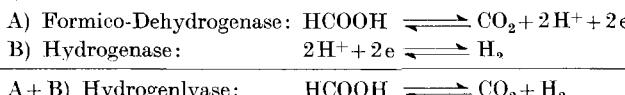


177. Isotopie-Effekte bei Formicodehydrogenase, Hydrogenase und Hydrogenlyase aus *E. Coli*

von H. Aebi und Eva Frei.

(12. VI. 57.)

Seit *Hoppe-Seyler*¹⁾ ist bekannt, dass verschiedene Mikroorganismen Formiat anaerob zu CO_2 und H_2 spalten. Die Natur dieses von *Stephenson & Stickland*²⁾ näher untersuchten und von diesen Autoren „Hydrogenlyase“ genannten Enzym-Systems ist nicht restlos geklärt. Es ist insbesondere umstritten, ob die von *Quastel & Whetham*³⁾ in *E. Coli* aufgefundene Formicodehydrogenase am Zustandekommen dieser Wirkung beteiligt ist. Der unitarischen Auffassung, wonach es sich bei der Hydrogenlyase um ein besonderes Enzym handeln soll, steht eine dualistische gegenüber. Nach *Gest*⁴⁾ ist somit die Bildung von molekularem H_2 aus Formiat auf das Zusammenwirken zweier Enzyme, nämlich der Formicodehydrogenase und der Hydrogenase sowie evtl. weiterer Cofaktoren zurückzuführen. Auf Grund dieser Annahme ist die Hydrogenlyase-Aktivität als Summation der Wirkung folgender beider Enzyme aufzufassen:



Als Argument für diese Annahme sprechen vor allem die Experimente von *Gest & Peck*⁵⁾. Diesen Autoren ist es durch Zusammenbringen beider Einzelenzyme und einer geeigneten Überträgersubstanz gelungen, Modellsysteme mit Hydrogenlyase-Aktivität darzustellen. *Wolf et al.*⁶⁾ haben erneut auf die sehr ungleiche Grösse der *Michaelis*-Konstanten von Formicodehydrogenase und Hydrogenlyase hingewiesen. *Crewther*⁷⁾ hat indessen gezeigt, dass die ungleiche Grösse dieser Konstanten zur 2-Enzymtheorie keineswegs im Widerspruch zu stehen braucht.

Bei der gesonderten Aktivitätsbestimmung der 3 in Frage kommenden Umsetzungen sind Isotopie-Effekte verschiedenen Ausmasses zu beobachten, sofern in diesen Systemen H_2 durch D_2 , HCOO^- durch DCOO^- sowie H_2O durch D_2O ersetzt werden. Diese Isotopie-Effekte

¹⁾ F. Hoppe-Seyler, Pflüger's Archiv **12**, 1 (1876).

²⁾ M. Stephenson & L. H. Stickland, Biochem. J. **26**, 712 (1932); **27**, 1528 (1933).

³⁾ J. H. Quastel & M. D. Whetham, Biochem. J. **19**, 520 (1925).

⁴⁾ H. Gest, Bacteriol. Rev. **18**, 43 (1954).

⁵⁾ H. Gest & H. D. Peck, J. Bacteriology **70**, 326 (1955).

⁶⁾ J. Wolf, H. Stickland & J. Gordon, J. general Microbiology **11**, 17 (1954).

⁷⁾ W. G. Crewther, Austral. J. biol. Sci. **6**, 198 (1953).

sind einer näheren Prüfung unterzogen worden, um damit weitere Einblicke in den Wirkungsmechanismus des Hydrogenlyase-Systems zu gewinnen.

Experimenteller Teil.

1. Methodisches. Gewinnung und Verarbeitung der *Coli*-Kulturen: *E. Coli* (Stamm 1955⁸⁾) wurden in *Roux*-Flaschen auf festem Nährboden (Difco Bacto Penassay Seed Agar) bei 37° kultiviert und nach 15 Std. durch Abschwemmen des Agars mit 1-proz. NaCl-Lösung gewonnen. In den Versuchen mit intakten *Coli* wurden diese durch zweimaliges Zentrifugieren und Wiederaufschwemmen gewaschen und nach Suspendierung in 1-proz. NaCl direkt verwendet. Die zellfreien *Coli*-Extrakte wurden nach *Gest & Gibbs*⁹⁾ durch Verreiben der Zellen mit „Alumina A 301“, Extraktion mit aq. dest. und anschließender Zentrifugation dargestellt. Bei einigen dieser Ansätze wurden sowohl das Überstehende, wie auch die sedimentierten Partikel lyophilisiert. Alle Präparate wurden unter N₂ im Eisschrank aufbewahrt.

Die Bestimmung der Formicodehydrogenase-Aktivität erfolgte teils manometrisch, teils mit Hilfe der *Thunberg*-Technik. Die *Warburg*-Gefäße enthielten: 0,5 ml Enzym, 1,0 ml 0,14-m. Na-Phosphatpuffer pH = 6,8, im Seitenarm 0,5 ml 0,1-m. Na-Formiat¹⁰⁾, im zentralen Einsatz 0,2 ml 20-proz. KOH. Gasphase: Gemisch von 5% O₂ und 95% N₂. Die *Thunberg*-Röhrchen enthielten: 1,0 ml Enzmylösung, 1,0 ml Na-Phosphatpuffer pH = 7,0, 0,5 ml 0,01-proz. Methylenblau („Merck“, B extra), im Seitenarm 0,5 ml Na-Formiatlösung¹⁰⁾ verschiedener Konzentration. Vor der Inkubierung wurden die Röhrchen dreimal mit N₂ bespült, dann evakuiert. Bei beiden Methoden wurde die Substratlösung nach einer Temperaturausgleichsperiode von 10 Min. zugekippt; die Versuchstemperatur betrug 32°. Als Mass für die Enzymaktivität diente bei der *Warburg*-Methode der O₂-Verbrauch, bei der *Thunberg*-Methode der reziproke Wert der Entfärbungszeit in Min. (90-proz. Methylenblau-Entfärbung).

