

# ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«  
HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

83. JAHRGANG 1971  
HEFT 15  
SEITE 553–594

## Zur anomalen Temperaturabhängigkeit enzymkatalysierter Reaktionen<sup>[\*\*]</sup>

Von Gerhard Talsky<sup>[\*]</sup>

In der Literatur sind für eine Reihe von Enzym-Reaktionen im  $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm „Knicke“ oder Kurven beschrieben worden. Wählt man bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit hinreichend kleine Temperaturintervalle (TKI-Technik), so ergibt sich stattdessen ein Kurvenzug. Dabei kann man Bereiche linearen Verlaufes und solche anomalen Verhaltens unterscheiden. – Es wurde geprüft, welchen Einfluß z. B. pH-Wert, Ionenstärke und Salzzusätze sowie die Größe der Enzym- und Substratmoleküle auf die Anomalien haben. Die anomale Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit erwies sich als besonders empfindlicher Indikator für das Reaktionsgeschehen am Enzym. Offenbar wird der Reaktionsablauf schon durch relativ kleine Konformationsänderungen, vor allem in der Umgebung des aktiven Zentrums, beeinflußt.

### 1. Einleitung

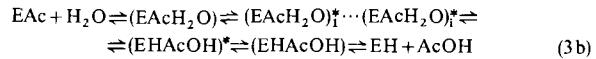
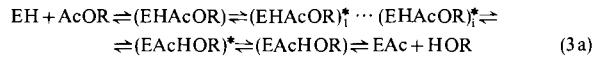
Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante  $k$  chemischer Reaktionen wird allgemein durch die Arrhenius-Gleichung [Gl. (1) und (2)] beschrieben:

$$k = A e^{-E_{exp}/RT} \quad (1)$$

$$\ln k = \ln A - E_{exp}/RT \quad (2)$$

Wenn man beim Auftragen von  $\ln k$  gegen  $1/T$  nach Gl. (2) eine Gerade erhält, so kann aus deren Anstieg die experimentelle Aktivierungsenergie  $E_{exp}$  berechnet werden. In  $E_{exp}$  geht bei einfachen Reaktionen neben der wahren Aktivierungsenergie die Temperaturabhängigkeit aller Reaktionsparameter ein.

Enzymreaktionen sind jedoch keine einfachen Reaktionen, sondern setzen sich aus einer Folge von Teilschritten zusammen. Schematisch lässt sich beispielsweise die enzymatische Spaltung eines Esters nach Gl. (3) darstellen:



Das Enzym (EH) und der Acylester (AcOR) bilden primär einen Adsorptionskomplex, den Michaelis-Komplex, der durch Konformationsänderung aktiviert wird. Hierauf bildet sich über mindestens zwei Stufen<sup>[11]</sup> das Acylenzym (EAc), das man unter günstigen Bedingungen sogar isolieren kann. EAc wird dann in Gegenwart von Wasser wieder über einige Reaktionsschritte in den Enzym-Produkt-Komplex (EHAcOH) übergeführt, der schließlich nach Desaktivierung und Rückbildung der ursprünglichen Konformation des Enzyms in das Produkt (AcOH) und das Enzym zerfällt, welches in einen neuen Zyklus eintreten kann.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  nimmt bei solchen zusammengesetzten Reaktionen einen komplexen Wert an und setzt sich dann aus den einzelnen Geschwindigkeitskonstanten der Teilschritte zusammen. Trotzdem sollten auch in diesem Fall die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Bruttoreaktion  $k_{br}$  sowie die dazu proportionale Bruttoreaktionsgeschwindigkeit  $v_{br}$  der Arrhenius-Gleichung gehorchen. Nun wurden aber auch Enzym-Substrat-Systeme beschrieben, bei denen dies

[\*] Priv.-Doz. Dr. G. Talsky  
Institut für Technische Chemie der Technischen Universität  
8 München 2, Arcisstraße 21

[\*\*] Aus der Habilitationsschrift G. Talsky, „Zum anomalen Temperaturverhalten von Enzymreaktionen“, Technische Universität München 1969.

nicht zutrifft; die wichtigsten Enzyme sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Beispiele für Enzyme aus Enzym-Substrat-Systemen, deren Reaktionsgeschwindigkeit anomal von der Temperatur abhängt.

<i>Oxidoreduktasen</i>
Alkohol-Dehydrogenase [2]
Bakterien-Dehydrogenase [3]
L-Amino-Oxidase [4]
Xanthin-Oxidase [5, 6]
<i>Transferasen</i>
Phosphorylase [7]
Lävansaccharase [8]
<i>Hydrolasen</i>
Acetylcholin-Esterase [9]
Lipase [10, 11]
Trypsin [11]
Chymotrypsin [10]
Cathepsin [10]
Papain [12]
Myosin-ATPase [13, 14]
Urease [15-17]
Invertase [11]
<i>Lyasen</i>
Fumarase [18, 19]

Prinzipiell wurden zwei Arten von Anomalien unterschieden, nämlich konvexe Kurven (kontinuierlicher Übergang von einer Aktivierungsenergie zu einer anderen) wie z.B. bei Acetylcholin-Esterase<sup>[9]</sup> und zwei sich schneidende Geraden (sprunghafter Wechsel zweier Aktivierungsenergien) wie z.B. bei Pankreas-Lipase<sup>[10, 11]</sup>, Trypsin<sup>[11]</sup> und Invertase<sup>[11]</sup>.

Den konvexen Verlauf der Kurve, den man beim Auftragen von  $\log v_{br}$  gegen  $1/T$  erhält, führten Wilson und Cabib<sup>[9]</sup> bei Acetylcholin-Esterase darauf zurück, daß bei niedrigen Temperaturen die Acetylierung, bei höheren Temperaturen die Desacetylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Stern<sup>[20]</sup> hat für solch einen Kurventyp zwei Folgereaktionen mit unterschiedlichen Temperaturkoeffizienten diskutiert.

Dagegen lassen sich scharfe „Knicke“ im Arrhenius-Diagramm mit den üblichen kinetischen Vorstellungen nicht erklären. Nach Kistiakowsky<sup>[34]</sup>, der sich mit der anomalen Temperaturabhängigkeit von Reaktionen der Urease kritisch auseinandersetzte, müßten sich nämlich die Aktivierungsenergien der beiden Reaktionen um etwa 200 kcal/mol unterscheiden, wenn man den „Knick“ auf einen Bereich von 2°C begrenzt. Er hält deshalb nur die gekrümmte Kurve, nicht aber die scharfen Knicke für reell. Die Anomalien erklärt Kistiakowsky durch ein Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Form des Enzyms.

