

Über die Hefekatalase.

Von
W. Issajew.

(Mitteilung aus dem Laboratorium für Technologie der Kohlehydrate des Polytechnischen
Instituts zu Warschau.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Mai 1904.)

1. Einleitung.

In dem mir am 5. Mai zugegangenen chemischen Zentralblatt Nr. 18 und Wochenschrift für Brauerei Nr. 15 befindet sich eine Mitteilung von Prof. Dr. Neumann-Wender «Die Hefekatalase». Seit einigen Monaten mit einer Untersuchung über denselben Gegenstand beschäftigt, sehe ich mich veranlaßt, über meine Versuche schon jetzt zu berichten, obgleich dieselben noch nicht abgeschlossen sind. Die Untersuchung wird gemeinschaftlich mit Herrn stud. A. Lerman ausgeführt, welcher die Versuche ausführlicher in seiner Diplomarbeit beschreiben wird.

Ich will an dieser Stelle von der Übersicht älterer Literaturangaben absehen; diese Literatur findet sich in den Arbeiten von O. Loew¹⁾ und G. Senter²⁾ zusammengestellt. Ich werde nur ganz kurz einige neuere Untersuchungen erwähnen.

Als Entdecker der Enzyme, welche das Wasserstoffsuperoxyd zersetzen — «katalysieren» — muß Schönbein angesehen werden, welcher gefunden hat, daß diese Erscheinung der «Katalyse» des H_2O_2 fast allen Pflanzenextrakten eigen ist; aber erst in jüngster Zeit hat Loew gezeigt, daß die Substanz, welche diese Katalyse hervorruft, von den anderen Enzymen

¹⁾ Catalase a new Enzyme etc. U. S. Dep. of Agric. Rep. Nr. 68. 1901.

²⁾ Das wasserstoffsuperoxydzersetzende Enzym des Blutes, Zeitschr. für physik. Chemie, Bd. 44, S. 257. 1903.

verschieden ist. Daß der Vorgang enzymatischer Natur ist, dürfte man schon daraus schließen, daß das allgemeine Verhalten von «Katalase» gegen Wärme, Reagentien etc. ganz dasselbe ist wie anderer Enzyme. Loew hat u. a. gezeigt, daß auch die Hefe eine Katalase enthält, welche sie an das Wasser abgeben kann; näher hat er die Hefekatalase nicht untersucht. Senter hat gefunden, daß die Eigenschaft des Blutes, das Wasserstoffsperoxyd zu zersetzen, einem Enzym — der Hämase — zuzuschreiben ist. Er hat hauptsächlich die Kinetik des Vorganges untersucht und dabei gezeigt, daß die Reaktion der Wasserstoffsperoxydzersetzung durch Hämase eine echt katalytische ist und zwar eine Reaktion erster Ordnung. Die Versuche von Prof. Wender hatten den Zweck, die Individualität der Hefekatalase festzustellen, da dieselbe von E. Buchner¹⁾ wiederum bezweifelt wurde. Bach und Chodat²⁾ haben aus *Sterigmatocystis nigra* eine Katalase dargestellt, welche frei von anderen Enzymen war.

Mit Studien über Hefeenzyme beschäftigt, habe ich die Erscheinung der H_2O_2 -Katalyse in den Kreis meiner Versuche herangezogen; ich suchte dabei die enzymatische Natur des Vorgangs festzustellen und den Verlauf der Reaktion zu verfolgen.

2. Untersuchungsmethoden.

Als Ausgangsmaterial diente uns untergärige Bierhefe, welche nach sorgfältigem Waschen abgenutscht und abgepreßt wurde. Die Versuche wurden nicht mit Hefe selbst, sondern mit Auszügen aus derselben und mit gefällttem Enzym angestellt. Nach verschiedenen Vorversuchen haben wir folgende Arbeitsmethode gewählt. Die Hefe wurde in dünner Schicht an der Luft getrocknet, dann mit etwas Wasser und Quarzsand zerrieben, mit der 8—10fachen Menge mit Chloroform gesättigten Wassers 2—3 Tage ausgezogen und das klare Filtrat mit Alkohol gefällt.³⁾ Der Niederschlag wurde im Vacuum über

¹⁾ Die Zymasegärung S. 77.

