

# Ueber ein Enzym „Phytase,“ das „Anhydro-oxy-methylen diphosphorsäure“ spaltet.

VON

U. Suzuki, K. Yoshimura und M. Takaishi.

Wenn man Reiskleie in Wasser suspendirt und bei gewöhnlicher Temperatur einige Tage stehen lässt, so beobachtet man, dass die Hauptmenge des organischen Phosphors gelöst wird, und gleichzeitig die Bildung von Phosphorsäure auf Kosten der organischen Phosphorverbindung energisch vor sich geht. Wir haben im ersten Versuche vier Erlenmeyerkolben mit je 5 gramm Reiskleie und 200 c.c. Wasser gefüllt, und bei einer Temperatur von 20-25°C stehen gelassen. Nach 18 Stunden, 4, 7 und 15 Tagen wurden Proben herausgenommen, und analysirt, mit folgendem Resultat. Gesamt-Phosphor in der trockenen Kleie betrug 2.04% :

*Nach.*

	18 Stunden.	4 Tagen.	7 Tagen.	15 Tagen.
Gesamt-Phosphor gelöst .....	0.930%	1.932	1.937	1.971
Anorganischer Phosphor .....	0.145	0.523	0.629	0.707
Organischer Phosphor.....	0.640	1.281	1.180	1.164

*Gesamt-Phosphor in der Kleie als 100 berechnet, nach.*

	18 Stunden.	4 Tagen.	7 Tagen.	15 Tagen.
Gesamt-Phosphor .....	45.59	94.71	94.94	96.61
Anorganischer Phosphor.....	7.11	25.63	30.83	34.66
Organischer Phosphor.....	31.37	62.76	57.84	57.06

Derselbe Versuch wurde auch mit dem Oelkuchen von *Brassica napus* wiederholt. Der Oelkuchen enthielt 1.099% Phosphor :

	Nach 24 Studen.	10 Tagen.	19 Tagen.
Gesamt-Phosphor gelöst .....	0.434	0.932	0.969
Anorganischer Phosphor.....	Spur.	0.287	0.521
Organischer Phosphor.....	0.384	0.615	0.327

*Gesamt-Phosphor im Oelkuchen als 100 berechnet.*

	Nach 24 Stunden.	10 Tagen.	19 Tagen.
Gesamt-Phosphor gelöst .....	39.52	84.78	88.14
Anorganischer Phosphor .....	Spur.	26.14	47.72
Organischer Phosphor .....	34.96	55.91	29.79

Aus diesen beiden Versuchen sieht man deutlich, dass aus der organischen Phosphorverbindung Phosphorsäure abgespalten wird. Wir haben anfangs angenommen, dass diese Erscheinung einem Fäulnisprozess zuzuschreiben sei. Die folgenden Versuche bewiesen uns aber, dass der Fäulnisprozess keine befördernde Wirkung auf die Phosphorsäureabspaltung hat, sondern im Gegenteil etwas hindernd darauf einwirkt.

Versuch 1. In diesem Versuch wurde die Fäulnis ausgeschlossen. Zwei Erlemeyerkolben wurden mit je 10 gram Reiskleie (nicht entfettet) und 100 c.c. Wasser gefüllt, mit Watte verschlossen. Der Inhalt des Kolben *a*) wurde 10 Minuten lang lebhaft gekocht, während der Inhalt des anderen *b*) nur mit 10 c.c. Toluol versetzt wurde. Nachdem sie eine Woche bei einer Temperatur von 30–35°C gestanden waren, wurde abfiltrirt. Die Phosphorsäurebestimmung wurde nach der gewöhnlichen Molybdänmethode ausgeführt.

*Phosphor in Phosphorsäure.*

- a*) Gekocht .....0.31% der lufttrockenen Kleie.  
*b*) Nicht gekocht, Toluol zugesetzt .....1.28% „  
 Gesamt-Phosphor der Kleie .....2.04%

Versuch 2. Vier mit Wattepfropfen versehene Kolben wurden mit je 5 gramm entfetteter Reiskleie und 100 c.c. Wasser gefüllt und in folgender Weise behandelt:

- a) Gekocht.
- b) Nicht gekocht.
- c) Gekocht und Toluol zugesetzt.
- d) Nicht gekocht und Toluol zugesetzt.

