

Über Phosphatase¹

Von PAUL OHLMEYER

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforschg. 1, 18—30 [1946]; eingegangen am 18. Oktober 1945)

Eine Dialysierapparatur nach dem Gegenstromprinzip wurde entwickelt. Die Dissoziationskonstante der Verbindung Prostataphosphatase-Glycerinphosphorsäure hat bei 37° und p_{H} 4,5 den Wert $4,7 \cdot 10^{-3}$. Die Hemmung dieser Phosphatase durch Fluorid wird durch Magnesiumsalz vergrößert; sie beruht auf der reversiblen Bildung von wirkungslosem Phosphatase-Magnesium-Fluorid. Die Dissoziationskonstante dieser Verbindung hat bei 37° und p_{H} 4,5 den Wert $4,6 \cdot 10^{-9}$. Die Fluoridhemmung wird auch durch Salze von Ca, Zn, Cd, Mn, Fe, Co, Ni und Cu vergrößert. Die Phosphatase des Harns und der Prostata wird, vor allem nach kathodischer Dialyse, durch Magnesiumsalz aktiviert. Muskelphosphatase, die bei p_{H} 4,5 wirksam ist, wird durch Magnesiumsalz stark aktiviert. Aktivierung der Phosphorylase der Hefe durch Mangansalz ist noch in der Salzkonzentration 10^{-6} Mole/Liter nachweisbar. Die untersuchte Phosphatase ist empfindlich gegen ultraviolettes Licht. Die Lösung zeigt während der Bestrahlung eine Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit, die keinen Gang mit der Fermentinaktivierung aufweist. Aus Adenosintriphosphorsäure wird durch das Ferment die Phosphorsäure quantitativ abgespalten. Das Prostataferment katalysiert die Synthese von Glycerinphosphorsäure aus Alkohol und Säure. Das synthetische Produkt wurde als krystallisiertes Bleisalz isoliert. Es bestand zur Hälfte aus α -Ester, der optisch inaktiv war. Die Synthese ist abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration; sie tritt bei p_{H} 6 ein, bei p_{H} 4 nicht. Die Gleichgewichtskonstante von Glycerinphosphorsäure hat bei 20° und p_{H} 5,8 den Wert 1,8. Aus der Änderung der Gleichgewichtskonstante mit der Temperatur errechnet sich für Zimmertemperatur eine molare Spaltungswärme von — 1300 cal. Die calorimetrische Messung der Spaltungswärme ergab — 1300 cal pro Mol. Aus dieser Übereinstimmung folgt ein echtes Gleichgewicht, eingestellt durch das Ferment als echten Katalysator. Aus den Gleichgewichtsversuchen wird geschlossen, daß das HPO_4^{2-} Ion die Reaktionsform der Phosphorsäure in der enzymatischen Synthese ist.

In der vorliegenden Arbeit teile ich Untersuchungen zur Kinetik, Chemie und Thermodynamik des Systems der Phosphatase mit. Sie befassen sich vorwiegend mit dem Ferment der Prostata, das 1935 von W. Kutscher und H. Wolbergs², und mit dem Ferment des Harns, das 1925 von Fr. Demuth³ entdeckt worden ist.

Im Laboratorium von W. Kutscher wurden wesentliche Merkmale des Prostataferments gefunden: Proteinnatur, Optimum der Aktivität in saurer Lösung, relative Unempfindlichkeit gegen Magnesiumsalz und Hemmbarkeit durch Fluorid.

¹ Abdruck einer am 23. Juni 1944 bei der Redaktion der Zeitschrift für physiolog. Chemie eingegangenen, aber dort nicht mehr erschienenen Arbeit mit Genehmigung der Herausgeber.

² Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **236**, 237 [1935].

³ Biochem. Z. **159**, 420 [1925].

Wir untersuchten vor allem die Ferment-Substrat-Verbindung, den Mechanismus der Fluoridhemmung, die Aktivierung durch Magnesium, die Synthese von Substrat, die Substratsspaltung als Gleichgewichtsreaktion und ihre Wärmetönung.

I. Ferment und Substrat

a) Gewinnung der Fermentpräparate. Eine neue Dialysierapparatur

Prostatasekret und Ejakulat sind die reichsten natürlichen Phosphataselösungen. Die immerhin beträchtliche Mengen von Begleitstoffen hat bei der Untersuchung des Ferments keine nachweisbare Störung verursacht, und für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche sind Präparate verwandt worden, die lediglich durch



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

scharfes Zentrifugieren und Dialyse gereinigt waren⁴. Ebenso war das Ferment aus (männlichem) Harn vorbehandelt.

Wir dialysieren kleine Flüssigkeitsmengen in Kollodiumhülsen von 8 ccm Inhalt, die bis zu 3 Tagen in reinem Wasser bewegt werden. Um rasch und reichlich, osmotisch nicht verdünnte Präparate zu gewinnen, benutzen wir eine von uns entwickelte Apparatur. Sie beruht auf dem Gegenstrom von Lösung und Wasser bei relativ großer Membran.

Die Lösung fließt aus einem Vorratsgefäß durch ein System von waagerechten geknitterten Kollodiumschläuchen von 0,3 cm Durchmesser und 450 cm wirksamer Länge. Dieses

ohne Wartung und mit einer Wirkung, die sich aus Tab. 1 ergibt.

Der Konzentrierung der Kolloide entspricht eine erhöhte Fermentwirkung der Volumeneinheit. Da der wirksame Raum für die Lösung etwa 15 ccm beträgt, standen in dem beschriebenen Versuch bereits nach 3 Stdn. 20 ccm der dialysierten Fermentlösung zur Verfügung.

b) Der Spaltungsansatz

Als Substrat verwenden wir vor allem β -glycerinphosphorsaures Natrium, daneben Kalium glycerinophosphoricum, beide von Merck. Der Ansatz von 7,0 ccm ist in der Regel in bezug auf das Substrat $0,8 \cdot 10^{-2}$ molar und mit Citratpuffer auf

	Harn	Dialysierte Lösung	Dialysat (= Wasserverbrauch)
Volumen in ccm	400	172	1885
Phosphat in $\gamma \text{ P}_2\text{O}_5$ pro ccm . . .	2680	3	566

Tab. 1. Stromdialyse von Harn. Dauer: 14 Stunden.

Teile des Ferments	100	85	70	60	50	40	25	15	8	2	0,5
Gespaltenes Substrat in $\gamma \text{ P}_2\text{O}_5$	748	675	611	568	503	447	338	231	131	47	10

Tab. 2. Menge und Wirkung der Harnphosphatase.

trägt am Ende eine Kapillare, deren Weite und Niveau die Strömungsgeschwindigkeit bestimmen. Der Schlauch ist von einem 0,45 cm weiten Glasrohr umgeben, durch das aus einer Mariotteschen Flasche das Wasser fließt, und zwar mit einer Geschwindigkeit, die durch die Höhendifferenz von Einlauf und Auslauf bestimmt wird. Durch Einstellung des Spiegels der Lösung im Vorratsgefäß gegen das Niveau des Wasserausflusses regeln wir auch das Verhältnis der Drucke zu beiden Seiten der Membran, so daß Wasser hindurchtreten und die Kolloide also konzentriert werden können. Zur Vermeidung einer Infektion wird die Lösung mit Toluol und das Wasser mit etwas Chloroform versetzt. Der Apparat arbeitet 48 Stdn.

