

Über die Wirkungsweise der Phosphatase.¹⁾

I. Mitteilung.

Von

Hans Euler und Sixten Kullberg.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)
(Der Redaktion zugegangen am 8. Juli 1911.)

Vergärt man Zucker durch Hefepreßsaft oder Trockenhefe in Gegenwart von Phosphaten, so entstehen unter der Einwirkung eines Enzyms Kohlenhydrat-Phosphorsäureester, welche nach den Untersuchungen von Harden und Young, Iwanoff und v. Lebedew aller Wahrscheinlichkeit nach die Rolle von Zwischenprodukten spielen. Die chemische Zusammensetzung ist von den genannten Autoren in letzter Zeit mehrfach bearbeitet worden, ohne daß übereinstimmende Resultate erzielt worden wären. Sichergestellt ist unserer Ansicht nach, daß in den entstehenden Produkten zwei Phosphorsäureester auf sechs Kohlenstoffatome kommen. Die Frage, ob ein Triosemonophosphorsäureester oder ein Hexosediphosphorsäureester vorliegt, dürfte sich dahin entscheiden, daß beide Stoffe gebildet werden. Wir werden in einer folgenden Mitteilung noch auf die Molekulargröße des Esters zurückkommen, und beschäftigen uns in dieser Arbeit mit dem synthetisierenden Enzym, welches die Bildung der genannten Ester vermittelt.

Methodik: Analytisch wird die Wirkungsweise des Enzyms dadurch festgestellt, daß die direkt fällbare Phosphorsäure, welche mit der Zeit aus den Lösungen verschwindet, mit Magnesiamischung gefällt und als $Mg_2P_2O_7$ gewogen wird. Die einfachere Methode, freie Phosphorsäure bezw. anorganisches

¹⁾ Die vorliegende Untersuchung ist noch nicht abgeschlossen. Wir teilen eine Reihe von Versuchen jetzt schon mit, da der eine von uns (S. K.) verhindert ist, sich an der Fortsetzung der Arbeit zu beteiligen.

Phosphat durch Urantitration zu bestimmen, führt zu nicht genügend genauen Resultaten, und es käme als weitere Methode nur noch diejenige von Neumann in Betracht. Wir haben dieselbe nicht angewandt, da nicht sicher festgestellt ist, inwieweit die nach derselben erhaltenen Resultate durch die Gegenwart von Eiweißkörpern beeinflußt werden.

Die Enzymversuche wurden nach gewissen Zeiten dadurch abgebrochen, daß ein bestimmtes Volumen der Versuchslösung in eine Lösung von Ammoniak einpipettiert wurde. Da die Hefenphosphatase sich aus getrockneter Hefe durch Wasser etwa in der gleichen Weise wie Invertase ausziehen läßt, so versuchten wir, die an der Invertase erprobten Reinigungsmethoden auch hier anzuwenden.

Die folgenden drei Parallelversuche zeigen, daß die Phosphatase durch Kaolin aus neutraler Lösung weit mehr adsorbiert wird als Invertase.

300 ccm 23%ige Rohrzuckerlösung wurden durch 50 g Trockenhefe 3 Stunden lang in Gärung gehalten. Hierauf wurde filtriert und das Filtrat A geteilt.

1. Nicht weiter behandelt.
2. 50 ccm Lösung A mit 20 g Kaolin verrieben und filtriert.
3. Lösung A mit Bleiacetat gefällt, mit Kaolin verrieben und filtriert.

25 ccm der Lösung 1 resp. 2 oder 3 wurden mit 25 ccm 2%iger neutralisierter NaH_2PO_4 -Lösung gemischt. Nach Verlauf der Zeit t wurde die Reaktion in den der Mischung entnommenen Proben durch Zusatz von Ammoniak gehemmt. In der folgenden Tabelle 1 sind die in je 10 ccm der Mischung vorhandenen Mengen direkt fällbaren, also nicht organisch gebundenen Mengen Phosphat als $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ermittelt.

Tabelle 1.

