

# Short Communications and Preliminary Notes

## WIRKUNG DES OXYDIERENDEN GÄRUNGSFERMENTES IN GEGENWART KATALYTISCHER ARSENIATKONZENTRATIONEN

von

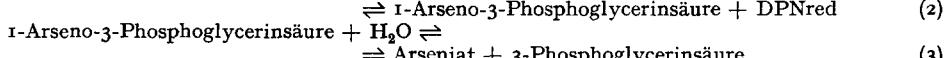
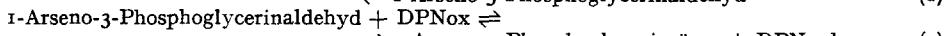
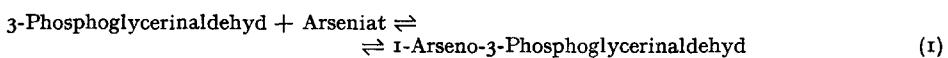
THEODOR BÜCHER UND KARL-HEINZ GARBÄDE

*Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg (Deutschland)*

Wir haben die Kinetik der Wasserstoffübertragung von Fischer-Ester (3-Phosphoglycerinaldehyd) auf DPN (Diphosphopyridinucleotid) in Gegenwart wechselnder Arseniatkonzentrationen und unter der Katalyse verschiedener Mengen oxydierenden Gärungsfermentes aus Hefe<sup>1</sup> untersucht. Die Figur zeigt zwei Ansätze (derart aufgetragen, dass Reaktionsabläufe zweiter Ordnung linear liegen), bei denen die Menge des Ferments bei konstanter, aber — relativ zu den Substratkonzentrationen — niedriger Arseniatkonzentration variiert wurde (Kreuze). Bei einem dritten Ansatz (Punkte) war die Arseniatkonzentration gross gegen die eingesetzten Substratmengen; die Fermentkonzentration wurde bei diesem Ansatz soweit erniedrigt, dass die Anfangsgeschwindigkeit mit einem der anderen Ansätze übereinstimmt.

Die Versuche zeigen: (1) Der Endwert der Reaktion ist in erster Näherung unabhängig von der eingesetzten Arseniatmenge; Arseniat wirkt katalytisch. (2) Der Typ des Reaktionsablaufs ist unabhängig von der Arseniatkonzentration; diejenigen Versuche, bei denen die geringe verfügbare Arseniatmenge während der Reaktion wiederholt umgesetzt wird, laufen nach dem gleichen kinetischen Gesetz wie diejenigen, bei denen ein grosser Überschuss von Arseniat zur Verfügung steht. (3) Auch bei den geringsten Arseniatkonzentrationen ist die Reaktionsgeschwindigkeit noch proportional zur Fermentkonzentration; der Gesamtablauf der Reaktion wird durch die Fermentkatalyse determiniert.

OTTO WARBURG hat zur Erklärung der Wirkung von Arseniat bei der Oxydationsreaktion der Gärung folgenden Reaktionsablauf vorgeschlagen<sup>1,2</sup>:



bei dem der eigentlichen Fermentreaktion je eine Vor- und eine Nachreaktion zugeordnet werden.

Unsere Versuche geben keinen Anhalt für die Existenz solcher Vor- und Nachreaktionen. Das bedeutet, dass solche Reaktionen, wenn sie freiwillig verlaufen, hohe Geschwindigkeitskonstanten besitzen müssen. Für die Reaktion (3) des obenstehenden Schemas können wir aus den mitgeteilten Versuchen einen Minimalwert folgendermassen abschätzen: Eine Anhäufung des gemischten Säureanhydrids würde die Fermentreaktion (neben einer konkurrierenden Blockierung der Wirkungsstellen des Ferments) dadurch verlangsamen, dass sie Arseniat aus dem System nimmt. Wie ein Vergleich der Versuche (2) und (3), besonders aber die in der folgenden Mitteilung geschilderte Wirkung von Arseniat auf die Sättigung des Ferments mit DPN zeigt, hängt die Geschwindigkeit der Fermentkatalyse von der Arseniatkonzentration ab. Geht man davon aus, dass eine Verminderung der vorhandenen Arseniatkonzentration um 20% beim Vergleich der Kinetiken unserer Versuche qualitativ und quantitativ erkennbar sein müsste und stellt man in Rechnung, dass beispielsweise in Versuch (2) eine der vorhandenen Arseniatmenge entsprechende Substratquantität in etwa einer halben Minute um-