²⁾ Berichte 36, S. 1756.

³⁾ Im Gegensatz zu Prof. Wenders Angabe fanden wir, daß mittels Glycerin Katalase auch aus unverletzten Hefezellen, wahrscheinlich infolge der Plasmolyse, extrahiert werden kann.

Schwefelsäure getrocknet. Die katalysierende Wirksamkeit des Enzymgemisches (von den reinen Katalasepräparaten kann vorläufig keine Rede sein) wurde in folgender Weise untersucht. Die Enzymlösung und das Wasserstoffsperoxyd wurden zuerst auf die Versuchstemperatur (25° oder 0°) gebracht, dann vermischt und in den Thermostaten gestellt; von Zeit zu Zeit wurden Proben herausgenommen, in verdünnte H_2SO_4 gegossen und das unzersetzte H_2O_2 mit verdünntem Permanganat titriert. Die augenblickliche Konzentration des H_2O_2 konnte somit in Kubikzentimeter Permanganatlösung ausgedrückt werden; da die Enzymlösung eine bestimmte, obgleich gewöhnlich sehr kleine Menge $KMnO_4$ für sich verbrauchte, mußte letztere abgezogen werden. Die Permanganatlösung war gewöhnlich $1/200$ — $1/400$ molar, das Wasserstoffsperoxyd $1/120$ — $1/265$ molar.

3. Darstellung der Katalase.

Wir untersuchten zuerst, unter welchen Bedingungen man ein möglichst kräftiges Katalasepräparat erhalten könnte. Die Messung der katalytischen Kraft, auf Einheit der Trockensubstanz bezogen, gestattete uns, Präparate verschiedener Herkunft zu vergleichen. Der wässrige Hefeauszug wurde mit Alkohol versetzt, sodaß die schließliche Konzentration des letzteren 50% betrug; das Filtrat vom Niederschlag I wurde von neuem mit Alkohol behandelt, bis die Konzentration sich auf 75% erhöhte. es entstand ein neuer Niederschlag II. Die erhaltenen Niederschläge, erst mit Alkohol dann mit Äther gewaschen und getrocknet, wurden in Wasser gelöst.

10 ccm H_2O_2 (etwa 0,1 molar) mit 1 ccm Enzymlösung versetzt, verblieben 10 Minuten im Thermostat bei 25° , dann wurden 25 ccm H_2SO_4 (1 : 4) zugesetzt, mit Wasser auf 250 ccm verdünnt und mit $n/10$ $KMnO_4$ titriert.

10 ccm H_2O_2 verbrauchten $KMnO_4$	1 ccm Enzymlösung verbrauchte $KMnO_4$		Nach 10 Min. langer Reaktion	
	I	II	I	II
20,9 ccm	0,06 ccm	0,07 ccm	12,7 ccm	21,0 ccm

Da die Trockensubstanz der ersten Enzymlösung 0,104%, der zweiten 0,17% betrug, so berechnet sich die von 1 g Enzym zersetzte Menge von H_2O_2 zu:

Niederschlag I — 13,5 g, Niederschlag II — 0,06 g.

Die Permanganatmenge, welche von 1 g Enzym für sich verbraucht wurde, berechnet sich zu 57,69 bzw. 41,18 g. Wir sehen daraus, daß es genügt, die Hefeauszüge mit gleichem Volum Alkohol zu versetzen, um aus ihnen die Hauptmenge der Katalase auszufällen.

Wir versuchten, die Katalase in der Weise zu reinigen, daß der Niederschlag von neuem in Wasser gelöst, abfiltriert und dann wieder mit Alkohol gefällt wurde.

