

BBA 6512

## SEDIMENTATIONS- UND DIFFUSIONSKoeffIZIENTEN AUS DEM TRANSPORT ENZYMATISCHER AKTIVITÄTEN

ANWENDUNG DER BESTIMMUNGSMETHODEN AUF DIE GLUCOSEOXYDASEN AUS *PENICILLIUM NOTATUM* (NOTATIN) UND AUS *ASPERGILLUS NIGER* (NIGERIN)

O. BODMANN

*Institut für Physikalische Chemie der Universität Mainz, Mainz (Deutschland)*

(Eingegangen am 28. Februar, 1966)

(Revidiertes Manuskript eingegangen am 29. Juli, 1966)

## SUMMARY

*Sedimentation and diffusion coefficients from the transport of enzymatic activities. Application of the method of determination to the glucose oxidases from *Penicillium notatum* (notatin) and *Aspergillus niger* (nigerin)*

It has been shown earlier that the sedimentation and diffusion coefficients of non-purified enzymes can be obtained from the transport of the enzymatic activity.

These methods are reexamined with respect to their accuracy, employing glucose oxidase enzymes ( $\beta$ -D-glucose:  $O_2$  oxidoreductase, EC 1.1.3.4) from *Penicillium notatum* and *Aspergillus niger*. The purity of the preparations was between 40 and 100%. Under suitable conditions the results obtained by the transport of activity methods are of nearly the same accuracy as the results of optical measurements of sedimentation and diffusion.

## EINLEITUNG

Die Methode, Diffusions- und Sedimentationskoeffizienten von Enzymen aus dem Transport ihrer Aktivitäten zu bestimmen, ist zwar schon länger bekannt<sup>1-16</sup>, jedoch bestand bisher noch keine Klarheit über die hierbei erreichbare Genauigkeit und Zuverlässigkeit. Kürzlich zeigten KRANZ, MUTZBAUER UND SCHULZ<sup>16</sup>, indem sie an  $\alpha$ -Amylasen die mit der Methode des Aktivitätstransportes erhaltenen Zahlenwerte mit den Messergebnissen der üblichen optischen Methoden verglichen, daß bei geeigneter Versuchstechnik eine gute Übereinstimmung beider Methoden erhalten wird. Bei der Aktivitätsmethode wird das Ergebnis nicht davon beeinflußt, ob man von reinem (kristallisiertem) Enzym oder unreinen Enzympräparationen ausgeht.

Diese im Molekulargewichtsbereich um etwa 50 000 durchgeführten Messungen werden in der vorliegenden Arbeit bis zu Molekulargewichten um 150 000 erweitert. Als Testsubstanzen werden die beiden Glucoseoxydäsen ( $\beta$ -D-Glucose:  $O_2$  oxidoreduc-

TABELLE I

MOLEKULARE KONSTANTEN VON NOTATIN UND NIGERIN UNTER STANDARDBEDINGUNGEN

	<i>Notatin</i>	<i>Nigerin</i>
$s_{20,w} \cdot 10^{13}$	(sec)	7.94
$D_{20,w} \cdot 10^7$	( $\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ )	4.95
$\bar{v}$	( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )	0.727
M		142 000
		151 000

tasen, EC 1.1.3.4) aus *Penicillium notatum* (Notatin) und aus *Aspergillus niger* (Nigerin) verwendet, deren molekulare Konstanten in einer vorangegangenen Arbeit<sup>18</sup> durch Messungen mit den üblichen optischen Methoden bestimmt wurden. Es zeigte sich, daß die beiden wirkungsgleichen Enzyme charakteristische Unterschiede im Molekulargewicht, im partiellen spezifischen Volumen und auch in der Zusammensetzung\* aufweisen. Einige Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt.

In dieser Arbeit bestimmen wir den Diffusionskoeffizienten  $D$  in der früher<sup>6</sup> beschriebenen Vierschichtenzelle. Der Sedimentationskoeffizient  $s$  wird aus dem Aktivitätsverlust der überstehenden Lösung in einer normalen Sedimentationszelle bestimmt, deren Boden mit 3 Schichten Filterpapier belegt ist. Die so erhaltenen Werte von  $D$  und  $s$  werden mit denen der Tabelle I verglichen.

