

## Hippurathydrolase, ein neues Enzym aus Mikroorganismen, 2. Mitt.:

### Enzymeigenschaften

Von

**M. Röhr**

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

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 21. Juni 1968)

Als charakteristische Eigenschaften des neu aufgefundenen Enzyms Hippurathydrolase werden festgestellt:

1. Die Hydrolyse von Hippursäure und ähnlich aufgebauten N-Benzoylaminosäuren verläuft mit Hippurathydrolase bis zu hohen Umsätzen nach einer Reaktion nullter Ordnung, bez. auf das Substrat. Die spezif. Enzymaktivität wurde bei 37° C und pH 7,5 zu 7,4  $\mu$ Mol Hippurat/Min. · mg Enzymprotein ermittelt. Die *Michaelis*-Konstante für die Hydrolyse von Hippurat beträgt  $5,5 \cdot 10^{-4}$  Mol/l bei 5° C und pH 7,5.

2. Der optimale pH-Bereich der enzymatischen Hydrolyse von Hippurat liegt bei pH 7,5.

3. Die optimale Temperatur der Enzymwirkung ist bei kurz-dauernden Spaltungsversuchen 60° C, doch wird bei dieser Temp. die Grenze der Enzymstabilität in Gegenwart des Substrates erreicht. In Abwesenheit von Substrat wird das Enzym bei 60° C innerhalb 15 Min. völlig inaktiviert. Die enzymat. Aktivität ist wenig temperaturabhängig ( $Q_{10} = 1,17-1,07$ ); im untersuchten Bereich von 20 bis 60° C wurde für die enzymatische Hydrolyse von Hippurat eine Aktivierungsenergie von 2700 cal/Mol bestimmt.

4. HgCl<sub>2</sub> und Parachlormercuribenzoat (*PCMB*) inaktivieren das Enzym. Die Hemmwirkung von *PCMB* ( $10^{-4}$  m) kann durch Cystein ( $10^{-2}$ — $10^{-1}$  m) nicht aufgehoben werden. 8-Hydroxychinolin und *EDTA* hemmen die Enzymwirkung; eine Beteiligung von Metallionen an der katalytischen Funktion von Hippurathydrolase wurde jedoch nicht nachgewiesen.

Characteristic properties of the new enzyme *hippurate hydrolase* are reported:

1. The Michaelis constant for hippurate hydrolysis is  $5.5 \cdot 10^{-4}$  mole/l at 5° and pH 7.5. The specific activity of the purified enzyme preparation is 7.5  $\mu$ mole/minute  $\cdot$  mg enzyme protein at 37° and pH 7.5. The pH optimum is 7.5.

2. The effects of temperature on the reaction rate and on the stability of the enzyme were determined.

3. The effects of various inhibitors (HgCl<sub>2</sub>, pCMB, EDTA, 8-hydroxyquinoline) and cations were studied. Participation of metal ions in the catalytic function of *hippurate hydrolase* was not detectable.

Durch Züchtung in Nährmedien mit Zusatz von Hippurat wird in *Fusarium semitectum* die Bildung eines Enzyms induziert, das bevorzugt zur Hydrolyse von Hippurat und ähnlich aufgebauten N-Benzoylamino-säuren befähigt ist. Vergleichende Untersuchungen zur Substratspezifität mit einer über hundertfach angereicherten Enzympräparation haben ergeben, daß es sich hierbei um ein neues Enzym handelt, für das die Bezeichnung „Hippurathydrolase“ bzw. „N-Benzoylamino-säure-amido-hydrolase“ vorgeschlagen wurde<sup>1</sup>. In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen über charakteristische Eigenschaften dieses Enzyms beschrieben.

## Material und Methoden

### *Enzympräparation*

Die Darstellung der für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Enzympräparation wurde in der 1. Mitt.<sup>1</sup> beschrieben. Die gereinigte Enzymlösung wurde durch Fällung mit der zum Erreichen des Sättigungsgrades 0,7 erforderlichen Menge Ammoniumsulfat und Lösen des gefällten Enzymproteins in einem Viertel des ursprünglichen Volumens 0,05m-Phosphatpuffer (pH 7,5) konzentriert und war etwa 110fach angereichert (Proteingehalt 5,70 mg/ml).