Minuten	1	2	3
1	0,0924	0,0921	0,0919
120	0,0790	0,0917	0,0907
193	0,0717	0,0930	0,0902

Die Möglichkeit, die Phosphatase zu reinigen, ist insofern geringer als bei der Invertase, als eine Fällung des Enzyms durch Alkohol mit einer viel erheblicheren Zerstörung des Enzyms verknüpft ist.

Aus gewöhnlichem Extrakt der Trockenhefe¹⁾ wurde durch Alkohol eine Fällung hervorgerufen. Dieselbe wurde mit Wasser digeriert und dann filtriert. 20 ccm dieses Filtrats + 10 ccm neutralisierte 5%ige NaH_2PO_4 -Lösung + 10 ccm angegorene Zuckerlösung. Dieser Mischung wurden in oben angegebener Weise Proben entnommen.

Tabelle 2.

Minuten	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$
2	0,0999
170	0,0991
386	0,0989

Es zeigte sich also, daß einstweilen die Phosphatase direkt in Lösung studiert werden muß.

Chemische Dynamik der Phosphatase.

300 ccm einer 23%igen Rohrzuckerlösung wurden durch 50 g vakuumgetrocknete Hefe während 3½ Stunden teilweise vergoren und hierauf filtriert.

a) 40 ccm des Filtrates wurden mit 40 ccm neutralisierter 2%iger NaH_2PO_4 -Lösung gemischt. Die Reaktion wurde in der üblichen Weise abgebrochen.

b) In 40 ccm des Filtrates wurden 1,6 g Glukose gelöst, dazu wurde wie oben 40 ccm neutralisierte 2%ige NaH_2PO_4 -Lösung gesetzt.

¹⁾ In diesen und folgenden Versuchen wurde die Hefe mit dem 10fachen Gewicht Wasser extrahiert.

Tabelle 3.

Normalität von $H_3PO_4 = 0,0828$			Normalität der ursprünglichen Zuckerlösung ¹⁾ : 1,28-norm. Normalität der bei b zugesetzten Zuckersäure: 0.11-norm.		
a			b		
Minuten	g $Mg_2P_2O_7$	$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	Minuten	g $Mg_2P_2O_7$	$k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$
0	0,0924	—	0	0,0909	—
111	0,0742	$8,6 \cdot 10^3$	105	0,0736	$8,7 \cdot 10^3$
284	0,0449	11,3	278	0,0491	9,6
451	0,0269	11,8	446	0,0323	10,8
1440	0,0051	—	1440	0,0082	—

Der Reaktionsverlauf ist offenbar ein nahezu monomolekularer. Die nächstliegende Deutung ist, daß derjenige Stoff, mit welchem die Phosphorsäure reagiert, in so großem Überschuß vorhanden ist, daß die Konzentration desselben durch die Esterbildung kaum geändert wird.

Schon aus den Zahlen der Tabelle 3 geht hervor, daß fast alle Phosphorsäure zur Esterbildung verbraucht wird, d. h. daß die Esterbildung unter den gewählten Versuchsbedingungen nahezu vollständig verläuft. Wir haben aber noch durch weitere Versuche feststellen wollen, ob sich nicht die Grenze der Esterbildung bzw. die entgegengesetzte Reaktion nachweisen läßt. Mit Extrakt von Trockenhefe wurde vergorene Glukoselösung von wechselnder Verdünnung gemischt und in jeder dieser Mischung wurde der Phosphatumsatz festgestellt.

1. 50 ccm Hefenextrakt + 20 ccm vergorene Glukoselösung + 20 ccm neutralisierte, 5%ige NaH_2PO_4 -Lösung.

2. 35 ccm Hefenextrakt + 5 ccm vergorene Glukoselösung + 5 ccm neutralisierte, 5%ige NaH_2PO_4 -Lösung + 45 ccm Wasser.

35 ccm Hefenextrakt + 5 ccm vergorene Glukoselösung + 5 ccm neutralisierte, 5%ige NaH_2PO_4 -Lösung + 135 ccm Wasser.

