

Über die Wirkungsweise der Phosphatase.

II. Mitteilung.

Von

H. Euler und Hj. Ohlsén.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Dezember 1911.)

Unsere früheren Versuche über die enzymatische Phosphoresterbildung fortsetzend, haben wir die Frage, welches Kohlenhydrat der Veresterung unterliegt, von neuem einer eingehenden Prüfung unterzogen. Bei unseren bisher mitgeteilten Versuchen hatte sich gezeigt, daß reine Glukose durch Extrakt der Trockenhefe H der hiesigen St. Eriksbrauerei nicht oder fast nicht verestert wird, während die Veresterung mit Glukose, welche durch lebende Hefe vorbehandelt worden war, schnell und vollständig vonstatten geht.

Wir haben bereits früher betont, daß dieses Ergebnis nur dann erhalten wird, wenn gewisse, vermutlich nicht gärkräftige, Heferasen angewandt werden, daß also z. B. Münchener Hefe diesen Unterschied nicht oder weit schwächer erkennen läßt und zwar, wie leicht ersichtlich deshalb, weil durch die Trocknung dieser Hefen die Zymase extrahierbar wird.¹⁾ In diesen Fällen finden sich also im Extrakt der Trockenhefe diejenigen Gärungsenzyme, welche die Umwandlung der Glukose (bezw. der anderen Hexosen) bewirken.

¹⁾ Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß die erste Veröffentlichung über die Extrahierbarkeit der Zymase aus Hefe, welche bei Temperaturen von 20—35° getrocknet ist, von A. v. Lebedew (Compt. rend., Bd. 152, S. 49, 1911) herrührt. Veranlaßt durch die Studien des hiesigen Laboratoriums über freie und gebundene Hefenzyme (Vet. Ark. f. Kemi, Bd. 4, und Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 85, 1911) hat der eine von uns, unabhängig von Lebedew, Versuche über die Extrahierbarkeit der Zymase angestellt, welche aber erst in einer im Anfang Februar der hiesigen Akademie der Wiss. eingereichten, im April veröffentlichten Arbeit kurz erwähnt sind. Für unsere Versuche waren rein theoretische Gesichtspunkte maßgebend.

Die Angabe einer neuen Methode zur Gewinnung der «Zymase» verdankt man ausschließlich Lebedew.

Wie viel Zymase in Lösung geht bzw. extrahiert werden kann, ist bei allen Hefen stark von der Behandlung derselben abhängig, von der Dauer und Temperatur der Trocknung usw. Es ist deshalb von vornherein zu erwarten, daß in vielen Fällen auch aus gärschwachen Hefen gewisse, wenn auch geringe Mengen Zymase in den Extrakt übergehen und in diesen Fällen wird dann auch reine Glukose verestert, scheinbar direkt, tatsächlich aber nachdem andere Bestandteile der Zymase bereits auf die Hexose eingewirkt haben; von welcher Art diese Einwirkung ist, mag vorläufig außerhalb der Diskussion bleiben.¹⁾

Wir gehen jetzt gleich zur Mitteilung unserer experimentellen Ergebnisse über.

Ein früherer Versuch hatte folgende Zahlen ergeben:

| 25 ccm Extrakt aus Trockenhefe | | | | 25 ccm Extrakt aus Trockenhefe | | |
|---|--------|--------|--------|---|-------|--------|
| 20 „ 20%ige Glukoselösung | | | | 20 „ 20%ige angegorene | | |
| 10 „ 5%ige Na ₂ HPO ₄ | | | | Glukoselösung | | |
| | | | | 10 „ 5%ige Na ₂ HPO ₄ | | |
| Minuten . . | 0 | 150 | 250 | 0 | 50 | 150 |
| g Mg ₂ P ₂ O ₇ . | 0,0398 | 0,0394 | 0,0394 | 0,0398 | 0,218 | 0,0000 |

Es muß besonders betont werden, daß die Vorbehandlung der Glukose, also die Herstellung der «angegorenen Glukose» mit lebender Hefe geschah. Von lebenden Hefezellen wurde die Glukoselösung durch sorgfältige Filtration befreit, die Lösung wurde durch etwa 10 Minuten langes Erhitzen sterilisiert. Der Extrakt der Trockenhefe wurde stets dargestellt durch Digerieren von etwa 50 g derselben mit der 5fachen Menge Wasser während 3 Stunden bei 30°. Der Extrakt wurde gleich nach der Filtration zur Erhöhung seiner Wirksamkeit²⁾ 1/2 Stunde auf 40° erhitzt.

Der reagierenden Mischung wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen, in welchen durch Zusatz von Ammoniak die Enzymwirkung gehemmt wurde.