### *Bestimmung der Enzymaktivität*

Die Bestimmung der Enzymaktivität in den einzelnen Versuchen erfolgte durch quantitative Bestimmung der bei der Hydrolyse der Substrate freiwerdenden Aminosäuren durch automatische Mikrotitration<sup>1, 2</sup>. Über die grundsätzliche Arbeitsweise bei der Durchführung der Versuche vgl.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Vgl. Mh. Chem. **99**, 2255 (1968).

<sup>2</sup> M. Röhr, F. Baumann und R. Brunner, Mh. Chem. (im Druck).

## 1. Kinetik der Enzymwirkung

Die Hydrolyse der leicht spaltbaren Substrate N-Benzoylglycin und N-Benzoyl-D,L-serin bis zur praktisch quantitativen Umsetzung wurde unter weitgehend optimalen Bedingungen verfolgt. Wie Abb. 1 zeigt, verläuft die Reaktion unter den angegebenen Bedingungen im Falle von

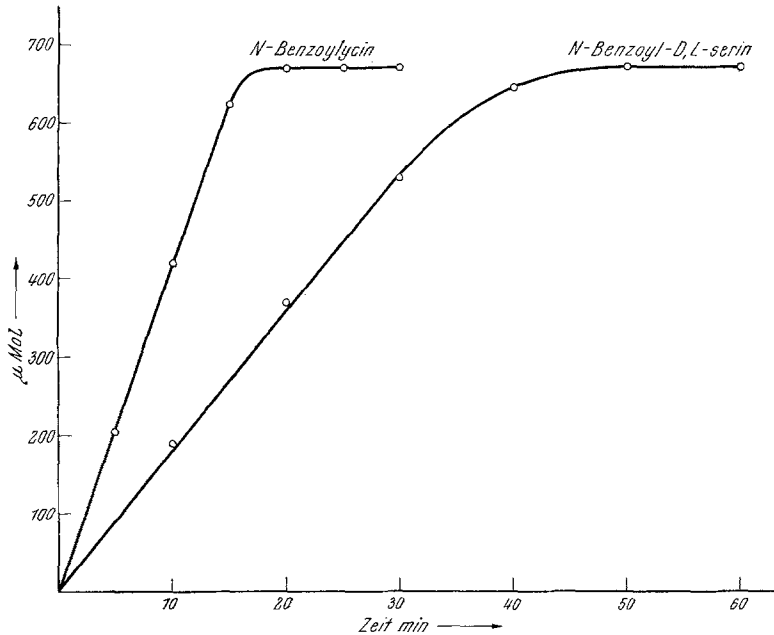
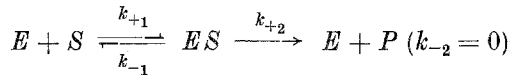


Abb. 1. Hydrolyse von N-Benzoylglycin und N-Benzoyl-D,L-serin. Versuchsansätze: 12 ml Substratlösung (56 µMol/ml N-Benzoylglycin bzw. 112 µMol/ml N-Benzoyl-D,L-serin), 1 ml Enzymlösung (Proteingehalt 5,70 mg/ml) (pH 7,5 37° C). Ordinate: Hydrolysierte N-Acylaminosäure in µMol. Abszisse: Zeit in Min.

N-Benzoylglycin bis zu einer Spaltung von über 95% und im Falle von N-Benzoyl-D,L-serin von über 75% (bez. auf den Anteil an N-Benzoyl-L-serin) nach der nullten Reaktionsordnung bezüglich des Substrates.

Aus den Daten von Abb. 1 ergibt sich für die Hydrolyse von Hippurat unter den angegebenen Bedingungen die Initialgeschwindigkeit  $v_0 = 42,2 \mu\text{Mol/ml} \cdot \text{Min}$ . Diese ist, wie Versuche unter Variation der Substratkonzentration zeigten, im Bereich zwischen 5 und 56 µMol/ml unabhängig von der Substratkonzentration und daher als Sättigungsgeschwindigkeit bzw. maximale Geschwindigkeit  $V = k_{+2} \cdot (E)_0$  entsprechend der Formulierung von *Michaelis* und *Menten*<sup>3</sup>

<sup>3</sup> L. *Michaelis* und M. L. *Menten*, *Biochem. Z.* **49**, 333 (1913).



bei völliger Sättigung des Enzyms mit Substrat aufzufassen; hierbei ist  $k_{+2}$  die Geschwindigkeitskonstante der Zerfallsreaktion des Komplexes  $ES$  aus Enzym  $E$  und Substrat  $S$  gemäß obiger Formulierung und  $(E)_0$  die initiale Enzymkonzentration. Daraus ergibt sich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_{+2} = \frac{V}{(E)_0}$  mit  $7,4 \mu\text{Mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1}$  für eine Enzymkonzentration von  $1 \text{ mg/ml}$ , also eine spezifische Enzymaktivität von  $7,4 \mu\text{Mol/Min.} \cdot \text{mg}$  Enzymprotein für die Hydrolyse von Hippurat bei pH 7,5 und  $37^\circ \text{C}$ .

