

## Die Bindung von Zink durch Zellwände von Chlorella

Von

Inge Schuster und E. Broda

Aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 19. November 1969)

Aus Chlorella pyrenoidosa präparierte Zellwände wurden durch Analyse und pH-Titration gekennzeichnet. Die Bindung von markiertem Zink durch die Zellwände, die reversibel ist, erfolgt an 2 Arten aktiver Stellen, die sich durch Affinität und Kapazität unterscheiden. Die Zahlenwerte dieser Größen wurden durch Aufnahme einer aus den beiden Komponenten zusammengesetzten *Langmuir*-Isotherme bestimmt. Die Verdrängung des Zinks von den Zellwänden durch mehrere Arten zweiwertiger Kationen wurde durch Gleichgewichtsdialyse gemessen und auf Grund der erhaltenen Affinitätsreihe die Natur der bindenden Gruppen diskutiert.

### *Binding of Zn by Cell Walls of Chlorella*

Cell wall material prepared from Chlorella pyrenoidosa was characterized by analysis and pH titration. Labeled zinc is found to be bound, reversibly, by 2 kinds of active sites. They differ in affinities and capacities, and these were determined from a 2-component *Langmuir* isotherm. The displacement of zinc from the cell walls by several kinds of 2-valent cations was measured by equilibrium dialysis. The nature of the sites was discussed on the basis of the affinity series obtained.

Im Rahmen von Untersuchungen über den Mechanismus der Anreicherung von Spurenelementen durch Pflanzenzellen wurde die Aufnahme von Zink durch die mikroskopische Süßwasseralge Chlorella pyrenoidosa verfolgt<sup>1</sup> (*C. pyrenoidosa* wird jetzt auch als *C. fusca* bezeichnet). Es wurde festgestellt, daß an der Aufnahme energieunabhängige und energieabhängige Komponenten beteiligt sind. Die energieabhängige Aufnahme von Stoffen kann allgemein auch entgegen dem Gradienten des elektrochemischen Potentials erfolgen („aktive“ Aufnahme) und wird nur an lebenden Zellen beobachtet; dagegen ist die „passive“ Aufnahme nicht direkt mit den Lebensvorgängen verknüpft. Die passive Aufnahme von Zink durch getötete Chlorella übertrifft jene

<sup>1</sup> G. R. Findenegg und E. Broda, Naturwissensch. 53, 358 (1966).

durch lebende Chlorella bedeutend<sup>2, 3</sup>; dies ist zweifellos darauf zurückzuführen, daß Ionen nach dem Absterben von Zellen leichter in deren Innenraum diffundieren können.

Chlorella war für diese Arbeiten gewählt worden, weil diese einzellige Pflanze leicht zu züchten ist und dann eine quasi-homogene Suspension ergibt, deren Medium innerhalb weiter Grenzen beliebige chemische Zusammensetzung verliehen werden kann; auch ist über Chlorella schon viel bekannt. Zink wurde als Kation ausgewählt, da es einen Bestandteil pflanzlicher Enzyme bildet und daher ein „essentielles Spurenelement“<sup>4</sup> ist<sup>4, 5, 6, 7</sup>; überdies steht ein geeignetes Radioisotop zur Verfügung.

Die passive Komponente ist bei der Zinkaufnahme weit stärker ausgeprägt als etwa bei der Kaliumaufnahme<sup>8</sup>, was auf die starke Affinität des Zinks zu Zellbestandteilen zurückzuführen sein dürfte. Zur Aufklärung des Mechanismus dieser passiven Aufnahme wurde nun die Zinkbindung durch isolierte Bestandteile von Chlorella untersucht. Vorliegend wird über die Zinkbindung durch die Zellwände berichtet, da sie in lebenden Zellen zweifellos für den Hauptteil der passiven Aufnahme verantwortlich sind; diese Bindung stellt dann den raschen Primärschritt bei der Gesamtaufnahme dar. Über die Zinkbindung durch die gelösten hochmolekularen Stoffe aus Chlorella wurde an anderer Stelle berichtet<sup>9</sup>.