Wir erhielten folgende Resultate:

10 ccm H_2O_2 verbr. n/10 $KMnO_4$	1 ccm Enzyml.		Nach 10 Min.		Trocken- substanz		1 g Enzym zersetzt H_2O_2		$n_{10} KMnO_4$ pro 1 g Enzym	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
27,5 ccm	0,04	0,05	10,00	18,1	0,206%	0,108%	14,5 g	14,9 g	19,4 ccm	46,3

Die zweite Fällung mit Alkohol erhöht also die katalytische Kraft kaum, und da diese Reinigung mit großen Verlusten an Material verbunden ist, so haben wir davon abgesehen und uns mit einmaliger Fällung bei Katalasedarstellung begnügt. Wir ersehen aus diesen Versuchen noch, daß Enzyme für sich große Mengen Chamäleon verbrauchen, da aber die benutzten Konzentrationen derselben gewöhnlich sehr klein waren, so konnte man diese Methode anwenden.

4. Einfluß der Temperatur auf die Katalase.

10 ccm H_2O_2 (0,012 molar) wurden mit 1 ccm Katalaselösung vermischt, wobei jede von den Flüssigkeiten vorher $\frac{1}{2}$ Stunde bei betreffender Temperatur gehalten wurde; nach weiteren 10 Minuten setzte man behufs Unterbrechung der Reaktion 25 ccm H_2SO_4 (1 : 4) zu. Die Permanganatlösung war $\frac{1}{200}$ normal.

Temperatur	Nach 10 Min. zersetzes H ₂ O ₂ in ‰	Temperatur	Nach 10 Min. zersetzes H ₂ O ₂ in ‰
0°	10,6	50°	6,6
10°	11,8	60°	4,8
20°	12,2	70°	4,2
30°	13,2	80°	3,6
40°	14,0	90°	3,2

Katalaselösung, 15 Minuten gekocht, zersetzte das H₂O₂ gar nicht. Aus dieser Versuchsreihe folgt, daß das Optimum der Katalasewirkung bei ca. 40° liegt. Die Erniedrigung der Temperatur wirkt auf dieselbe bei weitem nicht so schädlich, wie die Erhöhung, da bei höheren Temperaturen die Zersetzung der Katalase von zwei Ursachen bedingt wird: von dem schädlichen Einfluß der Wärme auf die Enzyme überhaupt und von der Oxydation der Katalase durch H₂O₂, welche bei höheren Temperaturen schneller vor sich geht.

5. Einfluß der H₂O₂-Konzentration auf die Reaktion.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß zu 190 ccm H₂O₂ verschiedener Konzentration 10 ccm Katalaselösung zugesetzt wurden: beide Lösungen waren vorher auf die Versuchstemperatur gebracht. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben zu je 20 ccm herausgenommen, in verdünnte H₂SO₄ gegossen und mit Permanganat passender Konzentration ($\frac{1}{200}$ — $\frac{1}{400}$ normal) titriert. Die Berechnung der Versuche geschah nach der Formel für Reaktion erster Ordnung $0,4343 K = \frac{1}{t} \log \frac{C_0}{C_1}$, wo C₀, C₁, C₂ . . . Konzentrationen in entsprechenden Zeiten t und k die Konstante der Reaktion sind. Gleichzeitig wurden gewöhnlich drei Versuche ausgeführt, nur diese sind also unmittelbar vergleichbar:

Versuchstemperatur 25°.

Min.	H ₂ O ₂ ¹ / ₂₆₅ mol.		H ₂ O ₂ ¹ / ₁₉₇ mol.		H ₂ O ₂ ¹ / ₁₂₆ mol.	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	ccm	—	38,6	—	60,5	—
5	28,7	—	30,4	0,02074	44,7	0,02629 ?
10	22,4	0,02154	24,0	0,02064	37,6	0,02067
15	17,5	0,02149	18,6	0,02113	29,7	0,02060
20	13,6	0,02162	14,8	0,02082	23,4	0,02062
25	10,6	0,02162	11,7	0,02073	18,4	0,02067
30	8,3	0,02155	9,2	0,02076	14,6	0,02058
30	6,4	0,02172				