## 2. Einfluß der Substratkonzentration

Es wurden nun Versuche durchgeführt, die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Hippurat bei Konzentrationen unter  $5 \mu\text{Mol/ml}$  zu messen, um im Bereich der 1. Reaktionsordnung die *Michaelis*-Konstante der Hippuratspaltung ermitteln zu können. Es zeigte sich jedoch, daß auch im Bereich von etwa  $1$  bis  $5 \mu\text{Mol/ml}$  die Reaktion mit maximaler Geschwindigkeit ablief, so daß innerhalb der kürzesten für die Analyse benötigten Zeit (2 Min.) bereits quantitative Spaltung eingetreten war, wodurch eine genaue Erfassung der Spaltungsraten nicht möglich war. Die Ermittlung der *Michaelis*-Konstante wurde daher bei einer tieferen Temperatur,  $+5^\circ \text{C}$ , durchgeführt, bei der die entsprechend erniedrigten Reaktionsgeschwindigkeiten im Konzentrationsbereich von  $0,25$  bis  $10 \mu\text{Mol/ml}$  noch erfaßt werden konnten.

Durchführung: Versuchsansätze mit  $6 \text{ ml}$  Hippuratlösung (pH 7,5) bestimmter Konzentrationen ( $10, 2,50, 0,75, 0,50, 0,25 \mu\text{Mol/ml}$ ) wurden in einem thermostatisierbaren Doppelmantelgefäß mit  $0,2 \text{ ml}$  Enzymlösung (Proteingehalt  $5,70 \text{ mg/ml}$ ) versetzt, nach  $0$  und  $2 \text{ Min.}$  Proben von  $2,5 \text{ ml}$  entnommen und in der beschriebenen Weise mit  $0,1n\text{-NaOH}$  auf pH  $11,0$  titriert. Die Thermostatierung auf  $+5^\circ \text{C}$  erfolgte mittels eines Kryostaten mit Methanol als Kühlflüssigkeit.

Die Ergebnisse sind aus Abb. 2 ersichtlich. Die graphische Auswertung der Daten zur Ermittlung der *Michaelis*-Konstante  $K_m$  sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  erfolgte durch doppelt-reziproke Aufzeichnung nach *Lineweaver—Burk*<sup>4</sup>. Die Lage der Geraden im Diagramm nach *Lineweaver—Burk* (Abb. 2) wurde durch Regressionsrechnung überprüft.

Die Auswertung nach *Lineweaver—Burk* ergibt eine *Michaelis*-Konstante  $K_m = 5,5 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/Liter}$  und eine maximale Geschwindigkeit der Hydrolyse von  $V = 2,9 \mu\text{Mol/ml} \cdot \text{Min.}$  (bei  $+5^\circ \text{C}$  und pH 7,5) gegenüber dem für  $37^\circ \text{C}$  ermittelten Wert von  $V = 7,4 \mu\text{Mol/ml} \cdot \text{Min.}$

<sup>4</sup> H. *Lineweaver* und D. *Burk*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).

### 3. Einfluß des pH-Wertes auf die Enzymaktivität

Die Untersuchungen zur Ermittlung des Einflusses des pH-Wertes auf die Enzymaktivität erfolgten unter Substratsättigungsbedingungen bei 37° C.

