

Über die Spaltung der Kohlenhydratphosphorsäureester.

Von

Hans Euler und Yngve Funke.

(Der Redaktion zugegangen am 11. März 1912.)

Kohlenhydratphosphorsäureester bzw. deren lösliche Salze werden durch ein im Hefenpreßsaft vorkommendes hydrolysierendes Enzym, von den Entdeckern Harden und Young¹⁾ Hexosenphosphatase genannt, hydrolysiert. Über die Verbreitung dieses Enzyms ist noch wenig bekannt. Da das Enzym und sein Verhältnis zum synthetisierenden Agens, der Phosphatase, besonderes theoretisches Interesse beansprucht, so hat der eine von uns sich bemüht, dieses Enzym zu isolieren und zu reinigen. Es wurde auch versucht, zu diesem Zweck ein geeigneteres Ausgangsmaterial zu finden, als es der Hefenpreßsaft ist. Obwohl diese Versuche noch zu keinem positiven Resultat geführt haben, sollen sie einleitend hier mitgeteilt werden.²⁾

I.

1 g Natriumphosphorsäureester + 25 ccm Pepsinlösung (10% Pepsin puriss. Merck in 1 n-HCl) + 45 ccm H₂O + 0,2 ccm Toluol.

Nach 180 und 250 Minuten wurden der Mischung Proben entnommen, in welchen der Gehalt eventuell gebildeten freien Phosphates untersucht wurde. Das Resultat war vollständig negativ, auch nach 4 Stunden (Temp. 18,3°) war keine Ester-spaltung nachzuweisen.

¹⁾ Proc. Roy. Soc., Bd. 82, S. 321, 1910.

²⁾ Diese Versuche wurden von Herrn Hj. Ohlsén und Fräulein Th. Berggren ausgeführt.

II.

1 g Natriumphosphorsäureester + 25 ccm Pankreatinlösung (etwa 3% ige Lösung von Pankreatin-Rhenania) + 45 ccm H₂O + 0,2 ccm Toluol.

Nach 3 Stunden (bei Zimmertemperatur) keine Spaltung.

III.

1 g Natriumphosphorsäureester + 10 ccm Glycerinextrakt der Darmschleimhaut eines frisch geschlachteten Kaninchens + 50 ccm H₂O + 0,2 ccm Toluol (Temp. 30°).

Der Lösung wurden von Zeit zu Zeit Proben von 10 ccm entnommen, in welchen die freien Phosphate durch Magnesia-mischung gefällt wurden.

Minuten	0	140	500	730
Mg ₂ P ₂ O ₇	0,0011 g	0,0020 g	0,0082 g	0,0165 g

Hier war allerdings eine geringe Spaltung eingetreten. Indessen ist diese Wirkung im Vergleich mit derjenigen der Hefenphosphatase sehr gering. Die Versuche werden unter Abänderung der H- bzw. OH-Konzentration des Mediums wiederholt.

IV.

1 g Natriumester + 25 ccm defibriertes Blut eines frisch geschlachteten Ochsen + 40 ccm H₂O.

Die Analysen wurden in folgender Weise angestellt. Nach 2, 4 und 6 Stunden wurde der Versuch mit NH₃ in 20 ccm abgebrochen. Im Meßzylinder wurde die Lösung mit Magnesia-mischung gefällt und mit NH₃ auf 200 ccm verdünnt. Nach 12 Stunden hatte sich die Fällung abgesetzt; es wurden nun dem Meßzylinder 100 ccm klare Lösung entnommen, das Ammoniak vertrieben und mit Alkali 1 Stunde gekocht; wobei der Ester gespalten wurde. Die Versuchsfehler sind natürlich hier recht erheblich. Es konnte aber festgestellt werden, daß in 6 Stunden jedenfalls weniger als 6% des angewandten Esters gespalten worden waren.

Ein entsprechender, minimaler Effekt wurde mit der Maceration von frischen Nieren von Kaninchen erhalten.

