

Induzierte Synthese von Aminoacylase in *Fusarium*

Von

M. Röhr und W. Hampel

Aus dem Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie
der Technischen Hochschule in Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Brunner)

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 12. September 1966)

In *Fusarium* ist bei Züchtung in Nährlösungen mit Zusatz von Hippurat oder Benzoat die Bildung einer Aminoacylase mit hoher Aktivität gegenüber Hippursäure und anderen N-Benzoyl-aminosäuren induzierbar. Die Enzymsynthese zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Induktorkonzentration bis zum Erreichen einer für das Wachstum der Organismen toxischen Konzentration. Die optimale Induktorkonzentration unter den angegebenen Kultivierungsbedingungen liegt bei etwa 20 mMol/l Benzoat bzw. Hippurat. Das induzierte Enzym hat ein pH-Optimum bei 7,5. Die Enzymwirkung wird durch Hemmstoffe für Sulfhydrylgruppen wie Jodacetat, p-Chlormercuribenzoat und HgCl₂ gehemmt.

When *fusarium* is grown in nutrient media containing hippurate or benzoate, an aminoacylase with high activity towards hippuric and other N-benzoylamino acids is induced. The enzyme synthesis is dependent on the concentration of the inducer up to a level which is toxic to the organism. Under the given growth conditions the optimum inducer concentration is approx. 20 mmoles/l of benzoate or hippurate. The pH optimum of the induced enzyme is 7.5. The enzyme can be inhibited by SH reagents such as iodoacetate, p-chloromercuribenzoate and mercuric chloride.

Unter der Bezeichnung „Aminoacylasen“ ist eine Gruppe von Enzymen bekannt, die durch die Fähigkeit zur Spaltung von N-Acylaminosäuren gekennzeichnet ist.

Nachdem *Schmiedeberg*¹ im Jahre 1881 erstmalig gefunden hatte, daß tierische Gewebe Hippursäure in Benzoesäure und Glycin zu spalten ver-

¹ O. *Schmiedeberg*, Arch. Exper. Pathol. Pharmacol. **14**, 379 (1881).

mochten („Histozyim“), wurde dieses später als Hippuricase² bzw. Aminoacylase³ bezeichnete Enzym bald auch in zahlreichen Mikroorganismen aufgefunden⁴. In Pilzen (vgl.⁵) konnte Aminoacylasewirkung hauptsächlich bei *Aspergillus* (z. B. Takadiastase)⁶ und *Penicillium*⁷ beobachtet werden. *Neuberg* und Mitarbeiter⁸ erkannten, daß neben Hippursäure auch andere N-Acyminosäuren, aber nur solche mit L-Konfiguration des Aminosäurenanteiles deacyliert wurden, und schlugen die Verwendung solcher Enzyme zur präparativen Trennung racemischer Aminosäuregemische vor. Diese Anwendungsmöglichkeit wurde in der Folge durch mehrere Autoren sowohl mit tierischen⁹ als auch mit Acylasen aus Pilzen¹⁰ und Bakterien¹¹ studiert sowie Methoden zur Herstellung angereicherter Enzympräparate beschrieben.

Eigene Untersuchungen¹² an *Fusarium semitectum* haben gezeigt, daß bei Züchtung des Pilzes in Gegenwart von Phenoxycyessigsäure, die zur Induktion einer Penicillinamidase (Penicillinacylase) mit hoher Spaltaktivität gegenüber Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V) führt¹³, auch die Aktivität einer im Organismus nur in geringer Menge vorhandenen Aminoacylase gesteigert wird. In der vorliegenden Arbeit wird nachge-

² *A. Clementi*, Atti acad. naz. Lincei **32**, II, 172 (1923).

³ *I. A. Smorodinzew*, J. Russ. Chem. Ges. **51**, 156 (1919); Z. physiol. Chem. **124**, 123 (1923).

⁴ *F. Leuthardt* in *J. B. Sumner* und *K. Myrbäck* (edit.): The Enzymes, 1. Aufl. Bd. 4, 951, New York 1951.

⁵ *V. W. Cochrane*, The Physiology of Fungi, S. 265, New York (1958).

