

Über die fermentative Hydroperoxydzersetzung.

II. Mitteilung.

Von

Percy Waentig und Otto Steche.

(Mitteilung aus dem Laboratorium für angew. Chemie der Universität Leipzig.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. November 1911.)

In unserer ersten Mitteilung über die fermentative Hydroperoxydzersetzung haben wir die Blutkatalase einer eingehenden Untersuchung unterworfen, einmal weil ein Vergleich der Ergebnisse der bisherigen Untersuchung über dieses Ferment (Senter) mit demjenigen anderer Autoren über Katalasen anderer Herkunft nicht im Einklang zu stehen schien, worauf unseres Erachtens die Aufmerksamkeit nicht genügend gelenkt worden ist. Weiterhin aber hatten gleich zu Anfang unserer Untersuchung über Blutkatalase sich Abweichungen von den Senter'schen Befunden ergeben, die auch aus diesem Grunde eine eingehendere Prüfung dieses Fermentes erforderten. Das Ergebnis unserer Untersuchung war, daß wir zwar viele der Senter'schen Resultate bestätigen, jedoch hinsichtlich des Reaktionsverlaufs der Hydroperoxydzersetzung mit dem Blutferment, gleichgültig, ob sie genau nach den Senter'schen Vorschriften oder etwas abweichend von diesen vorgenommen wurde, zu keiner so einfachen Auffassung wie Senter¹⁾ gelangen konnten, indem wir den monomolekularen Verlauf der Reaktion als einen nur von zufälligen, nicht immer reproduzierbaren Bedingungen abhängigen Grenzfall ansehen zu müssen glaubten, der die Eigenart der fermentativen Hydroperoxydzersetzung nicht genügend charakterisiert. Auch hinsichtlich des Einflusses von Temperatur

¹⁾ Zeitschrift für physikal. Chemie, Bd. 44, S. 257 (1905).

und H- resp. OH-Ionengehalt des Reaktionsgemisches mußten wir die Selterschen Befunde etwas modifizieren.

Mit Rücksicht auf den eigentlichen Endzweck unserer Untersuchung, die Messung der fermentativen Hydroperoxydzersetzung zu einer für biologische Zwecke allgemein brauchbaren Methode auszuarbeiten, haben wir nun auch Katalasen anderer Herkunft nach demselben Arbeitsplane untersucht, wodurch wir auch die zwischen den einzelnen Autoren bestehenden Unstimmigkeiten entweder zu beseitigen oder genau zu fixieren hofften.

Das Ergebnis unserer Untersuchung ist nun, daß wir eine größere Ähnlichkeit im Verhalten der Katalasen verschiedener Herkunft (soweit wir sie in den Bereich unserer Untersuchungen ziehen konnten) festgestellt haben, als wir sie nach dem Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Bearbeiter erwarten konnten, wenn auch gewisse Differenzen, z. B. hinsichtlich des Einflusses von Säure und Alkali, in dem von anderen Autoren angedeuteten Sinne zutage traten, und daß andererseits alle jene Eigentümlichkeiten im Ablauf der fermentativen Hydroperoxydzersetzung, wie wir sie an der Blutkatalase aufgefunden hatten, bestätigt werden konnten, was gleichzeitig bei der häufig großen Verschiedenheit im Ausgangsmaterial als eine wertvolle Bestätigung unserer Ergebnisse an Blutextrakten erscheinen mußte.

Die Gesichtspunkte, unter denen die Eigenschaften der verschiedenen aktiven Extrakte geprüft wurden, waren zunächst — was ja bei Dosierungsversuchen am wichtigsten erscheint — die Untersuchung des Einflusses des Reinheitsgrades, der durch Fällung mit Alkohol, durch Dialyse und durch Filtration geändert werden konnte; ferner die Isolierungsbedingungen aus dem Substrat, der Einfluß von Peroxyd- wie Fermentkonzentration, von Säure und Alkali, und endlich der Temperatur auf den Reaktionsverlauf.

Zur Untersuchung gelangten aktive Extrakte sowohl tierischer als pflanzlicher Herkunft. Von tierischen Extrakten kamen in Betracht einerseits solche aus einzelnen Organen von

Tieren, wie beispielsweise der Extrakt aus dem Fett von Schwein und Rind und aus der Leber von Schwein und Hund, ferner Extrakte der Geschlechtsorgane von *Rana temporaria*, anderseits Extrakte ganzer Tiere, wie solche von Raupen und Puppen von *Malacosoma neustria* und *Sphinx ligustri*. Von pflanzlichen Extrakten wurden diejenigen aus keimender Gerste, aus Hefe und aus Pilzen untersucht.

Leberkatalase.¹⁾

Als Ausgangsmaterial wurde die Leber eines Hundes verwendet, die von einem ganz frisch getöteten Tiere zur Verfügung stand und zur Entfernung des Blutes aus den Gefäßen mit Wasser von 30° 40 Minuten lang durchspült wurde, bis das ganze Gewebe einen gelblich-weißen Ton angenommen hatte und das ablaufende Wasser nur noch ganz verschwindende Blutfärbung zeigte. 500 g des wasserhaltigen Gewebes wurden darauf fein zerkleinert und mit Glaspulver zu einem möglichst homogenen Brei verrieben. Dieser wurde dann zwei Tage lang mit 500 ccm Wasser unter etwas Chloroformzusatz extrahiert, worauf dann, da eine Filtration sich nicht bewerkstelligen ließ, von dem gebildeten Bodensatz abgossen wurde. Die trübe, bräunlich-gelbe Flüssigkeit wurde zunächst mit dem halben Volumen absoluten Alkohols gefällt, wobei ein reichlicher flockiger Niederschlag entstand, der nach dem Trocknen eine braunschwarz gefärbte Masse hinterließ (Niederschlag 1). Aus einer qualitativen Aktivitätsprüfung des fast klaren Filtrats von dieser Fällung ergab sich jedoch, daß, wie schon früher festgestellt worden war, die Fällung durch diese Alkoholmenge, die bei Blut eine vollständige Fällung der Katalase bedingt, noch ganz unvollständig war (vgl. hierüber Mitteilung 1, diese Zeitschrift S. 242). Erst ein weiterer Zusatz des noch 1½fachen Volumens 96%igen Alkohols erzeugte eine neue starke Fällung, die nunmehr die ganze, noch in der Flüssigkeit vorhandene Katalase enthielt, wenn man durch Stehenlassen für eine vollständige Ausfällung sorgte (Niederschlag 2: Trockengewicht 0,42 g und Niederschlag 3: Trockengewicht 0,12 g). Aus diesen drei Nieder-

¹⁾ Vgl. auch Battelli und Stern, Soc. biol., Bd. 57, S. 375 (1905).

schlagen wurden nun nach der früher beschriebenen Methode mit Chloroformwasser Extrakte von schwach gelblicher, fast klarer Beschaffenheit hergestellt, deren Aktivität jedoch eine sehr große Verschiedenheit zeigte.

Niederschlag	Relative Konzentration ¹⁾	K-Werte ²⁾
1.	9	425
2.	2	378
3.	1	47,2

Hieraus geht hervor, daß Niederschlag 2 bei weitem die Hauptmenge der Katalase enthielt und daß die Fällung der Katalase aus Leberextrakt, wie dies schon aus früheren Versuchen gefolgert wurde, erst bei einer höheren Alkoholkonzentration zu erreichen ist. Für praktische Versuche zwecks Isolierung des Katalaseferments aus Leber würde es sich daher empfehlen, zunächst eine Fällung mit wenig Alkohol vorzunehmen, diese zu verwerfen und nun erst mit einem ungefähr doppelten Volumen Alkohol die Fällung des eigentlichen Ferments vorzunehmen.

Abgesehen von diesem verschiedenen Verhalten der Leberkatalase von der aus Blut gewonnenen, die wohl in der Hauptsache mehr auf die Anwesenheit von Fällung verhindernden Stoffen (Schutzkolloiden) zurückzuführen ist, zeigt die Leberkatalase wenigstens in den der Blutkatalase analog gewonnenen Extrakten große Ähnlichkeit mit dieser.

Sowohl hinsichtlich des Reaktionsverlaufs mit gewöhnlicher Perhydrollösung bei 0°, wobei normalerweise stets ein absteigender Gang der K-Werte zu beobachten ist, wie hinsichtlich des Einflusses von «Neutralisation», Alkalizusatz und Säurezusatz zum Reaktionsgemisch bis zu den in der folgenden Tabelle angegebenen Konzentrationen auf die Aktivität und hinsichtlich der Wirkung höherer Temperatur unter unveränderten Bedingungen bzw. bei gleichzeitiger Änderung der Reaktion des Versuchsgemisches ist eine weitgehende Analogie zu den

¹⁾ Gemeint ist das Verhältnis von Trockensubstanz zu Extraktionswasser.

²⁾ Wie in der vorigen Arbeit, sind die K-Werte sämtlich mit 10⁴ multipliziert.

Katalaselösungen aus Blut festzustellen, die hier noch einmal in folgendem zusammengefaßt seien (vgl. Tab. 1a):

Bei Reaktionstemperatur von 0° bringt Befreiung der wässerigen Lösung von der normalerweise in ihr enthaltenen Kohlensäure bzw. Neutralisation bis zum Farbenumschlag des Phenolphthaleins stets eine Aktivitätszunahme, höherer Alkaligehalt stets eine Abnahme, und Säurezusatz in schon viel geringerer Menge eine sehr starke Schwächung der Fermentaktivität hervor, während bei 30° schon die Neutralisation meist reaktionsverzögernd wirkt und Säure hier eine weniger starke Wirkung bei gleichem Zusatz auszuüben scheint.

Tabelle 1a. Leberkatalase. Extrakt der Alkoholfällung.

		1. unverändert			2. neutralisiert ¹⁾			3. $\frac{1}{5000}$ -n-KOH ²⁾		4. $\frac{1}{50000}$ -n-H ₂ SO ₄		
0°	1'	15,49		1'	15,67		1'	16,04		1'	16,10	
	4'	11,55	425	4'	11,14	494	4'	12,37	376	4'	14,17	185
	8'	8,33	355	8'	7,29	460	9'	8,90	286	9'	12,24	127
	12'	6,19	322	13'	4,70	381	17'	5,83	230	18'	9,65	115
	17'	4,42	293	19'	2,90	350				29'	7,81	83,5
		25'	2,58	292								
30°	1'	14,89		2'	13,68		1'	16,88		1'	15,24	
	3'	11,18	622	5'	9,50	528	4'	16,21	56,8	4'	10,64	520
	6'	7,38	601	9'	6,40	428	20'	15,73	8,1	8'	6,81	485
	10'	4,37	569	12'	4,61	475				13'	4,13	434
		14'	2,53	593	16'	3,22	390					

Ferner zeigen die folgenden Versuche ebenfalls in Übereinstimmung mit den Resultaten an Blutkatalase erstens, daß die Größe der Anfangskonstanten der Reaktionen praktisch proportional mit der Fermentkonzentration wächst, ziemlich unabhängig von der Hydroperoxydkonzentration, daß aber anderseits der Übergang von $\frac{1}{400}$ -n-Wasserstoffsperoxydlösung zu

¹⁾ Alle Versuche, bei denen Alkali oder Säure zugesetzt wurde, sind sowohl in dieser wie in sämtlichen folgenden Tabellen mit kohlenstoffsaurem Wasser ausgeführt.

