

Zur Kenntnis der im sauren Gebiet optimal wirksamen Phosphomonoesterase aus Oberhefe.

(V. Mitteilung über Phosphatasen der Hefe.¹)

Von

O. Hoffmann-Ostenhof, H. Moser und Felicitas Neumann.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 9. Febr. 1950. Vorgelegt in der Sitzung am 23. Febr. 1950.)

In der IV. Mitteilung dieser Reihe¹ wurde über die Konzentrierung der bei pH 4,1 optimal wirksamen Phosphomonoesterase der Oberhefe berichtet. In Verfolgung dieser Arbeit gelang es uns nun, die Wirksamkeit unserer Fermentpräparate auf mehr als das Dreißigfache zu steigern. Wir unternahmen es außerdem, die Substratspezifität dieser hochgereinigten Fermentpräparate sowie ihr Verhalten gegenüber verschiedenen Effektoren zu untersuchen.

Methodik.

Gewinnung der Fermentpräparate. Als Ausgangsmaterial wurde eine als „Prima“ bezeichnete Anstellhefe, welche wir sowohl von der Ottakringer Brauerei, Wien XVI, wie auch von den Mautner-Markhoffschen Preßhefefabriken, Wien XI, erhielten, verwendet, wofür wir den beiden Firmen unseren Dank aussprechen. Gewöhnliche Bäckerhefe erwies sich als sehr enzymarm. Auch die erwähnte Anstellhefe verhielt sich in ihrem Enzymgehalt und der Löslichkeit des Ferments von den Zellbestandteilen sehr unterschiedlich, selbst wenn sie nach den Angaben der Firmen aus dem gleichen Stamm gezüchtet worden war.

Die Hefe wurde über Nacht in ausgebreitetem Zustand in eine Kühltruhe gebracht (— 15 bis — 20°), am Morgen auftauen gelassen und dann in Wasser suspendiert und mit gut gereinigtem Sand in einer Kugelmühle 4 bis 5 Stdn. lang verrieben. Bei sehr fest an den Zellbestandteilen haftendem Enzym wurde eine Vorautolyse mit Ätherdampf durchgeführt. Wir ließen

¹ Als frühere Mitteilungen dieser Reihe gelten:

- I. O. Hoffmann-Ostenhof und E. Putz, Mh. Chem. 79, 421 (1948);
- II. O. Hoffmann-Ostenhof, H. Moser und E. Putz, Exper. 4, 352 (1948);
- III. Dieselben, Festschrift für P. Karrer, S. 11, Zürich 1949;
- IV. O. Hoffmann-Ostenhof und E. Putz, Mh. Chem. 80, 433 (1949).

die Hefe über Nacht in Ätherdampf stehen, wodurch die Zellmembran völlig aufgelöst und dadurch das Angreifen des Autolysenmittels erleichtert wurde. In die so erhaltene Mischung wurde Toluol (1 : 10) eingerührt. Die Toluolautolyse wurde bei 20° durchgeführt, die Dauer war 16 bis 20 Stdn., das pH der Mischung bei Autolysenbeginn 7,0.

Die Autolysensäfte wurden 4 Stdn. lang gegen Leitungswasser dialysiert, darauf zentrifugiert und dann das Zentrifugat mit Acetatpuffer von pH 5,0 im Verhältnis 1 : 1 versetzt. Die Mischung ließen wir 12 bis 16 Stdn. stehen (0°) und befreiten sie dann durch Zentrifugieren von den ausgefallenen inerten Stoffen.

Die so erhaltene Rohlösung wurde dann mit Methanol im Verhältnis 1 : 1 bei 0° versetzt, die Mischung 2 Stdn. im Eiskasten stehen gelassen und dann abzentrifugiert. Darnach versetzten wir den Niederschlag mit wenig Wasser, schüttelten 3 Stdn. und zentrifugierten wieder ab. Das Ferment befindet sich dann in der überstehenden Lösung, welche klar ist und einen braungelben Farbton zeigt.

