

BBA 66266

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER AMYLOMALTASE

## III. KINETISCHE ANALYSE DES REAKTIONSMECHANISMUS

H. SCHWINN\* UND G. V. SCHULZ

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

(Eingegangen am 14. August, 1970)

## SUMMARY

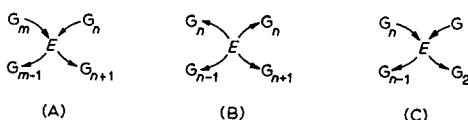
*Studies on amyloomaltase. III. Kinetic analysis of the reaction mechanism*

The kinetics of initial stage of the glucose transfer was measured starting from maltose, maltotriose and maltotetraose. The transfer reaction transforms two oligomers  $G_n$  into equal amounts of  $G_{n-1}$  and  $G_{n+1}$ . In another series of experiments the transfer to glucose as an additional acceptor was kinetically investigated. Thus more parameters could be determined which allow to calculate the equilibrium constants and the rate constants of almost all occurring partial reactions.

The transfer reaction consists of two steps with binary complexes (Scheme 2). In a side reaction the intermediate compound ( $E-G$ ) of the enzyme, amyloomaltase ( $\alpha$ -1,4-glucan:D-glucose 4-glycosyltransferase, EC 2.4.1.3), with glucose is hydrolysed. The hydrolysis is promoted more by maltose and less by maltotriose.

## I. EINLEITUNG

In vorangegangenen Arbeiten<sup>1-5</sup> wurde nachgewiesen, dass das Enzym Amyloomaltase ( $\alpha$ -1,4-Glucan:D-glucose 4-glycosyltransferase, EC 2.4.1.3) von jedem Vertreter der Amylosereihe einen Glukoserest abtrennt und auf einen anderen unter Aufrechterhaltung der  $\alpha$ -glukosidischen Bindung überträgt. Als Donator fungieren alle Oligo- bis Polymeren von der Maltose an aufwärts, als Acceptor zusätzlich Glukose. Allgemein kann man die Reaktion durch das Schema 1A wiedergeben, wobei  $G_m$  den Donator und  $G_n$  den Acceptor bezeichnet.  $G$  ist ein Glukoserest und  $E$  bezeichnet das Enzym.



Schema 1.

\* Dissertation, 2. Teil, Mainz, 1968.

Die kinetische Analyse wird erheblich vereinfacht, wenn man das gleiche Oligomere  $G_n$  als Donator und Acceptor verwendet, wie Schema 1B zeigt. In diesem Fall bilden sich im Anfangsstadium der Reaktion durch den Glukosetransfer die beiden Nachbaroligomeren  $G_{n-1}$  und  $G_{n+1}$  in gleichen molaren Mengen<sup>5</sup>. Abweichungen von dieser Stöchiometrie, die besonders bei Maltose und Maltotriose auftreten (vergl. Abschnitt III), sind auf eine zusätzliche Hydrolysereaktion zurückzuführen. In der vorangegangenen Arbeit wurde wahrscheinlich gemacht, dass die Hydrolyse vom gleichen Enzym verursacht wird.

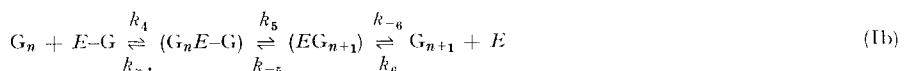
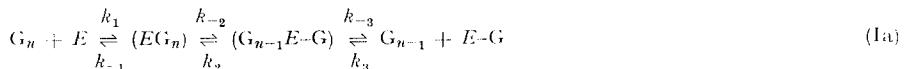
Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den Mechanismus der Reaktion genauer zu untersuchen und die aus ihm folgenden Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten zu bestimmen. Als Methode verwenden wir die quantitative chromatographische Bestimmung der bei der Reaktion entstehenden Oligomeren als Funktion der Zeit und der Konzentrationen (vergl. dazu die vorangegangene Arbeit<sup>5</sup>). Eine Serie von Versuchen geht von den reinen Oligomeren Maltose, Maltotriose und Maltotetraose aus gemäss Schema 1B; eine zweite Serie wird unter Zusatz von Glukose durchgeführt. Letztere wirkt, Schema 1C entsprechend, als konkurrierender Acceptor und erlaubt dadurch die Bestimmung einer Reihe zusätzlicher Parameter, so dass die Zahl der Bestimmungsstücke der Zahl der zu bestimmenden Einzelkonstanten angepasst werden kann.

Da es sich im Verlauf der Arbeit gezeigt hat, dass die Reaktion nicht über einen ternären Komplex verläuft, wird in Teil II ein Reaktionsmechanismus mit binären Komplexen nach der Stationärmethode durchgerechnet, wobei das Schema 1B sowie die Kombination von 1A und 1B zugrundegelegt werden. Für die Hydrolysereaktion werden für drei kinetisch unterscheidbare Reaktionstypen Gleichungen aufgestellt. In Teil III werden die Versuchsergebnisse mit den Rechnungen verglichen. In Teil IV wird der Versuch gemacht, für das im Teil III wahrscheinlich gemachte Reaktionsschema die Konstanten aller Teilreaktionen zu berechnen.

## II. FORMALE ZUSAMMENHÄNGE

### *Binärer Komplex bei der Reaktion mit einem Oligomeren $G_n$*

Bei Annahme binärer Komplexe zwischen Enzym und Substrat ist die Gesamtreaktion in zwei Halbreaktionen zu zerlegen: In der ersten Halbreaktion (Ia) übernimmt das Enzym vom Donator-Oligomeren einen Glukoserest, den es in der zweiten Halbreaktion (Ib) an das Acceptor-Oligomere weitergibt. Bei unseren Versuchen inkubierten wir jeweils nur eine Oligomerenart ( $G_2$ ,  $G_3$  oder  $G_4$ ) mit dem Enzym, so dass Donator und Acceptor identisch sind. Man kann dann erwarten, dass folgendes Schema die hauptsächlichsten Teilschritte der beiden Halbreaktionen beschreibt:



Hierbei bezeichnet die runde Klammer ( ) einen Michaelis'schen Enzym-Substrat-Komplex, der Bindestrich in  $E-G$  eine chemische Bindung. Eine solche muss ange-

nommen werden, da sonst die freie Energie der  $\alpha$ -glukosidischen Bindung bei der ersten Halbreaktion verloren gehen würde.

