

## BILDUNG VON ERYTHRULOSE AUS HYDROXYPYRUVAT DURCH HEFEENZYMEN

HELMUT HOLZER UND HEINZ WERNER GOEDDE

*Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, Freiburg im Breisgau (Deutschland)*

(Eingegangen am 3. August, 1959)

---

### SUMMARY

#### *Formation of erythrulose from hydroxypyruvate by yeast enzymes*

1. Polyoldehydrogenase has been purified 96-fold from sheep liver. Pyruvate, hydroxypyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate, acetaldehyde and glycolaldehyde are not reduced with DPNH by this preparation. Triose phosphate is reduced very slowly. Since erythrulose is reduced rapidly and completely, this ketose may be estimated spectrophotometrically by means of its DPNH consumption without the interference of the above mentioned carbonyl compounds.

2. On the incubation of hydroxypyruvate with purified pyruvate decarboxylase from yeast, decarboxylation to glycolaldehyde takes place without the simultaneous formation of erythrulose. Glycolaldehyde was estimated and distinguished from erythrulose spectrophotometrically with alcohol dehydrogenase and DPNH. Moreover glycolaldehyde has been characterized by specific colour reactions and paper chromatography of the *o*-nitrophenylhydrazones as well as of the free compounds.

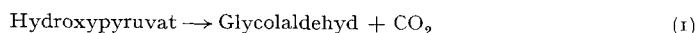
3. On the incubation of hydroxypyruvate with pyruvate decarboxylase and transketolase, erythrulose is formed in addition to glycolaldehyde. The amounts of either compound depend upon the ratio of the concentrations of the two enzymes.

4. The formation of erythrulose from hydroxypyruvate may be of biological importance in tissues containing hydroxypyruvate-forming enzymes, pyruvate decarboxylase and transketolase.

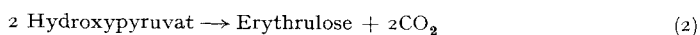
---

### EINFÜHRUNG

1955 beschrieben wir<sup>1</sup> die Decarboxylierung von Hydroxypyruvat durch gereinigte Pyruvatdecarboxylase aus Hefe nach der Gleichung



1956 berichteten DICKENS UND WILLIAMSON<sup>2</sup> über die Bildung von Erythrulose aus Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase aus Hefe nach der Gleichung

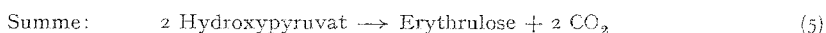
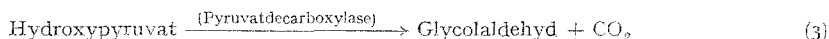


---

Es werden folgende Abkürzungen verwendet: DPN, Diphosphopyridinnucleotid; DPNH, hydriertes Diphosphopyridinnucleotid; HOBTs, Hydroxypyruvat; ADH, Alkoholdehydrogenase; MDH, Milchsäuredehydrogenase; Trispuffer, Trishydroxymethylaminomethanpuffer.

Freier Glycolaldehyd als möglicherweise auftretendes Zwischenprodukt der Reaktion konnte von DICKENS UND WILLIAMSON<sup>2</sup> nicht nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit wurde unternommen, um das Zustandekommen dieser gegensätzlichen Befunde zu klären. Wir gingen bei unseren Versuchen von der Arbeitshypothese aus, dass die unter (2) angegebene Reaktion durch Zusammenwirken der Enzyme Pyruvatdecarboxylase und Transketolase nach folgenden Gleichungen verläuft:



Durch die im folgenden dargestellten Versuche mit gereinigter Pyruvatdecarboxylase und kristallisierter Transketolase aus Hefe wurde diese Arbeitshypothese bestätigt.

Nach Abschluss unserer Experimente sahen wir eine Arbeit<sup>3</sup>, in der DICKENS Daten über die Verunreinigung seiner Carboxylase-Präparationen mit Transketolase mitteilt. Aufgrund dieser Daten zieht nun auch DICKENS eine Beteiligung von Transketolase an der Erythrulose-Bildung aus Hydroxypyruvat mit Hefe-Pyruvatdecarboxylase in Betracht.

#### METHODEN UND PRÄPARATE

##### *Darstellung von L-Erythrulose*

Erythrulose wurde durch aerobe Vergärung von meso-Erythrit mit Sorbose-Bakterien nach BERTRAND<sup>4</sup> gewonnen\*. Nach dem Verfahren von MÜLLER und Mitarbeiter<sup>5</sup> wurde Erythrulose aus dem Gäransatz als *o*-Nitrophenylhydrazon gefällt. Nach Umkristallisieren aus absolutem Äthanol betrug der Schmelzpunkt 151°C und die spezifische Drehung in absolutem Äthanol bei 20°C + 47.4° (Konzentration 10 mg/ml) in Übereinstimmung mit früheren Angaben anderer Autoren<sup>2,5</sup>. Freie Erythrulose wurde durch Zerlegung des *o*-Nitrophenylhydrazons mit Benzaldehyd nach den Angaben von MÜLLER und Mitarbeiter<sup>5</sup> als Sirup erhalten. Die spezifische Drehung betrug + 11.1° (Messungen mit 23 bzw. 101 mg/ml; Temperatur 20° C); nach MÜLLER und Mitarbeiter beträgt die Drehung + 11.4°.

##### *Enzymatisch-optische Bestimmung von Erythrulose mit Polyoldehydrogenase*

*Vorkommen von Polyoldehydrogenase:* In Tabelle I ist die Aktivität von Extrakten aus Leber verschiedener Tiere und von Bullen-Samenblasen bei der Reduktion von Fructose mit DPNH wiedergegeben. Man sieht aus der Tabelle, dass ein Extrakt aus Hammelleber die höchste Aktivität pro Milliliter und die höchste spezifische Aktivität des Enzyms enthält. Wir haben deshalb Hammelleber als Ausgangsmaterial für die Präparation des Enzyms benutzt. Dem Vorschlag einiger früherer Bearbeiter<sup>6-9</sup> des Enzyms folgend, bezeichnen wir in der vorliegenden Arbeit das Enzym als "Polyoldehydrogenase".

