

Zur Kenntnis des Phosphatstoffwechsels der Hefe.

I. Quantitative Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Phosphatfraktionen unter bestimmten Stoffwechselbedingungen¹.

Von

O. Hoffmann-Ostenhof, A. Klima †, J. Kenedy^{1a} und K. Keck².

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 6 Abbildungen.

(*Eingelangt am 14. Mai 1955.*)

Zur Prüfung der von uns seinerzeit entwickelten Arbeitshypothese, daß das polymere Metaphosphat in der Hefe die Funktion eines Phosphatspeichers, eines sogenannten Phosphagens, spielt, wurden die Veränderungen der Konzentrationen von Metaphosphat und einigen anderen phosphathaltigen Fraktionen der Hefe während der Phosphataufnahme in einer Phosphat enthaltenden Glucoselösung („Anreicherung“) und während der Phosphatverarmung in einer Lösung von Ammoniumsulfat quantitativ verfolgt. Weiters wurde die Menge Glucose bestimmt, welche unter den Bedingungen der anaeroben „Anreicherung“ vergoren wird. Es wurde errechnet, daß von der theoretisch zu erwartenden Menge Phosphats, das bei der Gärung aus der Orthophosphatform in Bindung überführt wird, nur ein ganz geringer Anteil (wenig mehr als 1%) als Metaphosphat auftritt. Damit muß die Vorstellung, daß das polymere Metaphosphat eine wesentliche Funktion als Phosphatspeicher der Hefe einnimmt, als widerlegt betrachtet werden.

¹ Der Inhalt dieser und der folgenden Mitteilung wurde in gekürzter Form von einem von uns (*O. H.-O.*) am VIII. Allsowjetischen Kongreß für Physiologie, Biochemie und Pharmakologie in Kiew (Mai 1955) vorgetragen.

^{1a} Derzeitige Adresse: Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences de l’Université, Paris, Frankreich.

² Derzeitige Adresse: Institute of Zoology, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, U. S. A.

Einleitung.

Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) enthält je nach den Kulturbedingungen verschiedene Mengen Metaphosphat, deren Bildung nur dann erfolgt, wenn gleichzeitig energieliefernde Vorgänge ablaufen³. Daß für die Entstehung von Metaphosphat Energie erforderlich ist, ist leicht verständlich, denn die —P—O—P-Bindungen im Metaphosphat entsprechen dem Typus der „energiereichen“ Bindung⁴.

Vor einiger Zeit haben wir⁵ die Arbeitshypothese entwickelt, daß das polymere Metaphosphat in der Hefe die Funktion eines Speichers für die beim aeroben oder anaeroben Kohlehydratabbau anfallenden „energiereichen“ Phosphatbindungen innehat und somit den sogenannten Phosphagenen der Tiere (Kreatinphosphat bzw. Argininphosphat) entspricht. Wir postulierten damals die Existenz eines enzymatisch katalysierten Gleichgewichts zwischen Adenosintriphosphat (ATP) und Metaphosphat. Einige Zeit später gelang es uns auch, in der Hefe ein Enzym nachzuweisen, welches die Übertragung von Phosphatresten von Metaphosphat auf Adenosindiphosphat (ADP) katalysiert⁶. Fast gleichzeitig berichteten Kornberg und Kornberg⁷ über ein Enzym aus Hefe, das die umgekehrte Reaktion, die Phosphatübertragung von ATP auf Polyphosphat bewirkt und höchstwahrscheinlich mit unserem Ferment, das wir als Metaphosphat → ADP-transphosphatase bezeichneten⁸, identisch ist.

Mit der Entdeckung dieses Fermentes ist nunmehr die Möglichkeit, daß Metaphosphat als das Phosphagen der Hefe fungieren kann, außer Frage gestellt. Um festzustellen, ob einer derartigen Speicherfunktion tatsächlich eine größere Bedeutung im Stoffwechsel der Hefe zukommt und ob das polymere Metaphosphat der einzige Energie- bzw. Phosphatspeicher der Hefe ist, unternahmen wir quantitative Versuche über die Veränderungen der Metaphosphatfraktion und anderer phosphathaltiger Fraktionen im Verlauf von Atmung und Gärung in Anwesenheit und in Abwesenheit von Orthophosphat im Versuchsmedium.

Methodik.

Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurde durchwegs Oberhefe der Ottakringer Brauerei, Wien XVI., benutzt, für deren Überlassung wir

³ G. Schmidt, L. Hecht und S. J. Thannhauser, J. Biol. Chem. **166**, 775 (1946). — J. M. Wiame, ibid. **178**, 919 (1949).