Die höchste erreichte Anreicherung war 1600 Phosphatase-Einheiten (PE) nach *Albers*² pro ccm bei einem Stickstoffgehalt von 2,3 bis 2,5 mg N pro ccm. Das entspricht 640 PE/mg N. Die Beständigkeit der Lösungen ist sehr gering; auch bei Stehen im Eisschrank nimmt die Aktivität der Präparate im Laufe einer Woche auf ein Siebentel ab.

Substrate. Als Substrate wurden Phenolphosphat, Phenolphthaleinphosphat, α -Glycerophosphat und β -Glycerophosphat verwendet. Alle diese Präparate wurden im hiesigen Laboratorium synthetisiert.

Aktivitätsmessungen. Die Messungen der Aktivität der Enzympräparate erfolgten bei Verwendung von Phenolphthaleinphosphat nach der Methode von *Huggins* und *Talalay*³; in allen anderen Fällen wurde nach *Fiske* und *Subbarow*⁴ (Modifikation von *Teorell*⁵) verfahren.

Ergebnisse und Diskussion.

Wie bereits erwähnt wurde, gelang es, mit der beschriebenen Isolierungsmethode ein Fermentpräparat zu gewinnen, welches eine Aktivität von 640 PE/mg N zeigte. Dies ist die bisher höchste bei einer aus Hefe gewonnenen Phosphatase festgestellte Aktivität. Wir nehmen trotzdem an, daß unser Enzympräparat noch beträchtliche Mengen an inerten Proteinen enthält. Versuche zur Kristallisation des Ferments waren bisher erfolglos.

Das Ferment konnte mit der beschriebenen Methodik durchaus nicht immer aus Oberhefe in entsprechender Menge und Konzentration erhalten werden. Die von den beiden Firmen bezogenen Hefen enthielten sehr stark wechselnde Mengen an Enzym und unterschieden sich auch wesentlich in der Loslösbarkeit des Ferments von den festen autolyse-resistenten Bestandteilen der Hefezelle. Es scheinen hier zwei Faktoren eine Rolle zu spielen: erstens liegt das Ferment in verschiedenen Hefe-

² Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **232**, 165 (1935).

³ J. biol. Chemistry **159**, 399 (1945).

⁴ J. biol. Chemistry **66**, 375 (1925).

⁵ Biochem. Z. **230**, 1 (1931); **232**, 485 (1931).

rassen in verschiedenen Mengen und auch in einem verschiedenen Bindungszustand an die Zellelemente vor und zweitens dürften für die Enzymmenge ebenso wie für die Lösbarkeit auch relativ geringe Veränderungen der Züchtungsbedingungen, wie z. B. stärkere oder schwächere Belüftung und ähnliches, eine große Rolle spielen. Leider stehen uns im hiesigen Laboratorium nicht die Möglichkeiten zur Verfügung, entsprechend große Mengen Hefe, wie sie für die Isolierung benötigt werden, unter Standardbedingungen zu züchten.

Die Versuche über die Substratspezifität und die pH-Abhängigkeit des Enzyms sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. pH-Abhängigkeit der Spaltung verschiedener Substrate durch die saure Oberhefenphosphomonoesterase. Pufferung: m/5-Natriumacetat-Essigsäure; 20°; willkürlich gewählte Relativeinheiten.

