

DAS KALORISCHE ÄQUIVALENT DES ATP-UMSATZES IM AEROBEN UND ANOXISCHEN METABOLISMUS.

E. GNAIGER

Institut für Zoophysiology, Universität Innsbruck,  
A-6020 Innsbruck, Austria

ABSTRACT

THE CALORIC EQUIVALENT OF ATP-TURNOVER OF AEROBIC AND ANOXIC METABOLISM.

The turnover rate of ATP is one of the most general bioenergetic quantities independent of the type of metabolism (aerobic or fermentative) and of the coupling efficiency ( $P/2e^-$  ratio etc.). It links the various processes of catabolism and anabolism as an expression of the "biochemical speed of rotation". Similarly, the rate of heat production is considered an unspecific measure of metabolic rate applicable under aerobic and anoxic conditions. The interpretation of biocalorimetric data in terms of ATP-turnover, however, requires a detailed thermochemical analysis of the biochemical pathways, i.e. of their stoichiometries and reaction enthalpies under physiological conditions, and of the molar ATP equivalent of any particular pathway. Such analyses are presented for aerobic and fermentative catabolism characteristic of organisms ranging from bacteria to higher animals including man.

The caloric equivalent of dissipative ATP-turnover under non-growing conditions,  $C_{\infty\text{ATP}}^d$  varies from 76 to 83  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ATP in aerobic metabolism, assuming a P/O-ratio of 3. In contrast to the uniform catabolic pathway in aerobic organisms a variety of fermentative reactions exists which differ with respect to reaction enthalpy and efficiency of phosphorylation. Under anoxia the caloric equivalent of ATP turnover is reduced under most conditions relative to the aerobic  $C_{\infty\text{ATP}}^d$ . This reduction amounts to up to 30% in lactate and ethanol fermentation of glucose and from 30 to 50% in propionate and acetate fermentation. Hence anoxic rates of heat

production may be significantly less than the aerobic rate without a corresponding reduction of metabolic rate expressed as ATP-turnover. Direct comparison of rates of heat production observed under different physiological conditions may lead to erroneous conclusions regarding the metabolic activity of organisms.

Organisms growing aerobically on glucose may theoretically conserve up to, but rather less than 25% of the catabolic reaction enthalpy in net biosynthesis. Uncertainties of energy balance calculations, however, stem primarily from the variability of physiological "side reactions", such as enthalpies of neutralization and complexation. Their significance in the estimation of caloric efficiencies of metabolism is discussed on the basis of the present state of biological thermochemistry. An experimental example with aquatic invertebrates illustrates the unique potential of the direct calorimetric method in quantitative bioenergetics, while it also points to some specific problems associated with the biochemical interpretation of thermometric measurements.

#### DIREKTE KALORIMETRIE UND ATP-UMSATZ.

Die direkte Kalorimetrie ermöglicht die Quantifizierung der metabolischen Aktivität von Organismen unabhängig von den spezifischen Prozessen der Energietransformation. Die vom Organismus mit der Umgebung ausgetauschte Wärme stellt ein meist ungenütztes Begleitprodukt des Stoffwechsels dar, dessen Produktion jedoch gesetzmäßig mit den physiologischen, lebensbestimmenden Reaktionen der Zelle verknüpft ist. Die biologisch sinnvolle Interpretation direkt kalorimetrischer Daten verlangt deshalb eine thermodynamische Analyse der biochemischen Reaktionen des Energiestoffwechsels. Der Auflösungsgrad oder umgekehrt das Unbestimmtheitsniveau dieser Analyse begrenzt den Informationswert kalorimetrischer Ergebnisse.

Der in Abbildung 1 dargestellte Verlauf der Wärmeproduktion von aquatischen Evertebraten im Hungerstoffwechsel wird durch drei physiologisch unterscheidbare Situationen bestimmt: (I) konstante Wärmeproduktion unter anoxischen Bedingungen, (II) konstante Wärmeproduktion unter aeroben Bedingungen, (I-II) transitorisch erhöhte Wärmeproduktionsrate (overshoot) beim Übergang von anoxischen zu aeroben Verhältnissen. In diesem Versuch zeigt sich sowohl der besondere Vorteil der direkten Kalorimetrie als der einzigen Methode,

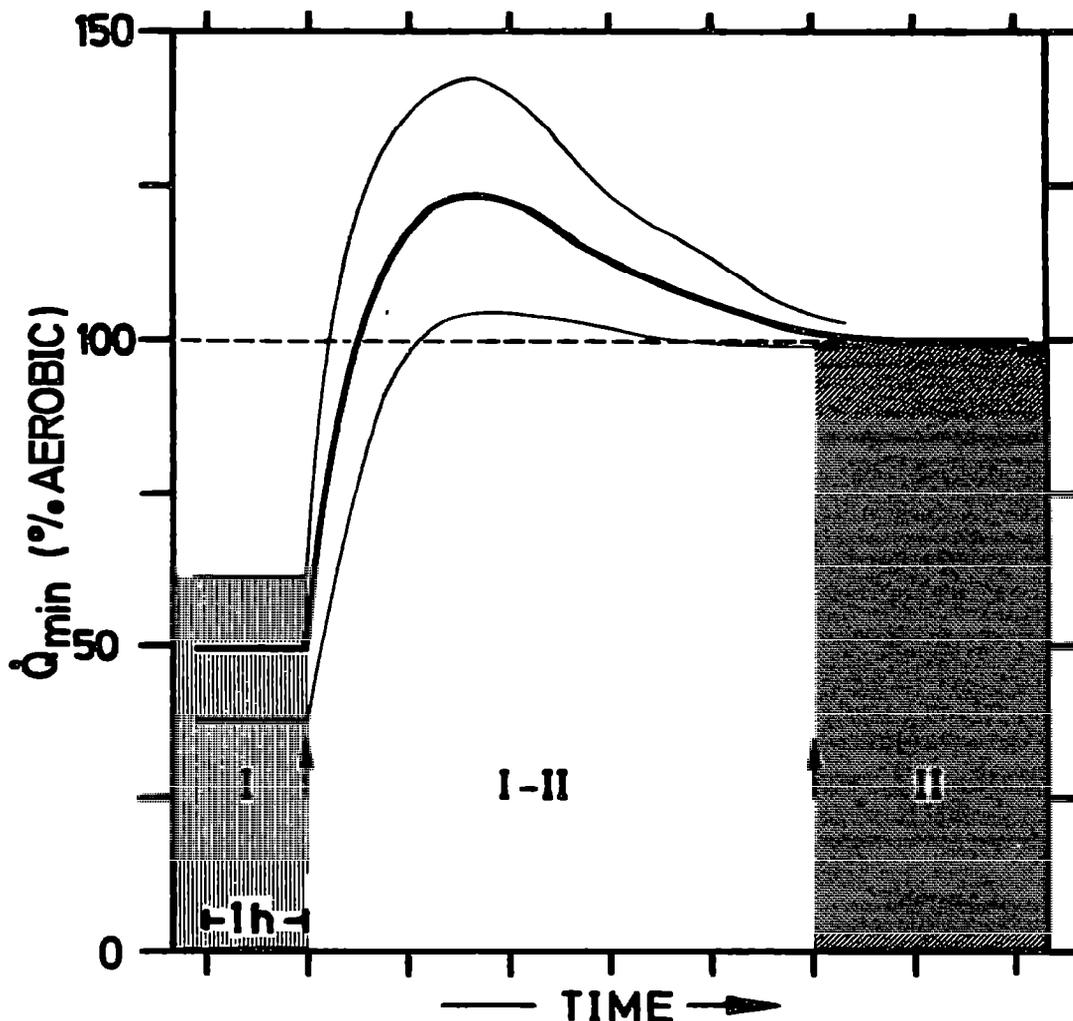


Fig. 1. Heat production of *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) in fresh water measured in a LKB-2107 flow sorption microcalorimeter. The mean  $\pm$  standard deviation of the mean is given for 5 experiments at 12°C.  $\dot{Q}_{\min}$  is the minimal rate of heat production disregarding periodical or irregular peaks of activity; 100% is equivalent to  $-0.4 \text{ mW}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight  $\pm 0.1$  S.D. For methodological details see Gnaiger (19). I: anoxic steady state rate of heat production, II: aerobic steady state rate, I-II: overshoot during anoxic-aerobic transition.

If the rates of heat production in these different physiological situations are to be interpreted in terms of metabolic rate (ATP-turnover), appropriate correction factors have to be applied, as the caloric equivalent of ATP-turnover may be significantly different under varied conditions.

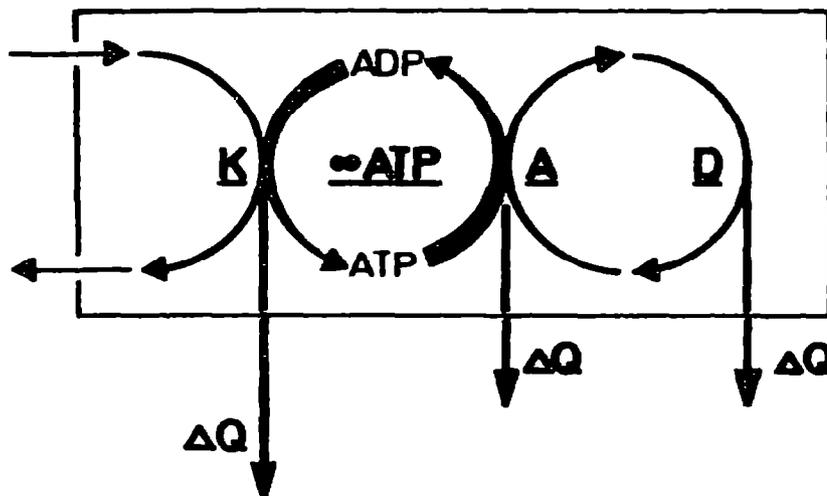
welche ein derart komplexes und variables Stoffwechselgeschehen kontinuierlich aufzulösen vermag, wie sich auch die Problematik der Interpretation der Wärmeproduktion im Sinne einer "physiologischen Aktivität" exemplarisch verdeutlichen läßt.

Die allgemeine Grundlage des bioenergetischen Stoffwechsels besteht in der Ausbeutung physiko-chemischer Potentiale zur intermediären Bildung eines einheitlichen Energieträgers, Adenosintriphosphat (ATP). Der ATP-Umsatz stellt die zentrale bioenergetische Größe dar, die zwischen den vielfältigen Prozessen des Katabolismus und des Anabolismus als ein Maß der "biochemischen Drehzahl" vermittelt (Abb.2). Die Rate des ATP-Umsatzes ist hier definiert als die Geschwindigkeit, mit der ATP zu ADP (Adenosindiphosphat) irreversibel dephosphoryliert und wieder regeneriert wird.