Zur manometrischen Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität diente folgender Ansatz: 0,5 ml Enzym, 1,0 ml 0,14-m. Na-Phosphatpuffer pH = 7,0, 0,5 ml 0,04-m. Methylenblaulösung im Seitenraum; der zentrale Einsatz enthielt nach dem Vorschlag von *Pietro*¹¹⁾ 0,2 ml *Fieser*-Lösung und ein kleines Röllchen Filterpapier. Die Methylenblaulösung wurde erst nach 30 Min. Vorinkubierung zugekippt (T = 32°). Gasphase: H₂ (99,99-proz.) bzw. D₂. Das D₂-Gas wurde durch Elektrolyse von D₂O, enthaltend 20% Kalilauge, dargestellt und durch mehrmaliges Durchleiten durch *Fieser*-Lösung von O₂-Resten befreit. Das verwendete D₂-Gas wies einen D-Gehalt von 98 At.-% auf¹²⁾.

Tabelle 1.

O ₂ -Gehalt der Gasphase	H ₂ -Aufnahme in mm ³ /5 Min/Ansatz	
	Exp. 1	Exp. 2
—	52,0 (100%)	49,3 (100%)
0,1%		43,5 (89,4%)
0,2%	43,0 (82,7%)	41,1 (83,3%)
0,5%	33,4 (64,1%)	30,4 (61,6%)
1,0%	20,9 (40%)	19,2 (39%)

⁸⁾ Bakteriologisches Institut der Universität Bern. Herrn Prof. C. Hallauer und Mitarbeitern sei für das Ansetzen der Kulturen hiermit bestens gedankt.

⁹⁾ H. Gest & M. Gibbs, J. Bacteriology **63**, 661 (1952).

¹⁰⁾ HCOONa („Merck“) bzw. DCOONA (Darstellung vgl. ¹⁴⁾).

¹¹⁾ A. San Pietro, Methods in Enzymology vol. II, Academic Press Inc. 1955, S. 865.

¹²⁾ Herrn Dr. M. Thürkau, Physikalisch-chemische Anstalt der Universität Basel, sei hiermit für die massenspektrometrischen D₂-Analysen bestens gedankt.

Die ausgeprägte Empfindlichkeit der Hydrogenase gegenüber O_2 zwingt zur Einhaltung anaerober Bedingungen, was durch Verwendung von gereinigtem H_2 -Gas und durch Vorinkubierung in Gegenwart von Fieser-Lösung zu erreichen versucht wurde. Aus Tab. 1 kann entnommen werden, dass es bereits bei einer O_2 -Konzentration von wenigen Promille zu einer beträchtlichen Aktivitätsabnahme kommt.

Die Hydrogenlyase-Aktivität wurde in Warburg-Ansätzen folgender Zusammensetzung bestimmt: 0,5 ml Enzym, 1,0 ml 0,14-m. Na-Phosphatpuffer pH = 6,8, 0,5 ml 0,2-m. Formiatlösung im Seitenarm, im zentralen Einsatz 0,2 ml 20-proz. KOH. Gasphase: N_2 (99,95-proz.) T = 32°. Zukippen der Substratlösung nach 10 Min. Temperaturausgleich. Es wird die H_2 -Produktion gemessen.

2. Formicodehydrogenase. Die Beurteilung der Formicodehydrogenase-Aktivität, welche auf Grund des O_2 -Verbrauches manometrisch bestimmt worden ist, wird durch die O_2 -Empfindlichkeit des hierbei wirksamen Überträgersystems erschwert. Wie bereits Gale¹³⁾ gezeigt hat, tritt eine Aktivitätsabnahme unter aeroben Bedingungen um so rascher ein, je höher der O_2 -Partialdruck der Gasphase. Dieser Aktivitätsabfall ist bei Gegenwart von $DCOO^-$ als Substrat in wesentlich grösserem Ausmass vorhanden und bewirkt somit — besonders bei längerer Versuchsdauer — das Zustandekommen eines (scheinbaren) Isotopie-Effektes. Während in Luft bereits nach 15 Min. ein messbarer Unterschied bezüglich O_2 -Verbrauch zwischen den Ansätzen mit $HCOO^-$ bzw. $DCOO^-$ auftritt, lässt sich ein solcher beim hier zumeist verwendeten Gasgemisch von 5% O_2 + 95% N_2 erst bei einer Versuchsdauer von über 1 Std. feststellen. Wird der O_2 -Verbrauch zwischen der 45. und der 60. Min. als Vergleichsbasis gewählt, so betragen die Unterschiede bei Gegenwart von 5% O_2 ca. 5—10%, während diese in 20% O_2 (Luft) je nach Enzympräparat 20—35% erreichen (Fig. 1).

Wird Methylenblau als zusätzliches H-Überträgersystem hinzugefügt, so kommt es zu einer Steigerung des O_2 -Verbrauches, dessen Ausmass von der Methylenblaukonzentration (0,5—2%) vom O_2 -Gehalt der Gasphase und der Versuchsdauer abhängt (Steigerung 20—100%). Unter diesen Bedingungen besteht zwischen den Oxydationsraten von $HCOO^-$ und $DCOO^-$ kein gesicherter Unterschied. Das Verschwinden eines Isotopie-Effektes bei Gegenwart von Methylenblau spricht dafür, dass die oben beschriebenen Aktivitätsunterschiede kaum der Formicodehydrogenase selbst zugeschrieben werden dürfen. Mit dieser Annahme steht in Einklang, dass sich auch mit der Thunberg-Technik unter den verschiedenartigsten Versuchsbedingungen (Variationen von Substratkonzentration, Methylenblauzusatz und Temperatur) kein Isotopie-Effekt nachweisen lässt.

