

Untersuchungen über die Bildung der Proteinase aus einem *Aspergillus awamori*-Stamm. II. Charakterisierung des Proteinasebildungsvermögens des Mycels im Kultursverlauf durch seinen Stickstoffwechsel

Von Jiro HOSHINO

(Eingegangen am 23. Juli, 1958)

Aus dem ausgewaschenen ruhenden Mycel des Schimmelpilzes, ebenso wie Bakterie sind reichliche Mengen von Enzyme im reinen Zustand leicht zugänglich. Die Enzymbildung wird aber bei diesem experimentalen System durch verschiedene äussere Faktoren stark beeinflusst. Es ist bekannt, wie auch der Verfasser in der vorigen Mitteilung¹⁾ über die Proteinasebildung bestätigt hat, dass sich das Vermögen der Zelle zur Enzymbildung, die eine der Mikroorganismus eigenen biochemischen Aktivitäten darstellt, mit der Züchtungsdauer ändert.

Nach der Angabe von O. Tanabe²⁾ wurde das Amylasebildungsvermögen des *Asp. oryzae*-Stammes in den früheren Stufen der Züchtung grösser erwiesen. Derselbe Tatbestand wurde von C. P. Hegarty bei der „adaptiven“ Bildung von Enzyme aus *Streptococcus lactis* festgestellt³⁾. Die Bakterien betreffend wurden noch von mehreren Forschern darüber mit den mannigfachen Ergebnisse verfolgt⁴⁻⁸⁾.

Es liegt nahe anzunehmen, dass verschiedene Stoffe innerhalb des Mycels für die Änderung dieser physiologischen oder biochemischen Aktivitäten verantwortlich sind, von denen die Nucleinsäuren als Spezifität-Donator und die Aminosäuren als Bausteine des Enzymproteins eine entscheidende Rolle spielen sollen.

Da die Ergebnisse über die Änderung des Proteinasebildungsvermögens mit der Züchtungsdauer, die der Verfasser in der vorigen Mitteilung kurz dargelegt hatte,

eine sehr Wichtige zu bedeuten scheint, hat der Verfasser nun diese vorige Aufgabe wieder sich aufgestellt, um damit tiefere Übersicht auf die Beziehung des Proteinasebildungsvermögens mit dem Sammelbecken von Aminosäuren des Mycels und seinem Stickstoffwechsel gewinnen zu können.

Arbeitsmethode

Bestimmung des Proteinasebildungsvermögens des Mycels.—Zur Ermittlung des Proteinasebildungsvermögens des Mycels wurde die Aktivität der in die Kulturflüssigkeit sezernierten Proteinase nach dem zwanzigstündigen Schütteln des ausgewaschenen Schüttelmycels (1.0 g feuchtes: ungefähr 0.2 g trocknes), welches aus den verschiedenen Phasen einer Entwicklungskultur abgeerntet worden war, in der 1.0 prozentige Glucose haltigen M/5-Phosphatpufferlösung (pH=6.1) nach der Folinschen Methode bestimmt und mit derselben pro g trocknes Mycels angegeben. Diese Aktivität wird vom Verfasser provisorisch als „potentielle Aktivität des Proteinasebildungssystems“ (PAPS) bezeichnet.

Züchtung des Pilzes und Gewinnung des ausgewaschenen Schüttelmycels wurden in der vorigen Mitteilung ausführlich dargelegt.

Bestimmung des organischen Stickstoffs des Mycels.—Zur Bestimmung des organischen Stickstoffs des Mycels wurde die semi-mikro Kjeldahlsche Methode nach A. O. A. C. verwendet. Den organischen Gesamtstickstoffgehalt hat der Verfasser experimentell in zwei Gruppen, d. h. Proteine- und non-Proteine-N, eingeteilt, wobei der erstere denjenigen Gesamtstickstoff bedeutet, der sich in der 5.0 prozentigen Trichloressigsäure löslichen Fraktion befindet. Den letztere kann man rechnerisch leicht erreichen. Bestimmung dessen ist wie folgt: Das üblicherweise gut ausgewaschene und abgepresste Mycel (ungefähr 0.2 g trocknes) wurde mit 40 ccm 5 prozentiger Trichloressigsäurelösung 20 Minuten am Rückfluss gekocht. Das Extrahieren wurde in analoger Weise noch zweimal wiederholt. Sodann wurde das rückstehende Mycel getrocknet und zur Ermittlung des Stickstoffs herangezogen.