In besonderen Versuchen („Konkurrenzversuchen“) wurde auch die Bindungsfestigkeit des Zinks an den Zellwänden mit jener anderer zweiwertiger Kationen verglichen. Dazu wurde geprüft, inwieweit die Aufnahme markierten Zinks durch die Fremdionen gehemmt wurde.

## Experimenteller Teil

### *Züchtung der Algen und Gewinnung der Zellwände*

Die Züchtung der Algen erfolgte in diffusum Licht in Stehkolben, deren sterilisiertes Nährmedium je Liter Wasser 0,303 g KNO<sub>3</sub>, 0,136 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,493 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,005 g Eisencitrat, 2,86 · 10<sup>-3</sup> g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 · 10<sup>-3</sup> g MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O, 2,3 · 10<sup>-4</sup> g ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 8 · 10<sup>-5</sup> g CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, 5 · 10<sup>-5</sup> g Ammonmolybdat und 10 g Glucose enthielt. Nach 10 Tagen wurden jeweils 60–70 g Algen (Trockengewicht) geerntet, mehrmals mit Wasser

<sup>2</sup> H. Krausz, Dissertation, Wien, in Vorbereitung.

<sup>3</sup> H. Krausz und E. Broda, Mh. Chem. **96**, 695 (1965).

<sup>4</sup> G. Weitzel, Angew. Chem. **68**, 566 (1956).

<sup>5</sup> F. L. Hoch und B. L. Vallee, in: C. A. Lamb et al. (Hrsg.), Trace Elements, New York, 1958.

<sup>6</sup> T. Bersin, Biochem. d. Mineral- und Spurenelemente, Frankfurt 1963.

<sup>7</sup> A. S. Prasad, Ed., Zinc Metabolism, Springfield 1966.

<sup>8</sup> H. Springer-Lederer und D. Rosenfeld, Physiol. Plant. [Kopenhagen] **21**, 435 (1968).

<sup>9</sup> I. Sarang (= Schuster), Dissertation, Univ. Wien (1967).

gewaschen und hierauf mit dem Zellhomogenisator nach *Merckenschläger*<sup>10</sup> behandelt. Dazu wurden 50 g Algen in 100 ml Wasser suspendiert, je 25 ml Suspension mit dem gleichen Volumen Glasperlen (Ballotini,  $d = 0,18$  mm) in 75-ml-Schüttelfläschchen gefüllt, jedes Fläschchen unter CO<sub>2</sub>-Kühlung bei 0—5° C bei 4000 Perioden/Min. 5 Min. geschüttelt und das hochviskose, dunkelgrüne Algenhomogenat durch Absaugen auf einer G1-Nutsche von den Glasperlen befreit. Zur Gewinnung der Zellwände<sup>11</sup> wurde das Homogenat bei 800 g 10 Min. zentrifugiert. Der resultierende Bodensatz enthielt teilweise zerstörte Zellen, Zellwände und Pyrenoide (Stärkekörner). Er wurde wiederholt in Wasser suspendiert und bei 200 g 30 Min. zentrifugiert, wobei die teilweise zerstörten Zellen und die Pyrenoide zu Boden sanken. Der opaleszierende Überstand wurde schließlich bei 800 g 10 Min. zentrifugiert. Lichtmikroskopisch wurde festgestellt, daß die so erhaltenen, rein weißen Zellwände frei von Pyrenoiden waren. Die Ausb. an trockenen Zellwänden betrug, auf trockene Algen bezogen, 2,5 Gew.%. Die Zellwände wurden nach ihrer Gewinnung in destill. Wasser suspendiert und bei 0—5° C aufbewahrt.

Die Mikroanalyse\* des Präparats ergab neben 7,5% Asche 45,0% C, 7,0% H, 4,6% N und 0,8% P. Diese Werte stimmen weitgehend mit jenen überein, die aus den von *Northcote* angegebenen Gehalten an Proteinen, Kohlehydrat, Glucosamin und Lipoid berechnet (42,6% C, 6,0% H, 4,6% N) bzw. angegeben (0,67% P, 5,2% Asche) werden. Die Elementarzusammensetzung ist also jener des Materials von *Northcote* ähnlich. Auch der Gehalt an extrahierbarem Lipoid (*Northcote*: 9,2%, hier: 10,5%) ist fast der gleiche. Schwefel wurde nicht gefunden (< 0,5%).

