

Über den oxydativen Abbau von *myo*-Inosit durch einige Sproßpilzarten

Von

R. G. Janke, C. Jungwirth, I. B. Dawid und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus dem Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie der Technischen Hochschule, Wien, und dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 24. April 1959)

Unter 36 untersuchten Sproßpilzarten erwiesen sich drei, nämlich *Schwanniomyces occidentalis*, *Cryptococcus neoformans* und *Candida krusei*, dazu befähigt, auf einem Nährboden, der *myo*-Inosit als einzige Kohlenstoffquelle enthält, zu wachsen und auch Inosit oxydativ abzubauen.

Die Untersuchung an *Schwanniomyces occidentalis* ergab, daß das für die Oxydation von *myo*-Inosit verantwortliche Enzymsystem nicht konstitutiv ist, sondern durch Inosit induziert wird. Beim oxydativen Abbau von Inosit werden pro Mol Inosit drei Mole Sauerstoff aufgenommen bzw. drei Mole Kohlendioxyd gebildet.

Einleitung

Es ist bekannt, daß *myo*-Inosit sowohl von einigen Bakterienarten als auch vom tierischen Gewebe oxydativ abgebaut wird. Die Oxydation des Inosits wurde von verschiedenen Autoren eingehend untersucht; es stellte sich dabei heraus, daß die Reaktion je nach dem Organismus verschiedenen Mechanismen folgt.

Acetobacter suboxydans oxydiert *myo*-Inosit und nahe verwandte Cyclite zu den entsprechenden Mono- und Diketonen^{1, 2}; *Aerobacter aerogenes* ist zu einem weiteren oxydativen Abbau des Inosits imstande, wobei pro Mol oxydiertem Inosit drei Mole CO₂ entstehen³. Auf Grund

¹ A. J. Kluyver und F. J. G. de Leeuw, Tijdschr. vergelijkt. Geneesk. **10**, 170 (1924).

² B. Magasanik und E. Chargaff, J. Biol. Chem. **174**, 173 (1948).

³ B. Magasanik, J. Biol. Chem. **205**, 1019 (1953).

von Versuchen mit präsumptiven Zwischenprodukten nimmt *Magasanik* bei *A. aerogenes* an, daß die ersten Reaktionsschritte die Oxydation des *myo*-Inosits zum Monoketo-Inosit (Inosose) und dann zur entsprechenden Diketoverbindung sind. Für den weiteren Verlauf wird eine Ringöffnung und ein weiterer Abbau bis zum C₃-Körper postuliert. Dieses Enzymsystem ist in *A. aerogenes* nur dann nachweisbar, wenn der Organismus vorher auf einem Inosit als einziges Kohlehydrat enthaltenden Medium gewachsen ist; es handelt sich somit um ein induzierbares Enzymsystem.

Ganz anders scheinen die Verhältnisse im tierischen Gewebe zu liegen; *Charalampous*⁴ konnte bei Versuchen mit Präparationen aus Rattenniere eine Oxydation des *myo*-Inosits zu Glucuronsäure beobachten.

Wir stellten uns die Aufgabe zu prüfen, ob sich auch in Sproßpilzen Enzymsysteme finden, die zur Oxydation von Inosit imstande sind. Es konnte mit Sicherheit geschlossen werden, daß Sproßpilzarten, welche auf Inosit als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können, derartige Enzymsysteme besitzen müssen. Bei der Untersuchung von insgesamt 36 verschiedenen Sproßpilzarten fanden sich tatsächlich drei, die auf Inosit gut wachsen konnten und auch Enzymsysteme der Inositoxydation besaßen. In der Folge war zu prüfen, ob es sich hier um konstitutive oder induzierbare Enzymsysteme handelt und welchem Mechanismus die Dissimilation des Inosits folgt.

Methodischer Teil

Züchtung: Das Grundnährmedium, welches bei unseren Versuchen angewandt wurde, war das Medium von *Reader*⁵, welches folgende Salze in 1000 ml Wasser enthält: 3 g (NH₄)₂SO₄, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 0,4 g Ca(NO₃)₂ und 0,16 g K₂HPO₄. Als Kohlehydrat wurden 10 g Glucose bzw. dieselbe Menge *myo*-Inosit (Fluka, Buchs, „für bakteriologische Zwecke“) zugesetzt; weiters enthielt der Nährboden für die Plattenversuche 15 g Agar pro 1000 ml.