Die verschiedenen Nukleotidtriphosphate werden als thermodynamisch identisch behandelt (38). Auf die Möglichkeit direkter Kopplung einzelner kataboler und anaboler Reaktionen (3) sowie auf die Bedeutung des nicht durch ATP vermittelten Ionentransportes (34) sei hier nur verwiesen, ohne daß näher darauf eingegangen wird.

Die zentrale Rolle des ATP-Umsatzes wird deutlich, wenn die gekoppelten Reaktionen des Energie- und Stoffumsatzes als eine Reihe ineinander verzahnter Halbzyklen klassifiziert werden (Abb.2). In nicht wachsenden biologischen Systemen wird der Halbzyklus des Anabolismus symmetrisch durch den "dissipativen Zyklus" ergänzt und geschlossen, nur wenn gleichzeitig keine Arbeit nach außen verrichtet wird. Der ATP-Umsatz entspricht dann einem rein "dissipativen Stoffwechsel" (Erhaltungsstoffwechsel im weitesten Sinn, Situation I und II in Abb.1). Bei Nettoleistungen der Biosynthese (Wachstum, Differenzierung, Reorganisation) ist der dissipative Zyklus jedoch nicht geschlossen (im gegebenen Beispiel in der transitorischen Situation I-II, Abb.1, wenn anoxische Endprodukte zu Glykogen resynthetisiert werden).

In Analogie zur Unspezifität der Wärmeproduktionsmessung drückt der ATP-Umsatz die metabolische Aktivität unabhängig von den jeweiligen Stoffwechselvorgängen aus, über welche die verschiedenen Energiequellen geleitet und physiologisch nutzbar gemacht werden. Ist jedoch auch das Verhältnis von Wärmeaustausch und ATP-Umsatz invariant gegenüber qualitativen Veränderungen des Stoffwechselgeschehens? Nur die Konstanz dieser kalorimetrisch-biochemischen Relation würde die Wärmeproduktion als ein allgemeines Maß für den



**Fig. 2.** ATP-turnover as the basic parameter of the metabolic rate, linking catabolic and anabolic reactions (half cycles K and A). If the ATP-cycle (ATP-turnover) and the dissipative cycle (D, protein-turnover etc.) are closed, the three sites of heat production add up to the total enthalpy of reaction in the catabolic half cycle,  $\Delta H_k(\rho)$ . Hence the caloric equivalent in the dissipative metabolism,  $C_{\infty \text{ATP}}^d$  is a simple function of  $\Delta H_k(\rho)$  and the ATP coupling coefficient,  $v_{\text{ATP}}(\rho)$  (see equ.1).

quantitativen Vergleich der Stoffwechselrate von Organismen auszeichnen - die ausgetauschte Wärme selbst ist ja als ein "Abfallprodukt" zunächst physiologisch irrelevant.

Die stöchiometrischen Beziehungen des Katabolismus definieren (unter Annahme konstanter Koppelung von Phosphorylierung und Elektronentransport,  $P/2e^-$ )<sup>1</sup> den stöchiometrischen ATP-Koeffizienten,  $v_{\text{ATP}}(\rho)$ <sup>2</sup> einer Stoffwechsel-Bilanzgleichung  $\rho$ , die sich aus der Reaktion oder Reaktionsfolge  $k(\rho)$  des katabolen Halbzyklus (Abb.2) und den damit gekoppelten Phosphorylierungsreaktionen zusammen-

<sup>1</sup>Auf die mögliche Variabilität des  $P/2e^-$ -Verhältnisses (7) und auf die Problematik der P/O-Bestimmung (25, 50) soll hier wiederum nur verwiesen werden.

setzt. Für das kalorische Äquivalent des dissipativen ATP-Umsatzes,  $C_{\infty\text{ATP}}^d$  (in kJ pro Mol  $\infty\text{ATP}$ )<sup>3</sup> gilt dann

$$C_{\infty\text{ATP}}^d = \frac{\Delta H_k(\rho)}{v_{\text{ATP}}(\rho)} \quad (1)$$

$\Delta H_k(\rho)$  ist die Enthalpieänderung einer Reaktion des (entkoppelten) katabolen Halbzyklus,  $k(\rho)$ . Wenn alle stöchiometrischen Koeffizienten,  $v_i(\rho)$  der katabolen Reaktion  $k(\rho)$  auf 1 Mol  $\infty\text{ATP}$  normiert werden, resultiert eine auf den ATP-Umsatz bezogene Reaktionsgleichung mit den stöchiometrischen Koeffizienten,  $v_{i/\text{ATP}}$ . Damit vereinfacht sich Gleichung (1) zur gleichbedeutenden Definition des kalorischen Äquivalents des dissipativen ATP-Umsatzes

$$C_{\infty\text{ATP}}^d = \Delta H_k(\infty\text{ATP}) \quad (1')$$

Sämtliche intermediär gespeicherte Energie geht im dissipativen Stoffwechsel irreversibel verloren, sodaß die katabole Reaktionsenthalpie gleich der theoretisch zu erwartenden Wärmeproduktion ist.

#### $v_{\text{ATP}}(\rho)$ UND STÖCHIOMETRISCHE BILANZGLEICHUNGEN DES STOFFWECHSELS

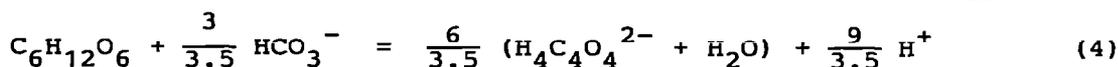
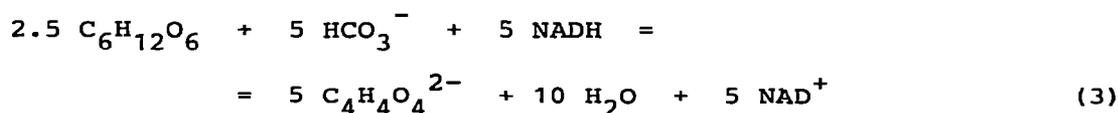
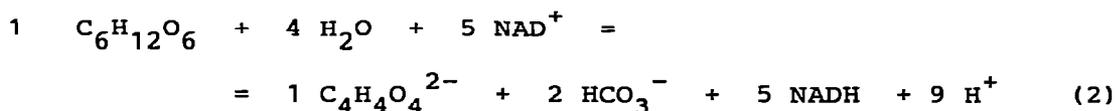
Die Berechnungen der Enthalpieänderungen eines Stoffwechselweges basieren auf der stöchiometrischen Beziehung zwischen Substrat(en) und Endprodukt(en), in welcher das Redox-(NAD/NADH-)Gleichgewicht erhalten bleibt (17). Die Stoffwechselbilanzgleichung selbst entspricht keinem physiologischen Reaktionsmechanismus, sondern faßt die biochemische Reaktionsabfolge in einer der thermodynamischen

<sup>2</sup> Reaktionsgleichungen werden meist auf 1 Mol Substrat (s) oder 1 Mol Produkt (p) bezogen, weshalb sich die Unterscheidung  $v_{\text{ATP}/s}$  und  $v_{\text{ATP}/p}$  als praktisch erweist, die den stöchiometrischen ATP-Koeffizienten in einer Bilanzgleichung pro Mol Substrat bzw. pro Mol Produkt symbolisieren. Entsprechendes gilt für die substrat- bzw. produktbezogenen katabolen Reaktionsenthalpien,  $\Delta H_k(s)$  und  $\Delta H_k(p)$  etc.

<sup>3</sup>  $\infty\text{ATP}$  symbolisiert ein den ATP-Zyklus (Abb.2) durchlaufendes Adenosintriphosphat, z.B. für die ATP-Umsatzrate,  $n_{\infty\text{ATP}}/t$  (in Mol  $\infty\text{ATP}$  pro Zeit). Dadurch soll eine Verwechslung mit der ATP-Bildungsrate,  $dn_{\text{ATP}}/dt$  (in Mol ATP pro Zeit) vermieden werden.

Analyse einfach zugänglichen Form zusammen. Der durch eine Kette von enzymatisch katalysierten Einzelreaktionen aktualisierte (und kompartimentierte) Stoffwechselweg interessiert dabei insofern, als er die chemische (und strukturelle) Maschinerie der ATP-Bildung darstellt, durch welche der stöchiometrische ATP-Koeffizient einer Bilanzgleichung bestimmt wird (Abb.3).

Die biochemische Literatur, auf welcher das Schema des anoxischen Stoffwechsels von Evertebraten und Vertebraten sowie vielen Mikroorganismen und Pflanzen basiert, wurde bereits ausführlich besprochen (17, 59). Dem stöchiometrisch einfachen, "linearen" Typus (53) der Laktat- und Äthanol-Gärung steht der komplexe, "verzweigte" Stoffwechsel der Succinat- und Propionat-Gärung gegenüber: Auf dem Niveau des Malats teilt sich der Stoffwechselweg in eine Vorwärts- und eine Rückwärtskomponente des Krebs-Zyklus, der sich im gemeinsamen End- oder Zwischenprodukt Succinat wieder schließt. Ausgehend von Glukose sind die beiden Richtungen im Verhältnis 1 (vorwärts) zu 5 (rückwärts, Fumarat  $\rightarrow$  Succinat) über das gemeinsame Intermediärprodukt NADH (2[H] in Abb.3) gekoppelt.



