Synthese von positionsmarkierter Saccharose aus freier Glucose

Von HEINZ KAUSS

Institut für Angewandte Botanik, Technische Hochschule München

(Z. Naturforschg. 17 b, 698—699 [1962]; eingegangen am 1. August 1962)

Für stoffwechselphysiologische Untersuchungen benötigen wir Saccharose, die nur im Kohlenstoffatom 1 des Glucoseteils mit ^{14}C markiert ist. Bisher benutzte man zur Synthese von Saccharose, die das radioaktive Isotop nur im Glucose- oder Fructoseteil enthält, das Ferment Saccharose-Phosphorylase aus *Pseudomonas*¹. Zur Markierung des Glucoseteils wurde dabei stets nur undefiniert markiertes Glucose-1- PO_4 aus Photosyntheseprodukten verwendet. Die Abwandlung dieses Verfahrens für unsere Zwecke hätte die Herstellung von Glucose-1- PO_4 aus käuflicher positionsmarkierter Glucose vorausgesetzt. Mit isolierten Enzymen ist dies sehr umständlich und schwierig. Eine weitere Möglichkeit ist die Fütterung von Glucose-1- ^{14}C an *Chlorella* und die Phosphorolyse der gebildeten Stärke. Da aber dabei eine starke Verschmierung der Radioaktivität vor allem in die Positionen 6, 3 und 4 erfolgt², war auch damit kein befriedigendes Ergebnis zu erwarten.

Diese Schwierigkeiten konnten auf einfache Weise umgangen werden. Wir stellten die positionsmarkierte Saccharose durch Übertragung eines Fructoserestes von Raffinose auf Glucose-1- ^{14}C mit einer Transfructosidase her. Das Verfahren hat den Vorteil, daß es von freier Glucose ausgehend ohne Isolierung von Zwischenprodukten in vitro ausgeführt werden kann und mit guter Ausbeute exakt positionsmarkierte Saccharose liefert. Als Transfructosidase benutzten wir ein Rohpräparat von „levansucrase“ aus *Bacillus subtilis*. Zu seiner Gewinnung wurden 2 l Nährlösung (5 g Cenovis-Bierhefe-Extrakt + 10 g Pepton + 5 g Saccharose auf 1 l Wasser, pH 6,8) mit 20 ml einer 13 Stdn. alten Kultur beimpft, 13 Stdn. bei 30 °C unter Schütteln bebrütet, die Bakterien abzentrifugiert, 2-mal mit dest. Wasser gewaschen und in der 5-fachen Menge Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde bei 4 °C mit Glasperlen in einer Mickle-Apparatur solange geschüttelt, bis die mikroskopische Kontrolle ergab, daß ungefähr die Hälfte der Bakterien leer war (5 Stdn.). Danach wurde von den Glasperlen abdekantiert und bei 4 °C und 17 000 g 40 min zentrifugiert. Die überstehende klare Lösung wird im folgenden als Enzym bezeichnet. Bei einer Lagertemperatur von -15 °C hatte ihre Aktivität nach 4 Monaten noch nicht abgenommen.

Die „levansucrase“ kann mehrere Reaktionen katalysieren. Sie überträgt reversibel D-Fructofuranosreste von der Raffinose auf Glucose und bildet so Saccharose³. Von der Saccharose wird der Fructoseteil ir-

reversibel auf das Polyfructosid Lävian übertragen⁴ und die Glucose zurückgebildet. Bei den anschließend beschriebenen Versuchen tritt weiterhin auch stets eine größere Menge von freier Fructose auf. Man muß daher annehmen, daß das Rohenzym auch hydrolytische Eigenschaften hat. In unseren Ansätzen läuft also eine komplexe Reaktion ab, bei der die Saccharose nur als Intermediärprodukt auftritt. Es mußte daher in Versuchen der Zeitpunkt und die Konzentration an Substrat und Enzym ermittelt werden, bei der ein möglichst hoher Anteil von Saccharose vorliegt.