*Reinigung und Charakterisierung der Polyoldehydrogenase aus Hammelleber:* Da die bisher beschriebenen angereicherten Polyoldehydrogenase-Präparate nicht ge-

\* Der Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach/Baden, insbesondere Herrn Dr. COUTELLE, danken wir für die Durchführung des Gäransatzes.

TABELLE I

## POLYOLDEHYDROGENASE IN ORGANEN VERSCHIEDENER TIERE

Es wurden Extrakte aus Acetontrockenpulver getestet (Herstellung siehe METHODEN UND PRÄPARATE). Definition der Aktivitätseinheiten siehe METHODEN UND PRÄPARATE. Ansätze zum optischen Test: 0.066 *M* Triäthanolaminpuffer, pH, 7.4; 0.5 mg DPNH; 0.016 *M* Fructose; 0.04 ml Extrakt; *d*, 1 cm, Gesamtvolumen, 3 ml, Wellenlänge, 366 m $\mu$ .

	Aktivitätseinheiten/ml Rohextrakt	mg Protein/ml Rohextrakt	Spezifische Aktivität
Ratte (Leber)	360	21.0	17.1
Rind (Leber)	415	17.0	24.4
Pferd (Leber)	575	22.1	26.0
Schwein (Leber)	590	21.0	28.0
Hammel (Leber)	970	17.3	49.0
Taube (Leber)	75	20.2	3.68
Bulle (Samenblasen)	200	19.0	10.5

nügend rein und aktiv waren, um eine einigermassen spezifisch und nicht zu trüg ablaufende Bestimmung von Erythrulose durchzuführen, haben wir das Anreicherungsverfahren von WILLIAMS-ASHMAN UND BANKS<sup>10</sup> weiter ausgebaut. Wir erhielten (allerdings mit geringer Ausbeute) eine 96fache Anreicherung des Enzyms (vgl. Tabelle II). Das derart gereinigte Enzym ist für die im folgenden beschriebene enzymatisch-optische Bestimmung von L-Erythrulose geeignet.

Im einzelnen erfolgte die Aufarbeitung der Hammellebern folgendermassen (vgl. Tabelle II): Frische Hammellebern wurden mit dem 20fachen Volumen an kaltem Aceton ( $-15^{\circ}$ ) im Starmix zerkleinert, auf der Nutsche abgesaugt, noch einmal mit Aceton im Starmix durchgerührt und nach Absaugen 60 min auf Filtrierpapier an der Luft (Zimmertemperatur) getrocknet. Das Acetontrockenpulver hält sich *ca.* 4 Wochen ohne nennenswerten Aktivitätsverlust im Kühlraum.

50 g Acetontrockenpulver wurden mit 500 ml destilliertem Wasser extrahiert,

TABELLE II

## ANREICHERUNG DER POLYOLDEHYDROGENASE AUS HAMMELEBER

(Definition der Aktivitätseinheiten siehe METHODEN UND PRÄPARATE) Ansätze zum optischen Test: 0.066 *M* Triäthanolaminpuffer, pH, 7.4; 0.5 mg DPNH; 0.16 *M* Fructose; *d*, 1 cm, Gesamtvolumen, 3 ml, Wellenlänge, 366 m $\mu$ .

Reinigungsstufe	Spezifische Aktivität (Einheiten/mg Protein)	Ausbeute bezogen auf Rohextrakt in %
Rohextrakt aus Acetontrockenpulver	$2.9 \cdot 10^2$	100
Säurefällung*	$2.3 \cdot 10^2$	67
Äthanol-fällung	$7.2 \cdot 10^2$	42
Acetonfällung	$8.2 \cdot 10^2$	30.5
Al-Cy-Gel	$23.6 \cdot 10^2$	27.6
DEAE-SF-Cellulose	$78 \cdot 10^2$	23.4
Äthanol-fällung	$147 \cdot 10^2$	8.6
Ammonsulfatfällung	$278 \cdot 10^2$	7.9

\* Bei diesem Schritt werden gefärbte Proteide und der Hauptteil der Alkoholdehydrogenase entfernt.

indem 10 min im Mörser bei Zimmertemperatur zerrieben und dann weitere 30 min mechanisch gerührt wurde. Wir zentrifugierten 30 min bei  $27,000 \times g$  und  $0^\circ$ . Im klaren Überstand wurde mit 1 *N* Essigsäure pH 4.65 eingestellt, hierauf 20 min bei  $27,000 \times g$  (Temperatur,  $0^\circ$ ) zentrifugiert und im Überstand mit 1 *N*  $\text{NH}_4\text{OH}$  pH 7.8 eingestellt. Nun wurde wieder 20 min bei  $27,000 \times g$  zentrifugiert (Temperatur =  $0^\circ$ ) und dem Überstand bei  $-15^\circ$  langsam absolutes Äthanol bis zu einem Gehalt von 45 % (v/v) zugefügt. Dann wurde 20 min bei  $27,000 \times g$  zentrifugiert (Temperatur,  $0^\circ$ ) und der Äthanolgehalt des Überstandes langsam bei  $-15^\circ$  auf 55 % (v/v) erhöht. Nach dem Zentrifugieren (20 min bei  $27,000 \times g$ ; Temperatur =  $0^\circ$ ) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in soviel 0.01 *M* Phosphatpuffer pH 7.4, gelöst, dass eine Proteinkonzentration von 10 bis 15 mg/ml vorlag. Bei  $-15^\circ$  wurde nun dasselbe Volumen Aceton zugegeben. Nach Abzentrifugieren bei  $27,000 \times g$  (Temperatur =  $0^\circ$ ) liess sich das Sediment im Exsikkator bei  $-20^\circ$  ohne wesentlichen Verlust an Aktivität über Nacht aufbewahren.

