

Über Aminoacylasen von *Penicillium chrysogenum*

Von

R. Brunner, M. Röhr und M. Zinner

Aus dem Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie der
Technischen Hochschule in Wien

(Eingegangen am 26. März 1966)

In *Penicillium chrysogenum* wurde bei Vermehrung in synthetischen Nährlösungen die Existenz eines Aminoacylasesystems geringer Aktivität nachgewiesen, das breite Substratspezifität gegenüber den Acyl- wie auch den Aminosäurekomponenten von N-Acylaminosäuren aufweist.

Bei Züchtung in Gegenwart von Phenoxyessigsäure bzw. N-Phenoxyacetyl-glycin wurde die Aminoacylaseaktivität durch Enzyminduktion erheblich gesteigert, doch konnte im Gegensatz zu den Befunden bei *Fusarium*arten keine Penicillinamidase-wirkung induziert werden.

Geringe Induktion einer Spaltwirkung gegenüber Penicillin V wurde jedoch erzielt, wenn im Nährmedium N-Phenoxyacetylaminosäuren bzw. Penicillin V als einzige Stickstoffquellen geboten wurden.

Die Affinitäten des durch Phenoxyessigsäure induzierten Enzyms gegenüber verschiedenen N-Acylaminosäuren, bei denen sowohl die Acyl- als auch die Aminosäureanteile variiert waren, wurden durch Ermittlung der Michaeliskonstanten bestimmt.

Beim enzymatischen Abbau von Penicillin ist außer der hydrolytischen Aufspaltung des Lactamringes durch das Enzym Penicillinase auch eine Abspaltung der als Precursorsäure in der Seitenkette befindlichen Acylgruppe von der den Penicillinkern darstellenden 6-Aminopenicillansäure (APA) möglich. Das wirksame Enzym, welches als Penicillinamidase bzw. Penicillinacylase bezeichnet wird, wurde erstmalig von *Sakaguchi* und *Murao*¹ (vgl.²) im Mycel eines sulfathiazolresistenten Stammes von *Penicillium chrysogenum* sowie in *Aspergillus oryzae* (*Takadiastase*) gefunden. Spätere Untersuchungen verschiedener Autoren ergaben, daß das

¹ *K. Sakaguchi* und *S. Murao*, J. Agr. Chem. Soc. Japan **23**, 411 (1950).

² *S. Murao*, J. Agr. Chem. Soc. Japan **29**, 400, 404 (1955).

Enzym in zahlreichen Mikroorganismen, Bakterien wie Pilzen, verbreitet ist^{4, 5}. Es zeigte sich überdies, daß hinsichtlich der (Grob-) Spezifität der Spaltenzyme zwei große Gruppen unterschieden werden können: aus Pilzen stammende Enzyme wirken bevorzugt auf das Penicillin V, während Bakterienenzyme bevorzugt Penicillin G spalten. Bemerkenswerterweise ist die von *Sakaguchi* und *Murao* beobachtete Spaltung von Penicillin durch Enzyme aus *Penicillium chrysogenum* in der Folgezeit nicht oder nur in geringem Ausmaße gelungen. So konnten *Robinson* et al.⁵ mit Präparationen aus *Penicillium chrysogenum* keine Spaltung von Penicillin G, hingegen eine solche von Penicillin K (Heptylpenicillin) nachweisen. Auch *Erickson* und *Bennett*⁶ gelang nur eine geringfügige Spaltung von Penicillin G und V, wobei festgestellt wurde, daß diese Aktivität auch in Stämmen vorliegt, die kein Penicillin produzierten. Nur von *Claridge*, *Luttinger* und *Lein*⁷ wurde über eine merkliche Spaltung von Penicillin V und G durch ein aus einer Penicillinfermentation stammendes Mycel berichtet. In diesem Zusammenhang erscheint interessant, daß die gebildete Enzymmenge drastisch gesteigert wird, wenn man bei der Anzucht des Organismenmaterials die entsprechende Precursorsäure zusetzt. So ergab bei *Escherichia coli*⁸ die Züchtung in Gegenwart von Phenylacetat eine stark erhöhte Spaltaktivität gegenüber Penicillin G, während bei *Fusarium*arten die Anwendung von Phenoxyacetat⁹ denselben Effekt gegenüber Penicillin V bewirkte. Das so induzierte Enzym aus *Fusarium semitectum* wurde von *Waldschmidt-Leitz* und *Bretzel*¹⁰ (vgl. ¹¹) isoliert und als zinkhaltiges Enzym mit einem Molgewicht von etwa 65000 erkannt. Untersuchungen von *Huang*, *Seto* und *Shull*¹² zur Substratspezifität von Penicillinspaltenzymen des Bakterientyps zeigten, daß ein Abweichen von