⁴ Hrn. Dozent Dr. H. Hüllstrung haben wir für die Versorgung mit Material aus der Hautklinik der Universität Tübingen bestens zu danken.

$p\text{H}$ 4,5 gebracht. Er reagiert 2 Stdn. bei 37° und wird durch Trichloressigsäure oder bei verschwindendem Eiweißgehalt durch Zugabe von Molybdat in Schwefelsäure zur Phosphatbestimmung nach Lohmann u. Jendrassik⁵ abgetötet.

Unter diesen Bedingungen spaltet 1 γ Prostataferment (Ejakulat nach der beschriebenen Reinigung) durchweg 200 γ Phosphorsäure aus dem β -Ester ab.

Die Bildung von anorganischem Phosphat ist bei dieser Substratkonzentration keine lineare Funktion der Fermentmenge, und um Fermentmengen vergleichen zu können, nehmen wir eine Wirkungskurve auf. Eine mit Harnferment gewonnene Kurve geben wir tabellarisch wieder (Tab. 2). Mit Rücksicht auf die geringe Wirkung des stark verdünnten Ferments betrug die Reaktionszeit 5 Stunden.

⁵ Biochem. Z. 178, 419 [1926].

c) Die Dissoziationskonstante der Ferment-Substrat-Verbindung (mitbearbeitet von C. Kioes)

Die Krümmung der Wirkungskurve erklärt sich daraus, daß die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Verbindung von Ferment und Substrat bestimmt wird; deren Konzentration aber wird mit relativer Erhöhung der Fermentkonzentration nach Maßgabe der Dissoziationskonstante kleiner. Die Dissoziationskonstante der Ferment-Substrat-Verbindung errechnen wir, indem wir das Massenwirkungsgesetz auf die Dissoziation anwenden. Die Verhältnisse liegen ziemlich einfach, weil die Reaktion unter den gewählten Bedingungen praktisch zu Ende verläuft, eine Bindung der Endprodukte an das Ferment also zu vernachlässigen ist.

Wir setzen die Reaktionsgeschwindigkeit v der Konzentration c_{FmS} der Ferment-Substrat-Verbindung proportional und schreiben

$$v = k \cdot c_{FmS}. \quad (1)$$

Ist das Substrat in großem Überschuß, so sollte das Ferment mit Substrat gesättigt sein; die Geschwindigkeit ist deswegen maximal und es gilt

$$v_{\max} = k \cdot c'_{FmS}. \quad (2)$$

Bei niedriger Substratkonzentration und also mangelnder Sättigung können wir das freie Ferment angeben als

$$c_{Fm} = c'_{FmS} - c_{FmS}. \quad (3)$$

Aus den Gleichungen (1), (2) und (3) folgt dann

$$\frac{v_{\max} - v}{v} = \frac{c'_{FmS} - c_{FmS}}{c'_{FmS}} \quad (4)$$

Nun setzen wir für die Dissoziation der Ferment-Substrat-Verbindung:

$$\frac{c_{Fm} \cdot c_S}{c'_{FmS}} = K \quad (5)$$

oder nach den Gleichungen (3) und (4)

$$\frac{(v_{\max} - v) \cdot c_S}{v} = K.$$

Wir können also die Dissoziationskonstante errechnen, wenn wir die Reaktionsgeschwindigkeiten kennen. Wir bestimmen die Geschwindigkeiten für maximale und stufenweise niedrigere Substratkonzentration, indem wir die Kurve der P-Abspaltung nach der Zeit aufnehmen. Die Geschwindigkeit für $t = 0$ ergibt sich dann in bekannter Weise aus der Neigung der Grenztangente als $v = d x / d t = \tan \alpha$. Wir drücken $\tan \alpha$ wie üblich im Einheitswinkel als Ordinate in beliebigem Maß aus.

Fermente pflegen gegen exzessiven Substratüberschuß empfindlich zu sein; in unserem Versuch wurde daher als Maximum die Substratkonzentration gewählt, die eben noch nicht hemmte. Zur Probe haben wir auch, anstatt zu differenzieren, den Verlauf zwischen 0 und 15 Minuten als Maß für die Geschwindigkeit benutzt. Es ergab sich ein und dasselbe Resultat, nämlich: $K = 4.7 \cdot 10^{-3}$ (Tab. 3).

Es versteht sich, daß die Dissoziationskonstante genauer berechnet wird, wenn man statt

Glycerin- Phosphor- säure Millimol/Ltr.	γP_2O_5 abgespalten					Reaktions- geschwindigkeit, relative Zahlen	Dissoziations- konstante $K \cdot 10^3$
	15'	30'	60'	120'	240'		
1,12	75	140	200	250	325	1	4,8
2,24	130	221	340	430	550	1,62	5,0
3,72	182	308	490	620	790	2,49	4,2
7,44	250	442	720	920	1245	3,06	5,4
14,85	288	—	880	1140	1825	4,17	3,9
22,4	300	578	894	1205	1910	4,34	4,8
74,4	378	730	1312	—	—	5,27	—
Mittel: 4,7							

Tab. 3. Dissoziationskonstante der Verbindung Phosphatase-Glycerinphosphorsäure.
Prostataferment. p_H 4,5; 37°.

der Konzentration der am Gleichgewicht beteiligten Stoffe deren Aktivitäten einsetzt, da ja diese allein das Massenwirkungsgesetz erfüllen. Diese Größen kennen wir aber nicht, wir schließen nur aus dem Fehlen eines Ganges in den Werten für K , daß die Aktivitätskoeffizienten, zumal in der hohen Verdünnung, nahe bei 1 liegen.

Ferner betrachten wir die im Ansatz hergestellte Substratkonzentration als die im Gleichgewicht vorhandene und vernachlässigen die Bindung an das Ferment, da das molare Verhältnis der beiden sehr groß ist. Wäre viel mehr Ferment oder viel weniger Substrat vorhanden, so würde ein scheinbarer Wert für die Konstante gefunden. Aus seiner Abweichung von dem wahren Wert ließen sich aber c_s in Gleichung (5) und weiter c_{FmS} und die molare Fermentkonzentration errechnen. Dazu wäre es erforderlich, extrem hohe Geschwindigkeiten zu messen.

II. Hemmung der Phosphatase durch Fluorid⁶

(Mitbearbeitet von W. Fuchs)

a) Beteiligung von Magnesium an der Hemmung. Die Dissoziationskonstante der wirkungslosen Fermentbindung.

W. Kutscher und A. Wörner haben gefunden⁷, daß die Phosphatase des Harns und der Prostata durch Fluorid in Abhängigkeit von dessen Konzentration gehemmt wird. Wir zeigen in Tab. 4, daß diese Hemmung auch von der Konzentration zugesetzten Magnesiumsalzes abhängt: das Metall vergrößert sie.

