

# Über die fermentative Hydroperoxydzersetzung.

## I. Mitteilung.

Von

Percy Waentig und Otto Steche.

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

(Der Redaktion zugegangen am 21. April 1911.)

### Inhaltsangabe.

1. Historisch-kritische Übersicht der wichtigsten Arbeiten über fermentative Hydroperoxydzersetzung. — 2. Problemstellung und Plan der Arbeit. — 3. Darstellung der Fermentlösung. — 4. Versuchsanordnung bei den kinetischen Messungen. — 5. Experimentelle Ergebnisse der kinetischen Messungen mit Blutkatalase: a) Einfluß der «Vorgeschichte» der Fermentlösung; b) Einfluß von Hydroperoxyd- und Fermentkonzentration; c) Einfluß von Alkali und Säure; d) Einfluß der Temperatur; e) Nähere Untersuchung der Säure- und Alkaliwirkung. — 6. Zusammenfassung.

Bei einem Versuche, vergleichende Messungen anzustellen über die Stärke der in tierischen Geweben so häufig beobachteten Funktion, Hydroperoxyd zu zersetzen, gelangten wir zu Resultaten, die keine einheitliche Beantwortung der Frage gestatteten.

Als Maß für die Stärke einer fermentativen Wirkung kann, seit dem die von Wilhelm Ostwald<sup>1)</sup> befürwortete Auffassung sich allgemein Geltung verschafft hat, daß die Fermente als Katalysatoren, d. h. Beschleuniger freiwillig verlaufender Vorgänge zu betrachten sind, nur die Geschwindigkeit des Ablaufs der durch die Fermente veranlaßten Reaktionen gelten. Ist nun der Reaktionsverlauf ein einfacher, d. h. ordnet er sich den Gesetzen der Massenwirkung unter, so kann einfach die nach den kinetischen Gleichungen berechnete Geschwindig-

<sup>1)</sup> «Über Katalyse», Vortrag gehalten auf der Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Hamburg 1901.

keitskonstante als Maß für die Stärke der Fermentwirkung angesehen werden. Andernfalls ist ein Vergleich schwierig durchzuführen.<sup>1)</sup>

Die auffälligste Beobachtung, die wir bei unseren anfänglichen Messungen an Extrakten tierischer Gewebe machten, war neben einer schlechten Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse das Auftreten eines sich abwärts bewegenden Ganges in den nach der Reaktionsgleichung erster Ordnung berechneten Konstanten, auch unter Versuchsbedingungen, unter denen vor allem G. Senter<sup>2)</sup> und Jssajeff<sup>3)</sup> einen genau monomolekularen Reaktionsverlauf der fermentativen Hydroperoxydzersetzung gefunden zu haben glaubten.

Diese sehr lästige Eigenschaft der Fermentlösung hat an ähnlichem Material auch Wolfgang Ostwald<sup>4)</sup> beobachtet und ihr dadurch zu begegnen gesucht, daß er die auf die Zeit 0 extra-polierte Konstante als Maß für die Stärke der Fermentwirkung ansah. Die jedoch in solchen Extrapolationen stets begründete Unsicherheit und die merkwürdige Tatsache, daß Ostwald an verwandtem Material wiederum den monomolekularen Verlauf der Reaktion bestätigt fand, veranlaßte uns, die Kinetik der fermentativen Hydroperoxydzersetzung noch einmal einer eingehenden Untersuchung zu unterwerfen, wie dies schon von G. Senter,<sup>5)</sup> Issajeff,<sup>6)</sup> Bach,<sup>7)</sup> Lockemann,<sup>8)</sup> Euler<sup>9)</sup> und anderen geschehen ist, zumal da ein näheres Studium dieser Arbeiten gewisse Abweichungen in den Befunden erkennen ließ, die uns der Erklärung bedürftig schienen.

<sup>1)</sup> Methoden der Aktivitätsbestimmung von Fermentlösungen, wie z. B. diejenige, auf der die Ermittlung der sog. «Katalasezahl» von Jolles (Münch. med. Wochenschr. 1904, Nr. 47) beruht, besitzen eine nur sehr bedingte Brauchbarkeit.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 257, Bd. LI, S. 682 (1905).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 102 (1904), Bd. XLIV, S. 546 (1905).

<sup>4)</sup> Bioch. Zentralbl., Bd. VI, S. 409 (1907) u. Bd. X, S. 1 (1908).

<sup>5)</sup> Loc. cit.

<sup>6)</sup> Loc. cit.

<sup>7)</sup> Berichte d. d. chem. Gesellsch., Bd. XXXVIII, S. 1882 (1905).

<sup>8)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. LVIII, S. 393 (1909).

<sup>9)</sup> Hofmeisters Beiträge, Bd. VII, S. 1 (1906).

Allerdings hat auch G. Senter in manchen Fällen Abweichungen vom einfach monomolekularen Verlauf der Reaktion in der geschilderten Weise beobachtet, jedoch nur bei Hydroperoxydkonzentrationen höher als  $\frac{1}{80}$  normal und Temperaturen mindestens über  $10^{\circ}$ , und auch da sind die Abweichungen in diesem Sinne noch gering; selbst bei der Verwendung einer so unreinen Fermentlösung, wie es das lackfarbene Blut darstellt, konnte der monomolekulare Reaktionsverlauf bei  $0^{\circ}$  und nicht zu hoher Peroxydkonzentration beobachtet werden. Arbeitete Senter bei Temperatur  $0^{\circ}$  und mit Peroxydkonzentrationen, bei denen eine Oxydation nicht mehr auftrat, so machte sich besonders bei sehr niedriger Fermentkonzentration eine Abweichung von dem monomolekularen Verlauf in dem Sinne bemerkbar, daß die K-Werte, welche den verschiedenen Phasen der Reaktion entsprachen, zunahmen, eine Erscheinung, die Bredig und Müller-Berneck<sup>1)</sup> und Bredig und Ikeda<sup>2)</sup> bei der Platin-Katalyse des Wasserstoffsperoxyds in viel stärkerem Maße beobachtet und durch eine aktivierende Wirkung des entstehenden Sauerstoffs auf das kolloide Platin zu erklären versucht haben. Diese Deutung kann nach Versuchen von Liebermann,<sup>3)</sup> der keine aktivierende Wirkung des Sauerstoffs im Entstehungszustande auf die Katalase feststellen konnte, für letztere also nicht zutreffen. Senter macht auf Vorschlag Luthers<sup>4)</sup> die Annahme, daß es sich um eine verzögernde Wirkung des Hydroperoxyds handelt, das mit dem Ferment eine zum Teil gesplattene Verbindung eingeht. Dies würde nach Senter nebenbei die ebenfalls beobachtete Tatsache erklären, daß die Reaktionsgeschwindigkeit schneller als die Katalysatorkonzentration zunimmt, und daß in den schwächeren Wasserstoffsperoxydlösungen die Reaktion etwas schneller verläuft. Alle diese von Senter geschilderten Abweichungen des Reaktionsverlaufs von der Norm sind jedoch relativ gering, sodaß es berechtigt er-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 258 (1899).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 1 (1901), S. 323 (1901).

<sup>3)</sup> Pflügers Archiv, Bd. CIV, S. 203 (1904).

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 290 f.

scheint, wenn er am Ende seiner Arbeit die Hämasekatalyse des Hydroperoxyds als eine Reaktion erster Ordnung hinstellt und in einer späteren Arbeit, die hauptsächlich der Untersuchung der Wirkung von Zusätzen gewidmet ist, zur Charakterisierung der Fermentwirkung nur noch einen konstanten Wert angibt. Vergleicht man damit die Untersuchungen anderer Autoren, insbesondere diejenige von Issajeff, der eine Katalase pflanzlicher Herkunft, die Hefekatalase, nach ähnlicher Reinigung wie bei Senter untersuchte, so wird, obgleich sich im einzelnen, wie schon erwähnt, erhebliche Abweichungen in den Befunden ergeben, an dieser Auffassung nichts Wesentliches geändert. Auch er findet sogar bis zu Hydroperoxydkonzentration von  $\frac{1}{90}$  normal bei  $25^{\circ}$  und  $\frac{1}{33}$  normal bei  $0^{\circ}$  monomolekularen Verlauf der Reaktion. In gewissem Gegensatz zu den Senter'schen Angaben wird beobachtet, daß gerade bei höherer Fermentkonzentration ein absteigender Gang der K-Werte zu beobachten ist, eine Tatsache, die sich vielleicht mit dem Befunde von Faitelowitz<sup>1)</sup> in Einklang bringen läßt, der bei einer Untersuchung über die hydroperoxydzersetzende Wirkung von Milch fand, daß der hier ebenfalls immer beobachtete Gang in den K-Werten größer wurde, wenn die Rahmkonzentration, d. h. also die Konzentration des Ferments, das sich als mit den Fettkügelchen der Milch vergesellschaftet erwies, zunahm. Noch weniger empfindlich gegen Hydroperoxyd und höhere Reaktionstemperatur scheint die von Euler<sup>2)</sup> untersuchte Pilzkatalase (von *Boletus scaber*) zu sein. Er fand noch mit  $\frac{1}{20}$ -normal-Peroxyd bei  $15^{\circ}$  innerhalb 55 Minuten völlig monomolekularen Verlauf der Reaktion, was um so auffälliger ist, als die Empfindlichkeit der Boletuskatalase in anderer Beziehung, z. B. gegen Säuren, diejenige aller anderen Katalaselösungen zu übertreffen scheint.

Unter den Faktoren, welche ferner den Reaktionsverlauf der Hydroperoxydzersetzung durch Katalase zu beeinflussen geeignet seien, hat Senter besonders auf die Wirkung ge-

<sup>1)</sup> Dissertation, Heidelberg 1905, Milchw. Zentralbl., Bd. VI, S. 299, 361, 420 (1910).

<sup>2)</sup> Loc. cit.

ringer Mengen von Säure und Alkali hingewiesen. — Die Wirkung der Säuren ist eine relativ einfache, sie ist nach ihm mit geringer Ausnahme proportional der Wasserstoffionenkonzentration (Essigsäure wirkt etwas schwächer, Salpetersäure etwas stärker) und besteht in einer momentanen Schwächung des Ferments, die jedoch durch nachträgliche Neutralisation völlig zu beseitigen, also umkehrbar ist. Den Reaktionsverlauf fand Senter durch Säure nicht beeinflusst. Die Empfindlichkeit der Senterischen Hämase gegen Wasserstoffionen zeigt folgende Versuchsreihe, die seiner zweiten Arbeit über diesen Gegenstand entnommen ist, speziell für Schwefelsäure:

$H_2SO_4$ -Konzentration:  $\frac{1}{20000}$      $\frac{1}{40000}$      $\frac{1}{100000}$

Reaktionskonstante: 0,0035    0,0072    0,0150.

Ganz anders verhält sich die Hefekatalase Issajeffs allem Anschein nach auch gegen Säuren. Einmal ist auch die Säureempfindlichkeit viel geringer, denn wenn die Säurekonzentration von 0 auf  $\frac{1}{150}$  normal steigt, sinkt der Wert für die Anfangskonstante nur von 0,0118 auf 0,0103, ferner aber erfolgt die Schwächung durch die Säure, nicht wie bei der Blutkatalase in kürzester Zeit, sondern allmählich, sodaß die K-Werte nun einen stärkeren Gang aufweisen, und endlich ist die Schwächung hier durchaus irreversibel. Den «Säuregang» Issajeffs hat Senter dadurch zu erklären gesucht, daß für das Zustandekommen der Schwächung eine, wenn auch sehr geringe Einwirkungszeit erforderlich sei. Dagegen sprechen jedoch einmal die Neutralisationsversuche Issajeffs,<sup>1)</sup> ferner aber vor allem die Tatsache, daß die Zunahme der Schwächung noch nach einer Stunde beobachtbar war.

Euler hat Senter's Versuche an Blutkatalase bestätigt, während seine Pilzkatalase eine, wie schon erwähnt, auffällig hohe Säureempfindlichkeit zeigt, indem nach seinen Angaben schon Essigsäure in  $\frac{1}{10000}$ -n-Konzentration die Reaktion fast zum Stillstand bringt.

<sup>1)</sup> Die Neutralisationsversuche scheinen allerdings zum Teil nicht ganz richtig angestellt zu sein. J. ließ nämlich eine höhere Säurekonzentration zunächst auf das Ferment einwirken, bevor er die Neutralisation vornahm, als er in den Versuchen ohne Neutralisation, deren Verlauf aufzuklären war, angewandt hatte.

Eine aus Schweinefett isolierte Katalaselösung erwies sich dagegen nach Euler als sehr unempfindlich, und auch hier ist die Wirkung, wenigstens in einigen Fällen, nicht augenblicklich. Beachtenswert sind jedoch folgende Tatsachen, die sich aus den Werten von Euler, der leider nur immer einen K-Wert zur Charakterisierung einer Fermentlösung angibt, erkennen lassen. Während nämlich einmal mit  $\frac{1}{2000}$ -n-HCl die Wirkung momentan auftritt, sinkt mit  $\frac{1}{200}$ -n-HCl beispielsweise die Konstante in 35 Minuten von 0,050 auf 0,0017. Andererseits ist die Säurewirkung um so stärker, je geringer die Fermentkonzentration ist:

Reaktionskonstante für Versuch ohne Säurezusatz	Reaktionskonstante für Versuch in $\frac{1}{10000}$ -n-HCl-Lösung
0,063	0,060
0,0090	0,0065

Die schwächende Wirkung des Alkalizusatzes ist nach Senter geringer und nicht momentan, sodaß die Hydroperoxydkatalyse sich während der Reaktion noch verlangsamt, wenn das Alkali nicht schon längere Zeit mit dem Ferment in Berührung war. Issajeff dagegen beobachtete bei geringem Alkalizusatz zunächst stets eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, die erst bei erheblichen Alkalimengen einer Schwächung der Fermentwirkung Platz machte. In einer späteren Untersuchung hat Senter diesen Befund Issajeffs auch für Blutkatalase bestätigt, jedoch sind die Konzentrationen, bei welchen er eine Verbesserung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet, viel geringer als bei Issajeff. Er findet folgendes: NaOH-Konzentration im

Reaktionsgemisch:	$\frac{1}{\infty}$	$\frac{1}{50000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{1000}$
-------------------	--------------------	-------------------	-------------------	------------------

Reaktionskonstante:	0,0150	0,0153	0,0200	0,0140
---------------------	--------	--------	--------	--------

während Issajeff bis zu Alkalikonzentrationen von  $\frac{1}{500}$  normal für Kalilauge und  $\frac{1}{300}$  normal für Natronlauge Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet hatte. Bei seiner Hefekatalase erscheint außerdem die Wirkung auffallenderweise momentan, denn der Verlauf der Reaktion ist auch in der alkalischen Lösung streng monomolekular. Senter hat als Erklärung der beschleunigenden Alkaliwirkung für seine bei 0° ausgeführten

Versuche eine direkt zersetzende Wirkung des Alkalis auf Hydroperoxyd angenommen, jedoch nicht gezeigt, daß diese bei 0° und den von ihm angewandten geringen Alkalikonzentrationen wirklich merkliche Bedeutung hat. Bemerkenswert im Hinblick auf die Issajeffschen Versuche sind auch einige Angaben von Euler über den Einfluß alkalischer Agenzien auf die Aktivität von Fettkatalase. Er fand mit  $\frac{1}{500}$ -n-Baryumhydroxyd nach 15 Minuten langer Einwirkungszeit eine Schwächung von nur 0,060 auf 0,040, die sich auch innerhalb weiterer 30 Minuten nicht mehr verstärkte.

Als wichtiges Ergebnis der bisherigen Katalaseuntersuchungen kann also nach diesem die Tatsache gelten, daß als erwiesen angesehen wird, daß die fermentative Hydroperoxydzersetzung unter normalen Bedingungen eine Reaktion erster Ordnung ist (wenn wir allerdings von der Arbeit von Faitelowitz absehen, der in keinem Falle den genau monomolekularen Verlauf der Reaktion feststellen konnte). Die Grenze, bis zu welcher äußere Einflüsse hierauf ohne Wirkung sind, scheint jedoch je nach Herkunft der Katalase recht verschieden zu sein. Während Senter Reaktionstemperatur von nicht über 10°, Hydroperoxydverdünnung von mindestens  $\frac{1}{80}$  normal und nicht zu kleine Reaktionsgeschwindigkeit als Bedingungen für Erzielung eines einfachen Reaktionsverlaufs ansieht und für 0° einen erheblichen schwächenden Einfluß der Wasserstoffionenkonzentrationen schon bei  $\frac{1}{10000}$ -Normalität beobachtete, wobei die Wirkung der Wasserstoffionen als fast momentan, diejenige des Alkalis als eine allmähliche anzusehen ist, erscheint Issajeffs Hefekatalase und Eulers Fettkatalase in jeder Beziehung unempfindlicher, d. h. der monomolekulare Verlauf der Reaktion scheint in einem viel größeren Bereich von Temperatur, Hydroperoxydkonzentration, Wasserstoff- bzw. Hydroxylionenkonzentration erhalten zu bleiben. Die Boletuskatalase wird dagegen als noch wasserstoffionenempfindlicher hingestellt wie die Hämase, obgleich sie wiederum erheblich weniger temperaturempfindlich zu sein scheint.

Auf Grund dieser Befunde schien uns die Tatsache nicht mehr so unerklärlich, daß wir auch unter den Senter'schen

Bedingungen mit unseren Extrakten keinen einfachen Verlauf der Reaktion beobachtet hatten. Diese Extrakte konnten ja noch empfindlicher als die Hämaselösungen Selters sein, wobei es natürlich unentschieden bleibt, ob die Empfindlichkeit eine wechselnde Eigenschaft des Ferments an sich oder, was wahrscheinlicher, dem Fehlen der in den chemisch ja niemals reinen Fermentlösungen enthaltenen Schutzstoffe zuzuschreiben sei. Auf Konto der Empfindlichkeit könnten dann auch die abweichenden Befunde der verschiedenen Autoren über die Wirkungsweise der Säure gesetzt werden. So konnte z. B. Issajeff den absteigenden Gang der K-Werte noch bei Schwefelsäurekonzentrationen von  $\frac{1}{750}$  normal messend verfolgen, einer Konzentration, bei welcher der Gang bei der Hämaselösung vielleicht auch beobachtbar gewesen wäre, wenn die Reaktion unter diesen Verhältnissen überhaupt noch mit meßbarer Geschwindigkeit verlaufen wäre. Die S. 231 berichteten Versuche Eulers über die Verschiedenheit der Wirkungsweise verschiedener konzentrierter HCl würden dafür sprechen. Auch der verschiedene Befund hinsichtlich der Umkehrbarkeit der Wirkung dürfte sich vielleicht so erklären lassen. Schwerer zu deuten ist das gänzliche Fehlen einer Andeutung des aufsteigenden Ganges bei der Fettkatalase, das Auftreten eines absteigenden Ganges der K-Werte bei hoher Hefefermentkonzentration, was von Issajeff ungenügend erklärt zu sein scheint, insbesondere aber die Abweichungen hinsichtlich der Alkaliwirkung und die Tatsache, daß die äußerst wasserstoffionenempfindliche Boletuskatalase so unempfindlich gegen Hydroperoxyd, sogar bei Zimmertemperatur ist, sodaß die Reaktion auch noch bei relativ sehr hohen Peroxydkonzentrationen fast genau monomolekular verläuft. Hinsichtlich der Alkaliwirkung ist es beispielsweise nicht erklärlich, warum die scheinbare Unempfindlichkeit der Fett- und Hefekatalase gegen Säure wie alkalische Zusätze hier nicht dieselben Folgeerscheinungen wie bei der Säurewirkung bedingt. Träfe die obige Erklärung für den «Säuregang» bei diesen Fermenten zu, so sollte diesem, da es sich ja auch um besonders hohe Alkalikonzentrationen handelt, ein Alkaligang entsprechen, zumal Euler für die Hämaselösung ja schon bei den



von ihm angewandten, viel niedrigeren Konzentrationen des Alkalis einen Gang der K-Werte während der Reaktion beobachtete.

Die Frage also, ob außer den angenommenen Empfindlichkeitsunterschieden, welche aus begrifflichen Gründen bei quantitativen Untersuchungen über Fermentwirkungen praktisch und theoretisch von größter Wichtigkeit sind, noch spezifische Verschiedenheiten in den Eigenschaften der Katalasen verschiedener Herkunft, wie die eben geschilderten, existieren, ist demnach eine weitere, die sich bei vergleichenden Messungen an Fermentextrakten entgegenstellt.

Ehe wir nun an eine allgemeine Klarstellung dieser Fragen gingen, schien uns jedoch die erste wichtige Aufgabe die Feststellung der Reproduzierbarkeit der Versuche der anderen Autoren zu sein. Wir wählten hierzu als Versuchsobjekt zunächst, als das am besten durchgearbeitete Beispiel, die Hä-mase Senters.

Dabei gelangten wir zu Resultaten, welche, obgleich sie im allgemeinen als Bestätigung der Senterschen Befunde in vieler Hinsicht betrachtet werden können, uns doch zu einer grundsätzlich anderen Auffassung über die Kinetik der fermentativen Hydroperoxydzersetzung überhaupt führten, deren Einzelheiten am Schlusse dieser Untersuchungen, nach Mitteilung des experimentalen Materials, dargelegt werden sollen. Der monomolekulare Reaktionsverlauf scheint insofern für die fermentative Hydroperoxydzersetzung praktisch nicht als charakteristisch, als es nicht in jedem Falle gelingt, durch geeignete Variation der Versuchsbedingungen, welche bisher als wesentlich angesehen wurden, einen solchen Verlauf zu garantieren. Der eigenartige Einfluß der Versuchsbedingungen, insbesondere derjenige der Temperatur macht es wahrscheinlich, daß es sich vielmehr um keine einheitliche Reaktion handelt. Ob dieser Befund, welcher mit Versuchen an Blutkatalase gewonnen wurde, allgemein in dieser Form gültig ist, muß durch spätere Versuche, mit denen wir beschäftigt sind, erhärtet werden. Bestätigt sich unsere Ansicht, so bedeutet das eine bisher nicht genügend beachtete Erschwerung vergleichender Messungen über Katalase-

wirkung<sup>1)</sup>) und stellt auch die bisher angestellten theoretischen Erörterungen über die Kinetik dieser Fermentwirkung in Frage.<sup>2)</sup>

Es fragt sich insbesondere, ob man im Prinzip an dem gleichförmigen Verlauf der fermentativen Hydroperoxydzersetzung festhalten und nur, wie das bisher geschehen ist, die Empfindlichkeit des Ferments für Abweichungen verantwortlich machen soll, oder ob man den gleichförmigen Verlauf nur als einen scheinbaren, durch Zusammenwirken mehr oder weniger regulierbarer Bedingungen gewährleisteten ansehen soll, der für den eigentlichen Chemismus des Vorgangs nichts zu folgern gestattet. Auch eine Entscheidung dieser Frage möchten wir uns vorbehalten, bis wir auch Katalasearten anderer Herkunft geprüft haben, wie wir es überhaupt für zweckmäßig halten, in dieser ersten Mitteilung mit Erklärungsversuchen dieses offenbar sehr komplizierten Erscheinungsgebietes nach Möglichkeit zurückzuhalten, bevor nicht eine vollständige experimentelle Durcharbeitung des Gebiets der fermentativen Hydroperoxydzersetzung vorliegt. Denn nur so scheint es uns möglich, zu auch für die Praxis wertvollen Folgerungen auf diesem Gebiete zu erlangen, die trotz des hier vorliegenden sehr ausgedehnten Literaturmaterials<sup>3)</sup> noch als sehr spärlich bezeichnet werden müssen.

