

## Hippurathydrolase, ein neues Enzym aus Mikroorganismen, 1. Mitt.:

Induzierte Biosynthese in *Fusarium semitectum*, Darstellung  
einer gereinigten Enzympräparation und Untersuchungen  
zur Substratspezifität

Von

**M. Röhr**

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

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 21. Juni 1968)

1. In *Fusarium semitectum* wird durch Kultivierung in Nährmedien mit Zusatz von Hippurat die Biosynthese eines Enzyms induziert, das bevorzugt die hydrolytische Spaltung von Hippursäure in Benzoessäure und Glycin bewirkt.

2. Es wurden die optimalen Kultivierungsbedingungen zur Gewinnung enzymreichen Mycelmaterials studiert.

3. Durch Hitzedenaturierung inaktiver Begleitstoffe bei 50° C, fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat und selektive Adsorption an Calciumphosphatgel wird eine 130fach angereicherte Enzympräparation erhalten.

4. Auf Grund vergleichender Studien über die Substratspezifität gegenüber N-Benzoylaminosäuren, N-Acetylaminosäuren und verschiedenen Peptiden wird gezeigt, daß es sich hier um ein neues Enzym handelt, das im Gegensatz zu der ursprünglich als „Hippuricase“ bezeichneten Aminoacylase (E.C. Nr. 3.5.1.14) aus tierischen Geweben spezifisch auf die Hydrolyse von Hippursäure und ähnlich aufgebauten N-Benzoylaminosäuren eingestellt ist.

5. Für das Enzym wird der Trivialname Hippurathydrolase und die systematische Bezeichnung N-Benzoylaminosäure-amidohydrolase vorgeschlagen.

When *Fusarium semitectum* is grown in media containing hippurate, the synthesis of an enzyme is induced, which effects hydrolytic splitting of hippuric acid to benzoic acid and glycine.

A 130-fold purified enzyme preparation is obtained from mycelial extracts by heat treatment, ammonium sulfate fractionation, and adsorption on calcium phosphate gel. Comparative studies of the substrate specificity indicate the presence of a new enzyme. Contrary to aminoacylase (E.C. 3.5.1.14) and related enzymes, the preferred substrates of the new enzyme are hippuric acid and similar N-benzoylated amino acids. The trivial name *hippurate hydrolase* and the systematic name *N-benzoylaminoacid amidohydrolase* is proposed for this enzyme.

Unter den Enzymen, welche —CO—NH-Bindungen hydrolytisch spalten, sind neben den zahlreichen am Abbau von Proteinen und Peptiden beteiligten Peptidhydrolasen (Proteinasen und Peptidasen) eine Anzahl weiterer Enzyme bekannt, die in den verschiedensten Bereichen des Stoffwechsels eine Rolle spielen. Unter diesen gibt es eine Gruppe von Enzymen, deren gemeinsames Merkmal die Fähigkeit zur Deacylierung N-acylierter natürlicher Aminosäuren ist und die als „Aminosäure-acylasen“, häufig auch kürzer als „Aminoacylasen“ (*Smorodinzew*<sup>1</sup>) oder „Acylasen“ (*Abderhalden* und *Schwab*<sup>2</sup>) bezeichnet werden.

Die erste Erwähnung einer Enzymwirkung dieser Art findet sich bei *van Tieghem* (1864)<sup>3</sup>, der darauf hinwies, daß das von ihm beschriebene *Bacterium ureae*, welches von *Pasteur*<sup>4</sup> im Zuge seiner berühmten Arbeiten zur Widerlegung der Urzeugungstheorie entdeckt worden war, zur Spaltung von Hippursäure in Benzoesäure und Glycin befähigt sei. 1881 fand *Schmiedeberg*<sup>5</sup>, daß in verschiedenen tierischen Organen, besonders in Niere und Leber, ein Enzym mit der Fähigkeit zur Spaltung von Hippursäure wirksam ist, und nannte dieses Enzym „Histozytm“; später schlug *Clementi*<sup>6</sup> dafür den Namen „Hippuricase“ vor. *Schmiedebergs* Entdeckung wurde in der Folgezeit von zahlreichen Forschern bestätigt und erweitert (vgl. die zusammenfassenden Darstellungen bei *Oppenheimer*<sup>7</sup>, *Kraut* und *Kofrányi*<sup>8</sup>, *Leuthardt*<sup>9</sup> sowie *Hanson*<sup>10</sup>). Es wurde auch gefunden, daß ähnliche Spaltungsvorgänge sowohl bei Bakterien als auch bei Pilzen vorkommen.

<sup>1</sup> I. A. Smorodinzew, Z. physiol. Chem. **124**, 123 (1923).

<sup>2</sup> E. Abderhalden und E. Schwab, Fermentforsch. **10**, 478 (1929).

<sup>3</sup> P. E. L. van Tieghem, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. **58**, 210 (1864).

<sup>4</sup> L. Pasteur, Ann. Chim. Phys. **64**, 6 (1862).

<sup>5</sup> O. Schmiedeberg, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **14**, 379 (1881).

<sup>6</sup> A. Clementi, Atti acad. naz. Lincei **32** II, 172 (1923).

<sup>7</sup> C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Bd. II, 780, Thieme: Leipzig 1926.

<sup>8</sup> H. Kraut und E. Kofrányi, in: G. M. Schwab, Hb. Katalyse, Bd. **3**, 272, Springer: Wien 1941.

<sup>9</sup> F. Leuthardt, in: J. B. Sumner und K. Myrbäck, The Enzymes, 1. Aufl., Bd. **4**, 951, Academic Press: New York 1951.

<sup>10</sup> H. T. Hanson, in: Hoppe-Seyler/Thierfelders Hb. physiol.- und pathol.-chem. Analyse, 10. Aufl. (K. Lang und E. Lehnartz edit.), Bd. VI/C, 124; Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1966.

Den Angaben *van Tieghems* folgend fanden *Burri*, *Herfeldt* und *Stutzer*<sup>11</sup> eine Spaltung von Calciumhippurat bei Einwirkung von Bakterien aus Mistjauche. Von *Yoshimura*<sup>12</sup> wurde angegeben, daß Hippursäure im Ackerboden schneller in den oberen als in den unteren Schichten abgebaut wird. *v. Raciborski*<sup>13</sup> wies nach, daß Hippurat von *Penicillium* als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden kann, und *Went*<sup>14</sup> konnte zeigen, daß *Monilia sitophila* Hippurat als Stickstoffquelle verwertet. *Schellmann*<sup>15</sup> infizierte reine Hippursäure—Mineralsalzlösungen sowie menschlichen Harn mit Jauche und isolierte aus den in ammoniakal. Gärung geratenen Ansätzen 25 Bakterien, die Hippurat unter Ammoniakbildung abbauten. *Shibata*<sup>16</sup> sowie *Nikitinski*<sup>17</sup> gaben an, daß *Aspergillus niger* „Histozytm“ enthält. *Bierema*<sup>18</sup> wies eine Assimilation von Hippurat durch Pilze (*Cordyceps*, *Septosporium*) und ein Bakterium (*Bacterium erythrogenes*) aus Erde nach. *Dox*<sup>19</sup> fand Spaltung von Hippursäure bei *Penicillium*arten sowie bei *Aspergillus niger* und *Hagem*<sup>20</sup> konnte bei 12 Arten der Ordnung *Mucorales* Wachstum mit Hippurat als Stickstoffquelle nachweisen. Nach den Ergebnissen von *Kossowicz*<sup>21</sup> können zahlreiche Pilze Hippursäure als Stickstoff- bzw. Stickstoff- und Kohlenstoffnahrung nutzen. 1924 fanden *Neuberg* und *Rosenthal*<sup>22</sup>, daß die aus *Aspergillus oryzae* hergestellte „Takadiastase“ Hippursäure spaltet. Es konnte gezeigt werden, daß neben Hippursäure auch andere benzoyleierte Aminosäuren<sup>23</sup> sowie andere N-Acylaminosäuren<sup>24</sup>, wie z. B. N-Acetyl- und N-Phenylacetylaminosäuren hydrolysiert werden können. *Neuberg* und *Linhardt*<sup>23</sup>, die die Beobachtung machten, daß bei der Spaltung N-acylierter Aminosäuren durch Takadiastase stets nur die Derivate der natürlichen L-Aminosäuren hydrolysiert werden, schlugen die Verwendung dieses Enzyms zur präparativen Trennung rac. Aminosäuren über deren Acylderivate in die optischen Antipoden vor. Diese Methode wurde in der Folge sowohl mit Enzymen aus tierischen Geweben<sup>25</sup> als auch mit solchen aus Pilzen<sup>26, 27</sup> und Bakterien<sup>28</sup>

<sup>11</sup> *R. Burri*, *E. Herfeldt* und *A. Stutzer*, *J. Landw.* **42**, 329 (1894); *Zbl. Bakt.* II 1, 284 (1895).