Dieses Grundmedium wurde je nach den Erfordernissen modifiziert. Als sich herausgestellt hatte, daß die drei Arten, welche gut zur Verwertung des Inosits als einziger Kohlenstoffquelle imstande sind, auf diesem Medium kein optimales Wachstum zeigen, wurden in späteren Versuchen folgende Wachstumsstoffe zugesetzt⁶: 2 µg Biotin, 400 µg Calciumpantothenat, 200 µg Riboflavin, 200 µg *p*-Aminobenzoesäure, 400 µg Thiaminhydrochlorid, 400 µg Nicotinsäureamid und 400 µg Pyridoxinhydrochlorid (sämtlich pro 1000 ml Nährmedium).

Die Salzlösungen und die Kohlehydratlösungen wurden getrennt der fraktionierten Sterilisation unterworfen; die Vitaminlösungen wurden momentautoklaviert.

Die einzelnen Sproßpilzarten wurden vor den Züchtungsversuchen 48 Std. lang bei 29° auf einem Biomalz-Agar wachsen gelassen und von diesem auf das Grundmedium überimpft. Die Kulturen wurden 1 Woche lang täglich auf ihr Wachstum geprüft.

⁴ *F. C. Charalampous* und *C. Lyras*, *J. Biol. Chem.* **228**, 1 (1957).

⁵ *V. Reader*, *Biochem. J.* **21**, 904 (1927).

⁶ *L. J. Wickerham* und *A. K. Burton*, *J. Bacteriol.* **56**, 363 (1948).

Um für manometrische Versuche ausreichende Mengen der auf Inosit wachsenden Sproßpilze zu erhalten, wurden diese auf einem flüssigen Nährmedium weiter gezüchtet. Zu diesem Zweck wurden die Kulturen nach 48 Stdn. Wachstum auf dem festen Medium auf ein flüssiges *Reader*-Medium mit Inosit als Kohlehydrat und den oben genannten Vitaminzusätzen überimpft.

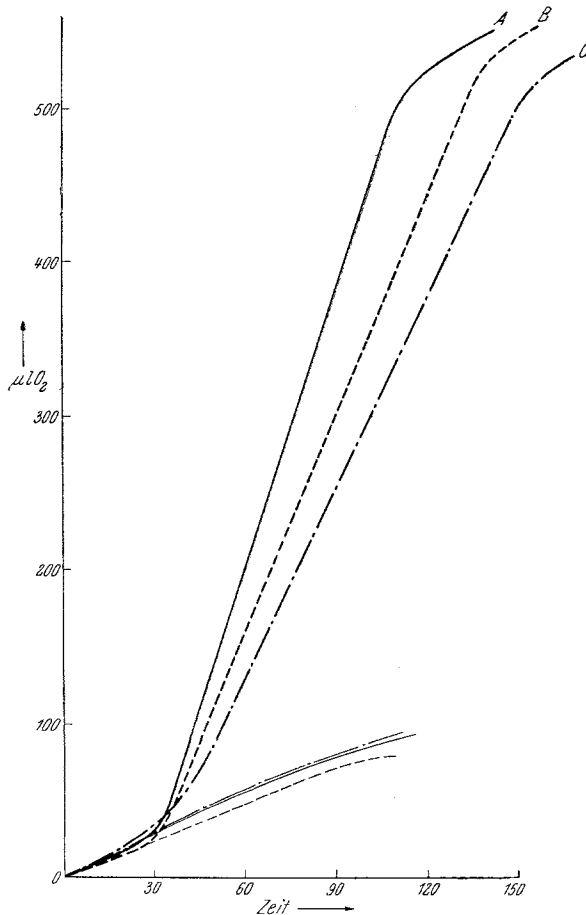


Abb. 1. Sauerstoffaufnahme verschiedener Sproßpilzarten in Gegenwart von *myo*-Inosit als einzigem veratembaren Substrat. Jedes *Warburg*-Kölbchen enthielt 1 ml Phosphatpuffer (1/15 m) pH 6, 1 ml Hefesuspension (0,5—1,5 mg N) und 0,5 ml Substratlösung (7 μ Mole Inosit). Temperatur 29°.