¹⁾ Berechnet auf Glukose.

Tabelle 4.

	1.	2.	3.
H_3PO_4	0,080	0,020	0,010
Hefenextrakt	1	0,7	0,35
Zucker	0,246	0,061	0,030
g $Mg_2P_2O_7$: 0 Stunden . . .	0,0960	0,0322	0,0153
„ „ : 18 „	0,0220	0,0153	0,0080

Es wurde noch eigens geprüft, ob die Phosphoresterbildung durch Hefenextrakt reversibel ist.

25 ccm der obigen Mischung 1 nach 18 Stunden wurden mit 25 ccm Hefenextrakt und 50 ccm Wasser gemischt.

Tabelle 5.

Zeit in Stunden	g $Mg_2P_2O_7$
0	0,0220
8	0,0216

Eine Spaltung des gebildeten Phosphorsäureesters bewirkt also der Hefeextrakt unter den angegebenen Bedingungen nicht.

Durch Kontrollversuche mit angegorener Glukose und Phospat wurde festgestellt, daß das zugesetzte Enzym synthetisch sehr wirksam war.

Einfluß der Alkalinität.

1. 25 ccm Trockenhefenextrakt + 10 ccm angegorene Glukoselösung + 10 ccm 5%ige NaH_2PO_4 -Lösung.

2. 25 ccm Trockenhefenextrakt + 10 ccm gegorene Glukoselösung + 10 ccm 5%ige Na_2HPO_4 -Lösung.

Tabelle 6.

Temperatur 19°.

Zeit in Minuten	1. g $Mg_2P_2O_7$	2. g $Mg_2P_2O_7$
5	0,1198	0,0509
150	0,1090	0,0398
1080	0,0726	0,0000

Die Esterbildung wird den obigen Ergebnissen zufolge durch eine Konzentration von OH-Ionen von etwa 10^{-5} stark beschleunigt. Bei welcher OH-Konzentration das Optimum der Esterbildung liegt, muß erst durch weitere Versuche festgestellt werden.

Einfluß der Temperatur.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Spaltungen verdoppelt sich im allgemeinen bei einer Temperaturerhöhung von 10° . Im allgemeinen steigen enzymatische Reaktionsgeschwindigkeiten langsamer als nichtenzymatische. In bezug auf Enzymsynthesen liegen bis jetzt keine Angaben vor.

Den auf S. 18 beschriebenen Versuch mit NaH_2PO_4 haben wir gleichzeitig bei 20° und bei 30° ausgeführt und stellen die beiden Ergebnisse in folgender Tabelle zusammen:

Minuten	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ bei 20°	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ bei 30°
5	0,1198	0,1137
150	0,1090	0,0975
1080	0,0726	0,0475

Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei beiden Temperaturen verhalten sich wie 1 zu 1,75. Der Temperaturkoeffizient dieser Synthese weicht also nicht wesentlich von denjenigen Werten ab, welche für enzymatische Spaltungen gefunden wurden. Bei der überwiegenden Mehrzahl derselben beträgt der Koeffizient für 10° Temperaturerhöhung 1,8—2,2.

Über die Wärmeempfindlichkeit der Phosphatase wird in einer folgenden Mitteilung näher berichtet werden. Hier sei nur folgendes erwähnt:

Arbeitet man mit einem Überschuß von angegebener Glukose, so kann man die Reaktionsgeschwindigkeit bei gegebener Temperatur durch eine Konstante ausdrücken. Erhitzten wir den Hefenextrakt vor der Mischung eine halbe Stunde lang auf die Temperatur von 60° , so zeigte sich die Reaktionsgeschwindigkeit auf etwa $\frac{1}{9}$ ihres ursprünglichen Wertes vermindert. Die Reaktionskonstanten betragen nämlich:

	k · 10 ³
Vor dem Erhitzen des Hefenextraktes	13,2
Nach 1/2-stündigem Erhitzen des Hefenextraktes auf 60°	1,5

