

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER AMYLOMALTASE

## II. MOLEKULARE KONSTANTEN UND WIRKUNGSWEISE DES ENZYMS

V. HÄSELBARTH\*, G. V. SCHULZ UND H. SCHWINN\*\*

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

(Eingegangen am 14. August, 1970)

## SUMMARY

*Studies on amyломaltase. II. Molecular constants and activity of the enzyme*

A preparation method for the enzyme, amyломaltase ( $\alpha$ -1,4-glucan: D-glucose 4-glycosyl transferase, EC 2.4.1.3), is described giving a highly uniform protein as can be seen by sedimentation, chromatography and electrophoresis. Using sedimentation equilibrium, sedimentation diffusion and Sephadex chromatography the molecular weight is determined to 71 000 ( $\pm$  5000). The isoelectric point lies at pH 5.57. The frictional ratio is 1.27.

The equilibrium of oligomers established by the enzyme is investigated starting from maltose, maltotriose and maltotetraose with the result that the turnover rate increases in this order. If the enzyme is incubated by maltotetraose equal molar fractions of maltotriose and maltpentaose are formed primarily showing that the enzyme transfers only one glucose unit from one to another oligomer.

The equilibrium constant is 1 within the limits of error for all partial equilibria between four or three oligomers. However, the distribution of all oligomers reveals that the transfer reaction is combined by a slow hydrolysis, probably a side reaction of the same enzyme.

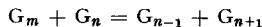
## I. EINLEITUNG

Das von MONOD UND TORRIANI<sup>1,2</sup> und DOUDOROFF *et al.*<sup>3</sup> beschriebene Enzym Amyломaltase ( $\alpha$ -1,4-Glucan:D-glucose 4-glycosyltransferase, EC 2.4.1.3) ist dadurch interessant, dass es durch einen Prozess, dessen freie Enthalpie nahe bei 0 liegt, höhere Oligomere der Maltosereihe—unter geeigneten Umständen bis zu Amylosen—synthetisieren kann. Nach WIESMEYER UND COHN<sup>4-6</sup> ist dieses Enzym eine Glukosetransferase, welche das nicht reduzierende Ende der Glukose von einem Maltosemolekül abtrennt und auf ein anderes überträgt. Hierbei entstehen Glukose und höhere Oligomere. Die Autoren fanden nach der Archibald-Methode ein Molekul-

\* Dissertation, Mainz, 1969.

\*\* Dissertation, 1. Teil, Mainz, 1968.

gewicht von 124 000. SCHULZ *et al.*<sup>7</sup> zeigten, dass das Enzym nicht spezifisch Maltose, sondern auch die höheren Oligomeren angreift, so dass das allgemeine Reaktionsschema durch die Gleichung



wiedergegeben werden kann ( $G$  = Glukose,  $G_2$  = Maltose usw.).

Diese und die folgende Arbeit haben zum Ziel, Genaueres über den Wirkungsmechanismus des Enzyms zu erfahren. Mit Hilfe einer Präparationsmethode, die in stärkerem Masse Säulentechniken verwendet, wurde ein sehr einheitliches Enzym erhalten, dessen Molekulargewicht nach verschiedenen Methoden übereinstimmen niedriger als bisher angenommen ist.

Anschliessend wird die Gleichgewichtseinstellung untersucht, wobei folgende bisher noch nicht beantwortete Fragen geklärt werden:

(1) Benötigt das Enzym für seine Wirkung stets Maltose bzw. Amylose und Glukose, oder kann es auch bei Abwesenheit von Maltose und Glukose die höheren Oligomeren der Maltosereihe umsetzen?

(2) Kann das Enzym ausser Glukose auch höhere Einheiten z.B. Maltose übertragen?

(3) Welcher Art ist das vom Enzym eingestellte Gleichgewicht; insbesondere welche Molekulargewichtsverteilung stellt sich im Gleichgewicht ein?

(4) Ist es möglich, die hydrolytische Aktivität, welche bei unseren Versuchen stets die Gleichgewichtseinstellung überlagert, von der Transglukosidaseaktivität zu trennen, oder handelt es sich bei beiden Reaktionen um Wirkungen des gleichen Enzyms?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden chromatographisch reine Maltotriose und Maltotetraose hergestellt, und alle Versuche parallel mit Maltose, Maltotriose und Maltotetraose als Substrat durchgeführt. Gleichgewichtseinstellung und Kinetik wurden untersucht, indem die entstehenden Zucker von der Glukose bis zur Pentose und eine Restfraktion  $R_6$ , welche alle höheren Oligomeren enthielt, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit chromatographisch bestimmt wurden. Die für das Gleichgewicht zu erwartende Molekulargewichtsverteilung der Oligomeren wurde theoretisch berechnet und mit dem Experiment verglichen.

In der nachfolgenden Arbeit<sup>8</sup> werden durch kinetische Messungen der Reaktionsmechanismus und die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Teilreaktionen ermittelt.

## II. BESTIMMUNG DER MOLEKULAREN KONSTANTEN

### *Sedimentationsgleichgewicht in der Ultrazentrifuge*

Die Gleichgewichtsmessungen wurden nach dem Verfahren von LÜTJE<sup>9</sup> und YPHANTIS<sup>10</sup> vorgenommen, wobei die Drehzahl so gewählt wird, dass am Meniscus die Konzentration  $o$  vorliegt. Gemessen wird der Konzentrationsgradient in einer Zone von 1–2 mm über einem künstlichen Zellenboden aus Silikonöl (Fa. Wacker, Typ 380). Daraus folgt die Konzentration  $c$  im Abstand  $r$  vom Rotationszentrum und weiter das Molekulargewicht  $M_{z,r}$  in Abhängigkeit von  $r$  nach der Gleichung

$$M_{z,r} = d[\ln(dc/dr)/dr] RT/(1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2 br \quad (1)$$

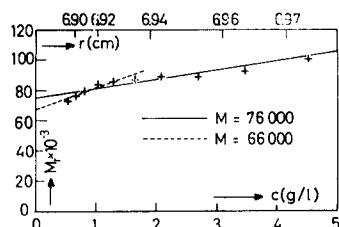


Abb. 1. Aus dem Sedimentationsgleichgewicht berechnetes Molekulargewicht der Amylomaltase in Abhängigkeit von der Konzentration  $c$  und dem Abstand vom Rotationszentrum. Phosphatpuffer, pH 6.85;  $I = 0.5$ .

( $\rho$  = Dichte der Lösung;  $b$  = Abstand des Bodens vom Rotationszentrum,  $\omega$  = Winkelgeschwindigkeit). Für das partielle spezifische Volumen des Proteins wurde  $\bar{v}_2 = 0.74$  gesetzt, ein Mittelwert aus zahlreichen anderen Proteinen. Eine Abweichung von 0.01 ergäbe einen Fehler in  $M$  von 5%.