Die Bruttogeschwindigkeit der Transferreaktion ist

$$v_{tr} = 2 d[G_{n+1}] / dt \quad (1)$$

Der Faktor 2 berücksichtigt, dass zur Bildung eines Moleküls  $G_{n+1}$  zwei Moleküle  $G_n$  verbraucht werden. Für den Anfang der Reaktion, bei welchem noch  $[G_{n-1}] = [G_{n+1}] \ll [G_n]$  ist, folgen nach dem Stationärprinzip die Gleichungen<sup>6</sup>

$$2 [E]_0 / v_{tr} = a + b/[G_n] \quad (2)$$

mit

$$a = 1/k_2 + 1/k_{-3} + 1/K_2 k_{-3} + 1/k_{-6} \quad (2a)$$

$$b = (1/k_2 + 1/k_{-3})K_1/K_2 + (1/k_{-5} + 1/k_{-6})K_4 K_5 \quad (2b)$$

Auftragung nach Lineweaver-Burk ergibt daher eine Gerade mit dem Ordinatenabschnitt  $a$  und der Neigung  $b$  (vergl. Kurven I in Abb. 2 und 3).

Eine Geschwindigkeitskonstante mit negativem Index bezieht sich im folgenden stets auf die Dissoziation eines Enzym-Substrat-Komplexes oder auf die Spaltung einer  $\alpha$ -glukosidischen Bindung. Gleichgewichtskonstanten sind stets als Dissoziationskonstanten definiert:

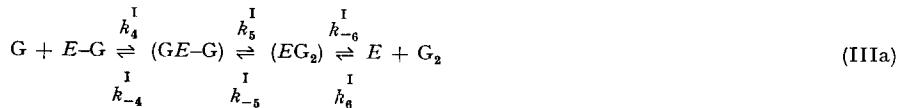
$$K_1 = k_{-1}/k_1 \quad (3)$$

Für die rechnerische Behandlung des bisher gegebenen Gleichungssystems ist es wichtig, dass bestimmte Identitätsbeziehungen zwischen verschieden indizierten Teilreaktionen benachbarter Oligomere existieren. Das zeigt im Schema 2 eine Aufstellung aller Teilreaktionen für die drei Oligomeren Maltose, Maltotriose und Malto-tetraose. Der obere Index (römische Ziffer) an jeder Konstante bezeichnet das Oligomere, auf welches sich die Konstante bezieht. Man sieht z.B., dass die Reaktionen 4, 5 und 6 der Maltose identisch mit den Reaktionen 1, 2 und 3 der Maltotriose usw. sind. Die darauf bezüglichen Konstanten kommen aber in den Gleichungen 2, 2a und 2b in verschiedenen Kombinationen vor, je nachdem, welches Oligomere man als Substrat verwendet.

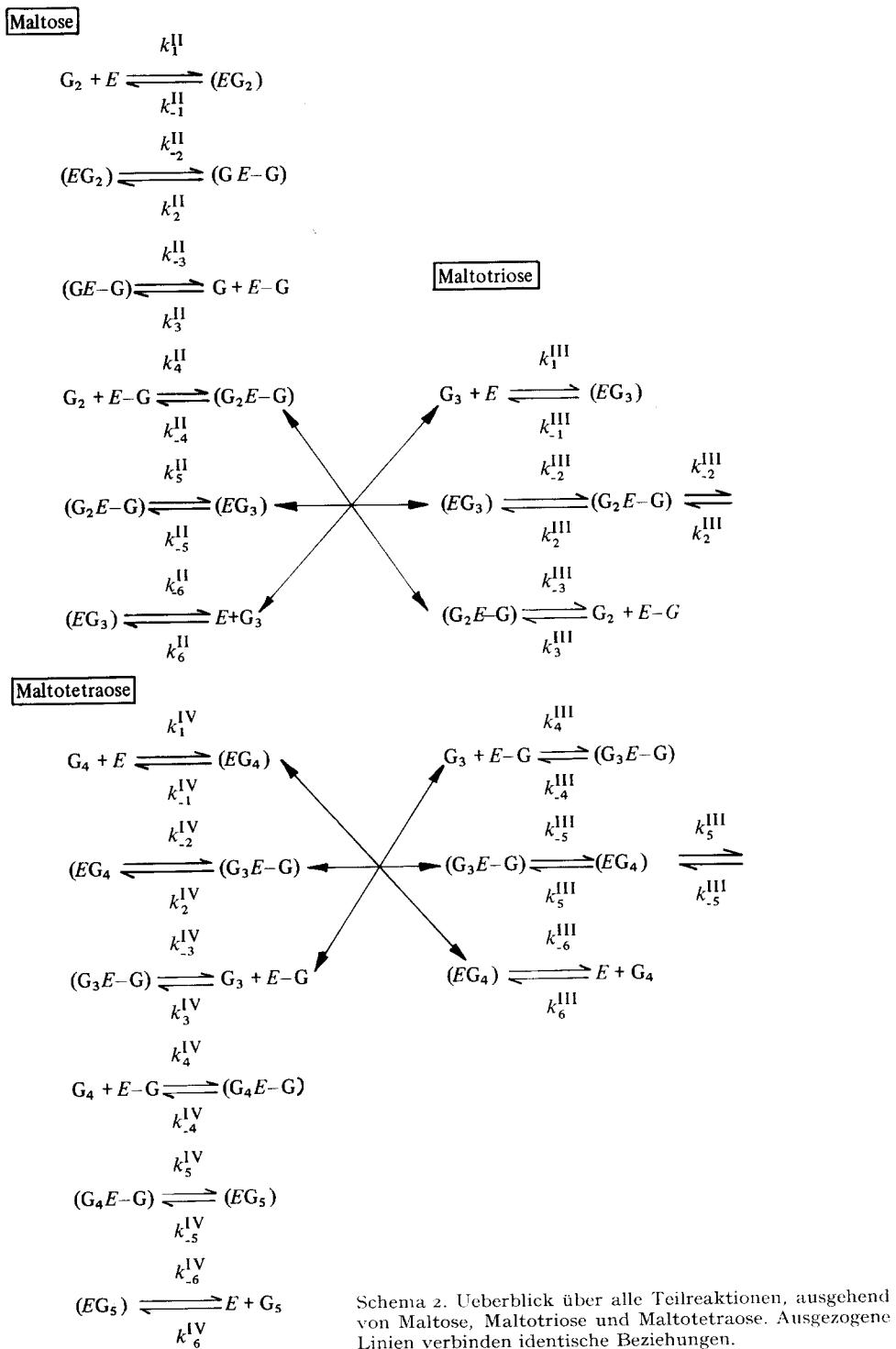
Bei Annahme eines ternären Komplexes ergeben sich quadratische Terme für die Substratkonzentration<sup>7,8</sup>. Das steht mit dem experimentellen Befund (Teil III) nicht in Übereinstimmung.