## PRÄPARATE

Die Präparate dieser Arbeit sind von verschiedenem Reinheitsgrad. Die Notatin-präparate entstammen Kulturfiltraten verschiedener Wachstumskulturen des gleichen Stammes FD 446 von *Penicillium notatum*. Ausgangsprodukte der Nigerin-präparate waren drei verschieden bezeichnete Handelsprodukte 'DeeO' und 'High Purity Glucose Oxidase' aus den Takamine Laboratorien der Miles Chemical Co. Clifton,

TABELLE II

ENZYMPRÄPARATE

<i>Präparat</i> <i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Anreicherung</i>	<i>Reinheitsgrad</i> (%) (aus spezifischer Aktivität)
<i>Notatin</i>			
8	Kulturfiltrat	Uranylacetatfällung	40
7	Kulturfiltrat	Wie 8, zusätzlich Ammonsulfat-Fraktionierung	60
10 C	Kulturfiltrat	Wie 7, zusätzlich Ionenaustausch-Chromatographie	100
<i>Nigerin</i>			
HP	High Purity Glucose oxidase	Keine	40
F	Fermcozyme	Keine	40
HP C	High Purity Glucose oxidase	Ionenaustausch-Chromatographie	90
F C	Fermcozyme	Ionenaustausch-Chromatographie	80
D C	DeeO	Ionenaustausch-Chromatographie	100

\* O. BODMAN, unveröffentlichte Messungen.

N.J., sowie 'Fermcozyme' aus den Fermco Laboratorien Inc. Chicago, Ill. Gewinnung und Anreicherung der Enzyme wurde an anderem Orte<sup>18</sup> ausführlich beschrieben. Der Werdegang der hier verwendeten Präparate ist aus der Tabelle II zu ersehen.

#### AKTIVITÄTSMESSUNG

Die enzymatischen Aktivitäten der Glucoseoxydasen wurden aufgrund der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs bei 25° und pH-Werten von 4.66 oder 5.6 mit Warburggeräten bestimmt. Die Enzymlösungen aus den Diffusions- und Ultrazentrifugenzellen wurden vorher auf eine Konzentration verdünnt, die eine Reaktionsgeschwindigkeit im meßtechnisch günstigsten Bereich ergibt. Unter den gegebenen Bedingungen war das etwa 1  $\mu\text{g}$  reinen Enzyms pro Reaktionsgefäß. Vor der Vereinigung von Enzym- und Substratlösung (0.1 M Glucose) wurde die Luft aus den Reaktionsgefassen durch reinen Sauerstoff verdrängt. Jeder Wert wurde durch mindestens 3 parallele Einzelwerte belegt.

#### SEDIMENTATION

Die Technik der Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten enzymatischer Aktivitäten wurde an anderem Orte<sup>15</sup> ausführlich beschrieben. Das Enzym sedimentiert in eine am Boden einer Ultrazentrifugenzelle befindliche Filterpapierschicht hinein und die Sedimentationskoeffizienten werden aus der Aktivitätsabnahme der darüberstehenden Lösung nach Formeln von YPHANTIS UND WAUGH<sup>18</sup> oder TISELIUS, PEDERSEN UND SVEDBERG<sup>20,21</sup> berechnet.

Die Versuche wurden mit einer Ultrazentrifuge Spinco Modell E unter Verwendung der Standardzelle mit 3 Lagen Filterkartons Schleicher und Schuell Nr. 470 (aus einem Vorhang der Spinco-Elektrophoreseapparatur CP zugeschnitten) gemacht. Die Sedimentationsdauer betrug bei 50 740 Umdrehungen/Min durchweg etwa 90 min. Während dieser Zeit waren etwa 70% der Aktivität in das Filterpapier hineinsedimentiert. Die Abstände  $r_m$  und  $r_p$  vom Rotationszentrum zum Meniskus bzw. zur oberen Grenzfläche des Filterpapiers betrugen etwa 5.9 und 6.9 cm. Die genauen Abstandswerte wurden optisch in jedem Versuch ermittelt.

