

Enzymatische Spaltung von Hippursäure durch Schimmelpilze.

Von

Arthur W. Dox und Ray E. Neidig.

(Aus der chemischen Abteilung der landwirtschaftlichen Versuchsstation zu Iowa.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. März 1913.)

Die Fähigkeit der niederen Pilze, eine enzymatische Spaltung von Hippursäure zu bewirken, wurde zuerst von Shibata¹⁾ mit *Aspergillus niger* bewiesen. Einige Jahre später gelang es einem²⁾ von uns, die Gegenwart eines Hippursäure spaltenden Enzyms oder Hippuricase, in mehreren anderen Pilzen festzustellen, namentlich *Penicillium camemberti*, *P. chrysogenum*, *P. brevicaulis*. Die Methode bestand darin, daß eine neutrale Lösung von Natriumhippurat der Wirkung eines Acetondauerpräparates des Pilzes unterworfen wurde. Die abgespaltene Benzoesäure wurde sodann nach der Methode von Bunge und Schmiedeberg ausgeschieden und ihrem Schmelzpunkt nach identifiziert. Durch Wägen der hierdurch gewonnenen Benzoesäure konnte der Umfang der Spaltung annähernd bestimmt werden. Seitdem hat Kossowicz³⁾ Präparate folgender Pilze geprüft: *Aspergillus niger*, *Mucor Boidin*, *Phytophthora infestans*, *Isaria farinosa*, *Botrytis besiana*, *Cladosporium herbarum*, und er fand, daß in jedem Fall die Hippursäure zersetzt wurde. Als eins von den Reaktionsprodukten identifizierte er Ammoniak, aber er gibt nicht an, in wie großem Maßstabe dieses Produkt sich vorfand.

Da nun aber die oben erwähnte Arbeit nur qualitativer Art war, so meinten wir, daß ein weiteres Studium betreffs einiger der gewöhnlichen saprophytischen Pilze interessant wäre, indem quantitativ der Umfang der Spaltung bestimmt werde, welche durch Enzympräparate hervorgerufen wird, die aus verschiedenen Wachstumsperioden der Organismen stammen. Sörensens formoltitrimetrische Methode schien zu diesem

¹⁾ Shibata, Beiträge z. Physiol. u. Path., Bd. 5, S. 384.

²⁾ Dox, J. Biol. Chem., Bd. 6, S. 465.

³⁾ Kossowicz, Z. Gärungsphysiol., Bd. 1, S. 121—3; S. 317—9.

Zwecke vortrefflich geeignet. Die Methode gründet sich bekanntlich auf die Reaktion zwischen Formaldehyd und der primären Amingruppe, wodurch die basischen Eigenschaften der letzteren zum Verschwinden gebracht werden, während die Carboxylgruppe unverändert bleibt und ihre sauren Eigenschaften bewahrt. Da Hippursäure keine primäre Amingruppe enthält, so erfolgt auch keine Reaktion mit Formaldehyd, nachdem aber die Hydrolyse erfolgt ist, reagiert das abgespaltene Glykokoll sogleich und die Carboxylgruppe des Glykokolls kann nun titriert werden.

Versuche.

Sechs charakteristische Pilze wurden in einem Erlenmeyerschen Literkolben auf einer Nährlösung von folgender Zusammensetzung gezüchtet.

Destilliertes Wasser	1000 ccm
Rohrzucker	45,0 g
Traubensäure	1,3 „
NH_4NO_3	2,6 „
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,4 „
K_2CO_3	0,40 „
MgSO_4	0,24 „
Na_2CO_3	0,13 „
ZnSO_4	0,05 „
FeSO_4	0,05 „
MnCl_2	0,05 „

Am Ende einer jeden Woche wurde das Mycel vorsichtig von 2 Kolben entfernt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Darauf wurde es in einem Mörser mit Hilfe von Glasscherben gründlich zerrieben und endlich in einer Buchnerschen Presse einem Druck von 350 kg pro Quadratcentimeter unterworfen. In jedem Falle wurden ungefähr 20 ccm Saft gewonnen. 10 ccm wurden mit 25 ccm einer vorher mit Ätznatron neutralisierten 1%igen Lösung von Hippursäure versetzt. Zu den übrigen 10 ccm der Enzymlösung wurden 25 ccm destilliertes Wasser als Kontrolle hinzugefügt. Toluol wurde in jedem Falle zugesetzt, um bakterielle Wirkung zu verhüten. Diese Lösungen wurden 2 Wochen

