

Überreicht vom Verfasser · Nicht einzeln im Buchhandel!
Sonderdruck aus «Zeitschrift für Pflanzenphysiologie», Band 70, Heft 1, Seite 74–87 (1973)
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

Institut für Pflanzenernährung der Technischen Universität München-Weihenstephan

○ **Isolierung und Eigenschaften einer Cyanamid-Hydratase
(E.C.-Gruppe 4. 2. 1.) aus *Myrothecium verrucaria*
Alb. u. Schw.**

H. STRANSKY und A. AMBERGER

Mit 8 Abbildungen

Eingegangen am 19. März 1973

Summary

1. Initially the growth of *Myrothecium verrucaria* was found to be inhibited through cyanamide. A concentration of 10^{-4} M of cyanamide caused a slight inhibition.
2. The addition of cyanamide to the culture medium brought about an induction of a cyanamide hydratase. This enabled the fungi to grow, with cyanamide as the only source of nitrogen. Urea was formed first, and then decomposed into ammonia and carbon dioxide.
3. Cyanamide hydratase was isolated from the fungi mycelium and concentrated approximately seventy times.
4. The characteristics of cyanamide hydratase were examined, i. e., to show that the reaction $\text{NH} = \text{C} = \text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{NH}_2)_2\text{CO}$ could be proved quantitatively, and that there was an absence of inhibitors in the preparations. In addition, it was found that the temperature optimum ranged between $40\text{--}55^\circ\text{C}$, that the pH optimum was pH 7.7 and that the K_m of the reaction was $3,7 \cdot 10^{-6}$ Mol/l. The cyanamide hydratase seemed to be crucial for the reaction. The velocity of the reaction was greatly enhanced through additional Mn^{2+} . The enzyme was classified as one of the E. C. group 4.2.1.
5. The question of an active secretion of the enzyme into the culture medium was discussed.

Zusammenfassung

Cyanamid beeinflusst das Wachstum des Bodenpilzes *Myrothecium verrucaria*. Aus Mycelien in Reinkultur wird eine spezifisch wirkende Cyanamid-Hydratase isoliert, angereichert und charakterisiert. Dieses Enzym ist durch das Substrat induzierbar. Das Cyanamid reagiert in molekularem Verhältnis zu Harnstoff. Dabei liegt der optimale Wirkungsbereich bei $40\text{--}55^\circ\text{C}$ und einem pH-Wert von 7,7. Mn^{2+} fördert die Umsetzungsgeschwindigkeit. Die Michaelis-Konstante wird mit $3,7 \cdot 10^{-6}$ Mol/l bestimmt. Das Enzym ist auch im Nährmedium nachzuweisen. Die Frage einer aktiven Exkretion wird diskutiert.

Einleitung

Das Calcium-Cyanamid ist ein wesentlicher Bestandteil des Kalkstickstoffs. Außer seiner Verwertung als Stickstoff-Quelle wurden auch die toxischen Wirkungen auf das

Wachstum parasitärer Pilze untersucht (AMBERGER, 1968). Die Umsetzungsmöglichkeiten des Cyanamids im Boden wurden von RATHSACK (1955) aufgezeigt. Die Hauptreaktionsfolge führt danach vom Calcium-Cyanamid über Harnstoff zu Ammoniak. Diese Reaktionen werden begünstigt durch hohe Wasserstoffionenkonzentration, gewisse Bodenminerale als Katalysatoren, Mikroben oder Fermente (Literatur siehe bei RATHSACK, 1955). Die Frage, ob die Harnstoffbildung aus Cyanamid im Boden unter dem alleinigen Einfluß von anorganischen Katalysatoren oder freien Enzymen vor sich geht, oder ob die Gegenwart lebender Bodenorganismen nötig ist, konnte von ERNST (1967) durch Strahlensterilisierung der Böden mit 5 Mrad geklärt werden. Er konnte zeigen, daß anorganische Katalysatoren keine Rolle spielen und daß der wesentliche Anteil der Umsetzung von Mikroorganismen geleistet wird.

Erste Hinweise über die enzymatische Umsetzung von Cyanamid zu Harnstoff gaben LAMAIRE und BRUNEL (1951) durch Untersuchungen an *Sterigmatocystis nigra* sowie HOFMANN und LATZKO (1954), HOFMANN et al. (1954) und LATZKO (1955) durch Arbeiten mit höheren Pflanzen. Das Ziel dieser Arbeit war, aus im Boden vorkommenden Organismen das Enzym zu isolieren und zu charakterisieren, welches Cyanamid in Harnstoff umwandelt. Als Versuchsobjekt wurde der Cellulose abbauende Pilz *Myrothecium verrucaria* gewählt, dessen Wachstumsbedingungen durch Arbeiten von MANDELS und REESE (1956) bekannt waren.

Material und Methodik

Die verwendeten Pilzkulturen: Für die Versuche wurde *Myrothecium verrucaria*, Stamm QM 460 (Dept. of the Army, U.S. Army Natick Laboratories, Natick, Mass.) verwendet. Dieser Bodenpilz ist nach GILMAN (1945) in die *Fungi imperfecti*, Ord. Moniliales, Fam. Tuberculariaceae einzuordnen.