Experimentelle Werte der Sedimentationskoeffizienten der Glucoseoxydase-Aktivität von Notatin liegen aus einer früheren Arbeit<sup>15</sup> bereits in größerer Zahl vor. Bei insgesamt 26 Einzelversuchen und Präparaten etwa 40%iger Reinheit war dort, auf Standardbedingungen umgerechnet, ein konzentrationsunabhängiger Wert  $7.91 \pm 0.05$  S als Sedimentationskoeffizient des Notatins gefunden worden. Dieser Wert wurde später<sup>18</sup> (siehe Tabelle I) durch optische Messungen bei reinen Enzympräparaten bestätigt.

Der Sedimentationstransport von Nigerinaktivität war bisher nur durch 3 Einzelmessungen bestimmt worden<sup>15</sup>. In Tabelle III sind neuere Meßergebnisse wiedergegeben. Bei diesen Versuchen wurde gleichzeitig auch die Wanderung der Gradientenmaxima mit der Schlierenoptik verfolgt. In den Gradientenkurven der beiden Handelspräparate HP und F bildeten sich jeweils 3 Maxima aus, deren mittleres den gleichen Sedimentationskoeffizienten ergab, wie der Transport der Glucoseoxydase-Aktivität (vgl. die Spalten 4 und 5 der Tabelle III). Fig. 1 zeigt ein Beispiel dieser

TABELLE III

## SEDIMENTATIONSKOEFFIZIENTEN VON NIGERIN

Versuche in 0.2 M Acetatpuffer (pH 4.66), 20.0°, Standardzelle mit Filterpapierschicht. Sedimentationsdauer etwa 90 min.

Präparat	Gesamt- protein (g/l)	Zahl der Einzel- versuche	$s \cdot 10^{-13}$ (sec)	
			Optisch (Schlieren- methode)	Analytisch (Aktivitäts- transport)
F	9	4	7.22 $\pm$ 0.03	7.30 $\pm$ 0.21
HP	5	1	7.88	7.93
FC	4	1	7.49	7.34
HPC	2	2	7.59 $\pm$ 0.08	7.77 $\pm$ 0.25
Mittelwert $s_{20,P}$			7.55	7.59
$s_{20,w}$			8.00	8.04

Gradientenkurven. Die Sedimentationskoeffizienten der beiden anderen Maxima lagen bei 3.5 und  $13 \cdot 10^{-13}$  sec.

Optische Sedimentationsmessungen reiner Nigerin- und Notatinpräparate zeigen unter den gleichen Bedingungen beide eine schwache Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten<sup>18</sup>. In den Werten der Tabelle III tritt keine solche in Erscheinung, oder sie ist hinter der Streubreite der Werte nicht erkennbar. Der Mittelwert der Sedimentationskoeffizienten aus Tabelle III liegt um etwa 1.5% unter dem auf  $c = 0$  extrapolierten Wert eines reinen Nigerinpräparates<sup>18</sup>. Bei Berücksichtigung der dort gefundenen Konzentrationsabhängigkeit würde der für unendliche Verdünnung hier zutreffende Wert etwa um 4% höher liegen, als der des reinen Nigerinpräparates. Auffallend ist, daß die Übereinstimmung zwischen den Werten aus dem Aktivitätstransport und der Gradientenwanderung bei gleichen Präparaten besser ist, als die der Werte gleicher Spalten der Tabelle. Die hier auftretenden Unterschiede überschreiten zum Teil die Fehlergrenze der optischen Methode, so daß das Sedimentationsverhalten dieses Enzyms innerhalb gewisser Grenzen (etwa  $\pm 3\%$ ) von der Beschaffenheit des Präparates abhängig ist.



Fig. 1. Sedimentation von Nigerin (Fermcozyme), dialysiert gegen 0.2 M Acetatpuffer (pH 4.7). Aufnahmen bei 50 740 Umdrehungen/min nach etwa 30 min rechts beginnend im Abstand von je 8 min. Die sechste Aufnahme, bei stehendem Rotor, dient zur Bestimmung von  $r_p$ .