Nachdem es sich also gezeigt hatte, daß weder Pepsin noch Trypsin den Kohlenhydratphosphorsäureester zu spalten vermögen, und nachdem unter den angegebenen Bedingungen weder mit Blut noch Nierenmaceration eindeutige Resultate erhalten worden waren, schien es geboten, zu untersuchen, ob im Tierkörper überhaupt eine Spaltung des Esters eintritt, oder ob derselbe, per os eingeführt, den Körper unzersetzt verläßt. Im letzteren Falle würde ja die Aussicht, die Phosphatase in einem Organ des Tierkörpers aufzufinden, sehr gering sein.

Es wurden also Versuche mit lebenden Kaninchen angestellt, und zwar 3 Versuchsreihen mit je 3 Tieren.

Diese Versuche wurden im physiologischen Institut des hiesigen Karolinischen Instituts ausgeführt, dessen Vorstand, Herrn Prof. J. Johansson, wir für freundliche Hilfe bestens danken.

In einer unserer Versuchsserien erhielten die Tiere phosphorarme Nahrung, unter Zusatz von 1 g Calciumsalz des Kohlenhydratphosphorsäureesters, welches dem mit Wasser aufgeweichten Brot beigemischt wurde. Dieses Salz ist in Wasser schwer löslich, löst sich aber leicht in verdünnten Mineralsäuren. Die tägliche Nahrung bestand aus 50 g Brot und 100 g Wasser. Diese Diät konnte indessen nicht lange durchgeführt werden, da sich nach 7 Tagen bei sämtlichen Tieren Verstopfung und Verdauungsstörung einstellte.

In zwei weiteren Versuchsreihen wurde deshalb den mit der unten angegebenen Nahrung, Brot und Heu, vorbehandelten Tieren täglich 1 g Salz gegeben.

Es erwies sich sehr schwierig, Serien zu erhalten, bei welchen die Schwankungen der Nahrungsaufnahme und -abgabe nicht allzu groß sind. Wir werden auf diese Versuche noch zurückkommen und teilen hier nur 3 Versuche ausführlicher mit.

Wie ersichtlich sind die Schwankungen der täglichen Abgabe von PO_4 im Harn beim Versuchstier 3 sehr groß und unregelmäßig; sie waren bei den hier nicht mitgeteilten Versuchen noch größer; diesen gegenüber sind die an den Versuchstieren 1 und 2 erhaltenen Ergebnisse auffallend konstant.

Versuchstier 1.

Anfangsgewicht: 1610 g. — Endgewicht: 1735 g.

		Ein- stellungs- tage		Versuchstage: Täglich 1 g Calciumsalz = 0,438 g PO ₄							Mittel- wert
		1	2	1	2	3	4	5	6	7	
Wasser in ccm . .		100	100	100	100	95	105	90	100	110	100
Brot in g		50	50	50	50	45	65	45	50	50	50
Urinmenge in ccm		95	65	75	nicht bestimmt	80	70	65	75	90	76
Darin ent- halten	Total-PO ₄ . .	0,210	0,193	0,320		0,434	0,341	0,393	0,367	0,417	0,37
	Anorgan. PO ₄	0,161	0,130	0,248		0,305	0,240	0,285	0,224	0,212	0,25
	Organ. PO ₄ .	0,049	0,063	0,072		0,129	0,100	0,108	0,143	0,205	0,12
Tägl. mittlerer PO ₄ - Gehalt der festen Exkreme in g		0,08		0,09							

Versuchstier 2.

Anfangsgewicht: 1580 g. — Endgewicht: 1640 g.

		Ein- stellungs- tage		Versuchstage: Täglich 1 g Calciumsalz = 0,438 g PO ₄							Mittel
		1	2	1	2	3	4	5	6	7	
Wasser in ccm . .		150	150	150	150	85	80	90	130	120	115
Brot in g		70	70	70	70	70	60	50	60	70	65
Urinmenge in ccm		95	85	90	90	65	75	90	65	100	85
Darin ent- halten	Total-PO ₄ . .	0,263	0,191	0,411	0,456	0,572	0,303	—	0,300	0,524	0,43
	Anorgan. PO ₄	0,170	0,110	0,323	0,360	0,431	0,203	—	0,153	0,329	0,26
	Organ. PO ₄ .	0,093	0,081	0,088	0,095	0,141	0,100	—	0,147	0,195	0,12
Tägl. mittlerer PO ₄ - Gehalt der festen Exkreme in g		0,07		0,11							

Versuchstier 3.