Stammkulturen: Der Organismus wurde in Schrägagar-Röhrchen auf Kartoffelagar bei 20° C kultiviert, bis reichlich Konidien gebildet waren. Dann wurden die Kulturen bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

Massenkulturen: Das Pilzmycel wurde in 500 ml Nährlösung in Penicillin-Schalen bei 25° C steril in Dunkelheit angezogen. Die Kulturen wurden ständig geschüttelt (50 Upm). Das Nährmedium ist nach Angaben von MANDELS und REESE (1956) sowie HALLIWELL (1962) zusammengestellt. In 1000 ml 1/15 M Phosphatpuffer nach Sørensen werden gelöst: 300 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 30 mg $CaCl_2$; 1 ppm $ZnCl_2$; 1 ppm $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 ppm $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,5 ppm $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,5 ppm $20MoO_3 \cdot 2H_3PO_4 \cdot 48H_2O$; 0,1 ppm $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 3 ppm H_3BO_3 . Als Kohlenstoffquelle wurde 0,5 % Natriumacetat verwendet. Zur Stickstoffversorgung diente Cyanamid $2 \cdot 10^{-2}$ M bzw. KNO_3 in gleicher Konzentration. Jede P-Schale wurde mit 10^6 Konidien von *Myrothecium* beimpft, welche aus einer Pilzkultur auf Kartoffel-Agar in Petrischalen durch Abspülen mit sterilem Aqua dest. gewonnen wurden.

Analysenmethoden:

Bestimmung von Cyanamid: Der qualitative Nachweis von Cyanamid erfolgte mittels Papierchromatographie auf Papier Nr. 2043 b mgl der Fa. Schleicher und Schüll in einem Laufmittel von n-Butanol : Eisessig : Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 1. Das Chromatogramm wurde mit Nitroprussidreagens nach HOFMANN und WÜNSCH (1958) besprüht.

Die quantitative Bestimmung wurde nach der von STELLER et al. (1965) veröffentlichten

Methode mit Trinatriumpentacyanoaminferrat-III ausgeführt. In den – durch Äthanol von Protein befreiten – in-vitro-Ansätzen wurde das Cyanamid mit einem Aminosäuren-Analysator unter folgenden Bedingungen quantitativ bestimmt: Säulenfüllung Aminex A 6, 30 cm hoch; Temperatur 30° C; Natriumcitratpuffer pH = 3,25; Durchflußgeschwindigkeit des Puffers 80 ml pro Stunde. Das Ninhydrinreagens wurde nach MOORE (1968) hergestellt. Das Cyanamid besitzt unter diesen Bedingungen eine Retentionszeit von 37,5 min. Das Extinktionsmaximum des Farbkomplexes liegt bei 470 nm. Der aus dem Cyanamid gebildete Harnstoff besitzt unter den gleichen Bedingungen eine Retentionszeit von 34,5 min, wobei das Extinktionsmaximum bei 540 nm liegt.

Bei der Messung von Cyanamid ist zu beachten, daß die Substanz nur im neutralen pH-Bereich hinreichend lange stabil ist. Als Hauptstörsungsquelle ist die Umlagerung in Dicyandiamid anzusehen. Diese tritt allerdings auch auf, sobald Cyanamid-Konzentrationen von 10^{-2} M in Lösung überschritten werden.

Bestimmung des Harnstoffs: Harnstoff wurde nach BERNT und BERGMAYER (1970) mit Hilfe von Urease und dem Phenol-Hypochlorit-Reagens colorimetrisch bestimmt. Die Meßergebnisse dieser Methode werden durch höhere Cyanamidkonzentrationen beeinträchtigt. Deshalb wurden zur Kontrolle auch Messungen nach WATT und CHRISP (1954) und die Bestimmung im Aminosäuren-Analysator (siehe oben bei der Bestimmung des Cyanamids) herangezogen.

Bestimmung des Nitrat-Ions: Das Nitrat wurde im anorganischen Nährmedium mit Phenol-Disulfonsäure nach SNELL und SNELL (1949) nachgewiesen. Da jedoch diese Methode von Carbonaten und Chloriden (siehe bei TARAS, 1950) und auch von Glucose gestört wird, wurde das Nitrat-Ion mit der sehr spezifischen Methode nach BALKS und REEKERS (1960) als Nitroxylenol bestimmt, sobald interferierende Substanzen zugegen waren.

Protein-Bestimmung: Die quantitative Bestimmung der löslichen Proteine wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt.

Bestimmung verschiedener Substrate: Arginin und die übrigen Guanidin-Derivate wurden nach ROSENBERG et al. (1956) colorimetrisch gemessen. Ornithin wurde nach der Methode von MACHOLÁN (1962) bestimmt.

Nachweis der Urease-Aktivität: Die Ureasewirkung wurde nach der Methode von KLECZKOWSKI et al. (1966) durch Titration des freigesetzten Ammoniaks mit n/100 HCl bestimmt.

Standard-Test auf Cyanamidase-Aktivität: 0,5 ml der zu prüfenden Lösung (maximal 0,5 mg Protein) werden mit 100 μ M Tris-HCl-Puffer auf pH = 7,5 eingestellt. Nach Zugabe von 1 μ M Mn^{2+} -Ionen werden 20 μ M Cyanamid zugefügt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 1 ml. Man läßt 15 min bei 25° C reagieren. Anschließend werden die Proben in einem Kryomaten bei -25° C sofort eingefroren. Unmittelbar vor der Cyanamid-Messung wird auf 10 ml mit *Aqua dest.* aufgefüllt und eine entsprechendes Aliquot zur Bestimmung verwendet. Eine Proteinfällung mit Trichlor-Essigsäure ist nicht möglich, da das Cyanamid zerstört wird. Ebenso ist eine Hitzedenaturierung problematisch.