Sie wurden bei einer Temperatur von 30–35°C stehen gelassen. Nach 4 Tagen wurde filtrirt und analysirt:

*In 100 Theilen der Trockensubstanz.*

	Gesamt-Phosphor, gelöst.	Der gebildete Phosphorsäure-Phosphor.
a)	—	0.19
b)	—	0.78
c)	1.19	0.19
d)	1.49	1.36

Versuch 3. Zwei Erlemmeyer-Kolben wurden mit je 0.5g. Phytin und 45 c.c. Wasser gefüllt, gekocht und abgekühlt. Ferner wurden 5 gramm Reiskleie mit 50 c.c. Wasser verrieben und abfiltrirt. 5 c.c. von diesem Filtrate wurde fünf Minuten gekocht und zum Kolben a) zugegeben. Zum Kolben b) wurden ebenfalls 5 c.c. des Filtrats zugesetzt, aber ohne diese vorher zu erhitzen. Die beiden Kolben nun wurden mit je 10 c.c. Toluol versetzt und bei 30–35°C stehen gelassen. Für die abgespaltene Phosphorsäure ergab sich:

*Phosphor in Phosphorsäure.*

	Nach 4.	5.	6 Tagen.
a)	0.002g.	0.005	0.005
b)	0.010	0.014	0.016

Man sieht hieraus, dass das Phytin nur gespalten wird, wenn der zugesetzte Reiskleie-Extract nicht vorher gekocht wor.

Versuch 4. 5 gramm Weizenkleie wurde mit 50 c.c. Wasser bei 30–35°C vier Tage stehen gelassen.

	Der gebildete Phosphorsäure Phosphor.	In Prozent der luft-trockenen Kleie.
a) Gekocht und Toluol zugesetzt.....	0.0040g.	0.08%
b) Nicht gekocht und Toluol zugesetzt..	0.0205g.	0.41%

Aus diesen Versuchen kann man schliessen, dass in der Reis- und Weizenkleie ein Enzym existirt, das die organische Phosphorverbindung bzw. Anhydro-oxy-methylen-diphosphorsäure spaltet.

Wir haben ferner beobachtet, dass bei Reis-, Gerste-, Brassica-, und anderen Samen, während der Keimung ein grosser Theil des organisch-gebundenen Phosphors als Phosphorsäure abgespalten wird, was wieder am einfachsten durch Enzymwirkung erklärt wird.

E. Schulze und N. Castoro haben ferner berichtet, dass in etiolirten Keimlingen verschiedener Pflanzen Phosphorsäure sich anhäuft, doch haben sie sich nicht speziell über die Beziehung zwischen der Anhydro-oxy-methylen-diphosphorsäure zur abgespaltenen Phosphorsäure geäussert, und auch über eine Enzymwirkung nichts erwähnt. Wir wollen nun die Resultate einiger Versuche mittheilen, die Bildung der Phosphorsäure auf Kosten des organischen Phosphors bzw. des Phytins beim Keimungsvorgang deutlich zeigen :

Versuch 1. Am 12ten August wurden Reissamen in feuchte Sägespäähne gesät und bis 1sten September in einem hellen Zimmer gehalten. Als die jungen Blätter etwa 3-4 cm. erreichten, wurden sie getrocknet und analysirt.

### Resultat.

	500 Samen.	500 Keimlinge.	(+) Zunahme. (-) Abnahme.
Trockensubstanz .....	11.50g.	7.50	(-) 4.00
Gesamt-Phosphor .....	0.0341	0.0326	(-) 0.0015
Lecithin-Phosphor .....	0.0005	0.0014	(+) 0.0009
In 0.2% HCl löslicher Phosphor ...	0.0151	0.0259	(+) 0.0108
Davon. { Anorg.-Phosphor .....	Spur.	0.0086	(+) 0.0086
{ Org.-Phosphor .....	0.0142	0.0145	(+) 0.0003