In Abb. 1 ist das berechnete Molekulargewicht im Bereich unterhalb 5 g/l in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen und nach der Konzentration 0 zurückextrapoliert, um Effekte der Nichtidealität zu eliminieren. Bewertet man alle Messpunkte mit gleichem Gewicht, dann erhält man für das Molekulargewicht

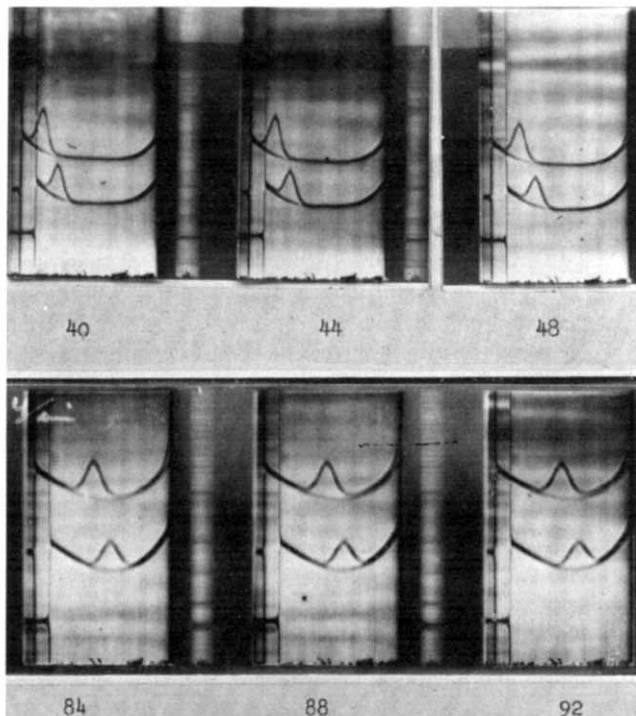


Abb. 2. Sedimentation der Amylomaltase bei 66 770 U/min; pH 6.85;  $I = 0.5$ ;  $c = 3.8$  bzw. 2.86 g/l. Bei den Aufnahmen von 40–48 min beträgt der Phasenwinkel 70°; für die späteren Aufnahmen (84–92 min) 60°.

$M = 76\ 000$ ; bei stärkerer Bewertung der Messpunkte niederer Konzentration ergibt sich  $M = 66\ 000$ . Als wahrscheinlichsten Wert des durch Gleichgewichtsmessungen erhaltenen Molekulargewichts ergibt sich  $M = 71\ 000 \pm 10\%$ .

### Sedimentationsgeschwindigkeit

In Abb. 2 ist ein Sedimentationslauf der Doppelsektorzelle mit zwei Konzentrationen dargestellt. Man erkennt einen gut ausgebildeten Peak, der auf eine einheitliche Substanz hinweist. Bei längerer Sedimentationsdauer und Konzentrationen über 5 g/l bilden sich geringe Mengen einer höher molekularen Komponente, deren Sedimentationskonstante bei etwa 9–10 Svedberg-Einheiten liegt. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um dasselbe Denaturierungsprodukt, das in den Elutionskurven der Gelchromatographie und bei den Gleichgewichtsmessungen auftrat. Auch WIESMEYER UND COHN<sup>4–6</sup> beobachteten bei der Ultrazentrifugierung in Phosphatpuffern niedrigerer Ionenstärke schneller sedimentierende Anteile.

Die unmittelbar im Puffer bestimmte Sedimentationskonstante  $s_{20}$  wurde unter Berücksichtigung der Viskositäten und Dichten von Wasser bzw. Puffer auf Wasser bezogen ( $s_{20,w}$ ). Das Ergebnis einer Reihe von Auswertungen enthält Tabelle I.

TABELLE I

SEDIMENTATIONSKONSTANTE VON AMYLOMALTASE BEI pH 6.85 ( $I = 0.5$ ; 20°) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION

Konzentration (g/l)	$s_{20} \times 10^{13}$ (sec)	$s_{20,w} \times 10^{13}$
1.26	4.17	4.79
1.89	4.23	4.85
1.95	4.25	4.88
3.81	4.20	4.82
7.56	4.14	4.75
Mittelwert	4.19	4.81 ± 0.04

Wie Tabelle I zeigt, ist die Sedimentationskonstante innerhalb der Fehlergrenzen von der Konzentration unabhängig. Unter dieser Bedingung kann man aus der Sedimentationskurve nach FAXEN<sup>11</sup> die Diffusionskonstante  $D$  berechnen. Danach gilt für ein molekular einheitliches Protein

$$D = \left( \frac{A}{H} \right)^2 \frac{1}{f^2} \frac{1 - s \omega^2 t}{4\pi t} \quad (2)$$

Hierin ist  $A$  die Fläche unter der Sedimentationskurve,  $H$  deren Höhe und  $f$  der Vergrößerungsfaktor. Bei Zutreffen von Gl. 2 erhält man eine Gerade mit der Steigung  $4\pi f^2 D$ , wenn man  $(A/H)^2$  gegen  $t(1 - s\omega^2 t)$  aufträgt.

Aus Abb. 3 ist zu entnehmen, dass die Methode von FAXEN auf unsere Lösungen von Amylomaltase anwendbar ist. Die Neigung der Geraden beträgt  $1.8 \cdot 10^{-3}$ . Daraus ergibt sich mit  $4\pi f^2 = 3.00 \cdot 10^3$   $D = 6.01 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ . Das Ergebnis von drei solchen Versuchen ist in Tabelle II zusammengestellt.

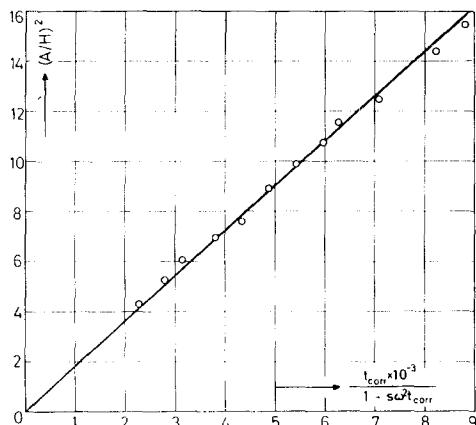


Abb. 3. Auswertung eines Sedimentationslaufes nach Faxen.  $c = 1.95 \text{ g/l}$ ;  $\omega^2 = 2.823 \cdot 10^7$ ;  $\omega^2 s = 1.20 \cdot 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ ;  $f = 15.45$ ;  $t_{\text{corr}} = t - 673 \text{ sec}$ .