⁴ Vgl. z. B. N. O. Kaplan in "The Enzymes", herausgegeben von J. B. Sumner und K. Myrbäck, Bd. II/1, S. 55. New York. 1951.

⁵ O. Hoffmann-Ostenhof und W. Weigert, Naturwiss. **39**, 303 (1952).

⁶ O. Hoffmann-Ostenhof, J. Kenedy, K. Keck, O. Gabriel und H. W. Schönfelling, Biochim. Biophys. Acta **14**, 285 (1954).

⁷ S. R. Kornberg und A. Kornberg, Federation Proc. **13**, 244 (1954).

⁸ Zur Nomenklatur vgl. O. Hoffmann-Ostenhof, Adv. Enzymology **14**, 219 (1953).

der genannten Firma zu großem Dank verpflichtet sind. Die Hefe wurde in abgepreßtem Zustande bezogen und unmittelbar nach Erhalt verarbeitet.

Herstellung „verarmter“ Hefe: 120 g Hefe werden in 4 l Leitungswasser suspendiert und durch die Suspension eine Nacht lang Luft durchgesaugt. Die Hefe wird dann durch Zentrifugieren und nachfolgendem Trockensaugen weitgehend von Wasser befreit. Derartig „verarmte“ Hefe erweist sich, wenn man die Zellen mit Toluidinblau anfärbt, als frei von metachromatischem Material, also von Metaphosphat.

Herstellung „angereicherter“ Hefe: 50 g „verarmte“ Hefe werden 2 Stdn. lang bei 30° in einer Lösung von 50 g Glucose und 4,5 g KH_2PO_4 in 500 ml Leitungswasser durch Durchsaugen belüftet. Die Hefe wird dann abzentrifugiert, mehrmals mit Wasser gewaschen und schließlich trockengesaugt.

Untersuchung des Phosphatstoffwechsels während der aeroben „Anreicherung“: 50 g „verarmte“ Hefe werden in einer auf 30° gehaltenen Lösung von 50 g Glucose und 4,5 g KH_2PO_4 in 400 ml Wasser rasch suspendiert und auf 500 ml aufgefüllt. Die Suspension wird in einen 750-ml-Belüftungskolben gebracht und dieser in einen Wasserthermostaten mit 30° gestellt. Dann wird ein gleichmäßiger Luftstrom (2 l/Min.) durchgesaugt. Nach 15, 30, 60 und 120 Min. werden je 10 ml der vorher gut durchmischten Suspension, das entspricht 1 g Hefe (Frischgewicht), herauspipettiert, sofort abzentrifugiert, 2mal mit Wasser gewaschen und dann auf die einzelnen Phosphatfraktionen — wie unten beschrieben — aufgearbeitet. Als Blindprobe für den Wert bei der Zeit 0 dienen 10 ml einer Suspension von 10 g „verarmter“ Hefe in 100 ml Leitungswasser.

Untersuchung des Phosphatstoffwechsels während der anaeroben „Anreicherung“: Es wird weitgehend analog wie bei der aeroben „Anreicherung“ gearbeitet, jedoch werden die Suspensionen und Lösungen mit destilliertem Wasser bereitet, welches vorher durch längeres Kochen vom Luftsauerstoff befreit wurde. Während des Versuches wird nicht Luft, sondern vorgereinigter (sauerstofffreier) Stickstoff in gleichmäßigem Strom durchgeleitet. Die Proben werden nach 30, 60, 180 und 360 Min. entnommen.

Untersuchung des Phosphatstoffwechsels während der „Verarmung“ im stickstoffhaltigen Nährmedium: 20 g „angereicherte“ Hefe werden in einer Lösung von 10 g Ammoniumsulfat in 150 ml Wasser suspendiert und die Mischung mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Suspension wird wiederum in einen 750 ml Belüftungskolben gebracht und in einen Wasserthermostaten von 30° gestellt. Dann wird die Luftmenge von 2 l/Min. durchgesaugt. Nach 1, 2 und 4 Stdn. Versuchsdauer werden je etwa 20 ml der Suspension entnommen, abzentrifugiert, 2mal mit Wasser gewaschen und dann auf einer kleinen Nutsche trockengesaugt. Von dieser Präparation werden genau 1 g ausgewogen und weiter verarbeitet. Die Probeentnahme muß hier auf diese Weise erfolgen, da unter den Versuchsbedingungen eine wesentliche Vermehrung der Hefe und damit eine Gewichtsveränderung erfolgt, weshalb die Entnahme von aliquoten Volumina zu störenden Ungenauigkeiten führen würde. Als Blindprobe für den Wert bei der Zeit 0 dienen 10 ml einer Suspension von 10 g „angereicherter“ Hefe in 100 ml Leitungswasser.

Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Phosphatfraktionen. Für die im folgenden beschriebenen Serienbestimmungen erwies es sich als vorteilhaft, sämtliche Operationen in etwa 12 ml fassenden Zentrifugengläsern, deren Hals mit einem Schliff versehen ist, vorzunehmen.

Zur Gewinnung der sogenannten löslichen Fraktion nach *Wiame*⁹, die wir als „leichtlösliche Fraktion“ bezeichnen wollen, werden die Hefeproben, die in allen Fällen 1 g frisch abgesaugter Hefe entsprechen, 1 Std. lang unter Eiskühlung mit 4 ml 10%iger Trichloressigsäure (TCE) geschüttelt, die überstehende Lösung abzentrifugiert und der Rückstand nochmals auf die gleiche Weise behandelt. Die beiden Extrakte werden vereinigt, auf 10 ml aufgefüllt und enthalten die Phosphate der „leichtlöslichen“ Fraktion.

Zur Isolierung der Lipoide werden nach *Schneider*¹⁰ die bei der vorhergehenden Operation erhaltenen Extraktionsrückstände der „leichtlöslichen“ Fraktion einer kombinierten Äther-Alkohol-Extraktion unterzogen. Nach Abzentrifugieren werden die Extrakte gesammelt, auf 10 ml aufgefüllt und das Lipoidphosphat nach der weiter unten beschriebenen Methode zur Bestimmung des Totalphosphats gemessen.

Zur Gewinnung der sogenannten unlöslichen Fraktion nach *Wiame*⁹, die wir als „schwerlösliche Fraktion“ bezeichnen, werden die Rückstände der Lipoideextraktion 2mal je 1 Std. lang mit je 4 ml verdünnter NaOH (pH 9,0) geschüttelt. Zur Kontrolle des pH-Wertes während der Extraktion werden der Lösung einige Tropfen alkohol. Phenolphthaleinlösung zugesetzt. Die vereinigten Extrakte werden auf 10 ml aufgefüllt und dienen zur Bestimmung der Phosphatanteile in der „schwerlöslichen“ Fraktion.

Die „leichtlöslichen“ und die „schwerlöslichen Fraktionen“ werden in folgender Weise aufgearbeitet: Das anorganische Orthophosphat wird unmittelbar nach der Methode von *Zeller*¹¹ gemessen. Zur Bestimmung der Werte von 7-Minuten-Phosphat und 180-Minuten-Phosphat werden je 2 ml der zu untersuchenden Extrakte in ein graduiertes Reagensglas pipettiert, darauf mit 2 ml 2 n HCl versetzt und 7 Min. bzw. 180 Min. lang auf dem kochenden Wasserbad der Hydrolyse unterworfen. Danach wird auf 5 ml aufgefüllt und das Phosphat wiederum nach *Zeller* gemessen.

Der verbleibende Rest der Extrakte (5,3 ml) wird zur Metaphosphatbestimmung⁹ verwendet. Er wird zuerst gegen Bromphenolblau neutralisiert, dann werden 4 ml 5 m Acetatpuffer vom pH 4,2 und 2 ml gesättigte wäßrige Bariumnitratlösung hinzugefügt. Darauf kühlt man die Lösung auf 0° ab und bewirkt das Ausfallen des Bariummetaphosphats durch Kratzen mit einem Glasstab an der Gefäßwand. Zur vollständigen Ausfällung lässt man 12 Stdn. im Eisschrank stehen, zentrifugiert dann ab und wäscht einmal mit Acetatpuffer nach. Nach 7 Min. langer Hydrolyse in 1 n HCl wird schließlich eine Orthophosphatbestimmung nach *Zeller* durchgeführt.

Zur Bestimmung des totalen Phosphatgehaltes (anorganisches Phosphat plus alle Arten organisch gebundenes Phosphat) in den Extrakten, den Extraktionsrückständen, den intakten Hefezellen und den vereinigten Alkohol-Äther-Auszügen der Lipoideextraktion wird nach einer von *King*¹² referierten Methode das Material vorerst mit Perchlorsäure und Wasserstoffperoxyd aufgeschlossen und darauf eine Phosphatbestimmung nach *Zeller* durchgeführt.

Der Nucleinsäuregehalt der Hefezellen wurde spektrophotometrisch ermittelt. Hefeproben, welche 1 g Hefe Frischgewicht entsprechen, werden

⁹ *J. Wiame*, *J. Biol. Chem.* **178**, 919 (1949).

¹⁰ *W. C. Schneider*, *J. Biol. Chem.* **161**, 293 (1945).

¹¹ *E. A. Zeller*, *Helv. Chim. Acta* **32**, 2512 (1949).