Im Nachstehenden sind nun die Ergebnisse unserer Messungen an der Blutkatalase, welche zu dem eben ausgesprochenen Ergebnisse geführt haben, dargestellt und zwar in der Hauptsache von dem Gesichtspunkte: In welcher Weise wird durch die regulierbaren Bedingungen der Reaktionsverlauf der fermentativen Hydroperoxydzersetzung beeinflusst? Wir

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu die sehr abweichenden Befunde über die Verteilung der Katalase im tierischen Organismus bei Batelli und Stern, Arch. di Fisiol., Bd. II, Lesser, Zeitschr. f. Biolog., Bd. XLVIII und van Itallie, Soc. biol., Bd. LX.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu die Diskussion zwischen G. Senter und H. Euler, G. Senter, Journ. Phys. Chem., Bd. IX, S. 311 (1905); Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 126 (1906). — H. Euler, Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 420 (1905).

<sup>3)</sup> Vgl. die Literatur bei Oppenheimer. Die Fermente und ihre Wirkungen, 3. Aufl., Leipzig 1909.

sind hierbei mit Absicht so ausführlich in der Darstellung gewesen, als der beschränkte Raum einer derartigen Arbeit es gestattet, haben aber trotzdem einen großen Teil unserer sehr zahlreichen Messungsreihen nicht anführen können, die zur Kontrolle der Versuche dienten. Bei derartigen Arbeiten, wie sie die Fermentchemie zu erledigen aufgibt, bei der noch so viel ins Ungewisse schwankt, ist eine Ausführlichkeit der Darstellung ein unumgängliches Übel, wenn die Früchte der eigenen Arbeit anderen Mitarbeitern nur einigermaßen zugänglich gemacht werden sollen.

Es geht deshalb diesen Versuchsreihen, in denen also hauptsächlich der Einfluß der wesentlichsten Faktoren, welche auf die Katalasewirkung von Einfluß sind, d. h. also der Temperatur, der Hydroperoxydkonzentration, der Fermentkonzentration, des Neutralitätsgrades des Reaktionsgemisches besprochen sind, eine kurze Darstellung darüber voraus, wie die Fermentlösung erhalten und in welcher Weise die Messungen der Reaktionen vorgenommen wurden.

Die Reihenfolge, in welcher die Versuche mitgeteilt sind, konnte nicht diejenige sein, in der sie tatsächlich angestellt wurden. Die Ausführung solcher Versuche wird durch eine große Anzahl praktischer Nebenumstände bestimmt, die für den gedanklichen Zusammenhang nicht in Betracht kommen. Es sind zunächst diejenigen Versuche besprochen und zusammengestellt, welche den eventuellen Einfluß der «Vorgeschichte» der Fermentlösung auf die Kinetik der Peroxydzersetzung darstellen, wobei auch ein eventueller Einfluß der Variation gewisser Versuchsbedingungen berücksichtigt ist, worauf dann nacheinander die Bedeutung der Peroxydkonzentration, der Fermentkonzentration, der Neutralisation, der Zusätze von Säure und Alkali und endlich der Einfluß der Temperatur besprochen ist.

#### **Darstellung der Fermentlösung.**

Bei der Darstellung der Fermentlösung hielten wir uns zunächst so eng wie möglich an die von Senter gegebene Vorschrift, die hier in aller Kürze referiert sei. Ein bestimmtes Volumen ganz frischen defibrinierten Rinderblutes wurde mit

dem zehnfachen Volumen kohlenensäuregesättigten Wassers verdünnt und so einen Tag im Eisschrank aufbewahrt. Darauf wurde die klare lackfarbene Blutlösung von dem aus den Stromata bestehenden Bodensatz abgossen und mit dem gleichen Volumen 99%igen Alkohols versetzt. Der dabei entstehende rotbraune voluminöse reichliche Niederschlag abzentrifugiert, mit ca. 55%igem Alkohol dekantiert und darauf auf dem Büchnerschön Trichter abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure und Ätznatron getrocknet. Die stets dunkelrotbraun gefärbte Trockensubstanz wurde darauf gepulvert, eine abgewogene Menge mit destilliertem Wasser versetzt, wobei das Ferment innerhalb ein bis zwei Tagen in Lösung gehen, der rotbraune Niederschlag jedoch ungelöst zurückbleiben soll. Senter erhielt dann nach 4 bis 5maliger Filtration eine klare, schwach gelbliche Flüssigkeit, die bei 0° eine fast völlige Haltbarkeit zeigte und deren Aktivität bei Einhaltung der beschriebenen Darstellungsbedingungen annähernd reproduzierbar sein sollte.

Über die Mengenverhältnisse von Trockensubstanz und Wasser, ob die Extraktion ohne weiteres Umschütteln erfolgte, ob Konservierungsmittel in Anwendung kamen, ob die Dauer der Extraktionen für die erhaltene Fermentlösung von Einfluß sei, darüber hat Senter nichts Näheres angegeben. Er bemerkt nur, daß bei der Reinigungsmethode nur ein Teil der aktiven Substanz, gemessen durch die Aktivität der Lösung, wieder erhalten worden sei.

Als wir jedoch während unserer Arbeit uns gezwungen sahen, die Lösungen aus immer neuem Material wiederholt darzustellen, machten wir die Erfahrung, daß alle die genannten Faktoren von wesentlichem Einfluß auf die Beschaffenheit der erhaltenen Fermentlösung waren.

Zunächst ist es von Bedeutung, wie innig man die Durchmischung von Fermentpulver und Extraktionswasser vornimmt. Schüttelt man das Gemenge auf der Schüttelmaschine, so erhält man beim Filtrieren durch gehärtetes Filter häufig, auch wenn man danach den Niederschlag mehrere Tage sich hat absetzen lassen, ein mehr oder weniger trübes Filtrat, das

sich auch durch wiederholte Filtration nicht ganz klären läßt. Nimmt man dagegen die Extraktion in der Weise vor, daß man die Mischung von Wasser und Trockensubstanzpulver nur einige Male mit der Hand durchschüttelt und dann sich selbst überläßt, so ist die schließlich erhaltene Lösung *ceteris paribus* stets klar. Auch die Feinheit des Trockensubstanzpulvers scheint von Einfluß: gröberes Pulver kann mit der Extraktionsflüssigkeit auch auf der Schüttelmaschine geschüttelt werden, ohne daß man Gefahr läuft, trübe Extrakte zu erhalten. Natürlich ist aber dann auch die Fermentextraktion entsprechend langsamer bzw. unvollkommener. Ganz wesentlich ist der Unterschied in der Aktivität der Fermentlösung, die bei dieser verschiedenen Behandlungsweise auftritt. Wir erhielten beispielsweise mit einem Präparat, das zum Teil mit einer bestimmten Menge Wasser auf der Schüttelmaschine geschüttelt war und nach eintägiger Extraktion bis zur völligen Klarheit des Filtrats durch gehärtetes Filter filtriert worden war, die Reaktionskonstante 659,<sup>1)</sup> während eine nicht geschüttelte Probe derselben Zusammensetzung nach derselben Zeit nur die Konstante 112 lieferte. In einem anderen Falle war die Extraktionsdauer auf 3 Tage verlängert und die nicht auf der Schüttelmaschine, sondern nur mit der Hand kräftig umgeschüttelte Lösung von vornherein mit mehr Wasser angesetzt worden, während die Verdünnung des geschüttelten Extrakts in demselben Verhältnis erst nach der Filtration erfolgte. Die entsprechenden Zahlen für die Reaktionskonstanten betragen 440 für den geschüttelten und nachträglich verdünnten, 172—203 für den nicht geschüttelten Extrakt. Aber auch wenn das Gemisch mehrere Stunden auf der Schüttelmaschine kräftig geschüttelt wurde, gelang die Extraktion nicht vollständig. Sofort nach dem Schütteln, zum Teil abfiltriert, gab ein Extrakt als Konstante 499, nach weiterem dreitägigem Stehen über den Niederschlag 734. Wie langsam und unvollständig die Extraktion eines nach Senter hergestellten Hämasepräparates durch bloßes Stehenlassen und auch beim Schütteln auf der

<sup>1)</sup> Hier wie bei allen folgenden Angaben sind die K-Werte zur Vermeidung der Stellen hinter dem Komma mit  $10^4$  multipliziert.

Schüttelmaschine erfolgt, wenn es sich um große Fermentmengen handelt, mögen die in der später dargestellten Tabelle 1 wiedergegebenen Versuchsreihen lehren. (Vgl. Tabelle 1, S. 249.)

Ob es sich hierbei um Sättigungserscheinungen handelt, ist fraglich. In bezug auf das Ferment selbst waren diese Lösungen jedenfalls niemals gesättigt, denn es lassen sich durch einmaliges Schütteln mit größeren Mengen Trockensubstanz viel aktivere Lösungen erhalten, aber man muß bedenken, daß die gelösten Stoffe offenbar nicht nur aus aktiver Substanz bestehen. In dieser Hinsicht und aus vielen anderen Gründen wären vergleichende Bestimmungen des Trockensubstanzgehaltes und der Asche der untersuchten Fermentlösungen wünschenswert gewesen. Da wir die Lösungen aber fast immer ganz für die Aktivitätsmessungen verbrauchten, mußten derartige Bestimmungen einstweilen unterbleiben. Es wird in einer späteren Mitteilung hierauf eingegangen werden.

Natürlich ist bei derartigen lang ausgedehnten Extraktionen die Anwendung eines Konservierungsmittels wünschenswert. Wir haben Chloroformwasser als vorteilhaft gefunden, obgleich von anderer Seite<sup>1)</sup> behauptet worden ist, daß es die Aktivität der Katalase schwäche. Die später mitgeteilten Versuche, Seite 252, Tabelle 2, beweisen das Gegenteil. Eine indirekt schädigende Wirkung des Chloroforms wäre ja auch aus dem Grunde zu vermuten gewesen, weil die bekanntlich leicht als Zersetzungsprodukt des Chloroforms auftretende Salzsäure bei der großen Säureempfindlichkeit der Fermentlösungen zur Wirkung kommen konnte. Wir haben jedoch, obgleich wir gewöhnlich die Fermentlösungen mit einem geringen Überschuß von Chloroform aufbewahrten, niemals eine saure Reaktion der Versuchsflüssigkeit beobachten können, wobei allerdings die Lösung vor der Einwirkung des Tageslichtes im allgemeinen geschützt wurde.

Im Trockenzustand ist das Ferment ungeschwächt monatelang haltbar. Als Beweis dafür seien folgende Versuche angeführt: Die aus einem Teile einer nach Senter hergestellten frischen Trockensubstanzprobe gewonnene Fermentlösung er-

<sup>1)</sup> Hoffmann und Spiegelberg. Wochenschrift f. Brauerei. Bd. XXII. Nr. 32.

gab am 27. Juni 1910 unter bestimmten Versuchsbedingungen die Reaktionskonstante 499. Aus einem anderen Teile derselben Trockensubstanzprobe wurde annähernd in der gleichen Weise am 24. Februar 1911 eine Fermentlösung hergestellt, welche, unter denselben Versuchsbedingungen untersucht, die Reaktionskonstante 414 lieferte. Der geringe Unterschied beruht darauf, daß der erste Versuch in sogenannter neutralisierter Lösung (siehe später) ausgeführt wurde, was, wie ebenfalls später ausgeführt werden wird, immer eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hat. Die Trockensubstanz war in gepulvertem Zustande in einer gewöhnlichen Pulverflasche bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden und hatte also an Aktivität in etwa 8 Monaten so gut wie nichts eingebüßt. Bei den Fermentlösungen ist das Kühlhalten unbedingt erforderlich, um sie unverändert aktiv zu erhalten. Bei Zimmertemperatur, auch bei Gegenwart von Chloroform, geht schon innerhalb 24 Stunden die Aktivität stark zurück, ohne daß eine sichtbare Veränderung der Lösung zu beobachten wäre. Ist die Lösung von vornherein trübe, so treten auch bei 0° leicht Schwächungen der Aktivität ein, wobei sich gleichzeitig dann meist ein geringer Bodensatz bildet. Ob diese Erscheinung, die nur gelegentlich auftrat, auf einem direkten Ausfallen der aktiven Substanz beruht, oder ob andere als Verunreinigungen ja stets vorhandene Stoffe beim Ausfallen ihrerseits geringe Mengen aktiver Substanz mit niederreißen, ließ sich der sehr geringen Menge dieser Niederschläge wegen nicht sicher feststellen. Diese Empfindlichkeit der Fermentlösung macht es jedenfalls bei einer größeren Versuchsreihe, die sich über mehrere Tage erstreckt, notwendig, die Aktivität der Fermentlösung täglich durch einen Normalversuch zu kontrollieren.

Die bisher geschilderten Beobachtungen gelten für die nach Senter'scher Vorschrift hergestellte Fermentlösung. Wir haben aus verschiedenen Gründen das nach Senter hergestellte Fermentpräparat noch einer weiteren Reinigung unterzogen, indem wir es mit Wasser möglichst vollständig extrahierten und den Extrakt darauf noch einmal in der gleichen Weise, wie von Senter vorgeschrieben ist, mit Alkohol fällten. Der

ziemlich geringfügige Niederschlag wurde darauf in der gleichen Weise gewaschen, getrocknet und die feucht gelbliche, nach dem Trocknen bräunliche gelatinöse Masse von neuem extrahiert. Die hiernach erhaltene Lösung bleibt auch nach beliebig häufigem Filtrieren durch gehärtetes Filter opalisierend trüb, und diese Trübung wird sehr stark, wenn man die filtrierte Lösung weiter verdünnt. Man kann die Zunahme der Trübung so gut wie vollständig vermeiden, wenn man zur Verdünnung an Stelle von destilliertem Wasser physiologische Kochsalzlösung verwendet. Dann erhält man fast völlig klare verdünnte Lösungen, die sich auch nach mehrtägigem Stehen nicht merklich trüben. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß nach Senter<sup>1)</sup> und auch nach Lockemann und seinen Mitarbeitern<sup>2)</sup> Chlor-natrium die Aktivität der Katalase an sich etwas hemmt. Ein Einfluß der besprochenen Verdünnungstrübung auf die Aktivität der Fermentlösung konnte merkwürdigerweise nicht festgestellt werden. Die Fermentlösung zeigte sofort nach der Herstellung der Verdünnung etwa die gleiche Reaktionskonstante wie nach längerem Stehen. Es muß also in diesem Falle angenommen werden, daß die Trübung entweder nicht aus aktiver Substanz besteht, oder daß die Fermentlösung durch den Übergang aus den optisch klaren in den trüben Zustand in ihrer Wirkung nicht verändert wird.

Wie sich ungefähr die Ausbeute an Hämase bei der Isolierung nach der Senter'schen Methode ergibt, mögen folgende Angaben darlegen. 21 lackfarbene Blutlösung ergeben an Alkohol-fällung 11,12 g Trockensubstanz, 1 ccm einer aus 1 g davon mit 50 g Wasser hergestellten Extraktflüssigkeit in der Verdünnung 1 : 500 gab eine Konstante 712; 4 ccm der Blutlösung, die, wie eine einfache Rechnung ergibt, etwa derselben Fermentmenge entsprechen, geben unter genau den gleichen Bedingungen die Konstante 895. Eine unter ebenfalls genau den gleichen Bedingungen untersuchte und hergestellte andere Hämaselösung gab die Konstante 780. Es ist dabei zu betonen, daß durch den ca. 55%igen Alkohol die Katalase vollständig gefällt sein

<sup>1)</sup> a. a. O.

<sup>2)</sup> a. a. O.



mußte. Denn weder die nach dem Abfiltrieren des ersten Niederschlags erhaltenen alkoholischen Lösungen noch die bei längerem Stehen sich abscheidenden neuen Niederschläge in dieser alkoholischen Flüssigkeit zeigen noch merkliche Aktivität. Dies ist auch deshalb erwähnenswert, weil aus einem wässerigen Auszug von Schweinsleber, der ebenfalls eine sehr aktive Katalaselösung liefert, durch 55%igen Alkohol keineswegs sämtliche Katalase fällbar ist. Die Hauptmenge der aktiven Substanz fällt nach unseren Beobachtungen hier erst, wenn die Alkoholkonzentration etwa 75% erreicht hat.

Bei der Reinigung der Hämaselösung liegen die Verhältnisse folgendermaßen: 9 g Trockensubstanz lieferten nach erneuter Fällung einen Trockenrückstand, der, da er zu fest am Filter haftete, nicht ohne Verluste genau zur Wägung gebracht werden konnte, aber sicher nicht mehr als 0,5 g betrug und dieser Gesamtrückstand lieferte dann mit 100 ccm Wasser extrahiert in der weiteren Verdünnung 1 : 5 eine Reaktionskonstante von 773. Ob also bei der Behandlung der Hämaselösung mit Alkohol ein erheblicher Anteil der fermentativen Wirkung zerstört wird, erscheint fraglich, denn es ist zu berücksichtigen, daß weder die nach Senter durch bloßes Anrühren des Trockensubstanzpulvers mit Wasser bewirkten Extraktionen noch die durch Schütteln vorgenommenen ausreichen, um völlige Erschöpfung der Substanz an Ferment zu erzielen. Die früher erwähnten Versuche lassen dies ohne weiteres erkennen.<sup>1)</sup>

Die Ansicht Senter's, daß mit ca. 55%igem Alkohol nahezu das ganze Hämoglobin in Lösung bleibt, können wir nicht teilen. Es wird zunächst ohne Zweifel ein großer Teil des Hämoglobins gefällt, was aus der tiefbraunen Farbe des Niederschlags hervorgeht. Andererseits konnten wir bestätigen, daß die wässerigen Auszüge der Fällung weder oxydierende Eigenschaften zeigten, noch das Spektrum des Hämoglobins erkennen ließen.

Zur Beseitigung von nicht kolloidal gelösten Verunreini-

<sup>1)</sup> Sehr alkoholempfindlich scheint die erwähnte Pilzkatalase aus *Boletus scaber* nach H. Euler zu sein.

gungen wäre die Dialyse am Platze gewesen, die ja schon häufig zur Befreiung der Fermentlösungen von Salzen angewendet worden ist. Schon Issajeff hat jedoch gezeigt, daß bei der Dialyse der Lösung seiner Hefekatalase eine sehr bedeutende Schwächung der Aktivität zu beobachten ist. Wir konnten diese Beobachtung bei der Blutkatalaselösung bestätigen. Die Aktivität einer solchen Lösung ging durch mehrtägiges Dialysieren gegen fließendes Wasser im Pergamentbeutel von  $k = 640$  auf  $k = 50$  herab. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit anderen aktiven tierischen Gewebeflüssigkeiten gemacht. Ob die Katalase deshalb als dialysierbar zu bezeichnen ist, erscheint noch fraglich. Es scheint, als sei der Fortschritt der Dialyse häufig mit einer Trübung der Lösungen verbunden.

Demgegenüber scheint in der vorhin geschilderten Langsamkeit, mit welcher die getrockneten und gepulverten Alkohol-fällungen den aktiven Stoff an das Extraktionswasser abgeben, ein brauchbarer Weg eröffnet, zu mineralstoffarmen Fermentlösungen zu gelangen. Denn es war von vornherein anzunehmen, daß die leichtlöslichen Salze in die ersten Anteile der Extraktionsflüssigkeit übergehen würden.

Wie erwähnt, war es manchmal nicht möglich, durch bloßes Filtrieren durch gehärtetes Filter klare Lösungen zu erhalten. Da es wichtig schien, festzustellen, ob die suspendierten Teilchen aktive Substanz darstellten, wurden diese Lösungen durch Berkefeld-Filter filtriert. Dabei resultierten stets völlig wasserklare Lösungen von wesentlich geringerer Aktivität. Es war aber keine Beziehung zwischen Trübungsgrad und Abnahme der Aktivität festzustellen. Vielmehr scheint die auf Absorption der aktiven Substanz durch das Filter bedingte Schwächung gerade um so stärker zu sein, je reiner die Fermentlösung war. So ergab zum Beispiel der erste Extrakt einer ersten Alkohol-fällung durch die Filtration eine Abnahme von 119 auf 94,5, der zweite Extrakt derselben Fällung eine Abnahme von 590 auf 465, der Extrakt einer zweiten Alkohol-fällung erlitt dagegen eine Aktivitätsabnahme von 650 auf 110. Die Filtration wurde hier selbstverständlich immer in der gleichen Weise ausgeführt, es kam stets ein

neues Filter zur Anwendung und die ersten Mengen des Filtrats wurden stets verworfen. Die Aktivität der mit verschiedenen Kerzen hergestellten Filtrate derselben Fermentlösungen war annähernd gleich. Es wurde z. B. gefunden das eine Mal 344, das andere Mal 322. Auch die völlig klare lackfarbene Blutlösung erleidet bei der Filtration durch Berkefeld-Filter eine sehr erhebliche Schwächung ihrer Aktivität.

#### Versuchsanordnung bei den kinetischen Messungen.

Zur messenden Verfolgung des Reaktionsverlaufs der fermentativen Hydroperoxydzersetzung eignet sich am besten die Methode, welche dazu den Hydroperoxydverbrauch während der Reaktion durch titrimetrische Bestimmung der Wasserstoff-superoxydkonzentration in dem Reaktionsgemisch benutzt. Auch die gasometrische Methode (Messung des entwickelnden Sauerstoffs) ist angewandt worden.<sup>1)</sup> Jedoch ist sie umständlicher und vor allem, wenn die Menge der Versuchsflüssigkeit groß gewählt werden muß, infolge der Gasabsorption durch diese ungenauer. Voraussetzung zur Anwendung der ersten Methode ist, daß das Hydroperoxyd nur in der zu messenden fermentativen Katalyse, und nicht anderweitig verbraucht wird. Eine solche Komplikation kann eine doppelte Ursache haben. Entweder es sind noch andere Katalysatoren zugegen, die eine katalytische Spaltung des Peroxyds herbeiführen, oder Stoffe, die das Peroxyd direkt oder indirekt (Peroxydase) oxydiert. Das Fehlen der Peroxydase in der Sengerschen Katalaselösung ist durch das Versagen der Guajakprobe nachgewiesen, ebenso das Fehlen merklich oxydabler Stoffe. Schwieriger ist die Vermeidung anderer Katalysatoren, denn wenn auch ihre Wirkung unter normalen Bedingungen der Reaktion bei peinlicher Reinhaltung der Reaktionsgefäße (Behandeln mit konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumbichromat und durch Ausdämpfen) ausgeschaltet werden kann, so können sie sich doch auch unter Einhaltung dieser Vorsichtsmaßregeln unter gewissen ungünstigen Versuchsbedingungen (höhere Temperatur, Alkalität der Lösung)

<sup>1)</sup> z. B. v. Faitelowitz, l. c.

sehr störend bemerkbar machen. Reaktionsgemische, in denen die Katalase durch Erhitzen oder durch starke Säure unwirksam gemacht worden war, ergaben in unserem Falle jedenfalls keine merkbare Hydroperoxydzersetzung.

