

3. Über Kürbis-Katalase

von L. Emden.

(29. X. 46.)

Während die tierischen Katalasen, besonders die Pferdeleber-Katalase, von verschiedenen Forschern^{1) 2) 3)} eingehend bearbeitet worden sind, ist über Pflanzen-Katalasen nur wenig mitgeteilt worden. Der Grund dafür liegt wohl in der grossen Empfindlichkeit und geringen Stabilität dieser Enzyme. *K. Zeile*⁴⁾ gibt eine knappe Vorschrift zur Darstellung von Katalase aus Kürbis-Kotyledonen. Nach seinen Angaben wurde die bisher wirksamste Lösung einer pflanzlichen Katalase erhalten, die jedoch ihre Wirksamkeit bereits nach einem Tag allmählich verliert.

Diese Mitteilung soll als Beitrag zur Kenntnis der Kürbis-Katalase eine Darstellungsvorschrift bringen, nach welcher anscheinend reine und relativ beständige Lösungen dieses Enzyms erhalten werden können.

1. Bestimmung der Katalase.

Als Mass für die Wirksamkeit des Enzyms gilt die Reaktionskonstante k der monomolekularen Reaktion der H_2O_2 -Zerlegung meist⁵⁾ in folgender Form:

$$k = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x},$$

worin t die Zeit in Minuten, a die Anfangskonzentration und x die umgesetzte Menge des Hydroperoxyds bedeutet.

Die Menge des jeweils vorhandenen Hydroperoxyds wird durch Titration mit $KMnO_4$ in schwefelsaurer Lösung bestimmt⁶⁾.

In zweckmässiger Weise wird die Reaktionskonstante k nach *H. v. Euler* bei einer Konzentration des $H_2O_2 = 0,005$ — $0,015$ molar, bei $0^\circ C$ und in $m/150$ Phosphatpuffer vom $p_H = 6,8$ ermittelt.

¹⁾ *H. v. Euler* und *K. Josephson*, *A.* **452**, 158 (1927); *A.* **455**, 1 (1927).

²⁾ *K. Zeile* und *H. Hellström*, *Z. physiol. Ch.* **192**, 171 (1930); *K. Zeile*, *Z. physiol. Ch.* **195**, 39 (1931).

³⁾ *J. B. Sumner* and *A. L. Dounce*, *Sci.* **85**, 366 (1937); *J. Biol. Chem.* **121**, 417 (1937); *A. L. Dounce* and *O. Frampton*, *Sci.* **89**, 300 (1939); *J. B. Sumner*, *A. L. Dounce* and *V. L. Frampton*, *J. Biol. Chem.* **136**, 343 (1940).

⁴⁾ *K. Zeile*, *Z. physiol. Ch.* **195**, 39 (1931), speziell S. 45.

⁵⁾ Vgl. jedoch *H. v. Euler*, *Chemie der Enzyme*, II, 3, S. 73, München 1934.

⁶⁾ *E. Bamann* und *K. Myrbäck*, *Die Methoden der Fermentforschung*, 1941, Bd. III, S. 2621.

Das Mass der „Aktivität“ als Mass der Reinheit solcher Enzympräparate ist nach *H. v. Euler* durch den Katalase-Wert „Kat. f.“ definiert wie folgt:

$$\text{Kat. f.} = \frac{k \text{ (bei } p_{\text{H}} = 6,8-7,0 \text{ in } 0,015 \text{ mol } \text{H}_2\text{O}_2\text{)}}{\text{g Enzym in } 50 \text{ cm}^3}$$

Ausführung der Bestimmung¹⁾: In einen Rundkolben gibt man 10 cm³ m/15 Phosphat-Puffer $p_{\text{H}} = 7$, 10 cm³ 0,15 mol. H₂O₂ und 80 - b cm³ dest. H₂O und temperiert dieses Gemisch auf 0°. Dann gibt man die Enzymlösung = b cm³ hinzu. Damit ist der Zeitpunkt des Reaktionsbeginns gegeben. Unmittelbar nachher entnimmt man dem Ansatz 10 cm³ und pipettiert diese Menge in einen Titrierkolben, der etwa 30 cm³ verdünnte H₂SO₄ enthält. Dadurch wird die Wirkung des Enzyms gestoppt. Dann wird mit 0,1-n. KMnO₄ titriert. (Für eine exakte Bestimmung der zum Zeitpunkt 0 vorhandenen Menge H₂O₂ titriert man besser $\frac{1}{10}$ der im Versuch angewendeten H₂O₂-Menge in einem besonderen Ansatz, wofür 3 cm³ 0,1-n. KMnO₄-Lösung gebraucht werden sollten.) Die Titrations werden zweckmässigerweise in Abständen von 30 Sekunden wiederholt. Die Reaktionskonstante k wird einzeln für jede einzelne Titration berechnet. Eine einfache graphische Extrapolation auf den Zeitpunkt des Reaktionsbeginns ergibt die von der Enzym-Zerstörung unabhängige Reaktionskonstante k.

