

esterase. Unlike WERNER AND BREHMER<sup>12</sup>, but in agreement with GLICK AND GLAUBACH<sup>14</sup> and ELLIS<sup>15</sup>, we were not able to demonstrate any activity in guinea-pig liver or serum towards atropine. MARGOLIS AND FEIGELSON<sup>16</sup> have suggested that rabbit atropinesterase is non-specific on the basis of competitive inhibition studies. Our evidence also indicates that a single non-specific enzyme is responsible for the hydrolysis of both atropine and homatropine in the rabbit. It also shows that a different more specific enzyme is responsible for the hydrolysis of homatropine in the guinea pig.

*Physiology Section, Suffield Experimental Station  
of the Defence Research Board of Canada,  
Ralston, Alberta (Canada)*

P. A. ADIE  
C. K. DAVIDSON

- 1 Z. SCHROFF, *Z. Ges. Artzte Wien*, 3 (1852) 211.
- 2 F. BERNHEIM, *The Interactions of Drugs and Cell Catalysts*, Burgess, Minneapolis, Minn., 1946, p. 15.
- 3 R. AMMON AND W. GAVELSBURG, *Z. Physiol. Chem.*, 284 (1949) 135.
- 4 A. CIHAK, *Chem. Listy*, 54 (1960) 1155.
- 5 P. FLEISCHMANN, *Naunyn-Schmeidebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 62 (1910) 518.
- 6 R. METZNER, *Naunyn-Schmeidebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 68 (1912) 110.
- 7 E. HESSE, *Naunyn-Schmeidebergs Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 98 (1923) 238.
- 8 F. BERNHEIM AND M. L. C. BERNHEIM, *J. Pharmacol.*, 64 (1938) 209.
- 9 S. C. KALSER, J. H. WILLS, J. D. GABOUREL, R. E. GOSSELIN AND C. F. EPES, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 121 (1957) 449.
- 10 D. GLICK, *J. Biol. Chem.*, 134 (1940) 617.
- 11 P. B. SAWIN AND D. GLICK, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 29 (1943) 55.
- 12 G. WERNER AND G. BREHMER, *Planta Medica*, 9 (1961) 293.
- 13 J. GODEAUX AND M. TONNESON, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 5 (1949) 95.
- 14 D. GLICK AND S. GLAUBACH, *J. Gen. Physiol.*, 25 (1941) 197.
- 15 S. ELLIS, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 91 (1947) 370.
- 16 F. MARGOLIS AND P. FEIGELSON, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2620.
- 17 P. A. ADIE AND J. TUBA, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 36 (1958) 21.
- 18 B. SPORN, T. WANKO AND W. DINGMAN, *J. Cellular Biol.*, 15 (1962) 109.
- 19 K. JORGENSEN, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 282 (1959) 11.
- 20 J. LEVEY AND E. MICHEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 27 (1945) 570.
- 21 DE SARAM, *J. Pathol. Bacteriol.*, 46 (1938) 559.

Received March 6th, 1967

*Biochim. Biophys. Acta*, 139 (1967) 130–182

BBA 63244

## **Oscillationen der Ureaseaktivität von *Hydrogenomonas H 16* in statischer Kultur**

Die Urease von *Hydrogenomonas H 16* ist als katabolisches Enzym anzusehen und wird anscheinend durch katabolische Repression (durch Ammonium-Ionen) und eine bei N-Mangel eintretende endogene Derepression<sup>1</sup> reguliert. Die durch Harnstoff "induzierte" Enzyymbildung setzt Bedingungen voraus, unter denen auch eine endogene Derepression erfolgt. Während des Wachstums in statischer Kultur mit Ammoniak als N-Quelle enthalten die Zellen von *Hydrogenomonas H 16* nur wenig Urease; die spezifische Ureaseaktivität beträgt im Mittel 7 Einheiten/g Protein. Die