#### *pH-Titration*

Die Titrationskurven wurden potentiometrisch mit dem pH-Meter E 396 von Metrohm aufgenommen. Die Zellwände (etwa 25 mg) wurden meist in 55 ml H<sub>2</sub>O suspendiert, mit 0,1*n*-NaOH oder HCl auf den gewünschten pH-Wert gebracht und die Ionenstärke mit NaNO<sub>3</sub> auf 0,1 eingestellt. Der Verbrauch an 0,1*n*-Titerlösung war insgesamt 1—2 ml, die Titration nahm 30—60 Min. in Anspruch. In Blindversuchen wurden gleichartige Lösungen ohne Zellwände titriert. Ein Kontrollversuch mit menschlichem Serumalbumin ergab Übereinstimmung mit der Literatur<sup>12</sup>.

#### *Messung der Radioaktivität*

Mit <sup>65</sup>Zn (Halbwertszeit 245 Tage) markiertes Zn war als Chlorid mit einer spez. Aktivität von 5,15 Ci/g bezogen worden. Die Herstellung markierter Lösungen bestimmter Zn-Konzentrationen erfolgte durch Zugabe von inaktivem ZnCl<sub>2</sub> zu Aliquoten dieser Lösung. Die Messung erfolgte am  $\gamma$ -Szintillationszähler im Bereich 1070—1150 keV. Zumindest wurden an jeder Probe mindestens 10 000 Impulse gezählt.

\* Durchgeführt von Dr. J. Zak (C, H, N, S) und Herrn H. Krausz (P).

<sup>10</sup> M. Merckenschläger, K. Schlossmann und W. Kurz, *Biochem. Z.* **329**, 332 (1957).

<sup>11</sup> D. H. Northcote, K. J. Goulding und R. W. Horne, *Biochem. J.* **70**, 391 (1958).

<sup>12</sup> C. Tanford, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 211 (1952).

### *Aufnahme der Adsorptionsisotherme*

Die bei Zimmertemp. von den Zellwänden in Abhängigkeit von der Zn-Konzentration der umgebenden Lösung gebundene Zn-Menge wurde durch Gleichgewichtsdialyse bestimmt, und auf diese Weise eine Adsorptionsisotherme erhalten. Suspensionen von 6 mg/ml Zellwand wurden gegen je 10 ml markierte  $\text{ZnCl}_2$ -Lösungen der Konzentration  $10^{-6}$  —  $5 \cdot 10^{-2}$  Mol/l dialysiert. Die Suspensionen und die Lösungen enthielten  $5 \cdot 10^{-2}m$ -Acetatpuffer (pH 6). Die Suspensionen waren in kleinen Dialysiersäckchen aus Cellulose (Volumen 1 ml) enthalten, die sich in den mit den Zn-Lösungen gefüllten Röhrchen (Volumen 10 ml) befanden. Das Gleichgewicht wurde, wie besondere Versuche<sup>9</sup> zeigten, in 48 Stdn. erreicht. Sodann wurde die Dialyse abgebrochen, und die Zn-Konzentrationen in der Suspension und im Außenraum durch Strahlenmessung ermittelt. Die jeweils durch die Zellwände gebundene Zn-Menge ergab sich aus der Differenz der beiden Meßwerte.

### *Konkurrenzversuche*

Auch die Konkurrenzversuche wurden durch Gleichgewichtsdialyse in Acetatpuffer ausgeführt. Als Konkurrenten wurden Ca, Co, Ni, Cu, Cd und inaktives Zn in Form ihrer Chloride eingesetzt. Um möglichst große Differenzen zwischen dem Zn-Gehalt des Außenraumes und des Säckchens zu erhalten, wurden konzentriertere Zellwandsuspensionen (12,6 mg/ml) und ein Überschuß von Fremdionen angewendet; die Außenlösung enthielt zu Versuchsbeginn  $10^{-5}$  Mol/l markiertes Zn und  $10^{-3}$  Mol/l an Fremdion. Im übrigen war die Versuchsführung die gleiche wie bei der Bestimmung der Adsorptionsisotherme.