#### Die Kinetik bei Zusatz von Glukose

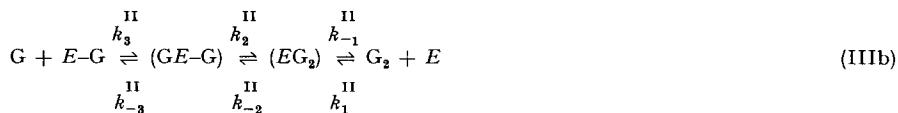
Eine weitere Serie von Informationen erhält man, wenn man dem jeweils verwendeten Oligomeren als kompetitiven Acceptor Glukose zusetzt. Da Glukose keine Donatorfunktion hat, kann sie die erste Halbreaktion Ia am Reaktionsbeginn nicht beeinflussen, gibt aber in Konkurrenz zu Reaktion Ib die weitere Übertragungsreaktion



Man sieht unmittelbar, dass Reaktion IIIa von rechts nach links gelesen identisch



mit der ersten Halbreaktion Ia der Maltose ist. Daher kann man die Konstanten dieser Reaktion—ohne ihre Identität zu ändern—in Bezug auf Maltose umindizieren und erhält an Stelle von Reaktion IIIa



Inkubiert man ein Oligomeres mit Glukose und Enzym, so erhält man eine modifizierte Reaktion, in der jedoch keine zusätzlichen Reaktionskonstanten gegenüber den im Schema 2 bereits enthaltenen vorkommen. Kombiniert man Reaktion IIIb mit Ia, b, so ergibt sich bei Beachtung von Gl. 3 das folgende Gleichungssystem.

Wir definieren zunächst zwei messbare Geschwindigkeiten: Die der normalen Transferreaktion auf das Oligomere  $G_n$  nach Gl. 1 und die Geschwindigkeit  $v_M$  der Bildung von Maltose durch Reaktion der Glukose mit der Enzym–Glukose-Verbindung  $E-G$

$$v_M = d[G_2]^*/dt \quad (4)$$

Wie  $v_M$  im Einzelfall aus den Versuchsdaten zu berechnen ist, wird im Abschnitt III gezeigt werden.

In den folgenden Gleichungen geben wir den Konstanten, die zu dem verwendeten Oligomeren gehören, keinen römischen Index, schreiben also z.B.  $k_{-6}$  an Stelle von  $k_{-6}^{\text{IV}}$ . Nur die zusätzlich durch Reaktion IIIa, b auftretenden Konstanten der Maltose werden mit II indiziert.

Eine Rechnung nach dem Stationaritätsprinzip ergibt dann (für kleine Umsätze)<sup>6</sup>:

$$2 [E]_0/v_{\text{tr}} = a_g + b_g/[G_n] + c_g/[G_n]^2 \quad (5)$$

$$[E]_0/v_M = \frac{2[G_n] [E]_0}{Y[G] v_{\text{tr}}} \quad (6)$$

$$v_M/v_{\text{tr}} = Y[G]/2[G_n] \quad (7)$$

Hierin sind

$$a_g = 1/k_{-6} + (1 + 1/K_2)/k_{-3} \quad (5a)$$

$$b_g = (1/k_2 + 1/k_{-3})K_1/K_2 + (1/k_{-5} + 1/k_{-6})K_4K_5 + (1/k_3 + 1/k_2^{\text{II}})Y[G] \quad (5b)$$

$$c_g = (1/k_2 + 1/k_{-3})Y(K_1/K_2) [G] \quad (5c)$$

$$Y = \frac{(1/k_{-5} + 1/k_{-6})K_4K_5}{(1/k_2^{\text{II}} + 1/k_{-3}^{\text{II}})K_3^{\text{II}}} \quad (8)$$

Gleichung 5 ergibt bei Auftragung von  $[E]_0/v_{\text{tr}}$  gegen  $1/[G_n]$  eine aufwärts gekrümmte Kurve, aus der sich gegenüber den Gleichungen 2, 2a, 2b zusätzliche Konstantenbeziehungen ermitteln lassen. Ein weiterer Test besteht darin, dass bei Auftragung von  $v_M/v_{\text{tr}}$  gegen  $1/[G_n]$  nach Gl. 7 eine durch den Nullpunkt gehende Gerade resultiert (vergl. Abb. 2 und 3).

### Die Hydrolysereaktion

Folgende drei Reaktionstypen sind prinzipiell für eine konkurrierende Hydrolysereaktion denkbar:

(HI) Zwei verschiedene Enzyme, Amylomaltase  $E$  und eine Hydrolase  $E^h$  liegen in einem bestimmten Mengenverhältnis nebeneinander vor.