<sup>12</sup> *K. Yoshimura*, *College of Agricult. Bull.* **2**, 221 (1895).

<sup>13</sup> *M. v. Raciborski*, *Flora [Jena]* **82**, 107 (1896).

<sup>14</sup> *F. C. Went*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **16**, 158 (1896).

<sup>15</sup> *W. Schellmann*, *Dissertat.* Göttingen 1902.

<sup>16</sup> *K. Shibata*, *Hofmeisters Beitr. chem. Physiol. Pathol.* **5**, 384 (1904).

<sup>17</sup> *J. Nikitinski*, *Jb. wiss. Bot.* **40**, 1 (1904).

<sup>18</sup> *S. Bierema*, *Zbl. Bakt.* II **23**, 672 (1909).

<sup>19</sup> *A. W. Dox*, *J. Biol. Chem.* **6**, 461 (1909).

<sup>20</sup> *O. Hagem*, *Vidensk. Selskab. Skrifter I Math.-naturwiss. Kl.* **1910**, 84.

<sup>21</sup> *A. Kossowicz*, *Z. Gärungsphysiol.* **1**, 60 (1912); **2**, 51, 81 (1913).

<sup>22</sup> *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*, *Biochem. Z.* **145**, 186 (1924).

<sup>23</sup> *C. Neuberg* und *K. Linhardt*, *Biochem. Z.* **147**, 372 (1924).

<sup>24</sup> *A. W. Dox* und *R. E. Neidig*, *Z. physiol. Chem.* **85**, 68 (1913); *C. Neuberg* und *J. Noguchi*, *Biochem. Z.* **147**, 370 (1924).

<sup>25</sup> *J. P. Greenstein*, *Adv. Protein Chem.* **9**, 174 (1954).

<sup>26</sup> *C. Neuberg* und *I. Mandt*, *Enzymologia [den Haag]* **14**, 128 (1950).

<sup>27</sup> *K. Michi* und *H. Nonaka*, *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **28**, 343, 346 (1954); *K. Michi* und *H. Tsuda*, *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan* **21**, 18, 235 (1957); *J. Biochem. [Tokyo]* **45**, 745 (1958); *J. Chibata*, *A. Watanabe* und *S. Yamada*, *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan* **21**, 291, 296 (1957).

<sup>28</sup> *G. Lucente*, *A. Romeo* und *D. Rossi*, *Experientia [Basel]* **21**, 317 (1965).

studiert und für die technische Anwendung ausgearbeitet (vgl. auch<sup>29</sup>). Die Verhältnisse bei Takadiastase wurden besonders von japanischen Arbeitsgruppen eingehend studiert und die präparative Spaltung zahlreicher N-Acetylaminosäuren, auch mit Präparationen aus Penicillien, beschrieben<sup>27</sup>. Das wirksame Enzym dürfte der tierischen Carboxypeptidase A nahestehen, wie aus Untersuchungen über die Substratspezifität sowie die Aktivierung durch Metallionen hervorgeht. *Gilbert* und *Frobisher*<sup>30</sup> wiesen Wachstum in Hippuratlösungen bei einer Reihe aerober Bakterien nach, und *Reis* und *Swensson*<sup>31</sup> fanden, daß gewisse Streptokokken Hippurat zu hydrolysieren vermögen, eine Eigenschaft, die auch heute zur Differentialdiagnose von *Streptococcus agalactiae* herangezogen wird. Von *Tomota* und *Saitoo*<sup>32</sup> wurde Spaltung von Hippursäure durch *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* und *Sarcina* festgestellt. *Kameda* und Mitarb.<sup>33</sup> fanden, daß ein aus Erde isolierter Stamm von *Pseudomonas* zur Hydrolyse von benzoilylierten L- und auch D-Aminosäuren befähigt ist; dies führte in der Folge zur Isolierung einer sog. D-Acylase<sup>34</sup>. *Itchner*, *Drechsler*, *Warner* und *Fox*<sup>35</sup> konnten in Wachstumsversuchen mit vier Bakterienstämmen (*Lactobacillus arabinosus* und *brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* und *Streptococcus faecalis*) die Verwertung von benzoilylierten Aminosäuren in Wachstumsversuchen beobachten (vgl. auch<sup>36</sup>).

Bei Mikroorganismen ist eine klare Unterscheidung zwischen Aminosäureacylasen und ähnlichen Enzymen infolge der zu beobachtenden breiten Substratspezifitäten äußerst schwierig. Es wurden daher auch alle oben angeführten Spaltungsvorgänge der Wirkung eines mit der ‚Hippuricase‘ *Schmiedebergs* identischen bzw. eng verwandten Enzyms zugeschrieben.

1952 gelang es *Birnbaum*, *Levintow*, *Kingsley* und *Greenstein*<sup>37</sup>, eine Enzympräparation mit Aminosäureacylasewirkung aus Schweineniere erstmals in einem für genauere Studien brauchbaren Ausmaß zu reinigen. Im Zuge der Fraktionierung wurden zwei Enzymindividuen gefaßt, eine sog. Acylase I (Aminoacylase = N-Acylaminosäure-amidohydrolase, E. C. Nr. 3.5.1.14<sup>38</sup>), deren Substratspezifität hauptsächlich N-Acetylaminosäuren, ausgenommen N-Acetylasparaginsäure, umfaßt, und eine sog.

<sup>29</sup> *T. Tosa*, *T. Mori*, *N. Fuse* und *I. Chibata*, *Enzymologia* **31**, 214, 225 (1966); **32**, 153 (1967).

<sup>30</sup> *I. Gilbert* und *M. Frobisher*, *Bull. John Hopkins Hosp.* **47**, 55 (1930).

<sup>31</sup> *I. Reis* und *A. Swensson*, *C. r. soc. biol.* **107**, 647 (1931).

<sup>32</sup> *S. Tomota* und *H. Saitoo*, *Tohoku J. exper. Med.* **39**, 211 (1940).

<sup>33</sup> *Y. Kameda*, *E. Toyoura*, *H. Yamazoe*, *Y. Kimura* und *Y. Yasuda*, *Nature* [London] **170**, 888 (1952).

<sup>34</sup> *Y. Kameda*, *E. Toyoura* und *Y. Kimura*, *Nature* [London] **181**, 1225 (1958).

<sup>35</sup> *K. F. Itchner*, *E. R. Drechsler*, *C. Warner* und *S. W. Fox*, *Arch. Biochem. Biophys.* **53**, 294 (1954).

<sup>36</sup> *R. W. Park* und *S. W. Fox*, *J. Biol. Chem.* **235**, 3193 (1960).

<sup>37</sup> *S. M. Birnbaum*, *L. Levintow*, *R. B. Kingsley* und *J. P. Greenstein*, *J. Biol. Chem.* **194**, 455 (1952).

<sup>38</sup> Rep. Commiss. on Enzymes of the Internat. Union of Biochemistry, Elsevier 1964.

Acylase II (Aspartoacylase = N-Acylaspartat-amidohydrolase, E. C. Nr. 3.5.1.15<sup>38</sup>), die bevorzugt N-Acetylasparaginsäure umsetzt. Es wurde vermutet, daß Acylase I mit der ‚Hippuricase‘ identisch sei. Diese Auffassung wurde durch die Arbeiten von *Bruns* und *Schulze*<sup>39</sup>, denen eine höhere Anreicherung des Enzyms gelang, experimentell bewiesen. Die Autoren bestätigten den bereits vom Arbeitskreis um *Greenstein* und *Birnbaum* erhaltenen Befund, daß Acylase I bevorzugt N-Acetyl- bzw. halogenierte N-Acetylaminosäuren angreift, während Hippursäure nur in erheblich geringerem Maße gespalten wird, und bewiesen, „daß ein besonderes, auf Hippursäure eingestelltes Enzym (‚Hippuricase‘) nicht existiert, sondern daß dieses Enzym mit Acylase I identisch ist. . . Wir müssen somit *Schmiedeberg* die Entdeckung der Acylase I zuschreiben, deren katalytische Funktion er als erster beobachtet und gemessen hat, wenn auch am wenig bevorzugten Substrat.“

In jüngster Zeit wurde nun jedoch vom Verfasser gefunden (*Röhr* und *Hampel*<sup>40</sup>; *Röhr*<sup>41</sup>), daß in verschiedenen Pilzen durch Züchtung in Nährmedien mit Zusatz von Hippursäure oder Benzoesäure die Synthese einer Aminosäureacylase hoher Aktivität induzierbar ist, die bevorzugt Hippursäure und andere N-Benzoylaminosäuren hydrolysiert und damit der früheren Bezeichnung „Hippuricase“ entspricht. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen an einer gereinigten Enzympräparation aus *Fusarium semitectum* beweisen, daß hier ein neues, von den bereits beschriebenen Aminosäureacylasen verschiedenes Enzym vorliegt, für das die Bezeichnung „Hippurathydrolase“ bzw. N-Benzoylaminosäure-amidohydrolase vorgeschlagen wird.