## Ergebnisse

### a) pH-Titration

Abb. 1 gibt das Ergebnis von pH-Titrationen. Ausgehend vom pH-Wert 10 wird Kurve  $T_1$  erhalten. Rücktitration gibt Kurve  $T_2$ , die sich bei abermaliger Rücktitration nicht mehr ändert.  $T_2$  wird auch erhalten, wenn von vornherein im sauren Bereich begonnen wird. Aus dem Verlauf von  $T_1$  kann abgeschätzt werden, daß je Gramm Zellwand etwa  $2,4 \cdot 10^{-4}$  Mol an Gruppen mit pK-Werten im Bereich 3,5—5, etwa  $6 \cdot 10^{-4}$  Mol im Bereich 5—8, und mindestens  $2 \cdot 10^{-4}$  im Bereich oberhalb 8 vorliegen.

### b) *Adsorptionsisotherme*

Zur Berechnung der gebundenen Zn-Menge ( $x/m$ ) (Mol/g Zellwand) als Funktion der Konzentration der umgebenden Lösung an freien Zn-Ionen  $c$  (Mol/l) mußte für Komplexierung durch den Puffer ( $K_1$  für Zn-Acetat = 11 l/Mol)<sup>13</sup> korrigiert werden. Stellt man ( $x/m$ ) gegen  $c$

<sup>13</sup> L. G. Sillén und A. E. Martell, Stability Constants of Metal-Ion Complexes, London 1964.

doppeltlogarithmisch dar, so erhält man eine Kurve, die anscheinend bei  $> 10^{-2}$  Mol/l in einen Sättigungsbereich mündet (Abb. 2).

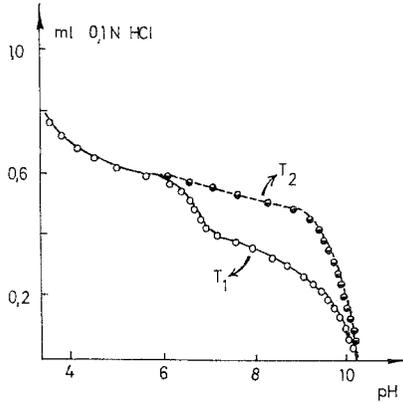


Abb. 1. pH-Titration der Zellwände von Chlorella

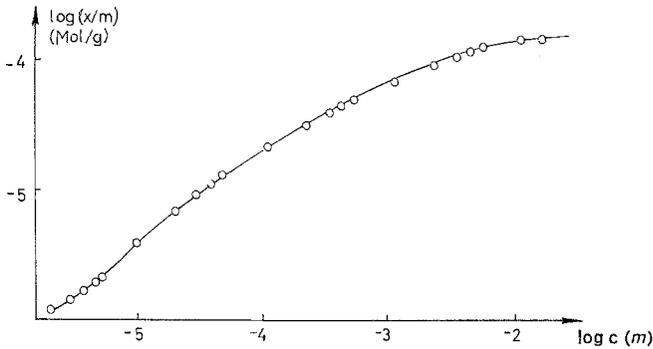


Abb. 2. Adsorptionsisotherme des markierten Zinks an den Zellwänden

Falls in den Zellwänden ( $Z$ ) nur *eine* Art zur Zn-Bindung befähigter Gruppen vorhanden ist, kann das Gleichgewicht  $Zn + Z \rightleftharpoons Zn-Z$  durch eine *Langmuir*-Isotherme

$$(x/m) = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot c}{1 + k_1 \cdot c} \tag{1}$$

beschrieben werden.  $k_1$  und  $k_2$  haben die Dimensionen l/Mol bzw. Mol/g. Der Wert von  $k_2$  kann mit  $c \rightarrow \infty$  aus (1) erhalten werden:

$$\lim (x/m) = k_2. \tag{2}$$

$k_2$  ist also im vorliegenden Fall die Kapazität der Zellwände für Zink.