Substanz	pH						
	3,19	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	5,1
β -Glycerophosphat	—	37	60	90	75	—	—
α -Glycerophosphat	—	—	3	4	8	12	12
Phenolphosphat	38	73	83	89	93	85	47
Phenolphthaleinphosphat . .	—	36	105	186	126	93	—

Das vom Ferment am schnellsten gespaltene Substrat ist also Phenolphthaleinphosphat; hier ist das pH-Optimum der Spaltung recht scharf bei 4,1. β -Glycerophosphat und Phenolphosphat werden bei dem für sie optimalen pH etwa im gleichen Ausmaß hydrolysiert; wir finden aber bei Phenolphosphat ein verhältnismäßig breites Wirkungsoptimum zwischen den pH-Werten 3,8 und 4,7, während beim β -Glycerophosphat das Maximum ziemlich scharf bei pH 4,1 liegt. α -Glycerophosphat wird nur wenig angegriffen, was mit den Berichten früherer Bearbeiter des Ferments übereinstimmt. Hier muß allerdings festgehalten werden, daß der Unterschied zwischen der Spaltung von β -Glycerophosphat und α -Glycerophosphat bei unseren gereinigten Präparaten weitaus stärker hervortritt als bei dem von *Albers* und *Albers*⁶ beschriebenen Produkt, denn während diese Autoren ein Verhältnis der β -Spaltung zur α -Spaltung von 10 : 4 finden, liegt dieses bei unserem Konzentrat beim pH-Optimum bei etwa 22 : 1. Der geringe Anstieg der Spaltbarkeit des α -Glycerophosphats bei höheren pH-Werten läßt sich vielleicht mit der Anwesenheit geringer Mengen einer sogenannten α -Glycerophosphatase in unserem Produkt erklären. Dieses seinerzeit von *Schäffner* und *Bauer*⁷ entdeckte Ferment, welches allerdings bisher in Oberhefe noch niemals nachgewiesen werden konnte, zeigt ein pH-Optimum bei etwa 6,5.

⁶ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **235**, 47 (1935).

⁷ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **232**, 66 (1935).

Wir führten weiters eine Anzahl von Versuchen über die Beeinflussbarkeit des Ferments durch verschiedene Effektoren durch. In Tabelle 2 sind die Daten über den Einfluß einiger Metallionen auf die Wirksamkeit des Enzyms wiedergegeben.

Tabelle 2. Einfluß verschiedener Metallionen auf die Aktivität der sauren Oberhefenphosphomonoesterase. Substrat: Phenolphthaleinphosphat; m/5-Acetatpuffer pH 4,1. Die Zahlen geben die prozentuelle Aktivitätshemmung im Vergleich mit unbeeinflussten Kontrollversuchen wieder.

Metallion	Negativer Logarithmus der molaren Konzentration der Metallionen im Versuchsansatz					
	2	3	4	5	6	7
Mg ⁺⁺	10	10	10	8	8	4
Zn ⁺⁺	—	5	5	4	3	1
Mn ⁺⁺	—	—	8	6	1	0
Cu ⁺⁺	—	10	8	5	3	0
Fe ⁺⁺	—	—	12	10	5	1
Co ⁺⁺	—	—	5	2	0	—

Die Wirkung anderer Effektoren auf die Aktivität der Phosphatase ist in Tabelle 3 veranschaulicht.

Tabelle 3. Einfluß verschiedener Effektoren auf die Aktivität der sauren Oberhefenphosphomonoesterase. Bedingungen wie bei Tabelle 2. Die Zahlen geben die prozentuelle Hemmung (—) oder Aktivierung (+) im Vergleich mit unbeeinflussten Kontrollversuchen wieder.

Substanz	Negativer Logarithmus der molaren Wirkstoffkonzentration im Versuchsansatz			
	2	3	4	5
Cystein	+ 23	+ 18	+ 11	+ 5
Methionin	+ 23	+ 21	+ 19	—
Kaliumcyanid	— 2,5	— 1,5	0	—
Natriumarsenat	— 100	— 30	— 13	—
NaH ₂ PO ₄	— 100	— 100	— 13	—
Borsäure	— 11	— 3	— 1	—
Natriumfluorid	— 100	— 100	— 7	—

Außer den in der Tabelle erwähnten Stoffen wurden noch folgende Substanzen auf ihre Wirksamkeit gegenüber dem Ferment untersucht: Alanin, Jodessigsäure und Ammoniumrhodanid. Diese Stoffe zeigten in keiner Konzentration irgendeine Wirkung auf die Fermentaktivität.

