

Zur Kenntnis der im alkalischen Gebiet optimal wirksamen Phosphomonoesterasen aus Oberhefe und Unterhefe.

(VI. Mitteilung über Phosphatasen der Hefe.)

Von

O. Hoffmann-Ostenhof, H. Moser und R. Ehrenreich.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 5. Jan. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 11. Jan. 1951.)

Wir haben in früheren Mitteilungen dieser Reihe¹, wie auch in Vorträgen² über die Auffindung und Charakterisierung eines Fermentes berichtet, welches aus der Hefe gewonnen werden kann und imstande ist, verschiedene Phosphorsäureester in schwach alkalischer Lösung (pH-Optimum etwa 9,1) zu spalten. Das Enzym zeigt eine auffallende Ähnlichkeit mit verschiedenen Phosphomonoesterasen animalischen Ursprungs, wie z. B. der alkalischen Nierenphosphatase, der Phosphatase der Darmschleimhaut oder der Knochenphosphatase. Etwa zur gleichen Zeit mit unserer ersten Veröffentlichung erschien ein Bericht von *Nickerson* und Mitarbeitern³ aus dem Carlsberg-Laboratorium in Kopenhagen, in welchem die Existenz derartiger Fermente in der Hefe mit Hilfe einer histochemischen Reaktion nachgewiesen wurde. Diese Autoren konnten auch feststellen, daß diese Enzyme in der Nähe kernartiger Strukturen der Hefe lokalisiert sind.

In der vorliegenden Mitteilung soll nun über die Fortschritte in der Bearbeitung dieser Fermente berichtet werden. Es ist uns gelungen, das Enzym aus Oberhefe in einer weitaus konzentrierteren Form dar-

¹ *O. Hoffmann-Ostenhof, H. Moser und E. Putz*, Exper. **4**, 352 (1948); Festschrift für *P. Karrer*, S. 11. Zürich 1949.

² *O. Hoffmann-Ostenhof und H. Moser*, Abstr. 1st. Intern. Congr. Biochem., Cambridge 1949, p. 345. — *O. Hoffmann-Ostenhof*, Angew. Chem. **61**, 35 (1949).

³ *W. J. Nickerson, E. Krugelis und N. Andersen*, Nature (London) **162**, 192 (1948).

zustellen, als es bei unseren früheren Präparaten der Fall war. Ferner konnte ein analoges Enzym — allerdings in weitaus geringerer Menge als in der Oberhefe — auch in der Unterhefe nachgewiesen werden. Schließlich sollen noch der Einfluß verschiedener Effektoren auf die Wirkung und weitere charakteristische Eigenschaften dieser Fermente beschrieben werden.

Methodik.

Darstellung der Enzympräparate aus Oberhefe. Zur Herstellung der Präparate aus Oberhefe wurden Anstellhefen, 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.

500 g dieser Anstellhefen wurden 3 bis 4 Tage bei etwa -8° gut durchgefroren; nach dem Auftauen verrieb man mit gereinigtem Sand und behandelte dann unter Wasserzusatz in einer Kugelmühle. Die Hefesuspension wurde dann 12 Stdn. lang bei pH 6 mit Toluolzusatz autolysieren gelassen, wobei 40° und ständiges Rühren sich als optimal erwiesen. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages brachte man die Lösung zur Ausfällung des überschüssigen Phosphats auf pH 8,5, zentrifugierte dann wieder und neutralisierte die überstehende Lösung. In den auf diese Art erhaltenen Rohextrakt wurde Bentonit (1 g Bentonit auf 20 ml Rohextrakt) eingerührt und die Lösung auf diese Art filtrierbar gemacht.

Nach der Filtration, welche in der Kälte durchgeführt wurde, gab man bei 0° allmählich Aceton zu dem Filtrat zu, bis das Verhältnis 100 ml Filtrat zu 75 ml Aceton erreicht war, ließ dann 3 bis 4 Stdn. in der Kälte stehen, worauf sich ein Niederschlag bildete. Nach Abzentrifugieren wurde die überstehende Lösung verworfen und der noch feuchte Niederschlag in möglichst wenig Wasser gelöst und einige Stunden gut geschüttelt. Es bildete sich ein aus inerten Proteinen bestehender Niederschlag, welcher durch Zentrifugieren entfernt und verworfen wurde. Die überstehende milchige Flüssigkeit filtrierte man durch einen Glassintertiegel *Schott G 4*.