Min.	H ₂ O ₂ ¹ / ₁₄₀ mol.		H ₂ O ₂ ¹ / ₉₀ mol.		H ₂ O ₂ ¹ / ₇₃ mol.	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	27,3	—	41,8	—	52,1	—
5	20,5	0,02488	31,5	0,02457	39,3	0,02449
10	15,4	0,02486	23,7	0,02464	29,8	0,02426
15	11,6	0,02478	17,9	0,02455	22,6	0,02418
20	8,7	0,02483	13,5	0,02454	17,3	0,02394
25	6,5	0,02493	10,2	0,02450	13,5	0,02346
30	4,9	0,02489	7,6	0,02469	10,5	0,02318

Min.	H ₂ O ₂ ¹ / ₇₁ mol.		H ₂ O ₂ ¹ / ₅₀ mol.		H ₂ O ₂ ¹ / ₃₆ mol.	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	26,7	—	38,1	—	54,0	—
5	20,2	0,02423	29,2	0,02311	41,7	0,02245
10	15,5	0,02362	22,9	0,02110	33,0	0,02139
15	12,1	0,02293	18,5	0,02092	26,9	0,02019
20	9,6	0,02216	15,0	0,02024	23,0	0,01853
25	7,6	0,02187	12,5	0,01936	20,0	0,01725
30	6,0	0,02161	10,7	0,01839	17,6	0,01623

Wie man aus dieser Tabelle ersieht, ist die Reaktion der Wasserstoffsperoxydszerersetzung durch Hefekatalase eine katalytische, enzymatische, da die Reaktionsgeschwindigkeit in jedem Augenblicke proportional der H_2O_2 -Konzentration ist: die Konstanten der ersten Ordnung sind recht gut, es verschwindet also während der Reaktion nur ein Stoff, Wasserstoffsperoxyd, die Katalase bleibt unverändert. Dies findet aber nur bis zu einer bestimmten Konzentration von H_2O_2 statt: bei $\frac{1}{73}H_2O_2$ ist schon ein deutlicher, obgleich noch kleiner Gang der Konstanten bemerkbar: bei höheren Konzentrationen ist die Abnahme der Konstanten schon ziemlich stark. Ihre Ursache ist entweder in der Oxydation der Katalase durch H_2O_2 zu suchen — so daß die wirksame Menge derselben fortwährend abnimmt — oder in der Verwickelung der Reaktion, worüber wir uns noch an anderer Stelle äußern werden. Bei niedrigerer Temperatur und fast denselben H_2O_2 -Konzentrationen findet diese Erscheinung nicht statt, wie folgende, bei 0° ausgeführte Versuche zeigen. Hier war die Enzymkonzentration etwas größer — 20 ccm auf 180 ccm H_2O_2 .

Versuchstemperatur 0° .

Min.	H_2O_2 $\frac{1}{440}$ mol.		H_2O_2 $\frac{1}{180}$		H_2O_2 $\frac{1}{53}$		H_2O_2 $\frac{1}{33}$	
	KMnO ₄ 0,4343 K		KMnO ₄ 0,4343 K		KMnO ₄ 0,4343 K		KMnO ₄ 0,4343 K	
0	29,9	—	39,9	—	30,4	—	48,4	—
5	23,6	0,02055	31,2	0,02136	23,2	0,02347	38,1	0,02078
10	18,5	0,02085	24,4	0,02136	17,7	0,02349	30,1	0,02062
20	11,6	0,02056	14,9	0,02139	10,4	0,02329	18,7	0,02065
30	7,0	0,02102?	9,2	0,02124	6,1	0,02325	11,6	0,02067
40	4,4	0,02080	5,6	0,02132	3,5	0,02372	7,2	0,02068
60	1,7	0,02075	2,1	0,02131	1,2	0,02339	2,8	0,02062

Stärkere Konzentrationen des Wasserstoffsperoxyds sind vorläufig noch nicht untersucht worden.

