

292. Kurt P. Jacobsohn und Anselmo da Cruz: Die Spezifität der Fumarase und enzymatische Gleichgewichte.

[Aus. d. Institut Rocha Cabral, Lissabon.]

(Eingegangen am 25. Juli 1934.)

In einer Untersuchung über „Die Spezifität der β -Glucosidase und enzymatische Gleichgewichte“ unterzogen kürzlich Ionescu und Kizyk¹⁾ das System: Methylalkohol + Glucose \rightleftharpoons β -Methyl-glucosid + Wasser einer eingehenden kinetischen Analyse. Die Autoren nahmen insbesondere zu den wichtigen Berechnungen Stellung, die v. Euler und Josephson²⁾ auf Grund des Versuchsmaterials von Bourquelot über dieses enzymatische Gleichgewicht anstellten. Ionescu und Kizyk führten die Vergrößerung der Gleichgewichtskonstante des Systems, die die schwedischen Autoren bei Erhöhung der relativen Alkohol-Konzentration beobachteten, darauf zurück, daß bei der Berechnung der Konstanten nach dem Massenwirkungsgesetz nicht die Spezifität der β -Glucosidase berücksichtigt wurde; trüge man der Tatsache Rechnung, daß das Gleichgewicht α -Glucose \rightleftharpoons β -Glucose sich in konzentrierteren Alkohol-Lösungen unter Änderung des Drehungsvermögens der Versuchs-Lösung zugunsten der α -Form verschiebt, so wäre die Gleichgewichtskonstante unabhängig von der Substrat-Konzentration.

Im zweiten Teil ihrer Arbeit gehen Ionescu und Kizyk auf die Theorie der enzymatischen Gleichgewichte v. Eulers (l. c.) ein. Dieser Autor berechnete aus den Versuchs-Daten Bourquelots, von den Konzentrationen der Substrate im Gleichgewicht ausgehend, die Gleichgewichtskonstante $K = 0.25$; für das Verhältnis (K') zwischen den Geschwindigkeitskonstanten der enzymatischen Hydrolyse (k_1) und ihrer Reversion (k_2) wurde indessen — entgegen dem Massenwirkungsgesetz — nicht derselbe Wert (K) erhalten; v. Euler schloß vielmehr aus der gleichen Geschwindigkeit, mit der sich unter bestimmten Versuchs-Bedingungen das Gleichgewicht von beiden Seiten des Systems her einstellte, auf Gleichheit der entsprechenden Massenwirkungskonstanten ($K' = k_2/k_1 = 1$); und fand demnach $K/K' = 1/4$. Auf dieser Berechnung fußend, kam v. Euler auf seine bekannte Hypothese zurück, mit der er die Differenz in der Größe der Gleichgewichtskonstanten (K und K') durch verschiedene Affinitäten des Enzyms zu den Substraten seines Systems erklärt. Ionescu und Kizyk machen nun geltend, daß die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten (k_1 und k_2) durch v. Euler nicht, wie bei der Gleichgewichtskonstanten K , die bimolekulare Natur der hydrolytischen Reaktion berücksichtige; in Wirklichkeit sei zwar in jeder Phase der Reaktion, unter den Versuchs-Bedingungen Bourquelots, die Menge der gebundenen Glucose in dem synthetischen Prozeß der hydrolysierten Menge an β -Glucosid in der Reversion äquimolar, dies treffe aber nicht für die entsprechenden Konzentrationen an Methanol und Wasser zu, die sich unter den gegebenen Versuchs-Bedingungen wie 1 : 4 verhielten. Unter diesen Umständen ergäbe sich das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten:

$$K' = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[\text{Glucose}] [\text{Alkohol}]}{[\text{Glucosid}] [\text{Wasser}]} = \frac{1 \times 1}{1 \times 4} = 0.25 \text{ und } K = K'.$$

¹⁾ Ionescu u. Kizyk, B. **67**, 990 [1934].