Im entsprechenden Verhältnis gehen die ATP-Bildungsstellen in die Bilanzgleichung ein (17). Aus  $v_{\text{ATP}}(2) = 3$  und  $v_{\text{ATP}}(3) = 5 \cdot 2$  ergibt sich für Reaktion (4)

$$v_{\text{ATP}/s} = \frac{13}{3.5} = 3.714 \quad (\text{Mol ATP/Mol Glukose})$$

In der Reaktionsgleichung wurden die Säuren in einer willkürlichen Dissoziationsform angeschrieben, wobei sich formell für den stöchiometrischen  $\text{H}^+$ -Koeffizienten (Gleichung 4) im katabolen

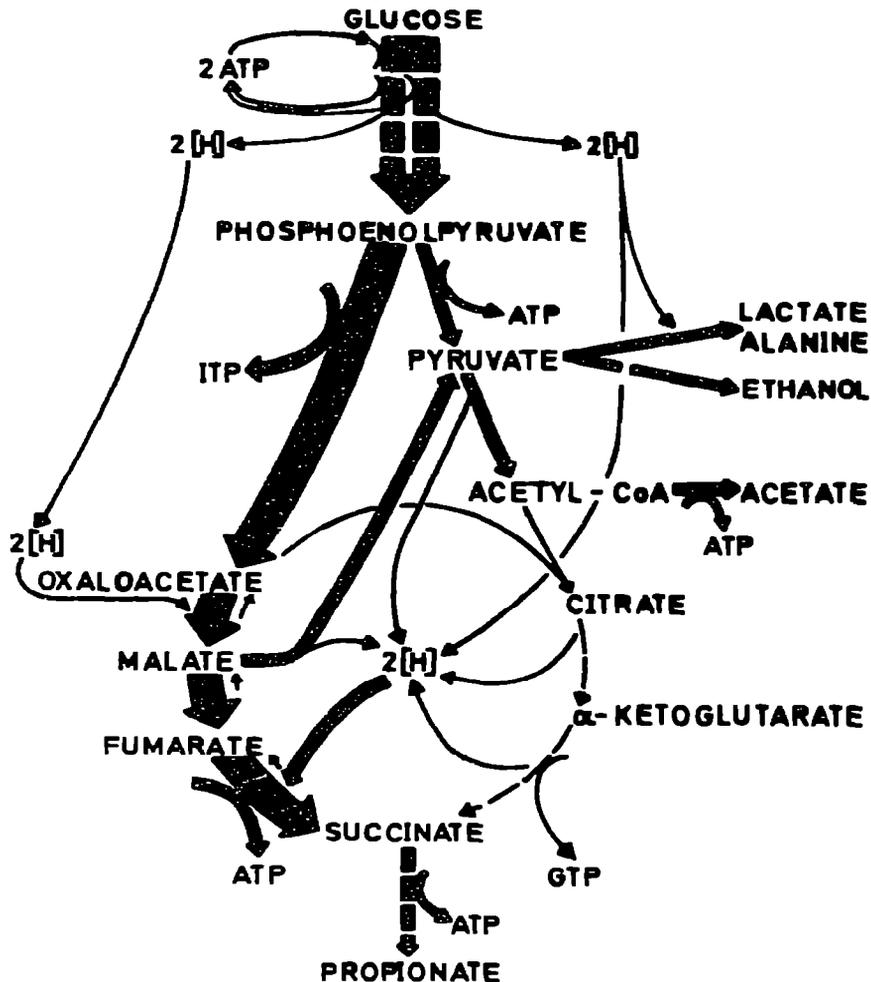
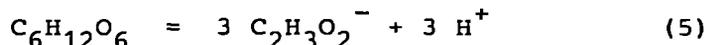


Fig. 3. Biochemical pathways in katabolism of glucose as interconnected by the common intermediate NADH ( $2 \text{ [H]}$ ). Anoxic end products are formed without disturbance of the redox (NADH/NAD<sup>-</sup>) balance via linear (lactate, alanine), branched (succinate, propionate) and coupled (acetate/succinate, acetate/propionate) pathways. In the aerobic electron transport chain NADH is reoxidized at the expense of oxygen, and the branched pathway is transformed into the cyclic one (citric acid cycle). After Gnaiger (17).

Halbzyklus  $v_{H^+}/_S(k) = \frac{9}{3.5} = 2.57$  ergibt; bei pH 7 und 25°C gilt jedoch für den pH-abhängigen  $H^+$ -Koeffizienten  $v_{H^+}'/_S(k) = 2.67$ .

Es ist zu beachten, daß die Säuredissoziationskonstanten von der Temperatur und Ionenstärke abhängig sind, wobei besonders die Dissoziationskonstante der Kohlensäure ins Gewicht fällt, die hier mit  $pK_a = 6.37$  (Handb.Chem.Phys. 1975) für reines Wasser eingesetzt ist.

Für die Acetat-Gärung läßt sich die einfache Reaktionsgleichung



formulieren, obwohl kein linearer Stoffwechselweg zum Acetat führt. Tatsächlich entspricht die durch das Anoxibioseschema (Abb.3) definierte Acetat-Gärung dem "gekoppelten" Stoffwechseltyp: Über das gemeinsame Intermediärprodukt NADH ist die Acetatbildung im Verhältnis 1:2 mit der Fumaratreduktion gekoppelt, woraus ein stöchiometrisches Verhältnis der Endprodukte,  $n_p$  (in Mol)

$$n_{\text{Acetat}} : (n_{\text{Succinat}} + n_{\text{Propionat}}) \leq 0.5 \quad (6)$$

folgt (17), welches durch zahlreiche biochemische Analysen belegt ist (16, 47, 52, 59, 26, 31, 56; Ausnahme: 60).

Während sich ein biochemisch flexibles System des gemischt-fermentativen Metabolismus entwickelt hat, indem unter anoxischen Verhältnissen lineare, verzweigte und gekoppelte Stoffwechselwege simultan ablaufen können, folgt der aerobe Katabolismus dem universellen "zyklischen" Stoffwechseltyp, da sämtliche Energiequellen in den Krebs-Zyklus eingeschleust und decarboxyliert werden (28). Diese Einheitlichkeit vereinfacht die thermodynamische Analyse, die in die bioenergetische Literatur besonders in der Diskussion des oxykalorischen Äquivalents,  $\Delta H_k(O_2)$  [kJ/Mol  $O_2$ ] eingegangen ist.

#### REAKTIONSENTHALPIEN DES KATABOLISMUS UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN.

Eine exakte biochemische Interpretation kalorimetrischer Untersuchungen des dissipativen Stoffwechsels basiert auf A) genauer Kenntnis der Stoffwechselwege, B) Verfügbarkeit physiologisch relevanter thermochemischer Daten über die Substrate und Endprodukte des Katabolismus und C) zuverlässiger Information über die Enthal-

pieänderung in Nebenreaktionen. Biochemische Reaktionen laufen in vivo annähernd isotherm und isobar in wässrigen Lösungen von hoher Verdünnung (meist millimolare Konzentrationen) der Reaktanten ab. Eine Ionenstärke von  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  kann als charakteristisch für physiologische Medien angesehen werden, die zudem vielfach im Neutralbereich pH-gepuffert sind. Informationen zur genauen Charakterisierung der chemischen Reaktionen im zellinternen Milieu sind oft nur ungenügend verfügbar. Organismen repräsentieren jedoch offene Systeme, die im kontinuierlichen Stoffaustausch mit ihrer Umwelt stehen und sich vielfach im stationären Zustand befinden. In dieser Situation reduziert sich das Problem auf die Zustandsbestimmungen der Reaktanten im Außenmedium, da die vom biologischen System im Fließgleichgewicht katalysierten Reaktionen ausschließlich Veränderungen im umgebenden System bewirken (9).

Die in Standardtabellen angeführten Bildungs- oder Verbrennungsenthalpien beziehen sich auf Standardzustände, die nicht für physiologische Bedingungen gelten. Enthalpieänderungen durch Lösung, Verdünnung, Dissoziation, Neutralisation und Komplexbildung müssen berücksichtigt werden (57, 12). Außerdem bedingt die Differenz zwischen bombenkalorimetrisch ermittelten Verbrennungswärmen einen hohen relativen Fehler in der Berechnung einzelner Reaktionsenthalpien, weshalb reaktionskalorimetrisch bestimmte Enthalpiewerte vorzugsweise heranzuziehen sind (51, 45).

### Die Hydrolyse von Glykogen

Der allgemein wichtigste Reservestoff für den fermentativen Stoffwechsel ist Glykogen (59), ein Polysaccharid der D-Glukose in  $\alpha$ -1,4 glukosidischer Bindung, wobei auf etwa 8 - 10 Glukose-Reste eine  $\alpha$ -1,6 Bindung kommt (28). Die Enthalpieänderungen der Hydrolyse sukzessiver Glukosid-Bindungen verhalten sich im Makromolekül rein additiv (36). Während jedoch die Hydrolyse der  $\alpha$ -1,4 Glukosid-Bindungen exotherm verläuft, ist die Spaltung der  $\alpha$ -1,6 Bindung bei etwa gleichem Absolutwert endotherm (Tab.1). So schwankt die Enthalpieänderung der Hydrolyse pro durchschnittlichem Glukose-Rest je nach Verzweigungsgrad des Makromoleküles bis zu 20%. Bezogen auf den fermentativen Abbau von Glykogen wirkt sich diese Variabilität jedoch mit weniger als 1% der Reaktionsenthalpie aus.

**Tab. 1.** Enthalpy of reaction in hydrolysis of  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6, glucosidic linkages,  $\Delta H_p / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (reaction product:  $\beta$ -D glucose(aq),  $25^\circ\text{C}$ ). Calculated after Ono and Takahashi (36).

a) Animal-glycogen:  $18.9 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ ; anhydrous:  $22.0 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$

b) phyto-glycogen:  $20.4 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ ; anhydrous:  $21.1 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$

$\alpha$ -1,4 %	$\alpha$ -1,6 %	glucoside	number of glucoside residues	$\Delta H_p$ [kJ.mol <sup>-1</sup> ]
100	0	$\alpha, \beta$ -Maltose	2	-4.61
0	100	Isomaltose	2	+5.44
50	50	Panose	3	+0.59
100	0	$\alpha$ -Amylose	~6000	-4.31
96.8	3.2	starch (corn)	~6000	-4.01
92.2	7.8	glycogen <sup>a</sup>	~6000	-3.56
90.6	9.4	glycogen <sup>b</sup>	~6000	-3.42

40% der aus Glykogen hydrolytisch gebildeten  $\beta$ -D Glukose wandelt sich durch Mutarotation in die anomere Form  $\alpha$ -D Glukose um, begleitet von einer Mutarotationsenthalpie,  $\Delta H_p = 1.162 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (51). Für die enzymatische Spaltung eines durchschnittlichen Glukosid-Restes von tierischen Glykogen ergibt sich somit bei  $25^\circ\text{C}$  die Reaktionsenthalpie der Hydrolyse,  $\Delta H_k(\rho) = -3.56 + 0.46 = -3.10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$   $\alpha, \beta$ -D Glukose(aq). Nach Gleichung (1) ist dies auch der Wert für das kalorische ATP-Äquivalent (da  $v_{\text{ATP}}(\rho) = 1$ ), welches verglichen mit dem weiteren Katabolismus der Glukose außerordentlich niedrig (wenig negativ) ist. Physiologisch ist deshalb die Wärmeproduktion bei Glykogenabbau anders als bei Glukoseabbau zu interpretieren: Die Wärmeabgabe würde trotz konstanter ATP-Umsatzrate um 30% sinken, wenn bei Laktat- oder Äthanol-Gärung nach Erschöpfung externer Glukose-Quellen interne Glykogenreserven abgebaut werden (vergl. Tab.2, Zeile 1 und 4; Tab.4, 2. und 3.Block).