¹² *E. J. King*, *Microanalysis in Medical Biochemistry*, 2. Aufl., S. 66. London: Churchill. 1951.

nach Entfernung der löslichen Fraktion und der Lipoide, welche wie geschildert vorgenommen wird, bei 95° mit 5%iger Trichloressigsäure extrahiert. Nach Entfernung der TCE mit Hilfe von Wasserdampf werden die Extrakte auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und die Absorption bei der Wellenlänge von 2600 Å im *Hilger*-Spektrophotometer gemessen.

Ergebnisse und Diskussion.

Die uns von der Brauerei zur Verfügung gestellte Hefe zeigte bei der Anfärbung mit Toluidinblau nur einen verhältnismäßig geringen Gehalt an metachromatischem Material, das heißt an Metaphosphat. Bei Versuchen stellte es sich heraus, daß solche Hefe ungleich schwieriger mit Phosphat angereichert werden kann als Hefe, die vor der Anreicherung einem Phosphatverarmungsprozeß unterzogen wurde. Durch mehrstündige Belüftung der Hefe in Leitungswasser, wie das im methodischen Teil beschrieben ist, wurde eine Hefepräparation („verarmte“ Hefe) erhalten, welche praktisch frei von metachromatischem Material war; bei der Fällung mit Bariumnitrat zeigte sich allerdings, daß auch diese „verarmte“ Hefe noch geringe auf diese Weise bestimmbare Mengen Metaphosphat enthält.

„Verarmte“ Hefe kann in einem Nährmedium, welches Glucose und anorganisches Phosphat enthält, sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen zur Speicherung von Metaphosphat gebracht werden, was sich mikroskopisch bereits nach wenigen Minuten Versuchsdauer durch Auftreten metachromatisch anfärbbaren Materials erkennen läßt.

Eine „angereicherte“ Hefe, deren Herstellung im methodischen Teil beschrieben ist, kann, gleichgültig ob die Anreicherung unter aeroben oder anaeroben Bedingungen erfolgte, auch durch sehr langes Belüften in Leitungswasser nicht mehr „verarmt“ werden. Eine „Verarmung“ erfolgt hingegen leicht in Nährmedien, welche assimilierbare stickstoffhaltige Substanzen enthalten. So führt ein 12stündiges Belüften der Hefe in einer 5%igen Lösung von Ammoniumsulfat zum vollständigen Verschwinden der metachromatischen Substanzen. Die in Gegenwart einer Stickstoffquelle eintretende Vermehrung der Hefezellen scheint somit einen schnellen Verbrauch des Metaphosphats zu verursachen.

Bei der quantitativen Verfolgung des Verhaltens der einzelnen phosphathaltigen Fraktionen während „Anreicherung“ und „Verarmung“ wurde die Versuchsdauer derartig gewählt, daß immer nach Erreichen einer stationären Phase je eine weitere Probe untersucht wurde. Für jede Kurve wurden jeweils 5 Proben analysiert. Bei entsprechenden Parallelversuchen zeigte es sich, daß wohl das Verhalten der einzelnen Phosphatfraktionen qualitativ stets gleich war, die Absolutwerte hingegen größeren Schwankungen unterworfen waren. Als Illustration dieser Ver-

hältnisse haben wir in Tabelle 1 die Ergebnisse dreier Parallelversuche über die aerobe „Anreicherung“ zusammengestellt. Wir nehmen an, daß diese Verschiedenheiten der Absolutwerte auf die Uneinheitlichkeit der von der Fabrik bezogenen Hefe zurückzuführen ist.

Tabelle 1. Vergleich mehrerer Versuchsreihen über das Verhalten der einzelnen Phosphatfraktionen bei der anaeroben Anreicherung. Die Zahlen bedeuten μg Phosphor pro g Hefe Frischgewicht.

	Leichtlösliche Fraktion					Schwerlösliche Fraktion				
	Zeit in Minuten					Zeit in Minuten				
	0	15	30	60	120	0	15	30	60	120
Orthophosphat	540	357	245	175	175	0	0	0	0	0
	492	378	204	132	132	0	0	0	0	0
	400	290	155	110	105	0	0	0	0	0
7-Min.-Phosphat	185	300	417	550	575	80	110	135	151	158
	150	312	437	502	510	87	100	131	150	156
	87	210	228	365	370	—	—	—	—	—
180-Min.-Phosphat	150	125	98	13	10	140	31	22	17	13
	138	62	25	0	0	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	129	25	18	12	10
Metaphosphat	33	110	186	225	260	11	37	75	101	112
	33	56	117	195	250	12	29	68	88	105
	12	35	85	91	—	32	47	63	—	102