A *Schwanniomyces occidentalis* B *Cryptococcus neoformans* C *Candida krusei*

Dazu wurden je 50 ml Nährmedium in 200 ml Erlenmeyerkolben steril abgefüllt, die Kultur von dem festen Medium übertragen, die Kolben mit speziellen Wattehauben für die aerobe Züchtung⁷ verschlossen und bei 29° 6—8 Tage lang geschüttelt. 3 Stdn. vor der Ernte wurden zu jedem Kolben 5 ml einer 10proz. Lösung von *myo*-Inosit zugesetzt, um eventuelle Schädigungen

⁷ A. Janke, Arch. Mikrobiol. 17, 155 (1952).

der Zellen durch Erschöpfung des Nährbodens auszugleichen. Die Zellen wurden durch Abzentrifugieren geerntet, zweimal mit Wasser gewaschen und in Wasser suspendiert.

Untersuchung der Oxydation von Inosit bzw. Glucose durch die Sproßpilzzellen. Für diese Versuche wurde die übliche manometrische Technik angewandt⁸. Die genauen Bedingungen der einzelnen Experimente werden bei der Darstellung der Ergebnisse angegeben.

Ergebnisse

Für die Untersuchung, welche Sproßpilzarten imstande sind, auf *myo*-Inosit als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, stand uns die Hefesammlung des Instituts für Biochemische Technologie und Mikrobiologie der Technischen Hochschule Wien zur Verfügung. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Die drei Hefearten, welche auf dem Inosit-Medium starkes Wachstum zeigten, wurden nunmehr auf ihre Fähigkeit, Inosit zu oxydieren, geprüft. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, zeigten alle drei Arten Sauerstoffaufnahme in Anwesenheit von Inosit als einzigem oxydierbarem Substrat.

Tabelle 1. Übersicht über die Sproßpilzarten, welche auf ihre Fähigkeit, auf *myo*-Inosit als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, geprüft wurden*

Name der Art (Nomenklatur nach Lodder ⁹)	Ergebnis
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Lindner)	—
<i>Schizosaccharomyces octoporus</i> (Beijerinck)	—
<i>Saccharomyces fragilis</i> (Jörg.)	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hansen)	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> (Hansen)	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Schönbrunn (Hansen)	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasse II (Hansen)	—
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (Hansen)	—
<i>Hanseniaspora apiculata</i> (Lindner)	—
<i>Hansenula saturnus</i> (Klöcker)	—
<i>Hansenula anomala</i> (Hansen)	—
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> (Klöcker)	+
<i>Pichia membranaefaciens</i> (Hansen)	—
<i>Pichia jarinosa</i> (Lindner-Hansen)	—
<i>Zygosaccharomyces priorianus</i> (Klöcker)	—
<i>Debariomyces globosus</i> (Klöcker)	—
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> (Fischer-Brebeck)	—
<i>Cryptococcus albidus</i> (Saito-Skinner)	(+)
<i>Cryptococcus neoformans</i> (Sanf.-Vuill.)	+
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> (Kuff.-v. Laer)	—

* Sämtliche Versuche wurden auf *Reader*-Medium mit Zusatz von *myo*-Inosit, aber ohne Zugabe von Wirkstoffen durchgeführt; + bedeutet gutes Wachstum, (+) schwaches Wachstum und — kein Wachstum.

⁸ W. W. Umbreit, R. H. Burris und J. F. Stauffer, *Manometric Techniques*. 3. Aufl. Minneapolis 1957.

⁹ J. Lodder, *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Amsterdam 1952.

Name der Art (Nomenklatur nach Lodder ⁹)	Ergebnis
<i>Torula molischiana</i> (Zikes)	—
<i>Torula globosa</i> (Olson-Hammer)	—
<i>Torula pulcherrima</i> (Lindner)	—
<i>Torula utilis</i> (Henneb.)	—
<i>Torulopsis minor</i> (Poll.-Nann.)	—
<i>Candida albicans</i> (Robin-Berkh.)	—
<i>Candida tropicalis</i> (Cast.-Berkh.)	—
<i>Candida pseudotropicalis</i> (Cast.)	—
<i>Candida humicola</i> (Didd.-Lodd.)	—
<i>Candida krusei</i> (Cast.-Berkh.)	+
<i>Candida guilliermondii</i> (Cast.)	—
<i>Candida pulcherrima</i> (Lindner)	—
<i>Candida lipolytica</i> (Harrison)	—
<i>Mycoderma lafarrii</i> (Janke)	—
<i>Kloeckera</i> (Janke)	—

Zu den weiteren Untersuchungen wurde nur mehr *Schwanniomyces occidentalis* verwendet.

