

Über die Spaltung organischer Phosphorsäureester.

Von

Hans und Beth Euler.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule, Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Juli 1914.)

Die bei der alkoholischen Gärung beteiligten Kohlenhydratphosphorsäureester werden im Verlauf der Gärung durch ein besonderes Enzym gespalten, welches von den Entdeckern, Harden und Young,¹⁾ als Hexosenphosphatase bezeichnet wurde, da es sich nach der Auffassung dieser Forscher nur um die Spaltung eines Hexosephosphorsäureesters handelt. Da sich gleichzeitig mit diesem Ester nach Euler und Fodor²⁾ ein Triosemonophosphorsäureester bildet, so wäre noch ein zweites hydrolysierendes Enzym, Triosephosphatase, anzunehmen, über dessen Existenz einstweilen noch nichts bekannt ist. Wir wollen im folgenden die beiden Enzyme unter der Bezeichnung Kohlenhydratphosphatase zusammenfassen.

Die Kohlenhydratphosphatase hat sich aus dem Hefepreßsaft bis jetzt noch nicht isolieren lassen. Da das Enzym und sein Verhältnis zum synthetisierenden Agens, der Phosphatase, besonderes theoretisches Interesse beansprucht, so ist der eine von uns bereits seit längerer Zeit mit Versuchen beschäftigt, ein an Phosphatase reiches Material zu finden.

Die ersten Versuche³⁾ wurden mit Pepsinlösung, Pankreatinlösung, Darmextrakt eines Kaninchens, mit defibriniertem Blut und mit Maceration der Nieren eines Kaninchens angestellt und ergaben durchgehends eine geringe Wirkung.

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

²⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 36, S. 401, 1911.

³⁾ Euler und Funke, Bd. 77, S. 488, 1912.

Bald darauf wurden diese Versuche mit der Darmschleimhaut eines Schweines und mit Pferdenieren fortgesetzt¹⁾ und zwar mit stärker positivem Erfolg. Die Versuche wurden wiederum unter möglichst peinlicher Einhaltung aseptischer Bedingungen und unter Zusatz von Toluol ausgeführt. Der Versuch mit Pferdenieren wurde in folgender Weise angestellt:

25 ccm Extrakt und 25 ccm 5%ige Lösung des Natriumphosphorsäureesters wurden gemischt und mit 0.5 ccm Toluol versetzt; der Lösung wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen, welche die folgenden Zahlen ergaben:

Stunden	0	2	15	24	∞
in 10 ccm g $Mg_2P_2O_7$	0	0,0061	0,0054	0,0144	0,1321

Es wurde also eine meßbare, aber geringe Spaltung erzielt. Eine stärkere Spaltung bewirken Bakterien. Mit einer Aufschlemmung von *Bacterium coli* fand der eine von uns eine deutliche und ziemlich erhebliche Spaltung des Natriumsalzes des Kohlenhydratphosphorsäureesters.

Bald nach dieser Arbeit erschien eine Mitteilung von Harding,²⁾ in welcher über ähnliche enzymatische Spaltungsversuche berichtet wird.

Autolysierter Ochsenpankreas erwies sich fast wirkungslos gegenüber Hexosephosphat. Ricinuslipase und Emulsin, ferner Zymineextrakt zeigen eine geringe hydrolytische Wirkung. Autolysierter Hefepreßsaft und die Alkohol-Äther-Fällung desselben besitzt eine deutliche Aktivität.

Diese Versuche sind neuerdings von R. H. A. Plimmer³⁾ weiter fortgesetzt worden. Plimmer erhielt ziemlich weitgehende Spaltung des von Young dargestellten Hexosephosphats durch Darmextrakt und Gehirnextrakt.

Kommt es nur darauf an, schnell eine größere Menge Kohlenhydratphosphat zu spalten, so empfiehlt es sich, nicht den Extrakt der Darmschleimhaut, sondern diese selbst mit dem Ester in Berührung zu bringen. Die Ergebnisse sind physiologisch nicht eindeutig, da ja Darmbakterien in großer Menge

¹⁾ Euler, Thorin und Johansson, Bd. 79, S. 375, 1912.

²⁾ Proc. Roy. Soc. Bd. 85, S. 418, 1912.

³⁾ Biochemical Journal, Bd. 7, S. 43, 1913.

anwesend sind, welche, wie oben erwähnt, eine kräftige spaltende Wirkung ausüben.

Immerhin verliefen auch diese Spaltungen noch ziemlich langsam, so daß wir unsere schon vor Erscheinen der Arbeit von Plimmer ausgeführten Versuche fortsetzten.

Es mag gleich von vornherein gesagt werden, daß wir zu einer befriedigenden Lösung unserer Aufgabe noch nicht gekommen sind.

Indessen haben wir bei der Untersuchung sehr verschiedenen Materials einige Beobachtungen über das Vorkommen von Phosphatase gemacht, welche uns der weiteren Verfolgung wert erscheinen.