In den Abb. 1 bis 4 ist eine Versuchsserie über das Verhalten einzelner phosphathaltiger Fraktionen während der „Anreicherung“ unter aeroben und unter anaeroben Bedingungen dargestellt. Wir nahmen dabei in Übereinstimmung mit *Wiame*⁹ eine Auftrennung in einen mit kalter Trichloressigsäure extrahierbaren Anteil (kurz als „leichtlösliche Fraktion“ bezeichnet) und einen nur mit heißer Trichloressigsäure oder mit verd. NaOH extrahierbaren Anteil (kurz „schwerlösliche Fraktion“) vor. In beiden Anteilen wurde der Gehalt an freiem Orthophosphat, 7-Minuten-Phosphat, 180-Minuten-Phosphat und Totalphosphat bestimmt. In einzelnen Versuchen wurde auch der Phosphatgehalt der mit einem Alkohol-Äther-Gemisch extrahierten Lipoidfraktion gemessen.

Bei näherer Betrachtung der Kurven in den Abb. 1 bis 4 fällt vorerst auf, daß die Endwerte für 7-Minuten-Phosphat und Metaphosphat bei der „Anreicherung“ unter aeroben Bedingungen beträchtlich höher liegen als bei demselben Vorgang unter anaeroben Bedingungen. Die bereits besprochene und in Tabelle 1 illustrierte Variationsbreite der einzelnen Versuchsserien läßt aber eine Verallgemeinerung dieser Beobachtung nicht ohne weiteres zu. Die Kurven für diese beiden Fraktionen zeigen

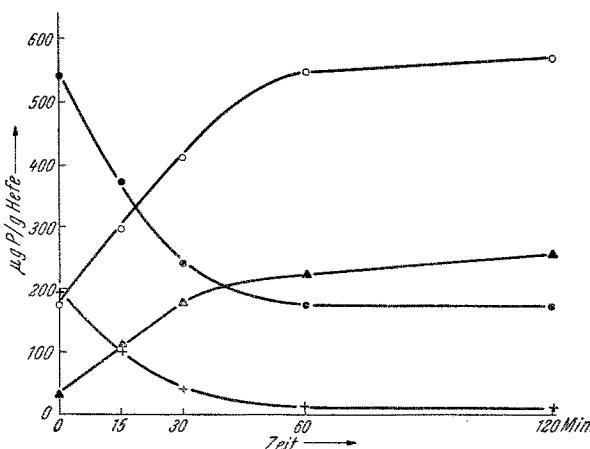


Abb. 1. Verhalten der einzelnen Phosphatanteile in der „leichtlöslichen Fraktion“ während der aeroben „Anreicherung“. Für die einzelnen Punkte gelten die folgenden Symbole: ● = Orthophosphat, ○ = 7-Minuten-Phosphat, + = 180-Minuten-Phosphat, △ = Metaphosphat.

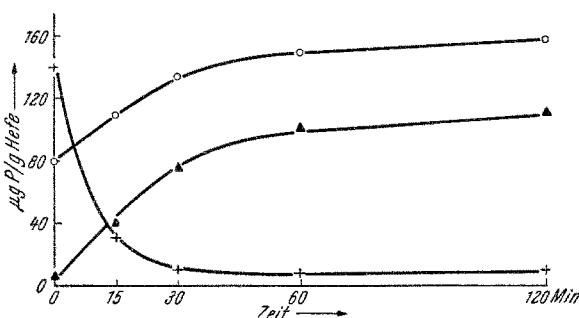


Abb. 2. Verhalten der einzelnen Phosphatanteile in der „unlöslichen Fraktion“ während der aeroben „Anreicherung“. Symbole wie bei Abb. 1.

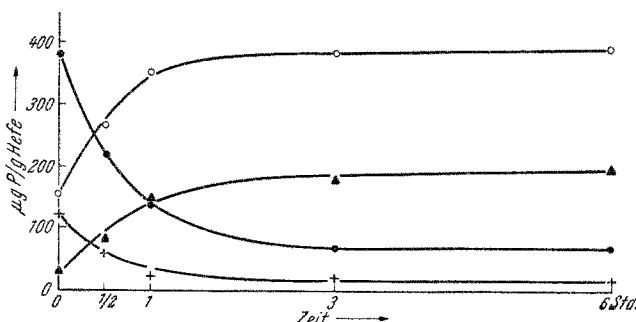


Abb. 3. Verhalten der einzelnen Phosphatanteile in der „leichtlöslichen Fraktion“ während der anaeroben „Anreicherung“. Symbole wie bei Abb. 1.

jedoch bei der aeroben „Anreicherung“ stets eine größere Anfangssteilheit als unter anaeroben Bedingungen. Ebenso wird der Beginn der stationären Phase, bei dem alle Kurven annähernd in die Horizontale einbiegen, in der aeroben Versuchsanordnung bereits nach 1 Std., unter anaeroben Bedingungen erst nach etwa 3 Std. erreicht.

