

16. Zur Kinetik der Peroxydspaltung durch Katalase

von R. Gressly, H. Erlenmeyer und H. Aebi

(8. XII. 58)

Die grosse Empfindlichkeit der Katalase gegenüber H_2O_2 ¹⁾ zwingt bei der Aktivitätsbestimmung zur Einhaltung kurzer Inkubationszeiten bei niedriger Versuchstemperatur (0°) und zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit (V_0) der H_2O_2 -Spaltung durch Extrapolation nach $t = 0$. Die Bestimmung der Katalase-Aktivität nach der «klassischen» Methode²⁾ bietet unter diesen Bedingungen zwar keine Schwierigkeiten, da die Wechselzahl der Katalase sehr gross ist³⁾. Bei der Durchführung grösserer Reihenuntersuchungen wird man sich dagegen zu Konzessionen bereit finden müssen und einer vereinfachten Methodik den Vorzug geben. Zur Katalasebestimmung in Blut und Geweben hat sich z. B. die von FEINSTEIN⁴⁾ angegebene Methode – vor allem wegen ihrer Handlichkeit und Zuverlässigkeit – als sehr geeignet erwiesen (vgl. z. B. ⁵⁾). An Stelle von freiem H_2O_2 wird hier Na-Perborat als Substrat verwendet und es wird nicht wie üblich bei 0°, sondern bei 37° inkubiert. Es sind somit die Art des Substrates sowie die Versuchstemperatur, durch welche sich das FEINSTEIN'sche Verfahren von den «klassischen» Methoden unterscheidet. Der Einfluss dieser beiden Faktoren auf den Verlauf der Zeit-Umsatzkurve ist in dieser Arbeit nicht so sehr aus Gründen der Vergleichbarkeit untersucht worden, sondern weil sich die beiden Methoden gegenüber verschiedenen Inhibitor-Wirkungen als recht ungleich empfindlich erwiesen haben.

Experimenteller Teil

1. *Methodisches.* Die Bestimmung der Katalase-Aktivität erfolgte im Prinzip nach FEINSTEIN⁴⁾. Zur Erzielung einer stärkeren Pufferung wurden Perborat- und Phosphat-Lösung auf pH 7,0 (pH-Optimum der Katalase) eingestellt. Zusammensetzung des Ansatzes: 6 ml 0,1-m. $\text{NaBO}_3 + 2$ ml 0,07-m. Na-Phosphat + 2 ml Enzymlösung (kristallisierte Katalase «BOEHRINGER») bzw. verdünntes Leberhomogenat (Ratte, Maus). Die Enzymkonzentration betrug in der Regel 1,5 γ kristallisiertes Enzym (Kat. F. 32000) bzw. 0,5 mg Lebergewebe pro Ansatz zu 10 ml. Die Kontrollansätze enthielten H_2O dest. anstelle der Enzymlösung. Verwendete Reagenzien: Na-Perborat, Perhydrol und Na-Azid «MERCK» *p.a.* Betreffend Darstellung von Histidin- H_2O_2 siehe ⁶⁾.

Bei der Inkubierung der meist ca. 30 Ansätze umfassenden Versuchsreihen arbeiteten jeweiligen 2 Untersucher nach Zeittabelle zusammen. Während des Temperaturnausgleiches und der Inkubierung wurden die Proben rotierend geschüttelt. Der Vorgang des «Startens» (= Enzymzugabe) und «Löschens» (= Unterbrechen der Reaktion durch Zugabe von 2-n. H_2SO_4) erfolgte mit einer Kadenz von 30 sec und wurde durch das Anbringen einer durch Fusstaste auslösbaren Unterbrechervorrichtung erleichtert. Die Reduktion der zeitlichen Verschiebung auf ein Minimum drängt sich besonders beim Arbeiten mit verdünnten Lösungen von Reinenzym auf, weil es bereits

¹⁾ S. MORGULIS, J. biol. Chemistry **92**, 377 (1931).

²⁾ a) U. S. v. EULER & K. JOSEPHSON, Liebigs Ann. Chem. **452**, 158 (1927); b) K. BONNICHSEN, B. CHANCE & H. THEORELL, Acta chem. scand. **1**, 685 (1947).

³⁾ R. F. BEERS & T. W. SIZER, J. biol. Chemistry **195**, 133 (1952).

⁴⁾ R. N. FEINSTEIN, J. biol. Chemistry **180**, 1197 (1949).