⁶ *I. Nikitinski*, Jb. wiss. Bot. **40**, 1 (1904); *K. Shibata*, Hofmeisters Beitr. **5**, 384 (1904); *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*, Biochem. Z. **145**, 186 (1924).

⁷ *A. W. Dox*, J. Biol. Chem. **6**, 461 (1909); *Y. Ito*, J. Biochem. [Tokyo] **37**, 237 (1950); *K. Michi* und *H. Nonaka*, J. Agr. Chem. Soc. Japan **28**, 343 (1954); *J. Chibata*, *A. Watanabe* und *S. Yamada*, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **21**, 300 (1957).

⁸ *C. Neuberg* und *K. Linhardt*, Biochem. Z. **147**, 372 (1924).

⁹ *J. P. Greenstein*, in *S. P. Colowick* und *N. O. Kaplan* (edit.) Meth. in Enzymol. **3**, 554, New York, (1957); *S. M. Birnbaum*, ebda. **2**, 115.

¹⁰ *C. Hoppert*, Biochem. Z. **149**, 510 (1924); *C. Neuberg* und *I. Mandl*, Enzymologia [Den Haag] **14**, 128 (1950); *K. Michi* und *H. Nonaka*, J. Agr. Chem. Soc. Japan **28**, 346 (1954); Bull. Agr. Soc. Japan **19**, 153 (1955); *K. Michi* und *H. Tsuda*, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **21**, 235 (1957); J. Biochem. [Tokyo] **45**, 745 (1958); *J. Chibata* und *S. Yamada*, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **20**, 174 (1956); *J. Chibata*, *A. Watanabe* und *S. Yamada*, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **21**, 291, 296 (1957); *T. Hata*, *E. Doi* und *T. Asai*, Jap. Pat. 10692 (1960).

¹¹ *G. Lucente*, *A. Romeo* und *D. Rossi*, Experientia [Basel] **21**, 317 (1965).

¹² *R. Brunner*, *M. Röhr* und *F. Baumann*, Allgem. und Prakt. Chem. **17**, 66 (1966).

¹³ *E. Brandl*, *A. Schmid* und *H. Steiner*, Österr. Pat. 233 739 v. 25. 5. 1964 (14. 2. 1962).

wiesen, daß in *Fusarium* durch Züchtung mit Hippursäure oder Benzoesäure die Bildung einer Aminoacylase mit hoher Aktivität gegenüber Hippursäure und anderen N-Benzoylaminosäuren induziert werden kann.

Material und Methodik

Zur Untersuchung gelangten vier *Fusarium*-Stämme: *Fus. semitectum*, *Fus. lini*, *Fus. solani*, *Fus. moniliforme*. Diese wurden auf Saccharose-Nitrat-Agar nach *Czapek-Dox* in Stammkulturen gehalten und monatlich überimpft. Zur Gewinnung von Sporensuspensionen für die Mycelvermehrung wurden 10 Tage alte Kulturen auf Saccharose-Nitrat-Agar nach *Czapek-Dox* oder auf Maisbruch bzw. Rollgerste mit physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt und mit diesen Suspensionen 100 ml Weithals-Erlenmeyer-Kolben mit 20 ml Nährlösung beimpft. Nach viertägiger Kultivierung am Rotations-schüttler (170 Upm) bei 24° C wurden diese Vorkulturen auf 1000 ml Weithals-Erlenmeyer-Kolben mit 100 bis 150 ml Nährlösung übertragen und erneut 4 Tage unter denselben Bedingungen kultiviert. Die verwendeten Nährlösungen sind bei den einzelnen Versuchen angegeben. Die erhaltenen Mycelmengen wurden am Büchnertrichter filtriert, mit Eiswasser gewaschen und die Mycele durch dreimalige Behandlung mit jeweils der zehnfachen Menge Aceton von -15° entwässert. Das feingepulverte, acetonfreie Trockenmycel wurde in verschlossenen Gefäßen bei +2° C aufbewahrt. Zur Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von Hippursäure wurden Versuchsansätze mit den bei den Versuchen angegebenen Mengen Trockenmycel und Substrat in Phosphatpuffer (pH 7,5) bei 38° C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen. Die qualitative Analyse erfolgte durch papierchromatographische Trennung der Proben auf Schleicher und Schüll-Papier 2043 b im Fließmittel Isopropanol + Methanol + Wasser + Ameisensäure/60 + 20 + 20 + 8.