²⁾ Die Konzentrationsangaben sind aus den zugefügten Mengen berechnet. Die Peroxydkonzentration im Reaktionsgemisch beträgt, wenn nicht anders angegeben, $\frac{1}{200}$ oder $\frac{1}{400}$ -n.

$1/80$ -n (Tab. 1b) stets nur insofern eine Schwächung der Fermentaktivität bedingt, als die ganze Reaktion in der peroxydreicheren Lösung etwas langsamer verläuft, ohne daß der Gang der K-Werte wesentlich verstärkt wird.

Tabelle 1b. Leberkatalase. Extrakt der Alkoholfällung.
0°, unverändert.

H ₂ O ₂ -Konzentration	Relative Fermentkonzentration:											
	2			5			25			50		
$1/400$ -n	1'	16,81		1'	16,04		1'	14,53		1'	12,78	
	7'	15,98	36,7	5'	14,84	84,4	3'	12,02	412	3'	9,36	67,9
	15'	15,12	30,0	12'	13,21	72,2	7'	8,48	379	5'	7,23	55,8
	35'	13,60	23,0	24'	10,88	70,2	11'	6,56	279	8'	5,28	45,5
	65'	11,78	20,8	38'	9,36	46,7	18'	4,32	259	13'	3,25	42,2
$1/80$ -n				1'	15,48		1'	14,20		1'	13,10	
				5'	14,46	74,0	3'	12,09	349	3'	9,85	61,9
				12'	13,57	39,4	7'	9,49	263	5'	7,80	50,7
				22'	12,36	40,6	11'	7,66	233	8'	5,94	39,4
				32'	11,40	35,1	18'	5,66	188	13'	3,70	41,4

Wie ferner aus allen Versuchen zu ersehen ist, ist auch für diese Fermentlösung und zwar für die Extrakte aller Niederschläge, welche zur Untersuchung gelangten, ein absteigender Gang der K-Werte charakteristisch. Genau wie bei der Blutkatalase bringt auch hier jedoch die Dialyse eine Änderung des Reaktionsverlaufs hervor, jedoch nicht, ohne daß eine sehr erhebliche Einbuße der Katalase an Aktivität bei gleichzeitiger Trübung der Lösung festzustellen ist (Tab. 1c).

Tabelle 1c. Leberkatalase.

Einfluß der Dialyse. 0°, H₂O₂-Konzentration $1/400$ -n.

1. vor der Dialyse			2. nach 3tägiger Dialyse		
1'	15,49		3'	18,80	
4'	11,55	425	7'	18,67	7,6
8'	8,33	355	25'	17,61	14,1
12'	6,19	322	49'	16,16	15,6
17'	4,42	293	76'	14,48	17,7
25'	2,58	292	96'	13,48	15,5

Mit Hinsicht auf die Untersuchung lackfarbener Blutlösung war es wichtig, hier den unveränderten Organextrakt zu prüfen. Die Resultate zeigt Tabelle 2a und 2b. Darnach ergibt sich das gleiche Verhalten wie für den Extrakt aus Alkoholfällung, mit Ausnahme einiger kleiner Abweichungen, die sich durch die in relativ großer Menge vorhandenen inaktiven Stoffe leicht erklären lassen. So wirkt bei 0° Alkalizusatz bis 1/5000-n-Konzentration nicht schwächend, sondern sogar noch merklich verstärkend, jedenfalls infolge Bindung von Alkali durch die großen Mengen vorhandener Eiweißstoffe. Ebenso ist die Säurewirkung, wenn auch merklich, so doch geringer als bei dem Extrakt aus Alkoholfällung. Änderung der Fermentkonzentration im Verhältnis 1 zu 5 bewirkt eine proportionale Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit, Erhöhung der Hydroperoxydkonzentration auf 1/80-n bringt auch hier eine deutliche Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit zustande.

Tabelle 2a. Leberkatalase. Ursprünglicher Organextrakt.

		1. unverändert			2. neutralisiert			3. 1/5000-n-KOH			4. 1/50000-n-H ₂ SO ₄		
0°	1'	16,95	180	17,07	271								
	5'	14,36	168	13,30	269								
	13'	10,54	130	8,62	244	—							
	23'	7,81	133	6,15	223								
	43'	4,24		4,50									
0°	1'	17,21	279			17,50	383	18,18	114				
	5'	13,31	227			13,43	328	16,37	91,1				
	9'	10,80	227			9,93	360	14,74	72,1				
	14'	8,32	190			7,13	280	12,28					
	26'	4,92				4,54							
30° ¹⁾	1' 40"	15,29	401	17,69	267								
	4' 40"	11,59	411	14,71	184								
	9' 40"	7,22	373	7,46	193								
	16' 40"	3,96		4,00									

¹⁾ Die 30°-Versuche sind vergleichbar mit der 1. Rubrik der 0°-Versuche.

Tabelle 2b. Leberkatalase. Ursprünglicher Organextrakt.

Einfluß der H_2O_2 -Konzentration und der Fermentkonzentration.

		H_2O_2 -Konzentration $\frac{1}{80}$ -n			H_2O_2 -Konzentration $\frac{1}{400}$ -n		
Ferment- konzentration 2 : 500 0°	1'	17,14	266	1'	17,21	279	
	4'	14,26		5'	13,31		
	8'	11,82	204	9'	10,80	227	
	18'	8,40	148	14'	8,32	227	
	33'	5,40	128	26'	4,92	190	
			Relative Fermentkonzentration 1			Relative Fermentkonzentration 2	
H_2O_2 -Konzentration $\frac{1}{400}$ -n 0°	1'	17,68	95,6	1'	16,95	180	
	5'	16,19		5'	14,36		
	15'	13,73	71,6	13'	10,54	169	
	30'	10,97	65,0	23'	7,81	130	
	47'	8,61	61,9	43'	4,24	133	

Fettkatalase.

Aktive Extrakte aus Fett wurden zunächst nach den von Euler¹⁾ und Bach²⁾ beschriebenen Verfahren gewonnen. Diese Methoden erschienen uns jedoch später zu umständlich und auch für unsere Zwecke nicht ganz einwandfrei, weshalb wir uns dann begnügten, zur Extraktion von Fett dieses nach Zerkleinerung mit der Fleischmaschine einfach mit lauwarmem Wasser mehrfach durchzukneten, wobei sehr aktive Extrakte erhalten werden können. Zur Untersuchung gelangten die Extrakte aus Rinder- und Schweinsnierenfett, das möglichst frisch und nach sorgfältiger Befreiung von Blutgefäßen zur Verwendung kam.

Extrakte nach Euler hergestellt.

Da es nicht gelang, eine Alkoholfällung aus dem nach Euler gewonnenen Extrakt auch unter Zusatz von Äther zu erhalten, so gelangte der Extrakt direkt zur Untersuchung.

¹⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. 7, S. 1 (1906).

²⁾ Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 37, S. 1882 (1905).

nachdem er noch durch Ausfrieren eines Teils des Wassers konzentriert worden war.¹⁾

Die Untersuchung geschah in der gleichen Weise wie die der Blut- und Leberkatalase, nur daß außer den dort ausgeführten Versuchen bzw. an Stelle dieser die von Euler angewendeten Säure- und Alkalikonzentrationen zur Wirkung gelangten. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle verzeichnet (Tab. 3a). Die Ergebnisse stehen in deutlichem Gegensatz zu den Befunden Eulers, aber in Übereinstimmung mit unseren Resultaten an Blut- und Leberferment. Neutralisation bringt eine, wenn auch geringe, so doch deutliche Zunahme der Aktivität hervor. Stärkerer Alkalizusatz (Euler verwendete Baryumhydroperoxyd in $1/500$ -n-Konzentration) wirkt schon bei 0° stärker schwächend, und Schwefelsäurezusatz wirkt bereits bei $1/50000$ -n-Konzentration bei 10° (Reaktionstemperatur von Euler) schwächend, erst recht bei $1/5000$ -n-Konzentration und entsprechend der von Senter festgestellten spezifischen Schädlichkeit der Chlorionen in Form von Salzsäure noch mehr als in Form von Schwefelsäure. Bei 0° ist die Wirkung analog den früheren Befunden wiederum erheblicher als bei 10° . Kurz, es läßt sich kein erheblicher Unterschied im Verhalten der Fettkatalase feststellen. Die Abweichung bezüglich der Geringfügigkeit der Neutralisationswirkung wird genügsam durch den verschiedenen Gehalt der Katalaselösungen an indifferenten Stoffen erklärt. Diese Unterschiede lassen sich leicht an den Trockensubstanz- und Aschegehaltsbestimmungen verfolgen, die an den Extrakten vorgenommen worden sind.

Die verschiedenen Extrakte verhalten sich bezüglich ihres Trockensubstanzgehaltes (Trockentemperatur 100°) und ihres Aschegehaltes wie folgt:

¹⁾ Eine Konzentration durch Ausfrieren gelingt nicht immer. Gelegentlich erwies sich das Eis nach der Schmelzung als ebenso aktiv wie der nicht gefrorene Anteil.

Art der Extrakte	Trockensubstanz in %	Aschegehalt in %
Lackfarbene Blutlösung nach Senter	1,75	0,077
Sentersche Hämaselösung (Probe I 1 : 50)	0,032	0,0018
	0,040	0,0092
Leberkataselösung (direkter Organ- extrakt).	0,18	0,011
Fettkatalaselösung (direkter) (Probe I Organextrakt))	0,43	0,068
	0,37	0,076

Auch hinsichtlich des Einflusses höherer Peroxydkonzentration im Reaktionsgemisch ergibt sich gleiches Verhalten wie bei den anderen aktiven Extrakten: Nimmt man die Reaktion in $\frac{1}{80}$ -n-Hydroperoxydlösung vor, so ist die Reaktionsverzögerung eine ganz erhebliche.

Tabelle 3b. Fettkatalase nach Euler.