Die Titration des Wasserstoffsuperoxyds erfolgt am besten mit Kaliumpermanganat in saurer Lösung. Störend wirkt hierbei der Reduktionswert des Fermentes selbst und der mit ihm gleichzeitig vorhandenen Verunreinigungen. Aus diesem Grunde läßt sich die Titrationsmethode nur anwenden, wenn es sich um relativ reine Fermentlösungen handelt. Senter hat für die Hämaselösungen gezeigt, daß der Reduktionswert hier vernachlässigt werden kann. Issajeff hat bei seinen Versuchen mit Hefekatalase eine Korrektur angebracht, jedoch nichts Näheres darüber mitgeteilt, wie er ihre richtige Größe festgestellt hat, obgleich es nach Versuchen, die wir hierüber angestellt haben, ziemlich schwierig erscheint, diese Korrektur richtig zu bestimmen. Denn die Oxydation der organischen Substanz erfolgt stets allmählich und es hängt also von der Schnelligkeit der Titration ab, wieviel man für sie in Rechnung zu setzen hat. Wir haben daher auch bei Versuchen mit unreinen Fermentlösungen (lackfarbene Blutlösung) von der Korrektur abgesehen und uns stets durch besondere Versuche über den ungefähren Betrag des Fehlers und seines Einflusses auf die Versuchsergebnisse orientiert.

Die zur Ausführung der Titration zugefügte Säure dient gleichzeitig dazu, die Reaktion zum Stillstand zu bringen. Senter und Issajeff verfahren so, daß sie aus einem größeren Gemenge des Reaktionsgemisches mit einer Pipette Proben in bestimmter Menge von Zeit zu Zeit entnehmen und diese in Säure einfließen ließen. Dabei gibt natürlich die Ausflußzeit der Pipette eine Unsicherheit in der Zeitbestimmung, wenn man die Verzugsdauer nicht zu groß wählen will, was aus vielen praktischen Gründen als wünschenswert erscheint. Der durch die Ausflußzeit bedingte Fehler wird in den ersten Teilen der Reaktion, in denen infolge der größeren Reaktionsgeschwindigkeit Probenentnahmen schneller aufeinander folgen müssen, mehr ins Gewicht fallen als später. Er scheint aber

bei Wahl geeigneter Pipetten klein genug, um vernachlässigt werden zu können.

Die zu verwendende Kaliumpermanganatlösung ist möglichst verdünnt zu wählen, da auch die Reaktion in verdünnter Hydroperoxydlösung abläuft. Wenn man die  $\text{KMnO}_4$ -Lösung vor Lichteinfluß schützt, so ändert sie nach einigem Stehen ihren Titer längere Zeit nicht mehr erheblich. Er kann überdies mit Mohrschem Salz von Zeit zu Zeit kontrolliert werden. Der Titer der verdünnten Hydroperoxydlösung, hergestellt durch Verdünnen von Merckschem Perhydrol mit destilliertem Wasser, ändert sich in Glasgefäßen, auch wenn man diese vor Licht schützt, ziemlich schnell. Wir haben deshalb zuerst die Peroxydlösung mit etwas Schwefelsäure angesäuert aufbewahrt und für jeden Versuch neutralisiert. Später, als wir die Neutralisation vermeiden wollten, haben wir die Hydroperoxydlösung bei jeder neuen Versuchsreihe frisch hergestellt.

Bei Herstellung des Reaktionsgemisches verfuhr Senter in der Weise, daß er Fermentlösung und Hydroperoxydlösung nach genügender Verdünnung zu gleichen Volumina zusammengoß. Es wurde bei Beginn der Reaktion also die Fermentkonzentration nur auf die Hälfte herabgesetzt. Wir verfahren gewöhnlich so, daß wir die Katalaselösung, die in stärkerer Konzentration, gewöhnlich zu 50 Teilen Extraktwasser auf 1 Teil Trockensubstanz hergestellt war, direkt oder nach unwesentlicher Verdünnung in geringer Menge zu der vorher auf die erforderliche Verdünnung gebrachten Hydroperoxydlösung fügten, wobei im allgemeinen eine Verdünnung mindestens auf das Zehnfache eintrat. Senter hat die oben beschriebene Versuchsanordnung vielleicht gewählt, weil er glaubte, daß die Hämaselösung als kolloidales Gebilde bei der Verdünnung Hysteresiserscheinungen zeigen könnte, die sich in einer Beeinflussung des Reaktionsverlaufes äußern könnten. Solche Störungen müßten natürlich bei unserer Mischungsmethode deutlicher hervortreten. Wir haben, wie die später mitgeteilten Versuche zeigen werden, etwas derartiges nicht feststellen können, weshalb, wie gesagt, der größte Teil der Versuche in der oben beschriebenen Weise ausgeführt wurde.

Um den Fehler zu eliminieren, welcher durch die Unbestimmtheit des Zeitpunktes des Reaktionsbeginns sich ergab, denn weder der Fermentzusatz, der allerdings höchstens 10 ccm betrug, noch die erforderliche Durchmischung des Reaktionsgemenges konnte momentan stattfinden, wurde der Reaktionsverlauf stets von einem späteren Zeitpunkt (ca. 1—2 Minuten nach Zusatz der Fermentlösung) an gerechnet.

Die Versuche wurden bei 0°, bei Zimmertemperatur und bei 30° ausgeführt. Bei den 0°-Versuchen befanden sich die Reaktionsgefäße in Eis und die Reaktion wurde erst in Gang gebracht, nachdem festgestellt war, daß die Flüssigkeit auf 0° abgekühlt war. Die Fermentlösung wurde vor dem Zusatze gewöhnlich auch auf 0° vorgekühlt. Doch stellte es sich heraus, daß es ohne jeden Einfluß auf die Reaktion ist, ob dies geschieht oder nicht, vorausgesetzt, daß die zugesetzte Menge Ferment nicht so groß ist, daß sie die Temperatur des Reaktionsgemisches wesentlich ändert. Für die Versuche bei 30° befanden sich die Versuchskölbchen in einem auf diese Temperatur gebrachten Thermostaten und die Probeentnahme erfolgte ohne Entfernung der Kölbchen aus diesem. Auch hier wurde durch Versuche festgestellt, daß Vorwärmen der Fermentlösung vor dem Zusatze den Reaktionsverlauf nicht beeinflußt. Überhaupt erscheint die Temperatur bezüglich ihres Einflusses auf die Reaktionsgeschwindigkeit als ein relativ untergeordneter Faktor bei diesen Versuchen, da, wie sich zeigen wird, der Temperaturkoeffizient der Reaktion außerordentlich gering ist. Da jedoch der Einfluß anderer Faktoren auf die Reaktion sich mit der Temperatur in auffallender Weise ändert, so haben wir uns bemüht, während des Versuchs die Temperatur stets völlig konstant zu erhalten.

Zur Verdünnung der Lösungen diente destilliertes Wasser. Da wir in einem Falle Verunreinigungen darin vermuteten, die den Reaktionsverlauf stören konnten, wurde eine größere Reihe von Versuchen mit einem destillierten Wasser anderer Herkunft ausgeführt, ohne daß jedoch der geringste Einfluß dieser Änderung der Versuchsbedingungen auf die Aktivität des Ferments und den Verlauf der Katalyse hätte festgestellt werden können.

### Kinetische Messungen mit Blutkatalase.

#### a) Einfluß der «Vorgeschichte» der Fermentlösung auf ihre Wirkungsweise.

Die Versuche, über die nun weiterhin berichtet werden soll, sind in strengem Anschluß an die Selterschen Versuchsbedingungen ausgeführt, welche nach seiner Annahme einen monomolekularen Verlauf der Reaktion garantieren. Die verwendete Hydroperoxydlösung war ca.  $1/200$ -n, hergestellt durch Verdünnen von Merckschem Perhydrol mit destilliertem Wasser. Die Versuchstemperatur betrug  $0^{\circ}$ . Die folgende Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der so angestellten Versuche, bei denen 5 bzw. 10 ccm der Fermentlösung, die aus verschiedenen Blutproben (in der Reihenfolge, in der sie verarbeitet wurden, mit den großen Buchstaben des Alphabets bezeichnet) hergestellt waren, zu 500 ccm  $1/200$ -n-Hydroperoxydlösung zugefügt wurden. Von den 3 Kolumnen der Versuchsreihen enthält die erste die Angabe der Zeit, bei welcher die Pipette in die mit verdünnter Schwefelsäure beschickten Titrierkölbchen zu fließen begann, von dem Zeitpunkte des Zusatzes der Fermentlösung zur Hydroperoxydlösung an gerechnet, die zweite die Zahl Kubikzentimeter Kaliumpermanganat, welche die zur betreffenden Zeit entnommenen Proben verbrauchten, die dritte die nach der Reaktionsgleichung erster Ordnung berechneten K-Werte mit  $10^4$  multipliziert. In dieser Weise sind auch sämtliche weiteren Versuche registriert. Die Berechnung der K-Werte geschah nach der die Abweichungen im Reaktionsverlaufe deutlicher zeigenden Formel:

$$0,4545 \cdot K = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{c_1}{c_2}$$

wobei  $t_1$  und  $t_2$  zwei aufeinander folgende Zeitpunkte der Probenentnahme,  $c_1$  und  $c_2$  die ihnen entsprechenden Titrationswerte bedeuten.

In Tabelle 1 sind also eine Anzahl Versuche zusammengestellt, die unter den Selterschen Normalbedingungen angestellt wurden, mit aus verschiedenen Blutproben hergestellten Fermentlösungen. Abgesehen von den Verschiedenheiten der

Tabelle 1.

Verlauf der  $H_2O_2$ -Zersetzung durch Fermentlösungen, die aus verschiedenen Blutproben nach Senter hergestellt wurden.  
Versuchsbedingungen: Temperatur 0°, 500 ccm  $H_2O_2$ -Lösung ca.  $1/500$ -n.

I.		II.		III.		IV.		V.		VI.	
Blutprobe B.		Blutprobe C.		Blutprobe D.		Blutprobe D.		Blutprobe E.		Blutprobe E.	
10g Trockensubstanz mit 500 ccm destilliertem Wasser aufgeschüttelt, nach 2tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter abfiltriert: Klare schwachgelbliche Flüssigkeit. 10 ccm	2g Trockensubstanz mit 100 ccm Wasser aufgeschüttelt, nach 2tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter abfiltriert: Klare hellrötlichgelbe, visköse Flüssigkeit. 1 ccm	2g Trockensubstanz mit 100 ccm Wasser aufgeschüttelt, nach 3tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter abfiltriert: Stark trübe, braungelbe, visköse Flüssigkeit. 1 : 5 verdünnt, 5 ccm	2g Trockensubstanz mit 500 ccm Wasser gemischt, nur kurz umgeschüttelt, nach 3tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter abfiltriert: Klare gelbrote Flüssigkeit. 5 ccm	10g Trockensubstanz mit 50 ccm Wasser aufgeschüttelt, nach 4tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter abfiltriert: Ganz trübe, braunrote Flüssigkeit. 1 : 4 verdünnt, 5 ccm	80g Trockensubstanz mit 1600 ccm Wasser aufgeschüttelt, nach 2tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter abfiltriert: Deutlich trübe, hellrotgelbe Flüssigkeit. 5 ccm						
32,92	29,01	29,64	28,48	37,81	31,81	717	390	508	173	222	119
4' 20"	5'	6'	10'	5' 35"	6'	20,06	368	453	23,28	32,43	28,52
8' 20"	7'	10'	15'	11'	15'	11,28	346	465	19,19	24,37	25,46
12' 20"	10'	14'	25'	22'	25'	6,47	314	455	12,89	13,90	88,4
16' 20"	12'	18'	35'	33'	35'	3,87	292	378	8,61	7,46	83,4
22' 20"	15'	22'	45'	46'	45'	1,90	10,42	3,70	5,82	3,77	14,44



Blutproben, die stets ganz frisches defibriertes Rinderblut darstellten, das in der von Senter vorgeschlagenen Weise mit kohlenensäuregesättigtem Wasser lackfarben gemacht worden war, ist die Darstellungsweise der Fermentlösungen insofern verschieden, als das anfängliche Verhältnis von Trockensubstanz zu Extraktionswasser, ferner die Mischungsweise und die Dauer der Extraktion, bevor die Filtration der Extraktflüssigkeit erfolgte, etwas variiert. Eine Folge davon ist nach dem oben schon Mitgeteilten die Verschiedenheit der Reaktionsgeschwindigkeit, wie sie sich in der Höhe der K-Werte erkennen läßt, ferner, worauf auch schon eingegangen ist, der verschiedene Trübungsgrad der Fermentlösungen. Betrachtet man den Reaktionsverlauf jeder Einzelreaktion, wie er sich aus den K-Werten für verschiedene Phasen der Reaktionen ergibt, so läßt sich ein einigermaßen genügender Anschluß an den monomolekularen Reaktionsverlauf nur in wenigen Fällen erkennen, in den übrigen finden sich sehr erhebliche Abweichungen davon, und wie ein Blick auf die Tabelle lehrt, läßt sich ein Zusammenhang zwischen den Abweichungen und den an dem Kopf jeder einzelnen Tabelle wiedergegebenen Bereitungsarten der Fermentlösungen nicht feststellen. Insbesondere ist, was wir natürlich zunächst vermuteten, eine Beziehung zwischen Trübungsgrad der Fermentlösung und Reaktionsverlauf nicht zu konstatieren. Wir haben außer den hier mitgeteilten Versuchen noch eine größere Reihe solcher Normalversuche, wie wir sie kurz nennen wollen, angestellt, ohne von der Auffassung abzukommen, daß das Auftreten eines streng monomolekularen Verlaufs der Reaktion als zufällig anzusehen ist und daß es die Regel bildet, daß die K-Werte einen mehr oder minder deutlich ausgeprägten absteigenden Gang erkennen lassen, der also so zu deuten wäre, daß die Reaktion in ihrem späteren Verlaufe sich mehr oder weniger verlangsamt, wenn man an der Annahme festhält, daß die fermentative Hydroperoxydzersetzung eine monomolekulare Reaktion darstellt, deren Geschwindigkeit proportional der jeweiligen Hydroperoxydkonzentration ist. Senter, der unter den angewandten Bedingungen von Temperatur und Peroxydkonzentration fast stets einen monomolekularen Verlauf der

Reaktion beobachtet hat, muß also zufällig Blutkatalaselösung in den Händen gehabt haben, die den in Versuch IV und V aus Blutprobe D und C gewonnenen entsprechen würden. Es ist sehr bedauerlich, daß er bei den zahlreichen Messungen, die in seiner zweiten Arbeit sich vorfinden, sich mit der Angabe nur eines K-Wertes begnügt hat, sodaß sich nicht feststellen läßt, ob auch bei allen diesen Versuchen der monomolekulare Verlauf gewahrt blieb. Jedenfalls schien uns nach dem vorliegenden Versuchsmaterial ein deutlicher Unterschied im Verhalten unserer Katalaselösungen im allgemeinen gegenüber denen Senter's vorzuliegen und wir haben zunächst die Ursache dieser Erscheinung zu ergründen versucht, in der Auffassung, daß es sich um ein anormales Verhalten in unseren Versuchen handelte und daß der Gang in einer Beeinträchtigung der Fermentwirkung irgend welcher Art beruhe. Senter hat, wie schon dargelegt, den Gang nur bei höherer Hydroperoxydkonzentration und höheren Temperaturen gefunden und daraus geschlossen, daß er in einer zerstörenden (oxydierenden) Nebenwirkung des Wasserstoffsperoxyds auf das Ferment zu suchen sei. Diese Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten Abweichungen schien uns zunächst fernliegend, weil wir den Gang unter den Normalbedingungen gefunden hatten, und wir suchten die Ursache dafür daher zunächst in den Eigenschaften der Fermentlösung selbst. Da es sich bei unseren Fermentlösungen um, wie im allgemeinen ja stets, offenbar kolloidale, infolgedessen in ihrem Lösungszustande leicht veränderliche und um stets mit mehr oder weniger großen Mengen von Fremdstoffen verunreinigte Lösungen handelte, so konnten auch bei ganz gleicher Darstellungsweise Verschiedenheiten vorhanden sein, die sich einmal auf den Zustand des gelösten Ferments, anderseits auf die Art und Menge der Verunreinigungen beziehen konnten. In Rücksicht auf den ersten Gesichtspunkt haben wir zunächst den Einfluß des Alters der Fermentlösung auf den Verlauf der Hydroperoxydzersetzung festgestellt. Eine hierüber angestellte Versuchsreihe ist in Tabelle 2 mitgeteilt. Eine frisch bereitete Fermentlösung wurde sofort nach der Filtration untersucht, der Rest in zwei Teile getrennt, zum Teil mit, zum

Tabelle 2.

Einfluß des Alters der Fermentlösungen auf den Verlauf der  $H_2O_2$ -Zersetzung.  
Blutprobe D (vgl. Tab. 1/III) 5 ccm + 500 ccm  $H_2O_2$ -Lösung ca.  $\frac{1}{200}$ -n.  $0^\circ$ .

	I. frisch filtriert			II. 2 Tage alt			III. 16 Tage alt		
Mit Chloro- form	2'	29,64	508	2'	29,13	517	2'	29,73	550
	6'	18,56	453	5'	20,38	481	5'	20,34	496
	10'	12,23	465	8'	14,62	482	8'	14,44	484
	14'	7,97	455	11'	10,48	467	11'	10,34	436
	18'	5,24	378	14'	7,59	451	14'	7,65	499
	22'	3,70		17'	5,56		17'	5,42	
Ohne Chloro- form	—	—	—	2'	28,50	546	2'	36,00	330
	—	—	—	5'	19,57	513	5'	28,66	357
	—	—	—	8'	13,83	476	8'	22,39	374
	—	—	—	11'	9,88	516	11'	17,29	366
	—	—	—	14'	6,92	476	16'	11,34	385
	—	—	—	17'	4,98		21'	7,28	

Teil ohne Chloroform in verschlossenen Kölbchen im Dunkeln bei Eisschranktemperatur aufbewahrt und nach 2 bzw. 16 Tagen wieder unter genau den gleichen Versuchsbedingungen geprüft. Ein Einfluß des Alters der Fermentlösung auf ihre Aktivität und die Art ihrer Wirkung ist bei den mit Chloroform sterilisierten Kölbchen nicht festzustellen, insbesondere bleibt der an der sofort nach der Filtration geprüften Fermentlösung festgestellte Gang unveränderlich erhalten. Das chloroformfreie Kölbchen zeigte nach 16 Tagen jedenfalls infolge bakterieller Zersetzung eine deutliche Schwächung der Aktivität; ob die gleichzeitig auftretende Konstanz der K-Werte hiermit etwas zu tun hat, läßt sich nicht sagen. Die Fermentschwächung läßt sich, wie schon erwähnt wurde, in Tagen herbeiführen, wenn man die Kölbchen bei Zimmertemperatur stehen läßt. Dabei ist jedoch niemals eine Verbesserung der Konstanz der K-Werte beobachtet worden, sodaß die eben beschriebene Erscheinung mehr als eine zufällige angesehen werden muß.

Es ist erwähnt worden, daß bei feiner Pulverung der Trockensubstanz und wenn diese mit dem Extraktionswasser

auf der Schüttelmaschine geschüttelt wurde, was beides zum Zweck einer möglichst vollständigen Extraktion des Ferments erwünscht war, meist keine völlig klaren Lösungen erhalten werden konnten. Obwohl schon, wie erwähnt, aus Tabelle 1 hervorgeht, daß ein direkter Zusammenhang zwischen Klarheit der Lösung und dem Gang nicht bestand, war es doch wichtig, ein und dieselbe Lösung in klarem und trübem Zustande zu untersuchen. Dazu bietet die Filtration durch Ton ein passendes Mittel, wobei stets völlig klare Lösungen erhalten werden. In Tabelle 3 sind einige Versuche hierüber zusammengestellt. Es ist ohne weiteres zu sehen, daß, abgesehen von der starken schon besprochenen Schwächung der Aktivität durch die Filtration, ein Einfluß dieser auf den Verlauf der Reaktion nicht zu konstatieren ist. Sämtliche Fermentlösungen, die unter den Normalbedingungen unfiltriert einen Gang zeigen, ergaben den ungefähr gleichen Reaktionsverlauf auch nach der Filtration, wonach es ausgeschlossen erscheint, die Ursache des Ganges in einer Trübung der Lösung zu sehen. Versuch 1 ist direkt mit der zur alkoholischen Fällung verwendeten lackfarbenen Blutlösung ausgeführt, die also außer dem Hämoglobin noch die übrigen Bestandteile des Blutserums, abgesehen vom Fibrin, enthält, Versuch 4 mit einer gereinigten Hämaselösung, von der gleich die Rede sein wird. Auch bei diesen sehr unreinen bzw. sehr reinen Fermentlösungen ist kein Einfluß der Filtration durch Berkefeld-Filter zu bemerken.

Eine Ursache des Ganges der K-Werte, die mit der kolloidalen Natur der Fermentlösung in Zusammenhang stehen würde, konnte endlich noch in einer schon betonten Abweichung der Versuchsordnung von derjenigen Senter's erblickt werden. Wie schon dargelegt, verfuhr Senter so, daß er die Fermentlösung schon vorher soweit verdünnte, daß er zur Einleitung der Reaktion gleiche Teile Peroxyd- und Fermentlösung zusammengoß. Damit vermied er eine plötzliche Verdünnung der Fermentlösung bei Beginn der Reaktion. Setzt man dagegen, wie es bisher bei den geschilderten Versuchen geschehen war, die Fermentlösung in geringerer Menge (etwa 5 ccm) zu einer relativ großen Menge Peroxydlösung (500 ccm), so ist natürlich die plötzliche

Tabelle 3.

Einfluß der Berkefeld-Filtration auf das Verhalten der Fermentlösung.