Fig. 1. Oxydationsreaktion in Gegenwart von Arseniat. Ordinate: Reciprokwert der Extinktion bei  $366 \text{ m}\mu$  und der Schichtdicke 2 cm. Abszisse: Reciprokwert der Minuten. Zusammensetzung der Testlösung in Molaritäten: DPN  $2.4 \cdot 10^{-4}$ , racem. Fischer-Ester  $4.8 \cdot 10^{-4}$ , Arseniat: Versuch 1 und 2:  $0.3 \cdot 10^{-4}$ , Versuch 3:  $0.9 \cdot 10^{-2}$ , Puffer: Bicarbonatkohlensäure mit Aethylendiamintetraacetat\* ( $0.25 \text{ g/l}$ )  $\text{pH} = 7.7$ . Kristallisiertes Hefeferment: Versuch 1:  $12.5 \text{ g/ml}$ , Versuch 2:  $50 \text{ g/ml}$ , Versuch 3:  $1.2 \text{ g/ml}$ . Anfangsgeschwindigkeit: Versuch 1: 0.12, Versuch 2 und 3: 0.49

gesetzt wird, so errechnet sich der Minimalwert der Konstante der monomolekularen Zerfallsreaktion (3) aus der maximal möglichen Lage des dynamischen Gleichgewichts von Ferment und Folgereaktion zu

$$k = \frac{\Delta C}{\Delta t \times C} = \frac{1 \times 100}{0.5 \times 20} = 10 \text{ reciproken Minuten.}$$

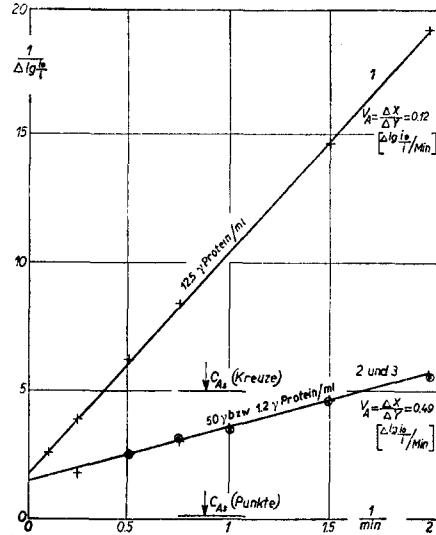
Dieser Wert ist um drei Größenordnungen grösser als derjenige, welcher von NEGELEIN UND BRÖMEL<sup>3</sup> für die entsprechende Phosphatverbindung bestimmt wurde.

## LITERATUR

- O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 303 (1939) 40.
- O. WARBURG, *Wasserstoffübertragende Fermente*, Freiburg 1949, bes. Seite 46.
- E. NEGELEIN UND H. BRÖMEL, *Biochem. Z.*, 303 (1939) 132.

Eingegangen am 22. Oktober 1951

\* Dr A. LEHNINGER hat uns liebenswürdigerweise auf die Schwermetallbindende Wirkung dieser Substanz aufmerksam gemacht.



## BEZIEHUNG DES OXYDIERENDEN GÄRUNGSFERMENTS ZU FISCHER-ESTER BEI VERSCHIEDENEN ARSENIATKONZENTRATIONEN

von

THEODOR BÜCHER UND KARL-HEINZ GARBÄDE

*Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg (Deutschland)*

Zur Beantwortung der Frage, ob die phosphatbindende Reaktion der Gärung möglicherweise eine freiwillig verlaufende Reaktion zwischen Fischer-Ester und Phosphat sei:

$$K_1 = \frac{C_3\text{-Phosphoglycerinaldehyd} \cdot C\text{phosphat}}{C_{1,3}\text{-Diphosphoglycerinaldehyd}} \quad (1)$$

welche dem eigentlichen Prozess der Wasserstoffübertragung am oxydierenden Gärungsferment<sup>1</sup> vorgeschaltet ist, sind kinetische Experimente, wie sie die voranstehende Mitteilung enthält, wie übrigens auch Gleichgewichtsansätze<sup>2</sup>, wenig geeignet, wenn ihr Ergebnis nicht positiv ist.

Misst man jedoch die Bindungsfestigkeit des Substrats am Ferment in Abhängigkeit von der Konzentration des Phosphats, dann verhält es sich gerade umgekehrt. Wenn nämlich die Reaktion (1)