Wird die Aktivität eines lyophilisierten, in D_2O suspendierten Präparates mit derjenigen in H_2O verglichen, so verhalten sich die manometrisch bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten bei beiden Substraten anfänglich wie $V_{D_2O} : V_{H_2O} \sim 4:5$. Wie Tab. 2 zeigt, kommt es bei längerer Versuchsdauer vor allem infolge der stärkeren Reaktionsverzögerung im schweren Wasser zu einer Vergrösserung dieses Unterschiedes.

Tabelle 2.

Ansatz (Gasphase 5% O_2)	O ₂ -Verbrauch in mm ³ /30 Min/Ansatz			
	0—30	30—60	60—90	90—120
$HCOO^-$ in H_2O	84	86,5	79,5	72,5
$HCOO^-$ in D_2O	69 (82%)	64,5 (74,5%)	53,5 (67%)	45 (62%)
$DCOO^-$ in H_2O	85	84	72,5	67,5
$DCOO^-$ in D_2O	69 (81%)	56 (67%)	37,5 (51,5%)	25,5 (38%)

Die Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_m) der Formicodehydrogenase ist bereits mehrfach durchgeführt worden^{2) 6) 7)}. Mit der manometrischen Technik lässt sich diese wegen der hohen Affinität zwischen Enzym und Substrat nicht durchführen, weil die An-

¹³⁾ E. F. Gale, Biochem. J. 33, 1012 (1939).

fangsgeschwindigkeit V_0 bei kleinen Substratkonzentrationen auf diese Weise nicht erfassbar ist. Im Thunberg-Versuch ergeben sich Werte für HCOO^- und DCOO^- von $K_m \sim 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Wie später erläutert werden soll, handelt es sich auch hierbei um verfälschte, aus methodischen Gründen zu hoch ausgefallene Werte. Die wahre Grösse der Michaelis-Konstanten der Formicodehydrogenase aus *E. Coli* dürfte noch wesentlich kleiner sein.

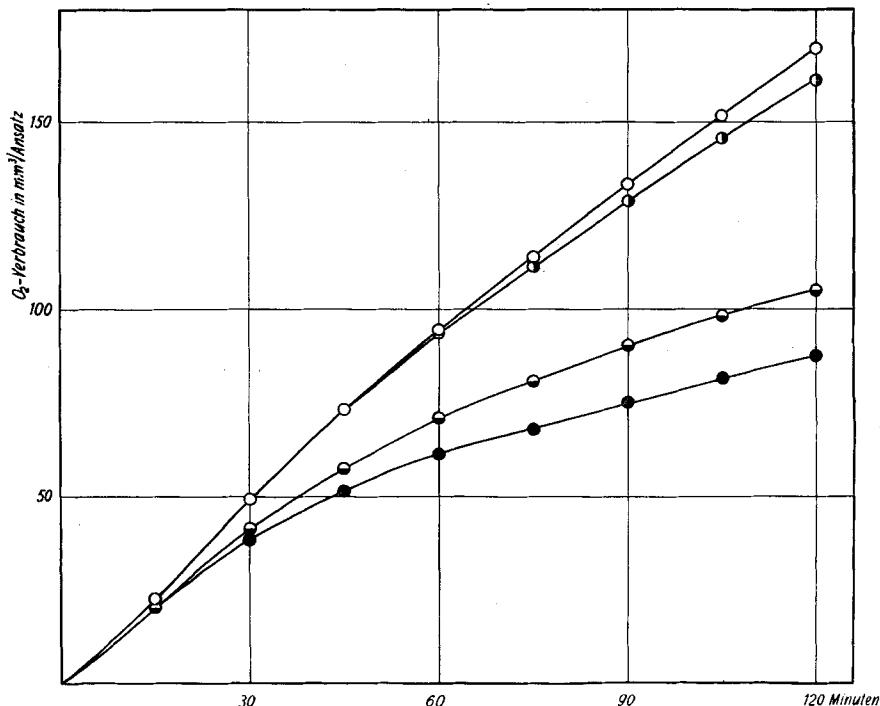


Fig. 1.

Einfluss des O_2 -Partialdruckes auf die Formicodehydrogenase-Aktivität intakter *E. Coli*:

- a) Gasphase 5% O_2 ; Substrat HCOO^- (○) bzw. DCOO^- (◐)
- b) Gasphase 20% O_2 ; Substrat HCOO^- (●) bzw. DCOO^- (●)

3. Hydrogenase. Da dieses Enzym nicht nur die Übertragung von molekularem H_2 auf ein Acceptorsystem katalysiert, sondern auch eine Gleichgewichtseinstellung mit den H^+ Ionen der Lösung bzw. des Lösungsmittels bewirkt, ist eine gesonderte Betrachtung von Isotopie-Effekten hinsichtlich H_2-D_2 und $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ nicht ohne weiteres möglich. Werden die Reaktionsgeschwindigkeiten von Systemen miteinander verglichen, welche in der Gasphase wie auch im Wasser nur das eine der beiden Wasserstoff-Isotope enthalten, dann ergeben sich — je nach Kombination — die in Tab. 3 wiedergegebenen Isotopie-Effekte.