	I.		II.		III.		IV.	
	Nach Senter hergestellte lackfarbene Blutlösung 2 ccm + 500 ccm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung <sup>1/1000</sup> -n (neutralisierl), 0°		Fermentlösung von Blutprobe E (Vgl. Tabelle 1, VI) 5 ccm + 500 ccm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung <sup>1/1000</sup> -n, 0°		1. Auszug aus dem Rückstand der vorigen Fermentlösung mit 300 ccm Wasser: Gelbrote, schwach trübe Flüssigkeit: 5 ccm + 500 ccm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung <sup>1/1000</sup> -n, 30°		Gereinigte Hämase Lösung (vgl. Tabelle 7) Verdümt 1 : 5. 1 ccm + 500 ccm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung <sup>1/1000</sup> -n: Fast klare, farblose Flüssigkeit, 0°	
Durch gehärtetes Filler filtriert	2'	13,08	2'	31,81	2'	27,81	2'	37,42
	5'	8,67	6'	28,52	5'	18,50	4'	25,48
	7'	6,88	11'	25,46	8'	12,65	6'	18,70
filtriert	10'	5,10	20'	21,20	11'	8,86	8'	13,98
	12'	4,17	40'	14,44	14'	6,24	10'	10,88
	15' 40"	2,97	—	—	17'	4,49	12'	8,26
Durch	2'	14,59	Wasserklar, ganz schwach gelblich		2'	29,58	Wasserklar, ganz schwach gelblich	
	5'	12,49	2' 10"	31,97	5'	21,45	4'	47,62
	7'	11,01	4' 30"	30,39	8'	16,25	8'	43,04
Berkefeld-	10'	9,37	10'	27,71	11'	12,45	12'	39,57
	15'	7,41	20'	23,91	15'	8,85	20'	34,02
	filtriert	27' 10"	31'	20,64	20'	5,95	30'	28,66
	45' 40"	2,16	41'	18,69	—	—	40'	23,76
			—	—	—	—	68'	15,29
								110
								91,3
								82,1
								74,5
								81,4
								68,4

Verdünnung sehr erheblich, sodaß sich damit verknüpfte Veränderungen der Fermentlösung stark bemerkbar machen könnten. Solche sind nun bei hydratischen Substanzen und Kolloiden häufig beobachtete Erscheinungen, und zwar gehen die mit der Verdünnung verbundenen Veränderungen des Gleichgewichtszustandes nicht momentan, sondern häufig langsam vor sich. Nimmt man nun an, daß mit solchen Änderungen des kolloidalen Zustandes des Ferments Aktivitätsänderungen einhergehen, so konnten diese wohl Ursache eines Ganges der K-Werte sein. Ein flüchtiger Blick auf die in Tabelle 4a und 4b zusammen-

Tabelle 4a.

Einfluß der Methode der Mischung von Ferment- und  $H_2O_2$ -Lösung.  
Blutprobe B. 0°.

I.			II.		
a) Zu 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{400}$ -n. werden 5 ccm Fermentlösung zugesetzt.			a) 5 ccm Fermentlösung werden mit 250 ccm Wasser gemischt und 4 Stunden in Eis stehen gelassen. Dann mit 250 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{200}$ -n. (also in der Mischung $\frac{1}{400}$ -n.) gemischt.		
2' 30"	16,79	340	2'	17,94	272
5' 30"	13,28	297	5'	14,87	251
11' 30"	8,81	280	11'	10,52	253
16' 30"	6,43	280	22'	5,54	216
23' 30"	4,11	254	40'	2,26	
32' 30"	2,43	209			
40' 30"	1,65				
b) Zu 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{200}$ -n. werden 10 ccm Fermentlösung zugesetzt.			b) 10 ccm Fermentlösung mit 250 ccm Wasser gemischt, 5 Stunden in Eis stehen gelassen. Dann mit 250 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{100}$ -n. (in der Mischung $\frac{1}{200}$ -n.) gemischt.		
1' 20"	32,92	717	1' 20"	33,88	636
4' 20"	20,06	625	4' 20"	21,83	564
8' 20"	11,28	604	10' 20"	10,02	550
12' 20"	6,47	558	14' 20"	6,04	498
16' 20"	3,87	515	18' 20"	3,82	
22' 20"	1,90				

gestellten Versuche ließ diese Vermutung berechtigt erscheinen, denn es ergaben nach der Senter'schen und unserer Methode ausgeführte Parallelversuche stets einen nicht unerheblichen Rückgang der Geschwindigkeit bei den nach Senter angestellten Versuchen, d. h. dann, wenn die Fermentlösung, nach-

dem sie längere Zeit in verdünntem Zustande gestanden hatte, nun erst zu einem gleichen Volumen Peroxydlösung zugefügt wurde. Jedoch könnte, wie die Versuche zeigen, auch so das Auftreten eines Ganges nicht vermieden werden, und wenn man die Anfangskonstante der nach Senter angestellten Versuche, bei denen also die verdünnte Fermentlösung vorher 4 bezw. 5 Stunden in Eiswasser gestanden hatte, vergleicht mit den K-Werten des Normalversuchs nach einer viel kürzeren Zeit, so ergibt sich aus der Differenz dieser Werte, daß der Gang im letzten Falle sicher nicht allein der Verdünnungswirkung, wenn eine solche überhaupt vorliegt, zugesprochen werden kann.

Tabelle 4b.

Einfluß der Methode der Mischung von Ferment- und  $H_2O_2$ -Lösung.  
Blutprobe E. 0°.

I.			II.		
Fermentlösung zu 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung zugesetzt.			$H_2O_2$ -Lösung zu 500 ccm Fermentlösung zugesetzt.		
a) 5 ccm Ferment + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $1/400$ -n.			a) 5 ccm Fermentlösung + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $1/400$ -n. Inkubation 100°.		
2' 30"	19,91		2' 30"	21,30	
5' 30"	18,37	117	5' 30"	20,27	71,8
10' 30"	16,16	111	10' 30"	18,64	72,8
21' 30"	12,48	102	20' 30"	16,01	66,1
31' 30"	9,55	116	30' 30"	13,87	62,3
41' 30"	7,41	110	45' 30"	10,84	71,4
58' 30"	4,93	104	70' 30"	7,07	74,3
76' 30"	3,23	102	110' 30"	3,45	77,9
b) 5 ccm Ferment + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $1/80$ -n.			b) 5 ccm Ferment + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $1/80$ -n. Inkubation 100°.		
3' 50"	38,57		3'	40,86	
6' 50"	35,46	122	6'	38,33	92,5
10' 50"	32,18	105			89,4
20' 50"	25,26	105	10'	35,30	
31' 50"	20,30	86,3			78,7
42' 50"	16,37	85,0	21'	28,92	
57' 50"	12,25	84,0			77,7
87' 50"	6,96	81,8	35'	22,51	
122' 50"	3,61	81,5	50'	17,98	65,0

Immerhin war es doch wünschenswert, die Verdünnung zu Anfang des Reaktionsverlaufs ganz auszuschließen. Dies ist in den in Tabelle 4b unter II wiedergegebenen Versuchen erreicht, indem zu der bis zu der Konzentration der Reaktion verdünnten und längere Zeit (100 Minuten) bei Eiswasser aufbewahrten Fermentlösung das Peroxyd in konzentriertem Zustande zugefügt wurde. Abgesehen von der auch hier wieder deutlich auftretenden Schwächung des Ferments bei den Versuchen, in denen Peroxyd zu der verdünnten Fermentlösung hinzugefügt wurde, ist auch hier ein Einfluß auf den Gang nicht festzustellen. Die Versuche sind insofern besonders interessant, als sie mit einer Fermentlösung ausgeführt wurden, die überhaupt nur einen sehr geringen Gang unter den Normalbedingungen ergaben. Auch bei diesen Versuchen tritt die Erscheinung deutlich hervor, daß die Reaktion bei vorausgegangener Verdünnung des Ferments langsamer verläuft als im anderen Falle, und daß diese Tatsache mit der Verdünnung wirklich zusammenhängt, wird dadurch wahrscheinlich, daß sie verschwindet, wenn die Verdünnung geringer ist, wie dies in dem Versuche, mit 20 ccm Fermentlösung der Fall ist, vgl. Tabelle 4c. Daß ein Einfluß auf den Reaktionsverlauf vorliegt, erscheint jedoch auch hier unwahrscheinlich. Zwar ist in Versuch 4b unter a der Gang gegenüber dem Normalversuch aufgehoben und ebenso in 4c unter a wenigstens geringer geworden; dem stehen jedoch die anderen Versuche entgegen, bei denen kein Einfluß festzustellen ist, insbesondere auch der in Tabelle 4b unter b angeführte, in dem durch Erhöhung der Peroxydkonzentration (siehe darüber später) der Gang künstlich gesteigert ist. Hier ist ein Einfluß der Mischungsmethode überhaupt nicht festzustellen.

Da die Seltersche Hämaselösung, wie gesagt, sicherlich keine reine Fermentlösung darstellt und die Darstellungsmethode nicht ohne weiteres völlige Übereinstimmung verschiedener Lösungen bezüglich des Gehaltes an Verunreinigungen garantiert, so mußten auch in dieser Richtung Versuche gemacht werden. Die Entfernung der Verunreinigungen konnte auf verschiedenem Wege angestrebt werden.



Tabelle 4c.

Einfluß der Methode der Mischung von Ferment und  $H_2O_2$ -Lösung.  
Blutprobe E. 0°.

I.			II.		
Fermentlösung zu 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung zugesetzt.			$H_2O_2$ -Lösung zu 500 ccm Fermentlösung zugesetzt.		
a) 10 ccm Ferment + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{500}$ -n.			a) 10 ccm Fermentlösung + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{500}$ -n., Inkubation 25'.		
2' 10"	36,91	321	3'	37,47	235
5' 10"	26,57	300	6'	31,85	197
11' 10"	19,55	283	11'	25,40	222
16' 10"	14,44	288	17'	18,70	205
21' 10"	10,37	280	23'	14,09	222
26' 10"	7,51	261	30'	9,85	226
36' 10"	4,12		40'	5,86	
b) 2 ccm Ferment + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{400}$ -n.			b) 2 ccm Fermentlösung + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{400}$ -n., Inkubation 230'.		
2' 30"	21,01	46,4	2' 30"	21,23	39,8
17' 30"	17,90	38,7	7' 30"	20,28	31,3
65' 30"	11,67	34,1	17' 30"	18,87	31,1
90' 30"	9,59	32,2	42' 30"	15,78	33,9
145' 40"	6,38	29,6	67' 30"	13,10	30,9
218' 30"	3,88		90' 30"	11,12	
c) 20 ccm Ferment + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{400}$ -n.			c) 20 ccm Ferment + 500 ccm $H_2O_2$ -Lösung $\frac{1}{400}$ -n., Inkubation 95'.		
1' 10"	18,30	502	1' 20"	17,76	501
3' 10"	14,52	434	3' 20"	14,10	430
5' 10"	11,89	410	5' 20"	11,57	405
8' 10"	8,96	410	11' 20"	6,61	386
11' 10"	6,75	385	20' 20"	2,97	
20' 10"	3,04				

Ein zur Reinigung von Fermentlösungen schon vielfach angewendetes Mittel ist die Dialyse, da die meisten Fermente nicht diffusibel sind, während die Verunreinigungen, insbesondere die mineralischen Stoffe infolge ihres im allgemeinen kleineren Molekulargewichtes leicht durch die Membran dringen.

Für Katalaselösung ist sie schon, wie erwähnt, von Issajeff angewendet worden, wobei sich ziemlich eigentümliche Wirkungen ergaben. Er glaubte, beobachtet zu haben, daß, wenn er mit größeren Hefefermentmengen (dem Volumen nach) die Katalyse vor sich gehen ließ, ein absteigender Gang der K-Werte auftrat und daß dieser Gang durch Dialysieren der Fermentlösung zum Wegfall zu bringen sei, woraus er schloß, daß es sich dabei um die Wirkung von Verunreinigungen handle. Mit der Dauer der Dialyse sinkt jedoch die Aktivität des Dialysats außerordentlich, so daß es nicht klar ist, ob die Ursache des Rückgangs der Reaktionsverzögerung der Entfernung von Verunreinigungen oder nicht einfach dem Umstande zuzuschreiben ist, daß die Reaktion mit der dialysierten Lösung viel langsamer verläuft. Issajeff hat nicht gezeigt, daß, wenn er durch Vergrößerung des Zusatzes der dialysierten Fermentlösung die Reaktionsgeschwindigkeit auf ungefähr den anfänglichen Wert brachte, der beobachtete monomolekulare Verlauf erhalten blieb. Die Abnahme der Aktivität der Fermentlösung ließ jedenfalls auf eine teilweise Diffusibilität der Katalase schließen. Mit den Selterschen Hämaselösungen beobachteten wir ebenfalls eine stärkere Abnahme der Aktivität beim Dialysieren durch eine Pergamentmembran und auch hier die Neigung des Dialysats zur Konstanz der K-Werte, ja in mehreren Fällen ist sogar eine ausgeprägte Zunahme dieser während der Reaktion zu beobachten, sodaß wohl schon jetzt gesagt werden kann, daß in der Dialyse ein ausgesprochenes Mittel vorliegt, den Reaktionsverlauf der fermentativen Hydroperoxydzersetzung zu modifizieren.<sup>1)</sup> Jedoch scheinen die hierbei auftretenden Vorgänge so komplizierter Natur, daß wir es uns vorläufig versagen müssen, auf diese Vorgänge näher einzugehen. Es soll dies in einer späteren Mitteilung geschehen.

---

<sup>1)</sup> Vgl. hiermit die interessanten Befunde beim Dialysieren von Invertaselösungen bei Hudson und Paine (Journ. Amer. Chem. Soc., Bd. XXXII, S. 779 (1910), die beim Dialysieren zunächst eine starke Schwächung, darauf jedoch wiederum eine Zunahme der Aktivität beobachteten; ferner Loew (Pflügers Archiv, Bd. CII, S. 1), der zwei Katalasearten verschiedener Löslichkeit festgestellt zu haben glaubt.

Tabelle 5.

Einfluß der Dialyse auf das Verhalten der Fermentlösung.

	I. Fermentlösung aus Blutprobe B. (vgl. Tabelle I): Klare, schwach gelbliche Flüssigkeit. 5 ccm + 500 ccm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> / <sub>400</sub> -n, 0°			II. Fermentlösung aus Blut- probe E. II. Auszug (vgl. Tabelle 3 III): Röt- lichgelbe, schwach trübe Flüssigkeit. 5 ccm + 300 ccm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> / <sub>200</sub> -n, 0° Berkefeld-Filtrat			III. Fermentlösung aus Blut- probe E. VI. Auszug mit 200 ccm Wasser. Nach Filtration fast klare, gelbliche Flüssigkeit. 10 ccm + 500 ccm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> / <sub>200</sub> -n, 0°		
Vor der Dia- lyse	2' 30"	16,79		5'	31,50		1' 50"	41,29	224
	5' 30"	13,28	340			344	4' 50"	35,36	179
	11' 30"	8,81	297	10'	21,21		11' 50"	26,52	183
	23' 30"	4,11	276	18'	11,71		20' 50"	18,16	145
	32' 30"	2,43	254			295	40' 50"	9,32	151
	40' 30"	1,65	209	33	4,23		63' 50"	4,18	
Nach der Dia- lyse	Fast klare, schwach gelbliche Flüssigkeit			Durch flockige Abscheid- ung getrübe, aber ganz farblose Flüssigkeit			Wie II. Flocken vor Versuch abfiltriert		
	1' 20"	23,09		2' 30"	48,27		1'	21,59	
	4' 20"	22,04	67,4			50,0	15'	20,80	11,6
	16' 20"	17,55	82,4	5' 30"	46,63		50'	19,00	11,2
	32' 20"	12,25	97,6	15' 30"	41,81	47,4	100'	16,65	11,5
	51' 20"	7,22	121	26' 30"	36,93	49,0	236'	11,64	11,5
71' 20"	4,05	126	40' 30"	32,09	43,6	300'	9,92	10,9	

Ein weiteres Mittel, das Ferment von anderen löslichen Verunreinigungen zu befreien, schien in der Langsamkeit zu liegen, mit der es aus der Trockensubstanz beim Stehen mit dem Extraktionswasser in dieses übergeht. In Tabelle 6 a und b sind Versuche angeführt, die unter den Normalbedingungen mit aufeinanderfolgenden Extrakten aus ein und derselben Menge Trockensubstanz angestellt waren. Aber obgleich, wie sich durch nebenher ausgeführte Leitfähigkeits-, Trockensubstanz- und Aschebestimmungen zeigen ließ, der Gehalt an Verunreinigungen in den Extrakten mit der Zahl der ausgeführten Extraktionen stark zurückging, so ist doch von einer Abnahme des Ganges während der Reaktion kaum zu sprechen. Man gewinnt nicht den Eindruck, als ob mit der sicher erreichten



Reinigung der Fermentlösung eine Annäherung an den molekularen Reaktionsverlauf stattfindende.

Tabelle 6b.

Verhalten verschiedener Fermentlösungen, hergestellt durch aufeinanderfolgende Extraktionen ein und derselben Menge Trockensubstanz.

Blutprobe B, 10 g Trockensubstanz.

Versuchsbedingungen: 500 ccm  $\frac{1}{400}$ -N-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 0°.

I. Auszug			II. Auszug			III. Auszug		
mit 500 ccm Wasser auf Schüttelmaschine geschüttelt. Nach 2tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter filtriert: klare schwach gelbliche Flüssigkeit: 5 ccm			mit 250 ccm Chloroformwasser auf Schüttelmaschine geschüttelt. Nach 5tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter filtriert: klare, fast farblose Flüssigkeit: 10 ccm			mit 250 ccm Chloroformwasser nur mit der Hand umgeschüttelt. Nach 11tägiger Extraktion im Eisschrank durch gehärtetes Filter filtriert: klare, fast farblose Flüssigkeit: 10 ccm		
2' 30"	16,79		1' 10"	21,01		1' 10"	20,16	
5' 30"	13,28	340	4' 10"	19,82	844	5' 10"	19,06	60,9
11' 30"	8,81	297	9' 10"	18,45	622	15' 10"	17,55	35,8
23' 30"	4,41	276	29' 10"	14,18	572	27' 10"	15,91	35,5
32' 30"	2,43	254	41' 10"	12,38	491	40' 10"	14,42	32,9
40' 30"	1,65	209	127' 10"	4,68	491	54' 10"	12,88	35,0

Auch eine Reinigung der Fermentlösung durch erneutes Füllen mit Alkohol und Herstellung eines Extrakts aus dem so erhaltenen getrockneten Niederschlag bringt keine Änderung im Ablauf der Peroxydzersetzung hervor, wie die in Tabelle 7 mitgeteilten Versuche mit aus zwei verschiedenen Blutproben hergestellten reinen Fermentlösungen erkennen lassen. Es ist schon mitgeteilt, daß die auf diesem Wege erhaltenen Lösungen bei Verdünnen mit destilliertem Wasser sich stark trüben, daß diese Trübung sich bei Anwendung physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel vermeiden läßt. Aber ebenso wenig wie die Aktivität der Fermentlösung wird der Reaktionsverlauf hierdurch beeinflusst. Dieses Resultat schien besonders wichtig, weil zu erwarten war, daß durch die Reinigung der Reduktionswert der Fermentlösung auf ein Minimum herabgedrückt wurde. Wäre also der Gang zum Teil durch den

hierdurch entstandenen Titrationsfehler bedingt gewesen, so hätte sich das hier zeigen müssen.

Tabelle 7.

Einfluß der Reinigung durch erneutes Fällen mit Alkohol auf das Verhalten der Fermentlösung.

Versuchsbedingungen:  $H_2O_2$   $\frac{1}{1000}$ -n.  $0^\circ$ .

Blutprobe C.			Blutprobe E.		
Herstellung des Extraktes aus dem Niederschlag der ersten Fällung vgl. Tabelle 1/II. Der daraus mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols gefällte und getrocknete Niederschlag wird auf Schüttelmaschine geschüttelt, 3 Tage im Eisschrank extrahiert und durch gehärtetes Filter filtriert: Schwachgelbliche, mäßig trübe Flüssigkeit: 5 ccm.			Herstellung des Extraktes aus dem Niederschlag der ersten Fällung vgl. Tabelle 1/VI. Der aus 1100 ccm dieses Extraktes mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols gefällte und getrocknete Niederschlag wird mit 50 ccm Wasser auf Schüttelmaschine geschüttelt, 4 Tage im Eisschrank extrahiert und durch gehärtetes Filter filtriert: Schwachgelbliche, mäßig trübe Flüssigkeit: 5 ccm.		
2'	22,66	650	2' 30"	42,05	236
4'	16,80	470	5' 30"	35,73	217
6'	13,53	498	10' 30"	27,84	191
10'	9,44	391	20' 30"	17,92	206
12'	8,14	321	30' 30"	11,15	140
16'	6,03		45' 30"	6,87	

Wenn man von den Erscheinungen bei der Dialyse absieht, die wir an dieser Stelle von der Diskussion ausschließen wollen, ergibt sich aus dem Vorausgegangenen jedenfalls, daß durch die besprochenen Versuche, welche zum Zweck hatten, die Fermentlösung einheitlicher, d. h. einerseits homogener im physikalischen, andererseits reiner im chemischen Sinne zu machen, der Reaktionsverlauf in keinem Falle prinzipiell geändert wird. Es kann darnach als für den Reaktionsverlauf ziemlich unwesentlich betrachtet werden, wie weit man die Reinigung der Fermentlösung treibt. Ja, man gewinnt sogar den Eindruck, daß mit zunehmender Reinheit der Lösung ihre Empfindlichkeit gegenüber allen denjenigen zum Teil unbekanntem Einflüssen, welche ihre Aktivität schwächen, zunimmt. Daß die Verunreinigungen, welche durch die Bestandteile des

Blutes in die Fermentlösung und das Reaktionsgemisch gelangen, nicht die Schuld an dem Gange tragen, erhellt noch besonders aus Versuchen mit lackfarbiger Blutlösung (Tab. 8). Sorgt man durch Anwendung genügend kleiner Mengen Blutlösung dafür, daß der Reduktionswert des Blutes nicht störend für die Titration in Betracht kommt, so erhält man mit Blutlösung, die ja zweifellos viel größere Mengen von fremden Stoffen, insbesondere noch das ganze Hämoglobin gelöst enthält, einen mindestens ebenso regelmäßigen Verlauf der Hämaselösung, ja man kann sogar hier häufiger eine gute Konstanz beobachten, was mit dem eben Gesagten in Einklang zu bringen wäre, daß die Empfindlichkeit des Ferments mit zunehmender Reinheit sich steigert. Dies ist auch ganz begreiflich, wenn wir die Kolloidnatur des Ferments in Betracht ziehen, denn es ist ja eine allgemein anerkannte Tatsache, daß kolloidale Lösungen durch gewisse Schutzstoffe außerordentlich viel stabiler gemacht werden können.

### Tabelle 8.

Verhalten der nach Senter hergestellten lackfarbenen Blutlösung.

Blutprobe F.

250 ccm defibriniertes Rinderblut wurden mit dem 10fachen Volumen mit Kohlensäure gesättigten Wassers verdünnt, nach 24 Stunden Stehen im Eisschrank von den Stromata abgegossen und mit Wasser 1:4 verdünnt.

1 ccm + 500 ccm  $H_2O_2$ -Lösung  $\frac{1}{400}$ -n.  $0^\circ$ .