Soll bei Multikomponentensystemen untersucht werden, ob die Aktivitätsträger einheitlich sind, dann müßte zu diesem Zweck die Sedimentationsdauer über einen größeren Bereich variiert werden. Mit kürzeren Versuchszeiten verschlechtert sich hingegen das Fehlerverhältnis (vgl. z.B. Lit. 13), so daß sichere Aussagen einen erhöhten experimentellen Aufwand erforderlich machen würden.

## DIFFUSION

Die Diffusionsversuche wurden mit den früher beschriebenen Vier-Schichten-Zellen<sup>6</sup> durchgeführt und mit Hilfe der erweiterten Kawalki'schen Tabellen<sup>22</sup> ausgewertet. Durch erschütterungsfreiere Aufstellung der Diffusionszellen auf einem in Sand und Kork gebetteten massiven Betonfundament mit einem horizontalen Querschnitt von 0.8 m × 1.0 m und einer Höhe von 1.5 m, sowie durch eine auch über längere Zeiten gewährleisteten Konstanz der Raumtemperatur auf  $20.0 \pm 0.02^\circ$  wurden die Voraussetzungen für einen einwandfreien Versuchsablauf verbessert.

Störungen des Transports, wie beispielsweise Konvektionen, führen zu gestörten Konzentrationsverteilungen. Diese äussern sich im Versuchsergebnis derart, daß die Konzentrationsverteilungen zu schichtweise unterschiedlichen Tabellenwerten  $Y_i$  führen<sup>22</sup> und sich entsprechend Gleichung (1) scheinbar schichtweise unterschiedliche Diffusionskoeffizienten  $D_i$  ergeben.

$$D_i = \frac{h^2}{4 Y_i^2 \cdot t} \quad (i = 1, 2, 3, 4) \quad (1)$$

$h$  ist darin die Höhe der 4 gleich dicken Schichten,  $t$  die Diffusionszeit.

Die gleiche Erscheinung tritt auch bei störungsfreiem Diffusionstransport durch Fehler der Aktivitätssmessungen auf. Der Unterschied ist lediglich, daß sich die zufälligen Aktivitätsfehler statistisch verhalten und deswegen bei Mittelwertbildungen herausfallen, während die irreversiblen Transportstörungen die Ergebnisse systematisch immer in der gleichen Richtung verfälschen.

Zur Bestimmung der Diffusionskonstanten von Nigerin aus dem Aktivitäts-transport liegen insgesamt 28 neuere Einzelversuche vor. Nach Präparaten zusammengefaßt, gibt die Tabelle IV die experimentellen Diffusionskoeffizienten als arithmetische Mittelwerte  $\bar{D}$  dieser  $4 \times 28$  Einzelwerte  $D_i$  wieder. Daneben sind die Standardabweichungen  $\sigma$  vom jeweiligen aus  $n$  Einzelwerten gebildeten Mittelwert wiedergegeben.

TABELLE IV

AUS DEM AKTIVITÄTSTRANSFER ANALYTISCH BESTIMMTE DIFFUSIONSKoeffizienten von NIGERIN  
Versuche in 0.2 M Acetatpuffer (pH 4.66),  $20.0^\circ$ , Vier-Schichten-Zellen, Dauer der Diffusion 48–72 h.

Präparat	Gesamt-protein (g/l)	Zahl der Einzel- versuche	$D \cdot 10^7$ (cm <sup>2</sup> · sec <sup>-1</sup> ) in Schicht			
			1	2	3	4
DC	14	2	$3.50 \pm 0.37$	$2.73 \pm 0.58$	$4.36 \pm 0.07$	$4.41 \pm 0.01$
DC	11	4	$4.44 \pm 0.26$	$4.69 \pm 0.57$	$4.40 \pm 0.25$	$4.23 \pm 0.01$
F	9	8	$4.33 \pm 0.13$	$4.33 \pm 0.22$	$4.31 \pm 0.06$	$4.42 \pm 0.11$
HP	5	4	$4.99 \pm 0.12$	$5.60 \pm 0.34$	$4.60 \pm 0.02$	$4.61 \pm 0.06$
FC	4	2	$4.47 \pm 0.05$	$4.55 \pm 0.11$	$4.26 \pm 0.13$	$4.37 \pm 0.06$
HPC	1	8	$4.82 \pm 0.19$	$3.97 \pm 0.32$	$4.51 \pm 0.29$	$4.78 \pm 0.18$
Mittelwerte von 28 Versuchen			$4.53 \pm 0.11$	$4.38 \pm 0.19$	$4.42 \pm 0.09$	$4.52 \pm 0.07$
Mittelwerte von 14 Versuchen mit einheitlicheren Teilergebnissen			$4.39 \pm 0.09$	$4.40 \pm 0.13$	$4.34 \pm 0.06$	$4.40 \pm 0.08$
$D_{20,w} \cdot 10^7$					$4.55 \pm 0.06$	