Der Anteil der Neutralisationsenthalpie an der Stoffwechselwärme.

Im weiteren Abbau der Glukose entstehen Kohlensäure oder organische Säuren, die entsprechend der Pufferwirkung des Mediums neutralisiert werden. Die Nebenreaktionen der Neutralisation durch das Puffersystem ist über den pH-abhängigen stöchiometrischen Koeffizienten der Protonenbildung,  $v'_{H^+}(k)$  mit der katabolen Reaktion  $k$  gekoppelt. Von physiologischer Bedeutung ist wiederum die auf den ATP-Umsatz bezogene Protonenbildung,

$$v'_{H^+/\omega ATP} = \frac{v'_{H^+}(k(\rho))}{v_{ATP}(\rho)} \quad (7)$$

$v'_{H^+/\omega ATP}$  (in Mol  $H^+$  pro Mol  $\omega ATP$ ) ist die bei einem bestimmten pH mit einem Stoffwechselweg verbundene und auf den ATP-Umsatz normierte Tendenz zur pH-Reduktion des zellinternen bzw. externen Mediums (entsprechend akkumulierender oder exkretierter Endprodukte). Im aeroben Stoffwechsel schwankt  $v'_{H^+/\omega ATP}$  (pH = 7) zwischen 0.1 und 0.14, während dieser Wert bei fermentativen Prozessen das 5- bis 10-fache erreicht.

Am Beispiel der Berechnung des Wärmeäquivalentes der Laktat-Gärung wird ersichtlich, daß bei Vernachlässigung der Neutralisationsenthalpie ein Fehler von über 50% möglich ist und daß die Reaktionsenthalpie in vivo das Doppelte der über Verbrennungskalorimetrie ermittelten Wärmetönung betragen kann (Tab.2).

Die Neutralisationsenthalpie,  $\Delta H_b$ , physiologisch wichtiger Puffersysteme liegt in einem weiten Bereich von etwa +10 bis -50 kJ  $\cdot$  mol<sup>-1</sup> Protonen (Tab.3). In Süß- und Meerwasser stellt das Karbonat-System den wichtigsten extrazellulären Puffer (23, 42) mit einem hohen Temperaturkoeffizienten von  $\Delta H_b$  (Tab.3). Die Pufferwirkung von Kalziumkarbonat ist in der Anoxibiose von Muscheln und Schnecken von besonderer Bedeutung (27, 11). Intrazellulär ist die Pufferung durch Proteine infolge der stark negativen Neutralisationsenthalpie der Imidazolgruppen wichtig. Wenn auch  $\Delta H_b(H^+)$ -Werte der wesentlichen Neutralisationsreaktionen tabellarisch verfügbar sind, ist die relative Bedeutung verschiedener Puffersysteme in vivo meist ungenügend bekannt, und es müssen plausible Extremwerte in die Berechnung eingesetzt werden. Außer bei Verwendung experimenteller Pufferlösungen (z.B. TRIS) ist unter physiologi-

Tab. 2. Enthalpy of reaction (catabolic half cycle) in lactic fermentation,  $\Delta H_k(p)$  / kJ · mol<sup>-1</sup> product.

Substrate	Product Lactate	$\Delta H_b(H^+)$	$\Delta H_k(p)$	% Dev.	Source	Ref.
$\alpha, \beta$ -D glucose (aq)	L(+) (eq, buf)	0	-54.8 <sup>a</sup>	0.0	$\Delta H_f$	57
$\alpha, \beta$ -D glucose (aq)	L(+) (eq, buf)	-7.7	-62.5	-14.1		
$\alpha, \beta$ -D glucose (aq)	L(+) (eq, buf)	-30	-84.8	-54.8		
animal-glycogen (aq)	L(+) (eq, buf)	0	-56.3 <sup>b</sup>	-2.8	$\Delta H_f$	36, 57
$\beta$ -D glucose (c)	L(+) (eq, buf)	0	-52.6	+3.9	$\Delta H_f$	57
$\alpha$ -D glucose (c)	L(+) (eq, buf)	0	-49.4	+9.7	$\Delta H_f$	57
glucose (s)	(l) ?		-44.0	+19.7	$\Delta H_c$	6
$\alpha$ -D glucose (s)	DL(l)		-34.3	+37.5	$\Delta H_c$	55
					<u>in vivo</u>	
glucose (aq)		-3.6	-64	-18	<u>S. faecalis</u>	15
glucose (aq)		0	-55	0	erythrocytes	29
glucose (aq)		-16	-71	-30	erythrocytes	33

a) In lactic fermentation of glucose  $C_{coATP}^d = \Delta H_k(p)$ , as  $v_{ATP/p} = 1$  (see equ. 1).

b) In lactic fermentation of glycogen  $C_{coATP}^d = \frac{-56.3}{1.5} = -37.5$  kJ · mol<sup>-1</sup> (see equ. 1).  
 Hence the caloric equivalent in lactic fermentation is 32% less if glycogen instead of glucose serves as a substrate under otherwise identical conditions. For consideration of the enthalpy of neutralization see Tab. 4.

Tab. 3. Enthalpies of neutralization,  $\Delta H_b(H^+)$  of physiological buffer systems. If available the values refer to ionic strength near  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . For further experimental details consult original references.  $\Delta H_b(H^+)$  corresponds to the reaction  $A^- + H^+ \rightarrow AH$ .

buffer system	T (°C)	$\Delta H_b(H^+)$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	pK <sub>a</sub>	ref.
bicarbonate				
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /CO <sub>2</sub> (aq)	0	-19	6.6	43
	25	- 8.7 - -7.7	6.4	43,57
	37	- 5	6.3	43
CaCO <sub>3</sub> (c)/HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25	-28		55,57
carboxyl groups				
succinate	25	- 0.3	5.6	24,57
citrate	25	+ 3.4	6.4	24,57
phosphate groups				
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0	-10	6.9	12
	25	- 4.2	6.9	12
	37	- 3.6	pH 6.6	15
pyrophosphate	25	- 0.4	6.8	24
glucose-1-P	25	+ 1.8	6.5	24
glycerol-1-P	25	+ 3.1	6.7	24
nucleotide-P	25	+ 3.4 - +7.3	6.7 - 7.7	12,24
ribose-5-P	25	+11.3	6.7	24
amine groups				
glycylglycine	20	-48	pH 8.0	24,38
TRIS	25	-48 - -49	8.0 - 8.3	38
imidazole groups				
histidine	25	-30	6.0	24
H.in protein	0	-32	6.5	12
H.in myoglobin	25	-30	6.6	24
H.in ribonuclease	10-32	-34 - -17	5.8 - 6.7	24
carnosine	0	-32	7.3	12
cysteine (-SH)	25	-36	8.4	24
ferrihemoproteins	20-25	-43 - -7	8.0 - 9.0	24
intracellular				
mitochondria				
-in phosphate-media	25	-27 - +4		39
-in chloride and acetate media	25	-27 - -18		39
erythrocytes	37	-17		33
muscle tissue	0	-31 - -25	pH 7.0	12
	25	-28 - -22	pH 7.0	12
	37	-26 - -20	pH 7.0	12

schen Bedingungen eine maximale Neutralisationsenthalpie von  $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (intrazellulär) anzunehmen. Mit weniger negativen Werten ist bei der Neutralisation exkretierter Säuren in Wasser zu rechnen.

#### Das kalorische Äquivalent des dissipativen ATP-Umsatzes.

Unter der Annahme, daß neben der Neutralisation dissoziierter Metaboliten weitere Nebenreaktionen keine signifikanten Enthalpieänderungen bewirken, kann die Reaktionsenthalpie des Katabolismus aus den Bildungsenthalpien,  $\Delta H_f$  der Reaktanten, der Neutralisationsenthalpie und den entsprechenden stöchiometrischen Koeffizienten berechnet werden.

$$\Delta H_k = \sum_i v_i \cdot \Delta H_f(i) + v_{H^+}^{\prime}(k) \cdot \Delta H_b(H^+) \quad (8)$$

Gleichermaßen gilt nach Gleichung (1') für das kalorische Äquivalent des dissipativen ATP-Umsatzes

$$\Delta H_k(\infty \text{ATP}) = \sum_i v_{i/\text{ATP}} \cdot \Delta H_f(i) + v_{H^+/\infty \text{ATP}}^{\prime} \cdot \Delta H_b(H^+) \quad (8')$$

Für physiologische Bedingungen ermittelte Bildungsenthalpien biochemisch wichtiger Substanzen und deren Dissoziationsformen finden sich in einer wertvollen Zusammenstellung von Wilhoit (57). Die in Tabelle 4 vorgelegten Berechnungen basieren auf diesen thermodynamischen Daten, welche nur durch die neu berechnete Bildungsenthalpie von Glykogen,  $\Delta H_f(\text{aq}, 25^\circ\text{C}) = -975.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (siehe oben) und von Propionsäure,  $\Delta H_f(\text{aq}, 25^\circ\text{C}) = -509.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  sowie Propionat,  $\Delta H_f(\text{aq}, 25^\circ\text{C}) = -510.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  ergänzt wurde.

Die Bildungsenthalpie von Propionsäure und Propionat wurde aus der Verbrennungsenthalpie von Propionsäure (1) (Handb.Chem.Phys. 1975), der Verdünnungsenthalpie, für die ein Mittelwert der Verdünnungsenthalpien von Essigsäure und Buttersäure (57) angenommen wurde, und der Ionisationsenthalpie von Propionsäure (24) berechnet.