*Gesamt-Phosphor der Samen als 100 berechnet.*

	Samen.	Keimlinge.	(+)	(-)
Gesamt-Phosphor .....	100.00	95.60	(-)	4.40
Lecithin-Phosphor .....	1.47	4.10	(+)	2.63
In 0.2% HCl löslich Phosphor .....	44.28	76.00	(+)	<u>31.72</u>
Davon, { Anorg.-Phosphor .....	Spur.	25.22	(+)	<u>25.22</u>
{ Org.-Phosphor .....	41.64	42.52	(+)	0.88

Versuch 2. Am 9ten October wurden 200 von *Brassica Napus* in feuchten Quarzsand gesät und keimen gelassen. Am 18ten als die Keimlinge etwa 3 cm. erreichten, wurden sie getrocknet und analysirt :

	200 Samen.	200 Keimlinge.	(+)	(-)
Trocken-Substanz .....	5.90	4.20	(-)	1.70
Gesamt-Phosphor .....	0.0417	0.0403	(-)	0.0014
Lecithin-Phosphor .....	0.0029	0.0041	(+)	0.0012
In 0.2% HCl löslicher Phosphor ...	0.0269	0.0326	(+)	0.0057
Davon, { Anorg.-Phosphor .....	Spur.	0.0292	(+)	0.0292
{ Org.-Phosphor .....	0.0259	0.0012	(-)	0.0248

*Gesamt-Phosphor der Samen als 100 berechnet.*

	Samen.	Kleimlinge.	(+)	(-)
Gesamt-Phosphor .....	100.00	96.64	(-)	3.36
Lecithin-Phosphor .....	6.95	9.83	(+)	2.88
In 0.2% HCl löslicher Phosphor ...	64.51	78.18	(+)	13.67
Davon, { Anorg.-Phosphor .....	Spur.	70.02	(+)	<u>70.02</u>
{ Org.-Phosphor .....	62.11	2.88	(-)	<u>59.23</u>

Versuch 3. Am 5ten October wurde Gerstensamen in feuchten

Quarzsand gesät, und am 18ten, als die Keimlinge etwa 9 cm. erreicht hatten, wurden sie getrocknet und analysirt:

	300 Samen.	300 Keimlinge.	(+)	(-)
Trocken-Substanz .....	12.00	9.10	(-)	2.90
Gesamt-Phosphor .....	0.0435	0.0404	(-)	0.0031
Lecithin-Phosphor .....	0.0018	0.0035	(+)	0.0017
In 0.2% HCl löslicher Phosphor ...	0.0255	0.0319	(+)	0.0064
Davon. { Anorg.-Phosphor .....	Spur.	0.0287	(+)	0.0287
{ Org.-Phosphor .....	0.0246	0.0030	(-)	0.0216

*Gesamt-Phosphor der Samen als 100 berechnet.*

	Samen.	Kleimlinge.	(+)	(-)
Gesamt-Phosphor .....	100.00	92.89	(-)	7.11
Lecithin-Phosphor .....	4.14	8.05	(+)	3.91
In 0.2% HCl löslicher Phosphor ...	58.62	73.34	(+)	14.72
Davon. { Anorg.-Phosphor .....	Spur.	65.98	(+)	<u>65.98</u>
{ Org.-Phosphor .....	56.55	6.89	(-)	<u>49.66</u>

Versuch 4. Weizensamen wurden am 5ten October in feuchten Quarzsand gesät und am 18ten October, als die Keimlinge etwa bis zu 13 cm. gewachsen waren, wurden sie getrocknet und analysirt:

	300 Samen.	300 Keimlinge.	(+)	(-)
Trocken Substanz .....	12.000g.	9.35	(-)	2.65g.
Gesamt-Phosphor .....	0.0373	0.0352	(-)	0.0021
Lecithin-Phosphor .....	0.0012	0.0026	(+)	0.0014
In 0.2 HCl löslicher Phosphor .....	0.0211	0.0277	(+)	0.0066
Davon. { Anorg.-Phosphor .....	Spur.	0.0236	(+)	0.0236
{ Org.-Phosphor .....	0.0207	0.0040	(-)	0.0167