Die größten Unsicherheiten in bezug auf die Esterbildung liegen darin, daß die Natur desjenigen Stoffes oder derjenigen Stoffe, welche mit dem Phosphat reagieren, noch unbekannt ist. Zunächst haben wir konstatiert, daß unveränderte Glukose nicht bezw. nur langsam mit Phosphat reagiert, und zwar bleibt diese Reaktion sowohl bei neutraler, als bei alkalischer und saurer Reaktion aus. Dies zeigen die folgenden drei voneinander unabhängigen Versuche, welche teils mit neutralisiertem NaH_2PO_4 , teils mit Na_2HPO_4 ausgeführt worden waren.

Tabelle 8.

Minuten	Neutralisiertes NaH_2PO_4	Na_2HPO_4	Na_2HPO_4
	1.	2.	3.
2	0,0782	0,0935	0,0520
120	0,0784	—	—
328	0,0783	—	—
840	—	0,0931	0,0475

Die drei Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt:

1. 25 ccm Hefenextrakt + 4 g Glukose + 10 ccm neutralisierte 5%ige NaH_2PO_4 -Lösung + 15 ccm Wasser.

2. 20 ccm Hefenextrakt + 2 g Glukose + 20 ccm 5%ige Na_2HPO_4 -Lösung.

3. 25 ccm Hefenextrakt + 2 g Glukose + 10 ccm 5%ige Na_2HPO_4 -Lösung + 10 ccm Wasser.

In der Tabelle 8 sind die Werte des gefundenen $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in Gramm angegeben.

Um darüber Aufschluß zu erhalten, welche Umwandlungsprodukte der Glukose die Verbindung mit der Phosphorsäure eingehen, haben wir in einer Glukoselösung die Gärung durch Trockenhefe verschieden weit gehen lassen und diese teilweise vergorenen Flüssigkeiten dann unter den gleichen Versuchsbedingungen mit Hefenextrakt und Phosphat gemischt. Ver-

suchsbedingungen sind die folgenden: 75 ccm 20%ige Glukoselösung wurden mit 15 g Trockenhefe während folgenden Zeiten vergoren:

1. 115 Minuten
2. 190 »
3. 275 »

Bei jeder Versuchsreihe wurden 10 ccm der teilweise vergorenen Glukoselösung mit 25 ccm Hefenextrakt und 10 ccm 5%iger Na_2HPO_4 -Lösung¹⁾ gemischt. Die folgenden Tabellen geben wiederum die nach verschiedenen Zeiten gefundenen Gramm $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ an.

Tabelle 9.

1. Gärungszeit der Glukose- lösung = 115 Min.		2. Gärungszeit der Glukose- lösung = 190 Min.		3. Gärungszeit der Glukose- lösung = 275 Min.	
Zeit in Min.	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Zeit in Min.	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Zeit in Min.	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$
3	0,0464	3	0,0501	3	0,0571
283	0,0025	200	0,0390	187	0,0520
1244	0,0000	1156	0,0236	1150	0,0510

Biologisch ist natürlich die Frage von größter Bedeutung, welche Stoffe des Pflanzen- und Tierkörpers mit Phosphaten enzymatisch verestert werden. Wir haben nur einige vorläufige Versuche angestellt, welche es wahrscheinlich machen, daß Arabinose in höherem Grade als unveränderte Glukose mit Phosphaten reagiert.²⁾

¹⁾ Kommt eine stärkere Konzentration des Dinatriumphosphats zur Anwendung, so wird die Reaktion wieder verzögert, wie folgende Tabelle zeigt:

25 ccm des zu obigen Versuchen angewandten Hefenextraktes + 10 ccm Glukoselösung 2 + 10 ccm 10%ige Na_2HPO_4 -Lösung.

Zeit in Minuten	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$
3	0,0813
202	0,0740
1165	0,0557

²⁾ Negative Resultate haben wir bis jetzt mit Inosit, Glycerin, Maunit und mit Alanin erhalten.