Ammonium-fluorid $c \cdot 10^3$	Magnesiumchlorid, $c \cdot 10^3$				
	—	0,5	1,0	3,0	6,0
0,4	502	464	442	328	249
0,8	273	223	191	123	83

Tab. 4. Einfluß von Magnesiumsalz auf die Fluoridhemmung der Harnphosphatase. Die Zahlen bedeuten abgespaltene γP_2O_5 .

⁶ Vorläufige Mitteilung, Naturwiss. **30**, 508 [1942].

⁷ Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **239**, 109 [1936].

Für die Theorie dieser Hemmung kommt in Betracht, daß das Ferment mit den hemmenden Stoffen eine Verbindung eingeht, die gegenüber dem Substrat wirkungslos ist⁸. Die Zahlen der an ein Fermentmolekül gebundenen Atome müssen dann als Exponenten in der Dissoziationsgleichung der Verbindung erscheinen, d. h. Phosphatase . $Mg_m F_n$ dissoziiert nach

$$\frac{c_{Fm} \cdot c_{Mg}^m \cdot c_F^n}{c_{Fm} c_{Mg_m F_n}} = K. \quad (6)$$

Für die Prüfung dieser Gleichung und für die Bestimmung von m , n und K gilt das Folgende. Wir wählen eine so hohe Substratkonzentration, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten linear und gemäß Gleichung (2) der Fermentmenge proportional gesetzt werden können. Bei verschiedenen Versuchen mit gleicher Reaktionszeit sind dann also die abgespaltene P -Mengen ein Maß für den jeweils wirksamen Anteil des Ferments:

$$\frac{c_{Fm}}{c'_{Fm}} = \frac{P}{P'}, \quad (7)$$

worin P und P' abgespaltene P -Mengen bedeuten.

Für den Fall der Hemmung gilt nun:

$$c_{Fm} c_{Mg_m F_n} = c_{Fm}, \text{ Nichthemmung} - c_{Fm}, \text{ Hemmung}.$$

Statt des Quotienten aus Gleichung (6)

$$\frac{c_{Fm}}{c_{Fm} c_{Mg_m F_n}}$$

lässt sich daher auch schreiben

$$\frac{c_{Fm}, \text{ Hemmung}}{c_{Fm}, \text{ Nichthemmung} - c_{Fm}, \text{ Hemmung}},$$

und unter Anwendung von Gleichung (7) folgt, daß er gleich ist

$$\frac{P_{\text{Hemmung}}}{P_{\text{Nichthemmung}} - P_{\text{Hemmung}}}.$$

Werden c_{Mg}^m und c_F^n bei festgehaltener Fermentmenge von 0 ansteigend variiert, so ergibt sich der für Gleichung (6) verlangte Quotient, und für m und n werden ganze Zahlen gesucht, die der Gleichung genügen.

In Tab. 5 sind für m und n die Zahlen 1 und 2 eingesetzt, und sie sind gültig, denn andere

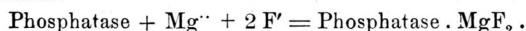
⁸ Vergl. O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. **310**, 384 [1941].

Zahlen würden für K einen Gang mit Mg^{++} oder F^- ergeben. Die Streuung der Werte für K erscheint nicht groß, wenn man beachtet, daß die aus den extremen Konzentrationen von Mg^{++} und F^- erhaltenen Produkte im Verhältnis 1:1000 stehen.

Ammonium-fluorid $c \cdot 10^3$	Magnesiumchlorid, $c \cdot 10^2$			
	—	0,2	0,8	2,0
—	720	—	—	—
0,3	—	690	610	472
		4,2	4,0	4,4
1,0	—	459	319	153
		3,5	6,4	5,4
3,0	—	92	43	25
		2,7	4,6	6,5

Tab. 5. Dissoziationskonstante von Phosphatase-magnesiumfluorid. Prostataferment. 45 Min. Reaktion. Die Zahlen bedeuten abgespaltene Phosphorsäure in γP_2O_5 , die fettgedruckten Zahlen $K \cdot 10^3$.

Der Mittelwert für K beträgt $4,6 \cdot 10^{-9}$. Wie die Dissoziationskonstante der Ferment-Substrat-Verbindung dürfte auch diese Konstante durch Einrechnung der Aktivitäten und der Ionenbindung — vor allem bei den großen Verdünnungen — keine erhebliche Korrektur erfahren. Sie zeigt, daß die Gleichung für die Bildung der inaktiven Fermentverbindung lautet:



Wahrscheinlich ist das Fluor in dieser Verbindung an das Metall gebunden.

Die Beteiligung von Magnesium an der Fluoridhemmung eines Ferments haben schon O. Warburg und W. Christian⁸ beschrieben und auf die Bildung eines Fermentkomplexes zurückgeführt. Die von ihnen untersuchte Hemmung der Enolase ist, wie O. Meyerhof und W. Schulz⁹ gefunden hatten, auch von der Konzentration anorganischen Phosphats abhängig. Die Hemmung der Prostata-Phosphatase ist in Anwesenheit verschieden hoch konzentrierten Phosphats gleich groß.

b) Diskussion

Es fragt sich nun, ob dieser Mechanismus der Fluoridhemmung allgemein zutrifft, ob also

⁸ Biochem. Z. 297, 60 [1938].

die Beteiligung von Metallatomen unerlässlich ist. Erschöpfend dialysiertes Ferment wird auch ohne Zusatz von Magnesiumsalz von Fluorid gehemmt. Liegt hier ein anderer Mechanismus vor?

Nun zeigen wir in Abschnitt III, daß die Phosphatase des Harns und der Prostata sich wie ein Metallprotein verhält. Es ist aber leicht einzusehen, daß das Ferment durch Reaktion allein des eigenen Metalls mit Fluor nicht quantitativ in die inaktive Verbindung übergehen kann. Für diese Reaktion wären nämlich zwei Gleichgewichte vorauszusetzen:

$$\frac{c_{\text{Protein}} \cdot c_{\text{Me}}}{c_{\text{Fm}}} = K$$

und

$$\frac{c_{\text{Protein}} \cdot c_{\text{Me}} \cdot c^2 F}{c_{\text{Fm}} F_2} = K'. \quad (8)$$

Dividiert man K' durch K , so folgt

$$\frac{c_{\text{Fm}} \cdot c^2 F}{c_{\text{Fm}} F_2} = K''. \quad (9)$$

In Gleichung (9) tritt die Metallkonzentration nicht auf. Das bedeutet, daß die diskutierte Reaktion keine Abhängigkeit von zugesetztem Metallsalz zeigen darf; sie ist also auszuschließen.

Wir halten es für wahrscheinlich, daß das einem Fermentmolekül eigene Metall dissoziieren und einem anderen Molekül zum Aufbau der Fluoridverbindung dienen kann. So wäre denn der oben dargestellte Mechanismus allgemein gültig.

