

L-Leucindehydrogenase

L-Leucin : NAD⁺ oxidoreductase, Leu-DH
EC 1.4.1.9

- Beschreibung:** L-Leucindehydrogenase katalysiert die oxidative Desaminierung von L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin sowie von Aminosäuren mit unverzweigter, aliphatischer Kohlenstoffkette. Dabei wurde bei Aminosäuren mit verzweigter Kohlenstoffkette eine höhere Reaktivität beobachtet als mit denen mit unverzweigter.
- Durch die Umkehrreaktion wird eine Vielfalt von 2-Ketosäuren, insbesondere 2-Isocaproat, 2-Ketoisovalerat und 2-Keto-3-methylvalerat mit 0,9 M Ammonium zu der entsprechenden L-Aminosäure reaktiv aminiert. [1]
- Bei der oxidativen Desaminierung kann NAD⁺ nicht durch NADP⁺ ersetzt werden. Ebenso kann bei der Umkehrreaktion NADH nicht durch NADPH ersetzt werden.
- Herkunft:** *Bacillus cereus*
- Verwendung:**
- Synthese von L-Leucin sowie einer Vielzahl anderer Aminosäuren mit unverzweigter und verzweigter Kohlenstoffkette, wie z.B. L-tert-Leucin und L-Methionin
 - Aminierung von 2-Ketosäuren unter kontinuierlichen Bedingungen im Enzym-Membran-Reaktor unter Verwendung von Formiat-Dehydrogenase zur Regeneration des Coenzym
 - Synthese radioaktiv markierter Aminosäuren
- Molekulargewicht:** 310 000 (± 10 000) D [1]
- Struktur:** Das Enzym besitzt sechs identische Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 39 000 D. [1]
- Isoelektrischer Punkt:** pH 5,75 (natives Enzym)
pH 4,0 (Untereinheiten) [2]
- Aktivität:** > 50 U/ml (Methode: ASA Spezialenzyme GmbH)

Spezifische Aktivität: > 20 U/mg

Definition Unit: Eine internationale Einheit (Unit) ist definiert als die Menge L-Leucindehydrogenase, welche die Produktion von 1 μmol NADH pro Minute unter Standardbedingungen katalysiert. [1]

Reaktionsparameter: pH-Optima:
oxidative Desaminierung: 10,7 (in Glycin/NaCl/NaOH-Puffer mit L-Leucin, L-Valin und L-Isoleucin als Substrat)

reduktive Aminierung: 9,0 – 9,5 (mit 2-Ketoisocapronat, 2-Ketomethionin als Substrat)

8,5 (mit 2-Ketovalerat als Substrat) [1]

Temperaturoptimum: 60°C (oxidative Desaminierung) [1]

Michaelis-Konstanten:	oxidative Desaminierung:		reduktive Aminierung:	
	Substrat	K_M [mM]	Substrat	K_M [mM]
	NAD ⁺	0,34	NADH	0,034
	L- α -Aminobutyrat	22,0	2-Ketobutyrat	1,5
	L-Norvalin	2,9	2-Ketovalerat	0,4
	L-Norleucin	1,5	2-Ketocapronat	1,2
	L-Valin	2,5	2-Ketoisovalerat	2,1
	L-Leucin	1,5	2-Ketoisocapronat	0,45
	L-Isoleucin	1,0	2-Keto-3-methylvalerat	0,9
	L-Methionin	23,0	2-Keto-4-mercaptoputyrat	2,1

Inhibitoren: oxidative Desaminierung von L-Leucin

leichter Aktivitätsverlust (10 – 20%) durch:

MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, CuSO₄, CoSO₄, ZnCl₂, EDTA, Citrat, 1.1-Phenanthrolin, 2.2-Dipyridyl, 2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol, red. Glutathion

hoher Aktivitätsverlust durch:

HgCl₂ (> 90%), p-Quecksilberbenzoat (> 75%), KCN (> 40%) [1]

Bestell-Nr.: 1410

Lieferform: Suspension in 50% Glycerin

Lagerung: -20°C

Stabilität: pH-Wert

Das Enzym ist in einem pH-Bereich von 5,6 – 9,8 stabil. Es wurde kein Aktivitätsverlust beobachtet, nachdem die Enzymlösung mit 50% Glycerin (v/v) versetzt und ein Jahr bei –20°C gelagert wurde. [1]

Temperatur

Bei 25°C wurde nach 24 Stunden ein maximaler Aktivitätsverlust von 12% nachgewiesen.

Lösungsmittel

Wurde das Enzym in 2 M Isopropanol gelöst, konnte nach 2 Monaten noch 60% Restaktivität nachgewiesen werden.

Hitzestabilität

Eine Lösung des Rohextraktes und des aufgereinigten Enzyms ist bis 50°C stabil, wenn das Enzym 30 Minuten in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,8) mit 0,1% 2-Mercaptoethanol erhitzt wird. [2]

Hitzedenaturierung

Zur Bestimmung der Hitzedenaturierung wurde das Enzym für 30 Minuten auf 55°C erhitzt. Mehr als 60% der Restaktivität blieben erhalten. Ein drastischer Rückgang der Aktivität wurde bei dem aufgereinigten Enzym bei über 55°C und bei dem Rohextrakt bei über 64°C beobachtet.

Literatur:

- [1] Schütte H., Hummel W., Tsai H., Kula M.R.:
Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 306 – 317 (1985)
- [2] Kärst U., Schütte H., Baydoun H., Tsai H.
Proc. 4th European Congress on Biotechnology, Vol.2 (1987)