Es wurden jeweils Versuchsansätze von 3 ml Hippuratlösung (56  $\mu\text{Mol}/\text{ml}$ ) knapp unter den gewünschten pH-Wert eingestellt, nach Zugabe von 0,2 ml Enzymlösung (Proteingehalt 5,70 mg/ml) dieser pH-Wert durch Titration mit

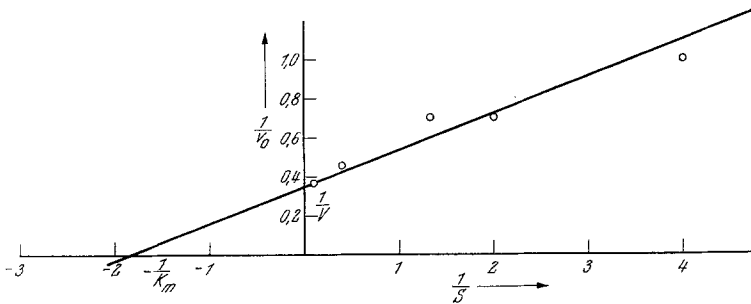


Abb. 2. Ermittlung der maximalen Geschwindigkeit  $V$  sowie der Michaelis-Konstante  $K_m$  nach Lineweaver—Burk<sup>4</sup>

$S$  = Hippuratkonzentration ( $\mu\text{Mol}/\mu\text{l}$ ),  $v_0$  = Anfangsgeschwindigkeit in  $\mu\text{Mol}/\text{ml} \cdot \text{Min.}$  für 1 mg Enzymprotein/ml

der automatischen Titrationsanlage in pH-Stat-Schaltung eingestellt und während der Versuchsdauer genau konstant gehalten. Nach 0, 5 und 10 Min. wurden Proben von 1 ml entnommen und wie oben auf pH 11,0 titriert. So wurde eine unspezif. Beeinflussung der Reaktion vermieden, wie sie bei der sonst nötigen Anwendung mehrerer Arten von Puffern zur Konstanthaltung der pH-Werte auftreten kann. Bei den auf pH 8,75, 9,15 und 9,75 eingestellten Versuchsansätzen liegt das bei der Spaltung freiwerdende Glycin entsprechend seinem  $pK_2$ -Wert von 9,72 gemäß der Beziehung

$$\text{pH} = \text{p}K + \lg \frac{[\text{-R-NH}_2]}{[\text{-R-NH}_3^+]}$$

nur zu einem bestimmten Teil in der titrierbaren Form  $\text{-R-NH}_3^+$  vor. Der tatsächliche Glycinegehalt wurde daher aus dem Titrationswert entsprechend obiger Beziehung berechnet.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Abb. 3 zeigt die erhaltene pH-Aktivitätskurve.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, weist das Enzym optimale Aktivität im Bereich von pH 7 bis 8 auf. Die höchste Spaltungsaktivität wurde bei pH 7,5 beobachtet. Bei Einstellung auf pH 4,3 wird das Enzym unter irreversibler Denaturierung ausgefällt.

Tabelle 1. Einfluß des pH-Wertes auf die Enzymaktivität  
(Versuchsbedingungen vgl. Text)

pH	Zeit Min.	Verbrauch 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml Versuchsansatz ml	Spezif. Aktivität $\mu\text{Mol/Min} \cdot \text{mg Enzymprotein}$
4,3	5	0	0
	10	0	0
5,2	5	0,038	
	10	0,051	1,4
5,45	5	0,056	
	10	0,111	3,1
5,7	5	0,075	
	10	0,148	4,2
6,1	5	0,093	
	10	0,188	5,3
6,6	5	0,092	
	10	0,196	5,5
7,0	5	0,119	
	10	0,230	6,5
7,4	5	0,115	
	10	0,232	6,5
7,5	5	0,127	
	10	0,236	6,6
7,8	5	0,121	
	10	0,228	6,4
7,9	5	0,113	
	10	0,222	6,2
8,0	5	0,110	
	10	0,217	6,1
8,3	5	0,106	
	10	0,211	5,9
8,75	5	0,080	
	10	0,156	4,4
9,15	5	0,057	
	10	0,119	3,3
9,75	5	0,018	
	10	0,022	0,6

## 4. Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität

Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Enzymaktivität wurden Versuchsansätze mit 6 ml Hippuratlösung (Hippuratkonzentration

56  $\mu\text{Mol/ml}$  und 0,15 ml Enzymlösung (Proteingehalt 5,70 mg/ml) im thermostatierten Doppelmantelgefäß bei den in Tab. 2 angegebenen Temperaturen inkubiert; nach 0, 5, 10, 15 und 20 Min. wurden Proben von 1 ml entnommen, sofort auf  $+ 20^\circ \text{C}$  gebracht und bei dieser Temp. titriert. Die aus den Initialgeschwindigkeiten ermittelten spezif. Enzymaktivitäten bei den untersuchten Temperaturen sind in Tab. 2 zusammengestellt.