⁴ C. A. Claridge, A. Gourevitch und J. Lein, Nature [London] **187**, 237 (1960); W. Kaufmann und K. Bauer, Naturwiss. **47**, 474 (1960); H. T. Huang, A. R. English, T. A. Seto, G. M. Shull und B. A. Sobin, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 3790 (1960); F. R. Batchelor, E. B. Chain, M. Richards und G. N. Robinson, Proc. Roy. Soc. **B 154**, 522 (1961); M. Cole und G. N. Robinson, Proc. Roy. Soc. **B 154**, 490 (1961).

⁵ G. N. Robinson, F. R. Batchelor, D. Butterworth, J. Cameron-Wood, M. Cole, G. C. Eustace, M. V. Hart, M. Richards und E. B. Chain, Nature [London] **187**, 236 (1960).

⁶ R. C. Erickson und R. E. Bennett, Bact. Proc. **1961**, A 60; Appl. Microbiol. **13**, 738 (1965).

⁷ C. A. Claridge, J. R. Luttinger und J. Lein, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **113**, 100 (1963).

⁸ W. Kaufmann und K. Bauer, Nature **203**, 520 (1964).

⁹ E. Brandl, A. Schmid und H. Steiner, Österr. Pat. 233 739 v. 25. 5. 1964 (14. 2. 1962).

¹⁰ E. Waldschmidt-Leitz und G. Bretzel, Z. physiol. Chem. **337**, 222 (1964).

¹¹ G. Bretzel, Diss. TH München (1963).

¹² H. T. Huang, T. A. Seto und G. M. Shull, Appl. Microbiol. **11**, 1 (1963).

der Phenylacetylgruppe der Seitenkette einen ausgeprägten Abfall der Spaltungsrate bedingte, das Enzym also deutlich acylspezifisch ist. Jüngste Studien von Cole¹³ ergaben, daß das Enzym aus *Escherichia coli* eine Reihe von N-Phenylacetyl-aminosäuren sowie Phenylacetamid spalten kann, sodaß der Autor den Schluß zog, das Enzym stelle eine Form der aus tierischen Geweben gut bekannten Aminoacylase dar, die auch in Pilzen und Bakterien vorkommt (vgl. ¹⁴). Die Beobachtung, daß Aminoacylasen spezifisch auf N-Acyl-L-aminosäuren eingestellt sind, hat dazu geführt, daß sowohl bei tierischen (vgl. ¹⁵) als auch bei den Enzymen aus Mikroorganismen¹⁶ die Möglichkeit der präparativen Trennung von Racematen der Aminosäuren bearbeitet wurde.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, an *Penicillium chrysogenum*

1. die Frage der Existenz bzw. Induzierbarkeit von Enzymen mit Spaltwirkung gegenüber Penicillin und N-Acylaminosäuren zu studieren sowie

2. die Spezifität dieser Enzyme gegenüber ausgewählten Substraten zu untersuchen.

Methodik

1. Verwendete Stämme

Für die Untersuchungen wurden *Penicillium chrysogenum* Q 176 (Stamm Q) sowie zwei von diesem abgeleitete Mutanten (Stamm P und R) verwendet.

2. Züchtung

Konidiensuspensionen von 6proz. Biomalz-agar wurden in 100 ml Erlenmeyer-Weithalskolben mit 25 ml Nährlösung (Vorkultur) sowie 1000 ml Erlenmeyer-Weithalskolben mit 100 ml Nährlösung (Hauptkultur) unter Zugabe von 1% CaCO₃ bei 26 bis 27° C am Rotationsschüttler (150 Upm) 3 bis 4 Tage (bei Verwendung von Nährlösungen mit induzierenden Substanzen als einziger Stickstoffquelle bis 10 Tage) vermehrt.

¹³ M. Cole, Nature [London] **203**, 519 (1964).