Bei der Beurteilung der in den gemischten Ansätzen ($\text{H}_2 + \text{D}_2\text{O}$ bzw. $\text{D}_2 + \text{H}_2\text{O}$) gemessenen Aktivitäten ist zu berücksichtigen, dass sich in der Gasphase der Warburg-Gefäße (Vol. $\sim 12 \text{ ml}$) ca. 1 mÄq. H_2 in der Lösung (2 ml) dagegen 220 mÄq. H_2 befinden. Wird nur der gelöste Gasanteil in Betracht gezogen, so verschiebt sich dieses Verhältnis noch stärker zugunsten der vom Wasser gelieferten Protonen. Die ungefähr gleich grosse Aktivität der beiden gemischten Ansätze weist darauf hin, dass selbst nach einer Versuchsdauer von 60 Min. ein Ausgleich infolge Isotopenaustausches nicht erreicht ist.

Tabelle 3.

Ansatz	Wasserstoffverbrauch in mm ³ /10 Min/Ansatz			
	Exp.	0—10	10—20	20—30
H_2 in H_2O	1	52 (100%)	51,5 (100%)	46,5 (100%)
	2	48,5 (100%)	47,5 (100%)	41 (100%)
H_2 in D_2O	1	41,5 (80%)	43 (83,5%)	40,5 (87%)
	2	40 (82,5%)	42 (88,5%)	38,5 (94%)
D_2 in H_2O	1	38,5 (74%)	42 (81,5%)	37 (80%)
	2	36 (74%)	37 (78%)	34 (83%)
D_2 in D_2O	1	30,5 (59%)	36 (70%)	32,5 (70%)
	2	30 (62%)	33 (69,5%)	30,5 (74,5%)

Wird das Isotopenverhältnis $D:H$ in Gasphase (= Substrat) und Wasser gleichsinnig variiert, so ergibt sich näherungsweise Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und prozentualem Isotopenanteil (Tab. 4).

Tabelle 4.

At.-% D in Gas und wässriger Phase	Wasserstoffverbrauch in mm ³ /10 Min/Ansatz	
	Exp. 1	Exp. 2
0	59 (100%)	49 (100%)
25	53 (90%)	44,5 (91%)
50	47,5 (80,5%)	42,5 (87%)
75	42,5 (72%)	35,5 (72,5%)
100	35 (59,5%)	32 (65,5%)

Um die Grösse der *Michaelis-Konstanten* (K_m) der Hydrogenase bei Verwendung von Methylenblau als H-Acceptor berechnen zu können, ist die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der H_2 -Konzentration in der Gasphase untersucht worden. Fig. 2 zeigt, dass die halbe Maximalgeschwindigkeit bereits bei relativ geringen H_2 - bzw. D_2 -Konzentrationen im Gasgemisch erreicht wird. Im Falle des H_2 beträgt diese Konzentration im Mittel 10 Vol.-%. Bei Verwendung von D_2/N_2 -Gemischen scheint sie hingegen kleiner zu sein. Unter der Annahme, dass sich H_2 -Anteil des Gases und der wässrigeren Phase im Gleichgewicht befinden, ergibt sich bei einer Löslichkeit von H_2 in H_2O entsprechend $\alpha = 0,0169$ (32°; 760 Torr) eine 0,75 millimolare H_2 -Konzentration in der Lösung für 100% H_2 , und eine 0,075 millimolare für 10% H_2 in der Gasphase. Die Grösse K_m der Hydrogenase dürfte somit näherungsweise $7,5 \cdot 10^{-5}$ m. betragen, sofern Methylenblau als H-Acceptor verwendet wird. Methylenblau ist hier gewählt worden, weil in seiner Gegenwart die höchste Hydrogenase-Aktivität resultiert. Ein mit verschiedenen Acceptorsystemen angestellter Vergleich ergibt folgende relative Reaktionsgeschwindigkeiten: Methylenblau (1,0), Dichlorphenol-indophenol (0,25), Fumarat (0,16) und Nitrat (0,07).

4. Hydrogenlyase. Verglichen mit den beiden zuvor betrachteten Enzymen, weist das Hydrogenlyase-System mit Abstand die kleinste Aktivität auf. Mit Suspensionen intakter *Coli* (Stamm 1955) unter Standardbedingungen ausgeführte Aktivitätsbestimmungen ergeben folgende Werte:

- A) Formicodehydrogenase: – 165 μl O_2 /Std./mg Trockengewicht
(entsprechend + 330 μl CO_2).
- B) Hydrogenase: – 445 μl H_2 /Std./mg.
- C) Hydrogenlyase: + 10 μl H_2 /Std./mg.

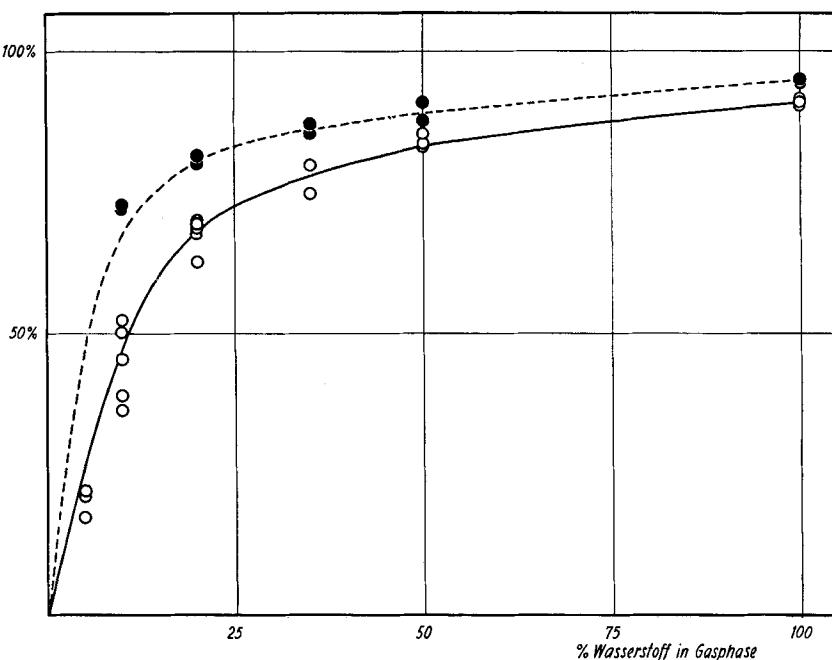


Fig. 2.