(HII) Die Hydrolyse erfolgt direkt aus der Verbindung  $E-G$ , durch Wasser als konkurrierendem Acceptor.

(HIII) Die Hydrolyse erfolgt aus dem Komplex  $(EG_n)$  oder  $(G_{n-1}E-G)$ , zwei Möglichkeiten, die mit den hier angewandten Methoden nicht unterschieden werden können.

Die Rechnung ergibt dann folgende Gleichungen:

*Reaktionstyp HI.* Nach Gleichung 2 ist für Maltose als Substrat

$$[E]_0/v_{tr} = a + b/[G_2]$$

Die Hydrolyse würde einer Michaelisgleichung gehorchen, so dass

$$[E^h]_0/v_h = 1/k_h + K_h/k_h[G_2]$$

ist, mit

$$v_h = d[G]/dt$$

Daraus folgt

$$\frac{v_h}{v_{tr}} = \frac{[E^h]_0}{[E]_0} \cdot \frac{a[G_2] + b}{(1/k_h)[G_2] + K_h/k_h} \quad (\text{III})$$

Falls nicht einer der unwahrscheinlichen Fälle eintritt, dass entweder  $b \ll a [G_2]$  und zugleich  $K_h \ll [G_2]$ , oder  $a = 1/k_h$  und  $b = K_h/k_h$  ist, führt Gl. HI zu einer Abhängigkeit des Verhältnisses  $v_h/v_{tr}$  von  $[G_2]$ . Das ist nach Tabelle I nicht der Fall.

*Reaktionstyp HII.* Dieser entspricht folgendem Reaktionsschema



Eine Rechnung nach dem Stationaritätsprinzip ergibt für diesen Fall

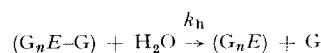
$$2[E]_0/v_{tr} = a + \beta/[G_n] + \gamma/[G_n]^2$$

und

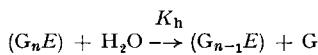
$$v_h/v_{tr} = \text{const}/[G_n] \quad (\text{H2})$$

Letztere Gleichung ist auch qualitativ leicht zu verstehen. Wenn das Oligomere  $G_n$  und  $H_2O$  als konkurrierende Acceptoren auftreten, dann muss bei Zusatz grösserer Mengen von  $G_n$  die Hydrolyse gegenüber dem Transfer vermindert werden. Die Versuche sprechen jedoch deutlich gegen diese naheliegende Annahme. Daher wurde ein dritter Weg durchgerechnet, der durch die Versuche bestätigt wurde.

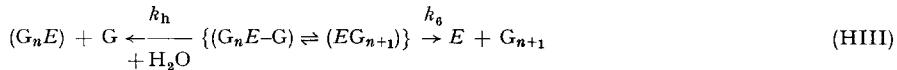
*Reaktionstyp HIII.* In diesem Fall erfolgt die Hydrolyse aus dem Michaelis-Komplex der Zwischenverbindung  $E-G$  mit einem Oligomeren oder direkt aus dem Komplex  $(EG_n)$ :



oder



Man kann die beiden Varianten in Anlehnung an Reaktionstyp Ib folgendermassen zusammenfassen:



Nach dem Stationaritätsprinzip folgt daraus<sup>6</sup>

$$2[E]_0/v_{tr} = \alpha' + \beta'/[G_n]$$

$$v_h/v_{tr} = \text{const} \quad (\text{H3})$$

wobei

$$\text{const} = \frac{k_h(k_{-3} + k_{-4})}{2 k_3 k_{-4}}$$

ist.

### III. KINETISCHE VERSUCHE

Die Reaktionszeiten wurden so gewählt, dass der Umsatz zwischen 15 und 20% des eingesetzten Oligomeren  $[G_n]$  lag. In diesem Bereich ist die Zeit-Umsatz-Kurve mit ausreichender Genauigkeit linear, wie Abb. I zeigt.

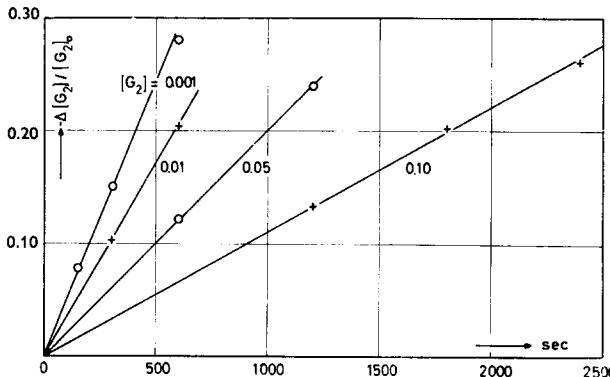


Abb. I. Prüfung der Linearität des Umsatzes als Zeitfunktion für den Anfang der Reaktion an Maltose  $[G_2]$ .  $[E]_0 = 0.81 \cdot 10^{-4}$  M; pH 6.9; 0.1 M Phosphatpuffer.

Die umgesetzten Mengen der Oligomeren wurde, wie früher beschrieben<sup>5</sup>, colorimetrisch nach dünnenschichtchromatographischer Trennung bestimmt. Jede Messserie wurde durch parallel geführte Nullversuche (ohne Enzym) kontrolliert. Die in den Tabellen angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 6 Einzelversuchen. Die Standardabweichung dieser Mittelwerte beträgt  $\pm 5\%$ .

Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden aus den Messwerten wie folgt berech-

net: Die Bruttoreaktion ergibt sich aus der Konzentrationsabnahme des eingesetzten Oligomeren  $G_n$

$$v_{Br} = -A[G_n]/\Delta t \quad (9)$$

und die Transferreaktion nach Gl. 1.