Da nun  $(x/m)$  die Konzentration der mit Zn verbundenen Gruppen in einer Suspension von 1 g Zellwand im Liter und  $(k_2 - [x/m])$  die Konzentration der freien, zur Bindung befähigten Gruppen in der gleichen Suspension ist, so gilt für das Adsorptionsgleichgewicht:

$$K = \frac{[\text{Zn-Z}]}{[\text{Zn}] [Z]} = \frac{x/m}{c \cdot (k_2 - [x/m])} \quad (3)$$

(3) und (1) sind identisch, falls  $k_1$  gleich  $K$  gesetzt wird.  $k_1$  ist also eine Gleichgewichtskonstante, d. h. ein Maß der Affinität.

Zur Bestimmung von  $k_1$  und  $k_2$  wird (1) in die Form

$$(x/m) = - \frac{1}{k_1} \frac{(x/m)}{c} + k_2 \quad (4)$$

gebracht und  $(x/m)$  gegen  $(x/m)/c$  graphisch aufgetragen. Aus der Steigung der Geraden wird die Affinität  $k_1$  ermittelt, aus dem Ordinatenabschnitt die Kapazität  $k_2$ .

Für den Fall zweier Arten bindender Gruppen gilt: Sind  $k_2'$  Gruppen der Art A mit hoher Affinität  $k_1'$  zu Zink und  $k_2''$  Gruppen der Art B mit niedriger Affinität  $k_1''$  vorhanden, so setzt sich ein gemessener Gesamtwert  $(x/m)$  zusammen:

$$(x/m) = (x/m)' + (x/m)'' \quad (5)$$

Hierbei ist  $(x/m)'$  die an A,  $(x/m)''$  die an B gebundene Zink-Menge. Da im Bereich niedrigster Zn-Konzentrationen praktisch nur Besetzung von Stellen A mit Zn erwartet werden darf, können  $k_1'$  und  $k_2'$  aus der Darstellung von  $(x/m)$  gegen  $(x/m)/c$  im Bereich kleinster  $c$ -Werte und damit auch kleinster  $(x/m)$ -Werte nach (4) ermittelt werden. Bei höheren Zn-Konzentrationen ergibt sich somit nach (1) und (5):

$$(x/m)'' = (x/m) - (k_1' \cdot k_2' \cdot c / (1 + k_1' \cdot c)) \quad (6)$$

Aus den für eine Reihe von  $c$ -Werten berechneten  $(x/m)''$ -Werten können schließlich — nach (4) —  $k_1''$  und  $k_2''$  berechnet werden.

Da die Zellwand mehrere Arten kationenbindender Gruppen enthält, ist eine solche Bindung des Zn an zwei oder mehr Arten von Gruppen nicht auszuschließen. Tatsächlich legt das Experiment die Existenz zweier Arten von Zn-bindenden Gruppen nahe. Die Werte von  $(x/m)$  (Abb. 3) entsprechen nämlich ungefähr der eben gegebenen Darstellung. Im Bereich niedrigster Zn-Konzentrationen gilt die Gerade (A) entsprechend der Bindung des Zn an die Gruppen A mit  $k_1' = 1,2 \cdot 10^5$  l/Mol und  $k_2' = 5,5 \cdot 10^{-6}$  Mol/g. Dann gilt für beliebige Konzentrationen:

$$(x/m)' = \frac{6,6 \cdot 10^{-1} \cdot c}{1 + 1,2 \cdot 10^5 \cdot c} \quad (7)$$

Schließlich werden nach dem gegebenen Verfahren  $k_1''$  und  $k_2''$  zu  $10^3$  l/Mol bzw.  $1,25 \cdot 10^{-4}$  Mol/g ermittelt.

Bei Erhöhung der Zn-Konzentrationen — im Bereich von  $10^{-5}$  Mol/l — tritt demnach offenbar eine Änderung in der vorherrschenden Art der Zn-Bindung ein. Innerhalb der Bereiche A und B ist hingegen laut Abb. 3 die Abweichung der Meßpunkte von den Geraden (und daher auch

