

hydrat des Kautschuks. Im Schmelzpunkt differiren diese beiden Körper; Weber giebt nämlich an, dass sein Dichlorhydrat schon bei 40° Chlorwasserstoff abspaltet.

Graz, den 8. Juni 1904.

365. A. Bach und R. Chodat: Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle.

IX. Geschwindigkeit der Peroxydase-Reaction.

(Eingegangen am 8. Juni 1904.)

Als charakteristisch für die Wirkungsweise der Fermente gilt die vielfach beobachtete Thatsache, dass bei denselben die Geschwindigkeit der Reaction dem Gesetz der Massenwirkung nicht folgt: zwar nimmt die Zeit der Reaction mit steigender Fermentmenge ab, sie ist aber Letzterer nicht umgekehrt proportional. Für einige Fermente ist sogar eine besondere Regel, die sogenannte Schütz'sche Regel, abgeleitet worden, nach welcher die Reaktionsgeschwindigkeit der Quadratwurzel aus den Fermentmengen proportional ist. Indessen giebt es auch Fermente (Invertase, Labferment), welche von dem Gesetz der Massenwirkung nicht abweichen. Allgemeine Gesetze der Fermentwirkung lassen sich also zur Zeit noch nicht aufstellen, wenn auch von verschiedener Seite es an Bestrebungen in dieser Richtung nicht fehlte<sup>1)</sup>.

Nachdem wir in der VIII. Mittheilung<sup>2)</sup> festgestellt hatten, dass Peroxydase und Hydroperoxyd bei der Oxydation des Pyrogallols stets in constanten Verhältnissen reagiren, suchten wir, um die Wirkungsweise der Peroxydase weiter kennen zu lernen, die Reaktionsgeschwindigkeit derselben bei der Activirung des Hydroperoxyds zu messen. Von den Oxydationsvorgängen, welche durch das System Peroxydase-Hydroperoxyd bewirkt werden, eignet sich nur einer, die Oxydation der Jodwasserstoffsäure, zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit, da hier der zeitliche Verlauf der Reaction durch Titration mit Thiosulfat messend verfolgt werden kann. Wie einfach aber auch sich die Ausführung dieser Reaction gestalten mag, es waren doch zahlreiche Vorversuche erforderlich, ehe es uns gelungen ist, die Bedingungen festzustellen, unter welchen brauchbare Resultate erhalten werden konnten. Die Hauptschwierigkeit lag in der ausserordentlich grossen Reaktionsgeschwindigkeit der Peroxydase. Natürlich konnte

<sup>1)</sup> Vergl. V. Henri: Lois générales de l'action des diastases. Paris 1903.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 37, 1342 [1904].

die Geschwindigkeit durch Verminderung der Peroxydaseconcentration herabgesetzt werden. Der Umsatz war aber dann so klein, dass die Messungen dadurch an Genauigkeit mehr verloren, als sie durch die Verlängerung der Reactionszeit gewannen. Als zweckmässig erwies sich schliesslich folgende Versuchsanordnung:

450 ccm einer Lösung, welche  $\frac{1}{200}$  Aequivalent Jodkalium und  $\frac{1.25}{10000}$  —  $\frac{15}{10000}$  Aequivalent Peroxydase<sup>1)</sup> enthielt, wurden mittels einer Pipette zu je 45 ccm auf 10 breithalsige, 125 ccm fassende Fläschchen vertheilt, welche in ein grösseres Wasserbad bei Zimmertemperatur gestellt waren.

Das zur Bereitung der Lösungen angewandte Wasser hatte zur Ausgleichung der Temperatur in demselben Wasserbade 24 Stunden gestanden. Die Temperatur des Zimmers (16°) schwankte während der Versuchsdauer nicht mehr als um 1°, die des Bades blieb praktisch constant. Andererseits wurde eine Lösung dargestellt, von welcher 5 ccm genau  $\frac{1}{2000}$  Aequivalent Essigsäure und  $\frac{1}{2000}$  Aequivalent Hydroperoxyd ( $\frac{H_2O_2}{2}$ ) enthielten. Der mit dieser Lösung beschickte Kolben wurde ebenfalls in das Wasserbad gestellt. Das angewandte Hydroperoxyd war das von Merck bezogene, chemisch reine Präparat.