Wenn Substrat und Hemmstoffe in definierten Gleichgewichten mit Phosphatase reagieren, so bedeutet das die Möglichkeit einer Konkurrenz der beiden um das Ferment. Es ist also zu erwarten, daß das Ausmaß der Fluoridhemmung bei niedriger Substratkonzentration groß und bei hoher klein ist. Diese Beobachtung haben W. Kutscher und H. Wüst¹⁰ auch gemacht, und wir können sie bestätigen. Unter Verwendung der Gleichungen (5) und (8) lassen sich diese Beziehungen formulieren, um ihre exakte Prüfung haben wir uns jedoch nicht bemüht.

¹⁰ Biochem. Z. 310, 292 [1941].

Zusatz	10 ⁻³ -mol.					2 · 10 ⁻³ -mol.		
	Ca ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Cd ⁺⁺	Mn ⁺⁺	Fe ⁺⁺	Co ⁺⁺	Ni ⁺⁺	Cu ⁺⁺
—	816	733	1160	1025	882	1362	1362	1362
Me	793	609	1135	1005	760	1275	1305	1342
0,9 · 10 ⁻³ F'	404	379	261	600	337	1036	1036	1036
Me + F'	282	165	196	379	95	757	667	319

Tab. 6. Wirkung von Metallen auf die Fluoridhemmung der Phosphatase. Harnferment. Metallechloride. 2 Stdn. Reaktion. Die Zahlen bedeuten abgespaltene γ P₂O₅.

Vor-behandlung	Ferment	Zuges. Mg $c \cdot 10^3$	P ₂ O ₅ abgespalten		prozent. Steigerung
			ohne Mg	mit Mg	
WD	H	5,0	297	344	20
WD	H	15,0	148	192	66
FD	P	0,5	597	647	15
FD	P	0,25	949	1275	56
FD	H	0,5	31	49	66
FD	H	1,0	527	584	17
FD	H	1,0	266	357	44
KD	P	0,6	416	438	7,5
KD	H	3,6	127	150	22
KD	H	0,4	364	487	44

Tab. 7. Steigerung der Wirkung dialysierten Ferments durch Magnesium. β -Glycerinphosphorsäure.

H: Harnferment. P: Prostataferment. WD: Dialyse gegen Wasser. FD: Dialyse gegen Fluorid. KD: Kathodische Dialyse.

c) Beteiligung anderer Metalle an der Hemmung

Anfangs glaubten wir, den Einfluß von Magnesium auf die Fluoridhemmung zur analytischen Bestimmung von Magnesium und Fluor heranziehen zu können; dann fanden wir jedoch, daß auch zahlreiche andere Metalle eine ähnliche Wirkung geben, Tab. 6 faßt diese Versuche zusammen.

Es ist bemerkenswert, daß Mn, Fe, Co und Ni nach der Feststellung von L. Massart und L. Vandendriessche¹¹ Phosphatasen auch aktivieren können.

III. Magnesium als Bestandteil des Ferments

(Mitbearbeitet von W. Fuchs)

Seit H. Erdmann¹² zeigen konnte, daß Nierenphosphatase durch Magnesiumsalz akti-

¹¹ Naturwiss. 28, 143 [1940]; vergl. R. Cloe-

vierbar ist, wurde diese Eigenschaft bei zahlreichen Fermenten gefunden, die die Esterbindung und Esterspaltung der Phosphorsäure bewirken. Daher prüfte W. Kutscher die Phosphatase des Harns und der Prostata, fand aber nur minimale Effekte.

Wir können bestätigen, daß eine Aktivierung durch Magnesium bei manchen Fermentpräparaten ausbleibt, jedoch sagt unsere Statistik aus, daß sie die Regel ist. Die Wirkungssteigerung durch das Metall reichte niemals an die Befunde mit Nierenphosphatase heran, nur in seltenen Fällen betrug sie über 250%. Raschere Reaktion mit Mangan an Stelle von Magnesium haben wir nur ein paarmal beobachten können; sie betrug 20—60%.

Eine Voraussetzung für diese Versuche ist tens, Naturwiss. 28, 252 [1940] u. E. Bamann, Naturwiss. 28, 535 [1940].

¹² Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 177, 211 [1928].

sorgfältige Dialyse. Die besten Ergebnisse erhielten wir nach zwei Methoden: 1. Dialyse gegen Wasser, gegen 0,01-*m*. Ammoniumfluorid und wieder gegen Wasser; 2. kathodische Dialyse¹³, ein Verfahren, bei dem die Anode innerhalb der semipermeablen Zelle, die Kathode außerhalb angebracht ist.

Wir verwandten Fermentlösungen, die gegen Wasser ausdialysiert waren, und legten in länglichen Zellen von 10 ccm Inhalt über einige Stunden 20—40 Volt aus einer Trockenbatterie an. Der Verlauf der Stromstärke wurde nicht verfolgt. — Mit der kathodischen Dialyse ist immer eine irreversible Wirkungsabnahme verknüpft.

In Tab. 7 geben wir Beispiele mittlerer Aktivierung aus Reihen von insgesamt 80 Versuchen wieder. Für ihre Auswertung wurde die Kurve nach Tab. 1 zugrunde gelegt.

Aus unseren Versuchen schließen wir, daß die Phosphatasen des Harns und der Prostata schwer dissoziierende Metallproteide sind. Wenn aber Metall ein Bestandteil des Ferments ist, so muß die Aschelösung der untersuchten Präparate die Fluoridhemmung vergrößern. Dies ist der Fall.

Wir lösen die Asche aus einer gegebenen Menge Harnferment in 0,1-*m*. Salzsäure und puffern diese Lösung mit Citrat.

ccm Aschelösung . . .	—	0,1	0,3	0,5
γ P ₂ O ₅ abgespalten . .	255	203	154	122

Tab. 8. Einfluß von Fermentasche auf die Fluoridhemmung. Harnferment. β-Glycerinphosphorsäure. 0,8. 10⁻³-*m*. Fluorid.

Analog wirkt die Asche von Prostatasekret. Aus ihrer Lösung haben wir auch das Tripelphosphat gefällt und errechnen für Magnesium 4,5 γ in 4,5 ccm Sekret mit 0,614 mg Trocken gewicht. Diese Ergebnisse beweisen die Möglichkeit für ein Metallproteid, nicht seine Existenz.

IV. Versuche mit Muskelphosphatase

Mit der Phosphatase des Muskels, die bei saurer Reaktion wirksam ist, hat Cl. Knoevenagel¹⁴ Versuche angestellt, aus denen

¹³ P. Ohlmeier, Naturwiss. **29**, 672 [1941].

¹⁴ Biochem. Z. **305**, 337 [1940].

eine geringe Aktivierung durch Magnesiumsalz hervorgeht. Die Autorin verwandte Muskelbrei, über dessen Zubereitung für die Aktivierungsversuche in ihrer Mitteilung nichts enthalten ist.