Bei allen Versuchen konnte freies Orthophosphat nur in der „leichtlöslichen Fraktion“ vorgefunden werden. Die Abnahme des Orthophosphats verläuft in unseren Versuchen wesentlich langsamer als in den Experimenten von *Lynen* und *Koenigsberger*¹³, welche das Verhalten dieser Fraktion bei Hefe verfolgten, die in einer phosphatfreien Glucose-

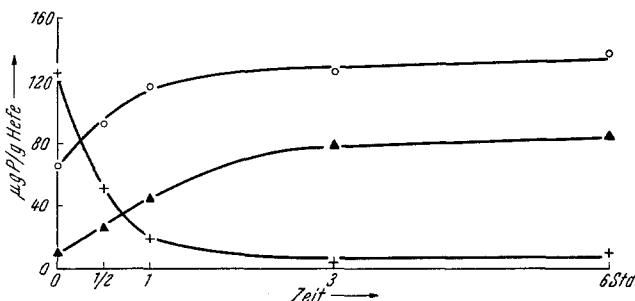


Abb. 4. Verhalten der einzelnen Phosphatanteile in der „schwerlöslichen Fraktion“ während der anaeroben „Anreicherung“. Symbole wie bei Abb. 1.

lösung unter anaeroben Bedingungen gehalten wurde. Dieser Unterschied ist leicht verständlich: in der Versuchsanordnung von *Lynen* entspricht die Abnahme des Orthophosphats dem Überwiegen der Phosphorylierung gegenüber der Dephosphorylierung, während bei uns insoweit kompliziertere Verhältnisse vorliegen, als gleichzeitig eine Resorption von Phosphat aus dem Außenmedium stattfindet.

Die Anteile an 7-Minuten-Phosphat und an Metaphosphat steigen bei aerober und anaerober „Anreicherung“ sowohl in den „leichtlöslichen“ als auch in den „schwerlöslichen Fraktionen“ beträchtlich an; die Werte für die „leichtlöslichen Fraktionen“ sind dabei wesentlich höher als diejenigen für die „schwerlöslichen Fraktionen“, der Kurvenverlauf ist aber gleichartig. Da Metaphosphat unter den Bedingungen der 7-Minuten-Hydrolyse gespalten wird, ist es im Wert für das 7-Minuten-Phosphat mitenthalten; dieses zeigt immer wesentlich höhere Werte als Metaphosphat, was durch die Anwesenheit weiterer „energiereicher“ Phosphatverbindungen — Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), 1,3-Diphosphoglycerinsäure, Phosphoenolbrenztraubensäure u. a. — bedingt ist.

¹³ *F. Lynen* und *R. Koenigsberger*, Ann. Chem. 573, 60 (1951).

Die Phosphatfraktionen, welche als 180-Minuten-Phosphat bezeichnet werden, zeigen sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen eine rasche Abnahme, wobei diese in den „leichtlöslichen Fraktionen“ noch schneller erfolgt als in den „schwerlöslichen“.

Der Phosphatgehalt der Lipoidfraktion, welcher in den Abb. 1 bis 4 wegen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt ist, zeigt bei der Anreicherung sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen einen deutlichen Anstieg.

Obwohl es bekannt ist, daß im stickstofffreien Medium keine Vermehrung der Nucleinsäuren bzw. der Purin- und Pyrimidinkörper erfolgt, haben wir das Verhalten der Nucleinsäuren unter den Bedingungen der aeroben und der anaeroben „Anreicherung“ spektrophotometrisch verfolgt und stellen dabei fest, daß in keinem Falle eine Konzentrationserhöhung der Purin- und Pyrimidinkörper stattfindet. Damit ist allerdings, was ausdrücklich betont werden muß, nicht ausgeschlossen, daß der Phosphatgehalt der Nucleinsäurefraktion eine Veränderung erfährt. Vorversuche zur Lösung dieser Frage ergaben aber noch keine eindeutigen Befunde.

Die entsprechenden Versuchsreihen über die „Verarmung“ wurden mit „angereicherter“ Hefe vorgenommen, welche in 5%iger Ammoniumsulfatlösung 12 Stdn. lang belüftet wurde. Verglichen mit den Versuchen über die „Anreicherung“ weisen die Kurven der einzelnen Phosphatfraktionen bei der „Verarmung“ (Abb. 5 und 6) genau den inversen Verlauf auf. Die „Verarmung“ kann somit als eine Umkehrung der „Anreicherung“ aufgefaßt werden.

