

# Versuche über die enzymatische Phosphatbindung.

Von

Hans Euler und David Johansson.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Juli 1912.)

Es dürfte keinem Zweifel unterliegen, daß bei der alkoholischen Gärung intermediäre Produkte im Sinne der v. Baeyerschen Annahme und des Wohlschen Schemas auftreten.

Welcher Zwischenkörper bei der Aufteilung der Hexosen in zwei Hälften entsteht, hat durch die bisher angestellten Versuche noch nicht entschieden werden können, Milchsäure scheint nach den Resultaten von Slator<sup>1)</sup> und besonders von Buchner und Meisenheimer<sup>2)</sup> ausgeschlossen zu sein. Die Vergärung von Methylglyoxal ist bisher weder mit lebender Hefe noch mit Hefepreßsaft gelungen, und Glycerinaldehyd wird von lebender Hefe nach Wohl (Bd. 31, S. 1300, 1898) und Emmerling (Bd. 32, S. 544, 1899) nicht vergoren, nach Buchner und Meisenheimer durch lebende Hefe langsam und durch Hefepreßsaft sehr langsam. Dadurch sind diese beiden im Wohlschen Schema vorkommenden Stoffe als Zwischenprodukte sehr unwahrscheinlich geworden. Größere Wahrscheinlichkeit hat die Annahme des intermediären Auftretens von Dioxyaceton. Boysen-Jensen, welcher auf die Rolle dieses Stoffes bei der Gärung hingewiesen hat,<sup>3)</sup> konnte keine Beweise für seine Annahme beibringen. Dagegen haben Buchner und Meisenheimer<sup>4)</sup> wesentliche Stützen für diese Hypothese beigebracht.

<sup>1)</sup> Journ. chem. Soc., Bd. 89, S. 141, 1906.

<sup>2)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 43, S. 1776, 1910.

<sup>3)</sup> Ber. d. Deutsch. bot. Ges., Bd. 26 a, S. 666, 1908.

<sup>4)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 43, S. 1776, 1910, und Bd. 45, S. 1633, 1912.

Über die Veresterung von Dioxyaceton mit Phosphaten liegen bisher Angaben vor, welche wenigstens in quantitativer Hinsicht scharf voneinander abweichen.

v. Lebedew, welcher die ersten Versuche in dieser Hinsicht angestellt hat, hatte ursprünglich angegeben,<sup>1)</sup> daß Dioxyaceton keine Phosphorsäureester bildet. Ohne Kenntnis dieses Versuches ist bald darauf der eine von uns (Euler) zum Ergebnis gekommen,<sup>2)</sup> daß eine, wenn auch geringe Esterbildung stattfindet.

Es waren folgende Parallelversuche angestellt worden:

A. 4 g Dioxyaceton + 25 ccm Extrakt von Acetondauerhefe + 10 ccm 5%ige  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung + 10 ccm Wasser.

B. 25 ccm angegorene Glukoselösung + 10 ccm 5%ige  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung + 10 ccm Wasser.

Die Bestimmung der fällbaren Phosphatmenge geschah durch Fällung mit Magnesiummischung. Die von Herrn Dr. Gambarian in Prof. Meisenheimers Laboratorium erhaltenen Resultate waren die folgenden:

Zeit in Stunden	g $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ in 10 ccm	
	B	A
0	0,0705	0,0658
4	Spuren	0,0625
20	—	0,0594

In einer bald darauf erschienenen Arbeit<sup>3)</sup> findet auch Herr v. Lebedew, daß Dioxyaceton durch Phosphate verestert werden kann, und zwar hatte er eine sehr starke Wirkung beobachtet. v. Lebedew stellte seine Versuche mit Macerationsaft an. Wie er sagt, geht aus seinen Versuchen deutlich hervor, daß das Dioxyaceton bis zu 5% der Konzentration ebenso gärt, wie der Rohrzucker, nur etwas langsamer, was auf die schädliche Wirkung des Dioxyacetons auf die Zymase zurückzuführen ist. In der gleichen Arbeit wird gezeigt, daß Dioxy-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 28, S. 214, 1910.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 15, 1911. Vgl. auch ebenda, Bd. 76, S. 281, 1911.

<sup>3)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 44, S. 2932, 1911.

aceton anwesendes Phosphat verestert, und daß der entstehende Ester identisch ist mit dem aus Glukose gewonnenen.