## 2. Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit in kleinen Temperaturintervallen

Aus den in der Literatur zitierten Beispielen anomaler Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit wählten wir als erstes das System Pankreas-Lipase – Tri-

butyrin<sup>[\*]</sup> aus. Bestimmt man, wie bisher üblich, die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Glycerinestern durch Lipase in Abständen von 5 bis 10°C, so erhält man Meßpunkte, durch die sich im  $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm je nach Interpretation sowohl zwei sich schneidende Geraden als auch ebensogut eine gekrümmte Kurve legen lassen<sup>[21]</sup> (Abb. 1 a). Um aber zu genaueren Aussagen über den Verlauf der Kurven, besonders im Gebiet des Überganges der beiden Geraden, zu gelangen, ermittelten wir die Reaktionsgeschwindigkeit in kleineren Abständen, etwa

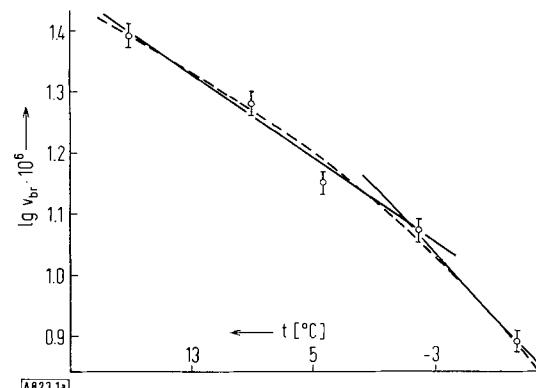


Abb. 1a. Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von Tributyrin durch Lipase aus Schweinepankreas. Bedingungen: [Substrat] =  $27.3 \cdot 10^{-2}$  mol  $l^{-1}$ , [Natriumtaurocholat] =  $5.95 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$ ,  $[CaCl_2] = 2.4 \cdot 10^{-2}$  mol  $l^{-1}$ ,  $[NH_4Cl] = 1.2 \cdot 10^{-2}$  mol  $l^{-1}$ , Glykol =  $4.7 \text{ mol l}^{-1}$ , 1 mg Lipase-Eiweiß  $l^{-1}$ , pH = 8.12, Temperaturintervalle 4 – 7°C.

1 bis 2°C (TKI-Technik), und registrierten sie auch kontinuierlich während gleichzeitiger, stetiger Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur.

Die sorgfältige Auswertung der Meßergebnisse führte zu einem anfangs überraschendem Ergebnis. In den jeweiligen „kritischen Temperaturbereichen“ der Kurve ergab sich nämlich ein wellenförmiger Verlauf<sup>[21 – 23]</sup> (Abb. 1 b). Er-

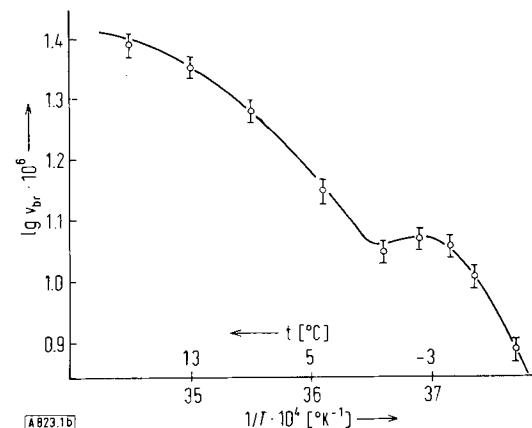


Abb. 1b. Bedingungen wie bei Abb. 1a, jedoch Temperaturintervalle 1 – 2°C.

faßt man auf gleiche Weise ein größeres Temperaturgebiet, so erhält man einen Wellenzug, dessen gut reproduzierbare Abweichungen von der durchgelegten Ge-

[\*] Tributyrin ist Glycerin-tributyrat.

raden deutlich außerhalb des Fehlerbereiches von maximal  $\pm 4\%$  liegen (Abb. 2)<sup>[22, 23]</sup>.

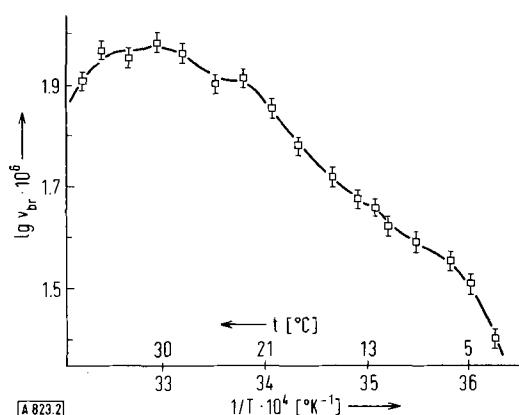


Abb. 2. Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von Tributyryl durch Lipase aus Schweinepankreas. Bedingungen:  $[\text{Substrat}] = 20.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $[\text{Glykol}] = 3.59 \text{ mol l}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 8.10$ ,  $1 \text{ mg Lipase-Eiweiß l}^{-1}$ .

Zur automatischen Registrierung der Zeit-Umsatz-Kurven verwendeten wir einen Autotitrierator (Firma Radiometer, Kopenhagen) mit Glas-Kalomel-Elektroden<sup>[22]</sup>. Bei konstantgehaltenem pH-Wert (pH-stat) wurde die freiwerdende Säure mit  $0.02 \text{ N NaOH}$  unter Stickstoff automatisch titriert. Auf diese Weise ließen sich die Anfangsgeschwindigkeiten  $v_0$  ermitteln.

Die Realität der von uns festgestellten Anomalien wurde auf verschiedene Art bewiesen:

- Die Abweichungen einiger Meßpunkte von einer durchgelegten Geraden waren weitaus größer als die ermittelten experimentellen Fehler<sup>[23]</sup>,
- die Abweichungen waren bei Verwendung gleicher Enzympräparationen gut reproduzierbar<sup>[24, 27]</sup>,
- auch bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung nahm die Reaktionsgeschwindigkeit nicht nach einer e-Funktion stetig zu, sondern wies Diskontinuitäten auf<sup>[21]</sup>, und schließlich
- verlief die Hydrolyse des Substrates *ohne Enzym* normal nach Arrhenius.

Die Frage, warum solche Effekte nicht früher beobachtet wurden, kann folgendermaßen beantwortet: Bei den üblichen kinetischen Messungen beschränkte man sich meist auf die Ermittlung einiger Meßpunkte in größeren Abständen, um daraus die Aktivierungsenergie zu berechnen; größere Abweichungen wurden als Fehler gewertet und blieben unbeachtet. Hinzu kommt die Durchführung der Reaktion in Gegenwart größerer Mengen von Puffern oder Salzen. Gerade dadurch werden aber die Anomalien vielfach unterdrückt. Es wird deshalb durchaus verständlich, daß beispielsweise weder Bender et al.<sup>[35]</sup> am Acetyltrypsin noch Follmann et al.<sup>[36]</sup> bei Ribonuclease anomale Kurven beobachteten.