Anfangsgewicht: 1710 g. — Endgewicht: 1860 g.

	Ein- stellungs- tag	Versuchstage: Täglich 1 g Calciumsalz = 0,438 g PO ₄									
		1	2	3	4	5	6	7	8	Mittel	
Wasser in ccm	300	300	350	325	275	225	350	250	300	—	
Brot in g . .	50	50	50	50	50	50	50	50	50	—	
Heu > > . .	40	30	40	30	50	25	40	35	20	—	
Urinmenge ccm	215	205	110	195	210	95	230	200	170	177	
Darin ent- halten	Total-PO ₄	0,232	0,187	0,236	0,221	0,187	0,170	0,331	0,240	0,510	0,25
	Anorg.PO ₄	0,140	0,095	0,122	0,162	0,147	0,092	0,230	0,159	0,352	0,15
	Organ.PO ₄	0,092	0,092	0,114	0,059	0,040	0,078	0,101	0,081	0,158	0,10
Tägl.mittlerer PO ₄ - Gehalt der festen Exkremente in g	0,16	0,20									

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte der 3 obigen Versuche zusammengestellt.

Ver- suchs- tier	Mittlere tägliche Auf- nahme von PO ₄		Mittlere tägliche Abgabe von PO ₄		Mittlere täg- liche Abgabe von organ. PO ₄ im Harn	
	Ohne Phosphorsäureester g PO ₄	Mit Phosphorsäureester g PO ₄	Ohne Phosphorsäureester g PO ₄	Mit Phosphorsäureester g PO ₄	Ohne Phosphorsäure- ester g PO ₄	Mit Phosphorsäure- ester g PO ₄
1	0,05	0,05 + 0,43 = 0,48	0,21 + 0,08 = 0,29	0,37 + 0,09 = 0,46	0,055	0,12
2	0,07	0,07 + 0,43 = 0,50	0,22 + 0,11 = 0,33	0,41 + 0,14 = 0,55	0,085	0,12
3	0,19	0,19 + 0,43 = 0,62	0,23 + 0,13 = 0,36	0,25 + 0,20 = 0,45	0,09	0,10

Die PO₄-Bilanz soll bald in anderem Zusammenhang diskutiert werden. Was die Spaltung des Esters in dem hier untersuchten Fall betrifft, so ergibt sich bei täglicher Zugabe von 1 g Kohlenhydratester-Calciumsalz = 0,438 g organisch gebundenes PO₄ zur Nahrung:

Versuchstier	Mittlere tägliche Zunahme von	
	Total-PO ₄	Organ. gebundenem PO ₄
1	0.29—0.46	0.055—0.12
2	0.33—0.55	0.085—0.12
3	0.36—0.45	0.09—0.10

Die Differenzen betragen also:

Total-PO ₄	0.17	0.22	0.09
Organ. gebund. PO ₄ . . .	0.065	0.035	0.01

Die Zunahme der organisch gebundenen Phosphorsäure im Harn beträgt also weniger als $\frac{1}{4}$ der gesamten PO₄-Zunahme. Man muß also schließen, daß mindestens $\frac{3}{4}$ des aufgenommenen Esters im Tierkörper gespalten worden sind.

Wie schon erwähnt, ist das Organ, in welchem die Ester-spaltung vor sich geht, noch nicht festgestellt worden. Wir setzen die diesbezüglichen Versuche fort, nicht nur zu dem eingangs erwähnten präparativen Zweck, sondern auch um Anhaltspunkte über das Schicksal des Kohlenhydratrestes dieses Esters zu gewinnen. Daß dieser Kohlenhydratrest der Verbrennung unterliegt, ist von vornherein wahrscheinlich, ebenso daß diese Verbrennung schneller erfolgt als diejenige der unveränderten Hexosen, da ja die Kohlenhydratkomponente aus den Hexosen in den ersten Stadien der Gärungsreaktion, also wohl auch in den ersten Stadien der Atmungs-Verbrennung, entstehen und somit ein Zwischenprodukt des Zuckerabbaus darstellen.

