



Title	Untersuchungen ueber die Hefekatalase
Author(s)	MATSUYAMA, Mosuke
Citation	Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University, 32(4), 109-199
Issue Date	1933-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12688
Type	departmental bulletin paper
File Information	32(4)_p109-199.pdf



UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE HEFEKATALASE

von

Mosuke Matsuyama

Mit 24 Abbildungen im Text

Inhaltsübersicht

I. Einführung.	110
II. Studien über die allgemeine Wirkungsweise der Hefekatalasen.	113
A. Versuch mit Katalase aus untergäriger Hefe. (U-Hefe).113	
1. Herstellung der Enzymlösung und die Methodik der Bestimmung der Katalasewirkung.	113
2. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Katalasewirkung. (U-Hefe)	114
3. Enzymmengen und Reaktionskonstanten.	116
4. Temperaturoptimum der Katalase. (U-Hefe)	117
5. Temperaturkoeffizient der H_2O_2 -Spaltung durch Hefekatalase. (U-Hefe)	118
6. Tötungstemperatur der Katalase. (U-Hefe)	119
7. Abhängigkeit des Inaktivierungskoeffizienten von der Temperatur.	121
8. Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der Katalase. (U-Hefe)	122
9. Einfluss der Azidität auf die Temperaturempfindlichkeit der Katalase. (U-Hefe)	123
10. Einfluss der Enzymkonzentration auf die Inaktivierungskonstante der Hefekatalase aus U-Hefe.	123
B. Versuch mit Katalase aus obergäriger Hefe. (O-Hefe).125	
1.—10. gleich wie der unter A angegebenen Reihenfolge.125	
C. Zusammenfassende Beschreibung der Versuche über allgemeine Wirkungsweise der Unter- und Oberhefekatalasen.	135

III.	Einfluss der Lüftung während der Züchtung auf die Katalase der untergärigen Hefe.	137
IV.	Untersuchungen über die Kinetik der Inaktivierung der Katalase selbst durch H_2O_2 während der Reaktion....	143
A)	Theoretischer Teil.	143
B)	Experimenteller Teil.	151
(I)	Bestätigung der Theorie.	151
	Proportionalität zwischen der Enzymmengen und der monomolekularen Reaktionskonstanten k bzw. der modifizierten Konstanten K	151
(II)	Einfluss der Faktoren auf die Zersetzungskonstanten.	154
a)	Enzymmengen und Zersetzungskonstanten. ..	154
1)	Mit Katalase aus U-Hefe.	154
2)	Mit Katalase aus O-Hefe.	159
b)	Einfluss von H_2O_2 -Konzentration auf die Zersetzungskonstanten.	164
1)	Mit Katalase aus U-Hefe.	164
2)	Mit Katalase aus O-Hefe.	171
c)	Einfluss der Temperatur auf die Zersetzungskonstanten....	180
1)	Mit Katalase aus U-Hefe.	180
2)	Mit Katalase aus O-Hefe.	187
(III)	Schlussfolgerungen der unter Kapital IV angegebenen Untersuchungen.	196
V.	Zusammenfassung.	197
	Literaturverzeichnis.	198

I. Einführung

Die Katalase ist ein unter den Lebewesen sehr weit verbreitetes Ferment und es ist anzunehmen, dass es irgend eine wichtige Rolle beim Atmungsprozess spielt. Nach verschiedenen neueren Forschungen über die Beziehungen zwischen den Enzymen und der Lebenstätigkeit ist das Interesse an diesen Enzymen in den Fachkreisen aufs neue erwacht.

Was die Hefekatalase anbetrifft, so liegen auch zahlreiche ältere Untersuchungen vor. N. Wender¹⁾ behauptete, dass junge Hefezellen mehr Katalase als alte enthalten. W. Issajew²⁾ hat einige ausführliche Versuche über diese Enzyme gemacht. Nach seinen Ergebnissen

liegt das Temperaturoptimum der Hefekatalasewirkung in 0.012 molarer Konzentration an H_2O_2 bei einer Reaktionszeit von 10 Minuten bei etwa 40° . Über die Reaktionskonstanten hat er viele Versuche in verschiedenen H_2O_2 -Konzentration bei 0° und 25° angestellt und bestätigt, dass die monomolekulare Reaktionskonstanten in verdünnten H_2O_2 -Konzentrationen recht gute übereinstimmende Werte ergibt, aber in höherer Konzentration, schon bei $m/73 \text{ H}_2\text{O}_2$, die Abnahme der Konstanten deutlich bemerkbar ist. Er behauptet auch dabei, dass die Hefekatalase von der Hämase verschieden sei, sie ist viel widerstandsfähiger gegen Wärme. Aus seinen Versuchen über die Enzymmengen und die Reaktionskonstanten folgt, dass erstens keine strenge Proportionalität zwischen der Enzymmenge und der Reaktionsgeschwindigkeit besteht: die Aktivität des Katalysators steigt langsamer als seine Konzentration. Eine zweite Folgerung aus seinen Versuchen ist, dass mit Zunahme der Enzymkonzentration die Konstanten der Reaktion sinken: bei schwachen Katalasemengen bleiben sie konstant, oder nehmen höchstens am Ende der Reaktion etwas ab, bei stärkeren aber zeigt sich diese Abnahme recht bald und umso früher, je grösser die Enzymmenge ist. Über den Einfluss von Salzen auf die Katalasewirkung hat er auch viele Versuche gemacht, aber die Resultate, welche seiner Zeit bei nicht festgelegten Wasserstoffionenkonzentrationen ausgeführt wurden, geben kein klares Bild. Euler und Blix³⁾ haben gezeigt, dass die Katalasewirkung der lebenden obergärigen Hefezellen in verdünnter H_2O_2 -Lösung in gewissen Grenzen im Sinne einer monomolekularen Reaktion verläuft und die Konstanten den angewandten Hefemengen proportional sind. Nach den genannten Forschern verstärkt eine geringe Menge von Plasmagiften wie Chloroform, Thymol u. s. w. die Wirkung von lebender Hefekatalase auf das 2-6 fache. Durch Trocknung der Hefe bei Zimmertemperatur oder Entwässerung mittels Alkohol bzw. Aether u. s. steigt die Wirkung der Enzyme auf das 10-15 fache. Durch 1/2-2 stündiges Erwärmen der lebenden Hefeemulsion auf 55° bis 63° verstärkt sich die Katalasewirkung auf das 20-30 fache. Durch Behandlung der Hefe mit Rohrzuckerlösung steigt auch die Wirkung der Katalase in Hefezellen. Methylenblau aktiviert, aber Essigsäure wirkt hemmend. Euler und Laurin⁴⁾ haben die Aktivierung der Katalasewirkung durch Chloroform auch bei Sacch. thermantitonus gefunden. Dagegen zeigte sich bei dieser Hefe keine Aktivierung durch Temperaturerhöhung. Die Verfasser

führen die Aktivierung der Katalase auf eine Aenderung des Quellungszustandes des kolloidalen Enzymmoleküls zurück. Durch Sonnenlicht wird die Katalase in den lebenden Hefezellen geschwächt, eine Aktivierung konnte nicht erzielt werden. Röntgenstrahlen sind ohne Einfluss auf die Katalasewirkung der lebenden Hefe. Nach Euler und Blix⁵⁾ steigert die Katalase ihre Wirkung in lebenden Hefezellen durch Behandlung derselben mit Rohrzucker, Asparagin und Kalium- und Magnesiumphosphate enthaltende Lösung. Y. Yamamoto⁶⁾ hat neuerdings Versuche mit zahlreichen Hefearten aufgenommen. Er hat die Versuche mit lebenden Hefen, die auf Koji-Agar kultiviert wurden, in n/100 H₂O₂-Lösung ausgeführt. Nach seinen Ergebnissen liegt das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration der meisten lebenden Hefezellen bei pH 8.5. Bei *Saccharomyces Awamori* Inui, *Sacch. sp.* (aus Honig) und *Willia Saturnus* Klöcker sind die monomolekularen Reaktionskonstanten im Laufe des Versuches absteigend, aber bei Johannisberg (Reingau-Weinhefe) sind sie aufsteigend, und bei Brennereihefe sind die Konstanten zuerst aufsteigend, nachher absteigend, und danach wieder aufsteigend. Wasserstoffsperoxyd ruft bei einigen Hefearten eine Schwächung der Hefekatalasen hervor, bei anderen eine Erhöhung.

Hier verlasse ich die Literatur, welche sich auf die Hefe bezieht und die übrige Literatur, welche in direkter Beziehung zu meiner vorliegenden Arbeit steht, wird an den betreffenden Stellen zitiert. In der vorliegenden Arbeit habe ich zuerst die allgemeine Wirkungsweise der Unter- und Oberhefekatalase unter Berücksichtigung des hiesigen Zustandes der Enzymforschung untersucht. Dann habe ich die Ampassungserscheinungen der Bierhefe nach veränderten Lebensbedingungen, starke Lüftung während der Züchtung, besonders in Bezug auf Katalase untersucht. Das Problem der Erniedrigung der Reaktionskonstanten der Katalasewirkung in höheren Konzentrationen von H₂O₂, besonders bei höheren Temperaturen, bezieht sich nicht nur auf Hefekatalase, sondern auch auf fast alle anderen Katalasen, aber ich habe in folgenden nur mit Hefekatalasen eine ausführliche Untersuchung über diese Frage angestellt.

Die angewandte untergärige Bierhefe wurde unserer Brauerei entnommen. Sie stammt aus dem Institut für Gärungsgewerbe, Berlin und führt die Nummer 772. Die obergärige Backhefe wurde von Herrn T. Kitajima von der Orientalhefefabrik bei Tokyo zur Verfügung gestellt. Herr. T. Komazawa hat mich bei vielen Versuchen

freundlichst unterstützt und Herr. Y. Hashitani hat mir auch immer wertvolle Anregung gegeben, wofür diesen Herren an dieser Stelle bestens gedankt sei.

II. Studien über die allgemeine Wirkungsweise der Hefekatalasen

A. Versuch mit Katalase aus untergäriger Hefe

1. Herstellung der Enzymlösung und die Methodik der Bestimmung der Katalasewirkung

150 g der untergärigen Presshefe wurden mit 50 ccm Toluol 3 Stunden lang bei 40° autolysiert, dann mit 200 ccm Wasser versetzt und gut umgerührt. Nach etwa 24 Stunden wurden das Autolysat durch Kieselguhr auf der Nutsche klar abfiltriert. In der auf das 10 fache verdünnten Lösung des oben beschriebenen Autolysates wird die Katalase in 20 ccm verdünnter Lösung (pH=4.7) durch 0.5 ccm Aluminiumhydroxydgel vollständig absorbiert. Das Aluminiumhydroxydgel wurde nach der Vorschrift von Willstätter und Kraut⁷⁾ bereitet und enthält in 10 ccm ca. 0.188 g Al_2O_3 . Ich habe aber gefunden, dass das Enzym bei der angegebenen Säurekonzentration verhältnismässig schnell zerstört wird, weshalb die Absorption bei noch schwächeren Säuren ausgeführt wurde. Als Elutionsmittel eignete sich ein m/30 Phosphatgemisch von pH 7.6 jedoch war die Ausbeute nicht hoch. Die Reinigung wurde beispielsweise wie folgt ausgeführt: Zu 200 ccm des wie oben hergestellten Autolysats wurden 1656 ccm Wasser, 44 ccm n/10 HCl und 100 ccm Aluminiumhydroxydgel hinzugesetzt und dadurch die Säurekonzentration des Gemisches auf ein pH von etwa 6.0 gebracht. Nach dem Absetzen des Absorbates wurde dekantiert und dann durch Kieselguhr auf der Nutsche abfiltriert. Das Absorbat wurde einmal mit Wasser gewaschen und danach mit 400 ccm m/30 Phosphatgemisch von pH 7.6 3 Stunden lang turbiniert, hierauf die Elution ebenfalls durch Kieselguhr abfiltriert. Die so erhaltene Elution behält ungefähr ihre H-Konzentration; in den meisten Fällen hatte ich ein pH von 7.4–7.5. Das nicht gereinigte Autolysat wurde auch als Versuchsmaterial angewandt.

Die Versuche wurden in Erlenmyerkolben von 100 ccm Inhalt ausgeführt, die in einem Wasserbade auf konstanter Temperatur gehalten wurden. Die Stammlösung von H_2O_2 wurde bereitet als

etwa $n/4$ Lösung und von Zeit zu Zeit gegen KMnO_4 -Lösung eingestellt, hiervon kam die berechnete Menge zur Anwendung. Wo nichts anderes angegeben ist, wurden in die Kolben die berechnete Menge von H_2O_2 -Lösung, 5 ccm $n/15$ Phosphatpuffergemisch, Enzymlösung und Wasser einpipettiert, so dass die Reaktionsmischung stets 20 ccm hält. Die Konzentration an H_2O_2 in der Reaktionsmischung ist, wenn nichts anderes gesagt wird, $n/20$ und die Reaktionstemperatur 20° . Nach einer gewissen Reaktionszeit wurden zu den Versuchskolben 10 ccm 10 % ige Schwefelsäure zugegossen und dadurch die Reaktion abgebrochen. Das nicht gespaltene H_2O_2 wurde mit $n/20$ KMnO_4 -Lösung (wenn nichts anderes angegeben wird) titriert. Der Anfangswert der Reaktionsmischung an KMnO_4 , welchen ich mit A bezeichnete, wurde bestimmt durch Titration des mit Schwefelsäure angesäuerten Reaktionsgemisches vor der Enzymzugabe. Die Menge des gespaltenen H_2O_2 wurde mit x bezeichnet, welches in ccm von KMnO_4 -Lösung ausgedrückt wurde. Sodann $A-x$ bezeichnet die Titrationszahl des zurückgebliebene H_2O_2 .

2. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Katalasewirkung (U-Hefe)

Die Versuche wurden mit 1 ccm Fermentlösung (I, $\text{pH}=7.4$) ausgeführt. Die Pufferkapazität, welche die Enzymlösung als Elutionsmittel hat, wurde durch wechselnde Mengen von $n/10$ HCl - bzw. $n/10$ NaOH -Lösung dem gewünschten pH geändert, wozu noch 5 ccm Phosphatpuffer von gewünschtem pH gefügt wurden. Die Wasserstoffionenkonzentrationen der reagierenden Mischungen wurden in besonderen Parallel=Kolben in bestimmten Zeitintervallen nach der Enzymzugabe bestimmt. Alle vorliegenden Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentration wurden nach der Indikatorenmethode von L. Michaelis⁸⁾ ausgeführt.

TABELLE Ia

1 ccm Probe (I) in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender Mischung,
15 Minuten bei 20° , $A=20.0$ ccm $n/20$ KMnO_4

pH:	4.8	5.5	6.3	7.5	8.0
$A-x$	7.30	5.90	5.10	5.75	6.65
x	12.70	14.10	14.90	14.25	13.35

TABELLE 1b

Gleich wie bei Vers. in Tabelle Ia, 20 Minuten bei 20°,
A = 20.1 ccm n/20 KMnO₄

pH:	5.0	5.6	6.3	6.8	7.5
<i>A</i> - <i>x</i>	7.60	6.60	5.60	5.60	6.20
<i>x</i>	12.50	13.50	14.50	14.50	13.90

TABELLE 1c

1 ccm ungereinigte Autolysat (auf d. 10 fache verd.)
 in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung, in Minuten bei 20°,
A = 20.4 ccm n/20 KMnO₄

pH:	4.8	5.4	6.6	7.5	7.9
<i>A</i> - <i>x</i>	13.35	11.05	9.70	10.00	10.65
<i>x</i>	7.05	9.35	10.70	10.40	9.75

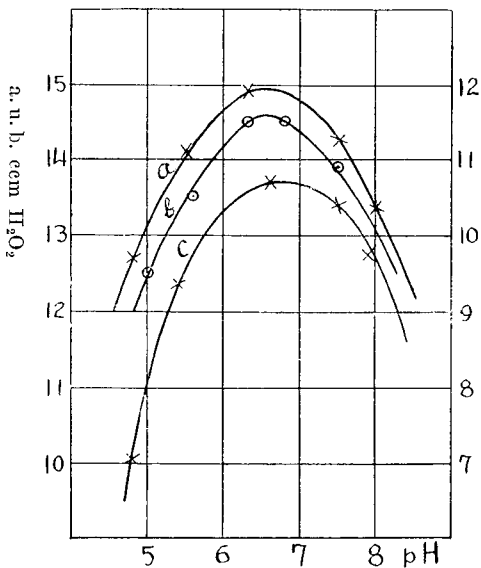


Abb. 1

Begleitstoffe in der Enzymlösung. Aus obigen Ergebnissen geht hervor, dass das pH-Optimum der Unterhefekatalase unter den angegebenen

Aus obigen Ergebnissen sowie aus der Abb. 1 geht hervor, dass das pH-Optimum der gereinigten Präparate unter den angegebenen Bedingungen bei pH 6.5 bis 6.6 liegt, während das Optimum des ungereinigten Autolysates bei etwa pH 6.8 liegt. Also liegt das pH-Optimum des ungereinigten Autolysates etwas mehr auf der alkalischen Seite im Gegensatz zum gereinigten Präparat. Derartige Erscheinungen erklären sich vielleicht durch den Einfluss der

Bedingungen zwischen pH 6.5 bis 6.8 liegt.

Wo nichts anderes angegeben ist, wurden als Puffer für die weiteren Versuche die Phosphatgemische von pH 6.6 gebraucht.

3. Enzymmengen und Reaktionskonstanten

Die Kinetik der Katalasewirkung hängt vom jeweiligen Mengenverhältnis vom Ferment zum H_2O_2 ab. Die Katalasewirkung verläuft nach dem Gesetz der monomolekularen Reaktion und die Abweichung von dem gesetzmässigen Verlauf wird durch die begleitende Reaktion der Inaktivierung der Katalase durch H_2O_2 verursacht.

Die von Maximowitsch und Awtonomowa⁹⁾ vorgeschlagene Formel des Reaktionsgesetzes zwischen Katalase und H_2O_2 erklärt die oben beschriebene Tatsache mit aller Deutlichkeit. Aus den Versuchen von Issajew¹⁰⁾ sieht man auch, dass die Hefekatalasewirkung in verdünnten Konzentrationen an H_2O_2 den Gesetzen einer monomolekularen Reaktion folgt. Die Abweichung der Reaktionskonstanten—die Inaktivierung der Katalase selbst—werden an späterer Stelle ausführlich untersucht. Hier soll nur der Zusammenhang zwischen der Enzymmenge und der Reaktionskonstante untersucht werden.

Die Versuche wurden mit verschiedenen Mengen von Enzymlösung unter den angegebenen Bedingungen ausgeführt. Die Reaktionskonstanten wurden nach der Formel $k = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$ berechnet, wobei, wie schon gesagt wurde, mit A die Anfangsmenge von H_2O_2 , mit x die Menge des in der Zeit t gespaltenen H_2O_2 ausgedrückt wird. Die Resultate waren wie folgt:

TABELLE II

*In 20 ccm n/20 H_2O_2 reagierender Mischung von pH 6.6,
20 Minuten bei 20°*

Probe ccm	0.5	1.0	1.5	2.0
A	19.70	19.75	19.80	19.85
$A-x$	15.60	12.30	9.85	7.75
k	0.00507	0.01028	0.01516	0.02042
$k/\text{Enzym Menge}$	0.01014	0.01028	0.01011	0.01021

Aus meinen Resultaten geht hervor, dass die Reaktionskonstante der Unterhefekatalasewirkung bei einer gleichen Reaktionszeit unter

den angegebenen Bedingungen ziemlich proportional mit der Enzymmenge ist. Versuche mit dem ungereinigten Präparat zeigten auch gleiche Ergebnisse. Also gilt die Konstante mit ziemlicher Genauigkeit als Mass für die Enzymmengen.

Die Proportionalität zwischen Enzymmengen und Reaktionskonstanten werden noch im späteren Teil der Arbeit ausführlich untersucht.

4. Temperaturoptimum der Katalase (U-Hefe)

Die Versuche sind mit 1 bzw. 2 ccm Probe (II) im Wasserbad bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt. Die Resultate waren wie folgt:

TABELLE IIIa

1 ccm Probe (II) in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender Mischung von pH 6.6, Reaktionszeit 20 Minuten

Temperatur:	1°	10°	20°	30°	40°	50°
A	20.1	20.1	20.1	20.1	20.1	20.0
$A-x$	10.0	9.0	8.95	10.1	12.4	16.55
$k \cdot 10^3$	15.16	17.45	17.57	14.94	10.49	4.11

TABELLE IIIb

2 ccm Probe (II) in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender Mischung von pH 6.6, Reaktionszeit 15 Minuten, $A=20$ ccm $n/20$ $KMnO_4$

Temperatur:	1°	10°	15°	20°	30°
$A-x$	7.9	7.15	6.925	7.075	8.0
$k \cdot 10^3$	23.89	29.78	30.71	30.09	23.53

TABELLE IIIc

2 ccm Probe (II) in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender Mischung von pH 7.0, Reaktionszeit 20 Minuten, $A=20.1$ ccm $KMnO_4$

Temperatur:	1°	10°	20°	30°	40°
$A-x$	4.65	4.2	4.2	5.0	7.2
$k \cdot 10^3$	31.79	34.00	34.00	30.21	22.29

Die drei Resultate sind zusammen in Abb. 2 graphisch dargestellt. Wie aus den Resultaten und aus Abb. 2 ersichtlich, habe ich bei den versuchen gefunden (Tabelle III a u. III b), dass das optimum

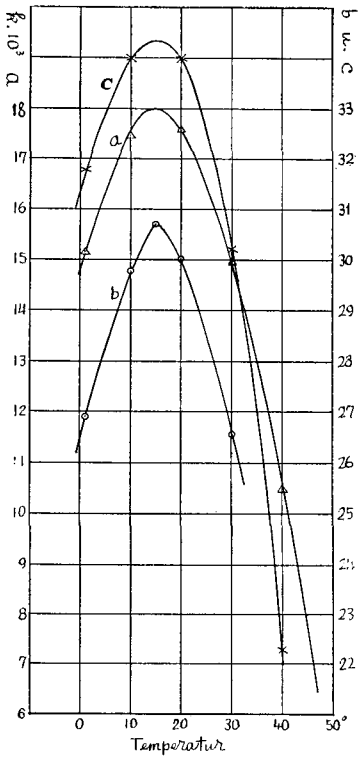


Abb. 2.

meinen späteren Versuchen gefunden habe, dass diese Faktoren ausserordentlich grossen Einfluss auf die Katalaseinaktivierung haben, wovon später die Rede sei soll.

5. Temperaturkoeffizient der H_2O_2 -Spaltung durch Hefekatalase (U-Hefe)

Es ist von mehreren Forschern und auch bei meinen Untersuchungen über Malzkatalase¹²⁾ erkannt worden, dass für die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur, auch bei Enzymreaktionen, in weiteren Grenzen die Formel von Arrhenius gilt:

$$k_2 = k_1 e^{\frac{A \cdot (T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2}}, \text{ wobei } A \text{ eine Konstante bedeutet,}$$

R die Gaskonstante, T_2 bzw. T_1 die den Reaktionsgeschwindigkeiten k_2 und k_1 entsprechenden absoluten Temperaturen und e die Basis der

der Wirkung der Unterhefekatalase bei etwa 15° liegt. Da mein Ergebnis nicht mit dem von Issajew¹¹⁾ gefundenen Resultat übereinstimmt, habe ich einen Versuch mit einem anderen pH als 6.6 und zwar bei pH-7.0 vorgenommen, bei welchem pH die Unterhefekatalase am beständigsten gegen Hitze nach meinen Versuchen gefunden wurde. Das Resultat ist in Tabelle IIIc angegeben.

Alle Resultate stimmen gut überein sodass man sagen könnte, dass das Optimum der Temperatur der Unterhefekatalase unter den angegebenen Bedingungen bei etwa 15° liegt. Wie schon erwähnt wurde, ist das Temperaturoptimum der Hefekatalase nach Issajews Angaben etwa 40° . Dieser grosse Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen wird vielleicht nur verursacht durch die verschiedenen Versuchsbedingungen, der H_2O_2 -Konzentration und der Reaktionszeit, da ich bei

natürlichen Log. Aus der obigen Temperaturformel ergibt sich die folgende Hilfsformel:

$$A = \frac{\log(k_2/k_1) \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot 2}{M(T_2 - T_1)}, \text{ wobei } M = \log e = 0.4343 \text{ ist.}$$

Wenn die Temperaturkoeffizienten k_2/k_1 und die Temperaturkonstanten von Arrhenius A aus den Versuchen der Tabelle IIIb ausgerechnet werden, erhält man:

TABELLE IV

Temperatur,	$k \cdot 10^3$	Temp. Gebiet	k_2/k_1	A
0°	26.50*			
5	28.30*	0°—5°	1.068	1997
10	29.78	5—10	1.052	1596
15	30.71	10—15	1.031	995
20	30.09	15—20	0.980	
25	28.50*	20—25	0.947	
30	26.53	25—30	0.931	

* Aus der graph. Darstellung gesucht.

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, dass die Werte der Temperaturkoeffizienten $k_{t+5} : k_t$ und die Konstanten A zwischen 0° und 10° annähernd konstant sind. Also gilt die Temperaturformel von Arrhenius für die Unterhefekatalasewirkung unter den angegebenen Bedingungen in weiteren Grenzen nicht.

6. Tötungstemperatur der Katalase (U-Hefe)

Um die von H. v. Euler¹³⁾ definierte "Tötungstemperatur" der Hefekatalase festzustellen, wurden folgende Versuche angestellt. In Glasröhren mit Stopfen wurden 10 ccm Enzymlösung (pH=6.6) 1 Stunde lang auf verschiedenen Temperaturen gehalten. Nach der Erhitzung wurden 2 ccm der Lösung zur H₂O₂-Spaltung verwendet. Gleichzeitig wurde eine Katalyse mit einem ebenso grossen Volumen der Enzymlösung, die nicht erhitzt war, ausgeführt. Die Katalyse dauerte 20 Minuten lang bei pH 6.6 und 20°.

TABELLE Va

2 ccm Probe (II) in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung von
pH 6.6, 20 Minuten bei 20°, A=20.1 ccm n/20 KMnO₄

Erhitzungs= temperatur;	Nicht erhitzt	30°	35°	40°	45°	50°	55°	60°
A-x.....	7.6	8.4	8.85	10.25	12.4	15.7	19.55	20.1
k.10 ³	21.12	18.95	17.81	14.62	10.49	5.37	0.60	0
Rel.k	100	89.7	84.3	69.2	49.7	25.4	2.84	0

Da bei dem als Optimum gefundenen pH 6.6 (eingestellt durch Zusatz von HCl) die Enzymlösung starke Flockung bildet und die Katalase auch bei Zimmertemperatur schnell zu verderben scheint, habe ich noch andere Versuche (Erhitzung beim pH 7.0) angestellt. Das Ergebniss war folgendes: Die Katalase wurde gleichfalls bei pH 7.0 ausgeführt.

TABELLE Vb

1.5 ccm Probe (III) in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender
Mischung von pH 7.0, Minuten bei 20°,
A=20.1 ccm n/20 KMnO₄

Erhitzungs= temperatur	Nicht erhitzt	30°	40°	45°	50°	55°	60°
A-x.....	8.7	8.7	10.05	12.58	17.35	19.775	20.1
k.10 ³	18.18	18.18	15.05	10.18	3.20	0.35	0
Rel.k	100	100	82.78	56.00	17.60	1.93	0

Die beiden Resultate wurden in Abb. 3 graphisch dargestellt. Bei beiden Versuchen, der eine bei pH 6.6 (das Optimum für H₂O₂-Spaltung) und der andere bei pH 7.0 (bei welcher das Ferment gegen Hitze am beständigsten ist), gibt es in bezug auf Tötungstemperatur, keinen grossen Unterschied.

Aus Abb. 3 geht hervor, dass die Inaktivierung bei einstündiger Erhitzung auf etwa 45-46° auf die Hälfte der Wirkung vorgeschritten ist. Die Tötungstemperatur der Unterhefekatalase liegt folglich bei etwa 45-46°C.

7. Abhängigkeit des Inaktivierungskoeffizienten von der Temperatur

Aus dem Ergebnis des oben angegebenen Versuchs (Tabelle Vb) wurden die Inaktivierungskoeffizienten nach der Formel $kc = \frac{1}{t} \log \frac{k\alpha}{kt}$ berechnet, worin t die Dauer der Erhitzung in Minuten angibt, $k\alpha$ die Reaktionsgeschwindigkeit der Katalyse durch nicht erhitzte Enzymlösung, kt die Reaktionsgeschwindigkeit der Katalyse durch erhitzte Enzymlösung. In der folgenden Tabelle ist kc , entsprechend der Katalyse durch Enzymlösung, welche eine Stunde lang auf 55° erhitzt war, mit 100 bezeichnet.