Wir sehen also, daß unsere Reaktion erster Ordnung ist, doch nur in erster Annäherung: die Reaktion verläuft verschieden, je nach der Konzentration von H_2O_2 . Bei 25° z. B.

ist die Reaktionsgeschwindigkeit in verdünnten Lösungen etwas größer, als in konzentrierteren: bei 0° fanden wir das Umgekehrte bis zu $\frac{1}{33}$ normal. Bei Reaktionen erster Ordnung ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration unabhängig. Es müßten noch weitere Versuche in dieser Richtung gemacht werden; aber das steht jetzt schon fest, daß hier eine allgemeine Eigenschaft der Enzymreaktionen vorliegt und zwar darin bestehend, daß dieselben verschieden verlaufen in Abhängigkeit von der Konzentration des umzuwandelnden Stoffes. Ganz ähnliche Erscheinungen hat auch Senter bei der Blutkatalase (Hämase) gefunden. Die Hefekatalase scheint aber von der Hämase verschieden zu sein: sie ist z. B. viel widerstandsfähiger gegen Wärme, denn Senter konnte seine Versuche nur bei 0° ausführen, schon bei 10° bemerkte er beträchtliche Oxydation des Enzyms: wir arbeiteten auch bei 25° mit sehr befriedigendem Resultat.

6. Einfluß der Enzymkonzentration.

Zu 140 ccm H_2O_2 wurden verschiedene Mengen Enzymlösung zugesetzt und mit Wasser auf 200 ccm ergänzt, so daß die H_2O_2 -Konzentration überall die gleiche war, nämlich $\frac{1}{210}$ molar.

Versuchstemperatur 0°.

Min.	10ccm Enzymlösung		20 ccm		30 ccm	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	26,6	—	26,6	—	26,6	—
5	23,9	0,00929	23,3	0,01150	22,0	0,01649
10	21,9	0,00844	20,3	0,01173	18,0	0,01696
20	17,9	0,00860	15,6	0,01158	12,3	0,01676
30	14,4	0,00921	11,9	0,01164	8,4	0,01668
40	11,7	0,00891	9,2	0,01152	7,2	0,01418
60	7,8	0,00887	5,4	0,01154	3,8	0,01408

Min.	40 ccm		50 ccm		60 ccm	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	26,6	—	26,6	—	26,6	—
5	19,2	0,02831	17,4	0,03686	15,5	0,04691
10	13,9	0,02818	12,9	0,03142	9,6	0,04426
20	7,1	0,02868	6,8	0,02962	3,8	0,04225
30	3,8	0,02817	3,6	0,02895	1,7	0,03981
40	2,0	0,03096	2,0	0,03096	0,8	0,03804
60	1,8	0,01949	1,2	0,02243	0,4	0,03038

Aus diesen Versuchen folgt, daß erstens keine strenge Proportionalität zwischen der Enzymkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit besteht: die wirksame Menge des Katalysators steigt langsamer als seine Konzentration; dasselbe habe ich auch bei anderen Enzymen gefunden, so daß man wahrscheinlich hier mit einer Erscheinung allgemeiner Natur zu tun hat.

Eine zweite Folgerung aus diesen Versuchen ist, daß mit zunehmender Enzymkonzentration die Konstanten der Reaktion sinken: bei schwachen Katalasemengen bleiben sie konstant, oder nehmen höchstens am Ende der Reaktion etwas ab, bei stärkeren aber zeigt sich diese Abnahme recht bald und desto früher, je größer die Enzymmenge ist. Dasselbe geht aus Versuchen bei 25° hervor, wie folgende Tabelle zeigt. Hier war die Konzentration der Enzymlösung stark: zu 200 ccm H₂O₂ wurden 1,2 . . . ccm Enzymlösung zugesetzt.