Beispiel der Berechnung des Katalasewertes Kat. f.: Eine Bestimmung mit 0,1 cm³ Katalase-Lösung ergibt den Wert k = 0,240. 0,1 cm³ dieser Lösung haben ein Trockengewicht von 0,66 mg, also befinden sich 0,33 mg = 0,00033 g Enzym in 50 cm³ Versuchsansatz. Der Katalasewert wird damit:

$$\text{Kat. f.} = \frac{0,240}{0,00033} = 730.$$

2. Bildung der Katalase bei der Keimung von Kürbis-kotyledonen.

Um für die Darstellung der Kürbis-Katalase ein möglichst enzymreiches Ausgangsmaterial zu erhalten, wurde die Bildung der Katalase in den keimenden Kürbiskernen verfolgt. *H. v. Euler*, *K. Myrbäck* und *S. Myrbäck* haben in ihrer Untersuchung „Zur Bestimmung der Katalase in Pflanzenmaterial“²⁾ gezeigt, dass der Katalase-Gehalt während der Keimung ein Maximum durchläuft und dass sich die Katalase dabei in den oberen Pflanzenteilen anhäuft. Über den Katalase-Gehalt von Kürbis-Kotyledonen liegen nur ungefähre Angaben von *K. Zeile*³⁾ vor, nach welchen „gewöhnlich am 5. Tage“ der Keimung das Maximum der katalatischen Aktivität erreicht sein soll.

In eigenen Versuchen wurden deshalb Keimlinge verschiedenen Alters auf ihren Katalase-Gehalt hin geprüft, wobei grössere Keimlinge in Wurzel, Stengel und Kotyledonen getrennt wie folgt zur Aufarbeitung gelangten:

Das gewogene, mit festem Kohlendioxyd eingefrorene Pflanzenmaterial wurde fein zerkleinert, beim Auftauen mit der doppelten Gewichtsmenge 5-proz. Natriumphosphat-Lösung (Na₂HPO₄, $p_{\text{H}} = 8,4$) aufgenommen, die Lösung abzentrifugiert und 0,1 cm³ davon zur Katalase-Bestimmung verwendet.

¹⁾ *A. Bertho* und *W. Grassmann*, Biochemisches Praktikum, 1936, S. 194.

²⁾ *Z. physiol. Ch.* **186**, 212 (1930), speziell S. 219.

³⁾ *Z. physiol. Ch.* **195**, 39 (1931), speziell S. 45.

Die Kurve der Figur 1 zeigt die dabei erhaltenen Werte der Reaktionskonstante k . Der Verlauf dieser Werte in bezug auf die Keimzeit lässt erkennen, dass der anfangs sehr niedrige Katalase-Gehalt bereits nach halbtägiger Keimung stark zu steigen beginnt, um nach den ersten 60 Stunden in den Kotyledonen ein Maximum zu erreichen. Dieses Maximum bleibt etwa 2 Tage lang erhalten, worauf der Katalasegehalt rasch abfällt.

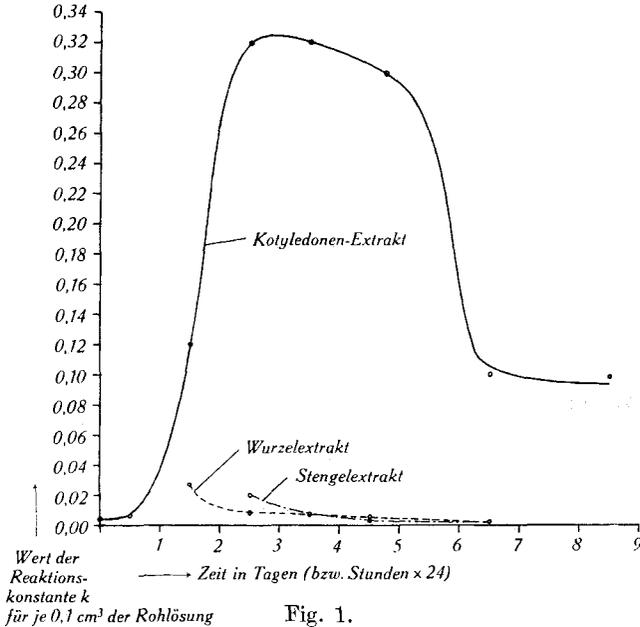


Fig. 1.

