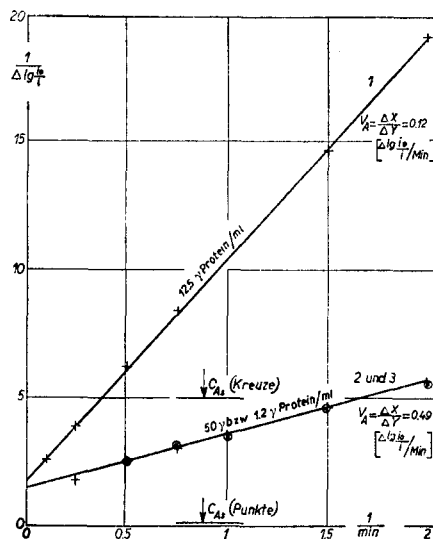


Fig. 1. Oxydationsreaktion in Gegenwart von Arseniat. Ordinate: Reciprokwert der Extinktion bei 366 m $\mu$  und der Schichtdicke 2 cm. Abszisse: Reciprokwert der Minuten. Zusammensetzung der Testlösung in Molaritäten: DPN  $2.4 \cdot 10^{-4}$ , racem. Fischer-Ester  $4.8 \cdot 10^{-4}$ , Arseniat: Versuch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

- <sup>1</sup> O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 303 (1939) 40.
- <sup>2</sup> O. WARBURG, *Wasserstoffübertragende Fermente*, Freiburg 1949, bes. Seite 46.
- <sup>3</sup> 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 GARBADE

*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:

$$K_1 = \frac{C_{3\text{-Phosphoglycerinaldehyd}} \cdot C_{\text{Phosphat}}}{C_{1,3\text{-Diphosphoglycerinaldehyd}}} \quad (I)$$

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 (I)

freiwillig und der Fermentreaktion vorgeschaltet ist, dann hat man bezüglich des Substrats für die Konstante der Fermentdissoziation zu schreiben:

$$K_2 = C_{1,3\text{-Diphosphoglycerinaldehyd}} \cdot \frac{C_{\text{freies Ferment}}}{C_{\text{wirkendes Ferment}}}$$

und es müsste die (formal auch in diesem Fall definierbare) Dissoziationskonstante des Fischer-Esters am Ferment

$$K_3 = C_{\text{Phosphoglycerinaldehyd}} \cdot \frac{C_{\text{freies Ferment}}}{C_{\text{wirkendes Ferment}}} \quad (3)$$

zu einer Funktion der Phosphatkonzentration werden

$$K_3 = \frac{K_1 \cdot K_2}{C_{\text{Phosphat}}} \quad (4)$$

sich umgekehrt proportional zur Phosphatkonzentration verhalten; oder mit anderen Worten: die Affinität zwischen Fischer-Ester und Ferment müsste mit steigender Phosphatkonzentration anwachsen. Bleibt ein solcher Effekt aus, dann bedarf es komplizierter Hypothesen, um die Theorie einer Vorreaktion aufrechtzuerhalten.

In Gegenwart von Arseniat sollten die Verhältnisse qualitativ gleichgeartet sein.

Wir haben in diesem Sinne die Affinitäten von Fischer-Ester und Glycerinaldehyd in Abhängigkeit von der Arseniatkonzentration gemessen. Die verwandten Präparate waren racemisch. Ihr Reinheitsgrad war besser als 95%. Das verwendete DPN-Präparat war vom Reinheitsgrad 65%. Das Ferment-Präparat war kristallisiertes Oxydationsferment aus Bäckerhefe<sup>1</sup>. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen wurden nach dem in der Figur der voranstehenden Mitteilung skizzierten Verfahren ermittelt und die scheinbaren Konstanten der Fermentdissoziationen (MICHAELIS-Konstanten) nach LINEWEAVER UND BURK<sup>3</sup> bestimmt. Die ersten beiden Spalten der Tabellen I und II enthalten die Konzentrationen an DPN und Arseniat in den einzelnen Versuchsreihen, die letzte Spalte zeigt die bei diesem Spiegel bestimmte Konstante für das Substrat.

TABELLE I

## VARIATION VON 3-PHOSPHOGLYCERINALDEHYD

Konzentrationen: Mol · 10<sup>4</sup> pro Liter; Fermentkonzentration: 2.4 γ/ml (Zur Versuchstechnik vergleiche Fig. 1 der vorangegangenen Mitteilung).

$C_{\text{DPN}}$	$C_{\text{Arseniat}}$	$K_3$ [Mol]/Liter
1.2	63	$1.6 \cdot 10^{-4}$
0.42	63	$0.96 \cdot 10^{-4}$
1.2	15.8	$0.67 \cdot 10^{-4}$
1.8	6.3	$0.30 \cdot 10^{-4}$

TABELLE II

## VARIATION VON GLYCERINALDEHYD

Konzentrationen: Mol · 10<sup>4</sup> pro Liter; Fermentkonzentration: 0.12 mg/ml; Bicarbonatkohlensäurepuffer pH 7.7; 0.25 mg/ml Äthylendiamintetraacetat.