«Im vorigen Jahre»,<sup>1)</sup> sagt v. Lebedew, «habe ich schon die Ansicht ausgesprochen, die ich jetzt nochmals betone»:

«Die Rolle der Phosphorsäure liegt bei dem Gärungsprozesse höchst wahrscheinlich nur darin, daß Dextrose bezw. Lävulose durch den Übergang in Esterform mit nachstehender Spaltung in eine instabile Modifikation übergeführt wird, die ihrerseits viel leichter durch ein entsprechendes Enzym gespalten wird.»

Dagegen hat v. Lebedew seine ursprüngliche Behauptung (Biochem. Zeitschr., Bd. 28, S. 224, 1910) «daß die Zusammensetzung des Zuckeresters, der bei der Gärung auftritt, folgende ist: 1 Mol. Hexose auf 1 Mol. Phosphorsäure» ganz aufgegeben, indem er die folgende Regel aufstellt: «Alle gärfähigen Zuckerester bilden beim Anfang der Gärung denselben Zuckerester, nämlich Hexosebiphosphat.» «Das kann», sagt dieser Verfasser, «wie es mir scheint, nur dadurch erklärt werden, daß die Hexose bei der Gärung zuerst in zwei Moleküle Triose gespalten wird, welche dann mit Phosphorsäure einen Ester  $C_3H_5O_2RPO_4$  bildet, der sich sofort zu  $C_6H_{10}O_4(RPO_4)_2$  kondensiert.»

Die Veresterung von Dioxyaceton ist neuerdings auch von Harden und Young<sup>2)</sup> untersucht worden, welche ebenfalls nur eine geringe Veresterung fanden.

Unabhängig von der Richtigkeit der über die Beteiligung der Phosphate und ihre Formeln geäußerten Ansichten<sup>3)</sup> schienen uns weitere Versuche darüber wünschenswert, welche Stoffe der enzymatischen Veresterung unterliegen.

Bis jetzt ist in dieser Hinsicht folgendes festgestellt:<sup>4)</sup> Verestert wird ein aus Glukose, Fruktose und Mannose, sowie Galaktose auf enzymatischem Wege gewinnbares Umwandlungsprodukt.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 28, S. 224, 1910.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 40, S. 458, 1912.

<sup>3)</sup> Euler und Fodor haben wahrscheinlich gemacht, daß ein Triosephosphorsäureester neben Hexosephosphorsäureester gewonnen wird, aus welchem bei der Spaltung primär Dioxyaceton entsteht. Sv. Vet. Akad. f. Kemi, Bd. 4, Nr. 16, und Biochem. Zeitschrift, Bd. 36, S. 401, 1911.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 15, 1911.

Nicht verestert werden die genannten Hexosen selbst, ferner Inosit, Glycerin, Mannit und Alanin.

Eine schwache Veresterung hat sich bei Dioxyaceton und eine noch schwächere bei einem Versuch mit Arabinose ergeben (l. c., S. 22).

## I.

Maltose wird ohne Vorbehandlung nicht oder nur in sehr geringem Grade verestert.<sup>1)</sup>

10 g bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete Hefe werden mit 50 g Wasser während 3 Stunden bei 30° extrahiert (Extrakt A).

25 ccm Extrakt A  
 + 20 » 20%ige Maltoselösung  
 + 10 » 5%ige Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung.

Minuten	g Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> × 10 <sup>4</sup> in 10 ccm
0	527
74	516
270	512
360	496
1440	486

## II.

Natriumlactat wird durch Extrakt von in oben angegebener Weise hergestellter Trockenhefe nicht zur Bindung von anorganischem Phosphat veranlaßt.

25 ccm Extrakt  
 + 20 » 0,36-norm.-Na-Lactat  
 + 10 » 5%ige Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung.

Minuten	g Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> × 10 <sup>4</sup> in 10 ccm
0	498
1020	502

<sup>1)</sup> Die schwache Abnahme von anorganischem Phosphat während 24 Stunden kann daher rühren, daß der Extrakt geringe Mengen von Hefezellen oder Spuren von Maltase und Zymase enthält.

III.

Bei der Vergärung von Pepton mit lebender Hefe wird durch Gegenwart von Phosphat keine Beschleunigung der Kohlensäureentwicklung hervorgerufen. Die während der Gärungsreaktion gebundene Menge Phosphat ist ziemlich gering und kann durch die Vergärung des Hefeglykogens veranlaßt worden sein. Diese Versuche werden wiederholt und wir geben nur einige für die Kohlensäureentwicklung gefundene Zahlen an.