Wie wir im folgenden zeigen, wird die Phosphatase des wäßrigen Muskelextrakts nach Dialyse durch Magnesiumsalz bei saurer Reaktion etwa so stark aktiviert wie Nierenphosphatase bei alkalischer Reaktion, nämlich auf mehr als das Zehnfache des Ausgangswertes.

Wir verreiben Beinmuskulatur vom Meerschweinchen mit 1,3 Tln. Wasser, bewahren den Brei 24 Stdn. bei +1° auf, zentrifugieren und dialysieren den Überstand 24 Stdn. gegen Wasser. Dieser Extrakt wird mit der Endverdünnung 1: 70, d. h. mit 0,30 mg Trockensubstanz im Versuch angewandt.

Magnesiumchlorid, c. 10 ² .	—	0,17	1,8	3,9
γ P ₂ O ₅ abgespalten . . .	19	123	210	230

Tab. 9. Muskelphosphatase, abhängig von Magnesiumsalz. Ansatz mit β-Glycerinphosphorsäure bei pH 4,5 (vergl. Tab. 1).

Nach unseren Ergebnissen mit den Fermenten des Muskels, des Harns und der Prostata halten wir dafür, daß alle Phosphatasen im Verhalten gegenüber Magnesium grundsätzlich übereinstimmen; dies um so mehr, als auch andere Phosphatasen, die in saurem Milieu wirksam sind, wie das Ferment der roten Blutkörperchen (J. R o c h e¹⁵) und das der Hefe (A. Schäffner und E. Bauer¹⁶) als aktivierbar durch Magnesium erkannt worden sind. Wenn es sich aber um Metallproteide handelt, so sind sie im Dissoziationsvermögen des Metalls verschieden und folglich leichter oder schwerer zu erkennen.

V. Exkurs über Phosphorylase

Die Wirkung von Mangan auf Gärungsfermente wurde zuerst von E. Buchner¹⁷ ge-

¹⁵ Biochemical J. **25**, 1724 [1931].

¹⁶ Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **232**, 66 [1935]; vergl. auch L. Massart u. R. Dufait, Naturwiss. **27**, 806 [1939].

¹⁷ Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **46**, 136 [1905].

sucht, dann von E. Negelein¹⁸ wahrscheinlich gemacht und schließlich im Heidelberger Institut gefunden¹⁹. Zu diesen Fermenten gehört die Phosphorylase, welche an der Umesterung der Phosphorsäure von Phosphobrenztraubensäure auf Zucker beteiligt ist. Nachdem wir gefunden hatten, daß wenige Mikrogramm Mangan eine Wirkung auf Phosphorylase zeigen, haben wir neuerdings Versuche zur Feststellung der unteren Wirkungsgrenze angestellt. Es ergab sich, daß Manganionen die Reaktion noch in der Konzentration $6,6 \cdot 10^{-7}$ Mole/Liter, das sind $0,036 \gamma$ im ccm, beschleunigen. Man bestimmt hier die Größe der Latenzzeit, weil nach Eintritt der Reaktion die Geschwindigkeit rasch auf das Maximum steigt.

Da der Ausschlag bei einer ausreichenden Anzahl von Fällen das Dreifache der mittleren Abweichung überschreitet, folgt, daß die Spuren von Mangan in unserem Versuch wirksam waren. Unser Ansatz enthielt aber zum Zwecke der Sensibilisierung des Fermentsystems schon einen Zusatz von Magnesium, das dem Mangan wirkungsgleich ist. Um so bemerkenswerter ist der Einfluß des Schwermetalls.

VI. Spaltung von Adeninnucleotid durch Prostataferment

Die Frage, ob es eine spezifische „Adenylpyrophosphatase“ gibt, ist seit den Untersuchungen von E. Jacobsen²⁰ umstritten. Die Phosphatase im Ejakulat spaltet die Phosphorsäure aus Adeninnucleotid quantitativ ab.

Zahl der Versuche	Fälle, in denen Mangan unterlegen	Prozente		
		Minimalwert	Mittelwert	Mittlere Abweichung
26	3	60	91,5	$\pm 2,6$

Tab. 10. Aktivierung der Phosphorylase durch kleine Mengen Mangan. Im Hauptaum der Gefäße 0,3 ccm Hefemacerationssaft, 45 Stdn. dialysiert; 33 mg Glucose; 0,07-*m*. Phosphatpuffer; 0,002-*m*. Magnesiumchlorid; 0,1 ccm Wasser bzw. $6,6 \cdot 10^{-6}$ -*m*. Mangansulfat. In der Birne: 0,01 ccm 0,014-*m*. Phosphoglycerinsäure. Volumen der Gesamtflüssigkeit 1,0 ccm; p_H 6,8. Im Gasraum: Stickstoff; 28°.

Substrat	Verdünnung des Ferments	Zeit in Stunden			Maximum nach Einwaage
		1	2	22	
Adenosinmonophosphat	1:4000	178	229	—	234
Adenosintriphosphat	1:500	211	230	217	264

Tab. 11. p_H 3,7; 37°; Spaltung in γP_2O_5 angegeben

Zur Anlage von Tab. 10 sind wir folgendermaßen verfahren: Wir lassen Hefeferment mit Phosphoglycerinsäure (im Gleichgewicht mit Phosphobrenztraubensäure) und Glucose reagieren und messen manometrisch die Kohlensäure, die aus freiwerdender Brenztraubensäure carboxylatisch entsteht. Die Zeiten, die bis zur Entwicklung von 40 mm³ im Ansatz mit Mangan verstreichen, drücken wir als Prozente der Zeiten für die zugehörige Wasserkontrolle aus. Aus den Prozentsätzen errechnen wir den Mittelwert und für diesen die mittlere Abweichung.

¹⁸ Vergl. O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. **287**, 294 [1936].

¹⁹ P. Ohlmeyer u. S. Ochoa, Biochem. Z. **293**, 338 [1937].

Aus der Tabelle geht hervor, daß das Monophosphat viel rascher hydrolysiert wird als das Triphosphat²¹.

VII. Lichtempfindlichkeit des Ferments

Messung der elektrischen Leitfähigkeit

Wie manche andere Fermente so wird auch die Phosphatase des Harns und der Prostata

²⁰ Biochem. Z. **242**, 292 [1931].

²¹ Wegen der Spaltung von Adeninnucleotid durch Knochenphosphatase vergl. W. L. Liebnecht, Biochem. Z. **303**, 96 [1939].

durch ultraviolettes Licht zerstört. Bei der statistischen Natur solcher Inaktivierungen, die einzelne Moleküle ganz oder gar nicht erfassen²², ist für die überlebenden Fermentmoleküle keine Änderung der Eigenschaften zu erwarten. Bei unseren Versuchen blieben Aktivierbarkeit durch Magnesium und Hemmbarkeit durch Fluorid bei teilweiser Inaktivierung denn auch erhalten, Tab. 12 gibt ein Versuchsbispiel wieder.