$$\sigma = \left( \frac{\sum (D_j - \bar{D})^2}{n(n-1)} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

Nach 48-h Diffusion befand sich etwa 6% der Gesamtaktivität in Schicht 3 und etwa 0.4% in Schicht 4. Nach 72 h waren etwa 13% in der dritten und 4% in der vierten Schicht. Die Qualität der Ergebnisse aus der dritten Schicht wurde nicht durch die Versuchsdauer beeinflußt, während die Auswertung der vierten Schicht bei geringen Gesamtaktivitäten längere Diffusionszeiten erforderlich macht, damit die Effekte vernünftig messbar sind.

Trotz der teilweise sehr großen Streubreite der Einzelergebnisse stimmen die Gesamtmittelwerte der vier Schichten untereinander sehr gut überein. Dadurch wird einigermaßen sichergestellt, daß keine auf Transportstörungen beruhenden Fehler vorhanden sind.

Nach unseren ersten, mit Notatin durchgeführten Probemessungen zu dieser Diffusionsmethode<sup>6</sup> schien es zunächst ein ausreichendes Kriterium für zuverlässige Versuchsergebnisse zu sein, wenn bei Diffusionszeiten, in denen noch keine messbaren Aktivitäten in Schicht 4 gelangt sein durften, dort auch keine gefunden wurden. Die Meßergebnisse der Versuche, die zu diesem Schluß veranlaßten, lagen, verglichen mit den Richtwerten von Tabelle I, jedoch durchschnittlich um etwa 10% zu hoch. Infolgedessen kann das dort aufgestellte Kriterium allein nicht mehr als ausreichend angesehen werden. Offenbar gab es auch Konvektionsströmungen, die sich nicht bis in Schicht 4 hinein fortpflanzten. Nachdem die bei diesen Versuchen anfangs noch etwas behelfsmäßigen Mittel zur Isolierung der Zellen gegen Erschütterungen durch bessere ersetzt wurden, zeigt sich bereits unmittelbar danach bei den an Nigerin durchgeführten Versuchen<sup>15</sup> auch unter den Schichten eine ähnlich gute Übereinstimmung der Werte, wie sie bei Tabelle IV in Erscheinung tritt. Das auf Standardbedingungen umgerechnete damalige Ergebnis  $D_{20,w} 4.47 \cdot 10^{-7}$  stimmt mit dem Wert  $4.55 \cdot 10^{-7}$  welcher hier in Tabelle IV, ebenfalls für Schicht 3 und auf Standardbedingungen umgerechnet, angegeben ist und mit dem auf optischen Wege ermittelten Diffusionskoeffizienten des reinen Nigerins<sup>17</sup>, der in der Tabelle I aufgeführt ist, innerhalb der Fehlergrenze überein.

TABELLE V

AUS DEM AKTIVITÄTSTRANSFER ANALYTISCH BESTIMMTER DIFFUSIONSKOEFFIZIENTEN VON NOTATIN  
Vier-Schichten-Zellen, Diffusionsdauer 24-48 h.