*Biochim. Biophys. Acta*, 139 (1967) 182–185

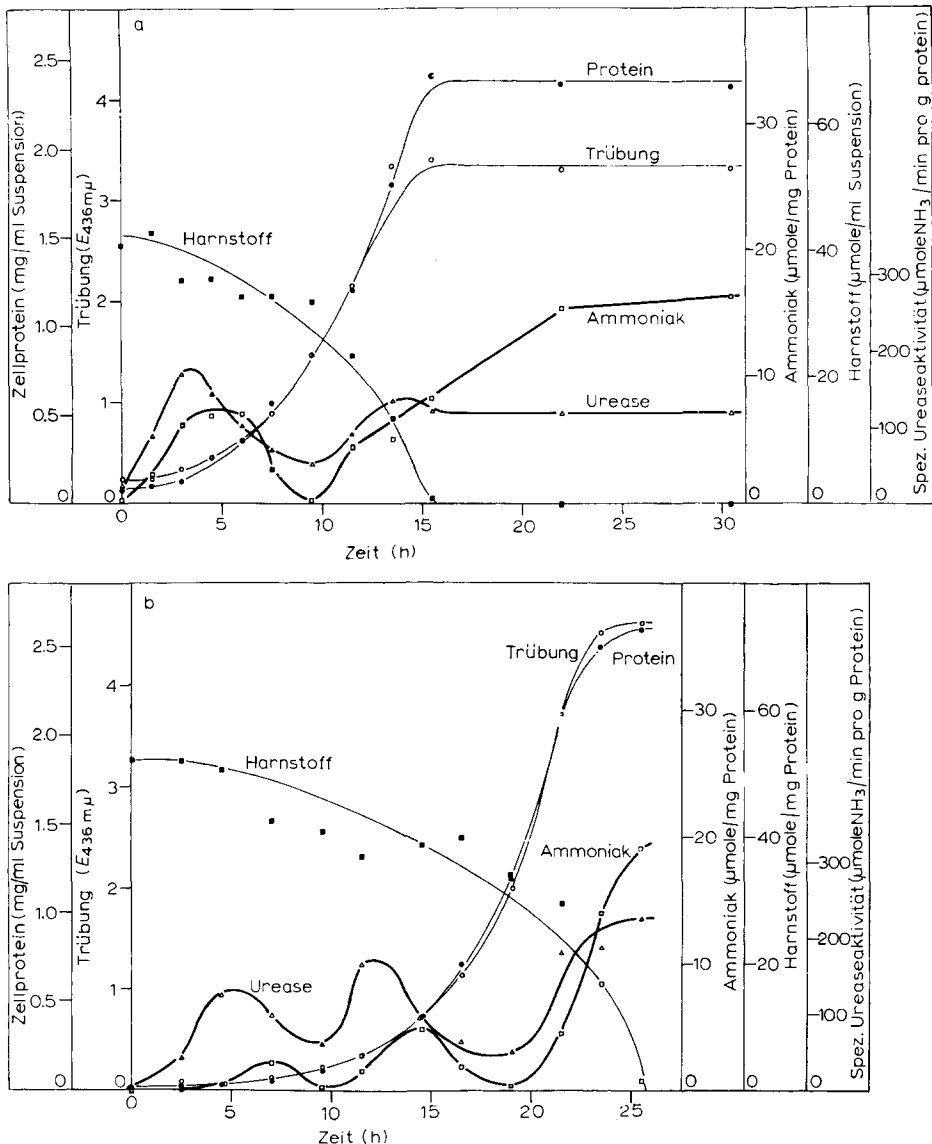


Abb. 1. Oscillationen der spezifischen Ureaseaktivität und der  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration während des Wachstums von *Hydrogenomonas H 16* in Fructose-Mineralsalz-Nährlösung mit Harnstoff als N-Quelle. (a) Anfangs-Zellkonzentration  $\text{ca. } 6 \cdot 10^8$  Zellen pro ml, (b) Anfangs-Zellkonzentration  $8 \cdot 10^7$  Zellen pro ml. 20 l Fructose-Mineralsalz-Nährlösung<sup>1</sup>, die als N-Quelle 50  $\mu\text{mole}$  Harnstoff pro ml enthielt, wurde mit einer Suspension von Zellen beimpft, die mit Ammoniumsals als N-Quelle gewachsen waren. Der pH-Wert wurde durch Zusatz von 2 M HCl unterhalb pH 7,8 gehalten. Temperatur 30°; Belüftung durch sterile Preßluft und Rühren mit 300–350 U/min. Bestimmung von Trübung, Protein, Ureaseaktivität wie bei KÖNIG, KALTWASSER UND SCHLEGEL<sup>1</sup> beschrieben, Bestimmung von Harnstoff und  $\text{NH}_4^+$  nach Harnstoff-Farbstest TCUR 15954 der Firma C. F. Boehringer.

spezifische Aktivität steigt auch nicht an, wenn Harnstoff als zusätzliche N-Quelle angeboten wird. Mit Harnstoff als einziger N-Quelle erreicht die Ureaseaktivität im

Mittel 60 Einheiten/g Protein, bei "endogener Derepression" in N-freiem Medium 600 Einheiten/g.