Min.	1 ccm; H ₂ O ₂ ¹ / ₂₁₂		2 ccm; H ₂ O ₂ ¹ / ₂₂₁		3 ccm; H ₂ O ₂ ¹ / ₂₂₅	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	37,7	—	36,2	—	35,8	—
5	32,2	0,01369	27,6	0,02356	19,0	0,05502
10	27,5	0,01370	21,1	0,02344	11,0	0,05125
20	19,6	0,01420	12,2	0,02362	4,7	0,04408
30	14,5	0,01383	7,3	0,02318	3,4	0,03408
45	9,8	0,01300	5,2	0,01872	3,2	0,02330
60	7,3	0,01188	4,2	0,02257	2,9	0,01826

Wie diese Abnahme der Konstanten zu erklären ist, kann ich vorläufig nicht entscheiden: man kann nur sagen, daß die Reaktion nicht mehr erster Ordnung ist, sondern nach einem verwickelterem Schema verläuft. Man darf auch nicht außer Acht lassen, daß die Korrektur auf KMnO_4 -Menge, welche von Enzym selbst verbraucht wird, zuweilen beträchtlich ist, so daß die Methode schon nicht so genau ist.

Wir versuchten diese Erscheinung näher zu verfolgen. Da die von uns gebrauchten Katalaselösungen schwach sauer reagierten und außerdem verschiedene fremde, z. B. anorganische, reduzierende etc. Substanzen enthielten, so konnte man denken, daß die Verwicklung der Reaktion von der Anhäufung dieser fremden Substanzen abhängt. Dieselben spielen selbst eine Rolle der Katalysatoren, ihre Wirkung braucht nicht in strenger Proportionalität mit deren Menge zu stehen.

Aber eine ganze Reihe von verschieden angeordneten Versuchen in schwach alkalischer Lösung, mit Zusatz von aufgekochter Enzymlösung, mit Zusatz von deren Aschelösung, von vorher mit H_2O_2 behandelter Lösung etc. zeigte immer dasselbe: bei schwachen Enzymkonzentrationen sind die Konstanten recht gut, bei stärkeren aber beginnt deren Sinken. Ich werde die entsprechenden Zahlen nicht anführen. Nur eine Versuchsreihe, nämlich mit Dialyse, da sie die uns interessierende Erscheinung klar zum Ausdruck bringt, will ich mitteilen.

4 Proben von je 50 ccm Katalaselösung wurden in Diffusionshülsen gebracht und gegen Toluolwasser, welches je 12 Stunden gewechselt wurde, dialysiert. Nach je 24 Stunden spülte man den Inhalt einer Hülse in ein 75 ccm-Kölbchen und untersuchte mit etwa $\frac{1}{170}$ molarem H_2O_2 bei 25° . Eine Probe wurde unmittelbar, ohne Dialyse geprüft. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

I. Enzymlösung vor der Dialyse.

Min.	10 ccm		20 ccm		30 ccm	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	39,9	—	39,9	—	39,9	—
5	36,1	0,00869	30,2	0,02419	25,7	0,03821
10	33,0	0,00825	23,8	0,02244	18,2	0,03409
20	27,0	0,00848	14,4	0,02213	10,0	0,03005
30	22,4	0,00836	9,1	0,02139	5,2	0,02949
40	18,4	0,00840	7,0	0,01889	3,9	0,02524
60	12,5	0,00840	4,2	0,01629	2,9	0,01898

II. Nach 24 Stunden Dialyse.

Min.	10 ccm		20 ccm		30 ccm	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	39,9	—	39,9	—	39,9	—
5	38,6	0,00310	34,3	0,01313	31,5	0,02053
10	37,0	0,00328	30,1	0,01224	26,6	0,01761
20	34,3	0,00329	26,9	0,00856	20,0	0,01499
30	32,2	0,00310	22,1	0,00855	14,2	0,01495
40	29,7	0,00321	19,6	0,00772	10,2	0,01481
60	25,8	0,00316	16,6	0,00635	5,9	0,01383

III. Nach 48 Stunden Dialyse.

Min.	10 ccm		20 ccm		30 ccm	
	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K	KMnO ₄	0,4343 K
0	39,9	—	39,9	—	39,9	—
5	38,8	0,00243	36,6	0,00749	33,5	0,01518
10	37,5	0,00269	33,4	0,00772	28,4	0,01477
20	35,3	0,00266	28,8	0,00708	21,6	0,01333
30	33,5	0,00253	24,0	0,00736	16,7	0,01263
40	31,7	0,00250	20,8	0,00707	12,3	0,01278
60	28,4	0,00249	17,7	0,00589	7,0	0,01260