Abb. 1. Einfluß der Glucosekonzentration [μMol] auf den Verlauf der Saccharosebildung.

Abb. 1 zeigt den Einfluß von verschiedenen Glucose/Raffinose-Verhältnissen auf die Saccharosemenge. Die Ansätze für diesen Versuch enthielten in einem Gesamtvolumen von 0,7 ml 0,2 ml $m/50$ -Mc-Irvine-Puffer pH 5,5, 0,1 ml Enzym, 0,1 ml Toluol, 10 μMole Raffinose und wechselnde Mengen radioaktive Glucose (0,1, 1, 10 μMole). Die Proben wurden bei Zimmertemperatur inkubiert, nach den angegebenen Zeiten jeweils 30 μl entnommen, auf Chromatographiepapier aufgetragen und eindimensional in Butanol/Propionsäure/Wasser (750 ml n-Butanol + 50 ml H_2O mit 352 ml Propionsäure + 448 ml H_2O im Verhältnis 1 : 1 gemischt) getrennt. Bei 0,1 und 1,0 μMol Glucose liegt nach 72 Stdn. ungefähr 35% der Radioaktivität als Saccharose vor. Ist die Konzentration an Glucose und Raffinose gleich, so ist der Anteil der Saccharose wesentlich geringer.

In Abb. 2 ist der Einfluß der Enzymmenge dargestellt. Die Ansätze enthielten in 1,0 ml Gesamtvolumen 0,2 ml Puffer, 0,1 ml Toluol, 10 μMole Raffinose, 1 μMol Glucose- ^{14}C und 0,1 bis 0,6 ml Enzym. Der Anteil der Saccharose an der Radioaktivität erreicht

¹ S. ARONOFF, Techniques of Radiobiochemistry 1958.

² O. KANDLER u. M. GIBBS, Z. Naturforschg. 14b, 8 [1959].

³ S. HESTRIN, D. S. FEINGOLD u. G. AVIGAD, J. Amer. chem. Soc. 77, 6710 [1955].

⁴ S. HESTRIN, D. S. FEINGOLD u. G. AVIGAD, Biochem. J. 64, 340 [1956].

nach einiger Zeit ein Maximum und fällt dann wieder ab. Dabei wird der Maximalwert mit zunehmender Enzymmenge kleiner. Nach dem Auszählen der Radioaktivität wurden die Chromatogramme mit dem Zucker-

Abb. 2. Einfluß der Enzymmenge [ml] auf den Verlauf der Saccharosebildung.

reagens nach TREVELYAN⁵ entwickelt und visuell bewertet. Es ergab sich zum Beispiel für die Versuche mit 0,45 und 0,6 ml Enzym, daß im abfallenden Teil der Kurve die noch vorhandene Raffinosemenge relativ gering war. Möglicherweise ist also eine zu niedrige Raf-

finosekonzentration für den Abfall verantwortlich. Die freie Fructose tritt mit zunehmender Zeit und steigender Enzymmenge in immer stärkerem Maße auf. Es legt dies den Gedanken nahe, daß die Transfructosylierung und die Hydrolyse vielleicht Fähigkeiten eines einzigen Enzyms in der „levansucrase“ sind. Ähnliches konnte für eine Reihe von Glycosidasen (Invertase, Lactase, Cellobiase etc.) bewiesen werden⁶.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde für die Synthese der positionsmarkierten Saccharose das Verhältnis von Glucose zu Raffinose wie 1 : 10 gewählt. Die Enzymkonzentration entsprach ungefähr dem Versuch mit 0,3 ml in Abb. 2. Der Ansatz enthielt in 6 ml Gesamtvolumen 2 ml Enzym, 2 ml Puffer, 0,1 ml Toluol, 138 μ Mole Raffinose und 13,8 μ Mole Glucose-1-¹⁴C (spez. Aktivität 7,2 μ C/ μ Mol). Nach 36 Std. Inkubation bei Zimmertemperatur wurde die Probe im Luftstrom eingengt, in 35 Streifen von 6 cm Länge auf Whatman Nr. 1 aufgetragen und in Butanol/Propionsäure/H₂O eindimensional chromatographiert. In diesem Lösungsmittel werden alle an der Reaktion beteiligten Zucker einwandfrei getrennt. Die nicht umgesetzte Glucose wird daher in unveränderter spez. Aktivität und Reinheit zurückgewonnen. Die erhaltene Saccharose (ungefähr 37 μ C) wurde vom Papier eluiert und nochmals chromatographiert. Kleine Anteile davon wurden in 6 Lösungsmittelsystemen mit authentischem Material cochromatographiert. Dabei deckten sich Radioaktivität und Substanzfleck stets vollkommen. Nach der Behandlung mit melibiosefreier Invertase ergab sich, daß die Radioaktivität ausschließlich in der Glucose enthalten ist.