#### Diffusionsmessungen

Zur direkten Bestimmung der Diffusionskonstante wurde das Diffusions- und Elektrophoresegerät (Modell E) der Fa. Beckman verwendet. Die Konzentrationsgradientenkurve wurde mittels der Schlierenoptik nach Philpot-Svensson mit Licht der Wellenlänge 5460 Å aufgenommen. Die Auswertung geschah in der üblichen Weise. Tabelle III enthält das Ergebnis einiger Versuche.

Ein Vergleich der direkt bestimmten Diffusionskonstanten in Tabelle III mit den nach FAXEN aus der Sedimentation berechneten Tabelle II zeigt, dass innerhalb

TABELLE II

DIFFUSIONSKOEFFIZIENT VON AMYLOMALTASE, ERMITTelt NACH FAXEN<sup>11</sup> AUS DEM SEDIMENTATIONSDIAGRAMM

$c$ (g/l)	$D_{20} \times 10^7$ ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ )	$D_{20,w} \times 10^7$ ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ )
1.89	6.16	6.50
1.95	6.01	6.33
3.81	6.51	6.86
Mittelwert	6.2	$6.55 \pm 0.3$

der Fehlergrenzen Übereinstimmung besteht. Wäre das Enzym uneinheitlich, so sollte die nach FAXEN berechnete Diffusionskonstante höher als die direkt bestimmte sein, da das Zentrifugalfeld die Komponenten verschiedenen Molekulargewichts auseinanderzieht. Der kleine Effekt in dieser Richtung liegt innerhalb der Fehlergrenzen.

#### Molekulargewicht und Reibungsverhältnis

Setzt man in die Svedbergsche Gleichung  $M = RTs/D(1 - \bar{v}_2\varrho)$  die Diffusionskonstante nach FAXEN ein (Tabelle II), so erhält man  $M = 69\,000$ , verwendet man den direkt bestimmten Wert (Tabelle III), so ergibt sich  $M = 71\,000$ . Diese Werte

TABELLE III

DIREKT BESTIMMTE DIFFUSIONSKONSTANTEN VON AMYLOMALTASE BEI 20°; pH 6.85;  $I = 0.5$ ,  
PHOSPHATPUFFER

$c$ (g/l)	$D_{20} \times 10^7$ ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ )	$D_{20,w} \times 10^7$ ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ )
0.43	6.3	6.7
0.57	5.7	6.0
0.63	5.9	6.2
Mittelwert	6.0	6.3 $\pm$ 0.30

stimmen ausgezeichnet mit dem Wert aus Gleichgewichtsmessungen  $M = 71\ 000$  überein. Die Gesamtheit der Messungen ergibt als wahrscheinlichsten Wert für die Amylomaltase bei Berücksichtigung der Unsicherheit von  $\bar{v}_2$   $M = 71\ 000 \pm 5\ 000$ .

Man kann das Reibungsverhältnis des Proteins nach der Gleichung

$$\frac{f}{f_0} = \left( \frac{1 - \bar{v}_2 \rho_w}{D_{20,w}^2 \cdot s_{20,w} \cdot \bar{v}_2} \right)^{1/3} \cdot 10^{-8} \quad (3)$$

berechnen. Dieses Verhältnis gibt die Reibung der Proteinmoleküle im Verhältnis zur Reibung kugelförmiger Teilchen nach dem Stokes'schen Gesetz an. Nach Einsetzen der hier gewonnenen Zahlenwerte ergibt sich  $f/f_0 = 1.27$ . Sowohl im Molekulargewicht als auch im Reibungsverhältnis entspricht demnach die Amylomaltase globulären Proteinen der Größenordnung von Serumalbumin oder Hämoglobin.

#### Elutionsvolumen an einer Sephadexsäule im Vergleich zu anderen Proteinen

Um das Molekulargewicht noch durch eine unabhängige Methode zu sichern, wurde das Elutionsvolumen mit dem anderer Proteine an einer Säule (2 cm  $\times$  50 cm),

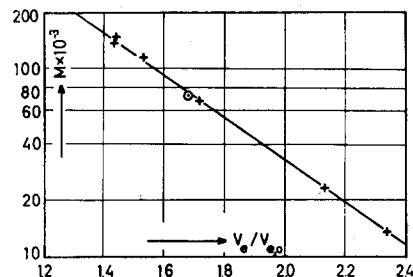


Abb. 4. Relatives Elutionsvolumen der Amylomaltase (○) im Vergleich mit anderen Proteinen (+) Alkoholdehydrogenase, Glukoseoxidase, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, Rinder-serumalbumin, Chymotrypsin, Cytochrom c.

die Sephadex G-200 enthielt, verglichen. Die Elutionsvolumina  $V_e$  wurden auf das Elutionsvolumen  $V_{e,0}$  von Blue Dextran bezogen. Das Ergebnis ist in Abb. 4 aufgetragen. Die gemeinsame Gerade zeigt, dass sich die von uns präparierte Amylomaltase auch hinsichtlich ihres gelchromatographischen Verhaltens gut in andere globuläre Proteine einfügt.

### *Elektrophoretische Einheitlichkeit und isoelektrischer Punkt*

Die Versuche wurden im Elektrophorese-Diffusionsgerät Modell E von Beckman bei  $1^\circ$  ausgeführt. Der Zellenquerschnitt beträgt  $q = 0.75 \text{ cm}^2$ , die Länge des Lichtwegs war  $2 \times 2.5 \text{ cm}$ . Die Auswertung geschah mit der Rayleigh-Interferenzoptik und der Schlierenoptik. Alle Messungen wurden bei der Ionenstärke  $I = 0.2$  vorgenommen. Die elektrophoretische Beweglichkeit wurde auf Wasser reduziert.