¹⁾ Bezüglich der Rolle des Dioxyacetons als Zwischenprodukt der Gärung verweisen wir auf die Notiz von H. Euler und S. Kullberg (Diese Zeitschr. Bd. 76, S. 241, 1912) und tragen nach, daß Hr. v. Lebedew auch in Compt. rend. Bd. 153, S. 136, 1911 Versuche über die Veresterung des Dioxyacetons mitgeteilt hat.

²⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. 37, S. 313, 1911.

Die analytische Methode war die früher angewandte; die Proben wurden mit Magnesiamischung gefällt, und die Fällung wurde als $Mg_2P_2O_7$ gewogen.

Die 5^o/_oige Lösung von Na_2HPO_4 wurde durch Abwägen des krystallisierten Salzes hergestellt: die genaue Konzentration wurde hierauf analytisch bestimmt.

10 ccm der Na_2HPO_4 -Lösung wurden mit Wasser auf 55 ccm verdünnt und dieser Lösung 10 ccm entnommen. Dieselben enthielten:

- Analyse 1. 0,0304 g $Mg_2P_2O_7$
 » 2. 0,0305 » $Mg_2P_2O_7$.

In allen folgenden Versuchen enthält das Reaktionsgemisch von Anfang des Versuches mehr anorganisches Phosphat, als dem Gehalt der obigen Lösung entspricht. Dieser höhere Phosphatgehalt entstammt der Trockenhefe, wie folgender Versuch zeigt.

50 g luftgetrocknete Trockenhefe H (Probe 15 HA₄ Öl) wurden im Thermostaten bei 30° während 3 Stunden extrahiert.

25 g Extrakt wurden mit 30 ccm Wasser vermischt. Je 10 ccm der Mischung wurden in der gewöhnlichen Weise mit Magnesiamischung gefällt und lieferten

- nach Analyse 1: 0,0158 g $Mg_2P_2O_7$
 » 2: 0,0157 » $Mg_2P_2O_7$.

Andere Extrakte dürften noch mehr Phosphorsäure enthalten haben.

Diese Phosphorsäure entstammt den Nucleinsäuren der Hefe. Im Verlaufe der Reaktion wird diese Phosphorsäure durch die im Extrakt der Trockenhefe enthaltene Nuclease abgespalten und dann verestert. So kommt es, daß in den folgenden Versuchen I—V die Zahlen für $Mg_2P_2O_7$ zu Anfang der Reaktion durchgehends höher sind als 0,0305 und nach einiger Zeit auf 0 heruntergehen.

Versuch I.

Hefe H im Vakuum zwischen 40° und 50° getrocknet.

Im Versuch B wurde die Glukose mit lebender Hefe während etwa 10 Minuten angegoren, wobei die optische Drehung im 50 mm-Rohr von 5,20° auf 5,04° zurückging: aus 150 ccm Glukoselösung entwichen 35 ccm CO₂.

25 ccm Extrakt aus Trockenhefe +
 10 „ 5%ige Na_2HPO_4 +

| A | | B | |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 20 ccm reine Glukoselösung | | 20 ccm angegorene Glukoselösung | |
| Minuten | g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ | Minuten | g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ |
| 0 | 0,0507 | 0 | 0,0500 |
| 100 | 0,0500 | 100 | 0,0472 |
| 200 | 0,0507 | 150 | 0,0450 |
| 250 | 0,0502 | 250 | 0,0235 |

Der Versuch zeigt, wie die früheren, den großen Unterschied in der Reaktionsfähigkeit der reinen und der angegorenen Glukoselösung. Die erstere wurde überhaupt nicht verestert.

Mit der gleichen Hefe und der gleichen Mischung wurde ein Gärungsversuch angestellt, wobei die Mischung vorher mit CO_2 gesättigt wurde. Eine CO_2 -Entwicklung war nicht meßbar.

Versuch IIa.

Hefe H im Vakuum bei 18° während 7 Stunden getrocknet.

Angegorene Glukoselösung: Während 10 Minuten wurden aus 100 ccm 20%iger Glukoselösung 30 ccm CO_2 entwickelt.

Drehungsrückgang: $5,33 - 5,17^\circ = 3\%$.