Nun haben wir Versuche über die Wirkung von ultraviolettem Licht auf die elektrische Leitfähigkeit von Lösungen anorganischer und organischer Stoffe ausgeführt²³, und es inter-

keitskurve um die Zeit der Erschöpfung des Ferments keinen Knick aufweist; eine Beziehung zur Inaktivierung des Ferments ist also nicht sichtbar.

VIII. Synthetische Wirkungen des Ferments

a) Isolierung synthetischer Glycerinphosphorsäure

Der Versuch, einen Phosphorsäureester mittels Phosphatase zu synthetisieren, ist in präparativem Maßstab zuerst H. D. Kay²⁴ gelungen. Er benutzte das Ferment des Darms, das

Unbehandeltes Ferment	12 Minuten mit UV bestrahlt	Bestrahlt, 60 Minuten kath. dialysiert	Bestrahlt, dialysiert, Ansatz mit Magnesium
100	28	15,5	21,5

Tab. 12. Einfluß von Magnesium auf Phosphatase nach UV-Bestrahlung. Harnferment. Angabe der Wirkung in willkürlicher Einheit. Glycerinphosphorsäure.

Zeit in Minuten	0	8	16	24	32	40	48	56	71	168	195
γP_2O_5	947	604	378	128	62	49	0	0	0	—	—
Widerstand in Ohm	3065	2960	2810	2750	2650	2635	2625	2580	2520	2225	2230

Tab. 13. Inaktivierung und Änderung des elektrischen Widerstands von Phosphataselösung im ultravioletten Licht. Harnferment. Als Maß der Fermentaktivität sind die im Normalansatz abgespaltenen γP_2O_5 angegeben.

essierte uns, ob die Abnahme der Aktivität einer Phosphataselösung einen Gang mit der Änderung des elektrischen Widerstandes zeigte.

Die Lösung befand sich in einem Leitfähigkeitsgefäß aus Quarz, das im Thermostaten mit Quarzfenster von einer Quecksilberdampflampe parallel zur Ebene der Elektroden bestrahlt wurde. Die Messung erfolgte bei 20° in der üblichen Anordnung mit Wechselstrom nach F. Kohlrausch. Ein Stickstoffstrom bewirkte ununterbrochene Durchmischung der Flüssigkeit. Die zu gegebenen Zeiten entnommenen Proben wurden sogleich auf ihre Aktivität geprüft.

Stellt man die Werte der (gekürzten) Tab. 13 graphisch dar, so sieht man, daß die Leitfähig-

²² Zur Theorie vergl. B. Rajewsky, Biochem. Z. **227**, 272 [1930] und W. Gentner u. K. Schwein, ebenda S. 286.

²³ P. Ohlmeyer u. H. Brilmayer, Strahlentherapie, **75**, 521 [1944].

unter den Bedingungen der Spaltung Glycerin auch verestert.

Auch mit der Phosphatase der Prostata kann man Glycerinphosphorsäure darstellen.

Ansatz: 192 ccm Glycerin, 47 ccm sek. Natriumphosphat in Wasser und 1 ccm unverdünntes Ferment wurden gemischt und 45 Stdn. bei 37° belassen. Dabei wurden bei p_H 689 von 253 mg P verestert.

Isolierung: Die Flüssigkeit wurde aufgekocht, abgekühlt, mit 280 ccm Wasser, mit 100 ccm *m*-Calciumnitrat, mit Ammoniak versetzt, bis p_H = 10 war. Nach eintägigem Stehen und Zentrifugieren war die Lösung frei von anorganischem Phosphat. Sie wurde aufgekocht, abgekühlt, mit Salpetersäure schwach lackmussauer gemacht und mit 50 ccm 25-proz. Bleiacetat versetzt. Langsam fielen Nadeln von glycerinphosphorsaurem Blei. Ausbeute: 0,599 g.

Analyse: 19,72 mg der Substanz verloren in 5,5 Stdn. bei 100° im Hochvakuum über Phosphor-

²⁴ Biochemical J. **22**, 855 [1928].

pentoxyd 0,68 mg an Gewicht. In der vakuumtrockenen Substanz wurde P colorimetrisch, Pb als PbSO_4 bestimmt.

Für $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{PPb}$ (M.G. 377): P ber. 8,22%, gef. 8,12%, Pb ber. 54,8%, gef. 54,0%; P; Pb ber. 0,15, gef. 0,15. Ausbeute demnach 49 mg von 89 mg P = 55%.

Das Präparat war optisch inaktiv. Die Verteilung auf α - und β -Ester bestimmten wir nach P. Fleury und R. Paris²⁵ mit Überjodsäure, die nur die α -Verbindung oxydiert. Das Salz wurde sauer mit Schwefelwasserstoff entbleit und mit Kalilauge neutralisiert. Substanz mit 0,695 mg P verbrauchte 2,15 mg Überjodsäure, entsprechend 0,347 mg P als α -Glycerinphosphorsäure. Das synthetische Produkt bestand also zu genau gleichen Teilen aus dem α - und dem β -Ester.

b) *Abhängigkeit der Synthese von der Wasserstoffzahl* (mitbearbeitet von C. Kioes)

Unsere präparativen Syntheseversuche wurden bei p_{H} 6 angesetzt. Arbeitet man saurer, so wird weniger Phosphat verestert, bei p_{H} 5 bleibt die Veresterung aus.

p_{H}	3,5	4,0	5,4	6,0	6,4	7,0
Prozent anorganisches Phosphat verestert	0	0	32	32	36	16

Tab. 14. Abhängigkeit der Phosphatveresterung von der Wasserstoffzahl.

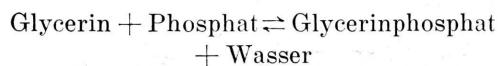
Ansatz: 20 ccm Glycerin; 0,5 ccm Phosphat mit 0,8 mg P_2O_5 ; 2 ccm Prostataferment 1:10; 2,5 ccm 0,1-n. Salzsäure bzw. Natronlauge; 37°; 18 Stn. Reaktion.

Der niedrige Wert bei p_{H} 7,0 beruht auf verringriger Reaktionsgeschwindigkeit; nach 3 Tagen wurden über 30% erreicht. Bei $p_{\text{H}} \leq 5$ ist das Gleichgewicht so sehr zugunsten der Spaltprodukte verschoben, daß es nicht zu beobachten ist.

Die Erscheinung, daß ein enzymatisches Gleichgewicht mit der Wasserstoffionenkonzentration verschoben werden kann, ist soweit wir wissen, zum erstenmal im Institut von O. Meyerhof durch H. Lehmann²⁶ unter-

sucht worden. Lehmann zeigte, daß die Verteilung der gebundenen Phosphorsäure zwischen dem Adenylsäuresystem und Kreatin von c_{H^+} abhängt. Soll man in diesem und in unserem Falle annehmen, daß diese Wirkung des Ionenmilieus auf das Ferment zu beziehen sei? Kann ein Ferment also, vielleicht infolge p_{H} -abhängiger Konstanten der Reaktionsgeschwindigkeit, eine bestimmte Konzentration von Ausgangs- und Endprodukten erzwingen und insofern von einem echten Katalysator verschieden sein?

