

## Hippurathydrolase, ein neues Enzym aus Mikroorganismen, 3. Mitt.:

Die induzierte Bildung von Hippurathydrolase in Mycel-  
und Sproßpilzen

Von

**M. Röhr**

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

(Eingegangen am 21. Juni 1968)

In zahlreichen Mycelpilzen sowie einigen Sproßpilzen ist bei Kultivierung in Nährmedien mit Hippuratzusatz Hippurathydrolasewirkung nachzuweisen. Die mögliche Bedeutung der Hippurathydrolase beim Abbau der aus dem tierischen Stoffwechsel stammenden Hippursäure im Rahmen des biologischen Kreislaufes der Stoffe wird diskutiert.

When grown in media containing hippurate various moulds and a number of yeasts show *hippurate hydrolase* activity. The possible biological function of *hippurate hydrolase* in the degradation of hippuric acid, an excretion product of animal metabolism, will be discussed.

In den voranstehenden Teilen dieser Arbeit<sup>1, 2</sup> wurde über die induzierte Bildung von Hippurathydrolase in *Fusarium semitectum*, die Darstellung einer gereinigten Enzympräparation aus diesem Organismus sowie über eine Reihe charakteristischer Eigenschaften dieses Enzyms berichtet. Nachdem bereits in den ersten Untersuchungen<sup>3</sup> das Enzym auch in anderen Vertretern der Gattung *Fusarium*, nämlich *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme* und *Fusarium lini* gefunden worden war, war es nun die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob diese Enzymbildung auch in anderen Mikroorganismen verbreitet sei.

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

<sup>2</sup> Vgl. Mh. Chem. **99**, 2278 (1968).

<sup>3</sup> M. Röhr und W. Hampel, Mh. Chem. **97**, 1787 (1966).

Im vorliegenden Beitrag wird über Versuche zur Induktion der Bildung von Hippurathydrolase in verschiedenen Mycel- und Sproßpilzen berichtet.

## Material und Methodik

### *Organismen*

Die für die Untersuchungen verwendeten Organismen aus der Sammlung des Institutes sind in den nachstehenden Tabellen angeführt. Sie wurden auf Glucose—Pepton-Agar nach *Sabouraud* in Stammkulturen gehalten und etwa monatlich überimpft.

### *Kultivierung*

Für die Induktionsversuche wurden mittels physiolog. Kochsalzlösung Abschwemmungen von 3 bis 10 Tage alten Agarkulturen hergestellt und mit den so erhaltenen Suspensionen von Pilzkonidien bzw. Hefezellen 100 ml-Erlenmeyer-Weithalskolben mit Wattehaubenschluß und 20 ml Nährlösung nachstehender Zusammensetzung beimpft.

Nährlösung (g/l):

Saccharose	30
Glucose	10
Ammoniumacetat	5
Hefeextrakt (Difco)	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,02
Hippursäure	3,58 (20mMol)

pH 6,3 (vor der Sterilisation), eingestellt mit NaOH.

Die Kultivierung erfolgte am Kreisschüttler mit 170 U/Min. bei 25° C bis zum Erreichen mittlerer Zellentwicklung, wofür durchschnittlich 48 bis 72 Stdn. nötig waren. Mit den so erhaltenen Vorkulturen in 100-ml-Kolben wurden jeweils 1000-ml-Erlenmeyer-Weithalskolben mit 100 ml der angegebenen Nährlösung beimpft und anschließend 72—96 Stdn. bis zur maximalen Zellentwicklung am Kreisschüttler unter denselben Bedingungen vermehrt.

### *Zelltrockenpräparate*

Zur Gewinnung des Zellmaterials aus der Nährlösung wurde im Falle von Pilzmycel auf Büchnertrichtern filtriert, im Falle von Hefezellen bei 3000 U/Min. 15 Min. zentrifugiert. Das mit Eiswasser gewaschene Zellmaterial wurde anschließend durch 3malige Behandlung mit der 10fachen Menge Aceton bei — 20° C entwässert und nach Entfernung des anhaftenden Acetons im Luftstrom (Ventilator) die erhaltenen Trockenpräparate in verschlossenen Gefäßen über Kieselgel gelagert.