25 ccm Extrakt aus Trockenhefe +
 10 „ 5%ige Na_2HPO_4 +

| A | | B | | C | |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| 20 ccm reine Glukoselösung | | 20 ccm angegorene Glukoselösung | | 20 ccm angegorene, gekockte Glukoselösung | |
| Minuten | g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ | Minuten | g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ | Minuten | g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ |
| 0 | 0,0560 | 0 | 0,0560 | 0 | 0,0560 |
| 62 | 0,0558 | 73 | 0,0541 | 67 | 0,0543 |
| 130 | 0,0541 | 141 | 0,0504 | 135 | 0,0508 |
| 361 | 0,0526 | 372 | 0,0317 | 366 | 0,0344 |

Ein Vergleich der Reihen B und C ergibt, daß die angegorene Glukoselösung durch Kochen nicht oder nur wenig verändert wird. Das aus der Glukose entstandene Produkt ist also jedenfalls wärmostabil. Die beiden Reaktionen B und C verliefen langsam, da die Glukoselösungen nach der Angärung

und Filtration mit Thymol versetzt worden waren, wodurch eine Hemmung der Phosphatase eintrat.

Bei diesem Versuch war die Trocknung der Hefe in der Weise geschehen, daß der Extrakt offenbar etwas Zymase enthielt, so daß auch die nicht angegorene Glukose ein wenig verestert wurde.

Versuch IIβ.

Kommt eine gärkräftigere Hefe zur Anwendung, aus welcher nach v. Lebedew viel Zymase extrahiert werden kann, so wird bei obiger Versuchsanstellung natürlich auch Glukose verestert, welche nicht eigens vorher mit lebender Hefe vorbehandelt worden ist, da ja der Extrakt selbst Vergärung hervorruft.

«Münchener Hefe, nach v. Lebedew getrocknet» von Schroder in München. Extraktion während 2,5 Stunden bei 30°.

Angegorene Glukoselösung: Während 92 Minuten wurden aus 200 ccm 20%iger Glukoselösung 620 ccm CO₂ entwickelt. Drehungsrückgang 6,85–4,58°.

25 ccm Extrakt aus Trockenhefe +
10 » 5%ige Na₂HPO₄ +

| A | | B | |
|----------------------------|---|---------------------------------|---|
| 20 ccm reine Glukoselösung | | 20 ccm angegorene Glukoselösung | |
| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ |
| 0 | 0,0511 | 0 | 0,0532 |
| 103 | 0,0510 | 118 | 0,0000 |
| 274 | 0,0049 | 289 | 0,0000 |
| 378 | 0,0000 | 393 | 0,0000 |

Gleichzeitig mit diesen Bestimmungen wurde ein Gärungsversuch angestellt, bei welchem die entweichende Kohlensäure gewogen wurde. Aus einer Lösung von der Zusammensetzung A (also 25 ccm + 10 ccm Phosphatlösung + 20 ccm reine Glukoselösung wurden 0,7223 g CO₂ während 372 Minuten entwickelt.

Versuch III.

Die im Versuch II α erwähnte schädliche Einwirkung von Thymol kann durch folgende Messungen als festgestellt angesehen werden.

Hefe H, im Vakuum bei 18° während 6 Stunden getrocknet.

Angegorene Glukoselösung. Während 10 Minuten werden aus 100 ccm 20%iger Glukoselösung 26 ccm CO₂ entwickelt: Drehungsrückgang 5,31–5,08°.

25 ccm Extrakt aus Trockenhefe +

10 „ 5%ige Na₂HPO₄ +

| A Ohne Thymol. | | B | |
|----------------------------|---|---------------------------------|---|
| 20 ccm reine Glukoselösung | | 20 ccm angegorene Glukoselösung | |
| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ |
| 0 | 0,0500 | 0 | 0,0500 |
| 100 | 0,0487 | 100 | 0,0450 |
| 150 | 0,0480 | 150 | 0,0390 |
| 200 | 0,0470 | 250 | 0,0240 |

| C Mit Thymol. | | D | |
|----------------------------|---|---------------------------------|---|
| 20 ccm reine Glukoselösung | | 20 ccm angegorene Glukoselösung | |
| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ |
| 0 | 0,0500 | 0 | 0,0500 |
| 100 | 0,0490 | 100 | 0,0473 |
| 150 | 0,0480 | 150 | 0,0455 |
| 200 | 0,0475 | 250 | 0,0430 |

Ähnliche Resultate wurden auch mit anderen Bierhefen erhalten; so trat z. B. mit der früher von uns untersuchten Hamburger-Hefe eine fast vollständige Hemmung ein. Versuchsbedingungen wie oben angegeben.

Bierhefe der Hamburger Brauerei in Stockholm; getrocknet bei 18°.