Nachdem nun die anomale Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von Tributyryl durch Lipase feststand, wurde im folgenden geprüft, wieweit sich die Anomaliebereiche durch Variation der Reaktionsbedingungen und Systeme beeinflussen lassen, um Näheres über die Ursache und den Grund dieses Phänomens zu erfahren.

### 3. Beeinflussung der Anomaliebereiche

#### 3.1. Molekülgröße von Enzym und Substrat

Vergleicht man die anomale Temperaturabhängigkeit von Reaktionen der Urease (Mol.-Gew. 473000<sup>[24]</sup>) und Xanthin-Oxidase (Mol.-Gew. 290000<sup>[25]</sup>) mit der von Papain (Mol.-Gew. 20700<sup>[26]</sup>), Trypsin (Mol.-Gew. 23800<sup>[21, 27]</sup>) und Chymotrypsin (Mol.-Gew. 21000<sup>[21, 27]</sup>), so kann man feststellen, daß bei Enzymen mit höheren Molekulargewichten der fast als „harmonisch oszillierende Kurve“ anzusprechende Verlauf bei niedrigeren Molekulargewichten unregelmäßiger wird. Das gleiche gilt für die Substrate. Verwendet man beispielsweise zusätzlich bei Trypsin und Chymotrypsin nicht das hochmolekulare, selbst strukturierte Casein, sondern  $N^{\alpha}$ -Benzoyl-L-argininamid,  $N^{\alpha}$ -Benzoyl-L-arginin-äthylester sowie Tyrosin-äthylester als Substrat, so treten zwischen Abschnitten anomalen Verhaltens auch lineare Bereiche auf. Dies gilt ebenso für das System Ribonuclease – cycl. Cytidin-2',3'-monophosphat<sup>[28]</sup>. Offenbar trennen sich bei Verwendung von Enzymen mit verhältnismäßig niedrigem Molekulargewicht und einfachen, niedermolekularen Substraten die Bereiche normaler und anomaler Temperaturabhängigkeit. Solche Systeme eignen sich wegen ihrer größeren Übersichtlichkeit besser zur Untersuchung der Anomalien. Abbildung 3 möge dies am Beispiel von Trypsin und Xanthin-Oxidase veranschaulichen.

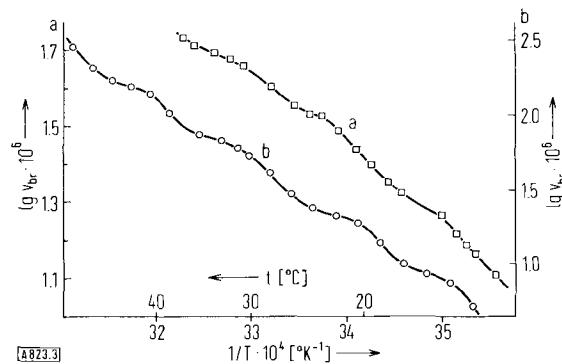


Abb. 3. Kurve a: Temperaturabhängigkeit der Spaltung von  $N^{\alpha}$ -Benzoyl-L-arginin-äthylester durch Trypsin. Bedingungen:  $[\text{Substrat}] = 3.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $[\text{Trypsin}] = 1 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 9.6$ . – Kurve b: Temperaturabhängigkeit der Oxidation von Salicylaldehyd durch Xanthin-Oxidase. Bedingungen:  $[\text{Salicylaldehyd}] = 1.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $[\text{Phosphatpuffer, pH} = 7.4] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $[\text{Methylenblau}] = 6.25 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $[\text{Xanthin-Oxidase}] = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### 3.2. Modifizierte Enzyme

Aus Arbeiten der vergleichenden Biochemie weiß man, daß sich homologe Proteine und Enzyme je nach Individuum, Organ oder Herkunft – Tier, Pflanze, Bakterium oder Pilz – meist geringfügig in ihren physikalischen oder immunologischen Eigenschaften unterscheiden. Während das aktive Zentrum und gewisse Teile des Moleküls bei allen Spezies identisch sind, treten an anderen Stellen des Moleküls Abweichungen in der Aminosäuresequenz auf<sup>[29]</sup>. Man kann derartige Enzyme somit als einfachste natürlich modifizierte Enzyme ansprechen.

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit solcher Enzyme, beispielsweise Trypsin aus Schweine-

und aus Rinderpankreas, zeigt zwar die gleiche „Grundcharakteristik“ der Kurven, jedoch lassen sich die Enzyme trotz der geringen strukturellen Unterschiede auf relativ einfache Weise mit der TKI-Methode charakterisieren (Abb. 4, Kurven a und c)<sup>[21]</sup>. Auch partiell autolysiertes Trypsin (Mol.-Gew. 17500), bei dem ein Teilstück der Sequenz (Mol.-Gew. 6000) – aber nicht aus der Umgebung des aktiven Zentrums – herausgespalten wurde<sup>[30]</sup>, kann auf diese Weise deutlich unterschieden werden, obwohl derart modifiziertes und natives Enzym praktisch die gleiche spezifische Aktivität besitzen (Abb. 4, Kurve b).

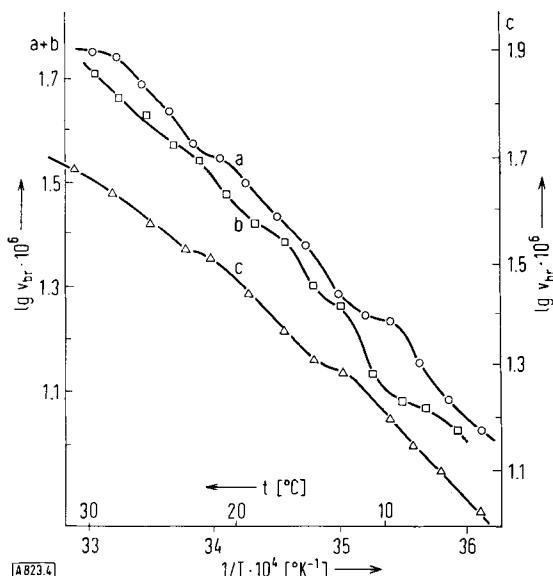


Abb. 4. Kurve a: Temperaturabhängigkeit der Spaltung von *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-L-arginin-äthylester durch Schweinetrypsin. Bedingungen: [Substrat] =  $3.8 \cdot 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>, [Trypsin] = 1 mg l<sup>-1</sup>, pH = 9.6. – Kurve b: wie a, jedoch teilautolysiertes Rindertrypsin vom Mol.-Gew. 17500 [30]. – Kurve c: wie a, jedoch natives Rindertrypsin.