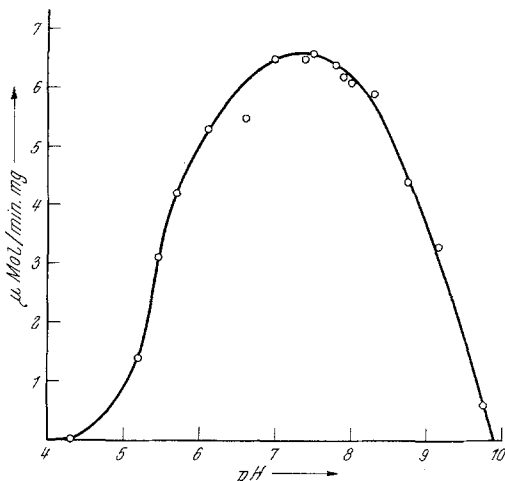


Abb. 3. pH-Aktivitätskurve der Hydrolyse von Hippurat. Ordinate: Spezif. Aktivität in  $\mu\text{Mol./Min.} \cdot \text{mg}$  Enzymprotein. Abszisse: pH-Werte

Wie die in Tab. 2 angeführten Ergebnisse zeigen, liegt die optimale Temp. der Spaltung von Hippurat bei  $60^\circ \text{C}$ . Allerdings nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit nach einer Versuchsdauer von über 10 Min. bereits merklich ab. Bei  $70^\circ \text{C}$  wird das Enzym sehr rasch inaktiviert.

Die in Tab. 2 zusätzlich angegebenen Quotienten  $Q_{10}$  der Reaktionsgeschwindigkeiten für eine Temperaturdifferenz von  $10^\circ \text{C}$  liegen erheblich unter den für gleichartige Reaktionen bekannten Erfahrungswerten von 1,5 bis 2. Es erschien daher interessant, die Aktivierungsenergie der enzymatischen Hydrolyse von Hippursäure zu berechnen.

Diese läßt sich bekanntlich aus der Gleichung von *Arrhenius*

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_A}{R T^2} \text{ bzw. ihrer integrierten Form}$$

$$\lg k = - \frac{E_A}{2,303 R} \cdot \frac{1}{T} + \text{const.}$$

( $k \dots$  Reaktionsgeschwindigkeitskonstante;  $T \dots$  absol. Temp.;  $E_A \dots$  Aktivierungsenergie;  $R \dots$  Gaskonstante) aus der Neigung  $\frac{E_A}{2,303 R}$  der bei

Tabelle 2. Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität  
(Versuchsbedingungen siehe Text)

Temp., °C	Zeit, Min.	Verbrauch 0,1 <i>n</i> -NaOH pro ml ml	Spezif. Aktivität μMol/Min. · mg Enzymprotein	Temperatur- koeffizient $Q_{10}$
20	5	0,035		
	10	0,068		
	15	0,103	4,9	
	20	0,133		1,15
30	5	0,040		
	10	0,078		
	15	0,115	5,6	
	20	0,150		1,17
40	5	0,046		
	10	0,091		
	15	0,137	6,6	
	20	0,184		1,10
50	5	0,049		
	10	0,100		
	15	0,151	7,2	
	20	0,202		1,07
60	5	0,057		
	10	0,107		
	15	0,147	7,7	
	20	0,185		
70	5	0,023		
	10	0,028		
	15	0,034	2,0	
	20	0,034		

Auftragung von  $\lg k$  gegen  $\frac{1}{T}$  erhaltenen Geraden ermitteln, vorausgesetzt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante direkt proportional ist. Dies ist im vorliegenden Fall für die spezif. Enzymaktivität bei Substratsättigung anzunehmen.

Die Auswertung der Daten aus Tab. 2 (vgl. Abb. 4) für den Bereich von 20 bis 60° C ergibt eine Aktivierungsenergie der Hippuratspaltung von 2700 cal/Mol. Dies ist ein auch für eine enzymatische Hydrolyse sehr niedriger Wert. Bezüglich vergleichbarer Daten von ähnlichen Reaktionen sei auf die Diskussion verwiesen.

