikasie van ensieme	15
2.5.3 Bronne van bio-kataliste	17
2.5.4 Toekomstige ontwikkelinge	19
2.6 Doelstelling en benaderingswyse	20

HOOFSTUK 3: ISOLERING EN KARAKTERISERING VAN BAKTERIEË WAT L-MALAAT PRODUSEER 21

3.1	Inleiding	21
3.2	Materiale en metodes	21
3.2.1	Bronne van bakterieë	22
3.2.2	Media	22
3.2.2.1	Spreiplate	22
3.2.2.2	Voedingsop met broomkresolpers	22
3.2.2.3	Fumaarsuuragarplate	23
3.2.2.4	Fumaarsuursop	23
3.2.3	Identifikasie van die geïsoleerde bakterieë	23
3.2.3.1	Transmissie elektronmikroskopie (TEM)	23
3.2.4	Gaschromatografie	24
3.2.4.1	Voorbereiding van monsters vir gaschromatografie	24
3.2.4.2	Skeiding van malaat isomere met behulp van R-(–)-2-butanol	25
3.3	Resultate	27
3.3.1	Isolering van L-malaatproduserende bakterieë	27
3.3.2	Identifikasie van die geselekteerde bakterieë	27
3.3.3	Gaschromatografiese analyses	28
3.3.4	Identifisering van die malaat isomeer wat gevorm is	33
3.4	Samevatting	37

HOOFSTUK 4: OPTIMALISERING VAN DIE KONDISIES VIR L-MALAAT PRODUKSIE 38

4.1	Inleiding	38
4.2	Materiale en metodes	39
4.2.1	Voorbereiding vir eksperiment	39

4.2.2	Gebufferde kulture	40
4.2.3	Optimale substraatkonsentrasie	40
4.2.4	Dunlaagchromatografie	41
4.2.5	Papierchromatografie	41
4.2.6	Akkurate bepaling van die L-malaatkonsentrasie	42
4.3	Resultate	42
4.3.1	Papierchromatografie	42
4.3.2	Akkurate bepaling van die malaatkonsentrasies	45
4.4	Samevatting	60
HOOFSTUK 5:	ALGEMENE BESPREKING	61
LITERATUURVERWYSINGS		69
AFKORTINGSLYS		74
BYLAAG 1		76

ABSTRACT

The Microbial Production of L-Malic Acid.

(Original title: Die Produksie van L-Malaat deur Mikro-organismes.)

L-Malic acid is of great importance as a food and beverage acidulant and is also used in the treatment of metabolic disorders such as hyperammonemia and liver disfunction. This acid from the citric acid cycle is an essential intermediate of cell metabolism and is one of the major acids in apples, other fruits and plants. The trend to use more natural food ingredients may increase the demand for L-malic acid. The chemical and enzymatic production of the L-isomer of malic acid is expensive and time consuming and because this acid is not manufactured in South Africa, it needs to be imported at a very high cost. We therefore investigated the potential of the microbiological production of L-malic acid. A large number of acid forming bacteria were selected for fumarase activity on a selective medium containing fumarate as the only carbon source. Of the three organisms with high fumarase activity, only one organism produced substantial amounts of L-malic acid and was selected for further study. The identity of the isomer (which has to be the L-isomer) formed by this bacterium was confirmed by GC analysis after derivitization with R-(–)-2-butanol. This result was confirmed with a L-isomer-specific enzymatic assay. A paperchromatographic method was developed to analyse a large number of samples. In this way the growth conditions (pH, temperature, time and concentration) for optimum L-malic acid production were determined. These conditions were verified with a more quantitative test.

Parts of this work were presented at the following scientific meetings:

Muller, F.J., Potgieter, A.C., Esterhuysen, H.A., Pretorius, P.J., Mienie, L.J. *Microbial production of L-malic acid*. Eighth Biennial Congress of the South African Society for Microbiology, Rhodes University, Grahamstown, June 1994.

Muller, F.J. & Pretorius, P.J. *The microbiological production of L-malic acid*. Ninth Biennial Congress of the South African Society for Microbiology, University of Pretoria, Pretoria, July 1996.

OPSOMMING

L-Malaat speel 'n belangrike rol in die voedsel- en koeldrankindustrie en word gebruik in die behandeling van sekere aangebore metaboliese defekte by mense. Die organiese suur van die sitroensuursiklus dien as reguleerder van suurgehalte by sekere voedselsoorte en verskillende koeldranke en sappe, terwyl dit ook gebruik kan word vir die behandeling van onder andere hiperammonemie en lewerdisfunksie. Die belangrikheid daarvan in die selmetabolisme is van groot belang, terwyl dit ook een van die belangrikste sure in vrugte (veral appels, vandaar die naam appelsuur) en sommige plante is. Die chemiese en ensimatiese produksie van die L-isomeer van malaat is baie duur en tydrowend en omdat dit nie in Suid Afrika vervaardig word nie, moet dit teen hoë koste ingevoer word. Die mikrobiologiese produksie van L-malaat is ondersoek deurdat 'n groot hoeveelheid suurvormende bakterieë vir hoë fumarase aktiwiteit getoets is op 'n selektiewe medium wat fumaarsuur as enigste koolstofbron het. Van die drie organismes wat deur die seleksie stappe gekies is, het slegs een organisme relatief groot hoeveelhede L-malaat geproduseer. Die identiteit van die isomere (wat die L-isomeer moet wees) wat deur die organismes geproduseer is, is bepaal met behulp van GC-analises na derivatisering met isomeer spesifieke R-(–)-2-butanol. Die resultate is bevestig met behulp van isomeer-spesifieke ensimatiese metodes. 'n Papierchromatografiese metode is ontwerp om die groot hoeveelheid monsters te toets sodat die optimum kondisies bepaal kon word vir optimum L-malaat produksie. Hierdie kondisies is met behulp van 'n meer kwantitatiewe toets bevestig.

Gedeeltes van hierdie werk is by die volgende vakwetenskaplike byeenkomste voorgedra:

Muller, F.J., Potgieter, A.C., Esterhuysen, H.A., Pretorius, P.J., Mienie, L.J. *Microbial production of L-malic acid*. Agtste tweejaarlikse kongres van die Suid Afrikaanse Vereniging vir Mikrobiologie, Rhodes Universiteit, Grahamstad, Junie 1994.

Muller, F.J. & Pretorius, P.J. *The microbiological production of L-malic acid*. Negende tweejaarlikse kongres van die Suid Afrikaanse Vereniging vir Mikrobiologie, Universiteit van Pretoria, Pretoria, Julie 1996.

BEDANKINGS

By die voltooiing van hierdie verhandeling wil ek graag my opregte dank en waardering uitspreek teenoor:

- My studieleier, Prof. P. J. Pretorius, vir u positiewe leiding, aanmoediging en hulp gedurende die studie.
- Prof. L. J. Mienie vir u hulp en bystand.
- Mnr. E. Erasmus vir u raad en bydraes met die gebruik van die gaschromatograaf.
- Dr. H. A. Esterhuysen vir u hulp en bystand met die mikrobiologiese aspekte van die studie.
- Karin Vergeer vir jou vriendskap en die finale afronding van die verhandeling.
- Anna van Urk vir jou taalkundige versorging van die verhandeling.
- My ouers vir u geduld, opofferings en finansiële ondersteuning.
- My suster en swaer vir al julle belangstelling en bydraes.
- Al die studente in die departement wie se vriendskap en bystand baie waardeur word.
- Marna van Aswegen vir die natrek van die gaschromatografiese profiele.
- Die Hemelse Vader vir die voorreg om te kan studeer en vir al die krag, insig en deursettingsvermoë wat die studie moontlik gemaak het.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

L-Malaat speel 'n belangrike rol in die voedsel- en koeldrankindustrie en word gebruik in die behandeling van sekere aangebore metaboliese defekte by mense. Hierdie organiese suur van die sitroensuursiklus dien as reguleerder van suurgehalte by sekere voedselsoorte en verskillende koeldranke en sappe, terwyl dit ook gebruik kan word vir die behandeling van onder andere hiperammonemie en lewerdisfunksie. Die belangrikheid daarvan in die selmetabolisme is van groot belang, terwyl dit ook een van die belangrikste sure in vrugte (veral appels, vandaar die naam appelsuur) en sommige plante is. Die chemiese en ensimatisiese produksie van die L-isomeer van malaat is baie duur en tydrowend en omdat dit nie in Suid Afrika vervaardig word nie, moet dit teen hoë koste ingevoer word. Die produksie van L-malaat deur mikro-organismes, en in besonder bakterieë, is in hierdie studie ondersoek. 'n Groot hoeveelheid mikro-organismes is vanuit verskeie bronne geïsoleer, waarna die organismes aan 'n aantal pre-seleksie stappe onderwerp is om organismes met sekere eienskappe te selekteer.

In Hoofstuk 2 word 'n literatuuroorsig gegee waarop die doelstellings en benaderingswyse vir hierdie studie gebaseer is. In Hoofstuk 3 word beskryf hoedat organismes wat baie suur (soos L-malaat) in 'n kort tydsinterval produseer, verkry is deur gebruik te maak van 'n eenvoudige kwekingsmetode met broomkresolpers as indikator. Die organismes is verder geselekteer op grond van fumarase aktiwiteit, want organismes met 'n hoë fumarase aktiwiteit verbeter die moontlikheid dat L-malaat as produk ekonomies gevorm kan word. Organismes met 'n hoë fumarase aktiwiteit is met behulp van die BIOLOG-sisteen geïdentifiseer. Die malaat-isomeer wat deur die organismes geproduseer word, is ook bepaal, omdat slegs die L-isomeer vir menslike doeleindes geskik is.

Kondisies vir die kweking van die beste L-malaatproduserende organisme is bepaal, sodat die optimum L-malaatproduksie verkry kon word (Hoofstuk 4). Die kondisies wat ondersoek is, sluit temperatuur, pH, tyd en substraatkonsentrasie in. Hierdie ondersoek

het 'n groot aantal monsters opgelewer wat die ontwikkeling van 'n nuwe pre-seleksie metode genoodsaak het om die groot hoeveelheid monsters te kon verwerk. Hiervoor is 'n papierchromatografiese metode aangewend. Die beste kondisies is vasgestel en die konsentrasie van die geproduseerde L-malaat, is akkuraat bepaal met behulp van 'n L-malaat pakket.

Hierdie verhandeling word met 'n algemene bespreking (Hoofstuk 5) afgesluit.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 Inleiding

In die natuur word 'n groot verskeidenheid organiese molekules aangetref wat 'n essensiële rol speel in die metabolisme van organismes. Hierdie diversiteit word grootliks moontlik gemaak deur die katalitiese werking van 'n groot verskeidenheid ensieme. Die katalitiese vermoë van ensieme word ook ingespan vir die sintese van 'n verskeidenheid kommersieel belangrike produkte, wat strek van die produksie van waspoeiers (*Bacillus* proteïenases) en semi-sintetiese antibiotika (byvoorbeeld die *Penicillium* sp.), tot die behandeling van mediese probleme soos leukemia met behulp van die ensiem asparaginase (Griffin *et al.*, 1993). Die ensiem fumarase, wat verantwoordelik is vir die produksie van L-malaat vanaf fumaarsuur, is een van die ensieme wat 'n belangrike funksie in baie metaboliese sisteme verrig. Organismes met 'n hoë fumarase aktiwiteit se katalitiese vermoë word ingespan om L-malaat te produseer. Die volgende aanhalings beklemtoon die belangrikheid van L-malaat sedert vroeg in hierdie eeu:

“POMALUS malic acid may be looked upon as the general-purpose food acidulant of Allied Chemical Corporation's series of food acids. This acid has been an exclusive product of Allied Chemical Corporation since first offered to beverage manufacturers in 1923. *It now bids to become one of the most widely used acidulants in the entire food field.*”

W.H. Gardner (1966)

“Miles, Inc. has extended its line of acidulants with the January acquisition of Denka Chemical Corp. by Mobay Corp., a sister company of Miles in the Bayer USA group. *Miles now markets malic acid and fumaric acid, manufactured by Mobay Synthetics at a plant in Duluth, MN.*”

“Food Engineering (1988)”

2.2 Die belangrikheid van stereospesifisiteit

Die *U.S. Food and Drug Administration* het 'n staatsbeleid aanvaar wat farmaseutiese maatskappye die keuse gegee het tussen die vervaardiging van enkel enantiomere of die rasemaatmengsel van middels vir menslike gebruik (Faber *et al.*, 1993). Die oorgrote meerderheid maatskappye het die keuse van enkel enantiomere gekies eerder as die rasemaatverbinding (Faber *et al.*, 1993). As gevolg hiervan val die top tien farmaseutiese maatskappye onder laasgenoemde groep, met 'n geskatte waarde van ongeveer US \$ 10 biljoen (Faber *et al.*, 1993).

2.3 Belangrikheid en gebruike van L-malaat

2.3.1 Kommersiële gebruik

Die produksie van L-malaat is van groot belang aangesien hierdie dikarboksielsuur op grootskaal gebruik word as reguleerder van die suurgehalte in die voedsel- en koeldrankindustrie (Peleg *et al.*, 1988). L-Malaat kom in sommige vrugte en veral in appels voor, sodat daar soms na verwys word as appelsuur in plaas van L-malaat. Appelsuur word in die voedselindustrie gebruik omdat dit nie-vlugtig en nie-higroskopies (dit is goed oplosbaar in water) is, en 'n aangename smaak het. As gevolg van die feit dat L-malaat ook beter suurgehalte verleen, word hierdie organiese suur in byvoorbeeld gekonsentreerde tamatiesappe, konfyt, roomys, pynappel-, duiwe- en appelsappe (Lumyong *et al.*, 1994), sommige tandepastes, mondspoelmiddels en nie-vetterige kosmetiese formulerings (Anonim, 1964) gebruik. 'n Ander gebruik is die inkorporering van L-malaat in poeier aanmaakkoeldrank, waar dit as 'n smaakreguleerder dien (Battat *et al.*, 1991). Volgens Peleg *et al.* (1988) word malaat gebruik as 'n komponent van aminosuur infusie, omdat dit 'n belangrike intermediêr tydens selmetabolisme is. Alhoewel die kommersiële fermentasie van L-malaat nie so algemeen as die van sitroensuur is nie, verhoog die aanvraag al hoe meer (Lumyong *et al.*, 1994).

2.3.2 Farmaseutiese gebruik

L-Malaat word gebruik vir die behandeling van sekere aangebore metaboliese defekte¹. Die defekte sluit onder meer hiperammonemie en lewerdisfunksie in (Peleg *et al.*, 1988; Battat *et al.*, 1991). As gevolg van die defek hiperammonemie ervaar pasiënte 'n hoë ammoniak konsentrasie in hul bloed. Deur die toevoeging van L-malaat funksioneer die sitroensuursiklus vinniger en sodoende kan die ureumsiklus vinniger aangevul word. Op hierdie wyse word 'n opeenhoping van ammoniak verhoed (Brusilow *et al.*, 1995).

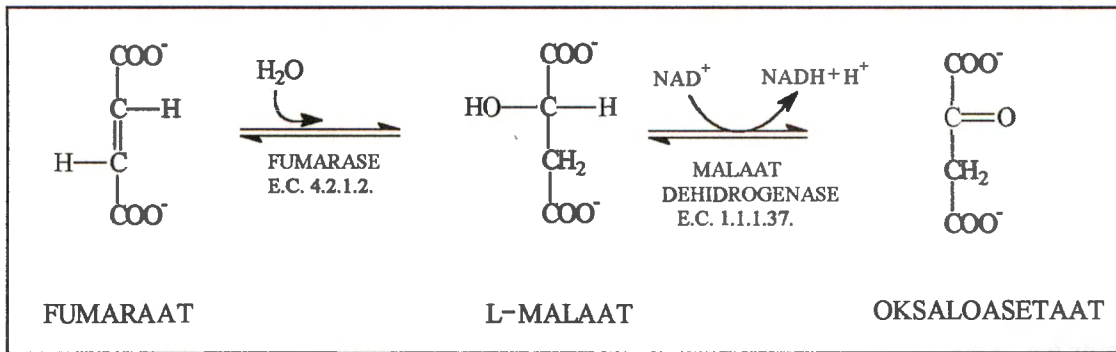
2.3.3 Rol van malaat in die selmetabolisme

In hierdie afdeling word die sentrale rol wat malaat in die intermediêre metabolisme van organismes in die algemeen speel, bespreek en om die oorsprong van sommige van die nuwe produkte te illustreer.

2.3.3.1 Sitroensuursiklus

Een van L-malaat se belangrikste funksies in die selmetabolisme is die rol wat dit speel in die sitroensuursiklus van die mens, bakterieë, giste, swamme, plante, invertebrate en soogdiere (Figuur 2.1), waartydens die ensiem fumarase (E.C. 4.2.1.2) die omsetting van fumaraat na L-malaat kataliseer (Voet *et al.*, 1990). In vergelyking met ander hidrolases, benodig fumarase geen ko-faktore nie (Hill, 1970). Die malaat wat geproduseer word moet egter die L-isomeer wees, aangesien die D-isomeer nie deur die sitroensuursiklus gebruik kan word nie (as gevolg van die spesifisiteit van die fumarase ensiem vir die L-isomeer). Malaat dehidrogenase kataliseer die finale reaksie van die sitroensuursiklus om oksaloasetaat te vorm deur die oksidasie van L-malaat se hidroksielgroep na 'n ketoongroep in 'n NAD^+ -afhanklike reaksie. Die reaksie van fumaraat na L-malaat is 'n gunstige reaksie met 'n ΔG° waarde van $-3,8 \text{ kJ/mol}$. Die reaksie van L-malaat na oksaloasetaat is weer 'n ongunstige reaksie met 'n ΔG° waarde van $+29,7 \text{ kJ/mol}$ (Mathews *et al.*, 1990).

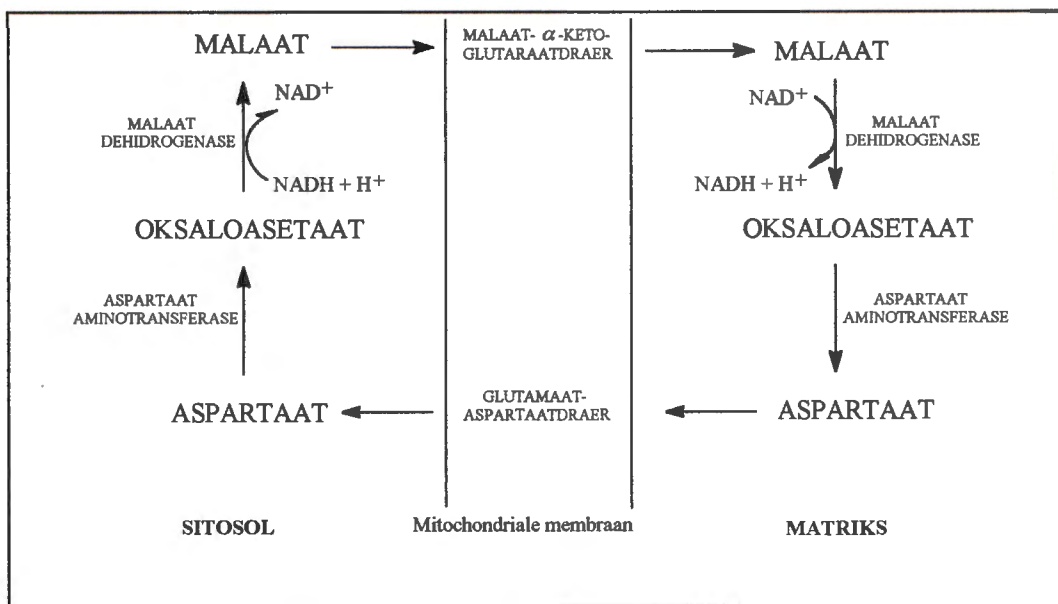
¹ Daar word op roetine basis getoets vir die voorkoms van hierdie siektetoestande deur die Afdeling Metabolisme, Departement Biochemie van die Potchefstroomse Universiteit.



Figuur 2.1: Die rol van L-malaat in die sitroensuursiklus. Die reaksie van fumaraat na L-malaat benodig geen ko-faktore nie, terwyl die tweede reaksie na oksaloasetaat wel NAD^+ benodig.

2.3.3.2 Malaat-aspartaatsiklus

In die sitosol van soogdierselle word oksaloasetaat omgeskakel na malaat. Die malaat- α -ketoglutaraatdraer transporteer die malaat vanaf die sitosol in die mitochondriale matriks, waar $\text{NADH} + \text{H}^+$ vanaf NAD^+ gegenereer word tydens die oksidasie van malaat na oksaloasetaat deur die mitochondriale malaatdehidrogenase (Figuur 2.2). Bogenoemde reaksie vind plaas omdat oksaloasetaat nie oor die mitochondriale membraan getranspoteer kan word nie (Voet *et al.*, 1990).



Figuur 2.2: Die rol van malaat in die malaat-aspartaatsiklus. Slegs die deel waarin malaat van toepassing is, word hier uitgebeeld.

2.3.3.3 Glioksalaatweg

Malaatsintase kataliseer die kondensasie van glioksalaat met asetiel-KoA om malaat te vorm. Na oordrag na die sitosol, kataliseer malaatdehidrogenase die oksidasie van malaat na oksaloasetaat, wat in die glukoneogeneseweg gebruik word (Voet *et al.*, 1990).

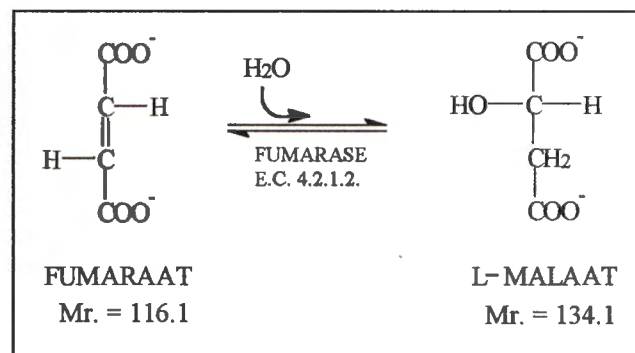
2.4 Bereiding van L-malaat

Die neiging om meer natuurlike voedselbestanddele in ons dieët te gebruik, word al groter en dit gee aanleiding tot 'n verhoogde aanvraag na die natuurlike vorm van malaat, naamlik L-malaat. Die tradisionele metode om L-malaat te produseer is deur middel van ekstraksie uit appelsap (0.4 tot 0.7 % malaat) (Buck en Mattern, 1947). Ander prosesse word tans ook gebruik (Peleg *et al.*, 1988) naamlik:

1. Chemiese sintese via hidrasie vanaf fumaarsuur by hoë temperatuur en hoë druk, wat lei tot die vorming van die rasemaat (Ng *et al.*, 1986). Die voordeel hieraan verbonde is dat min byprodukte gevorm word. Die proses is egter duur en die rasemaat word gevorm in plaas van die L-isomeer.
2. Ensimatiese sintese waar fumaarsuur omgeskakel word na L-malaat (Figuur 2.3) deur middel van:
 - a) geïmmobiliseerde *Brevibacterium ammoniagenes* selle (Yamamoto *et al.*, 1976; Rossi en Clementi, 1985; Schindler, 1988). Alhoewel daar baie voordele verbonde is aan die immobilisering van mikro-organismes eerder as die ensieme, veral wanneer chemiese verbindings geproduseer word, is daar egter ongunstige reaksies wat plaasvind (Figueiredo, 1991). 'n Voorbeeld is die vrystelling van ander verbindings, soos in die geval van L-malaatproduksie waar suksiensuur as byproduk gevorm word, as gevolg van die teenwoordigheid van multi-ensiem-komplekse (Yamamoto *et al.*, 1976).
 - b) immobilisering van ensieme (Yamazaki *et al.*, 1982). Die reaksie is baie spesifiek en geen ko-faktore is nodig nie. Voordele verbonde aan die immobilisering van

ensieme is dat die ensiem herwin en weer gebruik kan word en dat dit kan lei tot verhoogde ensiem stabiliteit. Die nadele hieraan verbonde is dat die kostes baie hoër is, byvoorbeeld wanneer die chemiese reaksie en die immobiliseringsproses die ensiem inaktiveer (Griffin *et al.*, 1993).