## Material und Methoden

### Pilzstamm

Für die Versuche wurde ein Stamm von *Fusarium semitectum* BC 805 verwendet, der abwechselnd auf *Sabouraud*-Agar (Difco) und Saccharose—Nitrat-Agar nach *Czapek—Dox* bei 24° C in Schrägagarkultur gehalten und monatlich überimpft wurde.

### Analysenmethoden

In den Kulturmedien wurde der Glucosegehalt jodometrisch mit *Fehling*-scher Lösung in der bei *Bernhauer*<sup>42</sup> angegebenen Ausführung nach *Lehmann—Maquenne—Schoorl* bestimmt. Die Ermittlung der Myceltrockengewichte er-

<sup>39</sup> *F. H. Bruns* und *C. Schulze*, *Biochem. Z.* **336**, 162 (1962).

<sup>40</sup> *M. Röhr* und *W. Hampel*, *Mh. Chem.* **97**, 1787 (1966).

<sup>41</sup> *M. Röhr*, *Allgem. u. prakt. Chem.* **18**, 6 (1967); *Zbl. Bakt. I. Referate* **210**, 323 (1968).

<sup>42</sup> *K. Bernhauer*, *Gärungschem. Praktikum*, Springer: Berlin 1939.

folgte gravimetrisch nach einer noch unveröffentlichten Schnellmethode<sup>43</sup>. Bei der Ermittlung der spezif. Enzymaktivitäten im Verlauf der Isolierung und Reinigung des Enzyms wurde der Proteingehalt photometrisch nach *Warburg* und *Christian*<sup>44</sup> sowie nach der Methode von *Lowry*, *Rosebrough*, *Farr* und *Randall*<sup>45</sup> bestimmt. Die quantit. Bestimmung der Hippursäure bei der Ermittlung der Enzymaktivitäten im Zuge der Reinigung des Enzyms erfolgte nach der Methode von *Gaffney* und Mitarb.<sup>46</sup> in leicht modifizierter Form<sup>40</sup> durch Besprühen von auf Chromatographiepapier aufgetragenen Proben (10 µl mit 10 bis 100 µg Hippursäure) mit dem Reagens von *Gaffney* (4% p-Dimethylaminobenzaldehyd in Ac<sub>2</sub>O)<sup>46</sup>, Erhitzen des Papiers durch 2 Minuten auf 140° C zwischen zwei Glasplatten im Trockenschrank, Elution

Tabelle 1. Untersuchte N-Acylaminosäuren

N-Acylaminosäure	Schmp., °C	Schmp., °C	Herkunft H = Handelsware P = Präp. Darst.
	Lit. *	Gef.	
N-Benzoyl-D,L-alanin	161—163	163	H
N-Benzoyl-D,L-arginin	290—300	290—295	H
N-Benzoyl-D,L-asparaginsäure	164—165	170	P
N-Benzoyl-D,L-glutaminsäure	155—157	155—157	P
N-Benzoyl-glycin	187—188	187	H
N-Benzoyl-D,L-histidin	247 Zers.	247 Zers.	P
N-Benzoyl-D,L-allo-isoleucin	118—119	118—120	P
N-Benzoyl-D,L-leucin	141—142	139—140	P
N-Benzoyl-D,L-methionin	152	149	P
N-Benzoyl-D,L-phenylalanin	187—188	186	P
N-Benzoyl-D,L-serin	168—169	167	P
N-Benzoyl-D,L-threonin	143—144	143—144	P
N-Benzoyl-D,L-tryptophan	193	193—194	P
N-Benzoyl-L-tyrosin	165—166	166—168	P
N-Benzoyl-D,L-valin	128—130	128	P
N-Benzoyl-S-benzyl-D,L-cystein	—	112	P
N-Acetyl-D,L-alanin	136	130—135	H
N-Acetyl-D,L-asparaginsäure	150	150	H
N-Acetyl-L-cystein	108—109	108	H
N-Acetyl-L-glutaminsäure	185	180—185	H
N-Acetyl-glycin	206—207	206—209	H
N-Acetyl-D,L-methionin	112	111—113	H
N-Acetyl-D,L-phenylalanin	146	138—145	P
N-Acetyl-D,L-tryptophan	205	203—206	H
N-Acetyl-D,L-valin	148	144—148	H

\* Bezüglich der Schmp. von N-Benzoylaminosäuren vgl.<sup>35</sup>. Bezüglich der Schmp. von N-Acetylaminosäuren vgl.<sup>37</sup>.

<sup>43</sup> R. Brunner, M. Röhr und J. Teifer (in Vorbereitung).

<sup>44</sup> O. Warburg und W. Christian, *Biochem. Z.* **310**, 384 (1941).

<sup>45</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

<sup>46</sup> G. W. Gaffney, K. Schreier, N. Di Ferrante und K. J. Altmann, *J. Biol. Chem.* **206**, 695 (1954).

mit 5 ml Methanol und Messung der Extinktion bei 470 nm im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II, 1-cm-Küvette).

Die Ermittlung der Enzymaktivitäten bei den Untersuchungen zur Substratspezifität erfolgte durch Titration der bei der Hydrolyse der eingesetzten N-Acylaminosäuren und Peptide frei werdenden Aminosäuren mittels einer automatischen Titrationseinrichtung (Radiometer A/S, Copenhagen), bestehend aus pH-Meßgerät PHM 25, Titrator TTT 11, Autobürette ABU 1 (Bürettenkapazität 2,5 ml, Ablesegenauigkeit 0,001 ml) und Mikrotitrationseinrichtung TTA 31 mit Glaselektrode G 2222 C und Kalomel-elektrode K 4112, mit 0,1*n*-NaOH unter Registrierung des Titrantverbrauches durch den Recorder SBR 2 in der von Röhr, Baumann und Brunner<sup>47</sup> beschriebenen Weise.

### Substrate

Die untersuchten N-Acylaminosäuren waren z. T. Handelsware (Fluka, Buchs; Th. Schuchardt, München), oder sie wurden präparativ hergestellt. Die Darstellung der N-Benzoylaminosäuren erfolgte durch Aminolyse von Benzoylchlorid analog der Methode von Schotten und Baumann in alkal. Lösung. Ihre Reinigung erfolgte durch Umfällung sowie Behandlung mit Petroläther zur Entfernung allenfalls vorhandener Benzoesäure. N-Acetylaminosäuren wurden analog dem Verfahren von Edsall<sup>48</sup> dargestellt. Die Reinheit der Präparate wurde papierchromatographisch (frei von Aminosäuren) sowie durch Bestimmung der Schmelzpunkte überprüft (Tab. 1).

Die für orientierende Untersuchungen eingesetzten Peptide waren Handelsware.

## Versuche und Ergebnisse

### 1. Kultivierungsversuche zur Gewinnung enzymreicher Mycelpräparate

#### *Konidiensuspensionen*

Zur Gewinnung größerer Konidienmengen als Impfmateriale hat es sich bewährt, analog der Praxis bei industriellen Pilzgärungen Oberflächenskulturen auf Rollgerste anzulegen. Hierzu wurden z. B. 100 g Rollgerste nach sorgfältigem Waschen in fließendem Wasser in 100 ml einer Lösung nachstehender Zusammensetzung durch 30 Min. gewicht: Lactose 30 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,1 g/l, Cornsteep-liquor solids 0,85 g/l. Nach Abgießen der Lösung wurde die feuchte Gerste in 1 bis 2 cm hoher Schicht in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit Watteverschluß verteilt und bei 120° C fraktioniert sterilisiert. Nach Beimpfung mit etwa 1 ml einer Konidiensuspension aus einem Schrägagarröhrchen wurde etwa eine Woche lang unter gelegentlichem Aufschütteln bei 25° C bebrütet. Durch Schütteln mit 150 ml steriler physiolog. NaCl-Lösung wurde eine Konidiensuspension erhalten, die nach Abtrennung von der Rollgerste bei 4° C mehrere Wochen lang haltbar ist. Die Ermittlung der Konidienkonzentration erfolgte durch Zählung in der Thomaschen Zählkammer.