Zu bestimmten Zeitpunkten wurden je 5 ccm der Hydroperoxyd und Essigsäure enthaltenden Lösung dem Inhalt eines Fläschchens zugesetzt und die Flüssigkeit mit einem Glasstab gut durchgemischt. Einige Sekunden vor dem Abschluss der beabsichtigten Versuchsdauer wurde das Fläschchen aus dem Wasserbade herausgenommen, unter dem Hahne einer annähernd  $\frac{1}{100}$ -normale Thiosulfatlösung enthaltende Bürette gestellt, das Reaktionsgemisch wurde mit Stärkelösung versetzt und am richtigen Zeitpunkt möglichst rasch bis zum ersten Farbenumschlag titirt. Als Anfangspunkt der Zeitählung wurde der Moment des Zubringens des Hydroperoxyd-Essigsäure-Gemisches, als Endpunkt der Beginn der Titration notirt. Letztere nahm 20—30 Sekunden in Anspruch. Die annähernd  $\frac{1}{100}$ -normale Thiosulfatlösung wurde auf reines Kaliumbichromat genau eingestellt und zur Haltbarmachung mit einer Spur Natriumcarbonat versetzt<sup>2)</sup>. Während der Versuchsdauer blieb der Titer der Thiosulfatlösung unverändert. Die Resultate wurden auf genau  $\frac{1}{100}$ -normale Lösung umgerechnet.

In dieser Weise führten wir 8 Versuchsreihen aus, wobei die Concentration des Jodkaliums, der Essigsäure und des Hydroperoxyds stets dieselbe war (je  $\frac{1}{2000}$  Aequivalent KJ,  $CH_3COOH$  und  $\frac{H_2O_2}{2}$  in 50 ccm), während die Concentration der Peroxydase von 0 auf  $\frac{15}{100000}$  Aequivalent stieg. Sämmt-

<sup>1)</sup> Wir wandten für diese Versuche dasselbe Peroxydasepräparat an, welches uns zu den früher (l. c.) beschriebenen Oxydationsversuchen mit Pyrogallol diente. Es activirte genau seinen Gewichtstheil Hydroperoxyd.

<sup>2)</sup> Ostwald-Luther: Physico-chemische Messungen. Leipzig 1902, S. 451.

liche Versuche wurden am selben Tage und unter gleichen Bedingungen ausgeführt. Die erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

| Nullreihe (ohne Peroxydase) |                                     | A ( $\frac{1.25}{100000}$ Aequiv. Peroxydase). |                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------|--|-------------------------------------|
| Zeit in Minuten             | Verbrauchte Thiosulfatlösung in ccm | Zeit in Minuten                                | Verbrauchte Thiosulfatlösung in ccm |
| —                           | —                                   | —  | —                                   |
| 1                           | —                                   | 1  | 1.3                                 |
| 2                           | 0.25                                | 2  | 2.4                                 |
| 3                           | —                                   | 3  | 3.6                                 |
| 4                           | 0.45                                | 4  | 4.4                                 |
| 5                           | —                                   | 5  | 5.3                                 |
| 6                           | 0.6                                 | 6  | 6.1                                 |
| 8                           | 0.8                                 | 8  | 7.1                                 |
| 10                          | 0.9                                 | 10   | 7.9                                 |
| 12                          | 1.1                                 | 12   | 8.1                                 |
| 20                          | 1.6                                 | 20   | 8.4                                 |

| B ( $\frac{2.5}{100000}$ Aequiv. Peroxydase). |                | C ( $\frac{5}{100000}$ Aequiv. Peroxydase). |                |
|---|----------------|---|----------------|
| Minuten                                       | ccm Thiosulfat | Minuten                                     | ccm Thiosulfat |
| —   | —              | —   | —              |
| 1   | 2.4            | 1   | 4.9            |
| 2   | 4.7            | 2   | 8.9            |
| 3   | 6.6            | 3   | 12.1           |
| 4   | 8.4            | 4   | 14.0           |
| 5   | 9.5            | 5   | 14.4           |
| 6   | 10.2           | 6   | 14.7           |
| 8   | 11.7           | 8   | 15.0           |
| 10  | 11.8           | 10  | 15.1           |
| 12  | 12.0           | 12  | 15.1           |
| 20  | 12.3           | 20  | 15.4           |