Der auf diese Weise erhaltene klare Fermentextrakt wurde nun in einen Cellophan Schlauch gefüllt und — mit Eis-Kochsalzmischung gekühlt — gegen halbgesättigte Ammoniumsulfatlösung dialysiert, wobei sich nach 10 bis 12 Stdn. ein Niederschlag ausschied, welcher nur geringe Aktivität zeigte. Die von diesem Niederschlag befreite Lösung wurde nun weiter gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung dialysiert; der sich nun nach 5 bis 6 Stdn. bildende Niederschlag enthielt das Enzym in einem stark angereicherten und nur wenig von Begleitstoffen verunreinigten Zustand. Durch Fortsetzung der Dialyse konnten weitere hochaktive Fraktionen erhalten werden, welche allerdings bereits stärkere Verunreinigungen enthielten.

Die höchste auf diese Weise erzielte Anreicherung war 1720 Phosphataseeinheiten (PE) nach *Albers*⁴ pro ml bei einem Stickstoffgehalt von 2,8 mg pro ml, was einer Aktivität von 614 PE/mg N entspricht. Der Ausgangsextrakt (nach der Autolyse) zeigte eine Aktivität von 5,9 PE/mg N, so daß wir mit der beschriebenen Methodik das Enzym auf mehr als das Hundertfache konzentriert haben.

⁴ *H. Albers* und *E. Albers*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **235**, 47 (1935).

An dieser Stelle soll auch erwähnt werden, daß es uns mehrmals gelang, aus derartig hochaktiven Fermentlösungen durch Stehenlassen in der Kälte Proteinkristalle zu erhalten, wobei die Aktivität der Mutterlaugen auf einen Bruchteil zurückging. Bei Wiederauflösen dieser Kristalle in entsprechenden Pufferlösungen zeigten aber die erhaltenen Extrakte verhältnismäßig geringe Aktivität, welche überdies in wenigen Stunden verloren ging. Es ist möglich, daß die geringe Beständigkeit des gereinigten Ferments für diese Erscheinung verantwortlich ist. Hochaktive Fermentlösungen, welche nicht über die Kristallisation erhalten worden waren, erwiesen sich jedenfalls als viel beständiger. Die Frage, ob wir in den Kristallen wirklich eine kristallisierte Phosphatase vor uns haben, oder nur, wie das vorstellbar wäre, ein inertes Protein, an welches etwas Ferment adsorbiert ist, soll noch näher geprüft werden.

Darstellung der Enzympräparate aus Unterhefe. Als Ausgangsmaterial diente uns hier Unterhefe, welche wir von der Schwechater Brauerei, Wien-Schwechat, erhielten. Auch dieser Firma sei für ihre Bereitwilligkeit, uns die Hefe kostenlos zu überlassen, unser Dank ausgesprochen.

1000 g Unterhefe wurden 3mal mit je 10 l destilliertem Wasser gewaschen und nach dem Abfiltrieren 2 Tage lang bei -20° eingefroren. Dann versetzten wir die Hefe mit 20 ml 0,3%igem Ammoniak, breiteten sie in einem großen Exsikkator aus und ließen 12 Stdn. lang Ätherdämpfe auf sie einwirken. Hierauf wurde der Hefebrei mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und bei guter Rührung tropfenweise mit Toluol versetzt, bis die zugesetzte Toluolmenge ein Zehntel des Gesamtvolumens betrug. Die mit Toluol versetzte Hefe wurde nun 24 Stdn. bei Zimmertemp. gerührt, darauf noch ein Viertel der zuerst angewandten Toluolmenge zugesetzt und weitere 24 Stdn. unter Rührung stehen gelassen. Während der gesamten Autolysevorgänge mußte streng darauf geachtet werden, daß die Temp. nicht über 25° stieg und pH 7 nicht unterschritten wurde.

Das erhaltene Autolysat wurde nun zentrifugiert und der Rückstand verworfen. Wir kühlten die überstehende Lösung auf 0° ab und versetzten sie unter Rühren langsam mit drei Viertel des Volumens eisgekühltem Aceton. Nach Abzentrifugieren wurde der erhaltene Niederschlag durch Absaugen an der Wasserstrahlpumpe vom restlichen Aceton befreit und dann in möglichst wenig Wasser aufgenommen. Hierauf wurde 4 Stdn. lang geschüttelt, abzentrifugiert und der unlösliche Rest, der aus inerten Proteinen bestand, verworfen.