¹⁴ K. Leuthardt, in J. B. Sumner und K. Myrbäck (edit.), The Enzymes, 1. Aufl., Bd. 4, 951, New York, Academic Press (1951).

¹⁵ S. M. Birnbaum, in S. P. Colowick und N. O. Kaplan (edit.), Methods in Enzymology, Bd. 2, 115, Academic Press, New York (1955); J. P. Greenstein, l. c. S. 109.

¹⁶ C. Neuberg und K. Linhardt, Biochem. Z. **147**, 372 (1924); C. Neuberg und J. Mandl, Enzymologia **14**, 128 (1950); K. Michi und H. Nonaka, J. Agr. Chem. Soc. Japan **28**, 343, 346 (1954); K. Michi und H. Nonaka, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **19**, 153 (1955); K. Michi und H. Tsuda, J. Biochem. [Tokio] **45**, 745 (1958); K. Michi und H. Tsuda, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **21**, 18, 235 (1957); 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, 300 (1957); T. Hata, E. Doi und T. Asai, Jap. Pat. 10692 (1960).

3. Nährlösungen

Die nachstehend angegebene Grundlösung wurde durch die weiter unten angeführten Komponenten zu den kompletten Nährlösungen I, II, III, V und VI (bei IV abgeänderte Grundlösung) ergänzt und diese mit 0,1 *n*-NaOH auf pH 6,5 eingestellt.

Grundlösung: (g/l)

KH ₂ PO ₄	2
Na ₂ SO ₄	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,02
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,02
MnSO ₄	0,02
Co(NO ₃) ₂	0,02
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,005
pH	6,5 (eingestellt mit 0,1 <i>n</i> -NaOH)

Nährlösungen: (g/l)

Nährlösung I	Pepton	10
	NH ₄ NO ₃	2
Nährlösung II	Glucose	10
	Lactose	20
Nährlösung III	NH ₄ NO ₃	2
	Glucose	10
	Lactose	30
	Milchsäure	3
	Ammonacetat	5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2

Nährlösung IV mit abgeänderter Grundlösung:

Nährlösung V	KH ₂ PO ₄	0,5
	K ₂ HPO ₄	1,5
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,02
	Biomalz	10
	Glycerin	30
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Nährlösung VI	Glucose	40
	Hefeextrakt	3
	NH ₄ NO ₃	2
Nährlösung VI	Glucose	40
	als N-Quelle wahlweise (vgl. Tab. 1)	
	N-Phenoxyacetyl-glycin	
	N- α -Phenoxypropionyl-glycin	
	N-Phenoxyacetyl-L-glutaminsäure	
	N-Acetyl-glycin	
	Penicillin V	
Phenoxyäthylpenicillin		
in einer Konzentration von 50 mMol/l.		

4. Enzympräparationen

a) Trockenmycel: Abgepreßtes und mit Eiswasser gewaschenes Mycel wurde 3mal mit der 15fachen Menge Aceton (-15°C) je 10 min. unter weitgehendem Zerkleinern entwässert, restliches Aceton im Luftstrom bzw. im Vak. entfernt und das Präparat bei 4°C verschlossen aufbewahrt.

b) Trockenmycelextrakt: 2 g Trockenmycel (Stamm Q, sechstägige Vermehrung auf Nährlösung IV mit 14,5 mMol/l Phenoxyacetat) wurden in 30 ml Wasser von 0°C 5 min. gerührt, der Rückstand nach 10 min. langem Zentrifugieren bei 5000 Upm (0°C) mit 2 g Celit (Hyflo Supercel) und 5 ml 0,02 *m*-NaCl von 0°C 15 min. in einer Porzellanreischale zerrieben, mit 55 ml 0,02 *m*-NaCl 1 Stde. bei 0°C unter Rühren extrahiert und bei 5000 Upm (0°C) zentrifugiert. Die erhaltene Rohenzymlösung wurde mit Aceton (-20°C) auf eine Acetonkonzentration von 20 Vol. % eingestellt, 30 min. bei -4°C gerührt und bei $27\,500 \times g$ 10 min. bei -4°C zentrifugiert. Der enzymhaltige Überstand wurde erneut mit Aceton von -20°C auf eine Konzentration von 60 Vol. % eingestellt, 30 min. bei -20°C gerührt und 10 min. bei $27\,500 \times g$ (-10°C) zentrifugiert. Der Rückstand wurde nun in 10 ml 0,2 *m*-Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gelöst (Proteingehalt 1,7 mg/ml).