Diese Frage hat bei einer ähnlichen Sachlage Meyerhof sich vorgelegt, als er das temperaturabhängige System der Zymohexase untersuchte. Er verneinte sie, gestützt auf die thermodynamische Betrachtung der Gleichgewichtsreaktion²⁷. So haben auch wir zunächst festzustellen gesucht, ob sich bei der Reaktion



ein echtes thermodynamisches Gleichgewicht einstellt.

c) *Die Gleichgewichtskonstante. Thermodynamische Berechnung der Reaktionswärme*

In den ersten Versuchen (Tab. 15) wurde die Konstante des Gleichgewichts für 20° und p_{H} 5,8 bestimmt. Wir fanden

$$\frac{c_{\text{Glycerin}} \cdot c_{\text{Phosphat}}}{c_{\text{Glycerinphosphat}} \cdot c_{\text{Wasser}}} = K = 1,82.$$

c_{Glycerin}	Anorg. P_2O_5		c_{Wasser}	K
	mg	$c \cdot 10^3$		
10,86	0,301	2,12	1,24	11,1
10,86	0,308	2,17	1,19	11,1
2,72	0,457	3,22	0,14	44,4
2,72	0,462	3,26	0,10	44,4
10,86	1,580	10,85	5,65	11,1
10,86	1,650	11,32	5,18	11,1

Mittel: 1,82

Tab. 15. Bestimmung der Gleichgewichtskonstante, Prostataferment. Reaktionszeit: 72 Stdn.

²⁵ C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **196**, 1416 [1933].
²⁶ Biochem. Z. **281**, 271 [1935]; vergl. auch J. Banga, Studies from the Inst. of Med. Chem. Univ. Szeged **3**, 59 [1943]; ferner P. Ohlmeier u. L. Mehmke, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **272**, 212 [1942].

²⁷ S. bes. O. Meyerhof, Biochem. Z. **277**, 83 [1935].

Die Aktivitätskoeffizienten standen auch für die Berechnung dieses Gleichgewichts nicht zur Verfügung. Die Bindung der reagierenden Stoffe an das Ferment kann wegen ihres sehr großen Überschusses wiederum vernachlässigt werden.

Das echte Gleichgewicht wird daran erkannt, daß es die Reaktions-Isochore von van't Hoff

Temperatur. Die Anwendung dieses Kriteriums für das echte Gleichgewicht läßt jedoch bei unserer Reaktion keinen bindenden Schluß zu, da sich ihre Gleichgewichtskonstante mit der Temperatur zu wenig ändert. Indessen ist die Bestimmung der Phosphorsäure genau genug, um die Errechnung der Wärmetönung nach der Reaktions-Isochore zu ermöglichen, und wir

Versuch	T	Reaktionszeit in Stunden	Anorg. Phosph. c. 10^3	Org. Phosph. c. 10^3	K_T	U in cal
A	—	0	2,77	—	—	1240
	310	14	1,75	1,04	1,71	
	274	24	1,92	0,86	2,2	
	310	14	1,80	0,98	1,84	
B	—	0	—	2,66	—	1380
	310	15	1,68	0,97	1,72	
	274	48	1,85	0,81	2,29	
	310	24	1,68	0,97	1,72	
C	—	0	3,36	—	—	1250
	274	48	2,27	1,08	2,10	
	310	24	2,07	1,29	1,61	
D	—	0	2,89	—	—	1230
	310	48	1,73	1,16	1,49	
E	—	0	2,78	—	—	1230
	274	48	1,84	0,95	1,49	

Tab. 16. Errechnung der Wärmetönung aus den Gleichgewichtskonstanten.
Prostataferment. 10,86-*m*. Glycerin. 11,1-*m*. Wasser.

erfüllt. Diese Gleichung lautet, wenn keine äußere Arbeit geleistet wird,

$$\frac{d \ln K}{d T} = \frac{U}{R T^2}.$$

Durch Integration und Einsetzen dekadischer Logarithmen und des Wertes 1,986 für R folgt

$$U = \frac{4,571 (\log K_2 - \log K_1)}{T_2 - T_1} T_1 T_2.$$

Hierin bedeutet U die Wärmetönung der Reaktion, K_1 die Gleichgewichtskonstante für die tiefere Temperatur T_1 und K_2 diejenige für die höhere T_2 .

Nach der Reaktions-Isochore bilden die Logarithmen der Gleichgewichtskonstanten innerhalb eines nicht zu großen Temperaturbereichs eine lineare Funktion der reziproken absoluten

besitzen ein Calorimeter, das die Wärme, so klein sie ist, mit ausreichender Genauigkeit zu messen erlaubt. Es wird also der Vergleich der gemessenen mit der errechneten Wärmetönung sein, der die Entscheidung darüber bringt, ob das Gleichgewicht dem zweiten Hauptsatz entspricht oder ob die Konzentrationen vom Ferment erzwungen werden.

In Tab. 16 haben wir die Versuche zur Errechnung der Wärmetönung nach der Reaktions-Isochore zusammengestellt. Ihr ist zu gleich zu entnehmen, daß das Gleichgewicht „von beiden Seiten“ erreicht werden kann. Als Glycerinphosphat wurde für die Versuche zur Einstellung vom Ester her das Kaliumsalz von Merck verwandt, weil es zu etwa 40% aus der α -Verbindung besteht und insofern dem synthetisierten Produkt ähnlich ist.

Für die genaue Errechnung der Konstanten sollten die Aktivitätskoeffizienten bekannt sein. Diese Korrekturen hätten jedoch als Faktoren auf die Differenz der Logarithmen und also auf den Wert für die Wärmetönung nur insofern einen Einfluß, als auch sie temperaturabhängig sind. Wir machen mit ihrer Vernachlässigung also keinen großen Fehler.

Als Mittel für die molare Reaktionswärme der Glycerinphosphorsäure bei Zimmertemperatur finden wir 1275 cal. Da das Gleichgewicht sich bei erniedriger Temperatur zugunsten der Spaltprodukte verschiebt, ist für die Spaltung exotherme Reaktion zu erwarten.

0,15 ccm Ferment in 20 ccm 0,035 m Substrat eingekippt.

Aus der guten (zufällig numerischen) Übereinstimmung zwischen der thermodynamisch errechneten und der calorimetrisch gemessenen Wärmetönung der Reaktion ist zu schließen, daß es sich um ein echtes, verschiebliches Gleichgewicht handelt. Das bedeutet aber, daß seine Lage vom Katalysator unabhängig ist. Die Phosphatase ist also ein echter Katalysator; sie erhöht die Geschwindigkeitskonstanten der Spaltung und der Veresterung um den gleichen Faktor. Der oben beschriebene Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration kann sich kine-

Versuch	t (Reaktionszeit in s)	Wattsekunden über t		Reakt.-Wärme in cal	Substratumsatz in Millimol	Molare Reakt.-Wärme in cal
		vor Reaktion	bei Reaktion			
A	5580	6,84	5,94	0,215	0,19	-1170
B	4365	6,55	5,86	0,165	0,116	-1380
C	7310	2,63	1,28	0,325	0,246	-1300
D	6640	4,03	2,83	0,285	0,246	-1160

Mittel: -1275

Tab. 17. Spaltungswärme der Glycerinphosphorsäure. Prostataferment. p_H 4,5; 24,3°.

d) Calorimetrische Messung der Spaltungs-wärme

Unser Calorimeter beruht auf der Substitution der elektrischen Heizung eines kleinen Thermostaten durch chemische Wärme. Die Stromarbeit im Thermostaten vor der Reaktion ist gleich der Summe von Stromarbeit und Reaktionswärme während der Reaktion. Kennen wir die beiden Stromarbeiten, so ergibt ihre Differenz für die Versuchszeit die Reaktionswärme in Wattsekunden.