Die verwendeten Chemikalien der Firmen Merck und Schuchardt hatten den Reinheitsgrad p. a. Das Cyanamid wurde freundlicherweise von den Süddeutschen Kalkstickstoffwerken in reiner Form zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse

1. Einfluß von Cyanamid auf das Mycel-Wachstum

Das Wachstum des Pilzes im Nährmedium mit Nitrat als Stickstoffquelle wird durch Cyanamid gehemmt. AMBERGER und WÜNSCH (1963) sowie AMBERGER (1968) konnten nachweisen, daß bei Pilzen durch Cyanamid die Aktivität der Endoxidationsenzyme

beeinflusst werden. In der Abbildung 1 ist die Abhängigkeit der Hemmung von der Cyanamidkonzentration wiedergegeben. Die verwendeten Kulturen wurden aus Konidien gewonnen, 5 Tage im Vollmedium angezogen und dann mit Cyanamid versetzt. Die Ernte erfolgte nach 20 Stunden.

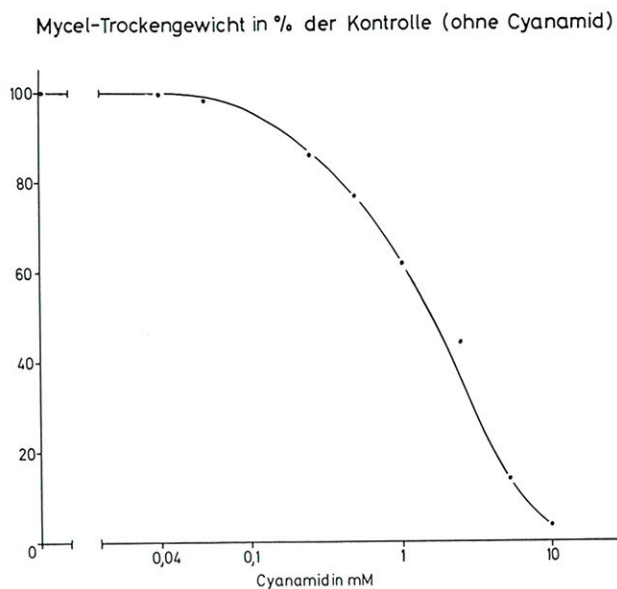


Abb. 1: Der Einfluß verschiedener Cyanamid-Konzentrationen auf das Wachstum von *Myrothecium*.

Verfolgt man jedoch das Wachstum von *Myrothecium* über längere Zeit (Abb. 2), so zeigt es sich, daß der Pilz in Nährlösung mit $2 \cdot 10^{-2}$ M Cyanamid als alleiniger Stickstoffquelle gut wächst. Bei Verwendung von Citrat als Kohlenstoffquelle wird durch Cyanamid das Wachstum nahezu unterbunden.

2. Isolierung der Cyanamid-Hydratase

Durch die Wachstumsversuche kann nur festgestellt werden, daß der Cyanamid-Gehalt der Nährlösung abnimmt. Eine direkte Umwandlung in Harnstoff oder Ammoniak kann aus derartigen Versuchen nicht abgeleitet werden. Unter den in Material und Methodik genannten Bedingungen ist keine Harnstoffbildung oder Ammoniakproduktion nachweisbar, welche in molekularem Verhältnis zur Cyanamidabnahme steht. Vielmehr stellt sich in den Kulturgefäßen ein sehr niedriger Harnstoffspiegel ein. Ammoniak kann nur in Spuren nachgewiesen werden.

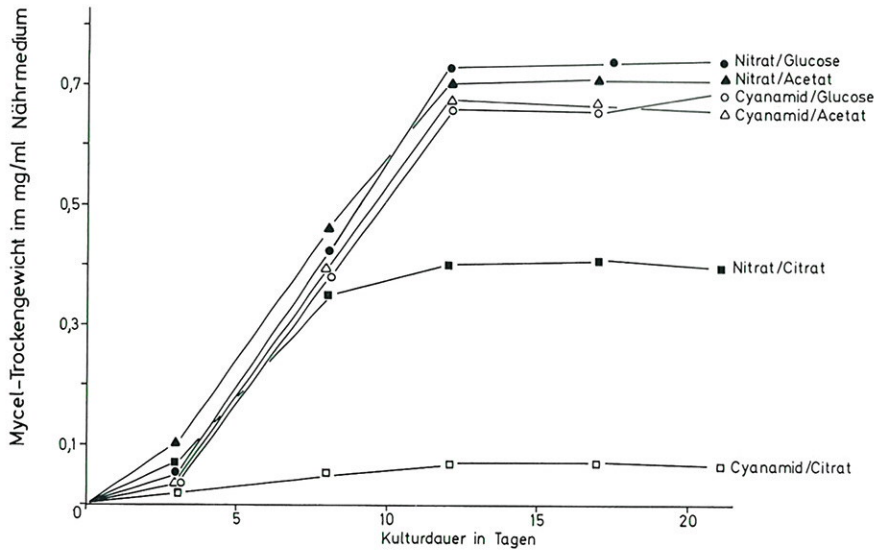
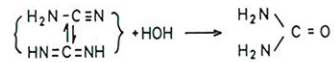


Abb. 2: Abhängigkeit des Mycelwachstums von der Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle. Die Stickstoff-Konzentration beträgt 500 mg N pro Liter Nährmedium in Form von Nitrat bzw. Cyanamid. Der Gehalt an der jeweiligen Kohlenstoff-Quelle beträgt 0,5 %. Der pH-Wert wurde auf pH = 6,7 eingestellt.

Zur Klärung des Reaktionsschrittes nach folgender Formel ist eine Isolierung des betreffenden Enzyms nötig.