50 ccm 15%ige Peptonlösung  
 + 1 „ Toluol  
 + 15 g lebende Hefe  
 + 2,5 „  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Minuten	ccm $\text{CO}_2$
73	100
110	150
191	225
275	259
348	278

50 ccm 15%ige Peptonlösung  
 + 1 „ Toluol  
 + 15 g lebende Hefe.

Minuten	ccm $\text{CO}_2$
70	95 75 95
108	160 160 150
190	230 190 225
275	270 275 265

IV.

Über die Einwirkung von Phosphat auf die zweite Hälfte der alkoholischen Gärung, also die Überführung des 3 Kohlenstoffatome enthaltenden Zwischenproduktes in Alkohol und Kohlensäure ist bis jetzt nichts bekannt. Daß hierbei Ameisensäure und Acetaldehyd gebildet wird, wird von mehreren Autoren als wahrscheinlich angesehen und neuere Arbeiten beschäftigen sich mit dem experimentellen Nachweis des Auftretens von einerseits Natriumformiat,<sup>1)</sup> andererseits von Acetaldehyd.<sup>2)</sup>

50 g bei gewöhnlicher Temperatur getrocknete Hefe wurden 3 Stunden bei 30 mit 50 ccm Wasser extrahiert (Extrakt A).

<sup>1)</sup> Franzen und Steppuhn, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 129, 1912.

<sup>2)</sup> Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 130 und 359, 1912.

25 ccm Extrakt A  
 + 20 „ 0,25-n-Natriumformiat  
 + 10 „ 5%ige Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösg.

Minuten	g Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> × 10 <sup>4</sup> in 10 ccm
0	428
125	424
960	424

25 ccm Extrakt A  
 + 20 „ 2%ige Acetaldehydlösg.  
 + 10 „ 5%ige Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösg.

Minuten	g Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> × 10 <sup>4</sup> in 10 ccm
0	433
121	432
960	425

25 ccm Extrakt A  
 + 10 „ Natriumformiat  
 + 10 „ 2%ige Acetaldehydlösung  
 + 10 „ 5%ige Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung.

Minuten	g Mg <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> × 10 <sup>4</sup> in 10 ccm
0	428
116	426
960	428

## V.

Schließlich wurde untersucht, ob Glukose durch eine rein chemische nicht enzymatische Vorbehandlung in eine veresterbare Modifikation übergeführt werden kann. Da nach Lobry de Bruyn und A. van Ekenstein aus Glukose, Fruktose und Mannose das gleiche inaktive Gemisch von Hexosen entsteht, wenn diese Zuckerarten mit verdünntem Alkali behandelt werden, so haben wir zunächst geprüft, ob Glukose nach einer derartigen Einwirkung von schwachem Alkali anorganisches Phosphat bindet.

Hefe wurde in gewöhnlicher Weise bei Zimmertemperatur getrocknet und mit dem 5fachen Volumen Wasser 3 Stunden bei 30° extrahiert.

Eine 20%ige Glukoselösung (Glukose Kahlbaum) wurde 2%ig in bezug auf NaOH gemacht und 40 Stunden lang stehen gelassen. Während dieser Zeit nahm die Lösung eine ganz schwach gelbliche Färbung an.

- 25 ccm Extrakt  
 + 20 » obiger (neutralisierter) Glukoselösung  
 + 10 » 5%ige  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung.

Minuten	$\text{g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 10^4$ in 10 ccm
0	414
136	381
300	379
420	377

Ein Parallelversuch mit nichtvorbehandelter Glukoselösung zeigte keine Abnahme des anorganischen Phosphates.

### Versuch 2. (Von Herrn Hj. Ohlsén.)

Dieselbe Versuchsanordnung wie oben.

Minuten	$\text{g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 10^4$ in 10 ccm
0	484
135	457
217	453

Parallelversuch mit nicht vorbehandelter Glukcse.

Minuten	$\text{g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \times 10^4$ in 10 ccm
0	484
132	480
205	481

Die Abnahme des anorganischen Phosphates in den Versuchen mit vorbehandelter Glukose ist zwar klein, liegt aber, wie die Parallelversuche zeigen, außerhalb der analytischen und systematischen Versuchsfehler und wir glauben deshalb schließen zu dürfen, daß bei der Behandlung von Glukose mit schwachem Alkali intermediär eine Substanz entsteht, an welche anorganisches Phosphat durch Vermittlung der Phosphatase gebunden wird.

Es bleibt zu untersuchen, ob die dabei entstehende Phosphorsäureverbindung mit der bei der alkoholischen Gärung entstehenden identisch ist.