Zu ähnlichen Resultaten gelangt man bei der Untersuchung von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Chymotrypsin<sup>[31]</sup>.

Die chemische Modifizierung, soweit sie nicht das aktive Zentrum betrifft, wirkt sich analog auf die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit aus. So konnte am Chymotrypsin, bei dem zwei der insgesamt drei terminalen Aminogruppen mit Fluorescein-isothiocyanat umgesetzt wurden, gezeigt werden, daß eine Veränderung des Moleküls selbst weit entfernt vom aktiven Zentrum die Anomaliebereiche beeinflußt. Das gleiche gilt, wenn man beim teilautolysierten Trypsin die gegenüber nativem Trypsin zusätzlich auftretende terminale Aminogruppe substituiert oder das Enzym acetyliert<sup>[21, 31]</sup>.

Bindet man jedoch Trypsin adsorptiv oder kovalent an hochmolekulare Träger wie z. B. *p*-Aminobenzylcellulose, so erhält man zwischen 10 und 50°C praktisch eine Gerade im lg v<sub>br</sub>/1/T-Diagramm<sup>[32]</sup>.

### 3.3. Einflüsse des Reaktionsmediums

#### 3.3.1. Homogene und heterogene Phase

Bei den Arbeiten über Pankreas-Lipase wurde eine starke Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Ver-

teilung des in Wasser schwerlöslichen Glycerinesters beobachtet<sup>[23]</sup>. Es war deshalb nicht auszuschließen, daß die Anomalien damit im Zusammenhang stehen. Da aber auch Systeme mit Tween 20 (einem gut wasserlöslichen Laurylsorbitanpolyäthylenglykoläther) als Substrat anomale Temperaturabhängigkeit zeigen, ist bewiesen, daß die Verteilung des Substrats dafür keine Bedeutung hat. Dies wurde auch durch die späteren Versuche mit anderen Enzym-Substrat-Systemen bestätigt, die alle in homogener Phase abliefen.

#### 3.3.2. pH-Wert des Reaktionsmediums

Die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen hängt meist stark vom pH-Wert der Lösung ab, was dem unterschiedlichen Ladungszustand der für die Katalyse wichtigen Aminosäuren im aktiven Zentrum zugeschrieben wird. Wir hatten bereits bei der Pankreas-Lipase<sup>[23]</sup> beobachtet, daß eine Erhöhung des pH-Wertes – unabhängig vom pH-Optimum der Enzym-Reaktion –  $\vartheta_A$  nach niedrigeren Temperaturen verschiebt<sup>[1]</sup>. Gleichzeitig war mit abnehmendem pH-Wert eine stärkere Ausprägung des Anomaliebereiches verbunden. Bei den Systemen Trypsin – Casein sowie Trypsin – *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-L-arginin-äthylester nahm jedoch die Amplitude der Kurve mit abnehmendem pH-Wert ab. Berücksichtigt man, daß der isoelektrische Punkt von Lipase bei pH = 5.2, der von Trypsin bei 10.8 liegt, so wird dieses scheinbar konträre Verhalten verständlich. Offensichtlich tritt – unabhängig vom pH-Optimum der Enzym-Reaktion – die Anomalie in der Nähe des isoelektrischen Punktes verstärkt auf.

#### 3.3.3. Salzgehalt der Reaktionslösung

Anionen und Kationen üben auf enzymatische Prozesse in vielen Fällen einen mehr oder weniger großen Einfluß aus. Bei niedrigen Salzkonzentrationen kann es durch spezifische Wirkung auf das aktive Zentrum sowohl zu einer Beschleunigung als auch zu einer Hemmung der Reaktion kommen<sup>[21]</sup>. Größere Mengen von Ionen führen dagegen zusätzlich zu einem unspezifischen Aktivitätsverlust sowie schließlich zu Denaturierung und Ausfällung des Proteins. Wir haben deshalb – wenn immer möglich – bei unseren Bestimmungen auf Puffer und Salze verzichtet. Die wenigen zur Einstellung des pH-Wertes in das System gebrachten Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen störten bei den untersuchten Reaktionen nicht und konnten deshalb vernachlässigt werden.

Bei Pankreas-Lipase wurde eine Verschiebung von  $\vartheta_A$  durch Salzzusätze registriert<sup>[23]</sup>. Am System Trypsin – *N*<sup>α</sup>-Benzoyl-L-arginin-äthylester konnten diese Effekte wegen der einfacheren und übersichtlicheren Reaktion noch im besser verfolgt werden<sup>[21]</sup>. Beispielsweise verschieben 0.1 mol/l NaCl die linearen Teilstücke der Kurve fast parallel. Dies läßt auf die Nichtbeeinflussung des Reaktionsgeschehens außerhalb der Anomaliebereiche schließen. Dagegen liegt  $\vartheta_A$  nicht immer an der gleichen Stelle.

[\*] Mit  $\vartheta_A$  wurde diejenige Temperatur bezeichnet, bei der die Abweichung von der „Arrhenius-Geraden“ beginnt.

Anders verhält sich Trypsin, wenn man in Gegenwart von 0.03 mol/l  $\text{CaCl}_2$  arbeitet, dessenaktivitäts- und stabilitiessteigernde Wirkung hinlänglich bekannt ist. In diesem Fall wird außer der Verschiebung von  $\theta_A$  noch eine unterschiedliche Steilheit der Linearabschnitte beobachtet, was darauf hindeutet, daß das Calcium-Ion zusätzlich auf den katalytischen Vorgang einwirkt.

Das System Ribonuclease – cycl. Cytidin-2',3'-monophosphat spricht auf Salze noch empfindlicher an. Dies drückt sich z. B. in der Zunahme der negativen optischen Drehung einer 1.295-proz. wäßrigen Lösung des Enzyms von  $\alpha_{23}^{365} = -3.275^\circ$  (ohne  $\text{NaCl}$ ) auf  $-3.295^\circ$  (0.03 mol/l  $\text{NaCl}$ ) aus; bei weiterer Natriumchlorid-Zugabe bleibt die optische Drehung konstant (bis 0.1 mol/l geprüft)<sup>[21, 33]</sup>. Interessanterweise werden aber mit Zunahme der negativen optischen Drehung durch Salzzugabe die Anomalien schwächer und verschwinden bei einer Konzentration von 0.1 mol/l schließlich ganz; hier resultiert eine Gerade im  $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm. Im vorliegenden Fall zumindest gehen die Strukturänderungen, die sich in der Änderung der optischen Drehung ausdrücken, mit dem Auftreten von Anomalien konform.