Die Hydrolysereaktion ist bei Maltotriose und Maltotetraose durch

$$v_h = A[G]/\Delta t \quad (10)$$

gegeben. Bei Maltose als Ausgangsmaterial entsteht auch Glukose durch die normale Transferreaktion, die außerdem Maltotriose liefert. Daraus folgt

$$v_h (\text{Maltose}) = (A[G] - A[G_3]/\Delta t) \quad (11)$$

Ferner muss gelten

$$v_{Br} = v_{tr} + v_h \quad (12)$$

TABELLE I

KINETIK DER 3 OLIGOMEREN

Umsatz als Funktion der Zeit und der Ausgangskonzentration  $[G_n]_0$ ; pH 6.9; 0.1 M Phosphatpuffer; 28°. Geschwindigkeiten  $v$  in Mol·l<sup>-1</sup>·sec<sup>-1</sup>. Konzentration in M.

$(G_n)_0 \times 10^2:$	10.0	5.0	1.0	0.50	0.20	0.10
Reaktionszeit (sec):	1800	1200	600	300	300	300
<i>Maltose: mit Enzymkonzn. <math>[E]_0 = 0.81 \cdot 10^{-7}</math> M</i>						
$-A[G_2] \times 10^2$	2.04	1.19	0.204	0.057	0.030	0.015
$+A[G_3] \times 10^2$	0.85	0.48	0.084	0.021	0.012	0.006
$+A[G] \times 10^2$	1.42	0.89	0.157	0.042	0.024	0.012
$v_h/v_{tr}$ nach Gln. 11, H <sub>3</sub>	0.21	0.21	0.21	0.19	0.25	0.25
<i>Maltose mit zusätzlich 0.01 M Glukose, <math>[E]_0 = 0.69 \cdot 10^{-7}</math> M</i>						
$-A[G_2] \times 10^2$	1.24	0.47	0.144	0.035	0.013	0.0044
$+A[G_3] \times 10^2$	0.51	0.19	0.056	0.014	0.0052	0.0018
<i>Maltotriose: mit Enzymkonzn. <math>[E]_0 = 0.35 \cdot 10^{-7}</math> M</i>						
$-A[G_3] \times 10^2$	1.30	0.81	0.25	0.086	0.041	0.020
$+A[G_4] \times 10^2$	0.63	0.38	0.12	0.041	0.018	0.009
$+A[G_2] \times 10^2$	0.67	0.42	0.13	0.045	0.019	0.011
$+A[G] \times 10^2$	0.05	0.03	0.01	0.003	0.001	—
$v_h/v_{tr}$ Gln. 10, H <sub>3</sub>	0.036	0.04	0.045	0.043	0.03	—
<i>Maltotriose mit zusätzlich 0.01 M Glukose, <math>[E]_0 = 0.35 \cdot 10^{-7}</math> M</i>						
$-A[G_3] \times 10^2$	1.26	0.73	0.185	0.078	0.036	0.026
$+A[G_4] \times 10^2$	0.62	0.34	0.080	0.031	0.011	0.004
$+A[G_2] \times 10^2$	0.66	0.43	0.13	0.064	0.040	0.027
<i>Maltotetraose: mit Enzymkonzn. <math>[E]_0 = 0.35 \cdot 10^{-7}</math> M</i>						
$-A[G_4] \times 10^2$	1.89	1.18	0.28	0.102	0.051	0.030
$+A[G_5] \times 10^2$	0.90	0.57	0.141	0.051	0.024	0.018
$+A[G_3] \times 10^2$	0.97	0.58	0.15	0.048	0.027	0.015
<i>Maltotetraose mit zusätzlich 0.01 M Glukose, <math>[E]_0 = 0.35 \cdot 10^{-7}</math> M</i>						
$-A[G_4] \times 10^2$	2.02	0.97	0.33	0.105	0.055	0.029
$+A[G_5] \times 10^2$	0.95	0.49	0.133	0.040	0.017	0.006
$+A[G_3] \times 10^2$	0.95	0.56	0.183	0.062	0.037	0.022
$+A[G_2] \times 10^2$	0.0	0.047	0.101	0.023	0.022	0.017

Für die Reaktionen mit *Glukose als zusätzlichem Acceptor* (Abschnitt IIb) entsteht eine zusätzliche Menge Maltose. Da beim Arbeiten mit Maltotriose auch durch die normale Transferreaktion Maltose entsteht, ist dieser mit  $\Delta[G_4]$  identische Betrag von  $\Delta[G_2]$  zu subtrahieren, um den korrekten Wert von  $v_m$  nach Gl. 3 zu erhalten. Das ergibt

$$v_m \text{ (Maltotriose)} = (\Delta[G_2] - \Delta[G_4])/\Delta t \quad (13)$$

Geht man von Maltotetraose aus, so entsteht Maltose primär nur durch die Acceptorreaktion mit Glukose. Daher gilt für Maltotetraose und die höheren Oligomeren

$$v_m \text{ (Maltotetraose)} = \Delta[G_2]/\Delta t \quad (14)$$

Die Ergebnisse der in der beschriebenen Weise durchgeföhrten und ausgewerteten Versuche sind in der Tabelle I zusammengestellt. Die graphischen Darstellungen in den Abbn. 2 und 3 ermöglichen es, das aufgestellte Reaktionsschema zu prüfen und die Zahlenwerte der linearen Beziehungen nach Gl. 2 und 7 direkt aus den Figuren abzulesen.

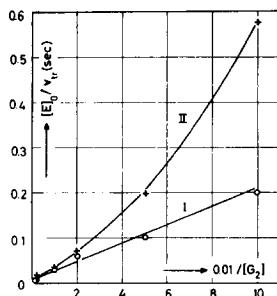


Abb. 2. Auftragung der Messergebnisse für Maltose aus Tabelle I. ○—○, Versuche ohne Glukosezusatz nach Gl. 2; +—+, Versuche mit Zusatz von 0.01 M Glukose nach Gl. 5.

Die Versuche ohne Glukosezusatz zeigen bei Auftragung nach Gl. 2 die für einen binären Komplex zu erwartende lineare Form. Die aus Ordinatenabschnitt und Steigung der Geraden abzulesenden Werte für die Parameter  $a$  und  $b$  sind in Tabelle II eingetragen. Man erkennt, dass sich die drei Oligomeren in ihrem kinetischen Verhalten deutlich unterscheiden.