²⁾ v. Euler u. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **136**, 30 [1924].

Die rumänischen Autoren stellen demnach fest, daß bei dem untersuchten Ferment-System das Massenwirkungsgesetz volle Bestätigung findet. Ihre Berechnungen sind von grundsätzlicher Bedeutung für die Chemie der Enzyme, da v. Eulers interessante Hypothese bis dahin ausschließlich bei dem Versuchsmaterial Bourquelots Anwendung fand. Die biochemische Literatur weist überhaupt sehr wenige kinetische Untersuchungen enzymatischer Gleichgewichts-Prozesse auf. Am besten bekannt ist noch das klassische lipatische System der Schule Bodensteins: *i*-Amylalkohol + *n*-Buttersäure \rightleftharpoons *i*-Amyl-*n*-butyrat + Wasser. Dietz³⁾ wies nach, daß bei dieser Reaktion das Verhältnis zwischen den beiden monomolekularen Geschwindigkeitskonstanten ($K' = k_2/k_1$) gut mit der Gleichgewichtskonstanten K übereinstimmte. Dieser Autor zog also die relativ geringfügigen Konzentrations-Änderungen von Wasser und Alkohol im Verlauf des Ferment-Prozesses nicht in Betracht, sondern wandte die kinetischen Formeln der monomolekularen Reaktionsordnung zur Berechnung der beiden Geschwindigkeitskonstanten (k_2 und k_1) an. (Es ist interessant, hier festzuhalten, daß die Gleichgewichtskonstante K von der Substrat-Konzentration abhängig war, indessen fand Dietz: $\frac{[\text{Ester}]^{1/2}}{[\text{Säure}]} = \text{konst.}$).

Konnte die hydrolytische Reaktion der Bodensteinschen Schule schon als pseudo-monomolekularer Prozeß aufgefaßt werden, so ist der Ferment-Prozeß der Fumarase echt monomolekular. Diese Hydratase vermittelt in reversibler Reaktion die Hydratisierung der Fumarsäure zu *l*-Äpfelsäure unter Einstellung eines Gleichgewichts zwischen den beiden Substraten. Wir wiesen bereits vor 3 Jahren⁴⁾ bei unseren „Untersuchungen über Hydratasen“ darauf hin, daß beim Enzym-System der Fumarase ein denkbar einfacher Reaktions-Mechanismus mit der Möglichkeit leichtester methodischer Durchdringung vorliegt, das sich in idealer Weise zur Bestätigung und weiteren Erforschung der kinetischen Gesetze der Ferment-Prozesse und besonders der enzymatischen Gleichgewichte eignet. In einer folgenden Arbeit⁵⁾ über die „Kinetik der Fumarase“ stellten wir fest, daß dieses Ferment sich weitgehend als echter Katalysator betätigt. Die Gleichgewichtskonstante K des Systems erwies sich als unabhängig von der Ferment- und Substrat-Konzentration, und ebenso folgte die Dynamik des Prozesses gut den Forderungen des Massenwirkungsgesetzes. Indessen beobachteten wir schon damals, daß (bei Verwendung von Leber-Fumarase) das Verhältnis zwischen den beiden monomolekularen Geschwindigkeitskonstanten ($K' = k_2/k_1$) einen anderen Wert annimmt als der Gleichgewichts-Quotient K der Reaktionsprodukte, und erklärten diesen Befund mit Hilfe der erwähnten Hypothese v. Eulers durch verschiedene Affinitäten der Fumarase gegen ihre beiden Substrate. Unsere damaligen Resultate gewinnen heute grundsätzliche Bedeutung angesichts der Berechnungen von Ionescu und Kizyk, die der Theorie v. Eulers den Boden entziehen. Unter diesen Umständen hielten wir es für wichtig, unsere Untersuchungen über diese Anomalie wieder aufzunehmen und die Tatsachen durch systematische Versuche klar zu stellen.