### 3.4. Partielle Denaturierung

Weitere Informationen über die anomale Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit hofften wir durch vorsichtige Denaturierung der Enzyme zu erhalten, wobei wir erwarteten, die Struktur des Proteins zwar zu verändern, die Aktivität jedoch nicht allzusehr herabzusetzen.

Inkubiert man Pankreas-Lipase längere Zeit bei 0°C und verfolgt dabei sowohl die Aktivität des Enzyms als auch die Temperaturabhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit, so kann man schließlich bei 69.3% Restaktivität keinerlei Anomalie mehr zwischen 10 und 25°C feststellen<sup>[23]</sup>. Zur Kontrolle untersuchten wir auch ein Gemisch aus 70% nativem und 30% völlig denaturiertem Enzym. In diesem Fall blieben die Anomalien vollständig erhalten, und bei Umrechnung auf gleiche Konzentrationen an aktivem Enzym ergaben sich praktisch deckungsgleiche Kurven.

Bei der Hydrolyse von Casein durch Trypsin ließ sich der Einfluß der Denaturierung noch deutlicher beobachten. Inkubiert man das Enzym 30 min bei 50°C, so sind die Amplituden des Kurvenzuges höher als beim 15 min langen Inkubieren oder bei natürlichem Enzym; dagegen ergibt sich beim 60 min langen Erwärmten auf 50°C eine Kurve, die zwischen 5 und 20°C normal verläuft und ein Temperaturoptimum bei 13°C aufweist<sup>[21]</sup>.

Zuletzt sei noch auf Versuche in Gegenwart von 6 mol/l Harnstoff hingewiesen. Der zugesetzte Harnstoff löst Wasserstoffbrücken und ändert die Solvationsverhältnisse des Moleküls, was zur Auffaltung und partiellen Denaturierung des Proteins führt. Wir fanden entsprechend im  $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm nur eine gekrümmte Kurve und nicht die charakteristische anomale Temperaturabhängigkeit vor<sup>[21]</sup>.

### 4. Diskussion der Anomalien

Das von uns erstmalig an Lipase aufgefundene anomale Temperaturverhalten der Reaktionsgeschwindigkeit<sup>[22, 23]</sup> konnte inzwischen an insgesamt 29 Enzym-Substrat-Systemen beobachtet werden. Aus den zumindest in Teilbereichen auftretenden Abweichungen vom nach Arrhenius erwarteten linearen Verlauf muß man schließen, daß die Voraussetzungen für die Arrhenius-Gleichung – nämlich die Temperaturabhängigkeit von  $E_{exp}$  und/oder die unveränderten räumlichen Verhältnisse am Reaktionsort und in dessen unmittelbarer Umgebung (sterischer Faktor) – in diesen Fällen nicht erfüllt sind.

Nehmen wir beispielsweise an, das Enzym würde gleichzeitig in zwei verschiedenen aktiven, nicht ineinander übergehenden Formen vorliegen, zwei die Reaktion mit verschiedenen Aktivierungsenergien katalysierende aktive Zentren besitzen oder zwei verschiedene aktivierte Enzym-Substrat-Komplexe bilden können. Unterscheiden sich die beiden Parallelreaktionen in ihrer Temperaturabhängigkeit, dann wird bei höheren Temperaturen die Reaktion mit der größeren Aktivierungsenergie vorherrschen. Im  $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm hätte man dann eine konkave Kurve, aber keine konvexe Kurve zu erwarten. Dies ist aber gerade das Gegenteil von dem, was bisher – mit einer Ausnahme – bei den Anomalien beschrieben wurde. Nur Massey<sup>[18]</sup> gibt für die fumarase-katalysierte Hydratation von Fumarat für pH-Werte oberhalb des pH-Optimums, also pH=7, bei Temperaturen über 18°C eine Aktivierungsenergie von 8.8 kcal/mol an, während er unterhalb 18°C nur 5.8 kcal/mol findet. Patat und Kolb<sup>[19]</sup> erhielten im Gegensatz dazu keine anomale Kurve; sie konnten die von Massey gefundenen Abweichungen durch die Temperaturabhängigkeit des Extinktionskoeffizienten des Fumarates (4% pro 10°C) erklären. Bei Anbringen dieser Korrektur resultiert dann für pH=7.8 (Phosphatpuffer) eine einheitliche Aktivierungsenergie von 7.3 kcal/mol.

Auf diese Weise kann man zwar die beschriebenen Anomalien mit kontinuierlichem Übergang erklären, nicht aber den „Knick“ (Schnittpunkt zweier Geraden), viel weniger noch den Kurvenzug, den wir mit der TKI-Technik fanden.

Bei der enzymatischen Lävanbildung haben Ebert et al.<sup>[18]</sup> den beobachteten Knick im Arrhenius-Diagramm der Aufbaureaktion mit der Annahme gedeutet, daß sich die Gesamtreaktion aus gleichzeitig ablaufenden Teilreaktionen zusammensetzt. Mit dieser „gekoppelten Simultanreaktion“ kann man aber nur solche Knickpunkte erklären, die zu niedrigeren Temperaturen hin die größeren Werte der Aktivierungsenergie anzeigen; Wellenzüge lassen sich damit nicht deuten.

Als Grund des anomalen Verhaltens haben wir nach den ersten experimentellen Befunden<sup>[22]</sup> die Konformationsänderung des Enzyms und damit des Enzym-Substrat-Komplexes zumindest in der Umgebung des aktiven Zentrums, die vergleichbar mit einer reversiblen Phasenumwandlung abläuft, angesehen. Die späteren Ergebnisse stützen und rechtfertigen diese Deutung.

Läßt man natives und modifiziertes Enzym, deren aktive Zentren sich nicht unterscheiden, auf das gleiche Sub-

strat einwirken, so müßte bei gleichem Reaktionsmechanismus auch die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit gleich sein – vorausgesetzt, der übrige Teil des Enzymmoleküls ist für die Anomalien unwichtig. Da die erhaltenen Kurven sich aber unterscheiden, muß man Konformationseinflüsse zur Erklärung heranziehen.

Es konnte bei der Hydrolyse von cycl. Cytidin-2',3'-monophosphat durch RNase auch ein Zusammenhang zwischen der optischen Drehung und den Anomalien im  $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm nachgewiesen werden<sup>[21, 28, 33]</sup>. Untersuchungen an Trypsin gaben uns ähnliche Hinweise; allerdings lagen die beobachteten anomalen Drehungs- und pH-Änderungen an der Grenze der Meßgenauigkeit. Es gelang bisher noch nicht, ähnliche Zusammenhänge mit der Rotationsdispersion, der Fluoreszenz, der DK-Dispersion sowie dem Verhalten bei der Differentialthermoanalyse sicher nachzuweisen.

