

B. Mit Palladiumoxyd in Alkohol mit Alkalizusatz.

2 g Keton XVII in 100 ccm Alkohol unter Zusatz von 0.2 g Ätzkali nehmen in 5 Stdn. 1 Mol  $H_2$  auf mit PdO als Katalysator, worauf die Hydrierung zum Stillstand kommt. Die Lösung wird abfiltriert, mit Eisessig neutralisiert und in gleicher Weise aufgearbeitet. Es wurde als einziges Hydrierungsprodukt quantitativ das *trans*-Nerolyl-methyl-cyclopentanon V, Schmp. 81—83°, gefaßt.

*trans*-Nerolyl-methyl-cyclopentan XVIII (1-Methyl-2-[6-methoxy-naphthyl-(2)]-cyclopentan).

0.25 g *trans*-Keton V wurden nach Clemmensen reduziert durch 23-stgd. Kochen mit Salzsäure 1:1 und amalgamiertem Zink unter Zusatz von wenigen ccm Toluol. Das Reaktionsprodukt wurde bei 110° und 0.2 mm Druck destilliert und aus Methanol in großen, flachen Platten vom Schmp. 52—54° erhalten.

4.565 mg Sbst.: 14.200 mg  $CO_2$ , 3.450 mg  $H_2O$ .

$C_{17}H_{20}O$ . Ber. C 84.93, H 8.41. Gef. C 85.02, H 8.48.

Das Pikrat bildet derbe, rote Nadeln vom Schmp. 112°.

2.197 mg Sbst.: 0.176 ccm  $N_2$  (27°, 744 mm Druck).

$C_{23}H_{28}O_8N_8$ . Ber. N 8.95. Gef. N 9.10.

### 329. C. N. Ionescu, N. Stanciu und V. Rădulescu: Untersuchungen über das $p_H$ -Optimum der Fumarase.

[Aus d. Biolog.-chem. Laborat. d. Pharmazeut. Fakultät, Bukarest.]

(Eingegangen am 18. September 1939.)

Die Fumarase, das Enzym, welches den reversiblen Umwandlungsprozeß der Fumarsäure in *l*-Äpfelsäure katalysiert, verhält sich, was die Kinetik anbetrifft, ziemlich eigenartig, eine Tatsache, auf welche wir in einer anderen Arbeit zurückkommen werden.

In unserer heutigen Arbeit werden wir unsere Beobachtungen über die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedener H-Ionen-Konzentration darlegen. Nach der Literatur liegt das  $p_H$ -Optimum für die Aktivität von aus verschiedenen Organen extrahierter Fumarase und in Gegenwart verschiedener Puffer innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Mann und Woolf<sup>1)</sup> fanden bei „ruhenden“ Colibakterien eine optimale Reaktionsgeschwindigkeit bei einem  $p_H$  6.4 und bei Zuführung von Salzen eine Verschiebung dieses Optimums — je nach der Natur des Salzes — zwischen  $p_H$  6.2—7.7. Mit Lebersaft fand K. P. Jacobsohn<sup>2)</sup> eine optimale Reaktionsgeschwindigkeit zwischen  $p_H$  6.5—7.7. Die Bestimmungen des  $p_H$ -Optimums wurden nur entweder mit Fumarsäure oder mit Äpfelsäure allein gemacht. Parallele Untersuchungen mit demselben enzymatischen Präparat bei beiden Säuren wurden unseres Wissens nicht angestellt. Das  $p_H$ -Optimum sollte, ob man von der einen oder der anderen Seite der Reaktion gegen den Gleichgewichtszustand vorgeht, derselbe sein. Um festzustellen, ob dies der Fall ist, machten wir an beiden Säuren Versuche mit demselben Enzym-Präparat und unter denselben Bedingungen. Um alle Fehler, welche sich durch die Inaktivierung der Enzyme

<sup>1)</sup> Biochem. Journ. **24**, 427 [1930] (nach v. Euler, Chemie der Enzyme II, 531 [1934]).

<sup>2)</sup> K. P. Jacobsohn u. Mitarbb., Biochem. Ztschr. **254**, 112 [1932].

mit der Zeit ergeben können, auszuschalten, haben wir alle Versuche in derselben Zeit durchgeführt.