Immobilisering van lewende selle of die isolering van die ensiem fumarase, is addisionele stappe wat baie tyd neem en kostes vermeerder. Ten spyte hiervan is daar verskeie industriële prosesse ontwikkel vir die produksie van L-malaat vanaf fumaarsuur deur middel van die ensimatiese sintese (Figuur 2.3) wat suksesvol bedryf word (Griffin *et al.*, 1993).



Figuur 2.3: Ensimatiese sintese van L-malaat vanaf fumaarsuur. Die reaksie word gekataliseer deur die hidroliaze ensiem fumarase.

3. Direkte fermentasie van suiker en nie-suiker koolstofbronne (Abe *et al.*, 1962; Tachibana *et al.*, 1973; Yukawa *et al.*, 1986). Die voordeel van hierdie metode is dat die produkte teen 'n kompeterende prys vervaardig kan word. Alkohole, suiker, molasse of *n*-paraffiene kan hier as koolstofbronne gebruik word (Sato *et al.*, 1977).
4. Die metode soos in hierdie studie gevolg, naamlik die produksie van L-malaat deur middel van mikro-organismes (Yamamoto *et al.*, 1976; Peleg *et al.*, 1988). Voordele verbonde aan hierdie benaderingswyse is die volgende:

a) Goedkoper. Die aankoop van duur ensieme en selektiewe media word uitgeskakel.

- b) Vinnig. Die organisme kan relatief vinnig tot 'n verlangde optiese digtheid gekweek word.
- c) Omdat die metode nie hoë temperatuur en hoë druk vereis soos in die geval van die chemiese sintese nie, is die reaksiekondisies meer ekonomies.

Nadele verbonde aan hierdie benaderingswyse is die volgende:

- a) Baie byprodukte kan vorm, veral suksiensuur, wat moeilik van malaat geskei kan word, terwyl ander byprodukte toksies mag wees (Schindler, 1988).
- b) Daar moet eers vooraf bepaal word of die D-isomeer of L-isomeer gevorm word. Slegs die L-isomeer kan in die sitroensuursiklus as substraat dien vir die fumarase ensiem (Voet *et al.*, 1990). Mikro-organismes kan óf die D-isomeer óf die L-isomeer produseer, maar aangesien daar baie min organismes is wat die D-isomeer produseer, is laasgenoemde heelwat duurder as die L-isomeer.
- c) Probleme kan ontstaan met die na-produksie skeidingsprosesse as gevolg van die bakterieë wat so klein is (Schindler, 1988).
- d) Daar moet ook bepaal word of die persentasie omskakeling van fumaarsuur na L-malaat hoog genoeg is. Laasgenoemde word bepaal deur die fumarase aktiwiteit.

Al bogenoemde nadele wil dit laat voorkom asof die betrokke metode nie ekonomies sal wees om te volg nie, maar vir elkeen van die nadele is daar oplossings ontwikkel. Probleme met byprodukte wat gevorm word, veral suksiensuur, is al in 1976 oorbrug deur die gebruik van detergense soos galekstrak, galsoute of deoksicholiensuur (Yamamoto *et al.*, 1976). Die detergense word by die media gevoeg en onderdruk dan die vorming van veral suksiensuur. Die isomeer wat deur 'n betrokke organisme geproduseer word, kan maklik bepaal word deur 'n metode wat meer volledig in Afdeling 3.2.4.2 beskryf word. L-Malaat kan gesuiwer word deur middel van verskillende metodes wat later in Hoofstuk 5 bespreek sal word. Indien die organisme oor 'n baie aktiewe fumarase geen

beskik, sal die fumarase aktiwiteit hoog wees en sal die kanse groter wees dat 'n hoë omskakeling verkry word.

Vervolgens word 'n kort oorsig gegee van die funksies, klassifikasie en belangrikheid van ensieme.

2.5 Biokatalitiese omsettings vir die bereiding van spesifieke verbindinge

2.5.1 Voordele van ensieme teenoor konvensionele chemiese kataliste vir die bereiding van spesiale verbindinge

Ensieme is meer selektief as konvensionele chemiese sintese en die selektiwiteit is ook posisioneel (regioselektiwiteit) of chiraal (stereoselektief). Ensieme wat hoë selektiwiteit toon, het sekere voordele soos verminderde byprodukte en het potensieel minder negatiewe effekte op die omgewing (Dordick, 1991). Biologiese verwerking van voedsel skakel die potensieel toksiese, sterk sure en basisse van chemiese kataliste uit en wanneer die twee prosesse met mekaar vergelyk word, het biokataliste baie groter voordele (Dordick, 1991).

Ensieme funksioneer optimaal by matige kondisies (soos temperatuur en druk) en het 'n hoër omskakeling as konvensionele chemiese kataliste wat by hoër temperatuur en druk funksioneer. Ongeveer 3 000 ensieme is tot dusver gekarakteriseer (Hacking, 1986), elk ingedeel in een van ses klasse op grond van die reaksie wat gekataliseer word. Baie ensieme benodig ko-faktore gedurende hul katalitiese werking.

2.5.2 Klassifikasie van ensieme

Die klassifikasie word gegee om die verskeidenheid van toepassings te illustreer vir die sintese van spesiale produkte (Dordick, 1991). Die basiese chemie van elke ensiemklas word hieronder gegee (Dordick *et al.*, 1991; Faber *et al.*, 1993).

1. Oksidoreduktase

Die dehidrogenases en oksidasies kataliseer die oksidasie- en reduksiereaksies van die volgende groepe: hidroksiel, aldehyd, ketoon, karboksiel, amino, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (oksidasie), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (reduksie) en NAD(P)(H) . Peroksidasies oksideer gereduseerde verbindings met H_2O_2 as oksidant en oksigenase inkorporeer een of twee atome van suurstof in die oksidasie produk.

2. Transferase

Transferases kataliseer die oordrag van 'n funksionele groep van een verbinding (skenker) na 'n tweede verbinding (akseptor). Die ensieme dra metiel-, hidroksimetiel-, formiel-, glikosiel-, asiel-, alkiel-, fosfaat- en sulfaatgroepe oor na die akseptor.

3. Hidrolases

Hierdie ensieme is maklik beskikbaar en word die meeste bestudeer. Hidrolases kataliseer die hidrolise van verskeie verbindings soos esters, lipiede, tio-esters, fosfate en pirofosfate, sulfate, glikosiede, peptiede en proteïene.

4. Liases

Liases slyt C-C, C-N en C-O bande deur middel van eliminasië om dubbelbande te vorm of om groepe by die dubbelbande te voeg. Voorbeelde sluit die volgende in: dekarboksilase, polisakkariedliase, ammonia-liase, aldehydliase en hidrolase. Die ensiem fumarase, wat die reaksie van fumaarsuur na L-malaat kataliseer, val in hierdie klas. Die volledige reaksie is in Afdeling 2.4 bespreek.

5. Isomerasies

Die ensieme kataliseer intramolekulêre isomerisasië en sluit rasemases, mutases en *cis-trans*-isomerasies in.

6. Ligases

Ligases kataliseer die ATP-afhanklike binding van twee of meer molekules. Voorbeelde sluit karboksilases en sintetasis in.

2.5.3 Bronne van biokataliste

Ensieme word geïsoleer vanuit 'n verskeidenheid mikrobiële fermentasieprosesse, plant- en diermateriale. Ensieme wat van plante en diere afkomstig is, is afhanklik van die beskikbaarheid van die betrokke plante of diere en is soms beskikbaar as onsuiver poeiers of suspensies, wat die gebruike daarvan kan beperk (Hacking, 1986). 'n Ander nadeel is dat daar soms slegs 'n gedeelte van die plant of dier nodig is vir die produksie van 'n ensiem, byvoorbeeld tripsien en chemotripsien vanaf diere en papaïne vanaf plante. Dit beteken dat die dier geslag word om net 'n betrokke orgaan te kan gebruik, terwyl die res van die plant of dier verlore mag gaan. Seisoens beskikbaarheid van plante is ook 'n groot struikelblok. Die grootskaalse produksie van ensieme vanaf plante en diere gaan gepaard met tegniese, ekonomiese en somtyds etiese probleme.

Ensieme van bakterieë, fungi en giste, daarenteen, verteenwoordig ongeveer 80 % van die totale industriële ensiemproduksie (Godfrey *et al.*, 1983). In die geval van mikrobiële ensieme word bogenoemde nadelige faktore uitgeskakel en isolering van die ensieme is vereenvoudig deur die verwydering van die selle en selreste voor isolering en suiwering. Die meeste kommersiële ensieme van mikrobiële oorsprong is ekstrasellulêre ensieme, wat die suiwering ook heelwat vergemaklik (Palmer, 1993). 'n Voordeel van die mikrobiële ensieme bó die ensieme van plante en diere, is dat hierdie ensieme vanaf 'n goedkoop substraat geproduseer kan word, mits 'n metaboliese weg bestaan vir die degradasie daarvan (Palmer, 1993). In Tabelle 2.1, 2.2 en 2.3 word slegs 'n paar industriële toepassings van ensieme in die voedsel-, mediese-, chemiese en farmaseutiese industrieë gegee (Dordick, 1991).

Die mees algemene industriële toepassing van biokataliste is die gebruik daarvan in die voedsel- en koeldrankindustrie (Tabel 2.1). Ensieme speel 'n belangrike rol in die produksie van baie suiwelprodukte (soos kaas en melk), in die verwerking van vleis, die voorbereiding van produkte vir bak en brouery en in die vrugtesap bedryf. Voorbeelde waar ensieme spesifieke funksies verrig is by koolhidrate (soos stysel, sellulose, sukrose, laktose en glukose), proteïene (renniën) en lipiede (lipases) byvoorbeeld kaasproduksie (Griffin *et al.*, 1993).

Tabel 2.1: Enkele industriële toepassings van ensieme in die voedsel- en koeldrankindustrie.

Ensiem	Bron	Toepassing
Sellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Wynindustrie
α -amilase	<i>Bacillus subtilis</i>	Alkoholfermentasie
Lipases	<i>Candida</i> sp., <i>A. niger</i>	Melkprodukte, kakaobotter
Pektinases	<i>Arthrobacter</i> , <i>A. niger</i>	Verwyder pektien uit vrugtesap en wyn
Amiloglukosidase	<i>Rhizopus</i> sp., <i>A. niger</i>	Dierevoeding, glukose produksie
Proteases	<i>B. subtilis</i> , <i>A. flavus</i>	Proteïenhidrolise, brouery, bakindustrie

Die gebruik van ensieme het baie groot vooruitgang op die gebied van diagnostiese toetse te weeggebring (Dordick, 1991). Hierdie industrie vereis hoogs selektiewe kataliste vir die sensitiewe en akkurate bepalinge in diagnostiese toetse (Tabel 2.2). Die belangrikheid van suiwer ensieme op hierdie gebied word beklemtoon deurdat sekere diagnostiese toetse net met behulp van ensieme uitgevoer kan word (Dordick, 1991).

Tabel 2.2: Enkele toepassings van ensieme in diagnostiese toetse.

Verbinding	Ensiem	Deteksie
Laktaat	Laktaatdehidrogenase, peroksidase	Vorming van NADH_2
L-malaat	Malaatdehidrogenase	Vorming van NADH_2
Sitraat	Sitraatliase, laktaatdehidrogenase	Afname in NADH_2
Sukrose	Invertase, peroksidase	Kolorimetries
L-alanien	Alanien aminotransferase	Kolorimetries

Sommige toepassings van biokataliste in die chemiese- en farmaseutiese industrieë word in Tabel 2.3 gegee, waar ensieme of geïmmobiliseerde selle betrokke is (soos L-malaat en L-aspartaat produksie, steroïed en semi-sintetiese antibiotika). Meer spesifieke prosesse kom in die leerindustrie (die verwydering van die hare van velle deur middel van proteases) en papierindustrie voor (Tabel 2.3).

Tabel 2.3: Enkele toepassings van biokataliste in die chemiese- en farmaseutiese industrieë.

Produk	Begin materiaal	Biokatalis
L-Malaat	Fumaraat	Fumarase (<i>B. ammoniagenes</i>)
L-Aspartaat	Fumaraat	Aspartase (<i>E. coli</i>)
Propileen glikool	Propileen	Chloroperoksidase
Kontaklensmiddels		Papaïen
Leerindustrieë		Keratinase, pektinase, sellulase
Papierindustrieë		α -Amilase, peroksidases, sellulases

2.5.4 Toekomstige ontwikkelinge

Die ontwikkeling van biokataliste is nie 'n stagnante industrie nie. Biokataliste speel so 'n belangrike rol in die voedsel- en koeldrankindustrieë, diagnostiese industrieë, chemiese en farmaseutiese industrieë, soos in Tabele 2.1, 2.2 en 2.3 hierbo aangedui, dat daar in die toekoms van nog meer biokataliste gebruik gemaak kan word om sekere funksies te verrig (Dordick, 1991; Faber *et al.*, 1993). Verdere ondersoek word gedoen deur ensieme in organiese oplosmiddels [gewoonlik is organiese middels denaturerend, maar met toenemende belangstelling is ensieme, soos oksidoreduktases, ontwikkel om aktief daarin te wees (Zaks, 1991)], in die potensiaal om kataliste as selektiewe antiliggamte te gebruik en in rekombinante DNA-tegnologie vir ensiemproduksie en proteïenmanipulering [wat dit moontlik maak om verlangde eienskappe in te kloneer, soos by subtilisien (Graycar, 1991)]. Alhoewel biokataliste geïnaktiveer kan word deur temperatuur, pH en ioonsterkte, is dit nodig om metodes te ontwikkel vir proteïenstabilisering, soos deur bestaande

ensieme te vervang met die ensieme van termofiele bakterieë, sodat hoër temperature benut kan word (Tomazic, 1991).

2.6 Doelstelling en benaderingswyse

Die hoofdoelstelling van hierdie studie is om een van die belangrikste organiese sure van die sitroensuursiklus met 'n eenvoudige en goedkoop, maar effektiewe metode, te produseer. Die volgende benaderingswyse is geformuleer om hierdie doelstelling te bereik:

- a) Die seleksie van bakterieë met 'n hoë fumarase aktiwiteit wat
- b) fumaarsuur omskakel spesifiek na L-malaat, en die
- c) optimalisering van die kondisies vir L-malaatproduksie.

HOOFSTUK 3

ISOLERING EN KARAKTERISERING VAN BAKTERIEË WAT L-MALAAT PRODUSEER

3.1 Inleiding

Daar is drie redes waarom die omsetting van fumaarsuur na L-malaat ondersoek is:

- 1) Dit is 'n direkte omskakeling met hopelik minder byprodukte (Voet *et al.*, 1990);
- 2) geen ko-faktore soos NAD^+ of FAD^+ is nodig vir die reaksie nie (Mathews *et al.*, 1990); en
- 3) fumaarsuur is nie so duur om as substraat te gebruik soos ander sure in die sitroensuursiklus nie.

Organismes met 'n hoë fumarase aktiwiteit sal die fumaarsuur as koolstofbron gebruik en goed op die fumaarsuuragarplate groei, terwyl die organismes wat nie goed op hierdie substraat groei nie, afgekeur sal word. Die malaat isomeer wat geproduseer word, word bepaal met behulp van 'n enantiomeer-spesifieke verbinding, naamlik R-(–)-2-butanol. Slegs die L-isomeer is geskik vir menslike gebruik en daarom sal organismes wat D-malaat of die rasemaat produseer, nie verder ondersoek word nie.

3.2 Materiale en metodes

'n Aantal pre-seleksie stappe is gedoen om die beste malaatproduserende bakterieë te isoleer. Die beste suurproduserende organismes is geïsoleer, aangesien 'n organisme wat suur vinnig produseer, onder andere malaat, meer ekonomies sal wees as 'n organisme wat 'n swak suurproduseerder is. Broomkresolpers, met 'n pH grens van pH 5,2 (geel) tot pH 6,8 (pers), is as indikator gebruik om die mate van suurvorming vas te stel. Indien suur gevorm word, sal die pH daal en die pers kleur sal geel word en hoe meer suur gevorm word, hoe meer intens sal die geel kleur word. Op dié manier is die vinnige en stadige suurproduseerders van mekaar onderskei.

Die vinnige suurproduseerders is aan 'n tweede seleksie stap onderwerp, naamlik seleksie van organismes met 'n hoë fumarase aktiwiteit. 'n Organisme met 'n hoë fumarase aktiwiteit verbeter die kanse dat verhoogde malaatproduksie wel kan voorkom. Die organisme is op fumaarsuuragarplate (fumaarsuur as die enigste koolstofbron) uitgestryk en by 37 °C geïnkubeer. In verskillende studies met bekende organismes wat die hoogste konsentrasies L-malaat produseer, word fumaarsuur as koolstofbron gebruik soos by *Brevibacterium ammoniagenes* (Yamamoto *et al.*, 1976) en *Brevibacterium flavum*. Sommige giste soos geïmmobiliseerde *Saccharomyces cerevisiae* (Figueiredo *et al.*, 1991) gee ook hoë omskakelings met fumaarsuur as die enigste koolstofbron.

3.2.1 Bronne van bakterieë

Mikro-organismes is vanuit verskeie bronne geïsoleer, naamlik komposhope, water, grond, rioolwater en molasse wat op die grond gestort is.

3.2.2 Media

3.2.2.1 Spreiplate

'n Verdunningsreeks vanaf 10^{-1} tot 10^{-7} is vir elke monster voorberei en 100 μ l is versprei op die voedingsagarplate (kyk Bylaag 1) om 'n 10^{-2} tot 10^{-8} reeks te kry. Die spreiplate is vir 18 tot 24 uur by 37 °C geïnkubeer, totdat enkel kolonies gevorm is. 'n Verskeidenheid enkel kolonies is geselekteer (op grond van koloniemorfologie) en gesuiwer en aan die seleksie stap onderwerp soos beskryf in Afdeling 3.2.2.2. Chemikalieë is, tensy anders vermeld, vanaf Merck aangekoop.

3.2.2.2 Voedingsop met broomkresolpers

Al die kulture is vir 18 uur in voedingsop met broomkresolpers (kyk Bylaag 1) geïnkubeer, sodat suurproduseerders geselekteer kon word. Die inkubasie tydperk was slegs 18 uur, omdat die vinnige suurproduseerders (malaat produseerders) waarskynlik meer ekonomies sal wees as organismes wat te lank vat om suur te produseer. Hierdie

prosedure is gevolg sodat die groot aantal organismes gesif kon word. Daarna is die organismes verder geselekteer soos in Afdeling 3.2.2.3 beskryf.

3.2.2.3 Fumaarsuuragarplate

‘n Spesifieke medium (kyk Bylaag 1) is saamgestel om vir organismes met ‘n hoë fumarase aktiwiteit te selekteer. Die organismes wat met die broomkresolperstoets geselekteer is, is op die fumaarsuuragarplate uitgestryk. Die agarplate is vir 18 uur (om die vinnige en stadige produseerders te skei) by 37 °C geïnkubeer. Daar is van 5 g/l fumaarsuur gebruik gemaak na aanleiding van Schindler (1988) wat hierdie konsentrasie aanbeveel het vir “nuwe” organismes en ook omdat die omskakelingsvermoë van die geselekteerde organismes op dié stadium nog nie bepaal was nie (Figuur 4.21). Op dié stadium was dit nog nie bekend by watter konsentrasie substraat-inhibisie moontlik mag voorkom nie. Al die chemikalieë behalwe die fumaarsuur, is van Merck aangekoop.

3.2.2.4 Fumaarsuursop

Dieselfde stappe soos in die geval van die fumaarsuuragarplate is gevolg, behalwe dat daar nie agar bygevoeg is nie. Nadat die organismes in die sop gekweek is, is die selle met sentrifugering teen 14 000 o.p.m verwyder en die supernatant is dan aan die prosedure, soos in Afdeling 3.2.4.1 beskryf, onderwerp, voordat die gaschromatografiese analise uitgevoer is.

3.2.3 Identifikasie van die geïsoleerde bakterieë

Primêre identifikasie- en biochemiese toetse is gedoen om die organismes te identifiseer (Tabel 3.1). Die resultate is met behulp van die BIOLOG-sisteem bevestig soos uitgevoer deur die Departement Mikrobiologie en Plantpatologie aan die Universiteit van Pretoria.

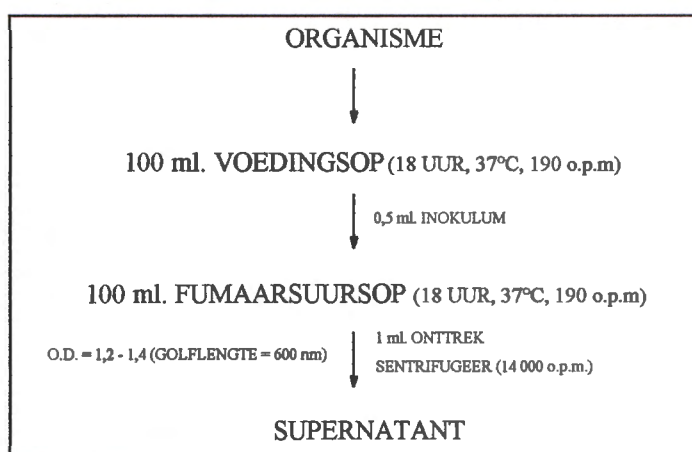
3.2.3.1 Transmissie elektronmikroskopie (TEM)

‘n Gedeelte van ‘n kolonie van ‘n suiwer kultuur, nie ouer as 24 uur nie, is met behulp van ‘n inokuleerorgie in ‘n druppel water gesuspendeer, waarna dit oorgedra is na ‘n

kopperroostertjie wat met 'n Formvar-lagie bedek is. Negatiewe kleuring van die organisme is uitgevoer met behulp van 0,05 % uranielasetaat (Handleiding, Laboratorium vir Elektronmikroskopie, PU vir CHO). 'n Phillips CM 10 TEM is gebruik om selvorm, teenwoordigheid en rangskikking van flagellums en endospore waar te neem.