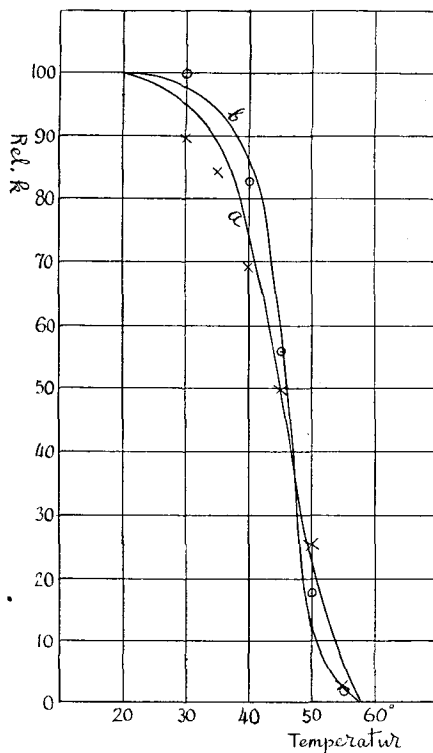


Abb. 3.

TABELLE VI

Temperatur	$k \cdot 10^8$	$kc \cdot 10^3$	Rel. kc .
Nicht erhitzt	18.18		
35°	17.09*	0.45	1.6
40	15.05	1.37	4.8
45	10.18	4.20	14.7
50	3.20	12.57	44.0
55	0.35	28.59	100.0

* Aus der graph. Darstellung gesucht.

Die Werte der relativen Inaktivierungskoeffizienten sind in Abb. 4 mit den entsprechenden Erhitzungstemperaturen graphisch dargestellt. Die Inaktivierung der Unterhefekatalase nach einstündiger Erhitzung auf 40° ist schon deutlich sichtbar. Sie vollzieht sich

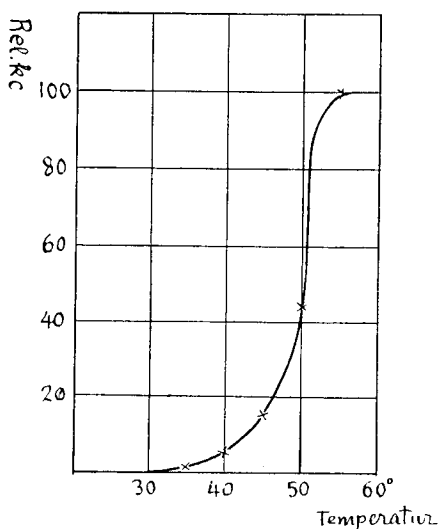


Abb. 4.

dann sehr schnell. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, dass die Aktivität der Unterhefekatalase nach einstündiger Erhitzung auf etwa 58° auf Null sinkt.

8. Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der Katalase (U-Hefe)

In Probierröhren mit Stopfen wurden 7 ccm Enzymlösung (III) beim pH 7.0 verschieden lange auf 45° gehalten. Nach der Erhitzung wurde die Lösung zur H₂O₂-Spaltung verwendet, welche gleichfalls bei pH 7.0 ausgeführt wurde. Gleichzeitig wurde ein Versuch mit nicht erhitzter Enzymlösung vorgenommen. Die Inaktivierungskonstanten k_c sind nach oben beschriebener Formel berechnet. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse:

TABELLE VII

2 ccm Probe (III) in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung von pH 7.0, 20 Minuten bei 20°, A=19.9 ccm n/20 KMnO₄

Erhitzungsdauer auf 45°, in Min.	A-x	k · 10 ³	Rel. k	k _c · 10 ³
Nicht erhitzt	5.8	26.77	100	
30°	9.25	16.64	62.16	6.88
60	10.8	13.27	49.57	5.08
90	11.7	11.53	43.07	4.06
120	12.3	10.45	39.04	3.40

Wie man aus der Tabelle VII sieht, nehmen die Werte von k_c mit steigender Erhitzungsdauer ab, die Inaktivierung geht mit steigender Erhitzungsdauer langsamer vor sich. Die Aktivität ist während der ersten 30 Minuten um etwa 40% und während der folgenden 60 Minuten um nur etwa 20% gesunken.

9. Einfluss der Azidität auf die Temperaturempfindlichkeit der Katalase (U-Hefe)

Je 10 ccm der Probe (III) wurden mit verschiedenen Mengen von n/10 HCL bzw. n/10 NaOH auf das gewünschte pH eingestellt und mit Wasser auf ein gleiches Volumen gebracht. Die so bereiteten Proben in Probierröhren mit Stopfen wurden 60 Minuten auf 45° erhitzt. Nach der Erhitzung wurde in einem Teile jeder Lösung das pH bestimmt, dann die Menge von n/10 HCl bzw. n/10 NaOH ermittelt, die notwendig ist, um das pH wieder auf 6.6 einzustellen. 2 ccm von der erhitzten Probe mit den nötigen Mengen von Säuren bzw. Alkali und dazu noch 5 ccm Phosphatgemisch von pH 6.6 wurden zur H₂O₂-Spaltung verwendet. Die Reaktion dauerte wie immer 20 Minuten bei 20°. Die Ergebnisse sind in folgende Tabelle niedergelegt.

TABELLE VIII

2 ccm Probe in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung von pH. 6.6, 20 Minuten bei 20°, A=20.1 ccm n/20 KMnO₄

pH Während der Erhitzung....	6.4	6.6	7.0	7.4	7.7
A-x.....	11.35	9.2	8.0	9.2	15.2
k · 10 ³	12.41	16.97	20.01	16.97	6.07

Die Resultate sind in Abb. 5 graphisch dargestellt.

Aus Abb. 5 ist ersichtlich, dass die Temperaturempfindlichkeit der Hefekatalase im starken Masse abhängig ist von der Azidität. Der grösste Stabilität liegt bei pH 7.0. Sie ist ein wenig nach der alkalischen Seite verschoben gegenüber der Säurekonzentration der grössten Wirksamkeit.

10. Einfluse der Enzymkonzentration auf die Inaktivierungskonstante der Hefekatalase aus U-Hefe

Mit den notwendigen Mengen von n/10 HCl auf pH 7.0 eingestellte Katalaseprobe (III) wurde mit m/30 Phosphatgemisch von pH 7.0 in verschiedenen Proportionen gemischt, so dass Mischungen

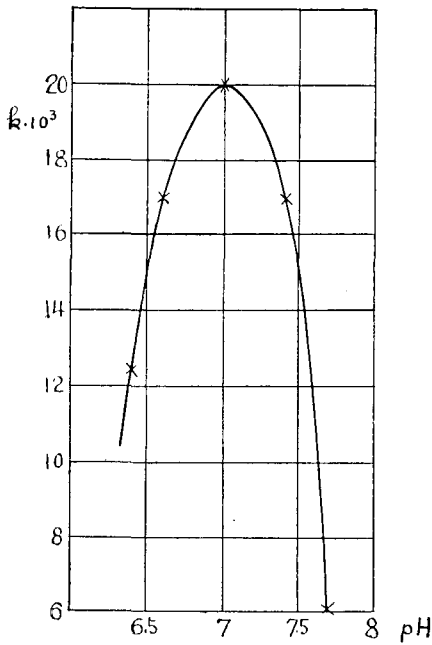


Abb. 5.

ausgeführt.

entstanden, die 1 ccm Katalaselösung auf 1, 2, 3, 4 und 5 ccm Mischung enthielten. In Probierröhren mit Gummistopfen wurden diese Mischungen eine Stunde lang auf 40° bzw. 45° gehalten. Nach dem Abkühlen wurde von jeder erhitzten Mischung so viel zur Katalyse genommen, dass diese durch 2 ccm Originalenzymlösung katalysiert wurde. Es wurden ausserdem verschiedene Mengen von Pufferlösung zugesetzt, so dass alle Proben einen nahezu gleichen Gehalt an Phosphat enthielten. Gleichzeitig wurde ein Versuch mit 1 ccm nicht erhitzter Katalaselösung gemacht. Die Reaktion wurde bei pH 7.0

TABELLE IXa

Auf 40° erhitzte Probe in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender
Mischung von pH 7.0, 20 Minuten bei 20°,
 $A = 20.0$ ccm $n/20$ $KMnO_4$

Verdünnung des Enz. während der Erhitzung	Nicht erhitzt	Erhitzt				
	1 : 0	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4
Probe ccm	1	2	4	6	8	10
m/30 Phosphatpuffer pH 7.0	9	8	6	4	2	0
$A - x$	8.775	5.45	6.4	6.8	6.85	7.1
$k \cdot 10^3$	17.89	28.23	24.74	23.43	23.27	22.49
Rel. k	$17.89 \times 2 = 100$	78.90	69.14	65.48	65.04	62.85
$kc \cdot 10^3$		1.72	2.67	3.06	3.11	3.36

TABELLE IXb

Auf 45° erhitzte Probe in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender
Mischung von pH 7.0, 20 Minuten bei 20°,
A = 20.1 ccm n/20 KMnO₄

Verdünnung des Enz. währ. der Erhitzung	Nicht erhitzt	Erhitzt				
	1 : 0	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4
Probe ccm	1	2	4	6	8	10
m/30 Phosphatpuffer pH 7.0	9	8	6	4	2	0
A-x.....	8.05	6.55	6.80	7.10	7.40	7.60
k. 10 ³	19.87	24.35	23.53	22.60	21.70	21.12
Rel. k	19.87 × 2 = 100	61.27	59.21	56.87	54.60	53.15
ke. 10 ³		3.55	3.79	4.09	4.38	4.58

Wie aus Tabellen IXa und IXb hervorgeht, gilt, dass die Temperaturempfindlichkeit bei sinkender Enzymkonzentration bei Unterhefekatalase zunimmt.

B. Versuch mit Katalase aus obergäriger Hefe.

1. Herstellung der Enzymlösung und die Methodik der Bestimmung der Katalasewirkung

Die hierfür angewandte Oberhefekatalase wurde in gleicher Weise wie bei der untergärigen Hefe bereitet. Die Presshefe wurde mit Toluol autolytisiert. Die Reinigung geschah wie folgt: Zu 800 ccm des Autolysates wurden 48 ccm n/10 HCl und 640 ccm Aluminiumhydroxydgel hinzugesetzt. Die H-Ionenkonzentration der Mischung beträgt etwa pH 6.1. Nach dem Absetzen wurde das Adsorbat auf der Nutsche abfiltriert und das Adsorbat mit 1200 ccm m/30 sekundärer Phosphatlösung 1 Stunde lang turbiniert, worauf die Elution durch Kieselguhr abfiltriert wurde. Die H-Ionenkonzentration der Elution war etwa pH 7.4. Ungereinigtes Autolysat kam auch zur Verwendung.

Die Methodik der Aktivitätsprüfung war dieselbe wie bei der Unterhefekatalase, deshalb will ich sie hier nicht wieder angeben und bei der weiteren Beschreibung habe ich auch das möglichst weggelassen, was aus den Tabellen klar verständlich ist.

2. Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Katalasewirkung (O-Hefe)

Die Versuche wurden mit dem gereinigten Präparat ebenso ausgeführt wie mit der Unterhefekatalase, d. h. mit Säure bzw. Alkali auf ein gewünschtes pH gebracht und mit Phosphatpuffer von entsprechendem pH versetzt.

Aus mehreren Versuchen habe ich als Beispiele folgende Tabellen zusammengestellt:

TABELLE Xa

1 ccm Probe (I) mit 5 ccm Phosphatpuffer in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender Mischung, 20 Minuten bei 20° ,
 $A = 20.2$ ccm $n/20$ $KMnO_4$

pH:	4.6	5.1	6.0	7.1	7.4	7.7
$A-x$	11.4	10.4	9.9	10.25	10.6	10.9
x	8.8	9.8	10.3	9.95	9.6	9.3

TABELLE Xb

Gleich wie bei Vers. in Tabelle Xa, 30 Minuten bei 20° ,
 $A = 20.2$ ccm $n/20$ $KMnO_4$

pH:	4.9	5.2	5.8	6.3	6.7	7.1	7.4
$A-x$	8.7	8.25	8.1	7.975	8.125	8.25	8.65
x	11.5	11.95	12.1	12.225	12.075	11.95	11.55

TABELLE Xc

1 ccm Probe (II) mit 5 ccm Phosphatpuffer in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender Mischung, 30 Minuten bei 20° ,
 $A = 20.1$ ccm $n/20$ $KMnO_4$

pH:	6.0	6.4	7.0	7.2
$A-x$	13.9	13.5	14.0	14.25
x	6.2	6.3	6.1	5.85

TABELLE Xd

2 ccm Probe (II) mit 5 ccm Phosphatpuffer in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung, 20 Minuten bei 20°,
A=20.2 ccm n/20 KMnO₄

pH:	5.0	5.3	5.9	6.3	6.8	7.4
A-x....	13.90	13.45	13.05	12.80	13.15	13.55
x.....	6.30	6.75	7.15	7.40	7.05	6.65

Die Resultate sind in Abb. 6 graphisch dargestellt. Wie aus obigen Versuchen sowie aus Abb. 6 hervorgeht, liegt das pH-Optimum der Oberhefekatalase bei einer Reaktionszeit von 20-30 Minuten unter den angegebenen Bedingungen bei pH 6.2-6.4.

3. Enzymmengen und Reaktionskonstanten

Die Versuche wurden mit Probe III (ungereinigtes Autolysat mit m/30 Phosphatlösung von pH 6.4 auf das fünfzigfache verdünnt) ausgeführt. Die Reaktion geht unter gleichen Bedingungen wie oben. Die Resultate waren wie folgt:

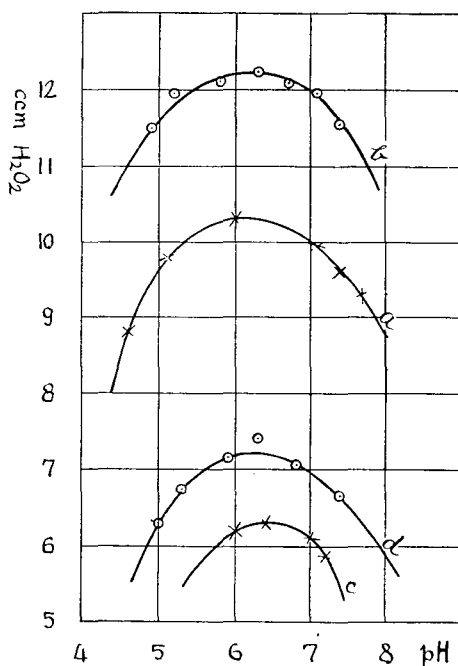


Abb. 6.

TABELLE XIa

Probe (III) in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung von pH 6.4, 20 Minuten bei 20°

Probe (III) ccm	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8
A.....	19.60	19.60	19.65	19.70	19.70
A-x	17.80	14.70	12.30	10.25	8.40
k	0.00209	0.006247	0.01017	0.01419	0.01851
k/Enzymmenge	0.01045	0.01041	0.01017	0.01014	0.01028

TABELLE XIb

Bedingungen wie bei Vers. in Tabelle XIa

Probe (III) ccm	0.5	1.0	1.5	2.0
<i>A</i>	19.60	19.65	19.70	19.70
<i>A-x</i>	15.40	12.30	9.75	7.65
<i>k</i>	0.00524	0.01017	0.01527	0.02054
<i>k</i> /Enzymmenge	0.01048	0.01017	0.01018	0.01027

Wie aus obigen Resultaten ersichtlich, zeigten die monomolekularen Reaktionskonstanten bei gleicher Reaktionszeit bei der Oberhefekatalase auch eine gute Proportionalität mit den Enzymmengen.

4. Temperaturoptimum der Katalase (O-Hefe)

Für diese Versuche wurde 1 ccm von Probe (I) mit den nötigen Mengen von $n/10$ HCl (0.12 ccm), welche die Wasserstoffionkonzentration der Probe auf pH 6.4 einstellte, mit 5 ccm $m/15$ Phosphatpuffer von pH 6.4 gebraucht. Die Resultate sind in folgenden Tabellen zusammengestellt:

TABELLE XIIa

1 ccm Probe (I) in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender Mischung von pH 6.4, Reaktionszeit 20 Minuten

Temperatur:	1°	10°	20°	30°	40°	50°
<i>A</i>	20.10	20.10	20.10	20.10	20.0	19.85
<i>A-x</i>	12.50	11.80	11.30	11.55	13.50	16.90
<i>k</i> · 10 ³	10.31	11.57	12.51	12.03	8.54	3.49

TABELLE XIIb

Bedingungen wie bei Vers. in Tabelle XIIa, Reaktionszeit 30 Minuten

Temperatur:	1°	10°	20°	30°	40°
<i>A</i>	20.15	20.15	20.15	20.15	20.05
<i>A-x</i>	11.00	9.80	9.45	9.95	12.50
<i>k</i> · 10 ³	8.76	10.44	10.96	10.22	6.84

Die beiden Resultate sind in Abb. 7 graphisch dargestellt. Es ist aus Abb. 7 ersichtlich, dass unter den angegebenen Versuchsbedingungen die optimale Temperatur der Oberhefekatalasewirkung bei etwa 20–24° liegt. Es ist deutlich bemerkbar, dass bei diesen Versuchen der optimale Punkt sich je nach der Reaktionszeit verändert. In Abb. 7 liegt in Kurve a das Optimum etwa bei 24°, in Kurve b bei etwa 20°.

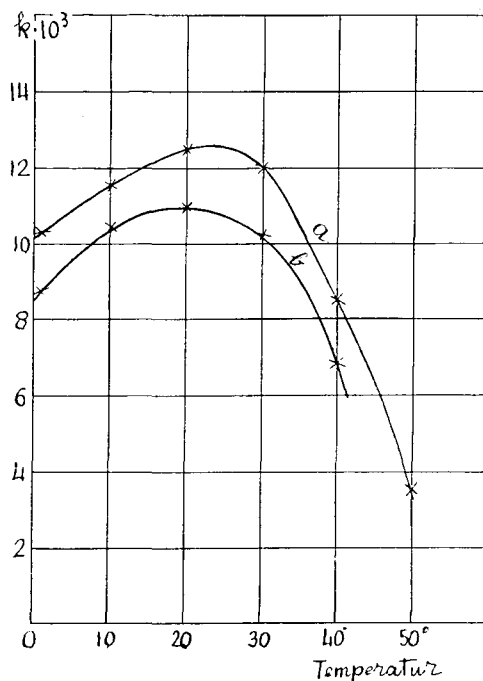


Abb. 7.

5. Temperaturkoeffizient der H₂O₂-Spaltung durch Hefekatalase (O-Hefe)

Die Temperaturkoeffizienten k_2/k_1 , und die Temperaturkonstanten von Arrhenius A wurden aus den Versuch der Tabelle XIIIa und XIIIb ausgerechnet. Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse.

TABELLE XIIIa

Temperatur	$k \cdot 10^3$	Temperaturgebiet	k_2/k_1	A
0°	10.13*			
5	10.89*	0°— 5°	1.075	2196
10	11.57	5 —10	1.062	1893
15	12.14*	10 —15	1.049	1560
20	12.51	15 —20	1.030	998
25	12.57*	20 —25	1.005	
30	12.03	25 —30	0.957	
35	10.54*	30 —35	0.876	

* Aus der graph. Darstellung gesucht.

TABELLE XIIIb

Temperatur	$k \cdot 10^3$	Temperaturgebiet	k_2/k_1	A
0°	8.50*			
5	9.63*	0°— 5°	1.133	3791
10	10.40	5 —10	1.080	2422
15	10.82*	10 —15	1.040	1278
20	10.95	15 —20	1.012	403
25	10.76*	20 —25	0.983	
30	10.17	25 —30	0.945	

* Auf der graph. Darstellung abgelesen. Andere Zahlen wurden auch korrigiert.

Die Temperaturkoeffizienten $k_{t+5}:k_t$ und der A -Wert sinken immer mit steigenden Temperaturen. Bei obigen beiden Versuchen zeigen die Temperaturkoeffizienten zwischen 0° bis 20° verhältnismässig gleiche Werte, während der A -Wert schon stark bei 15–20° sinkt.

6. Tötungstemperatur der Katalase (O-Hefe)

Hierfür wurde eine ungereinigte Probe (V) verwendet. Die Autolysat wurde mit m/30 Phosphatlösung von pH 6.4 auf das 50 fache verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde in Probierröhren mit Stopfen verteilt und eine Stunde lang auf verschiedenen Temperaturen gehalten. Nach der Erhitzung wurde 1 ccm von der Lösung zur Reaktion angewandt, welche ebenfalls bei pH 6.4 20 Minuten lang dauerte. Gleichzeitig wurde eine Katalyse mit einer ebenso grossen Menge der nicht erhitzten Enzymlösung ausgeführt. Die Resultat war wie folgt:

TABELLE XIVa

1 ccm Probe (V) in 20 ccm n/20 H_2O_2 reagierender Mischung
von pH 6.4, 20 Minuten bei 20°, $A=20.0$ ccm n/20 $KMnO_4$

Erhitzungs Temp.	Nicht erhitzt	30°	40°	45°	50°	55°	60°
$A-x$	8.6	8.75	10.9	13.1	16.0	19.9	20.0
$k \cdot 10^3$	18.327	17.951	13.180	9.188	4.846	0.109	0
Rel. k	100	97.95	71.92	50.13	26.44	0.59	0

Eine andere Erhitzung wurde bei pH 6.8, bei welcher die Präparate

gegen Hitze am beständigsten sind, vorgenommen und die weitere Katalyse wie oben ausgeführt.

TABELLE XIVb

1 ccm Probe (V) in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung
von pH 6.8, 20 Minuten bei 20°, A=20.0 n/20 KMnO₄

Erhitzungs Temp.	Nicht erhitzt	30°	40°	45°	50°	55°	60°
A-x.....	8.9	9.0	11.3	13.4	16.2	19.9	20.0
k.10 ³	17.582	17.340	12.398	8.697	4.576	0.109	0
Rel. k....	100	98.62	70.52	49.47	26.03	0.62	0

Die Werte der relativen Reaktionsgeschwindigkeiten sind in Abb. 8 mit den entsprechenden Erhitzungstemperaturen graphisch dargestellt. Es gibt keine wesentliche Unterschiede zwischen den Resultaten der beiden Versuche, obgleich das Präparat einmal bei pH 6.4 und das andersmal bei pH 6.8 erhitzt wurde.

Aus Abb. 8 geht durch Interpolierung hervor, dass die Tötungstemperatur der Oberhefe-katalase bei etwa 45° liegt. Bei einstündiger Erhitzung auf etwa 60° verliert das Enzym seine Wirkung fast vollständig.

7. Abhängigkeit des Inaktivierungskoeffizienten von der Temperatur

Aus dem Ergebnis des oben angegebenen Versuchs (Tabelle XIV-a) wurden die Inaktivierungskoeffizienten *ke* wie oben berechnet. In der folgenden Tabelle ist *ke*, entsprechend der Katalyse durch

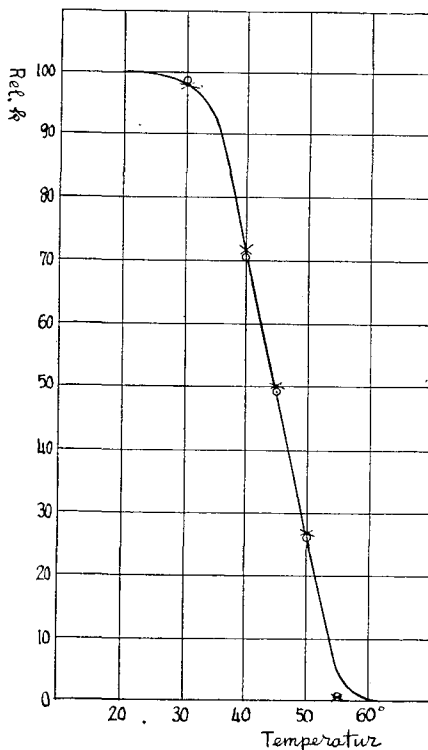


Abb. 8. x = a
o = b

Enzymlösung, welche eine Stunde lang auf 50° erhitzt war mit 100 bezeichnet.

TABELLE XV

Temperatur	$l. 10^3$	$lc. 10^3$	Rel. $lc.$
Nicht erhitzt	18.327		
30°	17.951	0.15	0.40
35	13.180	2.39	6.44
40	9.188	5.00	13.48
45	4.846	9.63	25.96
50	0.109	37.09	100

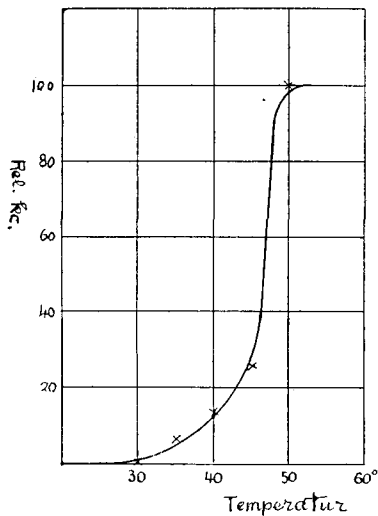


Abb. 9.

Phosphatlösung von pH 6.4 auf das 50 fache verdünnt) verschieden lange auf 45° gehalten. Nach der Erhitzung wurden die Lösungen auf H₂O₂-Spaltung nach obiger Methode geprüft. Die Inaktivierungskonstanten sind nach der angegebenen Formel berechnet. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse:

Die Werte der relativen Inaktivierungskoeffizienten sind in Abb. 9 mit den entsprechenden Erhitzungstemperaturen graphisch dargestellt. Aus Abb. 9 geht hervor, dass die Inaktivierung der Oberhefekatalaselösung nach einer einstündigen Erhitzung auf 35° schon bemerkbar ist. Von 40° an vollzieht sie sich sehr schnell.

8. Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der Katalase (O-Hefe)

Im Probierröhren mit Stopfen wurden je 10 ccm von der Enzymlösung (V, Autolysat wurde mit m/30

TABELLE XVIa

1 ccm Probe in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung von
pH 6.4, 20 Minuten bei 20°, A=20.1 ccm n/20 KMnO₄

Erhitzungsdauer auf 45°, in Min.	A-x	k. 10 ³	Rel. k	kc. 10 ³
Nicht erhitzt	7.4	21.699	100.00	
30	8.8	17.936	82.66	2.76
60	10.2	14.730	67.88	2.80
90	11.7	11.751	54.15	2.96
120	13.5	8.644	39.84	3.33

Dass die Inaktivierung der Enzyme bei höherer Temperatur nach der monomolekularen Formel verläuft, wurde bei meinen Versuchen bei Malzkatalase (l. c.) und auch bei Unterhefekatalase nicht bestätigt, während bei der Oberhefekatalase, wie aus obiger Tabelle ersichtlich, die kc. im Verlauf von 90 Minuten sehr angenährte Werte zeigte. Deshalb habe ich noch einen zweiten Versuch angestellt. Dieselbe Enzymlösung wurde diesmal auf das 100 fache verdünnt, sonst wurde die Erhitzung sowie die Katalyse unter den gleichen Bedingungen wie immer ausgeführt. Die Resultate sind in Tabelle XVIb angegeben.

TABELLE XVIb

1 ccm Probe in 20 ccm n/20 H₂O₂ reagierender Mischung von
pH 6.4, 20 Minuten bei 20°, A=19.7 ccm n/20 KMnO₄

Erhitzungsdauer auf 45°, in Min.	A-x	k. 10 ³	Rel. k	kc. 10 ³
Nicht erhitzt	8.6	17.999	100.00	
30	10.9	12.852	71.40	4.88
60	12.6	9.705	53.92	4.47
90	14.1	7.263	40.35	4.38
120	15.1	5.775	32.09	4.11

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, dass zwar die kc-Werte mit steigender Erhitzungsdauer sinken, aber nicht in so hohem Grade wie bei der Unterhefekatalase.

Aus diesen Versuchen wäre zu schliessen, dass die gesetzmässige Inaktivierung der Fermente während der Erhitzung, gewissermassen von der jeweiligen Enzymkonzentration abhängt.

Ob der Inaktivierungszustand eine Eigentümlichkeit eines Enzyms ist, das zu entscheiden erfordert noch weitere Versuche.

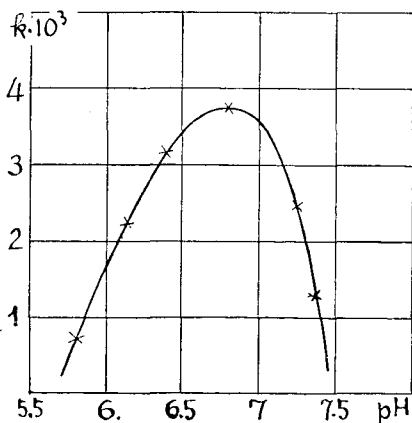
9. Einfluss der Azidität auf die Temperaturempfindlichkeit der Katalase (O-Hefe)

Je 15 ccm der Probe (II, pH 7.4) wurden mit verschiedenen Mengen von $n/10$ HCl auf verschiedene, gewünschte pH gebracht, mit Wasser auf gleiche Volumen (15 ccm) aufgefüllt und in Probierröhren mit Stopfen 60 Minuten lang im Wasserbade auf 40° erhitzt. Nach der Erhitzung wurden die pH von jeder Lösung bestimmt. 5 ccm von der erhitzten Probe wurden alsdann mit den nötigen Mengen von Säuren bzw. Alkali auf das pH von 6.4 eingestellt, mit 5 ccm Phosphatpuffer von 6.4 versetzt und zur Katalyse verwendet. Die Ergebnisse sind in folgende Tabelle niedergelegt, und in Abb. 10 graphisch dargestellt.