5. Analysenmethoden

Die qualitative Analyse von Aminosäuren erfolgte papierchromatographisch (aufsteigend, Papier S & S 2043b, Detektion mit Ninhydrinreagens) in den nachstehenden Fließmitteln

Fließmittel	h _{R_f} -Werte der Aminosäuren				
	Gly	Glu	Phe	Leu	s-Aminocaprons.
Methanol + Propanol-(2) + + Ameisensäure + Wasser 20 + 60 + 8 + 20	44	53	76	83	68
Collidin + Methanol + Aceton + + Wasser 8 + 40 + 40 + 20	32	12	—	—	—

Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren wurde nach *Moore* und *Stein*¹⁷ unter Verwendung eines Kolorimeters n. Dr. B. Lange bzw. des Spektralphotometers PMQ II von Zeiß durchgeführt.

Protein wurde nach *Weichselbaum*¹⁸ bestimmt.

Die papierchromatographische Analyse von Penicillin und dessen Abbauprodukten erfolgte nach *Röhr*¹⁹.

6. Substrate

N-Acetyl-glycin wurde nach *Edsall*²⁰ hergestellt. Die Darstellung der übrigen N-Acylaminosäuren sowie der Acylthioglycolsäurepräparate erfolgte

¹⁷ S. Moore und W. H. Stein, J. Biol. Chem. **211**, 907 (1954).

¹⁸ T. E. Weichselbaum, J. Amer. clin. Pathol. **7**, 43 (1946).

¹⁹ M. Röhr, Mikrochim. Acta [Wien] **1965**, 705.

²⁰ Z. Edsall, J. Amer. Chem. Soc. **59**, 2245 (1937).

nach dem Verfahren von *Offe*²¹; Hippursäure war ein Handelspräparat. 6-Aminopenicillansäure sowie Penicilline stammten von der Firma „Biochemie“ Ges. m.b.H. in Kundl, Tirol.

Versuche und Ergebnisse

A. Versuche zur induzierten Synthese von Penicillinamidase

Da eine Induktion der Synthese von Penicillinamidase bei *Penicillium chrysogenum* offenbar nur unter speziellen Bedingungen zu erwarten war, wurden verschiedene Versuche unternommen, um eine Induktionswirkung zu erreichen.

Die angewandten Nährlösungen und Induktoren sind in Tab. 1 angeführt.

Tabelle 1. Zusammenstellung der Versuche zur Induktion von Penicillinamidase in *Penicillium chrysogenum*

Stamm	Versuche Nr.	Nährlösung*	Induktor**
Q	38, 198, 203	III	Phenoxyacetat
Q	167	V	Phenoxyacetat
Q	37	III	N-Phenoxyacetylglycin
Q	4	I	Phenoxyacetylthioglycolat
Q	10	II	Phenoxyacetylthioglycolat
Q	12	IV	Phenoxyacetylthioglycolat
Q	164	VI	(Penicillin V)
P	34	III	Phenoxyacetat
P	165	V	Phenoxyacetat
P	33	III	N-Phenoxyacetylglycin
P	2	I	Phenoxyacetylthioglycolat
P	9	II	Phenoxyacetylthioglycolat
P	11	IV	Phenoxyacetylthioglycolat
P	116, 118	VII	(N-Phenoxyacetylglycin)
P	133, 136, 162	VI	(N-Phenoxyacetylglycin)
P	147, 161, 163	VI	(Penicillin V)
R	156	II	Phenoxyacetat
R	169	V	Phenoxyacetat
R	87, 89, 97, 108, 109	VII	(N-Phenoxyacetylglycin)
R	134, 137, 160	VI	(N-Phenoxyacetylglycin)
R	184	VI	(N-Phenoxyacetylglutaminsäure)
R	96	VII	(N-Acetylglycin)
R	148, 149, 157, 158, 159	VI	(Penicillin V)

* Bezügl. Züchtungen vgl. unter Methodik

** In Klammern angeführte Substanzen wurden als einzige Stickstoffquelle eingesetzt.

Zur Untersuchung der Enzymwirkung wurden jeweils 200 mg Trockenmycel mit 0,25 mMol Kalium-Penicillin V in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,5 suspendiert, bei 37° C inkubiert und nach 0, 1, 2, 4, 6 und 24 Stdn. Proben von je 20 µl papierchromatographisch analysiert.