Präparat	Gesamt- protein (g/l)	Zahl der Einzel- versuche	$D \cdot 10^7$ (cm <sup>2</sup> · sec <sup>-1</sup> ) in Schicht			
			1	2	3	4
10 C*	2	8	4.78 ± 0.18	4.48 ± 0.36	4.73 ± 0.08	5.35 ± 0.21
$D_{20,w} \cdot 10^7$					4.95 ± 0.08	
8**	0.5	4	4.56 ± 0.38	4.80 ± 0.80	4.60 ± 0.11	4.91 ± 0.14
8**	5	10	4.48 ± 0.07	4.40 ± 0.30	4.53 ± 0.05	4.80 ± 0.10
7**	5	2	4.14 ± 0.09	4.09 ± 0.12	4.40 ± 0.01	—
Mittelwerte**			4.45 ± 0.10	4.46 ± 0.20	4.53 ± 0.04	4.85 ± 0.08
$D_{20,w} \cdot 10^7$					4.98 ± 0.05	

\* In 0.2 M Acetatpuffer (pH 4.66) ( $\eta_{20,p}/\eta_{20,w} = 1.047$ ).

\*\* In 0.3 M Phosphatpuffer (pH 5.6) ( $\eta_{20,p}/\eta_{20,w} = 1.100$ ).

Wie bereits früher diskutiert<sup>6</sup>, übertragen sich prozentual gleiche Aktivitätsfehler schichtweise sehr unterschiedlich, verstärkt oder auch vermindert, auf die Ergebnisse. Relativ am unempfindlichsten reagiert der  $Y$ - bzw.  $D$ -Wert der vierten Schicht auf Fehler der Aktivitätsmessungen. Unter den speziell hier gegebenen Versuchsbedingungen sollte der prozentuale Fehler des Diffusionskoeffizienten, den man aus der vierten Schicht berechnet, nur etwa ein Fünftel des Aktivitätsfehlers betragen, der aus der dritten Schicht etwa drei Viertel und der in den beiden untersten Schichten jeweils etwa das Vierfache des Aktivitätsfehlers betragen.

Demgegenüber zeigen die Standardabweichungen in Tabelle IV ein etwas einheitlicheres Fehlerniveau zwischen den Einzelschichten. Die beiden oberen Schichten zeichnen sich allerdings immer noch durch Ergebnisse besserer Qualität aus.

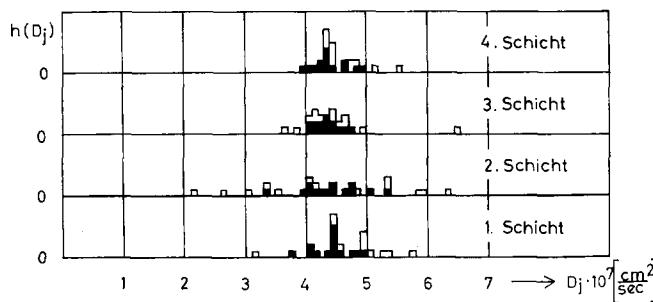


Fig. 2. Diffusionskoeffizienten von Nigerin aus Transportmessungen der Aktivität. Häufigkeitsverteilung der Einzelergebnisse aus 28 Versuchen.

In Fig. 2 sind sämtliche in Tabelle IV verwerteten  $4 \times 28$  Einzelwerte nach Schichten getrennt, in Form von Häufigkeitsverteilungen graphisch aufgetragen. Die Häufigkeit  $h(D_j) = n_j \cdot D_j$  der experimentellen Diffusionskoeffizienten vermittelt gegen  $D_j$  als Abszisse aufgetragen, nochmals ein anschauliches Bild von der vorhandenen erheblichen Streuung der Einzelwerte.

Unter den 28 Versuchen wurde sodann eine Auslese getroffen, und zwar wurden solche Versuche ausgeschieden, bei denen eine der 4 Schichten ein Ergebnis lieferte, welches vom Mittelwert aus allen 4 Schichten um mehr als 10% abweicht. Dadurch ergab sich eine Aufteilung in 2 zufälligerweise gleich große Gruppen von je 14 Versuchen. Die Versuche mit dem einheitlicheren Ergebnis sind in Fig. 2 durch voll ausgezeichnete Karos gekennzeichnet, die übrigen Versuche durch umrandete Felder. Aus der Abbildung und aus den Standardabweichungen, welche zu den Gesamtmittelwerten der Tabelle IV ergänzend noch hinzugefügt wurden, ist zu schliessen, daß es besser ist, Versuche, die in sich Unstimmigkeiten aufweisen, von vorn herein bei der Auswertung unberücksichtigt zu lassen.