Angegorene Glukose mit Thymol.

| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ |
|---------|---|
| 0 | 0,0570 |
| 150 | 0,0543 |
| 330 | 0,0484 |

Daß die Phosphatase von Thymol geschädigt wird, ist nicht besonders auffallend; Buchner hat bereits gefunden, daß diese Substanz die zellfreie Gärung hemmt, auch Amylasen werden durch Thymol inaktiviert.

Da nur der Zusatz eines wirksamen Antiseptikums die erforderliche Garantie dafür bietet, daß enzymatische Katalysen nicht durch die Tätigkeit lebender Zellen beeinflußt werden, haben wir dem Reaktionsgemisch stets Toluol zugesetzt, nachdem wir uns durch folgenden Versuch davon überzeugt hatten, daß ein solcher Zusatz die Wirkung der Phosphatase nicht beeinträchtigt.

Versuch IV.

Hefe H im Vakuum bei 18° während 7 Stunden getrocknet.

Angelegene Glukose; in 10 Minuten werden aus 100 ccm 20%iger Glukoselösung 25 ccm CO₂ entwickelt; Drehungsrückgang 5,27—5,05°.

25 ccm Extrakt aus Trockenhefe

10 » 5%ige Na₂HPO₄

A Ohne Toluol. B

| 20 ccm reine Glukoselösung | | 20 ccm angelegene Glukoselösung | |
|----------------------------|---|---------------------------------|---|
| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ |
| 0 | 0,0475 | 0 | 0,0475 |
| 61 | 0,0458 | 66 | 0,0428 |
| 282 | 0,0372 | 288 | 0,0000 |

C Mit Toluol. D

| 20 ccm reine Glukoselösung | | 20 ccm angelegene Glukoselösung | |
|----------------------------|---|---------------------------------|---|
| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ |
| 0 | 0,0473 | 0 | 0,0477 |
| 49 | 0,0453 | 56 | 0,0428 |
| 270 | 0,0357 | 276 | 0,0000 |

Toluol übt also keinen hemmenden Einfluß aus und bildet also für Versuche mit Phosphatase ein geeignetes Antiseptikum.

Die erste Mitteilung über Phosphatase enthält einen Versuch, nach welchem eine gewisse Menge Glukose um so un-

vollständiger verestert wird, je weiter die vorherige Angärung fortgeschritten ist. (Tab. 9.) Da dieser Versuch für das Verständnis der Phosphatbindung nicht unwesentlich ist, so haben wir uns von der allgemeinen Gültigkeit unsres Ergebnisses nochmals überzeugen wollen und haben deswegen in folgendem Versuch sowohl die Konzentration des Phosphates als auch den Grad der Vergärung variiert.

Versuch Va.

Hefe H bei 18° während 20 Stunden getrocknet.

Angegorene Glukoselösung A. In 64 Minuten werden aus 100 ccm 20% iger Glukoselösung 416 ccm CO₂ entwickelt.

Drehungsrückgang 5,77—4,57°.

25 ccm Extrakt der Trockenhefe +
20 » angegorene Glukoselösung +

| I. 10 ccm 5% ige Na ₂ HPO ₄ | | II. 10 ccm 10% ige Na ₂ HPO ₄ | | III. 15 ccm 10% ige Na ₂ HPO ₄ | |
|--|---|--|---|---|---|
| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ |
| 0 | 0,0444 | 0 | 0,0712 | 0 | 0,0909 |
| 89 | 0,0303 | 79 | 0,0679 | 74 | 0,0900 |
| 174 | 0,0000 | 164 | 0,0550 | 224 | 0,0881 |
| 239 | 0,0000 | 230 | 0,0390 | 266 | 0,0855 |

Versuch Vb.

Hefe wie in Versuch Va.

Angegorene Glukoselösung B. In 106 Minuten werden aus 100 ccm 20% iger Glukoselösung 880 ccm CO₂ entwickelt.

Drehungsrückgang 5,78—3,85°.

25 ccm Extrakt der Trockenhefe +
20 » angegorene Glukoselösung +

| IV. 10 ccm 5% ige Na ₂ HPO ₄ | | V. 10 ccm 10% ige Na ₂ HPO ₄ | | VI. 15 ccm 10% ige Na ₂ HPO ₄ | |
|---|---|---|---|--|---|
| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ |
| 0 | 0,0464 | 0 | 0,0732 | 0 | 0,0926 |
| 74 | 0,0440 | 67 | — | 61 | 0,0905 |
| 135 | 0,0386 | 128 | 0,0722 | 189 | — |
| 201 | 0,0208 | 189 | 0,0709 | 231 | 0,0909 |

Es sei zu den Versuchen V zunächst bemerkt, daß die Lösungen des Natriumphosphates stets aus Mono- und Dinatriumphosphat so hergestellt wurden, daß dieselben vollständig neutral gegen Lackmus waren. Es kann sich also bei den obigen Versuchen nicht ein verschiedener Einfluß der Alkalinität geltend gemacht haben.