⁵ W. E. TREVELYAN, D. D. PROCTER u. J. S. HARRISON, Nature

[London] **166**, 444 [1950].

⁶ J. EDELMAN, Advances in Enzymol. **17**, 189 [1956].

Stoffwechseluntersuchungen an Pflanzen mit ¹⁴C

Von W. HÄUSSERMANN und W. RENTSCHLER

Institut für Physik und Meteorologie der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim

(Z. Naturforsch. **17 b**, 699—701 [1962]; eingegangen am 16. März 1962)

Zur Erprobung einer Meßanordnung zur Untersuchung der Abgabe von Kohlenstoffverbindungen bei Pflanzen mit Hilfe ¹⁴C-markierten Kohlenstoffs wurde die Ausscheidungsgeschwindigkeit von frisch aufgenommenem ¹⁴CO₂ bei einem etwa 50 cm hohen im Gewächshaus angezogenen jungen Apfelbaum (*Pirus malus*) untersucht.

Zum Einbau des markierten Kohlenstoffes^{1, 2} wurden die oberirdischen Teile der Versuchspflanze in einen Polyäthylen-Beutel von 20 l Inhalt eingeschlossen. In diesen Beutel wurde das aus einer Na₂¹⁴CO₃-Lösung entwickelte markierte CO₂ eingebracht. Die ins-

gesamt zugeführte ¹⁴C-Aktivität betrug 0,5 mc. Dabei waren 60% der eingebrachten CO₂-Moleküle markiert. In diesem Beutel blieb die Pflanze eine halbe Stunde. Während dieser Zeit wurde sie mit 20 000 Lux (zwei Osram Concentra-Lampen 150 W und Wasserfilter 5 cm) beleuchtet. Daraufhin wurde die Pflanze eine halbe Stde. im Freien ohne Beutel aufgestellt, damit eventuell nur oberflächlich adsorbiertes ¹⁴CO₂ abgegeben werden konnte. Dann wurde die ganze Pflanze mit einem neuen Polyäthylen-Beutel von 20 l Inhalt umkleidet, durch den während des weiteren Versuches Außenluft mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit (12 l/h) gesaugt wurde. Der Pflanze wurden dabei 2 mg CO₂ pro Stde. und dm² Blattfläche zugeführt. Die Luftfeuchtigkeit in der Kammer betrug ständig 100 Prozent. Die ¹⁴C-Aktivität der abgesaugten Luft wurde nach deren Trocknung mit konzentrierter Schwefelsäure in einer Ionisationskammer von 200 cm³ Inhalt bestimmt. Zur Messung des Ionisationsstromes diente ein Schwingkondensator-Verstärker, dessen Ausgangsspannung mit einem elektronischen Kompensographen registriert wurde. Sowohl die Blatt- und Umgebungstempe-

¹ D. SAUERBECK, Atompraxis **6**, 221 [1960].

² H. W. SCHARPENSEEL, Landwirtsch. Forsch. **14**, 42 [1961].