1'	21,14	
4'	19,78	96,2
14'	15,91	94,6
26'	12,09	99,7
44'	8,05	98,1
62'	5,39	96,8

### b) Einfluß von Hydroperoxyd- und Fermentkonzentration.

In den bisher besprochenen Versuchen ist die Hydroperoxydkonzentration bis auf wenige Beispiele nicht variiert worden, sie war  $\frac{1}{200}$  normal, eine Verdünnung, bei der nach Senter eine schädigende Wirkung auf das Ferment nicht zu erwarten war. Soweit dies aus seinen Versuchen hervorgeht, sollte die

schädigende Wirkung, wenn die Versuchstemperatur nicht über  $0^{\circ}$  erhöht wurde, bis zu einer Konzentration von  $\frac{1}{80}$  normal ausbleiben, bei sehr geringen Fermentkonzentrationen und niederen Hydroperoxydkonzentrationen sogar soweit in den Hintergrund treten, daß ein aufsteigender Gang der K-Werte zu beobachten wäre, für dessen Auftreten er keinen bestimmten Grund angeben konnte. Es war wichtig, mit unseren Fermentlösungen, die schon unter den Normalbedingungen die Neigung zu einem absteigenden Gange der K-Werte zeigten, den Einfluß der Hydroperoxydkonzentration nach oben und unten festzustellen.

In Tabelle 9 sind eine größere Anzahl diesbezüglicher Versuche zusammengestellt, die durch einen Teil der schon in Tabelle 4 c mitgeteilten ergänzt werden können. Man erkennt, daß der Seltersche Befund über die Hydroperoxydwirkung insofern vollkommen bestätigt wird, als tatsächlich mit wachsender Wasserstoffsperoxydkonzentration der Gang sich vergrößert. Vergleicht man Phasen der Reaktion, in denen ungefähr gleichviel umgesetzt wurde, z. B. in Versuchsreihe 1, so läßt sich leicht die starke Zunahme der Reaktionsverzögerung feststellen, die beim Übergang von  $\frac{1}{200}$ - nach  $\frac{1}{100}$ - bzw.  $\frac{1}{40}$ -Wasserstoffsperoxyd auftritt. Sie ist ebenso in Versuchsreihe 2 zu bemerken, in der ein Versuch bei  $\frac{1}{400}$  normal mit annähernder Konstanz der K-Werte einem solchen mit  $\frac{1}{80}$  normal gegenübergestellt ist, in welchem die Verzögerung der Reaktion wieder deutlich zutage tritt. Ganz auffallend stark ist endlich die Wirkung bei der gereinigten Fermentlösung aus Blutprobe C, was wir auf die mit wachsender Reinheit gesteigerte Empfindlichkeit der Fermentlösung zurückführen können. Kann also über die Verstärkung des Ganges der K-Werte bei steigender Hydroperoxydkonzentration kein Zweifel bestehen, so macht die einheitliche Deutung der Versuche, in denen die Hydroperoxydkonzentrationen gegen die Normalkonzentrationen von  $\frac{1}{200}$  normal auf  $\frac{1}{400}$  normal herabgesetzt worden war, wiederum Schwierigkeit. Nach Versuch 1 a und 2 a in Tabelle 9 macht es den Eindruck, als wenn hierdurch die Konstanz der K-Werte erreicht würde. Und es ist wohl



Tabelle 9.

Einfluß der  $H_2O_2$ -Konzentration bei unveränderter Fermentkonzentration auf die Reaktion.1. Blutprobe E, IV. Auszug (vgl. Tabelle 5a).  $0^\circ$ .

a) $H_2O_2$ -Lösung $1/400$ -n.			b) $H_2O_2$ -Lösung $1/200$ -n.		
2'	34,37	395	2'	34,56	414
5'	26,17	347	5'	25,88	384
8'	20,59	308	8'	19,85	364
13'	14,45	343	19'	7,89	348
18'	9,74	398	26'	4,50	
23'	6,16	337			
30'	3,58	367			
38'	1,82				
c) $H_2O_2$ -Lösung $1/100$ -n.			d) $H_2O_2$ -Lösung $1/40$ -n.		
2'	34,83	402	2'	35,10	308
5'	26,39	345	5'	28,38	264
8'	20,80	321	8'	23,65	228
21'	7,96	297	12'	19,18	208
28'	4,93		19'	13,71	216
			26'	9,68	

2. Blutprobe E, V. Auszug (vgl. Tabelle 5a).  $0^\circ$ .

a) $H_2O_2$ -Lösung $1/400$ -n.			b) $H_2O_2$ -Lösung $1/80$ -n.		
2' 30"	19,91	117	3' 50"	38,57	122
5' 30"	18,37	111	6' 50"	35,46	105
10' 30"	16,16	102	10' 50"	32,18	105
21' 30"	12,48	116	20' 50"	25,26	86,3
31' 30"	9,55	110	31' 50"	20,30	85,0
71' 30"	7,41	104	42' 50"	16,37	84,0
58' 30"	4,93	102	57' 50"	12,25	81,8
76' 30"	3,23		87' 50"	6,96	81,5
			122' 50"	3,61	

3. Blutprobe C, gereinigte Fermentlösung (vgl. Tabelle 6).

a) $H_2O_2$ -Lösung $1/200$ -n.			b) $H_2O_2$ -Lösung $1/80$ -n.		
2'	37,42	835	2'	20,68	535
4'	25,48	672	4'	16,15	318
6'	18,70	632	6'	13,95	364
8'	13,98	544	8'	11,80	274
10'	10,88	598	10'	10,40	255
12'	8,26		12'	9,25	

keine Frage, daß eine noch weitere Herabsetzung der Hydroperoxydkonzentration die Konstanz weiter begünstigt, ohne jedoch, wie dies bei Senter der Fall war, zu einem aufsteigenden Gang zu führen. Jedoch stehen dem Versuche die in Tabelle 4 unter b und c mitgeteilten entgegen, nach denen auch bei sehr verschiedener Geschwindigkeit der Reaktion infolge verschiedenen Zusatzes an Ferment in  $\frac{1}{400}$ -n-Wasserstoffsuperoxydlösung die Konstanz der K-Werte zu wünschen übrig läßt.

Weil Senter das Verhältnis von Ferment- zu Peroxydkonzentration als wichtig für den Verlauf der Hydroperoxydzersetzung angesehen hat, so schien es auch interessant, bei gleich bleibender und niedriger Hydroperoxydkonzentration die Fermentkonzentration in dem Reaktionsgemisch zu variieren, besonders auch im Hinblick auf die von Issajeff an Hefekatalase gemachte Erfahrung, daß bei größeren Fermentzusätzen eine Verzögerung der Geschwindigkeit der Reaktion eintrete. Nach den in Tabelle 10 mitgeteilten Versuchen ist

Tabelle 10.

Einfluß der Fermentkonzentration bei unveränderter  $H_2O_2$ -Konzentration auf die Reaktion.

1. Blutprobe E, IV. Auszug (vgl. Tab. 5a).  $0^\circ$ .  $H_2O_2$ -Konzentration,  $\frac{1}{200}$ -n 500 ccm.

a) Fermentzusatz 2 ccm.			b) Fermentzusatz 5 ccm.		
2'	43,66	81,0	2'	40,00	210
5'	41,24	62,9	5'	34,61	195
15'	35,68	57,8	10'	27,66	172
30'	29,22	53,3	17'	20,97	174
50'	22,86	52,9	28'	13,49	
85'	14,92				
c) Fermentzusatz 10 ccm.			d) Fermentzusatz 25 ccm.		
3'	32,40	371	2'	24,85	1069
5'	27,31	334	7'	15,19	915
8'	21,68	340	9'	5,30	772
12'	15,85	306	12'	3,11	800
18'	10,38	293	15'	1,79	
24'	6,93				18*

von etwas derartigem nichts zu bemerken. Man könnte, wenn man wiederum die K-Werte gleicher Reaktionsphasen vergleicht, eher eine geringe Abnahme des Ganges mit wachsender Fermentmenge feststellen. Doch sind die Unterschiede zu geringfügig, um einen bindenden Schluß zuzulassen.

Bedeutungsvoller sind die Versuche in Hinsicht auf die Beziehung zwischen Fermentkonzentration und Größe der K-Werte. Vergleicht man die Anfangskonstanten untereinander, so findet man, daß sie ziemlich genau im Verhältnis der Fermentkonzentrationen stehen. Etwas zu niedrig ist der K-Wert, welcher der Fermentmenge von 10 ccm entspricht, was jedoch seine Erklärung darin findet, daß die erste Titerbestimmung bei diesem Versuche etwas später als bei den übrigen Versuchen ausgeführt wurde, infolgedessen also der K-Wert etwas niedriger ausfallen mußte. Weniger gute Übereinstimmung in dieser Hinsicht liefern die in Tabelle 4 c mitgeteilten Versuche, bei denen allerdings auch nicht völlige Übereinstimmung hinsichtlich der Konzentrationen der Hydroperoxydlösung und der Zeiten der Titerentnahme besteht.

Im allgemeinen läßt sich jedenfalls, wie das schon an anderer Stelle betont wurde, eine für praktische Versuche ausreichende Proportionalität zwischen Fermentkonzentrationen und Höhe der K-Werte feststellen, vorausgesetzt, daß die K-Werte für vergleichbare Phasen der Reaktionen oder zum mindesten mit Hilfe von nach der gleichen Zeit entnommenen Titerwerten ermittelt wurden, und daß die Versuche im übrigen unter den genau gleichen Bedingungen ausgeführt sind. Dies ist für vergleichende Messungen natürlich von großer Bedeutung. Denn wenn also nach dem Vorhergehenden die Störung der Reaktion auch durch keine der bisher genannten Vorsichtsmaßregeln völlig ausgeschlossen werden kann, so kann doch bis auf weiteres die Anfangskonstante ohne Anwendung einer Extrapolation auf die Zeit 0 als Vergleichsmaß für die Aktivität einer Fermentlösung angesehen werden.

#### c) Einfluß von Alkali und Säure.

Es ist im Vorausgegangenen dargelegt worden, daß die Wirkungsweise der Blutkatalase in ziemlich hohem Grade un-

abhängig zu sein scheint von den normalen Verunreinigungen, welche aus Gewebsflüssigkeiten in die Fermentlösungen übergehen. Es ist aber offenbar dies nur darin begründet, daß mit der Menge dieser Verunreinigungen der Neutralitätsgrad der Fermentlösung nicht wesentlich geändert wird, daß also die Gewebsflüssigkeiten, aus denen die Fermentlösungen isoliert werden, und mithin die Fermentlösungen selber annähernd neutral reagieren. Denn, wie einleitungsweise dargestellt worden ist, ist von Senter für die Blutkatalase wie auch von anderen Autoren für Katalasen anderer Herkunft eine sehr erhebliche Empfindlichkeit dieser Fermente gegen alkalische und saure Stoffe festgestellt worden, gegen die die Wirkung neutraler Fremdstoffe und ihrer Ionen fast vernachlässigt werden kann, wenn auch die Angaben der Autoren über den Wirkungsgrad und die Wirkungsweise von Alkali und Säure auf ihre Fermentflüssigkeiten zum Teil sehr erheblich qualitativ und quantitativ auseinandergehen. Besonders über die Wirkung des Alkalis sind charakteristische Abweichungen in den Befunden vorhanden und zwar, was hier besonders interessieren mußte, auch bezüglich des Einflusses auf die Reaktionskinetik.

Es ist nun an den Senter'schen Messungen auffällig, daß er, obgleich über den Alkaligehalt seiner Lösung sehr exakte Angaben gemacht werden, nichts darüber angibt, in welcher Weise er diese bestimmte. Betrachtet man aber das Reaktionsgemisch näher, so erkennt man ohne weiteres, daß die Menge des zugesetzten Alkalis über den wirklichen Gehalt der Lösung an diesem bzw. an Hydroxylionen, auf die es ja hier ankommt, nichts aussagen kann, denn es ist klar, daß eine mit destilliertem Wasser verdünnte Perhydraulösung allein infolge ihres Kohlensäuregehaltes Alkali binden wird. Diese Bindungsfähigkeit ist sehr erheblich, wenn es sich um sehr geringe Alkalimengen handelt, wovon man sich leicht überzeugen kann, wenn man die mit einem Tropfen Phenolphthalein versetzte Hydroperoxydlösung allmählich unter möglichstem Luftabschluß bis zum Farbumschlag mit einer verdünnten Alkalilösung versetzt. Es ergibt sich daraus, daß der wirkliche Alkali- bzw. Hydroxylionengehalt, immer vorausgesetzt,

daß es sich um Zusatz sehr kleiner Mengen davon handelt, weit hinter der zugesetzten Menge zurückbleiben wird, also die Angabe der zugesetzten Menge kein Maß für die tatsächlich in der Lösung vorhandene geben kann.

Wenn man den Einfluß der Hydroxylionen kennen lernen will, so ist es wünschenswert, in der besonders von Sörensen<sup>1)</sup> empfohlenen Weise mit Indikatorenkontrolle zu arbeiten. Vor allem ist es anzustreben, ein Wasserstoffionen- und Hydroxylionengleichgewicht für die Mischung zu fixieren, auf welches alle übrigen Reaktionsgemische bezogen werden können. Nach dem Vorausgegangenen würde nun bei der Reinheit des käuflichen Perhydrols und nach der eben geschilderten annähernden Neutralität der Fermentlösung das empirische Gemisch von Perhydrollösung und wässriger Fermentlösung hierzu ausreichen. Jedoch hängt das hierin vorhandene Wasserstoff- und Hydroxylionengleichgewicht von dem immerhin zufälligen Kohlensäuregehalt des Wassers ab. Dagegen besitzt man ein sehr bequemes und relativ leicht reproduzierbares derartiges Gleichgewicht in einer Lösung, die unter Zusatz eines Tropfens Phenolphthaleins gerade bis zum Farbenumschlag dieses Indikators gebracht wurde.

Ehe wir an die eigentliche Frage der Alkaliwirkung herangehen konnten, mußten wir deshalb den Einfluß dieser Neutralisation des empirischen Reaktionsgemisches einerseits und die Wirkung des normalen Kohlensäuregehaltes von destilliertem Wasser andererseits auf den Reaktionsverlauf prüfen. In Tabelle 11 finden sich nun eine größere Anzahl Versuche zusammengestellt, aus denen der Einfluß der Neutralisation in dem eben angegebenen Sinne hervorgeht. Und zwar sind die Versuche so angeordnet, daß die beiden zusammengehörigen Beispiele untereinander aufgeführt sind, der Art, daß zuerst der Versuch mit unveränderter Perhydrollösung, darunter derjenige unter sonst gleichen Bedingungen mit neutralisierter Perhydrollösung aufgezeichnet ist. Durchgehend wird durch das Neutralisieren die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroperoxydzersetzung vergrößert

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. XXI, S. 131 (1909).



und zwar in allen Fällen recht erheblich, wenn auch die relative Zunahme der K-Werte keineswegs immer die gleiche ist. Anders ausgedrückt: das Wasserstoff- und Hydroxylionengleichgewicht, welches dem Umschlag des Phenolphthaleins bei 0° entspricht, stellt für die fermentative Hydroperoxydzersetzung günstigere Reaktionsbedingungen dar, als dasjenige, welches durch eine Mischung von Perhydrollösung mit gewöhnlichem destilliertem Wasser erreicht wird. Beachtenswerterweise entspricht diesem Zustande größerer Reaktionsgeschwindigkeit nicht eine bessere Anpassung an das Reaktionsschema erster Ordnung. Vielmehr tritt, wie man wenigstens deutlich an denjenigen Versuchen erkennen kann, bei denen unter den gewöhnlichen Bedingungen, d. h. ohne Neutralisation annähernde Konstanz der K-Werte vorhanden ist, eine Neigung zum Fallen der K-Werte ein: die größte Beständigkeit des Ferments fällt ebensowenig mit den Bedingungen größter Aktivität zusammen, wie mit den Bedingungen größter Reinheit.

Da nun der Umschlag des Phenolphthaleins einer Wasserstoffionenkonzentration von ungefähr  $10^{-8}$  Mol. pro Liter entspricht, also vom Wasserstoffionengleichgewicht etwas entfernt ist, so ergab sich als weitere Frage die, ob die Abnahme der Aktivität bedingt ist durch den Kohlensäuregehalt des destillierten Wassers, oder ob dieser ohne Einfluß ist und die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bis zum Umschlag des Phenolphthaleins durch die hierfür notwendige Zunahme der Hydroxylionenkonzentration hervorgerufen wird.

Daß die Kohlensäure in höheren Konzentrationen, etwa denen, wie sie in Wasser von 0° bei Atmosphärendruck und Sättigung erreicht werden, außerordentlich schwächend auf die Reaktionsgeschwindigkeit wirkt, läßt sich leicht nachweisen. Bereitet man zwei Kölbchen mit dem Hydroperoxydgemisch bei 0° vor und leitet eine Zeitlang durch das eine Kohlensäure, durch das andere, um im übrigen konstante Reaktionsbedingungen zu erhalten, Stickstoff bis zur Sättigung und bringt nun durch Zusatz gleicher Fermentmengen die Reaktion in Gang, so erhält man je nach der Fermentkonzentration Schwä-

chungen, welche die K-Werte auf  $\frac{1}{4}$  bzw.  $\frac{1}{8}$  ihres ursprünglichen Betrags herabsetzen, während das Einleiten des Stickstoffes überhaupt ohne merklichen Einfluß bleibt (Tabelle 12).

Tabelle 12.

Einfluß der Durchleitung von  $\text{CO}_2$  während der Reaktion.  
Blutprobe C. 500 ccm  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\frac{1}{300}$ -n.  $0^\circ$ .

	$\text{CO}_2$ durchgeleitet			N durchgeleitet		
10 ccm Ferment	2'	30,79	251	2'	21,18	1102
	5'	25,88		5'	9,89	
	10'	21,09	163	10'	3,25	987
	20'	17,48	105	12'	2,09	959
	30'	15,49	42,8			
	50' 20''	12,72				
2 ccm Ferment	2'	37,01	25,3	2'	32,97	206
	5'	36,37		5'	28,63	170
	10'	35,50	21,0	10'	23,53	142
	15'	35,02	11,8	15'	19,98	136
	25'	33,90	14,1	25'	14,60	109
	40'		6,3	40'	10,01	77,6
	60'	32,23		80'	4,90	

Um die Wirkung der Kohlensäure des gewöhnlichen destillierten Wassers festzustellen, war es nötig, dieses von Kohlensäure zu befreien. Wir führten dies nach Art der Herstellung von Leitfähigkeitswasser aus, indem wir destilliertes Wasser in großen, gut gedämpften Kolben aus Jenaer Glas mehrere Stunden kochten und dann mit einem Stopfen verschlossen, der den Luftzutritt nur durch ein großes Natronkalkrohr vermittelte. Die Entnahme des Wassers erfolgte durch einen Heber, ähnlich dem für die Aufbewahrung von Leitfähigkeitswasser empfohlenen. Die Reaktionsgefäße wurden durch ein Natronkalkrohr vor dem Einfluß des Kohlensäuregehaltes der Luft geschützt oder dadurch, daß während des Versuchs ein langsamer Strom kohlenstofffreier Luft durch das Reaktionsgemisch geleitet wurde. Diese Vorsichtsmaßregel ist bei nicht zu langer Versuchsdauer und wenn die Reaktionsgefäße



enghalsig sind und gegen die Einwirkung der Außenluft geschützt werden, unnötig, aber sehr vorteilhaft, wenn diese Bedingung nicht zutrifft und wenn es sich um sehr kleine Verschiedenheiten im Alkaligehalt handelt wie z. B. in den in Tabelle 13a und b mitgeteilten Versuchen.

In diesen Tabellen sind nun die Wirkungen des Kohlensäuregehaltes des Wassers einerseits und geringfügiger Alkalimengen andererseits in auf die eben beschriebene Art kohlenstofffrei gemachtem destilliertem Wasser dargestellt. Und man sieht nun deutlich, daß das Optimum der Reaktionsgeschwindigkeit ziemlich genau bei dem Neutralitätspunkte des Wassers liegt. Während aber die durch den natürlichen Kohlensäuregehalt des destillierten Wassers bedingte Acidität eine erhebliche Geschwindigkeitsabnahme verursacht, wird durch die Steigerung des Alkaligehaltes durch Zusatz von Natriumhydroxyd eine, wenn auch deutliche, so doch ziemlich geringe Schwächung herbeigeführt, sodaß die K-Werte für die Versuche mit  $\frac{1}{20000}$ -n-Alkali diejenigen für die Versuche mit kohlenstoffhaltigem Wasser noch erheblich übertreffen.

Diese offenbar wichtige Tatsache des Einflusses von Kohlensäuremengen, wie sie in gewöhnlichem destilliertem Wasser enthalten sind, ist bisher von den Autoren nicht berücksichtigt worden. Der einzige, der den möglichen Einfluß der Kohlensäure erwähnt, ist Senter. Jedoch ist aus seiner Arbeit nicht zu ersehen, wie er diesen einschätzt. Denn während er in seiner ersten Arbeit ausdrücklich erwähnt, daß Kohlensäure ohne Einfluß sei, hat er in seiner zweiten Arbeit die Anwendung kohlenstofffreien Wassers als Verdünnungsmittel vorgezogen, ohne einen Grund dafür anzugeben.

Es muß bei der obigen Schätzung des Alkaligehaltes berücksichtigt werden, daß auch das Peroxyd geringe Alkalimengen binden kann, da das Peroxyd im System die Rolle einer im Überschuß vorhandenen sehr schwachen Säure spielt. Ein Alkalizusatz wird also zwar stets infolge der starken Hydrolyse des entstehenden Salzes die Bildung von Hydroxylionen neben dem Salz zur Folge haben. Die Hydroxylionenkonzentration wird jedoch bei Zusatz von Alkali entsprechend der

Tabelle 13a.

Einfluß des CO<sub>2</sub>-Gehaltes von destilliertem Wasser und von geringen Alkalimengen in CO<sub>2</sub>-freiem Wasser auf den Reaktionsverlauf bei 0°.

5 ccm Ferment + 500 ccm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/500-n.