Die Wurzeln und Stengel der Keimlinge enthalten anfänglich auch ein wenig Katalase, die indessen bald wieder verschwindet.

3. Reinigung der Kürbis-Katalase.

Die verschiedenen Operationen zur Reinigung der Kürbis-Katalase sollen an dem folgenden Beispiel beschrieben werden.

a) Gewinnung der Rohlösung: 240 g Kürbis-Kotyledonen im Alter von 3–4 Tagen werden mit festem Kohlendioxyd eingefroren und vermahlen. Das Mahlgut wird mit 480 cm³ 5-proz. Na₂HPO₄-Lösung aufgenommen und bei 4° eine Stunde lang geschüttelt. Darauf zentrifugiert man das Gemisch, wobei sich, wie es *K. Zeile*¹⁾ beschreibt, drei Schichten bilden, deren unterste aus Pflanzenteilchen, deren mittlere aus einer Katalase-haltigen Rohlösung und deren obere aus fettartigen Substanzen besteht, wie es die Fig. 2a zeigt.

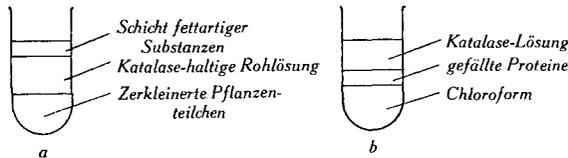


Fig. 2.

1) loc. cit.

b) Entfernung von begleitenden Proteinen mittels Chloroform und Alkohol: Die Katalase-haltige Rohlösung = 430 cm^3 wird 3 Minuten lang mit 430 cm^3 Chloroform, dem 43 cm^3 absoluten Alkohols zugesetzt sind, geschüttelt und anschliessend zentrifugiert. Hierbei bilden sich drei Schichten, wie dies in Fig. 2 b gezeichnet ist: Die unterste besteht aus Chloroform, die Mittelschicht aus gefällten Proteinen und die obere aus einer von anderen Proteinen teilweise befreiten Katalase-Lösung, deren Volumen 410 cm^3 beträgt.

c) Dialyse der Rohlösung nach der Protein-Fällung: Die mit Chloroform-Alkohol gefällte Lösung wird etwa 3 Tage lang gegen $m/150$ Phosphat-Puffer vom $p_H = 7$ dialysiert. Dabei nimmt das Volumen der Lösung auf 600 cm^3 zu und die Wirksamkeit auf etwa 60% des ursprünglichen Wertes ab. Der Katalasewert Kat. f. beträgt dann ca. 300 bei einem Trockengewicht von $12,3 \text{ mg pro cm}^3$.

d) Voradsorption von Ballaststoffen der dialysierten Lösung an Tricalciumphosphat¹⁾: 600 cm^3 der dialysierten, jetzt neutralen Lösung mit einem Substanzgehalt von $7,38 \text{ g}$ werden 5 Minuten lang mit $3,7 \text{ g}$ Tricalciumphosphat geschüttelt. Die davon abzentrifugierte Lösung enthält noch 83% des Gehaltes der dialysierten Rohlösung und weist einen Katalasewert Kat. f. von 435 bei einem Trockengewicht von $7,2 \text{ mg pro cm}^3$ auf.

e) Adsorption des Enzyms aus der dialysierten Lösung an Tricalciumphosphat: 600 cm^3 der so vorbehandelten Lösung mit einem Substanzgehalt von $4,32 \text{ g}$ werden durch Zusatz von $400 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4$ auf einen p_H -Wert von 6,6 gebracht und dann mit $4,3 \text{ g}$ Tricalciumphosphat geschüttelt. Anschliessend wird das Gemisch zentrifugiert. Das Zentrifugat besitzt noch 28% der Wirksamkeit und wird deshalb nochmals mit 356 mg Tricalciumphosphat geschüttelt und daraufhin zentrifugiert. Dieses zweite Zentrifugat weist dann noch 17% der Wirksamkeit auf und wird verworfen.

f) Elution der Katalase aus den Tricalciumphosphat-Adsorbaten: Die beiden Tricalciumphosphat-Adsorptionen werden gemeinsam mit 70 cm^3 einer 2-proz. Ammoniumphosphatlösung eluiert. Diese Elution besitzt nach dem Abzentrifugieren des Tricalciumphosphates 43% der Wirksamkeit der vorbehandelten Lösung. Das Tricalciumphosphat wird sodann ein zweites Mal mit 30 cm^3 derselben Ammoniumphosphatlösung eluiert. So werden weitere 8,5%, zusammen also 51,5% des Enzyms wieder in Lösung gebracht.