H ₂ O ₂ -Konzentration $\frac{1}{400}$ -n	Relative Fermentkonzentration:								
	5			10			20		
0°	1'	21,25	162	1'	18,50	265	1'	18,49	447
	4'	19,00	145	5'	14,50	224	5'	12,25	412
	8'	16,62	138	9'	11,80	202	9'	8,38	377
	18'	12,11	118	14'	9,35	176	12'	6,46	336
	28'	9,22	114	28'	5,31		17'	4,39	
	41'	6,55							
Fermentkonzentration	H ₂ O ₂ -Konzentration								
	$\frac{1}{80}$ -n			$\frac{1}{400}$ -n					
5 : 500 18°	3' 50"	17,28	279	1'	19,89	402			
	5' 50"	15,20	268	5'	13,73	388			
	9' 50"	11,88	245	8'	10,50	362			
	14' 50"	9,13	254	13'	6,92	339			
	21' 30"	6,06	251	19'	4,33				
	30' 30"	3,60							

Bezüglich des Einflusses der Fermentkonzentration ergibt sich, daß bei höheren Fermentzusätzen die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr ganz proportional mit der Fermentmenge wächst,

sondern etwas langsamer (Tab. 3b), was sich vielleicht aber durch die hemmende Wirkung einer Verunreinigung erklären läßt (vgl. auch Tab. 1b).

Die Versuche mit dem direkten Organextrakt aus Schweinsnierenfett, der einfach durch mehrmaliges Auskneten des Fettes¹⁾ mit lauwarmem Wasser hergestellt wurde, bestätigen im ganzen die bisher gewonnenen Resultate. Zusatz von Alkali bei 0° erhöht zwar die Geschwindigkeit der Reaktion, anstatt sie zu verlangsamen, bei 30° tritt jedoch die zerstörende Wirkung dieser Mengen um so deutlicher hervor, ebenso wie eine Erhöhung der Peroxydkonzentration hier sehr erheblich schwächend wirkt, was mit Hinsicht auf die Eulerschen Befunde nochmals zu betonen von Wichtigkeit erscheint (Tab. 4a und 4b).

Tabelle 4a. Fettkatalase durch Auskneten hergestellt.

		1. unverändert		2. neutralisiert		3. $\frac{1}{5000}$ -n-KOH	
		a) H_2O_2 - $\frac{1}{400}$ -n	b) H_2O_2 - $\frac{1}{80}$ -n				
0°	1'	17,26		1' 40"	17,67	1'	18,56
	4'	14,39	263	5' 40"	12,67	4'	14,44
	14'	8,12	249	8' 40"	10,46	8'	10,50
	20'	5,99	220	12' 40"	8,12	14'	6,70
	30'	3,88	189	22' 40"	4,32	22'	3,98
30°	2'	15,60	471	1' 16,60	353	a) 1'	16,40
	5'	11,27	411	4' 13,01	280	4'	12,21
	12'	5,81	363	8' 10,05	192	16'	7,11
	16'	4,16	395	15' 7,37	169	26'	5,15
	21'	2,64		26' 4,78			
						b) 1' 30"	18,70
						4' 30"	15,27
						7' 30"	13,16
						11' 30"	11,35
						19' 30"	8,92
						29' 30"	7,02

Daß die größeren Mengen der Verunreinigung die noch konstatierbaren Abweichungen vom Verhalten der Blutkatalase erklären, zeigen Versuche mit durch Alkoholfällung in der

¹⁾ Nach dreimaligem ausgiebigen Auskneten mit 500 bzw. 250 ccm Wasser ist doch noch keine vollständige Erschöpfung der Fettes an aktiver Substanz erreicht (1. Extrakt, Aktivität: 874, III, Extrakt, Aktivität 269).

üblichen Weise gewonnener Extraktlösung. Bei diesen verstärkt Alkali in $1/5000$ -n-Konzentration nicht mehr die Reaktionsgeschwindigkeit und bei 30° verursacht bereits Neutralisation starke Schwächung des Ferments und Zunahme des abfallenden Ganges der K-Werte (Tab. 5).

Tabelle 4b. Fettkatalase, durch Auskneten hergestellt.
Einfluß der Fermentkonzentration; 0° .

		Relative Fermentkonzentration:								
		1			2			4		
Ursprünglicher Extrakt	1'	19,43	67,7	1'	18,39	149	1'	17,26	263	
	13'	16,12		6'	15,50		4'	14,39		
	24'	14,23	49,2	11'	13,55	117	14'	8,12	249	
	46'	11,60	40,3	20'	10,78	110	20'	5,99	220	
	61'	10,12	35,4	34'	8,46	75,2	30'	3,88	189	
				46'	6,94	71,7				
Alkoholfällung	1'	18,62	128	1' 40"	17,72	266	—			
	4'	17,05		6' 40"	13,05					
	13'	13,63	108	19' 40"	7,11	203				
	27'	10,07	93,2	36' 40"	3,61	173				

Katalase aus den Geschlechtsorganen von *Rana temporaria*.

Als ein weiteres Beispiel für das Verhalten tierischer Katalasen seien die aus den geschlechtsreifen Hoden und Ovarien von *Rana temporaria* gewonnenen Extrakte angeführt. Eine aktive Alkoholfällung zu erzielen, gelang hier hauptsächlich aus Mangel an ausreichendem Material nicht. Und auch insofern bietet dieses Material kein günstiges Untersuchungsobjekt, als die Ovarien von *Rana temporaria* ziemlich inaktiv sind, so daß es nötig war, 120 g Ovarien mit 500 ccm Wasser zur Darstellung eines genügend aktiven Extraktes anzurühren, während bei der Untersuchung der Hoden ungefähr die zehnfache Verdünnung dieselbe Aktivität des Extrakts liefert. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Hoden wesentlich

Tabelle 5. Fettkatalase, Alkoholfällung.

	1. unverändert		2. neutralisiert		3. $\frac{1}{5000}$ -n-KOH		4. $\frac{1}{50000}$ -n-H ₂ SO ₄		
	a)	b) Parallelversuch	a)	b) Parallelversuch					
0°	1'	16,89	185	1' 40''	17,72	266	2'	16,24	252
	5'	14,08	157	6' 40''	13,05	203	6'	12,87	239
	10'	11,75	146	19' 40''	7,11	173	12'	9,25	198
	16'	9,60	141	36' 40''	3,61		18'	7,04	175
	29'	6,29					30'	4,34	
30°	2'	15,28	337	1'	17,43	354	1'	17,00	162
	5'	12,11	295	4'	13,65	338	4'	15,20	98,4
	9'	9,33	277	9'	9,25	277	11'	12,97	66,4
	14'	6,71	232	15'	6,31		25'	10,47	60,6
	25'	3,73					42'	8,26	

) Vergleichbar untereinander sind in dieser Tabelle jedesmal nur die unter a bzw. b angeführten Versuchssreihen.

wasserärmer sind, als die außerordentlich stark aufgequollenen Ovarien. Die Folge der höheren Konzentration ist offenbar, daß der Ovarialextrakt die Veränderung der Aktivität bei Neutralisation und Alkalisieren des Reaktionsgemisches nicht so deutlich zeigt wie der Hodenextrakt, jedenfalls infolge des im ersteren reichlicher vorhandenen Ballastes an alkalibindendem Material. Die Wirkung der Neutralisation auf den Abfall der K-Werte bei 30° ist deshalb auch bei dem Hodenextrakt viel deutlicher wahrnehmbar als bei dem Ovarialextrakt, wie die folgende Versuchsreihe erkennen läßt. Im ganzen ist an diesen wenigen Versuchen jedoch ebenfalls eine Übereinstimmung mit dem Verhalten von Blutkatalase festzustellen.

Tabelle 6a. *Rana temporaria* ♂.

32 ♂♂-Hoden 12 g + 250 ccm Wasser, Ferment vor Verwendung weiter 1:2 verdünnt, also Konzentration 1:41,7.

1 ccm + 250 H₂O₂ ¹/₂₀₀-n. Stets Ferment zu H₂O₂-Lösung gegeben.

	CO ₂ -haltig		CO ₂ -frei		«Neutralisiert»		¹ / ₁₀₀₀ -n-KOH				
(10°)	1' 20"	17,35	180	1' 10"	17,45	235	1'	18,37	233		
	4' 20"	15,32	175	4' 10"	14,84	215	4'	15,64	193		
	7' 20"	13,58	174	7' 10"	12,76	200	7'	13,69	184		
	12' 20"	11,12	151	11' 10"	10,61	200	15' 30"	9,55	178		
	24' 20"	7,32	160	19' 10"	7,34	159	25' 30"	6,34	175		
	32' 20"	5,45		33' 10"	4,40		35' 30"	4,24			
30°	1' 10"	17,43	268	1' 20"	16,91	270	1' 20"	17,74	252	2' 17,95	38,4
	4' 10"	14,48	271	4' 20"	14,03	249	4' 20"	14,91	220	5' 17,48	38,6
	7' 10"	12,01	246	7' 20"	11,84	230	9' 20"	11,57	193	8' 17,02	16,8
	12' 10"	9,05	217	12'	9,28	227	26' 30"	5,94	169	16' 16,50	6,6
	19' 10"	6,38	203	19'	6,44	176	34' 20"	4,35		26' 16,26	
	29' 10"	4,00		29' 20"	4,24						

Katalase aus Raupen und Puppen.

Handelt es sich schon bei den eben geschilderten Versuchen um physiologisch und chemisch sehr unreine Fermentextrakte, so gilt dies in wohl noch höherem Maße von den weiterhin untersuchten Extrakten aus den ganzen Raupen und

Tabelle 6b. *Rana temporaria* ♂.

16 ♂-Ovarien 120 g + 500 ccm Wasser. Konzentration der Fermentlösung, also 1:4,17 (10fach > ♂).

1 ccm + 250 H₂O₂ 1/300-n. Stets Ferment zu H₂O₂-Lösung zugesetzt.