R_f von Hippursäure .. 0,96; R_f von Glycin .. 0,44. Der Nachweis der Hippursäure erfolgte nach *Gaffney, Schreier, Di Ferrante* und *Altmann*¹⁴, der von Glycin durch Reaktion mit Ninhydrinreagens in üblicher Weise. Zur quantitativen Bestimmung der Hippursäure wurden genau gemessene Proben der Spaltansätze auf Filterpapier aufgebracht (etwa 10 bis 20 µl), mit dem Sprühreagens nach *Gaffney* u. a.¹⁴ gesprüht und das Papier zwischen vorgeheizten Glasplatten genau 1 Min. auf 140° C erhitzt; nach Elution mit reinem Methanol (5 oder 10 ml) wurde die Extinktion bei 470 nm im Spektralphotometer (Zeiß PMQ II) bestimmt. In derselben Weise gewonnene Eichkurven mit reinen Hippursäurelösungen ergaben im Bereich von 10 bis 100 µg einen linearen Verlauf. Versuche, die Analysenmethode von *Gaffney* u. a.¹⁴ in Lösung durchzuführen, ergaben schlecht reproduzierbare Werte, die vermutlich auf ungleichmäßige Erhitzung zurückzuführen sind, weswegen die Reaktion am Papier vorzuziehen war. Bei den Versuchen zur Spaltung anderer N-Benzoylaminosäuren wurden die Spaltungsraten durch Bestimmung der papierchromatographisch getrennten Aminosäuren nach der Ninhydrin-Kupfer-Methode von *Fischer* und *Dörfel*¹⁵ ermittelt.

¹⁴ G. W. Gaffney, K. Schreier, N. Di Ferrante und K. J. Altmann, J. Biol. Chem. **206**, 695 (1954).

¹⁵ F. G. Fischer und H. Dörfel, Z. physiol. Chem. **324**, 544 (1953).

Versuche und Ergebnisse

1. *Wachstumsversuche mit Hippurat als einziger Kohlenstoff- bzw. Kohlenstoff- und Stickstoffquelle*

In Nährlösungen mit 100 mMol/l Hippursäure (Mineralkomponenten $\text{KNO}_3 \dots 2 \text{ g/l}$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \dots 2 \text{ g/l}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} \dots 0,5 \text{ g/l}$; $\text{NaCl} \dots 0,1 \text{ g/l}$; $\text{CaCl}_2 \dots 0,02 \text{ g/l}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O} \dots 0,02 \text{ g/l}$; pH 7,0) wurden Kulturen der vier Stämme über vier Passagen stehend und submers geführt und in allen Passagen starke Vermehrung festgestellt. *Fus. semitectum* und *Fus. lini* zeigten flockiges, *Fus. solani* ein kugelförmiges Mycel, während die Kultur von *Fus. moniliforme* ein hefeartiges Aussehen aufwies. *Fus. moniliforme* wurde daher in den folgenden Versuchen ausgeschieden. Wurde aus der Nährlösung das Nitrat weggelassen, so war nur ein geringer Abfall des Wachstums zu beobachten. Alle Stämme können also Hippurat als C- und N-Quelle verwerten und sind somit zur Spaltung von Hippurat befähigt.

2. *Versuche zur Spaltung von Hippurat durch Mycelpräparate nach Vermehrung auf Hippurat*

Die Mycele aus der 4. Passage der vorangegangenen Wachstumsversuche wurden nach sechstägiger Vermehrung in dem oben angegebenen Nährmedium (Hippuratkonzentration erhöht auf 200 mMol/l) zu einem Aceton-Trockenmycel verarbeitet und in einem Versuchsansatz mit 10 mg/ml Trockenmycel und 25 $\mu\text{Mol/ml}$ Na-Hippurat bei pH 7,5 durch qualitative papierchromatographische Untersuchung nach 0, 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden auf die Fähigkeit zur Spaltung von Hippurat untersucht. Es wurde bei *Fus. semitectum* nach einer Stunde, bei *Fus. lini* nach zwei und *Fus. solani* nach drei Stunden eine deutliche Abnahme der Hippuratkonzentration beobachtet.