Der Enzymextrakt wurde dann bei Eistemp. zuerst 4 Stdn. gegen destilliertes Wasser und dann 10 bis 12 Stdn. gegen halbgesättigte Ammoniumsulfatlösung dialysiert, wobei sich ein Niederschlag abschied, welcher nur geringe Fermentaktivität zeigte. Die Lösung wurde dann in Eis-Kochsalzmischung einer 6stündigen Dialyse gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung unterzogen, der erhaltene Niederschlag darauf wiederum in Wasser gelöst und diese Lösung 4 Stdn. lang gegen 40%iges Aceton bei -15° dialysiert, wobei inerte Proteine ausfielen und die Aktivität des Extraktes auf 140 PE/ml stieg. Eine weitere Konzentration der nur in geringen Mengen erhaltenen Enzymlösung war bisher noch nicht möglich.

Substrate und Meßmethoden. Als Substrate wurden Phenolphosphat, Phenolphthaleinphosphat, α -Glycerophosphat, β -Glycerophosphat und Hexosediphosphat verwendet. Alle diese Präparate wurden im hiesigen Laboratorium synthetisiert. Die Messungen der Aktivität der Enzympräparate erfolgten bei Verwendung von Phenolphthaleinphosphat nach der Methode

von *Huggins* und *Talalay*⁵; in allen anderen Fällen wurde nach *Fiske* und *Subbarow*⁶ (Modifikation von *Teorell*⁷) verfahren.

Ergebnisse.

Spezifität und pH-Abhängigkeit der Wirkung. Die Spezifität der beiden Enzyme und die pH-Abhängigkeit der Spaltung verschiedener Substrate wird in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1. pH-Abhängigkeit der Spaltung verschiedener Substrate durch das Oberhefeferment.

Die Werte stellen PE/mg N dar; Substratkonzentration n/100; Versuchsdauer 1 Std.; n/10 Ammoniak-Ammoniumchlorid-Pufferlösung nach *Michaelis*; keine Zugabe aktivierender Metallionen.

Substrat	pH						
	8,0	8,3	8,5	8,9	9,2	9,5	9,8
Phenolphthaleinphosphat...	97	273	418	541	606	564	223
Phenolphosphat	85	242	390	508	572	478	127
β -Glycerophosphat	113	292	454	478	319	106	—
α -Glycerophosphat	89	190	271	329	191	28	—

Außer den in Tabelle 1 genannten Substraten wurden noch Hexosediphosphat, Pyrophosphat, Metaphosphat und Adenosintri-phosphat auf ihre Spaltbarkeit durch das Oberhefeferment untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die drei letztgenannten Substanzen überhaupt nicht angegriffen werden. Hingegen ist das Enzym imstande, Hexosediphosphat zu spalten, wobei allerdings das pH-Optimum etwas gegen den Neutralpunkt hin verschoben ist; bei pH 8,5 finden wir eine Spaltung von 294 PE/mg N, während die entsprechenden Werte für pH 8,9 240 und für pH 9,2 140 sind.

Tabelle 2. pH-Abhängigkeit der Spaltung verschiedener Substrate durch das Unterhefeferment.

Die Werte stellen PE/ml Fermentlösung dar; sonstige Bedingungen wie in Tabelle 1.

Substrat	pH					
	6,8	7,8	8,3	8,9	9,2	9,5
Phenolphthaleinphosphat.....	20	20	45	55	60	55
Phenolphosphat	15	30	70	82	90	75
β -Glycerophosphat	24	42	72	70	54	45

⁵ *C. Huggins* und *P. Talalay*, J. biol. Chemistry **159**, 399 (1945).

⁶ *C. H. Fiske* und *Y. Subbarow*, J. biol. Chemistry **66**, 375 (1925).

⁷ *T. Teorell*, Biochem. Z. **230**, 1 (1931); **232**, 485 (1931).