Bei der Messung der Stromarbeit sind Strom und Widerstand (der Heizspire) konstant. Die Heizzeit wird an einer elektrischen Uhr abgelesen, die vom Regulator zugleich mit dem Heizstrom ein- und ausgeschaltet wird. Wir arbeiten mit Strömen von 1—3 mA und messen Wärmemengen von 0,1 bis 5 cal, wenn diese in 1—3 Stdn. entwickelt werden. Ausführliche Angaben über die Apparatur und über einige Messungen werden wir später machen.

In den Versuchen, die in Tab. 17 zusammengestellt sind, wurden nach mehrstündigem Temperaturausgleich und Messung der Leerwärme

tisch insofern bemerkbar machen, als er die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichts verändert, wie wir es auch gefunden haben. Die Lage des Gleichgewichts indessen wird bei konstanter Temperatur durch die Konzentrationen der reagierenden Stoffe bestimmt.

Die Konzentration der Phosphationen hängt von der Wasserstoffzahl ab; die zweite Valenz der Phosphorsäure dissoziiert erst in schwach saurem Milieu, p_{K_2} ist 6,81. Unsere Lösung ist nun stark glycerinhaltig. Nehmen wir aber an, daß die Dissoziationskonstante der zweiten Phosphorsäurevalenz darum nicht erheblich verschoben ist, so folgt, daß die p_H -Grenze, die wir für die Veresterung fanden, durch p_{K_2} gesetzt ist. Das HPO_4^{2-} -Ion ist dann die Reaktionsform der Phosphorsäure in der enzymatischen Synthese. Seine Konzentration fällt bei $p_H = 5-6$ schon ins Gewicht, eine Synthese kann beobachtet werden; bei $p_H > 7$ muß die Bildung des Esters größer, die Konstante also kleiner sein. Die Angaben von D. H. Kay, der mit

„alkalischer“ Phosphatase arbeitete, lassen denn auch eine Gleichgewichtskonstante errechnen, die im Gegensatz zu der unsrigen kleiner als 1 ist. Da nun die Reaktionsgeschwindigkeiten mit der „sauren“ Phosphatase der Prostata im alkalischen Gebiet sehr klein sind, ist für die exakte Prüfung unserer Hypothese und die Berech-

nung des Gleichgewichts mit HPO_4^{2-} -Ionen eine besondere Untersuchung erforderlich.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sage ich für die Förderung meiner Arbeiten ehrerbietigen Dank. Bei dieser Untersuchung haben mir Fr. G. Schüz und Hr. H. Brilmayer wertvolle Hilfe geleistet.

Wärmemessung bei Fermentreaktionen¹

Von PAUL OHLMEYER

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforsch. 1, 30—35 [1946]; eingegangen am 18. Oktober 1945)

Es wird ein Calorimeter beschrieben, das 50 bis 250 Milligrammcalorien pro Stunde zu messen erlaubt. Die Wärmetönung der phosphatatischen Reaktion Adenosinmonophosphorsäure \rightarrow Adenosin + Phosphorsäure wurde zu — 1600 cal/mol bestimmt. Für die Wärmetönung der Reaktion Adenosintriphosphorsäure \rightarrow Adenosinmonophosphorsäure + 2 Phosphorsäure wurden in Übereinstimmung mit andersartigen Messungen von O. Meyerhof — 24000 cal/mol gefunden. Die Messung der Reaktion Fumarat + Wasser \rightarrow l(—)-Malat ergab — 3800 cal/mol, die Messung der Rückreaktion + 3900 cal/mol. Aus diesen Werten in Zusammenhang mit dem Temperaturkoeffizienten der Gleichgewichtskonstante folgt für das System der Fumarase die Einstellung eines thermodynamischen Gleichgewichts, für das Ferment also die Natur eines echten Katalysators.

Das volle Verständnis des chemischen Geschehens im Organismus setzt die thermodynamische Betrachtung voraus, und insbesondere die enzymatische Katalyse von Gleichgewichtsreaktionen verlangt die Erforschung der Energieverhältnisse. Dabei ist die Kenntnis ihres Wärmebedarfs sehr oft eine unerlässliche Bedingung. In Bestätigung und Erweiterung der bisher vorliegenden Ergebnisse, die vor allem O. Meyerhof zu verdanken sind, haben wir calorimetrische Messungen bei Fermentreaktionen unternommen, deren erste Resultate wir im folgenden mitteilen.

I. Die calorimetrische Methode

Die Apparatur

Da es leichter ist, eine Temperatur konstant zu halten, als sie mit derselben Genauigkeit zu messen, haben wir ein Verfahren der „isother-

men“ Wärmemessung entwickelt: Wir lassen die Reaktion in einem kleinen Thermostaten mit intermittierender elektrischer Heizung ablaufen, dessen bekannter Wärmebedarf dann durch die Summe von Stromarbeit und Reaktionswärme gedeckt wird. Die Differenz der Stromarbeiten vor und bei Reaktion ist also gleich der gesuchten chemisch erzeugten Wärme.

Konstante Temperatur in der Umgebung des Reaktionsgefäßes wird durch einen elektrisch geheizten Wasserthermostaten von 30 l Inhalt erreicht. Zu den Bedingungen für die Konstanz gehört ein Heizelement mit großer Oberfläche und kleiner Wärmekapazität und in seiner Nähe ein empfindliches Kontaktthermometer. Der Strom wird so gewählt, daß Heizzeit und Heizpause etwa gleich lange dauern; dadurch wird erreicht, daß die minimale Schwankung der Temperatur, die mit der unvermeidlichen Trägheit der Regulation gegeben ist, nicht wesentlich überschritten wird.

Die Schwankung um die Mitteltemperatur bestimmen wir wie folgt: Der Abkühlungskoeffizient, d. h. die stündliche Änderung der Temperatur des ungeheizten Thermostaten, ausgedrückt in Prozent der anfänglichen Temperaturdifferenz gegen die Umgebung, betrug 6,2%. Der Thermostat stand 4,3°

¹ Abdruck einer am 11. Sept. 1944 bei der Redaktion der Zeitschrift für physiolog. Chemie eingegangenen, aber nicht mehr erschienenen Arbeit mit Genehmigung der Herausgeber.