Bekanntlich ist das oxykalorische Äquivalent bei Fettatmung,

$\Delta H_k(\text{O}_2) = -438$  bis  $-455 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  deutlich niedriger als bei Kohlenhydratverbrauch,  $\Delta H_k(\text{O}_2) = -472$  bis  $-496 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Das kalorische Äquivalent des dissipativen ATP-Umsatzes nimmt jedoch im aeroben Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel einen konstanten Wert von

Tab. 4. The caloric equivalent of ATP-turnover in dissipative metabolism.

s	P	$v_{p/s}$	$v_{CO_2/s}$	$v_{ATP/s}$	$v_{H^+/\infty ATP}$	$\Delta \underline{H}_k (\infty ATP)$	
						$\Delta \underline{H}_b = 0$	$\Delta \underline{H}_b = -30$
F	CO <sub>2</sub> <sup>a</sup>		45	361	0.10	-77.0	-80.0
nG	CO <sub>2</sub> <sup>b</sup>		6	37	0.13	-76.4	-80.3
G	CO <sub>2</sub> <sup>c</sup>		6	36	0.14	-78.5	-82.6
G	lactate	2	0	2	1	-54.8	-84.8
	ethanol <sup>d</sup>	2	2	2	0.81	-62.8	-87.1
	alanine <sup>d</sup>	2	0	2	1	-76.5	-106.4
	succinate	1.71	-0.86	3.71	0.72	-51.1	-72.6
	propionate	1.71	0.86	5.43	0.44	-37.6	-50.9
	acetate	3	0	5	0.60	-38.6	-56.5
nG	lactate	2	0	3	0.67	-37.5	-57.5
	ethanol <sup>d</sup>	2	2	3	0.54	-42.9	-59.1
	alanine <sup>d</sup>	2	0	3	0.66	-52.0	-72.0
	succinate	1.71	-0.86	4.71	0.57	-40.9	-57.9
	propionate	1.71	0.86	6.43	0.37	-32.3	-43.4
	acetate	3	0	6	0.50	-32.7	-47.6

$C_{\infty ATP}^d$  is given as a function of various aerobic and anoxic substrates (s), products (p) and the enthalpy of neutralization.  $C_{\infty ATP}^d$  is the enthalpy of reaction in the catabolic half cycle per coupled ATP-cycle,  $\Delta \underline{H}_k (\infty ATP) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (equ.1). Calculated according to equ. 8' from enthalpies of formation (57 see text) for dilute aqueous solutions at  $T = 25^\circ\text{C}$  and pH 7, and for enthalpies of neutralization,  $\Delta \underline{H}_b (H^+) = 0$  (standard) and  $\Delta \underline{H}_b (H^+) = -30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (spanning the extreme for normal physiological conditions). Aerobic catabolism of fat (F=trimyristin(s)) and carbohydrates (nG = animal-glycogen(aq), G =  $\alpha, \beta$ -D glucose(aq)) is compared with anoxic catabolism of glucose (G, block 2) and glycogen (nG, block 3). The catabolic balance equations are relative to the consumption of one unit equivalent of substrate, i.e.  $v_s(k) = -1$ . They are expressed in terms of stoichiometric coefficients of the product,  $v_{p/s}$  and of total CO<sub>2</sub> (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(aq) and CO<sub>2</sub>(aq)),  $v_{CO_2/s}$ . The enzymatically and structurally channeled biochemical pathways determine the stoichiometric ATP-coupling coefficients,  $v_{ATP/s}$ . The pH-dependent (apparent) stoichiometric coefficient of proton evolution per ATP-cycle,

$v_{H^+/\infty ATP}$  is important both physiologically (acidification) and calorimetrically ( $\Delta \underline{H}_b(H^+)$ ).

a)  $v_{O_2/s} = -63.5$ ;  $RQ = 0.71$ ;  $\Delta \underline{H}_k(O_2) = -437.6$  to  $-454.8$  kJ . mol<sup>-1</sup>;  
 $v_{ATP/O_2} = 5.69$ .

b)  $v_{O_2/s} = -6$ ;  $RQ = 1$ ;  $\Delta \underline{H}_k(O_2) = -471.8$  to  $-496.1$  kJ . mol<sup>-1</sup>;  
 $v_{ATP/O_2} = 6.17$ .

c)  $v_{O_2/s} = -6$ ;  $RQ = 1$ ;  $\Delta \underline{H}_k(O_2) = -471.3$  to  $-495.6$  kJ . mol<sup>-1</sup>;  
 $v_{ATP/O_2} = 6.0$ .

d)  $v_{NH_4/s} = -2$ ; possibly transamination reactions are also involved in the formation of alanine (59), thence the linear pathway of alanine fermentation would be transformed into a coupled one (21).

etwa  $-80$  kJ . mol<sup>-1</sup>  $\infty ATP$  an (Tab.4, 1.Block; siehe auch Milligan (32)). Für die meisten Anwendungsbereiche ist die durch Substratbeschaffenheit und Neutralisationsenthalpie bedingte Variabilität von  $C_{\infty ATP}^d$  unter aeroben Bedingungen vernachlässigbar gering ( $\pm 4\%$ ) (30, 35).

Dem einheitlichen aeroben Mechanismus der ATP-Gewinnung steht die Vielfalt energetisch gekoppelter Phosphorylierungsreaktionen der verschiedenen anoxischen Stoffwechselwege gegenüber. Dementsprechend finden wir auch eine ausgeprägte Abhängigkeit des kalorischen ATP-Äquivalents vom Stoffwechsellyp vor (Tab.4). Die relativ geringe ATP-Ausbeute und die Acidität der Endprodukte bedingen überdies einen potentiell hohen Anteil der Neutralisationsenthalpie an der anoxischen Stoffwechselwärme. So ist es beinahe unmöglich, allgemeine Aussagen über  $C_{\infty ATP}^d$  unter Anoxia zu machen. Deutlich ist jedoch der relativ geringe Enthalpieverlust, der mit dem ATP-Umsatz der Propionat- und Acetat-Gärung insbesondere bei Glycogenabbau (Tab.4, 3.Block) verbunden ist.

Bei Mikroorganismen (54) und gegenüber Sauerstoffschwund toleranten Evertebraten (Literaturübersicht in 17, 59) wurde während anoxischer Akklimation eine sukzessive Umschaltung von Laktat- und Succinatbildung auf Propionat- und Acetat-Gärung beobachtet, wobei sich die substratbezogene ATP-Ausbeute etwa verdoppelt und die

⇒ATP-bezogene Protonenbildung sich stark vermindert (Tab.4). In dieser Situation ist mit einem gegenüber aeroben Bedingungen bis zu 50% reduzierten Wärmeäquivalent des ATP-Umsatzes zu rechnen. Aus dem Vergleich der aeroben und anoxischen Wärmeproduktion (Abb.1, Situation I und II) muß geschlossen werden, daß unter anoxischen und aeroben Bedingungen trotz unterschiedlicher Niveaus der Wärmeabgabe eine annähernd konstante ATP-Umsatzrate aufrecht erhalten bleibt, wenn die direkt-kalorimetrisch untersuchten Oligochaeten tatsächlich dem allgemein akzeptierten Stoffwechselschema folgen. Diesbezügliche Bedenken werden jedoch durch einen Vergleich direkt- und indirekt-kalorimetrischer Daten nahegelegt (18).

#### DIE KALORISCHE EFFIZIENZ DES METABOLISMUS

Wenn neben dem dissipativen Stoffwechsel auch biosynthetische Reaktionen zu berücksichtigen sind, erreicht die thermodynamische Analyse einen höheren Komplexitätsgrad. Hier stellt sich die Frage nach der kalorischen Effizienz des Metabolismus, auf welcher Grundlage Thermogramme des Wachstums und des Regenerations- oder Erholungstoffwechsels (Abb.1, transitorische Situation I-II) interpretiert werden können. Aus Abb. 2 ist leicht zu ersehen, daß die größtmögliche kalorische Effizienz gegeben ist, wenn bei vollständiger Blockierung des zyklischen ATP-Umsatzes die ATP-Konzentration durch die mit dem Katabolismus gekoppelte Phosphorylierung erhöht wird. Dieser maximale Grenzwert der katabolen Effizienz wird zwar nie verwirklicht, soll jedoch quantifiziert werden, da nach anoxischer Reduktion des ATP/ADP-Verhältnisses die ursprüngliche ATP-Konzentration am Beginn der aeroben Erholungsphase wieder aufgebaut wird (40).

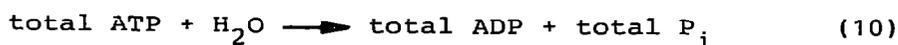
Die kalorische Effizienz einer chemischen Reaktion hat im Gegensatz zur Gibbs'schen Energie-Effizienz kein theoretisches Maximum von 1, erlaubt keine Aussagen über die Irreversibilität (Entropieproduktion) des Gesamtprozesses und ist konzentrationsunabhängig. Die numerischen Werte haben demnach vom thermodynamischen Standpunkt gesehen keine theoretische Bedeutung, stellen jedoch Grundgrößen im physiologischen Zusammenhang (20) sowie unter methodischem Aspekt dar. Das in den katabolen Halbzyklen (Abb.2) schemati-

sierte input-output Verhältnis der Reaktionsenthalpien definiert die kalorische (oder Enthalpie-) Effizienz des Katabolismus:

$$\eta_k(\Delta H) = \frac{v_{\text{ATP}}(\rho) \cdot \Delta H_{\text{-ATP}}}{\Delta H_k(\rho)} \quad (9)$$

#### Die Reaktionsenthalpie des ATP-Halbzyklus.

$\Delta H_{\text{-ATP}}$  ist die Reaktionsenthalpie der ATP-Hydrolyse



wobei "total ATP" die Summe aller Dissoziationsformen und Metallkomplexe des ATP bezeichnet (was ebenso für ADP und anorganisches Phosphat,  $\text{P}_i$ , gilt) (Abb.4).