Wir wir bei Vergleich der Tabellen 1 und 2 sehen, unterscheidet sich das Ferment aus Unterhefe von demjenigen aus Oberhefe dadurch, daß es Phenolphosphat und β -Glycerophosphat schneller spaltet als Phenolphthaleinphosphat; eine Hydrolyse von α -Glycerophosphat durch das Unterhefeenzym konnte nicht beobachtet werden, hingegen wird das vom Oberhefeferment nicht angegriffene Adenosintriphosphat vom Enzym aus Unterhefe bei pH 9,2 etwa ein Drittel so schnell gespalten wie Phenolphosphat. Die pH-Optima der Wirkung der beiden Enzyme

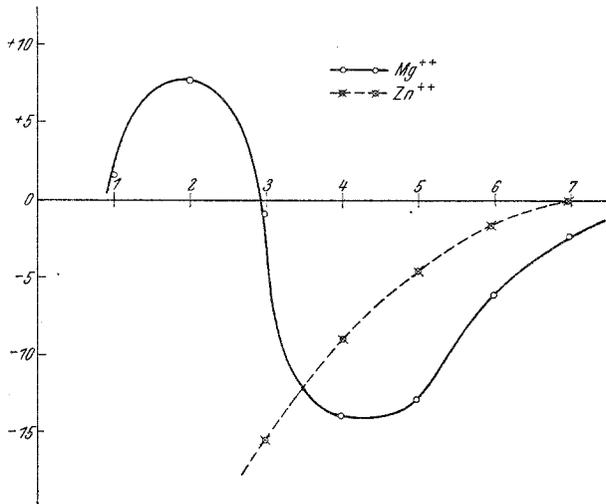


Abb. 1. Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses von Mg^{++} und Zn^{++} auf die Aktivität des Oberhefeenzyms. Abszisse: negativer Logarithmus der Metallionenkonzentration. Ordinate: Aktivierung (+) bzw. Hemmung (—) der Aktivität.

liegen aber im gleichen Bereich; in beiden Fällen findet man, daß die schnellste Hydrolyse von Phenolphosphat und Phenolphthaleinphosphat etwa bei pH 9,2 stattfindet, während das Optimum für die Spaltung von β -Glycerophosphat mehr gegen den Neutralpunkt verschoben zu sein scheint (pH 8,9).

Einfluß von Effektoren. Interessante, wenn auch noch ungeklärte Verhältnisse finden wir bei der Untersuchung des Einflusses von Metallionen auf die beiden Enzyme. Die Extrakte verhielten sich je nach der Vorbehandlung sehr verschieden; nach jedem einzelnen Reinigungsschritt konnten andere Effekte beobachtet werden. Bei den höchstgereinigten Präparaten des Ferments aus Oberhefe konnte eine bemerkenswerte Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Mg^{++} -Ionen festgestellt werden; diese Daten sind in Abb. 1 wiedergegeben. Alle anderen auf ihre Wirksamkeit gegenüber der Aktivität des Ober-

hefeenzymen geprüften Metallionen — Mn^{++} , Zn^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Fe^{++} , und Ca^{++} — verursachen eine Hemmung der Enzymwirkung.

Auch das Enzym der Unterhefe läßt sich durch Zugabe von Mg^{++} -Ionen aktivieren, wobei aber die Werte von Fermentpräparat zu Fermentpräparat beträchtlich schwankten. Bei der Untersuchung des Einflusses der anderen Kationen fanden wir noch verworreneren Verhältnisse. So konnten wir bei einer Enzymlösung feststellen, daß Zn^{++} , Mn^{++} , Co^{++} und Cu^{++} , sämtlich in 10^{-4} molarer Konzentration, Aktivierungen zwischen 22 und 33% bewirkten, während ein vollständig gleichartig hergestellter Enzymextrakt, der aber vor der Untersuchung 2 Tage lang bei -20° eingefroren gewesen war, dabei jedoch keine Veränderung der Aktivität erlitten hatte, sich völlig anders verhielt. Die Fermentwirkung dieser Enzymlösung wurde nämlich durch Zn^{++} überhaupt nicht beeinflußt, während die anderen Kationen, welche bei dem anderen Extrakt Aktivierungen verursacht hatten, in diesem Falle starke Hemmungen (bis zu 61% bei Mn^{++}) bewirkten, obwohl die Versuchsbedingungen völlig gleichartig waren.

Der Einfluß einer Anzahl anderer Effektoren auf die beiden Fermente ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Der Einfluß verschiedener Effektoren auf die Wirksamkeit der beiden Phosphomonoesterasen aus Hefe.