	CO ₂ -haltig			CO ₂ -frei			Neutralisiert ¹⁾			1/1000-n-KOH		
10°	1' 10"	18,26	77,0 65,7 46,2 46,3	1' 10"	19,30	92,0 81,8 72,7 62,6	1' 20"	19,17	100 85,4 60,8 52,4	1' 30"	19,92	59,3 49,5 32,4
	5' 10"	17,01		6' 10"	17,36		6' 20"	17,08		12' 30"	17,14	
	12' 10"	15,30		11' 10"	15,80		12' 20"	15,18		24' 30"	14,95	
	31' 10"	12,50		20' 10"	15,59		38' 20"	10,55		36' 30"	13,67	
	43' 10"	11,00		36' 10"	10,79		58' 20"	8,29				
30°	1' 30"	17,80	135 141 122 110 79,0	1' 30"	18,41	125 113 97,4 78,9	1' 50"	20,59	133 98,2 92,3 68,2	1' 20"	20,61	44,3 22,6 5,4
	4' 30"	16,22		4' 30"	16,89		4' 50"	18,78		8' 20"	19,19	
	8' 30"	14,24		10' 30"	14,44		11' 50"	16,03		19' 20"	18,12	
	13' 30"	12,37		24' 30"	10,55		21' 50"	12,96		40' 20"	17,65	
	25' 30"	9,13		37' 30"	8,33		37' 50"	10,08				
	46' 30"	6,23										

Puppen von *Malacosoma neustria*. Diese Extrakte wurden als weitere Beispiele tierischer aktiver Fermentlösungen gewählt, weil die Raupen ebenso wie die Puppen von Schmetterlingen, wie zahlreiche Versuche ergaben, überhaupt als ein recht brauchbares Material zur Darstellung starker Katalaseextrakte anzusehen sind. Die Raupen wurden vor der Tötung mit Chloroform einige Zeit ohne Futter gehalten, um eine Verunreinigung der Extrakte durch Pflanzennahrung zu vermeiden. Es wurde außerdem durch Versuche festgestellt, daß dieser Darminhalt keine nennenswerte Menge von Katalase enthält. Die getöteten Raupen wurden mit gereinigtem Quarzsand möglichst fein verrieben und aus ihnen wie üblich mit Chloroformwasser Extrakte hergestellt, die nach gehöriger Filtration ziemlich klar, aber infolge Gehalts an einer in der Lymphe der Raupe reichlich vorhandenen Tyrosinase fast schwarzgrün gefärbt waren. Anwesenheit oxydierender Fermente, die ebenfalls in der Lymphe reichlich

¹⁾ Die Fermentlösung reagierte gegen Lackmus deutlich sauer.

vorhanden sind, konnte jedoch in den fertigen Extrakten nicht festgestellt werden. Die Untersuchung dieser Extrakte geschah auch hier nach dem bisher verfolgten Plane; die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen wiedergegeben. Das den früher besprochenen Extrakten analoge Verhalten ist wieder in vielen Punkten in die Augen fallend, wie ein Vergleich mit den früheren Tabellen leicht erkennen läßt. (Tab. 7.) Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch in folgendem: Während der Reak-

Tabelle 7. Raupen von *Malacosoma neustria*.

	1. unverändert			2. neutralisiert			3. $\frac{1}{5000}$ -n-KOH			4. $\frac{1}{5000}$ -n- H_2SO_4		
Ursprünglicher Extrakt.	1'	16,56		1'	17,35		1'	17,70		1'	18,87	
	3'	13,27	481	5'	11,38	458	3'	14,58	421	3'	18,65	25,5
	6'	10,82	296	9'	7,49	454	6'	11,41	355	8'	18,08	27,0
	10'	9,21	175	13'	5,51	333	9'	8,78	379	108'	14,15	10,6
	19'	7,24	115	19'	3,51	326	14'	6,75	286			
							24'	4,14	212			
Alkoholfällung I.	1'	18,25	156	1'	18,72	168	1'	18,46	140	1' 40"	18,72	
	5'	15,80	91,4	4'	16,67	138	4'	16,76	123	8' 40"	18,70	
	16'	12,54	61,1	11'	13,31	122	8'	14,96	100	28' 40"	18,12	6,8
	46'	8,16		29'	8,03	108	18'	11,89	105			
				59'	3,80		37'	7,50				

tionsverlauf bei den bisher besprochenen Fermentlösungen derart war, daß bei ihnen die nach dem Schema einer Reaktion erster Ordnung berechneten K-Werte einen relativ gleichmäßigen Abfall zeigten, kann davon bei den Reaktionen mit den Raupenextrakten gerade unter den Normalbedingungen (d. h. bei 0° und mit unveränderter $\frac{1}{400}$ -n-Perhydrollösung), nicht die Rede sein. Wie die Tabelle erkennen läßt, besteht die Unregelmäßigkeit in einem außerordentlich starken Abfall der K-Werte in den ersten Phasen der Reaktion, worauf dann der Verlauf sich dem früher festgestellten nähert. Dieser schroffe Abfall wird vermieden und der ganze Reaktionsverlauf nähert sich merklich demjenigen einer Reaktion erster Ordnung, wenn

man die Reaktion in neutralisierter Lösung ausführt oder bei 30° vor sich gehen läßt. Den Grund für das sich hieraus ergebende, scheinbar abweichende Verhalten dieses Extraktes bei Neutralisation, Alkalizusatz und Erhöhung der Temperatur, das sich übrigens auch bei Extrakten aus anderen Raupenarten zeigt, glauben wir erkannt zu haben. Um jedoch die Behandlung der hier besprochenen Fragen nicht weiter zu komplizieren, beabsichtigen wir, die hier vorliegenden verwickelten Verhältnisse in einer besonderen Mitteilung darzulegen.

Da die beschriebene Komplikation an den in diesen Lösungen in ganz besonderem Maße vorhandenen Verunreinigungen liegen konnte, so war es von Wichtigkeit, hier auch nach Möglichkeit gereinigte Lösungen zu untersuchen. Es wurde deshalb zunächst wieder eine Fällung der Extrakte mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols vorgenommen, wobei eine nach dem Trocknen zähe, pechartig schwarze Masse von ca. 1 g Trockengewicht erhalten wurde (I. Fällung). Da jedoch das Filtrat dieses Niederschlags sich noch als außerordentlich stark aktiv erwies, so wurde auch hier wie bei den Leberextrakten durch nochmaligen Zusatz des ungefähr gleichen Volumens 96%igen Alkohols eine weitere stark aktive Fällung erhalten. Die Extrakte dieser Fällungen waren noch gefärbt und zeigten mit Lackmuspapier eine schwache, aber deutliche Rötung, wie sie bei den bisher besprochenen Extrakten nicht beobachtet worden war. Die Versuche mit diesen Extrakten sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt. Bemerkenswerterweise zeigen beide gereinigte Extrakte aus Fällung 1 und Fällung 2 die vorhin beschriebene Eigentümlichkeit in der gleichen Weise wie der ungereinigte Extrakt. Im übrigen zeigt die Fermentlösung das übliche Verhalten: Starke Empfindlichkeit gegen Säure, Empfindlichkeit gegen hohe Peroxydkonzentration, besonders bei 30°, ziemlich gute Proportionalität zwischen Fermentkonzentration und Größe der Anfangs-K-Werte.

Ausgesprochen beeinflußt wird der Reaktionsverlauf auch bei diesen Extrakten durch die Dialyse, und zwar bereits nach relativ kurzer Zeit, wie die in Tabelle 10 dargelegten Versuche

Tabelle 8. Raupen von *Malacosoma neustria*.
Alkoholfällung I. ¹⁾

		I.				II.			III.				
		H ₂ O ₂ -Konzentration ¹ / ₄₀₀ -n				H ₂ O ₂ -Konzentration ¹ / ₄₀₀ -n			H ₂ O ₂ ¹ / ₈₀ -n				
		Fermentkonzentration 1				Fermentkonzentration 5			Fermentkonzentration 1				
		a)		b) Parallelversuch									
0°	1'	18,03	183	2'	17,49	122	1'	13,93	963	2' 30"	16,98	90,6	
	4'	15,89	134	5'	16,07	93,1	3'	8,94	544	5' 30"	15,95		80,6
	8'	14,05	93,2	9'	14,75	98,2	5'	6,96	484	11' 30"	14,27		71,9
	13'	12,62	76,7	16'	12,59	76,8	7'	5,57	381	19' 30"	12,50		63,2
	25'	10,21	55,3	33'	9,32	62,9	10'	4,28	203	30' 30"	10,65		60,1
	35'	8,99		51'	6,89		14'	3,55		42' 30"	9,02		
30°	1'	17,00	340	1'	18,30	283				1'	18,25	260	
	3'	14,54	312	4'	15,05	274				4'	15,25	234	
	6'	11,72	281	8'	11,69	251				8'	12,29	163	
	10'	9,05	285	12'	9,27	217				12'	10,58	145	
	15'	6,52	247	17'	7,22					20'	8,12	97,5	
	22'	4,38								33'	6,05		

Tabelle 9. Raupen von *Malacosoma neustria*.
Alkoholfällung II.

		Relative Fermentkonzentration 1			Relative Fermentkonzentration 5		
0°	1'	18,33			1'	16,45	440
	4'	17,33	81,2		4'	12,14	355
	9'	15,87	76,4		7'	9,50	233
	25'	13,50	43,9		10'	8,09	185
	45'	11,87	27,9		19'	5,51	
30°	1'	17,92	94,9		1'	15,71	566
	5'	16,42	93,6		4'	10,63	560
	12'	14,12	88,3		7'	7,22	467
	23'	11,29	81,4		10'	5,23	432
	33'	9,36			13'	3,88	363
					19'	2,35	

¹⁾ In dieser Tabelle sind unter sich vergleichbar nur die Versuche I a mit II und I b mit III.

erkennen lassen. Die Aktivität der Fermentlösung nimmt stark ab, der Reaktionsverlauf mit dem Dialysat nähert sich aber auch hier demjenigen einer Reaktion erster Ordnung, so daß von dem ursprünglich starken Abfall der K-Werte im Anfang der Reaktion nichts mehr festzustellen ist.

Tabelle 10. Dialysat des ursprünglichen Extraktes von *Malacosoma neustria*.

	I. vor der Dialyse			II. nach 18 ^h Dialyse		
0°	1'	16,48	417	1'	18,20	59,3
	3'	13,60	286	4'	17,47	54,6
	6'	11,42	137	10'	16,20	55,4
	11'	9,75	69,3	20'	14,26	55,8
	23'	8,05	62,7	35'	11,76	67,8
	35'	6,77	21,3	60'	7,96	74,8
	62'	4,69		80'	5,64	58,2
				170'	1,69	

Aktive Extrakte pflanzlicher Herkunft.

Da die Katalase auch im pflanzlichen Organismus stark verbreitet ist, so war es von Wichtigkeit, auch einige aktive pflanzliche Extrakte zu untersuchen. Wir wählten als Ausgangsmaterial einmal die ja schon des näheren von Issajeff¹⁾ untersuchte Bierhefe, deren Extrakt von der Blutkatalase ziemlich abweichende Ergebnisse geliefert hatte, ferner keimende Gerste, die schon einmal von Liebermann²⁾ zur Darstellung von Katalaselösungen verwendet worden ist und, endlich Extrakte verschiedener Pilzarten.