Herstellung eines Rohextraktes

Das Pilzmycel aus den Massenkulturen von *Myrothecium* wird durch ein Nylongaze-Sieb mit 5 μ Porenweite vom Nährmedium abgetrennt, in McIlvaine-Puffer pH = 6,0 (STAUFF und JAENICKE, 1964) aufsuspendiert und im Messerhomogenisator (Ultraturrax, Typ TP 18-10) 2 min unter Kühlung bei 0° C zerkleinert. Anschließend wird das Homogenat 3 min mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier Typ B 12; Energie 100 W). Nach einer Zentrifugation bei 0° C und 50 000 g für 1 h wird die klare Lösung auf Cyanamidase-Aktivität getestet. Der Test wird wie in Material und Methodik beschrieben ausgeführt.

Anreicherung der Cyanamid-Hydratase

Eine stöchiometrische Umlagerung von Cyanamid in Harnstoff kann mit dem Rohextrakt nicht erhalten werden, da in der Präparation noch Urease vorhanden ist,

welche den Harnstoff in Ammoniak zerlegt. Nach Fraktionierung des Rohextraktes durch steigende Konzentrationen an Ammoniumsulfat wird eine ureasefreie Enzymlösung bei einer 70–90 %igen Sättigung erreicht, in welcher die Cyanamid-Hydratase gegenüber dem Rohextrakt ca. 66fach angereichert ist (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Anreicherung von Cyanamid-Hydratase aus Mycelien von *Myrothecium*. Reaktionsbedingungen: Cyanamid 20 μ M; Tris-HCl-Puffer pH = 7,0 100 μ M; 0,5 ml der jeweiligen Enzymprotein-Fraktion, welche nach der Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ über Nacht gegen Tris-HCl-Puffer dialysiert wurde; Gesamtvolumen 1 ml; Reaktionszeit 10 min bei 25° C.

Schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Ges. Aktivität U	Spez. Aktivität U/mg Protein	Ausbeute %	Anreicherungs-faktor
Rohextrakt	10	10,80	12,03	1,11	100	–
Ammoniumsulfat-Fractionen bei Sättigung:						
0 - 35 %	3	1,19	2,83	2,37	23,5	2,1
35 - 70 %	3	2,51	5,79	2,31	48,1	2,1
70 - 90 %	3	0,43	31,67	73,65	263,3	66,4

3. Eigenschaften der Cyanamid-Hydratase

Die folgenden Ergebnisse wurden mit dem angereicherten Enzym (siehe Tab. 1) erzielt. Durch die Dialyse, welche zur Entfernung des Ammoniumsulfates (Beeinträchtigung verschiedener Analysenmethoden) notwendig ist, entsteht im Mittel ein Aktivitätsverlust von 30 % gegenüber der nichtdialysierten Probe.

Nachweis des molekularen Umsatzes von Cyanamid in Harnstoff

Aus Abb. 3 ist zu entnehmen, daß pro 1 Mol Cyanamid 1 Mol Harnstoff gebildet wird. Die Reaktion verläuft linear über einen Zeitraum von 10 min. Später ist die Proportionalität zwischen Inkubationszeit und gebildeter Harnstoffmenge durch den Verbrauch des Cyanamids nicht mehr gewahrt.

Abhängigkeit der Reaktion von der Enzymkonzentration

Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt proportional zur eingesetzten Proteinmenge im untersuchten Bereich von 30 bis 600 μ g an (Abb. 4). Die Linearität zeigt die Abwesenheit hemmender Bestandteile an.

Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert

Der optimale Wirkungsbereich der Cyanamidase liegt bei pH = 7,7 in Tris-HCl-Puffer. Sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren H^+ -Ionenkonzentrationen fällt die Reaktionsgeschwindigkeit sehr rasch ab (siehe Abb. 5).

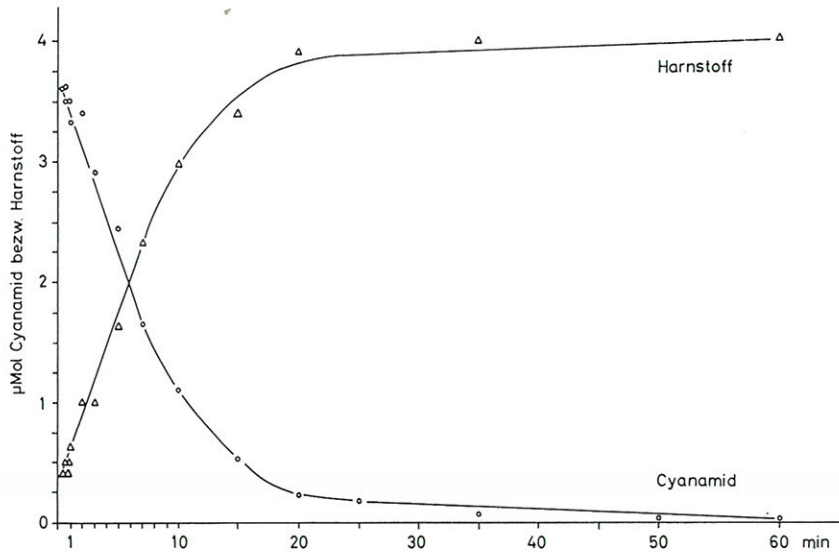


Abb. 3: Zeitkinetik und molekulares Verhältnis der enzymatischen Umsetzung von Cyanamid in Harnstoff. Reaktionsbedingungen: Cyanamid $4 \mu\text{M}$; Citrat-Phosphat-Puffer nach McIlvaine $\text{pH} = 6,0$ $60 \mu\text{M}$; Protein $0,58 \text{ mg}$; Gesamtvolumen $0,4 \text{ ml}$; Reaktionszeiten wie angegeben bei 25°C .