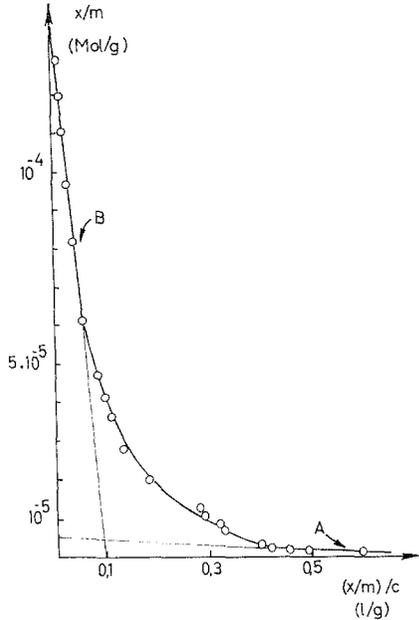


Abb. 3. Die beiden Komponenten der Zinkaufnahme

der Unterschied der Einzelwerte von  $k_1$ ) klein. Daher wäre angesichts der Einfachheit der gemachten Annahmen und der Größe der Meßfehler eine Aufspaltung in mehr als zwei Arten von Gruppen mit unterschiedlichen Affinitäten zu Zn zunächst nicht gerechtfertigt.

c) Konkurrenz

Die Ergebnisse einer Serie von Konkurrenzversuchen gibt Tab. 1. Die Größe  $M$  ist ein inverses Maß der Konkurrenz. Setzt man den Wert von  $1/M$  für Zn gleich 1, so erhält man für die „Konkurrenzkraft“ die Reihe

Zn	Cu	Cd	Ni	Co	Ca
1,00	> 0,66	> 0,56	> 0,46	> 0,43	> 0,36

Da die Konzentration an freien Zn-Ionen bei  $5 \cdot 10^{-6}$  Mol/l liegt, so berechnet man unter Verwendung der in b) erhaltenen Konstanten ( $k$ ),

daß es sich vorwiegend (zu etwa 85%) um eine Konkurrenz um die Stellen A handelt.

Tabelle 1. Zink-Bindung der Zellwände in Gegenwart  
zweiwertiger Konkurrenten

Konkurrent (unmarkiert)	Zählraten Imp./ml · Min.		Differenz (M)
	Innenraum	Außenraum	
Zn	28 000	16 900	11 100
Cu	33 100	16 300	16 800
Cd	35 700	16 000	19 700
Ni	39 700	15 700	24 000
Co	41 500	15 500	26 000
Ca	46 000	15 000	31 000

Die Stabilitätskonstante für die Bindung ist also im Falle des Zn am größten. Affinitätskonstanten  $k_1^*$  lassen sich für die Konkurrenten durch Verwendung der Gleichung<sup>14</sup>

$$(x/m)_A = \frac{k'_1 \cdot k'_2 \cdot c}{1 + k'_1 c \cdot k_1^* \cdot c^*} \quad (8)$$

ermitteln. Zu diesem Zweck werden die auf das markierte Zn bezüglichen Werte von  $c$  aus der gemessenen Aktivität der Lösung und die ebenfalls für Zn gültigen Werte von  $x/m$  durch (5) und (7) abgeschätzt.  $c^*$  wird nach

$$c^* = c_0^* - a^* - b^* \quad (9)$$

erhalten. Darin ist  $c_0^*$  die sich aus der zugefügten Menge ergebende Konzentration an Konkurrent,  $a^*$  der Konzentrationsverlust durch Bindung an Zellwand, der aber wegen der hohen Konzentration des Konkurrenten im Vergleich zu  $c_0^*$  wenig ins Gewicht fällt. Der Verlust durch Komplexierung ( $b^*$ ) wurde mit den tabellierten Werten der Stabilitätskonstanten für Acetatkomplexe ( $S$ )<sup>13</sup> berechnet. Die so ermittelten Werte von  $c^*$  und  $k_1^*$  sind der Tab. 2 zu entnehmen. Die Werte für  $k_1^*$  sind mit dem  $k_1'$ -Wert für Zn ( $1,2 \cdot 10^5$ ) zu vergleichen.

### Diskussion

Nach Northcote<sup>11, 15</sup> besteht die Zellwand von *Chlorella pyrenoidosa* (Dicke 210 Å) aus einem Netzwerk von Mikrofibrillen, die in eine „kon-

<sup>14</sup> Siehe T. R. Hughes und I. R. Klotz, *Methods of Biochemical Analysis* (D. Glick, Ed.), Bd. 3 (1966).