Durch die Ergebnisse von Godlewski und Polzeniusz,¹⁾ Palladin und Kostytschew²⁾ und L. Iwanoff u. a. ist festgestellt, daß die Pflanzenatmung mit der Gärung insofern sehr nahe verwandt ist, als die Veratmung der Kohlenhydrate mit einer Gärungsspaltung beginnt. Eine Aufteilung der Gärungsenzyme und Aktivatoren (Koenzyme) in den höheren Pflanzen ist indessen bis jetzt jedoch nicht geschehen. Fest steht aber,

¹⁾ Bull. Acad. des sciences de Cracovie, 1897, S. 267, und 1901, S. 227. — Godlewski, ebenda. 1904, S. 115.

²⁾ Diese Zeitschrift. Bd. 48, S. 214, 1906.

daß die Pflanzenatmung wie die Hefegärung durch Phosphate stark befördert wird. Die Mitwirkung der Phosphate an der Pflanzenatmung ist kürzlich der Gegenstand eingehender Diskussionen von S. Kostytschew,¹⁾ L. Iwanoff,²⁾ N. Iwanoff³⁾ und Zaleski und Reinhard⁴⁾ gewesen, welche sehr wertvolle Beiträge zu der experimentellen Lösung dieser Frage geliefert haben.

Über den Einfluß der Phosphate auf den Zuckerzerfall im Tierkörper ist noch wenig bekannt.

Cohnheim⁵⁾ hat 1903 Mitteilung über ein glykolytisches Enzym gemacht, welches als eine Zymase bzw. Zymase-Komponente anzusprechen wäre. Nach Harden und Maclean⁶⁾ soll Blumenthal⁷⁾ der erste sein, welcher ein zymaseähnliches Enzym in tierischen Geweben vermutet hat. Sehr entschieden sprach sich bereits 1903 auf Grund eigener Versuche Stoklasa⁸⁾ dahin aus, daß der Zuckerzerfall im tierischen Gewebe und die Hefegärung wesentlich gleichartige Vorgänge sind. Er hielt die Beweiskraft seiner Versuche gegenüber Einwänden von Mazé, Batelli und Portier aufrecht.⁹⁾ Neuerdings ist nun eine sehr bemerkenswerte Kritik der Versuche Stoklasas von Harden und Maclean (l. c.) erschienen, nach welcher es Stoklasa trotz sorgfältiger Arbeit doch nicht gelungen sei, bei seinen Versuchen Bakterienwirkungen auszuschließen. Harden

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 15, S. 185, 1908. — S. Kostytschew und A. Scheloumow, Jahrb. wiss. Bot., Bd. 50, S. 157, 1911.

²⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 25, S. 171, 1910, u. Bd. 29, S. 347, 1910.

³⁾ Bull. Acad. des sciences de St.-Petersbourg, 1910, S. 303.

⁴⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 27, S. 450, 1910, u. Bd. 35, S. 228, 1911.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 333, 1903; Bd. 42, S. 401, 1904, und Bd. 47, S. 253, 1906.

⁶⁾ Journ. of Physiol., Bd. 42, 1911.

⁷⁾ Zeitschrift f. diät. u. phys. Therap. II. (Zitiert nach Harden und Maclean.)

⁸⁾ Zentralbl. f. Physiol., Bd. 17, S. 465, 1903, u. Bd. 18, S. 793, 1904. — Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 36, S. 622 und 4058, 1903; ebenda, Bd. 38, S. 664, 1905.

⁹⁾ Stoklasa, Ernest und Chocensky, Diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 303, 1907, und Bd. 51, S. 156, 1907.

und Maclean konnten eine Zymase in tierischen Geweben nicht nachweisen.

Daß der Zerfall der Hexosen im Tierkörper in ähnlicher Weise geschieht bzw. beginnt wie die Gärungsspaltung, ist in hohem Grade wahrscheinlich; ebenso ist anzunehmen, daß auch im Tierkörper die Zuckerspaltung enzymatisch erfolgt.

Man konnte also erwarten, daß auch in tierischen Geweben die Zuckerspaltung durch Phosphate, und zwar sowohl durch anorganische wie organische bzw. durch einen dem Koenzym von Harden und Young entsprechenden Aktivator beschleunigt wird.