3.2.4 Gaschromatografie

3.2.4.1 Voorbereiding van monsters vir gaschromatografie

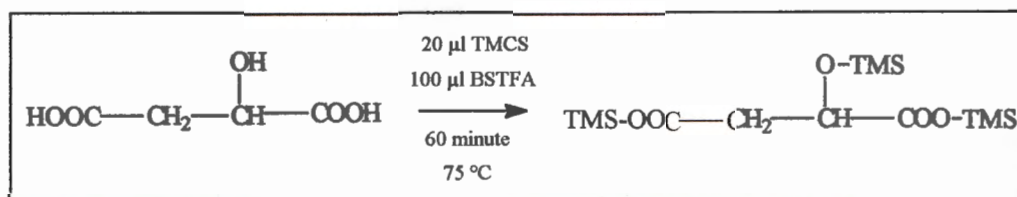


Figuur 3.1: 'n Kort skematiese voorstelling van hoe die monsters voorberei is vir die oplosmiddelekstraksie. 'n Oornagkultuur is as inokulum gebruik.

Die metode is uitgevoer volgens Erasmus (1987) waar 100 μ l interne standaard (25 mg/ 50 ml sitramalaat) by 1 ml supernatant gevoeg is. Die oplossing is aangesuur met 'n paar druppels 5N HCl om die pH laer as 2 te kry. Die oplosmiddelekstraksie word gedoen deur die supernatant en interne standaard (IS) te behandel met 'n organiese oplosmiddel. Die organiese oplosmiddel bestaan uit 6 ml gedistilleerde etielasetaat en 3 ml gedistilleerde diëtleter (wat onderskeidelik die meer hidrofiele en meer vlugtige en hidrofobe organiese sure ekstraheer), waar verdeling van organiese sure vanaf die waterfase na die organiesefase van die oplosmiddel plaasvind. 'n Spatelpunt watervrye Na_2SO_4 is bygevoeg om enige watermolekules wat teenwoordig mag wees, te verwyder. Die vloeistoffase (boonste fase) is onttrek en onder stikstof gedroog. Die meeste organiese sure is nie vlugtig genoeg om aan gaschromatografiese skeiding onderwerp te word nie en moet eers omskep word in verbindings wat chemies inert is, 'n hoë graad van termiese

stabiliteit besit en wat by temperature laer as 300 °C vlugtig is. Die aangewese metode is silanering van die organiese sure. Die reaksie is uitgevoer in 'n toeskroef proefbuis met 'n kombinasie van bis-trimetielsiliel trifluoroasetamied (BSTFA) en trimetiel chlorosilaan (TMCS) as reagense. TMCS tree op as katalisator, terwyl BSTFA die trimetielsilaangroep vir die werklike silanering verskaf (Figuur 3.2).

Die volgende illustrasie toon die derivatisering van L-malaat met TMCS en BSTFA:



Figuur 3.2: Derivatisering van L-malaat. Die massa van die gederivatiseerde malaat is aansienlik hoër as die van gewone malaat.

Die verhouding van 100 μl BSTFA en 20 μl TMCS is deurgaans dieselfde gehou vir al die analyses. 'n Fyngekalibreerde Hamilton-spuit is gebruik vir toediening. Die gaschromatograaf se kondisies was soos volg:

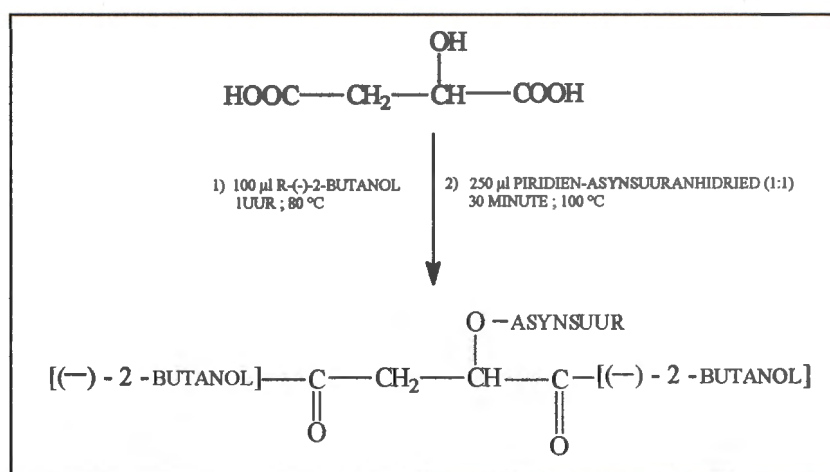
Gaschromatograaf:	Hewlett Packard 5880
Kolom:	SE-30 (30 meter x 0,32 mm. x 0,25 μl)
Detektor:	Vlamionisasie
Draergas:	Stikstof (vloeisnelheid: 1 ml/min)
Detektorgas:	Lug/waterstof
Temperatuurprogram:	Inspuitstuk 260 °C; detektor 275 °C; oond 70 °C vir 2 min, styg teen 5 °C/min vanaf 70 °C tot 280 °C, met 'n finale temperatuurtydperk van 2 min.

3.2.4.2 Skeiding van malaat isomere met behulp van R-(–)-2-butanol

Al die geselekteerde bakterieë (na die siftingsprosedures soos beskryf in Afdeling 3.2.2.2 en 3.2.2.3) is onder dieselfde kondisies gekweek, die supernatant is verkry en aan die oplosmiddelekstraksie onderwerp, soos in Afdeling 3.2.4.1 beskryf is. Die skeiding van die

isomere is gedoen deur 'n kombinasie van die metodes van Agarwal (1988) en Van Rooyen (1994), deur van stereospesifieke R-(–)-2-butanol gebruik te maak. 'n DL-standaard en 'n L-standaard van malaat is vooraf voorberei en geanaliseer. Dieselfde metode is op al die supernatante van die geselekteerde bakterieë uitgevoer om vas te stel of die D-isomeer, L-isomeer of die rasemaat gevorm is. Die metode is soos volg:

Die malaat is gebutileer deur 100 μ l R-(–)-2-butanol by die droë organiese suur ekstrakt te voeg en goed te skud. Na verhitting vir 1 uur by 80 °C, is die mengsel laat staan om af te koel. Die inhoud is oorgedra na 'n skeitregter deur die toeskroef proefbuis met 10 ml chloroform uit te spoel. Bogenoemde is herhaal met 10 ml gedistilleerde water. Die doel van die twee stappe is om al die droë organiese suur ekstrakt in die toeskroef proefbuis oor te dra na die skeitregter toe. Nadat die skeitregter liggies geskud is, is die chloroform (onderste laag) in 'n groot toeskroef proefbuis uitgetap. Watervrye Na₂SO₄ is bygevoeg om enige water wat teenwoordig mag wees, te verwyder. Die mengsel is gesentrifugeer en die supernatant is onttrek. Die supernatant is vervolgens onder stikstof gedroog. Asetilering van malaat vind plaas deur 250 μ l piridien-asynsuuranhidried (1:1) by te voeg en die mengsel vir 30 minute by 100 °C te los. Bogenoemde reaksie word in Figuur 3.3 geïllustreer. Nadat die mengsel kamertemperatuur bereik het, is dit onder stikstof gedroog. Die nie-vloeibare, donker mengsel is in 30 μ l chloroform opgelos en 0,2 μ l van die mengsel is met die gaschromatograaf geanaliseer.



Figuur 3.3: Metode vir die differensiasie tussen die L- en D-isomeer van malaat.

3.3 Resultate

3.3.1 Isolering van L-malaatproduserende bakterieë

Die bakterieë wat uit die verskillende bronne op die spreiplaat versprei is, is vir 18 tot 24 uur by 37 °C geïnkubeer, waarna die kolonies volgens koloniemorfologie en kleur geselekteer en uitgestryk is vir suiwering. Die kulture is herhaaldelik uitgestryk totdat suiwer kulture gekry is. Net meer as sowat tweehonderd gesuiwerde bakterieë is na die daaropvolgende pre-seleksie stappe oorgedra. In die 18 uur wat die kulture in die voedingsop met broomkresolpers (indikator) geïnkubeer is, het slegs 48 'n duidelike helder geel kleur gevorm. Die res van die kulture het 'n geel-pers kleur gevorm of pers gebly. Die 48 geselekteerde organismes is vervolgens op fumaarsuuragarplaat uitgestryk en by 37 °C geïnkubeer. Die plaat is vir 18 uur geïnkubeer en nie vir 24 uur nie, sodat organismes verkry kan word wat vinnige suurproduseerders is. Slegs 3 bakterieë van die 48 geselekteerde organismes het goed gegroei op die fumaarsuuragarplaat.

3.3.2 Identifikasie van die geselekteerde bakterieë

Die drie geselekteerde bakterieë, genummer O9, O13 en O17 respektiewelik, is aan 'n reeks identifikasie toetse onderwerp vir identifisering, wat later deur die BIOLOG-sisteen² bevestig is. Die resultate word in Tabel 3.1 gegee.

Uit die resultate van die identifikasie toetse, is die organismes geïdentifiseer volgens Krieg *et al.*, (1984) en Sneath *et al.*, (1986) as:

Organisme O9	<i>Bacillus brevis</i>
Organisme O13	<i>Bacillus firmus</i>
Organisme O17	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

² Uitgevoer deur die Departement Mikrobiologie en Plantpatologie, Universiteit van Pretoria.

Tabel 3.1: Identifikasie toetse gedoen op drie bakterieë.

TOETS	AFKORTING	O9	O13	O17
Kopeloff Gramkleuring vir selwand tipering	GRAM	+	+	-
Selmorfologie		Stawe	Stawe	Stawe
Spore		+	+	-
Beweeglikheid		-	+	-
Katalase	KAT	+	+	+
Sitochroom oksidase	OKS	+	+	-
Oksidatief / Fermentatief (Hugh Leifson)	O/F	O	O	O
Nitraatreduksie	NO ₃	-	-	+
Arginien dihidrolase	ADH	-	-	-
Gelatien hidrolise	GEL	-	(+)	-
Urease	URE	-	-	-
β -galaktosidase	ONPG	+	+	-
Sitraat benutting	CIT	-	-	+
Voges Proskauer toets vir asetoëen	VP	-	-	ND
Suurproduksie vanaf glukose	GLC (suur)	+	+	ND
Gasproduksie vanaf glukose	GLC (gas)	-	-	ND
Stysel hidrolise	STY	+	-	ND
Groei by 7% NaCl	7%	-	+	ND
Anaërobe groei in tioglikolaat medium	ANAE	- ³	-	ND
Kaseïen hidrolise in litmus melk	CAS	-	-	ND

+ = positief; - = negatief; ND = nie gedoen nie

3.3.3 Gaschromatografiese analyses

‘n Standaardreeks van L-malaat (Sigma) vanaf 0,03 tot 5 g/l is berei en ook aan die oplosmiddelektaksie onderwerp. Die reeks is met die gaschromatograaf geanaliseer om ‘n standaardkurwe saam te stel (Figuur 3.4). Die rede hiervoor is dat enige konsentrasie van malaatproduksie vinnig en maklik van die standaardkurwe afgelees kon word, indien die oppervlakte van die piek bekend is. Dit is belangrik om te beklemtoon dat dit nie ‘n kwantitatiewe metode is nie, maar die akkuraatheid van die metode is goed genoeg om ‘n

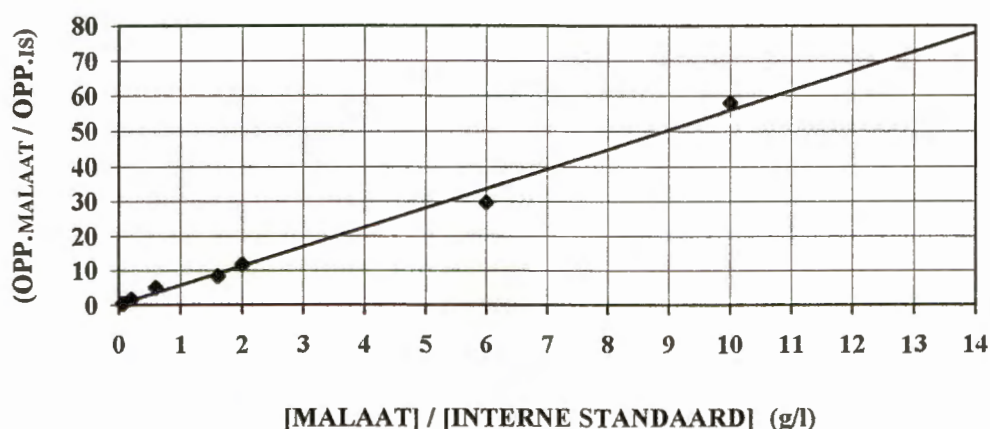
³ Aëroob

goeie voorlopige idee te kry van die mate van malaatproduksie. Akkurate malaatkonsentrasiebepalings is eers later uitgevoer nadat die optimum kondisies bepaal is (Afdeling 4.3.2). Die standaardkurwe bestaan uit die konsentrasie (x-as) teenoor oppervlakte (y-as), waar die oppervlakte bereken word deur die oppervlakte van malaat gedeel deur die oppervlakte van die IS (soos verkry deur GC se integreerder). Die konsentrasie is bereken deur die bekende konsentrasie van malaat gedeel deur die bekende konsentrasie van die IS (Tabel 3.2).

Tabel 3.2: Inligting vanaf die GC-profiel vir standaard L-malaatkonsentrasies.

Malaatkonsentrasie (g/l)	OPP.MALAAT	KONS. MALAAT
	OPP. IS	KONS. IS (g/l)
0,03	0.430	0.06
0,1	1.745	0.2
0,3	4.990	0.6
0,8	8.470	1.6
1	11.656	2.0
3	29.686	6.0
5	58.058	10

Die standaardkurwe word in Figuur 3.4 gegee.



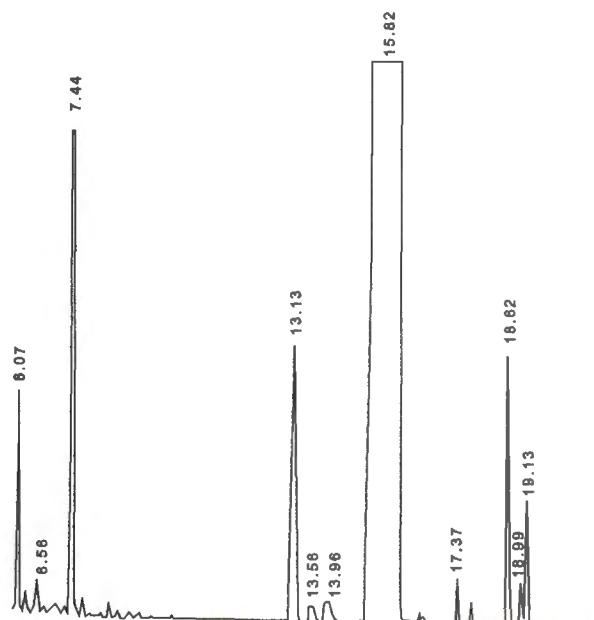
Figuur 3.4: 'n Standaardkurwe saamgestel uit bekende L-malaatkonsentrasies.

Die voorbereide supernatante van die drie geselekteerde organismes is met die gaschromatograaf geanaliseer en die profiele word in Figuur 3.6 tot 3.8 gegee. Figuur 3.5 is die kontrole in die eksperiment wat slegs uit die medium bestaan en waarin geen kultuur geïnokuleer is nie. 'n Duidelike fumaarsuurpiek (5 g/l) kan by retensietyd 15.82 opgemerk word. Die interne standaard, sitramalaat (25 mg/50 ml), is ook sigbaar by retensietyd 18.62. Verskeie ander pieke is ook sigbaar waarvan slegs laktaat (retensietyd van 7.44) bekend is. Geen piek wat malaat verteenwoordig is sigbaar nie.

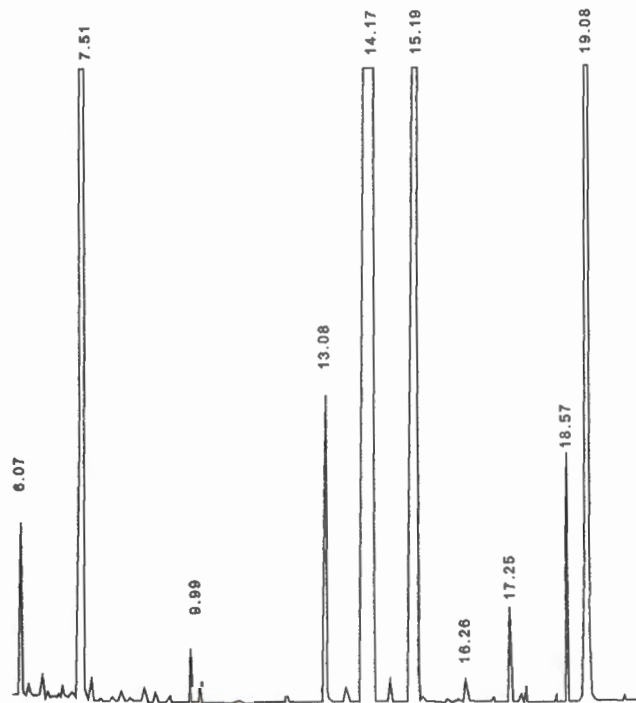
In Figuur 3.6, wat die malaatproduksie van organisme O9 illustreer, kan 'n duidelike toename in die byprodukte suksiensuur (retensietyd van 14.17) en laktaat (retensietyd van 7.51) waargeneem word, terwyl die malaat wat gevorm is (retensietyd van 19.08) heelwat minder is indien dit met byvoorbeeld Figuur 3.7 vergelyk word; Figuur 3.7 illustreer die malaatproduksie deur organisme O13. Ander kleiner pieke is ook sigbaar wat onbekende verbindings verteenwoordig. In Figuur 3.8, wat die malaatproduksie van organisme O17 illustreer, kan dieselfde toename in suksiensuur en laktaat (retensietye van 14.08 en 7.60 onderskeidelik) waargeneem word. In laasgenoemde geval is feitlik al die fumaarsuur (retensietyd van 15.08) opgebruik om die byprodukte te vorm. 'n Groot hoeveelheid ander onbekende produkte is gevorm, wat die suiwering van L-malaat later baie moeilik sal maak. Hierdie twee organismes (O9 en O17) is dus nie geskik vir malaatproduksie nie, want te veel van die fumaarsuur word onder hierdie kondisies gebruik om ander produkte as malaat te produseer. Wanneer die standaardkurwe gebruik word om die hoeveelheid malaat wat geproduseer is, te bereken, het *Bacillus brevis* (organisme O9) slegs 1,4 g/l malaat gevorm (Figuur 3.6) en *Acinetobacter calcoaceticus* (organisme O17) slegs 0,8 g/l malaat (Figuur 3.8) vanaf 5 g/l fumaarsuur. Dit is 'n omskakeling van slegs 28 % en 16 % onderskeidelik, wat relatief min is.

In Figuur 3.7 kan duidelik gesien word dat organisme O13 'n groter konsentrasie fumaarsuur (retensietyd van 15.24) omgeskakel is na malaat (retensietyd van 19.15) en dat die byprodukte minder is as by die ander twee organismes (suksiensuur en laktaat met retensietye van 14.12 en 7.57 onderskeidelik). Die piek met 'n retensietyd van 18.56 is die interne standaard met 'n konsentrasie van 25 mg/50 ml (die konsentrasie is deurgaans

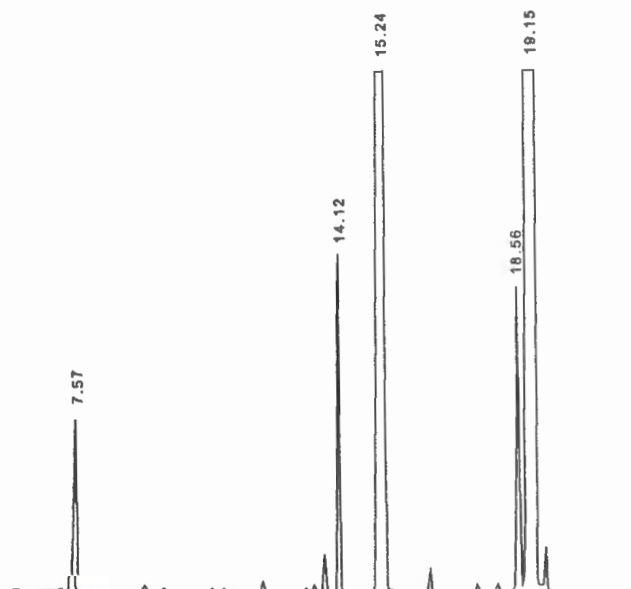
dieselfde gehou vir al die eksperimente). Daar is egter nog heelwat fumaarsuur wat na malaat omgeskakel kon word, indien die inkubasie moontlik verleng sou word. Organisme O13 is verder bestudeer aangesien dit die beste resultate van die drie organismes gelever het. Indien die gemiddelde oppervlakte van die malaatpiek op die standaardgrafiek (Figuur 3.4) afgelees word, vorm organisme O13 ongeveer 4 g/l malaat. Die 80 % omskakeling is hoog vir 'n organisme waarvan die optimum kondisies nog nie bepaal is nie. Indien hierdie persentasie met die van organisme O9 en O17 vergelyk word, is dit duidelik dat bogenoemde die beter keuse vir verdere studie is.



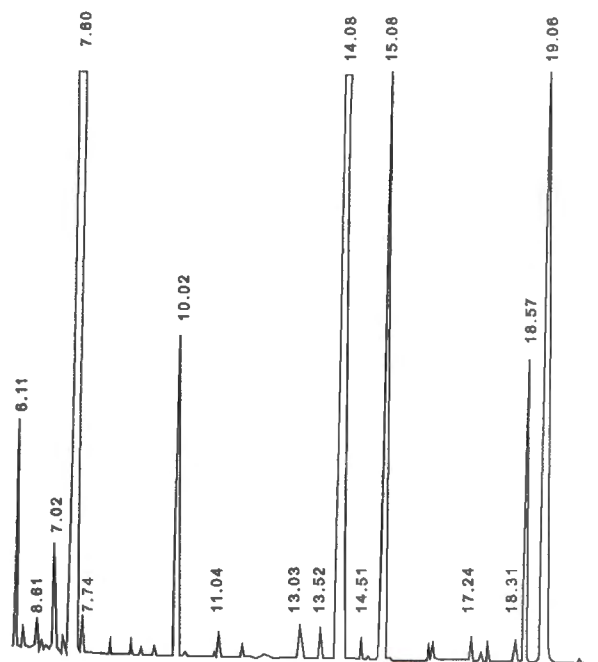
Figuur 3.5: GC-profiel van die groeimedium. Die groot piek (retensietyd van 15.82) is die fumaarsuur wat as koolstofbron vir die organismes dien. Slegs 'n gedeelte van die profiel word gegee.



Figuur 3.6: Malaatproduksie deur organisme O9. Die pieke by retensietye 14.17 en 7.51 verteenwoordig onderskeidelik suksiensuur en laktaat en die piek by 19.08 is malaat. Die interne standaard is by retensietyd 18.57. Slegs 'n gedeelte van die profiel word gegee.