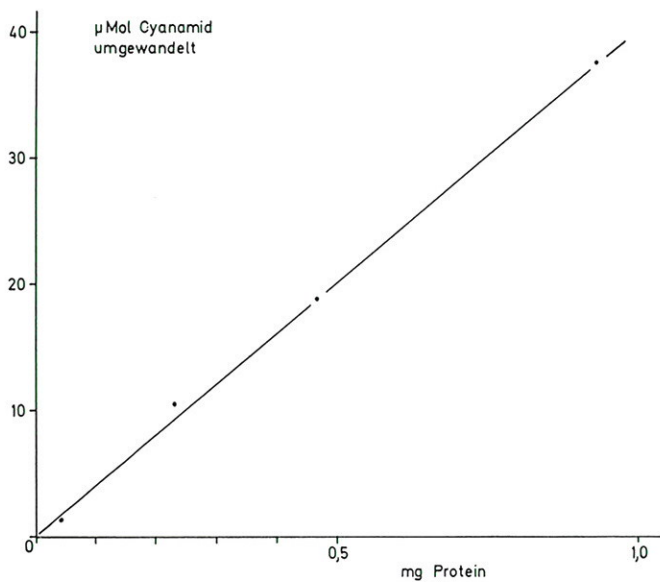


Abb. 4: Abhängigkeit der Harnstoffbildung aus Cyanamid von der Enzymkonzentration. Bedingungen: Cyanamid $60 \mu\text{M}$; Tris-HCl-Puffer $\text{pH} = 7,0$ $100 \mu\text{M}$; Gesamtvolumen 1 ml ; Reaktionszeit 15 min bei 25°C .

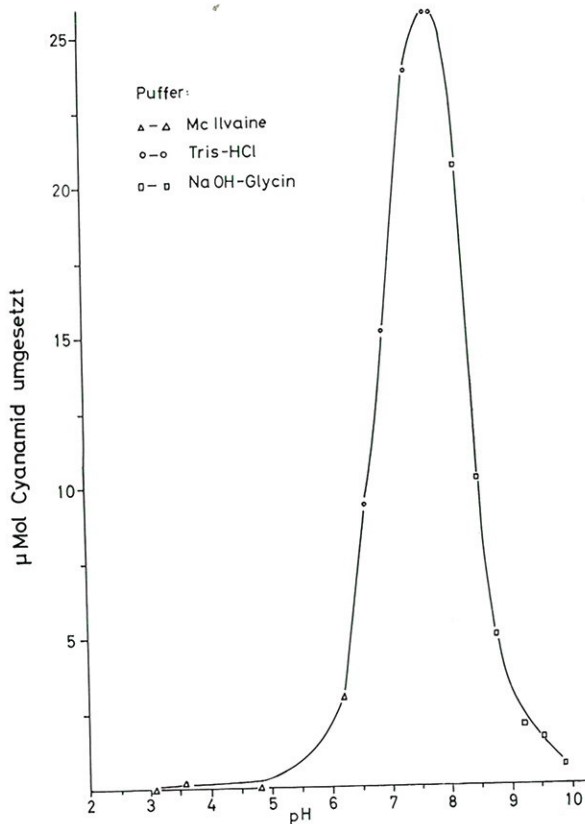


Abb. 5: Abhängigkeit der Cyanamidase-Aktivität vom pH-Wert. Bedingungen: Cyanamid $40 \mu\text{M}$; die angegebenen Puffer je $300 \mu\text{M}$; Protein $0,49 \text{ mg}$; Gesamtvolumen 1 ml ; Reaktionszeit 10 min bei 25°C .

Temperatur-Abhängigkeit der Reaktion

Der optimale Temperaturbereich liegt bei $40\text{--}55^\circ \text{C}$. Die noch rasche Umsetzung bei 70°C zeigt, daß das Enzym eine gute Stabilität gegenüber thermischen Einflüssen besitzt (Abb. 6).

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

Aus der Abb. 7 läßt sich entnehmen, daß bei zunehmender Cyanamidkonzentration keine Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit eintritt. Aus dem Diagramm nach LINEWEAVER und BURK (1934) wurde ein K_m -Wert von $3,7 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/Liter}$ ermittelt.

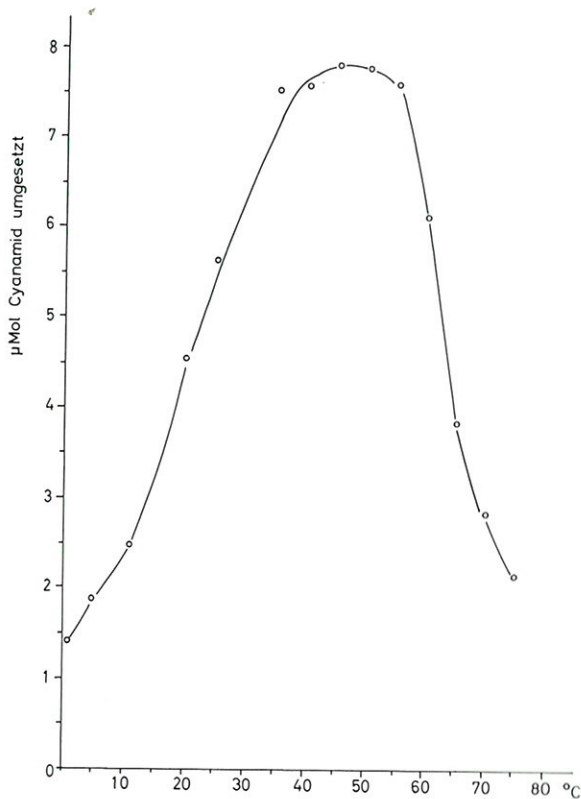


Abb. 6: Temperatur-Abhängigkeit der Cyanamid-Hydratase. Bedingungen: Cyanamid $8 \mu\text{M}$; Citrat-Phosphat-Puffer $\text{pH} = 6,0$ $60 \mu\text{M}$; Protein $0,58 \text{ mg}$; Gesamtvolumen $0,4 \text{ ml}$; Reaktionszeit 15 min bei den angegebenen Temperaturen.