<sup>47</sup> M. Röhr, F. Baumann und R. Brunner, Mh. Chem. (im Druck).

<sup>48</sup> Z. Edsall, J. Amer. Chem. Soc. 59, 2245 (1937).

*Kultivierung am Kreisschüttler*

1000 ml-Weithals-Erlenmeyerkolben mit Wattehaubenverschluß nach Janke<sup>49</sup> und 150 ml Nährlösung der nachstehenden Zusammensetzung wurden nach der Sterilisation mit 5–10 ml Konidiensuspension beimpft und bei 25–26° C am Kreisschüttler bei 150 U/min inkubiert.

## Zusammensetzung der Nährlösung:

	(g/Liter)
Glucose	40
Ammoniumacetat	3
Natriumacetat	2
Hefeextrakt (Difco)	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,02
Natriumhippurat	3,58 = 20 mMol
pH (vor der Sterilisation)	6,5

Nach einer Kultivierungsdauer von 72 bis 96 Stdn. wurde das erhaltene Submersmycel auf Trockenpräparate aufgearbeitet.

*Trockenmycelpräparate*

Zur Bereitung von Trockenmycelpräparaten wurde das Mycel nach Abtrennung der Nährlösung durch einen Büchnertrichter und Waschen mit Eiswasser durch dreimalige Behandlung mit der zehnfachen bis zwanzigfachen Menge Aceton von –20° C unter weitgehender Zerkleinerung entwässert und nach Entfernung des anhaftenden Acetons im Luftstrom eines Ventilators in verschlossenen Gefäßen über Silicagel bei Raumtemp. gelagert. Zur Ermittlung des Enzymgehaltes wurden Proben von 100 mg in 5 ml einer Lösung von Natriumhippurat bei pH 7,5 und 37° C inkubiert, in Abständen von 1–5 Min. Proben von 10 µl gezogen und die Spaltungsgeschwindigkeit mittels der modifizierten Methode von Gaffney<sup>46</sup> aus der jeweils noch vorhandenen Menge Hippurat bestimmt. Der Enzymgehalt wird zweckmäßig in Enzymeinheiten pro Gramm Trockenmycel angegeben, wobei 1 Enzymeinheit (1 *EE*) die Enzymmenge angibt, die die Hydrolyse von 1 µMol Hippurat pro Min. bei pH 7,5 und 37° C bewirkt. Die unter den angegebenen Bedingungen erhaltenen Präparate hatten Enzymgehalte, die zwischen 70 und 140 *EE* pro Gramm Trockenmycel schwankten. In dem Bestreben, die Reproduzierbarkeit der induzierten Enzymbildung zu verbessern, insbesondere aber mit dem Ziel einer genaueren Kenntnis des Zeitpunktes der maximalen Enzymproduktion wurde eine Reihe von Untersuchungen zur Klärung der zwischen den Kulturbedingungen und der Enzymsynthese bestehenden Zusammenhänge durchgeführt.

*Einfluß der Einsaatmenge*

Vorversuche hatten ergeben, daß die hinsichtlich einer befriedigenden Enzymausbeute und -stabilität anzustrebenden pH-Werte am Fermentations-

<sup>49</sup> A. Janke, Arch. Mikrobiol. **17**, 155 (1952).

ende offenbar stark von den bei der Beimpfung eingesetzten Menge an Konidien beeinflußt werden. Es wurden daher parallele Kultivierungsversuche in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt, bei denen gestufte Einsaatmengen angewandt wurden, so daß am Versuchsbeginn folgende Konidienkonzentrationen vorlagen:  $1,5 \cdot 10^3$ ;  $1,5 \cdot 10^4$ ;  $1,5 \cdot 10^5$ ;  $1,5 \cdot 10^6$  Konidien/ml. Im Verlauf der Versuche wurden in Intervallen von 6 Stdn. die pH-Werte der Fermentationsmedien gemessen und nach Beendigung der Versuche (72 Stdn.) die erhaltenen Enzymaktivitäten bestimmt (Abb. 1).

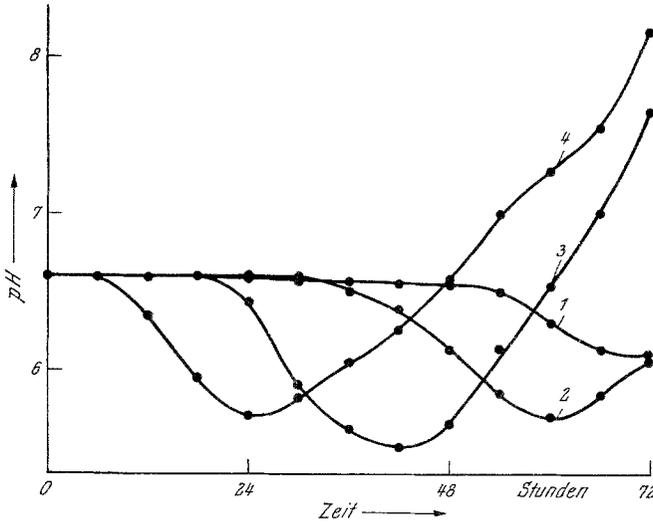


Abb. 1. Einfluß der Einsaatmenge auf pH-Verlauf und Enzymausbeuten

Kurve	Konidien/ml	Enzymaktivität in EE/g nach 72 Stdn.
1	$1,5 \cdot 10^3$	37
2	$1,5 \cdot 10^4$	59
3	$1,5 \cdot 10^5$	102
4	$1,5 \cdot 10^6$	87

Wie die Versuchsergebnisse ersehen lassen, zeigen die pH-Kurven unter den gegebenen Bedingungen einen charakteristischen Verlauf, der sich im Durchschreiten eines pH-Minimums äußert, das sich mit geringerer Einsaat infolge der langsameren Mycelvermehrung später einstellt, sowie einem darauffolgenden Anstieg, der, wie auch spätere Versuche zeigten, bei niedriger Einsaat sehr gering sein kann, bei hoher Einsaat hingegen bis zu pH-Werten über 8 führt, bei denen das Enzym bereits sehr geringe Stabilität aufweist. Dementsprechend wurden auch bei der Konidienkonzentration von  $1,5 \cdot 10^3$  und  $1,5 \cdot 10^4$  geringe, bei  $1,5 \cdot 10^5$  maximale und bei  $1,5 \cdot 10^6$  wieder etwas geringere Enzymaktivitäten erhalten.

### Enzymbildungsverlauf

Die folgenden Versuche sollten nun Einblick in den Verlauf der Enzymbildung in Zusammenhang mit den während der Kultivierung sich ändernden Bedingungen, wie pH-Wert, Glucose- und Hippuratgehalt sowie dem Mycelgewicht, geben und damit auch Daten, die eine einfache Ermittlung des Zeitpunktes der maximalen Enzymproduktion erlauben.

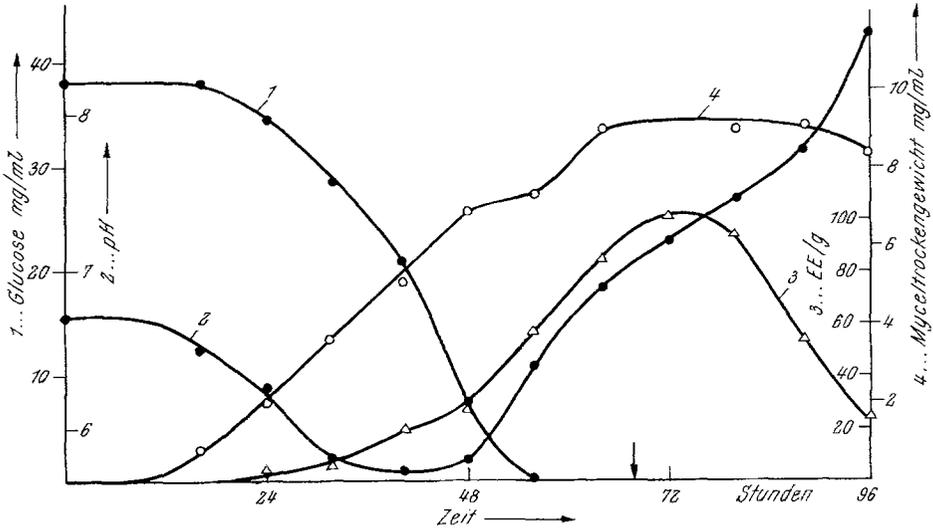


Abb. 2. Enzymbildungsverlauf in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen.