⁵⁾ H. AEBI, E. FREI, R. KNAB & P. SIEGENTHALER, Helv. physiol. Acta **15**, 150 (1957).

⁶⁾ W. DIRSCHERL & K. O. MOSEBACH, Naturwiss. **41**, 552 (1954).

nach Ablauf weniger Min. zu einer merklichen Aktivitätsabnahme kommt. Bei Reihenversuchen empfiehlt es sich daher, in regelmässigen Abständen (z. B. alle 4–5 Ansätze) einen «Katalase-Standard» anzusetzen.

2. *Vergleichende Aktivitätsbestimmung mit verschiedenen Peroxyden als Substrat.* Sowohl bei 0° als auch bei 37° werden Na-Perborat, Harnstoff-H₂O₂ und Picolinsäure-H₂O₂ als 0,06-m. Lösungen durch Katalase mit etwa gleicher Geschwindigkeit, freies H₂O₂ dagegen etwas rascher gespalten. Diese Feststellung trifft für Reinenzym und für Leberhomogenat zu. Der in Tab. 1 wiedergegebene Vergleich zeigt ferner, dass sich nach 2- und nach 5 Min. analoge Werte ergeben, d. h. dass der Verlauf der Zeit-Umsatzkurve ein ähnlicher ist.

Tabelle 1. *Vergleichende Bestimmung der Katalase-Aktivität von Leberhomogenat (Maus; Verdünnung 1:4000) mit verschiedenen Substraten.* Versuchstemperatur 0°. Alle Ansätze enthielten zudem 0,013-m. Na-Phosphat, pH = 7,0

Substrat (Konzentration: 0,06-m.)	Inkubationsdauer in Min. und zugehörige Peroxyd- spaltung (Absolutwert in mÄq. KMnO ₄)	entspr. H ₂ O ₂ - Spaltung, % (Perboratspaltung = 100%)	Differenz
Na-Perborat . . .	2: 1,90; 5: 3,27	100; 100	–
Harnstoff·H ₂ O ₂ .	2: 1,82; 5: 3,20	95,8; 97,9	– 4,2%; – 2,1%
Picolinsäure·H ₂ O ₂	2: 1,72; 5: 2,77	90,5; 84,8	– 9,5%; – 15,2%
freies H ₂ O ₂ . . .	2: 2,09; 5: 3,72	110,0; 113,8	+ 10,0%; + 13,8%

Zur weiteren Abklärung des zwischen freiem H₂O₂ und Perborat bestehenden Aktivitätsunterschiedes wurde der Einfluss des «begleitenden» Borat-Ions wie folgt zu erfassen versucht: Es wurde der bei Gegenwart von Perborat resultierende Umsatz mit demjenigen eines Borat und (freies) H₂O₂ enthaltenden Ansatzes verglichen. Wie aus Fig. 1 ersichtlich, wird H₂O₂ in Gegenwart einer äquivalenten Menge Borat (0,06-m. Endkonzentration) gleich rasch gespalten wie Perborat. Durch 0,06-m. Borat wird somit die Katalase-Aktivität unter den hier gewählten Versuchsbedingungen um ca. 12% herabgesetzt.

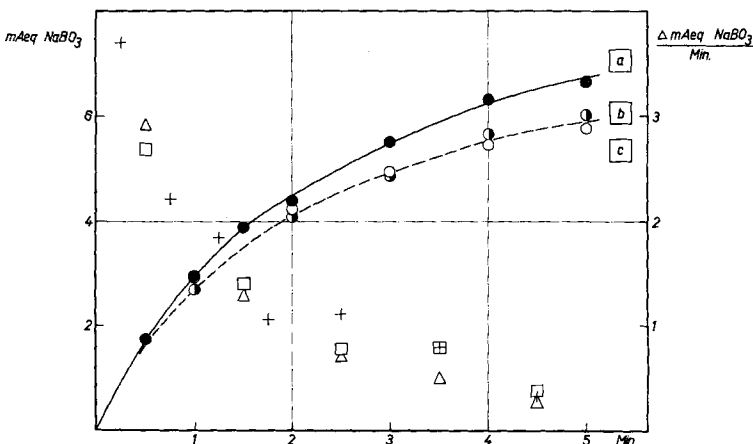


Fig. 1. *Zeit-Umsatzkurve der Katalase bei Verwendung verschiedener Substrate:* a) H₂O₂ (● bzw. +); b) H₂O₂ + Na-Borat (◐ bzw. ◑); c) Na-Perborat (◒ bzw. ◓), je 0,06-m. Alle Ansätze zusätzlich gepuffert mit 0,013-m. Phosphat. Versuchstemperatur 0°. Enzym: kristallisierte Leberkatalase. Ordinate links: Gesamtumsatz; rechts: ds/dt