*Gesamt-Phosphor der Samen als 100 berechnet.*

	Samen.	Kleimlinge.	(+)	(-)
Gesamt-Phosphor .....	100.00	94.37	(-)	5.63
Lecithin-Phosphor .....	3.32	6.97	(+)	3.65
In 0.2% HCl löslicher Phosphor ...	56.56	74.26	(+)	17.70
Davon. { Anorg.-Phosphor .....	Spur.	63.27	(+)	<u>63.27</u>
{ Org.-Phosphor .....	55.50	10.72	(-)	<u>44.78</u>

Wie man sieht, geht die Bildung der Phosphorsäure während des Keimungs-Prozesses manchmal auffallend rasch vor sich, bei Brassica sogar bis zu 70 prozent des gesammten Phosphors; und dieser Vorgang geht im hellen Licht ebenso schnell wie im Dunkeln vor sich.

*Darstellung des Enzyms.*

65 gramm entfetteter Reiskleie wurden in einem Porzellan-Mörser mit Wasser verrieben. Nach 4-5 Stunden wurde abfiltrirt und zum klaren Filtrat so viel Barytwasser und Bariumchlorid zugesetzt bis kein Niederschlag mehr entstand. Die meisten Unreinigkeiten, besonders organische so wie anorganische Phosphorverbindungen wurden dadurch entfernt. Das Filtrat von dem Niederschlag wurde dann mit einem Gemisch von 85% igem Alkohol und Aether versetzt, wobei ein weisser flockiger Niederschlag entstand, der das meiste Enzym enthielt. Dieser Niederschlag wurde in wenig Wasser gelöst, nochmals mit Bariumchlorid versetzt, um noch darin vorhandene Phosphate und andere Stoffe möglichst vollständig wegzuschaffen. Dem Filtrate wurde dann ein Ueberschuss von absolutem Alkohol und Aether zugegeben. Der weisse amorphe Niederschlag setzte sich allmählich auf den Boden ab. Nach 24 Stunden wurde er gesammelt, mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen, und über Schwefelsäure getrocknet. Das so gewonnene Produkt war ein weisses Pulver und betrug etwa 0.15g. Es löst sich sehr leicht in kaltem Wasser, enthält keinen Phosphor und zeigte weder diastatische, peptische noch tryptische Wirkung. Wir schlagen für dieses Enzym den Namen *Phytase* vor.

0.5 gramm Phytin wurde in 50 c.c. Wasser gelöst, 0.02g. dieses Phytase-Präparat zugegeben, und bei einer Temperatur von 35-40°C stehen gelassen. Nach vier Stunden konnte man schon die Abspaltung von Phosphorsäure durch Molybdän-Lösung nachweisen, und nach zwei Tagen waren etwa 10 Prozent des angewandten Phytins gespalten.

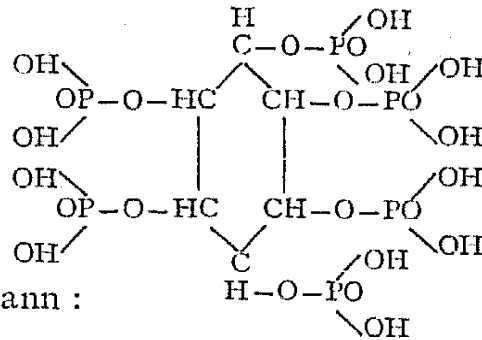
Analoge Versuche wurden auch mit anderen bekannten Enzymen ausgeführt, um zu sehen ob sie auch Phytin spalten können. In keinem Fall aber wurde Phosphorsäure abgespalten. Blos Emulsin schien etwas Phosphorsäure gebildet zu haben. Ob das Emulsin-Präparat ein einheitliches Enzym war, oder ob es ein Gemisch mit Phytase war, können wir zur Zeit nicht sagen. Doch halten wir es für wahrscheinlich, dass es sich bei der Phytase um ein neues Enzym handelt. Wir beabsichtigen später noch weiteres über die Natur der Phytase zu berichten.