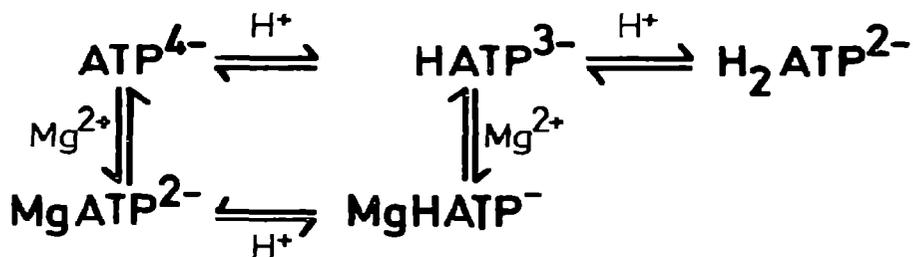
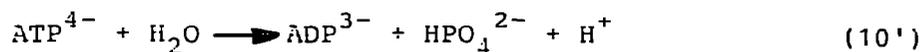
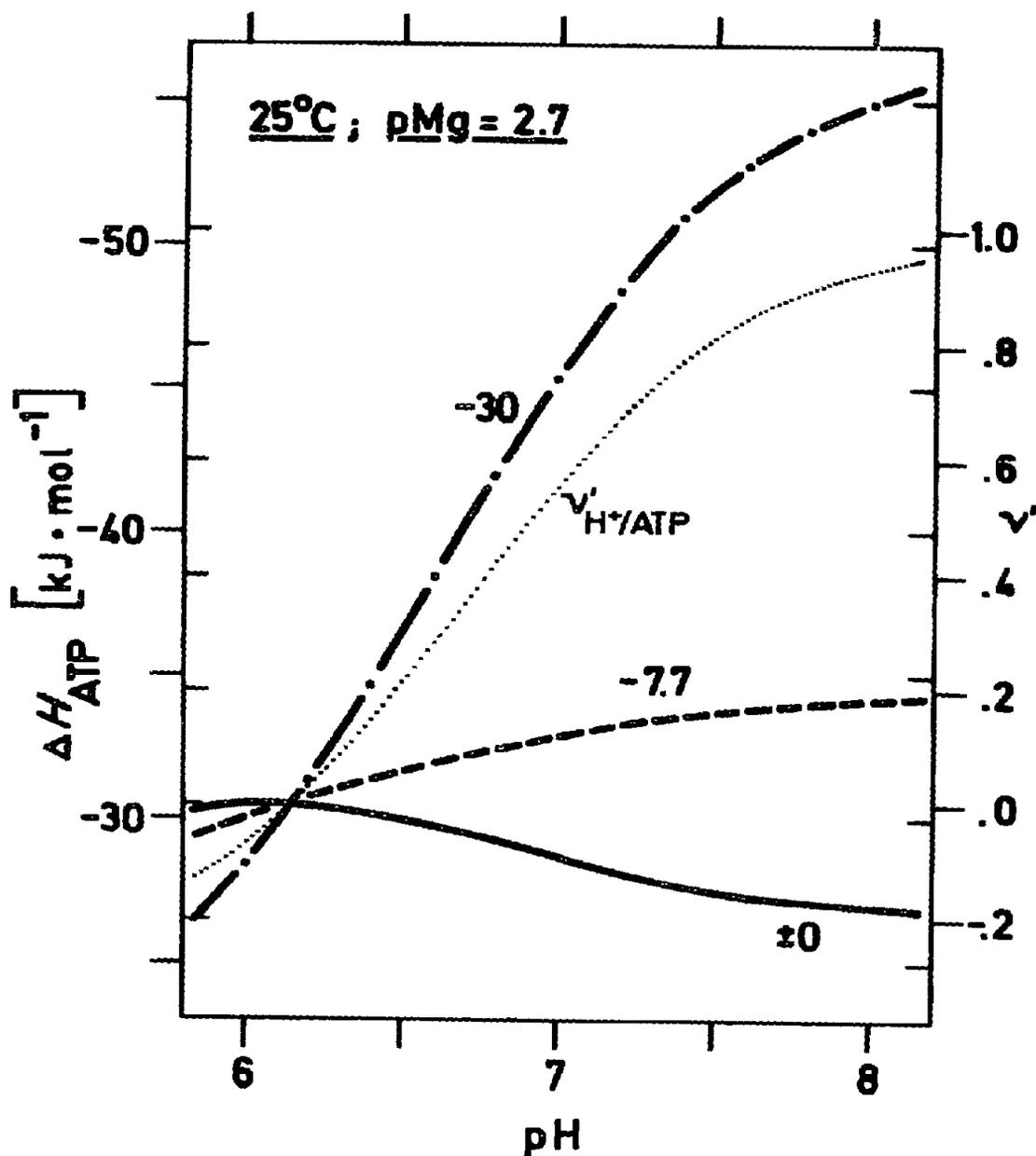


Fig. 4. Total ATP: ionized species and  $\text{Mg}^{2+}$ -complexes of ATP as considered in the calculations of  $\Delta H_{\text{-ATP}}$ .

Kalorimetrisch wurde für die Reaktion



$\Delta H_{\text{-ATP}} = -20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  (38) bestimmt, und kalorimetrische Untersuchungen wurden ebenso für die  $\text{Mg}^{2+}$ -Komplexbildungen (4, 58) und



**Fig. 5.** Enthalpy of reaction in hydrolysis of ATP,  $\Delta H_{ATP}'$ , as a function of pH and of the enthalpy of proton neutralization,  $\Delta H_b(H^+) \pm 0, -7.7$  and  $-30$  kJ · mol<sup>-1</sup>. The magnesium ion activity is  $2$  mmol · dm<sup>-3</sup>, and the enthalpy of pMg-buffering,  $\Delta H_b(Mg) = \pm 0$  kJ · mol<sup>-1</sup>. The dotted line denotes the apparent stoichiometric coefficient of proton evolution in hydrolysis of ATP.

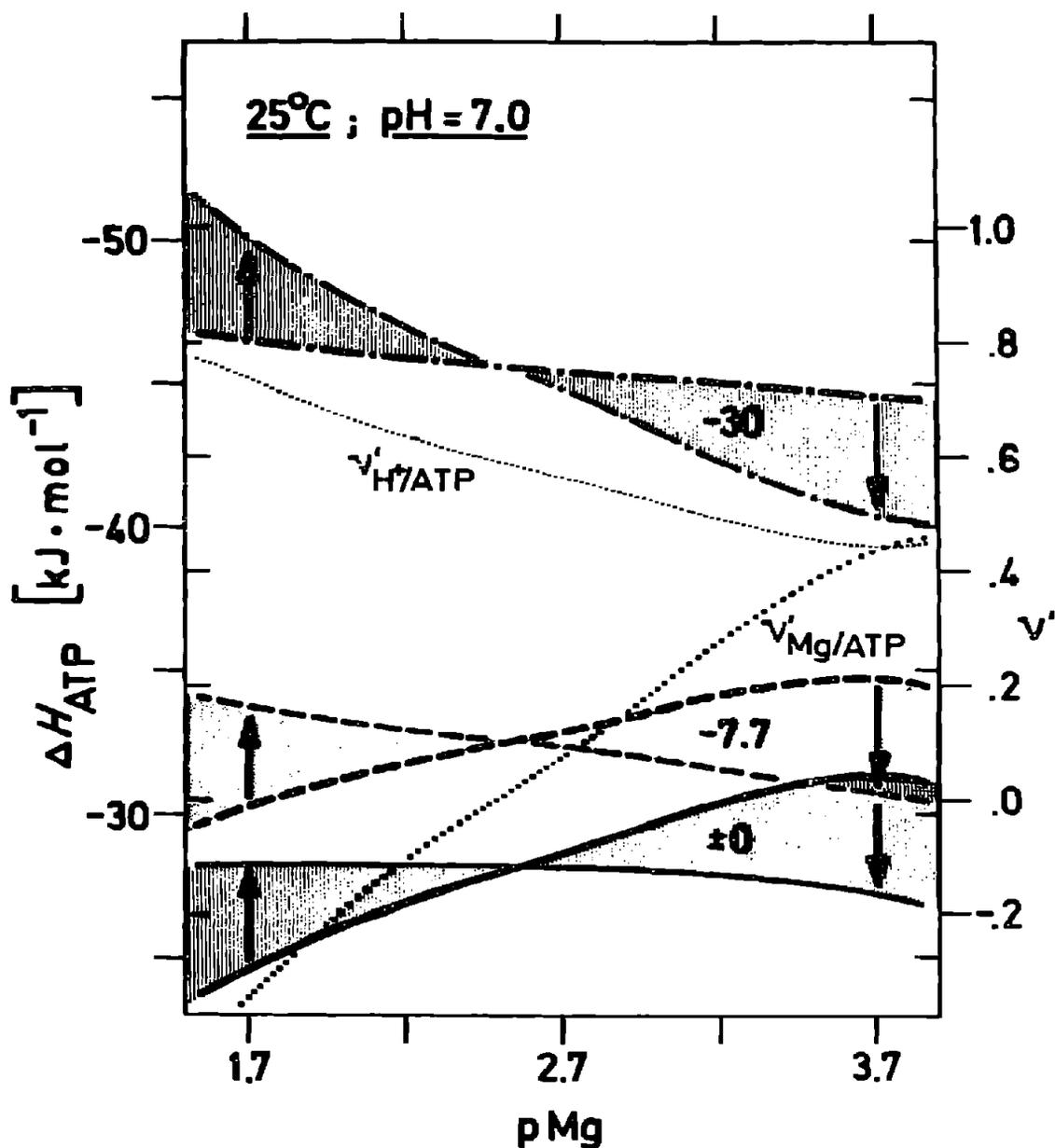


Fig. 6. Enthalpy of reaction in hydrolysis of ATP as a function of  $pMg$ ,  $\Delta H_b(H^+)$ , and  $\Delta H_b(Mg)$ . The dotted lines represent the apparent stoichiometric coefficients of proton and magnesium evolution in hydrolysis of ATP. The arrows show the shift in  $\Delta H_{ATP}$  due to the enthalpy of  $pMg$ -buffering,  $\Delta H_b(Mg) = \pm 0$  to  $+10$   $kJ \cdot mol^{-1}$ .

H<sup>+</sup>-Dissoziationen (10) durchgeführt. Etliche Enthalpiewerte basieren aber noch immer ausschließlich auf Temperaturvariationsdaten (van't Hoff isochore plots) (48,37) oder wurden für unphysiologisch niedrige Ionenstärken ermittelt, was mitbestimmend für die Diskrepanz der in der Literatur gebräuchlichen Daten sein mag. Die folgenden Berechnungen basieren auf der tabellarischen Zusammenstellung von Enthalpiewerten und Gleichgewichtskonstanten von Curtin and Woledge (12).