25 ccm Hefenextrakt + 4 g Arabinose + 10 ccm neutralisierte, 5%ige NaH_2PO_4 -Lösung + 15 ccm Wasser.

Tabelle 10.

Zeit in Minuten	g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$
2	0,0808
115	0,0790
336	0,0740

Die Frage, welcher Kohlenhydratrest mit der Phosphorsäure verbunden ist, versuchten wir auch in der Weise zu lösen, daß Lösungen nach der Esterbildung durch geringen Zusatz von Säuren und Basen gespalten wurden. Indessen konnten bei diesen Versuchen niemals einheitliche Kohlenhydrate erhalten werden und besonders auffallend war, daß niemals eine optisch-aktive Substanz zurückerhalten wurde.

Die Spaltungen wurden in folgender Weise vorgenommen. 50 g Trockenhefe vergären während 12 Stunden bei 30° 400 ccm 25%ige Glukoselösung. Die filtrierte Lösung wurde mit 30 g neutralisierten Natriumphosphates versetzt. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung kurz aufgeköcht, um den Hauptteil der Eiweißkörper zu entfernen.

Hierauf wurden je 10 ccm dieser Lösung a gemischt mit

1. 10 ccm Wasser
2. 10 » 0,2 n-KOH
3. 10 » 0,3 n-HCl.

Diese Mischungen wurden teils direkt in Bezug auf freie Phosphorsäure untersucht, teils nach 75 Minuten langem und nach 140 Minuten langem Kochen in zugeschmolzenen Röhren. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 11.

Zusammensetzung der Lösung	Ungekocht	Gekocht	
		75 Min.	140 Min.
10 ccm Lösung a + 10 ccm H_2O . . .	0,0487	0,1645	0,2175
10 » » a + 10 » 0,2-n-KOH .	0,0485	0,1289	0,1771
10 » » a + 10 » 0,3-n-HCl .	—	0,0485	0,0651

Es zeigt sich also, daß der Phosphorsäureester in neutraler und alkalischer Lösung sehr viel schneller gespalten wird als in saurer.

Da durch Kochen des Esters der Kohlenhydratrest offenbar zerstört wird, haben wir versucht, die Spaltung enzymatisch vorzunehmen in der Erwartung, daß die Phosphatbildung reversibel sei; wie bereits auf Seite 19 erwähnt, hat dieser Versuch doch nicht zum gewünschten Resultat geführt.

Durch diese Ergebnisse war die Möglichkeit gegeben, daß dasjenige Umwandlungsprodukt der Glukose, welches mit der Phosphorsäure reagiert, durch stärkere Erwärmung selbst zerstört wird. Es scheint dies indessen nicht der Fall zu sein, wie folgende Versuche zeigen: 100 ccm 20%ige Glukoselösung wurden mit 20 g Trockenhefe während einer $\frac{1}{2}$ Stunde teilweise vergoren, worauf abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde geteilt:

Teil A wurde aufgekocht und durch Filtration von koaguliertem Eiweiß befreit.

Teil B wurde nicht weiter behandelt.

10 ccm der Lösung A bezw. B wurden mit 25 ccm Hefenextrakt und 10 ccm neutralisierter 5%iger NaH_2PO_4 -Lösung gemischt.

Tabelle 12.

Zeit in Minuten	A. g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	B. g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$
1	0,0972	0,0960
123	0,0947	0,0825
218	0,0889	0,0706

Die folgenden Versuche zeigen, daß aus Glukose, Fruktose und Rohrzucker durch Trockenhefe der Phosphorester in gegebener Zeit in gleicher Menge gebildet wird.

10 g Trockenhefe	10 g Trockenhefe	10 g Trockenhefe
100 » Wasser	100 » Wasser	100 » Wasser
25 » Glukose	25 » Fruktose	25 » Rohrzucker
6 » K_2HPO_4	6 » K_2HPO_4	6 » K_2HPO_4
Stunden g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Stunden g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Stunden g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$
0 0,3968	0 0,3925	0 0,3940
2 0,3061	2 0,2885	2 0,3110

Durch den Versuch mit Rohrzucker wurde festgestellt, daß weder α -Glukose noch α -Fruktose, welche ja bei dessen enzymatischer Spaltung primär entstehen, eine besondere Fähigkeit zur Phosphorsäureesterbildung besitzt.