Am nächsten Tag wurde das Sediment in 45 ml 0.01 *M* Phosphatpuffer, pH 7.4, aufgenommen und klar zentrifugiert. Der Überstand enthielt etwa 20 mg Protein pro Milliliter. Dazu wurde das doppelte Volumen eines ca. 6 Monate alten Al-Cy-Gels<sup>11</sup> mit 20 mg Trockengewicht pro Milliliter gegeben. Nach 15 min Rühren wurde 30 min bei  $27,000 \times g$  (Temperatur,  $0^\circ$ ) zentrifugiert. Der Überstand (ca. 120 ml) wurde auf eine mit 20 g DEAE-SF-Cellulosepulver der Firma Serva (Nr. 1709 58; 0.4 mÄquivalente/g) beschickte Säule (7 cm  $\times$  2 cm) gegeben, welche vorher mit 0.01 *M* Phosphatpuffer, pH 7.4, behandelt worden war. Dann wurde weiter 0.01 *M* Phosphatpuffer, pH 7.4, auf die Säule gegeben und 15-ml Fraktionen aufgefangen. Die die Aktivität enthaltenden Fraktionen (meist die 3. bis 10. Fraktion) wurden vereinigt. Die Enzymlösung wurde bei  $-16^\circ$  mit Äthanol bis zu einer Endkonzentration von 55 % (v/v) versetzt. Nach dem Zentrifugieren (45 min bei  $27,000 \times g$ , Temperatur,  $0^\circ$ ) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in wenig 0.01 *M* Trishydroxymethylaminomethanpuffer, pH 7.4, aufgenommen und durch Zugabe von fein pulverisiertem Ammonsulfat zu 40 % gesättigt. Eine geringe Trübung wurde abzentrifugiert. Nun wurde die Ammonsulfatsättigung im Überstand auf 60 % erhöht. Dabei trat starker Seidenglanz auf. Nun wurde bei  $27,000 \times g$  45 min zentrifugiert (Temperatur,  $0^\circ$ ) und das Sediment in wenig 0.01 *M* Trispuffer, pH 7.4, aufgenommen. Dieses Präparat ist bei  $-20^\circ$  mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust haltbar.

Derart gereinigte Polyoldehydrogenase reduzierte Fructose und Erythrulose (Endkonzentration 0.01 *M*) nur mit DPNH, nicht mit TPNH. Weder nach Cystein-zusatz (Endkonzentration 0.001 *M*) noch nach Zusatz von Magnesiumchlorid (Endkonzentration 0.005 *M*) beobachteten wir eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit (vgl. hierzu HICKMAN UND ASHWELL<sup>12</sup>). Unser Präparat reduzierte mit DPNH und 0.01 *M* Substratkonzentration folgende Verbindungen nicht: Pyruvat, Hydroxypyruvat,  $\alpha$ -Ketoglutarat (auch bei Gegenwart von  $\text{NH}_4^+$ -Ionen), Acetaldehyd und Glycolaldehyd. Ein Gemisch von Phosphoglycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat wurde mit etwa 3 % der Geschwindigkeit von 0.01 *M* Erythrulose reduziert. Das Enzym eignet sich demnach zur enzymatisch-optischen Bestimmung von Erythrulose ohne Störung durch Glycolaldehyd, Hydroxypyruvat, Pyruvat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Acetaldehyd.

*Bestimmung von Erythrulose neben Glycolaldehyd und Hydroxypyruvat:* Die

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Polyoldehydrogenase mit L-Erythrose einerseits und Fructose andererseits als Funktion der Substratkonzentration ist nach dem Verfahren von LINEWEAVER UND BURK<sup>13</sup> in Fig. 1 wiedergegeben. Als Michaeliskonstanten ergaben sich für Erythrose  $2.5 \cdot 10^{-2}$  Mole/l, für Fructose 25 bis  $30 \cdot 10^{-2}$  Mole/l. Die Affinität des Enzyms zu Erythrose ist demnach eine Zehnerpotenz grösser als zu Fructose, jedoch immer noch recht gering. Für eine quantitative Erfassung von Erythrose müssen deshalb hohe Konzentrationen des Enzyms eingesetzt werden, um in kurzer Zeit einen vollständigen Reaktionsablauf zu erhalten. Die Reinheit des Enzyms muss gross sein, damit keine Nebenreaktionen erfolgen. Mit dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Enzympräparat sind diese Voraussetzungen gegeben. In Fig. 2 ist ein Beispiel für die Bestimmung von Erythrose neben Hydroxypyruvat und Glycolaldehyd wiedergegeben. Zwar reagiert unser Polyoldehydrogenase-Präparat nicht mit Hydroxypyruvat und Glycolaldehyd, sicherheitshalber wurden aber diese beiden Substanzen bei unseren Routinetesten vor der Erythrose bestimmt: Hydroxypyruvat mit kristallisierter Milchsäuredehydrogenase aus Kaninchenmuskel und Glycolaldehyd mit kristallisierter Alkoholdehydrogenase aus Hefe wie früher angegeben<sup>1</sup>.

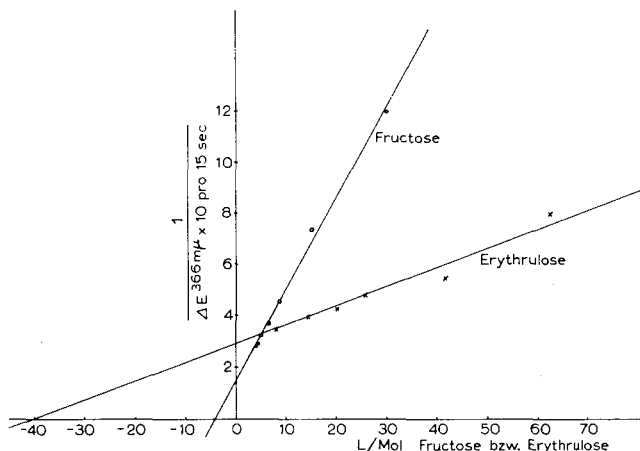


Fig. 1. Michaeliskonstanten für Fructose und Erythrose bei der Umsetzung an Polyoldehydrogenase mit DPNH. Auswertung nach LINEWEAVER UND BURK<sup>13</sup>. Zusammensetzung des Testsystems wie in Tabelle II beschrieben.

#### *Inkubation von Hydroxypyruvat mit verschiedenen Enzympräparationen*

Alle Ansätze wurden bei 28–30° in Citratpuffer, pH 6.8, (Endkonzentration 0.1 M) bzw. in Trishydroxymethylaminomethanpuffer, pH 7.4, (Endkonzentration 0.05 M) durchgeführt, Inkubationszeit 5 Stunden. Die Proben wurden 5 min bei 80° erhitzt, nach dem Abkühlen 3 min bei  $2000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand mit dem enzymatisch-optischen Test bzw. durch Papierchromatographie analysiert.