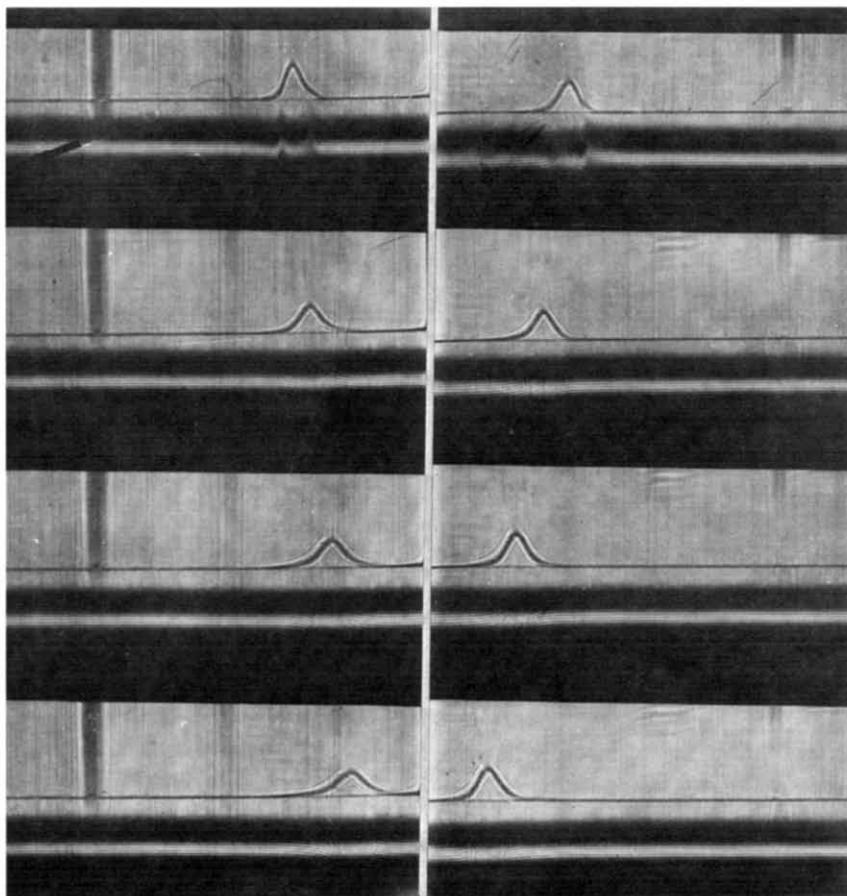


Abb. 5. Elektrophorese von Amylomaltase bei pH 5.05 und  $1^\circ$ . Links aufsteigender, rechts absteigender Peak. Die Zeiten beziehen sich auf das Umpolen der Elektroden während des Laufes. Vorher war die Elektrophorese 3 h in umgekehrter Richtung gelaufen.

Abb. 5 zeigt die Aufnahme eines Elektrophoreseverlaufes bei pH 5.05. Die Gestalt sowohl des aufsteigenden als auch des absteigenden Peaks entspricht einem einheitlichen Protein.

Die gemessene Beweglichkeit  $u_{H_2O}$  wurde in Abb. 6 gegen den pH aufgetragen. Der Schnittpunkt der Interpolationskurve mit der Nullachse ergibt für die Ionenstärke 0.2 den isoelektrischen Punkt  $= 5.57 \pm 0.03$ .

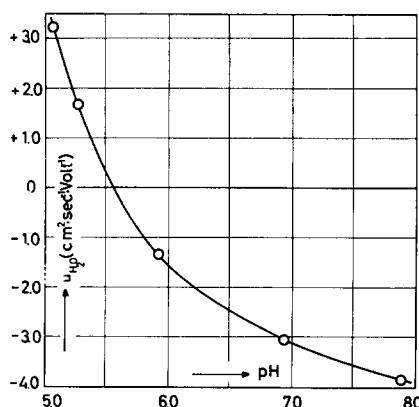


Abb. 6. Elektrophoretische Beweglichkeit von Amylomaltase in Abhängigkeit vom pH bei  $1^\circ$  und der Ionenstärke 0.2.

### III. EINSTELLUNG DES OLIGOMERENGLEICHGEWICHTS UND BESTIMMUNG DER GLEICHGEWICHTSKONSTANTEN

Um die zur Einstellung des Gleichgewichts notwendige Zeit zu ermitteln und gleichzeitig zu erkennen, wie das Enzym mit höheren Oligomeren reagiert, wurden reine Maltose bzw. reine Maltotetraose unter gleichen Bedingungen mit Enzym inkubiert und die zeitliche Abnahme des Oligomeren gemessen. Abb. 7 zeigt das Er-

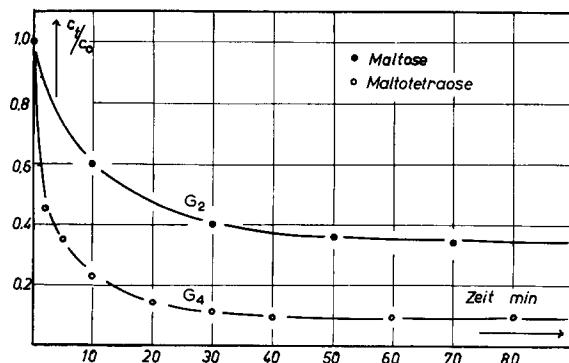


Abb. 7. Konzentrationsabnahme des Oligomeren als Funktion der Zeit bei  $28^\circ$ . Anfangskonzentration der Maltose bzw. Maltotetraose  $c_0 = 0.13 \text{ M}$ ;  $[E]_0 = 6.4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ; 0.1 M Phosphatpuffer, pH 6.9.

gebnis. Man erkennt, dass beide Substrate umgesetzt werden und zwar das höhere Oligomere mit höherer Geschwindigkeit. Die Transferreaktion findet offenbar an beliebigen Oligomeren bis Polymeren statt. Unter den angewandten Bedingungen ist das Gleichgewicht nach annähernd 1 h erreicht.

Grundsätzlich wäre es denkbar, dass ausser Glukose auch höhere Glieder der Reihe, etwa Maltose übertragen werden<sup>12</sup>. Folgender Versuch widerlegt diese Annahme. Reine Maltotetraose wird mit dem Enzym inkubiert und die zeitliche Ent-

TABELLE IV

MOLARE ANTEILE  $n_i$  DER NIEDEREN OLIGOMEREN UND GEWICHTSBRUCH  $R_6$  DER HÖHEREN OLIGOMEREN NACH VERSCHIEDENEN ZEITEN DER INKUBATION VON MALTOTETRAOSE MIT AMYLOMALTASE  $[E]_0 = 0.48 \cdot 10^{-7}$  M. Sonst wie in Abb. 7 (Mittelwerte aus jeweils 6 Einzelwerten).

Zeit (min)	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_4$	$n_5$	$R_6$ Gewichtsbruch
0	—	—	—	0.250	—	—
2	—	—	0.019	0.205	0.018	0.033
5	—	0.01	0.025	0.158	0.022	0.163
10	0.01	0.015	0.028	0.106	0.026	0.340
20	0.038	0.038	0.031	0.064	0.027	0.400
30	0.051	0.049	0.035	0.049	0.028	0.411
40	0.054	0.048	0.038	0.043	0.029	0.418
60	0.055	0.045	0.041	0.038	0.029	0.435
180	0.057	0.047	0.041	0.035	0.030	0.431

wicklung aller Zucker von der Glukose bis zur Pentaose, sowie der Gewichtsbruch  $R_6$  der höheren Oligomeren vom Hexameren ab aufwärts gemessen. Das Ergebnis ist in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV zeigt, dass zunächst in gleichen molaren Anteilen das Trimere und Pentamere entsteht. Es wird also nur ein Glukoserest übertragen, wobei die Maltotetraose zugleich als Donator und Acceptor wirkt. Im weiteren Verlauf entsteht eine statistische Verteilung aller möglichen (auch höheren) Oligomeren, die, wenn keine Hydrolyse einträtte (vergl. hierzu Abschnitt V), einem thermodynamischen Gleichgewicht zustrebte.