Substratspezifität der Cyanamid-Hydratase

Von den gewählten Substraten wurde außer Cyanamid praktisch keine andere Substanz angegriffen. Die geringfügige Abnahme bei Guanidino-Harnstoff-Sulfat und bei Kreatin erfolgte nach einer sehr langen Inkubationszeit von 2 Stunden. Aus den Werten der Tab. 2 kann somit auf eine gute Substratspezifität geschlossen werden, welche die unsubstituierte Atomgruppierung $\text{HN} = \text{C} = \text{NH}$ bzw. $\text{H}_2\text{N} - \text{C} \equiv \text{N}$ voraussetzt.

Beeinflussung der Reaktion durch Cofaktoren

Die Enzymaktivität wird durch Mn^{2+} gefördert; jedoch tritt bei einer Konzentration von 10^{-2} M wieder eine deutliche Hemmung ein, Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} und Co^{2+} hemmen die Reaktion in den angegebenen Konzentrationen. Siehe dazu Abb. 8.

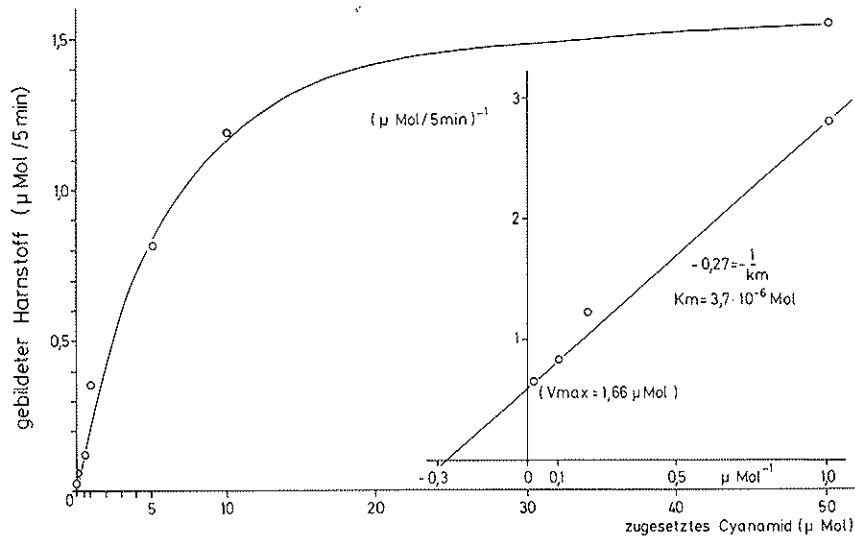


Abb. 7: Abhängigkeit der enzymatischen Harnstoffbildung von der Konzentration des Cyanamids. Bedingungen: Cyanamid 0,05 bis 50 μM ; Tris-HCl-Puffer pH = 7,0 100 μM ; Protein 0,49 mg; Gesamtvolumen 1 ml; Reaktionszeit 5 min bei 25° C.

Die Mn^{2+} -Abhängigkeit steht in Einklang mit Untersuchungen von RADAELLI und BRUNO (1969), welche die Cyanamid-Umsetzungen in einer Reihe von Böden getestet haben.

Eine Abhängigkeit von Sulfhydryl-Reagentien (z. B. Mercaptoäthanol, Cystein) konnte nicht beobachtet werden. Auch erfolgte während der Aufarbeitung keine meßbare Inaktivierung des Enzyms durch die Tätigkeit von Phenoloxidasen, welche im Rohextrakt zugegen sind.

4. Induktion und Lokalisierung der Cyanamid-Hydratase

Aus der Hemmung des Pilzwachstums (Abb. 1) kann bereits ersehen werden, daß die Cyanamid-Hydratase kein konstitutives Enzym ist; denn bei der raschen Umsetzung des Cyanamids durch das Enzym wäre ein derartiger Wachstumsstopp nicht denkbar. So kann auch bei Anzucht der Pilze mit Nitrat als Stickstoffquelle keinerlei Cyanamidase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Zugabe von Cyanamid induziert jedoch die Bildung des Enzyms, so daß nach 48 Stunden die volle Aktivität im *in-vitro*-Ansatz nachzuweisen ist.

Die Versuchsansätze waren folgende: In P-Schalen wurden aus Konidien von *Myrothecium* Mycelien herangezogen, wobei das in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-1}$ M zugesetzte Nitrat nach 7 Tagen völlig verbraucht war. Nun wurde zu einem Teil der Kulturen 10^{-2} M Nitrat zugefügt, zum anderen Teil jedoch Cyanamid in gleicher Konzentration. Nach 48 Stunden ergaben die Cyanamidase-Aktivitäts-Teste (siehe Material und Methodik) in den Nitrat-

Tab. 2: Die Substratspezifität der Cyanamid-Hydratase. Bedingungen: Substrat je $12 \mu\text{M}$; Tris-HCl-Puffer $\text{pH} = 7,0$ $60 \mu\text{M}$; Protein $0,52 \text{ mg}$; Reaktionszeit 2 Stunden bei 25°C . Zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Substrate siehe im Abschnitt Material und Methode.