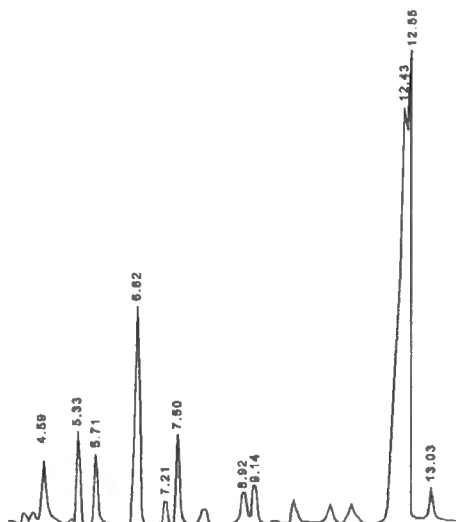
Figuur 3.7: Malaatproduksie deur organisme O13. Die pieke by retensietye 19.15, 18.56 en 15.24 verteenwoordig onderskeidelik malaat, IS en fumaarsuur.



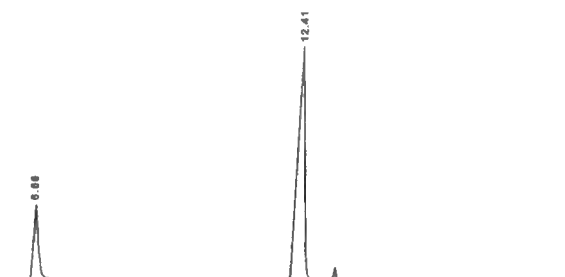
Figuur 3.8: Malaatproduksie deur organisme O17. Die pieke by retensietye 14.08 en 7.60 verteenwoordig suksiensuur en laktaat onderskeidelik, terwyl malaat by retensietyd 19.06 voorkom. Die interne standaard is by retensietyd 18.57. Slegs 'n gedeelte van die profiel word gegee.

3.3.4 Identifisering van die malaat isomeer wat gevorm is

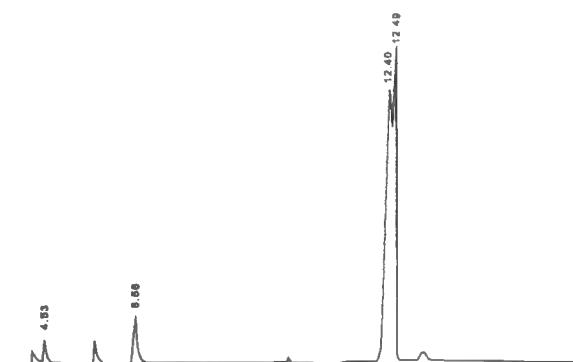
Die isomeer wat deur al drie die geselekteerde bakterieë gevorm is, is geïdentifiseer volgens die metodes van Agarwal (1988) en Van Rooyen (1994). Die DL-standaard is eerste geanaliseer om vas te stel of die twee isomere onder die vasgestelde kondisies geskei kon word (Afdeling 3.2.4.2). Die resultaat van hierdie skeiding word in Figuur 3.9 gegee. Twee duidelike pieke word by retensietye 12.43 en 12.55, onderskeidelik, waargeneem. Die ander pieke wat in hierdie profiel teenwoordig is, dui op onsuiverhede wat in die DL-malaat voorgekom het. Hierdie twee pieke is geïdentifiseer deur L-malaat afsonderlik (Figuur 3.10) en daarna 'n mengsel van L-malaat en DL-malaat (Figuur 3.11) te analiseer. Volgens hierdie resultate elueer die L-malaat na die D-malaat. Hierdie derivatiseringsmetode is dus geskik om die tipe isomeer wat die organisme produseer, te kan identifiseer.



Figuur 3.9: GC-analise van DL-malaat.

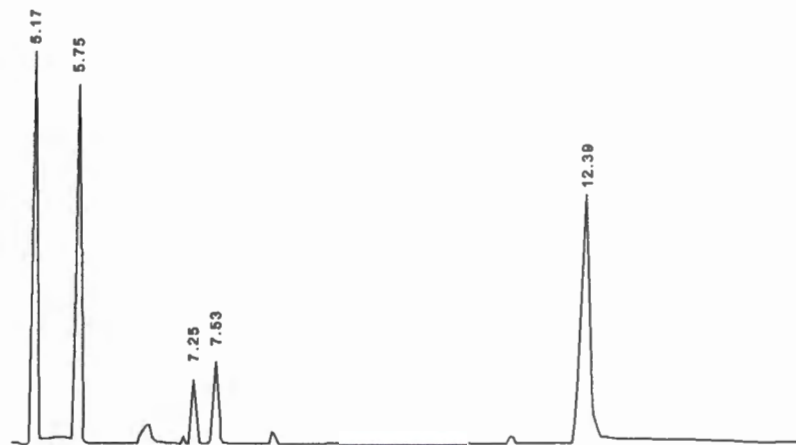


Figuur 3.10: GC-analise van L-malaat.

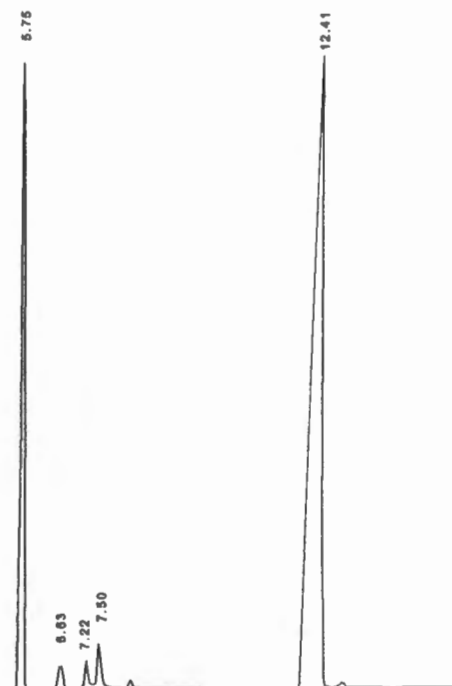


Figuur 3.11: GC-analise van 'n L- en DL-malaatmengsel.

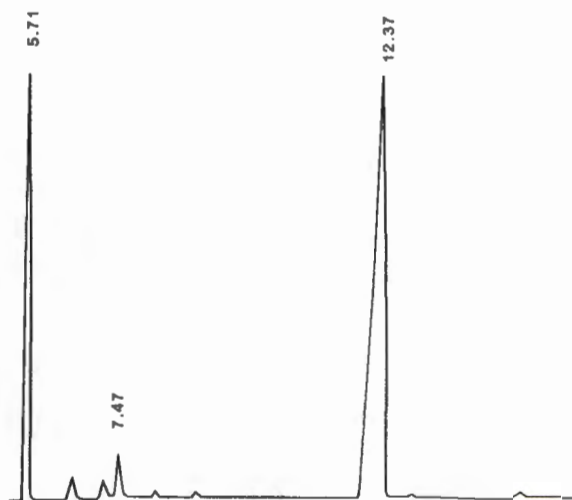
Die ekstrakte uit die supernatante van die onderskeie bakterieë is gebutileer en direk daarna geanaliseer. Organisme O9 (Figuur 3.12), organisme O13 (Figuur 3.13) en organisme O17 (Figuur 3.15) se profiele word hieronder gegee. In elkeen van die drie profiele is slegs een enkele piek met dieselfde retensietyd as die L-isomeer (Figuur 3.10) teenwoordig. Al drie die organismes produseer dus slegs die L-isomeer van malaat. Die oppervlakte van organisme O13 se profiel is redelik groot en is 'n verdunning (1:1; met behulp van chloroform) gemaak om vas te stel of die L-isomeer nie dalk die D-isomeer oorskadu nie. Hierdie profiel word in Figuur 3.14 gegee.



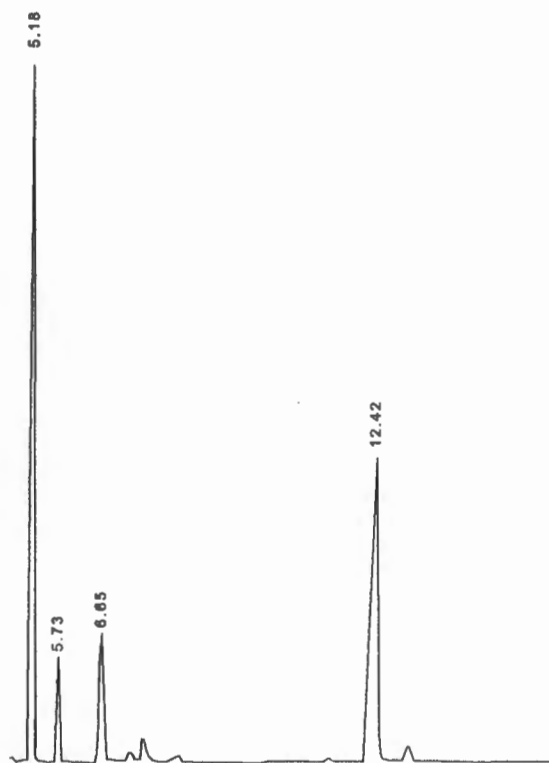
Figuur 3.12: Malaatproduksie deur organisme O9. Slegs 'n gedeelte van die profiel word gegee.



Figuur 3.13: Malaatproduksie deur organisme O13. Slegs 'n gedeelte van die profiel word gegee.



Figuur 3.14: Malaatproduksie deur organisme O13 (verdunning 1:1). Slegs 'n gedeelte van die profiel word gegee.



Figuur 3.15: Malaatproduksie deur organisme O17. Slegs 'n gedeelte van die profiel word gegee.

Dit is noodsaaklik om te noem dat die hoeveelheid L-malaat wat gevorm is op hierdie stadium nie so belangrik is nie, aangesien slegs die tipe isomeer wat gevorm word, geïdentifiseer moes word.

3.4 Samevatting

Bakterieë is vanuit verskillende bronne geïsoleer en daarna aan verskeie seleksie stappe onderwerp om die beste malaat produseerders te verkry. Nadat hierdie stappe uitgevoer is, is drie bakterieë as goeie malaat produseerders geselekteer, geïdentifiseer en die isomeer van malaat wat deur die bakterieë gevorm is, bepaal. In Hoofstuk 4 word beskryf hoedat die optimum kondisies vir malaatproduksie deur hierdie bakterieë vasgestel is.

HOOFSTUK 4

OPTIMALISERING VAN DIE KONDISIES VIR L-MALAAT PRODUKSIE

4.1 Inleiding

In Hoofstuk 3 is beskryf hoedat drie bakterieë (O9, O13 en O17) geïsoleer is wat relatief groot hoeveelhede L-malaat produseer. In hierdie hoofstuk word nou beskryf hoedat die optimum kondisies (pH, temperatuur, tyd en konsentrasie) bepaal is vir L-malaat produksie. Omdat die kondisies van elke organisme waarskynlik verskil, was dit eers nodig om 'n breë spektrum vir elke kondisie te ondersoek. Daarom is pH 5 tot 9 vir elke organisme getoets, terwyl die temperature van 25 °C, 30 °C en 35 °C ondersoek is. Dit dek die grootste gedeelte van die mesofiele temperatuurspektrum en is ook so gekies na aanleiding van Sato *et al.*, (1977). Vir elkeen van die pH's is daar ná inkubasie tye van 10,12,14,16,18 en 20 uur bepalinge gedoen. Die rede waarom die eerste onttrekking op 10 ure gedoen is, is omdat ensimatisiese bepalinge op die supernatante in loodseksperimente, lae aktiwiteit en malaatproduksie getoon het van tyd 2 tot 8 ure. As gevolg van die groot aantal monsters wat geanaliseer moes word, was dit nodig om 'n vinnige seleksiemetode te ontwikkel om al die monsters te toets vir L-malaatkonsentrasie. 'n Aantal dunlaagchromatografiese metodes is getoets, maar sonder veel sukses. 'n Papierchromatografiese metode is vervolgens gebruik om al die monsters te analiseer. Die papierchromatografie is nie 'n kwantitatiewe metode nie, maar is 'n vinnige en maklike metode om 'n aanduiding te kry van die hoeveelheid malaat wat geproduseer word. Daar is 288 monsters in 3 dae geanaliseer, waaruit die kondisies met die beste resultate gekies kon word. Daar is besluit om slegs die organisme wat die beste produksie toon, te kies vir verdere studie. Die spesifieke kondisies is akkuraat bepaal met behulp van L-malaat pakkette. Hieruit is die optimum kondisie vir die een organisme (Organisme O13) bepaal vir maksimum malaatproduksie.

4.2 Materiale en metodes

4.2.1 Voorbereiding vir eksperiment

Die groeimedium is voorberei soos in 3.2.2.4 beskryf, tot net voordat dit geoutoklaaf is. Nadat die 5 g/l fumaarsuur in die onderskeie flesse opgelos is, is die pH met behulp van 2N NaOH ingestel op onderskeidelik pH 5, 6, 7, 8 en 9, waarna die medium geoutoklaaf is. Die finale volume van die kulture was 100 ml. Die inokulum grootte vanuit 'n oornag-kultuur was 0,5 ml per fles. Na elke onttrekking (van 5 ml) is 1 ml van die kultuur teen 14 000 o.p.m. gesentrifugeer en die supernatant is gevries tot latere ondersoek.

Tabel 4.1: Inkubasie kondisies.

Fles	pH	Fumaarsuur-konsentrasie (g/l)	Temperatuur ⁴ (°C)	Onttrekkingstye (ure)
Kontrole	7	5	25, 30, 35	10,12,14,16,18,20
1	5	5	25, 30, 35	10,12,14,16,18,20
2	6	5	25,30, 35	10,12,14,16,18,20
3	7	5	25, 30, 35	10,12,14,16,18,20
4	8	5	25, 30, 35	10,12,14,16,18,20
5	9	5	25, 30, 35	10,12,14,16,18,20

In Tabel 4.1 word die kondisies waaronder die onderskeie organismes vir L-malaat-produksie getoets is, saamgevat. Die fumaarsuurkonsentrasie en temperatuur (25 °C, 30 °C en 35 °C onderskeidelik) is konstant gehou, terwyl die pH gevarieer is. Fles 1 bevat dus 5 g/l fumaarsuur, by 'n pH van 5 en 'n 0,5 ml inokulum van organisme O9. Die fles is by 25 °C (later 30 °C en 35 °C) geïnkubeer, terwyl daar op tye 10, 12, 14, 16, 18 en 20 uur 1 ml kultuur onttrek is. Dieselfde is vir organisme O13 en O17 herhaal. Die hele prosedure geld vir flesse 2, 3, 4 en 5. 'n Totaal van 288 monsters is so gegenereer.

⁴ Die volledige eksperiment is telkens by die onderskeie temperature uitgevoer, naamlik 25 °C, 30 °C en 35 °C onderskeidelik.

4.2.2 Gebufferde kulture

Die onderskeie kulture is saamgestel soos in Afdeling 4.2.1 beskryf, behalwe dat daar 3 ml natriumfosfaatbuffer (1M) by fles 2, 3 en 4 (pH 6, 7 en 8 onderskeidelik) en 6 ml boraatbuffer (0,5 M) by fles 5, 6 en 7 (pH 8, 9 en 10 onderskeidelik) bygevoeg is. Die finale volume van die kulture was 100 ml. Die grense waarin die natriumfosfaatbuffer aktief is, is pH 5.7 tot 8.0, terwyl Clark en Lubs se boraatbuffer tussen pH 7.8 en 10 funksioneer. Die finale konsentrasie van beide buffers in die fumaarsuursop is 30 mM. Die natriumfosfaatbuffer is vooraf op pH 6, 7 en 8 ingestel deur sekere volumes Na_2HPO_4 en NaH_2PO_4 by mekaar te voeg voordat dit by die fumaarsuursop gevoeg is. Die boraatbuffer bestaan uit 6,2 gram H_3BO_3 en 7,46 gram KCl per liter, waarna die oplossing tot pH 8, 9 en 10 ingestel is met 0,1N NaOH (Figuur 4.17 en 4.18). Die 1M Tris-HCl buffer, dek pH 7, 8 en 9 en het later die boraatbuffer vervang by fles 5 tot 7 onderskeidelik, behalwe dat die finale konsentrasie na 50 mM verhoog is (Figuur 4.19).

4.2.3 Optimale substraatkonsentrasie

Nadat die optimale temperatuur, tyd en pH vir organisme O9, O13 en O17 bepaal is, is die organisme wat die hoogste malaatproduksie in die kortste tyd gelewer het (O13), gekies vir verdere studie. Die variasie in substraatkonsentrasie word in Tabel 4.2 gegee.

Tabel 4.2: Bepaling van die optimale substraatkonsentrasie vir organisme O13.

Fles	pH	Fumaarsuur-konsentrasie (g/l)	Temperatuur (°C)	Onttrekkingstyd (uur)
Kontrole	9	2	25	10
1	9	4	25	10
2	9	5	25	10
3	9	6	25	10
4	9	8	25	10
5	9	10	25	10

4.2.4 Dunlaagchromatografie

Verskillende dunlaagchromatografiese metodes is ondersoek en sluit die volgende in, wat ook in verskillende kombinasies gebruik is:

- | | | |
|-------------------------------|---|---|
| 1) Dunlaagchromatografieplate | : | DC-alufoliensellulose
DC-alufoliensellulose (Fluorescent) |
| 2) Loopmiddels | : | Etielasetaat : asynsuur : water (3:1:1)
Benseen : IAA ⁵ : Mieresuur (70:25:5) |
| 3) Metodes van visualisering | : | UV-lig
Jodiumdampe
Kleuring met broomkresolgroen |

4.2.5 Papierchromatografie

Groeimedium wat na elke onttrekking voorberei en gevries is, is ontdooi en sonder enige verdere voorbereiding of verdunning gebruik. Die metode is uitgevoer soos deur Snyman (1978) beskryf, behalwe dat die loopmiddel aangepas is. Ongeveer 5 μ l van elke supernatant is met behulp van 'n Hamiltonspuit op die Whatman No.1 chromatografiepapier geplaas, terwyl daar met 'n handhaardroër op die kol geblaas is (die uiteindelijke deursnit van die kol moet nie meer as 1 cm wees nie). Nadat al die monsters en standaard op die papier aangebring is, is die punte van die papier vasgekram, sodat 'n ronde pyp gevorm is. Die loopmiddel wat gebruik is, bestaan uit 100 ml *n*-butanol, 100 ml gedistilleerde water, 7 ml gekonsentreerde mieresuur en 12,5 ml broomkresolgroen oplossing en is vooraf deur Whatman no.1 filtreerpapier gefiltreer. Die water is van die res van die oplossing geskei met behulp van 'n skeitregter. Hierdie loopmiddel is vooraf in 'n groot chromatografie tenk gegooi, sodat ewewig bereik kon word. Na ongeveer 4 ure in die tenk, is die chromatografiepapier verwyder en binne-in 'n trekkas opgehang, sodat die gekonsentreerde mieresuur en *n*-butanol kon verdamp waarna die chromatogram gekleur is. Die organiese sure word gekenmerk deur liggeel kolle op 'n blou-groen agtergrond.

⁵ Isoamielalkohol

4.2.6 Akkurate bepaling van die L-malaatkonsentrasie

Die L-malaatkonsentrasie in die supernatante is met behulp van die L-malaat pakket (Boehringer Mannheim) bepaal. Hierdie is 'n baie sensitiewe en akkurate metode vir die bepaling van die L-isomeer van malaat. Die analyses is spektrofotometries met 'n Beckman 7500 spektrofotometer by 340 nm uitgevoer. Die monsters is eers 30x verdun, aangesien die L-malaatkonsentrasie in die kuvet volgens die gebruiksaanwysings wat saam met die pakket verkry is, tussen 0,04 en 0,2 g/l moet wees vir akkurate lesings.

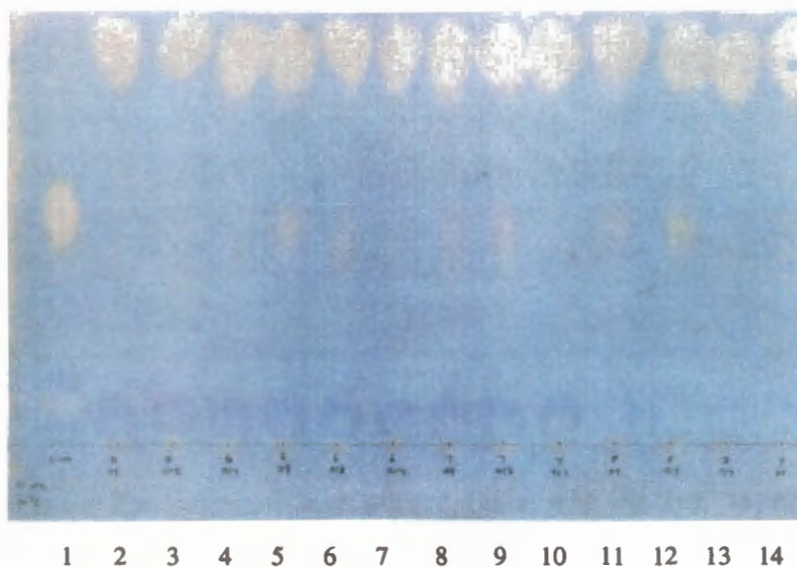
4.3 Resultate

Aangesien die resultate wat met behulp van die dunlaagchromatografie verkry is, baie onduidelik was en soms geen skeiding verkry is nie, word hierdie resultate nie getoon nie.