TABELLE XVII

5 ccm Probe in 20 ccm $n/20$ H_2O_2 reagierender Mischung von pH 6.4, 20 Minuten bei 20° , $A=19.9$ ccm $n/20$ $KMnO_4$

pH während der Erhitzung	5.8	6.15	6.4	6.8	7.25	7.4
$A-x$	19.25	17.95	17.20	16.75	17.75	18.85
$k \cdot 10^3$	0.72	2.24	3.17	3.74	2.48	1.18



Aus Tabelle XVII und Abb. 10 ist die Abhängigkeit der Temperaturempfindlichkeit der Oberhefekatalase von der Azidität ersichtlich. Die grösste Stabilität liegt bei dem pH etwa 6.8. Sie ist auch nach der alkalischen Seite verschoben gegenüber der optimalen H-Ionenkonzentration der Wirksamkeit.

Abb. 10.

10. Einfluss der Enzymkonzentration auf die Inaktivierungskonstante der Hefekatalase aus O-Hefe

Probe (V) (Autolysat mit m/30 Phosphat von pH 6.4 auf das 50 fache verdünnt) wurde mit dem m/30 Phosphatgemisch vom pH 6.4 in verschiedenen Proportionen verdünnt und 1 Stunden lang auf 45° erhitzt. 1 cem der nicht erhitzten Enzymlösung, und entsprechenden Mengen der erhitzten Proben wurden nach dem Abkühlen zur H₂O₂-Spaltung verwendet.

TABELLE XVIII

In 20 cem n/20 H₂O₂ reagierender Mischung von pH 6.4, 20 Minuten bei 20°, A=19.55 cem n/20 KMnO₄

Verdünnung des Enzyms während der Erhitzung	Nicht erhitzt	Erhitzt				
	1:0	1:0	1:1	1:4	1:7	1:9
Probe cem	1.0	1.0	2.0	5.0	8.0	10.0
m/15 Phosphatpuffer (6.4)	4.5	4.5	4.0	2.5	1.0	0
H ₂ O ₂ und Wasser auf 20 cem						
A-x	11.35	15.0	15.05	15.3	15.35	15.55
k. 10 ³	11.81	5.75	5.68	5.32	5.25	4.97
Rel. k	100	48.69	48.09	45.05	44.45	42.08
kc. 10 ³		5.21	5.30	5.77	5.87	6.27

Eine Zunahme der Temperaturempfindlichkeit bei sinkender Enzymkonzentration ist aus der Tabelle auch bei Oberhefekatalase bemerkbar, aber in sehr geringem Masse. Mithin hat die Enzymkonzentration in den untersuchten Grenzen nicht so grossen Einfluss auf die Hitzeinaktivierung der Oberhefekatalase wie bei der Unterhefekatalase.

C. Zusammenfassende Beschreibung der Versuche über allgemeine Wirkungsweise der Unter- und Oberhefekatalasen

Zusammenfassend kann über die Ergebnisse der obigen Versuche folgendes gesagt werden:

- 1) Bei dem Versuch über den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Katalasewirkung in n/20 H₂O₂-Lösung bei 20° wurde bei der Unterhefe das Optimum bei pH=6.5 bis 6.8, bei der Oberhefe bei pH=6.2 bis 6.4 festgestellt.

- 2) Bei beiden Hefekatalasen zeigten die monomolekulare Reaktionskonstanten bei gleichen Reaktionszeiten eine sehr gute Proportionalität mit den Enzymmengen.
- 3) Die optimale Temperatur der Unterhefekatalasewirkung bei 20 Minuten Wirkungszeit in $n/20$ H_2O_2 -Lösung vom pH 6.6 liegt bei etwa 15° , während die bei Oberhefekatalase, bei pH 6.4 unter sonst gleichen Bedingungen bei $20-24^\circ$ liegt. (Reaktionszeiten von 20 und 30 Minuten) Hier war die Veränderung der Optima nach der Reaktionszeit deutlich bemerkbar.
- 4) Die Werte des Temperaturkoeffizienten k_{t+5}/k_t und A der Arrheniusschen Temperaturformel bei Versuchen mit Unterhefekatalase sind zwischen nur 0° und 10° annähernd konstant. Bei Versuchen mit Oberhefekatalase zeigten k_2/k_1 zwischen 0° bis 20° verhältnismässig konstante Werte, jedoch sinken die A -Werte schon bei $15-20^\circ$ ziemlich stark. In weiteren Grenzen unter den angegebenen Bedingungen gilt die Temperaturformel für die Hefekatalasen nicht. (Die Formel gilt nur in gewissen Temperaturgebieten von niederer bis zur optimalen Temperatur.)
- 5) Die Tötungstemperaturen beider Hefekatalasen liegen bei etwa 45° .
- 6) Die Inaktivierung beider Hefekatalasen nach einstündiger Erhitzung auf $35-40^\circ$ ist schon deutlich sichtbar. Nach einstündiger Erhitzung auf $58-60^\circ$ ist die Aktivität nahezu auf Null gesunken.
- 7) Die Inaktivierung der Unterhefekatalase verläuft nicht nach der monomolekularen Reaktion. Bei den Versuchen mit Oberhefekatalase zeigte der kc -Wert ein schwächeres Absinken als bei Unterhefekatalase.
- 8) Die Temperaturempfindlichkeit der Hefekatalasen zeigten starke Abhängigkeit von der Azidität. Das Maximum der Stabilität gegen Erhitzung wurde bei Unterhefekatalase beim pH 7.0 und bei Oberhefekatalase beim pH 6.8 gefunden. Bei beiden sind sie etwas nach der alkalischen Seite verschoben gegenüber der "Azidität der grössten Wirksamkeit."
- 9) Die Temperaturempfindlichkeit der beiden Hefekatalasen nimmt bei sinkender Enzymkonzentration zu, bei der Unterhefekatalase mehr als bei der Oberhefekatalase.

Die meisten Katalasepräparate sind sehr unbeständig, was auch für das Hefekatalasepräparat gilt; dadurch wird es schwer, in manchen Versuchen ganz einwandfreie Resultate zu erhalten. Die

Eigenschaft, welche als Charakteristikum eines Enzymes gilt, wird oft beeinflusst durch die Art und Menge der Begleitstoffe im Präparat. Bei meinen Versuchen mit Unterhefekatalase zeigten sich auch verschiedene pH-Optima zwischen dem reineren und dem ungereinigten Autolysat.

Die verschiedenen Reaktionszeiten und das Verhältnis der jeweiligen Mengen von H_2O_2 zum Enzym zeigten sich unter sonst gleichen Bedingungen auch die verschiedenen Temperatur-Optima für ein dasselbe Enzympräparat.

Die oben beschriebenen anderen Eigenschaften, wie die Inaktivierungskonstanten, ihre Beziehung zu der Zeit bzw. zur Enzymkonzentration, sollten auch verschiedene Resultate je nach der Konzentration der angewandten Präparate zeigen. Aus diesen Grunde ist es trotz meiner ausführlichen Versuche schwer zu sagen, ob ein prinzipieller Unterschied zwischen den beiden Hefekatalasen besteht.

III. Einfluss der Lüftung während der Züchtung auf die Katalase der untergärigen Hefe

Alle Lebewesen können sich innerhalb bestimmter Grenzen an ungewohnte Lebensbedingungen anpassen. Ueber die Anpassungserscheinungen der Hefe und Pilze an Nährlösungen sind seit langem von verschiedenen Forschern, wie Wortman, Effront, Fernbach, Duclaux, Dubourg, Hansen, Boselli, Klöcker, Bau, Armstrong u. s. w., Untersuchungen angestellt worden, aber diese haben nicht immer zu einem übereinstimmenden Resultat geführt.¹⁴⁾ Die von Dienert¹⁵⁾ und nachher von Slator¹⁶⁾ gefundene Tatsache, dass Hefe an die Vergärung von Galaktose gewöhnt werden könne, ist von Harden und Norris¹⁷⁾ bestätigt worden. Er hat *Saccharomyces Carlsberg I* an Galaktose aklimatisiert und fand, dass der aus solcher Hefe gewonnene Presssaft ebenfalls die Fähigkeit besitzt, die Galaktose zu vergären. Dieser Versuch ist der einzige, welcher die qualitative Veränderung des Enzymsystems der Hefe durch fremde Zuckerarten bewiesen hat, aber die Anreicherung solcher Enzyme, welche im normalen Zustand der Hefe enthalten sind, ist nicht selten bestätigt worden.

Beispielsweise haben Euler und af Uglas¹⁸⁾ und nachher Johanson, Meyer und Cramér¹⁹⁾ eingehend der Einfluss von Rohrzucker auf die Invertasebildung der Hefe untersucht. Nach letztgenannten Autoren tritt durch Vorbehandlung der Hefe mit Rohrzucker enthaltender Nährlösung eine starke Anreicherung an Invertase ein. Neuerd-

ings haben F. Hayduck und H. Haehn²⁰⁾ über die Zymasebildung der Hefe Versuche angestellt, wobei es gelang eine zymasearme Torulahefe durch Lufthunger in eine sehr zymasereiche Hefe umzuwandeln. Dabei hatten sie zugleich die Zurückdrängung der Katalasebildung der Hefe mit steigender Zymasebildung gezeigt und für die Lehre Pasteurs eine neue Stütze gegeben, dass die Gärung gewissermassen einen Ersatz für die Atmung der Hefe bildet. Sie behaupten: „Man muss in der Lage sein, durch Zurückdrängung der Atmung die Gärung, also den Zymasegehalt der Hefe zu steigern“ was ihnen mit einer Torulahefe gelungen ist. Was der Einfluss des Sauerstoffs auf die Hefe anbetrifft, so behaupten Gilty und Aberson,²¹⁾ dass eine reichliche Zufuhr von Sauerstoff den Zuckerverbrauch der Hefe steigert. Chudiakow²²⁾ fand einen hemmenden, Brown²³⁾ und van Laer²⁴⁾ einen fördernden Einfluss des Sauerstoffs auf die alkoholische Gärung, während Iwanowsky²⁵⁾ keinen Einfluss des Sauerstoffzutritts auf die Zuckerspaltung durch Hefe feststellte. Bei der Nachprüfung des Chudiakowschen Ergebnis hat Buchner²⁶⁾ behauptet, dass die reichliche Sauerstoffzufuhr für die Zymasebildung vermutlich indifferent zu sein scheint. F. Henmi und K. Tsukiashi²⁷⁾ haben neuerdings den hemmenden Einfluss von Luftzufuhr auf die Gärkraft von *Saccharomyces Sake* konstatiert.

Die Existenz der Katalase muss sicher ein wichtiges Moment für den physiologischen Zustand der Hefe sein und die Klärung der Verhältnisse dürfte vermutlich auch ein interessantes und umfassendes Forschungsgebiet ergeben. Bezüglich dieses Kapitels ist die vorliegende Arbeit nur ein vorläufiger Teil der Versuche, die bei späterer Gelegenheit ausführlich durchgeführt werden sollen. Der oben zitierte Einfluss von Sauerstoff auf die Gärung wurde nur in der Verlaufszeit einer Gärdauer geprüft. Ich habe aber im Gegensatz zu den Versuchen von Hayduck und Haehn wiederholt unter reichlicher Luftzufuhr dieselbe Bierhefe gezüchtet. Mit der geernteten Hefe wurde der Katalasegehalt und zugleich die Gärtätigkeit bestimmt und weiter habe ich der Eigenschaft der Katalase zweier Hefen, die eine gelüftet, die andere nicht, verglichen.

Als Gärtätigkeit der Hefe wurden Triebkraft und Gärkraft bestimmt. Man versteht unter „Triebkraft“ die CO_2 -Menge, die durch verhältnismässig grössere Mengen von Hefe und Zucker bei kurzer Gärdauer entwickelt wird. Ich habe die Triebkraftbestimmung nach der Hayducksche Methode,²⁸⁾ aber zweckmässig nur mit

kleineren Mengen von Hefe, wie folgt ausgeführt: 50 ccm 20%ige Rohrzuckerlösung werden in einer Gärflasche im Wasserbade auf 30° temperiert und dann mit 2.5 g abgepresster Hefe, in einer kleinen Menge Brunnenwasser von ebenfalls 30° verrührt, quantitativ versetzt. (50 ccm Wasser). Die Bestimmung wurde also auf 1/4 des Masses der Hayduckschen Methode ausgeführt. Nach ordentlichen Verschluss der Apparate las ich die entwickelte CO₂ Menge in der ersten, zweiten, dritten halben Stunde ab. Die angegebene Triebkraft dient nur zum Vergleich der Resultate in der vorliegenden Arbeit.

Die Gärkraft der Hefe wurde in Erlenmeyerkölbchen mit Meisslschem Ventil bestimmt. Ich verwendete 1 g gepresste Hefe und 40 ccm 10%ige Rohrzuckerlösung und bestimmte die innerhalb von 24 Stunden bei 30° entwickelte CO₂-Menge. Die Gärkraft und Triebkraft wurden durch direkt bestimmte Zahlen, ohne Umrechnung auf Wassergehalt, angegeben. Die H₂O₂-Spaltung wurde wie vorher, aber in 20 ccm n/10 H₂O₂-Lösung mit 5 ccm m/15 sekundärer Phosphatlösung 20 und 30 Minuten bei 20° ausgeführt und das zurückgebliebene H₂O₂ mit n/10 KMnO₄-Lösung titriert. Als Probe kamen 2 ccm 1%ige gepresste Hefeaufschlammung (0.02 g gepresste Hefe) zur Verwendung. Die katalytische Fähigkeit der Hefe bezeichnete ich nach den Vorschläge von Euler und Josephson²⁹⁾ durch den Quotienten aus der Reaktionskonstante (monomolekulare *k* bei 30 Minuten) der H₂O₂-Spaltung und der angewandten Hefemenge (Trockensubstanz) und zwar habe ich mit Kat.-f10² angegeben.

Als Anstellhefe diente die aus unserer Brauerei bezogene Bierhefe, welche gut gewaschen und etwa 2 Wochen in gekühltem Wasser gelagert wurde. Die Züchtung erfolgte unter Luftzufuhr in 2 l Kolben mit Watteverschluss, mit eingestecktem Glassrohr zur Luftzufuhr. Je 1 l Würze von 13° Balling, welche in unserer Brauerei bereitet worden war, wurde mit 2 g abgepresster Hefe geimpft und während der ganzen Gärdauer gelüftet. Die einmalige Züchtung dauerte 2-3 Tage. Nach beendeter Züchtung wurde die Hefe geerntet und mit Kühlwasser gut gewaschen; ein Teil davon wurde wieder als Impfmateriel zur nächsten Züchtung benutzt. Die Ernte betrug etwa 30 g aus 2 g Aussaathefe. Zum Vergleich wurden die Gärtätigkeit und Katalasewirkung der Anstellhefe, ferner einer unreifen Hefe, welche der normalen Gärung (ohne starke Luftzufuhr) nach etwa 25 Stunden nach dem Anstellen entnommen wurde und der Hefe der beendeten Gärung angegeben. Die beobachteten Ergebnisse

sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

TABELLE XIX

	Bezeichnung der Hefe	Wassergehalt	Gärkraft	Triebkraft, entwickelte CO ₂ Menge in ccm in den halben Stunden			Katalasewirkung			Kat. f. 10 ²
				I	II	III	A	A-x bei Zeit (m.)		
								20	30	
Normale Hefe	Anstellhefe	73.30	1.407	23.2	69.5	94.2	20.1	17.0	15.9	63.55
	Unreife Hefe (25 std)	73.80	1.589	121.2	186.7	186.5	20.0	16.9	15.8	65.12
	„ (andere Probe)						19.8	17.1	16.0	
	Fertige Hefe	73.29	1.6365	22.0	65.7	93.5	20.0	17.2	16.1	58.78
Durch Lüftung gezüchtete Hefe	I	73.80	1.462	20.0	63.0	65.8	20.0	16.0	14.6	86.95
	II	74.56	1.462	14.0	58.4	70.4	19.9	16.1	14.7	86.17
	III	74.02	1.458	10.8	30.5	58.0	19.9	16.0	14.6	86.28
	IV	71.89	1.558	9.0	15.8	13.6	19.8	16.0	14.8	74.95
	V	72.45	1.354	13.4	31.4	53.1	19.8	16.1	15.1	71.20
	VI	72.14	1.497	9.4	36.7	62.1	19.9	16.2	14.85	76.05
	VII	71.68	1.4885	11.6	41.7	56.1	19.8	16.3	14.9	72.67
	VIII	72.62	1.4210	9.5	38.1	45.7	19.8	16.25	14.9	75.16

TABELLE XX

0.5 ccm Autolysat in n/10 H₂O₂ reagierendere Mischung von pH 6.6, bei 20°

Bezeichnung der Hefe	A	A-x bei Zeit (m)		k. 10 ² bei 30'	k. 10 ² umgerechnet auf 1 g. gepress. Hefe
		20	30		
Gelüfte Hefe	19.9	6.15	3.85	2.38	95.2
Normal Hefe	20.2	17.60	16.7	0.28	11.2

Wie aus der Tabelle XIX ersichtlich ist, wies die Hefe bei normaler Züchtung kurz nach Angärung starke Anreicherung der Zymase (Triebkraft der unreife Hefe) auf. Dies ist auch eine schon längst bekannte Tatsache³⁰⁾. Zubemerken ist, dass die Hefe in diesem Zustand stärkster Gärung fast dieselbe Menge Katalase enthält wie die Anstellhefe.

Bei achtmaliger Wiederholung der Lüftungszüchtung sieht man

nicht immer eine regelmässig, aber eine deutliche Zurückdrängung der Zymasebildung, also der Triebkraft. Es ist auch bemerkenswert, dass die Hefe mit schwacher Triebkraft immer noch eine grosse Gärkraft besitzt, etwas grösser als die Anstellhefe. In bezug auf Gärkraft (CO_2 =Entwickelungskraft unter den angegebenen Bedingungen) ist die Hefe also durch Luftzufuhr keineswegs beschädigt worden.

In Anpassung an die reichliche Luftzufuhr steigerte die gezüchtete Bierhefe wirklich den Katalasegehalt, aber nicht in starkem Masse. Der Katalasegehalt der gelüfteten Hefe ist schon durch nur einmalige Züchtung maximal erreicht und die nachfolgende Wiederholung der Luftzüchtung, in den angeführten Grenzen, hatten keinen fördernde Einfluss mehr auf die Katalasebildung.

Ausser in den lebenden Zellen wurde der Katalasegehalt im Autolysat bestimmt. Zu 5 g abgepresster Hefe in Erlenmeyerkolbchen mit Stopfen wurden 5 ccm Toluol zugesetzt und 3 Stunden lang auf 40° gehalten, dann wurden 50 ccm Wasser zugegossen und weitere 2 Stunden bei 20° gehalten. Nach den angegebenen Zeiten wurde der Inhalt in 100 ccm Messkolben eingespült und mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Das einmal durch Papier filtrierte Autolysat wurde als Probe benutzt. Ob das so erhaltene Autolysat die maximale Katalasemenge aufweist, prüfte ich nicht; ich habe die Bereitung unter möglichst gleichen Bedingungen ausgeführt, um ein vergleichbares Resultat zu erhalten. Die Autolysate von der 8 mal unter Lüftung gezüchteten Hefe und der aus dem Betriebe ausgezogenen normalen Hefe wurden verglichen. Die pH der Autolysate waren 6.1 (gelüftet) und 6.2 (normal). Die Katalasewirkung der Autolysate sind in Tabelle XX zusammengesetzt.

In der Tabelle XX wurde k. 10^2 auf 1 g gepresster Hefe umgerechnet (0.5 ccm Autolysat entspricht 0.025 g gepresster Hefe), welche in der letzten Spalte der Tabelle angegeben wurde. Bei diesem Versuch zeigte das Autolysat der gelüfteten Hefe etwa eine neunmal so starke Wirkung der Katalase als das Autolysat der normalen Hefe.

Aber bei anderen Versuchen habe ich ein umgekehrtes Resultat gefunden. Die Katalasewirkung der lebenden Zellen ist also nicht immer parallel der der Autolysate. Es ist vermutlich so, dass die in der Zelle frei vorhandene und die an Protoplasma gebundene Katalase je nach dem Zustand der Zelle in verschiedenen Mengen vorhanden sind. Der Unterschied wird wahrscheinlich auch durch

die verschieden starke Proteasewirkung der verschiedenen Hefen während der Autolyse bedingt, wodurch verschiedene Mengen Katalase in Freiheit gesetzt werden.

Zur weiteren Prüfung der Eigenschaften der Katalase wurde ein Präparat aus Autolysat durch Alkoholzusatz gefällt. Die Autolyse wurde gleich wie bei den vorausgegangenen Versuchen ausgeführt. Nach 3 stündiger Autolyse bei 40° wurde nach Wasserzusatz genau 20 Stunden lang bei Zimmertemperatur gehalten und durch Kieselerde abfiltriert. Zum Autolysat wurde so viel Alkohol zugesetzt, dass die Mischung 50 Volumenprozent Alkohol enthält, dann sogleich zentrifugiert, mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure 24 Stunden lang getrocknet. Hierzu wurden auch die bei obigem Versuch angewandten beiden Hefen genommen und unter möglichst gleichen Bedingungen präpariert. Mit den so erhaltenen beiden Präparaten, welche also als Begleitstoffe die in den Zellen im natürlichen Zustand vorhandenen Substanzen enthält, wurden die optimalen pH in $n/10$ H_2O_2 bestimmt, weil früher mit Unter- und Oberhefe eine verschiedene pH zwischen den beiden gefunden wurde.

Die Resultate sind in Tabelle XXIa und XXIb zusammengesetzt.

TABELLE XXIa

1 ccm 0.2%iger Enzymlösung (gelüfte) in 20 ccm
 $n/10$ H_2O_2 reagierender Mischung, 20' bei 20°,
 $A=19.75$ ccm $n/10$ $KMnO_4$

pH:	5.2	5.6	6.05	6.5	6.9	7.3	7.7
$A-x$	11.95	11.85	11.575	11.55	11.55	11.9	12.325
$k \cdot 10^8$	10.910	11.093	11.603	11.650	11.650	11.001	10.239

TABELLE XXIb

2 ccm 0.12%iger Enzymlösung (normale) in 20 ccm
 $n/10$ H_2O_2 reagierender Mischung, 20' bei 20°,
 $A=20.0$ ccm $n/10$ $KMnO_2$

pH:	5.3	5.7	6.1	6.5	6.9	7.4	7.75
$A-x$	13.125	12.9	12.625	12.45	12.55	12.85	13.225
$k \cdot 10^8$	9.147	9.522	9.990	10.293	10.120	9.607	8.982

Die beiden Resultate sind in Abb. 11 graphisch dargestellt. Aus obigen Tabellen sowie Abb. 11 geht hervor, dass das Optimum der Wirkung der beiden Präparate bei etwa pH 6.5 liegt und es keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden gibt.

Was die Beziehung des Zymase- und Katalasegehaltes der Zelle anbetrifft, so habe ich ausser den oben mitgeteilten Resultaten auch oft verwickelte Ergebnisse gefunden. Die Ursache hiervon ist wahrscheinlich in dem jeweiligen physiologischen Zustand der Zelle zu suchen und eine vollständige Klärung scheint nicht so einfach zu sein. Immerhin dienen die mitgeteilten Resultate als Grundlage für weitere Arbeiten.

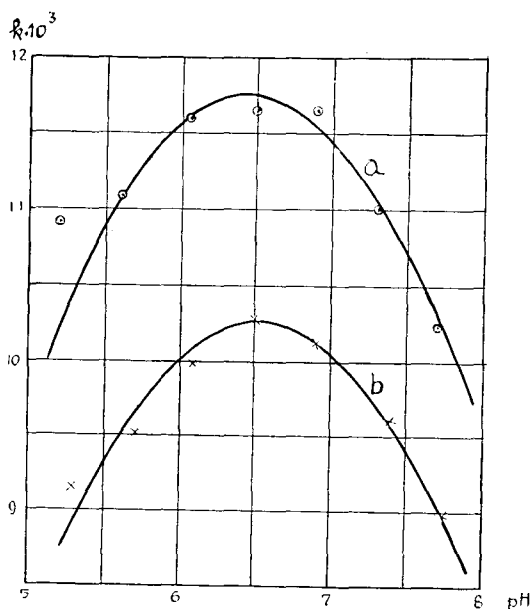


Abb. 11.

IV. Untersuchungen über die Kinetik der Inaktivierung der Katalase selbst durch H_2O_2 während der Reaktion.

A) Theoretischer Teil.

Die Katalasereaktion wird auf verschiedene Weise je nach den Bedingungen inaktiviert, weshalb man bei der Charakteristik der Eigenschaften ganz verschiedene Resultate findet. Als auffallendes Beispiel diene der Hinweis, dass ich ein viel niedrigeres Temperaturoptimum der Katalase gefunden habe als Issajew. Im Verlauf meiner vorausgegangenen Versuche kam ich zu dem Schluss, dass man bei der Charakterisierung der Eigenschaften einer Katalase besondere Rücksicht auf die Inaktivierungserscheinungen nehmen muss. so habe ich meine vorliegende Arbeit nach obigem Titel erweitert.

Seit langem ist bekannt, dass die Wasserstoffsperoxydspaltung durch die Katalase nur unter gewissen Bedingungen nach dem Typus einer monomolekularen Reaktion gemäss der Formel $\frac{dx}{dt} = k(A-x)$ verläuft. Unter anderen Bedingungen reagiert die Katalase nach einem anderen Reaktionsgesetz. Morgulis³¹⁾ hat Reaktionen angestellt, welche nach dem Gesetz 2. Ordnung gemäss der Formel: $\frac{dx}{dt} = C(A-x)(B-x)$ oder nach dem Gesetz 1 $\frac{1}{2}$ Molekularreaktion nach der Formel $\frac{dx}{dt} = C(A-x)^{3/2}$ verlaufen. Wenn auch die Aufstellung einer Theorie der Katalasewirkung sowie die Festlegung der Gesetze der Inaktivierung der Katalase selbst nicht möglich sind³²⁾, so sprechen die hiesigen Untersuchungen dafür, dass bei der Katalasereaktion das Verschwinden zweier Substanzen stattfindet: des H_2O_2 und der Katalase. Auf dieser Grundlage kommt E. Yamazaki³³⁾ zu den Ausdruck: $-\frac{dE}{dt} = K$, $-\frac{dC}{dt} = kEC$, wobei mit E die Konzentration des Fermentes, mit C die des H_2O_2 und mit K und k die Konstanten der Reaktion bezeichnet werden. Als Ergebnis der Integration erhält er: $\log \frac{C_0}{C} - \log \frac{C_0 + a}{C + a} = k'at$, wo C_0 die Anfangskonzentration des H_2O_2 , C die Konzentration des H_2O_2 in dem Zeitraume t , $k' = kK$ ist und a die Integrationskonstanten bezeichnet. Aus gleichem Grunde schlägt Maximowitsch und Awtonomowa (l. c.) für die zwei Prozesse folgendes Gleichungssystem vor: $\frac{dx}{dt} = C(A-x)(B-y)$, $\frac{dy}{dt} = C_1(A-x)(B-y)$, wobei mit A die Initialmenge von H_2O_2 , mit B die Initialmenge der Katalase, mit x die Quantität des in Zeitraum t gespaltenen H_2O_2 , mit y die Quantität der in denselben Zeiten gespaltenen Katalase ausgedrückt wird. Aus den zwei Gleichungen erhält man die Formel $C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{AE - B} \log \frac{B(A-x)}{A(B - Ex)}$, welche den Gesamtausdruck des komplizierten Prozesses der Zusammenarbeit der Katalase und des H_2O_2 in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen bezeichnet.

Durch diese Arbeit hatten wir die sehr klare Kenntnis über das Wesen der Katalasewirkung bekommen, dass bei der Katalasewirkung zwei gleichzeitige, voneinander unabhängige Prozesse verlaufen, und zwar ein fermentativer, die durch Katalase bedingte H_2O_2 -Spaltung und ein anderer, die Reaktion der Inaktivierung der Katalase selbst

durch H_2O_2 . Es wurde auch einwandfrei gezeigt, dass der fermentative Prozess der H_2O_2 -Spaltung durch Katalase dem Gesetz einer monomolekularen Reaktion folgt und der Grad der Abweichung von diesem Verlaufe von der Intensität der begleitenden Reaktion der Inaktivierung der Katalase durch Wasserstoffsperoxyd abhängt.