Die Versuchslösungen hatten folgende Zusammensetzung:

a) 20 ccm Fumarsäurelösung (10 %)	b) 23.1 ccm l-Äpfelsäurelösung (10 %)
10 „ Enzym-Präparat	10 „ Enzym-Präparat
20 „ Phosphatpuffer	20 „ Phosphatpuffer
50 „ Wasser	46.9 „ Wasser
2 „ Toluol	2 „ Toluol

Die Säurelösungen wurden zuerst in Gegenwart von Lakmus mit NaOH neutralisiert. Beide Säuren (Schering-Kahlbaum) wurden durch wiederholte Krystallisierungen gereinigt. Der Schmelzpunkt für Fumarsäure war 286° (im geschlossenen Rohr) und für Äpfelsäure 100°. Der Puffer wurde aus Phosphat (p. an. Merck) nach Sörensen<sup>3)</sup> hergestellt und der p<sub>H</sub>-Gehalt der Lösungen mit einem Potentiometer-Pehavi bestimmt. Wir erhielten eine p<sub>H</sub>-Stufe zwischen p<sub>H</sub> 4.49—p<sub>H</sub> 9.18. Bei allen Versuchen verwendeten wir dasselbe Enzym-Präparat, mazerierte Muskel nach der Technik Clutterbuck's<sup>4)</sup>, welches eine Fumarase ziemlich frei von Ballaststoffen und Succinodehydrase und mit einer auf Methylenblau untersuchten sehr geringen Reduktionskapazität gibt.

Die Enzymlösung wurde bei einer Temperatur von 30° zur gleichen Zeit zu den Reaktionslösungen (Fumarsäure und l-Äpfelsäure) gegeben und die Temperatur während der Reaktion auf 30° ( $\pm 1^{\circ}$ ) gehalten.

Der Verlauf der Reaktion wurde von Stde. zu Stde. durch polarimetrische Bestimmung der l-Äpfelsäure in Gegenwart von Ammoniummolybdat und Eisessig verfolgt<sup>5)</sup>. Da wir beobachtet hatten, daß die Reaktion zwischen dem Molybdän-Ion und Äpfelsäure nicht plötzlich, sondern erst allmählich stattfindet, wurden die Bestimmungen ungefähr 6 Stdn. nach der Mischung der Versuchslösung mit der Molybdatlösung vorgenommen. Die Drehung wurde in einem Polarimeter nach Lippich, mit monochromatischem Natriumlicht (Osram) bis zu einer Präzision von  $\pm 0.01^{\circ}$  festgestellt.

Tafel 1. p<sub>H</sub>-Optimum für Fumarsäure.

Zeit in Minuten	p <sub>H</sub>													
	4.49		5.28		6.54		7.16		7.73		8.33		9.18	
	r <sub>F</sub> in °	k $\times 10^4$	r <sub>F</sub> in °	k $\times 10^4$	r <sub>F</sub> in °	k $\times 10^4$	r <sub>F</sub> in °	k $\times 10^4$	r <sub>F</sub> in °	k $\times 10^4$	r <sub>F</sub> in °	k $\times 10^4$	r <sub>F</sub> in °	k $\times 10^4$
60	+1.90	10.93	+2.07	11.99	+3.35	21.97	<b>+4.43</b>	<b>28.63</b>	+4.02	25.45	+3.50	20.18	+2.88	12.27
120	+3.40	10.44	+3.62	11.24	+6.00	21.14	<b>+7.36</b>	<b>28.32</b>	+6.94	25.95	+5.30	17.93	+4.06	12.87
180	+4.60	9.99	+4.86	10.71	+7.60	20.20	<b>+9.36</b>	<b>28.28</b>	+9.06	26.61	+7.89	21.42	+7.06	17.74
240	+5.56	9.54	+6.00	10.57	—	—	<b>+10.70</b>	<b>28.16</b>	+10.55	27.24	+9.52	21.91	+8.64	18.34
300	—	—	—	—	+10.00	19.36	<b>+11.71</b>	<b>28.83</b>	+11.58	27.85	+10.70	22.53	+9.80	18.15
360	+7.12	8.98	+7.46	9.63	+10.80	19.20	<b>+12.29</b>	<b>28.55</b>	+12.26	28.28	+11.60	18.81	+10.79	19.16
Durchschn.	9.976		10.83		20.37		<b>28.46</b>		26.89		20.46		17.25	
	Substrat: 2 g %				r <sub>∞</sub> = +13.56°				l = 2.					
	Enzym: 10 ccm %				T = 30°.									

<sup>3)</sup> Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 1929, 615.

<sup>4)</sup> Biochem. Journ. 22, 1193 [1928].

<sup>5)</sup> F. Auerbach, D. Krüger, Ztschr. Unters. Nahr.- u. Genußmittel 46, 423 [1910] (nach Jacobsohn, Biochem. Ztschr. 1. c. 117).