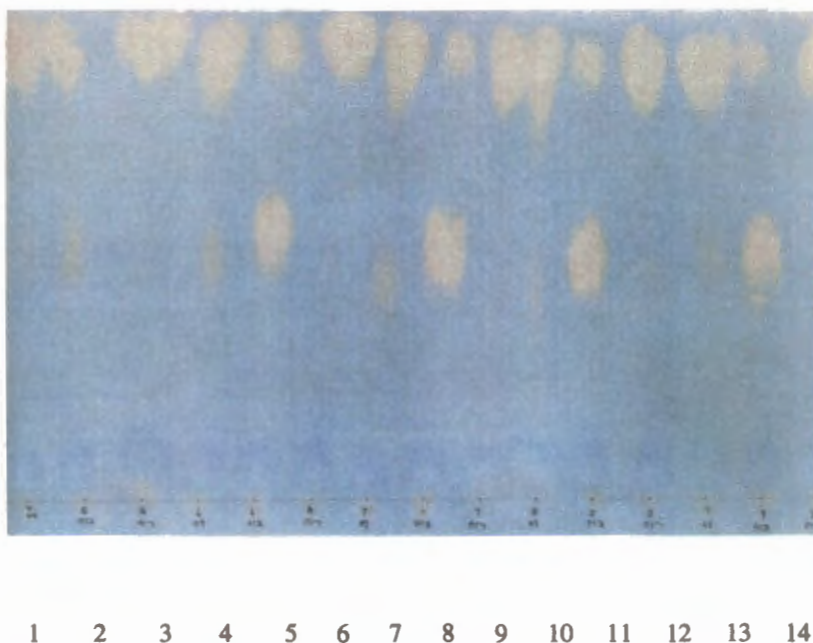
4.3.1 Papierchromatografie

Die agtergrond van die papierchromatografie is blou-groen as gevolg van die broomkresolgroen wat blou-groen word in 'n alkaliese medium. Die sure wat gemigreer het, is waarneembaar as geel kolle op die papier (die indikator is geel wanneer die medium suur word). Alhoewel die chromatogramme lig van kleur is en dit moeilik was om kleurfoto's daarvan te neem, kon tog kleur skandeerafdrukke daarvan gemaak word. 'n Duidelike verskil in die grootte en intensiteit van die kolle is op hierdie afdrukke sigbaar (Figuur 4.1): hoe groter en helderder die kol is, hoe hoër is die konsentrasie van die malaat (onderste kolle) en fumaarsuur (boonste kolle) onderskeidelik. Wanneer fumaarsuur na malaat omgeskakel is, is 'n omgekeerde verband in die helderheid en grootte van die onderskeie sure se kolle waargeneem. Hiervolgens kan verskille in die mate van omsetting van fumaarsuur na L-malaat waargeneem word. Hierdie metode was dus geskik om die beste kondisies te selekteer vir optimale malaatproduksie. Daar kan ook duidelik gesien word dat daar 'n afname in die konsentrasie van fumaarsuur en malaat is namate die inkubasie tyd toegeneem het vanaf 10 tot 20 ure (Figuur 4.2 tot 4.4). In elkeen van die chromatogramme is fumaarsuur en malaat as standaard bygevoeg. Die konsentrasies van hierdie merkers is ook gebruik om 'n skatting te maak van die mate van

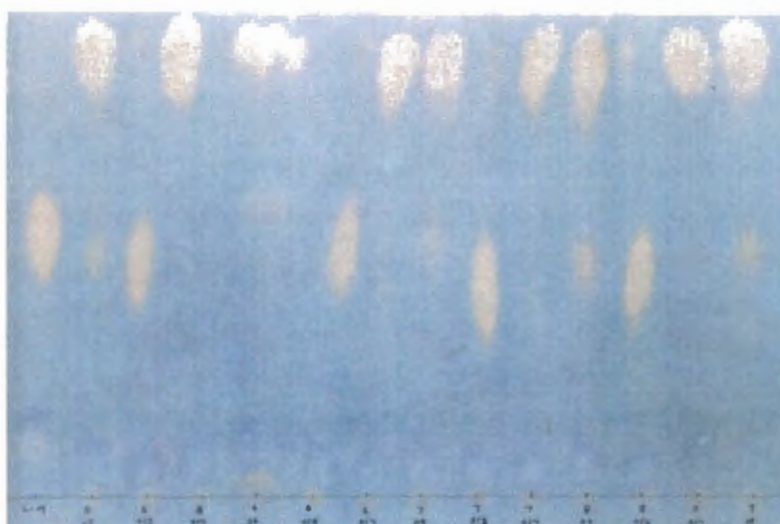
omsetting van fumaarsuur na malaat. Tog moet dit beklemtoon word dat hierdie 'n kwalitatiewe metingsmetode is waarmee 'n groot aantal monsters in 'n relatiewe kort tydperk geanaliseer kon word.



Figuur 4.1: Papierchromatogram wat die hoeveelheid L-malaat en fumaarsuur aandui. Die monsters is op tyd 10 uur onttrek. 1 = L-malaat standaard, 2 = pH 5 (O9), 3 = pH 5 (O13), 4 = pH 5 (O17); 5 = pH 6 (O9)...

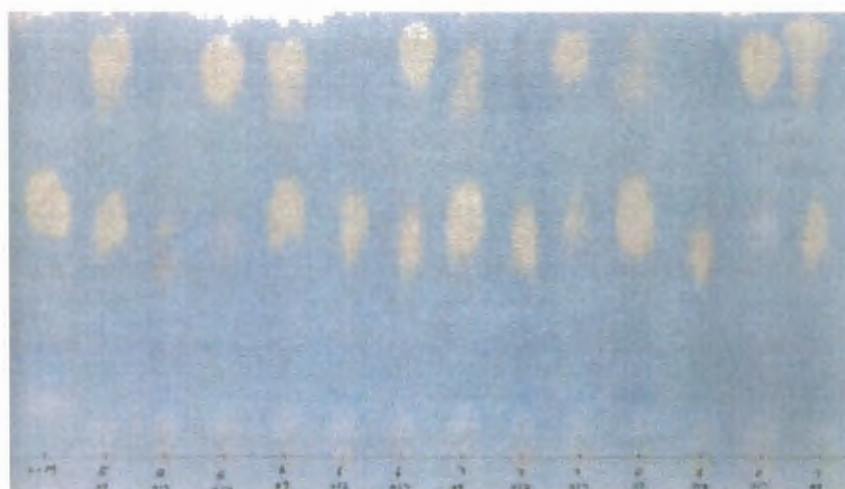


Figuur 4.2: Papierchromatogram met supernatante wat op tyd 12 ure onttrek is. 1 = pH 5 (O9), 2 = pH 5 (O13), 3 = pH 5 (O17)...



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Figuur 4.3: Papierchromatogram met supernatante wat op tyd 16 ure onttrek is.
1 = L-malaat standaard, 2 = pH 5 (O9), 3 = pH 5 (O13), 4 = pH 5 (O17)...



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

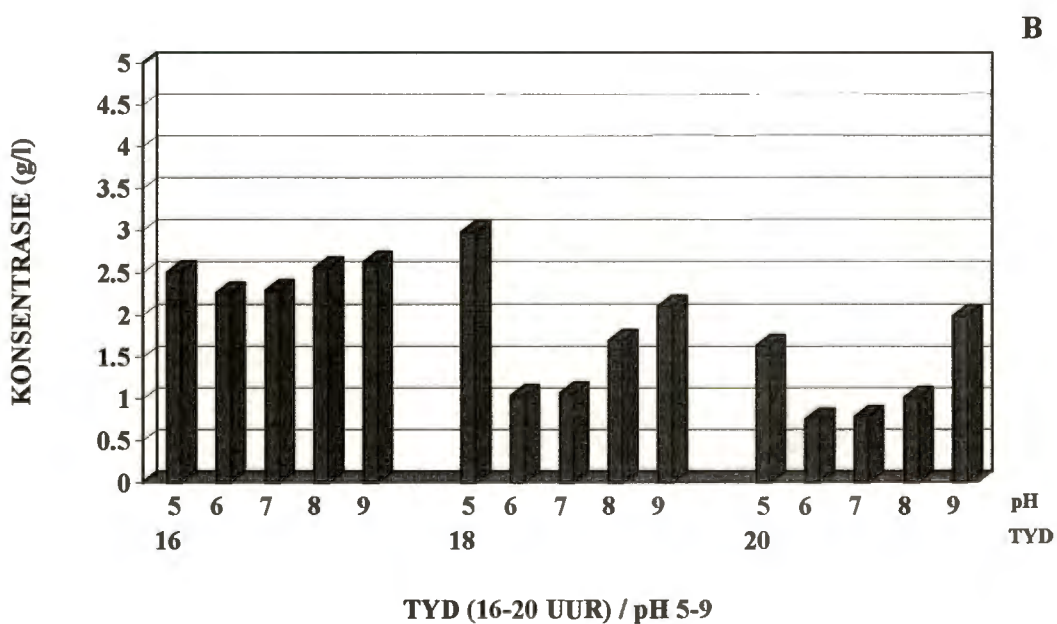
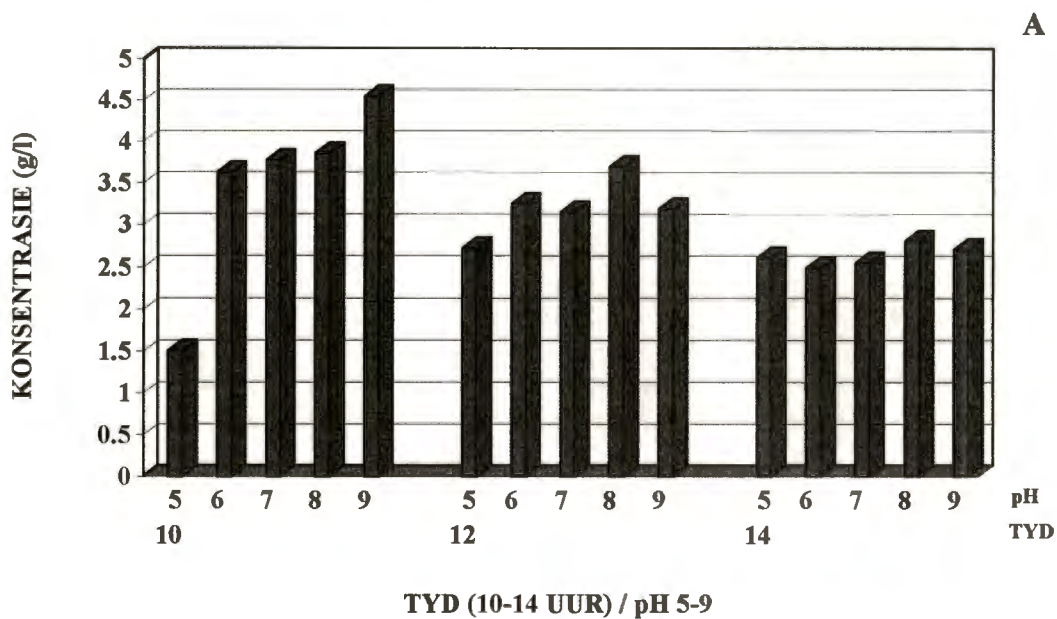
Figuur 4.4: Papierchromatogram met supernatante wat op tyd 20 ure onttrek is.
1 = L-malaat standaard, 2 = pH 5 (O9), 3 = pH 5 (O13), 4 = pH 5 (O17)...

4.3.2 Akkurate bepaling van die malaatkonsentrasies

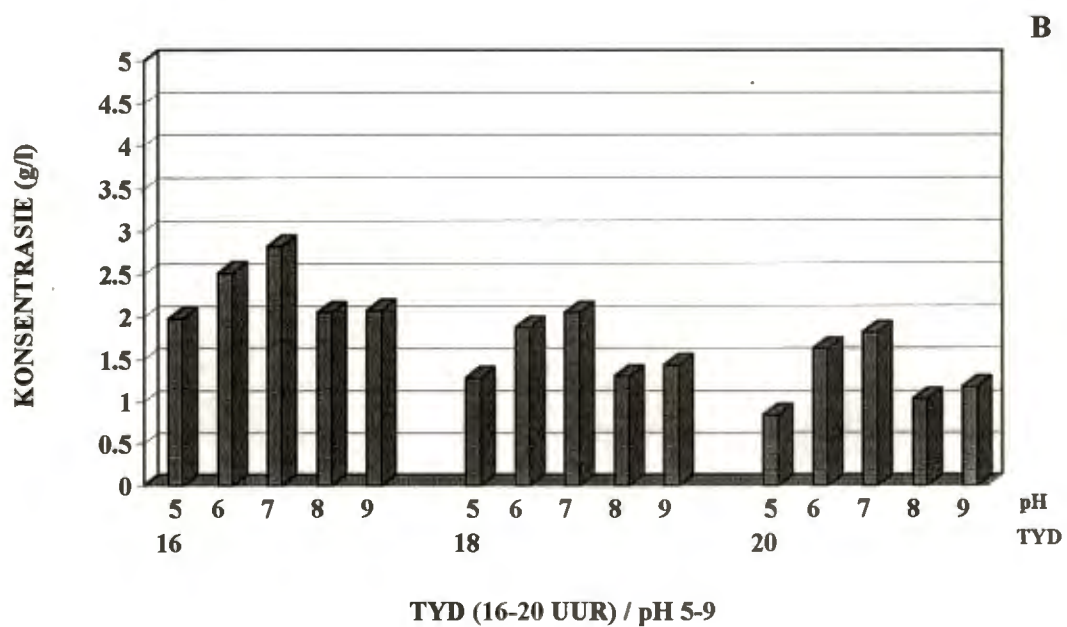
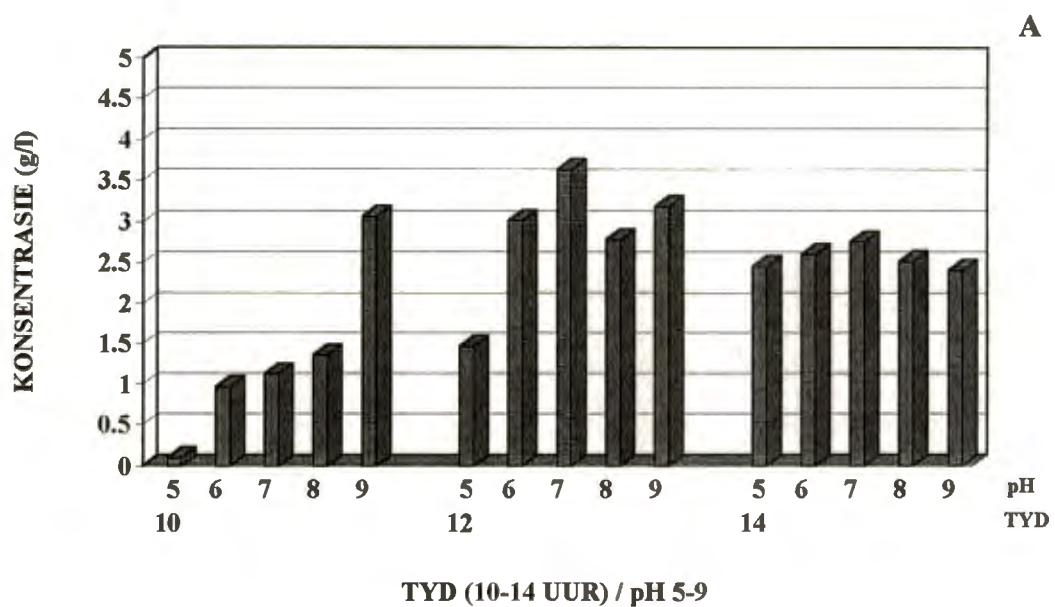
Organisme O13 is volgens die papierchromatogramme uitgewys as die beste malaatproduseerder van die drie bakterieë, want daar is telkens duideliker en groter geel kolle waargeneem by hierdie organisme wat dui op beter omsetting. Vir hierdie organisme is die hoeveelheid malaat wat onder die volgende kondisies geproduseer is, akkuraat bepaal (Afdeling 4.2.6):

25 °C	10 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	12 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	14 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	16 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	18 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	20 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
30 °C	10 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	12 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	14 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	16 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	18 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	20 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
35 °C	10 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	12 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	14 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	16 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	18 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9
	20 ure	pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 en pH 9

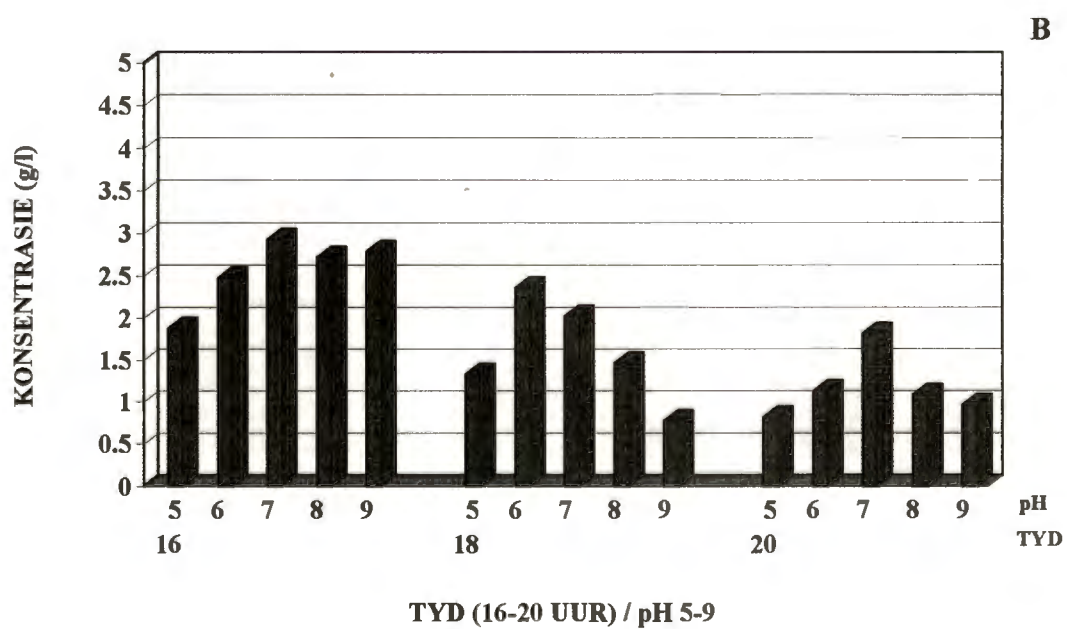
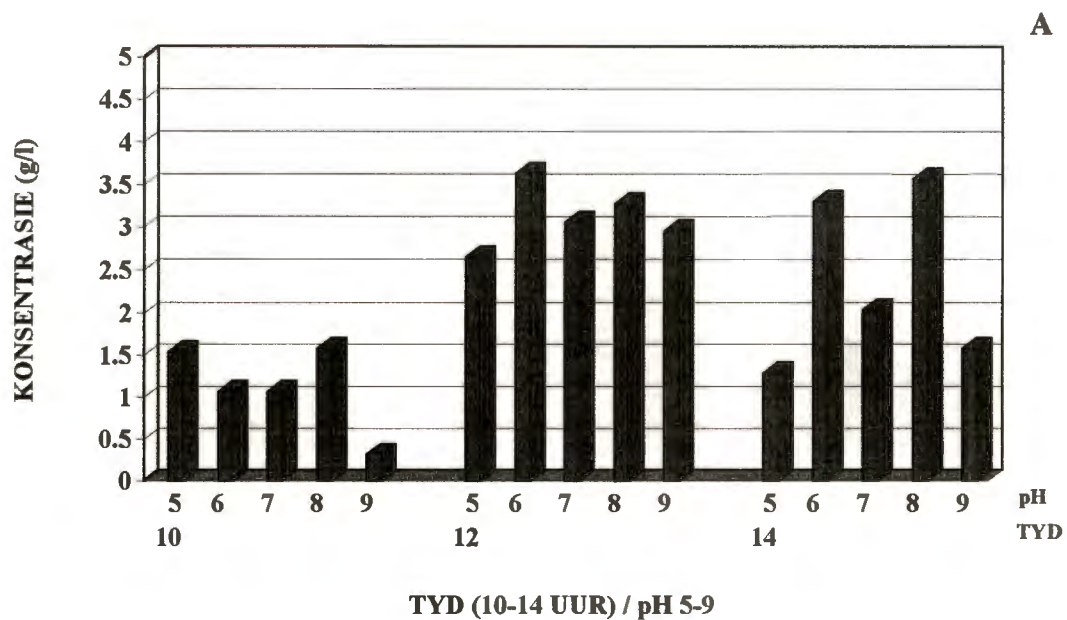
Die resultate van hierdie bepalings word in Figuur 4.5 tot 4.7 gegee.



Figuur 4.5: L-malaatproduksie by 25 °C. A = Onttrekkings op tyd 10, 12 en 14 uur. B = Onttrekkings op tyd 16, 18 en 20 uur. 'n pH grens van 5 tot 9 is by elke tyd getoets. Die fumaarsuurkonsentrasie was 5 g/l.



Figuur 4.6: L-malaatproduksie by 30 °C. A = Onttrekkings op tyd 10, 12 en 14 uur. B = Onttrekkings op tyd 16, 18 en 20 uur. 'n pH grens van 5 tot 9 is by elke tyd getoets.



Figuur 4.7: L-malaatproduksie by 35 °C. A = Onttrekkings op tyd 10, 12 en 14 uur. B = Onttrekkings op tyd 16, 18 en 20 uur. 'n pH grens van 5 tot 9 is by elke tyd getoets.

Wanneer hierdie resultate vergelyk word, kan daar duidelike verskille in malaatproduksie by die verskillende groeikondisies waargeneem word. In Figuur 4.5 (a) word die L-malaatproduksie (in g/l) vanaf 5 g/l fumaarsuur aangedui. 'n Toename in die L-malaat produksie kan waargeneem word soos wat die pH vanaf 5 tot 9 styg, wat ook die maksimum is waarby malaatproduksie getoets is. Dit is 'n aanduiding dat organisme O13 eerder 'n hoër pH verkies om die reaksie van fumaarsuur na L-malaat te laat plaasvind. Die 4,5 g/l L-malaat wat gevorm het by pH 9 op tyd 10 uur, is 'n 90 % omskakeling (!). Die feit bly egter staan dat die organisme wel oor die vermoë beskik om 'n hoë omskakeling van fumaarsuur na L-malaat te kan bewerkstellig.

Die mate van L-malaatproduksie by pH 5 tot 9 na 12 uur en 14 uur inkubasie by 25 °C, toon 'n verlaging in die L-malaatproduksie, wat daarop dui dat die reaksie sy piek na 10 uur bereik het (Figuur 4.5 a). Die malaatproduksie na die verskillende inkubasie tye, was by al die ander pH's (6 tot 9) laer, terwyl dit by pH 5 eerder toegeneem het. Die daling in L-malaat produksie kan ook duidelik waargeneem word in Figuur 4.5 (b), waar onttrekkings van die supernatante op tyd 16, 18 en 20 uur (pH 5 tot 9 by elk) plaasgevind het. 'n Drastiese verandering kan waargeneem word by tyd 18 en 20 uur, waar daar ongeveer 1 g/l L-malaat gevorm is vanuit die 5 g/l fumaarsuur. Dus sal die organisme nie vir so lank gekweek kan word nie, aangesien die malaat later as substraat gebruik mag word om te probeer oorleef. 'n Duidelike daling in malaatproduksie kan ook waargeneem word wanneer dieselfde pH's van elke tyd (byvoorbeeld pH 9 van tyd 10, 12, 14, 16, 18 en 20 uur) met mekaar vergelyk word.

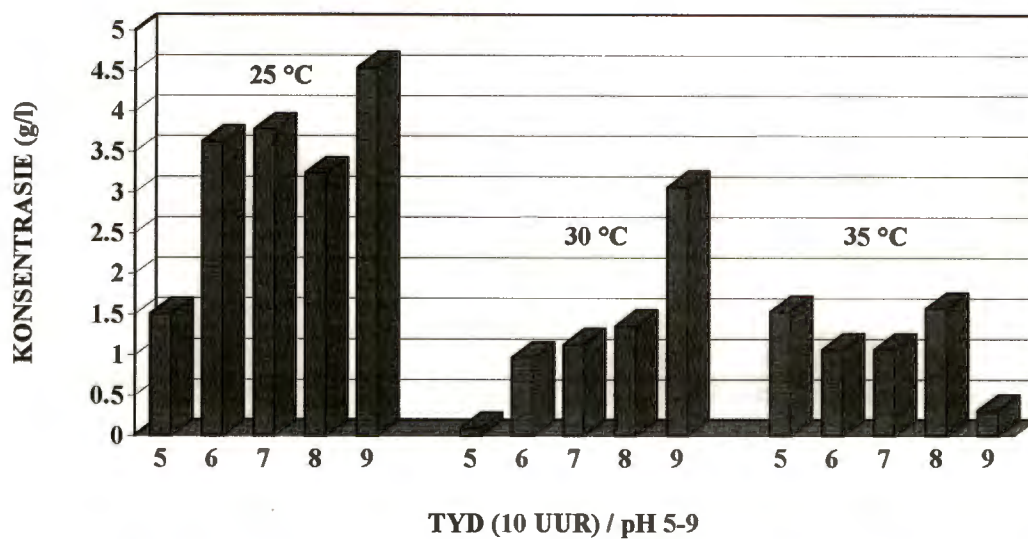
Wanneer Figuur 4.6 (a) met Figuur 4.5 (a) vergelyk word, is die L-malaatproduksie heelwat laer by 30 °C (met 'n maksimum van 3,6 g/l op tyd 12 uur, pH 7) as in die geval van 25 °C, wat 'n aanduiding is dat die optimum temperatuur eerder in die omgewing van 25 °C sal wees. Die tendens van die styging in malaatproduksie vanaf pH 5 tot 7 is weereens sigbaar. Figuur 4.6 (b) toon 'n skerp daling in malaatproduksie, wat die temperatuur (30 °C) en tyd (16 tot 20 uur) nie die geskikte kondisies vir optimum malaatproduksie maak nie. Die malaatproduksie by 35 °C toon 'n soortgelyke tendens as

by 30 °C, met sommige resultate wat in twyfel getrek kan word indien dit met die ander van dieselfde tyd vergelyk word (Figuur 4.7 a; tyd 14 uur, pH 8).