#### *Angaben über die verwendeten Enzyme und Präparate*

Pyruvatdecarboxylase wurde aus getrockneter Bierhefe der Ganter-Brauerei (Freiburg im Breisgau) nach einem früher angegebenen Verfahren<sup>15</sup> gereinigt. Kristallisierte Alkoholdehydrogenase wurde aus getrockneter Bäckerhefe der Sinner AG. (Karlsruhe) nach RACKER<sup>16</sup> präpariert. Kristallisierte Transketolase präparierte

Herr Dr. BUSCH in unserem Institut nach den Angaben von SRERE und Mitarbeiter<sup>17</sup> aus getrockneter Bäckerhefe. Kristallisierte Milchsäuredehydrogenase aus Kaninchenmuskeln wurde von der Firma Boehringer (Mannheim) bezogen, ebenso Triosephosphatisomerase und  $\alpha$ -Glycerophosphatdehydrogenase. Weiter lieferte Boehringer 85 %iges DPN und ca. 78 %iges enzymatisch reduziertes DPNH. Phosphoriboseisomerase und Phosphoketopentosepimerase ("Isomerasegemisch") wurden aus Bäckerhefe nach TABACHNIK und Mitarbeiter<sup>18</sup> hergestellt. Macerationssaft wurde nach der Vorschrift von LEBEDEV<sup>19</sup> aus getrockneter Bierhefe der Ganter-Brauerei (Freiburg) bereitet; Macerationssaft aus getrockneter Bäckerhefe der Sinner AG. (Karlsruhe) gewannen wir nach der Vorschrift von RACKER<sup>16</sup>.

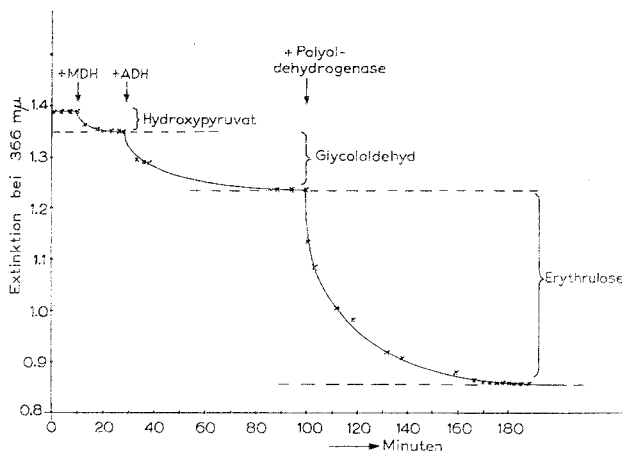


Fig. 2. Enzymatische Bestimmung von Erythrulose neben Hydroxypyruvat und Glycolaldehyd. Ansatz zum Test: 0.1 M Triäthanolaminpuffer, pH 7.4; 0.3 mg DPNH; 0.015 ml der zu analysierenden Probe. Start mit 0.025 mg kristallisierter Milchsäuredehydrogenase. Nach Ablauf der Reaktion Start mit 0.12 mg kristallisierter Hefealkoholdehydrogenase und nach der Bestimmung des Glycolaldehyds Start mit 0.18 mg gereinigter Polyoldehydrogenase. Gesamtvolumen, 0.4 ml;  $d$ , 0.5 cm; Wellenlänge, 366 m $\mu$ . Als Extinktionskoeffizient für DPNH bei 366 m $\mu$  wurde der von HOHORST<sup>14</sup> angegebene Wert benutzt. Die durch Enzymzusatz bewirkten Extinktionsdifferenzen (mit denen die erhaltenen Ausschläge zu korrigieren sind) wurden durch nochmaligen Zusatz des Enzyms nach Reaktionsablauf ermittelt.

Hydroxypyruvat wurde nach SPRINSON UND CHARGAFF<sup>20</sup> hergestellt. Glycolaldehyd bezogen wir von den Firmen Light (England) und Fluka AG. (Buchs, SG Schweiz). Ebenso wurde Ribose-5-phosphat als Bariumsalz von der Fluka AG. geliefert. *o*-Nitrophenylhydrazin wurde aus *o*-Nitroanilin durch Diazotierung nach MÜLLER und Mitarbeiter<sup>5</sup> und BISCHLER<sup>21</sup> dargestellt. Thiaminpyrophosphat und 2,4-Dinitrophenylhydrazin bezogen wir von der Firma Merck (Darmstadt).

#### *Darstellung der o-Nitrophenylhydrazone als Vergleichssubstanzen für die Papierchromatographie*

Hydroxypyruvat, Glycolaldehyd bzw. Erythrulose wurden jeweils in wenig Methanol gelöst und in heissem Methanol gelöstes *o*-Nitrophenylhydrazin in geringem Überschuss zugefügt. Nach 10 min Erwärmen bei 80° fiel beim anschliessenden Abkühlen das *o*-Nitrophenylhydrazon aus. Es wurde abgesaugt, mit Methanol, dann mit Äther gewaschen, auf dem Tonteller abgepresst und aus absolutem Äthanol

umkristallisiert. Der Schmelzpunkt des *o*-Nitrophenylhydrazons von Glycolaldehyd betrug 116–117°, der des *o*-Nitrophenylhydrazons von Erythrulose 151°. Zur Gewinnung der *o*-Nitrophenylhydrazone aus den enzymatischen Ansätzen wurden diese durch Erwärmen auf 80° enteweisst, mit einem Überschuss von *o*-Nitrophenylhydrazin versetzt und 40 min bei 60° erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde abgesaugt und wie oben beschrieben, gewaschen und umkristallisiert. Zur Chromatographie nach MEIGH<sup>22</sup> wurden die *o*-Nitrophenylhydrazone in wenig 96 %igem Äthanol gelöst und auf das Papier aufgetragen.