| D ( $\frac{7.5}{100000}$ Aequiv. Peroxydase). |                | E ( $\frac{10}{100000}$ Aequiv. Peroxydase). |                |
|---|----------------|--|----------------|
| Minuten                                       | ccm Thiosulfat | Minuten                                      | ccm Thiosulfat |
| —   | —              | —  | —              |
| 1   | 7.3            | 1  | 10.1           |
| 2   | 13.3           | 2  | 15.7           |
| 3   | 15.5           | 3  | 16.9           |
| 4   | 16.0           | 4  | 17.0           |
| 5   | 16.2           | 5  | 17.1           |
| 6   | 16.2           | 6  | 17.1           |
| 8   | 16.3           | 8  | 17.2           |
| 10  | 16.3           | 10   | 17.2           |
| 12  | 16.3           | 12   | 17.2           |
| 20  | 16.4           | 20   | 17.4           |

$$F \left( \frac{12.5}{100000} \text{ Aequiv. Peroxydase} \right).$$

| Minuten | ccm Thiosulfat |
|---------|----------------|
| 1       | 12.2           |
| 2       | 17.1           |
| 3       | 18.2           |
| 4       | 18.3           |
| 5       | 18.2           |
| 6       | 18.3           |
| 8       | 18.3           |
| 10      | 18.4           |
| 12      | 18.4           |
| 20      | 18.5           |

$$G \left( \frac{15}{100000} \text{ Aequiv. Peroxydase} \right).$$

| Minuten | ccm Thiosulfat |
|---------|----------------|
| 1       | 15.0           |
| 2       | 18.6           |
| 3       | 18.9           |
| 4       | 19.1           |
| 5       | 19.1           |
| 6       | 19.1           |
| 8       | 19.2           |
| 10      | 19.2           |
| 12      | 19.3           |
| 20      | 19.4           |

Trägt man die Minuten auf der Abscissen- und die Cubikcentimeter der verbrauchten Thiosulfatlösung auf der Ordinaten-Axe ein, so erhält man folgende Curven.

$$A : B : C : D : E : F : G = 1 : 2 : 4 : 6 : 8 : 10 : 12.$$

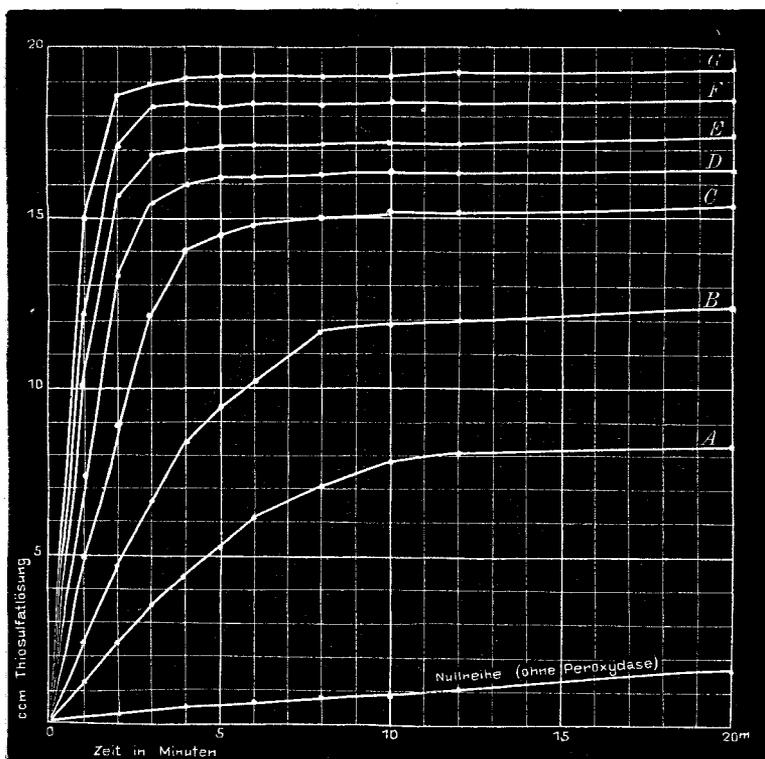


Fig. 1.