Um eine Beziehung zwischen unseren Beobachtungen über den Phosphatstoffwechsel und den Kohlehydratstoffwechsel feststellen zu können, bestimmten wir die Geschwindigkeit der Glucosevergärung unter denjenigen Bedingungen, unter denen wir die anaerobe „Anreicherung“ verfolgt hatten. Die Messung des Glucoseverbrauches erfolgte durch Bestimmung der CO_2 -Entwicklung im Warburg-Apparat¹⁴. Unter den beschriebenen Bedingungen setzt 1 g Hefe Frischgewicht bei konstanter Gärgeschwindigkeit in 10 Min. $1380 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2$ in Freiheit, das bedeutet, daß in dieser Zeit $2,78 \cdot 10^{-6}$ Mol Glucose vergoren werden.

Wenn man annimmt, daß in der Hefe unter anaeroben Bedingungen die Dissimilation der Glucose allein über den Abbauweg von *Embden* und *Meyerhof*¹⁵ verläuft, wie das auch von *Lynen* und *Koenigsberger*¹³ als sicher angesehen wird, kann man — unter Vernachlässigung der Vorgänge bei der Glykogensynthese — berechnen, daß pro Mol vergorener Glucose 2 Mol Orthophosphat in organische („energiereiche“)

¹⁴ Vgl. dazu *W. W. Umbreit, R. H. Burris* und *J. F. Stauffer*, *Manometric Methods and Related Techniques*, 2. Aufl. Minneapolis. 1949.

¹⁵ Vgl. dazu z. B. *F. F. Nord* und *S. Weiss* in „The Enzymes“, herausgegeben von *J. B. Sumner* und *K. Myrbäck*, Bd. II/1, S. 684. New York. 1951.

Bindung überführt werden. Obwohl während der Gärung sicher auch dephosphorylierende Prozesse stattfinden, muß es doch schon auf Grund unserer Beobachtung, daß der Gehalt an Orthophosphat während der

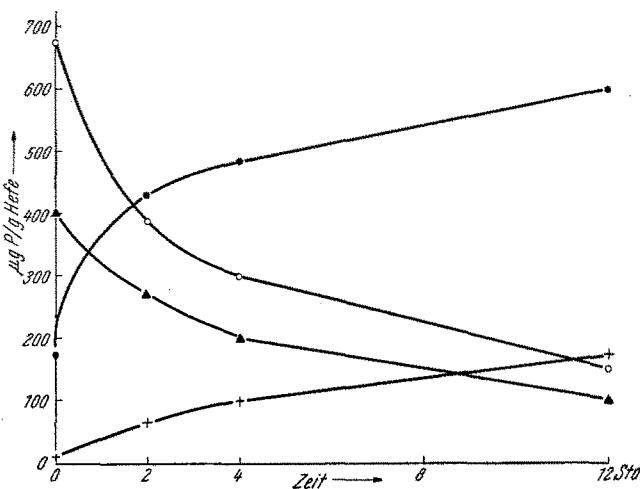


Abb. 5. Verhalten der einzelnen Phosphatanteile in der „leichtlöslichen Fraktion“ während der „Verarmung“. Symbole wie bei Abb. 1.

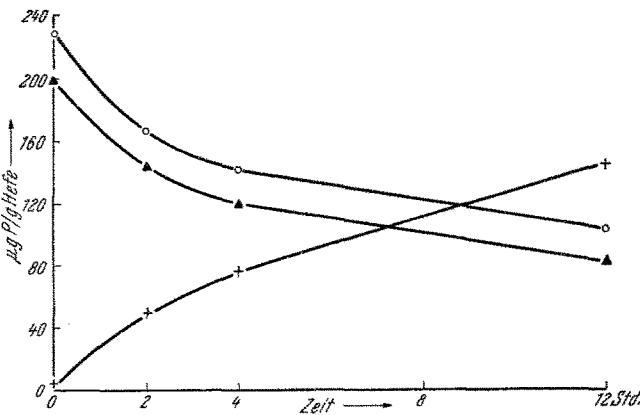


Abb. 6. Verhalten der einzelnen Phosphatanteile in der „schwerlöslichen Fraktion“ während der „Verarmung“. Symbole wie bei Abb. 1.