Substrat	Abnahme in μM	rel. Aktivität in %
Cyanamid	12	100
Arginin	0,420	3,5
Ornithin	0,0	0
Harnstoff	0,0	0
Guanidin	0,181	1,5
Guanidino-Harnstoff	0,652	5,4
Kreatin	1,260	10,5
Kreatinin	0,140	1,2
Guanidino-Essigsäure	0,0	0

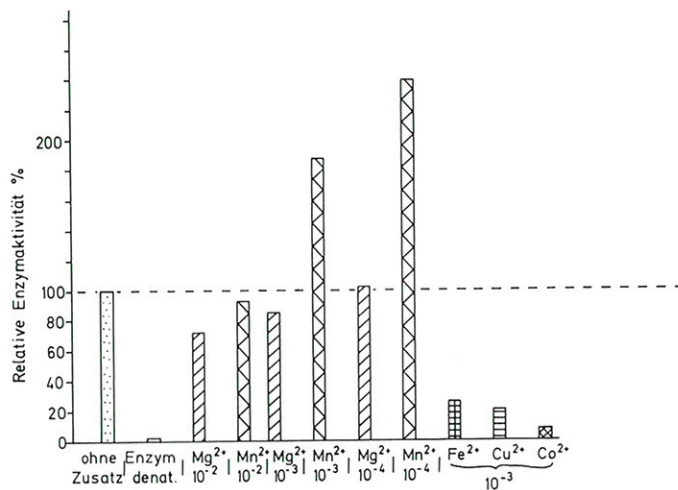


Abb. 8: Beeinflussung der Enzymaktivität durch Metall-Ionen. Bedingungen siehe Tabelle 1.

kulturen kein positives Ergebnis. In den Cyanamidkulturen wurden dagegen bis zu 45 Enzym-einheiten (U) gemessen.

Bei den Wachstumsversuchen wurde festgestellt, daß nach Abzentrifugation oder Abfiltration der Pilze im Nährmedium freie Cyanamid-Hydratase vorhanden ist. Der Gehalt an diesem Enzym im Nährmedium steigt mit zunehmender Kulturdauer an (Tab. 3). Ob es sich jedoch um eine aktive Exkretion des Enzyms handelt, oder ob die Cyanamidase nur durch Zell-Lyse in das Medium gelangt, konnte nicht eindeutig entschieden werden. Für die Interpretation als Exoenzym spricht aber die Tatsache, daß bereits in der frühen log. Wachstumsphase (3. Tag) Enzym im Medium nachweisbar ist und daß die Gesamtaktivität bei stagnierendem Wachstum (34. Tag) im Medium größer ist als im Mycel.

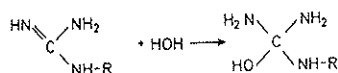
Tab. 3: Verteilung der Gesamtaktivität (in internat. Enzymeinheiten) einer Pilzkultur nach 3, 21 und 34 Tagen Kulturdauer. Bedingungen des Aktivitäts-Testes siehe Tabelle 1.

Kulturdauer in Tagen	3	21	34
Gesamtaktivität im Pilzmycel	1203	1429	1015
Gesamtaktivität im Nährmedium	218	612	1363

Diskussion der Ergebnisse

Die Hinweise bei LAMAIRE und BRUNEL (1951) auf ein adaptives Enzym, welches Cyanamid in Harnstoff umsetzt, konnten durch diese Arbeit bestätigt werden. Aus den Ergebnissen über die molekulare Umsetzung von Cyanamid mit Wasser zu Harnstoff geht jedoch hervor, daß es sich nicht um eine Hydrolase (E.C.-Gruppe 3.5.) handeln kann wie bei der Zerlegung des gebildeten Harnstoffs durch die Urease (E.C. 3.5.1.5.). Die Cyanamidase ist vielmehr ein Enzym der E.C.-Gruppe 4.2.1., eine Hydratase. Zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit ist nur eine geringe Substratkonzentration von $3,7 \cdot 10^{-6}$ Mol/l erforderlich.

Interessant ist die Substratspezifität des Enzyms, welches praktisch nur Cyanamid umsetzt. Guanidine reagieren nicht, obwohl sie Wasser nach folgender Gleichung anlagern können. Diese Reaktion wurde von ROCHE und LACOMBE (1952) als erster Schritt für die Arginin-Desiminase aus Bäcker-Hefe beschrieben.



Unter den in Tab. 1 genannten Bedingungen errechnet sich eine katalytische Aktivität von 17,1 Mol Cyanamid-Umsatz pro Minute und 100 g Enzymprotein.

Derartige Umsätze wurden in den Arbeiten von HOFMANN et al. (1954) und LATZKO (1955) bei Extrakten aus höheren Pflanzen bei weitem nicht erreicht. In diesen Untersuchungen wurden mit Präparaten aus 20 g Sojamehl und einer Inkubationszeit von 144 Stunden maximal 2,5 mM Cyanamid umgesetzt.

Aus diesen geringen Werten kann gefolgert werden, daß bei höheren Pflanzen das Cyanamid nur zu einem geringen Teil durch eine Hydratase verwertet wird.