Eine weitere Bestätigung des vorgeschlagenen Versuchsmechanismus ist die Aufwärtskrümmung der Kurven bei Zusatz von Glukose entsprechend Gl. 5. Bei diesen Versuchen tritt der quadratische Term  $1/[G_n]^2$  auf, wie es das Reaktionsschema IIIa bzw. IIIb fordert. Die Konstanten  $a_g$ ,  $b_g$  und  $c_g$  wurden aus den Versuchsdaten durch Ausgleichsrechnung ermittelt und in Tabelle II zusammengestellt. Hierbei wurde für  $a_g$  der Wert von  $a$  aus der linearen Auftragung der Versuche ohne Glukosezusatz verwendet.

In den Abbn. 3B ist das Verhältnis der Geschwindigkeit  $v_m$  der Übertragung auf Glukose zur Geschwindigkeit  $v_{tr}$  der Übertragung auf Maltotriose und Maltotetraose dargestellt, welches nach Gl. 11 proportional zu  $1/[G_n]$  sein soll.

TABELLE II

## EXPERIMENTELLE KONSTANTEN FÜR 3 OLIGOMERE

Konstante:	$a \times 10^2$	$b \times 10^4$	$b_g \times 10^4$	$c_g \times 10^4$	$Y$
Dimension:	(sec)	(sec · Mol <sup>-1</sup> · l <sup>-1</sup> )	(sec · Mol <sup>-1</sup> · l <sup>-1</sup> )	(sec · Mol <sup>-2</sup> · l <sup>-2</sup> )	
Gleichung:	$2a$	$2b$	$5, 5b$	$5, 5c$	$7, 8$
Maltose	1.31	3.94	5.4	5.9	
Maltotriose	0.85	0.99	1.11	1.58	0.28
Maltotetraose	0.73	0.66	0.77	0.86	0.26

Auch diese Beziehung wird durch die Versuche bestätigt. Die Proportionalitätskonstante  $Y$  nach Gl. 7 ist in Tabelle II mit eingetragen.

Aus den in Tabelle I zusammengestellten Messdaten ergibt sich weiterhin die Möglichkeit, die Hydrolysereaktion in das Gesamtschema einzuordnen. Das Verhältnis der Hydrolyse zur Transfergeschwindigkeit ( $v^h/v_{tr}$ ) ist innerhalb der Fehlergrenzen über einen Bereich von zwei Größenordnungen unabhängig von der Konzentration des Oligomeren. Das entspricht Gl. H3 und schliesst die Annahmen HI und HII aus.

Der Ausschluss von HII besagt, dass die Hydrolyse nicht direkt aus der Verbindung  $E-G$  erfolgt, sondern dass Maltose und Maltotriose durch Anlagerung an das Enzymmolekül die Enzym-Glukose-Bindung lockern (vergl. Abschnitt V).

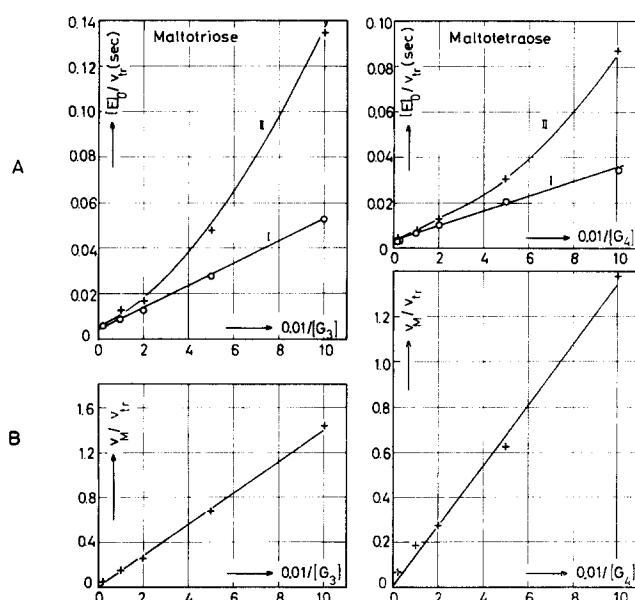


Abb. 3. (A) Auftragung der Messergebnisse für Maltotriose und Maltotetraose aus Tabelle I. ○—○, Versuche ohne Glukosezusatz nach Gl. 2; +—+, Zusatz von 0.01 M Glukose nach Gl. 5. (B) Auftragung nach Gl. 7.

## IV. DIE GESCHWINDIGKEITS- UND GLEICHGEWICHTSKONSTANTEN DER TEILREAKTIONEN

Nachdem vorangehend bewiesen wurde, dass das in Schema 2 dargestellte Reaktionssystem mit dem experimentellen Befund gut übereinstimmt, soll jetzt versucht werden, die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Teilreaktionen aus den experimentellen Parametern zu berechnen. Hierfür ist die Frage zu beantworten, wieviel Unbekannten wieviel Gleichungen gegenüberstehen.

Nach Schema 2 existieren für jedes Oligomere 6 Gleichgewichte, die nach Gl. 3 durch je 2 Konstanten festgelegt sind. Das gibt für jedes Oligomere 12 und für die 3 Oligomeren zusammen 36 Konstanten. Wie unten gezeigt werden wird, sind aber die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen 1 und 6 eliminierbar, so dass sich die Zahl der insgesamt zu berechnenden Konstanten auf 30 reduziert.