3. *Versuche zur Induktion von Aminoacylase durch Hippurat*

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche ließen auf das Vorliegen einer Induktion der Enzymbildung schließen. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde *Fus. semitectum* in einer Nährlösung mit 20 g/l Saccharose, 20 g/l Glucose und den Mineralsalzen der vorangegangenen Versuche mit und ohne Zusatz von 11 mMol/l Hippursäure über drei Passagen von je drei Tagen sub-

Tabelle 1. Induktion von Aminoacylase durch Hippurat

Zeit in min.	Gespaltene Menge Hippurat in $\mu\text{Mol/ml}$ Züchtung ohne Hippurat	Züchtung mit Hippurat
30	0,4	5,1
60	0,8	10,7
90	1,6	14,1
150	2,9	21,5
210	3,7 = 13,3%	24,9 = 89,2%

Versuchsansatz (5 ml): 20 mg/ml Acetontrockenmycel
28 $\mu\text{Mol/ml}$ Na-Hippurat
pH 7,5 38° C.

mers kultiviert und die aus der letzten Passage gewonnenen Aceton-Trockenmycele einem Spaltversuch unterworfen. Die Versuchsbedingungen und Ergebnisse sind aus Tab. 1 ersichtlich.

Das Versuchsergebnis zeigt eine deutliche Induktionswirkung der bei der Vermehrung des Mycels zugesetzten Hippursäure. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß variiertes Induktorkonzentrationen untersucht.

Die Vermehrung erfolgte durch Schüttelkultur in einer Nährlösung ähnlich der von *Hockenhull*¹⁶ angegebenen.

	g/l		g/l
Lactose	25	Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O	0,5
Saccharose	20	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01
Essigsäure	2,5	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01
KNO ₃	2	MnSO ₄	0,01
K ₂ HPO ₄	5	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05
Hefeextrakt Difco	2	Co(NO ₃) ₂	0,005
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5	NaCl	0,001

pH 7,0 (mit NaOH eingestellt).

Die nach viertägiger Kultivierung hergestellten Aceton-trockenmycele wurden in analoger Weise untersucht. Versuchsbedingungen und Ergebnisse sind in Tab. 2 angeführt.

Tabelle 2. Induktion von Aminoacylase durch variierte Hippurat-konzentrationen

Zeit in min.	Induktorkonzentration in mMol/l						
	0	0,05	0,5	5	20	50	100
Gespartene Menge Hippurat in µMol/ml							
15	—	—	—	—	41,0	43,5	47,4
30	—	—	—	14,4	48,5	52,9	54,9
60	—	—	10,0	28,6	—	—	—
120	—	3,5	19,2	51,8	—	—	—
240	2,6	6,8	36,2	—	—	—	—

Versuchsansatz (5 ml): 20 mg/ml Aceton-trockenmycel
56 µMol/ml Na-Hippurat
pH 7,5 38° C.

Wie die Daten von Tab. 2 erkennen lassen, bewirkt eine Erhöhung der Induktorkonzentration eine Zunahme der Enzymsynthese. Ab einer Induktorkonzentration von 20 mMol/l ist jedoch kein wesentlicher Effekt mehr erzielbar.

4. Versuche zur Induktion von Aminoacylase durch Benzoesäure

In derselben Weise wie bei den Versuchen zur Induktion mit Hippurat wurden nun Kulturen mit gestuften Mengen Na-Benzoesäure (vgl. Tab. 3) nach

¹⁶ D. J. D. Hockenhull, in Progress in Industr. Microbiol. Bd. 1, 4, 5, London (1959).

vier Tagen Vermehrung in der modifizierten Nährlösung des vorangegangenen Versuches und Herstellung von Aceton-Trockenmycelpräparaten in analogen Spaltversuchen untersucht. Die Versuchsbedingungen und Ergebnisse zeigt Tab. 3.