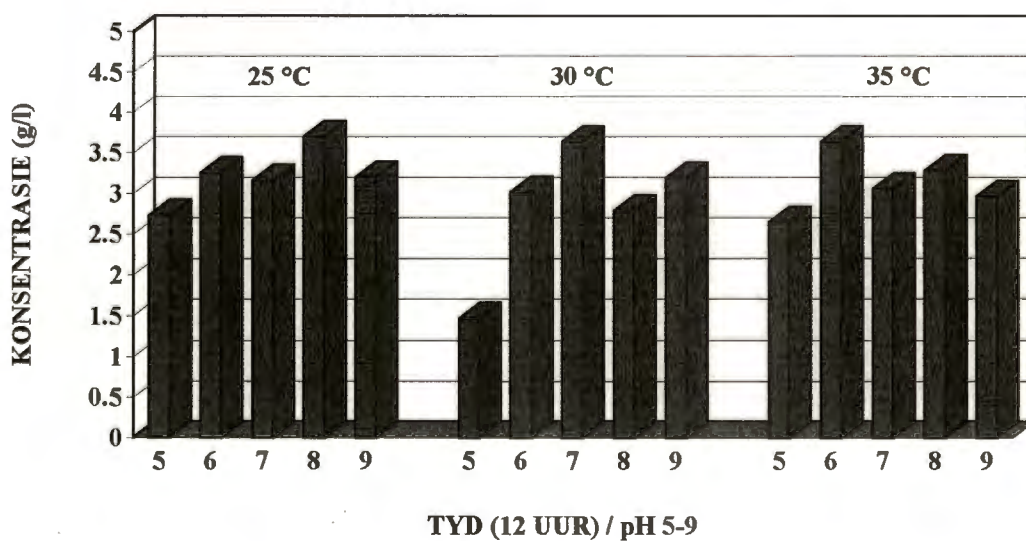
Volgens hierdie resultate kan 25 °C as die beste van die drie temperature beskou word, met die hoër pH's (7 tot 9) as die beste L-malaatproduserende kondisies. Die tyd van inkubasie moet nie langer as 10 uur wees nie, want op tyd 16 tot 20 uur is daar 'n duidelike afname in L-malaatproduksie. Wanneer Figuur 4.5 (a) tot Figuur 4.7 (b) met mekaar vergelyk word, kan die volgende kondisies as die beste L-malaatproduserende kondisies vir organisme O13 gekies word:

Temperatuur	25 °C
Inkubasie tyd	10 uur
pH	7 tot 9

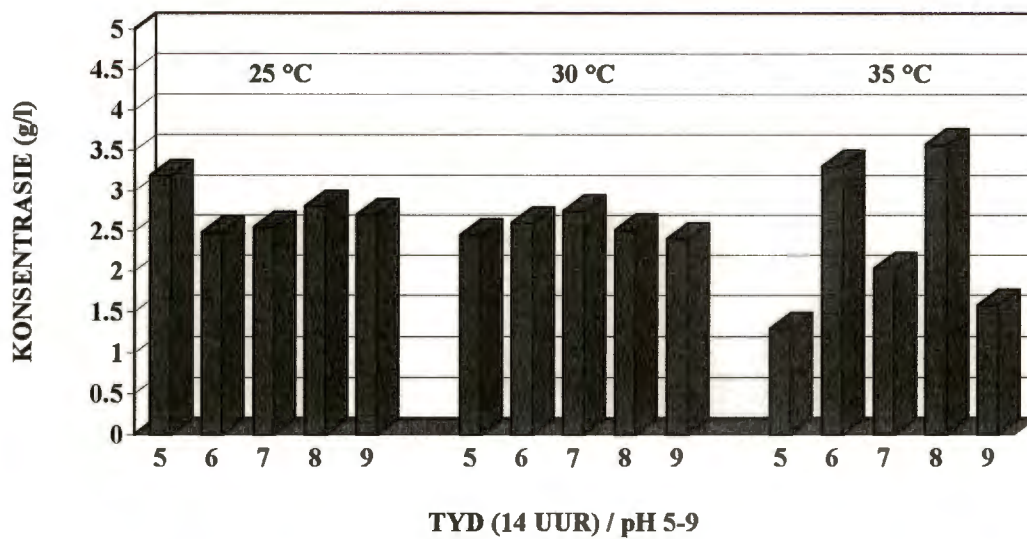
Wanneer dieselfde inkubasietye by die verskillende temperature met mekaar vergelyk word, is daar sekere verskille en ooreenkomste waargeneem (Figuur 4.8 tot 4.13). Op tyd 10 uur by 25 °C is die piek van die omsetting van fumaarsuur na L-malaat, want die konsentrasie malaat daal vanaf tyd 12 na 20 uur (Figuur 4.8). Die konsentrasies by 30 °C en 35 °C is laag en 'n styging vind plaas op tyd 12 uur, wat aandui dat die hoër temperature die reaksie (van fumaarsuur na L-malaat) stadiger laat plaasvind omdat dit nie die optimum temperature vir die organisme is nie. Op tyd 12 uur is al die konsentrasies min of meer in die omgewing van 3 tot 4 g/l vir al die temperature (Figuur 4.9). Die konsentrasie L-malaat bly redelik konstant tussen 2 en 3,5 g/l op tyd 14 uur (Figuur 4.10) en 16 uur (Figuur 4.11), wat laer is as die vorige twee temperature. Hierdie afname dui daarop dat die organisme nie so lank geïnkubeer moet word nie. 'n Duidelike daling in die malaatkonsentrasie is waarneembaar op tyd 18 en 20 uur, waar die malaat tussen 0,8 en 2 g/l is. Uit bogenoemde resultate kan afgelei word dat die organisme optimum L-malaat produseer by ekonomiese lae temperature (25 °C) en tye (10 uur).



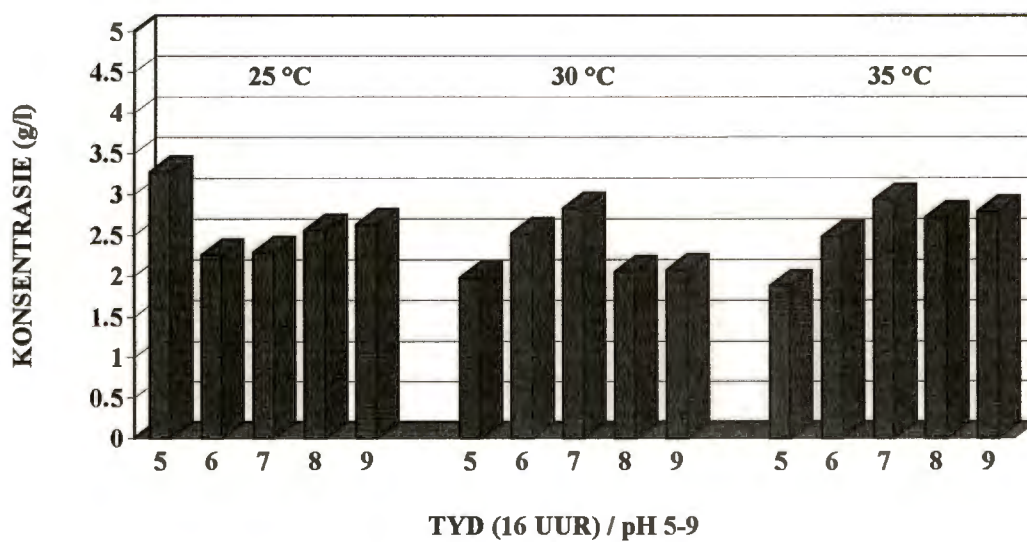
Figuur 4.8: L-malaatproduksie op tyd 10 uur by 25, 30 en 35 °C (pH 5-9 by elk).



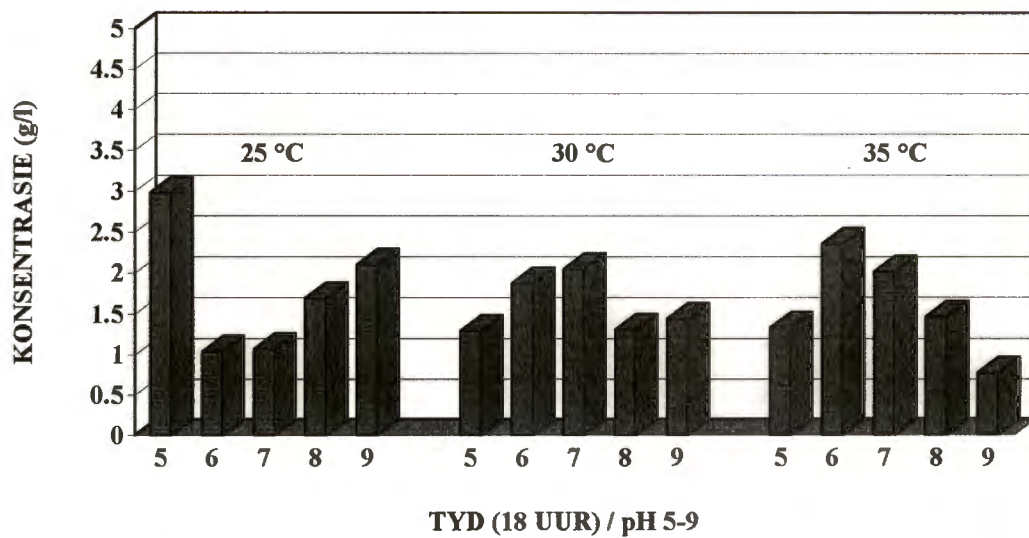
Figuur 4.9: L-malaatproduksie op tyd 12 uur by 25, 30 en 35 °C (pH 5-9 by elk).



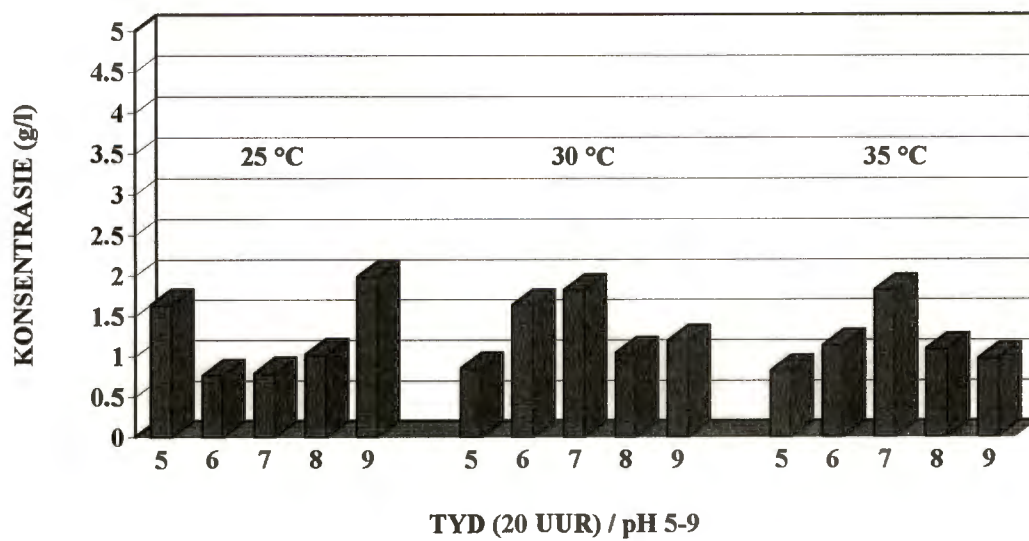
Figuur 4.10: L-malaatproduksie op tyd 14 uur by 25, 30 en 35 °C (pH 5-9 by elk).



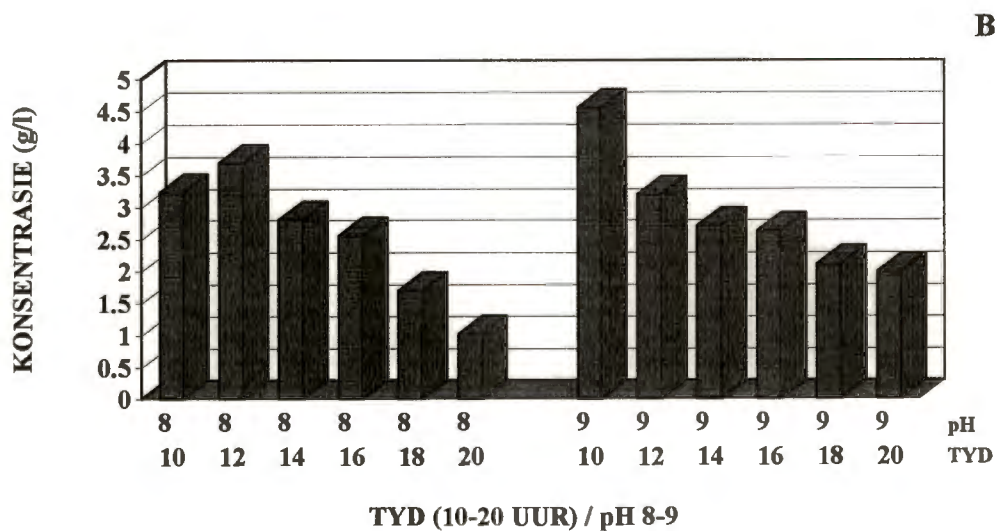
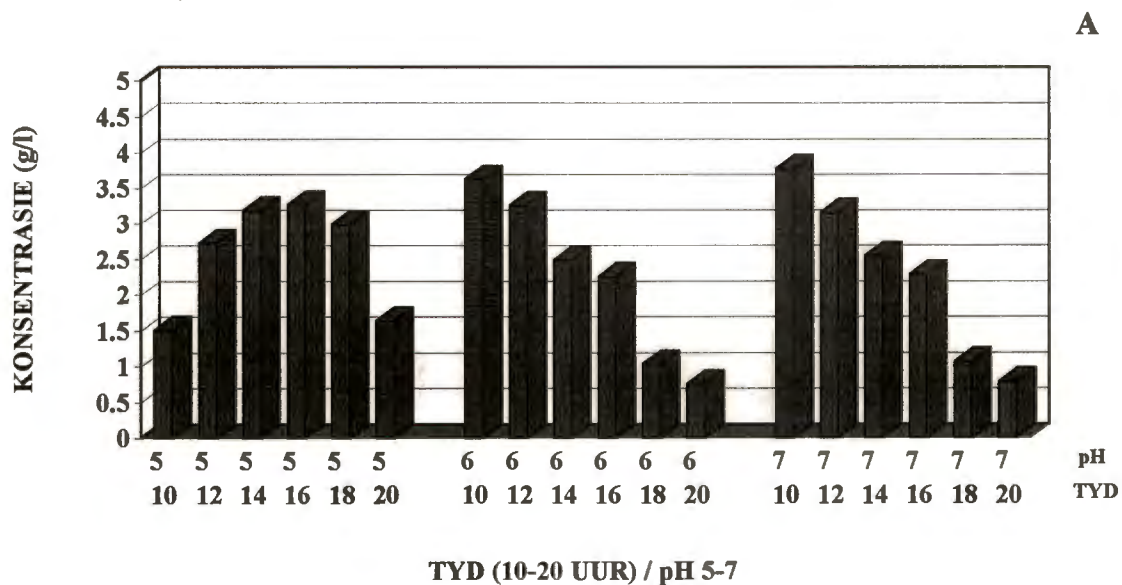
Figuur 4.11: L-malaatproduksie op tyd 16 uur by 25, 30 en 35 °C (pH 5-9 by elk).



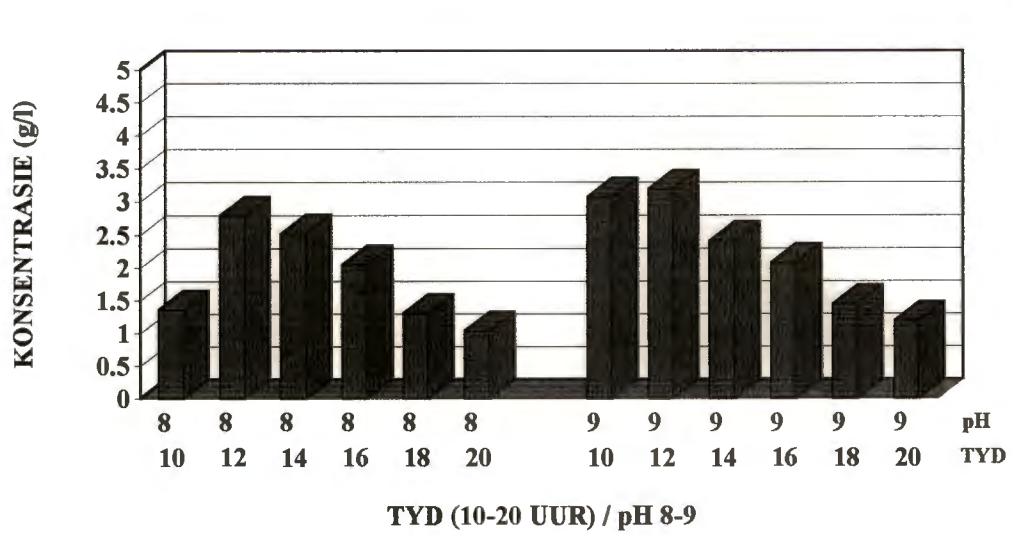
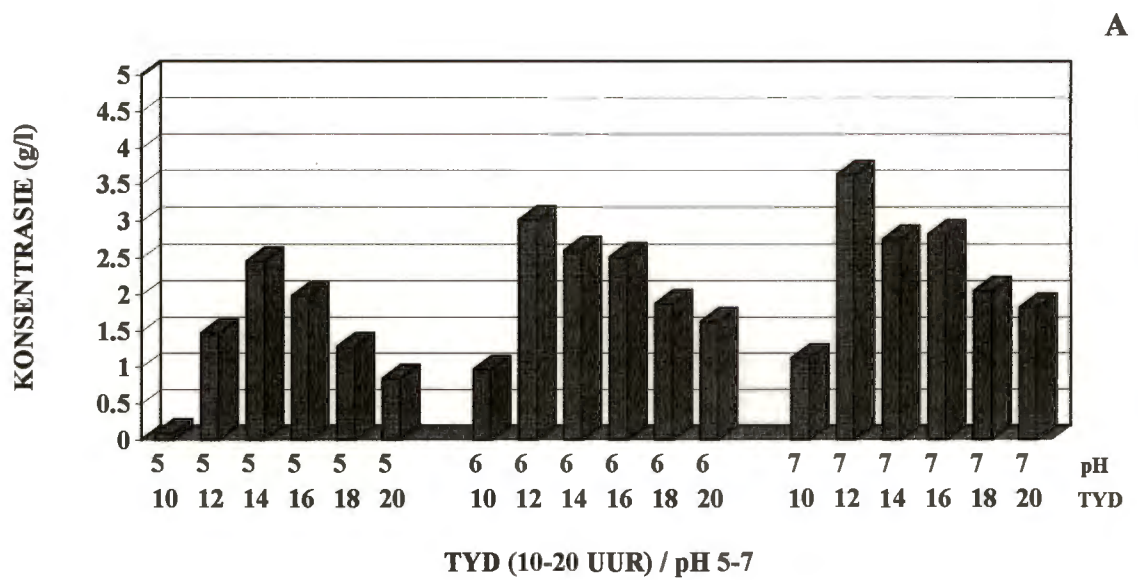
Figuur 4.12: L-malaatproduksie op tyd 18 uur by 25, 30 en 35 °C (pH 5-9 by elk).



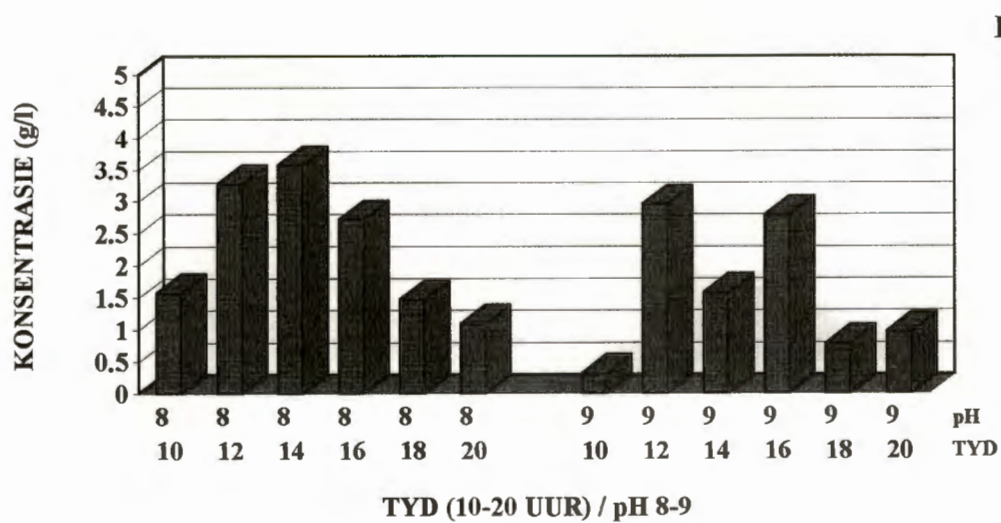
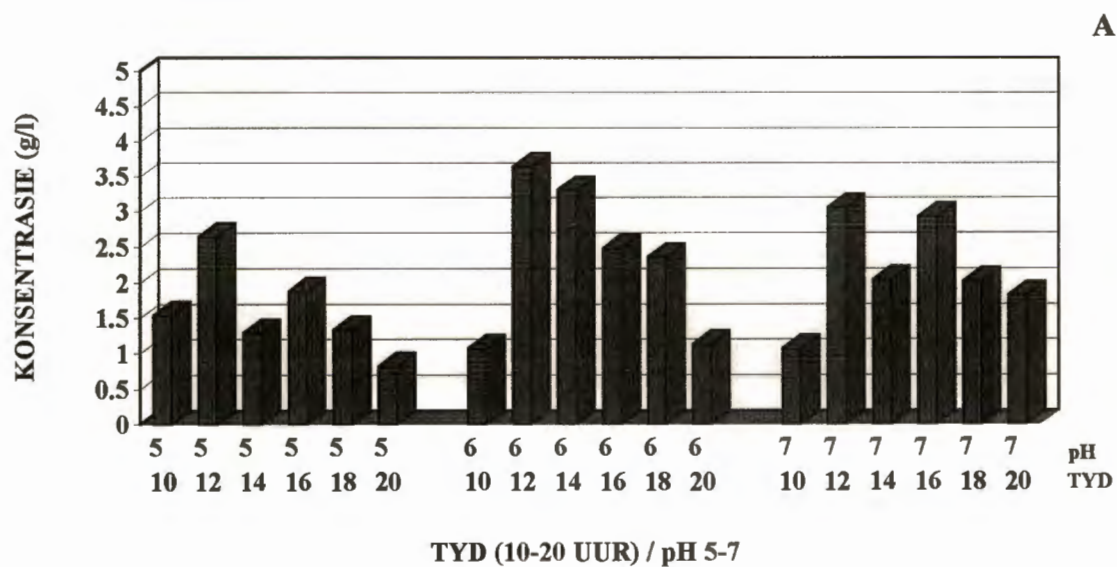
Figuur 4.13: L-malaatproduksie op tyd 20 uur by 25, 30 en 35 °C (pH 5-9 by elk).