Diesen stehen nach Tabelle II zunächst 14 Gleichungen mit den experimentell bestimmmbaren Parametern  $a$ ,  $b$ ,  $b_g$ ,  $c_g$ ,  $Y$  gegenüber. Dazu kommen noch die 10 Identitäten aus Schema 2:

$$\begin{aligned} k_4^{\text{II}} &= k_3^{\text{III}} ; k_{-4}^{\text{II}} = k_{-3}^{\text{III}} ; k_5^{\text{II}} = k_2^{\text{III}} ; k_{-5}^{\text{II}} = k_{-2}^{\text{III}} ; K_6^{\text{II}} = K_1^{\text{III}} \\ k_4^{\text{III}} &= k_3^{\text{IV}} ; k_{-4}^{\text{III}} = k_{-3}^{\text{IV}} ; k_5^{\text{III}} = k_2^{\text{IV}} ; k_{-5}^{\text{III}} = k_{-2}^{\text{IV}} ; K_6^{\text{III}} = K_1^{\text{IV}} \end{aligned} \quad (15)$$

und folgende 3 Beziehungen der Gleichgewichtskonstanten

$$\begin{aligned} K_{13} &= K_1^{\text{II}} K_4^{\text{II}} K_5^{\text{II}} / K_2^{\text{II}} K_3^{\text{II}} K_6^{\text{II}} = 1.0 \\ K_{24} &= K_1^{\text{III}} K_4^{\text{III}} K_5^{\text{III}} / K_2^{\text{III}} K_3^{\text{III}} K_6^{\text{III}} = 1.0 \\ K_{35} &= K_1^{\text{IV}} K_4^{\text{IV}} K_5^{\text{IV}} / K_2^{\text{IV}} K_3^{\text{IV}} K_6^{\text{IV}} = 1.0 \end{aligned} \quad (16)$$

da die in der vorangegangenen Arbeit<sup>5</sup> definierten Konstanten  $K_{13} = K_{24} = k_{35} = 1$  sind.

Den 30 Unbekannten stehen damit  $14 + 10 + 3 = 27$  Gleichungen mit experimentell bestimmmbaren Parametern gegenüber; das Gesamtsystem ist also noch unterbestimmt. Um uns dem angestrebten Ziel zu nähern, werden noch folgende drei Hilfsvoraussetzungen gemacht:

(a) Die Werte sämtlicher Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten müssen positiv sein. Da bei Auflösung des Gleichungssystems Differenzen auftreten, ergeben sich dadurch untere Grenzwerte für einige Konstanten. Hierdurch gelingt die Eliminierung der Konstanten  $k_1$  und  $k_6$ .

(b) Entsprechende Konstanten verschiedener Oligomere (z.B.  $k_i^{\text{II}}$  und  $k_i^{\text{III}}$ ) können nicht um mehr als eine Größenordnung verschieden sein.

(c) Entsprechende Konstanten nähern sich bei den höheren Oligomeren einem Grenzwert. Wir nehmen an, dass die Konstanten der 2. Halbreaktion des Trimeren und Tetrameren von diesem Grenzwert nicht mehr sehr weit entfernt sind. Daraus ergeben sich folgende Näherungsbeziehungen:

$$K_5^{\text{III}} \approx K_5^{\text{IV}} \quad k_{-5}^{\text{III}} = k_{-5}^{\text{IV}} \quad K_6^{\text{III}} = K_6^{\text{IV}} \quad (17)$$

Da Voraussetzung (c) ziemlich ungewiss ist, sind die damit errechneten Werte in

TABELLE III

ZAHLENWERTE DER EINZELKONSTANTEN FÜR DIE TEILREAKTIONEN IN SCHEMA 2 (pH 6.9; 28°)

Konstante	Grässenordnung	Maltose	Maltotriose	Maltotetraose
$K_1$	$10^{-3}$	2	7.4	5.2
$k_{-1}$	$> 10^3$	—	—	—
$k_1$	$> 10^5$	—	—	—
$K_2$	$10^{-1}$	5	2.6	1.6
$k_{-2}$	$10^2$	2.5	2.7	16
$k_2$	$10^3$	0.5	1.0	10
$K_3$	$10^{-1}$	0.5	3.8	4.2
$k_{-3}$	$10^2$	6	10.2	10.6
$k_3$	$10^3$	1.2	2.7	2.6
$K_4$	$10^{-1}$	3.8	4.2	(4)
$k_{-4}$	$10^2$	10.2	10.6	(10)
$k_4$	$10^3$	2.7	2.5	(2.5)
$K_5$	$10^{-1}$	2.6	1.6	(1.5)
$k_{-5}$	$10^2$	2.7	16	(15)
$k_5$	$10^3$	1.04	10	(10)
$K_6$	$10^{-3}$	7.4	5.2	(5)
$k_{-6}$	$> 10^3$	—	—	—
$k_6$	$> 10^5$	—	—	—

Tabelle III in Klammern gesetzt. Das Gesamtergebnis der Auswertung aller Konstanten ist in Tabelle III zusammengestellt.

Zur Ausrechnung noch folgende Ergänzungen: Die Konstanten  $k_2^{II}$ ,  $k_{-3}^{II}$ ,  $k_{-3}^{III}$ ,  $k_{-3}^{IV}$ ,  $k_4^{II}$ ,  $k_{-4}^{II}$ ,  $K_{-3}^{III}$  und das Verhältnis  $K_1/K_2$  können ohne die Hilfsannahmen berechnet werden. Dadurch sind die Größenordnungen wichtiger Teilreaktionen festgelegt. Aus Hilfsvoraussetzung (a) ergibt sich  $k_{-6} > 10^3$ ; aus (b)  $k_2^{IV} \gg 1$ . Mit diesen beiden Voraussetzungen kann man die Terme  $1/k_{-6}$  und  $1/k_2^{II}$  in einigen Gleichungen vernachlässigen. Dadurch erhält man die Zahlenwerte  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ ,  $K_4$ ,  $K^3$ ,  $k_2^{III}$ ,  $k_3^{II}$ ,  $k_5^{III}$ .

#### DISCUSSION

Durch den Nachweis, dass die Transferreaktion der Amylomaltase über binäre Komplexe verläuft, ist Schema 2 die einfachste Reaktionsform, welche alle bisherigen Experimente wiederzugeben vermag. Nachfolgend werden noch einige spezielle Ergebnisse besprochen.

