

Eine im Alkalischen wirksame Monophosphoesterase aus Hefe

Eine anscheinend bisher noch nicht beschriebene Phosphatase mit alkalischem Wirkungsoptimum konnte aus Hefe nach folgender Methodik freigesetzt, nachgewiesen und angereichert werden:

0,5 kg frische Anstellhefe der Ottagringer Brauerei AG., Wien XVI, wurde mit Chloroform verflüssigt und in 0,5 Liter Ammoniak suspendiert. Nach 17stündiger Autolyse wurde zentrifugiert, die Flüssigkeit verworfen und der Rückstand in 300 cm³ Wasser suspendiert. Diese Suspension wurde dann mit Essigsäure auf $p_H = 5,0$ gebracht und nach Zusatz von Toluol weitere 5 Stunden der Autolyse überlassen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde diesmal der Rückstand verworfen und die Lösung durch Zusatz von Ammoniak auf $p_H = 8,5$ gebracht. Ein gebildeter Niederschlag wurde abfiltriert, die Lösung neutralisiert und im Eisschrank aufbewahrt.

Diese Lösung zeigte nun eine überraschend starke Phosphatasewirkung gegenüber Natriumphenolphthaleinphosphat¹, eine ebenfalls starke Wirkung gegenüber Phenolphosphat und β -Glycerophosphat; hingegen ist die Spaltwirkung gegenüber α -Glycerophosphat und Hexosediphosphat vergleichsweise recht gering. Diese Verhältnisse und der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Spaltung der verschiedenen Substrate sind im Diagramm dargestellt. Es sei hier besonders auf die Substratabhängigkeit des p_H -Wirkungsoptimums des Ferments hingewiesen; dieses schwankt von $p_H = 8,5$ für Hexosediphosphat bis zu $p_H = 9,1$ für Phenolphthaleinphosphat. Eine Spaltung von Pyrophosphat konnte nur in ganz geringem Maße nachgewiesen werden.

Magnesiumionen sind in einem engen Konzentrationsbereich imstande, das Ferment in einem geringen

Ausmaße zu aktivieren; ihre Anwesenheit ist aber für die enzymatische Wirkung nicht erforderlich, wie Versuche mit Extrakten, die 48stündiger Dialyse gegen fließendes und destilliertes Wasser unterworfen waren, beweisen. Die optimale Konzentration an Mg-Ionen ist 10^{-2} -molar; in dieser Hinsicht verhält sich unser Enzympräparat gleich wie die von SCHÄFFNER und KRUMAY¹ untersuchten Fermente α -Glycerophosphatase und Pyrophosphatase.

Tabelle I

Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die alkalische Hefephosphatase; Substrat Na-Phenolphthaleinphosphat; Aktivierung durch optimale Konzentration von Magnesiumionen (10^{-2} -molar); $p_H = 9,2$ (0,1-mol. Ammoniak-Ammonchloridpuffer nach MICHAELIS); 30°.

Hemmstoff	Prozentuale Hemmung bei verschiedener molekularer Konzentration der Hemmstoffe im Versuchsansatz		
	$4 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$
Natriumcyanid . . .	100	100	36
Natriumfluorid . . .	—	20	7
Natriumjodacetat . .	9	3	0
Cysteinchlorhydrat .	—	100	8

Die Wirkung von Hemmstoffen auf die enzymatische Aktivität unseres Fermentextrakts wird in Tabelle I verdeutlicht.

Verschiedene Chinone zeigen ähnlich wie bei den bisher von uns untersuchten Phosphomonoesterasen pflanzlichen und tierischen Ursprungs² eine Hemmwirkung; Natriumsulfid aktiviert hingegen. Anorganisches Phosphat hemmt den Spaltprozeß, was bei Annahme des katalysierten Vorgangs als Gleichgewichtsreaktion unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetzes leicht verständlich ist.

Die beschriebenen Extrakte sind sehr thermolabil; sie können aber im Kühlschrank längere Zeit ohne Aktivitätseinbuße aufbewahrt werden. Bei Aufbewahrung auf Eis zeigt sich nach einigen Tagen eine starke Proteinasewirkung, was nicht verwunderlich ist, da unsere Aufarbeitung sich im wesentlichen mit der Bereitung einer Hefeproteinase von GRASSMANN³ deckt. Eine Trennung der Phosphatase von der Proteinase ist bisher noch nicht geglückt.

Es sei darauf hingewiesen, daß Phosphomonoesterasen mit einem so stark alkalischen Wirkungsoptimum bisher nur in tierischen Geweben nachgewiesen werden konnten.

Eine genaue Beschreibung der durchgeführten Versuche wird an anderer Stelle erscheinen.

O. HOFFMANN-OSTENHOF, H. MOSER und E. PUTZ

1. Chemisches Laboratorium der Universität Wien, den 26. Mai 1948.

Summary

The authors describe a monophosphoesterase isolated from yeast which acts strongly on sodium phenolphthaleinphosphate, phenolphosphate, and β -glycerophosphate in an alkaline medium (p_H 8,5–9,1). The enzyme does not need magnesium ions for its activity.

¹ C. HUGGINS und P. TALALAY, J. Biol. Chem. 159, 399 (1945).

² H. und E. ALBERS, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 235, 47 (1935).

³ A. SCHÄFFNER und F. KRUMAY, Biochem. Z. 255, 145 (1938).

⁴ O. HOFFMANN-OSTENHOF und E. PUTZ, Mh. Chem. (im Druck).

⁵ A. GRASSMANN, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 179, 41 (1928).

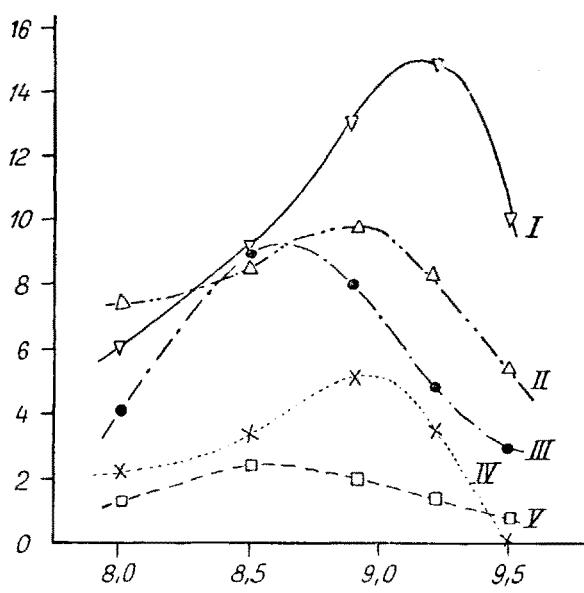


Abb. 1. Abhängigkeit der Spaltung verschiedener Substrate vom p_H bei optimaler Mg-Ionenkonzentration. Abszisse: p_H ; Ordinate: Phosphataseeinheiten nach H. und E. ALBERS².

I: Natriumphenolphthaleinphosphat; II: Natriumphenolphosphate; III: β -Glycerophosphat; IV: α -Glycerophosphat; V: Hexosediphosphat.