Figuur 4.14: L-malaatproduksie van dieselfde pH op tyd 10 tot 20 uur. Al die resultate is by temperatuur 25 °C. A = pH 5, 6 en 7. B = pH 8 en 9.



Figuur 4.15: L-malaatproduksie van dieselfde pH op tyd 10 tot 20 uur. Al die resultate is by temperatuur 30 °C. A = pH 5, 6 en 7. B = pH 8 en 9.

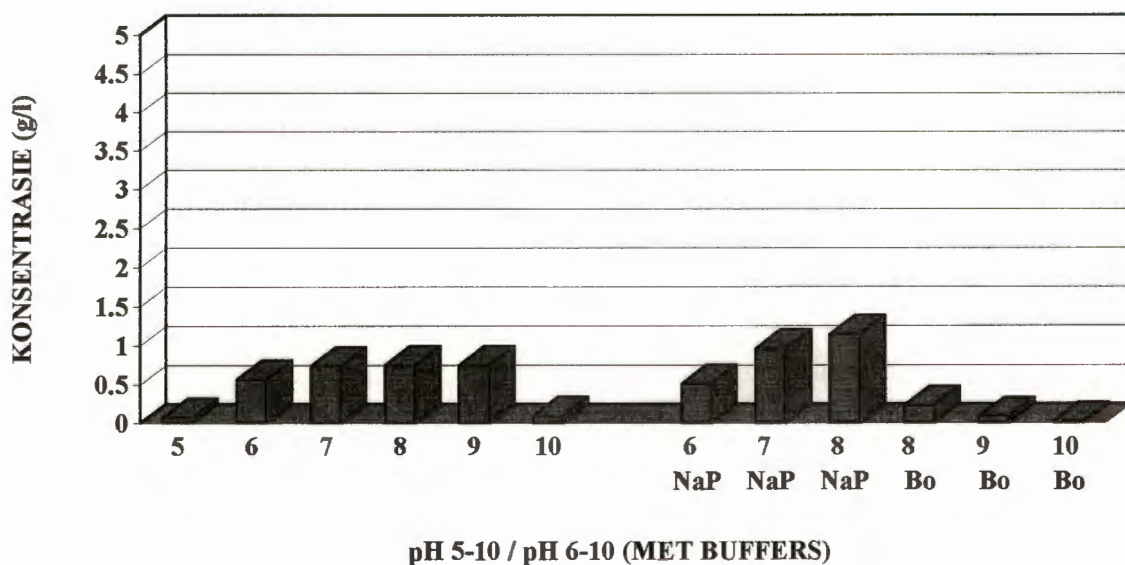


Figuur 4.16: L-malaatproduksie van dieselfde pH op tyd 10 tot 20 uur. Al die resultate is by temperatuur 35 °C. A = pH 5, 6 en 7. B = pH 8 en 9.

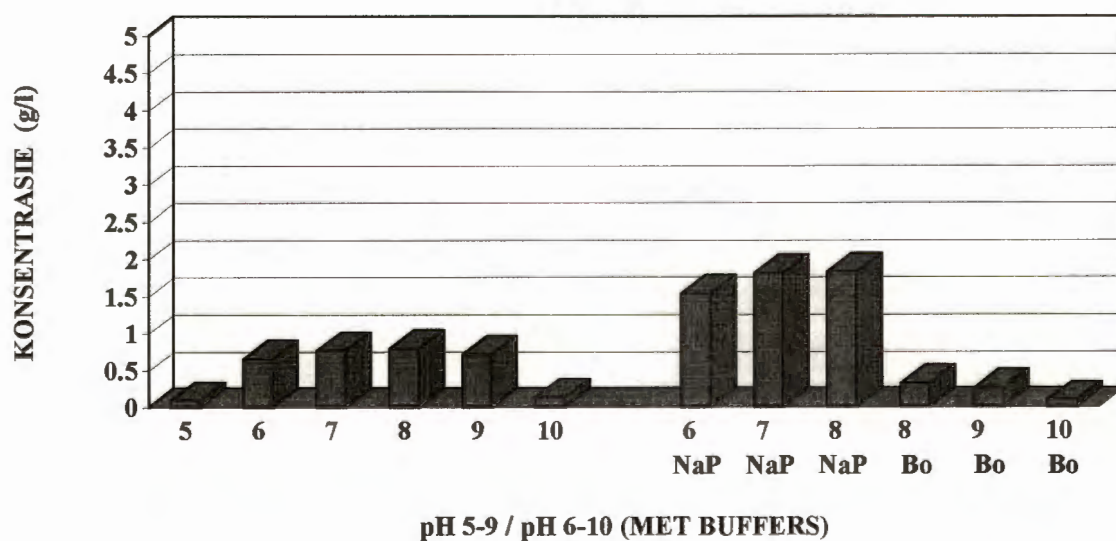
In Figuur 4.14 (a) en (b) kan duidelik gesien word dat die L-malaatkonsentrasie op tyd 10 uur by pH 6, 7, 8 en 9 hoog is en geleidelik afneem namate die tyd vanaf 12 na 20 uur toeneem. Verder neem die L-malaatkonsentrasie geleidelik toe soos wat die pH vanaf 5 tot 9 styg by tyd 10, 12, 14, 16, 18 en 20 uur. Dieselfde resultate kom by temperatuur 30 °C (Figuur 4.15 a en b) en 35 °C voor (Figuur 4.16 a en b), behalwe dat die L-malaatkonsentrasies laer is as in die geval van 25 °C.

Die mate van L-malaatproduksie in die teenwoordigheid van gebufferde groeimedium is vervolgens bepaal en die resultate word in Figuur 4.17 en Figuur 4.18 gegee. Die eksperiment is by 25 °C uitgevoer. In Figuur 4.17 is die onttrekking op tyd 9 en 10 uur gedoen, omdat daar nie met sekerheid gesê kon word of die optimum L-malaatproduksie by 9, 10 of 11 uur (by 25 °C) sou wees nie (kyk Figuur 4.8 waar die beste malaatproduksie voorgekom het). Daar sal ook opgemerk word dat 'n pH 10 bygevoeg is wat nie met die papierchromatogramme uitgevoer is nie. Die rede hiervoor is om te sien of die organisme die styging in malaatproduksie vanaf pH 7 tot 9 op tyd 10 uur (Figuur 4.8) sal handhaaf.

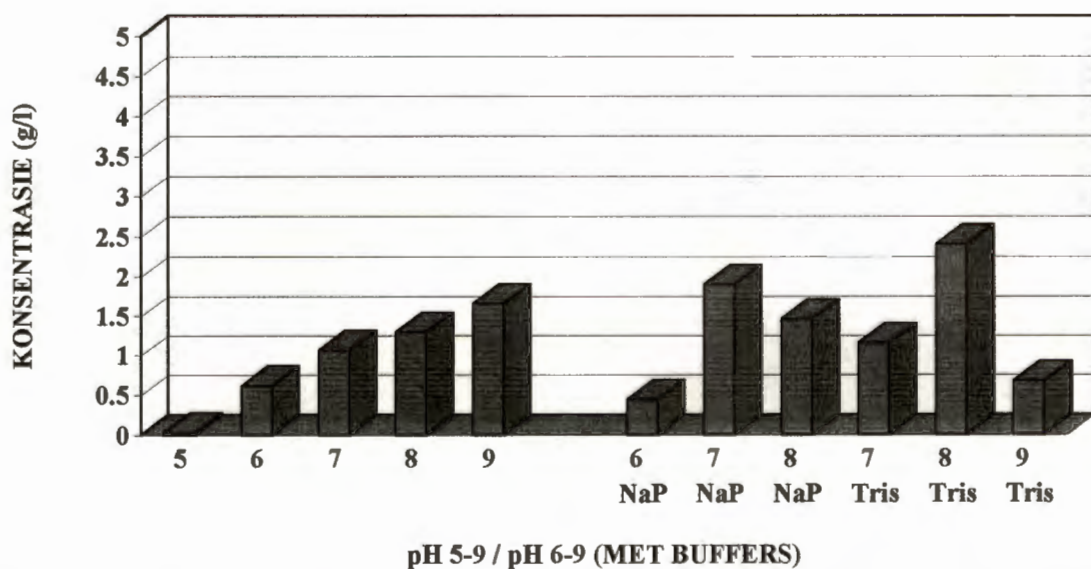
Die boraatbuffer inhibeer die vorming van L-malaat en 'n ander buffer sal dus gekies moet word om by pH 7 tot 9 te gebruik (Figuur 4.18). Die buffers is so gekies dat ten minste een van die onderskeie pH-reekse oorvleuel (pH 8). Die ander buffer wat vir die doel gebruik kan word, is Tris-HCl. In Figuur 4.19 (tyd 9 uur) en Figuur 4.20 (tyd 10 uur) kan die invloed van die natriumfosfaatbuffer en Tris-HCl buffer duidelik waargeneem word. Dit wys weereens dat die toevoeging van 'n buffer die L-malaatproduksie verhoog en die pH stabiliseer, al word daar heelwat sure deur die organisme geproduseer. Die buffers oorvleuel by pH 7 en 8 sodat die resultate met mekaar vergelyk kan word. Die relatiewe lae omsettings wat in Figuur 4.17 tot Figuur 4.20 verkry is (wanneer dit met Figuur 4.5 a vergelyk word), word in Hoofstuk 5 bespreek. Alhoewel van die buffers malaatproduksie inhibeer, kan 'n bepaalde tendens tog waargeneem word.



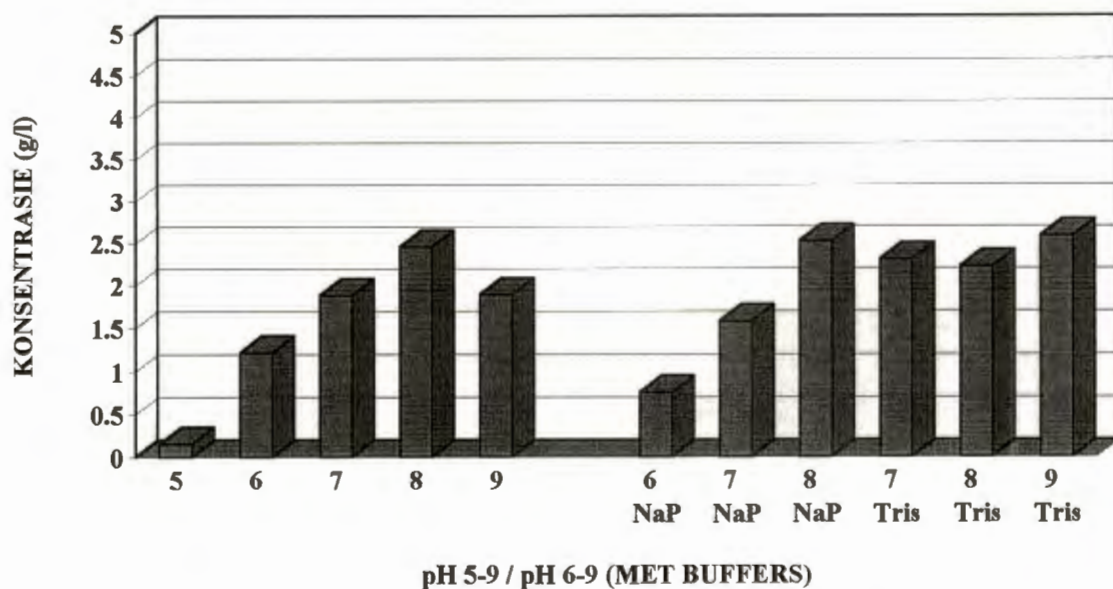
Figuur 4.17: L-malaatproduksie by die gekose temperatuur van 25 °C en tyd van 9 uur. Die pH is van 5-10 gewissel om te kyk of die styging vanaf 5 na 9 nie sal voortduur tot by pH 10 nie. NaP = natriumfosfaatbuffer; Bo = boraatbuffer



Figuur 4.18: L-malaatproduksie by die gekose temperatuur van 25 °C en tyd van 10 uur. Die pH is van 5-10 gewissel om te kyk of die styging vanaf 5 na 9 nie sal voortduur tot by pH 10 nie. NaP = natriumfosfaatbuffer; Bo = boraatbuffer

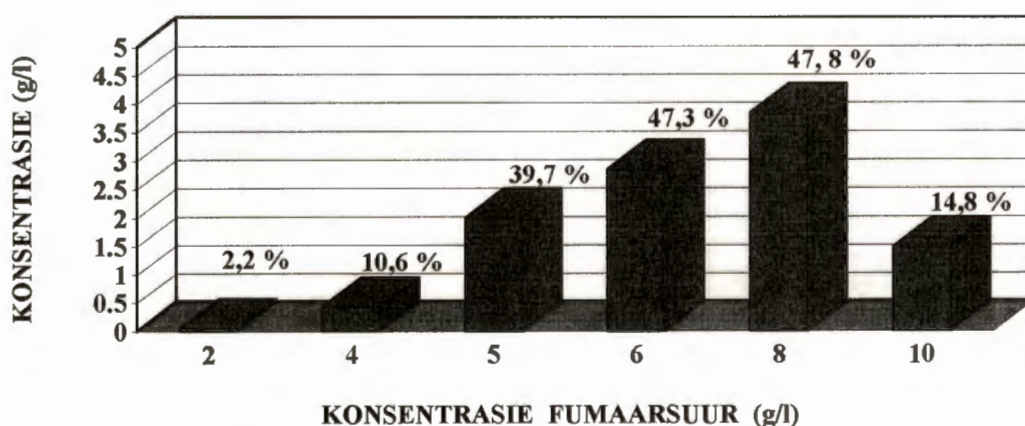


Figuur 4.19: L-malaatproduksie by die gekose temperatuur van 25 °C en tyd van 9 uur. Daar is nou van Tris-HCl gebruik gemaak eerder as die boraatbuffer. NaP = natriumfosfaatbuffer; Tris = Tris-HCl buffer.



Figuur 4.20: L-malaatproduksie by die gekose temperatuur van 25 °C en die tyd van 10 uur. NaP = natriumfosfaatbuffer; Tris = Tris-HCl buffer

Nadat die optimale temperatuur (25 °C), tyd (10 uur) en pH (9) vir L-malaatproduksie bepaal is, was dit nodig om die optimale substraatkonsentrasie te bepaal waar die organisme die meeste malaat sal vorm sonder enige substraatinhibisie. Volgens Figuur 4.21 is slegs 2,2 % L-malaat vanaf 2 g/l fumaarsuur gevorm, 10,6 % L-malaat vanaf 4 g/l fumaarsuur en 39,7 % L-malaat vanaf 5 g/l fumaarsuur. Die optimum L-malaatproduksie is by die fumaarsuurkonsentrasie van 8 g/l waar 47,8 % fumaarsuur omgeskakel is na L-malaat. Die relatiewe lae omsettings wat in hierdie eksperiment verkry is, word in Hoofstuk 5 bespreek.



Figuur 4.21: L-malaatproduksie vanaf verskillende substraatkonsentrasies. Fumaarsuur-konsentrasies = 2, 4, 5, 6, 8 en 10 g/l.

4.4 Samevatting

In Hoofstuk 3 is die organismes met die vermoë om fumaarsuur na L-malaat om te skakel, geïsoleer en geïdentifiseer. In hierdie hoofstuk is die optimum kondisies vir die drie beste malaatproduseerders bepaal en sluit temperatuur, pH, tyd en substraatkonsentrasie in. Verder is waargeneem dat organisme O13 'n temperatuur van 25 °C verkies, nie goed groei by pH 5 en 10 nie en dat die teenwoordigheid van 'n buffer (pH 6, 7 en 8 met Na-P) die L-malaatproduksie heelwat verhoog het.

HOOFSTUK 5

ALGEMENE BESPREKING

Die *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* het gedurende 1992 'n beleid aanvaar wat farmaseutiese maatskappye die keuse gegee het tussen die vervaardiging van enkel enantiomere of die rasemaatmengsel van geneesmiddels vir menslike gebruik. Die oorgrote meerderheid maatskappye het die opsie van enkel enantiomere gekies eerder as die rasemaatverbinding as gevolg van die komplekse effek van rasemaatverbinding op biologiese sisteme en die tot nog toe onbekende reaksies waarby hulle in hierdie sisteme betrokke mag wees, dit wil sê die presiese effek van die nie-aktiewe isomeer is in baie gevalle onbekend. Die vervaardiging van rasemaatmengsels word nie verbied nie, maar volgens die *FDA* word produksie van enkel enantiomere bo die rasemaatmengsel verkies (Faber *et al.*, 1993). Die gevolg hiervan was dat metodes ontwikkel is waarmee spesifieke isomere van geneesmiddels berei kon word. Hiervoor is spesifieke ensieme uitermate geskik. Die verskynsel het ook oorgespoel na ander verbindinge vir menslike gebruik, soos byvoorbeeld die produksie van die organiese suur L-malaat vanaf fumaarsuur. Dit is 'n omsetting waar die ensiem fumarase baie spesifiek is ten opsigte van die produk wat gevorm word, naamlik die L-isomeer van malaat (Voet *et al.*, 1990). Die belangrikheid van die stereospesifisiteit van malaat, sowel as die kommersiële en farmaseutiese rol daarvan in biokatalitiese omsettings en in die selmetabolisme, het in die literatuuroorsig (Hoofstuk 2) aan die orde gekom.

Die direkte omskakelingsreaksie vanaf fumaarsuur na L-malaat is ondersoek omdat geen ko-faktore nodig is nie (Mathews *et al.*, 1990), hopelik minder byprodukte geproduseer sal word en omdat fumaarsuur as substraat nie so duur is soos die ander sure in die sitroensuursiklus nie (Hoofstuk 3). Die beste malaatproduserende bakterieë is vanuit verskillende bronne, wat water, grond, rioolwater en komposhope insluit, geïsoleer. Daar is van 'n verskeidenheid bronne gebruik gemaak sodat die moontlikheid om 'n goeie malaatproduseerder te kry, vergroot kon word. Soos wat verwag is, is 'n groot hoeveelheid mikro-organismes vanaf die spreiplaat verkry (Afdeling 3.3.1) en die metode

waar broomkresolpers as indikator gebruik is vir die seleksie van vinnige suurproduseerders, het goeie resultate as 'n seleksiestap gelewer en die aanvanklike groot aantal organismes kon so drasties verminder word van oor die tweehonderd organismes tot slegs 48 organismes (Afdeling 3.3.1). Hierdie metode kan daarom in die toekoms gebruik word as 'n vinnige en maklike seleksiemetode om vinnige en stadige suurproduseerders te onderskei. 'n Volgende seleksiestap is toegepas deurdat die organismes op fumaarsuuragarplate (waar fumaarsuur die enigste koolstofbron is) uitgestryk is en die vinnige suurproduserende organismes verder gesif kon word sodat slegs organismes met 'n hoë fumarase aktiwiteit verkry kon word (van 48 organismes tot slegs drie bakterieë; Afdeling 3.2.2.3). Laasgenoemde metode is eenvoudig maar baie effektief en kan ook vir soortgelyke studies (waar daar van slegs een koolstofbron gebruik gemaak word) in die toekoms aangewend word, veral wanneer organismes met sekere eienskappe geselekteer moet word.

Die drie geselekteerde bakterieë is met behulp van 'n verskeidenheid identifikasie toetse geïdentifiseer (Tabel 3.1), wat later deur die Departement Mikrobiologie en Plantpatologie van die Universiteit van Pretoria bevestig is (BIOLOG-sisteem). Organisme O9 is geïdentifiseer as *Bacillus brevis*, organisme O13 as *Bacillus firmus* en organisme O17 as *Acinetobacter calcoaceticus*. Alhoewel die drie bakterieë uit rioolwater geïsoleer is, kom *Bacillus* hoofsaaklik in die grond voor, terwyl *Acinetobacter* in water sowel as grond voorkom.

Die vermoë van bogenoemde drie bakterieë om malaat te produseer, is ondersoek deurdat elkeen se groeimedium (die selle is verwyder deur sentrifugering) aan 'n organiese oplosmiddelekstraksie onderwerp is (Afdeling 3.2.4.1) en daarna met behulp van 'n gaschromatograaf geanaliseer is. Wanneer die GC-profiel van die drie organismes met mekaar vergelyk word, is *Bacillus firmus* (O13) die beste malaatproduseerder omdat die meeste van die substraat (fumaarsuur) na malaat omgeskakel is en daar baie min byprodukte gevorm het (Figuur 3.7). Die ander twee organismes (*Bacillus brevis* en *Acinetobacter calcoaceticus*) het aansienlik meer suksiensuur en laktaat (en ander verbindings) gevorm, moontlik vanaf die substraat fumaarsuur, wat die organismes

ondoeltreffend maak vir verdere studie (Figuur 3.6 en Figuur 3.8 onderskeidelik). Aangesien daar heelwat byprodukte soos suksiensuur en laktaat gevorm het, moet aandag daaraan gegee word om die vorming daarvan tot 'n minimum te beperk of, indien moontlik, te voorkom. Een van die metodes wat gevolg kan word, is om sekere detergense soos galekstrak, galsoute of deoksicholiensuur in die medium in te sluit en sodoende die ensieme wat lei tot die vorming van laktaat en suksiensuur, te onderdruk. Op dié manier kan al die fumaarsuur (wat die enigste koolstofbron is) gebruik word vir die vorming van L-malaat (Yamamoto *et al.*, 1976). Die organisme kan gekweek word en deur gereelde monitering kan aangetoon word wanneer die byprodukte suksiensuur en laktaat gevorm word. Die reaksie kan dus net voor byprodukvorming gestop word. Gedurende die eerste paar uur van inkubasie (dit wil sê gedurende die positiewe versnellingsfase), is die hoofdoel om biomassa te vorm. Na hierdie fase begin die aktiwiteit van ander ensieme verhoog en word byprodukte gewoonlik gevorm. Baie van die ensieme wat kommersieel vanaf mikrobiële kulture verkrygbaar is (soos byvoorbeeld hidrolases), is ekstrasellulêre ensieme; dit is ensieme wat deur die selmembraan in die medium uitgeskei word (Palmer, 1993). 'n Toename in die ekstrasellulêre ensieme kan verkry word deur surfaktante by die medium in te sluit, wat kan lei tot verhoogde L-malaat produksie en ook tot die onderdrukking van die byprodukte wat deur *Bacillus firmus* gevorm word (Yamamoto *et al.*, 1976).