Die theoretischen Grundlagen für die Analyse des ATP-Systemes wurden von Alberty (1,2) diskutiert. Diese Studien geben noch keinen Aufschluß über die thermodynamischen Parameter *in vivo*, da die Neutralisationsenthalpie nicht berücksichtigt wurde (5,12).  $\Delta H_{ATP}$  ist eine Funktion von pH und pMg ( $-\log[Mg^{2+}]$ ) und wird im hohen pH-Bereich entscheidend von der Neutralisationsenthalpie mitbestimmt (Abb.5)

Eine weitere und bisher noch nicht analysierte Komponente der Variabilität ist durch die Komplexierung von bei der ATP-Hydrolyse frei werdendem Mg<sup>2+</sup> bedingt. Unter physiologischen Verhältnissen (pH 6 bis 8, pMg 2.5 bis 4.5) können je nach pH-pMg Kombination bis

**Tab. 5.** Enthalpy of reaction in phosphorylation of ADP ( $= -\Delta H_{ATP}$ ) as a function of pH, pMg, and enthalpies of pH- and pMg-buffering (T = 25°C, ionic strength = 0.2 mol . dm<sup>-3</sup>).

		pH		6		7		8	
		$\Delta H_b (H^+)$		0	-30	0	-30	0	-30
pMg	$\Delta H_b (Mg)$								
2.5	0			31	30	28	46	26	54
	10			28	28	28	46	27	55
3.5	0			30	27	31	45	30	58
	10			27	23	27	41	27	54
4.5	0			26	29	28	44	29	57
	10			25	29	25	42	25	52

zu 0.5 Mol  $Mg^{2+}$  pro Reaktionsäquivalent frei werden (Abb.6). Da die Magnesium-Komplexierung organischer Phosphate endotherm ist ( $\Delta H_D(Mg) = 5$  bis  $19 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; 44,12), kann ein der Neutralisationsenthalpie meist entgegengesetzter Effekt angenommen werden. Nur bei außergewöhnlich hohen  $Mg^{2+}$ -Aktivitäten wird Magnesium bei der ATP-Hydrolyse in signifikantem Ausmaß gebunden, womit eine exotherme Nebenreaktion der pMg-Pufferung gegeben wäre (Abb.6). Eine maximale Reaktionsenthalpie der ATP-Hydrolyse von  $-57 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  könnte deshalb bei  $pMg = 2$ ,  $pH = 8$ ,  $\Delta H_D(H^+) = -30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  und  $\Delta H_D(Mg) = 15 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  erreicht werden, ein Wert, der ohne Berücksichtigung eines pMg-Puffers auch bei  $pMg = 3.5$  bis  $4.5$  und sonst gleichen Bedingungen gilt (Tab. 5).

#### Katabole und anabole Enthalpie-Effizienz

Die widersprüchlichen Literaturwerte für die kalorische Effizienz des aeroben Katabolismus,  $\eta_k(\Delta H)$  von 0.25 (41) bis nahe 1 (20) lassen sich auf unzulässig vereinfachende Generalisierungen oder auf eine unzulässige Approximation von Gibbs'scher Energie- und Enthalpie-Effizienz zurückführen (in der Nähe des thermodynamischen Gleichgewichtes ist  $\eta_k(\Delta G) \approx 1$ , was keine Aussagen über den von Substrat- und Produktkonzentrationen unabhängigen Wert von  $\eta_k(\Delta H)$  erlaubt). Selbst angesichts der pH- und pMg-Abhängigkeit der Reaktionsenthalpie ist eine präzisere Bestimmung der kalorischen Effizienz des aeroben Katabolismus möglich: Nur in den Extrembereichen physiologischer Bedingungen, die in Tab. 5 umrissen sind (allerdings ohne einzelne Zellkompartimente zu berücksichtigen), erreicht  $\eta_k(\Delta H)$  die Grenzwerte 0.3 bis 0.7. Allgemeiner verwirklicht sind die Werte der katabolen Enthalpie-Effizienz im Neutralbereich; bei  $\Delta H_D(H^+) = -15$  bis  $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  gilt für aerobe Verhältnisse  $\eta_k(\Delta H, pH 6.5 \text{ bis } 7.5) = 0.50 \pm 0.15$ .

Da unter anoxischen Bedingungen das kalorische Äquivalent des dissipativen ATP-Umsatzes deutlich geringer als im aeroben Stoffwechsel sein kann (Tab.4), nimmt die Enthalpie-Effizienz des anoxischen Katabolismus entsprechend zu

$$\eta_k(\Delta H) = \frac{\Delta H_{ATP}}{\Delta H_k(\infty ATP)} \quad (11)$$

und Effizienzwerte über 1 können bei der Propionat-Gärung theoretisch erreicht werden.

Jedoch selbst im Wachstums- und Regenerationsstoffwechsel wird beinahe das gesamte gebildete ATP wieder verbraucht, sodaß von den etwa 50% der intermediär gespeicherten Enthalpie ein weiterer Teil bei anabolen Reaktionen als Wärme dissipiert wird (Abb.2). Glykoneogenese und ähnliche Biosyntheseprozesse laufen mit einer anabolen Enthalpie-Effizienz von wiederum etwa 0.5 ab, sodaß bereits 75% der Reaktionsenthalpie des katabolen Halbzyklus als Wärme verloren gehen, ohne daß der Erhaltungsstoffwechsel im Sinne des dissipativen Zyklus an der Wärmeproduktion beteiligt ist. Unter diesen theoretischen Bedingungen sinkt das kalorische Äquivalent des ATP-Umsatzes,  $C_{\infty\text{ATP}}$  bis  $-60 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Während ein Aufbau der ATP-Konzentration diesen Wert weiter reduzieren würde, trägt jeder dissipative Prozeß (z.B. Aufrechterhaltung von Ionen-Ungleichgewichten, Umsatz von Makromolekülen, "futile cycles") zu einer gegen-sinnigen Erhöhung bis zu  $-80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  für den rein dissipativen Stoffwechsel bei.

Es kann also ohne nähere Bestimmung der tatsächlich ablaufenden anabolen Reaktionen mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß beim aeroben Erholungsstoffwechsel (Abb. 1, transitorische Situation I-II) das kalorische Äquivalent des ATP-Umsatzes zwischen dem relativ niedrigen Wert des stationären Zustandes unter Anoxia und dem hohen Wert des aeroben Dissipationsstoffwechsels liegt, welchem es sich allmählich oder abrupt annähert.

Auch an anoxischen Mikroorganismen konnte eine Wachstumsenthalpie experimentell nicht nachgewiesen werden (14,22,34a, 46), da die methodische und/oder thermochemische Fehlergrenze keine genügend hohe Auflösung der Energie-Bilanz zuließ. In erster Näherung läßt sich deshalb die kalorimetrische Methode über das kalorische Äquivalent des ATP-Umsatzes mit dem  $Y_{\text{ATP}}$ -Konzept des mikrobiellen Wachstums (49) verbinden.

$$Y_{\text{ATP}} = \frac{\Delta w}{n_{\infty\text{ATP}}} \quad (12)$$

"YIELD-ATP" ist der Zuwachs des Biomasse-Trockengewichtes,  $w$  pro umgesetztem ATP. Sind  $C_{\infty\text{ATP}}$  (näherungsweise geschätzt durch  $C_{\infty\text{ATP}}^d$ ) und  $Y_{\text{ATP}}$  bekannt, läßt sich der Biomassezuwachs direkt aus der

kalorimetrisch ermittelten Wärmeproduktion,  $\Delta Q$ , errechnen:

$$\Delta w = \frac{\Delta Q}{C_{\infty \text{ATP}}} \cdot Y_{\text{ATP}} \quad (13)$$

Die Arbeit wurde durch den "Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich", Projekt Nr. 2919 und 3917 unterstützt. Ich danke Frau E.Pöder für die Reinschrift auch dieses Manuskriptes.

#### LIST OF SYMBOLS

Symbol	Definition	SI Unit
$C_{\infty \text{ATP}}$	caloric equivalent of ATP-turnover	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
$C_{\infty \text{ATP}}^d$	caloric equivalent of dissipative ATP-turnover	"
$\Delta \underline{H}_p$	enthalpy of reaction $p$	"
$\Delta \underline{H}_{\text{ATP}}$	enthalpy of hydrolysis of ATP	"
$\Delta \underline{H}_b(\text{H}^+)$	enthalpy of neutralization ( $\text{H}^+$ -binding) by a pH-buffer system	"
$\Delta \underline{H}_b(\text{Mg})$	enthalpy of $\text{Mg}^{2+}$ -binding by a pMg-buffer system	"
$\Delta \underline{H}_c$	enthalpy of combustion	"
$\Delta \underline{H}_f$	enthalpy of formation	"
$\Delta \underline{H}_k(p)$	enthalpy of reaction in the catabolic half cycle related to the balance equation $p$	"
$\Delta \underline{H}_k(\infty \text{ATP})$	$\Delta \underline{H}_k$ per mole of stoichiometrically coupled ATP-turnover, i.e. the caloric equivalent of dissipative ATP-turnover	"
$\Delta \underline{H}_k(\text{O}_2)$	oxycaloric equivalent	"
$\Delta \underline{H}_k(p)$	$\Delta \underline{H}_k$ per mole of product	"
$\Delta \underline{H}_k(s)$	$\Delta \underline{H}_k$ per mole of substrate	"
$n_{\infty \text{ATP}}$	molar ATP-turnover; number of moles of ATP passing the ATP-cycle	mol
$n_i$	number of moles of chemical species $i$	mol
$\Delta Q$	heat gain of a system; a negative sign indicates heat loss	kJ

Symbol	Definition
$\eta_k(\underline{\Delta G})$	Gibbs energy-efficiency of catabolic phosphorylation of ADP
$\eta_k(\underline{\Delta H})$	enthalpy-efficiency of catabolic phosphorylation of ADP
$\nu_i(\rho)$	stoichiometric coefficient of chemical species $i$ in reaction $\rho$
$\nu_{ATP}(\rho)$	stoichiometric ATP-coupling coefficient in reaction $\rho$
$\nu_{i/ATP}$	$\nu_i$ based on 1 mole ATP; i.e. in a reaction with $\nu_{ATP} = 1$
$\nu_{i/p}$	$\nu_i$ based on 1 mole product
$\nu_{i/s}$	$\nu_i$ based on 1 mole substrate
$\nu_{H^+/\infty ATP}^i$	apparent stoichiometric coefficient of proton evolution in the catabolic half reaction based on 1 mole coupled ATP-turnover, dependent on pH, etc.
$\nu_{H^+/p}^i(k)$	$\nu_{H^+}^i$ per 1 mole product in the catabolic half reaction
$\nu_{H^+/s}^i(k)$	$\nu_{H^+}^i$ per 1 mole substrate in the catabolic half reaction
$\rho$	reaction; metabolic equation

## LITERATUR

- 1 Albery R.A. (1969) Standard gibbs free energy, enthalpy, and entropy changes as a function of pH and pMg for several reactions involving adenosine phosphates. *J.Biol.Chem.*244, 3290-3302
- 2 Albery R.A. (1969) Maxwell relations for thermodynamic quantities of biochemical reactions. *J.Am.Chem.Soc.*91, 3899-3903
- 3 Atkinson D.E. (1977) Cellular energy metabolism and its regulation, Academic Press, New York, 293 pp
- 4 Belaich J.P., Sari J.C. (1969) Microcalorimetric studies on the formation of magnesium complexes of adenine nucleotides. *Proc.Nat.Acad.Sci.*64, 763-770
- 5 Bernhardt S.A. (1956) Ionization constants and heats of tris (hydroxymethyl) aminomethane and phosphate buffers. *J.Biol.Chem.*218, 961-969
- 6 Blaxter K.L. (1967) The Energy Metabolism of Ruminants. Hutchinson Scientific and Technical, London, 3rd impr.1969, 332 pp
- 7 Blumenfeld L.A. (1978) The physical aspects of energy transduction in biological systems. *Q.Rev.Biophys.*11, 251-308
- 8 Cannan R.K., Kibrick A. (1938) Complex formation between carboxylic acids and divalent metal cations. *J.Am.Chem.Soc.*60, 2314-2320
- 9 Caplan S.R. (1971) Nonequilibrium thermodynamics and its application to bioenergetics. In: Current topics in bioenergetics. (Sanadi D.R., ed.) Vol.4, Academic Press, New York, 1-79