Tabelle 3. Induktion von Aminoacylase durch Benzoat

Zeit in min.	Induktorkonzentration in mMol/l							
	0	0,05	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0	10
Gespaltene Menge Hippurat in μ Mol/ml								
60	—	—	—	7,2	8,2	9,9	25,0	25
120	1,3	3,1	3,6	14,3	16,8	20,4	38,2	52,5
240	2,7	4,3	11,3	28,5	32,4	41,4	—	—
360	4,1	7,3	15,6	43,8	49,4	—	—	—

Zeit in min.	Induktorkonzentration in mMol/l				
	20	50	80	100	200
Gespaltene Menge Hippurat in μ Mol/ml					
15	12,5	11,8	21,7	16,1	11,7
30	25,1	25,9	38,2	32,3	30,6
45	38,0	35,5	45,2	47,7	43,8
60	49,6	45,2	52,8	—	—

Versuchsansatz (5 ml): 20 mg/ml Acetontrockenmycel
56 μ Mol/ml Na-Hippurat
pH 7,5 38° C.

Wie die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, ist auch durch Benzoat eine Induktion der Aminoacylase erzielbar, wenngleich unter vergleichbaren Versuchsbedingungen Hippurat eine bessere Induktionswirkung ausübt. Eine Steigerung der Induktorkonzentration bewirkte im Bereich bis 20 mMol/l wiederum eine gesteigerte Enzymsynthese; bei höheren Induktorkonzentrationen war jedoch bereits eine deutliche Hemmung der Mycelvermehrung zu beobachten, die sich auch in einer Abnahme der Induktorwirkung ausdrückte.

Das Vorliegen einer Affinitätsbeziehung zwischen dem Induktor und dem Repressor der Enzymsynthese analog der Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat (oder Inhibitor) nach der Theorie von *Michaelis* und *Menten*, wie sie z. B. für die Induktion der Valindecaboxylase durch Leucin in *Proteus vulgaris* von *Haughton* und *King*¹⁷ gefunden wurde, konnte auch bei der Auswertung der Induktionsversuche mit Benzoat im Bereich von 1 bis 80 mMol/l Benzoat als Induktor gezeigt werden. Trägt man (vgl. Tab. 4) die Kehrwerte der Induktorkonzentrationen gegen die Kehrwerte der aus den Aktivität/Zeit-Kurven ermittelten Initialgeschwindigkeiten $\left(\frac{\mu\text{Mol Hippurat}}{\text{ml} \cdot \text{Stdn} \cdot \text{mg Trockenmycel}} \right)$, die als Maß für

¹⁷ B. G. *Haughton* und H. K. *King*, *Biochem. J.* **80**, 268 (1961).

die Enzyymbildungsgeschwindigkeiten anzusehen sind, in einem Koordinatensystem auf, so erhält man (vgl. Abb. 1) eine Gerade entsprechend der Darstellung nach *Lineweaver* und *Burk*, deren Schnittpunkt mit der Abszisse eine Affinitätskonstante der Induktorwirkung zu ermitteln gestattet.

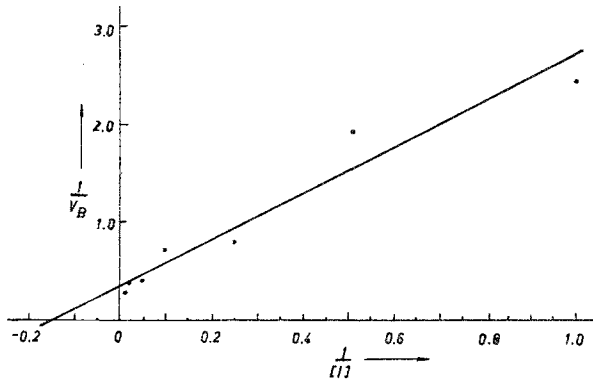


Abb. 1. Abhängigkeit der Enzyymbildungsgeschwindigkeit v_B ($\mu\text{Mol Hippurat/ml, Stdn., mg Trockenmycel}$) von der Induktorkonzentration I (mMol/l).