	CO <sub>2</sub> -haltiges dest. Wasser		CO <sub>2</sub> -freies dest. Wasser		NaOH 0.5 ccm 1/500-n = 1/500 000-n		NaOH 1.5 ccm 1/500-n = 1/66 667-n		NaOH 3 ccm 1/500-n = 1/55 555-n		NaOH 5 ccm 1/500-n = 1/50 000-n	
	2'	6'	2'	5'	2'	5'	2'	5'	2'	5'	2'	5'
Blutprobe E.	31,81	119	36,68 <sup>1)</sup>	160	—	—	31,50	157	31,61	153	2' 20"	31,42
1. Auszug	28,52	98,6	32,85	128	—	—	28,26	140	28,45	143	5' 20"	28,75
vgl. Tab. 5a	25,46	88,4	24,48	114	—	—	24,06	119	24,12	116	10' 20"	24,79
	21,20	71,3	18,85	92,6	—	—	18,29	101	18,48	107	20' 20"	19,94
	17,58	88,5	11,06	—	—	—	14,51	90,6	14,44	97,3	30' 30"	16,60
	14,44	—	—	—	—	—	10,61	—	10,32	—	45' 20"	13,75
Blutprobe E.	38,94	189	38,33	287	2' 40"	39,15	39,80	260	—	—	—	—
3. Auszug	33,43	189	31,43	264	5' 40"	32,25	33,25	262	—	—	—	—
vgl. Tab. 5a	26,90	183	26,20	254	15' 40"	20,96	24,60	217	—	—	—	—
	21,79	182	17,41	229	20' 40"	13,48	16,57	196	—	—	—	—
	14,33	171	10,84	229	30' 40"	7,90	10,55	171	—	—	—	—
	6,51	—	6,40	229	45' 40"	3,61	5,40	—	—	—	—	—
Blutprobe D.	28,48	173	—	—	—	—	—	—	27,61	307	5'	27,47
vgl. Tab. 1 IV	23,28	168	—	—	—	—	—	—	19,38	293	10'	20,64
	19,19	173	—	—	—	—	—	—	9,87	283	20'	13,01
	12,83	175	—	—	—	—	—	—	5,15	252	30'	8,69
	8,61	170	—	—	—	—	—	—	2,88	160	40'	6,01
	5,82	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50'	4,06

<sup>1)</sup> Dieser Versuch ist mit einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung von etwas größerem Gehalt ausgeführt worden.

Tabelle 13b.

Einfluß des CO<sub>2</sub>-Gehaltes von destilliertem Wasser und von geringen Alkalimengen in CO<sub>2</sub>-freiem Wasser auf den Reaktionsverlauf der Hydroperoxydzersetzung durch die Katalase bei 0°.

Blutprobe E, verdünnte Lösung (10 cem Ferment + 500 cem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/500-n).

Kohlensäurehaltiges, destilliertes Wasser	CO <sub>2</sub> -freies, destilliertes Wasser	0,5 cem NaOH 1/500-n = 1/500 000-n		1,0 cem NaOH 1/500-n = 1/500 000-n		1,5 cem NaOH 1/500-n = 1/666 667-n				
		a)	b)	a)	b)	a)	b)			
2' 30''	41,19	2' 30''	40,21	2' 30''	40,98	2' 30''	40,36	2' 30''	40,44	231
5' 30'	36,58	5' 30''	33,99	5' 30''	34,66	5' 30''	34,51	5' 30''	34,48	202
12' 30''	27,63	10' 30''	26,58	10' 30''	27,12	10' 30''	26,88	10' 30''	27,33	192
		20' 30''	17,26	20' 30''	16,98	20' 30''	17,51	20' 30''	17,58	166
38' 30''	10,75	30' 30''	11,25	30' 30''	11,46	30' 30''	11,54	30' 30''	11,99	158
		40' 30''	7,88	40' 30''	8,04	40' 30''	8,27	40' 30''	8,33	

Blutprobe E, konzentrierte Lösung (vor dem Versuch verdünnt 1 : 4, 5 cem Ferment + 500 cem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/500-n).

Kohlensäurehaltiges, destilliertes Wasser	CO <sub>2</sub> -freies, destilliertes Wasser	1,5 cem NaOH 1/500-n = 1/666 667-n	
		a)	b)
2' 30''	37,81	2' 30''	36,18
5' 35''	32,43	5' 30''	28,42
11'	24,37	10' 30''	19,70
22'	13,90	15' 30''	14,40
33'	7,46	35' 30''	4,75
46'	3,77		

Tabelle 13c.

Einfluß von geringen Alkalimengen in CO<sub>2</sub>-freiem Wasser auf die Reaktion.  
5 ccm + 500 ccm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>1</sup>/<sub>500</sub>-n. 0°.

	CO <sub>2</sub> -freies, destilliertes Wasser			1,5 ccm NaOH <sup>1</sup> / <sub>500</sub> -n = <sup>1</sup> / <sub>66 667</sub> -n		
Blutprobe E, III. Auszug, Berkefeld- Filtrat	5'	31,50	344	5'	31,90	327
	10'	21,21	323	10'	21,91	271
	18'	21,71	323	18'	13,29	212
	24'	6,46	204	24'	9,00	221
	33'	4,23		33'	5,69	
Blutprobe E, gereinigte Ferment- lösung, vgl. Tabelle 6	2' 30"	42,05	236	2' 30"	42,03	219
	5' 30"	35,73	217	6'	35,24	179
	10' 30"	27,84	191	11'	28,70	134
	20' 30"	17,92	206	25'	18,65	115
	30' 30"	11,15	140	36'	13,94	93,9
	45' 30"	6,87		46'	11,23	

Verschiebung der hydrolytischen Spaltung viel langsamer wachsen, als dem Alkalizusatz entspricht. Man kann diese Erscheinung leicht verfolgen, wenn man zu der mit kohlenstoffreiem Wasser bereiteten Hydroperoxydlösung allmählich verdünntes Alkali zusetzt. Während kohlenstoffreies Wasser allein mit dem ersten Tropfen den Farbumschlag ergibt und bei weiterem Zusatz sich rasch stärker rötet, erfolgt der Umschlag bei der Peroxydlösung erst durch einen etwas größeren Zusatz von Alkali und die Zunahme der Rotfärbung, welche die Zunahme der Hydroxylionenkonzentration verfolgen läßt, erfolgt bei weiterem Zusatz von Alkali hier viel langsamer als bei dem Versuch mit kohlenstoffreiem Wasser allein.

Daß jedoch größere Alkalikonzentrationen schließlich eine stark schwächende Wirkung auf das Ferment ausüben, geht aus Tabelle 14 mit voller Sicherheit hervor. Allerdings beträgt schätzungsweise der Alkaligehalt bei diesen absichtlich nur roh angestellten Versuchen mindestens ca. <sup>1</sup>/<sub>500</sub>-n. Hier tritt nun auch die gangsteigernde Wirkung des Alkalis deutlich zutage. Vergleichen wir diese Befunde mit den Senterschen Ergebnissen, so können wir sagen, daß sie sich fast mit diesen

Tabelle 14.

Einfluß von Alkalizusatz auf den Verlauf der  $H_2O_2$ -Zersetzung.  
Blutprobe D (vgl. Tab. 1IV). 5 ccm + 500 ccm  $H_2O_2$ ,  $1/200$ -n, destilliertes  
( $CO_2$ -haltiges) Wasser.  $0^\circ$ .

1. Ohne Zusatz			2. Mit 8 Tropfen NaOH ca. $1/1$ -n			3. Mit 14 Tropfen NaOH ca. $1/1$ -n			4. Mit 30 Tropfen NaOH ca. $1/1$ -n		
5'	28,48		5'	29,00		5'	29,98		5'	34,25	
10'	23,28	173	10'	24,61	143	10'	25,49	141	10'	31,48	73,3
15'	19,19	168	15'	21,39	122	15'	22,35	114	15'	29,51	56,1
25'	12,89	173	25'	16,48	113	25'	17,36	110	25'	26,71	43,3
35'	8,61	175	45'	10,10	106	35'	13,97	94	35'	24,16	43,6
45'	5,82	170				45'	11,27	93	60'	19,85	34,1

decken. Nur hinsichtlich der Wirkung sehr kleiner Alkalimengen, d. h. hinsichtlich der Verhältnisse um den Neutralitätspunkt des Wassers gehen die Erfahrungen etwas auseinander. Nach den unserigen liegen die Dinge so, daß das Optimum sehr nahe um den Neutralitätspunkt liegt, und daß die Wirkung nicht zu großer Alkalimengen von da ab ziemlich gering ist, vielleicht infolge der als eine Art Puffer wirkenden Perhydrolösung, daß hingegen nach der anderen Seite bereits der Kohlen säuregehalt des destillierten Wassers eine sehr merkliche schwächende Wirkung ausübt.

Diese relativ viel stärkere Wirkung bei Säurezusatz, wie wir uns vorsichtig ausdrücken wollen, kann man recht gut aus Tabelle 15a erkennen, wo der Einfluß von Zusätzen sehr verdünnter Schwefelsäure dargestellt ist. Schon der geringe Zusatz von 1 ccm  $1/200$ -n-Schwefelsäure, welcher einer Konzentration von  $1/100000$ -n in der Lösung entspricht, bringt die K-Werte auf etwa  $1/3$  des Betrages, den sie mit kohlen säurehaltigem Wasser haben, herab und auf  $1/6$  desjenigen, der durch Zusatz geringer Alkalimengen zu dem Reaktionsgemisch zu erreichen ist (vgl. hierzu Tabelle 13a, 3. Versuchsreihe). Die weitere Abnahme der K-Werte erfolgt jedoch nicht proportional dem Säurezusatz, sondern erheblich langsamer, sodaß eine Säurezunahme um das zehnfache die K-Werte nur auf nicht

Tabelle 15a.

Einfluß von geringen Mengen  $H_2SO_4$  auf dem Reaktionsverlauf.  
Blutprobe D (vgl. Tab. 1IV), 5 ccm + 500 ccm  $H_2O_2$   $\frac{1}{500}$ -n. 0°.

	1 ccm $H_2SO_4$		1,5 ccm $H_2SO_4$		2 ccm $H_2SO_4$		5 ccm $H_2SO_4$		10 ccm $H_2SO_4$						
	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{100000}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{66667}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{33333}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{22222}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{16667}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{11111}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{50000}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{33333}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{16667}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{10000}$ -n					
Destilliertes															
( $CO_2$ -haltiges) Wasser															
5'	28,84	32,78	67,2	5' 30"	36,17	46,6	5' 30"	34,82	49,5	5'	36,85	19,6	10'	36,32	26,5
10'	23,28	28,08	60,8	10' 30"	34,28	40,2	10' 30"	32,89	39,4	10'	36,03	22,7	20'	34,17	26,1
15'	19,19	24,41	58,6	20' 30"	31,25	42,0	20' 30"	30,04	43,1	15'	35,10	21,3	40'	29,88	30,3
25'	12,89	21,23	61,4	30' 30"	28,37	39,1	30' 30"	27,20	36,5	35'	31,82	22,3	60'	25,99	33,8
35'	8,61	18,52	56,3	40' 30"	25,93	37,6	45' 30"	23,98		55'	28,71	22,6	80'	22,24	37,1
45'	5,82	16,27		50' 30"	23,78					75'	25,87		100'	18,75	

Tabelle 15b.

Einfluß von geringen Mengen  $H_2SO_4$  auf den Reaktionsverlauf.  
Blutprobe E, gereinigte Fermentlösung (vgl. Tab. 7), 5 ccm + 500 ccm  $\frac{1}{500}$ -n. 0°.

	CO <sub>2</sub> -freies destilliertes Wasser		1,5 ccm $H_2SO_4$ $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{66667}$ -n		
	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{100000}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{66667}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{33333}$ -n	ca. $\frac{1}{500}$ -n = $\frac{1}{22222}$ -n	
2' 30"	42,57	186	3'	46,73	11,2
10' 30"	30,20	167	6'	46,37	14,0
21' 30"	19,77	156	16'	44,90	10,8
33' 30"	12,86	125	1:30'	33,85	
48' 30"	8,39				

viel weniger als die Hälfte herabsetzt. Es wäre unberechtigt, daraus zu schließen, daß die Wirkung nicht der Wasserstoffionenkonzentration proportional ginge, wie das Senter durch Vergleich der Wirkung verschieden starker Säuren bewiesen zu haben glaubt. Berücksichtigen wir die sauren Eigenschaften des Perhydrols, das als außerordentlich schwache Säure im System im Überschuß vorhanden ist, so haben wir zu erwarten, daß jeder Wasserstoffionenzusatz infolge der Störung des Dissoziationsgleichgewichts der schwachen Säure zum Teil kompensiert wird, indem sich zwecks Wiedereinstellung des Dissoziationsgleichgewichts ein Teil der zugefügten Wasserstoffionen mit den Anionen der schwachen Säuren zu Neutralmolekülen vereinigt. Außerdem ist natürlich immer mit dem Säurebindungsvermögen der Fermentverunreinigungen zu rechnen, was durch die in Tabelle 15 b mitgeteilten Versuche recht deutlich gemacht wird. Hier scheint durch die Anwendung der gereinigten Fermentlösung die Säureempfindlichkeit infolgedessen erheblich gesteigert.

Bemerkenswerterweise liegt bei der Säurewirkung keine Tendenz vor, den Gang der K-Werte zu verstärken, im Gegenteil — und dies geht besonders aus Tabelle 15 b hervor —: eine Fermentlösung, die mit kohlensäurefreiem Wasser eine deutliche Tendenz zu fallenden K-Werten zeigte, gibt bei einem Versuche mit saurem Reaktionsgemisch konstante K-Werte.

#### d) Einfluß der Temperatur.

Bisher sind, um die Verhältnisse nicht zu komplizieren, sämtliche Versuche bei 0° ausgeführt worden. Diese Temperatur war gewählt, weil nach Senter hier bei genügender Verdünnung des Perhydrols die schädlichen Wirkungen desselben auf das Ferment verschwinden. Es schien uns aber von großer Wichtigkeit, die bisherigen Versuche durch solche bei höherer Temperatur zu ergänzen, da Senter auf Grund der von ihm gefundenen Temperaturkoeffizienten der Reaktion, die er sehr klein fand, weitgehende theoretische Schlüsse über die Kinetik der fermentativen Hydroperoxydzersetzung gezogen

hat, anderseits der Einfluß der Temperatur für andere Katalasearten, wie beschrieben worden ist, abweichend gefunden wurde.

Zunächst konnten wir die relative Kleinheit des Temperatureinflusses auf die Reaktionsgeschwindigkeit leicht bestätigen. In Tabelle 16a sind unter I mit ein und derselben

Tabelle 16a.

Einfluß der Temperatur auf den Reaktionsverlauf bei Verwendung von unveränderter und neutralisierter  $H_2O_2$ -Lösung.

Blutprobe D.  $H_2O_2$  konzentriert  $1/200$ -n.

0°		17°		30°		40°					
I. Unverändert.											
2'	29,64	508	2'	26,35	825	2' 30"	22,30	921	2' 30"	21,50	872
6'	18,56	453	5'	14,90	746	4' 30"	14,59	862	4' 30"	14,39	782
10'	12,23	465	10'	6,30	788	6' 30"	9,81	796	6' 30"	10,04	728
14'	7,97	455	12'	4,39	728	8' 30"	6,80	839	8' 30"	7,18	651
18'	5,24	378	14'	3,14	773	10' 30"	4,62	705	10' 30"	5,32	641
22'	3,70		16'	2,20		12' 30"	3,34		12' 30"	3,96	
II. Neutralisiert.											
2'	27,80	595	—	—	—	2' 30"	24,50	627	2' 30"	24,00	639
5'	18,43	533	—	—	—	4' 30"	18,36	593	4' 30"	17,88	575
8'	12,75	570	—	—	—	6' 30"	13,97	624	6' 30"	13,72	516
11'	8,60	453	—	—	—	8' 30"	10,48	559	8' 30"	10,82	471
14'	6,29	511	—	—	—	10' 30"	8,10	532	10' 30"	8,71	506
17'	4,42		—	—	—	12' 30"	6,34		12' 30"	6,90	

Fermentprobe Versuche bei 0°, 17°, 30° und 40°, bei Hydroperoxydkonzentration  $1/200$ -n angestellt. Der Einfluß der Temperatur scheint hier noch erheblich geringer, als ihn Senter gefunden hat. Es lag nahe, zunächst zu vermuten, daß dies in einer gleichzeitigen Zerstörung des Ferments begründet sei. Jedoch hätte eine solche Wirkung in einer Zunahme des Ganges der K-Werte zum Ausdruck kommen müssen. Davon ist jedoch kaum etwas festzustellen. Die in Tabelle 16b und c mitgeteilten Versuche, in denen jedesmal bei 0 und 30° gearbeitet worden ist, verändern das Bild nicht wesentlich. Es liegen zwar einige Versuche vor, wie z. B. diejenigen in Tabelle 16b mit der



Tabelle 16b.

Einfluss der Temperatur auf den Reaktionsverlauf bei Verwendung von unveränderter  $H_2O_2$ -Lösung.

	Blutprobe B.		Blutprobe C.		Blutprobe D.		Blutprobe E.						
	$H_2O_2$ konz. $\frac{1}{1000}$ -n	$H_2O_2$ konz. $\frac{1}{1000}$ -n	$H_2O_2$ konz. $\frac{1}{1000}$ -n	$H_2O_2$ konz. $\frac{1}{1000}$ -n	$H_2O_2$ konz. $\frac{1}{1000}$ -n	$H_2O_2$ konz. $\frac{1}{1000}$ -n	1. Auszug	$H_2O_2$ konz. $\frac{1}{1000}$ -n	6. Auszug	$H_2O_2$ konz. $\frac{1}{1000}$ -n			
0°	1'10"	21,01	2'	29,01	5'	28,48	173	2'30"	37,81	222	1'30"	42,06	99,4
	4'10"	19,82	5'	22,16	10'	23,28	168	5'35"	32,43	226	5'30"	38,52	82,5
	9'10"	18,45	7'	18,71	15'	19,19	173	11'	24,37	222	11'30"	34,37	71,8
	29'10"	14,18	10'	15,73	25'	12,89	175	22'	13,90	246	20'30"	29,13	75,4
	41'10"	12,38	12'	12,75	35'	8,61	170	33'	7,46	228	36'30"	22,45	62,2
	127'10"	4,68	15'	10,42	45'	5,81	46'	3,77	228	66'30"	14,61		
30° (bezw. 20°)	1'30"	20,69	2'10"	25,42	4'	21,48	564	2'10"	35,68	428	1'40"	39,32	228
	5'30"	18,23	5'10"	15,54	8'	12,78	567	5'10"	26,55	401	5'40"	31,87	192
	11'30"	15,62	7'10"	11,20	12'	7,58	505	9'10"	18,36	355	11'40"	24,44	152
	19'30"	12,87	10'10"	7,21	16'	4,76	527	14'10"	12,20	324	21'40"	17,23	121
	31'30"	10,12	12'10"	5,46	20'	2,93	453	20'10"	7,80	296	40'40"	10,13	
	81'30"	7,73	15'10"	3,56	24'	1,93	26'10"	5,18					

1) Dieser Versuch wurde bei 20° C. ausgeführt.

Tabelle 16c.

Einfluß der Temperatur auf den Reaktionsverlauf bei Verwendung von unveränderter  $H_2O_2$ -Lösung. —  $H_2O_2$   $\frac{1}{200}$ -n.

Blutprobe B. $H_2O_2$ konz. $\frac{1}{400}$ -n.			Blutprobe C, gereinigte Hämaselösung 0°			Blutprobe C, gerei- nigte Hämaselösung, durch Berkefeld- filter filtriert 0°			Blutprobe E. Berkefeld-Filtrat 0°		
1' 10"	16,83		2'	37,42		4'	47,62		2' 10"	31,97	
4' 10"	12,64	414	4'	25,48	835	8'	43,04	110	4' 30"	30,39	94,5
7' 10"	9,95	346	6'	18,70	672	12'	39,57	91,3	10'	27,71	72,9
11' 10"	7,50	307	8'	13,98	632	20'	34,02	82,1	20'	23,91	64,1
16' 10"	5,23	313	10'	10,88	544	30'	28,66	74,5	31'	20,64	58,1
22' 10"	3,61	268	12'	8,26	598	40'	23,76	81,4	41'	18,69	43,1
29' 10"	2,40	253				68'	15,29	68,4			
30°			18°			18°			30°		
1' 10"	16,02		2'	31,60		4'	36,28		2'	31,67	
4' 10"	9,35	780	4'	17,25	1315	8'	24,56	424	5'	28,31	162
7' 10"	5,57	750	6'	9,58	1277	12'	17,27	382	10'	24,37	130
10' 10"	3,35	736	8'	5,42	1237	16'	12,09	387	21'	18,89	90,6
13' 10"	2,21	736	10'	3,26	1103	20'	8,64	365	30'	16,01	71,8
			12'	1,83	1254	24'	6,31	341	40'	13,99	58,6
						28'	4,76	306	105'	8,13	36,3

Tabelle 16d.

Einfluß der Temperatur auf den Reaktionsverlauf bei Verwendung von unveränderter  $H_2O_2$ -Lösung.

	Nach Senter herge- stellte lackfarbene Blut- lösung. $H_2O_2$ konz. $\frac{1}{200}$ -n.			Dieselbe Lösung aus einer anderen Blut- probe hergestellt. $H_2O_2$ konz. $\frac{1}{400}$ -n.					
				a) unverdünnt			b) 1:4 verdünnt		
0°	2'	22,60		1'	19,73		1'	21,14	
	5'	12,29	882	4'	14,62	434	4'	19,78	96,2
	7'	8,46	811	8'	10,05	407	14'	15,91	94,6
	10'	5,09	736	12'	6,94	402	26'	12,09	99,4
	12'	3,71	687	16'	4,86	386	44'	8,05	98,1
	15' 10"	2,49	577	24'	2,52	357	62'	5,39	96,8
20°	2'	11,50		2'	15,84		1'	20,93	
	5'	5,32	1116	4'	12,07	590	4'	18,54	175
	7'	3,30	1037	6'	9,25	578	13'	13,74	145
	10'	1,58	1066	9'	6,37	540	28'	8,59	136
	12'	0,99	1015	12'	4,39	539	40'	6,22	117
				16'	2,88	458			

Blutprobe D und E, in denen eine Zunahme des Ganges der K-Werte beim 30°-Versuch festzustellen ist. Jedoch kann man eine solche Zunahme der Reaktionsverzögerung bei den Versuchen, bei denen die Parallelversuche bei 20° ausgeführt wurden, nicht beobachten. Im Gegenteil, die Konstanz ist bei der höheren Temperatur eine bessere, wie aus den Versuchen von Tabelle 16 C deutlich hervorgeht. Daraus folgt, daß der beschriebene Gang jedenfalls nicht direkt mit einer durch Temperaturwirkung gesteigerten Perhydrolempfindlichkeit des Ferments zu tun hat, ebenso wie es durchaus falsch sein würde, die von dem Verhalten einfacher chemischer Vorgänge so stark abweichende Temperaturempfindlichkeit der Reaktion ausschließlich oder auch nur zum größeren Teile auf die Fermentschädigung durch die hohe Temperatur zurückzuführen. Es müßte jedenfalls dann diese Schwächung eine fast augenblickliche sein, sodaß bereits etwa nach den ersten zwei Minuten eine Zunahme dieser Wirkung nicht mehr beobachtbar wäre. Wenn ferner die Sengersche Ansicht zuträfe, so müßte auch die Zunahme des Ganges der K-Werte bei erhöhter Temperatur deutlicher zutage treten, je höher die Hydroperoxydkonzentration im Reaktionsgemisch wäre. Ein solcher Schluß läßt sich jedoch nicht ziehen, obgleich, wenn wir die in Tabelle 17 angeführten Versuche hier mit berücksichtigen, auf die wir gleich zu sprechen kommen werden, in den einzelnen Versuchen die Peroxydkonzentrationen zwischen  $\frac{1}{400}$  und  $\frac{1}{80}$  normal schwankt.