*Bestimmung des Enzymgehaltes*

Die Bestimmung des Enzymgehaltes erfolgte, wie bei den Versuchen mit *Fusarium* beschrieben<sup>1, 3</sup>, durch Verfolgung der Hydrolyse von Hippurat. Die Angabe des Enzymgehaltes erfolgt in Enzymeinheiten (*EE*) pro Gramm Trockenmycel, wobei 1 *EE* die Menge Enzym angibt, die bei 37° C und pH 7,5 die Spaltung von 1  $\mu$ Mol Hippurat pro Min. bewirkt.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Versuche mit einer Auswahl von Mycel- und Sproßpilzen sind in Tab. 1 und 2 zusammengestellt. In Fällen, bei denen das Zellmaterial höhere Enzymgehalte aufwies, wurden auch Kultivierungsversuche in Nährlösungen ohne Zusatz von Hippurat angestellt. Die in analoger Weise aufgearbeiteten Präparate wiesen keinen Enzymgehalt auf.

Tabelle 1. Bildung von Hippurathydrolase in Mycelpilzen

Organismus	pH*	Enzymgehalt in <i>EE</i> /g Trockenmycel
<i>Absidia glauca</i>	6,9	15
<i>Aspergillus oryzae</i>	7,7	13
<i>Aspergillus niger</i>	7,8	10
<i>Botrytis allii</i>	6,2	20
<i>Cephalosporium salmosynnematum</i>	6,2	0
<i>Chaetomium globosum</i>	7,4	0
<i>Emericellopsis terricola</i>	7,2	0
<i>Helminthosporium sativum</i>	6,9	0
<i>Mucor mucedo</i>	8,1	43
<i>Penicillium notatum</i>	6,5	57
<i>Penicillium chrysogenum</i> St. P	6,1	46
<i>Penicillium chrysogenum</i> St. Q 176	6,3	47
<i>Penicillium chrysogenum</i> St. R	6,6	60
<i>Penicillium chrysogenum</i> St. D	6,6	60
<i>Rhizopus nigricans</i>	8,4	42
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	7,1	25
<i>Trichoderma koningii</i>	8,0	67
<i>Trichoderma viride</i>	8,0	93

\* Gemessen in der Nährlösung am Ende der Kultivierung.

Die Ergebnisse dieser Versuche deuten an, daß die Fähigkeit zur Bildung des Hippursäure spaltenden Enzyms in Mycelpilzen offenbar relativ verbreitet vorkommt. Es sei hier vermerkt, daß es sich bei den untersuchten Pilzen zum großen Teil um solche handelt, die als typische Bodenorganismen bekannt sind; auf die damit zusammenhängenden Folgerungen wird in der Diskussion eingegangen. In Sproßpilzen ist die

Tabelle 2. Bildung von Hippurathydrolase in Sproßpilzen

Organismus	pH*	Enzymgehalt in EE/g Trockenmaterial
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	5,6	0
<i>Candida mycoderma</i>	5,6	0
<i>Candida sp.</i>	6,2	930
<i>Candida utilis</i>	6,8	0
<i>Candida pulcherrima</i>	6,4	0
<i>Candida lipolytica</i>	6,3	0
<i>Candida pseudotropicalis</i>	6,3	0
<i>Candida crusei</i>	6,5	0
<i>Debaryomyces vini</i>	6,8	0
<i>Debaryomyces membranefaciens</i>	6,6	0
<i>Hanseniaspora apiculata</i>	6,3	0
<i>Hansenula saturnus</i>	7,1	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6,0	0
<i>Rhodotorula rubra</i>	6,8	39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasse Johannisberg	5,4	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasse Stadlau	5,9	0
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	5,3	0
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	6,3	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	6,7	0
<i>Torulopsis minor</i>	7,9	18
<i>Torulopsis sanguinea</i>	5,1	0

\* Gemessen in der Nährlösung am Ende der Kultivierung.