Die Versuche mit den Metallionen und mit den anderen Effektoren zeigen übereinstimmend mit den früheren Bearbeitern des Gebietes, daß wir es hier mit einem Ferment des Typus A_{III} nach *Folley* und *Kay*⁸ zu tun haben; allerdings ist diese Gruppe der Phosphomonoesterasen noch ziemlich schlecht charakterisiert. Nach *Roche* und *Courtois*⁹ finden sich Enzyme dieses Typus außer in der Oberhefe in allen untersuchten Basidiomyceten, weiters in vielen Ascomyceten und auch in manchen *Fungi imperfecti*. Analoge Fermente sind weiter auch in höheren Pflanzen sowie in Milz, Leber und Erythrozyten verschiedener Tiere nachgewiesen worden. Es scheint noch nicht festzustehen, wie weit die Übereinstimmungen bei all diesen Enzymen verschiedenen Ursprungs geht und ob wir es hier tatsächlich mit einem einheitlichen Typus zu tun haben. So schwanken die berichteten pH-Optima der Wirkung zwischen 3,0 bei dem Ferment des Hepatopancreas der Schnecke (*Karrer* und *Freuler*¹⁰, *Munemura*¹¹ und *Ohmory*¹²) und 4,2. Auch in bezug auf die Wirkung der verschiedenen Effektoren bestehen einige Unterschiede bei den Enzymen verschiedener Herkunft; diese sind allerdings mehr quantitativer als qualitativer Natur.

Bei unserem Ferment zeigte es sich nun, daß das pH-Optimum schon bei Verwendung verschiedener Substrate um einiges schwankt. Das Verhalten gegenüber den Effektoren bietet nichts von besonderem Interesse; sämtliche Enzyme dieser Gruppe werden durch Mg⁺⁺ mehr oder minder stark gehemmt; dasselbe ist bezüglich der Hemmung durch die anderen Metallionen, Fluorid, Arsenat und Phosphat, zu sagen, wobei die Wirkung der zwei letztgenannten Salze wohl ein gutes Beispiel kompetitiver Hemmung darstellt.

Es erscheint uns als erwähnenswert, daß die Wirksamkeit des Ferments wohl durch Cystein gefördert wird, daß aber andererseits Jodessigsäure keinerlei Hemmwirkung ausübt, was zu erwarten wäre, wenn es sich um ein Enzym mit für die Wirkung wesentlichen SH-Gruppen handeln würde. Bemerkenswert ist auch die derjenigen des Cysteins analoge fördernde Wirkung des Methionins, für welche uns noch jede Erklärung fehlt.

Abschließend darf gesagt werden, daß die saure Oberhefenphosphomonoesterase sich auch im hochkonzentrierten Zustand weitgehend analog zu weniger aktiven Präparaten verhält. Über die biologische Funktion des Enzyms ist bis heute noch kaum etwas bekannt; wir beabsichtigen, demnächst eine diesbezügliche Versuchsreihe durchzuführen.

⁸ *Ergebn. Enzymforsch.* 5, 159 (1936).

⁹ *Exp. ann. Biochimie méd.* 4, 219 (1944).

¹⁰ *Festschrift für A. Tschürch*, S. 421. Zürich 1926.

¹¹ *J. Biochemistry* 17, 343 (1933).

¹² *Enzymologia* (Den Haag) 4, 217 (1937).

Zusammenfassung.

Es wird die Reinigung der sauren Phosphomonoesterase aus Oberhefe beschrieben, wobei Präparate mit 640 Phosphataseeinheiten nach *Albers* pro mg Stickstoff erhalten wurden. Das Ferment verhält sich in seiner Substratspezifität, seinem pH-Optimum und seinem Verhalten gegenüber Effektoren völlig entsprechend dem Typus A_{III} der Phosphomonoesterasen nach *Folley* und *Kay*.