*Definition der in dieser Arbeit benutzten Enzymaktivitätseinheiten*

Als 1 Einheit wird eine Änderung der Extinktion um 0.001/min bei 366 m $\mu$  im optischen Test mit DPNH bei einem Gesamtvolumen des Testansatzes von 3.0 ml und einer Schichtdicke von 1 cm bezeichnet. Die Temperatur war 18–22°. Beim Test der Pyruvatdecarboxylase wurde mit 0.12 M Citratpuffer, pH 6.0, gearbeitet, die Pyruvatkonzentration war 0.025 M. Transketolase wurde im Prinzip nach DE LA HABA und Mitarbeitern<sup>23</sup> in 0.05 M Trishydroxymethylaminomethanpuffer, pH 7.6, getestet. Der Ansatz enthielt 8.2  $\mu$ Mole Ribose-5-phosphat, 9  $\mu$ Mole Magnesiumchlorid, 0.12  $\mu$ Mol Thiaminpyrophosphat, 0.6 mg reduziertes Diphosphopyridinnucleotid und folgende Hilfsenzyme: Triosephosphatisomerase,  $\alpha$ -Glycerophosphatdehydrogenase, Phosphoriboseisomerase + Phosphoketopentoepimerase ("Isomerasegemisch").

ERGEBNISSE

*Pyruvatdecarboxylase decarboxyliert Hydroxypyruvat zu Glycolaldehyd ohne gleichzeitige Entstehung von Erythrulose*

Zum qualitativen Nachweis von Glycolaldehyd neben Erythrulose in Ansätzen mit Hydroxypyruvat und Pyruvatdecarboxylase benutzten wir fuchsin-schweflige Säure (0.1 % Fuchsin in heissem Wasser gelöst und mit SO<sub>2</sub> bis zur Entfärbung begast). Durch Zusammenbringen desselben Volumens Fuchsin-schwefligsäure-Reagenz und Probe konnte Glycolaldehyd in Konzentrationen bis herunter zu 2 · 10<sup>-3</sup> Mol/l nachgewiesen werden. Erythrulose in Konzentrationen bis 1 Mol/l ergab keine Farbreaktion. Ansätze von Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase ergaben nach Enteissen durch Erhitzen und Versetzen mit dem Reagenz eine starke Farbreaktion. Auswertung der Farbintensität von Verdünnungsreihen ergab Glycolaldehydkonzentrationen der Grössenordnung, wie sie aufgrund der enzymatisch-optischen Bestimmung von Glycolaldehyd mit Hefealkoholdehydrogenase (vgl. Tabelle IV) zu erwarten waren.

Nach DICKENS UND WILLIAMSON<sup>24</sup> ergibt Glycolaldehyd mit Naphtoresorcin in stark schwefelsaurem Milieu bereits in der Kälte eine grün-gelbe Färbung. Erythrulose reagiert unseren Messungen zufolge unter diesen Bedingungen nicht. Ansätze von Hydroxypyruvat mit reiner Pyruvatdecarboxylase ergaben eine positive Naphtoresorcinreaktion. Wie beim Test mit fuchsin-schwefliger Säure ergab eine halbquantitative Auswertung der Farbintensität Glycolaldehydkonzentrationen in der Grössenordnung der im optischen Test mit Alkoholdehydrogenase erhaltenen Konzentrationen.

Zur weiteren Identifizierung des Reaktionsproduktes beim Umsatz von Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase wurden die durch Erhitzen auf 80° enteissenen

Ansätze entweder direkt oder nach Überführung der darin enthaltenen Carbonylverbindungen in *o*-Nitrophenylhydrazone bzw. 2,4-Dinitrophenylhydrazone nach MEIGH<sup>22</sup> papierchromatographiert. In Tabelle III sind die  $R_F$ -Werte der bei der Chromatographie erhaltenen Flecke wiedergegeben. Man sieht aus Tabelle III, dass nach Umsatz von Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase allein Glycolaldehyd bzw. sein *o*-Nitrophenylhydrazon nachweisbar ist, während in Ansätzen mit rohem Macerationssaft aus Bierhefe als Enzymquelle vorwiegend Erythrulose bzw. ihr *o*-Nitrophenylhydrazon gefunden wird. Auf die Ergebnisse mit Macerationssaft werden wir im nächsten Abschnitt zurückkommen; hier sei festgehalten, dass mit reiner Pyruvatdecarboxylase im Einklang mit den vorstehend mitgeteilten Farbreaktionen allein Glycolaldehyd als Reaktionsprodukt aufgefunden wurde. Unsere früheren papierchromatographischen Versuche mit den 2,4-Dinitrophenylhydrazonen<sup>1</sup> waren für eine Unterscheidung von Glycolaldehyd und Erythrulose nicht geeignet, da die Dinitrophenylhydrazone dieser Verbindungen nicht getrennt werden (vgl. Tabelle III).

TABELLE III

$R_F$ -WERTE VON GLYCOLALDEHYD, ERYTHRULOSE UND HYDROXYPYRUVAT, SOWIE IHRER *o*-NITROPHENYLHYDRAZONE UND 2,4-DINITROPHENYLHYDRAZONE

Absteigende Chromatographie; mobile Phase: mit Heptan gesättigtes Methanol<sup>22</sup>; Papier: Schleicher und Schüll 2043 b Mgl. Die Phenylhydrazone wurden durch ihre gelbe Farbe erkannt. Die freien Carbonylverbindungen wurden durch Besprühen mit einer gesättigten Lösung von *m*-Phenylendiamin in absolutem Äthanol und 10 min Erhitzen auf 110° sichtbar gemacht.