Substrat: Phenolphthaleinphosphat; pH 9,2; sonstige Bedingungen wie in Tabelle 1. Die Zahlen geben die prozentuelle Hemmung im Vergleich mit unbeeinflussten Kontrollversuchen wieder.

Effektor	Negativer Logarithmus der molaren Konzentration der Effektoren im Versuchsansatz					
	Oberheferment			Unterheferment		
	2	3	4	2	3	4
Kaliumcyanid	100	100	85	100	70	30
Natriumborat	100	48	10	90	30	7
Natriumfluorid	8	0	—	0	—	—
Natriumarsenat	100	100	57	100	40	10
Natriumphosphat	47	21	3	100	20	0
Ammoniumrhodanid	18	5	—	10	0	—
Natriumjodacetat	10	0	—	16	0	—
Cystein	100	100	52	100	90	10

Außer den in Tabelle 3 beschriebenen Effekten wurde noch eine allerdings schwache Wirkung von Methionin auf das Oberheferment beobachtet; dieser Effektor hemmt die Wirksamkeit in 10^{-2} molarer Konzentration um 18%. Das Enzym der Unterhefe zeigt außerdem die Besonderheit, durch das Natriumsalz der Diäthylbarbitursäure in seiner

Wirksamkeit gehemmt zu werden; dieser Effekt kann durch Zusatz von Mg^{++} -Ionen aufgehoben werden. Das Enzym der Oberhefe verhält sich gegenüber diäthylbarbitursaurem Natrium völlig refraktär.

Stabilität der Fermente. Das pH-Optimum der Stabilität der beiden Fermente liegt, wie das übrigens bei allen anderen Phosphomonoesterasen des Typus A_1 der Fall ist, zwischen 7 und 8. Die beiden Fermente zeigen aber bedeutende Unterschiede in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Temperatureinflüssen. Während die Optimaltemperatur für das Oberhefeferment bei etwa 40° liegt, ist das Unterhefeenzym viel temperaturempfindlicher. Dies macht sich insbesondere bei der Herstellung der Enzyme bemerkbar. So erträgt das Enzym aus Oberhefe Temperaturen bis zu 40° bei der 18stündigen Autolyse ohne Schädigung, während das Unterhefeferment bei der gleichen Temperatur nach 24 Stdn. bereits völlig und irreversibel inaktiviert wird.

Durch 2tägige Dialyse gegen destilliertes Wasser werden beide Fermente inaktiviert. Das Enzym aus Oberhefe ist aber durch Zusatz von Mg^{++} oder Alanin zumindest teilweise reaktivierbar, dagegen gelang es uns niemals, dies auch bei dialysierten Extrakten des Enzyms aus Unterhefe zu erreichen.

Bei den Versuchen zur Reaktivierung dialysierter Extrakte des Oberhefeenzym erhielten wir wohl regelmäßig gleichsinnige Resultate im Sinne einer Reaktivierung durch Mg^{++} und Alanin; die Ergebnisse waren aber quantitativ nicht reproduzierbar. Das Ausmaß der erzielbaren Reaktivierung der Enzymextrakte scheint von Faktoren abzuhängen, die noch nicht beherrscht werden können. Aus diesem Grunde wird auf eine eingehendere Behandlung unserer diesbezüglichen Versuchsserien verzichtet.

Diskussion.

Wie bereits berichtet wurde, gelang es uns also, die im alkalischen Bereich optimal wirksame Phosphomonoesterase der Oberhefe bis zu einer Aktivität von 614 PE/mg N zu konzentrieren, womit dieses Ferment nur um wenig hinter der mit ihm isodynamen, im sauren Bereich optimal wirksamen Phosphomonoesterase⁸ der Oberhefe zurückbleibt. Es besteht Grund zur Annahme, daß das hier beschriebene Ferment schon in verhältnismäßig reiner Form — wenig verunreinigt durch inerte Proteine — vorliegt. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, daß der auf empirische Weise erhaltene Arbeitsgang zur Herstellung des Enzyms noch beträchtlich verbesserungsfähig ist und es möglich sein sollte, größere Ausbeuten an Enzym zu erhalten. Auch die Frage der Kristallisation des Ferments erwartet noch seine Lösung; das Verhalten der einige Male erhaltenen Kristalle läßt allerdings unter der Annahme, daß es sich hier tatsächlich

⁸ O. Hoffmann-Ostenhof, H. Moser und F. Neumann, Mh. Chem. 81, 708 (1950).

um das kristallisierte Ferment gehandelt haben sollte, auf eine große Unbeständigkeit im kristallisierten Zustand schließen.