Diesbezügliche Versuche, welche der eine von uns angestellt hat, sind bis jetzt negativ ausgefallen. Es soll gleich erwähnt werden, daß es auf Grund der Ergebnisse von Harden und Maclean für aussichtslos gehalten wurde, maßgebende Versuche ohne Zusatz antiseptischer Mittel anzustellen, und es wurde deswegen stets unter Zusatz von Toluol gearbeitet, obwohl die Möglichkeit vorlag, daß hierdurch eine eventuell anwesende Zymase in ihrer Wirkung stark beeinträchtigt werde.

Die Versuche wurden angestellt mit folgenden Organen von ganz frisch geschlachteten Kaninchen:

1. mit fein zerschnittenen Muskeln,
2. mit Leber, in flüssiger Luft abgekühlt und pulverisiert.

Je 1 g der Substanz 1 oder 2 wurde in 21 ccm 10%iger Glukoselösung aufgeschlemmt; 1 ccm Toluol wurde zugefügt. Zu jedem Versuch wurde ein Parallelversuch unter Zusatz von 0,5 g Na_2HPO_4 bzw. 0,5 g Zymase-Koenzympräparat angestellt. Das Koenzympräparat war durch Extraktion getrockneter Hefe und Fällung des Extraktes mit Alkohol gewonnen worden.

Innerhalb 24 Stunden wurde keine Kohlensäure entwickelt. Das gleiche negative Ergebnis wurde erhalten, als Lebergewebe mit Glycerin extrahiert und einer Glukoselösung zugesetzt wurde; 5 ccm Glycerinextrakt + 20 ccm 10%ige Glukoselösung + 1 ccm Toluol.

Weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von Koenzym oder Phosphat trat Kohlensäureentwicklung ein.

Inwieweit das Pnein, welches nach Batelli und Stern¹⁾ die Hauptatmung im Tierkörper beschleunigt, Phosphorsäure enthält und mit dem Koenzym der Gärung verwandt ist, geht aus der Literatur nicht sicher hervor.

Die negativen Ergebnisse Hardens und Macleans und die hier erwähnten haben den einen von uns zu einer Überlegung veranlaßt, deren Konsequenzen im hiesigen Laboratorium weiter geprüft werden.

Auch im Tierkörper wird, wie in der Hefe, der Zuckerzerfall in mehreren Phasen verlaufen, an welchen verschiedene Enzyme beteiligt sind. Es ist die Möglichkeit gegeben, daß diese Enzyme räumlich von einander getrennt sind, so daß die primäre Umwandlung des Zuckers in einem Organ A, die eventuelle intermediäre Bildung eines Phosphorsäureesters in einem anderen Organ B, und die schließliche Bildung von Alkohol und Kohlensäure in einem weiteren Organ C erfolgt.

Weder A noch B oder C würden dann für sich die Gärung der Hexosen vermitteln können. Es wird sich also darum handeln, die Wirkung der beteiligten Organe zu kombinieren bzw. dieselben auf diejenigen Zwischenprodukte wirken zu lassen, an deren Umwandlung sie speziell beteiligt sind.

Wird nun vom Organismus die erste Phase der Zuckerspaltung in betreffendem Organ A unvollständig oder gar nicht ausgeführt, so wäre damit der normale Zuckerabbau im Organismus überhaupt unmöglich gemacht. Es bleibt dann noch immer die Möglichkeit, daß die am weiteren Zuckerabbau beteiligten Enzyme normal funktionieren, und daß somit ein Zwischenprodukt, wie der im Kohlenhydratphosphorsäureester enthaltene Zuckerrest dem normalen Abbau unterliegt. Diese Überlegung hat die Veranlassung gegeben zu Versuchen über das Schicksal des Kohlenhydratphosphorsäureesters in Diabetikern, welche hier in Angriff genommen sind.

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 21, S. 487, 1910; Bd. 33, S. 315, 1911; Bd. 38, S. 163, 1912. Siehe hierzu Harden und Maclean, Journ. of Physiol., Bd. 43, S. 34, 1911. — Thunberg, Skand. Arkiv f. Physiol., Bd. 25, S. 37, 1911.