1) J. Hoshino, Dieses Bulletin, 31, 883 (1958).

2) O. Tanabe und K. Tonomura, *J. Agr. Chem. Soc. Japan (Nippon Nōgei-Kagaku Kaishi)*, 30, 596 (1956).

3) C. P. Hegarty, *J. Bact.*, 37, 145 (1939).

4) E. F. Gale, "Chem. Act. of Bacteria" p. 51, Academic Press, Inc., New York, (1948).

5) D. Billen, *J. Bact.*, 61, 515 (1951).

6) M. J. Pinsky, ebenda, 64, 337 (1952).

7) M. Suda, *Symp. Enz. Chem. (Kōso Kagaku Symposium)*, 4, 18 (1950).

8) J. Fukumoto und T. Yamamoto, *J. Agr. Chem. Soc. Japan (Nippon Nōgei-Kagaku Kaishi)*, 31, 421 (1957).

Ergebnisse

Abhängigkeiten der PAPS und N-Konstitution des Mycels von seinen Entwicklungsphasen. — Das Proteinasebildungsvermögen (PAPS) des Mycels und seine Gehalte am Gesamt-(N_t), Proteine-(N_p) und non-Proteine-N(N_{np}) wurden in den verschiedenen Entwicklungsphasen ermittelt, um damit auf die Frage zu beantworten, welche Bestandteile an die Biosynthese von Proteinase teilnehmen. Die Resultate sind in der Abb. 1 illustriert.

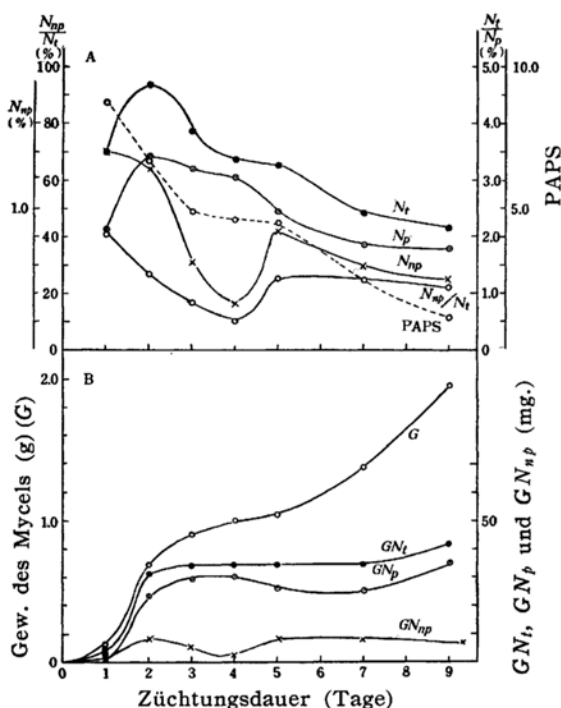


Abb. 1. Abhängigkeiten der PAPS und N-Konstitution des Mycels von seiner Züchtungsdauer.

N_t : totaler Stickstoffgehalt des Mycels
 N_p : Proteinstickstoffgehalt des Mycels
 N_{np} : non-Proteinstickstoffgehalt des Mycels

Die Sporen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht behandelt, weil die Dauer kurz nach dem Impfen dieselbe der Keimung darstellt und der Stoffwechsel dabei von der Mycelentwicklung recht verschieden sein soll⁹⁾.