Zur Prüfung, ob das für den oxydativen Abbau von Inosit verantwortliche Enzymsystem konstitutiv ist, d. h. in den Zellen immer aktiv vorhanden ist, oder erst durch das Wachstum des Sproßpilzes auf dem Inosit-Medium induziert wird, wurde folgender Versuch unternommen: *Schwanniomyces occidentalis* wurde unter sonst völlig gleichartigen Bedingungen auf flüssigem Reader-Nährmedium mit Zusatz der oben genannten Wuchsstoffe in zwei Kulturgefäßen, von denen das eine *myo*-Inosit und das andere Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, gezüchtet. Die Zellen wurden dann in der beschriebenen Weise geerntet und der manometrischen Untersuchung ihrer Fähigkeit, Inosit zu oxy-

Tabelle 2. Die Oxydation von *myo*-Inosit durch *Schwanniomyces occidentalis*

Jedes Warburg-Kölbchen enthielt: 1 ml Phosphatpuffer (1/15 m) pH 6, 1 ml Hefesuspension (entsprechend ungefähr 0,5 mg N) und 0,5 ml Substratlösung (7 μ Mole Inosit). Die Analyse ergab, daß die Zellen nur 6,66 μ Mole Inosit resorbierten bzw. oxydierten, da nach dem Versuch 0,34 μ Mole aus dem Kölbchen rückgewonnen wurden

Versuch Nr.	O ₂ -Verbrauch		CO ₂ , gebildet	
	μ l	in Molen pro Mol Inosit	μ l	in Molen pro Mol Inosit
1	380	2,55	399	2,67
2	420	2,80	450	3,02
3	400	2,68	410	2,75

dieren, unterzogen. Die Ergebnisse, die in Abb. 2 dargestellt sind, zeigen, daß die auf Glucose gewachsenen Zellen anfangs nicht zur Inosit-Oxydation imstande sind und diese Fähigkeit erst nach einer Induktions-

periode gewinnen, während die auf Inosit gewachsenen Zellen sofort Inosit oxydieren können.

Wenn aber analoge Versuche zur Induktion des Inosit abbauenden Enzymsystems in Gegenwart von 2,4-Dinitrophenol (10^{-4} molar) durchgeführt werden, so ist die Fähigkeit der Zellen, Inosit zu oxydieren, deut-

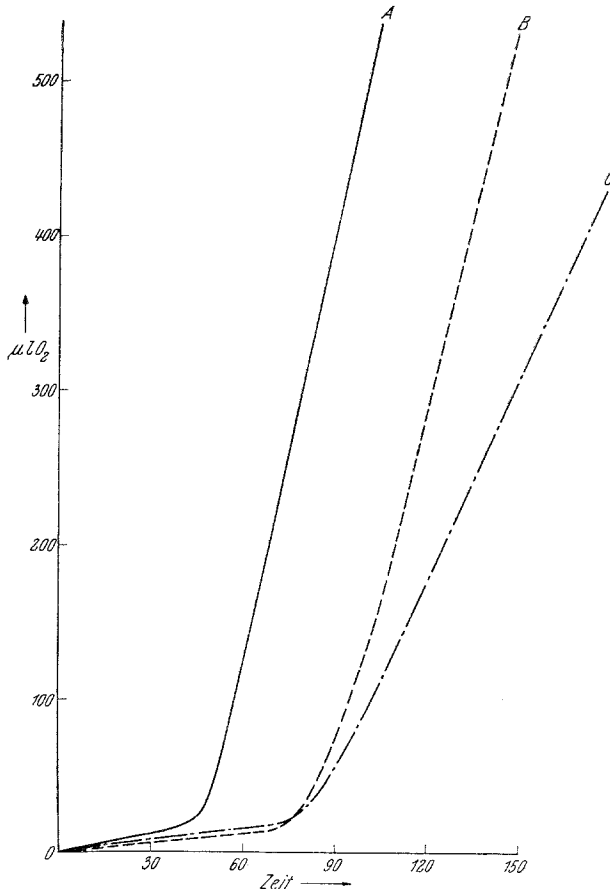


Abb. 2. Sauerstoffaufnahme von *Schwanniomyces occidentalis* in Gegenwart von *myo*-Inosit als einzigem veratembarem Substrat. Bedingungen wie in Abb. 1