Nach diesen Ergebnissen kann es sich nur um geringe Konformationsänderungen, vielleicht sogar nur um die Lageänderung weniger Aminosäuren handeln. Nach Abschätzung unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit der angewendeten Methoden ist eine Änderung der Achsenverhältnisse des globulären Proteins um weniger als 5% zu erwarten.

Aus den Befunden, daß teildenaturierte Enzyme normale Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen, sowie aus den Modifizierungsversuchen leitet sich der nur *mittelbare* Zusammenhang zwischen der eigentlichen Katalyse und dem die Anomalie verursachenden Vorgang ab. – Auch bei pH-Änderung fallen das Maximum der Enzym-Aktivität und die stärkste Ausprägung der Anomaliebereiche nicht zwingend zusammen. Man geht deshalb wohl nicht fehl, wenn man die Ursache an der Bindungsstelle des Substrates und in deren Umgebung sucht.

Nimmt man beim System Trypsin- $N^{\alpha}$ -Benzoyl-L-arginin-äthylester die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  bei verschiede-

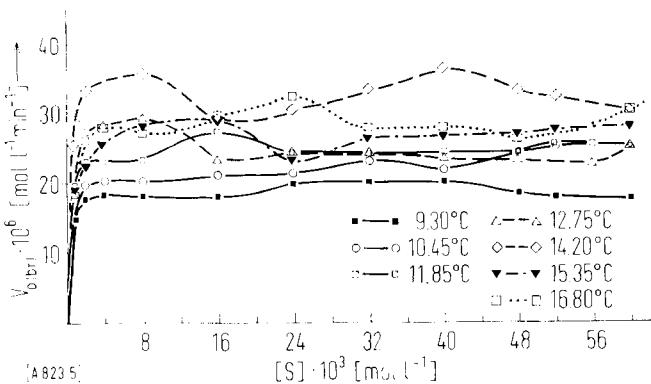


Abb. 5. Abhängigkeit der Hydrolyse von  $N^{\alpha}$ -Benzoyl-L-arginin-äthylester (=S) durch Trypsin von der Substratkonzentration bei 9.30, 10.45, 11.85, 12.75, 14.20, 15.35 und 16.80°C. Bedingungen: [Substrat] =  $1 \cdot 10^{-3}$  bis  $60 \cdot 10^{-3}$  mol l $^{-1}$ , [Trypsin] = 1 mg l $^{-1}$ , pH = 9.59.

nen Temperaturen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration [S] auf, so sollte man erwarten, daß die erhaltenen „Michaelis-Kurven“ mit steigender Temperatur synchron übereinander liegen. Man findet dagegen bei 15.35°C durchwegs niedrigere  $v_0$ -Werte als bei 14.20 und 16.80°C (Abb. 5)<sup>[21]</sup>. 15.35°C liegt aber genau im Anomalie-

bereich der Gesamtreaktion<sup>[\*]</sup>. Wir sehen dies als weiteren Beweis dafür an, daß die Anomalien durch Änderungen im Enzym-Substrat-Komplex zustande kommen.

Wie aus Abbildung 5 weiter ersichtlich, handelt es sich hier um ein Enzym-Substrat-System, bei dem die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration nicht der Michaelis-Menten-Beziehung gehorcht. Will man die Michaelis-Konstante  $K_m$ <sup>[\*\*]</sup> berechnen, so kann man nur den Kurven-Abschnitt im Bereich geringer Substratkonzentrationen heranziehen, da bei höheren Konzentrationen der Verlauf von der normalen „Michaelis-Kurve“ stark abweicht. Die experimentelle Maximalgeschwindigkeit liegt also dort weit unter der aus dem Dixon-Diagramm berechneten. Dies wurde auch an anderen Enzym-Substrat-Systemen wie Lipase – Triglyceride<sup>[23]</sup>, Xanthin-Oxidase – Aldehyde<sup>[25]</sup>, Urease – Harnstoff<sup>[24]</sup> und Chymotrypsin – Tyrosin-äthylester<sup>[37, 38]</sup> beobachtet, soll jedoch erst nach Abschluß der Untersuchungen diskutiert werden.

Fink und Patat<sup>[38]</sup> geben bei der Hydrolyse von Tyrosin-äthylester durch Chymotrypsin A aufgrund von NMR-Messungen am reagierenden Substrat einen „Knick“ in der Temperaturabhängigkeit des Anlagerungsvorganges des Substrates bei ca. 19°C an. Bei dieser Temperatur hatten wir aber im  $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm der Gesamtreaktion einen der Anomaliebereiche vorgefunden<sup>[21]</sup>. Für die Abreaktion, also für die postulierte Mehrzentrenreaktion, ergibt sich bei gleicher Auftragung dagegen eine Gerade<sup>[38]</sup>.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen wir bei der kinetischen Analyse der Hydrolyse von cycl. Cytidin-2',3'-monophosphat durch RNase (s.u.)<sup>[28]</sup>. Gegenwärtig vorgenommene Versuche zur Esterhydrolyse durch Trypsin, wobei wir die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes, die Acylierung und Desacylierung sowie die Gesamtreaktion unabhängig voneinander untersuchen, sollen die Ursache der Anomalien in diesem System noch genauer lokalisieren<sup>[31]</sup>.

Bei Lipase – Tween 20<sup>[21]</sup> oder RNase – cycl. Cytidin-2',3'-monophosphat<sup>[33]</sup> läßt sich der Verlauf der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration im Gegensatz zu den obigen Beispielen nach Michaelis und Menten beschreiben. Trägt man bei RNase  $K_m$  gegen  $1/T$  auf, so erhält man zwei Geraden verschiedener Steigung mit wellenförmigem Übergang an der gleichen Stelle wie im  $\log v_{br}/1/T$ -Diagramm<sup>[28]</sup>. Mit steigender Substratkonzentration treten die Anomalien immer mehr zurück. Dies ist auch verständlich, da bei Substratsättigung das vorgelagerte Gleichgewicht der Bildung des aktivierte Enzym-Substrat-Komplexes immer weniger Einfluß auf die Bruttoreaktionsgeschwindigkeit hat und diese immer eindeutiger eine Funktion von  $k_{+2}$ , der Ge-

[\*] B. H. Hausteen (Univ. Aarhus, 1969) hat bei Chymotrypsin und Maloamidinochymotrypsin für die Temperaturabhängigkeit sowohl der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit als auch der Michaelis-Konstanten  $K_m$  ähnliche Anomaliebereiche nachweisen können (persönliche Mitteilung).

