

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

- ¹ O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 303 (1939) 40.
O. WARBURG, *Wasserstoffübertragende Fermente*, Freiburg 1949, bes. Seite 46.
- ² 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.
- ³ 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 BURK¹ 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 MENTEN², welche sich zur Deutung der Kinetik und der Verdrängungserscheinungen bei anderen DPN-Fermenten bewährt hat³, liegt eine mögliche Deutung in der Annahme, dass der eigentlichen Fermentreaktion eine sehr geschwinde, freiwillige Reaktion zwischen DPN und Arseniat vorgeschaltet ist.

$$K = \frac{C_{DPN} \cdot C_{\text{Arseniat}}}{C_{\text{DPN-Arseniatkomplex}}} \quad (1)$$

Die betreffende Theorie ist in der vorstehenden Mitteilung gegeben worden. Würden DPN und Arseniat getrennt am Ferment gebunden, dann wäre es unwahrscheinlich, dass die Bindungsfestigkeit des DPN am Ferment gleichsinnig mit der Arseniatkonzentration anwächst und dann könnte bei kleinen Arseniatkonzentrationen nicht der gleiche Sättigungswert erreicht werden wie bei grossen. Quantitativ fügen sich die Versuchsdaten allerdings nicht ohne weitere Annahmen in die Theorie. Bei den Versuchen mit Glycerinaldehyd zum Beispiel finden wir annähernd eine quadratische Beziehung zwischen Michaelis-Konstante und Arseniatkonzentration

$$\frac{K_{DPN}}{\sqrt{C_{\text{Arseniat}}}} \approx \text{const.}$$

während nach Reaktionsgleichung (1) eine lineare Beziehung zu erwarten gewesen wäre. Die Diskrepanz könnte eine Konkurrenz zwischen Arseniat und DPN-Arseniatkomplex zur Ursache haben, ähnlich wie sie zwischen Fischer-Ester und Arseniat besteht.

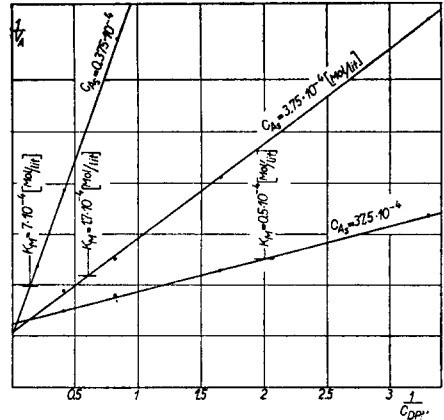


Fig. 1. MICHAELISKONSTANTE von DPN bei verschiedenen Arseniatkonzentrationen (Darstellung nach LINEWEAVER UND BURK); Ordinate: Reciprokwert der Anfangsgeschwindigkeit; Abszisse: Reciprokwert der DPN-Konzentration. Glycerinaldehyd $2.4 \cdot 11^{-2}$ mol.; Krist. Hefeferment 0.12 mg/ml; Bicarbonat-Kohlensäure-Puffer pH 7.7; 0.25 mg/ml Aethylendiamintetraacetat

TABELLE I

VARIATION VON DIPHOSPHOPYRIDINNUCLEOTID
Konzentration des racem. 3-Phosphoglycerinaldehyds $4.8 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter

Arseniat [Mol/Liter]	$K_{DPN} = C_{DPN} \cdot \frac{C_{\text{freies Ferment}}}{C_{\text{wirkendes Ferment}}}$ [Mol/Liter]
$63 \cdot 10^{-4}$	$0.44 \cdot 10^{-4}$
$15.8 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-4}$
$0.3 \cdot 10^{-4}$	$5.4 \cdot 10^{-4}$

LITERATUR

- ¹ H. LINEWEAVER UND D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- ² L. MICHAELIS UND MAUD L. MENTEN, *Biochem. Z.*, 49 (1913) 333.
- ³ O. WARBURG, *Ergebnisse der Enzymforschung*, 7 (1938) 210.

Eingegangen am 22. Oktober 1951