Was die Größe der Beschleunigung der Reaktion durch Temperatur anlangt, so ist sie, wie man sieht, für die einzelnen Fermente recht verschieden. Besonders groß ist die Temperaturwirkung bei dem gereinigten Ferment der Blutprobe c, das durch Berkefeld-Filter filtriert war. Daß dies jedoch weder an der Filtration noch an der Reinigung des Ferments liegt, ergibt sich aus den diesem Versuch benachbarten Versuchen einerseits und dem in Tabelle 16 d mitgeteilten Versuch mit lackfarbener Blutlösung. Die letztgenannten Versuche weisen Temperaturwirkungen auf, die sich der Größe nach nicht wesentlich von den Versuchen mit gereinigtem Hämasepräparat unterscheiden.

Der Einfluß der Temperatur kann nun überhaupt fast aufgehoben werden, wenn man das Ferment in einer nach obigen Angaben neutralisierten Hydroperoxydlösung wirken läßt. Derartige Versuche sind zunächst in Tabelle 16a unter II dargestellt und zwar unter Verwendung derselben Fermentlösung wie unter I, sodaß also die unter einander befindlichen Versuche jedesmal die Wirkung derselben Fermentlösung, jedoch einmal in unverändertem, das andere Mal in neutralisiertem Medium zeigen und zwar bei ein und derselben Temperatur, während die neben einander befindlichen Versuche die Veränderungen des Reaktionsverlaufs durch die Temperaturänderung unter sonst gleichen Bedingungen zur Anschauung bringt. Vergleicht man also die unter II angegebenen Konstantenreihen, welche den Temperaturen von 0, 30 und 40° entsprechen, so sieht man, daß eine erhebliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit überhaupt nicht wahrzunehmen ist und die Folge davon ist, daß, wie aus einem Vergleich der unter einander befindlichen Versuche erhellt, mit zunehmender Temperatur die zunächst reaktionsbeschleunigende Wirkung der Neutralisation allmählich in eine hemmende übergeht, mit anderen Worten: die fermentative Hydroperoxydzersetzung, die bei 0° im neutralisierten Medium schneller verläuft als in unverändertem, zeigt bei 30° genau das umgekehrte Verhältnis. Dazwischen liegt ein Temperaturgebiet relativ großer Unempfindlichkeit gegenüber einer Änderung des Reaktionsmediums. Die außergewöhnlich geringe Beschleunigung, welche die fermentative Hydroperoxydzersetzung in neutraler Lösung erfährt, ist in Tabelle 17 noch durch eine Anzahl Beispiele belegt. Und auch hier geht wiederum deutlich hervor, daß diese Temperaturunempfindlichkeit nicht in Zusammenhang gebracht werden kann mit einer durch die Temperaturzunahme bedingten Verstärkung des Ganges der K-Werte. So sind in dieser Tabelle einige Fälle (2 und 3) angeführt, in denen schon durch Temperaturerhöhung auf 20° sogar eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit verursacht ist. Gerade hier jedoch ist von einer Gangsteigerung nichts zu beobachten.

Tabelle 17.

Einfluß der Temperatur auf den Reaktionsverlauf bei Verwendung von neutralisierter  $H_2O_2$ -Lösung.

Blutlösung nach Senter hergestellt $H_2O_2$ $\frac{1}{500}$ -n $0^\circ$	Blutprobe C.		Blutprobe C, gereinigte Hämase Lösung				Blutprobe D.		
	$H_2O$ $\frac{1}{500}$ -n $0^\circ$	$H_2O_2$ $\frac{1}{500}$ -n Ferment unver- dünnt $0^\circ$	$H_2O_2$ $\frac{1}{500}$ -n Ferment 1 : 5 verdünnt $0^\circ$	$H_2O_2$ $\frac{1}{500}$ -n $0^\circ$	$H_2O_2$ $\frac{1}{500}$ -n $0^\circ$	$H_2O_2$ $\frac{1}{500}$ -n $0^\circ$	$H_2O_2$ $\frac{1}{500}$ -n $0^\circ$		
2' 13,08	2' 19,80	1' 17,42	2' 19,36	2' 36,30	5' 27,61	2' 13,08	2' 19,80		
5' 9,67	5' 7,97	2' 9,00	4' 13,56	4' 21,76	10' 19,38	5' 9,67	5' 7,97		
7' 6,88	7' 4,61	3' 10'' 4,59	6' 9,45	6' 13,29	20' 9,87	7' 6,88	7' 4,61		
10' 5,10	10' 2,08	4' 2,99	8' 7,02	8' 8,38	30' 5,15	10' 5,10	10' 2,08		
12' 4,17		5' 2,0	10' 5,18	10' 5,48	40' 2,88	12' 4,17			
15' 40'' 2,97			12' 3,89	12' 3,59		15' 40'' 2,97			
17,5°		20°		20°		18°		30°	
2' 13,61	2' 35,16	1' 18,55	2' 19,82	2' 32,35	4' 24,42	2' 13,61	2' 35,16	4' 24,42	
5' 8,81	5' 16,47	2' 10,17	4' 12,88	4' 16,91	8' 15,95	5' 8,81	5' 16,47	8' 15,95	
7' 6,63	7' 10,53	3' 6,42	6' 8,59	6' 9,34	12' 10,84	7' 6,63	7' 10,53	12' 10,84	
20' 4,30	10' 5,45	4' 4,10	8' 6,40	8' 5,27	16' 7,51	20' 4,30	10' 5,45	16' 7,51	
12' 3,26	12' 3,50	5' 2,70	10' 4,50	10' 2,85	20' 4,94	12' 3,26	12' 3,50	20' 4,94	
15' 2,14	15' 1,90	6' 1,85	12' 3,40	12' 1,76	25' 30'' 3,18	15' 2,14	15' 1,90	25' 30'' 3,18	

Das Dargelegte gilt jedoch wiederum nur für die Verhältnisse um den Neutralitätspunkt. Steigert man die Alkalimengen in dem Reaktionsgemisch bei 30° über den Neutralitätspunkt hinaus, wie dies in den auf Tabelle 18 a mitgeteilten Versuchen dargestellt ist, so treten nun Erscheinungen auf, welche sehr deutlich für eine allmähliche Zerstörung des Ferments während der Reaktion sprechen. Unter langsamem Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit überhaupt tritt mit wachsendem Alkaligehalt des Reaktionsgemisches ein immer stärkerer Gang der K-Werte auf. Es ist dies die gleiche Erscheinung, die wir auch bei 0°, hier aber erst bei höheren Alkalikonzentrationen beobachten.

Tabelle 18 a.

Verlauf der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zersetzung bei 30° unter dem Einfluß geringer Alkalimengen.

5 ccm Fermentlösung + 500 ccm H<sub>2</sub>O,  $\frac{1}{200}$ -n.

	CO <sub>2</sub> -freies dest. Wasser			$\frac{1}{66667}$ -n-NaOH			$\frac{1}{33333}$ -n-NaOH			$\frac{1}{20000}$ -n-NaOH		
I. Blut- probe E	2'	31,39	180	2'	31,26	159	2'	32,00	155	2'	31,45	121
	5'	27,72	139	5' 10"	27,83	128	5'	29,43	84,0	5' 30"	28,54	74,1
	10'	23,62	126	13' 10"	21,99	96,4	13'	25,21	63,5	13' 30"	24,90	66,5
	15'	20,43	98,8	22' 10"	18,01	72,4	21'	22,74	40,1	21'	22,20	50,7
	25'	16,35	78,1	35' 10"	14,50	53,2	34'	20,17	32,4	35'	18,86	35,0
	35'	13,66		55' 10"	11,35		50'	17,90		50'	16,71	
II. Blut- probe E, Berke- feld- Filtrat	2'	29,58	465	2' 10"	30,13	357	2'	33,07	301		—	
	5'	21,45	402	5' 10"	23,54	322	5'	26,87	247		—	
	8'	16,25	386	8' 10"	18,85	311	10'	20,21	205		—	
	11'	12,45	371	12' 10"	14,15	262	19'	13,22	172		—	
	15'	8,85	345	18' 10"	9,86	262	25'	10,43	153		—	
	20'	5,95		25' 10"	6,46		37'	6,83			—	
III. Blut- probe E, ge- reinigte Fer- ment- lösung	2'	42,19	288	2'	43,95	207		—			—	
	5'	34,59	253	5'	38,08	202		—			—	
	10'	25,86	186	10'	30,90	132		—			—	
	22'	15,48	147	20'	22,82	105		—			—	
	32'	11,03	129	30'	17,92	77,7		—			—	
	45'	7,50		45'	13,71			—			—	

Tabelle 18 b.  
Einfluß geringer Alkalimengen auf den Reaktionsverlauf bei 0° und 30°.  
Blutprobe B, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konz. 1/50-n

	CO <sub>2</sub> -haltiges Wasser	CO <sub>2</sub> -freies Wasser	Neutralisiert	1/15500-n-KOH	1/1000-n-KOH 1)										
0°	1' 10"	13,85	475	1'	13,91	514	1' 40"	12,97	587	1' 10"	16,03	543	1' 10"	14,68	365
	3' 10"	11,13	421	3'	10,98	483	3' 40"	9,90	504	4' 10"	11,02	476	3' 10"	12,41	282
	5' 10"	9,17	358	5'	8,79	406	5' 40"	7,85	477	8' 10"	7,11	362	7' 10"	9,75	199
	8' 10"	7,16	356	9'	6,05	394	9' 40"	5,06	387	17' 10"	3,28	284	12' 10"	7,75	156
	11' 10"	5,60	348	13'	4,21	394	14' 40"	3,24	387	26' 10"	1,82	284	19' 10"	6,03	127
	16' 10"	3,75	348	16'	3,12	434	—	—	—	—	—	—	—	29' 10"	4,50
30°	1' 20"	12,61	689	1' 30"	15,72	668	—	—	—	—	—	—	1' 50"	16,44	315
	3' 20"	9,18	580	4' 30"	9,91	554	—	—	—	—	—	—	4' 50"	13,23	254
	6' 20"	6,15	511	7' 30"	6,76	508	—	—	—	—	—	—	8' 50"	10,47	204
	9' 20"	4,32	505	10' 30"	4,76	422	—	—	—	—	—	—	14' 50"	7,90	159
	15' 20"	2,15	—	18' 30"	2,19	—	—	—	—	—	—	—	24' 50"	5,48	101
													40' 50"	3,78	—

1) Bei diesem Versuch wurde je eine etwas kleinere Menge titriert.

Berücksichtigt man nun auch hier den Kohlensäuregehalt des Wassers, so ergibt sich auch hinsichtlich dieses ein unterschiedliches Verhalten gegenüber demjenigen bei 0°. Der Übergang von kohlensäurehaltigem zu kohlensäurefreiem Wasser bedingt bei 30° schon eine charakteristische Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, auch hier jedoch wieder, ohne daß der Gang der K-Werte beeinflußt würde: Das Optimum der Reaktion für 30° ist in ein Gebiet höherer Wasserstoffionenkonzentrationen verschoben. Diesbezügliche Versuche sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19.

Einfluß der Verwendung von CO<sub>2</sub>-freiem destilliertem Wasser auf den Reaktionsverlauf bei 30°. — H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/200-n.

	Blutprobe A			Blutprobe B			Blutprobe B (Parallelversuch)		
Gewöhnliches destilliertes Wasser	2' 30"	39,33		2' 10"	35,68		2' 10"	35,03	
	5' 30"	31,94	301	5' 10"	26,55	428	5' 20"	25,09	414
	11'	22,76	268	9' 10"	18,36	400	9' 20"	17,71	413
	16'	17,22	242	14' 10"	12,20	355	14' 20"	11,95	342
	21'	13,49	212	20' 10"	7,80	324	20' 20"	7,55	332
	27'	10,23	200	26' 10"	5,18	296	26' 20"	5,17	274
CO <sub>2</sub> -freies destilliertes Wasser	2' 30"	38,57		2' 10"	36,63		3'	33,81	
	5' 30"	32,09	266	5' 10"	28,27	375	6'	26,83	335
	10' 30"	24,49	237	9' 10"	20,78	334	15'	15,02	280
	15' 30"	19,49	198	14' 10"	14,99	284	20'	11,12	261
	20' 30"	15,85	179	20' 10"	9,94	297	27'	7,65	232
			162			253			
	28' 30"	11,77		26' 10"	7,01				

Faßt man also die durch Erhöhung der Alkalität des Reaktionsgemisches bei erhöhter Temperatur auftretenden Erscheinungen zusammen, so läßt sich etwa folgendes sagen. Während bei 0° durch Entfernen der Kohlensäure aus dem Wasser bzw. durch Neutralisation bis zum Farbenumschlag des Phenolphthaleins die Geschwindigkeit der Reaktion wächst, um bei größeren Alkalikonzentrationen dann wieder abzunehmen, hat bei 30° die Entfernung der Kohlensäure aus dem Wasser ebenso wie die Neutralisation schon den entgegengesetzten



Effekt, d. h. die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt hierdurch ab und diese Abnahme wächst mit steigendem Alkalizusatz. Es besteht aber insofern ein geringer Unterschied in der Wirkung der Neutralisation und dem Zusatz größerer Alkalimengen, als durch erstere ebenso wie durch Entfernung der Kohlensäure der Reaktionsverlauf im allgemeinen nicht verändert wird, während größere Alkalimengen einen sehr starken Abfall der K-Werte während der Reaktion verursachen.

Als eine Folge der besprochenen Tatsachen hat zu gelten, daß die Temperaturbeschleunigung der Reaktionen, welche in der unveränderten Lösung bereits sehr gering ist, in neutralisierter Lösung entweder ganz verschwindet oder sogar einer Temperaturhemmung Platz machen kann, ebenso wie andererseits in einem zwischen 0 und 30° liegenden Temperaturgebiet eine gänzliche Unempfindlichkeit der fermentativen Hydroperoxydzer-  
setzung gegenüber geringen Alkalitätsänderungen bestehen wird.

Erschwerend für eine genaue Untersuchung der Alkaliwirkung bei 30° ist der Umstand, daß gelegentlich unter Bedingungen, die sich nicht feststellen lassen, eine starke Schwächung des Ferments während der Reaktion eintritt, schon bei Alkalikonzentrationen, die nur eben den Farbumschlag des Phenolphthaleins herbeiführen. Wir haben dieses Verhalten vorläufig als ein abnormes angesehen, da die Erscheinung nur gelegentlich auftrat, ohne daß wir trotz zahlreicher Versuche den Grund hierfür angeben konnten. Wahrscheinlich ist die Erscheinung begründet in einer enormen Labilitätssteigerung der Fermentlösung bei alkalischer Reaktion. Zur Illustration dieser Beobachtung mögen die in Tabelle 18 c mitgeteilten Versuche dienen. Hier sehen wir, wie gelegentlich schon bei ganz geringer Alkalitätssteigerung, eventuell auch bei einem zweiten Versuche unter ganz gleichen Bedingungen ein außerordentlich starker Gang der K-Werte auftritt.

Ein anderes, die Versuche erschwerendes Moment liegt in der leichten Zersetzlichkeit des Hydroperoxyds in alkalischer Lösung, die schon von Tammann und anderen<sup>1)</sup> untersucht

<sup>1)</sup> Vgl. hierüber Gmelin-Krauts Handbuch der anorg. Chemie. VII. Aufl. 1907, S. 140.

Tabelle 18c.

Abnormer Einfluß geringer Alkalimengen auf den Reaktionsverlauf bei höheren Temperaturen.

	Lösung «ganz schwach rosa»			Lösung «ganz schwach rosa»			Lösung «rosa»		
	Blutprobe C	2'	32,95	241	2'	33,91	144	2' 30''	32,66
20° C.	5'	27,89	208	5'	30,69	82,8	5'	28,62	193
$\frac{1}{200}$ -n-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10'	21,96	168	10'	27,90	38,8	10'	22,92	161
	15'	18,09	174	15'	26,68	19,1	16'	18,35	138
	27'	11,18		25'	25,53		25'	13,80	
	Lösung «farblos»			Lösung «schwach rosa»			Lösung «rosa»		
Blutprobe C,	2'	18,02	983	2'	22,77	613	2'	20,82	427
gereinigte	4'	11,46	926	4'	17,17	414	4'	17,10	184
Ferment-	6'	7,48	914	6'	14,19	342	6'	15,71	164
lösung	8'	4,91	848	8'	12,12	287	8' 10''	14,69	42,3
20° C.	10'	3,33		10'	10,62	219	11'	14,15	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> $\frac{1}{80}$ -n				12'	9,60				

worden ist. Bei 0° kommt sie unter den von uns angewendeten Alkalikonzentrationen nicht in Betracht, wohl aber bei 20 und noch mehr bei 30°. Sie scheint veranlaßt zu sein durch Spuren von katalytisch wirkenden Stoffen, deren Wirkung jedoch erst in alkalischer Lösung zur Geltung kommt. Dies folgt daraus, daß die Hydroperoxydzersetzung bei bloßer Gegenwart von Alkali in bestimmter Menge unter sonst scheinbar völlig gleichen Bedingungen sehr verschiedene Geschwindigkeit annehmen kann. Es muß also noch eine zufällige Bedingung für das Zustandekommen der Alkalikatalyse, wie wir sie hier kurz nennen wollen, hinzutreten. Und diese besteht wahrscheinlich in einer sehr schwer mit aller Sicherheit vermeidbaren Verunreinigung der Reaktionsgefäßwände.

Es wäre also demnach immer möglich, daß sich über die Fermentkatalyse die Alkalikatalyse überlagert, sobald man bei alkalischer Lösung und höheren Temperaturen mit dem Ferment arbeitet. Es läßt sich jedoch zeigen, daß der die Alkalikatalyse aktivierende Stoff durch die Fermentlösung

zweifellos außer Funktion gesetzt wird. Dies geht aus der folgenden Versuchsreihe hervor. (Tab. 18 d.)

Tabelle 18 d.

Einfluß des Ferments auf die Zersetzung des Perhydroxyls bei 30°  
in alkalischer Lösung.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration 1/400-n, Alkali (KOH)-Konzentr. 1/500-n, 30°.

1.			2.		3.		
Ohne Fermentzusatz			Mit 10 ccm Fermentlösung		Ohne Fermentzusatz		
1' 50"	11,99		1'	15,18	1' 10"	12,78	
4' 50"	7,12	755	5'	14,69	4' 10"	8,00	678
8' 50"	3,74	699			8' 10"	4,70	578
12' 50"	1,58	936			12' 10"	2,64	626

Im Versuch 1 ist die Alkalikatalyse des Wasserstoffsperoxyds mit 1/500-n-Kalilauge dargestellt, die, wie man sieht, bei dieser Kaliumhydroperoxydkonzentration sehr rasch verlaufen kann. Setzt man unter den gleichen Bedingungen außerdem Ferment hinzu, so ist die Reaktion fast zum Stillstand gekommen: Das starke Alkali hatte die Fermentwirkung fast aufgehoben, andererseits ist aber auch die Alkalikatalyse durch das Ferment zum Verschwinden gebracht worden. Reinigt man darauf das Kölbchen, in dem die Reaktion vorgenommen worden war, gründlich durch mehrmaliges Ausspülen, so tritt die Alkalikatalyse bei einem neuen, dem ersten analogen Versuch in ungefähr der gleichen Stärke wieder auf. Die gleiche Wirkung, wie wir sie eben an dem lebenden Ferment kennen gelernt haben, scheint auch dem Ferment zuzukommen, wenn es durch Kochen zerstört ist.

Es bleibt nun noch übrig, die Wirkung geringer Säuremengen auf die fermentative Hydroperoxydzersetzung bei erhöhter Temperatur zu untersuchen. Wir wählten als zuzusetzende Säure wie bei den 0°-Versuchen wiederum Schwefelsäure, weil das Sulfation nach Senter sowohl wie nach Lockemann und seinen Mitarbeitern ohne Einfluß auf das Ferment ist, während dies bei dem Chlorion nicht der Fall zu sein scheint.

In Tabelle 20 a und b sind die Versuche so dargestellt, daß für jeden Säurezusatz gleichzeitig der 0°- und der 30°-Versuch untereinander angeführt ist. Ohne weiteres ist nun zu sehen, daß auch bei 30° schon der geringe Zusatz, der einer Konzentration der Schwefelsäure in der Lösung von etwa  $1/100000$  normal entspricht, eine starke Schwächung der Fermentwirkung bedingt, die dann auch mit wachsendem Säuregehalt in dem Reaktionsgemisch, wenn auch nicht entfernt proportional diesem zunimmt, ohne daß durch die Säure eine Zunahme des Ganges der K-Werte verursacht würde. Im Gegenteil, man gewinnt den Eindruck, wenn man von dem letzten Versuche mit der höchsten Säurekonzentration in Tabelle 20 a absieht, daß die K-Werte in dem säurehaltigen Reaktionsmedium eine Neigung zu größerer Konstanz zeigen. Besonders interessant ist jedoch, daß die Schwächung durch die Säure bei höherer Temperatur viel geringer ist als bei tiefer, die Verhältnisse also hier gerade umgekehrt liegen, wie hinsichtlich der Alkaliwirkung.

Der Versuch bei 30° in  $1/10000$  normal saurer Lösung ist, falls sich die Reproduzierbarkeit desselben bestätigen sollte, bemerkenswert, weil er für die Richtigkeit der früher erwähnten Vermutung spricht, daß der Unterschied in der Wirkungsweise der Säure auf Hämase und andere Katalasen in erster Linie auf die Verschiedenheit der angewendeten Säurekonzentrationen zurückzuführen ist. Der allmählich zerstörenden Wirkung alkalischer Flüssigkeiten, die sehr deutlich an dem gesteigerten Gange der K-Werte zum Ausdruck kommt, entspräche dann eine analoge Eigenschaft saurer Flüssigkeiten, wenn der Wasserstoffionengehalt in diesen eine bestimmte Höhe erreicht hat. In beiden Fällen tritt die Wirkung um so stärker auf, je höher die Reaktionstemperatur ist.

#### e) Nähere Untersuchung der Säure- und Alkaliwirkung.

Daß die starke Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, welche beim Ansäuern der Reaktionsflüssigkeit auftritt, und

Tabelle 20a.

Einfluss von geringen Säuremengen auf den Reaktionsverlauf bei 0° und 30°.  
Blutprobe D, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration 1/500-n.