Vom ersten bis zum zweiten Tagen nach dem Impfen hat sich das Mycel sehr stark entwickelt, und solche Phase wurde 4~5 Tage danach wieder beobachtet. Dass das Mycel in dieser Entwicklungsphase

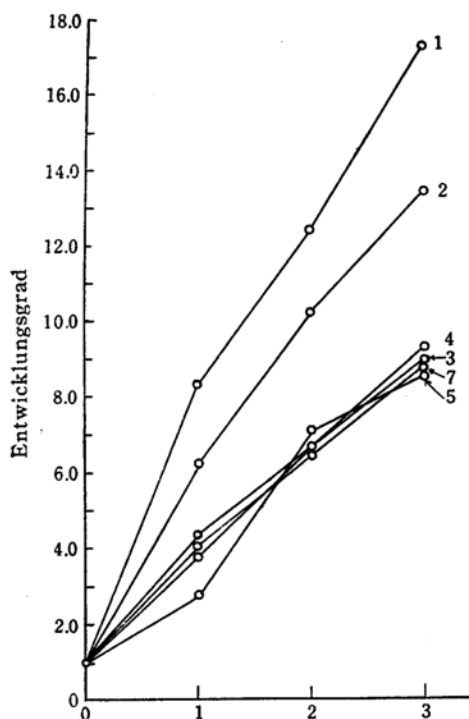
allmählich reicher an N_t und N_p , und im Gegenteil armer an N_{np} geworden ist, ist es nun bedeutungsvoll. Daraus geht es klar hervor, dass in dieser Entwicklungsphase die Myceleiweisskörpern aus den Aminosäuren kräftig synthetisiert werden, wobei also der anabolische Stoffwechsel den Eiweissstoff betreffend eine dominierende Rolle spielt. Vom 4 Tage nach dem Impfen fängt der Amino-N Gehalt des Mycels plötzlich an zuzunehmen und dementsprechend fängt der N_p Gehalt an abzunehmen. In Anbetracht, dass der Gesamt-N inzwischen unveränderlich bleibt, (Abb. 1, B) müssen die Aminosäuren innerhalb des Mycels unter dem Verbrauch von Myceleiweisskörpern anhäufen. In dieser Phase scheint daher der catabolische Stoffwechsel den Eiweisskörper betreffend in analogem Sinne eine dominierende Rolle zu spielen.

Die in der Figur gegebenen Versuche zeigen weiter, dass sich das Proteinasebildungsvermögen (PAPS) in der anabolischen Phase allmählich erschwächt und es gerade mit dem Aminosäuregehalt des Mycels gleichläuft. Daraus folgt es, dass die Proteinasebildung von der Menge der inneren Aminosäuren beschränkt wird, und sich vermindert, wenn die Aminosäuren zur Myceleiweissstoffbildung verbraucht worden sind.

Den Züchtungsverlauf in der Figur kann man in zwei „Lebenskreise“ einteilen, von denen das Erste einen typischen Entwicklungs- oder Stoffwechselprozess bietet: die catabolische Phase entspricht der „lag“ Phase und die anabolische Phase der „log“ d.h. kräftig entwickelnden Phase. Das Mycel, das sich zwischen diesen beiden Phasen befindet und also die Aminosäuren am meisten enthält, hat das grösste Proteinasebildungsvermögen in jedem Kreis.

Beziehung der Änderung des Vermögens zur Mycelentwicklung mit der Proteinasebildung. — Da das Mycel, das ein erhebliches Vermögen zur Proteinasebildung besitzt, nicht dasjenige, das ein sich kräftig entwickelndes Mycel, sondern dasjenige ist, das sich in der Vorstufe der „log“ Phase befindet und damit, wie aus der Abb. 1 ersichtlich ist, uns seine kommende kräftige Entwicklung erwarten liess, hat der Verfasser das potentiale Entwicklungsvermögen des Mycels in den jeden Phase in folgender Weise ermittelt: 1.0g wie üblich dargestelltes Schüttelmycel wurde in die frische Nährlösung unter sterilen Bedingungen übertragen und weiter bei

9) T. Yanagita, Arch. für Mikrobiol., 26, 329 (1957).



