

Über die Gewinnung einer zellfreien Präparation eines induzierbaren, myo-Inosit oxydierenden Enzyms aus *Schwanniomyces occidentalis*

(Vorläufige Mitteilung)

Von

C. Jungwirth, A. Sivak¹, O. Hoffmann-Ostenhof und R. G. Janke

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien
und dem Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie
der Technischen Hochschule, Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 22. Dezember 1960)

Vor kurzem berichteten wir, daß *Schwanniomyces occidentalis*, eine Sproßpilz-Art, imstande ist, auf einem Nährboden, der myo-Inosit als einzige Kohlenstoffquelle enthält, unter aeroben Bedingungen zu wachsen und den Inosit zu veratmen². Es handelt sich dabei offenbar um die induzierte Bildung eines Enzyms oder Enzymsystems, das Inosit oxydativ abbaut.

Mit der Absicht, den Abbauweg des Inosits in *Schwanniomyces* näher zu charakterisieren, versuchten wir, die dafür verantwortlichen Enzyme in zellfreiem Zustand zu erhalten. Die Züchtung der auf Inosit bzw. auf Glucose gewachsenen Zellen wurde, wie in unserer früheren Mitteilung beschrieben², durchgeführt. Die Zellen wurden nach 48 Stdn. geerntet, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und unter Kühlung 3 Min. in einem Zellhomogenisator nach *Merkenschlager*³ behandelt. Dann wurden die Zellreste durch 30 Min. Zentrifugieren bei $11\,000 \times g$ in einer Kühlzentrifuge abgetrennt und die überstehende Lösung direkt für die Enzymversuche verwendet.

¹ Postdoctoral fellow of the U. S. Public Health Service.

² R. G. Janke, C. Jungwirth, I. B. David und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **90**, 382 (1959).

³ M. Merkschlager, K. Schlossmann und W. Kurz, Biochem. Z. **329**, 332 (1957).

Das Reaktionsgemisch enthielt 2 ml des so erhaltenen Zellsafts (Proteingehalt etwa 4 mg/ml), 5 ml 0,2 m Phosphatpuffer, pH 7,5, 5 ml einer 0,3proz. Lösung von *myo*-Inosit und 3 ml destill. Wasser. Dieses Gemisch wurde bei 28° inkubiert. Aliquote Anteile wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen und die Reaktion durch kurzzeitiges Kochen oder durch Zusatz von Perchlorsäure abgestoppt. Bei Verwendung des Extraktes aus auf Inosit gewachsenem *Schwanniomyces* wurde im Verlauf der Reaktion ein deutliches Ansteigen sowohl der orcin-positiven als auch der mit Naphthoresorcin reagierenden Substanzen⁴ beobachtet (Abb. 1). Eine gleichzeitige Reduktion von dem Reaktionsgemisch zugesetzten Pyridinnucleotiden (DPN und TPN) ließ sich nicht nachweisen. Die unter gleichen Bedingungen aus auf Glucose gewachsenem *Schwanniomyces* erhaltenen Extrakte bewirkten keine Bildung von orcin- oder naphthoresorcin-positiven Substanzen aus Inosit.

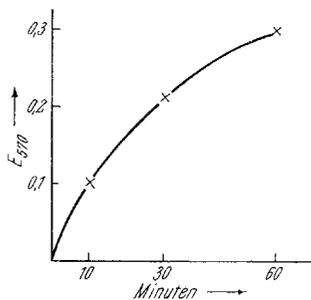


Abb. 1. Zeitliche Abhängigkeit der Bildung einer naphthoresorcin-positiven Substanz aus *myo*-Inosit unter Einfluß des Zellextrakts

Um das aus Inosit entstehende Reaktionsprodukt näher zu charakterisieren, wurden zuerst weitere Farbreaktionen durchgeführt. Die Substanz ergab im Carbazol-Test nach *Dische*⁵ eine positive Reaktion. Unter den angegebenen Bedingungen ist diese Probe spezifisch für Uronsäuren. Es wurde auch ein gefärbter Komplex mit Anilinetat⁶ hergestellt; sein Absorptionsspektrum erwies sich als identisch mit demjenigen eines Komplexes, der unter denselben Bedingungen aus Glucuronsäure und Anilinetat entsteht. Auch bei Papierchromatographie des Reaktionsgemisches in verschiedenen Lösungsmittelsystemen wurden Flecke erhalten, welche dieselben R_F -Werte zeigen wie daneben mitlaufende Glucuronsäure und auch dieselben Reaktionen geben wie diese Substanz.

Frühere Studien über den Abbau von Inosit in verschiedenen Organismen haben ergeben, daß manche Bakterienarten Inosit primär mit Hilfe einer DPN-spezifischen Dehydrogenase zu Inosose (2-Keto-*myo*-inosit) oxydieren^{7, 8}, während in Rattenniere zwei Enzyme nachgewiesen werden konnten, die Inosit zu D-Glucuronsäure bzw. zu L-Glucuronsäure abbauen^{9, 10}.

⁴ W. Deichmann, J. Lab. clin. Med. **28**, 770 (1943).

⁵ Z. Dische, J. Biol. Chem. **183**, 489 (1950).

⁶ M. V. Tracey, Biochem. J. **47**, 433 (1950).

⁷ B. Magasanik und E. Chargaff, J. Biol. Chem. **174**, 173 (1948).

⁸ B. Magasanik, J. Biol. Chem. **205**, 1007, 1019 (1953).

⁹ F. C. Charalampous und C. Lyras, J. Biol. Chem. **228**, 1 (1957).

¹⁰ F. C. Charalampous, J. Biol. Chem. **234**, 220 (1959).

Weitere Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des Enzyms sowie zur eindeutigen Identifizierung des Reaktionsprodukts und zur Aufklärung seiner sterischen Konfiguration sind im Gange.

Wir danken Herrn Prof. Dr. *A. Lindner* für die Erlaubnis, den im Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie befindlichen Zellhomogenisator zu benutzen.