	$R_F$ -Werte der unbehandelten Substanzen bzw. Inkubationsansätze	$R_F$ -Werte nach Überführung in <i>o</i> -Nitrophenylhydrazone	$R_F$ -Werte nach Überführung in 2,4-Dinitrophenylhydrazone
Glycolaldehyd (authentische Probe)	0.83	0.77	0.66
Erythrulose (authentische Probe)	0.72	0.69	0.66
Hydroxypyruvat (authentische Probe)	0.57	0.62	0.46
Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase inkubiert	0.83	0.77	---
Hydroxypyruvat mit Macerationssaft aus Bierhefe inkubiert	0.72	0.69	---

In unserer früheren Arbeit wiesen wir Glycolaldehyd durch quantitative Reduktion mit DPNH an kristallisierter Alkoholdehydrogenase aus Hefe nach. Wir prüften nun, ob auch Erythrulose unter diesen Bedingungen reduziert wird. In einem Ansatz mit 0.22 *M* Citratpuffer, pH 6.0, 0.6 mg DPNH und einer Endkonzentration von  $0.56 \cdot 10^{-2}$  *M* Erythrulose nach Zusatz von 0.3 mg kristallisierter Hefe-Alkoholdehydrogenase wurde kein Verschwinden von DPNH beobachtet (Gesamtvolumen 3.0 ml Schichtdicke 1 cm; Wellenlänge 366 m $\mu$ ). Wurden dem Ansatz 0.5  $\mu$ Mol Glycolaldehyd zugesetzt, so fand rasche und quantitative Hydrierung des Glycolaldehyds unter Verbrauch von DPNH statt. Der in unserer früheren Arbeit beschriebene Verbrauch von DPNH nach Zusatz von Hefealkoholdehydrogenase zu Ansätzen mit Hydroxypyruvat und Pyruvatdecarboxylase kann demnach nicht auf die Bildung von Erythrulose zurückgeführt werden.

In Fig. 3 ist ein Versuch wiedergegeben, der zeigt, dass die beim Umsatz von Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase entstehende Substanz quantitativ mit DPNH und Alkoholdehydrogenase aus Hefe reduziert wird. Kurve 1 wurde mit einer



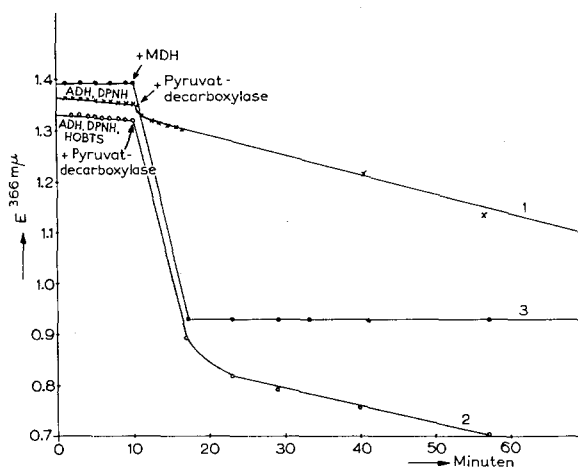


Fig. 3. Quantitativer Umsatz von Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase zu einer Verbindung, die mit Alkoholdehydrogenase und DPNH reduziert wird. Ansätze zum optischen Test: 0.22 M Citratpuffer, pH 6.0 (Versuche 1 und 2), bzw. 0.133 M Trishydroxymethylaminomethanpuffer, pH 8.0 (Versuch 3); 1 mg DPNH; 0.43  $\mu$ Mol Hydroxypyruvat; 0.6 mg kristallisierte Alkoholdehydrogenase bzw. 0.05 mg kristallisierte Milchsäuredehydrogenase. Gesamtvolumen: 3.0 ml;  $d$ , 1 cm; Wellenlänge, 366 m $\mu$ .

Kontrollküvette erhalten, in der Alkoholdehydrogenase, DPNH und Pyruvatdecarboxylase, jedoch kein Hydroxypyruvat enthalten war. Kurve 2 gibt denselben Versuch mit Zusatz von Hydroxypyruvat wieder. Als Differenz aus den Kurven 1 und 2 errechnet man einen Verbrauch von 0.416  $\mu$ Mol DPNH, der durch den Umsatz von Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase bewirkt wurde. Kurve 3 gibt die Austestung des eingesetzten Hydroxypyruvats mit DPNH und kristallisierter Milchsäuredehydrogenase aus Kaninchenmuskel wieder. Aus der DPNH-Abnahme berechnet man 0.42  $\mu$ Mol Hydroxypyruvat im Ansatz. Da der DPNH-Verbrauch im Versuch mit Pyruvatdecarboxylase ebenso gross war wie der DPNH-Verbrauch durch Reduktion von Hydroxypyruvat mit Milchsäuredehydrogenase, beweist dieser Versuch, dass beim Umsatz von Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase in stöchiometrischer Menge zum Hydroxypyruvat eine Substanz entsteht, die mit DPNH an Alkoholdehydrogenase reduziert wird. Da Erythrulose nicht mit DPNH an Alkoholdehydrogenase reduziert wird, kann es sich nicht um diese Tetrose handeln. Den vorstehend mitgeteilten Versuchen zufolge kommt als Reaktionsprodukt nur Glycolaldehyd in Frage, sodass die früher von uns formulierte Gleichung (1) bestätigt ist.

#### *Entstehung von Erythrulose aus Hydroxypyruvat*

Im Kapitel METHODEN beschreiben wir einen enzymatisch-optischen Test für Erythrulose mit Polyoldehydrogenase aus Hammelleber. Das gereinigte Enzym reagiert nicht mit Hydroxypyruvat und Glycolaldehyd. Da Hydroxypyruvat mit DPNH und Milchsäuredehydrogenase aus Kaninchenmuskel und Glycolaldehyd mit Hefe-Alkoholdehydrogenase bestimmt werden kann, ist eine schnelle und spezifische Nebeneinanderbestimmung dieser 3 Substanzen im enzymatisch-optischen Test möglich (vgl. Fig. 2). Wir haben mit dieser Methode Ansätze von Hydroxypyruvat mit verschiedenen Enzympräparationen analysiert. Die Ergebnisse sind in