Hydrogenase-Aktivität lyophilisierter *E. coli* in Abhängigkeit vom H₂- bzw. D₂-Partialdruck der Gasphase (= „Substratkonzentration“):

a) H₂-Gas in H₂O (—○—) b) D₂-Gas in D₂O (---●---)

Ordinate: Prozentuale Aktivität (durch Extrapolation mittels der Gleichung von Lineweaver & Burk bestimmte Maximalgeschwindigkeit = 100%).

Gest & Peck⁵) haben bei intakten Zellen von *E. Coli* (Stamm „Crookes“) Aktivitäten von teils gleicher Größenordnung bestimmt, und zwar für: A) Formicodehydrogenase: + 340 µl CO₂; B) Hydrogenase: + 450 µl H₂. Die von diesen Autoren bestimmte Hydrogenlyase-Aktivität ist dagegen viel höher (+ 190 µl H₂/Std./mg). Die Frage, ob für diese Diskrepanz neben der Verschiedenheit der Stämme auch die ungleichen Kultivierungsbedingungen verantwortlich zu machen sind, muss zunächst offen gelassen werden. Da die Aktivität dieser 3 Enzymsysteme durchwegs bei pH = 6,6 gemessen worden ist, sind diese Daten — wenigstens bezüglich pH — mit denen von Gest & Peck⁵) vergleichbar. Es ist indessen zu berücksichtigen, dass damit zwar die pH-Optima von Formicodehydrogenase (aerober Test) und Hydrogenlyase getroffen werden, dass aber die pH-Aktivitätskurve der Hydrogenase eine beträchtliche Verschiebung nach der alkalischen Seite erkennen lässt (Fig. 3).

Wird HCOO⁻ als Substrat durch DCOO⁻ ersetzt, so erfahren sowohl die nach dem Zukippen der Formiatlösung zu beobachtende initiale Induktionsperiode („lag“) sowie die im stationären Zustand erreichte Reaktionsgeschwindigkeit eine Verzögerung, und zwar entsprechend einem Verhältnis von 2:3. Dieser Quotient trifft auch für die Hydrogenlyase-Aktivität frischer *Coli* zu, welche nach Zentrifugation in D₂O suspendiert worden sind. Der Ersatz von H₂O durch 90-proz. D₂O als Lösungsmittel hat seinerseits eine Herabsetzung des Umsatzes auf etwa den halben Betrag zur Folge. Wie aus Fig. 4 hervorgeht, verhalten sich die Hydrogenlyase-Aktivitäten (in mm³ H₂/10 Min./Ansatz) nach Ablauf der initialen Induktionsperiode in H₂O wie V_{DCOO⁻}:V_{HCOO⁻} = 26:38 = 0,68, und in 90-proz. D₂O wie 16,5:23 = 0,72.

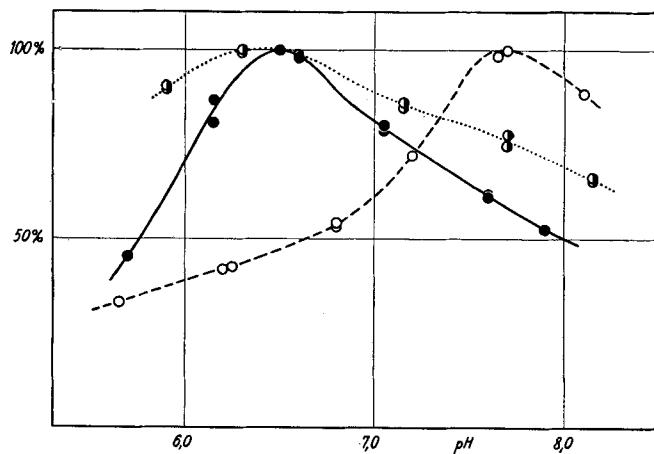


Fig. 3.

Verlauf der pH-Aktivitätskurve der Hydrogenlyase intakter *E. Coli* (—●—). Aktivität beim pH-Optimum = 100%. Pufferung durch Phosphat. Es sind vergleichshalber einge tragen: a) Hydrogenase (---○---); b) Formicodehydrogenase (Gasphase 5% O₂) (....○....).