³⁾ Dietz, Ztschr. physiol. Chem. **52**, 279 [1907].

⁴⁾ Jacobsohn, Biochem. Ztschr. **243**, 9 [1929].

⁵⁾ Jacobsohn, Pereira u. Tapadinhas, *ibid.* **254**, 112 [1932].

Die Geschwindigkeitskonstanten der synthetischen Reaktion (k_1) bzw. der Reversion (k_2) konnten nach den kinetischen Formeln für reversible monomolekulare Prozesse ermittelt werden⁵⁾. Für die Hydratisierung gilt $dx/dt = k_1(a-x) - k_2x$ und für die Wasser-Abspaltung aus *l*-Äpfelsäure $dx/dt = k_2(a'-x') - k_1x'$. In einer größeren Versuchsreihe fanden wir immer bei 38° das folgende Wertverhältnis zwischen den Geschwindigkeitskonstanten: $K' = k_2/k_1 =$ etwa 0.5. Diese Konstante wurde mit dem Gleichgewichtsquotienten K der Reaktionsprodukte verglichen, der nach dem Massenwirkungsgesetz gleich K' sein sollte. Aus den erwähnten kinetischen Reaktionsformeln ergibt sich nämlich für $dx/dt = 0$: $k_2/k_1 = a-x/x = K'$ und dieser Ausdruck ist identisch mit der Gleichgewichtskonstanten $K = \frac{[\text{Fumarat}]}{[l\text{-Malat}]}$. Für diese erhielten wir durch Bestimmung der molaren Substrat-Konzentrationen im Gleichgewicht (wie in unseren früheren Arbeiten) immer $K_{38^\circ} = 0.26$ ⁶⁾, gleichgültig ob Fumarsäure oder eine äquimolare *l*-Äpfelsäure-Lösung als Ausgangsmaterial verwandt wurde. Die Angabe der Versuchs-Temperatur ist wichtig, da sich herausgestellt hatte, daß das Gleichgewicht des Systems stark temperatur-abhängig ist⁷⁾. Die Einsetzung der molaren Wasser-Konzentration in die Gleichgewichts-Formel und ihre Berücksichtigung bei der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten war unnötig, da die Änderungen der Wasser-Menge im Verlauf der hydratatischen Reaktion in verdünnter wäßriger Lösung ganz unbedeutend sind⁸⁾. Wir beobachteten demnach nicht nach dem Massenwirkungsgesetz $K_{38} = K' = k_2/k_1$, sondern $K_{38} = 0.26$ und $K' =$ etwa 0.5; demnach ist $K'/K =$ etwa 2.

Die Ergebnisse von Ionescu und Kizyk richten sich zwar gegen die Berechnungen v. Eulers auf Grund des Versuchsmaterials Bourquelots, sie beweisen aber eigentlich nichts gegen die Hypothese v. Eulers über die enzymatischen Gleichgewichte, die in unseren Versuchen eine neue Stütze zu finden scheint. Nach dieser Theorie hätte jetzt wohl die β -Glucosidase dieselbe Affinität für das Glucosid wie zur β -Glucose, die Fumarase wäre aber durch die doppelte Affinität zur Fumarsäure wie zur Äpfelsäure ausgezeichnet. In anderen Versuchen⁹⁾ schätzten wir unter Anwendung der Theorie von Michaelis und Menten die Dissoziationskonstante der Fumarase-Fumaratverbindung bei 38° zu $K_s = 0.003$; die Affinitätskonstante wäre demnach $1/K_s = K_m = 330$ und die Affinität der Fumarase zur *l*-Äpfelsäure $K_m = 165$.

Beschreibung der Versuche.

Bei der Anordnung unserer Versuche gingen wir im wesentlichen in der Weise vor, die wir in früheren Arbeiten beschrieben haben (I. c.). Als Enzym-

⁶⁾ Über scheinbare Ausnahmen s. Jacobsohn u. Tapadinhas, Biochem. Ztschr. **269**, 225 [1934], sowie Bull. Soc. Chim. biol. (im Druck).