Von den oben beschriebenen Tatsachen ausgehend, habe ich eine ausführliche Untersuchung über den einen der zwei Prozesse der Katalasewirkung, den bis heute noch nicht viel diskutierten Prozess, der Zersetzung der Katalase selbst durch H_2O_2 , unternommen. Die ganze Idee meiner vorliegenden Bearbeitung stammt aus der wertvollen Untersuchung von Maximowitsch und Awtonomowa (1. c.), woraus ich die Gleichung in ganz analoger Weise abgeleitet habe. Es wurden die oben erwähnten zwei Prozesse, gemäss Maximowitsch's und Awtonomowa's Vorschlag, mit folgenden zwei Gleichungen bezeichnet:

$$\frac{dx}{dt} = C(A-x)(B-y), \quad \frac{dy}{dt} = C_1(A-x)(B-y),$$

wobei mit A die Initialmenge von H_2O_2 , mit B die Initialmenge der Katalase, mit x die Quantität des in Zeitraum t gespaltenen H_2O_2 , mit y die Quantität der in denselben Zeiten zerstörten Katalase ausgedrückt wird. Die erstere Gleichung drückt die Geschwindigkeit der fermentativen Wirkung, der H_2O_2 -Spaltung durch die Katalase mit dem Proportionalkoeffizienten C aus und die zweite Gleichung bezeichnet die Geschwindigkeit der durch H_2O_2 hervorgerufenen Katalasezerstörung, wobei der Proportionalkoeffizient durch C_1 ausgedrückt ist. Wenn die zwei Koeffizienten C und C_1 Konstanten sind, muss die Forderung, dass das Verhältnis zwischen ihnen, $\frac{dx}{dy} = \frac{C}{C_1} = E$, eine Konstante darstellen. Differential: $dx = E dy$, Integral: $x = Ey + K$ wenn $y=0$ ist, auch $x=0$, folglich ist $K=0$ und $x = Ey$. Der erhaltene Ausdruck für x , in die zweite der oben angegebenen Gleichungen eingesetzt, gibt:

$$\frac{dy}{dt} = C_1(B-y)(A-Ey) = C_1 E (B-y) \left(\frac{A}{E} - y \right)$$

Wenn wir $\frac{A}{E} = G$ und $C_1 E = C$ bezeichnen, so erhalten wir aus der vorigen Gleichung:

$$\frac{dy}{dt} = C(B-y)(G-y)$$

Es muss hier bemerkt werden, dass der Proportional-Koeffizient C

zunehmend den Koeffizienten der Katalasespaltung bezeichnet. Die integrierten Gleichungen: $\frac{dy}{dt} = C(B-y)(G-y)$ wurden weiter umgewandelt wie folgt:

$$\text{wenn } t=0 \text{ dann } y=0 \text{ ist. } C \int_0^t dt = \int_0^y \frac{dy}{(B-y)(G-y)}$$

$$\text{Umwandlung von } \frac{dy}{(B-y)(G-y)} :$$

$$\frac{1}{(B-y)(G-y)} = \frac{\alpha}{B-y} + \frac{\beta}{G-y} \quad 1 = \alpha(G-y) + \beta(B-y)$$

$$\text{Wenn } y=B \text{ dann } 1 = \alpha(G-B) \quad \therefore \alpha = \frac{1}{G-B} = \frac{-1}{B-G}$$

$$\text{wenn } y=G \text{ dann } 1 = \beta(B-G) \quad \therefore \beta = \frac{1}{B-G}$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{(B-y)(G-y)} &= \frac{\alpha}{B-y} + \frac{\beta}{G-y} = \frac{-1}{B-G} + \frac{1}{B-G} \\ &= \frac{1}{B-G} \left[\frac{-1}{B-y} + \frac{1}{G-y} \right] dy \end{aligned}$$

diese Beziehung wurde in die obigen Gleichungen eingesetzt

$$\begin{aligned} C_t &= \int_0^y \frac{1}{B-G} \left[\frac{-1}{B-y} + \frac{1}{G-y} \right] dy \\ &= \frac{1}{B-G} [\log(B-y) - \log(G-y) - \log B + \log G] \\ &= \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)} \\ \therefore \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)} &= C(B-G)t \end{aligned}$$

Also die integrierten Gleichung $\frac{dy}{dt} = C(B-y)(G-y)$ führt durch mathematische Bearbeitung zu:

$$\log \frac{G(B-y)}{B(G-y)} = C(B-G)t \quad \text{woher:}$$

$$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$$

Da die Initialmenge der Katalase B und die Quantität der im Zeit-

müssen auch $\frac{1}{t_2-t_1} \log \frac{A-x_1}{A-x_2}$ mit D proportional sein, Diese Beziehung soll, wie folgt, mathematisch nachgewiesen werden.

$$(1) \quad \frac{\log \frac{A}{A-x_2}}{D_1} = \frac{\log \frac{A'}{A'-x'_2}}{D_2}$$

$$(2) \quad \frac{\log \frac{A}{A-x_1}}{D_1} = \frac{\log \frac{A'}{A'-x'_1}}{D_2}$$

worauf (1)-(2) führt zu

$$\frac{\left(\log \frac{A}{A-x_2} \times \frac{A-x_1}{A} \right)}{D_1} = \frac{\log \left(\frac{A'}{A'-x'_2} \times \frac{A'-x'_1}{A'} \right)}{D_2}$$

$$\frac{\log \frac{A-x_1}{A-x_2}}{D_1} = \frac{\log \frac{A'-x'_1}{A'-x'_2}}{D_2}$$

oder $\frac{1}{t_2-t_1} \log \frac{A-x_1}{A-x_2} : \frac{1}{t_2-t_1} \log \frac{A'-x'_1}{A'-x'_2} = D_1 : D_2$

Also die Konstanten $\frac{1}{t_2-t_1} \log \frac{A-x_1}{A-x_2}$ sind auch mit den Enzymmengen proportional und in einem Reaktionssystem variieren sie mit den Enzymmengen, was aus folgendem Beispiel ersichtlich ist.

Nr.	Zeit (M)	$A-x$	$\frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$	$\frac{1}{t_2-t_1} \log \frac{A-x_1}{A-x_2}$
(1)	0	20.00	—	—
	10	17.80	0.00506	0.00506
	20	15.84	0.00506	0.00507
	30	14.10	0.00506	0.00505
(2)	0	20.00	—	—
	10	18.40	0.00362	0.00362
	20	17.90	0.00241	0.00120
	30	17.70	0.00177	0.00049
	40	17.60	0.00139	0.00025
	50	17.60	0.00110	0

Im Beispiel (1) wenn $\frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$ eine Konstant ist, zeigt $\frac{1}{t_2-t_1} \log \frac{A-x_1}{A-x_2}$ auch gleiche Werte. Im Beispiel (2) bei den Reaktionszeiten

40 und 50 Minuten verschwindet die Enzymwirkung ganz, doch hat $\frac{1}{t} \log \frac{A}{A-x}$ noch einen Wert, während $\frac{1}{t_2-t_1} \log \frac{A-x_1}{A-x_2}$ auch 0 zeigt. Also die letzteren Konstanten variieren in einem Reaktionssystem gerade proportional mit den Enzymmengen. Aus diesem Grunde habe ich die Enzymmengen bei verschiedenen Reaktionszeiten in ein System mit dem Wert $K = \frac{1}{t_2-t_1} \log \frac{A-x_1}{A-x_2}$ von entsprechender Zeit bezeichnet. (durch K unterscheidet sich von der eigentlichen monomolekularen Konstante k) In der Gleichung habe ich immer $t_2-t_1=10$ Minuten angenommen.

Nimmt man weiter die K -Werte mit den entsprechenden Zeiten in ein Coordinatensystem auf, so stellen die K -Werte eine Kurve dar. Im Falle, dass die Reaktion nach einem monomolekularen Gesetz verläuft, ist die K -Linie eine Gerade und zur Abszisse parallele Linie. In einem solchen Falle zeigt der K -Wert gleichfalls die relative Initialmenge der Katalase. Wenn die K -Linie eine Kurve ist, so erhält man durch Interpolierung den Punkt auf der Ordinate, an dem sie die Kurve schneidet, als relative Initialmenge der Katalase, nämlich den B -Wert. Aber wenn die Kurve zu steil in der Nähe der Ordinate oder wenn einige durch Experimente gefundene Werte nicht gut ausgefallen sind, so hat man Schwierigkeiten, um die richtige oder wahrscheinlichste Interpolierungs-Kurve abzuleiten und dadurch werden oft grosse Fehler verursacht. So habe ich in den meisten Fällen zuerst die empirische Formel, welche die K -Kurve darstellt, gesucht und nach der Formel die B -Werte für den Fall Zeit $t=0$ abgeleitet. Auf dieser Weise habe ich mich bemüht, den höchst wahrscheinlichen B -Wert abzuleiten. Genauer wird an späterer Stelle bei jedem Experiment erwähnt.

Nun werden die relativen Initialmengen der Katalase abgeleitet und die K -Werte zeigen die relativen Mengen vorhandener Katalase bei der verlaufenen Zeit t . Sodann werden die im Zeitraum t gespaltenen relativen Katalasemengen durch $B-K$ dargestellt; also im oben erwähnten Sinne ist $K=B-y$, $y=B-K$. Dieses quantitative Verhältnis von B und y zeigt natürlich nur eine relative Beziehung in einem Reaktionssystem der Katalasewirkung. Daher bekommt man mit derselben Menge der Katalase unter verschiedenen Bedingungen auch verschiedene Werte von B und y . Nimmt man z. B. eine solche Reaktion an, dass eine Katalase bei einem anderen pH als dem

optimalem ausgeführt und dass nach einer gewissen Reaktionszeit auf optimale Wasserstoffionenkonzentration eingestellt wurde, so steigt der K -Wert an und es scheint, dass eine Regenerierung der Katalase stattfindet. Aber in solchen Fällen müssen die gesteigerten K -Werte zusammen mit B' , welche unter neu angestellten Bedingungen abgeleitet werden mussten, harmonieren.

Nun kehren wir zu der oben angegebenen integrierten Gleichung $\log \frac{G(B-y)}{B(G-y)} = C(B-G)t$ zurück. In die Gleichung setze ich die Werte y , welche den zwei Momenten der Reaktion t_1 und t_2 entsprechen ein. Wir erhalten ein System zweier Gleichungen mit zwei Unbekannten G und C :

$$\log \frac{G(B-y_1)}{B(G-y_1)} = C(B-G)t_1$$

$$\log \frac{G(B-y_2)}{B(G-y_2)} = C(B-G)t_2$$

in welchem der Wert y steht, der den zwei Momenten t_1 und t_2 entspricht, bei $t_2=2t_1$ und durch Ausschaltung der Unbekannten C erhalten wir weiter

$$\frac{\log \frac{G(B-y_1)}{B(G-y_1)}}{\log \frac{G(B-y_2)}{B(G-y_2)}} = \frac{t_1}{t_2} = \frac{1}{2}$$

Weitere Umwandlung dieser Gleichung führt zu:

$$2 \log \frac{G(B-y_1)}{B(G-y_1)} = \log \frac{G(B-y_2)}{B(G-y_2)}$$

$$\log \frac{G^2(B-y_1)^2}{B^2(G-y_1)^2} = \log \frac{G(B-y_2)}{B(G-y_2)}$$

folglich
$$\frac{G(B-y_1)^2}{B(G-y_1)^2} = \frac{B-y_2}{G-y_2}$$

$$G(B-y_1)^2(G-y_2) = B(G-y_1)^2(B-y_2)$$

$$(B-y_1)^2 G^2 - y_2(B-y_1)^2 G = B(B-y_2) G^2 - 2By_1(B-y_2) G + By_1^2(B-y_2)$$

$$\{B(B-y_2) - (B-y_1)^2\} G^2$$

$$- \{2By_1(B-y_2) - y_2(B-y_1)^2\} G + By_1^2(B-y_2) = 0$$

$$G^2 - \left\{ \frac{2By_1(B-y_2) - y_2(B-y_1)^2}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2} \right\} G + \frac{By_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2} = 0$$

Bezeichnet man die zwei Werte von G mit α und β , so ist

$$\begin{aligned}(G - \alpha)(G - \beta) &= 0 \\ G^2 - (\alpha + \beta)G + \alpha\beta &= 0 \\ \alpha\beta &= \frac{By_1^2(B - y_2)}{B(B - y_2) - (B - y_1)^2}\end{aligned}$$

Es wird bestätigt, dass der eine Wert von G durch B befriedigt wird, so ist $\alpha = B$

$$\beta = \frac{By_1^2(B - y_2)}{B(B - y_2) - (B - y_1)^2} \times \frac{1}{B} = \frac{y_1^2(B - y_2)}{B(B - y_2) - (B - y_1)^2}$$

Für den einen Wert von G muss der andere Wert als B -Wert beachtet werden und zwar als Schluss der mathematischen Bearbeitung gelangt man, wenn man die zwei Momente t_1 und t_2 als die Zeiten $t_2 = 2t_1$ annimmt, zu dem Ausdruck

$$G_{t_2=2t_1} = \frac{y_1^2(B - y_2)}{B(B - y_2) - (B - y_1)^2}$$

aus welchem wir den Wert des unbekanntes G berechnen können. Die Konstante C der Reaktion der Inaktivierung der Katalase durch H_2O_2 , wird aus der Gleichung

$$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B - G} \log \frac{G(B - y)}{B(G - y)}$$

durch Einsetzung des B -Wertes und aus den der obigen Gleichung erhaltenen G -Wert berechnet.

B) Experimenteller Teil.

(I) Bestätigung der Theorie.

Proportionalität zwischen den Enzymmengen und den monomolekularen Reaktionskonstanten k bzw. der modifizierten Konstanten K .

Die Methodik für die unter Kapitel IV angegebenen Versuche ist die gleiche wie vorher. Wenn nichts anderes angegeben wurde, wurde wie folgt gearbeitet. Mehrere Kolben mit 5 ccm m/15 Phosphatpuffer und Probe in 20 ccm Reaktionsmischung von n/10 H_2O_2 -Lösung wurden bereitet und auf ein Wasserbad von 20° gesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 10, 15, 20, (25), 30, 40, 50 und 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zusatz von je 10 ccm 10%ige Schwefelsäure unterbrochen und dann das Ganze mit n/10 $KMnO_4$ -Lösung titriert. Die Anfangsmenge von H_2O_2 , A , wurde bestimmt in besonderen

TABELLE XXII

Ungereinigte Unterhefekatalaseprobe in 20 ccm n/10 H₂O₂ reagierender Mischung
von pH 6.6, Katalyse bei 20°

Nr.	A ccm n/10 KMnO ₄		Zeit (in Minuten)								D
			10	15	20	25	30	40	50	60	
(1)	A=19.8 (Probe=0.3)	A-x	17.95	17.25	16.60	16.05	15.55	14.70	13.95	13.25	$t_{10}-t_{20}$ 8.77
		x	1.850	2.55	3.20	3.75	4.25	5.10	5.85	6.55	$t_{15}-t_{30}$ 9.79
		$k \cdot 10^3$	4.26	3.99	3.83	3.65	3.50	3.23	3.04	2.91	$t_{20}-t_{40}$ 9.71
		$K \cdot 10^3$	4.261	—	3.395	—	2.838	2.441	2.275	2.235	$t_{25}-t_{50}$ 10.54
											$t_{30}-t_{60}$ 11.65
											Durch. 10.09
(2)	A=19.8 (Probe=0.4)	A-x	17.00	16.00	15.10	14.30	13.60	12.40	11.40	10.60	$t_{15}-t_{30}$ 14.79
		x	2.80	3.80	4.70	5.50	6.20	7.40	8.40	9.20	$t_{20}-t_{40}$ 15.64
		$k \cdot 10^3$	6.62	6.17	5.89	5.65	5.44	5.08	4.80	4.52	$t_{25}-t_{50}$ 16.24
		$K \cdot 10^3$	6.622	—	5.147	—	4.544	4.012	3.652	3.159	$t_{30}-t_{60}$ 16.35
											Durch. 15.76
(3)	A=19.9 (Probe=0.5)	A-x	16.95	15.95	15.10	14.32	13.60	12.30	11.30	10.40	$t_{15}-t_{30}$ 13.07
		x	2.95	3.95	4.80	5.58	6.30	7.60	8.60	9.50	$t_{20}-t_{40}$ 16.91
		$k \cdot 10^3$	6.97	6.41	5.99	5.72	5.51	5.22	4.92	4.700	$t_{25}-t_{50}$ 17.76
		$K \cdot 10^3$	6.968	—	5.019	—	4.544	4.363	3.683	3.605	$t_{30}-t_{60}$ 18.76
											Durch. 16.63
(4)	A=19.9 (Probe=0.6)	A-x	16.00	14.70	13.55	12.60	11.75	10.20	8.95	7.90	$t_{20}-t_{40}$ 21.23
		x	3.90	5.20	6.35	7.30	8.15	9.70	10.95	12.00	$t_{25}-t_{50}$ 24.65
		$k \cdot 10^3$	9.47	8.77	8.35	7.94	7.63	7.26	6.94	6.69	Durch. 22.94
		$K \cdot 10^3$	9.473	—	7.218	—	6.190	6.144	5.678	5.419	
(5)	A=19.8 (Probe=0.7)	A-x	15.15	13.85	12.60	11.50	10.50	8.90	7.60	6.60	$t_{15}-t_{30}$ 23.12
		x	4.65	5.95	7.20	8.30	9.30	10.90	12.20	13.20	$t_{20}-t_{40}$ 26.42
		$k \cdot 10^3$	11.63	10.35	9.82	9.44	9.18	8.68	8.32	7.95	$t_{25}-t_{50}$ 28.72
		$K \cdot 10^3$	11.626	—	8.004	—	7.918	7.180	6.858	6.127	$t_{30}-t_{60}$ 27.94
											Durch. 26.55
(6)	A=19.8 (Probe=1.0)	A-x	13.475	11.70	10.10	8.75	7.60	5.85	4.55	3.55	$t_{15}-t_{30}$ 36.69
		x	6.325	8.10	9.70	11.05	12.20	13.95	15.25	16.25	$t_{20}-t_{40}$ 39.83
		$k \cdot 10^3$	16.71	15.23	14.62	14.19	13.86	13.24	12.77	12.44	$t_{25}-t_{50}$ 41.08
		$K \cdot 10^3$	16.714	—	12.521	—	12.351	11.365	10.915	10.778	$t_{30}-t_{60}$ 42.17
											Durch. 39.94

Versuchskolben, welche vor der Enzymzugabe mit Schwefelsäure angesäuert worden waren.

Die Proportionalität des k -Wertes mit den Enzymmengen (verglichen bei gleichen Reaktionszeiten) wurde schon bei den vorhergehenden Versuchen gezeigt. Aber diese Proportionalität und weiter die Proportionalität zwischen den Enzymmengen und die aus der monomolekularen Reaktion modifizierten Konstanten $K = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{A - x_1}{A - x_2}$ werden hier ausführlich bestätigt, weil diese Daten die wichtigsten Fundamente für die weitere Untersuchung bilden.

Eine Reihe von Untersuchungen wurde mit verschiedenen Mengen von gereinigter Unterhefekatalase vorgenommen. Von den Resultaten wurden die monomolekularen Reaktionskonstanten nach der Formel $k = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A - x}$ und weiter die modifizierte Konstanten nach der Formel $K = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{A - x_1}{A - x_2}$ berechnet. Da während der Versuchsdauer die Enzymprobe bedeutend schwächer geworden war, gelten die cem der angewandten Katalasemenge nicht als Mass für die Enzymmenge. Deshalb habe ich als Mass für die Enzymmenge den D -Wert nach der von Maximowitsch (l. c.) vorgeschlagenen Formel

$$\frac{\log \frac{D}{D - x_1} + \log \frac{A - x_1}{A}}{\log \frac{D}{D - x_2} + \log \frac{A - x_2}{A}} = \frac{t_1}{t_2} = f(D)$$

abgeleitet. Die Tabelle XXII enthält die Ergebnisse.

Aus Tabelle XXII wurde weiter $k \cdot 10^3/D$ und $K \cdot 10^3/D$ bei verschiedenen Zeiten berechnet, welche in den Tabellen XXIII und XXIV zusammengesetzt sind.

TABELLE XXIII

Nr.	$k \cdot 10^3/D$ bei Zeit (in Minuten)						
	10	15	20	30	40	50	60
(1)	0.4222	0.3954	0.3796	0.3469	0.3201	0.3013	0.2884
(2)	0.4201	0.3915	0.3731	0.3452	0.3223	0.3046	0.2868
(3)	0.4191	0.3848	0.3602	0.3313	0.3139	0.2959	0.2826
(4)	0.4128	0.3823	0.3640	0.3326	0.3165	0.3025	0.2916
(5)	0.4380	0.3998	0.3699	0.3458	0.3269	0.3134	0.2994
(6)	0.4184	0.3813	0.3660	0.3470	0.3315	0.3197	0.3115
Durchschnitt	0.4218	0.3875	0.3688	0.3415	0.3219	0.3062	0.2934

TABELLE XXIV

Nr.	$K \cdot 10^3/D$ bei Zeit (in Minuten)					
	10	20	30	40	50	60
(1)	0.4223	0.3365	0.2813	0.2419	0.2255	0.2215
(2)	0.4202	0.3266	0.2884	0.2546	0.2317	0.2004
(3)	0.4190	0.3018*	0.2732	0.2624	0.2215	0.2168
(4)	0.4129	0.3146	0.2698	0.2679	0.2475	0.2362
(5)	0.4378	0.3015*	0.2982	0.2704	0.2583	0.2270
(6)	0.4185	0.3135	0.3092	0.2846*	0.2733*	0.2699*
Durchschnitt	0.4218	0.3228	0.2867	0.2594	0.2369	0.2204

* Abweichende Zahlen wurden zur Berechnung des Durchschnitts ausgelassen:

Vergleicht man in der Tabelle XXIII die $k \cdot 10^3/D$ -Werte bei jeder Zeit mit den entsprechenden Durchschnittszahlen, so findet man, dass die Werte ziemlich gut übereinstimmen. In der Tabelle XXIV sieht man etwas grössere Schwankungen als in der letzt genannten Tabelle. Diese entstehen dadurch, dass die kleinen Fehler oder Abweichungen in den Experimenten grössern Einfluss auf die Berechnung von K als auf die von k haben.

Die Proportionalität zwischen den Monomolekularkonstanten k und den Enzymmengen, sowie die Proportionalität zwischen den Enzymmengen und der Konstante K aus der modifizierten monomolekularen Formel, welche schon mathematisch als richtig erwiesen wurde, wurden hierdurch ausführlich durch das Experiment bestätigt. Also gilt die Konstante $K = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{A - x_1}{A - x_2}$ in gewissen Grenzen mit befriedigender Genauigkeit als Mass für die Enzymmengen.

Die Übereinstimmung der nach meiner Formel ausgerechneten Konstanten, namentlich die Giltigkeit meiner Theorie, findet man in den weiteren Versuchen.

(II) Einfluss der Faktoren auf die Zersetzungskonstanten.

Der Begriff "Zersetzungskonstante" soll dieselbe von der Inaktivierungskonstante lc , welche schon im vorausgegangenen Teil behandelt wurde, unterscheiden.

a) Enzymmengen und Zersetzungskonstanten.

1) Mit Katalase aus U-Hefe. (ungereinigtes Präparat)

Ein Versuch wurde mit ungereinigter Unterhefekatalase, wie erwähnt, ausgeführt. Das Hefeautolysat wurde mit m/30 Phosphat-

TABELLE XXV

Ungereinigte Unterhefekatalaseprobe in 20 ccm n/10 H_2O_2 reagierender Mischung
von pH 6.6, Katalyse bei 20°

Nr,	A ccm n/10 $KMnO_4$		Zeit (in Minuten)								D
			10	15	20	25	30	40	50	60	
(1)	A=20.0 (Probe=0.35)	A-x	18.00	17.25	16.625	16.07	15.60	14.70	13.975	13.40	$t_{15}-t_{30}$ 8.17
		x	2.00	2.75	3.375	3.93	4.40	5.30	6.025	6.60	$t_{20}-t_{40}$ 9.51
		$K \cdot 10^3$	4.576	—	3.451	—	2.764	2.580	2.196	1.826	$t_{25}-t_{50}$ 10.16
											$t_{30}-t_{60}$ 10.53
										Durch. 9.59	
(2)	A=20.0 (Probe=0.5)	A-x	17.25	16.20	15.30	14.50	13.80	12.65	11.70	10.90	$t_{10}-t_{20}$ 13.71
		x	2.75	3.80	4.70	5.50	6.20	7.35	8.30	9.10	$t_{15}-t_{30}$ 14.70
		$K \cdot 10^3$	6.424	—	5.210	—	4.481	3.779	3.390	3.076	$t_{20}-t_{40}$ 14.78
											$t_{25}-t_{50}$ 14.90
										$t_{30}-t_{60}$ 15.20	
										Durch. 14.66	
(3)	A=20.1 (Probe=0.8)	A-x	15.95	14.45	13.10	12.00	11.05	9.50	8.30	7.35	$t_{10}-t_{20}$ 25.33
		x	4.15	5.65	7.00	8.10	9.05	10.60	11.80	12.75	$t_{15}-t_{30}$ 26.52
		$K \cdot 10^3$	10.044	—	8.549	—	7.391	6.564	5.864	5.279	$t_{20}-t_{40}$ 24.07
											$t_{25}-t_{50}$ 23.85
										$t_{30}-t_{60}$ 23.49	
										Durch. 24.65	

gemisch von pH 6.6 auf das 5 fache verdünnt. Das verdünnte Autolysat wurde als Probe benutzt.

Aus dem Resultat wurden die Enzymmenge D , $K \cdot 10^3$ und $K \cdot 10^3/D$ berechnet. Die Tabelle XXV und XXVI enthält die Ergebnisse:

TABELLE XXVI

Nr	$K \cdot 10^3/D$ bei Zeit (in Minuten)					
	10	20	30	40	50	60
(1)	0.4772	0.3599	0.2882	0.2690	0.2290	0.1904
(2)	0.4382	0.3554	0.3057	0.2578	0.2312	0.2098
(3)	0.4075	0.3468	0.2998	0.2663	0.2379	0.2142
Durchschnitt	0.4410	0.3540	0.2979	0.2644	0.2327	0.2048

Die Durchschnittswerte von $K \cdot 10^3/D$ sind in Abb. 12 graphisch dargestellt. Um die B -Werte, die relative Initial-Katalasemenge, aus den Versuchsserien zu finden, habe ich zuerst die empirische Formel, welche die $K \cdot 10^3/D$ -Kurve umfasst, gesucht und folgende Formel bekommen:

$$\frac{K_t \cdot 10^3}{D} = \frac{t}{-(45.253 + 1.829t)} + 0.5984$$

worin t = Reaktionszeit in Minuten.

Die Prüfung dieser Formel geschieht wie folgt:

Zeit in Minuten		10	15	20	25	30	40	50	60
$K \cdot 10^3/D$	Berechnet	0.4411	0.3920	0.3540	0.3236	0.2989	0.2606	0.2326	0.2113
	Gefunden	0.4410	—	0.3540	—	0.2979	0.2644	0.2327	0.2048

Setzt man in die Formel $K_t \cdot 10^3/D$ $t=0$ ein, so ist $K_{t=0} \cdot 10^3/D = 0.5984$, was dem Wert des Schnittpunktes entspricht, der durch Interpolierung der $K \cdot 10^3/D$ -Kurve auf der Ordinate erhalten wird, Diese Zahl dient als allgemeiner Faktor für die B -Werte der Versuchsserien. Also $K_{t=0} \cdot 10^3/D = 0.5984$, folglich $K_{t=0} \cdot 10^3 = D \times 0.5984 = B$. Auf diese Weise wurden an Stelle der graphischen Interpolierung der $K \cdot 10^3$ -Kurve jeder Versuchsserie auf einmal alle B -Werte gewonnen.

Für die weitere Berechnung der Konstanten G und C wurden die $K \cdot 10^3 = B - y$ jeder Versuchsserie nach den aus der Formel berechneten $K \cdot 10^3/D$ korrigiert, um eine bessere Übereinstimmung der Resultate zu erzielen. Die Korrekturen ermöglichen sich auch nach $D \times K \cdot 10^3/D$ bei verschiedenen Zeiten.

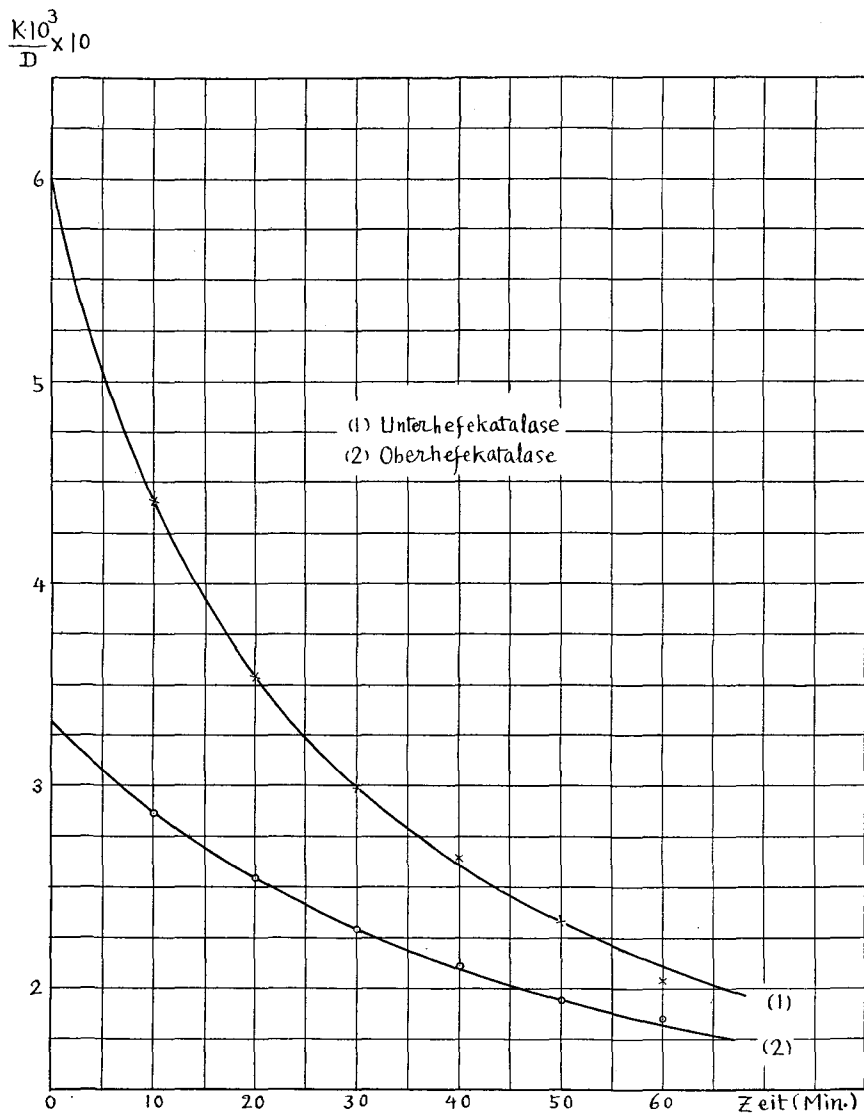


Abb. 12.