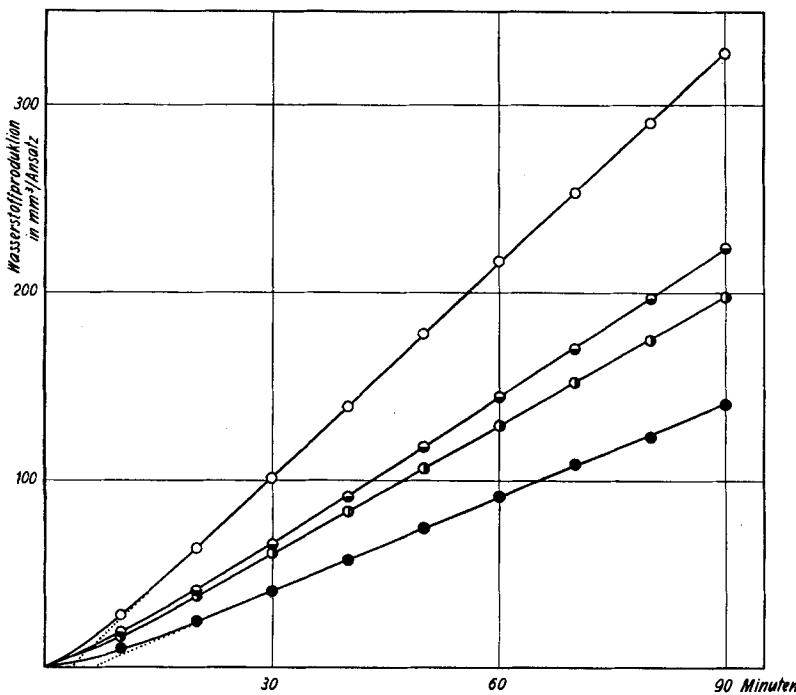
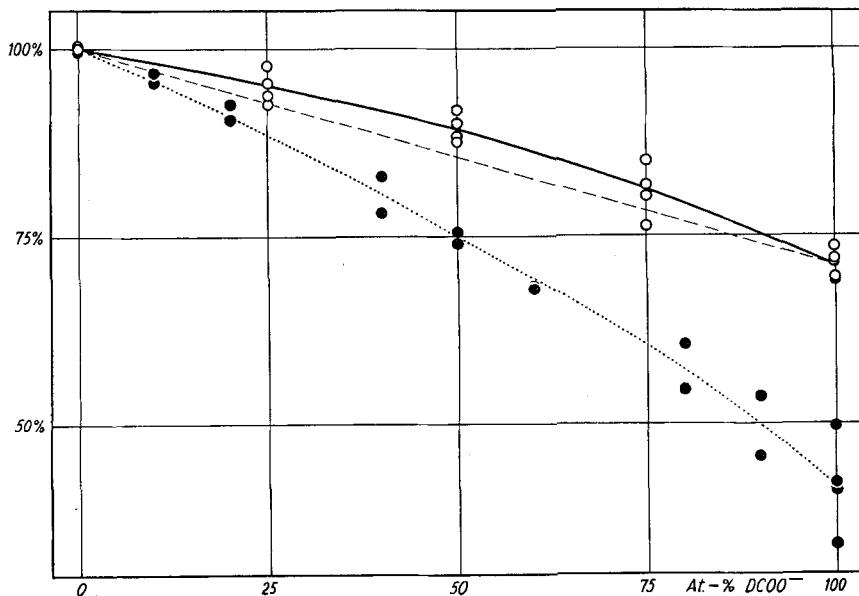


Fig. 4.

Hydrogenlyase-Aktivität intakter *E. Coli* in H₂O und in D₂O:

- a) Substrat HCOO⁻ in H₂O (○) bzw. 90% D₂O (●)
- b) Substrat DCOO⁻ in H₂O (□) bzw. 90% D₂O (■)

Bei systematischer Variation des Mischungsverhältnisses von HCOO^- und DCOO^- ergibt sich — wie aus Fig. 5 ersichtlich — eine ungleiche Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Mischungsverhältnis. Die geringgradige Durchbiegung der Kurve, welche bei Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion des Mischungsverhältnisses resultiert, weist auf unterschiedliche Affinitätsverhältnisse hin. Während sich mit frisch geernteten *Coli*-Suspensionen ein wohl reproduzierbares Aktivitätsverhältnis von $V_{\text{DCOO}^-} : V_{\text{HCOO}^-} = 2:3$ ergibt, zeigen gealterte Suspensionen, d. h. solche, die nach längerem Aufbewahren an Aktivität eingebüßt haben, noch grössere Isotopie-Effekte von allerdings unterschiedlichem Ausmass.



Abhängigkeit der Hydrogenlyase-Aktivität intakter *E. Coli* vom
Mischungsverhältnis $\text{HCOO}^-/\text{DCOO}^-$.

- a) Verhalten frischer *Coli*-Suspensionen (—○—) = Regel
- b) Verhalten „gealterter“ Suspensionen (···●···) = Ausnahme

Ordinate: Wasserstoff-Produktion/20 Min. in den Ansätzen mit $\text{HCOO}^- = 100\%$
Abszisse: Prozentualer Anteil DCOO^- im Formiat.

Im Gegensatz zu den beiden zuvor untersuchten Enzymen, welche sich durch eine sehr kleine *Michaelis*-Konstante, d. h. durch eine bemerkenswert hohe Affinität zwischen Enzym und Substrat auszeichnen, wird eine „Sättigung“ des Hydrogenlyase-Systems erst durch relativ hohe Substratkonzentration erreicht. Halbe Maximalgeschwindigkeit resultiert bei einer Formikatkonzentration von 0,0185-m. für HCOO^- (Mittel aus 6 Bestimmungen) bzw. 0,022-m. für DCOO^- (Mittel aus 3 Bestimmungen). Die Werte für DCOO^- liegen somit ca. 20% höher, was mit dem in Fig. 5 wiedergegebenen Kurvenverlauf in Einklang steht. Auch bezüglich Verlauf der p-S-Kurve zeigen „gealterte“ Suspensionen ein abweichendes Verhalten, indem bei diesen wesentlich flachere Kurven resultieren. Die sich bei der Auswertung solcher Kurven ergebenden K_m -Werte liegen demnach höher und können das Mehrfache des mit frischen Suspensionen erhaltenen Wertes erreichen (0,04 bis 0,08-m.). Methylenviologen, welches von *Gest & Peck*⁵⁾ als Überträgersubstanz in Modell-Hydrogenlyase-Systemen verwendet worden ist, beeinflusst die Hydrogenlyase-Aktivität frisch suspendierter *Coli* eher im Sinne einer Hemmung. Durch Zusatz von Methylenviologen ($0,12\%$) wird die (scheinbare) *Michaelis*-Konstante der Hydrogenlyase frischer *Coli* von $2 \cdot 10^{-2}$ auf ca. $5 \cdot 10^{-2}$ -m. erhöht.