⁷⁾ Jacobsohn, C. S. I. c. S. 118. Franke bezeichnet (in „Chemie der Enzyme“, 2. Teil, 3. Abschnitt, S. 531 [1934]) die von uns beobachtete Temperatur-Abhängigkeit des Gleichgewichts als unwahrscheinlich. Wir halten indessen die Richtigkeit unserer Befunde voll aufrecht und werden bald auf diese interessante Anomalie bei einer thermodynamischen Analyse unseres Enzym-Systems zurückkommen.

⁸⁾ Jacobsohn u. Tapadinhas, I. c.

⁹⁾ Jacobsohn, a. a. O. (im Druck).

Material wurde ein Organsaft verwendet, der durch Zentrifugieren des Macerats von Rindsleber in 3 Vol. Wasser erhalten worden war. Zur Herstellung der Substrat-Lösungen wurden Fumarsäure bzw. *l*-Äpfelsäure genau mit 3-n. KOH neutralisiert und die erhaltenen Lösungen so verdünnt, daß sie beide 8.62-m. an Carbonsäure waren. Die quantitative Zusammensetzung eines unserer Versuchs-Ansätze geht aus dem folgenden Beispiel hervor. Substrat-Lösung und Ferment-Auszug wurden bei gleicher Temperatur zu einem bestimmten Zeitpunkt vereinigt, der als Versuchs-Beginn galt.

Der Fortschritt der enzymatischen Umsetzung wurde wie früher durch polarimetrische Bestimmungen der jeweiligen *l*-Äpfelsäure-Konzentration in aliquoten Teilen der Versuchs-Ansätze verfolgt. Zu Versuchs-Beginn und dann in bestimmten Zeit-Abständen wurden 5 ccm Ansatz-Flüssigkeit entnommen und mit 0.5 ccm Eisessig und 4.5 ccm gesättigter Ammoniummolybdat-Lösung vermischt. Die Flüssigkeit wurde filtriert und die erhaltene klare Lösung der polarimetrischen Beobachtung unterworfen. Nach Ablauf der Hauptreaktion wurden die Ansätze eine Nacht zur Einstellung des Gleichgewichts (mit 1% des Flüssigkeits-Volumens an Toluol) im Brutschrank belassen. Sodann wurde die Enddrehung in der beschriebenen Weise bestimmt.

Die Berechnung der monomolekularen Geschwindigkeitskonstanten erfolgte für den Hydratisierungs-Prozeß nach folgenden Zeit-Gleichungen, die sich durch Integration der erwähnten Reaktionsformel und Einsetzung der entsprechenden Drehungen für die Konzentrationen ergeben:

$$k_1 = \frac{r_\infty}{r_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{r_\infty}{r_\infty - r}; \quad k_2 = \frac{r_0 - r_\infty}{r_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{r_\infty}{r_\infty - r}; \quad k_1 + k_2 = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{r_\infty}{r_\infty - r}.$$

Für die Versuche mit *l*-Äpfelsäure als Ausgangssubstrat (Reversion) wurden folgende Zeit-Gleichungen verwandt, die aus der entsprechenden Massenwirkungs-Formel folgen:

$$k_2 = \frac{r_0 - r_\infty}{r_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{r_0 - r_\infty}{r - r_\infty}; \quad k_1 = \frac{r_\infty}{r_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{r_0 - r_\infty}{r - r_\infty}; \quad k_1 + k_2 = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{r_0 - r_\infty}{r - r_\infty}.$$

In diesen Formeln stellen r und r_∞ die Drehungen der Versuchs-Lösungen zur Zeit t und am Schluß des enzymatischen Umsatzes dar, r_0 entspricht der Anfangs-Drehung der *l*-Äpfelsäure-Ansätze; bei Verwendung von Fumarsäure als Ausgangs-Substrat gibt r_0 den gleichen Rotationswert wieder, der hier bei 100-proz. Hydratisierung zu *l*-Äpfelsäure beobachtet würde.