Alter der Kultur Wochen	Titration $n/10\text{-Ba(OH)}_2$ ccm	Kontrolle $n/10\text{-Ba(OH)}_2$ ccm	Differenz ccm	Spaltung %
Penicillium expansum.				
1	16,6	4,0	12,6	90,0
2	15,9	3,9	12,0	85,7
3	13,0	1,6	11,4	81,4
4	14,6	1,9	12,5	89,3
Aspergillus clavatus.				
1	19,4	6,5	12,9	92,1
2	21,0	7,0	14,0	100,0
3	20,8	9,0	11,8	84,3
4	16,6	6,2	10,4	74,3
Aspergillus fumigatus.				
1	19,7	7,5	12,2	87,1
2	19,5	7,8	11,7	83,6
3	15,3	2,4	12,9	92,1
4	13,1	1,2	11,9	85,0
Penicillium roqueforti.				
1	15,3	3,2	12,1	86,4
2	13,2	5,4	7,8	55,7
3	22,2	9,7	12,5	89,3
4	14,2	2,4	11,8	84,3
Penicillium camemberti.				
1	17,7	4,9	12,8	91,4
2	18,6	5,9	12,7	90,7
3	15,2	2,4	12,8	91,4
4	9,3	1,2	8,1	57,8
Aspergillus niger.				
1	20,3	7,7	12,6	90,0
2	10,1	9,2	0,9	6,4
3	3,8	1,5	2,3	16,4
4	7,8	1,2	6,6	47,1
Taka-diastrase (0,1 g).				
	6,1	0,5	5,6	40,0

lang stehen gelassen und alsdann nach Sörensens Methode titriert. Käufliche Taka-diastrase wurde auch in diesen Versuchen mit einbegriffen, da es ein enzymatisches Präparat aus *Aspergillus oryzae* darstellt. Dieser Pilz ist sehr nahe mit den oben hergezählten Pilzen verwandt.

Dieselben Lösungen wurden nach der Titrierung mittels der Magnesiumoxydmethode zu Ammoniakbestimmungen benutzt.

	Titration $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$	Kontrolle $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$	Ammoniak ccm decinormal
Kulturen 3 Wochen alt.			
1. <i>Aspergillus niger</i>	0,48	0,33	0,15
2. > <i>fumigatus</i> . .	1,08	0,58	0,50
3. <i>Penicillium camemberti</i> .	1,63	0,68	0,95
4. <i>Aspergillus clavatus</i> . . .	2,88	1,28	1,60
5. <i>Penicillium roqueforti</i> . .	0,98	0,68	0,30
6. > <i>expansum</i> . .	0,68	0,33	0,35
Kulturen 4 Wochen alt.			
1. <i>Aspergillus niger</i>	0,53	0,28	0,25
2. > <i>fumigatus</i> . .	0,68	0,23	0,45
3. <i>Penicillium camemberti</i> .	0,53	0,38	0,15
4. <i>Aspergillus clavatus</i> . . .	1,88	0,98	0,90
5. <i>Penicillium roqueforti</i> . .	0,73	0,33	0,40
6. > <i>expansum</i> . .	0,68	0,38	0,30

Die obigen Tabellen zeigen in jedem Fall eine entschiedene Spaltung der Hippursäure an. Das Alter der Kultur scheint während der ersten vier Wochen wenig Einfluß auf den Umfang der Spaltung zu haben. Es ist zu erwarten, daß Unregelmäßigkeiten vorkommen werden wegen der mannigfachen Umstände, welche das Wachstum der Kultur beeinflussen.

Nach den an drei- und vierwöchigen Kulturen ausgeführten Bestimmungen bildet sich Ammoniak nur in kleinen Mengen. Die sekundäre Reaktion, wodurch Glykokoll in Ammoniak verwandelt wird, ist also von nicht sehr großer Wichtigkeit.