Es ergibt sich also das auffallende Resultat, daß die Veresterungsgeschwindigkeit mit zunehmender Phosphatmenge abnimmt.

Ferner bestätigt sich unser früheres Ergebnis, daß die Phosphatbindung um so schneller verläuft, je weniger weit die Angärung fortgeschritten ist.

Da ein Überschuß von Phosphat hemmt, so war es nicht unwahrscheinlich, daß ein Zusatz von Ester die weitere Phosphatbindung ebenfalls beeinträchtigt. Folgender Versuch zeigt aber, daß dies nicht der Fall ist, vielmehr beschleunigt ein Zusatz eines Estersalzes die Phosphatbindung.

Versuch VI.

Hefe H bei 18° getrocknet.

Angegorene Glukoselösung. Während 10 Minuten wurden 42 ccm CO₂ entwickelt.

15 ccm Extrakt aus Trockenhefe +
 10 „ 5%ige Na₂HPO₄ +
 20 „ angegorene Glukoselösung

| A. Ohne Zusatz. | | | B. + 2,5 g Esternatriumsalz. | | |
|-----------------|---|--------|------------------------------|---|--------|
| Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | | Minuten | g Mg ₂ P ₂ O ₇ | |
| | I. | II. | | I. | II. |
| 0 | 0,0460 | 0,0462 | 0 | 0,0460 | 0,0463 |
| 103 | 0,0375 | 0,0393 | 95 | 0,0230 | 0,0239 |
| 155 | 0,0205 | 0,0213 | 145 | 0,0107 | 0,0105 |
| 242 | 0,0000 | 0,0000 | 232 | 0,0000 | 0,0000 |

Im Anschluß an die obigen Versuche sei in aller Kürze ein Resultat mitgeteilt, das der eine von uns gemeinschaftlich mit Herrn H. Bäckström gewonnen hat, und das uns für das Verständnis der physiologischen Wirkung des enzymatisch ge-

bildeten Kohlenhydratphosphorsäureesters von Bedeutung zu sein scheint.

Das Natriumsalz des Kohlenhydratphosphorsäureesters wird zwar, wie Iwanoff gefunden hat, durch Zymin, und wie Harden und Young gefunden haben, durch ein Enzym des Hefepreßsaftes, welches sie als Hexosenphosphatase bezeichnen, hydrolysiert. Lebende Hefe greift aber, wie ebenfalls durch Iwanoff und Harden und Young bekannt geworden ist, den Kohlenhydratphosphorsäureester bezw. dessen Salze nicht an. Nach S. G. Paine¹⁾ dringt auch nur ein kleiner Teil des Natriumsalzes aus einer Lösung in die Hefe ein.

Läßt man aber 20 ccm einer 20%igen Glukoselösung durch 0,25 g lebender Preßhefe vergären, so wird die Geschwindigkeit der Gärung durch Zusatz von 0,25 g des Natriumestersalzes verdoppelt. Das Salz selbst bleibt dabei so gut wie unverändert, höchstens Spuren davon werden gespalten; wieviel davon von der Hefe resorbiert wird, haben wir nicht untersucht. Diese Wirkung des Natriumestersalzes übertrifft diejenige des freien Natriumphosphates um etwa das Zehnfache. Dieses Resultat schließt sich an dasjenige von Iwanoff (Zbl. f. Bakt., Bd. 24, S. 10, 1909) an, nach welchem die Triosophosphorsäure die Gärungswirkung des Hefanols stimuliert.

Das Natriumestersalz scheint hier also als Katalysator der Gärung durch lebende Hefe zu fungieren. Dies würde für die Vermutung Iwanoffs sprechen, daß das Salz des Kohlenhydratphosphorsäureesters bezw. des einen der beiden vermutlich existierenden, bei der Gärung auftretenden Ester mit dem von Harden und Young aufgefundenen und studierten «Co-Enzym der Zymase» identisch ist.²⁾ Jedoch ist zu bemerken, daß das «Co-Enzym» selbst die Gärung durch lebende Hefe noch viel stärker stimuliert als das Estersalz.

Leksand, Dezember 1911.

¹⁾ Proc. Roy. Soc. Biol., Vol. 84, p. 389, 1911.

²⁾ Indessen muß daran erinnert werden, daß Hardens und Youngs Versuche (Zbl. f. Bakt., Bd. 26, S. 183, 1910) mit dieser Annahme nicht übereinstimmen.