Das zu erwartende Gleichgewicht muss folgende Eigenschaften haben: Bezeichnen wir mit  $G_1, G_2, G_3$  usw. die Reihe Glukose, Maltose, Maltotriose usw. und mit  $n_1, n_2, n_3$  usw. die dazugehörigen molaren Konzentrationen oder Molzahlen\* so entsprechen den Reaktionen



die Gleichgewichtsbeziehungen

$$\begin{aligned} K_{13} &= (n_1 \cdot n_3) / n_2^2 \\ K_{14} &= (n_1 \cdot n_4) / (n_2 \cdot n_3) \\ K_{15} &= (n_2 \cdot n_4) / n_3^2 \end{aligned} \tag{4}$$

Allgemein entspricht der Reaktion



die Gleichgewichtsbedingung

$$K_{ik} = \frac{n_i \cdot n_k}{n_{i-1} \cdot n_{k-1}} \tag{6}$$

Aus der Verteilung der Oligomeren nach Einstellung des Gleichgewichts kann man die Konstanten  $K_{ik}$  aller Einzelgleichgewichte zwischen jeweils 4 bzw. 3 Oligo-

\* Da die Konstanten  $K_{ik}$  dimensionslos sind, kann man zu ihrer Berechnung ebensogut normierte Molzahlen wie Konzentrationen verwenden.

TABELLE V

VERTEILUNG DER ENTSTANDENEN OLIGOMEREN NACH 3 h INKUBATION VON MALTOSE, MALTO-TRIOSE UND MALTOTETRAOSE

Bedingungen wie in Tabelle IV.

Substrat	Maltose	Maltotriose	Maltotetraose
$n_1$	0.265	0.082	0.057
$n_2$	0.123	0.060	0.047
$n_3$	0.059	0.051	0.041
$n_4$	0.030	0.043	0.035
$n_5$	0.016	0.036	0.030
$\sum_{i=1}^5 n_i$	0.493	0.272	0.210
$R_6$	0.117	0.290	0.432

meren nach diesen Gleichungen ausrechnen. Die so gefundenen Konstanten sollten unabhängig davon sein, ob man von Maltose, Maltotriose oder Maltotetraose ausgeht. Eine entsprechende Versuchserie ist in Tabelle V dargestellt. Die Molzahlen  $n_i$  sind auf 1 Grundmol Ausgangssubstanz normiert.

Zur Berechnung der Gleichgewichtskonstanten  $K_{ik}$  nach Gl. 6 stehen uns für jeden Ausgangsstoff, wenn wir die ersten 5 Oligomeren zugrundelegen, 6 Gleichgewichte zur Verfügung, insgesamt also bei Verwendung von Maltose, Maltotriose und Maltotetraose 18 Konstanten. Diese wurden aus den Messwerten der Tabelle V ausgerechnet und sind in Tabelle VI zusammengestellt.

TABELLE VI

GLEICHGEWICHTSKONSTANTEN  $K_{ik}$  DER EINZELGLEICHGEWICHE, BERECHNET NACH GL. 6 AUS DEN MOLZAHLEN DER TABELLE V FÜR DREI VERSCHIEDENE AUSGANGS-OLIGOMERE  
Einstellzeit 3 h, Temperatur 28°.

$K_{ik}$	Maltose	Maltotriose	Maltotetraose	Mittelwert
$K_{13}$	1.03	1.15	1.05	1.07
$K_{14}$	1.09	1.15	1.03	1.09
$K_{15}$	1.03	1.14	1.09	1.07
$K_{24}$	1.05	0.99	0.98	1.01
$K_{25}$	1.10	0.99	0.98	1.02
$K_{35}$	1.05	0.99	1.00	1.01
Gesamtmittel: 1.04 ± 0.04				

Tabelle VI zeigt, dass der Wert aller Gleichgewichtskonstanten  $K_{ik}$ , unabhängig davon, von welchem Oligomeren man ausgeht, nahe bei 1 liegt. Der im Durchschnitt etwas höhere Wert 1.04 liegt nahe an der Fehlergrenze der Messungen. Ihm kommt jedoch eine reale Bedeutung insofern zu, als in den ersten 3 h bereits eine leichte Hydrolysereaktion mit der Gleichgewichtseinstellung konkurriert (vergl. Abschnitt IV). Diese Reaktion erhöht den Glukoseanteil und damit—scheinbar—die Gleichgewichtskonstanten, an welchen Glukose beteiligt ist ( $K_{13}$ ,  $K_{14}$ ,  $K_{15}$ ). Die drei

Konstanten, an welchen Glukose nicht beteiligt ist ( $K_{24}$ ,  $K_{25}$ ,  $K_{35}$ ), liegen wie Tabelle VI zeigt, fast genau bei 1.0.

Wir können daher annehmen, dass der korrekte Wert aller Gleichgewichtskonstanten  $K_{ik}$  praktisch gleich 1.0 ist. Das ist zu erwarten, da beim Transfer einer Glukoseeinheit nur eine  $\alpha$ -glukosidische Bindung gegen eine andere ausgetauscht wird, rein chemisch also fast nichts geschieht. Da bei jeder Einzelreaktion die Anzahl der Moleküle erhalten bleibt, sind auch keine erheblichen Entropieänderungen zu erwarten. Die freie Standardenthalpie ist somit  $\Delta G^\circ = RT \ln K_{ik} = 0$ . Voraussichtlich sind auch  $\Delta H^\circ$  und  $\Delta S^\circ$  sehr nahe gleich 0. In einer früheren Arbeit<sup>7</sup> haben wir aus der Temperaturabhängigkeit von  $K_{13}$  endliche Werte für  $\Delta H^\circ$  und  $\Delta S^\circ$  abgeschätzt. Obgleich diese nicht sehr weit von 0 lagen, erscheinen sie uns auf Grund der neueren Ergebnisse als noch zu hoch.

#### IV. MOLEKULARGEWICHTSVERTEILUNG UND HYDROLYSEREAKTION

Aus den Einzelleichgewichten ergibt sich eine definierte Gesamtverteilung der Oligomeren, falls sich kein irreversibler Vorgang überlagert. Im folgenden wird zuerst die theoretisch zu erwartende Verteilung abgeleitet und diese sodann mit dem experimentellen Befund verglichen.