In der vorliegenden Untersuchung wurden Fluktuationen der spezifischen Ureaseaktivität der Zellen und des Ammoniumgehalts des Mediums nachgewiesen, die im Verlauf des Wachstums von *Hydrogenomonas* H 16 auftreten.

Eine Harnstoff im Überschuß enthaltende Nährlösung wurde mit Zellen beimpft, die in ammoniumhaltiger Nährlösung vorkultiviert und somit ureasearm waren. Die mit der Impfsuspension in den 20 l-Fermenter übertragene  $\text{NH}_4^+$ -Menge war zu vernachlässigen. Abb. 1 gibt zwei Versuche wieder, die sich lediglich in der Impfmenge unterscheiden. Der Wachstumsverlauf ist aus der Zunahme der Trübung und des Proteingehalts der Suspension zu ersehen. Die zugesetzte Harnstoffmenge war so bemessen, daß bis zu Versuchszeiten von 15 bzw. 25 Std Harnstoff im Überschuß vorhanden war. Die spezifische Ureaseaktivität nahm nach Impfung zunächst zu; ihrem Anstieg folgte mit einer Phasenverschiebung von etwa  $\lambda/4$  eine Zunahme des Gehalts an Ammonium-Ionen. Es wurde also durch Harnstoffspaltung zunächst mehr Ammoniak gebildet als zur Aminosäuresynthese verwendet werden konnte. Noch bevor die Ammoniumkonzentration ein Maximum erreicht hatte, setzte Repression der Ureasesynthese ein; die spezifische Ureaseaktivität sank durch "Ausverdünnen" auf mittlere Werte ab. Nachdem die Ammonium-Ionen durch Proteinsynthese und Wachstum weitgehend verbraucht worden waren, setzte erneut Ureasesynthese und später Ammoniakfreisetzung ein. Diese alternierende Folge von Derepression und Repression der Ureasebildung wiederholte sich im Verlauf des Wachstums dreimal (Abb. 1b). Dabei folgten die Anstiege der Ammoniumkonzentrationen den Anstiegen der spezifischen Ureaseaktivität mit einiger Verzögerung.

Durch Erfassung der spezifischen Ureaseaktivität und der Ammoniumkonzen-

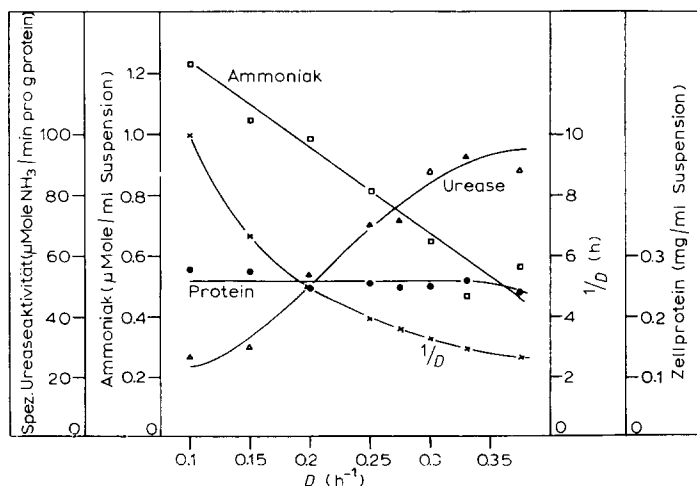


Abb. 2. Beziehungen zwischen spezifischer Ureaseaktivität und  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration bei verschiedenen Verdünnungsraten im Chemostaten. *Hydrogenomonas* H 16 wurde in einem 1 l Quickfit-Weithalsgefäß mit 320 ml Kulturvolumen bei magnetischer Rührung und Belüftung in einer Nährlösung mit Harnstoffüberschuß (0.056%) und Fructose (0.1%) als begrenzendem Faktor kultiviert. Die Verdünnungsrate  $D$  wurde zwischen 0.1 und 0.375  $\text{Std}^{-1}$  variiert. Die Suspension wurde in einem Eisbad aufgefangen und auf den Gehalt an Zellprotein, Ammoniak und auf die spezifische Ureaseaktivität der Zellen hin geprüft (Methoden wie Abb. 1).