Tabelle IV wiedergegeben. Aus Versuch 1 sieht man, dass im Einklang mit den im vorherigen Abschnitt dargestellten Versuchsergebnissen bei Einsatz von reiner Pyruvatdecarboxylase nur Spuren von Erythrose neben viel Glycolaldehyd nachweisbar sind. Da mehr als 99 % des eingesetzten Hydroxypyruvats umgesetzt wurden, davon jedoch nur 57 Mol % als Glycolaldehyd und Erythrose aufgefunden wurden, sind 43 % des Hydroxypyruvats zu einer Substanz (oder zu Substanzen) verändert worden, die in unserem optischen Test nicht erfasst wird. Wir wissen noch nicht, um welche Substanzen es sich handelt. Setzt man als Enzymquelle Macerationssaft aus Bierhefe ein (Tabelle IV, Versuch 2), so entstehen neben Glycolaldehyd beträchtliche Mengen Erythrose. Wir nehmen an, dass die Entstehung von Erythrose auf das Zusammenwirken von Pyruvatdecarboxylase und Transketolase zurückzuführen ist, wie in den Gleichungen (3), (4) und (5) der Einleitung wiedergegeben wurde. Dafür spricht, dass ein Macerationssaft aus Bäckerhefe, der im Vergleich zum Macerationssaft aus Bierhefe wenig Pyruvatdecarboxylase und viel Transketolase enthält, die Entstehung von Erythrose auf Kosten von Glycolaldehyd noch mehr begünstigt (Tabelle IV, Versuch 3). In diesem Versuch wurden nur 67 % des eingesetzten Hydroxypyruvats umgesetzt, da die geringe Pyruvatdecarboxylase-Aktivität des Bäckerhefeextraktes nur einen langsamen Hydroxypyruvat-Umsatz ermöglicht. Die den Hydroxypyruvatumsatz einleitende und in seiner Geschwindigkeit begrenzende Reaktion ist demnach die Decarboxylierung zu Glycolaldehyd. Was mit dem so entstandenen Glycolaldehyd weiter geschieht, entscheidet die anwesende Transketolase. Ist keine Transketolase vorhanden (Versuchsreihe 1), so bleibt der Hauptteil des Glycolaldehyds liegen und der Rest wird zu Produkten weiter verändert, die wir

TABELLE IV

## UMSETZUNG VON HYDROXYPYRUVAT MIT VERSCHIEDENEN ENZYMPRÄPARATEN

Inkubation und Gewinnung der Proben wie unter METHODEN UND PRÄPARATE angegeben. Aktivitätseinheiten der Enzympräparate/mg Protein: gereinigte Pyruvatdecarboxylase ( $2.2 \cdot 10^4$ ), kristallisierte Transketolase ( $0.23 \cdot 10^4$ ), Bierhefe-Macerationssaft (Pyruvat-decarboxylase:  $0.24 \cdot 10^4$ ), Bäckerhefe-Macerationssaft (Pyruvat-decarboxylase:  $0.01 \cdot 10^4$ , Transketolase:  $0.004 \cdot 10^4$ ). Definition der Aktivitätseinheiten siehe METHODEN UND PRÄPARATE. Die Versuchsreihen 1-3 wurden in Citratpuffer, pH 6.8 (Endkonzentration 0.1 M), die Versuchsreihen 4-6 in Trishydroxymethylaminomethanpuffer, pH 7.4 (Endkonzentration 0.05 M), durchgeführt.

Versuchsreihe	Enzympräparat	Mol % (bezogen auf eingesetzte HORTS = 100 %)			
		Glycolaldehyd	Erythrose*	Glycolaldehyd + Erythrose	HORTS
1	Gereinigte Pyruvat-decarboxylase	55	2	57	0.2
2	Macerationssaft (Bierhefe)	13	84	97	1
3	Macerationssaft (Bäckerhefe)	2	64	66	33
4	Gereinigte Pyruvat-decarboxylase und kristallisierte Transketolase	16	86	102	3
5	Kristallisierte Transketolase	4	13	17	56
6	Kristallisierte Transketolase; Glycolaldehyd zugesetzt	—	90	—	3.5

\* Bei der Auswertung der Versuchsreihen 1-5 wurde je 1 Mol im Ansatz entstandener Erythrose mit einem Verbrauch von 2 Molen Hydroxypyruvat gleichgesetzt (vgl. Gleichung (2)). Beim Versuch 6 wurde je 1 Mol im Ansatz analysierter Erythrose mit einem Verbrauch von 1 Mol Hydroxypyruvat gleichgesetzt, da hier Glycolaldehyd im Überschuss zugesetzt worden war.

in unserem kombinierten enzymatisch-optischen Test nicht erfassen können. Liegt wenig Transketolase vor (Versuchsreihe 2), so entsteht Erythrulose neben Glycolaldehyd. Ist viel Transketolase vorhanden (Versuchsreihe 3), so entsteht vorwiegend Erythrulose; Glycolaldehyd ist nur in geringer Menge nachweisbar. Die Nebenreaktionen zu Produkten, die von unseren optischen Testen nicht erfasst werden, fallen bei Anwesenheit von Transketolase nur wenig ins Gewicht. Dies ist wohl so zu erklären, dass bei diesen Versuchen (Versuchsreihen 2, 3 und 4) Transketolase Glycolaldehyd rasch weiter umsetzt und damit den Nebenreaktionen entzieht.

Durch Zusatz von kristallisierter Transketolase zu gereinigter Pyruvatdecarboxylase (Versuchsreihe 4) können die Verhältnisse in Extrakten aus Bierhefe und Bäckerhefe initiiert werden. Da bei diesem Versuch reine Enzyme eingesetzt wurden, ist damit das Funktionieren der in den Gleichungen (3), (4) und (5) postulierten Reaktionsfolgen bewiesen.

Wie zu erwarten, entstehen bei Einsatz von reiner Transketolase nur geringe Mengen Glycolaldehyd und Erythrulose (Versuchsreihe 5). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Transketolase noch in geringem Masse mit Pyruvatdecarboxylase verunreinigt ist. DE LA HABA und Mitarbeiter<sup>23</sup> zeigten, dass Hydroxypyruvat an reiner Transketolase bei Gegenwart von zugesetztem Glycolaldehyd als Acceptoraldehyd umgesetzt wird. Im Einklang damit beobachtet man bei Inkubation von reiner Transketolase mit Hydroxypyruvat unter Zusatz von überschüssigem Glycolaldehyd (Versuchsreihe 6) fast vollständige Überführung von Hydroxypyruvat in Erythrulose.