##### Formale Beziehungen

Nach Einstellung des Oligomerengleichgewichtes befinden sich im System  $n_1$  Mole Glukose,  $n_2$  Mole Maltose, ...  $n_p$  Mole des Oligomeren mit dem Polymerisationsgrad  $P$ . Die Molzahlen  $n_i$  sind normiert auf 1 Mol Glukoseeinheiten des Gleichgewichtsgemisches. Es sind also in 1 Mol Glukoseeinheiten insgesamt

$$n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_p + \dots + n_\infty = \sum_{p=1}^{\infty} n_p \quad (7)$$

Mole Substanz enthalten. Hieraus ergibt sich der mittlere Polymerisationsgrad  $\bar{P}_n$  (Zahlenmittel) zu

$$\bar{P}_n = 1 / \sum_{p=1}^{\infty} n_p \quad (8)$$

Das Produkt

$$m_p = P n_p \quad (9)$$

ist der Gewichtsbruch des Oligomeren mit dem Polymerisationsgrad  $P$  in 1 Gramm Glukoseresten (nicht Glukose). Die Summe aller Gewichtsbrüche ist

$$\sum_{p=1}^{\infty} m_p = 1 \quad (10)$$

Aus diesen Definitionen und den Gleichgewichtsbeziehungen des vorigen Abschnittes ergeben sich, wie im Anhang nachgewiesen, folgende Verteilungsgleichungen

$$n_p = (1/\bar{P}_n^2) (1 - 1/\bar{P}_n)^{p-1} \quad (11)$$

$$m_p = (P/\bar{P}_n^2) (1 - 1/\bar{P}_n)^{p-1} \quad (12)$$

Ferner ist wegen Gl. 6 der Gewichtsbruch aller Polymeren vom  $i$ -ten ab aufwärts

$$R_i = 1 - \sum_{p=1}^{i-1} m_p \quad (13)$$

In Tabelle VII sind die nach Gl. 11 und 13 abgeleiteten Verteilungsdaten für 3 Oligomere als Substrate zusammengestellt. Der mittlere Polymerisationsgrad  $\bar{P}_n$  des Gemisches ist bei ungestörter Einstellung des Gleichgewichts identisch mit dem Polymerisationsgrad des als Substrat verwendeten Oligomeren.

TABELLE VII

BERECHNETE MOLEKULARGEWICHTSVERTEILUNGEN FÜR 3 SUBSTRATE NACH ERREICHUNG DES GLEICHGEWICHTS

Substrat	Maltose $\bar{P}_n = 2$	Maltotriose $\bar{P}_n = 3$	Maltotetraose $\bar{P}_n = 4$
$n_1$	0.250	0.111	0.0625
$n_2$	0.125	0.074	0.0470
$n_3$	0.0625	0.0495	0.0350
$n_4$	0.0312	0.037	0.0265
$n_5$	0.0156	0.022	0.0189
$\sum_{p=1}^5 n_p$	0.484	0.2895	0.1908
$R_6$	0.108	0.349	0.535

### Vergleich mit dem Experiment und Langzeitversuche

Ein Vergleich der experimentellen Werte der Tabelle V mit den berechneten in Tabelle VII ergibt folgendes: Bei Maltose als Ausgangsstoff ist die Übereinstimmung recht gut; bei den höheren Oligomeren ergeben sich aber Abweichungen, die sich besonders in den zu kleinen Werten des Betrages  $R_6$  zeigen. Zur Erklärung dieses Effektes könnte man annehmen, dass bei den höheren Oligomeren nach 3 h die Gleichgewichtseinstellung noch nicht beendet ist, da bei diesen die Gesamtverteilung breiter ist und damit mehr Einzelreaktionen erforderlich ist. Um dies zu klären, wurden mit Maltotetraose Versuche mit längeren Inkubationszeiten (6 und 24 h) durchgeführt, deren Ergebnis in Tabelle VIII zusammengestellt ist.

Das Ergebnis entspricht nicht der Erwartung, denn die gemessenen Zahlen-

TABELLE VIII

LANGZEITVERSUCHE MIT MALTOTETRAOSE

Versuchsbedingungen wie in Tabelle IV bzw. Abb. 7.

Substrat	Zeit:	6 h	24 h
$n_1$		0.071	0.151
$n_2$		0.062	0.091
$n_3$		0.056	0.067
$n_4$		0.046	0.049
$n_5$		0.040	0.040

werte entfernen sich mit zunehmender Inkubationszeit von den berechneten. Die zunehmenden Molzahlen der niederen Oligomeren und der Glukose zeigen, dass der mittlere Polymerisationsgrad des Gemisches mit der Zeit abnimmt, d.h. dass sich der Einstellung des Transferasegleichgewichts eine—wenn auch langsame—Hydrolysereaktion überlagert. Ein Mass für diese ist die Abnahme des mittleren Polymerisationsgrades  $\bar{P}_n$ .

Dieser ist auf direktem Wege kaum zugänglich; man kann ihn aber aus den Daten der vorangehend beschriebenen Messungen in folgender Weise abschätzen. Nach Gl. 8 ist

$$\bar{P}_n = \left( \sum_{P=1}^5 n_p + R_6/\bar{P}_{n(6)} \right)^{-1}, \quad (14)$$

wobei  $\bar{P}_{n(6)}$  der mittlere Polymerisationsgrad der im Gewichtsanteil  $R_6$  enthaltenen Oligomeren ist. Für ihn gilt in Umkehrung von Gl. 14

$$\bar{P}_{n(6)} = R_6 / \left( 1/\bar{P}_n - \sum_{P=1}^5 n_p \right) \quad (15)$$

Für das Gleichgewicht lässt sich  $\bar{P}_{n(6)}$  aus den Zahlenwerten der Tabelle VII berechnen. Das ergibt für Maltotetraose als Ausgangsmaterial  $\bar{P}_{n(6)} = 9.1$ . Für das Nichtgleichgewicht ist dieser Wert nicht ganz korrekt, doch bleibt der Fehler gering, so lange die Teilgleichgewichte nach Gl. 6 annähernd erhalten bleiben (vergl. Tabelle VI). Tabelle IX zeigt den Verlauf des so berechneten hydrolytischen Abbaus während der ersten 24 h.

TABELLE IX

MITTLERER POLYMERISATIONSGRAD  $\bar{P}_n$  BEI WACHSENDER INKUBATIONSZEIT, AUSGEHEND VON MALTOTETRAOSE ( $\bar{P}_{n(6)} = 9.1$ )

Zeit:	1 h	3 h	6 h	24 h	Gleichgewichtswerte nach Gl. 12 und 14
$R_6$	0.435	0.432	0.300	0.121	0.535
$\sum_{P=1}^5 n_p$	0.208	0.210	0.275	0.398	0.191
$\bar{P}_n$ nach Gl. 14	3.95	3.9	3.24	2.42	4.00

Das Ergebnis der Gleichgewichtsmessungen in Abschnitt IV und die in Tabelle IX zusammengestellten Versuchsergebnisse über den Abbau scheinen sich zu widersprechen. Die Konzentrationen benachbarter Oligomeren stehen mit guter Näherung im richtigen Gleichgewichtsverhältnis, zugleich aber ist der Anteil  $R_6$  zu niedrig und der Anteil der niederen Oligomeren zu hoch. Der Befund kann folgendermassen ge deutet werden.