Aus der Tatsache, daß die beiden unteren Schichten im Mittel keine vom richtigen Wert abweichenden Ergebnisse liefern, kann man entnehmen, daß durchweg bei der Überschichtung keine nennenswerten Störungen verursacht worden sind. Demnach sind mit Diffusionszellen, die nur zwei trennbare Schichten besitzen, ebenfalls durchaus verlässliche Ergebnisse erreichbar. Um die gleiche Genauigkeit zu erzielen, wie bei Vier-Schichten-Zellen, sind allerdings Mittelwertbildungen aus einer entsprechend größeren Anzahl von Einzelmessungen erforderlich.

Diffusionskoeffizienten von Notatin wurden ebenfalls aus dem Aktivitäts-transport erneut bestimmt. Von insgesamt 24 Einzelversuchen wurden 8 in 0.2 M Acetatpuffer bei pH 4.66 und 16 unter gleichen Bedingungen wie in der früheren Arbeit<sup>6</sup>, in 0.3 M Phosphatpuffer bei pH 5.6, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle V zusammengefaßt. Nach 24-h Diffusion befand sich in der dritten Schicht etwa 2.0% der gesamten Aktivität, bis in die vierte Schicht war noch keine messbare Aktivität hineingelangt. Nach 48 h Diffusionsdauer lagen ähnliche Konzentrationsverteilungen vor, wie für Nigerin angegeben wurden.

Die Werte von Tabelle V stimmen im Mittel mit den Ergebnissen völlig überein, die bei Verwendung eines reinen Präparates auf optischem Wege erzielt wurden<sup>18</sup>. Die älteren Ergebnisse des Aktivitätstransportes<sup>6</sup> hatten wahrscheinlich aus Gründen nicht ganz störungsfreier Versuchsbedingungen 10%ige Abweichungen ergeben.

TABELLE VI

MOLEKULARE KONSTANTEN DER GLUCOSEOXYDASEN NOTATIN UND NIGERIN, AUS DEM AKTIVITÄTS-TRANSPORT ANALYTISCH BESTIMMT

	Notatin	Nigerin
$s_{20,w} \cdot 10^{13}$ (sec)	7.91*	8.04
$D_{20,w} \cdot 10^7$ (cm <sup>2</sup> ·sec <sup>-1</sup> )	4.97	4.55
M (berechnet mit $\bar{v}$ , 0.73)	144 000	162 000
M (berechnet mit $\bar{v}$ , 0.75)	155 000	174 000

\* Siehe Lit. 14.

#### MOLEKULARGEWICHTE

Vergleicht man die Transportkoeffizienten, die bei den Glucoseoxydasen Notatin und Nigerin aus den Aktivitätstransportversuchen hervorgingen, deren Mittelwerte in Tabelle VI zusammengefaßt sind, mit den Richtwerten der reinen Enzyme aus Tabelle I, dann stellt man bei allen 4 Wertepaaren überraschenderweise keine größeren Differenzen als  $\pm 1\%$  fest. Wenn auch in dieser ausgezeichneten Übereinstimmung zweifellos noch ein zufälliger Faktor enthalten ist, so zeigen die Versuche, daß die Methoden des Aktivitätstransportes, unabhängig von der Reinheit eines Enzyms richtige Werte für die Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten zu bestimmen erlauben.

Wie bereits auch von KRANZ, MUTZBAUER UND SCHULZ<sup>17</sup> hervorgehoben wurde, kommt der größte Unsicherheitsfaktor in die Berechnung des Molekulargewichtes unzureiniger Enzyme durch die Unkenntnis des partiellen spezifischen Volumens  $\bar{v}$ . Dieses liegt im allgemeinen zwischen den Grenzen 0.70 und 0.75 cm<sup>3</sup>·g<sup>-1</sup>. Nimmt man einen bei Proteinen am häufigsten vertretenen mittleren Wert von 0.73 an, dann ist, wie man durch Einsetzen in der SVEDBERG'schen Formel