Es ist uns endlich auch gelungen, *aus den enzymatischen Spaltungs-Produkten des Phytins Inosit zu isolieren*. Zu diesem Zwecke wurden 5 gramm Phytin in 100 c.c. Wasser gelöst, 0.1g. Phytase zugesetzt und das Gemisch unter Toluolzusatz bei 30-35°C 4 Tage stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde jetzt mit Bariumchlorid-Lösung gefällt, um das unverändert gebliebene Phytin und auch gebildete Phosphorsäure möglichst vollständig zu entfernen. Das Filtrat wurde stark eingeeengt, der dabei ausgeschiedene Niederschlag abfiltrirt, weiter stark eingeeengt, und mit wenig absolutem Alkohol versetzt. Der sofort gebildete Niederschlag wurde schnell abfiltrirt und zum Filtrat ein Ueberschuss von absolutem Alkohol und Aether zugegeben. Die weisse Trübung verwandelte sich allmählich in charakteristische Krystalle von Inosit. Leider genügte die Menge nicht für eine Analyse, wesshalb wir uns mit der Schmelzpunktbestimmung und einigen Farbenreaktionen begnügen mussten, wodurch aber jeder Zweifel entfernt wurde, es lag unbedingt Inosit vor. Da bis jetzt Inosit aus Phytin nur bei Anwendung von starker Salzsäure und hoher Temperatur erhalten worden war, wobei Umlagerungen und Kondensationen nicht ausgeschlossen waren, so spricht dieser enzymatische Inositspaltung sehr für das *ursprüngliche Vorhandensein von Inosit im Phytin* und deshalb müsste diese Substanz als Inosit-hexa-phosphorsäure (ein Analogon der Mellithsäure) aufgefasst werden. Zudem ist es uns



weder gelungen, Formaldehyd aus Phytin abzuspalten, noch Formaldehyd

mittelst starker Salzsäure in Inosit umzuwandeln. Die Formel der Phytinsäure wäre dann :



womit die analytischen Resultate Posternaks ebenfalls stimmen würden.

Aus der Reiskleie haben wir ebenfalls Inosit isoliren können. 100g. Reiskleie wurde mit Wasser versetzt. 4 Tage bei 30 35°C stehen gelassen, abfiltrirt, das Filtrat durch Bariumchlorid gefällt, nochmals abfiltrirt, und zum Filtrate basisches Bleiacetat zugegeben. Der dadurch entstandene Niederschlag wurde durch Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Schwefelblei abfiltrirt, stark eingeeengt, und mit Alkohol und Aether gefällt. Der so ausgeschiedene Inosit zeigte die charakteristische Krystallform so wie die eigentümlichen Reaktionen des Inosit.

Bekanntlich ist Inosit auch im tierischen Muskel gefunden worden. Es dürfte hier die Vermutung berechtigt sein, dass dieser Inosit aus dem Phytin der vegetabilischen Nahrung stammt.

*Zusammenfassung der Resultate.*

1. Der grösste Theil des Phosphors in Pflanzensamen besteht aus der in Wasser und in verdünnten Mineralsäuren löslichen organischen Phosphorverbindung, die schon von Schulze, Palladin, Winterstein, Posternak, Patten, u. A. erhalten wurde und als „Anhydro-oxy-methylen-diphosphorsäure“ oder „Phytin“ bezeichnet wurde.

Aus der Reiskleie haben wir etwa 8% und aus der Weizenkleie etwa 2% Phytin isolirt.

2. In Wurzeln, Zwiebeln, und Obst herrscht jedoch die anorganisch gebundene Phosphorsäure vor.

3. In den Knochen ist das Vorhandensein des Phytins zweifelhaft.

4. Während der Keimung der Pflanzensamen, entweder im Lichte oder im Dunkeln nimmt die anorganisch gebundene Phosphorsäure beträchtlich zu.

Auch wenn man Reis- oder Weizenkleie oder verschiedene Samen zerreibt und in Wasser suspendiert und einige Tage stehen lässt, bildet sich Phosphorsäure in grösseren Mengen auf Kosten des Phytins.

5. Aus Reis- und Weizenkleie wurde ein Enzym isoliert, das Phytin in Phosphorsäure und Inosit spaltet. Es ist wahrscheinlich ein neues Enzym und scheint im Pflanzenreich weit verbreitet zu sein.