Die aus dieser Darstellung ermittelte Affinitätskonstante der Induktion K_I von 6 mMol/l sagt aus, daß bei Induktion mit 6 mMol Benzoat pro Liter die Enzymsynthese mit halbmaximaler Geschwindigkeit ver-

Tabelle 4. Abhängigkeit der Enzyymbildungsgeschwindigkeit von der Induktorkonzentration

Induktorkonzentration I , mMol/l	$\frac{1}{I}$	Enzyymbildungsgeschwindigkeit v_B^*	$\frac{1}{v_B}$
1,0	1,0	0,41	2,44
2,0	0,50	0,50	2,00
4,0	0,25	1,25	0,80
10	0,10	1,40	0,71
20	0,05	2,50	0,40
50	0,02	2,60	0,38
80	0,0125	3,80	0,26

* ausgedrückt als spezif. Enzymaktivität in $\frac{\mu\text{Mol Hippurat}}{\text{ml} \cdot \text{Stdn} \cdot \text{mg Trockenmycel}}$

läuft. Eine Induktorkonzentration von 20 mMol/l entspricht etwa 90 bis 95% der maximalen Enzyymbildungsgeschwindigkeit; diese für die Enzyymbildung optimale Konzentration wurde daher in allen folgenden Versuchen angewandt.

Die Vermehrung des Pilzes in Gegenwart von Na-Benzoesäure und damit die anwendbaren Induktorkonzentrationen sind sehr stark von den sich im Verlauf der Züchtung einstellenden pH-Werten abhängig, wie in Vorversuchen festgestellt worden war.

Wurde nämlich in dem verwendeten modifizierten Nährmedium der pH-Wert vor Beimpfung auf 5,0 eingestellt, so konnte in Gegenwart von Na-Benzoesäure keine Zellenentwicklung erzielt werden. Bei Einstellung des pH auf 6,0 wurde nur bis zu einer Benzoesäurekonzentration von 4 mMol/l ungehemmtes Wachstum beobachtet, und bei pH 7,0 war eine Vermehrung im gesamten Konzentrationsbereich von 0 bis 200 mMol/l Benzoesäure möglich. Im letzten Fall stiegen die pH-Werte am Ende der Vermehrung bis über 9 an. Diese hohen pH-Werte bedingten jedoch eine schlechte Lagerstabilität der Enzympräparate. So wurde bei Aufbewahrung in verschlossenen Gefäßen bei + 2° C nach zwei Monaten ein Aktivitätsabfall von 75% festgestellt. In einem vereinfachten Nährmedium (Saccharose . . . 30 g/l; Glucose . . . 10 g/l; Ammoniumacetat . . . 5 g/l; Ammoniumsulfat . . . 2 g/l; Hefeextrakt Difco . . . 1 g/l; MgSO₄ · 7 H₂O . . . 0,2 g/l; ZnSO₄ · 7 H₂O . . . 0,02 g/l; KH₂PO₄ . . . 6,0 g/l) war es nun möglich, von einem eingestellten pH von 6,2 ausgehend mit Induktorkonzentrationen bis zu 20 mMol/l — entsprechend einer in den vorangegangenen Versuchen ermittelten optimalen Induktorkonzentration — gute Mycelentwicklung zu erreichen, wobei am Ende der Züchtung ein pH von 7,5 nicht überschritten wurde. Acetonmycel aus so angestellten Züchtungsversuchen zeigten die in Tab. 5 angeführten Aktivitäten, die auch nach Lagerung über mehrere Monate keinen Abfall aufwiesen.

Tabelle 5

Zeit in min.	Induktion mit	
	20 mMol/l Hippurat gespaltene Menge	20 mMol/l Benzoesäure in μ Mol/ml
5	15,3	9,5
10	29,2	19,1
20	48,5	31,2
30	55,8	49,4

Versuchsansatz (5 ml): 20 mg/ml Aceton-trockenmycel
56 μ Mol/ml Na-Hippurat
pH 7,5 38° C.

Mit in dieser Weise gewonnenen Präparaten wurde auch das pH-Optimum der Enzymwirkung mit 7,5 ermittelt sowie orientierende Untersuchungen über die Spaltaktivitäten gegenüber anderen N-Benzoylamino-säuren durchgeführt.