Uit bogenoemde gaschromatografiese analyses is dit duidelik dat al drie bakterieë malaat produseer, maar dit is belangrik om te weet watter isomeer geproduseer word. Dit was dus nodig om 'n metode te ontwikkel om die verskillende isomere van mekaar te onderskei (Van Rooyen *et al.*, 1994). Die malaat isomere is suksesvol geïdentifiseer met behulp van die enantiomeer-spesifieke R-(–)-2-butanol (Afdeling 3.2.4.2). Die suksesvolle skeiding van die standaard DL-malaat met behulp van die gaschromatograaf het bewys dat die metode suksesvol was en dat die malaat isomeer wat deur organisme O9, O13 en O17 gevorm is, geïdentifiseer kon word. Die resultate van hierdie analyses (Figuur 3.12 tot 3.15) toon dat *Bacillus brevis*, *Bacillus firmus* en *Acinetobacter calcoaceticus* almal slegs die L-isomeer van malaat produseer. Daar moet weereens

beklemtoon word dat die hoofdoel van hierdie eksperimente was om die isomeer wat gevorm is, te identifiseer en dat dit op hierdie stadium nie gegaan het om die L-malaatkonsentrasies te bepaal nie.

Nadat die organismes wat L-malaat kan produseer geïsoleer en geïdentifiseer is, was dit nodig om die optimum kondisies (temperatuur, pH, tyd en substraatkonsentrasie) vir L-malaatproduksie vir elkeen van die drie bakterieë te bepaal. Verskeie metodes is aangewend om die groot aantal monsters wat gegenereer is, te analiseer. Die dunlaagchromatografiese metodes (Afdeling 4.2.4) wat gebruik is om die malaat- en fumaarsuorkonsentrasies kwalitatief te bepaal, het onaanvaarbare resultate gegee deurdat die resolusie en skeiding baie swak was, ongeag van die loopmiddel of die tipe dunlaagchromatografiemateriaal wat gebruik is (die resultate word nie gegee nie). Die papierchromatografiese metode wat gebruik is (Snyman, 1978; Afdeling 4.2.5), het besonder goeie resultate gelever wanneer dit vergelyk word met die resultate van die L-malaat-spesifieke pakket (Afdeling 4.3.2) waarmee die L-malaatkonsentrasies akkuraat bepaal is. Dit is ook 'n relatief goedkoop (omdat die loopmiddel uit *n*-butanol, water, miersuur en broomkresolgroen bestaan) en vinnige metode (288 monsters is in drie dae geanaliseer) om die konsentrasies van organiese sure soos malaat en fumaarsuur kwalitatief te kan bepaal deur slegs na die grootte en intensiteit van die kolle op die papierchromatogram te kyk (Figuur 4.1 tot Figuur 4.4). Hierdie metode kan vir roetine analyses gebruik word en deur 'n paar veranderinge in die metode aan te bring, kan daar moontlik vir ander sure ook getoets word. Wanneer die intensiteit van die kolle wat gevorm word met dié van die standaarde, met bekende konsentrasies, vergelyk word, kan hierdie metode ook semi-kwantitatief aangewend word. Na aanleiding van bogenoemde resultate is daar besluit om verdere eksperimente slegs met *Bacillus firmus* (organisme O13) uit te voer, aangesien hierdie bakterie by 25 °C, tyd 10 uur, pH 7 tot 9, die beste L-malaatproduseerder van die drie is. Dié kondisies is ekonomies en mededingend, veral ten opsigte van temperatuur, wanneer dit vergelyk word met die produksie van L-malaat vanaf fumaarsuur deur die gis *Saccharomyces cerevisiae*, waar die pH 7.5 en die temperatuur 37 °C is (Figueiredo *et al.*, 1991) en deur *Brevibacterium ammoniagenes*, waar die pH 7, die temperatuur 30 °C en die tyd van inkubasie 24 uur is. Alhoewel

B. firmus aanvanklik by 37 °C geïsoleer is (Afdeling 3.2.2.3), is die optimum temperatuur 25 °C, wat aandui dat die seleksie van die organismes in die toekoms by verskillende temperature gedoen moet word.

Die effek van gebufferde groeimedium op die L-malaatproduksie deur *Bacillus firmus* (by bogenoemde optimum kondisies) is ondersoek om te bepaal of daar nie 'n verdere verhoging in malaatproduksie verkry kon word nie (Figuur 4.18). Aanvanklik is daar nie 'n buffer in die groeimedium ingesluit nie ten einde die groeimedium se koste so laag as moontlik te hou, maar sonder om die effektiwiteit (mate van malaatproduksie) te verlaag. Deur die toevoeging van 'n buffer is 'n duidelike toename in malaatproduksie waargeneem (Figuur 4.18). Alhoewel geen ekonomiese evaluering van malaatproduksie gedoen is nie, is dit duidelik dat 'n kompromis aangegaan moet word tussen die bereidingskoste en die opbrengs, sodat die beste opbrengs verkry kon word maar teen die laagste moontlike koste. Sonder die buffer in die groeimedium is die pH van die kultuur na 10 uur van inkubasie aansienlik laer as die pH van die gebufferde kulture (natriumfosfaat- en tris-HCl-buffer; 50 mM). Die styging in malaatproduksie vanaf 0,65 en 0,79 g/l tot 1,5 en 1,82 g/l onderskeidelik (Figuur 4.18), dui daarop dat daar in die opskaling van die projek wel van 'n buffer in die groeimedium gebruik gemaak moet word.

Bacillus firmus (organisme O13) se vermoë om L-malaat vanaf fumaarsuur te produseer het gedurende die verloop van die studie afgeneem soos waargeneem kan word in die bogenoemde eksperimente met die byvoeging van die buffers. Hierdie verskynsel word duidelik waargeneem wanneer Figuur 4.5 (a), waar tussen 3,5 en 4,5 g/l L-malaat vanaf 5 g/l fumaarsuur (25 °C en pH 7-9) gevorm het, met die 0,5 tot 1 g/l L-malaat in Figuur 4.17 (25 °C en pH 7-9) met mekaar vergelyk word. Die rede wat aangevoer kan word vir die verlaging in produksie, is dat daar elke keer wanneer die organisme oorgeplant word, om een of ander rede van die vermoë om die reaksie van fumaarsuur na malaat te kataliseer, verlore gegaan het. 'n Moontlike oplossing is dat daar elke keer vanaf die moederkultuur 'n inokulum berei moet word, wat hierdie afname in malaatproduksie kan uitskakel.

Nadat die optimum kondisies (temperatuur, pH en tyd) vir *Bacillus firmus* bepaal is, was dit nodig om die optimum substraatkonsentrasie te bepaal. Die resultate in Figuur 4.21 gee nie 'n duidelike aanduiding van watter substraatkonsentrasie die beste vir *Bacillus firmus* is nie, aangesien 'n 47,3 % omskakeling by 6 g/l (wat 2,84 g/l is) dieselfde verhouding is as 47,8 % omskakeling van 8 g/l (wat 3,83 g/l is). Al wat dit aantoon is dat die organisme 'n hoë substraatkonsentrasie van tussen 6 en 8 g/l fumaarsuur na L-malaat kan omskakel sonder dat substraatinhibisie voorkom. Die persentasie daling by 10 g/l dui daarop dat die konsentrasie te hoog is om in die 10 uur om te skakel en konsentrasies laer as die 10 g/l gebruik moet word. Wanneer bogenoemde resultate vergelyk word met ander organismes se vermoë om fumaarsuur te gebruik (Schindler, 1988), soos byvoorbeeld die fungi *Aspergillus wentii* (107 g/l L-malaat vanaf 125 g/l fumaarsuur), *Penicillium nalgiovensis* (105 g/l L-malaat vanaf 125 g/l fumaarsuur) of die gepatenteerde organisme wat deur Schindler beskryf word (210 g/l L-malaat vanaf 210 g/l fumaarsuur), moet daar ook na ander organismes behalwe *Bacillus firmus* gesoek word om L-malaat te produseer. Dieselfde seleksiemetodes wat gebruik is om vir *Bacillus firmus* mee te selekteer, kan gebruik word om die fungi of giste te isoleer.

Schindler (1988) het die proses vir die bio-omsetting van fumaraat na L-malaat ondersoek en voorgestel dat NH_4OH gebruik word om die pH van die ongebufferde groeimedium (pH 5, 6, 7, 8 en 9) te handhaaf, eerder as die NaOH wat in die studie gebruik is. Daar word meer fumaarsuur (in die vorm van NH_4 -fumaraat) opgelos in dieselfde hoeveelheid medium wanneer NH_4OH gebruik word en die ammoniumfumaraat laat die reaksie ook vinniger plaasvind as natriumfumaraat. Volgens Schindler versnel ammoniak die bio-omsetting van fumaraat na L-malaat. Ammoniumhidroksied sou ook in hierdie studie gebruik kon word om die pH van die medium (sonder die buffer), in te stel, maar nie vir die doel om meer fumaarsuur op te los nie (aangesien die organisme net ongeveer 8 g/l kan gebruik), maar eerder om die reaksie vinniger en effektiewer te laat plaasvind en sodoende beter malaatproduksie te verkry. Hierdie aanpassing is nie op *Bacillus firmus* uitgevoer nie, omdat die patentbeskrywing (Schindler, 1988) eers aan die einde van die studie vanaf die Verenigde State van Amerika bekom is.

Volgens die resultate van Figuur 3.6, 3.7 en 3.8 is daar nog heelwat fumaarsuur wat nie gedurende die inkubasie tyd deur die organisme benut is nie. Cao *et al.*, (1996) het 'n metode ontwerp waar fumaarsuur as substraat gebruik word en die substraat wat oorbly weer herwin kan word. Op hierdie manier kan 'n kontinue proses bewerkstellig word deur herhaalde produksie van L-malaat en herwinning van die fumaarsuur wat nie gebruik is nie (die substraat word weer in die reaksie teruggepomp). Fumaarsuur wat nie gedurende die produksie van L-malaat gebruik word nie, kan ook op ander maniere verwyder word. 'n Heelwat duurder proses is om van adsorpsie deur PVP (poliviniel piridien) gebruik te maak (Cao *et al.*, 1996). Fumaarsuur kan ook verwyder word deur die pH baie te verlaag wat lei tot die presipitering van die fumaarsuur.

Yamamoto *et al.*, (1976) het 1 gram *Brevibacterium ammoniagenes* selle gekweek en dit by 30 ml 1M fumaarsuur gevoeg en vir 'n paar uur geïnkubeer, waarna daar onttrekkings gedoen is om te bepaal hoeveel L-malaat geproduseer is. *Brevibacterium* beskik oor die vermoë om hierdie omsetting te laat plaasvind as gevolg van die fumarase geen wat tot 'n vlakke van fumarase uitdrukking lei. Dieselfde metode kan ook op *Bacillus firmus* toegepas word as gevolg van die organisme se fumarase geen (aktiwiteit). Hierdie proses van Yamamoto *et al.*, is aansienlik vinniger (onttrekkings word tussen tyd 2 en 3 ure uitgevoer) en die byprodukte is minder, omdat die groeimedium slegs uit buffer en 1 M fumaarsuur bestaan.

Wanneer daar nie 'n mikrobiële ensiem is vir 'n betrokke bio-omsetting nie, is dit moontlik om 'n ensiem te manipuleer deur rekombinante DNA-tegnologie. 'n Voorbeeld van 'n suksesvolle toepassing is die toename in die penisillien-G-amidase van *E. coli* met die plasmied pBR322 as 'n vektor (Palmer, 1993). Deur genetiese manipulerings kan die struktuur van 'n fumarase geen ook verander word deur dit byvoorbeeld onder die beheer van 'n sterk en reguleerbare promotor te plaas om sodoende groter stabiliteit te verkry.

Wanneer daar noukeurig na die resultate van hierdie studie gekyk word, val dit op dat malaatproduksie deur *B. firmus* wisselvallig is (vergelyk Figuur 4.5 a en Figuur 4.7). Om dit te kan oorkom, kan die fumarase geen van *Bacillus firmus* (organisme O13)

byvoorbeeld in 'n ander mikro-organisme gekloneer word om sekere nadele (soos die vorming van byprodukte) te verminder of verhoogde malaatproduksie te bewerkstellig. Sodoende kan ook groter stabiliteit ook verkry word. Die optimum kondisies sal egter streng toegepas moet word om hierdie wisselvalligheid tot 'n minimum te beperk.

Noudat die organisme wat die L-malaat vervaardig, geïsoleer en geïdentifiseer is en die optimum substraatkonsentrasie bepaal is, kan daar ook na verskillende metodes gekyk word om die L-malaat te suiwer. Deur sekere kalsiumverbindinge by die supernatante (nadat die selle deur sentrifugering verwyder is) te voeg, word kalsium-malaat gevorm wat kan presipiteer (Schindler, 1988). Die nadeel hieraan verbonde is dat sommige van die kalsium-malaat verlore kan gaan gedurende die proses en sodoende kan die L-malaatproduksie verlaag word. 'n Ander nadeel is dat daar nie voldoende belugting kan plaasvind nie as gevolg van die presipitering van die produk. Deur die kondisies soos verbeterde belugting of verhoogde skudtempo aan te pas, kan die L-malaatproduksie moontlik verhoog word. L-Malaat kan herwin word deur 'n oplosmiddelelektrosietegniek met tributiefosfaat opgelos in dodekaan en tri-iso-okstiel amien (Malmay *et al.*, 1994). Deur die metode word ongeveer 92 % van die malaat in die afvalwater van industrieë herwin.

Samevatting

Met vrymoedigheid kan gestel word dat daar aan die hoofdoelstelling van hierdie studie voldoen is deurdat daarin geslaag is om 'n bakterie te isoleer en te identifiseer (*Bacillus firmus*) wat die L-isomeer van malaat as produk vanaf fumaarsuur as substraat produseer. Die optimale kondisies vir hierdie omskakeling is ook vasgestel. Hierdeur is 'n belangrike fondament gelê vir verdere studie op hierdie gebied.

LITERATUURVERWYSINGS

ABE, S., FURUYA, A., SAITO, T. & TAKAYAMA, K. 1962. Method of producing L-malic acid by fermentation. **United States Patent**, patent number : 3,063,910.

AGARWAL, V.K. 1988. Simultaneous determination of D- and L-malic acids in apple juice by gas chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 71:466-468.

ANONIEM. 1964. Malic and fumaric acids : British production opens up wider usage. **Manufacturing Chemist and Aerosol News**, 35:56-59.

ANONIEM. 1988. Miles adds malic and fumaric acids to its acidulant line. **Food Engineering**, 60:45.

BATTAT, E., PELEG, Y., BERCOVITZ, A., ROKEM, J.S. & GOLDBERG, I. 1991. Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, 37:1108-1116.

BRUSLOW, S.W. & HORWICH, A.L. 1995. Urea cycle enzymes. (*In* Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. *eds*. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York : McGraw-Hill, p. 1187-1232.)

BUCK, R.E. & MATTERN, H.H. 1947. L-malic acid as by-product in apple syrup manufactured by ion exchange. **Industrial and Engineering Chemistry**, 39:1087-1090.

CAO, N., DU, J., GONG, C.S. & TSAO, G.T. 1996. Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column. **Applied and Environmental Microbiology**, 62:2926-2931.

DORDICK, J.S. 1991. An introduction to industrial biocatalysts. (*In* Dordick. J.S., *ed.* Biocatalysts for industry. New York & London : Plenum Press, p. 1-19.)

DORDICK, J.S. 1991. Biocatalysts for industry. New York & London : Plenum Press. 330 p.

ERASMUS, E. 1987. Die gebruik van gaschromatografie, massaspektrometrie en rekenaartegnologie in die identifisering van organiese-suururië. Potchefstroom : PU vir CHO. (Verhandeling-M.Sc.) 272 p.

FABER, K. & FRANSSEN, M.C.R. 1993. Prospects for the increased application of biocatalysts in organic transformations. *Tibtech*, 11:461-470.

FIGUEIREDO, Z.M.B. & CARVALHO, L.B. 1991. L-Malic acid production using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30:217-224.

GRIFFIN, M. , HAMMONDS, E.J. & LEACH, C.K. 1993. Use of enzymes in large scale industrial applications. (*In* Barker, R.D.J., *ed.* Technological Applications of Biocatalysts. Oxford : Butterworth-Heinemann Ltd. p. 149-179.)

GARDNER, W.H. 1966. Food acidulants. New York : Allied Chemical Corporation. 185 p.

GODFREY, T. & REICHEL, J. 1983. Industrial enzymology. New York : The Nature Press. 582 p.

GRAYCAR, T.P. 1991. Protein engineering of subtilisin. (*In* Dordick. J.S., *ed.* Biocatalysts for industry. New York & London : Plenum Press, p. 257-283.)

HACKING, A.J. 1986. Economic aspects of biotechnology. Cambridge : Cambridge University Press. 147 p.

HILL, R.L. & TEIPEL, J.W. 1970. Fumarase and crotonase. (*In* Boyer, P.D., *ed.* The enzymes. 3rd ed, Vol.2. New York : Academic Press. p. 539-571.)

KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., *eds.* 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.1. Baltimore : Williams & Wilkins. 964 p.

LUMYONG, S., TAKAO, S. & TOMITA, F. 1994. Microbial utilization of renewable resources. **Joint Seminar on Biotechnology**, 7:166-174.

MALMARY, G., VEZIER, A., ROBERT, A., MOURGUES, J., CONTE, T. & MOLINIER, J. 1994. Recovery of tartaric and malic acids from dilute aqueous effluents by solvent extraction technique. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 60:67-71.

MATHEWS, C.K. & VAN HOLDE, K.E. 1990. Biochemistry. California : The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1129 p.

NG, T.K., HESSER, R.J., STIEGLITZ, B., GRIFFITHS, B.S. & LING, L.B. 1986. Production of tetrahydrofuran/1,4 butanediol by a combined biological and chemical process. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, 17:355-363.

PALMER, T. 1993. Industrial production and purification of enzymes. (*In* Barker, R.D.J., *ed.* Technological Applications of Biocatalysts. Oxford : Butterworth-Heinemann Ltd. p. 19-50.)

PELEG, Y., STIEGLITZ, B. & GOLDBERG, I. 1988. Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 28:69-75.

ROSSI, J. & CLEMENTI, F. 1985. L-Malic acid production by polyacrylamide gel entrapped *Pichia membranaefaciens*. **Biotechnology Letters**, 7:329-334.

SATO, S., NAKAHARA, T. & MINODA, Y. 1977. L-Malic acid production from n-paraffins by *Candida brumptii* IFO-0731. **Agricultural and Biological Chemistry**, 41:967-973.

SCHINDLER, F. 1988. Process for the bioconversion of fumarate to L-malate. **United States Patent**, patent number : 4,734,368.

SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. & HOLT, J.G., *eds.* 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.2. Baltimore : Williams & Wilkins. 1599 p.

SNYMAN, J.P. 1978. 'n Praktiese metode vir die vasstelling van appelmelksuurgisting. **Wynboer**, 563:54-55.

TACHIBANA, S. & MURAKAMI, T. 1973. L-Malate production from ethanol and calcium carbonate by *Schizophyllum commune*. **Journal of Fermentation Technology**, 51:858-864.

TOMAZIC, S.J. 1991. Protein stabilization. (*In* Dordick. J.S., *ed.* Biocatalysts for industry. New York & London : Plenum Press, p. 241-255.)

VAN ROOYEN, J.P.G., MIENIE, L.J., ERASMUS, E., DE WET, W.J., KETTING, D., DURAN, M. & WADMAN, S.K. 1994. Identification of the stereoisomeric configurations of methylcitric acid produced by *si*-citrate synthase and methylcitrate synthase using capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Inherited Metabolic Diseases**, 17:738-747.

VOET, D. & VOET, J.G. 1990. Biochemistry. New York : John Wiley & Sons. 1223 p.

YAMAMOTO, K., TOSA, T., YAMASHITA, K. & CHIBATA, I. 1976. Continuous production of L-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cells. **European Journal of Applied Microbiology**, 3:169-183.

YAMAZAKI, Y., MAEDA, H. & KAMIBAYASHI, A. 1982. The long-term production of L-malate by the co-immobilized NAD and dehydrogenases. **Biotechnology and Bioengineering**, 24:1915-1918.

YUKAWA, H., YAMAGATA, H. & TERASAWA, M. 1986. Production of L-malic acid by the cell reusing process. **Process Biochemistry**, 10:164-166.

ZAKS, A. 1991. Enzymes in organic solvents. (*In* Dordick. J.S., *ed.* Biocatalysts for industry. New York & London : Plenum Press, p. 161-180.)

AFKORTINGSLYS

BSTFA	bis (trimetielsiliel) (trifluoroasetamied)
°C	grade Celsius
cm	sentimeter
DNA	deoksiribonukleïensuur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	gram
GC	gaschromatografie
GC-MS	gaschromatografie-massaspektrometrie
g/l	gram per liter
HCl	waterstofchloried (soutsuur)
IAA	isoamielalkohol
IS	interne standaard
KCl	kaliumchloried
kons	konsentrasie
<i>l</i>	liter
M	molêr
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter

mM	millimolêr
mm	millimeter
μ l	mikroliter
N	normaal
NaCl	natriumchloried
Na ₂ HPO ₄	dinatriumwaterstofortofosfaat
NaH ₂ PO ₄	natriumdiwaterstofortofosfaat
NaOH	natriumhidroksied
NH ₄ OH	ammoniumhidroksied
nm	nanometer
Na ₂ SO ₄	natriumsulfaat
OD	optiese digtheid
o.p.m.	omwentelings per minuut
opp	oppervlakte
TEM	transmissie elektronmikroskopie
TMCS	trimetiel chlorosilaan
Tris-HCl	tris-(hidroksiemetiel)-aminometaan
UV	ultraviolet

BYLAAG 1

a) Voedingsagarplate

Gisekstrak	3 g/l
Peptoon	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

Al die reagense word in 'n een liter Scott bottel gevoeg. Die pH word op 7,5 ingestel met 1 N NaOH. Die media word vir 15 minute by 121 °C geoutoklaaf.

b) Voedingsop met broomkresolpers

Broomkresolpers	5 gram
Etanol (98 %)	47,5 ml
Water (gedistilleerd)	2,5 ml

'n Vyf persent oplossing word gemaak deurdat alles in 'n volumetriese fles gevoeg word en daarna tot 100 ml met gedistilleerde water opgevul word. Nadat 1 ml van die oplossing by 1 liter voedingsop gevoeg is, word 'n 0,005% oplossing verkry. Die broomkresolpers dien as indikator. Die voedingsop word op dieselfde wyse gemaak as die voedingsagarplate, behalwe dat daar geen agar bygevoeg word nie. Die media word in die botteltjies versprei en geoutoklaaf vir 15 minute by 121 °C. Daarna word al die verskillende organismes in die botteltjies geïnkuleer en geïnkubeer vir 18 uur by 37 °C.

c) Fumaarsuuragarplate

Fumaarsuur	5 g/l
Peptoon	10 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

Bogenoemde word in 1 liter gedistilleerde water opgelos. Die pH word op 7,5 met 2N NaOH ingestel. Indien die fumaarsuur nie alles wil oplos nie, kan die oplossing effens verhit word op 'n warmplaat. Die media word dan vir 15 minute by 121 °C geoutoklaaf.