Aus obigen Tabellen ergibt sich zuerst, dass die Peroxydase bei der Oxydation der Jodwasserstoffsäure, ebenso wie bei der Oxydation des Pyrogallols, im Activirungsprocesse des Hydroperoxyds verbraucht wird, da die Reaction bald zu einem Zustand kommt, bei welchem sie genau, wie ohne Peroxydasezusatz, verläuft. Die Geschwindigkeit der Zerstörung der Peroxydase wächst dabei mit der Peroxydaseconcentration, aber schneller als Letztere. Die Grösse des Umsatzes ist hier nicht mehr, wie bei der Oxydation des Pyrogallols, der Peroxydasemenge proportional. Berechnet man — unter Abzug der bei der Nullreihe ermittelten Werthe — den Umsatz auf Grund der bei Versuch A verbrauchten Thiosulfatmenge, so erhält man folgende Zahlen:

$$\text{Berechnet: } A : B : C : D : E : F : G = 6.8 : 13.6 : 27.2 : 40.8 : 54.4 : 68.0 : 81.6.$$

$$\text{Gefunden: } \quad \quad \quad 1 \quad 2 \quad 4 \quad 6 \quad 8 \quad 10 \quad 12 \quad \quad \quad 6.8 : 10.6 : 13.8 : 14.8 : 15.8 : 16.9 : 18.0.$$

Aus den Tabellen geht weiter die ganz unerwartete Thatsache hervor, dass bei der Katalyse der Reaction zwischen Jodwasserstoffsäure und Hydroperoxyd die Peroxydase ein viel grösseres Activirungsvermögen zeigt, als bei der Oxydation des Pyrogallols. Während in letzterem Falle die Peroxydase mit genau ihrem Gewichtstheil Hydroperoxyd in Reaction trat, activirte sie in ersterem folgende Hydroperoxydmengen:

$$\begin{array}{ccccccc} A & B & C & D & E & F & G \\ \text{Gewichtstheile: } & 5.44 & 4.36 & 2.56 & 1.97 & 1.58 & 1.37 & 1.20. \end{array}$$

Die Ursache dieses Unterschiedes scheint von ziemlich complicirter Natur zu sein und kann nur durch weitere Versuche aufgeklärt werden.

Will man nun die Geschwindigkeit der Peroxydasereaction beurtheilen, so muss man die Thatsache berücksichtigen, dass die Wirksamkeit der Peroxydase um so schneller abnimmt, je grösser die Peroxydaseconcentration ist. Die mit verschiedenen Concentrationen erhaltenen Ergebnisse sind daher nur dann vergleichbar, wenn man Reactionsphasen wählt, bei welchen die Peroxydase noch nahezu ihre volle Wirksamkeit ausübt. Zeichnet man die Peroxydaseconcentrationen auf der Abscissen- und die verbrauchte Thiosulfatmengen auf der Ordinaten-Axe, so erhält man das aus Fig. 2 (S. 2439) ersichtliche Bild des zeitlichen Verlaufes der Peroxydasezerstörung.

Am Ende der 1. Minute behält hiernach die Peroxydase noch in allen Fällen ihre volle Wirksamkeit bei. Die Grösse des Umsatzes ist hier den Peroxydasemengen innerhalb des Versuchsfehlers genau proportional: die Concentrationsfunction ist durch eine gerade Linie ausgedrückt. Am Abschluss der 2. Minute ist die Proportionalität nur

bei den Concentrationen  $A - E$ , am Abschluss der 3. Minute nur bei  $A - C$ , am Abschluss der 4. Minute nur bei  $A - B$  ersichtlich.

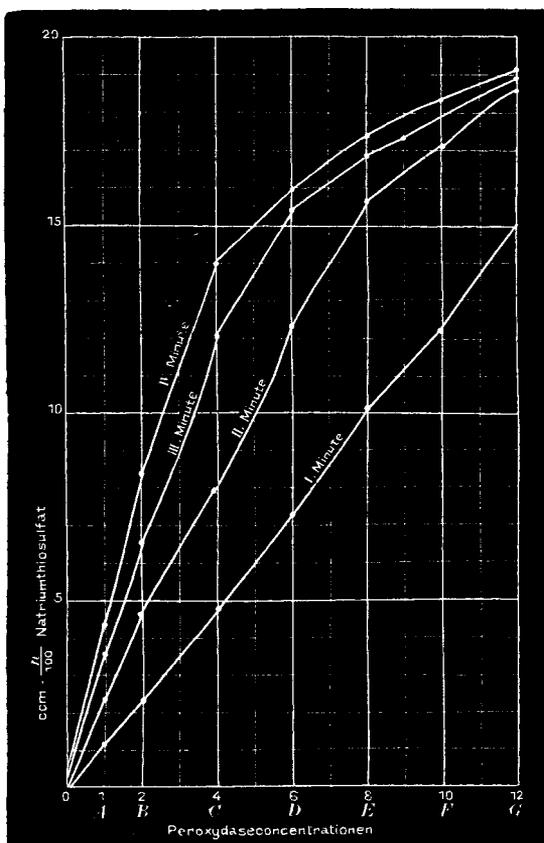


Fig. 2.