Tafel 2. p<sub>H</sub>-Optimum für Äpfelsäure.

Zeit in Minuten	p <sub>H</sub>														
	4.49		5.28		6.64		7.16		7.73		8.33		9.18		
	rM in °	k×10 <sup>4</sup>	rM in °	k×10 <sup>4</sup>	rM in °	k×10 <sup>4</sup>	rM in °	k×10 <sup>4</sup>	rM in °	k×10 <sup>4</sup>	rM in °	k×10 <sup>4</sup>	rM in °	k×10 <sup>4</sup>	
60	+16.18	15.82	+16.14	16.93	+15.76	28.47	+15.40	41.40	+14.96	61.17	<b>+14.90</b>	<b>64.35</b>	+15.00	59.13	
120	+15.89	12.15	+15.86	12.63	+15.47	19.34	+14.62	40.66	+14.40	49.07	<b>+14.30</b>	<b>53.67</b>	+14.44	47.39	
180	+15.66	10.61	+15.61	11.19	+15.20	16.57	+14.33	34.82	+14.08	44.29	<b>+13.87</b>	<b>56.72</b>	+14.12	42.50	
240	+15.41	10.25	+15.36	8.53	—	—	+14.08	33.22	+13.84	44.42	<b>+13.70</b>	<b>56.96</b>	+13.94	38.89	
300	—	—	—	—	+14.73	14.83	+13.89	33.15	+13.76	40.40	<b>+13.64</b>	<b>53.67</b>	+13.81	37.17	
360	+15.06	9.36	+14.98	10.07	+14.50	15.00	+13.80	31.48	+13.71	37.14	<b>+13.62</b>	<b>48.20</b>	+13.74	34.92	
Drchschn.	11.64		11.87		18.84		35.79		45.08		<b>55.59</b>		43.33		
		Substrat: 2 g %		r <sub>0</sub> = +16.82°		T = 30°.									
		Enzym: 10 ccm %		r <sub>∞</sub> = +13.56°		l = 2.									

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch die Geschwindigkeitskonstante *k* aus dem Ausdruck der monomolekularen Reaktion errechnet<sup>2)</sup>. Aus den Tafeln 1 und 2 ersieht man, daß das p<sub>H</sub>-Optimum für Fumarsäure und *l*-Äpfelsäure verschieden ist. Während bei dem Versuch mit Fumarsäure die optimale Wirksamkeit der Fumarase bei p<sub>H</sub> 7.16 liegt, wurde sie bei dem Versuch mit Äpfelsäure bei p<sub>H</sub> 8.33 gefunden. Das Vorhandensein zweier verschiedener p<sub>H</sub>-Optimen für Fumarase, je nachdem ob man von der einen oder der anderen Richtung der Reaktion Fumarsäure ⇌ Äpfelsäure ausgeht, könnte durch folgende Hypothese erklärt werden: bei einer enzymatischen Reaktion, mit einem in Ionen dissoziierbaren Substrat beeinflusst der p<sub>H</sub>-Gehalt der Lösung die Reaktionsgeschwindigkeit auf zwei Weisen:

1. Verändert er den Dispersionsgrad der Enzyme, indem er die Reaktionsoberfläche vergrößert oder verkleinert.
2. Beeinflusst er den Dissoziationsgrad des Substrats.

Die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenem p<sub>H</sub> ergibt sich aus der Addierung dieser beiden Wirkungen.

Fumarsäure und besonders Äpfelsäure sind zwei ziemlich schwache Säuren, ihre Dissoziationskonstante als Na-Salz ist<sup>6)</sup>:

$$\text{Fumarsäure } 100K = 0.104 \text{ und } \text{Äpfelsäure } 100K = 0.0395.$$

Wenn sich diese Säuren nun in einer Lösung als Na-Fumarat oder Malat befinden, also kombiniert mit einer starken Base, dann sind sie einem Hydrolyse-Prozeß folgender Art ausgesetzt:



Diese Reaktion zeigt, daß die Dissoziation der Säure von einer Vermehrung der OH<sup>+</sup>-Ionen in der Lösung begünstigt wird. Je schwächer die Säure ist, um so notwendiger ist eine stärker alkalische Lösung, um eine größere Dissoziation zu erhalten. Wenn wir annehmen, daß das Substrat an der Reaktion in einer dissoziierten Form teilnimmt, muß man annehmen, daß die Reaktion in einer basischen Lösung mehr in Richtung nach Äpfelsäure als nach Fumarsäure begünstigt ist. Die Alkalinität der Lösung darf aber nicht zu stark sein, da sie sonst eine ungünstige Modifizierung der Enzyme