#### DISKUSSION

Da für die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Überführung von Hydroxypyruvat in Erythrulose neben der universell verbreiteten Transketolase Pyruvatdecarboxylase benötigt wird, kann diese Reaktion nur in pyruvatdecarboxylasehaltigen Zellen, also in Pilzen, gewissen Bakterien und Pflanzen verifiziert sein. Ob die Reaktion in diesem Material in bedeutungsvollem Umfange stattfindet, dürfte massgebend von der stationären Hydroxypyruvat-Konzentration abhängen. VIRTANEN und Mitarbeiter<sup>25, 26</sup> wiesen in pflanzlichen Geweben Hydroxypyruvat nach. Auch wir<sup>27</sup> konnten in früheren Untersuchungen mit einem enzymatisch-optischen Test zeigen, dass Hydroxypyruvat in Gräser-Chlorenchloroplasten in einer Konzentration von etwa  $10^{-5}$  Mol/l vorliegt. Es ist demnach damit zu rechnen, dass in Hefen und höheren Pflanzen tatsächlich eine Erythrulose-Bildung aus Hydroxypyruvat stattfindet.

Möglichkeiten für die Synthese von Hexosen aus Erythrulose unter Beteiligung von Transketolase und Transaldolase wurden von DICKENS<sup>3</sup> diskutiert. Nach DICKENS ist demnach ein Übergang von Hydroxypyruvat in Hexosen in Betracht zu ziehen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Die 96fache Anreicherung von Polyoldehydrogenase aus Hammelleber wird beschrieben. Dieses Präparat reduziert mit DPNH folgende Verbindungen nicht: Pyruvat, Hydroxypyruvat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Acetaldehyd und Glycolaldehyd. Triosephosphat wird nur sehr langsam reduziert. Da Erythrulose rasch und vollständig

reduziert wird, kann diese Ketose enzymatisch-optisch ohne Störung durch die andern genannten Carbonylverbindungen aufgrund des DPNH-Verbrauches bestimmt werden.

2. Inkubiert man Hydroxypyruvat mit gereinigter Pyruvatdecarboxylase aus Hefe, so findet Decarboxylierung zu Glycolaldehyd ohne gleichzeitige Bildung von Erythrulose statt. Glycolaldehyd wird in diesen Ansätzen mit Farbreaktionen, durch enzymatisch-optische Bestimmung mit Alkoholdehydrogenase und durch Papierchromatographie der *o*-Nitrophenylhydrazone, sowie der freien Verbindungen nachgewiesen und von Erythrulose unterschieden.

3. Inkubiert man Hydroxypyruvat mit Pyruvatdecarboxylase und Transketolase, so entsteht neben Glycolaldehyd Erythrulose. Das Mengenverhältnis von Glycolaldehyd zu Erythrulose hängt vom Konzentrationsverhältnis der beiden Enzyme ab.

4. Die Bildung von Erythrulose aus Hydroxypyruvat kann in Geweben, die Hydroxypyruvat bildende Enzymsysteme, Pyruvatdecarboxylase und Transketolase enthalten, biologisch bedeutsam sein.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung unserer Arbeiten im Rahmen des Schwerpunktprogrammes Biochemie. Der Sinner AG (Karlsruhe) und der Ganter-Brauerei (Freiburg) danken wir für die kostenlose Überlassung von Bäckerhefe und Bierhefe.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> H. HOLZER, H. W. GOEDDE UND S. SCHNEIDER, *Biochem. Z.*, 327 (1955) 245.
- <sup>2</sup> F. DICKENS UND D. H. WILLIAMSON, *Nature*, 178 (1956) 1349.
- <sup>3</sup> F. DICKENS, *Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto, 1957*, Seite 102.
- <sup>4</sup> G. BERTRAND, *Compt. rend.*, 130 (1900) 1330; *Bl* (3) 23 (1900) 681; *Ann. chim. (Paris)*, (8) 3 (1904) 206.
- <sup>5</sup> H. MÜLLER, C. MONTIGEL UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 20 (1937) 1468.
- <sup>6</sup> J. McCORKINDALE UND N. L. EDSON, *Biochem. J.*, 57 (1954) 518.
- <sup>7</sup> A. C. ARCUS UND N. L. EDSON, *Biochem. J.*, 64 (1956) 385.
- <sup>8</sup> D. R. D. SHAW, *Biochem. J.*, 64 (1956) 394.
- <sup>9</sup> S. HOLLMANN UND O. TOUSTER, *J. Biol. Chem.*, 225 (1957) 87.
- <sup>10</sup> H. G. WILLIAMS-ASHMAN UND J. BANKS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 50 (1954) 513.
- <sup>11</sup> E. BAUER, in E. BAMANN UND K. MYRBÄCK, *Die Methoden der Fermentforschung*, Bd. 2, Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1941, p. 1449.
- <sup>12</sup> J. HICKMAN UND G. ASHWELL, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 758.
- <sup>13</sup> H. LINEWEAVER UND D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- <sup>14</sup> H. J. HOHORST, *Biochem. Z.*, 328 (1957) 509.
- <sup>15</sup> H. HOLZER, G. SCHULTZ, C. VILLAR-PALASI UND J. JÜNTGEN-SELL, *Biochem. Z.*, 327 (1956) 331.
- <sup>16</sup> E. RACKER, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 313.
- <sup>17</sup> P. SRERE, J. R. COOPER, M. TABACHNIK UND E. RACKER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 74 (1958) 295.
- <sup>18</sup> M. TABACHNIK, P. A. SRERE, J. COOPER UND E. RACKER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 74 (1958) 315.
- <sup>19</sup> A. V. LEBEDREW, *Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler's*, 73 (1911) 447.
- <sup>20</sup> D. B. SPRINSON UND E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 164 (1946) 424.
- <sup>21</sup> A. BISCHLER, *Ber. deut. chem. Ges.*, 22 (1889) 2801.
- <sup>22</sup> D. F. MEIGH, *Nature*, 170 (1952) 579.
- <sup>23</sup> G. DE LA HABA, I. G. LEDER UND E. RACKER, *J. Biol. Chem.*, 214 (1955) 409.
- <sup>24</sup> F. DICKENS UND D. H. WILLIAMSON, *Biochem. J.*, 68 (1958) 84.
- <sup>25</sup> A. I. VIRTANEN UND M. ALFTHAN, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 1720.
- <sup>26</sup> A. I. VIRTANEN UND M. ALFTHAN, *Acta Chem. Scand.*, 9 (1955) 188.
- <sup>27</sup> H. HOLZER UND A. HOLLDORF, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 292.