Da bei der Berechnung von $K = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{A - x_1}{A - x_2}$ immer $t_2 - t_1 = 10$ Minuten eingesetzt wurde, eignet sich die experimentell gewonnene Zahl bei $t = 15$ (im einigen Fällen auch $t = 25$ Min.) nicht zur Berechnung von K ; daher wurde die Werte von K bei $t = 15$ und 25 Minuten

immer nach der empirischen Formel oder durch direktes Ablesen auf der Kurve gewonnen.

Die auf diese Weise erhaltenen Werte von B und $B-y$ (korr.) sind in der Tabelle XXVII zusammengestellt.

TABELLE XXVII

Nr.	D	B	$K \cdot 10^3 = B-y$ (korr.) bei Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	9.59	5.739	4.230	3.759	3.395	3.103	2.866	2.499	2.231	2.026
(2)	14.66	8.773	6.467	5.747	5.190	4.744	4.382	3.820	3.410	3.098
(3)	24.65	14.751	10.873	9.663	8.726	7.977	7.368	6.424	5.734	5.209

Hierauf habe ich die Konstanten G und die Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten C ausgerechnet, welche auf folgender Tabelle zu finden sind.

TABELLE XXVIII

Nr.	t (Min)	$B-y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2}$	
		$D=9.59$		$B=5.739$		
(1)	10	4.230	1.509	0.003284	$Gt_{10} - t_{20} = 4.859$	
	15	3.759	1.980	0.003286		$Gt_{15} - t_{30} = 4.847$
	20	3.395	2.344	0.003282		$Gt_{20} - t_{40} = 4.876$
	25	3.103	2.636	0.003282		$Gt_{25} - t_{50} = 4.882$
	30	2.866	2.873	0.003280		$Gt_{30} - t_{60} = 4.899$
	40	2.499	3.240	0.003283		
	50	2.231	3.508	0.003287		
	60	2.026	3.713	0.003294	Im Durchschnitt $G = 4.873$	
		$D=14.66$		$B=8.773$		
(2)	10	6.467	2.306	0.002146	$Gt_{10} - t_{20} = 7.439$	
	15	5.747	3.026	0.002147		$Gt_{15} - t_{30} = 7.408$
	20	5.190	3.583	0.002146		$Gt_{20} - t_{40} = 7.457$
	25	4.744	4.029	0.002145		$Gt_{25} - t_{50} = 7.470$
	30	4.382	4.391	0.002143		$Gt_{30} - t_{60} = 7.488$
	40	3.820	4.953	0.002146		
	50	3.410	5.363	0.002149		
	60	3.098	5.675	0.002151	Im Durchschnitt $G = 7.452$	
		$D=24.65$		$B=14.751$		
				Im Durchschnitt $C = 0.003285$		
				Im Durchschnitt $C = 0.002147$		

Nr.	t (Min.)	B-y	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_1)-(B-y_1)^2}$
		D = 24.65		B = 14.751	
(3)	10	10.873	3.878	0.001277	$Gt_{10} - t_{20} = 12.504$
	15	9.663	5.088	0.001278	
	20	8.726	6.025	0.001277	$Gt_{15} - t_{30} = 12.457$
	25	7.977	6.774	0.001277	$Gt_{20} - t_{40} = 12.526$
	30	7.368	7.383	0.001275	$Gt_{25} - t_{50} = 12.559$
	40	6.424	8.327	0.001277	$Gt_{30} - t_{60} = 12.591$
	50	5.734	9.017	0.001279	Im Durchschnitt G = 12.527
	60	5.209	9.542	0.001280	
			Im Durchschnitt C = 0.001278		

2) Mit Katalase aus O-Hefe

Die Oberhefekatalaseprobe für diese Versuche war wie das im vorausgegangenen Teil beschriebene Autolysat bereitet worden. Das Autolysat wurde kurz vor dem Gebrauch mit m/30 Phosphatgemisch von pH 6.4 auf das 50 fache verdünnt.

Aus den Resultaten wurden zuerst die monomolekularen Konstanten *k* berechnet und die Werte von *A-x* durch Prüfung der dargestellten Kurve von *k* korrigiert. Die Ergebnisse und die weiteren Berechnungsergebnisse wurden in folgender Tabelle zusammengesetzt.

TABELLE XXIX

Ungereinigte Oberhefekatalaseprobe in 20 ccm n/10 H₂O₂
reagierender Mischung von pH 6.4, Katalyse bei 20°, A=20.0

Nr.	(Probe)		Zeit (in Minuten)							D	
			10	15	20	30	40	50	60		
(1)	(0.25 ccm)	A-x	18.60	18.00	17.45	16.50	15.70	15.00	14.25	$t_{10} - t_{20}$	11.25
		A-x (korr.)	18.60	18.00	17.45	16.52	15.71	15.00	14.25	$t_{15} - t_{30}$	10.33
		x	1.40	2.00	2.55	3.48	4.29	5.00	5.75	$t_{20} - t_{40}$	10.53
		K · 10 ³	3.152	—	2.771	2.379	2.183	2.009	2.228	$t_{30} - t_{60}$	14.27*
									Durch.	10.70	
(2)	(0.5 ccm)	A-x	17.15	16.00	14.95	13.20	11.80	10.65	9.70	$t_{10} - t_{20}$	24.06
		A-x (korr.)	17.14	15.973	14.943	13.214	11.8	10.667	9.684	$t_{15} - t_{30}$	23.44
		x	2.86	4.027	5.057	6.786	8.20	9.333	10.316	$t_{20} - t_{40}$	23.75
		K · 10 ³	6.702	—	5.957	5.341	4.915	4.384	4.199	$t_{30} - t_{60}$	23.38
									Durch.	23.66	

Nr.	(Pro- be)		Zeit (in Minuten)							D
			10	15	20	30	40	50	60	
(3)	(0.75 ccm)	A-x	16.35	14.90	13.60	11.55	9.95	8.60	7.55	$t_{10}-t_{20}$ 29.96
		A-x (korr.)	16.33	14.88	13.64	11.58	9.932	8.62	7.552	$t_{15}-t_{30}$ 30.97
		x	3.67	5.12	6.36	8.44	10.068	11.38	12.448	$t_{20}-t_{40}$ 31.99
		$K \cdot 10^3$	8.804	—	7.818	7.185	6.592	6.153	5.745	Durch. 30.96
(4)	(1.0 ccm)	A-x	15.05	13.20	11.65	9.20	7.40	6.00	4.95	$t_{10}-t_{20}$ 42.66
		A-x (korr.)	15.05	13.20	11.66	9.20	7.376	6.00	4.95	$t_{15}-t_{30}$ 43.59
		x	4.95	6.80	8.34	10.80	12.624	14.00	15.05	$t_{20}-t_{40}$ 44.37
		$K \cdot 10^3$	12.349	—	11.084	10.291	9.597	8.967	8.354	Durch. 43.52

TABELLE XXX

Nr.	$K \cdot 10^3/D$ bei Zeit (in Minuten)					
	10	20	30	40	50	60
(1)	0.2946	0.2590	0.2223	0.2040	0.1875	0.2082*
(2)	0.2833	0.2518	0.2257	0.2077	0.1853	0.1775
(3)	0.2844	0.2525	0.2321	0.2129	0.1987	0.1856
(4)	0.2838	0.2547	0.2365	0.2205	0.2060	0.1920
Durchschnitt	0.2865	0.2545	0.2292	0.2113	0.1945	0.1850

* Abweichende Zahlen wurden zur Berechnung des Durchschnitts ausgelassen.

Die Durchschnittswerte von $K \cdot 10^3/D$ wurden gleichfalls in Abb. 12 graphisch dargestellt.

Die gesuchte empirische Formel der $K \cdot 10^3/D$ -Kurve war wie folgt:

$$\frac{K_t \cdot 10^3}{D} = \frac{t}{-(184.532 + 3.589t)} + 0.3319$$

Prüfung der Formel:

Zeit in Minuten		10	15	20	25	30	40	50	60
$K \cdot 10^3/D$	Berechnet	0.2865	0.2690	0.2539	0.2407	0.2292	0.2100	0.1945	0.1819
	Gefunden	0.2865	—	0.2545	—	0.2292	0.2113	0.1945	0.1850

$$\text{Wenn } t=0, \text{ so ist } \frac{K \cdot 10^3}{D} = 0.3319$$

Die B-Werte jeder Versuchsserie wurden nach der Formel $D \times 0.3319$

gewonnen und die $K \cdot 10^3 = B - y$ wurde nach $D \times K \cdot 10^3 / D$ (Ber.) korrigiert.

Folgende Tabelle enthält die Zahlen.

TABELLE XXXI

Nr.	D	B	$K \cdot 10^3 = B - y$ (korr.) bei Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	10.70	3.551	3.066	2.878	2.717	2.575	2.452	2.247	2.081	1.946
(2)	23.66	7.853	6.779	6.365	6.007	5.695	5.423	4.969	4.602	4.304
(3)	30.96	10.276	8.870	8.328	7.861	7.452	7.096	6.502	6.022	5.632
(4)	43.52	14.444	12.468	11.707	11.050	10.475	9.975	9.139	8.465	7.916

Die weitere Konstanten sind in folgender Tabelle niedergelegt worden.

TABELLE XXXII

Nr.	t (Min.)	B - y	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B - G} \log \frac{G(B - y)}{B(G - y)}$	$G = \frac{y_1^2(B - y_2)}{B(B - y_2) - (B - y)^2}$
$D = 10.70 \quad B = 3.551$					
(1)	10	3.066	0.485	0.002711	$G_{t_{10} - t_{20}} = 2.580$ $G_{t_{15} - t_{30}} = 2.618$ $G_{t_{20} - t_{40}} = 2.618$ $G_{t_{25} - t_{50}} = 2.612$ $G_{t_{30} - t_{60}} = 2.618$ <hr/> Im Durchschnitt $G = 2.609$
	15	2.878	0.673	0.002711	
	20	2.717	0.834	0.002708	
	25	2.575	0.976	0.002714	
	30	2.452	1.099	0.002713	
	40	2.247	1.304	0.002710	
	50	2.081	1.470	0.002715	
	60	1.946	1.605	0.002716	
				Im Durchschnitt $C = 0.002712$	
$D = 23.66 \quad B = 7.853$					
(2)	10	6.779	1.074	0.001230	$G_{t_{10} - t_{20}} = 5.688$ $G_{t_{15} - t_{30}} = 5.791$ $G_{t_{20} - t_{40}} = 5.764$ $G_{t_{25} - t_{50}} = 5.782$ $G_{t_{30} - t_{60}} = 5.789$ <hr/> Im Durchschnitt $G = 5.763$
	15	6.365	1.488	0.001227	
	20	6.007	1.846	0.001228	
	25	5.695	2.158	0.001229	
	30	5.423	2.430	0.001228	
	40	4.969	2.884	0.001228	
	50	4.602	3.251	0.001230	
	60	4.304	3.549	0.001230	
				Im Durchschnitt $C = 0.001229$	

Nr.	t (Min.)	$B-y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2}$
		$D=30.96$		$B=10.276$	
(3)	10	8.870	1.406	0.000937	
	15	8.328	1.948	0.000935	$Gt_{10} - t_{20} = 7.390$
	20	7.831	2.415	0.000934	$Gt_{15} - t_{30} = 7.558$
	25	7.452	2.824	0.000935	$Gt_{20} - t_{40} = 7.555$
	30	7.093	3.180	0.000934	$Gt_{25} - t_{50} = 7.563$
	40	6.502	3.774	0.000933	$Gt_{30} - t_{60} = 7.572$
	50	6.022	4.254	0.000935	
	60	5.632	4.644	0.000935	
				Im Durchschnitt $C=0.000935$	Im Durchschnitt $G=7.568$
		$D=43.52$		$B=14.444$	
(4)	10	12.468	1.976	0.000670	
	15	11.707	2.737	0.000668	$Gt_{10} - t_{20} = 10.384$
	20	11.050	3.394	0.000668	$Gt_{15} - t_{30} = 10.637$
	25	10.475	3.969	0.000669	$Gt_{20} - t_{40} = 10.632$
	30	9.975	4.469	0.000669	$Gt_{25} - t_{50} = 10.631$
	40	9.139	5.305	0.000669	$Gt_{30} - t_{60} = 10.655$
	50	8.465	5.979	0.000670	
	60	7.916	6.528	0.000670	
				Im Durchschnitt $C=0.000669$	Im Durchschnitt $G=10.588$

Aus den Resultaten der beiden Versuche mit Verschiedenen Mengen von ungereinigten Proben der Unter- und Oberhefekatalase wurde folgende Tabelle zusammengestellt:

TABELLE XXXIII

Nr. d. Versuchs		D	B	G	$\frac{G}{B} \times 100$	C
Tabelle Nr.	Serie Nr.					
XXVIII	(1)	9.59	5.739	4.873	84.91	0.00329
	(2)	14.66	8.773	7.452	84.94	0.00215
	(3)	24.65	14.751	12.527	84.92	0.00128
XXXII	(1)	10.70	3.551	2.609	73.47	0.00271
	(2)	23.66	7.853	5.763	73.39	0.00123
	(3)	30.96	10.276	7.568	73.65	0.00094
	(4)	43.52	14.444	10.588	73.30	0.00067

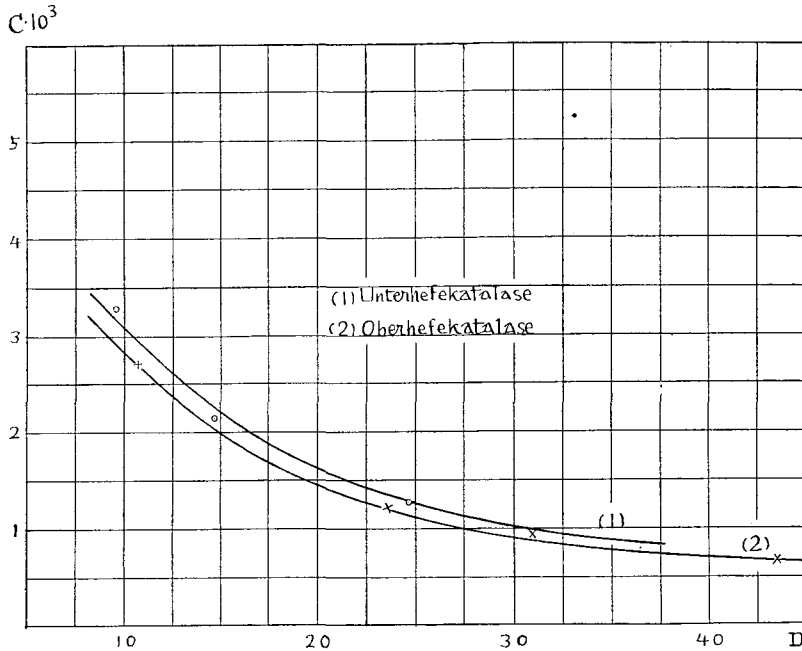


Abb. 13

Die Werte der Zersetzungskonstanten C sind mit den entsprechenden Katalasemengen D in Abb. 13 graphisch dargestellt.

Aus obiger Tabelle geht hervor, dass die beiden Werte von B , die relative Initialmenge, (obgleich nach Lage der Verhältnisse dieser Wert selbstverständlich ist) und G mit den Enzymmengen zunehmen. Aber das prozentische Mengen-Verhältnis von G gegen B bleibt fast gleich. Die Zersetzungskonstante C nimmt mit steigenden Enzymmengen ab.

Bei den Versuchen von Maximowitsch und Awtonomowa (l. c.) bezeichnet der D -Wert die Grenzmenge von H_2O_2 , welche von der Katalase zersetzt wurde, während in meinem Fall der in analoger Weise abgeleitete G -Wert die relative Grenzmenge (gegen B) der Katalase bezeichnet, welche durch H_2O_2 zersetzt wird. Dieses sieht man bei gewissen Versuchen daraus, dass die gespaltene relative Menge der Katalase y bei 60 Minuten (die längste Zeit bei meinen Versuchen) schon sehr nahe dem Wert von G kommt. Solche Beispiele sieht man in den späteren Fällen z. B. in Tabelle L.

Serie Nr	y bei 60 Minuten	G
(1)	1.038	1.165
(2)	2.980	3.185
(3)	4.741	4.950

In gewissen Fällen kann man einfach in Abbildung auf der $K \cdot 10^3 (= B - y)$ -Kurve die angenäherten Werte von G finden.

Weil die Zersetzungskonstanten C mit den verwendeten Enzymmengen variieren, wenn man die Werte einer gleichen Enzymmenge annimmt, so bekommt man vergleichbare Werte. Liest man auf Abb. 13 z. B. die Werte von C bei $D=20$ (welche nach Angabe von Maximowitsch und Awtonomowa der Enzymmenge entspricht, die am Ende der Reaktion die beiden Substanzen, H_2O_2 und Katalase, gerade vernichte), so findet man $C \cdot 10^3 = 1.60$ für Unterhefekatalase und $C \cdot 10^3 = 1.45$ für Oberhefekatalase. Nach diesem vergleichbaren C können wir die Labilität einer Katalase in H_2O_2 -Lösung während der Reaktion annehmen.

Ob die C -Werte durch Begleitstoffe eines Enzympräparates beeinflusst werden, muss noch durch weitere genaue Untersuchungen ermittelt werden; immerhin können wir die C bei einer bestimmten Enzymmenge zum Beispiel C bei $D=20$ als die Labilität wenigstens eines Katalasepräparates annehmen.

Bei meinen mit rohen Autolysaten (Begleitstoffe: z. T. natürliche Zellinhaltsstoffe, z. T. Hydrolysate) ausgeführten Versuchen zeigten die beiden Hefekatalasen eine sehr ähnliche Labilität in H_2O_2 .

Ob die Katalasen von verschiedenen Hefearten in natürlichem Zustand wirklich eine verschiedene Labilität besitzen, soll an anderer Stelle mitgeteilt werden.

b) Einfluss von H_2O_2 -Konzentration auf die Zersetzungskonstanten

1) Mit Katalase aus U-Hefe

Um zu erklären, wie die Zersetzung der Katalase durch die H_2O_2 -Konzentration der reagierenden Mischung während der Reaktion vor sich geht, habe ich folgenden Versuche ausgeführt. Die Katalaseprobe hierfür war die gereinigte Unterhefekatalase, 0.4 ccm derselben wurden zur Katalyse angewandt. Die folgenden 4 Serien der Versuche wurden unter Berücksichtigung der Katalaseschwächung (auch in tief gekühltem Zustand vermeidbar) auf einmal zur gleichen

Zeit ausgeführt, um miteinander vergleichbare Resultate zu erhalten. Die Konzentration des H_2O_2 in der reagierenden Mischung variierte von ca. $n/40$ bis $n/10$, welche durch A , durch die entsprechenden Mengen (cem) von $n/10$ KMnO_4 -Lösung bezeichnet wurden. Die zwei Versuchsserien mit der schwächeren H_2O_2 -Konzentration wurden mit $n/20$ KMnO_4 -Lösung titriert und auf $n/10$ Lösung umgerechnet. Die Einstellung der Lösungen war 20.0 cem $n/20$ $\text{KMnO}_4 = 10.0$ $n/10$ KMnO_4 . Die anderen Versuchsserien wurden direkt mit $n/10$ KMnO_4 -Lösung titriert.

In den vorausgegangenen Versuchen mit den Enzymmengen und Zersetzungskonstanten wurden die experimentellen Fehler durch eine Korrektur als Durchschnittswert nach $K \cdot 10^3 / D \times D$ ausgeschaltet, so konnte ich ohne Schwierigkeit immer gut übereinstimmende Konstanten ausrechnen. Aber bei diesen und auch bei den nachfolgenden Versuchen mit dem Einfluss der Temperatur auf die Zersetzungskonstanten, besonders bei den Versuchen mit schwacher H_2O_2 -Konzentration bzw. bei niedriger Temperatur, wo die H_2O_2 -Spaltung annähernd nach der monomolekularen Reaktion verläuft, übt ein kleiner experimenteller Fehler oft einen grossen Einfluss auf die Berechnung der $K \cdot 10^3$ und auf die Konstanten G aus. So hatte ich ausserordentliche Schwierigkeiten um regelmässig ausfallende Resultate zu erzielen und musste zahlreiche Versuchsserien wiederholt ausführen. Von jeder Versuchsserie für sich habe ich die Kurven der Titrationszahl und das monomolekulare k dargestellt und die Genauigkeit der Resultate der Versuchsserien geprüft. Durch eine solche Prüfung habe ich eine Serie, welche die beste Übereinstimmung der Titrationszahl bzw. k gezeigt hatte, als richtigste zur weiteren Berechnung hier angenommen. Diese Annahme hatte zur Folge, dass ich der Berechnung die Abweichungen mehrmals korrigieren musste.

Zur Beurteilung der Richtigkeit der vorliegenden Resultate ist es auch sehr wichtig, wie weit und in welcher Weise die Korrektur stattfindet, weshalb ich die Art der Korrektur an den Tabellen sowie in den Abbildungen anschaulich gemacht habe. Die Korrektur wurde wie folgt ausgeführt: Aus A und $A-x$ wurden die monomolekulare Konstanten k ausgerechnet und die Konstanten graphisch dargestellt. Sodann wurden zuerst die k -Werte nach der wahrscheinlichsten Kurve korrigiert. Aus den korrigierten k wurden wieder $A-x$ umgerechnet-korrigiert- und aus den korrigierten $A-x$ wurden wie vorher $K \cdot 10^3$ ausgerechnet und nochmal wurden die $K \cdot 10^3$ nach

der Kurve, bezw. nach der empirischen Formel korrigiert.

Die zur Korrektion benutzten $k \cdot 10^3$ waren von jeder Versuchsserie in Abb. 14 graphisch dargestellt. Folgende Tabelle enthält die Ergebnisse.

TABELLE XXXIV

0.4 ccm gereinigte Unterhefekatalaseprobe in 20 ccm reagierender Mischung von pH 6.6, Katalyse bei 20°.

Nr.	A ccm KMnO ₄		Zeit (in Minuten)						
			10	15	20	30	40	50	60
(1)	9.90 (n/20)	A-x (n/20)	8.20	7.50	6.95	5.94	5.15	4.50	3.90
		A-x (n/10)	4.10	3.75	3.475	2.97	2.575	2.25	1.95
	4.95 (n/10)	$k \cdot 10^3$	8.183	8.039	7.683	7.395	7.096	6.849	6.743
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	8.120	7.900	7.710	7.335	7.100	6.887	6.706
	(20 ccm n/20 KMnO ₄ = 10ccm n/10KMnO ₄)	A-x (korr.)	4.106	—	3.471	2.976	2.574	2.240	1.960
		$K \cdot 10^3$	8.119	—	7.297	6.682	6.302	6.036	5.799
		$K \cdot 10^3$ (korr.)	8.150	7.660	7.270	6.696	6.300	6.013	5.800
(2)	19.8 (n/20)	A-x (n/20)	16.45	15.10	14.00	12.15	10.60	9.35	8.25
		A-x (n/10)	8.225	7.55	7.00	6.075	5.30	4.675	4.125
	9.90 (n/10)	$k \cdot 10^3$	8.050	7.846	7.527	7.070	6.784	6.517	6.337
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	8.050	7.750	7.500	7.080	6.760	6.510	6.337
	A-x (korr.)	8.225	—	7.009	6.071	5.312	4.679	4.125	
	$K \cdot 10^3$	8.050	—	6.948	6.240	5.800	5.511	5.473	
	$K \cdot 10^3$ (korr.)	8.050	7.434	6.948	6.240	5.800	5.511	5.350	
(3)	14.85 (n/10)	A-x	12.35	11.45	10.625	9.325	8.30	7.45	6.70
		$k \cdot 10^3$	8.006	7.528	7.270	6.736	6.316	5.991	5.761
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	7.975	7.575	7.250	6.730	6.320	6.000	5.760
		A-x (korr.)	12.359	—	10.635	9.329	8.297	7.443	6.701
		$K \cdot 10^3$	7.974	—	6.525	5.690	5.092	4.717	4.561
$K \cdot 10^3$ (korr.)	7.974	7.142	6.525	5.690	5.092	4.717	4.561		
(4)	19.80 (n/10)	A-x	16.50	15.30	14.325	12.75	11.50	10.475	9.625
		$k \cdot 10^3$	7.919	7.465	7.029	6.372	5.899	5.530	5.221
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	7.950	7.425	7.020	6.375	5.899	5.530	5.225
		A-x (korr.)	16.488	—	14.330	12.747	11.500	10.475	9.620
		$K \cdot 10^3$	7.950	—	6.092	5.084	4.471	4.055	3.697
$K \cdot 10^3$ (korr.)	7.950	6.825	6.050	5.126	4.505	4.020	3.697		

Um die *B*-Werte von jeder Versuchsserie zu finden, wurden die empirischen Formeln gesucht und die folgenden gewonnen. Die Prüfung der Formeln ist auch in Tabelle XXXV zusammengestellt.

Die $K \cdot 10^3$ von jeder Serie sind in Abb. 15 und die B -Werte mit den entsprechenden H_2O_2 -Konzentrationen A in Abb. 16 graphisch dargestellt. Die B und die korrigierten $B-y$ sind in Tabelle XXXVI zusammengestellt. Tabelle XXXVII enthält die Resultate der ausgerechneten Konstanten G und C .

Empirische Formel:

$$\begin{aligned}
 (1) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(5.18 + 0.171t)} + 9.600 & B & 9.600 \\
 (2) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(3.752 + 0.1421t)} + 9.983 & B & 9.983 \\
 (3) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(2.115 + 0.1175t)} + 11.010 & B & 11.010 \\
 (4) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(0.75 + 0.086t)} + 14.150 & B & 14.150
 \end{aligned}$$

Prüfung der Formeln:

TABELLE XXXV

Nr.			Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	$K \cdot 10^3$	Ber.	8.149	7.663	7.274	6.956	6.690	6.272	5.958	5.714
		Gef.	8.150	7.660	7.270	6.960*	6.696	6.300	6.013	5.800
(2)	$K \cdot 10^3$	Ber.	8.050	7.434	6.950	6.561	6.240	5.744	5.378	5.096
		Gef.	8.050	7.434	6.948	6.540*	6.240	5.800	5.511	5.350
(3)	$K \cdot 10^3$	Ber.	7.970	7.142	6.531	6.062	5.691	5.141	4.752	4.463
		Gef.	7.974	7.142	6.525	6.060*	5.690	5.092	4.717	4.561
(4)	$K \cdot 10^3$	Ber.	7.939	6.797	6.053	5.529	5.141	4.603	4.249	3.998
		Gef.	7.950	6.825	6.050	5.520*	5.126	4.505	4.020	3.697

* Auf der graph. Darstellung abgelesen.