Die korrekten Werte für die maximalen Wechselzahlen der Amylomaltase gegenüber den drei hier untersuchten Oligomeren lassen sich aus den Daten der Tabelle II berechnen. Aus Gl. 2 folgt, dass die Anzahl Mole Glukose, welche 1 Mol Enzym bei Substratüberschuss in der Zeiteinheit überträgt, durch  $1/a$  (pro sec) bzw.  $60/a$  (pro min) gegeben ist. Dadurch ergibt sich für Maltose 4600, für Maltotriose 7000 und für Maltotetraose 8200 pro min.

Die Zahlenwerte für die einzelnen Konstanten in Tabelle III können vorläufig

nur bezüglich ihrer Größenordnung diskutiert werden, da bei den langwierigen Rechenoperationen die Versuchsfehler sich vergrössern und die Anwendung der Hilfsvoraussetzungen (a) und (b) den approximativen Charakter der Rechnung noch verstärkt. Jedoch diese Größenordnungen sind bereits in mehrfacher Hinsicht aufschlussreich.

Interessant ist das Verhältnis der Michaelisgleichgewichte (1) und (6) des freien Enzyms mit den Oligomeren verglichen mit den entsprechenden Gleichgewichten (3) und (4) der Enzym-Glukose-Verbindung mit denselben Oligomeren. Die Michaelis-

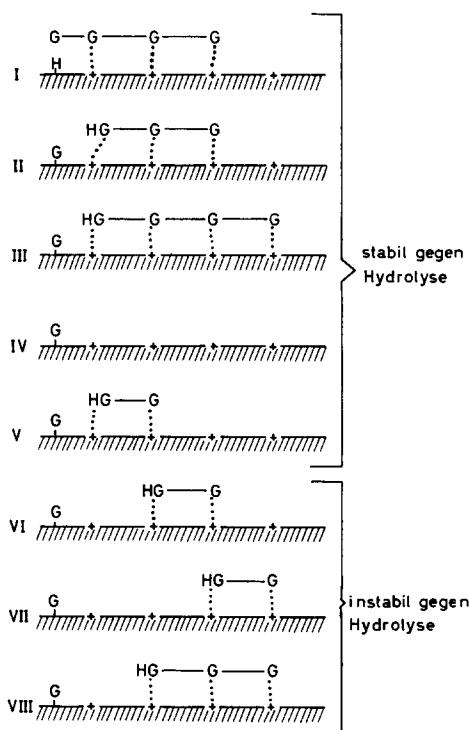


Abb. Modell für die aktivierende Wirkung von Maltose und Maltobriose auf die Hydrolyse (+ Haftstelle).

konstanten  $K_1$  und  $K_6$  liegen in der Größenordnung  $10^{-3}$ , dagegen  $K_3$  und  $K_4$  in der Größenordnung  $10^{-1}$ . Die Bindung des Oligomeren an das freie Enzym ist also wesentlich stärker als an die Verbindung  $E-G$ . Auch die Geschwindigkeit der entsprechenden Gleichgewichtseinstellungen ist bei dem freien Enzym um Größenordnungen höher als bei der Verbindung  $E-G$ . Dabei ist zu berücksichtigen, dass die für die Konstanten  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_6$ ,  $k_{-6}$  in Tabelle III angegebenen Größenordnungen nur Minimalwerte sind.

Die Gleichgewichtskonstanten  $K_2$  und  $K_3$  des für den Glukosetransfer zentralen Prozesses  $(G_nE) \rightleftharpoons (G_{n-1}E-G)$  liegen in der Nähe von 1 (etwa 15–30%  $G_{n-1}E-G$  im "inneren" Gleichgewicht). Das ist fast selbstverständlich, wenn man bedenkt, dass die freie Enthalpie der  $\alpha$ -glukosidischen Bindung beim Übergang von der ersten zur

zweiten Halbreaktion erhalten bleiben muss. Die Wechselzahl dieses "inneren" Gleichgewichts liegt ungefähr in der Größenordnung  $10^3$  pro sec.

Die Hydrolysereaktion erscheint in diesem Zusammenhang als eine Fehlleistung aus dem inneren Gleichgewicht heraus. Da die Verbindung  $E-G$  stabil gegenüber Hydrolyse ist, kann man Maltose und (in schwächerem Masse) Maltotriose als Aktivatoren der Hydrolyse auffassen. Aus den Versuchen ist nicht mit Sicherheit zu schliessen, dass diese Oligomeren als Aktivatoren der Hydrolyse die gleiche Stelle der Enzymoberfläche besetzen wie bei der Transferreaktion. Andererseits ist es nicht unwahrscheinlich, dass die für die Anlagerung der Oligomeren vorgesehenen Haftstellen auch bei der Hydrolyseaktivierung besetzt werden, jedoch in anderer Anordnung.

Modellmässig könnte man sich das etwa nach Abb. 4 vorstellen. An der aktiven Stelle des freien Enzyms befinden sich z.B. vier Haftstellen für Glukosereste und ein H-Atom, das gegen einen Glukoserest ausgetauscht werden kann. Die Aktivierungsschwelle der Bindung  $E-G$  wird durch jede Anlagerung von Oligomeren an die Haftstelle herabgesetzt; in den Positionen II, III und V zugunsten eines Oligomeren als Acceptor, in den Positionen VI, VII und VIII zugunsten der Hydrolyse. Die Verbindung IV ist gegen Hydrolyse stabil.

#### 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) 464.
- 3 H. WIESMEYER UND M. COHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 427.
- 4 G. V. SCHULZ, V. HÄSELBARTH, H. E. KELLER UND H. A. SCHWINN, *Makromol. Chem.*, 92 (1966) 91.
- 5 G. V. SCHULZ, V. HÄSELBARTH UND H. SCHWINN, *Biochim. Biophys. Acta*, 227 (1971) 296.
- 6 H. A. SCHWINN, Dissertation, Mainz, 1968.
- 7 K. J. LAIDLER, *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Clarendon Press, Oxford, 1958
- 8 CH. WALTER, *Steady-State Applications in Enzyme Kinetics*, Ronald Press, New York, 1965.

*Biochim. Biophys. Acta*, 227 (1971) 313-326