IV. Nach 72 Stunden Dialyse.

Min.	10 ccm		20 ccm		30 ccm	
	KMnO ₄	0.4343 K	KMnO ₄	0.4343 K	KMnO ₄	0.4343 K
0	39.9	—	39.9	—	39.9	—
5	39.0	0.00198	37.6	0.00516	34.8	0.01187
10	38.4	0.00166	35.4	0.00519	30.5	0.01166
20	36.7	0.00182	31.0	0.00548	23.0	0.01196
30	34.6	0.00209	27.3	0.00549	17.7	0.01177
40	33.9	0.00177	24.3	0.00538	13.4	0.01185
60	31.3	0.00176	18.2	0.00568	7.8	0.01181

Wir sehen, daß die Konstanten mit jedem Tag der Dialyse in allen Proben kleiner werden: bei 10 ccm sind sie immer konstant, je höher aber die Konzentration der Katalase, desto schneller sinken unsere Konstanten; aber mit fortschreitender Dialyse verdünnt sich die Lösung und der Gang der Konstanten wird immer kleiner, bis er nach 72 Stunden überall verschwindet. Vielleicht wirkt hier außer der Verminderung der Konzentration der Katalase auch die Entfernung irgend welcher Substanzen, die auf den Verlauf der Reaktion einen Einfluß ausüben. Man ersieht außerdem, daß keine Regelmäßigkeit in der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Enzymkonzentration existiert: hier steigt dieselbe schneller als die Katalysatormenge, oben haben wir das umgekehrte gesehen. Diese Frage bedarf noch eingehender Prüfung.

7. Einfluß fremder Stoffe auf die Reaktion.

Wie bekannt, üben verschiedene Stoffe ziemlich starken Einfluß auf die Enzymreaktionen aus: allgemeinere Schlüsse aus zahlreichen diesbezüglichen Untersuchungen lassen sich schwer ziehen. Unsere Versuche in dieser Richtung sind noch nicht zum Abschluß gebracht und ich teile nur einige derselben mit. Wir wählten hauptsächlich nur solche Stoffe, welche in der Physiologie der Hefe oder bei Versuchen mit Enzymen eine größere Rolle spielen.

In erster Linie untersuchten wir die Kaliumphosphate, da diese in den Pflanzen in größerer Menge vorkommen.

Versuchstemperatur 25°: KH_2PO_4 $1/136$ bis $5/136$ molar:
 H_2O_2 $1/147$ molar.

Min.	Ohne Zusatz		0,1 %		0,2 % KH_2PO_4	
	KMnO_4	0,4343 K	KMnO_4	0,4343 K	KMnO_4	0,4343 K
0	27,2	—	27,2	—	27,2	—
5	24,0	0,01087	23,9	0,01123	23,6	0,01233
10	20,9	0,01144	20,6	0,01207	20,2	0,01292
20	16,2	0,01125	16,0	0,01152	15,7	0,01193
30	12,6	0,01114	12,3	0,01160	12,1	0,01173
40	9,5	0,01142	9,4	0,01154	9,1	0,01189
60	5,7	0,01132	5,4	0,01170	5,0	0,01226

Min.	0,3 %		0,4 %		0,5 %	
	KMnO_4	0,4343 K	KMnO_4	0,4343 K	KMnO_4	0,4343 K
0	27,2	—	27,2	—	27,2	—
5	23,7	0,01196	24,2	0,01015	24,5	0,00908
10	20,5	0,01228	21,1	0,01103	21,3	0,01062
20	16,1	0,01139	16,4	0,01099	16,7	0,01059
30	12,4	0,01137	12,8	0,01091	13,0	0,01069
40	9,6	0,01131	9,8	0,01103	9,9	0,01097
60	5,3	0,01184	5,5	0,01118	5,8	0,01185