5. Versuche zur Spaltung anderer N-Benzoylaminosäuren

In orientierenden Spaltversuchen (20 mg/ml Aceton-trockenmycel, 56 μ Mol/ml Substrat, pH 7,5; 38° C) wurde die Spaltung von N-Benzoyl-derivaten folgender Aminosäuren untersucht: Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Phenylalanin, Methionin, Leucin. Es wurde deutliche Spaltung der Derivate von Alanin, Asparaginsäure und Methionin, schwächere Spaltung der Derivate von Phenylalanin, Leucin und Glutaminsäure festgestellt.

6. Versuche mit Hemmstoffen für Sulfhydrylgruppen

Zur Orientierung über die Existenz aktiver Sulfhydrylgruppen wurde die Spaltung von Hippurat in Versuchsansätzen (10 mg/ml Aceton-trockenmycel; 28 μ Mol/ml Hippurat; pH 7,5; 38° C) mit Zusatz der in Tab. 6 angeführten Hemmstoffe untersucht. Die ermittelten Spaltaktivitäten (μ Mol Hippurat pro ml, min, mg Trockenmycel) sowie die daraus erhaltenen relativen Aktivitäten, bezogen auf eine mit 100% angenommene Aktivität im Versuch ohne Hemmstoffzusatz, sind in Tab. 6 angeführt.

Tabelle 6. Verhalten gegenüber Hemmstoffen

Hemmstoff	Konzentration Mol/l	Aktivität (*)	relative Aktivität %
—	—	0,19	100
Jodacetat	$2 \cdot 10^{-3}$	0,08	42
	$2 \cdot 10^{-2}$	0,01	5
p-Chlormercuribenzoat	$3 \cdot 10^{-4}$	0,19	100
	$3 \cdot 10^{-3}$	0,0	0
Quecksilber-II-chlorid	10^{-3}	0,0	0

* μ Mol Hippurat pro ml, min, mg Trockenmycel

Die Tatsache, daß sowohl Jodacetat als auch p-Chlormercuribenzoat eine hemmende Wirkung ausüben, deutet darauf hin, daß die Enzymwirkung mit dem Vorhandensein aktiver Sulfhydrylgruppen verknüpft ist.

Diskussion

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ist die Bildung einer sehr aktiven, Hippursäure und andere N-Benzoylaminosäuren spaltenden Aminoacylase durch Züchtung des Pilzes in Gegenwart des Substrates Hippursäure bzw. des Spaltproduktes Benzoesäure induzierbar. Als optimale Induktorkonzentration kann eine Menge von 10 bis 20 mMol/l angegeben werden. Wegen der starken Abhängigkeit von den jeweiligen Züchtungsbedingungen sind die optimalen Induktorkonzentrationen sowie

die dadurch erzielbaren Enzymaktivitäten nur unter definierten Versuchsbedingungen reproduzierbar. Ob Hippursäure selbst als Induktor wirkt oder erst die aus ihr entstehende Benzoessäure, läßt sich aus den vorhandenen Versuchsdaten nicht entnehmen, da vergleichende Versuche zur Kurzzeitinduktion bisher nicht erfolgreich waren, mit welchen die Klärung dieser Frage möglich wäre. Der Zusammenhang zwischen der Induktorkonzentration und der induzierten Enzymaktivität zeigte, wie im Beispiel der Induktion mit Benzoat dargestellt wurde, eine Gesetzmäßigkeit, wie sie im Falle der Beziehung zwischen Enzym und Substrat nach der Theorie von *Michaelis* und *Menten* besteht; dies deutet, wie bereits *Haughton* und *King*¹⁷ gezeigt haben, auf eine analoge Bindung zwischen dem Induktor und dem spezifischen Repressor der Enzymsynthese. Inwieweit eine besondere Spezifität der Induktion vorliegt, sollen weitere Versuche erweisen. Die Tatsache, daß auch mit Phenoxyessigsäure im selben Organismus eine Enzyminduktion möglich ist, läßt darauf schließen, daß mehrere Induktionsmechanismen existieren. Über die Spezifität dieser Induktionen wird an anderer Stelle berichtet werden.