1. Kultivierung der Organismen unter Induktorzusatz

Da bei Organismen mit der Fähigkeit zur induzierten Synthese von Penicillinamidase eine Induktion optimal durch Zusatz der entsprechenden Precursorsäure gelingt, also des Produktes der Spaltung, wurden Züchtungsversuche unter Zusatz von 14,5 mMol/l Phenoxyacetat (entspr. 0,2% Phenoxyessigsäure) durchgeführt. Es konnte in keinem Fall eine Spaltung von Penicillin V beobachtet werden (Versuche Nr. 34, 38, 156, 165, 167, 169, 198, 203). Ebenso erfolglos waren Versuche, bei denen optimal entwickeltes Mycel (Nährlösung IV) mit 0,2% Phenoxyessigsäure bei pH 2,8 bis zu 24 Stdn. am Schüttler inkubiert und dann erst in die Spaltversuche eingesetzt wurde.

2. Kultivierung mit Zusatz aktivierter Precursorsäuren

Da Phenoxyessigsäure auch das Substrat der Penicillinsynthese darstellt, diese jedoch zur N-Acylierung von 6-Aminopenicillansäure in aktivierter Form vorliegen müßte (vgl. Brunner²²), wurde auch die Möglichkeit untersucht, energiereichere Derivate der Phenoxyessigsäure als Induktoren einzusetzen. Züchtungen in Gegenwart von 14,5 mMol/l Phenoxyacetyl-glycin bzw. Phenoxyacetyl-thioglycolsäure (vgl. ²³) waren jedoch erfolglos (Versuche Nr. 33, 37; 2, 4, 9, 10, 11, 12).

3. Kultivierung unter Einsatz induzierender Substanzen als Stickstoffnahrung

In der Überlegung, daß bei Vornahme von Züchtungen mit stickstoffhaltigen Substraten wie Penicillin V bzw. N-Acylaminosäuren, speziell N-Phenoxyacetylaminosäuren, als einziger Stickstoffquelle im Falle einer Vermehrung der Organismen eine Induktion durch Adaptation eintreten könnte, wurden entsprechende Züchtungsversuche angestellt. Hierbei konnte in den Versuchen Nr. 87, 116 und 133 (Versuche mit Frischmycel) sowie 118 und 137 durch Verwendung von N-Phenoxyacetyl-glycin (50 mMol/l), im Versuch Nr. 184 durch Verwendung von N-Phenoxyacetyl-L-glutaminsäure (50 mMol/l) und in den Versuchen Nr. 147, 148 und 161 durch Einsatz von Penicillin V (50 mMol/l) als Stickstoffquelle eine Spalt-

²² R. Brunner, Med. Welt **1963**, Nr. 29—31.

²³ K. Bauer, W. Kaufmann und H. Offe, Planta Medica [Stuttgart] **8**, 447 (1960).

aktivität gegen Penicillin V erzielt werden, die allerdings nicht immer reproduzierbar war und nur in den Versuchen Nr. 116, 118 und 184 stärkeres Ausmaß erreichte.

Ähnliche Versuche wurden auch zur Induktion der enzymatischen Spaltung von Phenoxäthylpenicillin durch Einsatz der entsprechenden α -phenoxypropionyl-substituierten Verbindungen durchgeführt; es konnte kein für die Hydrolyse dieses halbsynthetischen Penicillins spezifisches Enzym induziert werden.

B. Versuche zur induzierten Synthese von Aminoacylasen

Besonders die Versuche von Cole¹³ an Bakterien hatten ergeben, daß das Enzympräparat neben der Spaltung von Penicillin G auch zur Hydrolyse verschiedener N-Phenylacetyl-aminosäuren befähigt, somit offenbar als eine acylspezifische Aminoacylase anzusprechen war; der Autor wies überdies nach, daß ein Handelspräparat von Acylase I tierischen Ursprungs Penicillin V zu spalten vermochte. Auch eigene Versuche mit *Fusarium semitectum*²⁴ haben das Vorhandensein von Aminoacylaseaktivität neben der ausgeprägten Fähigkeit zur Spaltung von Penicillin V ergeben. In den nachstehenden Untersuchungen wurde nun die Frage der Existenz von Aminoacylaseaktivität in *Penicillium chrysogenum* und deren Induzierbarkeit durch die für Penicillinamidase geeigneten Induktorsubstanzen studiert. Im weiteren wurde durch den Einsatz ausgewählter Substrate die Substratspezifität der Enzyme untersucht, um Einblick in die Frage der Identität von Penicillinamidase und Aminoacylase zu gewinnen.