<sup>15</sup> D. H. Northcote, in: *The Structure and Function of the Membranes and Surfaces of Cells*, Biochem. Soc. Symp. No. 22 (1958).

tinuierliche Matrix“ eingelagert sind. Die Mikrofibrillen bestehen aus  $\alpha$ -Zellulose (15% der Zellwand), die Matrix hauptsächlich aus Hemicellulosen (31%) und aus Material, das aus Aminosäuren zusammengesetzt ist und als Protein betrachtet wurde (27%), und möglicherweise teilweise als Glykoprotein vorliegt. (Auch in den Zellwänden anderer Algen wurde Protein festgestellt<sup>16</sup>.) Außerdem wurden Lipide (9%) gefunden; die Art ihrer Assoziation mit der Zellwand ist unbekannt.

Tabelle 2. Affinitäten der Konkurrenten zu Zellwand (Stellen A)

Konkur- rent	$c$ (Mol/l) ( $\cdot 10^6$ )	$x/m$ (Mol/g) (gemessen) ( $\cdot 10^7$ )	$(x/m)_A$ (Mol/g) [aus (5)] ( $\cdot 10^7$ )	$\log S$ (l/Mol)	$c^*$ (Mol/l) ( $\cdot 10^4$ )	$k_1^*$ (l/Mol) ( $\cdot 10^{-3}$ )
Cu	5,5	6,75	5,7	1,80	2,1	23
Cd	5,4	7,95	6,7	1,50	3,4	11
Ni	5,3	9,7	8,2	1,00	5,8	4,6
Co	5,24	10,3	8,7	1,52	3,3	7,2
Ca	5,0	13,0	10,5	0,53	7,45	2,1

Untersuchungen mit schärfer gereinigten Zellwänden von mikroskopischen Algen haben zu der Ansicht geführt<sup>17</sup>, daß die Aminosäuren in Form von Polypeptiden vorliegen, und zwar wurde in *C. pyrenoidosa* nur Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Glykokoll, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Prolin, Phenylalanin und Tyrosin gefunden. Weitere Aminogruppen waren in Glucosamin enthalten. In Übereinstimmung mit unserem analytischen Resultat wurden keine schwefelhaltigen Aminosäuren aufgefunden. Bemerkenswert ist auch die Abwesenheit von Histidin, das für die feste Bindung von Ionen von Zink, Kupfer und anderen Übergangselementen durch Proteine, etwa Serumalbumin<sup>12, 18-20</sup> verantwortlich gemacht wird.

Die in der vorliegenden Arbeit bei der pH-Titration gefundenen, im Bereich 3,5—5 dissoziierenden Gruppen ( $2,4 \cdot 10^{-4}$  Mol/g) sind gewiß Carboxylgruppen und dürften vorwiegend den Peptiden der Zellwand angehören. Phosphatgruppen in Diesterbindung haben  $pK$ -Werte um 1,3<sup>21</sup> und werden daher nicht mehr erfaßt. Im Bereich 5—8 werden

<sup>16</sup> E. W. Thompson und R. D. Preston, *Nature* **213**, 684 (1967).

<sup>17</sup> T. Punnett und E. C. Derrenbacker, *J. Gen. Microbiol.* **44**, 105 (1966).

<sup>18</sup> F. R. N. Gurd und D. S. Goodman, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 670 (1952).

<sup>19</sup> C. Tanford, *Adv. Protein Chem.* **17**, 69 (1962).

<sup>20</sup> R. A. Bradshaw, W. T. Shearer und F. R. N. Gurd, *J. Biol. Chem.* **243**, 3817 (1968).

<sup>21</sup> A. L. Olins und R. C. Warner, *J. Biol. Chem.* **242**, 4994 (1967).

$\alpha$ -Aminogruppen von Peptiden und von Aminozuckern<sup>21</sup> sowie sekundäre Phosphatgruppen aus Lipoiden (in Phosphatidsäuren) titriert ( $6 \cdot 10^{-4}$  Mol/g). Bei den oberhalb pH = 8 titrierten Gruppen, die hier nur teilweise erfaßt wurden, könnte es sich u. a. um phenolische OH-Gruppen handeln ( $> 2 \cdot 10^{-4}$  Mol/g).