Der Isolierung starker Katalaseextrakte aus Pflanzen stellen sich größere Schwierigkeiten entgegen als derjenigen aus tierischen Organismen, da die Katalasen sich offenbar in den Zellen befinden und zu ihrer Isolierung die resistende Zellwand zerrissen werden muß, was die durch die Geschichte der Isolierung der Zymase genügend bekannten Schwierigkeiten bereitet.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 102 (1904); Bd. 44, S. 546 (1905).

²⁾ Pflügers Arch., Bd. 104, S. 201.

Katalase aus Hefe.

Bei der Herstellung der Hefekatalase hielten wir uns möglichst eng an die von Issajeff gegebene Darstellungsvorschrift, um seine Resultate mit den unsrigen vergleichen zu können.

Die aus der Alkoholfällung des nach Issajeff hergestellten Hefeextraktes gewonnene Fermentlösung mußte sehr häufig filtriert werden, ehe eine annähernd klare Flüssigkeit resultierte. Die mit dieser Fermentlösung gewonnenen Versuche sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Das Verhalten dieser Katalase pflanzlicher Herkunft ähnelt offenbar wieder völlig demjenigen der Fermente tierischer Abstammung. Es ist eine ganz ähnliche Empfindlichkeit gegen das Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionengleichgewicht festzustellen wie dort. Neutralisation des Reaktionsgemisches beschleunigt den Reaktionsverlauf, größere Mengen von Alkali hemmen ihn. Auch die Säureempfindlichkeit ist eine sehr große und zwar bei 10° erheblich stärker als bei 30°. (Tab. 11 a.) Nur hinsichtlich des Einflusses des Hydroperoxyds zeigt sich eine auffallende Unempfindlichkeit, indem bis 1/40-n-Wasserstoffsuperoxydlösung bei 0°, bis 1/80-n-Lösung bei 30° offenbar noch nicht verzögernd auf die Reaktion wirkt. Die Reaktionsgeschwindigkeit wächst etwas schneller als proportional der Fementmenge. (Tab. 11 b.)

Tabelle 11a. Hefekatalase, Alkoholfällung.

		1. unverändert			2. neutralisiert			3. 1/500-n-KOH			4. 1/1250-n-H ₂ SO ₄		
0°	2'	8,00	78,3	1' 30"	8,50	97,5	3'	8,11	25,4	2'	8,20	5,3	
	8'	7,18	83,6	11' 30"	6,79	83,9	11'	7,74	19,7	12'	8,10	3,3	
	19'	5,81	77,9	25' 30"	5,18	82,1	31'	7,07	13,6	46'	7,98	2,9	
	34'	4,44	76,6	53' 30"	3,05		51'	6,64		84'	7,69		
	54'	3,12											
30°	5' 30"	7,45	94,0	2'	7,99	62,0	1' 30"	7,69	25,7	1' 40"	8,30	9,2	
	15' 30"	6,00	71,8	11'	7,02	54,4	5' 30"	7,51	8,5	5' 40"	8,23	5,3	
	32' 30"	4,53	67,2	46'	4,53		23' 30"	7,25	5,0	25' 40"	8,03	2,4	
	58' 30"	3,03	50,6				60' 30"	6,95		70' 40"	7,83	1,7	
	78' 30"	2,40								155' 40"	7,58		

Den außerordentlich geringen Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit zeigt dieses Ferment besonders deutlich (vgl. Tab. 11c). Steigert man die Temperatur von 0° über 10°, 20° bis auf 30°, so nehmen die Anfangs-K-Werte nur in sehr geringem Maße zu. Allerdings zeigt sich bei den höheren Temperaturen die zerstörende Wirkung der Wärme in einer Zunahme des Ganges der K-Werte, doch kann diese nicht den geringen Einfluß der Temperatur auf die Anfangs-K-Werte bedingen, denn auch in dem Intervall von 0°–10°, wo von einer solchen Zerstörung noch nichts zu bemerken ist, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit überhaupt nicht zu.

Tabelle 11b. Hefekatalase, Alkoholfällung.

	Ferment 2 ccm + 500 $\frac{1}{400}$ -n-H ₂ O ₂			Ferment 5 ccm + 500 $\frac{1}{400}$ -n-H ₂ O ₂			Ferment 2 ccm + 100 $\frac{1}{80}$ -n-H ₂ O ₂			Ferment 2 ccm + 100 $\frac{1}{40}$ -n-H ₂ O ₂		
0°	1' 40"	23,28	56,9	1' 20"	23,66	138	1' 20"	20,89	302	1'	43,20	309
	7' 40"	21,52		5' 20"	20,84		6' 20"	14,77		5'	32,51	
	47' 40"	14,29	44,5	13' 20"	16,41	130	10' 20"	11,80	244	10'	24,20	256
	67' 40"	12,00	37,9	31' 20"	10,19	115	14' 20"	9,05	288	15'	17,71	271
	92' 40"	9,62	38,4	49' 20"	6,65	103	27' 20"	4,40	241	20'	13,16	258
	172' 40"	4,92	36,4	74' 20"	3,80	99,6	35' 20"	2,70	265	28'	8,14	261
30°	Ferment 2 ccm + 250 $\frac{1}{200}$ -n-H ₂ O ₂						Ferment 2 ccm + 100 $\frac{1}{80}$ -n-H ₂ O ₂					
	5' 30"	7,45	94,0				1' 20"	21,30	299			
	15' 30"	6,00		6' 20"	15,10	271						
	32' 30"	4,53	71,8				10' 20"	11,76	241			
	58' 30"	3,03	67,2				15' 20"	8,91	268			
	78' 30"	2,40	50,6				19' 20"	6,96	242			
						26' 20"	4,71	189				
						36' 20"	3,05					

Vergleicht man diese Resultate mit den Issajeffschen Befunden, so finden wir insofern Übereinstimmung der Ergebnisse, als ja Issajeff, unbeschadet eines normalen Ablaufs der Reaktion, seine Versuche bei 25° und mit Peroxydkonzentrationen von $\frac{1}{90}$ bzw. $\frac{1}{35}$ -n ausführte. Also auch dort ist eine ziemliche Peroxydunempfindlichkeit festgestellt worden.

Tabelle 11c. Hefekatalase, Alkoholfällung.

0°			10°			25°			30°		
2'	8,00	78,3	2'	7,95	75,3	2'	7,90	80,6	5' 30"	7,45	94,0
8'	7,18	83,6	10'	6,92	68,4	10'	6,81	74,4	15' 30"	6,00	71,8
19'	5,81	77,9	24'	5,55	78,7	23'	5,45	67,8	32' 30"	4,53	67,2
34'	4,44	76,6	34'	4,63	61,3	34'	4,59	56,9	58' 30"	3,03	50,6
54'	3,12		48'	3,80	79,0	48'	3,82	59,3	78' 30"	2,40	
			64'	2,84		64'	3,07				

Die jedoch von uns gefundene Ähnlichkeit der Verhaltens der Hefekatalase gegen Säure und Alkali mit anderen Fermentlösungen steht mit den Issajeffschen Ergebnissen in Widerspruch. Letzterer findet bei $1/750$ -n-Säurelösungen keine erheblichere Schwächung der K-Werte als ca. 4%, während nach unseren Versuchen bei 0° schon in $1/1250$ -n-Lösungen der Anfangs-K-Wert auf etwa $1/15$ seines Betrages fällt; bei 30° ist die Schwächung zwar geringer, aber wesentlich größer, als nach Issajeff zu erwarten wäre, und nähert sich jedenfalls viel mehr derjenigen, die die Blutkatalase und andere tierische Fermente erkennen lassen. Diese Wirkung relativ starker Säure kam auch äußerlich dadurch zum Ausdruck, daß sich bei Zusatz der Säure zum Reaktionsgemisch stets eine leichte Trübung der Fermentlösung einstellte.

Fast noch auffallender sind die Abweichungen zwischen den Issajeffschen und unseren Befunden bezüglich des Verhaltens gegen Alkali. Issajeff stellt für Alkalikonzentrationen bis $1/500$ bzw. $1/300$ -n Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei streng monomolekularem Reaktionsverlauf fest. Beschränken wir uns auf die Wirkung des Alkalis, wie sie schon bei 0° festgestellt werden kann, — da ja bei höheren Temperaturen das Alkali, wie früher dargelegt wurde (siehe die erste Mitteilung Seite 291 ff.), die katalytische Zersetzung des Hydroperoxyds spontan stark beeinflussen kann —, so kann von einer Reaktionsbeschleunigung bei ca. $1/500$ -n-Hydroxyl-Ionenkonzentration hier jedenfalls durchaus nicht die Rede sein, ebenso wenig wie von einem monomolekularen Reaktionsverlauf der

Peroxydzersetzung. Es muß also festgestellt werden, daß sich im großen und ganzen auch dieser pflanzliche Katalase-extrakt dem Verhalten der Senterschen Hämaselösung anschließt.

Katalase aus Pilzen.

Auch dies Material wurde in den Kreis der Betrachtung gezogen, weil Euler¹⁾ gerade mit Extrakten aus Pilzen — er verwandte im besonderen solche aus *Boletus scaber* — eine auffallende Unempfindlichkeit gegen Hydroperoxyd beobachtet hatte, die mit unseren bisherigen Befunden bezüglich des Verhaltens aktiver Extrakte pflanzlicher Herkunft in Einklang stehen würde. Euler führt insbesondere einige Versuche an, in denen der Pilzextrakt noch mit $\frac{1}{20}$ -n- H_2O_2 -Lösungen und bei 15° einen streng monomolekularen Reaktionsverlauf ergab.