##### 5. Temperaturstabilität des Enzyms

Die vorliegende Enzympräparation verliert bei Aufbewahrung in eingefrorenem Zustand bei -20° C innerhalb von einigen Wochen



10 bis 20% ihrer Aktivität. Es erschien nun interessant, die Stabilität der Enzymlösung unter den bei den Versuchen auftretenden Bedingungen (Tiefkühlung, Kühlschranktemp., Raumtemp., Temperaturoptimum der Spaltung) zu studieren.

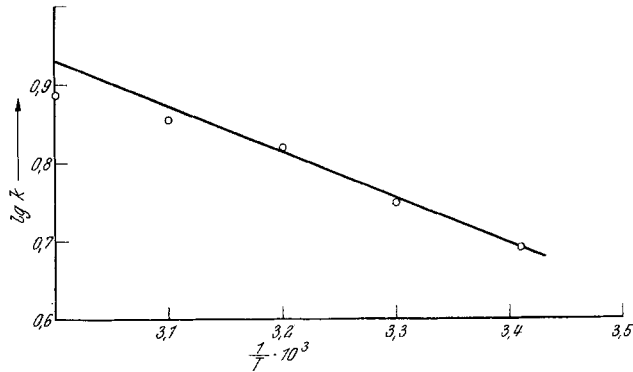


Abb. 4. Graphische Ermittlung der Aktivierungsenergie. Ordinate:  $\lg k$  ( $k$  in  $\mu\text{Mol/ml} \cdot \text{Min.}$  für 1 g Enzymprotein/ml). Abszisse:  $1/T \cdot 10^3$  ( $T$  in  $^{\circ}\text{K}$ )

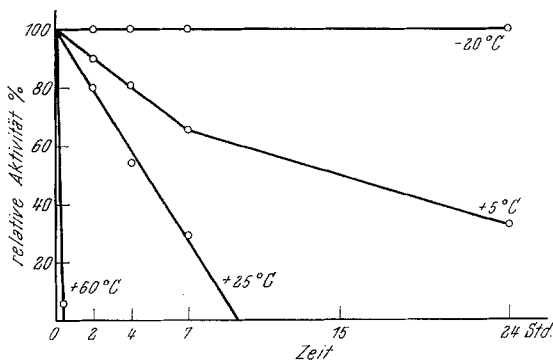


Abb. 5. Temperaturstabilität der Hippurathydrolase. Ordinate: Relative Enzymaktivität in Prozent der Anfangsaktivität. Abszisse: Zeit, Stdn.

Für die Untersuchungen wurden jeweils 1,2 ml der Enzymlösung in 0,05 *m*-Phosphatpuffer (pH 7,5) bei  $-20^{\circ}$ ,  $+5^{\circ}$ ,  $+25^{\circ}$  und  $+60^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach jeweils 0, 2, 4, 7 und 24 Stdn., im Falle der Probe bei  $60^{\circ}\text{C}$  nach 15 und 30 Min., wurden je 0,2 ml entnommen und die Enzymaktivität in Versuchsansätzen mit 6 ml Hippuratlösung (56  $\mu\text{Mol/ml}$ ) bei pH 7,5 und  $37^{\circ}\text{C}$  bestimmt. Die Versuchsergebnisse über einen Zeitraum von 24 Stdn. sind in Abb. 5 dargestellt.

Abb. 5 zeigt, daß die Enzympräparation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  stabil ist, aber schon bei Aufbewahrung bei  $+5^{\circ}\text{C}$  einen merklichen Aktivitätsabfall aufweist, der nach 24 Stdn. über 60% beträgt. Bei  $25^{\circ}\text{C}$  ist eine ziemlich rasche Inaktivierung zu beobachten, wobei nach 9 Stdn. die Aktivität auf Null abgesunken ist. Bemerkenswert ist das Verhalten bei  $60^{\circ}\text{C}$ ; während bei  $60^{\circ}\text{C}$  das Enzym in Gegenwart des Substrates maximalen Umsatz bewirkt, wird es in Abwesenheit des Substrates bei dieser Temperatur innerhalb von 15 Min. völlig inaktiviert. Das Substrat schützt somit das Enzym in sehr wirksamer Weise gegenüber der Denaturierung bei erhöhten Temperaturen.

## 6. Verhalten gegenüber Hemmstoffen und Metallionen

### a) *Sulphydryl-Hemmstoffe*

Es wurde der Einfluß von  $\text{HgCl}_2$  und Parachlormercuribenzoat (PCMB) sowie der von Jodacetat auf die Enzymaktivität studiert.