TABELLE XXXVI

Nr.	A cem n/10 $KMnO_4$	B	$K \cdot 10^3 = B - y$ (korr.) bei Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	4.95	9.600	8.150	7.660	7.270	6.960	6.696	6.300	6.013	5.800
(2)	9.90	9.983	8.050	7.434	6.948	6.540	6.240	5.800	5.511	5.350
(3)	14.85	11.010	7.974	7.142	6.525	6.060	5.690	5.092	4.717	4.561
(5)	19.80	14.150	7.950	6.825	6.050	5.520	5.126	4.505	4.020	3.697

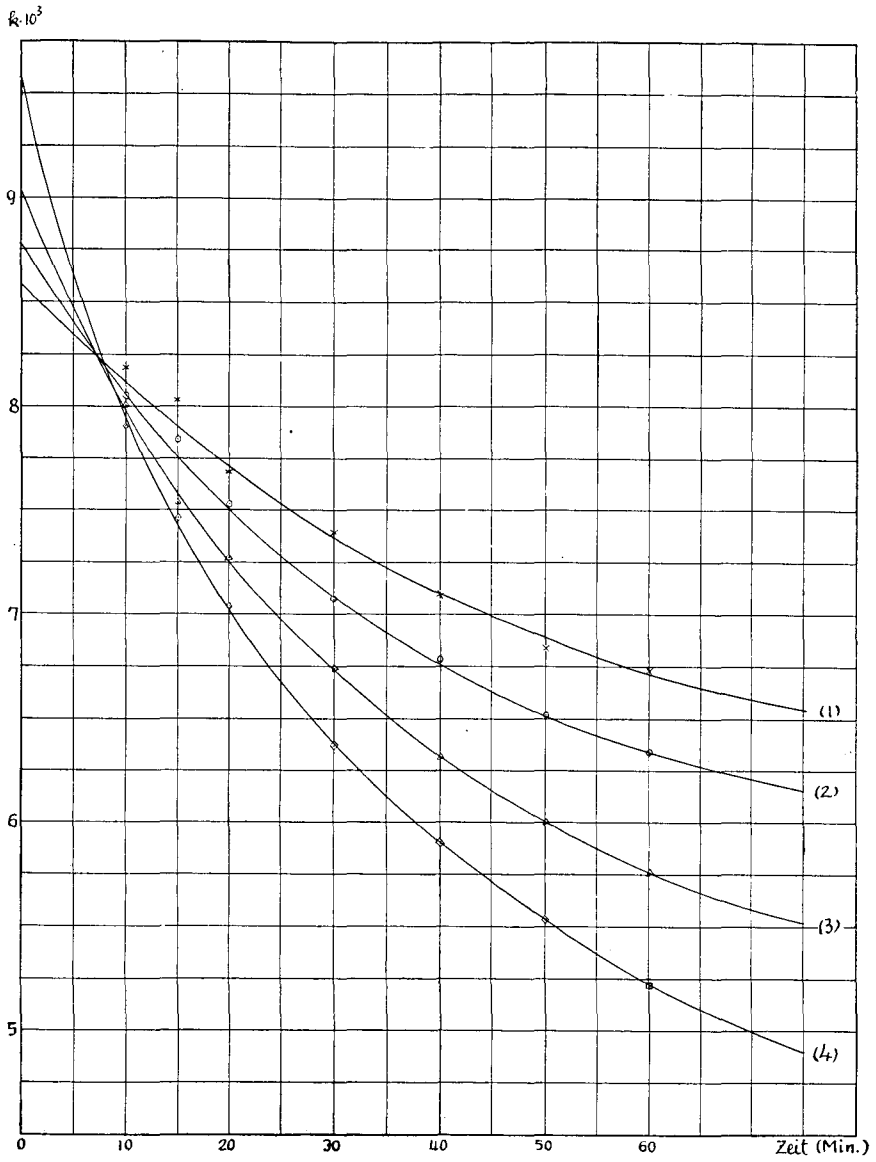


Abb. 14

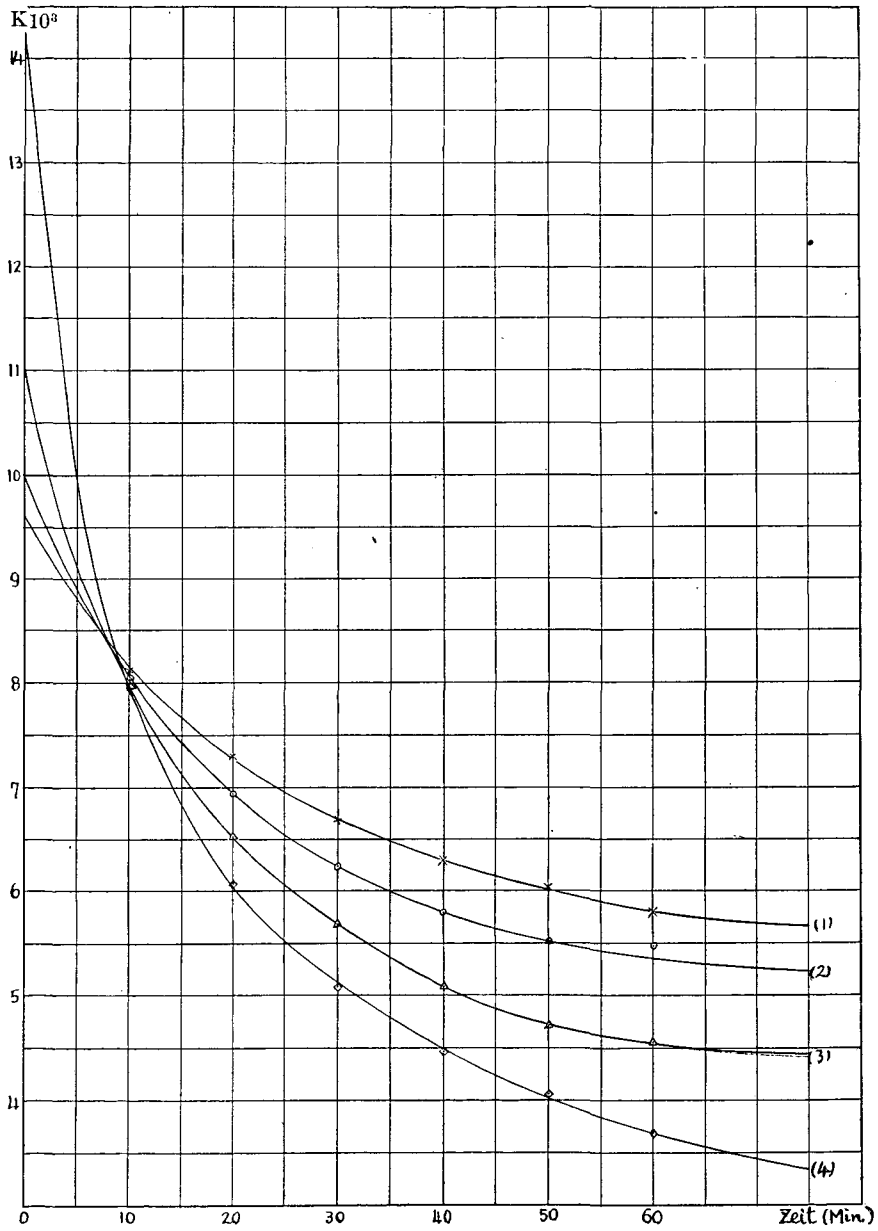


Abb. 15

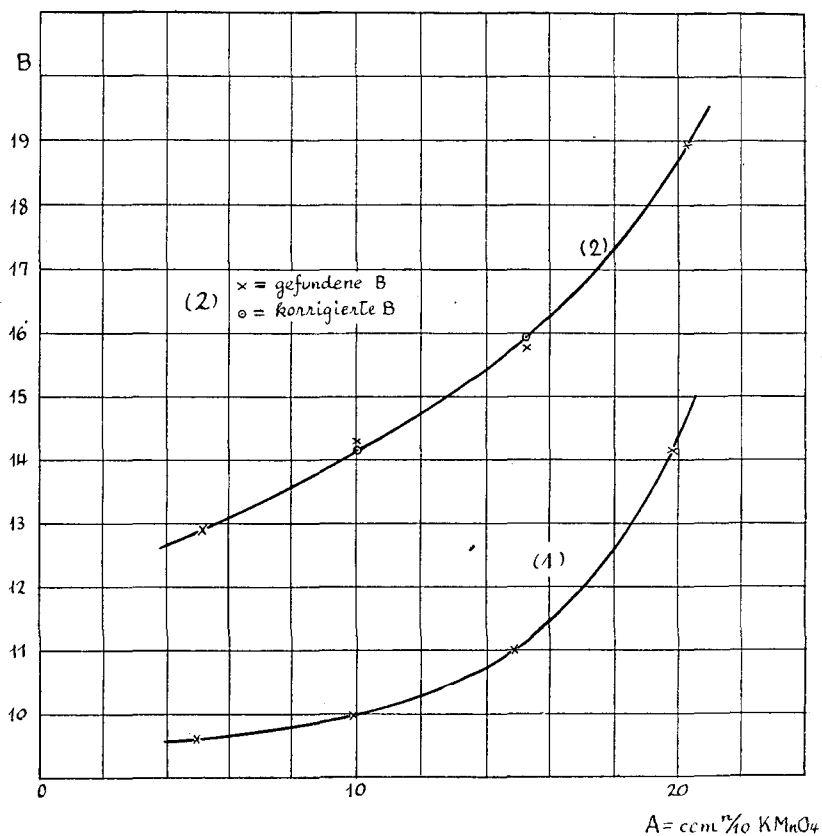


Abb. 16

TABELLE XXXVII

Nr.	t (Min.)	B - y	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2}$
H ₂ O ₂ -Konz. A = 4.95 cem (n/10 KMnO ₄), B = 9.600					
(1)	10	8.150	1.450	0.001913	$G_{t_{10} - t_{20}} = 4.536$ $G_{t_{15} - t_{30}} = 4.495$ $G_{t_{20} - t_{40}} = 4.484$ $G_{t_{25} - t_{50}} = 4.514$ $G_{t_{30} - t_{60}} = 4.511$ Im Durchschnitt G = 4.508
	15	7.660	1.940	0.001916	
	20	7.270	2.330	0.001917	
	25	6.960	2.640	0.001908	
	30	6.696	2.904	0.001914	
	40	6.300	3.300	0.001910	
	50	6.013	3.587	0.001911	
60	5.800	3.800	0.001915		
				Im Durchschnitt C = 0.001913	

Nr.	t (Min.)	$B-y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2}$
		H ₂ O ₂ -Konz. $A+9.9$ ccm (n/10 KMnO ₄),			$B=9.983$
(2)	10	8.050	1.933	0.002108	$Gt_{10}-t_{20}=5.694$ $Gt_{15}-t_{30}=5.768$ $Gt_{20}-t_{40}=5.550$ $Gt_{25}-t_{50}=5.335$ $Gt_{30}-t_{60}=5.179$ Im Durchschnitt $G=5.505$
	15	7.434	2.549	0.002114	
	20	6.948	3.035	0.002129	
	25	6.540	3.443	0.002169	
	30	6.240	3.743	0.002164	
	40	5.800	4.183	0.002142	
	50	5.511	4.472	0.002093	
	60	5.350	4.633	0.001970	
				Im Durchschnitt $C=0.002111$	
		H ₂ O ₂ -Konz. $A=14.85$ ccm (n/10 KMnO ₄),			$B=11.010$
(3)	10	7.974	3.036	0.002469	$Gt_{10}-t_{20}=7.285$ $Gt_{15}-t_{30}=7.314$ $Gt_{20}-t_{40}=7.594$ $Gt_{25}-t_{50}=7.599$ $Gt_{30}-t_{60}=7.236$ Im Durchschnitt $G=7.406$
	15	7.142	3.868	0.002457	
	20	6.525	4.485	0.002453	
	25	6.060	4.950	0.002442	
	30	5.690	5.320	0.002438	
	40	5.092	5.918	0.002512	
	50	4.717	6.293	0.002525	
	60	4.561	6.449	0.002340	
				Im Durchschnitt $C=0.002455$	
		H ₂ O ₂ -Konz. $A=19.8$ ccm (n/10 KMnO ₄),			$B=14.150$
(4)	10	7.950	6.200	0.003509	$Gt_{10}-t_{20}=10.380$ $Gt_{15}-t_{30}=10.598$ $Gt_{20}-t_{40}=10.889$ $Gt_{25}-t_{50}=11.335$ $Gt_{30}-t_{60}=11.563$ Im Durchschnitt $G=10.953$
	15	6.825	7.325	0.003403	
	20	6.050	8.100	0.003366	
	25	5.520	8.630	0.003311	
	30	5.126	9.024	0.003266	
	40	4.505	9.645	0.003330	
	50	4.020	10.130	0.003613	
	60	3.697	10.453	0.003950*	
				Im Durchschnitt $C=0.003400$	

* Abweichende Zahl, wurde zur Berechnung des Durchschnitts ausgelassen.

2) Mit Katalase aus O-Hefe

Das Oberhefeautolysat, mit m/30 Phosphatgemisch von pH 6.4 auf das 50 fache verdünnt, wurde als Probe benutzt. In den vorliegenden Versuchen wurden 0.5 ccm der verdünnten Probe angewandt.

Die anderen Bedingungen sowie die Beobachtungen bei den Versuchen waren die gleichen wie bei den Versuchen mit Unterhefekatalase.

Die Einstellung der $n/20$ KMnO_4 -Lösung, welche für die zwei Versuchsserien der schwächeren Konzentration an H_2O_2 benutzt wurde, mit $n/10$ KMnO_4 -Lösung war $20.5 \text{ ccm } n/20 \text{ KMnO}_4 = 10.0 \text{ ccm } n/10 \text{ KMnO}_4$.

Die Ergebnisse waren in Tabelle XXXVIII zusammengesetzt.

TABELLE XXXVIII

0.5 ccm Ungereinigte Oberhefekatalaseprobe in 20 ccm reagierender Mischung von pH 6.4, Katalyse bei 20° .

Nr.	A ccm KMnO_4		Zeit (in Minuten)						
			10	15	20	30	40	50	60
(1)	10.5 (n/20)	A-x (n/20)	7.80	6.80	5.95	4.575	3.55	2.75	2.15
		A-x (n/10)	3.805	3.317	2.902	2.231	1.732	1.341	1.049
		$k \cdot 10^3$	12.909	12.579	12.337	12.031	11.772	11.640	11.478
	<u>5.122 (n/10)</u> (n/20 KMnO_4 20.5 ccm, = n/10 KMnO_4 10.0 ccm)	$k \cdot 10^3$ (korr.)	12.875	12.620	12.380	12.030	11.780	11.620	11.500
		A-x (korr.)	3.808	—	2.896	2.231	1.731	1.344	1.046
		$K \cdot 10^3$	12.874	—	11.890	11.330	11.026	10.990	10.887
		$K \cdot 10^3$ (korr.)	12.300	12.025	11.800	11.440	11.150	10.990	10.890
(2)	20.51 (n/20)	A-x (n/20)	15.35	13.425	11.80	9.25	7.275	5.80	4.65
		A-x (n/10)	7.488	6.549	5.756	4.512	3.550	2.829	2.268
		$k \cdot 10^3$	12.585	12.270	12.005	11.528	11.250	10.972	10.743
	<u>10.005 (n/10)</u>	$k \cdot 10^3$ (korr.)	12.600	12.270	12.000	11.590	11.250	10.975	10.750
		A-x (korr.)	7.486	—	5.757	4.493	3.550	2.828	2.266
		$K \cdot 10^3$	12.597	—	11.405	10.766	10.231	9.875	9.622
		$K \cdot 10^3$ (korr.)	12.550	11.970	11.475	10.766	10.231	9.875	9.622
(3)	15.25 (n/10)	A-x	11.475	10.10	9.00	7.25	5.95	4.90	4.20
		$k \cdot 10^3$	12.352	11.930	11.452	10.764	10.219	9.861	9.334
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	12.375	11.850	11.400	10.750	10.220	9.800	9.480
		A-x (korr.)	11.470	—	9.021	7.257	5.949	4.935	4.116
		$K \cdot 10^3$	12.371	—	10.431	9.449	8.632	8.115	7.881
		$K \cdot 10^3$ (korr.)	12.350	11.350	10.570	9.449	8.700	8.200	7.825
(4)	20.25 (n/10)	A-x	15.30	13.55	12.25	10.15	8.50	7.2	6.25
		$k \cdot 10^3$	12.174	11.633	10.915	9.999	9.425	8.982	8.509
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	12.174	11.500	10.925	10.060	9.430	8.950	8.525
		A-x (korr.)	15.300	—	12.244	10.107	8.496	7.226	6.236
		$K \cdot 10^3$	12.174	—	9.677	8.330	7.541	7.031	6.399
		$K \cdot 10^3$ (korr.)	12.174	10.670	9.650	8.330	7.541	6.930	6.480

Man sieht in Abb. 16, dass die B -Werte des letzten Versuches mit Unterhefekatalase regelmässig in einer Kurve mit der H_2O_2 -Konzentration variieren. So habe ich die B -Werte dieser Versuchsserien durch direkte Interpolierung zu finden versucht. Die empirische Formel wurde nur für Versuch (4) gesucht und folgendermassen gefunden:

Empirisch Formel für (4)

$$K_t \cdot 10^3 = \frac{t}{-(0.805 + 0.0675t)} + 18.93$$

Prüfung der Formel.

Zeit in Minuten		10	15	20	25	30	40	50	60
$K_t \cdot 10^3$	Berechnet	12.173	10.676	9.649	8.900	8.329	7.518	6.968	6.571
	Gefunden	12.174	10.670	9.650	8.900	8.330	7.541	6.930	6.480

B von Nr. (4)=18.93

Die B -Werte der anderen Serien wurden vorläufig schätzungsweise auf der Kurve interpoliert und die gesuchten Werte wurden weiter graphisch geprüft und die kleine Abweichung nach der dargestellten Kurve korrigiert, welche man gleichfalls in Abb. 16-(2) sieht. Die auf diese Weise gefundenen B -Werte der Serien waren folgende.

Nr.	(1)	(2)	(3)	(4)
B	12.90	14.15	15.92	18.93

Die $k \cdot 10^3$ und $K \cdot 10^3$ sind in Abb. 17 und 18 graphisch dargestellt, aus welchen man auch die Art der Korrektur der Werte sieht. Die gefundene B und $B-y$ sind in Tabelle XXXIX zusammengefasst und daraus weitere Berechnungen ausgeführt worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle XXXX zusammengestellt.

TABELLE XXXIX

Nr.	A cem n/10 KMnO ₄	B	$K \cdot 10^3 = B - y$ (korr.) bei Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	5.122	12.90	12.300	12.025	11.800	11.610	11.440	11.150	10.990	10.890
(2)	10.005	14.15	12.550	11.970	11.475	11.100	10.766	10.231	9.875	9.622
(3)	15.25	15.92	12.350	11.350	10.570	9.930	9.449	8.700	8.200	7.825
(4)	20.25	18.93	12.174	10.670	9.650	8.900	8.330	7.541	6.930	6.480

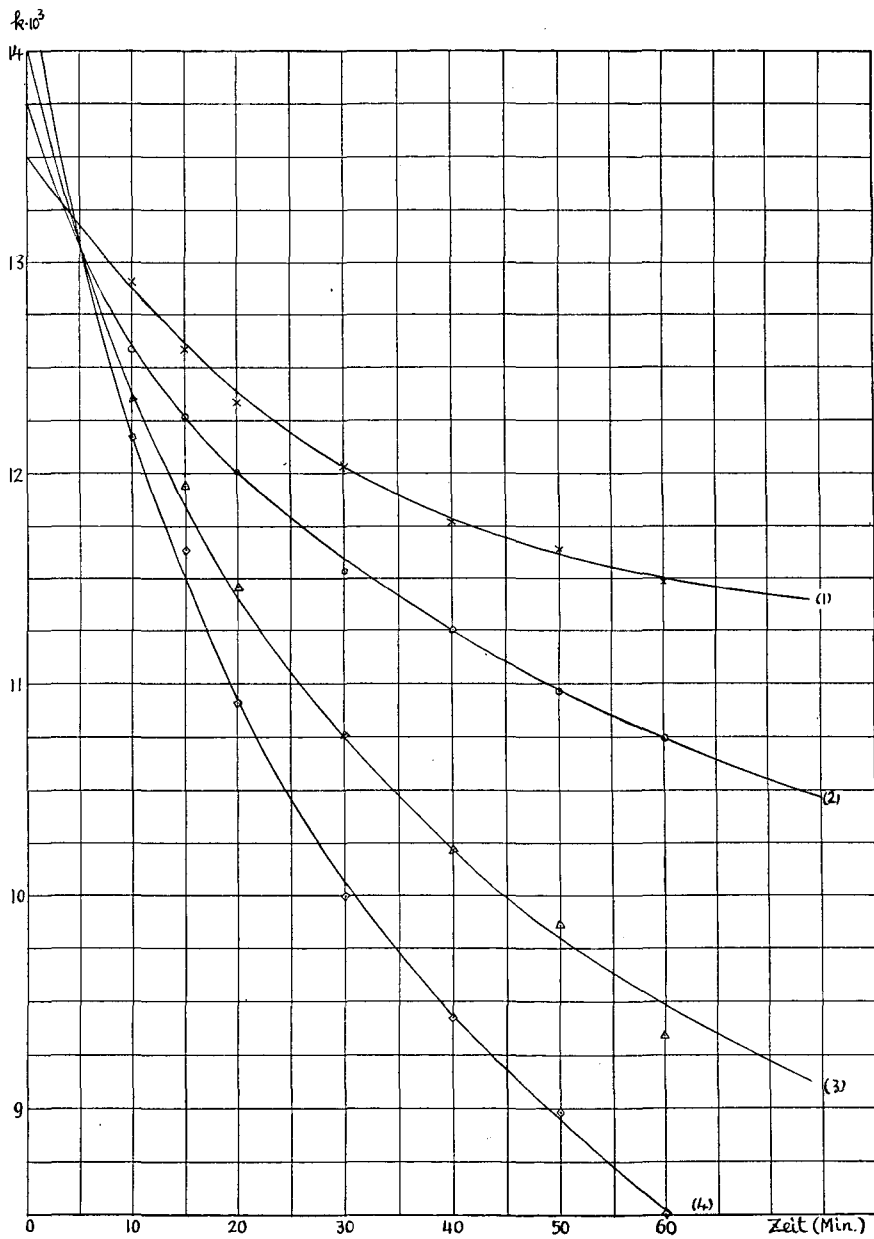


Abb. 17.

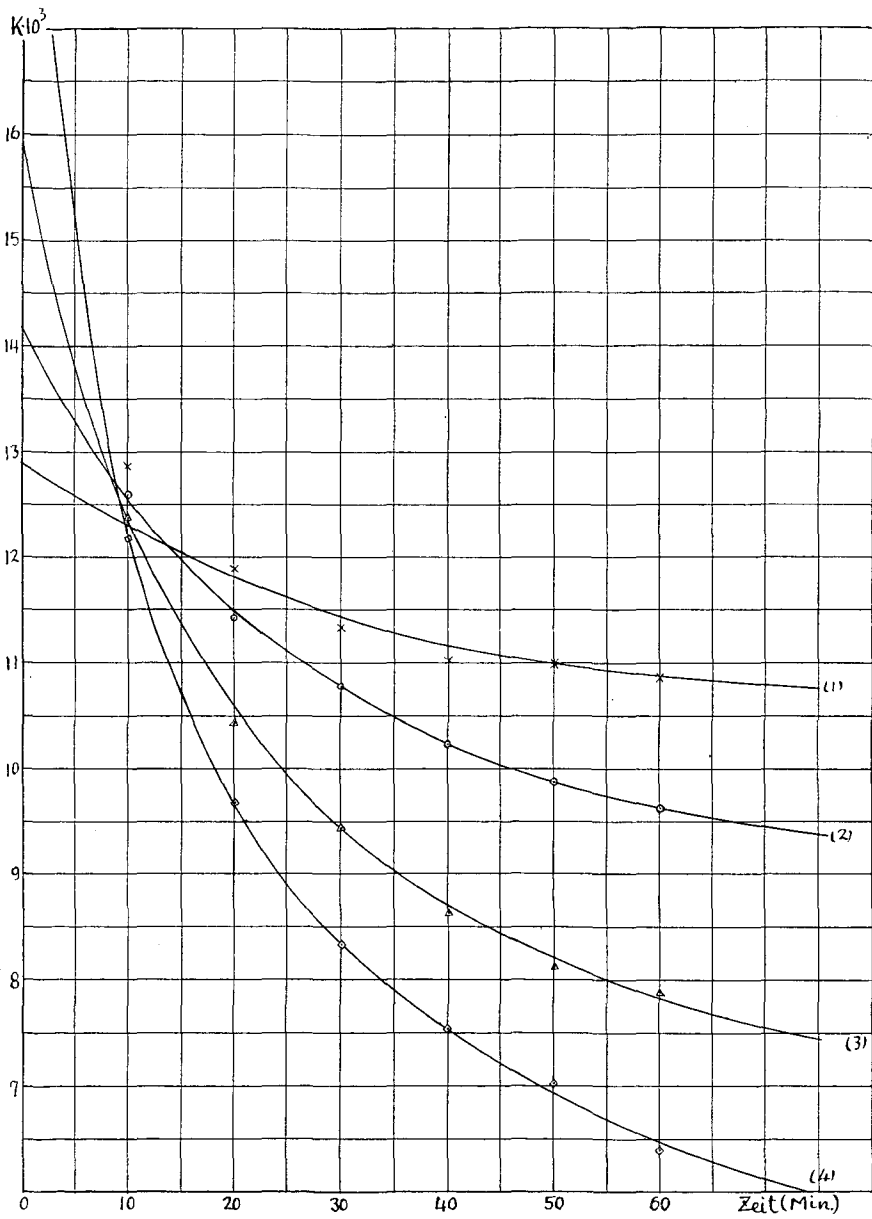


Abb. 18.

TABELLE XXXX

Nr.	t (Min.)	$B-y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2}$
H ₂ O ₂ -Konz. $A=5.122$ ccm (n/10 KMnO ₄), $B=12.90$					
(1)	10	12.300	0.600	0.000857	$Gt_{10} - t_{20} = 4.538^*$ $Gt_{15} - t_{30} = 2.944$ $Gt_{20} - t_{40} = 2.936$ $Gt_{25} - t_{50} = 2.621$ $Gt_{30} - t_{60} = 2.416$ <u>Im Durchschnitt</u> $G = 2.729$
	15	12.025	0.875	0.000901	
	20	11.800	1.100	0.000911	
	25	11.610	1.290	0.000913	
	30	11.440	1.460	0.000919	
	40	11.150	1.750	0.000939	
	50	10.990	1.910	0.000891	
	60	10.890	2.010	0.000829	
			<u>Im Durchschnitt</u> $C = 0.000895$		
H ₂ O ₂ -Konz. $A=10.005$ ccm (n/10 KMnO ₄), $B=14.15$					
(2)	10	12.550	1.600	0.001109	$Gt_{10} - t_{20} = 6.034^*$ $Gt_{15} - t_{30} = 5.649$ $Gt_{20} - t_{40} = 5.591$ $Gt_{25} - t_{50} = 5.560$ $Gt_{30} - t_{60} = 5.443$ <u>Im Durchschnitt</u> $G = 5.561$
	15	11.970	2.180	0.001113	
	20	11.475	2.675	0.001128	
	25	11.100	3.050	0.001117	
	30	10.766	3.384	0.001120	
	40	10.231	3.919	0.001132	
	50	9.875	4.275	0.001117	
	60	9.622	4.528	0.001094	
			<u>Im Durchschnitt</u> $C = 0.001116$		
H ₂ O ₂ -Konz. $A=15.25$ ccm (n/10 KMnO ₄), $B=15.92$					
(3)	10	12.350	3.570	0.001523	$Gt_{10} - t_{20} = 8.552^*$ $Gt_{15} - t_{30} = 9.134$ $Gt_{20} - t_{40} = 9.299$ $Gt_{25} - t_{50} = 9.212$ $Gt_{30} - t_{60} = 9.285$ <u>Im Durchschnitt</u> $G = 9.233$
	15	11.350	4.570	0.001493	
	20	10.570	5.350	0.001483	
	25	9.930	5.990	0.001492	
	30	9.449	6.471	0.001483	
	40	8.700	7.220	0.001492	
	50	8.200	7.720	0.001483	
	60	7.825	8.095	0.001497	
			<u>Im Durchschnitt</u> $C = 0.001494$		

Nr.	t (Min.)	$B-y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2}$
H ₂ O ₂ -Konz. $A = 20.25$ cem (n/10 KMnO ₄),				$B = 18.93$	
(4)	10	12.174	6.756	0.002094	$G_{t_{10}-t_{20}} = 12.778$
	15	10.670	8.260	0.002075	
	20	9.650	9.280	0.002054	$G_{t_{15}-t_{30}} = 12.964$
	25	8.900	10.030	0.002044	$G_{t_{20}-t_{40}} = 13.086$
	30	8.330	10.600	0.002039	$G_{t_{25}-t_{50}} = 13.413$
	40	7.541	11.389	0.002030	$G_{t_{30}-t_{60}} = 13.666$
	50	6.930	12.000	0.002127	
	60	6.480	12.450	0.002292*	
Im Durchschnitt $C = 0.002066$				Im Durchschnitt $G = 13.181$	

* Abweichende Zahlen wurden zur Berechnung des Durchschnitts nicht benutzt.

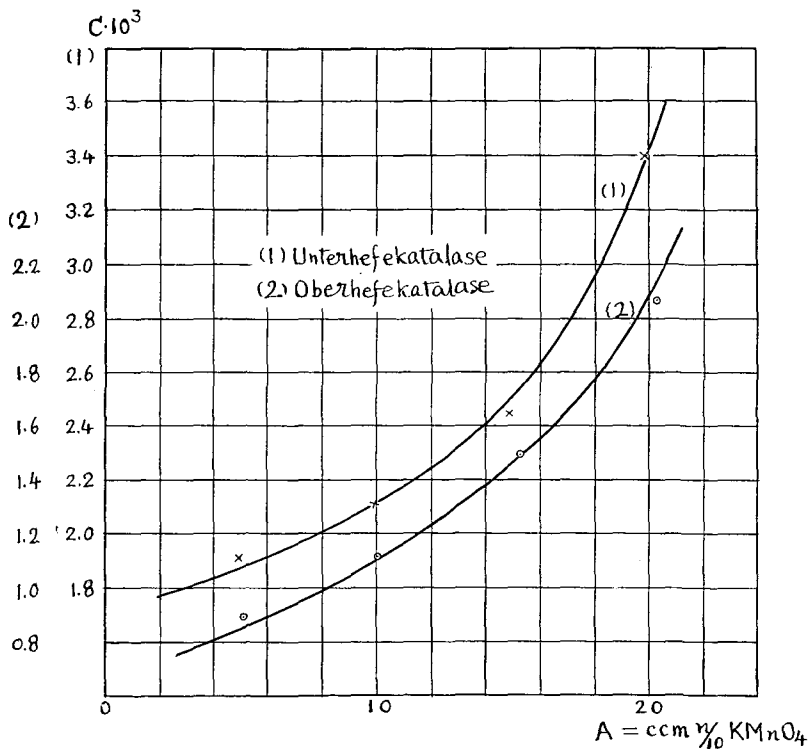


Abb. 19.