In Ermangelung der von Euler benutzten Pilzart haben wir Versuche mit einer Anzahl anderer Pilzspezies ausgeführt. Hauptsächlich kamen zur Verwendung direkte Preßsäfte aus dem Wiesenchampignon *Agaricus campester*, die besonders stark aktiven Saft lieferte. Zunächst verfahren wir zur Herstellung aktiver Lösungen aus Pilzen allerdings so, wie Euler empfohlen, indem wir nämlich die Pilze möglichst fein zerrieben und die zerkleinerte Masse so rasch und gründlich als möglich mit dem gleichen Volumen Wasser extrahierten. Später haben wir jedoch ausschließlich, wie oben gesagt, mit dem direkt gewonnenen Preßsaft der ganzen Pilze gearbeitet, der noch schneller gewonnen werden konnte und alsbald in verschlossener Flasche auf 0° abgekühlt wurde. Diese Vorsichtsmaßregel ist notwendig, da der ja auch sonst an Katalaselösungen wenigstens bei höherer Temperatur beobachtete spontane Rückgang der Aktivität hier ganz besonders stark in den Vordergrund tritt. Eine Folge dieser ganz abnormen Labilität des Fermentes in den Pilzsäften ist die Unmöglichkeit der Herstellung einer Alkoholfällung, die auch Euler schon konstatierte, ferner die Tatsache, daß es fast nie möglich ist, den Pilzsaft

¹⁾ l. c. vgl. Literatur bei Oppenheimer, Fermente, Bd. 1, S. 398.

längere Zeit auf dem anfänglichen Aktivitätsgrad zu erhalten, auch unter den oben angegebenen Versuchsmaßregeln. Aus diesem Grunde eignet sich dieses Material besonders wenig zur Ausführung größerer Versuchsreihen und die nachstehende Tabelle, welche eine solche nach unserm bisherigen Arbeitsplan (Tab. 12a) gewonnenen Reihe von Versuchen zeigt, muß deshalb mit einigem Vorbehalt gegeben werden, da das Ferment am Schluß der Versuchsreihe offenbar nicht mehr seine ursprüngliche Aktivität besaß. Immerhin geht aus den Versuchen hervor, daß sich im ganzen auch dieses Ferment in seinem Verhalten den früher besprochenen Lösungen anschließt, wenn man in Rücksicht zieht, daß eine sehr stark verunreinigte Lösung vorliegt. Auffällig ist nur die bisher noch in keinem Fall beobachtete außerordentliche Temperaturempfindlichkeit, die dazu führt, daß eine merkliche Hydroperoxydzersetzung bis 30° überhaupt nicht mehr stattfindet.

Tabelle 12a. Pilzkatalase.

		1. unverändert			2. neutralisiert			3. $\frac{1}{5000}$ -n-KOH			4. $\frac{1}{50000}$ -n-H ₂ SO ₄		
0°	1'	16,90	777 694 523	1'	16,81	904 739 611	1'	16,31	826 735 731 656	1'	18,11	98,7 37,1 32,5	
	7'	5,78		7'	11,82		4'	9,22		4'	16,94		
	10'	3,58		11'	2,44		7'	5,55		12'	15,82		
	15'	1,96		15'	1,39		11'	2,83		22'	14,68		
							16'	1,33					
30°	1'	18,98	—										
	3'	19,13											
	24'	19,12											

Im Hinblick auf die von Euler bei 15° festgestellte Konstanz der K-Werte haben wir nun seine Versuchsbedingungen genau angewandt. Die so erhaltenen Versuche zeigen (vgl. Tab. 12b) jedoch einen ausgesprochenen abfallenden Gang der K-Werte. Versuche bei 0° beweisen, daß dieser Gang zum größten Teil auf Temperaturwirkung beruht. Die Peroxydkonzentration ist jedoch in Übereinstimmung mit Eulers Befunden ohne Einfluß auf den Reaktionsverlauf, wie die in

Tab. 12c angegebenen Versuche zeigen. Die Ursachen für das abweichende Verhalten bei höherer Temperatur darzulegen, behalten wir aus den bei Besprechung der Raupenextrakte angeführten Gründen einer weiteren Mitteilung vor.

Tabelle 12b. Pilzkatalase. Einfluß der Temperatur.

	Champignon			Steinpilz			Pfifferling			Spitzmorchel		
0°	1'	27,50		1'	41,01		1'	37,73		1'	27,72	
	2'	20,20	1340	7'	33,30	151	5'	29,52	266	2'	18,71	1707
	3'	15,78	1072	17'	25,00	125	11'	22,25	205	3'	12,85	1632
	5'	9,67	1063	30'	16,03	149	22'	13,95	184	4'	9,00	1547
	8'	5,45	830	41'	12,00	114	54'	6,25	109	6'	4,59	1462
	11'	3,25	748	69'	5,93	110						
15°	1'	28,93		1'	39,90		1'	36,95		1'	26,00	
	3'	17,82	1052	7'	29,31	223	6'	27,27	264	2'	17,15	1807
	5'	12,88	705	14'	21,49	193	13'	22,40	122	3'	11,89	1591
	9'	8,17	494	24'	15,70	136	37'	19,30	26,9	4'	9,40	1021
	13'	6,39	267	45'	10,51	84,0				5'	7,43	1021
20°	1'	31,10										
	2'	26,99	616									
	3'	24,49	422									
	6'	19,81	307									
	12'	17,50	89,7									
	22'	16,74	19,3									

Katalase aus keimender Gerste.

Hierzu wurde frisch gekeimte Gerste (Malzauszüge¹⁾ erwiesen sich als nur recht schwach aktiv) fein zerkleinert, mit Chloroformwasser ausgezogen und der abfiltrierte Extrakt mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt. Der ursprüngliche Auszug erwies sich als ziemlich sauer (blaues Lackmuspapier wurde durch ihn deutlich rot), weshalb auch durch Neutralisation des Ferments direkt eine sehr erhebliche Aktivierung möglich war, wie die folgenden Versuche lehren. (Tab. 13a.)

¹⁾ Mit solchen hat schon L. Liebermann einige Versuche angestellt. Pflügers Archiv, Bd. 104, S. 203 (1904).

Tabelle 12c. Pilzkatalase. Einfluß der Peroxydkonzentration.

1. Champignon			2. Spitzmorchel		
Peroxydkonzentration $\frac{1}{400}$ -n			Peroxydkonzentration $\frac{1}{200}$ -n		
1'	13,03	1399	1'	38,54	334
3'	6,84	1049	3'	33,05	226
5'	4,22	940	5'	29,78	152
7'	2,75		9'	25,90	100
			21'	19,63	72,6
			40'	14,29	
Peroxydkonzentration $\frac{1}{20}$ -n			Peroxydkonzentration $\frac{1}{20}$ -n		
1'	27,50	1340	1'	38,80	336
2'	20,20	1072	2'	35,91	211
3'	15,78	1063	4'	32,58	150
5'	9,67	830	6'	30,40	96,0
8'	5,45	748	12'	26,66	46,9
11'	3,25		40'	19,70	

Jedoch wurde wegen dieser Komplikation von einer weiteren Untersuchung des direkten Extrakts abgesehen und eine nähere Prüfung nur an dem Extrakte aus der Alkoholfällung vorgenommen. Die Fällung erforderte den Zusatz des doppelten Volumens Alkohol und ergab eine nach dem Trocknen gelbbraune gelatinöse Masse, die auf die übliche Weise einen bräunlichen, völlig klaren Extrakt von genügender Aktivität, aber immer noch merklich saurer Reaktion lieferte. Die Versuche mit diesem Extrakte zeigt Tabelle 13b.

Tabelle 13a. Gerstekatalase, Ursprünglicher Extrakt.

0°.

I. unverändert			II. Ferment vor dem Zusatz zur H_2O_2 -Lösung neutralisiert		
2'	20,96	39,6	2'	20,93	71,6
6'	20,21	54,1	8'	18,96	79,4
17'	17,62	47,5	16'	16,38	67,0
36'	14,31	51,4	30'	13,20	
75'	8,96				

Tabelle 13b. Gerstekatalase, Alkoholfällung.

	1. unverändert			2. neutralisiert			3. $\frac{1}{5000}$ -n-KOH			4. $\frac{1}{2500}$ -n-KOH			5. $\frac{1}{50000}$ -n-H ₂ SO ₄		
0°	1'	18,99	80,1	1' 18,13	75,4	1' 30"	19,24	90,5	1'	18,39	63,9	1' 18,04	70,2		
	7'	17,00	75,8	9' 15,78	63,3	10' 30"	15,95	67,7	8'	16,59	61,4	6' 16,64	70,0		
	16'	14,53	65,8	19' 13,64	69,5	18' 30"	14,08	73,5	20'	14,00	59,0	23' 12,65	75,1		
	40'	10,10	62,9	36' 10,39	71,9	31' 30"	11,30	55,6	35'	11,42	38,8	60'	6,67		
	66'	6,93		53' 7,84		58' 30"	8,00	56,6	83'	7,44					
						87' 30"	5,48								
30°	1' 40"	18,14	146	1' 17,99	149				1' 30"	17,12	145				
	5' 40"	15,85	127	4' 16,23	119				4' 30"	15,49	108				
	10' 40"	13,69	125	10' 13,77	107	—			10' 30"	13,33	85,9				
	18' 40"	10,88	87,9	23' 9,99	78,5				34' 30"	8,29	75,1				
	33' 40"	8,03		38' 7,61					47' 30"	6,62					

Es ist offenbar, daß die saure Reaktion auch dieser Lösung etwas die Resultate beeinflußt, indem nämlich die Alkaliempfindlichkeit des Ferments eine scheinbar geringere sein mußte. Immerhin ist die Indifferenz gegenüber Alkalikonzentrationen bis $\frac{1}{1000}$ -n nicht dadurch völlig zu erklären, denn durch Indikatoren konnte leicht festgestellt werden, daß das Reaktionsgemisch eine sehr erhebliche Konzentration an freien Hydroxyl-Ionen besitzen mußte. Diese Indifferenz gegen Alkali ist um so auffälliger, als sie auch für die Versuche bei 30° gilt. Die Wasserstoff-Ionenempfindlichkeit scheint für diese Fermentlösung eine etwas geringere zu sein, als für die tierischen Fermentlösungen.

Was den Einfluß der Temperatur auf die Reaktion anlangt, so scheint er derselbe wie bei den anderen untersuchten Fermentlösungen. Der Temperaturkoeffizient der Reaktion ist relativ klein und die erhöhte Temperatur macht ihre schädigende Wirkung auf das Ferment durch einen ausgeprägten Gang der K-Werte kenntlich, während bei 0° der Reaktionsverlauf mit diesem Ferment sich auffallend gut dem Schema der Reaktion erster Ordnung anschließt.

Bestrahlungsversuche.