Kurve 1: Glucosegehalt in mg/ml; Kurve 2: pH-Wert; Kurve 3: Enzymgehalt in  $EE/g$  Trockenmycel; Kurve 4: Myceltrockengewicht in mg/ml. In dem auf der Abszisse durch einen Pfeil kenntlich gemachten Zeitpunkt war im Nährmedium kein Hippurat mehr nachweisbar

1000 ml-Weithals-Erlenmeyerkolben mit je 100 ml der oben angegebenen Nährlösung wurden so beimpft, daß die Anfangskonzentration an Konidien  $5,5 \cdot 10^5$  betrug. In Abständen von 8 Stdn. wurde aus einem Kolben nach Bestimmung des Glucosegehaltes und des pH-Wertes sowie Prüfung auf Hippurat im Nährmedium das Mycel zu einem Acetontrockenpräparat aufgearbeitet und dessen Gewicht sowie der Enzymgehalt in der bereits beschriebenen Weise ermittelt (Abb. 2).

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, beginnt die Enzymbildung in der Phase der exponentiellen Vermehrung und verläuft optimal in der darauffolgenden Phase abnehmender Vermehrungsgeschwindigkeit. Der Zeitraum der maximalen Enzymproduktion ist einerseits dadurch gekennzeichnet, daß die pH-Kurve nach Durchschreiten des Minimums den Neutralpunkt überschreitet, andererseits dadurch, daß im Nährmedium

kein Hippurat mehr nachgewiesen werden kann. Durch diese Daten ist eine einfache Ermittlung des Zeitraumes der maximalen Enzymproduktion möglich. Die hier erhaltenen Ergebnisse wurden in einer Reihe analoger Versuche reproduziert.

Mit der angegebenen Arbeitsweise gelang es, in der oben angeführten Nährlösung unter Einsatz der bereits in einer vorangegangenen Arbeit<sup>40</sup> als optimal ermittelten Induktorkonzentration von 20 mMol/l sowie einer Konidienkonzentration von  $1 \cdot 10^5$  bis  $5 \cdot 10^5$  Konidien/ml nach einer 72 bis 96 Stdn. dauernden Kultivierung ein enzymreiches Mycel bei einem End-pH der Nährlösung von 7,0 bis 7,5 zu gewinnen, dessen Enzymgehalt gut reproduzierbar war, so daß eine Isolierung des Enzyms in präparativem Maßstab möglich war.

Desgleichen war es unter Anwendung der erhaltenen Erfahrungen möglich, Kultivierungsversuche in Fermentatoren mit einem Fassungsvermögen von 3 und 10 l (New Brunswick) unter analogen Bedingungen mit befriedigendem Erfolg durchzuführen, wenngleich die in der Schüttelkultur erzielten Mycelaktivitäten nicht zu erreichen waren. Versuche, durch zeitlich gestufte Zugabe des Induktors die Enzymausbeute zu erhöhen, brachten keine Erfolge.

## 2. Reinigung und Anreicherung des Enzyms

### *Extraktion*

Versuche zur Extraktion des Enzyms aus den Aceton-trockenpräparaten mit Wasser oder Neutralsalzlösungen verschiedener Ionenstärke über Perioden von mehreren Stdn. ergaben nur geringe Ausbeuten. Nur wenig besser verliefen Versuche zur Anwendung der sog. Butanol-Methode nach Morton<sup>50</sup>, die in der Annahme durchgeführt wurden, das Enzym liege in Form eines Lipoproteinkomplexes vor. Ausgezeichnete Erfolge brachten jedoch Extraktionsversuche, die bei pH-Werten über 7 ausgeführt wurden. Folgende Arbeitsweise hat sich gut bewährt:

20 g Aceton-trockenmycel werden mit 400 ml 0,05*m*-Diammoniumphosphatlösung (pH 7,9) versetzt, durch 2 Stdn. bei Raumtemp. kräftig geschüttelt oder gerührt und sodann in der Kühlzentrifuge durch 30 Min. bei 0° C und 6000 U/min zentrifugiert. Es werden etwa 360 ml eines schwach opaleszierenden Extraktes mit einem pH-Wert von ungefähr 7 erhalten, der unter günstigen Bedingungen über 80% der im Mycel vorhandenen Enzymmenge enthält.

Wie sich jedoch zeigte, ist eine so hohe Extraktionsausbeute nur erzielbar, wenn das Aceton-trockenmycel durch mehrere Wochen bei Raumtemp. gelagert war, wobei offenbar gewisse Autolysevorgänge wirksam werden. Frisch hergestellte Trockenmycelpräparate sind hingegen kaum extrahierbar. In diesem Fall hat sich die Extraktion unter Anwendung von Abrasivmitteln bewährt:

<sup>50</sup> R. K. Morton, in: S. P. Colowick und N. O. Kaplan (edit.), *Methods in Enzymol.* 1, 25, Acad. Press, New York 1955.

20 g Acetonrockenmycel werden mit 20 g Diatomeenerde (Hyflo Supercel, Johns Manville, Baltimore) innig vermischt und 15 Min. mit 100 ml 0,05*m*-Diammoniumphosphatlösung (pH 7,9) in einer Reibschale verrieben. Sodann wird mit weiteren 200 ml Diammoniumphosphatlösung 30 Min. unter Rühren bei Raumtemp. extrahiert. Nach Abschleudern in der Kühlzentrifuge bei 0° C und 6000 U/min durch 30 Min. wird der Rückstand wenige Minuten mit 200 ml Diammoniumphosphatlösung extrahiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Die vereinigten, stark opaleszierenden Überstände (etwa 400 ml) enthalten durchschnittlich 50 bis 80% der im Mycel enthaltenen Enzymmenge.

#### *Darstellung einer gereinigten Enzympräparation*

Die Reinigung des Enzyms stößt, wie die nachfolgend angeführten Versuche zeigen, infolge seiner geringen Stabilität auf zahlreiche Schwierigkeiten. Das Enzym ist äußerst empfindlich gegenüber extremen pH-Werten, so daß eine Vorreinigung durch selektive Denaturierung auf diesem Wege unmöglich ist: Das Enzym wird bei pH-Werten unter 5 und über 10 innerhalb weniger Min. völlig zerstört. Ebenso ist bei Dialyse des Extraktes gegen Leitungswasser innerhalb weniger Stdn. und bei Versuchen zur Entsalzung durch Gelfiltration über Sephadex G 25 (coarse) innerhalb von 10 bis 20 Min. ein Aktivitätsabfall von über 80% zu beobachten. Umfangreiche Versuche zur fraktionierten Fällung mit Lösungsmitteln, wie Äthanol oder Aceton, ergaben auch bei — 25° C stets Aktivitätsverluste von über 80%.

Ebenso hohe Verluste wurden auch bei Versuchen zur fraktionierten Gelfiltration über Sephadex G 75, G 100, G 150 und G 200 unter Anwendung von Puffern verschiedener Ionenstärke bei pH 7,5 an gekühlten Säulen erhalten.

Es gelang jedoch ein Reinigungsverfahren auszuarbeiten, das eine über hundertfache Anreicherung des Enzyms bei einer Endausbeute von über 60% gestattet. Dieses wird im folgenden beschrieben:

#### *1. Hitzefällung*

Der aus dem Acetonrockenmycel gewonnene Extrakt wird nach Einstellen von pH 7,5 in einem dünnwandigen Glaskolben in einem thermostatierten Wasserbad unter guter Durchmischung durch Drehen des Kolbens rasch auf 50° C erhitzt, genau 5 Min. bei 50° C gehalten und durch Einbringen des Kolbens in Eiswasser unter Schwenken rasch auf etwa 10° C gekühlt. Die entstandene dichte Fällung von Begleitstoffen wird 30 Min. bei 0° C und 6000 U/min abgeschleudert.