1. Aminoacylase in *Penicillium chrysogenum*

Trockenmycele, die aus induktorfreen Kulturen (Nährlösung V) gewonnen worden waren und natürlich kein erfaßbares Penicillinspaltungsvermögen aufwiesen, wurden in analogen Versuchsansätzen (200 mg Trockenmycel, 0,25 mMol N-Acylaminosäure pH 7,5 in 10 ml Phosphatpuffer pH 7,5) auf ihre Fähigkeit zur Hydrolyse von N-Acylaminosäuren untersucht (vgl. Tab. 2). Die Analyse erfolgte wieder papierchromatographisch an Proben von 10 μ l nach 0, 1, 2, 4, 6 und 24 Stdn. Versuchsdauer durch Nachweis der enzymatisch deacylierten Aminosäuren. Da aus dem Aminosäure-, „pool“ des Mycels sowie der Mycelautolyse mit der gleichzeitigen Ausscheidung von Aminosäuren zu rechnen war, wurden Chromatogramme von parallel gezogenen Proben aus substratfreien Kontrollansätzen angefertigt und mit denen der Spaltungsversuche verglichen. Es wurde bei den folgenden Substraten eine — an der höheren Empfindlichkeit des Aminosäurenachweises gemessen — relativ geringe Spaltung

²⁴ R. Brunner, M. Röhr und F. Baumann, *Allgem. und Prakt. Chem.* **17**, 66 (1966).

beobachtet: N-Phenoxyacetyl-glycin, N-Phenoxyacetyl-L-leucin, N-Phenoxyacetyl-L-phenylalanin, N-Phenoxyacetyl-L-glutaminsäure, N-Benzoyl-glycin, N- α -Phenoxypropionyl-glycin, N-Acetyl-glycin; lediglich N-Phenoxyacetyl- ϵ -aminocaprinsäure wurde nicht angegriffen.

Tabelle 2. Zusammenstellung der Versuche über Aminoacylase-wirkung in *Penicillium chrysogenum*

Substrat	Versuch Nr.	Stamm
N-Phenoxyacetyl-glycin	100, 181	Q
	98, 179	P
	102, 183	R
N-Phenoxyacetyl-L-leucin	140	P
	126	R
N-Phenoxyacetyl-L-phenylalanin	139	P
	125	R
N-Phenoxyacetyl-L-glutaminsäure	142	P
	128	R
N-Benzoyl-glycin	101, 175	Q
	99, 173	P
	103, 177	R
N- α -Phenoxypropionyl-glycin	120	P
	111	R
N-Acetyl-glycin	119	P
	112, 189	R
N-Phenoxyacetyl- ϵ -aminocaprinsäure	141	P
	127	R

2. Induzierbarkeit der Aminoacylase

Die bei den Penicillinspaltungsversuchen eingesetzten, durch die verschiedenen Induktionsmaßnahmen vorbehandelten Mycelpräparate wurden nun in gleicher Weise auf ihre Spaltaktivität gegenüber denselben N-Acyl-aminosäuren untersucht. Die Einzelversuche sind in Tab. 3 angeführt. In allen Fällen wurden positive Ergebnisse festgestellt. Verglichen mit den Versuchen bei induktorfreien Kulturen zeigte sich jedoch eine bedeutende Erhöhung der Spaltungsaktivität.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß durch den Zusatz von induzierenden Substanzen zum Kulturmedium, die eine Induktion von Penicillinamidase kaum oder nicht bewirken, eine Aminoacylasebildung induziert werden kann, wodurch die in den Organismen normal vorhandene Enzymaktivität um ein vielfaches übertroffen wird. Wie der Vergleich der eingesetzten Substrate zeigt, weist dieses Enzymsystem eine relativ breite Substratspezifität auf, die sich sowohl auf die acylierenden als auch auf die acylierten Komponenten von N-Acylaminosäuren erstreckt.