Wählt man also Reaktionsphasen aus, bei welchen die Peroxydase noch ungestört wirkt, und vergleicht man z. B. für die Concentrationen  $D, E, F, G$  die Zeiten, welche dem Verbrauch von 13 ccm Thiosulfatlösung entsprechen, so hat man folgende Werthe:

$$D:E:F:G = 1.9:1.5:1.15:0.9.$$

6    8    10    12

Das Product aus Peroxydasemenge und Reaktionszeit ( $Pt$ ) ist hier im wesentlichen eine Constante:

$$Pt = 11.4, 12.0, 11.5, 10.8.$$

Bei  $B, C$  und  $D$  verhalten sich die Zeiten, welche dem Verbrauch von 8 ccm Thiosulfat entsprechen, wie:

$$B:C:D = 3.75:1.85:1.20.$$

2    4    6

$$Pt = 7.50, 7.40, 7.20.$$

Aus diesen Versuchen kann mit voller Sicherheit geschlossen werden, dass die Geschwindigkeit der Peroxydasereaction dem Gesetz der Massenwirkung folgt, insofern die Reaction durch die auftretenden Reactionsproducte nicht gestört wird. In welcher Weise diese Störung erfolgt, ist noch nicht näher ermittelt worden.

Die Frage, ob die Peroxydase als Ferment anzusehen ist, glauben wir bejahend beantworten zu dürfen. Zwischen der Peroxydase und den anderen Fermenten besteht nur ein Unterschied. Während Letztere im Verlauf der von ihnen ausgelösten Reactionen mehr oder weniger vollständig regenerirt werden und daher im Verhältniss zu ihrer eigenen Quantität sehr grosse Mengen des Substrates zu verwandeln im Stande sind, wird die Peroxydase im Prozesse der Hydroperoxydactivirung völlig und rasch verbraucht. Die Regenerirbarkeit des activen Principis ist aber für die Fermentnatur desselben keineswegs ausschlaggebend, da die Wirkung der Fermente doch eine mehr oder weniger begrenzte ist.

Die Peroxydase theilt dagegen mit anderen »organischen Katalysatoren« (Oppenheimer) ihren Ursprung, ihre Darstellungsweise, die Zerstörbarkeit durch Hitze, die Specificität. Wenn sie bei ungestörter Reaction dem Gesetz der Massenwirkung folgt, so thut es auch das Labferment (Fuld), die Invertase (O'Sullivan und Thompson, Henri) und, nach Senter<sup>1)</sup>, die Katalase. Weiss<sup>2)</sup>, welcher vor kurzem die proteolytischen Enzyme der keimenden Gerste einer eingehenden Untersuchung unterzog, construirte für die Wirkungsweise der »Malzpeptase« Curven, denen die von uns erhaltenen auffallend ähnlich sind.

Unserer Ansicht nach giebt es viel mehr Gründe, die Peroxydase unter die Fermente zu zählen, als ihr die Fermentnatur abzusprechen. Schlägt man letzteren Weg ein, wie es Oppenheimer<sup>3)</sup> zu thun scheint, so wird dadurch die verwickelte Frage nach den in der lebenden Zelle thätigen, katalytisch wirkenden Oxydationsagentien in keiner Hinsicht klarer oder ihrer Lösung näher gebracht.

Genf. Pflanzenchem. Laboratorium des Botanischen Institutes.

<sup>1)</sup> Zeitschr. für physikal. Chem. 41, 257 [1903].

<sup>2)</sup> Comptes rendus des trav. du lab. de Carlsberg 5, 3, 196 [1903].

<sup>3)</sup> Oppenheimer, Die Fermente. Leipzig 1903, S. 351, 367.