#### *2. Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat*

Der Überstand nach Zentrifugation der Hitzefällung wird unter guter Rührung und Kühlung im Eiswasserbad innerhalb 20 bis 30 Min. mit der zum Erreichen des Sättigungsgrades 0,45 nötigen Menge von festem Ammoniumsulfat versetzt; der auf etwa 6,2 gefallene pH-Wert wird auf 7,2 gebracht, anschließend 15 Min. bei 0° C gerührt und bei 6000 U/min 30 Min. zentrifugiert. Die abgeschleuderte Fällung, die praktisch keine Aktivität aufweist, wird verworfen, der Überstand unter denselben Bedingungen mit der zum Erreichen des Sättigungsgrades 0,65 nötigen Menge festen Am-

moniumsulfates versetzt, 15 Min. im Eiswasserbad gerührt und erneut 30 Min. bei 0° C und 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Proteinfällung in einer geringen Menge 0,05m-Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst. Hierbei soll möglichst wenig Ammoniumsulfat mitgeschleppt werden.

### 3. Selektive Adsorption an Calciumphosphatgel

Die nach den vorstehenden Operationen vorliegende Lösung mit einem pH-Wert von 7,5 wird mit 50% ihres Volumens einer Suspension von Calciumphosphatgel nach *Keilin* und *Hartree*<sup>51</sup> (50 mg/ml Trockensubstanz) gut vermischt. Das Calciumphosphatgel ist vor der Zugabe auf einen pH-Wert von 7,3 bis 7,5 einzustellen. Sodann wird 5 Min. bei 0° C und 6000 U/Min. geschleudert und der Überstand verworfen. Die Elution des Enzyms aus dem Gel erfolgt durch Zugabe des ursprünglichen Volumens an 0,1m-Phosphatpuffer pH 7,5 mit Zusatz von 10% Ammoniumsulfat. Die nach kräftigem Rühren (5 bis 10 Min.) und anschließender Zentrifugation (10 Min.) bei 0° C und 6000 U/Min. erhaltene Enzymlösung wird bei -20° C eingefroren.

Der Verlauf eines typischen Reinigungsversuches ist in Tab. 2 übersichtlich dargestellt.

Der Reinigungseffekt in den Stufen der zweiten Ammoniumsulfatfällung und der Adsorption an Calciumphosphatgel wurde durch Gelfiltration an Sephadex G 100 (fine) verfolgt. Die auf +5° C gekühlte Säule (2,5 cm × 45 cm) war mit einem Adapter zur Förderung des Elutionsmittels von unten nach oben versehen. Proben von jeweils 1 ml der Enzymlösung nach der zweiten Ammoniumsulfatfällung bzw. 3 ml nach der Elution aus dem Calciumphosphatgel wurden mittels einer peristaltischen Pumpe am unteren Ende der Säule eingebracht und mit 0,01m-NaCl-

<sup>51</sup> D. *Keilin* und E. F. *Hartree*, Proc. roy. Soc. B, **124**, 397 (1938).

Tabelle 2. Verlauf der Enzymanreicherung

Fraktion	Volumen ml	EE/ml	EE total	Protein mg/ml	spezif. Aktivität E/E/mg Protein	Ausbeute %	Anreicherungsgrad
Extrakt	390	1,25	488	18,9	0,066	100	1
Hitzefällung	380	1,26	475	12,7	0,098	97	1,5
Ammoniumsulfat 0,45—0,65	20	22,5	450	10,9	2,065	92	31
Calciumphosphatgel 0,50	20	16	320	1,84	8,70	67	132

Lösung pH 7,0 eluiert. Die Aufnahme von Elutionskurven erfolgte durch kontinuierliche Messung der optischen Durchlässigkeit im Eluat bei 254 nm in einem Photometer mit Durchfluß-Quarzzelle (Uvicord I, LKB, Stockholm) und Registrierung mittels eines Fallbügelschreibers; Elutionskurven s. Abb. 3 und 4.

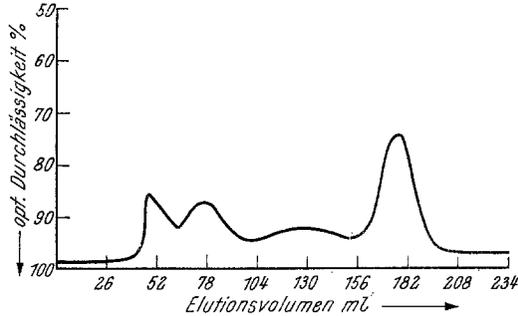


Abb. 3. Elutionskurve der Enzympräparation nach der Ammoniumsulfatfraktionierung bei Gelfiltration durch Sephadex G 100 (Versuchsbedingungen vgl. Text). Durchflußgeschwindigkeit 26 ml/Stde. Ordinate: Optische Durchlässigkeit bei 254 nm in Prozent. Abszisse: Elutionsvolumen in ml

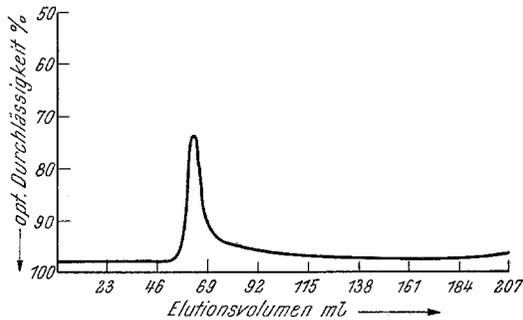


Abb. 4. Elutionskurve der Enzympräparation nach der Fraktionierung an Calciumphosphatgel bei Gelfiltration durch Sephadex G 100 (Versuchsbedingungen vgl. Text). Durchflußgeschwindigkeit 23 ml/Stde. Ordinate: Optische Durchlässigkeit bei 254 nm in Prozent. Abszisse: Elutionsvolumen in ml

Durch den beschriebenen Reinigungsvorgang, der bis zur Stufe der Ammoniumsulfatfraktionierung etwa 50mal und bis zur Stufe der Adsorption an Calciumphosphatgel über 10mal mit gutem Erfolg reproduziert werden konnte, war eine weitgehend gereinigte und mehr als hundertfach angereicherte Enzympräparation erzielbar, die für Studien zur Substratspezifität im Hinblick auf eine Differenzierung gegenüber bekannten

Aminosäureacylasen sowie für die Untersuchung der wichtigsten Enzym-eigenschaften ausreichend geeignet erschien.

### 3. Untersuchungen zur Substratspezifität

Die Untersuchung der Substratspezifität verfolgte mehrere Zielsetzungen:

a) Kenntnis der Spezifität des Enzyms gegenüber den der Hippursäure analogen N-Benzoylaminosäuren;

b) Vergleich der Substratspezifität gegenüber N-Benzoyl- und N-Acetylaminosäuren zur Differenzierung des Enzyms von den bekannten Aminosäureacylasen;

c) Untersuchung der Spaltung von einfachen Peptiden als Substraten von Exopeptidasen wie Carboxypeptidase A und B sowie Di- und Tripeptidase, da bei diesen Enzymen zum Teil auch Aminosäureacylaseaktivität beobachtet wurde.

Um für alle im folgenden durchgeführten Versuche ein Enzympräparat gleicher Beschaffenheit zu erhalten, wurden 300 ml aus 15 Ammoniumsulfatfraktionen vereinigt und nach Behandlung mit Calciumphosphatgel in der beschriebenen Weise mit 300 ml 0,05*m*-Phosphatpuffer unter Zusatz von 10% Ammoniumsulfat eluiert. Da sich diese Enzymlösung für die vorzunehmenden Spezifitätsuntersuchungen als zu verdünnt erwies, wurde sie mit der zum Erreichen des Sättigungsgrades 0,7 nötigen Menge Ammoniumsulfat versetzt und die erhaltene Fällung in 50 ml 0,05*m*-Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst. Diese Lösung wurde in für jeweils 1 bis 3 Versuche ausreichenden Mengen geteilt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Sie hatte einen Enzymgehalt von 42 Enzymeinheiten pro ml bei einem Proteingehalt von 5,75 mg/ml und war etwa 110fach angereichert.

Die Durchführung der Versuche erfolgte unter vergleichbaren Bedingungen in nachstehender Weise:

Die Substrate wurden in einer Konzentration von 56  $\mu\text{Mol/ml}$  bezogen auf den Anteil an N-Acyl-L-aminosäure unter Neutralisation mit NaOH in Wasser gelöst und nach Einstellen von pH 7,5 auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Die eingefrorenen Enzymlösungen wurden kurz vor dem Versuch aufgetaut und bis zum Versuchsbeginn bei  $+5^{\circ}\text{C}$  gehalten. Der Versuch wurde durch Zugabe von 0,50 bzw. 1,00 ml Enzymlösung zu 6 bzw. 12 ml Substratlösung in einem auf  $37^{\circ}\text{C}$  thermostatierten und mit Magnetrührung versehenen Gefäß gestartet. Zur Zeit Null sowie nach 10, 20, 30, 40 und 50 Min. (im Falle des N-Benzoylglycins nach 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Min.) wurden Proben von genau 1 ml entnommen und in der angegebenen Titrationsapparatur mit 0,1*n*-NaOH rasch auf pH 11,0 titriert. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen wurden im Diagramm Titrantverbrauch/Zeit aus dem linearen Kurventeil ermittelt und daraus die spezifischen Enzymaktivitäten errechnet.