Tabelle 3. Zusammenstellung der Versuche zur Induktion von Aminoacylase in *Penicillium chrysogenum*

Substrat	Versuch Nr.	Stamm	Induktor*
N-Phenoxyacetyl-glycin	45, 180	Q	Phenoxyacetat
	41, 178	P	Phenoxyacetat
	182	R	Phenoxyacetat
	16, 20	Q	Phenoxyacetylthioglycolat
	15, 19	P	Phenoxyacetylthioglycolat
	44	Q	N-Phenoxyacetyl-glycin
	40	P	N-Phenoxyacetyl-glycin
	123	P	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	106	R	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	N-Phenoxyacetyl-L-leucin	144	P
130		R	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
N-Phenoxyacetyl-L-phenylalanin	145	P	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	129	R	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
N-Phenoxyacetyl-L-glutaminsäure	146	P	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	132	R	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
N-Benzoyl-glycin	174	Q	Phenoxyacetat
	48, 172	P	Phenoxyacetat
	176	R	Phenoxyacetat
	28, 32	Q	Phenoxyacetylthioglycolat
	27, 31	P	Phenoxyacetylthioglycolat
	51	Q	N-Phenoxyacetyl-glycin
	47	P	N-Phenoxyacetyl-glycin
	122	P	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	107	R	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	N- α -Phenoxypropionyl-glycin	124	P
114		R	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
N-Acetyl-glycin	188	R	Phenoxyacetat
	121	P	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	115	R	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	113	R	(N-Acetyl-glycin)
N-Phenoxyacetyl- ϵ -amino-capronsäure	147	P	(N-Phenoxyacetyl-glycin)
	131	R	(N-Phenoxyacetyl-glycin)

* In Klammern angeführte Substanzen wurden als einzige Stickstoffquelle eingesetzt.

Versuche zur halbquantitativen Auswertung der Analysenergebnisse durch Elution der Aminosäureflecken aus den Chromatogrammen in Form der Kupferkomplexe²⁵ und kolorimetrischer Analyse der Eluate nach *Fischer* und *Dörfel*²⁶ ergaben, daß infolge der hohen Aminosäurekonzentrationen in den Kontrollchromatogrammen nur sehr ungenaue Daten zu gewinnen waren. Für die im folgenden beschriebenen Versuche wurde daher ein vorgereinigter Trockenmycelextrakt (vgl. Methodik) eingesetzt,

²⁵ *T. Wieland* und *E. Kowerau*, *Nature* [London] **168**, 77 (1951).

²⁶ *F. G. Fischer* und *H. Dörfel*, *Z. physiol. Chem.* **324**, 544 (1953).

bei dem eine störungsfreiere Analyse der Proben durch direkte Kolorimetrie nach *Moore* und *Stein*¹⁷ möglich war.

3. Ermittlung von Michaeliskonstanten und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten

Die Ermittlung der Michaeliskonstanten K_M und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten v_{\max} für die einzelnen Substrate (vgl. Tab. 4)

Tabelle 4. Michaeliskonstanten, maximale Geschwindigkeiten und spezifische Aktivitäten

Substrat	Initial- geschwin- digkeit	Substrat- konzent- ration S	K_M	v_{\max}	Spezifische Aktivität
	v_i $\mu\text{Mol/ml/min}$	mMol/l	Mol/l	$\mu\text{Mol/ml/min}$	$\mu\text{Mol/ml/min/mg}$ Protein
N-Phenoxyacetyl-glycin	0,020	0,48			
	0,028	0,96	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,063	1,27
	0,040	1,92			
N-Phenoxyacetyl-L-leucin	0,011	0,38			
	0,016	0,76	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,042	0,85
	0,024	1,52			
N-Benzoyl-glycin	0,014	0,56			
	0,022	1,12	$1,4 \cdot 10^{-3}$	0,050	1,01
	0,035	2,24			
N-Phenoxyacetyl-L-phenyl- alanin	0,011	0,33			
	0,018	0,67	$1,4 \cdot 10^{-3}$	0,056	1,13
	0,030	1,33			
N- α -Phenoxypropionyl- glycin	0,006	0,43			
	0,010	0,86	$2,0 \cdot 10^{-3}$	0,034	0,69
	0,016	1,72			
N-Phenoxyacetyl-L-glut- aminsäure	0,005	0,36			
	0,010	0,71	$1,4 \cdot 10^{-2}$	0,200	4,04
	0,018	1,42			
N-Acetylglycin	0,013	0,86			
	0,025	1,71	$2,0 \cdot 10^{-2}$	0,333	6,75
	0,048	3,42			