$C_{\text{DPN}}$	$C_{\text{Arseniat}}$	$K'_3$ [Mol]/Liter
0.52	37	$145 \cdot 10^{-4}$
1.7	3.7	$200 \cdot 10^{-4}$

Aus den ersten beiden Zeilen der Tabelle I kann man ersehen, dass zwischen Fischer-Ester und DPN ein Verdrängungsverhältnis besteht, denn die Bindungsfestigkeit des Fischer-Esters sinkt mit steigender DPN-Konzentration. Wegen des in der nachfolgenden Mitteilung zu beschreibenden Effektes zwischen Arseniat und DPN haben wir die DPN-Konzentration bei jedem Arseniat-Niveau so eingestellt, dass das Ferment zur Hälfte an Co-Ferment gesättigt ist. Diese Massnahme hat ihr Für und Wider.

Die Versuche zeigen, dass  $K_s$  für Fischer-Ester um das dreifache ansteigt, wenn die Arseniatkonzentration um das zehnfache gesteigert wird, während die analoge Konstante für Glycerinaldehyd  $K'_s$  bei gleicher Variation des Arseniats in erster Näherung konstant bleibt. Im Falle freiwilliger Vorreaktionen zwischen Fischer-Ester und Arseniat beziehungsweise Glycerinaldehyd und Arseniat hätten die Konstanten nach der Beziehung (4) in beiden Fällen um den Faktor 10 absinken müssen. Der Verdrängungseffekt zwischen DPN und Aldehyd mag durch die getroffene Versuchsanordnung nicht völlig ausgeschaltet sein; die Diskrepanz überwiegt jedoch den möglichen Irrtum, und es ergibt sich aus unseren Versuchen ein hoher Grad von Unwahrscheinlichkeit für die Existenz einer freiwilligen Vorreaktion nach Gleichung (1) — zumindest in Gegenwart von Arseniat.

Die ausserordentliche Verschiedenheit der Bindungsfestigkeiten von Fischer-Ester und Glycerinaldehyd, sowie der Verdrängungseffekt zwischen Arseniat und Fischer-Ester erscheint uns bemerkenswert. Möglicherweise findet die Bindung des Fischer-Esters am Ferment an zwei Haftstellen statt, deren eine die Phosphatgruppe bindet und die nur der Fischer-Ester wahrnehmen kann — in Konkurrenz mit Arseniat.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 303 (1939) 40.  
O. WARBURG, *Wasserstoffübertragende Fermente*, Freiburg 1949, bes. Seite 46.
- <sup>2</sup> O. MEYERHOF, *Biological Symposia*, 5 (1941) 141.  
D. L. DRABKIN UND O. MEYERHOF, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 571.  
O. MEYERHOF UND P. OESPER, *J. Biol. Chem.*, 170 (1947) 1.
- <sup>3</sup> H. LINEWEAVER UND D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.

Eingegangen am 22. Oktober 1951

## BEZIEHUNG DES OXYDIERENDEN GÄRUNGSFERMENTS ZU DPN BEI VERSCHIEDENEN ARSENIATKONZENTRATIONEN

von

THEODOR BÜCHER UND KARL-HEINZ GARBADE

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

Im Verlauf der Versuche, welche in der vorstehenden Mitteilung beschrieben worden sind, haben wir einen Einfluss der Arseniatkonzentration auf die Affinität zwischen oxydierendem Gärungsferment und DPN gesehen, den wir wegen seiner Beziehung zu den voranstehenden Versuchen mitteilen. Unsere Versuchstechnik war die gleiche wie in den voranstehenden Mitteilungen (vergleiche die Legenden zur Figur in der ersten Mitteilung und zu den Tabellen in der zweiten Mitteilung).

Tabelle I zeigt Michaelis-Konstanten für DPN in Gegenwart konstanter Fischer-Ester Mengen und wechselnder Arseniatkonzentrationen. In Fig. 1 sind nach dem Verfahren von LINEWEAVER UND BURK<sup>1</sup> drei Versuche mit Glycerinaldehyd eingetragen, bei denen die Arseniatkonzentration jeweils um den Faktor 10 variiert wurde. Sowohl im Fischer-Ester-Test wie bei Gegenwart von Glycerinaldehyd erkennt man die überraschende Tatsache, dass (1) die Affinität zwischen DPN und oxydierendem Gärungsferment (kristallisiertem Ferment aus Hefe) beträchtlich mit wachsender Arseniatkonzentration steigt. Aus der Figur ersieht man ausserdem, dass im Versuch mit Glycerinaldehyd (2) die Kurven bei verschiedenen Arseniatkonzentrationen in erster Näherung demselben Grenzwert zustreben, dass also der sehr erhebliche Wirkungsverlust bei Senkung der Arseniatkonzentration durch eine Erhöhung der DPN-Konzentration wettgemacht werden kann.

Auf der Basis der Theorie von MICHAELIS UND MENTEN<sup>2</sup>, welche sich zur Deutung der Kinetik und der Verdrängungserscheinungen bei anderen DPN-Fermenten bewährt hat<sup>3</sup>, liegt eine mögliche Deutung in der Annahme, dass der eigentlichen Fermentreaktion eine sehr geschwinde, freiwillige Reaktion zwischen DPN und Arseniat vorgeschaltet ist.