Aus den Resultaten der beiden Versuche betreffend H_2O_2 -Konzentration wurde folgende Tabelle zusammengestellt:

TABELLE XXXXI

Nr. d. Versuch		A (H_2O_2 - Konz.)	B	G	$\frac{G}{B} \times 100$	C
Tabelle Nr.	Serie Nr.					
XXXVII	(1)	4.95	9.600	4.508	46.96	0.001913
	(2)	9.90	9.983	5.505	55.14	0.002111
	(3)	14.85	11.010	7.406	67.27	0.002455
	(4)	19.80	14.150	10.953	77.41	0.003400
XXXX	(1)	5.122	12.900	2.729	21.16	0.000895
	(2)	10.005	14.150	5.561	39.30	0.001116
	(3)	15.25	15.920	9.233	58.00	0.001494
	(4)	20.25	18.930	13.181	69.63	0.002066

Die Konstanten C der beiden Versuche sind in Abb. 19 mit den entsprechenden H_2O_2 -Konzentrationen A graphisch dargestellt. Aus den in Tabelle XXXXI angegebenen Zahlen sieht man;

Erstens: Obgleich gleiche Mengen an Enzymproben gebraucht wurden, zeigen sich verschiedene Bedingungen, namentlich verschiedene H_2O_2 -Konzentrationen, eine (gegen $B-y$) verschiedene relative Anfangsenzymmenge B und zwar konzentrierter das H_2O_2 ist, desto grösser ist B . Diese Tatsache bedeutet die kräftigere Wirkung der H_2O_2 -Spaltung in den früheren Stadien der Reaktion.

Zweitens: Die Konstanten G , die relative Grenzmenge der zersetzten Katalase sowie die prozentische Menge derselben $G/B \times 100$ nehmen mit steigender H_2O_2 -Konzentration zu.

Drittens: Die Zersetzungskonstante C nimmt auch mit steigender H_2O_2 -Konzentration zu.

Bei mehreren Versuchen der Katalasewirkung hat man meistens kein regelmässiges Verhältnis zwischen die Monomolekularekonstanten k und die H_2O_2 -Konzentration gefunden. Die Ursache hiervon können wir erst in Abb. 14 auf der korrigierten $k \cdot 10^3$ -Kurve verstehen, wobei noch das vorgelegte Versuchsergebnis der Zersetzungskonstanten in verschiedener H_2O_2 -Konzentration eine ganz deutliche Erklärung abgeben sollte. In früheren Stadien der Katalasewirkung findet eine kräftigere H_2O_2 -Spaltung statt in konzentrierten Lösungen an H_2O_2 als in verdünnten, aber zugleich ist die Zerstörung der Katalase

selbst auch kräftiger. Deshalb zeigen die Konstanten k , verglichen in verschiedenen H_2O_2 -Konzentration, eine verschiedene Grösseordnung nach der Reaktionszeit. Wenn ich z. B. aus Abb. 14 $k \cdot 10^3$ bei verschiedenen Zeiten nehme, so finde ich etwa folgendes:

TABELLE XXXXII

Nr.	A (H_2O_2 -Konz.)	$k \cdot 10^3$ bei Zeit (m.)		
		2.5	7.5	30
(1)	4.95	8.45	etwa zwischen	7.38
(2)	9.90 ↓	8.58 ↓	8.2	7.08 ↑
(3)	14.85 ↓	8.75 ↓	u.	6.73 ↑
(4)	19.80	9.05	8.25	6.38

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, dass $k \cdot 10^3$ bei etwa 2.5 Minuten mit der steigenden H_2O_2 -Konzentration zunimmt, bei einer Reaktionszeit von etwa 7.5 Minuten zeigen die Konstanten fast dieselben Werte, während die Konstante bei etwa 30 Minuten mit der steigenden H_2O_2 -Konzentration abnimmt.

Hierfür wird noch ein besonders ausgeführter Versuch als Beispiel angegeben werden.

TABELLE XXXXIII

0.4 ccm Oberhefeautolysat (verünnt) in 20 ccm $n/10 H_2O_2$
reagierender Mischung von pH 6.4, Katalyse bei 20°.

H_2O_2 -Konz. ccm	$A=9.95$ (n/10 $KMnO_4$)			$A=19.9$ (n/10 $KMnO_4$)		
	5	30	120	5	30	120
$A-x$	8.9	5.2	1.4	17.4	10.7	4.15
$k \cdot 10^3$	9.686	9.394	7.097	11.660	8.982	5.673

Aus obiger Tabelle ersieht man, dass in verdünnterer H_2O_2 -Lösung $k \cdot 10^3$ bei 5 Minuten kleiner ist als in konzentrierter während bei 30 und 120 Minuten es umgekehrt ist.

Es wurde schon früher festgestellt, dass die Zersetzung der Katalase je nach den Mengen des angewandten Enzyms in verschiedener Weise verläuft, deshalb wird die Anordnung von k in verschiedener H_2O_2 -Konzentration mit der Reaktionszeit auch, unter Umständen, ein anderes Bild ergeben, als ich gezeigt habe, aber das gewonnene Versuchsergebnis vermag auf die Frage nach den Reaktions-

konstanten der H_2O_2 -Spaltung in verschiedenen Konzentrationen eine sehr klare Antwort zu ergeben.

c) Einfluss der Temperatur auf die Zersetzungskonstanten

1) Mit Katalase aus U-Hefe

Die Versuche wurden mit 0.4 ccm der gereinigten Unterhefekatalase-Probe in 20 ccm $n/10 H_2O_2$ bei pH 6.6 bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt. Zuerst wurde eine Katalyse mit gleichen Enzymmengen 20 Minuten lang bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt; die Resultate dienen als Mass zur Umrechnung der Resultate der Hauptversuche auf gleiche Enzymmengen und ich habe durch Ausschaltung der Enzymschwächung während der Versuchsdauer die Ergebnisse jeder Versuchsserie mit einander vergleichbar gemacht.

Das Resultat des Standardversuches ist wie folgt:

TABELLE XXXXIV

0.4 ccm Probe in 20 ccm $n/10 H_2O_2$ reagierender Mischung von
pH 6.6, 20 Minuten, $A=20.0$ ccm $n/10 KMnO_4$

Temperatur	1°	10°	20°	30°	40°
$A-x$	17.05	16.8	16.8	17.2	17.9
$k \cdot 10^3$	3.4655	3.786	3.786	3.275	2.409

Die Hauptversuche wurden ganz gleich wie der Standardversuch ausgeführt, deren Resultate in Tabelle XXXXV zusammengesetzt sind.

Um die Ergebnisse auf gleiche Enzymmengen zu umrechnen, wurde das Verhältnis von $k \cdot 10^3$ des Standardversuches und der $k \cdot 10^3$ bei einer Reaktionszeit von 20 Minuten von jedem Hauptversuch berechnet. Das Verhältnis wurde durch F bezeichnet und in Tabelle XXXXVI angegeben.

Die $k \cdot 10^3$ jeder Versuchsserie wurden, nach dem Gesetz der Proportionalität der monomolekularen Konstanten und Enzymmengen, mit F multipliziert und auf eine gleiche Enzymmenge umgerechnet. Die umgerechneten k -Werte wurden zuerst in der Abbildung graphisch dargestellt und die abweichenden Werte aus der Kurve korrigiert. Aus den korrigierten k -Werten wurden wieder $A-x$ bzw. $\log(A-x)$

(auf gleiche Enzymmengen) umgerechnet, und sodann daraus $K \cdot 10^3$ ausgerechnet. Um die B -Werte jeder Serie zu finden, wurden wie immer die empirischen Formeln gesucht.

TABELLE XXXXV

0.4 ccm Probe in 20 ccm $n/10$ H_2O_2 reagierender Mischung von pH 6.6, $A=20.0$ ccm $n/10$ $KMnO_4$

Nr.	Temp.		Zeit (in Minuten)						
			10	15	20	30	40	50	60
(1)	1°	$A-x$	18.80	18.35	17.90	17.00	16.15	15.35	14.55
		$k \cdot 10^3$	2.687	2.493	2.409	2.353	2.3215	2.2984	2.303
(2)	10	$A-x$	18.45	17.80	17.30	16.20	15.20	14.50	13.80
		$k \cdot 10^3$	3.503	3.374	3.149	3.050	2.980	2.793	2.686
(3)	20	$A-x$	18.15	17.35	16.80	15.65	14.75	14.00	13.20
		$k \cdot 10^3$	4.215	4.115	3.786	3.551	3.306	3.098	3.0077
(4)	30	$A-x$	18.45	17.90	17.50	17.00	16.60	16.15	16.00
		$k \cdot 10^3$	3.503	3.212	2.8995	2.353	2.023	1.8572	1.6152
(5)	40	$A-x$	18.40	18.20	17.90	17.70	17.50	17.60	17.60
		$k \cdot 10^3$	3.621	2.731	2.409	1.769	1.4497	1.1104	0.92533

TABELLE XXXXVI

Temperatur	1°	10°	20°	30°	40°
$k \cdot 10^3$ vom Standardversuch	3.4655	3.786	3.786	3.275	2.409
$k \cdot 10^3$ bei 20 Min. von Hauptversuch	2.409	3.149	3.786	2.8995	2.409
F =das Verhältnis der beiden $k \cdot 10^3$	1.4386	1.2023	1.000	1.1295	1.000

Die auf eine gleiche Enzymmenge umgerechneten $k \cdot 10^3$ -Werte sind in Abb. 20 und die $K \cdot 10^3$ -Werte in Abb. 21 graphisch dargestellt.

Wenn die Zersetzung der Katalase sehr klein ist-z. B. bei der Katalyse bei 1°, hat eine ganz kleine Abweichung der $K \cdot 10^3$ -Werte von der wahrscheinlichen Kurve einen grossen Einfluss auf die Berechnung der weiteren Konstanten, weshalb ich die ganzen Versuchsserien nach der empirischen Formel auf $K \cdot 10^3$ korrigiert habe.

Beim Suchen von B nach der empirischen Formel, sowie bei der Korrektur der ausgerechneten Werte habe ich immer darauf geachtet, einen Irrtum zu vermeiden durch Prüfung der Werte B und G jeder Serie, weil diese Werte immer regelmässig variieren. Die Umrech-

nung, Korrektion und die ausgerechneten $K \cdot 10^3$ sind zusammen in Tabelle XXXXVII niedergelagt. Die gesuchte empirische Formel jeder Serie wird weiter unten und ihre Prüfung in Tabelle XXXXVIII gezeigt. Der aus der gewonnenen Formel gesuchte Wert B und die auch nach den empirischen Formeln korrigierten Werte $B-y$ sind in Tabelle XXXXIX zusammengestellt. Aus den gewonnenen Werten

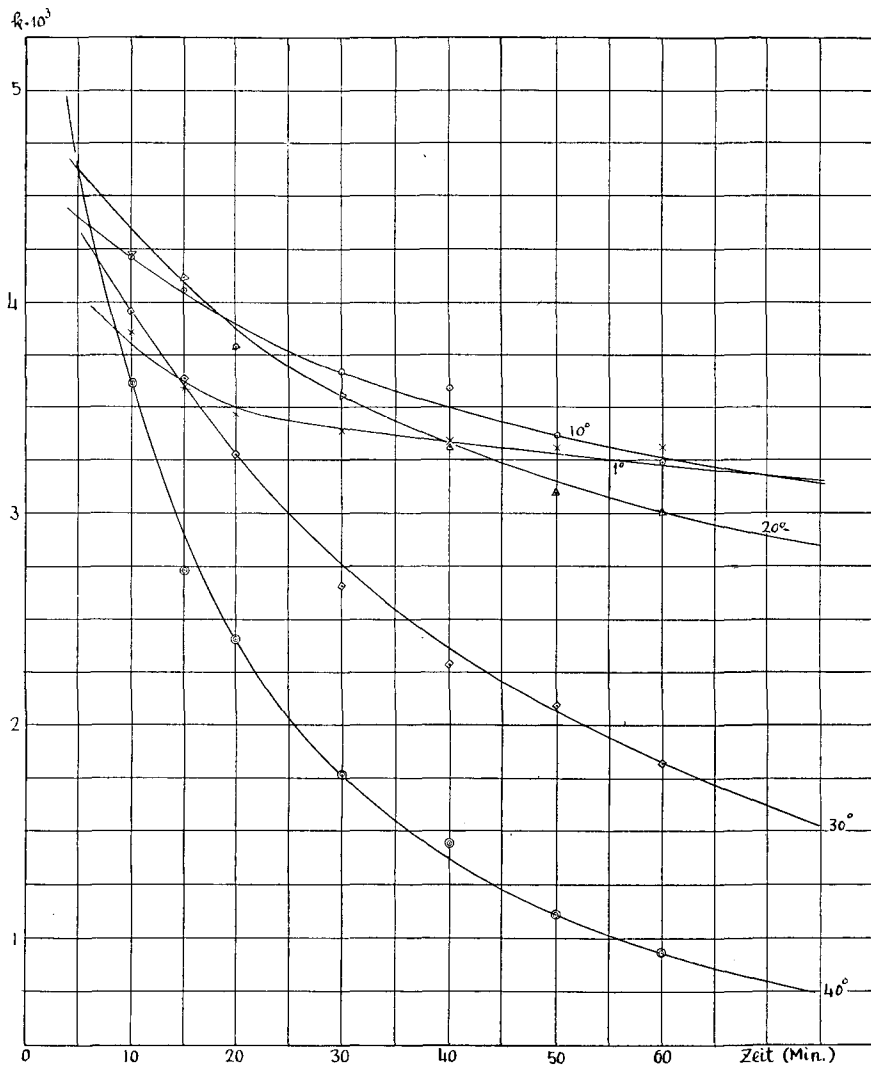


Abb. 20.

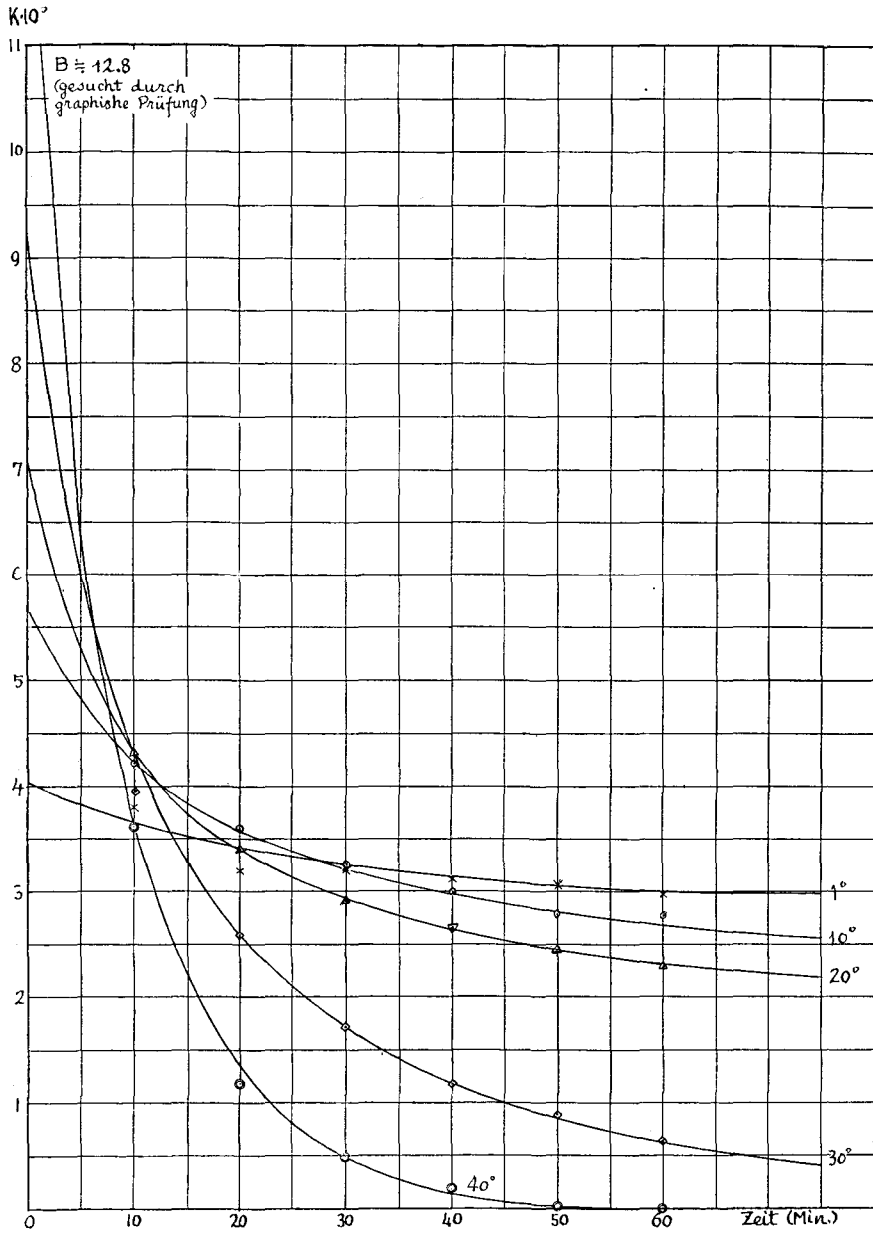


Abb. 21.

B und $B-y$ wurden die Konstanten G und die Zersetzungskonstanten C berechnet, deren Resultate in Tabelle L zusammengestellt sind.

TABELLE XXXXVII

Nr.	Temp.		Zeit (in Minuten)						
			10	15	20	30	40	50	60
(1)	1°	$k \cdot 10^3 \times F (=1.4386)$	3.8655	3.586	3.4655	3.385	3.340	3.306	3.313
		„ (korr.)	3.800	3.625	3.500	3.400	3.330	3.275	3.225
		$\log(A-x)$	1.26303	—	1.23103	1.19903	1.16783	1.13728	1.10753
		$K \cdot 10^3$	3.800	—	3.200	3.200	3.120	3.055	2.975
(2)	10	$k \cdot 10^3 \times F (=1.2023)$	4.212	4.0566	3.786	3.667	3.583	3.358	3.229
		„ (korr.)	4.212	4.050	3.900	2.667	3.500	3.358	3.260
		$\log(A-x)$	1.25891	—	1.22303	1.19102	1.16103	1.13313	1.10543
		$K \cdot 10^3$	4.212	—	3.588	3.201	2.999	2.790	2.770
(3)	20	$k \cdot 10^3 \times F (=1.0)$	4.215	4.115	3.786	3.551	3.306	3.098	3.0077
		„ (korr.)	4.338	4.100	3.870	3.550	3.325	3.150	3.0077
		$\log(A-x)$	1.25705	—	1.22363	1.19453	1.16803	1.14353	1.12057
		$K \cdot 10^3$	4.338	—	3.402	2.910	2.650	2.450	2.296
(4)	30	$k \cdot 10^3 \times F (=1.1295)$	3.9566	3.623	3.275	2.6577	2.285	2.0977	1.8244
		„ (korr.)	3.9566	3.620	3.275	2.7625	2.360	2.0672	1.8244
		$\log(A-x)$	1.26146	—	1.23553	1.21815	1.20663	1.19767	1.19157
		$K \cdot 10^3$	3.957	—	2.593	1.738	1.152	0.896	0.610
(5)	40	$k \cdot 10^3 \times F (=1.0)$	3.621	2.731	2.409	1.769	1.4497	1.1104	0.92533
		„ (korr.)	3.621	2.890	2.409	1.769	1.375	1.1104	0.92533
		$\log(A-x)$	1.26482	—	1.25285	1.24796	1.24603	1.24551	1.24551
		$K \cdot 10^3$	3.621	—	1.197	0.489	0.193	0.052	0

Empirische Formel:

$$\begin{aligned}
 (1) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(19.5134 + 0.6378t)} + 4.036 & B & 4.036 \\
 (2) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(4.2559 + 0.2647t)} + 5.661 & & 5.661 \\
 (3) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(1.8873 + 0.17945t)} + 7.054 & & 7.054 \\
 (4) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(1.0572 + 0.09757t)} + 9.241 & & 9.241
 \end{aligned}$$

Prüfung der Formeln:

TABELLE XXXXVIII

Nr.			Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	$K \cdot 10^3$	Ber.	3.650	3.520	3.416	3.331	3.260	3.148	3.063	2.998
		Gef.	3.800		3.200		3.200	3.120	3.055	2.975
(2)	$K \cdot 10^3$	Ber.	4.212	3.838	3.568	3.362	3.201	2.966	2.802	2.681
		Gef.	4.212		3.588		3.201	2.999	2.790	2.770
(3)	$K \cdot 10^3$	Ber.	4.338	3.778	3.402	3.132	2.928	2.642	2.450	2.313
		Gef.	4.338		3.402		2.910	2.650	2.450	2.296
(4)	$K \cdot 10^3$	Ber.	4.322	3.290	2.593	2.091	1.711	1.176	0.817	0.560
		Gef.	3.957		2.593		1.738	1.152	0.896	0.610

TABELLE XXXXIX

Nr.	Temp.	B	$K \cdot 10^3 = B - y$ (korr.) bei Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	1°	4.036	3.650	3.520	3.416	3.331	3.260	3.148	3.063	2.998
(2)	10	5.661	4.212	3.838	3.568	3.362	3.201	2.966	2.802	2.681
(3)	20	7.054	4.383	3.725*	3.402	3.132	2.928	2.642	2.450	2.313
(4)	30	9.241	4.322	3.290	2.593	2.091	1.711	1.176	0.850*	0.610*

* Auf der graph. Darstellung abgelesen.

TABELLE L

Nr.	t (Min.)	$B - y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B - G} \log \frac{G(B - y)}{B(G - y)}$	$G = \frac{y_1^2(B - y_2)}{B(B - y_2) - (B - y_1)^2}$
		Temp. 1°,		$B = 4.036$	
(1)	10	3.650	0.386	0.004567	$G_{t_{10} - t_{20}} = 1.096$
	15	3.520	0.516	0.004521	
	20	3.416	0.620	0.004485	$G_{t_{15} - t_{30}} = 1.131$
	25	3.331	0.705	0.004461	$G_{t_{20} - t_{40}} = 1.168$
	30	3.260	0.776	0.004454	$G_{t_{25} - t_{50}} = 1.202$
	40	3.148	0.888	0.004493	$G_{t_{30} - t_{60}} = 1.226$
	50	3.063	0.973	0.004620	
	60	2.998	1.038	0.004838	
				Im Durchschnitt $C = 0.004555$	Im Durchschnitt $G = 1.165$

Nr.	t (Min.)	$B-y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2}$
Temp. 10°, $B=5.661$					
(2)	10	4.212	1.449	0.005459	
	15	3.838	1.823	0.005389	$G_{t_{10}-t_{20}} = 3.048$
	20	3.568	2.093	0.005340	$G_{t_{15}-t_{30}} = 3.137$
	25	3.362	2.299	0.005321	$G_{t_{20}-t_{40}} = 3.200$
	30	3.201	2.460	0.005320	$G_{t_{25}-t_{50}} = 3.248$
	40	2.966	2.695	0.005373	$G_{t_{30}-t_{60}} = 3.290$
	50	2.802	2.859	0.005529	
	60	2.681	2.980	0.005834	Im Durchschnitt $G = 3.185$
				Im Durchschnitt $C = 0.005446$	
Temp. 20°, $B=7.054$					
(3)	10	4.338	2.716	0.006387	
	15	3.725	3.329	0.006575	$G_{t_{10}-t_{20}} = 4.845$
	20	3.402	3.652	0.006289	$G_{t_{15}-t_{30}} = 4.787$
	25	3.132	3.922	0.006274	$G_{t_{20}-t_{40}} = 4.989$
	30	2.928	4.126	0.006287	$G_{t_{25}-t_{50}} = 5.043$
	40	2.642	4.412	0.006385	$G_{t_{30}-t_{60}} = 5.086$
	50	2.450	4.604	0.006618	
	60	2.313	4.741	0.007052*	Im Durchschnitt $G = 4.950$
				Im Durchschnitt $C = 0.006402$	
Temp. 30°, $B=9.241$					
(4)	10	4.322	4.919	0.005584	
	15	3.290	5.951	0.005979	$G_{t_{10}-t_{20}} = 11.878$
	20	2.593	6.648	0.006424	$G_{t_{15}-t_{30}} = 12.150$
	25	2.091	7.150	0.006942	$G_{t_{20}-t_{40}} = 12.543$
	30	1.711	7.530	0.007559	$G_{t_{25}-t_{50}} = 12.478$
	40	1.176	8.065	0.009189	$G_{t_{30}-t_{60}} = 12.765$
	50	0.850	8.391	0.011149	
	60	0.610	8.631	0.014475	Im Durchschnitt $G = 12.363$
				Im Durchschnitt $C = 0.008413$	$G(\text{vorläufig}) = 8.991$

* Abweichende Zahl wurde zur Berechnung des Durchschnitts ausgelassen.

Wie aus mehreren angeführten Versuchen zu ersehen ist, weisen die Werter unserer Formel C eine gute Übereinstimmung auf, jedoch hat die Giltigkeit der Formel gewisse Grenzen. Wenn man die Richtigkeit der Formel $C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$ kritisiert, so findet

man, dass in derselben $B-G$ ein Integral darstellen muss, folglich $G < B$. Also gilt unsere Formel von C für den Prozess nur in den Fällen, wo die Katalasezersetzung in den Grenzen $G < B$ endigt. Bei den Versuchen muss man daher darauf achten, dass die angewandte Enzymmenge im oben angegebenen Verhältnis in der reagierenden Mischung vorhanden ist.

Der letzte Versuch, welcher bei 30° ausgeführt wurde, war jener Fall, für welchen die Formel nicht gilt. Also ist G grösser als B . Um aber einen vorläufigen Begriff zu haben an Stelle des ausgerechneten G -Wertes, habe ich den aus der graphischen Darstellung entnommenen Wert 8.991 zur weitere Berechnung gebraucht. Doch zeigten die ausgerechneten C grosse Schwankungen und gaben keinen konstanten Wert. Dies kommt vielleicht dadurch, dass schon bei 30° auf die Zersetzung der Katalase ausser dem H_2O_2 noch die Temperatur stark wirkt, obwohl die Inaktivierung der Enzyme ohne Substrat bei 30° nicht so bedeutend war. Die Konstanten im Versuch bei 40° wurden nicht berechnet. Den Begriff der Zersetzung ersieht man aus der graphischen Darstellung in Abb. 21.

2) Mit Katalase aus O-Hefe

Als Probe diene, wie vorher, das mit m/30 Phosphat-Lösung von pH 6.4 auf das 50 fache verdünnte Autolysat. Das Ergebnis des Standardversuches, welcher mit 0.5 ccm Probe in 20 ccm n/10 H_2O_2 reagierender Mischung von pH 6.4 20 Minuten bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt wurde, ist wie folgt:

TABELLE LI

0.5 ccm Probe in 20 ccm n/10 H_2O_2 reagierender Mischung von pH 6.4, Reaktionszeit 20 Minuten

Temperatur.	1°	10	20	30	40
A	19.9	19.9	19.9	19.9	19.9
$A-x$	16.8	15.95	15.75	16.3	18.8
$k \cdot 10^9$	3.677	4.8045	5.0785	4.333	1.2345

Die Hauptversuche wurden unter ganz gleichen Bedingungen ausgeführt. Die Umrechnung der Resultate auf gleiche Enzymmengen (zur Ausschaltung der Schwächung der Enzymprobe selbst) wurde auch in gleicher Weise wie bei der Unterhefekatalase ausgeführt, aber

diesmal wurden die $k \cdot 10^3$ vor dem Multiplizieren mit F (das Verhältnis beider $k \cdot 10^3$ aus Hauptversuch und Standardversuch) zuerst korrigiert. Die Korrektur ist auch in Abb. 22 auf der entsprechenden Kurve von $k \cdot 10^3$ anschaulich gemacht.

Die Resultate des Hauptversuches, sowie die Werte von F und die weitere Berechnung wie bei der Unterhefekatalase sind in folgenden Tabellen zusammengefasst.