Eigene Versuche mit höheren Pflanzen (Blätter und Wurzeln von Maispflänzchen und Weizenkeimlingen) ergaben, daß bei identischen Aufarbeitungs-Bedingungen im Vergleich zu *Myrothecium* maximal 1,8 % Cyanamidase-Aktivität festgestellt werden kann. Bei diesen Versuchen konnte jedoch keine vollständige Sterilität erreicht werden, so daß der positive Cyanamidase-Test durchaus als «Rest-Aktivität» von in der Rhizosphäre verbliebenen Mikroorganismen zu erklären ist. Die höheren Pflanzen können dagegen ^{14}C -markiertes Cyanamid aufnehmen, wie es Isotopenversuche von HOFMANN und LATZKO (1954) sowie WÜNSCH und AMBERGER (1968) nachgewiesen haben. Über Zerlegung bzw. Einbau des Cyanamids in der Pflanze liegen bisher noch keine weiteren Arbeiten vor.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Gesellschaft der Freunde der TU München danken wir für die Förderung dieser Arbeit durch Gewährung einer Sachbeihilfe; Fr. E. ALT für die gewissenhafte Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Literatur

- AMBERGER, A.: Wirkungsmechanismus von Cyanamid auf den Atmungsstoffwechsel parasitärer Pilze. *Z. Pflanzenern. und Bodenkunde* 119, 1–10 (1968).
- AMBERGER, A., und A. WÜNSCH: Pflanzenphysiologische Wirkungen des Cyanamids. *Landwirtschaftl. Forschung* 16, 162–172 (1963).
- BALKS, R., und I. REEKERS: Nitratbestimmung in Pflanzensubstanz mit 1,2,4-Xylenol. *Landwirtschaftl. Forschung* 13, 134–136 (1960).
- BERNT, E., und H. U. BERGMAYER: Harnstoff. In H. U. BERGMAYER: Methoden der enzymatischen Analyse, Band II, S. 1738–1741, Verlag Chemie Weinheim 1970.
- ERNST, D.: Die Umsetzung des Cyanamids in Kulturböden. *Z. Pflanzenern. und Bodenkunde* 116, 34–44 (1967).
- GILMAN, J. C.: A manual of soil fungi. The Iowa State College Press; Ames, Iowa 1945.
- HALLIWELL, G.: Cellulose. In H. U. BERGMAYER: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 64–71, Verlag Chemie Weinheim 1962.
- HOFMANN, ED., und E. LATZKO: Anwendung der Radioautographie zum Studium der Aufnahme und Verteilung von $H_2^{14}CN_2$ durch die Pflanze. *Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde* 66, 222–226 (1954).
- HOFMANN, ED., E. LATZKO und A. SÜSS: Über Aufnahme und fermentativen Abbau von Cyanamid durch höhere Pflanzen. *Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde* 66, 193–202 (1954).
- HOFMANN, ED., und A. WÜNSCH: Verwendung von Nitroprussidreagens in der Papierchromatographie. *Naturwiss.* 45, 338 (1958).
- KLECZKOWSKI, K., U. HIORT und H. KATING: Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs bei Mikroorganismen. IV. Adaptive Ureasebildung bei *Micrococcus denitrificans* Beij. *Arch. Mikrobiol.* 54, 177–183 (1966).
- LAMAIRE, Y., et M. A. BRUNEL: Un nouvel enzyme d'adaptation: la cyanamidase. *Compt. rend. Acad. Sci. (Paris)* 232, 872–873 (1951).
- LATZKO, E.: Zur Biochemie des Cyanamids. *Landwirtschaftl. Forschung*, 6. Sonderheft, 113–116 (1955).
- LINWEAVER, H., and D. BURK: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. chem. Soc.* 56, 658–666 (1934).
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265–275 (1951).
- MACHOLÁN, L.: Photometrische Bestimmung von α -Keto- δ -aminovaleriansäure und Prolin. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 328, 111–119 (1962).
- MANDELS, M., and E. T. REESE: Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bact.* 73, 269–278 (1956).
- MOORE, S.: Amino acid analysis; aqueous dimethylsulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J. biol. Chem.* 243, 6281–6283 (1968).
- RADAELLI, L., e V. BRUNO: Ricerche sull'idrolisi della cianamide ad urea. III. Attività catalitica di terreni minerali. *Agrochimica (Pisa)* 13, 103–110 (1969).
- RATHSACK, K.: Über Umsetzungsprodukte des Cyanamids im Boden. *Landwirtschaftl. Forschung*, 6. Sonderheft, 116–123 (1955).
- ROCHE, J., et G. LACOMBE: Sur l'argininedésiminase et sur la formation enzymatique de citrulline par les levures. *Biochem. Biophys. Acta* 9, 687–692 (1952).
- ROSENBERG, H., A. H. ENNOR and J. F. MORRISON: The estimation of arginine. *Biochem. J.* 63, 153–159 (1956).

Z. Pflanzenphysiol. Bd. 70. S. 74–87. 1973.

- SNELL, F. D., and C. T. SNELL: Colorimetric methods of analysis, Vol. II, p. 785-807, Van Nostrand, London, Toronto 1949.
- STAUFF, J., und R. JAENICKE: Physikalische Chemie der Lösungen. In H. M. RAUEN: Biochem. Taschenbuch, Band II, S. 37-121, Springer-Verlag Berlin 1964.
- STELLER, W. A., I. B. FREDERIK and P. W. MORGAN: Determination of cyanamide residues. J. Agric. Food Chem. 13, 329-330 (1965).
- TARAS, M. J.: Nitrate determination in water by the phenoldisulphonic acid method. Analytical Chem. 22, 1020-1022 (1950).
- WATT, G. W., and J. D. CHRISP: Spectrophotometric method for determination of urea. Analytical Chem. 26, 452-453 (1954).
- WÜNSCH, A., und A. AMBERGER: Über den Nachweis von Cyanamid und dessen Umwandlungsprodukten in Pflanzen. Atompraxis 14, 1-2 (1968).

Dr. HARALD STRANSKY, Botanisches Institut der Westf. Wilhelms Universität, D-44 Münster, Schloßgarten 3.

Prof. Dr. A. AMBERGER, Institut für Pflanzenernährung der TU München-Weihenstephan, D-805 Freising-Weihenstephan.