erfolgte graphisch nach dem Verfahren von *Lineweaver* und *Burk*²⁷. Zur Bestimmung der jeweiligen Initialgeschwindigkeiten v_i wurden Versuchsansätze mit den aus Tab. 4 ersichtlichen Konzentrationen an N-Acyl-aminosäuren (pH 7,5) in 9,7 ml 0,15 *m*-Phosphatpuffer pH 7,5 mit der in Vorversuchen als günstig gefundenen Menge von 0,3 ml Trockenmycel-extrakt (Proteingehalt 1,7 mg/ml) versetzt und nach 0, 2, 3, 4, 5, 10, 15 und 20 Min. Proben kolorimetrisch analysiert; die eingesetzte Enzym-menge war dabei so gewählt, daß im Bereich von 0 bis 5 Min. bei einer Hydrolyse von 0 bis 10% ein linearer Kurvenverlauf im Konzentration—

²⁷ *H. Lineweaver* und *D. Burk*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).

Zeit-Diagramm gegeben war. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 4 dargestellt.

Diskussion

Wie die Untersuchungen zeigten, liegt in *Penicillium chrysogenum* nach Züchtung in einfachen synthetischen Nährlösungen ein Aminoacylase-system geringer Aktivität vor; die aus der Literatur bekannte, bei verschiedenen Pilzen beobachtete relativ breite Substratspezifität, die sich sowohl auf die N-Acylgruppen als auch auf die N-acylierten Aminosäuren erstreckt, konnte auch hier festgestellt werden. Durch Züchtung in Gegenwart von Phenoxyessigsäure bzw. den hier beschriebenen Derivaten derselben wurde die Aminoacylaseaktivität beträchtlich gesteigert, ohne daß dabei eine Erweiterung des Spektrums der Substratspezifität zu beobachten war. Es liegt also offenbar eine induzierte Enzymsynthese vor, wobei die quantitativen Verhältnisse gegenüber nicht induzierten Präparaten den Befunden von *Dubnau* und *Pollock*²⁸ an gewissen Penicillinase bildenden Bakterienmutanten ähneln, die diese Autoren als „semiinduzierbar“ bezeichneten. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei *Fusarium semitectum*, bei dem durch Züchtung mit Phenoxyessigsäure die Induktion einer Penicillinamidase sehr hoher Aktivität erfolgte⁹ und ebenso eine Steigerung einer vorhandenen Aminoacylasewirkung erreichbar war²⁴, wurde bei *Penicillium chrysogenum* durch diese Maßnahme keine Penicillinamidase induziert. Nur durch die Verwendung von N-Phenoxyacetyl-aminosäuren bzw. Penicillin V als einziger Stickstoffquelle bei der Anzucht des Mycels war eine geringe Spaltfähigkeit gegenüber Penicillin V erzielbar. Die Tatsache, daß nur eine Art „training“, wie es auch die von *Sakaguchi* und *Murao*¹ beschriebene Sulfathiazol-resistenz darstellen dürfte, zu einer geringen Penicillinamidaseinduktion führt, deutet darauf hin, daß die an der Spaltung von Penicillinen bzw. N-Acylaminosäuren beteiligten Enzyme wegen ihrer Amidohydrolase-wirkung zwar als ähnlich, jedoch nicht als identisch anzusehen sind. Da eine exakte Abtrennung solcher Enzyme auf präparativem Wege noch nicht gelungen ist, stellt die vergleichende Untersuchung der Substratspezifitäten im Verein mit entsprechenden Induktionsversuchen neben dem Vergleich von Enzympräparationen verschiedener Herkunft derzeit die einzige brauchbare Möglichkeit dar, in das Problem der Differenzierung von Enzymen mit Aminoacylasewirkung Einblick zu gewinnen.

²⁸ *D. A. Dubnau* und *M. R. Pollock*, J. gen. Microbiol. **41**, 7 (1965).