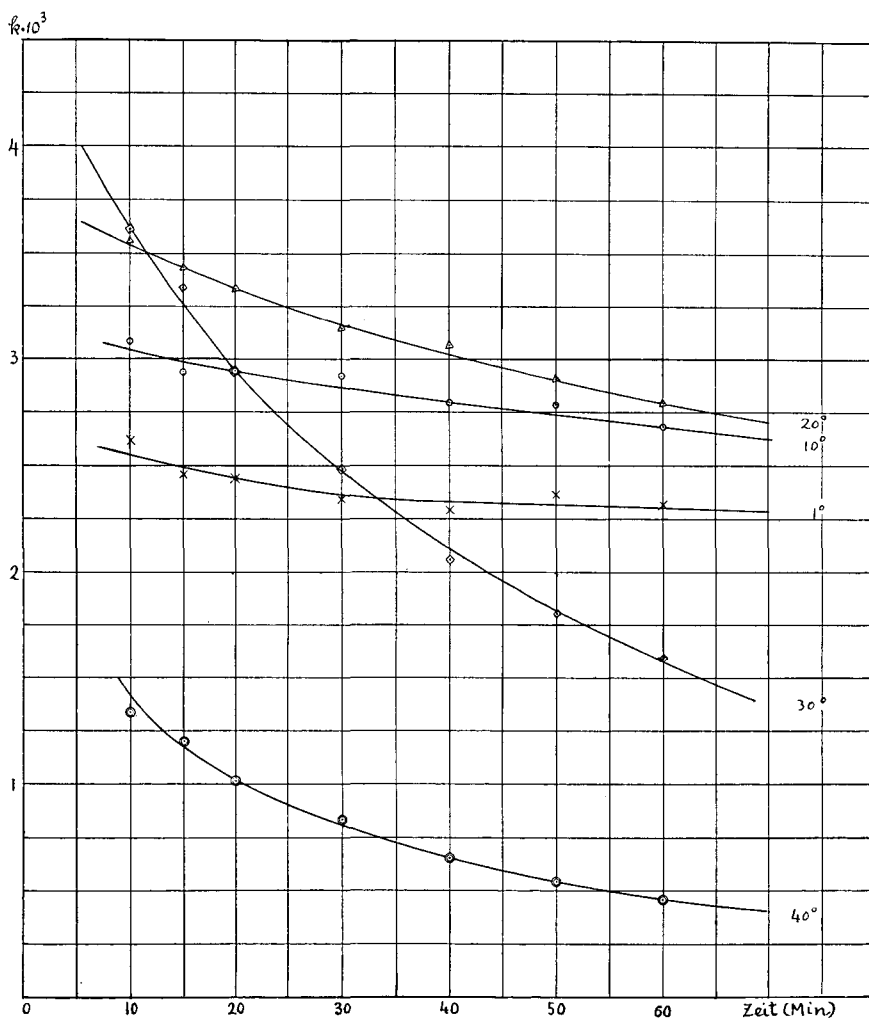


Abb. 22.

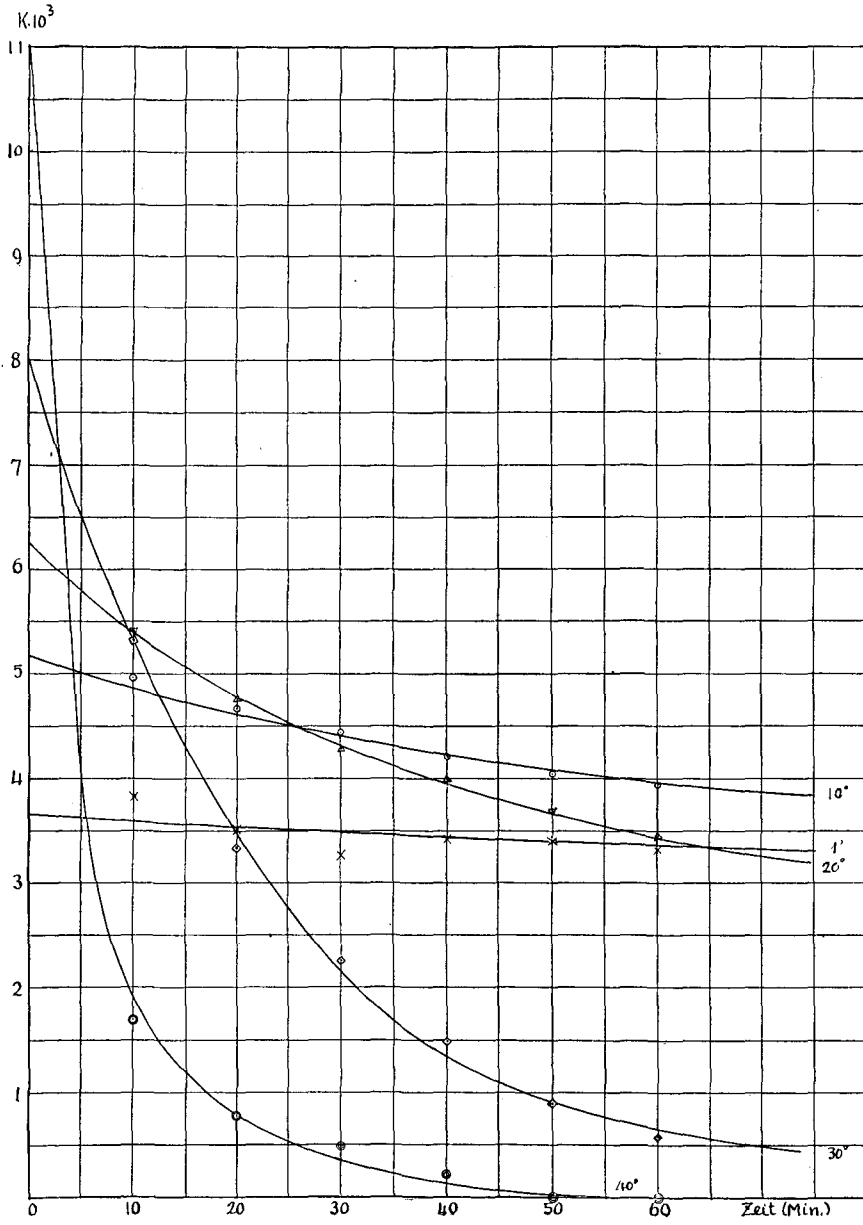


Abb. 23.

TABELLE LII

0.5 ccm Probe in 20 ccm n/10 H_2O_2 reagierender Mischung von
pH 6.6, $A=19.7$ ccm n/10 $KMnO_4$

Nr.	Temp.		Zeit (in Minuten)						
			10	15	20	30	40	50	60
(1)	1°	$A-x$	18.55	18.10	17.60	16.75	15.95	15.00	14.30
		$k \cdot 10^3$	2.613	2.453	2.448	2.349	2.293	2.3676	2.319
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	2.550	2.490	2.446	2.355	2.335	2.320	2.300
(2)	10	$A-x$	18.35	17.80	17.20	16.10	15.225	14.30	13.60
		$k \cdot 10^3$	3.083	2.937	2.947	2.9213	2.798	2.7826	2.682
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	3.040	2.980	2.947	2.870	2.798	2.735	2.682
(3)	20	$A-x$	18.15	17.50	16.90	15.85	14.85	14.10	13.40
		$k \cdot 10^3$	3.559	3.429	3.329	3.148	3.0685	2.905	2.790
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	3.535	3.430	3.329	3.155	3.020	2.900	2.793
(4)	30	$A-x$	18.125	17.55	17.20	16.60	16.30	16.00	15.80
		$k \cdot 10^3$	3.619	3.346	2.947	2.4787	2.057	1.807	1.597
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	3.619	3.265	2.947	2.475	2.110	1.810	1.575
(5)	40	$A-x$	19.10	18.90	18.80	18.60	18.55	18.50	18.50
		$k \cdot 10^3$	1.344	1.200	1.0155	0.832	0.653	0.546	0.455
		$k \cdot 10^3$ (korr.)	1.390	1.175	1.0155	0.810	0.653	0.546	0.455

TABELLE LIII

Temperatur	1°	10°	20°	30°	40°
$k \cdot 10^3$ von Standardversuch	3.677	4.8045	5.0785	4.333	1.2345
$k \cdot 10^3$ bei 20 Min. von Hauptversuch	2.446	2.947	3.329	2.947	1.0155
F =das Verhältnis der beiden $k \cdot 10^3$	1.50327	1.63030	1.52553	1.47031	1.21566

TABELLE LIV

Nr.	Temp.		Zeit (in Minuten)					
			10	20	30	40	50	60
(1)	1°	$k \cdot 10^3$ (korr.) $\times F$	3.833	3.677	3.540	3.510	3.488	3.4575
		$\log(A-x)$	1.25614	1.22093	1.19827	1.15407	1.12007	1.08702
		$K \cdot 10^3$	3.833	3.521	3.266	3.420	3.400	3.305
(2)	10	$k \cdot 10^3$ (korr.) $\times F$	4.956	4.8045	4.679	4.5616	4.4589	4.3725
		$\log(A-x)$	1.24491	1.19838	1.15410	1.11201	1.07152	1.03212
		$K \cdot 10^3$	4.956	4.653	4.428	4.209	4.049	3.940

Nr.	Temp.		Zeit (in Minuten)					
			10	20	30	40	50	60
(3)	20	$k \cdot 10^3 (\text{korr.}) \times F$	5.393	5.0785	4.813	4.607	4.424	4.261
		$\log (A-x)$	1.24054	1.19290	1.15008	1.11019	1.07327	1.03881
		$K \cdot 10^3$	5.393	4.764	4.282	3.989	3.692	3.446
(4)	30	$k \cdot 10^3 (\text{korr.}) \times F$	5.321	4.333	3.639	3.10235	2.6613	2.3157
		$\log (A-x)$	1.24126	1.20781	1.18530	1.17038	1.16140	1.15553
		$K \cdot 10^3$	5.321	3.345	2.251	1.492	0.898	0.587
(5)	40	$k \cdot 10^3 (\text{korr.}) \times F$	1.6898	1.2345	0.9847	0.7938	0.6637	0.5531
		$\log (A-x)$	1.27757	1.26978	1.26493	1.26272	1.26128	1.26128
		$K \cdot 10^3$	1.690	0.779	0.485	0.221	0.144	0

Empirische Formel:

$$\begin{aligned}
 (1) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(151.4293 + 0.7878t)} + 3.657 & B & 3.657 \\
 (2) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(30.9332 + 0.32036t)} + 5.152 & & 5.152 \\
 (3) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(9.659 + 0.19267t)} + 6.250 & & 6.250 \\
 (4) \quad K_t \cdot 10^3 &= \frac{t}{-(2.99535 + 0.070536t)} + 8.019 & & 8.019
 \end{aligned}$$

Prüfung der Formeln:

*TABELLE LV

Nr.			Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	$K \cdot 10^3$	Ber.	3.594	3.565	3.537	3.511	3.486	3.438	3.395	3.355
		Gef.	3.833		3.521		3.266	3.420	3.400	3.305
(2)	$K \cdot 10^3$	Ber.	4.859	4.732	4.616	4.510	4.412	4.238	4.087	3.956
		Gef.	4.956		4.653		4.428	4.209	4.049	3.940
(3)	$K \cdot 10^3$	Ber.	5.387	5.055	4.770	4.525	4.307	3.947	3.658	3.422
		Gef.	5.393		4.764		4.282	3.989	3.692	3.446
(4)	$K \cdot 10^3$	Ber.	5.317	4.318	3.480	2.766	2.150	1.142	0.353	—
		Gef.	5.321		3.345		2.251	1.492	0.898	0.587

* Es ergibt sich eine verhältnismäßig große Differenz zwischen dem berechneten und dem gefundenen Wert aber man sieht die Richtigkeit der Formel an der entsprechenden graphischen Darstellung in Abb. 23.

Um einen gut übereinstimmenden Wert der Konstanten zu gewinnen, musste ich auch die ausgerechnete $K \cdot 10^3 = B - y$ nochmals genau korrigieren. So habe ich als korrigierte Werte die nach der empirischen Formel ausgerechneten Werte benutzt, nur einige Zahlen davon wurden aus der entsprechenden Kurve entnommen. Die Werte B und korrigierten $B - y$ sind in Tabelle LVI zusammengefasst. Für die Versuche bei höherer Temperatur als 30° gilt die Formel für C nicht mehr, deshalb habe ich die Resultate der Versuche bei 40° ausgelassen; die $B - y$ -Kurve sieht man zusammen mit anderen Kurve in Abb. 23. Aus den in der Tabelle LVI angegebenen B und $B - y$ wurden die Konstanten G und C ausgerechnet, welche in Tabelle LVII zusammengefasst sind.

TABELLE LVI

Nr.	Temp.	B	$K \cdot 10^3 = B - y$ (korr.) bei Zeit (in Minuten)							
			10	15	20	25	30	40	50	60
(1)	1°	3.657	3.594	3.565	3.537	3.511	3.486	3.438	3.395	3.355
(2)	10	5.152	4.859	4.732	4.616	4.510	4.412	4.238	4.087	3.956
(3)	20	6.250	5.387	5.055	4.770	4.523	4.307	3.947	3.658	3.422
(4)	30	8.019	5.317	4.318	3.480	2.766	2.150	1.340 ¹	0.900*	0.650*

* Auf der graph. Darstellung abgelesen.

TABELLE LVII

Nr.	t (Min.)	$B - y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B - G} \log \frac{G(B - y)}{B(G - y)}$	$G = \frac{y_1^2(B - y_2)}{B(B - y_2) - (B - y_1)^2}$
Temp. 1° , $B = 3.657$					
(1)	10	3.594	0.053	0.000987	$Gt_{10} - t_{20} = 0.781$
	15	3.535	0.092	0.000984	
	20	3.537	0.120	0.000986	$Gt_{15} - t_{30} = 0.755$
	25	3.511	0.146	0.000982	$Gt_{20} - t_{40} = 0.793$
	30	3.486	0.171	0.000980	$Gt_{25} - t_{50} = 0.819$
	40	3.438	0.219	0.000985	$Gt_{30} - t_{60} = 0.838$
	50	3.395	0.262	0.000985	Im Durchschnitt $G = 0.797$
	60	3.355	0.302	0.000987	
				Im Durchschnitt $C = 0.000985$	

Nr.	t (Min)	$B-y$	y	$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$	$G = \frac{y_1^2(B-y_2)}{B(B-y_2) - (B-y_1)^2}$
Temp. 10°, $B = 5.152$					
(2)	10	4.859	0.293	0.001169	$Gt_{10} - t_{20} = 2.307$ $Gt_{15} - t_{30} = 2.297$ $Gt_{20} - t_{40} = 2.312$ $Gt_{25} - t_{50} = 2.352$ $Gt_{30} - t_{60} = 2.366$ <hr/> Im Durchschnitt $G = 2.327$
	15	4.732	0.420	0.001168	
	20	4.616	0.536	0.001167	
	25	4.510	0.642	0.001167	
	30	4.412	0.740	0.001167	
	40	4.238	0.914	0.001166	
	50	4.087	1.065	0.001169	
	60	3.956	1.196	0.001172	
				Im Durchschnitt $C = 0.001168$	
Temp. 20°, $B = 6.250$					
(3)	10	5.387	0.863	0.001590	$Gt_{10} - t_{20} = 4.481$ $Gt_{15} - t_{30} = 4.503$ $Gt_{20} - t_{40} = 4.513$ $Gt_{25} - t_{50} = 4.536$ $Gt_{30} - t_{60} = 4.553$ <hr/> Im Durchschnitt $G = 4.517$
	15	5.055	1.195	0.001588	
	20	4.770	1.480	0.001588	
	25	4.523	1.727	0.001588	
	30	4.307	1.943	0.001587	
	40	3.947	2.303	0.001588	
	50	3.658	2.592	0.001590	
	60	3.422	2.828	0.001593	
				Im Durchschnitt $C = 0.001589$	
Temp. 30°, $B = 8.019$					
(4)	10	5.317	2.702	0.002897	Bemerkungen: Für diese Versuche ist die Formel von G nicht mehr voll gültig. Der Berechnung von C wurde vorläufig ungefähr $G = 7.7$ zugrunde gelegt, was man auf der entsprechenden graphischen Darstellung ablesen kann.
	15	4.318	3.701	0.003281	
	20	3.480	4.539	0.003782	
	25	2.766	5.253	0.004463	
	30	2.150	5.869	0.905446	
	40	1.340	6.679	0.007871	
	50	0.900	7.119	0.010811	
	60	0.650	7.369	0.014391	
				$C_{20^\circ - 30^\circ} = 0.004564$	

Die Konstanten C der beiden Versuche mit Unter- und Oberhefe-katalasen sind in Abb. 24 mit den entsprechenden Temperaturen graphisch dargestellt.

Aus den beiden Versuchsergebnissen betreffend der Zersetzungskonstanten und Temperatur wurde die Tabelle LVIII zusammengefasst.

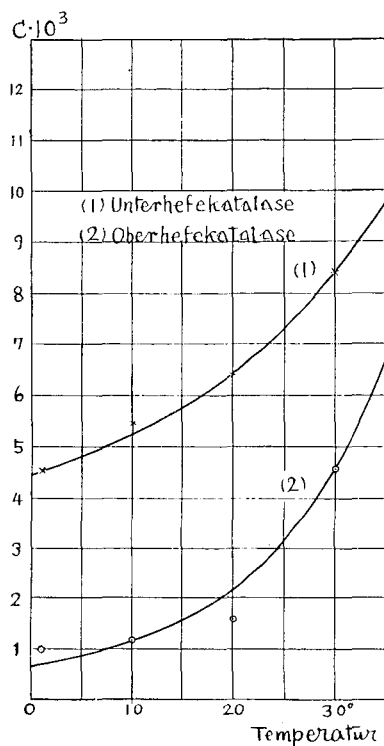


Abb. 24.

TABELLE LVIII

Nr. d. Versuch		Temp.	B	G	$\frac{G}{B} \times 100$	C
Tabelle Nr.	Serie Nr.					
L	(1)	1°	4.036	1.165	28.87	0.004555
	(2)	10	5.661	3.185	56.26	0.005446
	(3)	20	7.054	4.950	70.17	0.006402
	(4)	30	9.241	(8.991)	(97.29)	(0.008413)
LVII	(1)	1°	3.657	0.797	21.79	0.000985
	(2)	10	5.152	2.327	45.17	0.001168
	(3)	20	6.250	4.517	72.27	0.001589
	(4)	30	8.019	(7.7)	(96.02)	(0.004564)

Aus den in Tabelle LVIII zusammengefassten Zahlen ziehe ich folgende Schlüsse:

Erstens: Gleiche Enzymmengen zeigen verschiedene relative

(gegen $B-y$) Initialkatalasemenge B und zwar je höher die Temperatur ist, desto grösser ist B . Diese Tatsache bedeutet auch, wie bei der Konzentration des Substrats, die Kräftigere Wirkung der H_2O_2 -Spaltung in früheren Stadien der Reaktionen.

Zweitens: Die Konstante G , die relative (gegen B) Grenzmenge der zersetzten Katalase, sowie die prozentische Menge derselben $G/B \times 100$ nehmen mit steigenden Temperaturen zu.

Drittens: Die Zersetzungskonstante der Katalase durch H_2O_2 während der Reaktion nimmt auch mit steigender Temperatur zu.

Diese Versuchsergebnisse sind also ganz analog den Versuchsergebnissen der C und H_2O_2 -Konzentration.

Als wichtigen Charakterpunkt eines Enzyms bestimmt man oft das Optimum der Temperatur, aber bei der Katalase fällt, wie schon gesagt wurde, die Bestimmung nicht so einfach aus. Das Temperaturoptimum verändert sich zuerst mit der H_2O_2 -Konzentration. Weiter findet man ganz verschiedene Temperaturen als Optimum je nach der Reaktionszeit. Die Ursache hierfür ersieht man auf den Kurven von $k \cdot 10^3$ und $K \cdot 10^3$ bei verschiedenen Temperaturen in den Abbildungen 20 und 21. In den Anfangsstadien der Reaktion ist die Reaktionskonstante desto grösser, je höher die Temperatur ist und in späteren Stadien der Reaktion ist dieses umgekehrt, weil die Zersetzung der Katalase selbst bei höherer Temperatur grösser ist als bei niederer.

Die zur Bestätigung der Verschiedenheit der Temperaturoptima angeführten Versuche werden noch in folgender Tabelle angezeigt. Der Versuch wurde mit Oberhefeautolysat in Verdünnung auf das 50 fache wie immer ausgeführt.

Aus der Tabelle LIX sieht man mit aller Deutlichkeit, dass das Optimum der Katalasewirkung sich nach der niederen Temperatur bei verlängerter Reaktionszeit verschiebt. Das Temperaturoptimum liegt nämlich bei etwa 30° bei einer Reaktionszeit von 5 Minuten, etwa bei 15° bei einer Reaktionszeit von 30 Minuten und bei einer Temperatur unter 0° bei 120 Minuten.

Die Differenz im Temperaturoptimum zwischen dem Ergebnis von Issajews und mir ist somit einwandfrei erklärt worden.

Durch die ausgeführten Untersuchungen zur Kenntniss der Katalase-Zersetzung bei verschiedenen Temperaturen wurden mehrere Fragen betreffend der eigentlichen Enzymwirkung und der H_2O_2 -Spaltung ganz einwandfrei gelöst.

TABELLE LIX

0.4 ccm Oberhefeautolysat verdünnt in 20 ccm $n/10$ H_2O_2
 reagierender Mischung von pH 6.4

Zeit (M)	5		30		120	
Temperatur	A	A-x	A	A-x*	A	A-x
1°	20.00	18.50	20.00	12.65	20.00	3.50
10	20.00	18.20	20.00	11.675	20.00	3.95
20	20.00	17.95	20.00	11.725	20.00	4.95
30	20.00	17.90	19.80	13.475	19.75	11.875*
	$k \cdot 10^3$ bei Zeit (in Minuten)					
	5		30		120	
1°	6.772		6.631		6.308	
10	8.192		7.793		5.870	
20	9.394		7.731		5.054	
30	9.636		5.571		1.841	

* Angegebene Zahlen wurden nach der graphischen Prüfung korrigiert.

Die bei den Versuchen mit gleichen Enzymmengen unter verschiedenen Bedingungen, namentlich in verschiedenen H_2O_2 -Konzentration bzw. bei verschiedenen Temperaturen, gefundene Tatsache ist auch bemerkenswert, dass die zersetzte Katalasemenge G sowie die Geschwindigkeitskonstante C mit steigendem B -Wert, dass heisst, wenn die fermentative H_2O_2 -Spaltung in den früheren Stadien der Reaktion kräftiger ist, zunehmen. Diese Tatsache dürfte zur weiteren Entwicklung der Theorie der Katalasewirkung einen gewissen Anreiz geben.

(III) Schlussfolgerungen der unter Kapitel IV
 angegebenen Untersuchungen

- 1) Das Problem der Inaktivierung der Katalase selbst durch H_2O_2 während der Reaktion wurde mit Unter- und Oberhefekatalase als Proben ausführlich untersucht. Für die relative Initialmenge der Katalase und die bei einer Reaktionszeit vorhandenen Menge derselben habe ich zuerst $K \cdot 10^3$ und B abgeleitet. $K \cdot 10^3$ ist eine aus der monomolekularen Reaktionsformel $k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{A}{A-x}$

modifizierte Konstante und zwar $K = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \log \frac{A - x_1}{A - x_2}$, deren Verwendbarkeit zur Bestimmung der Enzymmenge mathematisch sowie experimentell ausführlich bestätigt wurde. Die Relative Initialmenge der Katalase B entspricht dem Wert, der durch Interpolierung der K -Kurve auf der Ordinate als der Wert, wo $t=0$, abgeleitet werden soll.

- 2) Der Prozess der Katalasezersetzung durch H_2O_2 folgt innerhalb gewisser Grenzen, namentlich wenn $G < B$ ist, nach der Formel $C = \frac{1}{t} = \frac{1}{B - G} \cdot \log \frac{G(B - y)}{B(G - y)}$ Die Konstante G entspricht der relativen Grenzmenge der gespaltenen Katalase und ist nach der Formel

$$G_{t_1 - t_2} = \frac{y_1^2 (B - y_2)}{B(B - y_2) - (B - y_1)^2} \quad \text{wo } 2t_1 = t_2$$

ausgerechnet worden.

- 3) Unter gleichen Bedingungen nimmt die Zersetzungskonstante C mit der steigenden Enzymmenge ab.
 4) Vergleicht man C bei einer bestimmten angewandten Enzymmenge der verschiedenen Proben, so erhält man die "Labilität" der Katalaseproben in der H_2O_2 reagierenden Mischung.
 5) Bei gleichen Enzymmengen nimmt die Konstante C mit steigender H_2O_2 -Konzentration zu.
 6) Bei gleichen Enzymmengen nimmt die Konstante C mit erhöhten Temperaturen zu.
 7) Dabei habe ich auch eine einwandfreie Erklärung über die bisherige Unklarheit betreffend des Reaktionsverlaufes der fermentativen H_2O_2 -Spaltung durch Katalase angegeben.

V. Zusammenfassung.

Am Schluss meiner Arbeit über Hefekatalase gebe ich folgende Zusammenfassung:

- 1) Mit Katalase aus Unter- und Oberhefe wurden ausführliche Untersuchungen vorgenommen.
 Zuerst wurde allgemeine Wirkungsweise beider Hefekatalasen unter Berücksichtigung des heutigen Standes der Enzymforschung untersucht, deren Resultate stets am Schluss der Versuche zusammengefasst sind.
 2) Ein Versuch über den Einfluss von Luftzufuhr während der Züchtung auf den Katalasegehalt der Bierhefe wurde auch stud-

iert. Durch dauernde Luftzufuhr während des Hefewachstums, also durch Anpassung an veränderte Lebensbedingungen, vergrößert die Hefe ihren Katalasegehalt. Das Maximum der Anreicherung an Katalase wird schon durch einmalige Züchtung unter Lüftung erreicht, während nachfolgende wiederholte Züchtungen in den angeführten Grenzen keinen fördernden Einfluss mehr auf die Katalasebildung hatten. Es gibt keinen qualitativen Unterschied zwischen beiden Hefekatalasen, der der gelüfteten und der der normalen Hefen, soweit die optimale H-Ionenkonzentration in Frage kommt.

- 3) Das Problem der Katalaseinaktivierung während der Reaktion wurde mit Hefekatalasen ausführlich untersucht. Ich habe dabei bestätigt, dass der Prozess nach der Formel

$$C = \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{B-G} \cdot \log \frac{G(B-y)}{B(G-y)}$$

verläuft.

- 4) Weiter wurde studiert die Beziehung der Katalasezersetzungs-konstanten C zu den angewandten Enzymmengen, der Einfluss der H_2O_2 -Konzentration und der Einfluss der Temperatur auf die Konstanten C . Die Resultate sind am Schlusse der entsprechenden Teile zusammengefasst.
- 5) Durch die Ergebnisse der letzten Versuchen konnte über das Wesen der Katalaseinaktivierung während der Reaktion Aufklärung gegeben werden.
- 6) Ausserdem wurde eine einwandfreie Erklärung für die bisher unklare Reaktion der fermentativen H_2O_2 -Spaltung gegeben.

LITERATUR

1. N. Wender, Die Deutsche Essigind. 34, 35, 1904. Bioch, Zbl. 3, 974.
2. W. Issajew, Zeitschr. f. phys. Chem. 42, 102, 1904.
" " 44, 546, 1905.
3. H. v. Euler u. R. Blix, Zeitschr. f. phys. Chem. 105, 83, 1919.
4. H. v. Euler u. I. Laurin, Zeitschr. f. phys. Chem. 103, 312, 1919.
5. H. v. Euler u. R. Blix, Medd. K. Vetenskapsakad. Nobelinst., 5, No. 23, I, 1919.
6. Yoshihiko Yamamoto, Zyoogaku Zasshi (Zeitschr. f. Gärungschemie, Osaka), 2 Bd. V. 370, 1927.
7. R. Willstätter u. H. Krant, Ber. d. D. chem. Ges. 5, 1118, 1923.
8. L. Michaelis, Woch. f. Brauerei, 38. Jahrgang Nr. 22, 107, 1921.
9. S. M. Maximowitsch u. E. S. Awtonomowa, Zeitschr. f. phys. chem. 174, 233, 1928.
- 10.—11. W. Issajew. I. c.
12. M. Matsuyama, Biochem Zeitschr. 213, 123, 1929.

13. H. v. Euler, *Chemie d. Enzyme I*, 2. Aufl., 189.
 14. Die diesbezügliche Literatur siehe: Euler-Lindner, "Chemie der Hefe" 328.
 - 15.—19 Zitiert auch aus "Chemie d. Hefe" (l. c.) S. 328-332.
 20. F. Hayduck u. H. Haehn, *Biochem. Zeitschr.* 128, 568, 1922.
 21. Gilty und Aberson, *Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot.* 26, 543.
 22. Chudiakow, *Landwirtschaftliche Jahrbücher, Jahrbuch* 23, S. 391, 1894.
 23. Brown, *Koch's Jahresbericht* 1892, S. 101.
 24. van Laer, *Koch's Jahresbericht* 1893, S. 139.
 25. Iwanowsky " " 1894, S. 116.
22.—25. Zitiert aus E. Buchner: "Zymasegärung" S. 358.
 26. E. Buchner, "Die Zymasegärung" S. 389.
 27. F. Henmi u. K. Tsukiashi, *Nihon Nogei Kagaku Kaishi (Zeitschr. f. Agr. Chem., Japan)* Bd. 6. Heft. 7, 583, 1930.
 28. P. Lindner: "Mikroskopische Betriebskontrolle in d. Gärungsgewerben" 4. Aufl. S. 263.
 29. H. v. Euler u. D. Josephson, *Chem. Ber.* 53, 1749, 1923.
 30. P. Lindner, "Betriebskontrolle" (l. c.) S. 265.
 31. S. Morgulis, *Jl. of Biol. Chem.* 47, 341, 1921.
 32. Siehe Oppenheimer: "Die Fermente und ihre Wirkungen" 5. Aufl. S. 362.
 33. Eiichi Yamazaki, *The Science Reports of the Tohoku Imperial University*, 9, 13, 1920.
 34. S. M. Maximowitsch u. E. S. Awtonomowa, l. c.
-