In einer langsam hydrolytischen Reaktion wird Glukose aus den Oligomeren abgespalten. Die so erzeugte Glukose wird sodann unter nochmaligem Abbau der Oligomeren in Maltose umgesetzt und geht dadurch von unten her wieder in das

Transferasegleichgewicht ein. Da die Hydrolyse erheblich langsamer verläuft als die Transferasereaktion, können sich die niedrigen Oligomeren immer wieder annähernd ins Gleichgewicht setzen, jedoch der mittlere Polymerisationsgrad  $\bar{P}_n$  fällt wegen der thermodynamisch bedingten Irreversibilität der Hydrolyse stetig ab.

*Versuch einer präparativen Trennung der hydrolytischen Aktivität von der Transferaseaktivität*

Es gelang uns durch keine präparative Massnahme, die beiden Aktivitäten voneinander zu trennen, so dass die Annahme gerechtfertigt erschien, dass beide Wirkungen vom gleichen Enzym herrührten. Um das nachzuprüfen, wurde ein gereinigtes Enzympräparat an einer mit DEAE-Sephadex gefüllten Austauschersäule mit einem linearen Salzgradienten in 3 Fraktionen unterteilt, wobei die mittlere Fraktion (II) aus dem Maximum, die beiden anderen Faktionen (I und II) aus den Randbezirken der Elutionskurve (vergl. Abb. 8) entnommen wurden. Die Fraktionen wurden auf gleiche Enzymkonzentration gebracht und 5 h mit Maltoselösung ( $1 \cdot 10^{-3}$  M) inkubiert.

Nach dieser Zeit sind 15% der Maltose umgesetzt. Ohne Hydrolyse läge dann gleich viel Glukose und Maltotriose vor. Der relative Überschuss der Glukose über die Maltose ist daher ein Mass für das Verhältnis der Hydrolase- zur Transferaseaktivität. Tabelle X zeigt das Ergebnis.

TABELLE X

VERHÄLTNIS DER BILDUNG VON GLUKOSE ZU MALTOTRIOSE NACH 5 H INKUBATION VON MALTOSE MIT DREI VERSCHIEDENEN FRAKTIONEN VON AMYLOMALTASE

Faktion	$-A[G_2]$	$[G_1]$	$[G_3]$	$[G_1]/[G_3]$
I	0.14	0.11	0.06	1.84
II	0.17	0.13	0.07	1.84
III	0.14	0.12	0.07	1.74

Man sieht, dass durchschnittlich 80% mehr Glukose als Maltotriose entsteht, und dass das Verhältnis der beiden entstehenden Zucker auch unter verschärften Fraktionierbedingungen praktisch konstant bleibt. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Hydrolyse eine Nebenwirkung der Amylomaltase ist. In der nachfolgenden Arbeit wird gezeigt, in welcher Weise die beiden Reaktionen ineinander greifen.

## V. EXPERIMENTELLES

### *Aktivitätsbestimmung*

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach der Vorschrift von MONOD UND TORRIANI<sup>2</sup>. Eine etwas andere Vorschrift geben WIESMEYER UND COHN<sup>4</sup> an. Unter Berücksichtigung der kinetischen Ergebnisse der nachfolgenden Arbeit entspricht eine Monod-Einheit (ME) etwa 1.67 Wiesmeyer-Cohn-Einheiten (WE). Der Proteingehalt der Lösung wurde während der Präparation nach RIEDER<sup>15</sup> mit Folin-Ciocalteu-Reagenz bestimmt. An reinen Proben wurde der Proteingehalt mit Hilfe eines mittleren Brechungssinkments ( $dn/dc = 0.185$ ) aus Ultrazentrifugen- oder Elektrophoreseaufnahmen berechnet. Die spezifische Aktivität rechnen wir in ME/mg Protein als Einheit.

TABELLE XI

## EFFEKTIVITÄT DER TRENNSTUFEN

 $f$  = Anreicherungsfaktor bezogen auf Gesamtprotein.

Trennschritt	ME/g	Ausbeute	ME/ml	ME/mg	$f$
(1) Nucleinsäurefällung	2280	88	540	44	(1)
(2) 1. Gradientenelution	1700	73	1950	1840	40
(3) $\text{Al}_2\text{O}_3$	1047	45	6800	4540	95
(4) 2. Gradientenelution	860	37	9000	5760	120
(5) 3. Gradientenelution	790	34	7500	6100	132
(6) Ultrafiltration	651	28	71200	6100	132

## Präparation des Enzyms

Die Züchtung von *Escherichia coli*, Stamm ML wurde in Tauchkulturen nach MONOD UND TORRIANI<sup>2</sup> vorgenommen\*. 10 l Nährlösung ergaben nach 20 h 30–35 g Bakterien. Nach dem Ultraschallaufschluss und der Nucleinsäurefällung erhielt man eine Lösung der Aktivität 540 ME/ml entsprechend 2280 ME/g Bakterien bzw. 44 ME/mg Protein. Die weitere Anreicherung geschah durch dreimalige Elution aus einer mit DEAE-cellulose (A 50 coarse bzw. medium) gefüllten Säule mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten und eine zwischengeschaltete Adsorption–Desorption an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nach WIESMEYER UND COHN<sup>4</sup> (vergl. Tabelle XI). Nach Konzentrierung der Enzymlösung an einem LKB-Ultrafilter wird sie an Sephadex G-200 (Säule 2 cm  $\times$  40 cm) in ein definiertes Puffermilieu überführt. Das Elutionsdiagramm zeigt einen symmetrischen Peak mit einem kleinen inaktiven Vormaximum, das denaturiertem Protein entspricht (vergl. Abb. 8). Für die in Abschnitt II beschriebenen Messungen wurde jeweils der mittlere Teil des Peaks herausgeschnitten.

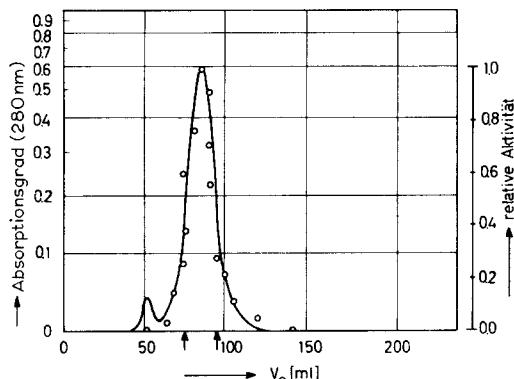


Abb. 8. Elutionskurve und Messpunkte der Aktivität o des gereinigten Enzyms. Der Teil zwischen den Pfeilen wird für die Versuche verwendet.