#### 1. Hydrolyse von N-Benzoylaminosäuren

Die Ergebnisse der Spaltungsversuche mit N-Benzoylaminosäuren als Substraten sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. Hydrolyse von N-Benzoylaminosäuren

Versuchsansätze: 12 ml Substrat (112  $\mu$ Mol N-Benzoyl-D,L-aminosäure bzw. 56  $\mu$ Mol N-Benzoyl-L-aminosäure/ml), 1 ml Enzymlösung (Proteingehalt 5,75 mg/ml), pH 7,5, 37° C

N-Benzoyl-aminosäure	Verbr. 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz ml	Spezif. Aktivität $\mu$ Mol/min · mg Enzymprotein
N-Benzoyl-glycin	0,157	7,30
	0,323	
	0,480	
	0,515	
	0,516	
N-Benzoyl-D,L-serin	0,149	3,37
	0,284	
	0,408	
	0,496	
	0,519	
N-Benzoyl-D,L-alanin	0,083	1,88
	0,166	
	0,255	
	0,347	
N-Benzoyl-D,L-asparaginsäure	0,064	1,44
	0,119	
	0,158	
	0,195	
N-Benzoyl-D,L-methionin	0,039	0,89
	0,071	
	0,103	
	0,133	
N-Benzoyl-L-tyrosin	0,029	0,66
	0,057	
	0,069	
	0,080	
N-Benzoyl-D,L-leucin	0,028	0,63
	0,050	
	0,075	
	0,088	
N-Benzoyl-D,L-threonin	0,113	0,63
	0,028	
	0,048	
	0,066	
	0,082	
	0,094	

Fortsetzung (Tabelle 3)

N-Benzoyl-aminosäure	Verbr. 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz ml	Spezif. Aktivität $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ Enzymprotein
N-Benzoyl- D,L-glutamin- säure	0,028	0,63
	0,048	
	0,060	
	0,081	
	0,089	
N-Benzoyl- D,L-allo- isoleucin	0,027	0,61
	0,048	
	0,052	
	0,057	
N-Benzoyl- D,L-histidin	0,064	0,61
	0,027	
	0,040	
	0,044	
N-Benzoyl- D,L-arginin	0,048	0,57
	0,059	
	0,025	
	0,039	
N-Benzoyl- D,L-phenyl- alanin	0,054	0,54
	0,069	
	0,082	
	0,023	
	0,042	
N-Benzoyl- D,L-valin	0,057	0,45
	0,075	
	0,089	
	0,020	
N-Benzoyl- (S-Benzyl)- D,L-cystein	0,033	0,45
	0,041	
	0,055	
	0,062	
N-Benzoyl- D,L-trypto- phan	0,020	0,24
	0,022	
	0,023	
	0,024	
	0,011	
	0,013	
	0,021	
	0,016	
	0,022	

Wie aus Tab. 3 ersichtlich, wird Hippurat am schnellsten hydrolysiert, gefolgt von den ähnlich aufgebauten Substraten N-Benzoyl-D,L-serin und N-Benzoyl-D,L-alanin. Relativ schnell ist auch N-Benzoyl-D,L-

asparaginsäure spaltbar; hingegen wird N-Benzoyl-D,L-glutaminsäure bedeutend langsamer angegriffen. N-Benzoyl-D,L-methionin sowie N-Benzoyl-L-tyrosin und N-Benzoyl-D,L-leucin weisen mittlere Spaltungsgeschwindigkeiten auf, während die Derivate der restlichen aromatischen sowie die der basischen und verzweigten Aminosäuren als gering spaltbare Substrate zu bezeichnen sind.

### 2. *Hydrolyse von N-Acetylaminosäuren*

Die Ergebnisse der Versuche mit N-Acetylaminosäuren als Substraten sind in Tab. 4 angeführt.

Wie aus Tab. 4 zu ersehen, weicht bei der Spaltung der N-Acetylaminosäuren die Reihenfolge der Substrate in bezug auf ihre Spaltungsgeschwindigkeit beträchtlich von jener der N-Benzoylaminosäuren ab.

N-Acetyl-glycin wird nur sehr langsam hydrolysiert, N-Acetyl-D,L-alanin und N-Acetyl-L-cystein dagegen sehr schnell. Auch werden die N-Acetyl-derivate der aromatischen Aminosäuren im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den N-Benzoylaminosäuren schneller umgesetzt als die N-Acetyl-derivate der Aminodicarbonsäuren. Bezüglich der daraus zu ziehenden Schlüsse in Richtung einer Differenzierung des vorliegenden Enzyms von der bekannten Aminoacylase sei auf die Diskussion verwiesen.

### 3. *Hydrolyse von Peptiden*

In das Studium der Substratspezifität wurden auch Peptide einbezogen, da einerseits z. B. bekannt ist, daß Aminoacylase Dipeptide zu spalten vermag, andererseits die den Aminosäureacylasen am nächsten stehenden Carboxypeptidasen, die bevorzugt Peptidsubstrate hydrolysieren, bei denen die der Carboxyl-terminalen Aminosäure benachbarte Aminosäure keine freie Aminogruppe aufweist, auch Aminosäureacylase-wirkung zeigen.

#### a) *Hydrolyse von Glycylglycin*

Dieses Substrat wird von Aminoacylase gespalten und ist daneben das bevorzugte Substrat der Glycylglycin-dipeptidase (E. C. 3.4.3.1). Spaltungsversuche in Ansätzen von 6 ml mit 56  $\mu$ Mol/ml Glycylglycin und 0,5 ml Enzymlösung zeigten innerhalb einer Versuchszeit von 30 Min. keine meßbare Hydrolyse.

#### b) *Hydrolyse von Glycyl-L-leucin*

Auch dieses Substrat wird von Aminoacylase hydrolysiert; es ist daneben das bevorzugte Substrat der Glycylleucin-dipeptidase (E. C. 3.4.3.2). Das Ergebnis eines Spaltungsversuches mit diesem Substrat ist aus Tab. 5 ersichtlich.

Tabelle 4. Hydrolyse von N-Acetylamino-säuren

Versuchsansätze: 6 ml Substrat (112  $\mu$ Mol N-Acetyl-D,L-aminosäure bzw. 56  $\mu$ Mol N-Acetyl-L-aminosäure/ml), pH 7,5, 37° C

N-Acetyl-aminosäure	Verbr. 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz ml	Spezif. Aktivität $\mu$ Mol/min · mg Enzymprotein
N-Acetyl-D,L-alanin	0,034	0,77
	0,050	
	0,066	
	0,082	
	0,096	
N-Acetyl-L-cystein *	0,033	0,75
	0,056	
	0,057	
	0,060	
	0,070	
N-Acetyl-D,L-tryptophan	0,021	0,59
	0,036	
	0,046	
	0,059	
	0,071	
N-Acetyl-D,L-phenylalanin	0,020	0,45
	0,035	
	0,046	
	0,054	
	0,065	
N-Acetyl-D,L-methionin	0,020	0,35
	0,031	
	0,042	
	0,053	
	0,063	
N-Acetyl-D,L-asparagin-säure	0,013	0,30
	0,022	
	0,029	
	0,031	
	0,041	
N-Acetyl-glycin	0,012	0,28
	0,017	
	0,023	
	0,030	
	0,033	
N-Acetyl-L-glutamin-säure	0,012	0,28
	0,016	
	0,025	
	0,028	
	0,037	

\* Titration auf pH 11,75 (vgl.<sup>47</sup>).

Fortsetzung (Tabelle 4)

N-Acetyl-aminosäure	Verbr. 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz ml	Spezif. Aktivität $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ Enzymprotein
N-Acetyl-	0,009	
D,L-valin	0,016	
	0,024	0,21
	0,030	
	0,037	

Tabelle 5. Hydrolyse von Glycyl-L-leucin

Versuchsansatz: 4 ml Glycyl-L-leucin (56  $\mu\text{Mol}/\text{ml}$ ) 0,33 ml Enzymlösung (Proteingehalt 5,75 mg/ml) pH 7,5, 37° C

Zeit, Min.	Verbr. 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz ml	Spezif. Aktivität $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ Enzymprotein
10	0,056	
20	0,105	1,28
30	0,141	

## c) Hydrolyse von Benzoyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanin

Dieses Substrat ist das optimale synthetische Substrat für Carboxypeptidase A (E. C. 3.4.2.1). Das Ergebnis eines Spaltungsversuches mit diesem Substrat ist aus Tab. 6 ersichtlich.