Anders liegen die Verhältnisse bei dem Ferment aus Unterhefe, das im Ausgangsmaterial nur in sehr geringer Menge vorhanden ist. Hier handelt es sich bei den von uns erhaltenen Extrakten sicher nicht um Reinpräparate. Eine weitere Konzentrierung erwies sich allerdings bisher wegen der Unbeständigkeit des Enzyms als unmöglich; es ist aber durchaus vorstellbar, daß ein schonenderes Verfahren zu höher konzentrierten und reineren Präparaten führen kann.

Sämtliche angeführten Daten zeigen, daß beide Fermente ziemlich typische Vertreter des Typus A_1 in der seinerzeit von *Folley* und *Kay*⁹ aufgestellten Systematik der Phosphomonoesterasen darstellen. Substratspezifität, pH-Abhängigkeit, Einfluß von Effektoren, Stabilität und sonstiges Verhalten zeigen kaum irgendeine charakteristische Abweichung von den anderen Fermenten dieses Typus¹⁰.

Es erhebt sich nun die Frage, ob wir auf Grund der berichteten Unterschiede im Verhalten der beiden Enzyme, die ja in mancher Hinsicht charakteristisch, wenn auch nicht sehr groß sind, schließen können, daß wir es mit zwei verschiedenen Enzymindividuen zu tun haben oder ob die beiden Fermente, welche ja aus sehr ähnlichen Ausgangsmaterialien stammen, identisch sind. Die Beantwortung dieser Frage wird dadurch erschwert, daß die zur Verfügung stehenden Enzympräparate sich in ihrer Reinheit stark unterschieden, so daß man annehmen kann, daß manche Verschiedenheiten im Verhalten auf diesen Umstand zurückzuführen sind.

Das Problem mündet aber in die allgemeine, schwer zu beantwortende Frage, ob gleichartig wirksame Enzyme aus verschiedenen Ausgangsmaterialien als identisch anzusehen sind oder nicht, wobei als Kriterium der Identität wohl der chemische Befund Geltung haben muß. Ob wir nun in unserem Falle zwei chemisch identische Wirkstoffe vor uns haben, können wir mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln noch nicht entscheiden, da hierzu analytische Methoden der Eiweißchemie Anwendung finden müßten, welche nur bei höchstgereinigten Präparaten verwendbar sind. Wir müssen die Frage deshalb bis auf weiteres offen lassen. Es mag hier aber festgestellt werden, daß im Falle, daß unsere beiden Fermente tatsächlich identische Enzymindividuen sind, es mit einiger Sicherheit angenommen werden muß, daß der Bindungszustand der Wirkstoffe an die Zellbestandteile der Hefe verschieden ist und daß das Enzym der Oberhefe von Schutzstoffen begleitet wird, welche seinem Analogen aus Unterhefe fehlen, wodurch sich die weitaus geringere Stabilität des letzteren erklären läßt.

⁹ *S. J. Folley* und *H. D. Kay*, *Ergebn. Enzymforsch.* 5, 159 (1936).

¹⁰ Vgl. bes. *J. Roche* und *Ng. van Thoway*, *Adv. Enzymology* 10, 83 (1950).

Zusammenfassung.

Es wird die Gewinnung und Reinigung der alkalischen Oberhefe-phosphomonoesterase sowie eines neuentdeckten analogen Enzyms aus Unterhefe beschrieben. Das erstgenannte Ferment wurde bis zu einer Aktivität von 614 Phosphataseeinheiten nach *Albers* pro Milligramm Stickstoff konzentriert. Beide Enzyme verhalten sich entsprechend ihrer Substratspezifität, ihren pH-Optima und ihrer Beeinflußbarkeit durch Effektoren völlig entsprechend dem Typus A_I der Phosphomonoesterasen nach *Folley* und *Kay*. Die Frage, ob die beiden Wirkstoffe identisch sind, muß bis auf weiteres offen bleiben.