Bei dieser Reinigungsoperation ist der Verlust an Enzym sehr gross, wahrscheinlich infolge der schwach sauren Reaktion während der Adsorption. Nach *H. v. Euler, K. Myrbäck* und *S. Myrbäck*²⁾ ist Katalase aus Gerstenkeimlingen nur im Bereich von $p_H = 6,8$ bis $p_H = 8,2$ einigermassen beständig. Nach eigenen Versuchen scheint dies auch für die Kürbis-Katalase zuzutreffen. Es ist also die Adsorption an Tricalciumphosphat so rasch wie möglich und unter Kühlung auszuführen.

g) Dialyse der Ammoniumphosphat-Elutionen: Die vereinigten Elutionen bilden eine klare, hellgelbe Lösung. Diese wird etwa 72 Stunden lang gegen $m/300$ Phosphat-Puffer vom $p_H = 7,2$ dialysiert. Eine sich während der Dialyse bildende leichte Trübung wird abzentrifugiert. Der Katalasewert Kat. f. dieser gereinigten Lösung beträgt dann rund 1000 bei einem Trockengewicht von $5,75 \text{ mg pro cm}^3$.

4. Elektrophorese-Versuche mit Kürbis-Katalase.

Die beschriebene Reinigung der Kürbis-Katalase ist fortlaufend durch Elektrophorese-Versuche kontrolliert worden³⁾. Dabei erwiesen sich Lösungen vom Katalasewert Kat. f. = 1000 als frei von elektrophoretisch nachweisbaren Begleitstoffen. Daraufhin wurde eine Lösung vom Katalasewert Kat. f. = 1050 in der präparativen Elektro-

¹⁾ *M. Tsuchihashi*, *Bioch. Z.* **140**, 63 (1923).

²⁾ *Z. physiol. Ch.* **186**, 212 (1930), speziell S. 217.

³⁾ Die Ausführung und Ergebnisse dieser Versuche verdanke ich *Hrn. Dr. E. Wiedemann*.

phorese-Zelle von *A. Tisclius* der Wanderung unterworfen und der bei $p_H = 7,2$ anodisch gewanderte Anteil in drei Fraktionen der Zelle entnommen. Die Katalasewerte Kat. f. dieser Fraktionen wurden zu: I = 1045, II = 1065 und III = 1010, also innerhalb der Fehlergrenze als gleich bestimmt. Die elektrophoretische Einheitlichkeit der Kürbis-Katalase vom Kat. f. = 1000 dürfte damit erwiesen sein.

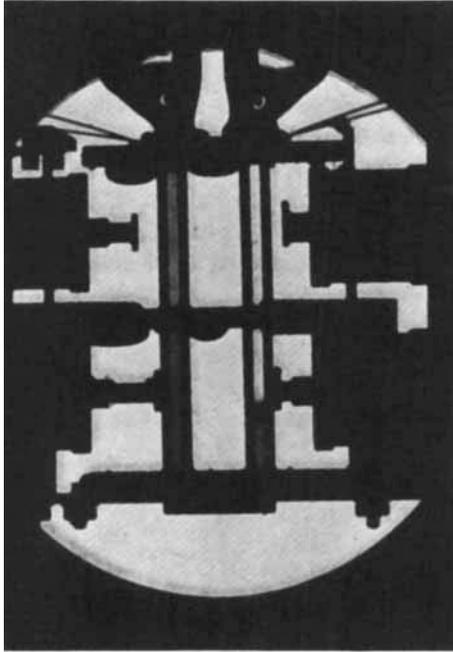


Fig. 3.

In Fig. 3 ist die Aufnahme eines nach der Schlierenmethode registrierten analytischen Elektrophorese-Versuches mit einer Kürbis-Katalase-Lösung vom Katalasewert Kat. f. = 1030 wiedergegeben. Der Versuch wurde bei einem p_H -Wert von 7,2 ausgeführt. Ausser den beiden Grenzflächen und einem schwach ausgeprägten θ -boundary war keine weitere Gradienten-Ausbildung zu erkennen, so dass das Präparat als elektrophoretisch einheitlich angesehen werden darf.

Da der Katalase-Wert der Kürbis-Katalase etwa 30mal kleiner ist als derjenige der Leber-Katalase, bleibt zu untersuchen, ob die elektrophoretisch einheitlich befundenen Präparate noch weiter gereinigt werden können oder ob der relativ niedrige Katalase-Wert durch ein relativ grosses Teilchengewicht erklärt werden kann. Die Einheitlichkeit wäre unter anderem durch Aufnahme von Diffusionsgradienten und das Teilchengewicht durch Messung der Sedimentationskonstante festzustellen. Diesbezügliche Versuche mussten vorläufig zurückgestellt werden.

Chemisch-pharmazeutisches Laboratorium „Sandoz“
(Prof. Dr. A. Stoll), Basel.