Aus allen drei Zuckerarten wird also das gleiche Zwischenprodukt entstehen, welches der Esterbildung unterliegt.

Die mitgeteilten Ergebnisse ließen vermuten, daß Dioxyaceton dasjenige Zwischenprodukt der Gärung sei, welches mit Phosphorsäure in Reaktion tritt. Deswegen und in Rücksicht auf die Arbeit von L. Iwanoff¹⁾ wurde geprüft, ob Phosphorsäure unter der Einwirkung von Phosphatase an Dioxyaceton organisch gebunden wird.

Das Dioxyaceton, gewonnen nach Bertrand aus Glycerin durch die Wirkung des Sorbosebakteriums wurde dem einen von uns von Herrn Prof. J. Meisenheimer freundlichst zur Verfügung gestellt. Der folgende Versuch wurde in seinem Laboratorium von seinem Assistenten, Herrn Dr. Gambarian, während der Anwesenheit des einen von uns (Hans Euler) in Berlin ausgeführt. Beiden Herren sei für ihre bereitwillige Hilfe der aufrichtigste Dank ausgesprochen.

Versuchsbedingungen: 30 g Acetondauerhefe wurden mit 250 ccm Wasser verrührt und blieben etwa 20 Stunden damit in Berührung. Hierauf wurde der Extrakt durch Zentrifugieren vom Rückstand getrennt. Ferner wurden in 50 ccm Wasser 10 g reinste Glukose gelöst und mit 10 g Acetondauerhefe während 1½ Stunden angegoren; auch hier wurde die Hefe abzentrifugiert (Lös. G.).

Es wurden nun folgende Parallelversuche angestellt:

A. 4 g Dioxyaceton + 25 ccm Extrakt + 10 ccm 5%ige Lösung + 10 ccm Wasser.

B. 25 ccm angegorene Glukose (Lös. G) + 10 ccm 5%ige Na_2HPO_4 -Lösung + 10 ccm Wasser.

Die Bestimmung der fällbaren Phosphatmenge geschah wie früher.

¹⁾ Zentralblatt f. Bakt. (II). Bd. 24, 1909.

Tabelle 13.

Zeit in Stunden	g $Mg_2P_2O_7$ in 10 ccm	
	B.	A.
0	0,0705	0,0658
4	Spuren	0,0625
20	—	0,0594

Ein Verbrauch von Phosphorsäure tritt, wie die Spalte A der Tabelle zeigt, allerdings ein, indessen ist derselbe im Vergleich zu der Esterbildung bei Gegenwart angegoener Glukose so gering, daß man schließen muß, daß Dioxyaceton nicht derjenige Bestandteil des angegoenen Zuckers ist, welcher die Phosphorsäure bindet.

Schließlich sei noch ein Versuch erwähnt, welcher zeigt, daß die Phosphatase keineswegs auf die Hefezellen beschränkt ist.

Eine Reinkultur von *Aspergillus niger* war auf Hefenwasser, welches im Verhältnis 1:10 verdünnt war und 2% Rohrucker enthielt, während eines Monats gezüchtet worden. Hierauf wurde die Nährlösung abfiltriert, der Pilz wurde auf Ton im Vakuumtrockenapparat bei 40° getrocknet.

5 g des trockenen, fein verriebenen Pilzes wurden hierauf mit 50 g Wasser, 10 g Glukose und 3 g K_2HPO_4 gemischt.

Aus 10 ccm der Lösung wurden erhalten:

Unmittelbar nach der Mischung: 0,3750 g $Mg_2P_2O_7$

Nach 30 Stunden: 0,2882 g $Mg_2P_2O_7$.