Die Anwendbarkeit einer (aus zwei Komponenten zusammengesetzten) *Langmuir*-Isotherme auf die Ergebnisse der Gleichgewichtsdialyse an Zellwand weist darauf hin, daß jedes Zn-Ion bloß durch *eine* (einwertige oder zweiwertige) Haftstelle des Adsorbens gebunden wird. Dies ergibt sich besonders deutlich aus der Form der Gl. (3). Die Zerlegbarkeit der Isotherme in zwei Komponenten läßt auf eine Bindung an zwei unterschiedlichen Arten von Haftstellen schließen.

Während Salze der Carbonsäuren Ionen von Übergangselementen nur wenig fest binden, wie z. B. durch die geringen Stabilitätskonstanten der Komplexe des Acetats veranschaulicht wird<sup>13</sup>, binden die Anionen des Phosphors diese Ionen ziemlich fest. Die nach verschiedenen Verfahren an den Anionen des fünfwertigen Phosphors erhaltenen Stabilitätskonstanten sind allerdings (auch für ein und dasselbe System) sehr unterschiedlich<sup>13</sup>. Sie liegen im Bereich  $10^3$  bis  $10^{10}$ . Komplexierung von Zink durch Phosphatgruppen in Naturstoffen ist öfters festgestellt worden.

Die hier von uns bestimmten Werte der Affinitäten für Zn,  $k_1'$  und  $k_1''$  ( $1,2 \cdot 10^5$  bzw.  $\cdot 10^3$ ), liegen in dem genannten Bereich oder doch an seiner Grenze. Die Kapazität der Zellwand für die Bindung an Phosphat kann unter der Annahme, daß jedes analytisch gefundene Phosphoratom eine Haftstelle ergibt, zu  $2,7 \cdot 10^{-4}$  Mol/g abgeschätzt werden. Dieser Wert ist kleiner als die Kapazität, die aus der Gesamtzahl der im pH-Bereich 5—8 dissoziierenden Gruppen errechnet wird ( $6 \cdot 10^{-4}$ ), aber größer als die radiochemisch gefundene Kapazität der zahlreicheren Gruppen, also der Gruppen B ( $k_2'' = 1,25 \cdot 10^{-4}$ ). Dies könnte so gedeutet werden, daß etwas weniger als die Hälfte der bei pH 5—8 dissoziierenden Gruppen sekundäre Phosphatgruppen sind, daß aber nicht der gesamte analytisch festgestellte Phosphor Gruppen ergibt, die unter den Bedingungen der Adsorptionsversuche reaktionsfähig sind.

Die Kapazität der Gruppen A ( $k_2' = 5,5 \cdot 10^{-6}$ ) liegt sogar um zwei Größenordnungen niedriger als dem gesamten Phosphorgehalt entspricht. Auskunft über ihre Natur kann von den Konkurrenzversuchen erhofft werden. Das auffälligste Merkmal der Affinitätsreihe für die Gruppen A ist die Überlegenheit des Zn im Vergleich zum Cu, die z. B. nicht bei stickstoffhaltigen organischen Liganden<sup>22, 23</sup>, wohl aber bei phosphor-

<sup>22</sup> R. J. P. Williams, Biol. Rev. Camb. Phil. Soc. **28**, 381 (1953).

<sup>23</sup> A. E. Dennard und R. J. P. Williams, in: R. L. Carlin (Hrsg.), Transition Metal Chem., Bd. 2, New York 1966.

haltigen Liganden<sup>24, 25</sup> beobachtet wird. Es wäre also möglich, daß ein kleiner Teil des Phosphors in besonders aktiver chemischer Form vorliegt.

Wir danken dem Bundesministerium für Verkehr und Verstaatlichte Unternehmungen der Republik Österreich für finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Forschungsauftrages „Anreicherung von Spurenelementen in Pflanzenzellen“ an *E. B.*

---

<sup>24</sup> *J. J. Butzow* und *G. L. Eichhorn*, *Biopolymers* **3**, 95 (1965).

<sup>25</sup> *Y. A. Shin* und *G. L. Eichhorn*, *Biochem.* **7**, 1026 (1968).