Diskussion.

Die Wirkung der Formicodehydrogenasen besteht darin, die bei der Dehydrierung des Formiats anfallenden H-Atome bzw. Elektronen auf ein Acceptorsystem zu übertragen. Die bakterielle Formicodehydrogenase unterscheidet sich vom gleichnamigen Enzym des Pflanzenreiches durch eine rund 100mal grössere Affinität zum Substrat sowie durch die Art des Acceptors¹⁴⁾. Beim pflanzlichen Enzym handelt es sich um DPN. Die Identifizierung des Reaktionspartners der Bakterien-Formicodehydrogenase, welcher von *Gest & Peck*⁵⁾ als Faktor X₁ bezeichnet worden ist, steht noch aus. Wird die Formicodehydrogenase-Aktivität unter anaeroben Versuchsbedingungen und bei Gegenwart eines Methylenblauüberschusses gemessen, so tritt dieser als begrenzender Faktor des Systems nicht in Erscheinung. Wie bereits *Gale*¹³⁾ gezeigt hat, kommt es dagegen unter aeroben Bedingungen zur fortschreitenden Limitierung des Umsatzes durch ein O₂-empfindliches Überträgersystem, welches möglicherweise mit Faktor X₁ identisch ist. Das Auftreten eines Isotopie-Effektes, wie er hier bei der Formicodehydrogenase beobachtet werden kann, stützt die Vermutung, dass im Verlauf der aeroben Inkubierung ein derartiger Wechsel des umsatzbegrenzenden Faktors erfolgt.

Das Fehlen eines Isotopie-Effektes bei Gegenwart von Methylenblau als H-Acceptor ist nicht beweisend, dass ein solcher nicht existiert. Es ist zu erwägen, ob nicht die Gleichheit der Dehydrierungsgeschwindigkeiten von HCOO⁻ und DCOO⁻ durch die maximale Hydrierungsgeschwindigkeit des Acceptorsystems bedingt sein könnte. Nach *Crewther*⁷⁾, der bei der *Thunberg*-Methode eine Abhängigkeit der Entfärbungszeit von der Art und Konzentration des H-Acceptors beobachtet hat, ist dies sogar anzunehmen.

Dazu kommt nun noch, dass sich die ausschliesslich verwendete *Thunberg*-Methode zur genauen Ermittlung der *Michaelis*-Konstanten (K_m) beim Bestehen einer relativ grossen Affinität zum Substrat — wie dies hier der Fall ist — wenig eignet. Dies, weil nicht V_0 , sondern t^{-1} zum Erreichen eines bestimmten Umsatzes gemessen wird. Selbst wenn die Methylenblaukonzentration möglichst klein gewählt wird ($2,6 \cdot 10^{-5}$ m. Endkonzentration; Endpunkt = 80% Entfärbung), so entspricht dies einer gleichzeitigen Abnahme der Formiatkonzentration um $2,1 \cdot 10^{-5}$ m. Daraus geht hervor, dass Substratkonzentrationen unterhalb dieses Wertes experimentell überhaupt nicht zugänglich sind und solche, die nicht weit darüberliegen, infolge Abnahme der Substratkonzentration während der Inkubierung zu lange Entfärbungszeiten zeigen. Die Auswertung von *Thunberg*-Versuchen, welche mit verschiedenen Substratkonzentrationen ausgeführt worden sind, ergibt daher zu hohe Werte für K_m . Bei Annahme einer unendlich grossen Affinität der Formicodehydrogenase zum Substrat und einer Reaktion 1. Ordnung erhält man auf Grund der graphischen Auswertung der Beziehung $1/V$ gegen $1/S$ eine (scheinbare) *Michaelis*-Konstante von $K_m = 3,2 \cdot 10^{-5}$ m. Da unter diesen Bedingungen K_m theoretisch 0 sein sollte, ist anzunehmen, dass die Grösse des begangenen Fehlers etwa dem 1,5fachen Wert der Konzentrationsabnahme an Formiat entspricht, welche zur Entfärbung der vorgelegten Methylenblau menge erforderlich ist. Unter Vorbehalt der oben gemachten Einwände dürfte K_m für die Formicodehydrogenase von *E. Coli* nicht $4 \cdot 10^{-5}$ m., sondern $3 \cdot 10^{-5}$ m. weniger, d. h. näherungsweise $1 \cdot 10^{-5}$ m. betragen.