## Präparation und Analyse der Oligomeren

6 g reine Maltose wird in 60 ml einer Lösung mit 1000 ME/ml Amylomaltase

\* Der Stamm wurde uns freundlicherweise von Prof. J. Monod zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle vielmals danken.

2 Tage bei 28° inkubiert. Die Trennung erfolgt in einer Säule (4.5 cm × 160 cm) von Sephadex G-25 mit einer Geschwindigkeit von 120 ml/h im ersten Lauf. Die Spaltenfraktionen der Elutionskurve wurden sodann noch zweimal durch die Säule geschickt. Ausbeute chromatographisch reiner Oligomerer: 415 mg Maltotriose, 254 mg Malto-tetraose, 108 mg Malto-pentaose.

Die Analyse des Oligomerengemisches geschah durch Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel G (Merck), imprägniert mit B(OH)<sub>3</sub>. Schichtdicke 250 µm. Laufmittel Essigester-Eisessig-Wasser (10:14:3.5, Volumina). Aufgetragene Menge 0.5 mg/mm<sup>2</sup>. Sichtbarmachung der Zonen durch Besprühen der Platten zuerst mit 1 M methanolische NaOH, dann mit 4% Lösung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in 1 M methanolische NaOH (bei 60°). Die Farbzonen wurden in eine Standardlösung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid gebracht und colorimetrisch nach einer Eichkurve ausgewertet.

## VI. DISKUSSION

Durch Verwendung der Austauscherchromatographie an Sephadexgelen konnte ein sehr einheitliches Enzym gewonnen werden, das nach verschiedenen Methoden übereinstimmend ein Molekulargewicht von 71 000 hat und nach seinem allgemeinen Verhalten den globulären Proteinen dieses Molekulargewichtsbereiches zuzuordnen ist. In Konzentrationen über 5 g/l wird es instabil und neigt zu Aggregationen und Aktivitätsverlusten. Möglicherweise hängt damit das höhere Molekulargewicht zusammen (124 000), welches WIESMEYER UND COHN gefunden haben.

Die scheinbaren Diskrepanzen in der Oligomerenverteilung, fast korrekte Gleichgewichtseinstellung zwischen benachbarten Oligomeren bei zunehmend zu niedrigem Polymerisationsgrad der Gesamtverteilung, erklären sich durch Überlagerung einer schnellen Einstellung des Transferasegleichgewichtes durch eine vom gleichen Enzym ausgelöste langsame Hydrolysereaktion. Das Ineinanderspiel dieser Reaktionen untersucht die nachfolgende Arbeit.

## ANHANG

### Ableitung der Gleichungen II bis I<sub>3</sub><sup>13,14</sup>

Aus den Gleichungen des Abschnittes III folgt

$$n_3 = K_{13} n_2^2 / n_1 = n_2 K_{13} (n_2 / n_1)$$

$$n_4 = K_{14} n_2 n_3 / n_1 = n_2 K_{13} K_{14} (n_2 / n_1)^2$$

und allgemein für den Polymerisationsgrad *P*

$$n_p = (n_2 / n_1)^{P-2} \prod_{P=1}^P K_{ip} \quad (a)$$

Sind alle Gleichgewichtskonstanten gleich:  $K_{13} = K_{14} = \dots + K_{tp} = K$ , so vereinfacht sich Gl. a zu

$$n_p = n_2 (K n_2 / n_1)^{P-2} \quad (b)$$

Mit Hilfe der Gl. 7 bis 9 können die Molenbrüche  $n_3$  und  $n_2$  eliminiert werden. Hierfür setzt man

$$Kn_2/n_1 = \alpha \text{ und } n_2(Kn_2/n_1) = \text{const}$$

Dies eingesetzt in Gl. b ergibt

$$n_p = \text{const } \alpha^P; \quad (c)$$

und für die Gewichtsbrüche gilt dann wegen Gl. 9

$$m_p = \text{const } Pa^P \quad (d)$$

Wegen Gl. 10 ist

$$1/\text{const} = \alpha + 2\alpha^2 + 3\alpha^3 + \dots = \frac{\alpha}{1-\alpha} + \frac{\alpha^2}{(1-\alpha)^2} + \frac{\alpha}{(1-\alpha)^3}$$

Setzen wir das in Gl. c und d ein, so erhalten wir

$$n_p = (1-\alpha)^2 \alpha^{P-1} \text{ und } m_p = (1-\alpha)^2 P \alpha^{P-1} \quad (e)$$

Unter Berücksichtigung von Gl. 8 können wir  $\alpha$  durch das Zahlenmittel des Polymerisationsgrades ersetzen. Aus Gl. 8 und c folgt nämlich

$$\begin{aligned} 1/\bar{P}_n &= (1-\alpha)^2 (1 + \alpha + \alpha^2 + \dots) = (1-\alpha) \\ \alpha &= 1 - 1/\bar{P}_n \end{aligned} \quad (f)$$

#### DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

#### LITERATUR

- 1 J. MONOD UND A. M. TORRIANI, *Compt. Rend.*, 227 (1948) 240.
- 2 J. MONOD UND A. M. TORRIANI, *Ann. Inst. Pasteur*, 78 (1950) 65.
- 3 M. DOUDOROFF, W. Z. HASSID, W. PATMAN, A. L. POTTER UND J. LEDERBERG, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 921.
- 4 H. WIESMEYER UND M. COHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 417.
- 5 H. WIESMEYER UND M. COHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 427.
- 6 H. WIESMEYER UND M. COHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 440.
- 7 G. V. SCHULZ, V. HÄSELBARTH, H. E. KELLER UND H. A. SCHWINN, *Makromol. Chem.*, 92 (1968) 81.
- 8 H. A. SCHWINN UND G. V. SCHULZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 227 (1971) 313.
- 9 H. LÜTJE, *Z. Physik. Chem. Frankfurt*, 43 (1964) 11.
- 10 D. A. YPHANTIS, *Biochemistry*, 3 (1964) 297.
- 11 H. FAXEN, *Arch. Mat. Astron. Fysik*, 25B (1936) 13.
- 12 STANLAY, G. W. PEAT, B. WHEALAN UND S. A. REES, *Nature*, 172 (1953) 158.
- 13 G. V. SCHULZ, *Z. Physik. Chem. Leipzig*, 182 (1938) 127.
- 14 G. V. SCHULZ, *Z. Physik. Chem. Leipzig*, 132 (1936) 27.
- 15 H. P. RIEDER, *Clin. Chim. Acta*, 4 (1959) 737.

*Biochim. Biophys. Acta*, 227 (1971) 296-312