„Anreicherung“ beträchtlich absinkt, angenommen werden, daß diese Prozesse eine geringere Rolle spielen und daß zumindest der größte Teil des während der Gärung entstehenden organisch gebundenen Phosphats in gebundener Form in der Hefezelle verbleibt. Ein Herausdiffundieren von Orthophosphat aus der intakten Hefezelle ist auf Grund zahlreicher

älterer Befunde sehr unwahrscheinlich; so konnte in unserem Laboratorium vor einiger Zeit in Versuchen mit radioaktivem Phosphat gezeigt werden, daß lebende Hefe, wenn überhaupt, nur verschwindend geringe Mengen Orthophosphat an das umgebende Medium abgibt¹⁶.

Unserer seinerzeitigen Arbeitshypothese⁵ entsprechend, daß das Metaphosphat als eine Art Phosphagen der Hefe fungiert, müßte ein Anteil des während der Glucosegärung gebundenen Phosphats in Metaphosphat überführt werden. Dies ist auch, wie unsere Kurven (Abb. 3 und 4) zeigen, ohne Zweifel der Fall. Es erhebt sich in diesem Zusammenhang allerdings die Frage, in welchem Ausmaß das während der Gärung in gebundene Form übergehende Phosphat zu Metaphosphat wird. Zur Klärung dieses Problems berechneten wir aus unseren Experimenten, wie groß die Menge gebundenen Phosphats ist, welche bei der anaeroben „Anreicherung“ innerhalb 10 Min. gebildet werden kann, wobei wir an den Anfangsteil der entsprechenden Kurve in Abb. 3 eine Tangente legten und durch Extrapolation die maximal mögliche Vermehrung des Metaphosphatanteils während 10 Min. berechneten. Es ergab sich, daß in dieser Zeit $27 \mu\text{g}$ Metaphosphat gebildet werden; das sind auf PO_3^{2-} -Einheiten bezogen, $0,87 \cdot 10^{-6}$ Mole. Wenn wir diesen Wert mit der Menge vergorener Glucose in demselben Zeitraum in Beziehung bringen, so können wir berechnen, daß pro Mol vergorener Glucose nur 0,03 Mole Metaphosphat entstehen, das heißt, daß von den theoretisch zu erwarten- den 2 Mol gebundenem Phosphat wenig mehr als 1% in Metaphosphat überführt wird.

Da wir nun für unsere Versuche Bedingungen wählten, welche die Metaphosphatbildung besonders begünstigen, muß angenommen werden, daß die Kapazität der Hefe, energiereich gebundenes Phosphat als Metaphosphat zu speichern, nur sehr gering ist. Damit ist unsere seinerzeitige Arbeitshypothese, daß Metaphosphat eine Art Phosphagen der Hefe darstellt, unwahrscheinlich geworden. Die wahre Rolle des Metaphosphats und des Enzyms, welches die Übertragung von Phosphatresten von Metaphosphat auf das Adenylsäuresystem bzw. die umgekehrte Reaktion katalysiert, muß also noch immer als völlig ungeklärt bezeichnet werden.

Die Frage, warum trotz des unbestreitbaren Vorhandenseins eines Fermentes, das das Gleichgewicht zwischen Adenylsäuresystem und Metaphosphat einstellen kann, diesem Gleichgewicht in der Hefe nicht dieselbe Rolle zukommt wie dem Gleichgewicht zwischen Adenylsäuresystem und Kreatinphosphat bzw. Argininphosphat bei den Tieren, läßt sich auf Grund unserer Ergebnisse noch nicht beantworten. Hier könnte vor allem die Gleichgewichtslage der Reaktion



¹⁶ O. Hoffmann-Ostenhof und E. Kriz, Mh. Chem. 80, 90 (1950).

für die Phosphagenfunktion ungünstig liegen; wohl wissen wir aus den Ergebnissen von *Kornberg*⁷ und aus unserem eigenen Laboratorium, daß der Vorgang reversibel ist, doch ist über die Lage des Gleichgewichts noch überhaupt nichts bekannt geworden. Ein zweiter möglicher Grund für das geschilderte Verhalten könnte darin liegen, daß die katalytische Wirkung der Metaphosphat → ADP-transphosphatase vergleichsweise gering ist, das heißt, daß die Übertragungsreaktion langsamer vor sich geht als andere konkurrenzierende Reaktionen. Da bisher nur ungereinigte Fermentpräparate zur Verfügung stehen, wissen wir auch über diesen Faktor noch nichts.

Aus unseren Ergebnissen ergibt sich schließlich noch die Frage, was mit dem während der Gärung oder Atmung in organisch gebundene Form überführten Phosphat im weiteren Verlauf geschieht. Mit diesem Problem, das zur Erklärung des sogenannten *Harden-Young*-Effekts (vgl. dazu *Nord* und *Weiss*¹⁵) von größter Bedeutung ist, werden wir uns in der folgenden Mitteilung beschäftigen.