[\*\*]  $K_m$  ist eine Substratkonzstante, die angibt, bei welcher Substratkonzentration die halbe Maximalgeschwindigkeit vorliegt. Je nach angewandter Theorie kann  $K_m$  durch Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktionen ausgedrückt werden. Nach der Vorstellung von Michaelis und Menten ist z. B.  $K_m = (k_{-1})/(k_{+1})$ , nach Briggs und Haldane  $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/(k_{+1})$ . Modelle, bei denen mehrere Zwischenstufen oder kovalente Zwischenverbindungen formuliert werden, führen zu komplizierteren Ausdrücken (vgl. dazu z. B. [39, 40]).

schwindigkeitskonstante der Abreaktion, wird.  $k_{+2}$  wird im Gegensatz zu  $K_m$  auch im Anomaliebereich durch Temperaturänderung immer nur *stetig* beeinflußt, d.h. bei logarithmischer Auftragung von  $k_{+2}$  gegen  $1/T$  erhält man eine Gerade<sup>[28]</sup>. Entscheidend für die anomale Temperaturabhängigkeit der Gesamtreaktion ist somit der Beitrag, den die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes zum Gesamtgeschehen liefert.

Versuche mit Inhibitoren stützen die obigen Befunde. Beispielsweise zeigen sich im Temperaturprofil der Hemmung von Trypsin mit Sojabohnen-Inhibitor neben normalen auch anomale Bereiche<sup>[31]</sup>. Außerdem ergibt sich für die Konstante  $K_p$  der kompetitiven Produkthemmung von RNase durch das entstehende 3'-Cytidylat bei ca. 22°C – und somit im gleichen Bereich wie bei  $K_m$  – eine Temperaturanomalie<sup>[28]</sup>. Dies deutet darauf hin, daß sich die postulierte geringe Konformationsänderung auf die Bindung des Inhibitors und des Substrates ähnlich auswirkt, wodurch sich der Reaktionsablauf ändert.

## 5. Modell zur Beschreibung der Temperatur-anomalien

Um eine Vorstellung zu gewinnen, welche Annahmen nötig sind, um die experimentell erhaltenen Anomaliebereiche durch ein Modell beschreiben zu können, haben wir beim System Trypsin –  $N^a$ -Benzoyl-L-arginin-äthylester den Kurvenverlauf zwischen 4 und 21°C eingehend geprüft<sup>[21,33]</sup>. Abbildung 6 gibt diesen Teil der Kurve

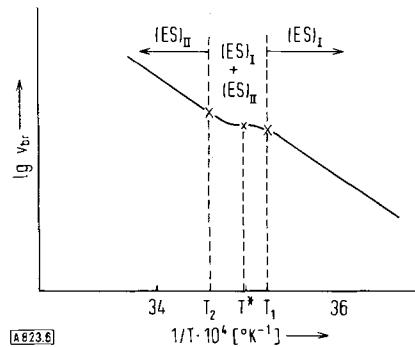


Abb. 6. Anomale Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von  $N^a$ -Benzoyl-L-arginin-äthylester durch Trypsin. Bedingungen:  $[Substrat] = 3.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $[Trypsin] = 1 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $pH = 9.6$ . Weitere Erläuterungen s. Text.

wieder. Setzt man voraus, daß unterhalb  $T_1$  praktisch nur  $(ES)_1$ , oberhalb  $T_2$  nur  $(ES)_2$  vorhanden sind und zwischen  $T_1$  und  $T_2$  beide Formen im Gleichgewicht stehen, so ergibt sich für die Abnahme der Substratkonzentration mit der Zeit, d.h. für die Geschwindigkeit der Hydrolyse

$$-\frac{d[S]}{dt} = A_1 \cdot e^{-(E_{exp})_1/RT} [(ES)_1] + A_2 \cdot e^{-(E_{exp})_2/RT} [(ES)_2], \quad (4)$$

$S$  = Substrat,  $E$  = Enzym,  $(ES)$  = Enzym-Substrat-Komplex,  $E_{exp}$  = experimentelle Aktivierungsenergie.

wobei in diesem Fall  $(E_{exp})_1 = (E_{exp})_2$ , jedoch  $A_1 \neq A_2$  sind. Beschränkt man den Anomaliebereich auf 3.28° mit  $T_1 = 284.9$  und  $T_2 = 288.18^\circ\text{K}$  (11.74 bzw. 15.02°C), so

ergibt sich nach Umformung der van't Hoff'schen Reaktionsisobare für die Enthalpie des Überganges

$$\Delta H = \frac{2.303 R T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{K_{T_2}}{K_{T_1}} \quad (5)$$

Postuliert man weiter, daß die Konzentrationen der Formen I und II bei  $T_1$  0.99 bzw. 0.01, bei  $T_2$  0.01 bzw. 0.99 betragen, so errechnet sich für  $\Delta H$  457.2 kcal/mol, ein Wert, der unverständlich hoch liegt. Ähnlichen Schwierigkeiten begegnete man z.B. bei der Behandlung des Helix-Coil-Überganges von Polypeptiden oder DNA. Man ist deshalb auf die zusätzliche Annahme kooperativer Vorgänge angewiesen. In diesem Fall gilt für die scheinbare Gleichgewichtskonstante

$$K_{app} = K^n \quad (6)$$

wobei  $K$  die Gleichgewichtskonstante des Elementarprozesses und  $n$  die „kooperative Länge“ bedeuten. Für die Geschwindigkeit resultiert dann:

$$-\frac{d[S]}{dt} = v_{br} = e^{-E_{exp}/RT} \left[ A_1 \frac{1}{1 + K_{T_2(app)}} + A_2 \frac{K_{T_2(app)}}{1 + K_{T_2(app)}} \right] \quad (7)$$

wobei

$$K_{T_2(app)} = \exp \cdot \frac{n \Delta H}{R} \left[ \frac{T_2 - T_1}{T_2 T^*} \right] \quad (8)$$

$n$  = kooperative Länge,  $\Delta H$  = Bindungsenthalpie einer kooperativen Bindung oder Wechselwirkung,  $T^*$  = Temperatur, bei der die Konzentrationen von  $(ES)_1$  und  $(ES)_2$  gleich sind ( $K_T = 1$ ).