Es seien endlich noch in diesem Zusammenhang einige Versuche geschildert, die über die Lichtempfindlichkeit der Extrakte angestellt wurden. Diese verdient hier deshalb besonderes Interesse, weil Wolfgang Ostwald¹⁾ aus dem antagonistischen Verhalten der Oxydationsfermente und der Katalase bezüglich ihrer Lichtempfindlichkeit einen Zusammenhang zwischen dieser Eigenschaft und dem Phototropismus gewisser niederer Tiere festgestellt zu haben glaubte. Man könnte danach erwarten, daß die Lichtempfindlichkeit eine Eigenart derjenigen Katalasen darstellen würde, welche bei typisch phototropen Organismen vorkommen, und es wäre interessant, hierin vielleicht gewisse spezielle Eigentümlichkeiten der Katalasenarten feststellen zu können, nachdem die bisher angewandten Mittel zu ihrer Charakterisierung keine deutlichen Unterschiede zu ihrer Klassifizierung erkennen ließen. Es sei gleich hier vorweggenommen, daß eine derartige Spezifität sich nicht konstatieren ließ, indem nicht nur die untersuchten Raupenextrakte, sondern auch diejenigen aus Leber, Fett und Blut eine große Lichtempfindlichkeit erkennen ließen. Als Lichtquelle benützten wir bei unseren Versuchen eine Quarzquecksilberlampe, deren Strahlen die Fermentlösung in einer Entfernung, in der keine merkliche Erwärmung durch sie mehr stattfand, ausgesetzt wurde. Der Einfluß einer eventuellen Erwärmung wurde außerdem durch besondere Vorversuche als unwesentlich erwiesen. Eine an ultravioletten Strahlen reiche Lichtquelle eignet sich auch aus dem Grunde besonders für solche Versuche, weil, wie sich bald herausstellte, hauptsächlich die ultravioletten Strahlen die Lichtwirkung, d. h. die Schwächung der Fermentlösung bedingen. Denn in Glasgefäßen bestrahlte Lösungen zeigten entweder keine oder nur eine vergleichsweise sehr geringe Beeinflussung. Es wurde daher die Bestrahlung in Gefäßen aus Quarzglas oder, wenn es sich um größere Mengen handelte, in Uviolglasgefäßen ausgeführt (vgl. hierzu Tab. 14a).

¹⁾ Bioch. Zeitschrift, Bd. 6, S. 409 (1907) u. Bd. 10, S. 1 (1908).

Tabelle 14a.

	1. un- bestrahlt		2. im Glasrohr bestrahlt 5h 25'		3. im Quarzrohr bestrahlt 15'		4. desgl. 40'		5. desgl. 2h 30'						
Fett- katalase 1 + 500 1/400-n 20°	2'	15,08	297	2'	15,12	299	2'	14,91	273	2'	15,99	192	1'	17,00	187
	5'	12,28	270	5'	12,30	276	5'	12,35	250	5'	14,00	197	5'	14,31	177
	12'	7,95	258	13'	7,40	245	13'	7,80	229	12'	10,22	201	13'	10,33	155
	21'	4,66	263	22'	4,45	233	37'	2,20		21'	6,75	201	22'	7,49	155
	30'	2,70		32'	2,60		wenig getrübt		35'	3,53		31'	5,43		stark getrübt
Leber- katalase 1 + 500 1/400-n 0°	1. un- betrahlt		2. im Glasrohr bestrahlt 2h				4. im Quarzrohr bestrahlt 40'		5. desgl. 4h						
	2'	14,89	378	1' 30"	16,11	203	2'	15,43	184	1'	17,05	0			
	5'	11,47	324	4' 30"	14,00	149	5'	13,59	184	19'	17,06				
	9'	8,51	277	9' 30"	11,79	142	12'	10,11	147	stark getrübt					
	14'	6,19	281	19' 30"	8,51	131	22'	7,20	162						
20'	4,20		29' 30"	6,29		32'	4,95		nicht sichtbar getrübt						

Tabelle 14b.

	1. Lackfarbene Blutlösung 0°		2. Blutlösung, Alkoholfällung 0°		3. Pilzkatalase 0°		5. Sphinx li- gustri, Raupen 0°		5. Sphinx li- gustri, Puppen 0°						
Unbe- strahlt	1' 30"	18,54	407	1' 30"	19,44	148	1'	15,17	1012	2'	16,74	39,8	1'	18,71	1012
	4' 30"	14,00	350	5' 30"	16,96	125	3'	9,52	876	9'	15,70	17,2	3'	11,74	668
	7' 30"	11,00	378	15' 30"	12,71	119	5'	6,36	820	19'	15,09	16,1	6'	7,40	528
	15' 30"	5,48	406	25' 30"	9,66	98,7	7'	4,36	748	44'	13,50		9'	5,14	364
	25' 30"	2,15		59' 30"	4,51		10'	2,60					14'	3,38	
Be- strahlt im Quarz- rohr	30' bestrahlt		30' bestrahlt		20' Im Uviolglas bestrahlt		40' bestrahlt		30' bestrahlt						
	1' 30"	18,72	332	1'	20,04	39,6	1'	18,00	773	2'	17,11	40,8	1'	20,75	589
	4' 30"	14,88	336	4'	19,50	42,4	4'	10,55	679	9'	16,02	20,4	3'	15,82	447
	7' 30"	11,80	348	13'	17,86	28,2	7'	6,60	661	28'	14,65	15,2	6'	11,62	341
	14' 30"	6,73	343	99'	10,02		11'	3,59	519	47'	13,71		11'	7,85	247
22' 30"	3,58					15'	2,22					22'	4,21		

Unter diesen Versuchsbedingungen beruht die Schädigung des Fermentes zweifellos nicht auf einem photochemischen Oxydationsvorgang, wie Tabelle 14c zeigt. Das Gleiche bewiesen Zeller und Jodlbauer¹⁾ für Blut- und Fettkatalase, indem sie mit evakuierten Quarzgefäßen, welche die Fermentlösung enthielten, fast dieselben Resultate erzielten wie mit sauerstoffgefüllten. Unsere Versuchsanordnung unterschied sich von der ihrigen dadurch, daß wir zur Vermeidung jeder Oxydation längere Zeit vor und während der Bestrahlung reinen Stickstoff durch die Fermentlösung leiteten, dessen Indifferenz auf das Ferment an anderer Stelle dargetan ist (vgl. Mitteilung I, S. 273).

Tabelle 14c. Durchleitung von N während der Bestrahlung.

	I. Sphinx ligustri, Puppen 1 + 250 $\frac{1}{200}$ -n 0°			II. Blutkatalase, Alkoholfällung 1 + 250 $\frac{1}{200}$ -n 0°		
	Unbestrahlt	1'	19,60	797	1'	21,52
	4'	11,30	513	4'	16,99	315
	7'	7,93	440	8'	12,71	288
	10'	5,85	310	18'	6,55	270
	17'	3,55		27'	3,74	
30' bestrahlt	1'	21,05	470	1' 30"	20,30	84,4
N durch-	4'	15,21	309	4' 30"	19,15	81,8
geleitet	8'	11,44	219	8' 30"	17,76	77,3
	14'	8,45		17' 30"	15,13	80,4
				33' 30"	11,25	

Die Wirkung des Lichts besteht vielmehr offenbar darin, daß die ultravioletten Strahlen den Lösungszustand des Ferments verändern. Denn im allgemeinen ist mit der Schwächung der Aktivität eine mehr oder weniger deutliche Trübung der Fermentlösung verbunden, die nach längerer Zeit in eine aus-

¹⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. 8, S. 84 (1908); vgl. auch daselbst, Bd. 8, S. 61; s. auch Lockemann, Thies u. Wichern, Diese Zeitschrift, Bd. 58, S. 390 (1909).

gesprochene Fällung übergeht.¹⁾ Die überstehende Flüssigkeit hat dann ihre Aktivität teilweise oder vollkommen eingebüßt. Trotzdem scheint jedoch der gebildete Bodensatz nicht völlig seine Aktivität verloren zu haben. So war z. B. ein aktiver Extrakt durch Bestrahlung von ca. 500 auf 244 geschwächt worden, wenn man die über dem durch Bestrahlung gebildeten Bodensatz befindliche Flüssigkeit untersuchte; nach dem Aufschütteln des Bodensatzes ergab jedoch dieselbe Lösung einen Anfangs-K-Wert von 347. Damit wäre die Erscheinung mit der kolloidfällenden Eigenschaft ultravioletter Strahlen in Zusammenhang gebracht, die ja schon mehrfach festgestellt wurde. Andererseits muß aber hervorgehoben werden, daß die sichtbare Trübung nicht völlig parallel mit der Schwächung der Fermentlösung geht. Ursprünglich klare Fermentlösungen erscheinen nach einer bestimmten Zeit der Bestrahlung schon erheblich geschwächt, ohne eine merkliche Trübung erkennen zu lassen. Auch die Schwächung erfolgt offenbar sprungweise und nicht proportional der Belichtungsdauer. Es kommt vor, daß eine Fermentlösung während einer bestimmten Zeit der Belichtung (etwa 20 Minuten) so gut wie keine Schwächung ihrer Aktivität zeigt, um dann in den nächsten 5 Minuten außerordentlich stark geschwächt zu werden. Diese Erscheinung erinnert an eine Art photo-chemischer Induktion.

Geringe alkalische Reaktion der Fermentlösung scheint ihre Lichtempfindlichkeit außerordentlich zu steigern, saure Reaktion dagegen nicht. Das stimmt durchaus mit den Befunden von Zeller und Jodlbauer an Blut- und Fettkatalase überein, so daß man wohl schließen kann, daß auch diese Eigenschaft allen Katalasen zukommt. (Vgl. Tabelle 14d.)

Die Wirkung tritt auch in Uviolgefäßen ein und zwar auch bei einer Verdünnung der Fermentlösung, wie sie im Reaktionsgemisch vorliegt. Bestrahlt man nämlich unter ständigem Rühren mit einem zweckmäßig durch eine Wasser-

¹⁾ Die ultramikroskopische Untersuchung der Fermentlösung, mit der wir zurzeit beschäftigt sind, läßt auch auf einen solchen Zusammenhang schließen. Bei längerer Beobachtung einer aktiven Fermentlösung nimmt die Zahl der Mizellen im Gesichtsfeld ganz erheblich zu.

Tabelle 14d. Leberkatalase.

	10 ccm Fermentlösung mit 1 ccm $\frac{1}{100}$ -n-H ₂ SO ₄ versetzt, davon 2 + 500 $\frac{1}{400}$ -n-H ₂ O ₂ 0°			10 ccm Fermentlösung mit 1 ccm $\frac{1}{10}$ -n-KOH versetzt, davon 2 + 500 $\frac{1}{400}$ -n-H ₂ O ₂ 0°		
unbe- strahlt	1' 30"	13,08	428	2'	12,23	404
	4' 30"	9,73	404	5'	9,25	375
	7' 30"	7,36	357	8'	7,14	350
	11' 30"	5,30	317	13'	4,77	336
	16' 30"	3,68		21'	2,57	
40' be- strahlt	1' 30"	14,34	288	2'	15,21	5.4
	4' 30"	11,75	258	10'	15,06	
	7' 30"	9,83	231			
	14' 30"	6,78	212			
	22' 30"	4,59				

turbine getriebenen Glasrührer das Reaktionsgefäß und vergleicht man den Reaktionsverlauf in der bestrahlten Lösung mit demjenigen der Dunkelreaktion, so findet man ein wesentlich rascheres Sinken der K-Werte bei ersterem Versuch. Daß dieser Abfall der K-Werte auf eine Schädigung des Ferments durch die Bestrahlung zurückzuführen ist, folgt daraus, daß man auch eine wesentliche Aktivitätsverminderung des Ferments beobachtet, wenn man den Versuch so anstellt, daß man die zur Reaktionsverdünnung gebrachte Fermentlösung ohne Hydroperoxyd bestrahlt und darauf nach Zufügung des Peroxyds den Reaktionsverlauf mit der vorherbestrahlten Fermentlösung verfolgt. Dann verläuft die Reaktion wie die Dunkelreaktion, nur mit dem Unterschied, daß ihre Geschwindigkeit von Anfang an eine wesentlich geringere ist. (Vgl. Tabelle 14e.)