$$M = \frac{s \cdot RT}{D \cdot (1 - \bar{v}q)} \quad (3)$$

ersieht, in Extremfällen beim Molekulargewicht noch mit Fehlern bis zu etwa  $\pm 10\%$  zu rechnen, selbst wenn die Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten fehlerfrei er-

mittelt wurden. Der Einfluß fehlerhafter partieller Volumen, z.B. des bei früheren Bestimmungen<sup>15</sup> und von anderen Autoren<sup>23,24</sup> benutzten Wertes 0.75 führt zu erheblichen Abweichungen (Tabellen I und VI).

#### ZUSAMMENFASSUNG

Transportmethoden enzymatischer Aktivitäten, die zur Bestimmung von Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten nicht reiner Enzyme bereits früher beschrieben und benutzt wurden, werden durch weitere Messungen auf ihre Genauigkeit geprüft. Als Testsubstanzen dienten Enzympräparate der Glucoseoxydasen ( $\beta$ -D-Glucose:O<sub>2</sub> oxidoreductasen, EC 1.1.3.4) aus *Penicillium notatum* und *Aspergillus niger*, deren Reinheitsgrade zwischen 40 und 100% lagen. Es wird gezeigt, daß die Ergebnisse des Aktivitätstransportes unter geeigneten Versuchsbedingungen nahezu die gleiche Genauigkeit erreichen, wie die von optischen Sedimentations- und Diffusionsmessungen.

#### DANK

Herrn Professor Dr. G. V. SCHULZ danke ich für wertvolle Diskussionen und Frau M. VON BALUGYANSZKY für technische Assistenz.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft förderte die Arbeit durch Sachbeihilfen.

#### LITERATUR

- 1 H. VON EULER, A. HEDELius UND O. SVANBERG, *Z. Physiol. Chem.*, 110 (1920) 190.
- 2 J. BOURDILLON, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1941) 459.
- 3 J. BOURDILLON, *J. Gen. Physiol.*, 25 (1942) 263.
- 4 A. POLSON, *Nature*, 145 (1944) 823.
- 5 A. POLSON UND G. M. POTGIETER, *Nature*, 204 (1964) 379.
- 6 G. V. SCHULZ, D. LAUE UND O. BODMANN, *Makromol. Chem.*, 31 (1959) 75.
- 7 D. MOHRING, *Naturwissenschaften*, 46 (1959) 625.
- 8 H. BECHHOLD UND M. SCHLESINGER, *Biochem. Z.*, 236 (1931) 387.
- 9 M. SCHLESINGER, *Nature*, 138 (1936) 549.
- 10 R. MARKHAM, *Progr. Biophys. Biophys. Chem.*, 3 (1953) 61.
- 11 E. L. KUFF, G. H. HOGEBOOM UND M. J. STRIEBICH, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 439.
- 12 O. DREES, *Kolloid Z.*, 153 (1957) 97.
- 13 K. STROHMAIER UND T. ZIMMERMANN, *Z. Naturforsch.*, 13b (1958) 234.
- 14 O. BODMANN, D. KRANZ UND G. V. SCHULZ, *Makromol. Chem.*, 41 (1960) 225.
- 15 R. G. MARTIN UND B. N. AMES, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1372.
- 16 D. KRANZ, H. MUTZBAUER UND G. V. SCHULZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 514.
- 17 O. BODMANN UND M. WALTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 110 (1965) 496.
- 18 D. A. YPHANTIS UND D. F. WAUGH, *J. Phys. Chem.*, 60 (1956) 623.
- 19 A. TISELIUS, K. O. PEDERSEN UND T. SVEDBERG, *Nature*, 140 (1937) 848.
- 20 T. SVEDBERG, K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge*, Steinkopff, Dresden, 1940, S. 273.
- 21 O. BODMANN UND C. WITZGALL, *Z. Physik. Chem. Frankfurt*, 36 (1963) 148.
- 22 R. CECIL UND A. G. OGSTON, *Biochem. J.*, 42 (1948) 229.
- 23 B. E. P. SWOBODA UND V. MASSEY, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 2209.