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß KH_2PO_4 bis zu einer bestimmten Konzentration günstig auf den Verlauf der Reaktion wirkt, ungeachtet dessen, daß es saure Reaktion besitzt, was sonst bekanntlich die Zersetzung des Wasserstoff-superoxyds verhindert. Von einer gewissen Konzentration an wirkt aber KH_2PO_4 hemmend. Die Konstanten bleiben immer erhalten — sie schwanken wie früher um einen Mittelwert —, das Salz wirkt also katalytisch. Dasselbe gilt von K_2HPO_4 . Die Versuche mit NaH_2PO_4 haben gezeigt, daß, obgleich auch

für dieses Salz eine Optimalkonzentration existiert, dasselbe aber auch bei dieser Konzentration auf die Reaktion hemmend wirkt. Diese Tatsachen lassen vermuten, daß wir hier mit einer spezifischen Wirkung der Salze und zwar der K- und Na-Ionen zu tun haben; dasselbe geht aus Versuchen mit KCl und NaCl hervor. Die Phosphate selbst zersetzen H_2O_2 kaum. Ich stehe von der Mitteilung der Zahlenbelege hier ab, da über diese und andere Versuche später nach deren Abschluß zusammenfassend berichtet werden soll. Ich gebe hier nur eine Tabelle mit Versuchen über die Wirkung der Schwefelsäure auf die Wasserstoffsuperoxydzersetzung.

Versuchstemperatur 25° ; H_2O_2 $1/150$ molar.

Min.	Ohne Zusatz		H_2SO_4 $1/2000$ normal		H_2SO_4 $1/1000$ normal		H_2SO_4 $1/750$ normal	
	KMnO_4	0.4343 K	KMnO_4	0.4343 K	KMnO_4	0.4343 K	KMnO_4	0.4343 K
0	26.8	—	26.8	—	26.8	—	26.8	—
5	23.4	0.01178	23.5	0.01141	23.6	0.01104	23.8	0.01031
10	20.7	0.01122	22.1	0.00837	22.6	0.00740	23.0	0.00564
20	15.6	0.01175	21.4	0.00488	21.6	0.00468	21.9	0.00438
30	12.1	0.01151	20.3	0.00402	20.6	0.00380	20.8	0.00367
40	9.4	0.01138	20.1	0.00312	20.3	0.00302	20.6	0.00286
60	5.6	0.01133	19.7	0.00216	20.0	0.00212	20.1	0.00208

Man sieht, daß bei reinem H_2O_2 die Konstanten wie gewöhnlich erhalten bleiben, dagegen bei Gegenwart von H_2SO_4 dies nicht mehr der Fall ist, sogar in Verdünnung $1/2000$ normal. Schwefelsäure wirkt also etwas anders als die oben angeführten Salze (und die Alkalien): es ist noch unentschieden, ob H_2SO_4 die Katalase allmählich vernichtet, oder in irgend welcher Weise an der Reaktion teilnimmt, jedenfalls wird der Verlauf der Reaktion geändert.

Die bisher mitgeteilten Resultate können so zusammengefaßt werden:

1. In der Hefe existiert ein besonderes Enzym, Katalase, welches mit Wasser oder Glycerin extrahiert und mit Alkohol gefällt werden kann. Das Enzym wirkt zersetzend auf H_2O_2 .

2. Die Reaktion der H_2O_2 -Zersetzung ist eine katalytische: das Enzym bleibt nach der Reaktion unverändert zurück.

3. Dieselbe ist erster Ordnung, aber nur in erster Annäherung.

4. Verschiedene Substanzen, z. B. Salze, Säuren, Basen, üben auf die Reaktion einen Einfluß aus und zwar einen verschiedenen, je nach ihrer Natur. Bei einigen bleibt der allgemeine Charakter der Reaktion unverändert, sie wirken als Katalysatoren zweiten Grades, bei anderen wird der Reaktionsverlauf wesentlich geändert.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.