- 10 Christensen J.J., Izatt R.M. (1962) Thermodynamics of proton dissociation in dilute aqueous solution. 2.Heats of proton dissociation from ribonucleotides and related compounds determined by a thermometric titration procedure.J.Phys.Chem. 66, 1030-1034
- 11 Crenshaw M.A. , Neff J.M. (1969) Decalcification at the mantle-shell interface in molluscs. Am.Zool.9, 881-885
- 12 Curtin N.A., Woledge R.C. (1978) Energy changes and muscular contraction. *Physiol.Rev.*58, 690-761
- 13 Evans W.J., Framton V.L. (1977) Calorimetric analysis of the interaction of calcium ions with galactose, myo-inositol, and lactose. *Carbohyd.Res.*59, 571
- 14 Forrest W.W. (1970) Entropy of microbial growth. *Nature* 225, 1165-1166
- 15 Forrest W.W., Walker D.J., Hopgood M.F. (1961) Enthalpy changes associated with the lactic fermentation of glucose. *J.Bacteriol.*82, 685-690
- 16 Gäde G., Wilps H., Kluytmans J.H.F.M., Zwaan A. de (1975) Glycogen degradation and end products of anaerobic metabolism in the fresh water bivalve *Anodonta cygnea*. *J.comp. Physiol.*104, 79-85
- 17 Gnaiger E. (1977) Thermodynamic considerations of invertebrate anoxybiosis. In: Application of calorimetry in life sciences. (Lamprecht I., Schaarschmidt B., eds.), Walter de Gruyter, Berlin, 281-303
- 18 Gnaiger E. (1979) Contribution of direct calorimetry to the study of invertebrate anoxybiosis: A challenge to the biochemist. In: The Physiology of Euryoxic Animals (Holwerda D.A., ed.) Zeist (The Netherlands), 21-24 March, 1979, 98-101
- 19 Gnaiger E. (1979) Direct calorimetry in ecological energetics. Long term monitoring of aquatic animals. *Experientia Suppl.* 37, in press
- 20 Himms-Hagen J. (1976) Cellular thermogenesis. *Ann.Rev.Physiol.* 38, 315-351
- 21 Hochachka P.W., Fields J. Mustafa T. (1973) Animal life without oxygen: Basic biochemical mechanisms. *Amer.Zool.*13,543-555
- 22 Hoogerheide J.C. (1975) Studies on the energy metabolism during anaerobic fermentation of glucose by baker's yeast. *Radiation environmental Biophys.*11, 295-307
- 23 Hutchinson G.E. (1957) A treatise on limnology. I.Geography, physics, and chemistry. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1015 pp
- 24 Izatt R.M., Christensen J.J. (1970) Heats of proton ionization, pK, and related thermodynamic quantities. In: Handbook of biochemistry (Sober H.A., ed.), CRC, Cleveland, 2nd ed., J58 - J173
- 25 Jones C.W. (1977) Aerobic respiratory systems in bacteria. In: Microbial energetics. (Haddock B.A., Hamilton W.A., eds.) Cambridge Univ.Press, London, 23-59
- 26 Kluytmans J.H., Graft M.van, Janus J., Pieters H. (1978) Production and excretion of volatile fatty acids in the sea mussel *Mytilus edulis* L. *J.comp.Physiol.*123, 163-167
- 27 Kühnelt W. (1938) Beziehungen zwischen Kalkstoffwechsel und Atmung bei Mollusken der Meeresküste.*Zool.Anzeiger* 124, 182-190
- 28 Lehninger A.L. (1975) Biochemistry. Worth Publ., New York, 2nd ed., 1104 pp

- 29 Levin K., Fürst P., Harris R., Hultman E. (1974) Heat production from human erythrocytes in relation to their metabolism of glucose and amino acids. *Scand.J.clin.Lab.Invest.*34, 141-148
- 30 Long R.A., Martin W.G., Schneider H. (1977) Energy requirements for the transport of methylthio- $\beta$ -D-galactoside by *Escherichia coli*: Measurement by microcalorimetry and by rates of oxygen consumption and carbon dioxide production. *J.Bacteriol.*130, 1159-1174
- 31 Miller T.L. (1978) The pathway of formation of acetate and succinate from pyruvate by *Bacteroides succinogenes*. *Arch.Microbiol.*117, 145-152
- 32 Milligan L.P. (1971) Energetic and metabolic transformations. *Fed.Proc.*30, 1454-1458
- 33 Minakami S., de Verdier C.H. (1976) Calorimetric study on human erythrocyte glycolysis. Heat production in various metabolic conditions. *Eur.J.Biochem.*65, 451-460
- 34 Mitchell P. (1979) Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur.J. Biochem.*95, 1-20
- 34a Murgier M., Belaich J.P. (1971) Microcalorimetric determination of the affinity of *Saccharomyces cerevisiae* for some carbohydrate growth substrates. *J.Bacteriol.*105, 573-679
- 35 Nakamura T., Matsuoka I. (1978) Calorimetric studies of heat of respiration of mitochondria. *J.Biochem.*84. 39
- 36 Ono S. Takahashi K. (1969) Chemical structure and reaction of carbohydrates. In: *Biochemical microcalorimetry* (Brown H.D. ed.) Academic Press, New York, 99-116
- 37 Phillips R.C., George P., Rutman R.J. (1966) Thermodynamic studies of the formation and ionization of the magnesium(II) complexes of ADP and ATP over the pH range 5 to 9. *J.Am.Soc.*88, 2631-2640
- 38 Podolsky R.J., Morales M.F. (1956) The enthalpy change of adenosine triphosphate hydrolysis. *J.Biol.Chem.*218, 945-959
- 39 Poe M. (1969) Kinetic studies of temperature changes and oxygen uptake in a differential calorimeter: Energy balance during calcium accumulation by mitochondria. *Arch.Biochem.Biophys.* 132, 377-387
- 40 Pörtner H.O., Surholt B., Grieshaber M. (1979) Recovery from anaerobiosis of the lugworm, *Arenicola marina* L.: Changes of metabolite concentrations in the body-wall musculature. *J.comp. Physiol.* 133, 227-231
- 41 Prusiner S., Poe M. (1968) Thermodynamic considerations of mammalian thermogenesis. *Nature* 220, 235-237
- 42 Pytkowicz R.M. (1967) Carbonate cycle and the buffer mechanism of recent oceans. *Geochim.Cosmochim.Acta* 31, 63-73
- 43 Raughton F.J.W. (1941) The kinetics and rapid thermodynamics of carbonic acid. *J.Am.Chem.Soc.*63, 2930-2934
- 44 Sari J.C., Belaich J.P. (1973) Microcalorimetric studies on the formation of magnesium complexes with 5' ribonucleotides of guanine, uracil, and hypoxanthine. *J.Am.Chem.Soc.*95, 7491-7499
- 45 Saville H., Gundry H.A. (1959) The heats of combustion, solution and ionization of lactic acid. *Trans.Faraday Soc.*55, 2036-2038
- 46 Schaarschmidt B., Lamprecht I., Welge G. (1974) Microcalorimetric investigations of the metabolism of yeasts. IV. Effects of oxygen and hydrogen pressure on growth. *Rad.and Environment.Biophys.*11, 53-61

- 47 Schöttler U., Schroff G. (1976) Untersuchungen zum anaeroben Glykogenabbau bei *Tubifex tubifex* M. *J.Comp.Physiol.B.* 108, 243-254
- 48 Smith R.M., Alberty R.A. (1956) The apparent stability constants of ionic complexes of various adenosine phosphates with divalent cations. *J.Am.Chem.Soc.* 78, 2376-2380
- 49 Stouthamer A.H. (1977) Energetic aspects of the growth of microorganisms. In: *Microbial energetics.* (Haddock B.A., Hamilton W.A., eds.) Cambridge Univ.Press, London, 285-315
- 50 Stouthamer A.H., Bettenhausen C.W. (1975) Determination of the efficiency of oxidative phosphorylation in continuous cultures of *Aerobacter aerogenes*. *Arch.Microbiol.* 102, 187-192
- 51 Sturtevant J.M. (1941) Calorimetric investigations of organic reactions. II. A new calorimeter. The mutarotation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucose. *J.Phys.Chem.* 45, 127-147
- 52 Surholt B. (1977) Production of volatile fatty acids in the anaerobic carbohydrate catabolism of *Arenicola marina*. *Comp. Biochem.Physiol.* 58B, 147-150
- 53 Thauer R.K., Jungermann K., Decker K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol.Rev.* 41, 100-180
- 54 Walker D.J., Forrest W.W. (1964) The application of calorimetry to the study of ruminal fermentation in vitro. *Australian J. Agr.Res.* 15, 299-315
- 55 Weast R.C. (1974) *Handbook of chemistry and physics.* 55th edition, 1974-1975, CRC Press, Cleveland
- 56 Widdows J., Bayne B.L., Livingstone D.R., Newell R.I.E., Donkin P. (1979) Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. *Comp.Biochem.Physiol.* 62A, 301-308
- 57 Wilhoit I. (1969) Thermodynamic properties of biochemical substances. In: *Biochemical Microcalorimetry* (Brown H.D., ed.) Academic Press, New York, 33-81, *ibid.* 305-317
- 58 Woledge R.C. (1972) In vitro-calorimetric studies relating to the interpretation of muscle heat experiments. *Cold Spring Harb.Symp.quant.Biol.* 37, 629-634
- 59 Zwaan A. de (1977) Anaerobic energy metabolism in bivalve molluscs. *Oceanogr.Mar.Biol. Ann.Rev.* 15, 103-187
- 60 Zwaan A. de, Skjoldal H.R. (1979) Anaerobic energy metabolism of the scavenging isopod *Cirolana borealis* (Lilljeborg). *J.comp.Physiol.B* 129, 327-331