¹⁴⁾ *H. Aebi, Eva Frei & Marlies Schwendimann, Helv. 39, 1765 (1956).*

Die Annahme, dass die Formicodehydrogenase auch am Hydrogenlyase-System beteiligt ist, wird durch zahlreiche Befunde gestützt. Am beweiskräftigsten dürften die von *Gest & Peck*⁵⁾ gemachten Beobachtungen sein, wonach die Bildung aktiver Modell-Hydrogenlyase-Systeme durch Zusammenbringen der einzelnen Komponenten *in vitro* möglich ist (Formicodehydrogenase aus *E. Coli* + Faktor X₁ + Faktor X₂ bzw. Methylviologen + Hydrogenase aus *Clostridium butylicum*). Wie bereits erwähnt, kann nach *Crewther*⁷⁾ die Ungleichheit der Michaelis-Konstanten von Formicodehydrogenase und Hydrogenlyase nicht als Gegenargument gegen die 2-Enzymtheorie betrachtet werden. Dies wird durch das Verhalten der hier verwendeten, aerob gezüchteten *Coli* verdeutlicht, welche – möglicherweise wegen ihres geringen Gehaltes an Faktor X₁ – eine im Vergleich zur Formicodehydrogenase und Hydrogenase auffallend geringe Hydrogenlyase-Aktivität aufweisen. Die Annahme liegt nahe, dass es in diesem Falle nicht das zuerst reagierende Glied der Reaktionskette (= Formicodehydrogenase) sein kann, welches auf Grund seiner Affinität zum Substrat den Verlauf der p-S-Kurve der Reaktionsfolge als Ganzes (= Hydrogenlyase) bestimmt. Vielmehr dürfte diese Rolle demjenigen Faktor in der Reihe zufallen, der infolge seiner geringen Affinität wie auch seiner kleinen Konzentration umsatzbegrenzend wirkt, welches das Substratangebot (HCOO^-) auch sein möge. Grundsätzlich kommen alle in der Kette vorkommenden Überträger hiefür in Frage. Sofern Methylviologen auch im hier verwendeten System befähigt ist, den Faktor X₂ zu ersetzen, so dürfte – angesichts der Unwirksamkeit dieses Farbstoffes auf die Hydrogenlyase – der Faktor X₁ von *Gest* als limitierender Faktor anzusprechen sein. Trifft dies zu, dann würde die geringe Hydrogenlyase-Aktivität auf den beim Faktor X₁ liegenden Engpass zurückzuführen sein. Die im Vergleich zu den beiden Einzelenzymen recht hohe Michaelis-Konstante der Hydrogenlyase wäre andererseits als ein Ausdruck der geringen Affinität dieses Faktors zu der von diesem in der Kette übertragenen Gruppe zu bewerten. Das bei der Hydrogenlyase zu beobachtende Ausmass des Isotopie-Effektes entspricht demjenigen der aerob gemessenen Formicodehydrogenase, was bei Annahme einer Begrenzung beider Vorgänge durch Faktor X₁ der Fall sein sollte.

Wenn auch diese Experimente für keine der beiden Auffassungen über die Natur der Hydrogenlyase beweisend sind, so stehen sie trotz dem unterschiedlichen Verhalten von Formicodehydrogenase und Hydrogenlyase (vgl. Tab. 5) in keinem Widerspruch zur 2-Enzymtheorie. Die geringe Aktivität der Hydrogenlyase sowie ihre Variabilität bezüglich Isotopie-Effekt und Affinität zum Substrat machen es wahrscheinlich, dass es sich beim begrenzenden Faktor der Umsetzung um einen labilen (gegen O₂ und Alkalien empfindlichen) Überträger in einer mehrgliedrigen Reaktionskette handelt.

Tabelle 5.

	K_m (bez. HCOO^-)	pH-Optimum	Isotopie-Effekte	
			$\frac{V_{\text{DCOO}^-}}{V_{\text{HCOO}^-}}$ (in H_2O)	$\frac{V_{\text{D}_2\text{O}}}{V_{\text{H}_2\text{O}}} (\text{S}=\text{HCOO}^-)$
Hydrogenlyase <i>E. coli</i> (32°)	$1,8 \cdot 10^{-2} \text{-m.}$	6,5	0,68	0,60
Hydrogenase <i>E. coli</i> (32°)	$\sim 7 \cdot 10^{-6} \text{-m.}$	7,7	$\frac{V_{\text{D}_2} \text{ in } \text{D}_2\text{O}}{V_{\text{H}_2} \text{ in } \text{H}_2\text{O}} = 0,67$	
Formicodehydrogenase (anaerob; + Methylenblau) <i>E. coli</i> (32°)	$< 4 \cdot 10^{-5} \text{-m.}$ ($\sim 1 \cdot 10^{-5} \text{-m.}$)	7,0	1,0	0,9—0,8
Formicodehydrogenase (5% O_2 ; - Methylenblau) <i>E. coli</i> (32°)	—	6,4	1,0—0,9 (in 20% O_2 : bis 0,65)	0,8—0,6
Formicodehydrogenase <i>Phaseolus</i> (27,5°)	$2,7 \cdot 10^{-3} \text{-m.}$	~ 7	0,4	0,75

In biologischer Hinsicht sind diese an einzelnen Enzymen oder Enzymsystemen beobachteten Verzögerungen des Reaktionsablaufes, welche durch Einführung des schweren Wasserstoffisotops in Substrat und Lösungsmittel erzeugt werden können, geeignet, die längst bekannte Toxizität des schweren Wassers gegenüber den verschiedenartigsten Organismen dem Verständnis näher zu bringen.

Der *Schweizerischen Studienkommission für Atomenergie* sei für finanzielle Unterstützung hiermit bestens gedankt.

SUMMARY.

1. Formicodehydrogenase, hydrogenase and hydrogenlyase activity of intact cells (and extracts) of *E. coli* have been measured using HCOO^- and DCOO^- , H_2 and D_2 as a substrate and H_2O and D_2O as a solvent.

2. Whereas HCOO^- and DCOO^- are dehydrogenated anaerobically at the same rate by formicodehydrogenase (in presence of methylene blue) an increasing isotope effect can be observed under aerobic conditions. (Aerobic) formicodehydrogenase as well as hydrogenlyase reveal a maximal activity ratio of $V_{\text{DCOO}^-}:V_{\text{HCOO}^-} \sim 2:3$.

3. Replacement of H by D in both substrate and solvent results in a reduction of the initial reaction rate from unity to 0.67 in hydrogenase and to 0.4 in hydrogenlyase.

4. The variability of hydrogenlyase activity with respect to isotope effect and to enzyme-substrate affinity is discussed and considered as indirect evidence for the existence of an intermediate carrier in the hydrogenlyase system.