Durchführung: 0,2 ml Enzymlösung wurden jeweils bei pH 7,5 und  $37^{\circ}\text{C}$  mit 0,2 ml der Lösung des Hemmstoffes inkubiert; die erhaltenen Hemmstoffkonzentrationen sind in Tab. 3 angegeben. Nach 10 Min. dauernder Einwirkung des Hemmstoffes wurden 6 ml Hippuratlösung zugefügt und die Enzymaktivität in bekannter Weise ermittelt. Die Ergebnisse sind aus Tab. 3 ersichtlich; hierbei sind die ermittelten Enzymaktivitäten in Prozenten der in Kontrollversuchen ohne Hemmstoffzusatz bestimmten Aktivitäten angegeben.

Tabelle 3. Einfluß von Sulphydryl-Hemmstoffen auf die Enzymaktivität

Hemmstoff	Konzentration Mol/l	Relat. Aktivität, % (vgl. Text)
Kontrolle	0	100
$\text{HgCl}_2$	$10^{-2}$	18
	$10^{-3}$	18
	$10^{-4}$	20
	$10^{-5}$	56
Parachlormercuribenzoat	$10^{-3}$	0
	$10^{-4}$	10
	$10^{-5}$	88
Jodacetat	$10^{-1}$	61
	$5 \cdot 10^{-2}$	80
	$10^{-2}$	80

Während also die quecksilberhaltigen Inhibitoren einen deutlichen Inaktivierungseffekt ausüben, ist die Wirkung von Jodacetat weniger aus-

geprägt. Dies deutet darauf hin, daß die Enzymwirkung an das Vorhandensein freier SH-Gruppen geknüpft ist. Versuche, die Enzymaktivität nach Einwirkung von *PCMB* ( $10^{-4}$  Mol/l) durch Behandlung mit Cystein zu reaktivieren, zeigten, daß auch bei Zugabe von  $10^{-2}$  bis  $10^{-1}$  Mol/l Cystein durch 10 bis 30 Min. die Hemmwirkung des *PCMB* irreversibel war. Es ist daher wahrscheinlich, daß *PCMB* das Enzymprotein irreversibel denaturiert.

#### b) Chelatbildende Substanzen und Metallionen

Da eine Reihe von Enzymen des Typus der Exopeptidasen Metallenzyme sind bzw. durch Metallionen deutlich aktiviert werden, während bei Aminosäureacylasen bisher keine eindeutige Abhängigkeit von Metallionen festgestellt wurde, erschien auch das Studium des Einflusses von Metallionen auf die Hippurathydrolase von Interesse. In den folgenden Untersuchungen wurde einerseits direkt der Einfluß bestimmter Metallionen auf die Enzymaktivität studiert, andererseits wurde versucht, die Enzymwirkung durch Zugabe von chelatbildenden Substanzen, wie 8-Hydroxychinolin bzw. Äthylendiamintetraacetat (*EDTA*), zu hemmen, und diese Wirkung sodann durch Zugabe überschüssiger Metallionen wieder aufzuheben. Die Ergebnisse der Versuche mit Metallionen sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Es wurden jeweils 0,2 ml Enzymlösung mit 0,2 ml der Lösung des Metallsalzes (vgl. Tab. 3) 10 Min. inkubiert, wobei eine Metallsalzkonzentration von  $10^{-3}$  m resultierte, und sodann nach Zugabe von 6 ml Hippuratlösung die Enzymaktivitäten in der anfangs beschriebenen Weise bestimmt.

Tabelle 4. Einfluß von Metallionen auf die Enzymaktivität

Metallsalz $10^{-3}$ m	Rel. Aktivität, %
Kontrolle	100
ZnSO <sub>4</sub>	92
CoSO <sub>4</sub>	86
MnSO <sub>4</sub>	93
FeSO <sub>4</sub>	12
CuSO <sub>4</sub>	0
AgNO <sub>3</sub>	0
CaCl <sub>2</sub>	88
MgSO <sub>4</sub>	104

Wie ersichtlich, üben die Salze von Kupfer, Silber und Eisen einen starken Hemmeffekt aus, während die Salze von Zink, Cobalt, Mangan und Calcium eine geringfügige Verminderung der Aktivität bewirken. Lediglich in Gegen-

wart von Magnesiumionen ist eine geringe Erhöhung der Enzymaktivität zu beobachten.