Setzt man in obigen Ansatz für  $n$  80 und  $\Delta H$  5 kcal/mol ein, so erhält man Punkte, die den experimentell gewonnenen Kurvenverlauf gut wiedergeben (Abb. 7); somit ist zumindest eine formale Beschreibung des Temperaturverhaltens möglich. Allerdings sollte man dann erwarten, daß

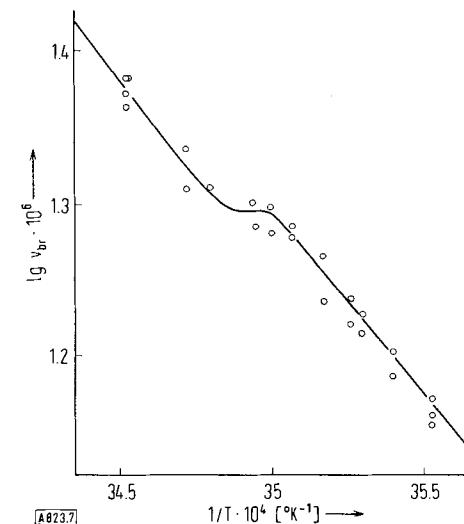


Abb. 7. Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse von  $N^a$ -Benzoyl-L-arginin-äthylester durch Trypsin. Bedingungen:  $[Substrat] = 3.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ ,  $[Trypsin] = 1 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $pH = 9.6$ .

man bei der gewählten „kooperativen Länge“ entgegen den bisherigen Befunden mit physikalischen Methoden (Abschnitt 4) eine deutlichere Strukturänderung nachweisen könnte, sofern sich diese nicht größtenteils auf das Innere des gefalteten Moleküls beschränkt.

## 6. Ausblick

Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeit vieler Enzym-Reaktionen folgt nicht der Arrhenius-Gleichung, sondern gibt sich bei sorgfältiger Messung in kleinen Temperaturintervallen als Kurvenzug zu erkennen. Aus der kinetischen Analyse der Gesamtreaktion konnten noch Hinweise auf Änderungen der Elementarprozesse gewonnen werden. Die genaue Verfolgung des Temperaturverlaufes gestattet es somit – empfindlicher als etwa durch Messung der optischen Drehung – geringe strukturelle Veränderungen am Enzym oder am Enzym-Substrat-Komplex sichtbar zu machen.

Auch für die Biotechnik enzymatischer Prozesse sollten sich zusätzliche Informationen gewinnen lassen. Beispiele sind die Veränderung der Enzyme bei der Konservierung, besonders der Gefriertrocknung sowie die Entwicklung möglichst beständiger und technisch verwendbarer Enzyme für die Synthese spezieller chemischer Produkte.

*Die Deutsche Forschungsgemeinschaft sowie der Fond der Chemischen Industrie haben die Untersuchungen dankenswerterweise durch Sach- und Personalmittel unterstützt. – Fräulein Dipl.-Chem. G. Klunker und Fräulein K. Thomass sowie den Herren Dr. W. Müller, Dr. G. Fink, Dipl.-Chem. Ch. Gramsch, Dipl.-Chem. J. Maris, Dipl.-Chem. D. Wolf und Dipl.-Ing. H. Rusche möchte ich an dieser Stelle für ihre Mitarbeit, Frau R. Ehmer für die technische Assistenz herzlich danken.*

Eingegangen am 24. November 1970 [A 823]

- 
- [1] T. E. Barman u. H. Gutfreund, Biochem. J. 101, 411 (1966).
  - [2] B. Müller-Hill u. K. Wallenfels, Biochem. Z. 339, 338 (1964).
  - [3] B. S. Gould u. I. W. Sizer, J. Biol. Chem. 124, 269 (1938).
  - [4] J. F. Koster u. C. Veeger, Biochim. Biophys. Acta 167, 48 (1968).
  - [5] I. W. Sizer u. B. S. Gould, Enzymologia (Amsterdam) 8, 75 (1940).
  - [6] Z. Hodidian u. H. Hoagland, J. Gen. Physiol. 24, 339 (1940).
  - [7] E. Helmreich u. C. F. Cori, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 52, 647 (1964).

- [8] K. H. Ebert u. H. Stricker, Z. Naturforsch. 19b, 287 (1964).
- [9] I. E. Wilson u. E. Cabib, J. Amer. Chem. Soc. 78, 202 (1956).
- [10] H. Lineweaver, J. Amer. Chem. Soc. 61, 403 (1939).
- [11] I. W. Sizer u. E. S. Josephson, Food Res. 7, 201 (1942).
- [12] E. L. Smith, B. J. Finkle u. A. Stockell, Discuss. Faraday Soc. 20, 96 (1955).
- [13] P. R. Krishnaswamy u. K. V. Giri, Biochem. J. 62, 301 (1956).
- [14] P. R. Krishnaswamy u. A. Meister, J. Biol. Chem. 235, 408 (1960).
- [15] I. W. Sizer, J. Biol. Chem. 132, 209 (1940).
- [16] I. W. Sizer, J. Gen. Physiol. 22, 719 (1939).
- [17] I. W. Sizer, J. Bacteriol. 41, 511 (1941).
- [18] V. Massey, Biochem. J. 53, 67, 72 (1953).
- [19] F. Patat u. H. J. Kolb, Z. Naturforsch. 21b, 32 (1966).
- [20] E. A. Stern, Advan. Enzymol. 9, 25 (1949).
- [21] G. Talsky, Habilitationsschrift, Technische Universität München 1969.
- [22] F. Patat u. G. Talsky, Z. Naturforsch. 22b, 524 (1967).
- [23] G. Talsky, Z. Naturforsch. 22b, 1111 (1967).
- [24] G. Talsky u. G. Klunker, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1372 (1967).
- [25] G. Talsky u. G. Fink, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1141 (1967).
- [26] G. Talsky u. J. Maris, Z. Naturforsch. 23b, 645 (1968).
- [27] G. Talsky in Tagungsberichte der Deutschen Ges. für Biophysik e. V. und Österr. Ges. für Reine und Angewandte Physik, Baden bei Wien. Verlag der Wiener Med. Akademie 1968.
- [28] W. Müller, Dissertation, Technische Universität München 1970.
- [29] F. Šorm, Advan. Enzymol. 24, 415 (1962).
- [30] G. Talsky u. D. Wolf, Z. Naturforsch. 23b, 1389 (1968).
- [31] G. Talsky u. Ch. Gramsch, noch unveröffentlicht.
- [32] G. Talsky u. H. Rusche, noch unveröffentlicht.
- [33] G. Talsky u. W. Müller, noch unveröffentlicht.
- [34] G. B. Kistiakowsky u. R. Lumry, J. Amer. Chem. Soc. 71, 2006 (1949).
- [35] M. L. Bender, F. J. Kézdy u. C. R. Gunter, J. Amer. Chem. Soc. 86, 3714 (1964).
- [36] H. Follmann, H. J. Wieker u. H. Witzel, European J. Biochem. 1, 243 (1967).
- [37] G. Talsky, noch unveröffentlicht.
- [38] G. Fink u. F. Patat, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1501 (1969).
- [39] M. Dixon u. E. C. Webb: Enzymes. 2. Aufl., Longmans, Green & Co., London 1964, S. 92ff.
- [40] H. R. Mahler u. E. H. Cordes: Biological Chemistry. 6. Aufl., Harper & Row, New York, und John Weatherhill, Tokyo 1969, S. 228ff.