Schüttelungsdauer bei der Entwicklungsprüfung (Tage)

Abb. 2. Entwicklungsverläufe der in verschiedenen Entwicklungsphasen abgeernteten Mycel. Die Ziffern in der Figur zeigen die Züchtungsdauer an.

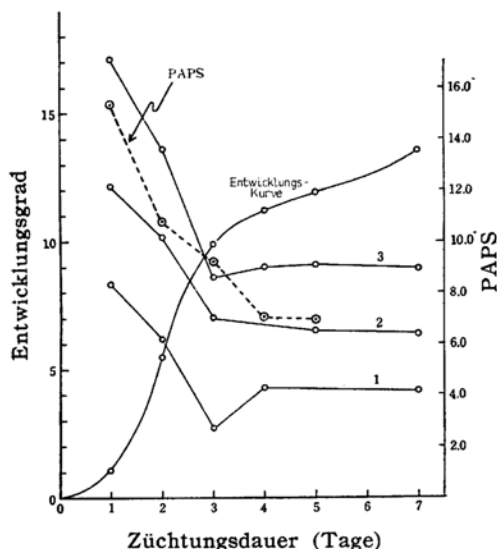


Abb. 3. Abhängigkeiten der PAPS und Entwicklungsvermögens des Mycels von seiner Züchtungsdauer. Die Ziffern in der Figur zeigen die Schüttelungsdauer bei der Entwicklungsprüfung an.

30°C fortgeschüttelt. Je nach 1, 2 und 3 Tagen wurde je ein Kolben abgebrochen und die sich entwickelte Mycel abgeerntet, ausgewaschen, sodann zur Wägung getrocknet.

Als Entwicklungsgrad wurde das Gewichtsverhältnis dieses Mycels zum unterworfenen Mycel ermittelt. In der Abb. 2 werden die Entwicklungsgrade der Mycel verschiedener Züchtungsphasen in Kurvenform gegeben. Dabei ergab es sich, dass das jüngere Mycel ein größeres Entwicklungsvermögen besitzt, ohne „lag“ Phase zu zeigen. Die Mycel in den Züchtungsphasen von 3, 4, 5 und 7 Tagen zeigten aber beinahe gleichartige Entwicklungsverläufe. Diese Umstände sind auf der Abb. 3 leicht begreiflich. Hierbei wurde es gezeigt, dass ein deutlicher Parallelismus zwischen dem Proteinasebildungs- und dem Entwicklungsvermögen des Mycels auch in diesem Falle besteht.

Der „lag“ Phase des zweiten „Lebenskreises“ entspricht also die Phase, wovon die Fläche der Kurven des Entwicklungsvermögens beginnt. Während der Prüfung über das Entwicklungsvermögen wurde keine massgebende Bildung der Proteinase beobachtet.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wurde es festgestellt, dass das erhebliche Proteinasebildungsvermögen einem Mycel gehört, welches ein kräftiges Entwicklungsvermögen besitzt und reichliche Mengen von Aminosäuren enthält. Diese Erscheinungen stellen daher vermutlich zwei Seiten eines Attributes dar, und sie antagonisieren einander gegen ein Sammelbecken von Aminosäuren. Dieser Befund steht in voller Übereinstimmung mit den Untersuchungen von M. Nomura¹⁰⁾, in denen er eine antagonistische Biosynthese von Amylase durch *Bacillus subtilis* gegen dieselbe der Zelleiweissstoffen beobachtet und die Amylasebildung als „abnorme“ Biosynthese bezeichnet hat.

Beziehung des Proteinasebildungsvermögens der in verschiedenen Bedingungen entwickelten Mycel mit seinem Amino-N Gehalt.— Aus den hierher geschilderten Ergebnisse schien der Aminosäuregehalt des Mycels bei der Proteinasebildung eine dominierende Rolle zu spielen. In Anbetracht dessen wurden die N-Bestandteile desjenigen Mycels in Bezug auf seine Proteinasebildungs- und Entwicklungsvermögen untersucht, das sich unter der

10) M. Nomura, J. Hosoda, B. Maruo und S. Akabori, *J. Biochem.*, **43**, 841 (1956).