Fähigkeit zur Spaltung von Hippursäure nur in einer sehr geringen Zahl von Organismen zu finden. Bei einem Organismus jedoch, einer *Candida*-art (vgl. Tab. 2) war ein außerordentlich hoher Enzymgehalt nachzuweisen, der den in *Fusarium semitectum* erreichbaren etwa um das Siebenfache übertraf. Allerdings sind die Ausbeuten an Zellmaterial geringer als die von *Fusarium semitectum*, so daß nur etwa dreimal höhere Gesamtausbeuten an Enzym bei der Kultivierung resultieren. Der Organismus, der in der Institutssammlung als *Endomycopsis*art geführt war, konnte weder durch langdauernde Züchtung auf *Sabouraud*-Agar noch auf dem zur Erkennung der Sporulierung verwendeten Acetat-Agar<sup>4</sup> zur Bildung von Ascosporen gebracht werden. Es wurde daher die Bezeichnung der imperfekten Form, *Candida sp.*, gewählt.

Der hohe Enzymgehalt dieses Organismus veranlaßte die Durchführung umfangreicher Versuche mit dem Ziel, die Optimalbedingungen für eine Kultivierung und Enzyymbildung in großem Maßstab zu ermitteln. Hierbei ergab sich jedoch, daß auch bei strikter Einhaltung der Versuchsbedingungen, unter denen die angegebenen hohen Enzymausbeuten

<sup>4</sup> I. G. Kleyn, Wallerstein Lab. Commun. 17, 91 (1954).

erhalten worden waren, das Enzymbildungsvermögen extremen Schwankungen unterliegt. Es gelang zwar, die in Tab. 2 angeführte Enzymaktivität mehrmals in analogen Versuchen zu reproduzieren, wobei sogar vereinzelt noch höhere Enzymgehalte gemessen wurden, doch mißlingen bisher alle Versuche zur Züchtung großer Zellmengen hohen Enzymgehaltes zum Zwecke einer Anreicherung des Enzyms. Es ist daher *Fusarium semitectum* trotz geringerem Enzymgehalt für enzymologische Studien als geeigneter anzusehen.

### Diskussion

Aus den beiden ersten Teilen dieser Arbeit geht hervor, daß es sich bei der hier aufgefundenen und beschriebenen Hippurathydrolase im Gegensatz zu der ursprünglich als „Hippuricase“ bezeichneten Aminocyclase (Acylase I) um das erste isolierte Enzym mit typischer Spaltungswirkung gegenüber Hippursäure handelt. Die Tatsache, daß dieses Enzym in zahlreichen Pilzen gebildet wird und darüber hinaus, wie das Studium der Literatur (vgl. Teil I) sowie eigene orientierende Untersuchungen (unveröffentlicht) zeigen, auch bei Bakterien vorkommen dürfte, läßt es angebracht erscheinen, die biologische Bedeutung dieser Enzymwirkung zu diskutieren.

Hippursäure ist ein Produkt des tierischen Stoffwechsels. Sie wird im Zuge der Entgiftung der beim Abbau der Nahrung entstehenden bzw. in dieser enthaltenen Benzoesäure gebildet und ausgeschieden. Bekannt ist bei vielen pflanzenfressenden Tieren der Anteil der Hippursäure in den Ausscheidungen in derselben Größenordnung wie der von Harnstoff. Dadurch werden dem Boden beträchtliche Mengen an Hippursäure zugeführt, die dort wieder abgebaut werden müssen, um dem natürlichen Stoffkreislauf erneut zur Verfügung zu stehen. Einem Enzym, welches wie das hier aufgefundene typisch auf die Hydrolyse von Hippursäure eingestellt ist und damit eine ähnliche Funktion wie das Enzym Urease beim Abbau des Harnstoffes in der Natur einnimmt, kommt daher eine erhebliche Bedeutung im Rahmen des biologischen Kreislaufes der Stoffe zu.