Wir erwähnen zunächst einen Versuch mit Extrakt von grünen Blättern: 100 g Ahornblätter wurden mit der 5-fachen Menge Wasser verrieben und die Masse wurde dann abgepreßt. Ohne Zusatz enthielt der Blätterextrakt 21 mg freie Phosphorsäure.

Zu 50 ccm Blätterextrakt wurden ungefähr 10 ccm 20%ige Lösung des Natriumphosphorsäureesters und 0,5 ccm Toluol gesetzt, und der Mischung wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen. Nach Abzug der aus den Blättern stammenden Phosphorsäure stellt sich das Ergebnis der Analysen folgendermaßen:

Stunden	0	3	9	23	∞
in 10 ccm g $P_2O_7Mg_2$	0,0000	0,0041	0,0162	0,0311	0,20

Eine Zunahme der Bakterienzahl war in dieser Zeit nicht eingetreten. Die Versuchslösung war so nahe neutral, daß eine nicht enzymatische Spaltung durch ihre freien H- und OH-ion, wie besonders festgestellt wurde, nicht eintrat.

Bemerkenswerter als diese immerhin schwache Phosphatasewirkung scheint uns das allmähliche Auftreten der Phosphatase in keimenden Samen.

600 Gerstenkörner wurden in einem Keimungsapparat gleichmäßig bei 18° in feuchtem Sand zur Keimung gebracht. Zu Beginn des Versuchs und dann in Zwischenräumen von etwa 20 Stunden wurden je unter Zusatz einiger Tropfen Toluol 40 Gerstenkörner mit Seesand gemahlen und der Brei wurde während zwei Stunden mit 100 ccm Wasser extrahiert. Ein

Parallelversuch (mit Par. bezeichnet) wurde mit 20 Körnern und 50 ccm Wasser angestellt, um den Gehalt der Samen selbst an freiem PO_4 zu ermitteln.

Nun wurden 25 ccm Samenextrakt und 25 ccm einer etwa 5%igen Lösung des Natriumphosphorsäureesters gemischt, und Proben von 10 ccm wurden von Zeit zu Zeit analysiert.

Die gewonnenen Zahlen zeigen deutlich, wie die Fähigkeit der Körner zur Phosphoresterhydrolyse mit fortschreitender Keimung ansteigt, und zwar wird nach etwa vier Tagen ein Maximum erreicht.

Weitere Versuche müssen zeigen, in welchem Grade diese Spaltung durch eine gleichzeitig stattfindende Bindung anorganischen Phosphors beeinflusst sind. Daß eine solche gleichzeitige Synthese stattfindet, wird nicht nur durch den Gang der obigen Zahlen wahrscheinlich gemacht, sondern auch durch die früher von Euler und Kullberg mit Hafer gewonnenen gefundenen Synthesen.

Zwei längere Versuchsserien wurden angestellt, und zwar vor Beginn des Keimens und eine zweite nach etwa dreitägiger (65 stündiger) Keimung.

In den folgenden Tabellen ist der aus den Körnern selbst stammende PO_4 -Gehalt abgezogen.

Serie I. — Vor der Keimung.

Stunden	10	22	28	35	45	62	∞
in 10 ccm mg $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$	0	0,5	1,6	1,3	4,1	8,0	142

Serie II. — Nach 65 stündiger Keimung.

Stunden	10	21	27	32	38	50	∞
in 10 ccm mg $\text{P}_2\text{O}_7\text{Mg}_2$	10	17,8	30,5	37,7	—	48,0	150

Nach den übrigen Keimungszeiten wurde der Gehalt an freiem Phosphat nur in der Ausgangslösung und nach 32 stündiger Hydrolyse untersucht. In der umstehenden Tabelle stellen wir die erhaltenen Resultate zusammen:

Der Gehalt der ungekeimten Gerstenkörner an organisch gebundenem, extrahierbarem PO_4 entsprach 11 mg; das während der Hydrolyse bei obigen Versuchen frei gemachte PO_4 stammt also zum allergrößten Teil aus dem zugesetzten Kohlenhydratphosphorsäureester.

Keimungszeit in, Stunden	mg P_2O_5, Mg_2 nach 32stündiger Hydrolyse	Hydrolysierter Ester in %
0	1.2	0,8
20	7	4,6
42	19	12,6
65	37,7	25,1
93	41,0	27,0
120	34,0	22,5

Durch die Arbeiten von L. Iwanow¹⁾ und von N. Iwanow²⁾ ist der sehr interessante Nachweis erbracht worden, daß der Eiweißzerfall in der Pflanzenzelle in hohem Grade von ihrem Phosphorgehalt abhängig ist. Es ist darnach anzunehmen, daß die Bildung und Spaltung der Kohlenhydratphosphorester beim Eiweißumsatz eine nicht unwesentliche Rolle spielt.

Unsere Versuche werden, besonders unter diesem Gesichtspunkt, fortgesetzt.

¹⁾ L. Iwanow, Über die Umwandlung des Phosphors in der Pflanze im Zusammenhang mit dem Eiweißumsatz. Petersburg 1905.

²⁾ N. Iwanow, Zeitschr. f. Gärungsphysiol., Bd. 1, S. 230, 1912.