tration im Chemostaten war es möglich, die Beziehungen zwischen beiden Größen bei verschiedenen Wachstumsraten zu prüfen. Die Nährlösung enthielt Harnstoff im Überschuß; das Wachstum wurde durch Fructose als Energiequelle begrenzt. Die Apparatur zur kontinuierlichen Kultur genügte den üblichen Anforderungen<sup>2,3</sup>; Ergänzungen wurden bereits beschrieben<sup>4</sup>. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, nimmt die spezifische Ureaseaktivität mit steigender Verdünnungsrate  $D$  zu, während die Ammoniumkonzentration sinkt. Bei einer mittleren Verweilzeit  $1/D$  von 10 Std hatten die Zellen eine spezifische Ureaseaktivität von ca. 27 Einheiten/g Protein, bei 2.7 Std etwa 80 Einheiten/g. Den Enzymaktivitäten entsprachen Ammoniakkonzentrationen von 1.23 bzw. 0.46  $\mu\text{Mol NH}_3$  pro ml. Demnach genügen schon weniger als 1  $\mu\text{Mol NH}_3$  pro ml, um die Ureasebildung weitgehend zu reprimieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den an der statischen Kultur (Abb. 1) gewonnenen Ergebnissen. Auch in statischer Kultur erfolgt eine Ureasesynthese erst dann, wenn die Ammoniumkonzentration in der Nährlösung unter 1  $\mu\text{Mol NH}_3$  pro ml abgesunken ist. Nach Extrapolation der Ammoniumkonzentration erreicht die spezifische Ureaseaktivität erst bei 1.4  $\mu\text{Mole NH}_3$  pro ml das Grundniveau. Genaue Angaben über die "Grenzkonzentration", von der ab eine merkliche Enzymsynthese erfolgt, lassen sich jedoch erst nach weiteren Versuchen mit verschiedenen stationären Ammoniumkonzentrationen in kontinuierlicher Kultur machen.

In vielen Fällen ist bereits nachgewiesen worden, daß die Bildung der am Abbau N-haltiger Verbindungen beteiligten Enzyme durch  $\text{NH}_4^+$  reprimiert wird: für Histidase in *Aerobacter aerogenes*<sup>5</sup>, für L-Threonin-Dehydratase in Hefe<sup>6</sup>, für NAD-abhängige Glutamat-Dehydrogenase in Hefe<sup>7,8</sup>, für Glutamin-Synthetase<sup>9</sup>.  $\text{NH}_4^+$  ist demnach als die stärkere, dominierende N-Quelle anzusehen. Die Oscillation der Ureaseaktivität ist ein einfacher Modellfall einer periodischen Veränderung in einer statischen Kultur. Sie läßt sich auf die Ausscheidung überschüssigen Ammoniaks ins Medium zurückführen, wodurch bei geringen Zellkonzentrationen (und somit geringem Ammoniumverbrauch) eine langanhaltende Anhäufung von Ammoniak in der Nährlösung und damit eine stundenlange Repression der Ureasesynthese zustandekommt. Die geschilderte Oscillation kann als extremer Fall einer "verzögerten Rückkopplung" angesehen werden<sup>10,11</sup>.

Institut für Mikrobiologie,  
Universität Göttingen,  
Göttingen (Deutschland)

CHRISTEL KÖNIG  
H. G. SCHLEGEL

- 1 C. KÖNIG, H. KALTWASSER UND H. G. SCHLEGEL, *Arch. Mikrobiol.*, 53 (1966) 231.
- 2 D. HERBERT, R. ELSWORTH UND R. C. TELLING, *J. Gen. Microbiol.*, 14 (1956) 601.
- 3 H. W. JANNASCH, *Arch. Mikrobiol.*, 45 (1963) 323.
- 4 H. G. SCHLEGEL, E. SCHUSTER UND C. KÖNIG, *Suppl. Zbl. Bakteriol. I*, im Druck.
- 5 F. G. NEIDHARDT UND B. MAGASANIK, *J. Bacteriol.*, 73 (1957) 253.
- 6 H. HOLZER, M. BOLL UND C. CENNAMO, *Angew. Chem.*, 75 (1963) 894.
- 7 G. HIERHOLZER UND H. HOLZER, *Biochem. Z.*, 339 (1963) 175.
- 8 H. WESTPHAL UND H. HOLZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 42.
- 9 D. MECKE UND H. HOLZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 341.
- 10 W. BERNHARDT, K. PANTEN UND H. HOLZER, *Angew. Chem.*, 76 (1964) 990.
- 11 W. BERNHARDT, K. PANTEN UND H. HOLZER, *Biochim. Biophys. Acta*, 99 (1965) 531.

Eingegangen am 11. November, 1966