Tabelle 6. Hydrolyse von Benzoyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanin

Versuchsansatz: 4 ml BOC-glycyl-L-phenylalanin (35  $\mu\text{Mol}/\text{ml}$ ) 0,33 ml Enzymlösung (Proteingehalt 5,75 mg/ml) pH 7,5, 37° C

Zeit, Min.	Verbr. 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz ml	Spezif. Aktivität $\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ Enzymprotein
10	0,093	
20	0,182	2,12
30	0,240	

## d) Hydrolyse von Glycyl-glycyl-glycin

Dieses Tripeptid ist ein Substrat der Aminotripeptidase (E. C. 3.4.1.3). Es erschien aber auch deshalb interessant, die Spaltung dieses Substrates zu untersuchen, da die sogen. Hefecarboxypeptidase (E. C. 3.4.2.3) abweichend von Carboxypeptidase A auch zur Abspaltung von C-termi-

nalem Glycin aus Oligopeptiden und N-substituierten Peptiden befähigt ist.

Das Ergebnis eines Spaltungsversuches mit Glycyl-glycyl-glycin ist in Tab. 7 angeführt.

Tabelle 7. Hydrolyse von Glycyl-glycyl-glycin

Versuchsansatz: 4 ml Glycyl-glycyl-glycin (56  $\mu$ Mol/ml) 0,33 ml Enzymlösung (Proteingehalt 5,75 mg/ml) pH 7,5, 37° C

Zeit, Min.	Verbr. 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz ml	Spezif. Aktivität $\mu$ Mol/min · mg Enzymprotein
10	0,036	
20	0,072	0,82
30	0,112	

Wie die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, besitzt die vorliegende Enzympräparation deutliches Spaltungsvermögen gegenüber gewissen Peptiden. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Präparation auch Anteile von Peptidasen enthalten könnte, so daß eine endgültige Klärung erst nach Vorliegen einer noch höher gereinigten Enzympräparation möglich sein dürfte. Bezüglich der Differenzierung des Enzyms von den genannten Peptidasen sei auf die Diskussion verwiesen.

### Diskussion

Das im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen isolierte und partiell gereinigte Enzym ist eine induzierte Aminosäureacylase. Wie die Ergebnisse der Versuche zur Substratspezifität zeigen, werden durch das Enzym N-Benzoylderivate von Aminosäuren in deutlich stärkerem Maße hydrolysiert als N-Acetylaminosäuren. Es liegt somit ein bedeutender Unterschied gegenüber den in tierischen Organen vorkommenden Enzymen Aminoacylase (3.5.1.14) und Aspartoacylase (3.5.1.15) vor, da diese bevorzugt N-Acetyllderivate von Aminosäuren umsetzen. Besonders augenfällig wird dieser Sachverhalt bei vergleichender Betrachtung der relativen Spaltungsgeschwindigkeiten der einzelnen N-Acylaminosäuren. So werden durch das vorliegende Enzym in abfallender Reihenfolge der Spaltungsgeschwindigkeiten bevorzugt die N-Benzoylderivate von Glycin, Serin, Alanin, Asparaginsäure und Methionin hydrolysiert (N-Benzoylglycin zu N-Benzoylmethionin = 8 : 1) sowie die N-Acetyllderivate von Alanin, Cystein, Tryptophan, Phenylalanin und Methionin, wobei das Verhältnis der Spaltungsgeschwindigkeiten von N-Acetylalanin zu N-Acetylmethionin 2 : 1 beträgt. Aminoacylase spaltet N-Acetyllderivate von Aminosäuren in der Reihenfolge

Methionin, Leucin, Glutaminsäure, Alanin, Valin und Glycin, wobei die Verhältnisse der Spaltungsgeschwindigkeiten N-Acetylmethionin zu N-Acetylalanin 10 : 1 und N-Acetylmethionin zu N-Acetylglycin 50 : 1 betragen. Aspartoacylase spaltet N-Acetylasparaginsäure 3mal schneller als N-Acetylmethionin, und alle anderen N-Acetylaminosäuren langsamer als N-Acetylmethionin. Bezüglich der Spaltung von N-Benzoylaminosäuren durch Aminoacylase sind nur Angaben über die Hydrolyse von N-Benzoylglycin (Hippursäure) bekannt<sup>59</sup>. Aminoacylase spaltet Hippursäure 200- bis 300mal langsamer als N-Acetylmethionin; hingegen spaltet das vorliegende Enzym Hippursäure etwa 12mal schneller als N-Acetylmethionin. Durch dieses Verhalten ist das vorliegende Enzym von den genannten Aminosäureacylasen eindeutig differenziert.

Die relativ gute Spaltung von Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-phenylalanin, dem optimalen synthetischen Substrat von Carboxypeptidase A (3.4.2.1), durch das vorliegende Enzym weist auf die bekannte Verwandtschaft zwischen den Aminosäureacylasen und den Carboxypeptidasen hin. Während jedoch Carboxypeptidase A bevorzugt Derivate aromatischer Aminosäuren, und Carboxypeptidase B (3.4.2.2) bevorzugt solche basischer Aminosäuren angreift, sind die N-Benzoylderivate aromatischer und basischer Aminosäuren für das vorliegende Enzym als sehr ungünstige Substrate zu bezeichnen, wodurch eine Differenzierung von den genannten Carboxypeptidasen hinreichend möglich erscheint. Zu bemerken sei hier, daß auch die von japanischen Forschergruppen studierten Pilzacylasen aus *Aspergillus* und *Penicillium* bevorzugt N-Acetylderivate aromatischer und basischer Aminosäuren umsetzen (vgl. <sup>27</sup>), d. h., daß ihr Verhalten von dem des vorliegenden Enzyms eindeutig abweicht.

Die bevorzugte Hydrolyse von N-Benzoylglycin sowie die beobachtete Spaltung von Glycyl-glycyl-glycin durch das vorliegende Enzym erfordert eine vergleichende Betrachtung der von *Felix* und *Labouesse-Mercoureff*<sup>52</sup> beschriebenen Hefecarboxypeptidase (3.4.2.3); dieses Enzym hydrolysiert bevorzugt N-acylierte Peptide mit carboxylterminalem Leucin oder Glycin. Über die Substratspezifität der Hefecarboxypeptidase liegen nur wenige Angaben vor, doch ermöglichen die von den genannten Autoren für dieses Enzym angegebenen Proteineigenschaften zusätzlich eine klare Differenzierung. Gemäß diesen Angaben ist Hefecarboxypeptidase durch Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungsgrad von 0,7 nicht fällbar, von Calciumphosphatgel nicht ohne völlige Inaktivierung eluierbar und zeigt bei pH 7,5 minimale Stabilität, während das Aktivitätsoptimum bei pH 6,0 liegt. Wie die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, liegen somit völlig entgegengesetzte Befunde vor.

---

<sup>52</sup> *F. Felix* und *J. Labouesse-Mercoureff*, *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 303 (1956); *F. Felix* und *N. Brouillet*, *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 127 (1966).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen somit erkennen, daß es sich bei dem hier studierten Enzym um ein neues Enzymindividuum handelt, dessen bevorzugte Substrate Hippursäure und ähnlich aufgebaute N-Benzoylaminosäuren sind. Es wird daher für das Enzym in Einklang mit den Regeln der International Union of Biochemistry zur Nomenklatur von Enzymen der Trivialname *Hippurathydrolase* sowie die systematische Bezeichnung *N-Benzoylaminosäure-amidohydrolase* vorgeschlagen.

Das Enzym darf nicht mit der ursprünglich als „Hippuricase“ bezeichneten Aminoacylase (Acylase I) tierischen Ursprungs verwechselt werden. Im Gegensatz zu diesem Enzym weist Hippurathydrolase als erstes bekanntes Enzym eine spezifische Spaltungswirkung gegenüber Hippursäure auf.

Über Eigenschaften der Hippurathydrolase sowie über die Biosynthese in anderen Mikroorganismen und die biologische Bedeutung des Enzyms wird in den folgenden Mitteilungen berichtet werden.