TABELLE I

PAPS UND N-KONSTITUTION DES SICH UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN ENTWICKELTEN MYCELS

N-Quelle %	C-Quelle %	Gew. des Mycels in mg	N_t (%)	N_p (%)	N_{np} (%)	N_{np}/N_t (%)	PGA*	PAPS**
NH ₄ NO ₃	4 %	312	5.7	3.5	2.2	38.3	4.6	5.1
Rohrzucker	4 %							
NH ₄ NO ₃	1.5%	345	5.2	3.6	1.6	29.8	4.4	5.5
Rohrzucker	10 %							
NH ₄ NO ₃	0.2%	427	4.0	3.2	0.8	20.8	4.7	6.2
Rohrzucker	20 %							

* Entwicklungsvermögen: dies wurde mit dem Entwicklungsgrad der 24-stündigen Prüfung angegeben.

** Proteinasebildungsvermögen: dies steht im Text geschrieben.

variierten N-Konzentration entwickelt hatte. Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Dabei hat es sich ergeben, dass kein wesentlicher Parallelismus zwischen dem Aminosäuregehalt und den beiden Vermögen des Mycels besteht, während es dem Verfasser gelungen ist, auf obige Weise den Aminosäuregehalt des Mycels zu verändern. Daraus darf festgestellt werden, dass der Gehalt des Mycels an Aminosäuren nicht immer für die Proteinasebildung ein entscheidender Faktor ist. Doch ist es so zu deuten, dass das Mycel, das erhebliche Proteinasebildungs- und Entwicklungsvermögen besitzt, stets reichliche Aminosäuren darin enthält.

Die Aufgabe, was für ein Substrat auf die Proteinasebildung in diesem experimentalen System eine dominierende Rolle spielt, bleibt auf Grund der oben dargelegten Resultaten noch unlöslich und bedarf noch weitere Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Schlusse das Proteinasebildungsvermögen des Mycels im Kultursverlauf in Bezug auf das Mycelentwicklung durch seinen Stickstoffwechsel charakterisiert.

Schlusswort

Die Proteinasebildungsvermögen des Pilzmycels wurde in Anbetracht seines Stickstoffwechsels verfolgt. Gleichungen wurden durch die Verfolgungen der Änderung der Stickstoffkonstitution und des Entwicklungsvermögens des Mycels im Kultursverlauf abgeleitet, um damit auf die Frage zu beantworten, ob ein Sammelbecken von Aminosäuren bei der

Biosynthese von Proteinase eine dominierende Rolle spielt.

Es wurde gezeigt, dass ein „Lebenskreis“ des Mycels in einige metabolische Phasen, d. h. catabolische und anabolische usw. eingeteilt wird und dass Mycel, das sich zwischen diesen beiden Phasen befindet, wo der Vorstufe der gebräuchlichen „log“ Phase entspricht und Aminosäuren am meisten enthalten sind, das grösste Proteinasebildungsvermögen zeigt.

Das erhebliche Proteinasebildungsvermögen gehört zu einem Mycel, welches neben dem grossen Sammelbecken von Aminosäuren ein kräftiges Entwicklungsvermögen besitzt.

Aus dem Versuch mit dem Mycel, das sich unter der variierten N-Konzentration entwickelt hatte, wurde es aber festgestellt, dass der Aminosäuregehalt des Mycels nicht immer für die Proteinasebildung ein dominanter Faktor ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Verfasser zusammenfassend das Proteinasebildungsvermögen des Mycels im Kultursverlauf in Bezug auf das Mycelentwicklung durch seinen Stickstoffwechsel charakterisieren.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. N. Taketomi, und Herrn ausserordentlichen Professor H. Suzuki für ihre vielfache Anregungen und Revisionen bei der Anfertigung dieser Arbeit meinen besten Dank auszusprechen.

Laboratorium der Gärungs- und Biochemie
Abteilung für Angewandte Chemie
Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät
Universität Waseda, Shinjuku-ku, Tokyo