A Zellen, die auf Inosit gewachsen sind,

B Zellen, die auf Glucose gewachsen sind,

C Zellen, die auf Glucose gewachsen sind und denen beim Oxydationsversuch 2,4-Dinitrophenol (10^{-4} molar) zugesetzt wurde

lich vermindert, aber nicht vollständig unterbunden (Kurve C in Abb. 2), während die Substanz in dieser Konzentration die Oxydation von Inosit durch auf Inosit gewachsene Zellen nicht beeinflusst.

Quantitative Versuche über die Oxydation des Inosits durch die Zellen ergaben, daß pro Mol eingesetztem Inosit 2,55 bis 2,8 Mole O₂

verbraucht und 2,67 bis 3,02 Mole CO_2 gebildet werden (Tab. 2). Parallelversuche, bei welchen an Stelle von Phosphatpuffer $1/15$ m Phthalatpuffer, pH 6, verwendet wurde, ergaben völlig gleichartige Resultate.

Diskussion

Die Ergebnisse, über welche hier berichtet wurde, zeigen, daß von den von uns untersuchten Sproßpilzen unter den angewandten Versuchsbedingungen die drei erwähnten Arten imstande sind, auf einem Nährboden, der *myo*-Inosit als einzige Kohlenstoffquelle enthält, gut zu wachsen und auch Inosit oxydativ abzubauen. Allerdings sind die Enzymsysteme, welche den oxydativen Abbau des Inosits katalysieren, zumindest in derjenigen Sproßpilzart, die wir näher untersucht haben, nicht immer aktiv in den Zellen vorhanden, sondern werden erst unter dem Einfluß von Inosit gebildet. Es handelt sich somit um ein induzierbares Enzymsystem. Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, daß 2,4-Dinitrophenol die Bildung induzierbarer Enzyme hemmt¹⁰. Die Substanz soll die zwei sonst miteinander gekoppelten Vorgänge der Atmung und oxydativen Phosphorylierung entkoppeln, wodurch die für die Synthese von Enzymproteinen erforderliche Phosphatbindungsenergie nur in einem weitaus verringerten Ausmaß zur Verfügung steht. Alle unsere Ergebnisse über die Induzierbarkeit des Enzymsystems der Inosit-Oxydation sind vollständig analog den seinerzeit von *Magasanik*¹¹ erhobenen Befunden über das inositabbauende Enzymsystem von *Aerobacter aerogenes*.

Ebenfalls mit den an *Aerobacter* gefundenen Ergebnissen³ stimmt unsere Beobachtung überein, daß pro Mol Inosit etwa drei Mole Sauerstoff verbraucht und etwa drei Mole Kohlendioxyd gebildet werden.

Die Befunde, über welche hier berichtet wurde, sprechen jedenfalls eher dafür, daß *Schwanniomyces occidentalis* Inosit in ähnlicher Weise abbaut wie *Aerobacter aerogenes*, während die beiden anderen bekannten Abbauewege, wie sie in *Acetobacter suboxydans* und in tierischen Geweben beobachtet wurden, offenbar auszuschließen sind. Es wird nunmehr unsere weitere Aufgabe sein, den Mechanismus der Inosit-Oxydation in unserer Sproßpilzart klarzulegen und die dafür verantwortlichen Enzyme zu charakterisieren.

Der Leiter der hier beteiligten Arbeitsgruppe am I. Chemischen Institut (O. H.-O.) dankt der Firma Austria Tabakwerke A. G., vormals Österreichische Tabakregie, Wien, für die Unterstützung dieser Untersuchungen.

¹⁰ S. Spiegelman, J. M. Reiner und R. Cohnberg, J. Gen. Physiol. **31**, 27 (1947).

¹¹ B. Magasanik, J. Biol. Chem. **205**, 1006 (1953).