Wurden nun Enzymlösungen mit 8-Hydroxychinolin (Endkonzentration  $3,3 \cdot 10^{-3} m$ ) bzw. *EDTA* (Endkonzentration  $10^{-2} m$ ) durch 10 Min. inkubiert, so erschien die Enzymaktivität im Falle von 8-Hydroxychinolin zu 60%, im Falle von *EDTA* zu 40% gehemmt. Versuche, diese Hemmwirkung durch anschließende Behandlung mit den in Tab. 5 angegebenen Salzen (ausgenommen die von Kupfer und Silber) aufzuheben, waren ohne Erfolg. Lediglich bei Behandlung mit Magnesiumsulfat wurde der Hemmeffekt von *EDTA* etwa um die Hälfte vermindert. Es dürfte offenbar dem Magnesiumion ein gewisser stabilisierender Effekt auf die aktive Enzymstruktur zukommen, während eine Aktivierung durch Metallionen nicht nachgewiesen werden kann.

### Diskussion

Die in dieser Arbeit erhaltenen Untersuchungsergebnisse stützen die Auffassung, daß ein Enzym vorliegt, dessen bevorzugte katalytische Funktion die hydrolytische Spaltung von Hippursäure und ähnlich aufgebauten N-Benzoylaminosäuren ist. Die relativ hohe Affinität des Enzyms für Hippursäure drückt sich in der mit  $5,5 \cdot 10^{-4}$  Mol/l ermittelten *Michaelis*-Konstante aus. Der optimale pH-Bereich der Enzymwirkung (um pH 7,5) ist etwa gleich dem pH-Bereich, in dem auch die Bildung des Enzyms optimal erfolgt. Ähnlich wie bei Aminoacylase aus Schweineiere<sup>5</sup> wurde auch bei Hippurathydrolase eine sehr hohe optimale Temperatur der Enzymwirkung von 60° C festgestellt. Das Enzym zeigt jedoch bei dieser Temperatur in Gegenwart des Substrates bereits deutlich verringerte Stabilität; in Abwesenheit des Substrates kommt es sehr rasch zur völligen Inaktivierung des Enzyms. Auffallend sind die sehr niedrigen Temperaturkoeffizienten  $Q_{10}$  für den beobachteten Temperaturbereich und die entsprechend niedrige Aktivierungsenergie von 2700 cal/Mol für die enzymatische Spaltung von Hippurat durch Hippurathydrolase. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß *Bruns* und *Schulze*<sup>5</sup> bei Aminoacylase (3.5.1.14) für die Hydrolyse des bevorzugten Substrates N-Acetylmethionin eine Aktivierungsenergie von 4300 cal/Mol ermittelten, für die Hydrolyse von Hippurat durch dasselbe Enzym aber 18 000 cal/Mol.

Die Hippurathydrolase ist auch bei niedrigen Temperaturen in verdünnten Pufferlösungen im Bereich von pH 7 bis 7,5 nur relativ kurze Zeit beständig, wodurch Versuche mit dem Ziel einer höheren Reinigung entsprechenden Schwierigkeiten begegnen. Die in den vorliegenden Versuchen beobachtete stabilisierende Wirkung des Substrates auf die aktive Struktur des Enzyms dürfte hier erfolgversprechende Möglichkeiten für weitere Arbeiten aufzeigen.

<sup>5</sup> *F. H. Bruns* und *C. Schulze*, *Biochem. Z.* **336**, 162 (1962).

Das Enzym wird durch Quecksilberhaltige Enzymgifte, wie  $\text{HgCl}_2$  und Parachlormercuribenzoat offenbar irreversibel gehemmt, während das sulfhydrylalkylierende Jodacetat eine weniger ausgeprägte Wirkung zeigt. Dies deutet eher auf eine strukturstabilisierende Funktion vorhandener SH-Gruppen als auf eine Beteiligung an der Komplexbildung mit dem Substrat. Auch chelatbildende Substanzen, wie 8-Hydroxychinolin und Äthylendiamintetraacetat, üben eine hemmende Wirkung auf das Enzym aus, doch konnte bislang keine Beteiligung von Metallionen an der katalytischen Funktion der Hippurathydrolase nachgewiesen werden.