	Unverändertes Mercksches Perhydrol	1/100000-n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1/6666-n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1/50000-n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1/50000-n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1/10000-n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>												
0°	5'	28,48	173	10'	32,78	67,2	5' 30"	36,17	46,6	5' 30"	34,82	49,5	5'	36,85	19,6	10'	36,32	26,5
	10'	23,28	168	20'	28,08	60,8	10' 30"	34,28	40,2	10' 30"	32,89	39,4	10'	36,03	22,7	20'	34,17	26,1
	15'	19,19	173	30'	24,41	58,6	20' 30"	31,25	42,0	20' 30"	30,04	43,1	15'	35,10	21,3	40'	29,88	30,3
	25'	12,89	175	40'	21,33	61,4	30' 30"	28,37	39,1	30' 30"	27,20	36,5	35'	31,82	22,3	60'	25,99	33,8
	35'	8,61	170	50'	18,52	56,3	40' 30"	25,93	37,6	45' 30"	23,98	55'	28,71	22,6	80'	22,24	37,1	
45'	5,82		60'	16,27		50' 30"	23,78					75'	25,87		100'	18,75		
30°	4'	21,48	564	4'	24,77	519	4'	24,82	476	4'	27,91	334	4'	29,42	303	5'	27,76	200
	8'	12,78	567	8'	15,36	484	8'	16,01	471	8'	20,52	312	8'	22,26	272	10'	22,05	125
	12'	7,58	505	12'	9,84	449	12'	10,38	428	12'	15,40	317	12'	17,33	312	20'	16,55	64,4
	16'	4,76	527	16'	6,51	466	16'	7,00	433	16'	11,50	308	17'	12,10	285	30'	14,27	32,3
	20'	2,93	453	20'	4,24	523	20'	4,69	372	20'	8,66	298	22'	8,72	267	45'	12,77	15,2
24'	1,93		24'	2,62		24'	3,33		24'	6,58		28'	6,03	278	79'	11,34		

Tabelle 20b.

Einfluß von geringen Säuremengen auf den Reaktionsverlauf bei 0° und 30°  
in CO<sub>2</sub>-freiem Wasser.Blutprobe E. — H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration 1/100-n.

		I. CO <sub>2</sub> -freies dest. Wasser			II. 1/66667-n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			III. 1/33333-n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			1/20000-n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
0°	2'	36,68	160	2'	38,86	23,2	2'	39,17	7,17	—			
	5'	32,85		5'	37,75		25'	37,71		—			
	15'	24,48	128	15'	36,35	16,4	60'	35,91	6,07	—			
	25'	18,85	114	30'	34,45	15,5	0'	33,75	— <sup>1)</sup>	—			
	50'	11,06	92,6	50'	32,79	10,7	5'	31,95	47,6	—			
				0'	28,66	— <sup>1)</sup>	15'	28,41	51,0	—			
				5'	26,16	79,3	35'	22,41	51,5	—			
			15'	23,14	53,3				—				
30°	2'	31,39	180	2'	31,48	149	2'	31,80	121	2'	38,53	54,8	
	5'	27,72		5'	28,40		5'	29,25		5'	37,10		47,1
	10'	23,62	139	10'	24,78	118	10'	25,96	104	21'	31,19	49,9	
	15'	20,43	126	20'	19,77	98,1	20'	21,58	80,3	45'	24,22		
	25'	16,35	96,8	30'	16,20	86,5	30'	18,25	72,8				
	35'	13,66	78,1	40'	13,91	63,0	40'	15,84	61,5				
				40' 30''	13,91								

zwar bei 0° bedeutend stärker als bei 30° (sich also schon dadurch von der gangsteigernden Wirkung, die eben besprochen wurde, prinzipiell unterscheidet), nichts mit einer dauernden Zerstörung des Fermentes zu tun hat, kann leicht an den in Tabelle 20 b und c, sowie in den in Tabelle 21 unter I und III mitgeteilten Versuchen erkannt werden. In den in Tabelle 20 b dargestellten Versuchen II und III und in dem in Tabelle 20 c ist so verfahren worden, daß, nachdem die Reaktion einige Zeit in saurer Lösung fortgeschritten war, das Reaktionsgemisch nach Zusatz eines Tropfens Phenolphthalein mit verdünntem Alkali bis zum Farbenumschlag neutralisiert wurde, worauf die Messungen der Reaktionsgeschwindigkeit ihren Fortgang

<sup>1)</sup> Die Lösung wird nach diesem Zeitpunkt neutralisiert bis zum Farbenumschlag des Phenolphthaleins.

Tabelle 20c.

Einfluß von geringen Säuremengen auf den Reaktionsverlauf bei 0°  
in CO<sub>2</sub>-freiem Wasser.

Blutprobe E, gereinigte Fermentlösung.

CO <sub>2</sub> -freies Wasser ohne Säurezusatz.			<sup>1</sup> / <sub>66667</sub> -n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
2' 30''	42,57		3'	46,73	
19' 30''	30,20	186	6'	46,37	11,2
21' 30''	19,77	167	16'	44,90	14,0
33' 30''	12,86	156	130''	33,85	10,8
48' 30''	8,39	125	0'	32,36	1)
			3'	29,65	127
			10' 30''	23,16	143
			24'	15,65	126

nahmen.<sup>2)</sup> Man sieht, daß, wenn auch nicht in allen Fällen die K-Werte der Normalversuche durch die Neutralisation erreicht werden, die Reaktionsgeschwindigkeit sich doch sehr erheblich «erholt» hat, ein Beweis dafür, daß die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit in saurer Lösung ein umkehrbarer Vorgang ist. Das gleiche beweisen die in Tabelle 21 mitgeteilten Versuche unter I und III. Bei der bei 0° ausgeführten Versuchsreihe, welche die ausführlichere ist, erkennt man zunächst aus einem Vergleich von Versuch II und III, daß für die Höhe der bei dem betreffenden Versuch gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit es völlig ohne Belang ist, ob man die Messung gleich nach Zusammenbringen von Ferment, Säure und Hydroperoxydlösung beginnt oder ob man die saure Fermentlösung etwa 18 Stunden stehen läßt, um dann erst durch Zusammenbringen mit der Perhydrollösung die Reaktion einzuleiten; eine weitere Schädigung des Ferments kann auch bei dieser langen Einwirkungszeit nicht stattgefunden haben.

1) Die Lösung wird nach diesem Zeitpunkt bis zum Farbumschlag des Phenolphthaleins neutralisiert.

2) Durch den Vorgang der Neutralisation, die mit KOH oder NaOH vorgenommen wurde, werden außer der damit beabsichtigten Entfernung freier H-Ionen K<sup>+</sup> bzw. Na<sup>+</sup> gebildet, die jedoch nach Senter keine merkliche Wirkung auf das Ferment haben.

Tabelle 21.

Verlauf der  $H_2O_2$ -Zersetzung, wenn Säure vor Einleitung der Reaktion auf das Ferment eingewirkt hat.

Blutprobe D.  $H_2O_2$ -Konzentration  $\frac{1}{1000}$ -n.

Die Einleitung der Reaktion erfolgte durch Zufügen des  $H_2O_2$  zur Fermentlösung.

1.	2.	3.	4.
Ohne Säurezusatz, aber neutralisiert	Sofort nach Säurezusatz, nicht neutralisiert	18 Stunden nach Säurezusatz, nicht neutralisiert	3 Tage nach Säurezusatz, neutralisiert

I. 0°. Säurekonzentration in der Mischung  $\frac{1}{10000}$ -n- $H_2SO_4$ .

5'	27,61	307	10'	36,32	26,5	10'	35,18	28,3	5'	28,12	243
10'	19,38	293	20'	34,17	26,1	20'	32,96	27,8	10'	21,25	233
20'	9,87	283	40'	29,88	30,3	40'	29,00	30,2	15'	16,25	222
30'	5,15	252	60'	25,99	33,8	61'	25,06	30,4	20'	12,59	227
40'	2,88		80'	22,24	37,1	81'	21,79	31,7	25'	9,70	185
			100'	18,75		101'	17,51	30,7	35'	6,34	
						144'	13,85				

II. 30°. Säurekonzentration in der Mischung  $\frac{1}{10000}$ -n- $H_2SO_4$ .

1.	2.	3.	4.								
Ohne Säurezusatz, aber neutralisiert	Sofort nach Säurezusatz, nicht neutralisiert	73 Minuten nach Säurezusatz, nicht neutralisiert	75 Minuten nach Säurezusatz, neutralisiert								
4'	24,42	463	5'	27,76	200	5'	34,26	70,5	2' 30"	35,90	119
8'	15,95	419	10'	22,05	125	10'	31,59	55,8	5'	33,52	98,4
12'	10,84	399	20'	16,55	64,4	20'	27,78	36,9	10'	29,93	80,8
16'	7,51	455	30'	14,27	32,2	30'	25,52	17,4	15'	27,27	61,3
20'	4,94	474	45'	12,77	15,2	45'	24,03	4,9	25'	23,68	41,1
25' 30"	3,18		79'	11,34		80'	23,10		42'	20,16	

III. 30°. Säurekonzentration in der Mischung  $\frac{1}{50000}$ -n- $H_2SO_4$ .

1.	2.	3.	4.				
Ohne Säurezusatz, aber neutralisiert	Sofort nach Säurezusatz, nicht neutralisiert		114 Minuten nach Säurezusatz, neutralisiert				
	4'	27,91	334	—	2'	28,97	470
	8'	20,52	312	—	5'	20,94	447
Wie II. 1.	12'	15,40	317	—	8'	15,38	458
	16'	11,50	308	—	12'	10,09	408
	20'	8,66	298	—	17'	6,31	410
	24'	6,58		—	23'	3,58	



Fast noch deutlicher erhellt dies aus Versuch 4, bei dem das Gemisch von Ferment und Säure nach einer 3tägigen Einwirkungszeit zunächst neutralisiert wurde, worauf dann wiederum die Aktivität der Fermentlösung nach Zusatz von der gleichen Perhydrolmenge wie bei den anderen Versuchen messend verfolgt wurde. Ein Vergleich von Versuch I und IV ergibt, daß trotz der sehr langen Einwirkungszeit von Säure auf das Ferment dieselbe Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wurde, welche der in neutralem Medium ausgeführte Normalversuch ergeben hatte. Diesem Versuche entspricht in jeder Beziehung der in III unter 4 mitgeteilte bei  $30^{\circ}$ , nur daß hier die Einwirkung der Säure nur über 114 Minuten ausgedehnt, und die Säurekonzentration innerhalb derjenigen Grenzen gehalten wurde, in denen der vorhin besprochene Säuregang noch nicht bemerkt werden konnte, was jedoch völlig ausreicht, um zu zeigen, daß die auch bei dieser Temperatur auftretende Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei saurem Reaktionsgemisch nichts mit einer Fermentzerstörung zu tun hat. Wie ein Vergleich von Versuch 4 mit dem unter II 1 mitgeteilten Normalversuche bei  $30^{\circ}$  in neutralem Reaktionsmedium ergibt, ist hier das Ferment vollständig erholt, d. h. die Anfangskonstanten beider Reaktionen zeigen völlige Übereinstimmung. Anders liegen die Verhältnisse, wenn man die Säurekonzentrationen so weit steigert, daß der Säuregang bei  $30^{\circ}$  auftritt. Dann erweisen die in II unter 3 und 4 mitgeteilten Versuche, die nun ohne weiteres verständlich sein werden, daß einmal die Länge der Einwirkung von Säure und Ferment aufeinander nicht ohne bleibenden Einfluß auf die Reaktion ist und daß andererseits diese Wirkung auch nicht mehr völlig umkehrbar ist.

Wie liegen nun diese Verhältnisse bei alkalischen Lösungen? Es sei gleich hier bemerkt, daß infolge der vorhin beschriebenen mannigfaltigen Schwierigkeiten, die sich gerade hier bemerkbar machen, eine völlige Klarheit vor allem bezüglich der Wirkung geringer Mengen von Alkali nicht zu erlangen war. Wir haben uns deshalb vorläufig nur auf die Mitteilung einiger Versuche, bei hoher Alkalikonzentration ( $1/1000$ ), beschränkt. Die Versuche sind ganz entsprechend wie diejenigen in Tabelle 21 ausgeführt,

nur daß hier die Zeit der Einwirkung von Alkali auf Ferment bei den aufeinander folgenden Versuchen jedesmal länger gewählt ist (Tab. 22). Weder bei  $30^{\circ}$  noch bei  $0^{\circ}$  ist von einer Umkehrbarkeit der Wirkung zu sprechen, d. h. durch Neutralisation kann weder die kürzere noch längere Zeit mit Alkali in Berührung gewesene Fermentlösung wieder auf ihren ursprünglichen Aktivitätsgrad zurückgebracht werden, wie leicht aus einem Vergleich der unter I angeführten Normalversuche mit den unter III, IV und V angegebenen Versuchen hervorgeht. Auch ist leicht festzustellen, wie die Fermentschwächung durch Alkali mit wachsender Dauer der Einwirkung ständig zunimmt, und zwar bei  $30^{\circ}$  mehr als bei  $0^{\circ}$ . Daß die Wirkung jedoch auch bei  $0^{\circ}$  deutlich vorhanden ist — sie könnte nach der geringen Verschiedenheit der K-Werte von Versuch III und IV, welche einer so kleinen Verschiedenheit in der Einwirkungsdauer entspricht — fraglich erscheinen, geht aus einer Versuchsreihe hervor, in der die Wirkung des Alkalis 3 Tage dauerte. Nach dieser Zeit neutralisiert, zeigt das Ferment überhaupt keine Aktivität mehr. Ein Beweis dafür, daß alles Ferment unwiederbringlich zerstört worden ist.

Eins ist jedoch bei diesen Versuchen auffällig! Wenn die Wirkung des Alkalis, wie sie auch in dem gesteigerten Gange zur Anschauung gelangt, vollständig irreversibel wäre, so sollten die Anfangskonstanten der Versuche, bei denen Alkali und Ferment bestimmte Zeit lang aufeinander eingewirkt haben, die Alkaliwirkung dann jedoch mit Beginn der Reaktion durch Neutralisation aufgehoben wurde, denjenigen K-Werten der in alkalischem Medium angestellten Reaktion gleich sein, die den etwa nach einer der Einwirkungsdauer von Ferment und Alkali gleichen Zeit gefundenen Titerwerten entsprächen. Dies ist jedoch nicht der Fall, sondern die Werte der «Inkubationsversuche»<sup>1)</sup> sind stets höher. Daß dies nicht seinen Grund in einer doch vorhandenen teilweisen Umkehrbarkeit der Alkali-

<sup>1)</sup> Diesen Ausdruck hat Senter zur Bezeichnung solcher Versuche angewandt, in denen schon vor Beginn der Reaktion das Ferment der Wirkung irgend eines Stoffes ausgesetzt wurde.

Tabelle 22.

Verlauf der  $H_2O_2$ -Zersetzung, wenn eine starke Alkalisierung vor Einleitung der Reaktion auf das Ferment eingewirkt hat. Blutprobe B.  $H_2O_2$ -Konzentration  $1/_{50}$ -n.  $CO_2$ -freies Wasser. Alkalikonzentration in der Lösung  $1/_{1000}$ -n-KOH. Die Einleitung der Reaktion erfolgte stets durch Zufügen des  $H_2O_2$  zur Fermentlösung.

	I.	II.	III.	IV.	V.
	Ohne Alkalizusatz	Sofort nach Alkalizusatz ohne Neutralisation	5 Minuten nach Alkalizusatz neutralisiert	15 Minuten nach Alkalizusatz neutralisiert	100 Minuten nach Alkalizusatz neutralisiert
0°	1'	1' 10''	1' 20''	1' 10''	—
	3'	3' 15''	4' 20''	5' 10''	—
	5'	7' 10''	8' 20''	9' 10''	—
	7'	12' 10''	13' 20''	17' 10''	—
	10'	19' 10''	22' 20''	26' 10''	—
13'	29' 10''	29' 20''	2' 49	4,73	—
30°	1' 30''	1' 50''	1' 30''	1' 30''	38,06
	4' 30''	4' 50''	4' 30''	4' 30''	238
	7' 30''	8' 50''	8' 30''	9' 30''	151
	10' 30''	14' 50''	13' 30''	19' 30''	82,2
	18' 30''	24' 50''	24' 30''	11,09	34' 30''
	15,72	16,44	20,52	18,80	38,06
	9,91	13,23	15,64	15,95	34,75
	6,76	10,47	11,70	13,40	32,25
	4,76	7,90	8,98	11,09	29,47
	2,19	5,48	5,47	11,09	26,82
	668	315	392	238	98,8
	554	254	315	151	81,1
	508	204	230	82,2	48,9
	422	159	196	—	23,9
	422	101	196	—	—

fermentschwächung hat, geht daraus hervor, daß, wenn man die Neutralisation unterläßt, die Anfangskonstanten der Reaktion ebenfalls oberhalb der Werte des normalen Alkaliversuchs liegen. Es muß also die schwächende Wirkung des Alkalis auf das Ferment größer sein, wenn gleichzeitig Peroxyd vorhanden ist, d. h. wenn das Ferment sich in Tätigkeit befindet. Daß außer der allgemein zerstörenden Wirkung des Alkalis auf das Ferment, welche durch die Inkubationsversuche dargestellt wird, noch eine andere Erscheinung die fermentative Hydroperoxydzersetzung in alkalischer Lösung charakterisiert, erhellt insbesondere noch aus einer näheren Betrachtung der K-Werte in den Alkaliversuchen. Während man nämlich eine gleichförmige Abnahme der K-Werte erwarten sollte, wenn eine Zersetzung des Ferments als die einzige Ursache des Ganges und der Aktivitätsabnahme anzusehen wäre, sinken tatsächlich die K-Werte und damit also auch die Fermentaktivität in den ersten Minuten der Reaktion außerordentlich stark unter die Hälfte ihres Anfangswertes herab, um dann in den späteren Phasen der Reaktion viel langsamer abzunehmen. Bei den Versuchen mit schwachem Alkali würde man dann nur das Vorhandensein der letzteren schnell in Erscheinung tretenden Wirkung anzunehmen haben.

#### **Kurze Zusammenfassung.**

Fassen wir die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammen, so läßt sich etwa folgendes sagen:

1. Der Reaktionsverlauf der fermentativen Hydroperoxydzersetzung mit aus Blut gewonnenen Fermentlösungen paßt sich im allgemeinen nicht dem Schema der Reaktion erster Ordnung an; insbesondere genügen die von Senter gegebenen Erklärungen nicht, die Abweichungen von diesem Schema zu deuten. Andererseits ist es uns aber auch nicht gelungen, Bedingungen zu finden, die einen solchen Reaktionsverlauf unter allen Umständen garantieren. Vor allem fällt das Optimum der Wirkung einer Fermentlösung nicht mit der größten Annäherung an eine

Reaktion erster Ordnung zusammen. Immerhin besteht unter bestimmten Versuchsbedingungen eine annähernde Proportionalität zwischen Fermentkonzentrationen und den aus den in der ersten Phase der Reaktion stattfindenden Hydroperoxydabnahmen nach der Reaktionsgleichung erster Ordnung berechneten K-Werten, sodaß diese *ceteris paribus* als Maß für die Fermentaktivität gelten können und es sich daher einstweilen empfiehlt, den Reaktionsverlauf durch eine Reihe solcher aus verschiedenen Phasen der Reaktion berechneten K-Werte darzustellen.

2. Die Reinheit der Fermentlösung, d. h. das Fehlen der mit dem Ferment in den natürlichen Gewebeflüssigkeiten vorkommenden, nicht aktiven Stoffe, scheint eine sehr geringe Bedeutung für die Art des Ablaufs der fermentativen Hydroperoxydzersetzung zu haben. Doch ist eine möglichste Reinheit der Fermentlösung aus versuchstechnischen Gründen erwünscht. Allerdings tritt mit wachsendem Reinheitsgrade eine Zunahme der Empfindlichkeit der Fermentlösung gegenüber irgend welchen Schädigungen auf.

3. Das Hydroperoxyd übt, wie schon Senter beobachtete, einen schädlichen Einfluß auf das Ferment in den Hämäse-lösungen aus, was sich bei 0° schon in etwa  $\frac{1}{80}$ -n-Wasserstoffsuperoxydlösung bemerkbar macht.

4. Ohne Einfluß auf den Reaktionsverlauf ist in gewissen Grenzen die Höhe der zugesetzten Fermentmenge.

5. Von erheblichem Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit und den Reaktionsverlauf der Hydroperoxydzersetzung ist der Neutralitätsgrad des Reaktionsgemischs.

Bei 0° verläuft die Reaktion am schnellsten etwa beim Neutralitätspunkt reinen destillierten Wassers, sodaß schon der Kohlensäuregehalt des gewöhnlichen destillierten Wassers einerseits, andererseits ein Alkalizusatz bis zum Farbenumschlag des Phenolphthaleins eine mehr oder weniger erhebliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hat. Bei höheren Temperaturen ist das Optimum mehr nach Gebieten höherer Wasserstoffionenkonzentrationen verschoben, sodaß hier die Entfernung der Kohlensäure aus dem destillierten Wasser gerade den ent-

gegengesetzten Effekt wie bei  $0^{\circ}$  hat, d. h. eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bedingt.

Steigert man den Säurezusatz bei  $0^{\circ}$ , so sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit zuerst sehr schnell, später langsam, ohne daß das Ferment jedoch hierdurch dauernd geschädigt wird. Auch die Sättigung des Reaktionsgemischs mit  $\text{CO}_2$  bei  $0^{\circ}$  bedingt einen sehr starken Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit. Bei  $30^{\circ}$  ist die Wirkung der Säure auf das Reaktionsgemisch viel schwächer, dagegen tritt schließlich eine Zerstörung des Ferments durch die Säure bei dieser Temperatur ein.

Steigert man bei  $0^{\circ}$  den Alkalizusatz, so sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit ebenfalls weiter. Gleichzeitig wird jedoch auch der Reaktionsverlauf beeinflußt und die Ursache hierfür ist eine wenigstens zum Teil nicht umkehrbare Zerstörung des Ferments.

Bei  $30^{\circ}$  treten alle diese Wirkungen in sehr verstärktem Maße auf.

6. Der Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist auch dann, wenn durch niedrige Hydroperoxydkonzentration eine Oxydation des Ferments in der Lösung vermieden wird, auffallend gering, aber nicht für alle Fermentlösungen völlig gleich.

Infolge der beschriebenen Verschiedenheit der Lage des Reaktionsoptimums hinsichtlich des Neutralitätsgrads der Reaktionsflüssigkeit verschwindet der Temperatureinfluß in Reaktionsgemischen, die bis zum Farbumschlag des Phenolphthaleins neutralisiert sind, fast vollständig, ja es treten Fälle ein, in denen, ohne daß eine Beeinflussung des Reaktionsverlaufs bemerkbar wäre, Temperaturerhöhung zu einer Reaktionsverzögerung führt.

Die vorliegende Untersuchung wurde im Laboratorium für angewandte Chemie zu Leipzig ausgeführt, dem der eine der Verfasser (Waentig) als Assistent angehört. Herrn Geheimrat Beckmann, dem Leiter des Instituts, sei für die Überlassung von Apparaten und anderen Hilfsmitteln der verbindlichste Dank ausgesprochen. Ganz besonders verpflichtet ist

ihm der andere Verfasser (Steche) für die gastfreundliche Aufnahme im Institut, die allein ein nutzbringendes Zusammenarbeiten ermöglichte. Ebenso schuldet er seinem Chef, Herrn Geheimer Rat Chun, herzlichen Dank für die zeitweilige Entbindung von seinen Assistentenpflichten, nur dadurch ließen sich die zeitraubenden Versuche durchführen.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.