Das Absinken der K-Werte im bestrahlten Reaktionsgemisch ist jedoch nicht immer festzustellen, und dies erklärt sich daraus, daß das Peroxyd, wie sich leicht nachweisen läßt, in den in der Reaktion angewendeten Verdünnungen bereits durch die zur Wirkung gelangenden Strahlen zersetzt wird. So ging z. B. bei zweistündiger Bestrahlung im Uviol-

kölbchen der Titer einer $1/200$ -n- H_2O_2 -Lösung von 16,38 auf 12,75 herunter, während eine im Dunkeln gehaltene Lösung die Titer 16,57 und 16,56 ergab. Es lagert sich also über die fermentative Hydroperoxydzersetzung mit einem gewissen Betrage die photochemische Zersetzung des Peroxyds, die, wenn sie stark genug ist, die Fermentschädigung verdecken kann.

Tabelle 14e. Bestrahlung während der Reaktion.

	1. Unbestrahlt			2. Während der Reaktion bestrahlt			3. Vor der Reaktion 30' bestrahlt		
Fettkatalase 25°	2'	14,27	185	2'	14,17	178	2'	15,33	136
	10'	10,15	188	20'	6,59	123	6'	13,53	113
	18'	7,18	151	30'	4,97	107	10'	12,19	115
	33'	4,26		43'	3,61	93,9	20'	9,35	110
				60'	2,50		29'	7,44	

	1. Unbestrahlt		2. Während der Reaktion bestrahlt		3. Vor der Reaktion bestrahlt					
					20'		32'		50'	
Leberkatalase 25°	3'	14,99	3'	15,31	1' 20"	16,27	1' 30"	16,30	1' 30"	16,53
		279		265	238		189		154	
	7'	11,59	8'	11,29	5' 20"	13,07	5' 30"	13,70	5' 30"	14,34
		258		245	192		153		152	
	12'	8,61	12'	9,01	9' 20"	10,95	19' 30"	8,36	9' 30"	12,45
		278		184	198		151		127	
20'	5,40	20'	6,42	17' 20"	7,60	28' 30"	6,11	17' 30"	9,85	
	219		156					113		
33'	2,80	33'	4,03					32' 30"	6,66	
			126							
			48'	2,61						

Was den Unterschied in der Empfindlichkeit der verschiedenen Fermentlösungen anlangt, so hat es den Anschein, als wenn solche quantitativer Art beständen und zwar, wie natürlich, in der Richtung, daß die reineren Fermentlösungen empfindlicher sind als unreine. Jedoch ist eine einigermaßen quantitative Vergleichung der Fermentlösungen in dieser Hinsicht schwierig, da ja die Empfindlichkeit gewiß auch von äußeren Umständen, wie Trübungsgrad und Färbung der Lösung, abhängt. So zeigt sich z. B. der Extrakt der Raupe von *Sphinx ligustri* gerade weitgehend indifferent gegen die Lichtwirkung, was jedenfalls mit seiner schwarzgrünen Färbung in Zusammenhang steht. Diese dunkle Färbung rührt von einem sehr hohen Gehalt an Tyrosinase her. Benutzt

man Puppen von *Sphinx ligustri*, bei denen der Extrakt wegen Abnahme der Tyrosinase hell gelblichgrün gefärbt ist, so tritt bei der Bestrahlung eine sehr erhebliche Schwächung ein. Die gleiche oder ähnliche Ursache (Schutzkolloid) wird wohl auch die auffallende Verschiedenheit der Lichtempfindlichkeit von Blutlösung und gereinigter Blutkatalaselösung haben.

Zusammenfassung.

Das Verhalten aktiver (wasserstoffperoxydzersetzender) Extrakte tierischer sowohl als pflanzlicher Herkunft ist übereinstimmender und insbesondere dem Verhalten der Hämase Sinters weit ähnlicher, als nach den bisherigen Angaben in der Literatur zu erwarten war.

Diese Übereinstimmung betrifft besonders den Einfluß, der auf den Verlauf der fermentativen Hydroperoxydzersetzung durch kleine Änderungen im Wasserstoffhydroxylionengleichgewicht des Reaktionsgemisches hervorgebracht wird.

Ein Gleichgewicht, das sich von dem in kohlenstoffsaurem, destilliertem Wasser vorhandenen wesentlich in der einen oder der anderen Richtung entfernt, wirkt stets verzögernd auf den Reaktionsverlauf. Schon der Kohlenstoffsauregehalt des destillierten Wassers hemmt die Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Empfindlichkeit der Reaktion vermindert sich, wenn in den aktiven Extrakten relativ viel Verunreinigungen enthalten sind (direkte Organextrakte), wahrscheinlich infolge Basen- und Säurebindungsvermögens vorhandener Eiweißkörper oder einer vorläufig nicht näher zu erklärenden Schutzwirkung der Verunreinigung, welche an die Wirkung der sog. Schutzkolloide erinnert.

Es ist möglich, daß die abweichenden Befunde Eulers bei Fettkatalase und diejenige Issajeffs bei Hefekatalase sich in dieser Weise erklären, obgleich betont werden muß, daß wir auch mit ursprünglichen Organextrakten in keinem Fall eine solche Unempfindlichkeit haben feststellen können, wie sie von den genannten Autoren beobachtet wurde.

Daß eine weitgehende Unempfindlichkeit aktiver Extrakte

möglich ist, konnten wir nur an Katalaselösungen aus keimender Gerste feststellen, und zwar auch aus dem Auszuge der Alkoholfällung des ursprünglichen Extraktes.

Die Übereinstimmung im Verhalten der verschiedenen Fermentlösungen gilt auch für die Reaktionstemperatur von 30°: Die schwächende Wirkung der Wasserstoffionen tritt bei dieser Temperatur stets in geringerem, die der Hydroxylionen in stärkerem Maße auf als bei 0°.

Der Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit entspricht ebenfalls völlig den bei Blutkatalaselösungen gemachten Erfahrungen. Er ist meistens sehr klein und je nach den übrigen Reaktionsbedingungen wechselnd. Der Reaktionsverlauf entspricht im allgemeinen nicht genau demjenigen einer Reaktion erster Ordnung. Auch bei sehr verdünnter Wasserstoffperoxydkonzentration ($1/400$ -n) und der Reaktionstemperatur von 0° ist fast in allen Fällen eine Abnahme der K-Werte festzustellen.

Als ein Mittel, den Reaktionsverlauf demjenigen einer Reaktion erster Ordnung weitgehend zu nähern, ist für alle untersuchten Extraktlösungen die Dialyse anzusehen; längeres Dialysieren hat jedoch stets auch eine sehr erhebliche Abnahme der Extraktaktivität zur Folge.

Die Proportionalität zwischen Fermentmenge im Reaktionsgemisch und Reaktionsgeschwindigkeit, gemessen an den Anfangs-K-Werten, ist ausreichend, um einen Vergleich der Aktivität verschiedener Extrakte zu ermöglichen, vorausgesetzt, daß die Versuchsbedingungen im übrigen streng übereinstimmen.

Schwächung der Aktivität durch Bestrahlung ist ebenfalls bei allen untersuchten Fermentlösungen nachgewiesen. Der Grad der Empfindlichkeit hängt auch hier von der Reinheit und natürlich außerdem von der Lichtdurchlässigkeit ab.

Die Lichtwirkung, welche in der Hauptsache den ultravioletten Strahlen zukommt, ist in alkalischer Lösung stärker als in neutraler oder saurer und mit einer Trübung der Fermentlösung verbunden. Jedoch ist häufig Schwächung schon zu beobachten, ehe eine Trübung konstatierbar ist.

Bei Bestrahlung des Reaktionsgemisches zeigt sich die Lichtwirkung in einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Verschiedenheiten im Verhalten der Organextrakte traten gegenüber den genannten Ähnlichkeiten sehr zurück:

1. Die vollständige Fällung des aktiven Stoffes aus den meisten Extrakten (Leber, Fett, Gerste, Raupen) gelingt erst bei einem größeren Alkoholgehalt als der zur Fällung der Hämase erforderlichen ca. 55%igen Lösung.

Aus Fettextrakten ist die Abscheidung aktiver Alkohol-fällung nur selten, aus Pilzextrakten nie gelungen.

2. Während alle untersuchten Extrakte tierischer Herkunft von einer gewissen Konzentration des Hydroperoxyds im Reaktionsgemisch an stets eine Abnahme ihrer Aktivität zeigen, ist dies bei den untersuchten pflanzlichen Extrakten niemals der Fall.

3. Die ganz auffallende Unregelmäßigkeit im Reaktionsablauf mit Raupenextrakten und die abnorme Wärmeempfindlichkeit der Pilzsäfte soll hier außer Diskussion bleiben und an anderer Stelle erklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich demnach sagen, daß, abgesehen von unwesentlichen Abweichungen, der aktive Stoff, welcher die Hydroperoxydzerlegung bedingt, aus Organismen und Organen verschiedenster Herkunft und Funktion gleichartig ist. Von theoretischen Betrachtungen haben wir auch in dieser Arbeit abgesehen. Wir versparen uns deshalb auch ein Eingehen auf die Bemerkungen G. Sinters zu unserer ersten Mitteilung auf den Teil unserer Arbeit, in dem wir die allgemein wichtigen Ergebnisse unserer Untersuchungen im Zusammenhange zu erörtern gedenken. Doch weisen wir darauf hin, daß auch in dieser Mitteilung mehrere Versuche angeführt sind, welche durch die von Senter gemachten theoretischen Annahmen nicht erklärbar sind.

Wie bei der vorigen Mitteilung, möchten wir auch diesmal nicht versäumen, den Direktoren der Institute, in denen wir tätig sind, Herrn Geheimrat Beckmann und Herrn Geheimen Rat Chun, unseren verbindlichsten Dank auszusprechen für ihr freundliches Entgegenkommen in jeder Hinsicht, das uns für die Ausführung unserer Versuche von größtem Werte war.