Wir führen im folgenden als Beispiel nur einen Versuch an, dessen Anordnung, Resultate und theoretische Analyse unsere Ergebnisse veranschaulichen sollen.

		I	II
Fumarat	8.62 m ccm	10	—
<i>l</i> -Malat	8.62 m ccm	—	10
Wasser	ccm	35	35
Lebersaft	ccm	5	5

t	I		II	
	r^{10}	$(k_1 + k_2) \cdot 10^4$	r^{10}	$(k_1 + k_2) \cdot 10^4$
0'	0.00 ⁰	—	(r_0) 17.25 ⁰	—
4'	0.55 ⁰	45	16.95 ⁰	94
8'	1.15 ⁰	48	16.70 ⁰	90
12'	1.70 ⁰	48	16.50 ⁰	85
20'	2.65 ⁰	47	16.05 ⁰	88
36'	4.40 ⁰	47	15.50 ⁰	80
50'	5.65 ⁰	46	15.05 ⁰	84
80'	7.90 ⁰	47	14.35 ⁰	89
1200'	$r_\infty = 13.65^0$		$r_\infty = 13.65^0$	

d = 2; Temp.: 38°.

In Anbetracht der Gleichgewichtslage sind die polarimetrischen Werte des synthetischen Prozesses (I) viel genauer; die Konstanz von $(k_1 + k_2) 10^4$ für diese Reaktion ist deutlich. Aber auch im Reversions-Prozeß, dessen Drehungswerte besonders am Anfang und am Ende der Reaktion ungenau¹¹⁾ ausfallen müssen und damit die Exaktheit der Berechnung beeinträchtigen, ist kein deutlicher Gang der Konstanten zu beobachten. Jedenfalls tritt klar zutage, daß die Werte für $(k_1 + k_2)$ in beiden Prozessen grundverschieden sind. Unter diesen Umständen können wir nicht k_1 und k_2 ebenso gut aus den Versuchs-Daten des synthetischen Prozesses berechnen wie aus denen der Reversion, da die so erhaltenen Größen für dieselben Geschwindigkeitskonstanten nicht übereinstimmen. Wir entlehnen daher k_1 aus den Daten der Hydratisierungs-Reaktion und k_2 aus denen der Reversion und erhalten:

$$k_1 = \frac{r_\infty}{r_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{r_\infty}{r_\infty - r} = 0.79 \cdot 0.0047 = 0.0037;$$

$$k_2 = \frac{r_0 - r_\infty}{r_0} \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{r_0 - r_\infty}{r - r_\infty} = 0.21 \cdot 0.0087 = 0.0018;$$

$$K' = \frac{k_2}{k_1} = \frac{18}{37} = 0.5.$$

Bei derselben Temperatur erhielten wir nach der Formel $K_{38} = r_0 - r_\infty / r_\infty$ ¹²⁾ die Gleichgewichtskonstante $K_{38} = 0.26$. Es ist demnach $K' > K$ und zwar $K'/K = 2$.

Dieses Verhältnis (K'/K) war in unseren verschiedenen Versuchen gewiss, wenn auch unbeträchtlichen Schwankungen unterworfen, die auf die Fehlerquellen bei der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten zurückzuführen sind.

¹⁰⁾ Die verzeichneten Drehungswerte sind um die Eigendrehung der Ferment-Lösung korrigiert.

¹¹⁾ Zu unseren Untersuchungen stand uns nur ein Polarimeter einfachster Konstruktion zur Verfügung, dessen Fehlergrenze $\pm 0.05^0$ ist.

¹²⁾ Durch Einsetzung der entsprechenden Drehungen für die Konzentrationen in die Gleichgewichtskonstante: Fumarat/l-Malat = a-x/x.