<sup>6)</sup> Roth, Wallasch, Physik. chem. Tabellen 1912; Ostwald, Ztschr. physik. Chem. 3, 418 [1889] (nach Kauffman, Beziehungen zwischen Physikalischen Eigenschaften und Chemischer Konstitution. Stuttgart 1920, 342, 347).

hervorrufft. Die  $p_{\text{H}}$ -Optima, welche wir beobachten konnten, entstanden aus der Addierung der Begünstigung der Dissoziation des Substrats in alkalischem Medium und der Hemmung der Enzyme durch eine Vergrößerung der Alkalinität. Diese zwei Optima könnten für Äpfelsäure und Fumarsäure nur dann gleich sein, wenn ihre Dissoziationskonstanten nahe beieinander lägen. Da aber die Äpfelsäure eine etwa 2.5-mal kleinere Dissoziationskonstante als Fumarsäure hat, ist es natürlich, daß das  $p_{\text{H}}$ -Optimum in dieser Reaktion bei alkalischen Werten für Äpfelsäure größer ist, als für Fumarsäure, welche weniger hydrolysiert ist. Wir geben diese Hypothese unter dem Vorbehalt einer späteren Nachprüfung, welche um so notwendiger ist, als die Reaktion in größerem oder kleinerem Maße von sekundären Reaktionen begleitet ist. Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Änderung der Dissoziation des Substrats wurde von Northrop<sup>7)</sup> im Falle des Pepsins, Trypsins und Papains betont.

Die Beobachtung, daß diese reversible Reaktion zwei  $p_{\text{H}}$ -Optima für die beiden Richtungen zuläßt, zeigt, daß bei demselben  $p_{\text{H}}$  die Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur von der aktiven Masse des in der Lösung befindlichen Salzes abhängig ist. In Wirklichkeit sollte man als aktive Masse die in Ionen dissoziierte Fraktion annehmen, welche verschieden ist, obwohl die beiden Säuren in gleichmolekularer Konzentration angewendet wurden.

K. P. Jacobsohn<sup>8)</sup>, welcher die kinetischen Gleichungen dieses Prozesses aufgestellt hat und welcher von der Hypothese ausging, daß dieses Phänomen dem Massenwirkungsgesetz folgt, hat in seinen Folgerungen als aktive Masse die Gesamtheit des in der Lösung befindlichen Substrats eingeführt.

Die Tatsache, daß das  $p_{\text{H}}$ -Optimum in den beiden Richtungen dieses reversiblen Prozesses verschieden ist, kann eine der Ursachen dafür sein, daß die von Jacobsohn aufgestellten Gleichungen und folglich auch die diesen zugrunde liegende Hypothese (außer der Existenz der sekundären Reaktionen, im speziellen der Entstehung von Bernsteinsäure und der Inaktivierung der Fumarase bei der Reaktion) durch Versuche nicht bestätigt werden können.

#### Zusammenfassung.

Wir haben unter denselben Bedingungen das  $p_{\text{H}}$ -Optimum für den reversiblen Prozeß Fumarsäure  $\rightleftharpoons$  Äpfelsäure bestimmt, und fanden für die Reaktion mit Fumarsäure einen Wert von  $p_{\text{H}}$  7.16 und in der entgegengesetzten Richtung einen Wert von 8.33.

Die Verschiedenheit des  $p_{\text{H}}$ -Optimums in den beiden Reaktionsrichtungen erklären wir durch die Hypothese, daß die Reaktionsgeschwindigkeit sich aus der Addierung der Wirkung der Dissoziation des Substrats in alkalischen Lösungen (welche stärker für die Äpfelsäure mit ihrer kleineren Dissoziationskonstante als für die Fumarsäure ist) und einer Änderung des Dispersionsgrades der Enzyme zusammensetzt.

Die Tatsache, daß es für die beiden Richtungen des Prozesses zwei  $p_{\text{H}}$ -Optima gibt und daß sekundäre Reaktionen und eine Inaktivierung der Enzyme mit der Zeit eintreten können, kann sowohl die Abweichungen, welche Jacobsohn von der Theorie sowie von den für die Kinetik der Fumarase aufgestellten Gleichungen erhielt, erklären.

<sup>7)</sup> Journ. gen. Physiol. **6**, 263 [1922] (nach Haldane, Stern, Allgemeine Chemie der Enzyme, Leipzig 1932). <sup>8)</sup> K. P. Jacobsohn, l. c. u. B. **67**, 1481 [1923].