Schließlich sei noch ein Versuch erwähnt, welcher zeigt, daß Phosphatase auch in reifen Haferkörnern enthalten ist.

10 g Körner einer in den nördlichen Teilen Schwedens heimischen Hafersorte, welche ich von der hiesigen landwirtschaftlichen Akademie erhielt, wurden fein gemahlen und mit 50 ccm Wasser und Toluol über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurde abzentrifugiert und folgende Mischung hergestellt. Die dazu verwandte Glukoselösung A war 20%ig und wurde mit 10 g frischer abgepreßter Brauereihefe zwei Stunden lang vergoren.

Versuch.		Parallelversuch.	
10 ccm	Hefenextrakt	10 ccm	Wasser
20 „	Glukoselösung	20 „	Glukoselösung
10 „	2%ige K_2HPO_4 -Lösung.	10 „	2%ige K_2HPO_4 -Lösung.
Minuten	g $Mg_2P_2O_7$	Minuten	g $Mg_2P_2O_7$
0	0,1621	0	0,1638
490	0,1570	496	0,1623
720	0,1503	723	0,1619

Während im Parallelversuch nur eine ganz geringe Abnahme der fällbaren Phosphorsäure zu bemerken war, ist dieselbe bei der Einwirkung des Haferextraktes deutlich, wengleich sehr viel schwächer als die mit Hefenextrakt hervorgerufene.

Dieses Ergebnis legt die Frage nahe, in welcher Weise die Phosphorsäure die enzymatische Verzuckerung der Stärke beschleunigt. Es ist ja wohl nicht zweifelhaft, daß die «Diastase» ein Gemisch mehrerer Enzyme darstellt, und es besteht die Möglichkeit, bei der Feststellung der Beständigkeitskonstanten einzelne Komponenten der Diastase von anderen, labileren, zu trennen. Eine solche Untersuchung ist im hiesigen Laboratorium begonnen worden.

Unter den Ergebnissen der bis jetzt ausgeführten Versuche möchten wir folgende hervorheben:

1. Sowohl das untersuchte Hefenenzym als das entsprechende aus *Aspergillus niger* synthetisiert Kohlenhydratphosphorsäureester und zwar bis zum völligen Verschwinden der Phosphationen. Eine spaltende Wirkung konnte unter den entsprechenden Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

2. Die Stabilität dieses Enzyms ist geringer als diejenige der Invertase. Halbstündiges Erwärmen der neutralen wässrigen Lösung vernichtet die Phosphatase fast vollständig. Ebenso ist dieses Enzym gegen Einfluß von Chemikalien empfindlicher.

3. Die Phosphatase entwickelt die größte Wirksamkeit in schwach alkalischer Lösung.

Für die Beurteilung des durch die Phosphatase gebildeten Produktes kommen besonders die folgenden Tatsachen in Betracht:

1. Der aus angegorener Glukose und Fruktose entstehende Ester ist optisch inaktiv und bei seiner Spaltung durch Säure oder Basen werden keine optisch aktiven Produkte gewonnen.

2. Die Esterbildung erfolgt an einer Substanz, welche durch Hefe oder Aspergillus aus Glukose entsteht und wieder verbraucht wird. Aus Glukose und Fruktose, sowie Rohrzucker scheint sich ein und derselbe Stoff mit der gleichen Geschwindigkeit zu bilden.

Man wird wohl anzunehmen haben, daß zwei Enzyme an der hier besprochenen Esterbildung beteiligt sind, nämlich:

a) ein Enzym, welches die Glukose oder Fruktose in das esterbildende Kohlenhydrat umwandelt und

b) ein Enzym, die eigentliche Phosphatase, welches aus letzterem und Phosphationen die Phosphorsäureester aufbaut. Letzteres Enzym scheint auch die Esterbildung bei gewissen Kohlenhydraten direkt zu vermitteln.

Für die Ausführung der vielen Phosphorsäureanalysen, die bei dieser Untersuchung erforderlich waren, sind wir Fräulein stud. phil. Th. Berggren zu bestem Dank verpflichtet.