Ein analoges Ergebnis zeitigen Experimente mit Perborat als Substrat, bei denen der Einfluss eines Picolinsäurezusatzes auf die Katalase-Aktivität untersucht wurde. Während 10^{-5} -m. Picolinsäure die Katalase-Aktivität gar nicht beeinflusst, bewirkt eine Erhöhung der Picolinsäurekonzentration auf 10^{-3} -m. eine Hemmung von -13% , auf $5 \cdot 10^{-2}$ -m. eine solche von -25% . Die etwas geringere Aktivität, welche Katalase dem Substrat Picolinsäure- H_2O_2 gegenüber im Vergleich zu Perborat zeigt, stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Peroxydspaltung in Gegenwart von Picolinsäure etwas langsamer erfolgt als mit Borat. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, nimmt das Ausmass der Peroxydspaltung in Gegenwart verschiedener «Peroxid-Träger» in der Reihenfolge Borat $>$ Harnstoff $>$ Picolinsäure ab.

Die in allen Fällen ausgeprägte Reaktionsverzögerung ist nur zum geringsten Teil auf eine Abnahme der Substratkonzentration zurückzuführen, sondern vor allem auf die unter diesen Bedingungen in jedem Fall rasch eintretende Inaktivierung der Katalase infolge Bildung von (inaktivem) Komplex II. Fig. 1 zeigt, dass das Ausmass dieser Reaktionsverzögerung bei allen untersuchten Substraten etwa gleich ist. Ein unterschiedlicher Verlauf der Zeit-Umsatzkurve ist dagegen bei längerer Versuchsdauer (10 Min.) festzustellen, wenn Ansätze mit kristallisiertem Reinzym und Leberhomogenat von derselben Aktivität miteinander verglichen werden. Wird die nach 5 Min. resultierende Perboratspaltung = 100% gesetzt, so ist in den Ansätzen mit Leberhomogenat nach 2 bzw. 10 Min. ein Spaltungsausmass von 61,5 bzw. 129% festzustellen. Analoge Ansätze mit reiner Leberkatalase zeigen nach 2 bzw. 10 Min. Umsätze von 71 bzw. 119,5%. Es ergibt sich somit beim Reinzym eine stärkere Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit, was auf eine geringere Stabilität der Katalase beim Fehlen inerter Begleitproteine zurückzuführen sein dürfte.

3. *Temperaturabhängigkeit der nach FEINSTEIN bestimmten Katalase-Aktivität.* Es ist bekannt, dass die nach der klassischen Methodik, d. h. bei Verwendung von freiem H_2O_2 als Substrat bestimmte Katalase-Aktivität im Bereich von $0-37^\circ$ nur eine geringe Temperaturabhängigkeit aufweist (FEINSTEIN⁴), BEERS & SIZER³). Wird Perborat als Substrat verwendet, so ergibt sich eine etwas grössere, jedoch immer noch bescheidene Abhängigkeit von der Versuchstemperatur.

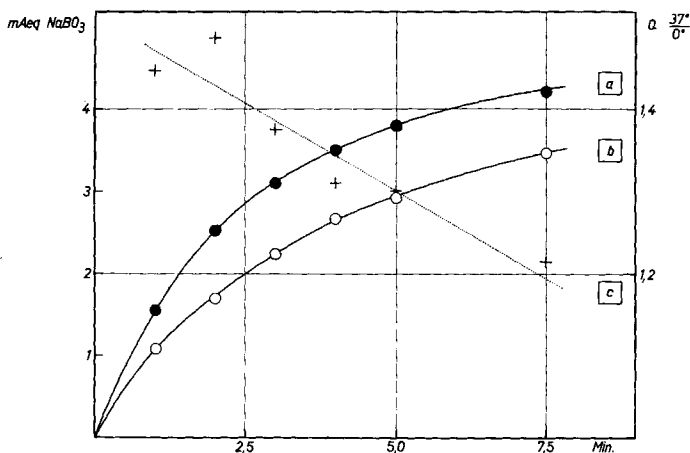


Fig. 2. Zeit-Umsatzkurve der Katalase bei verschiedenen Temperaturen: a) 37° (\bullet), b) 0° (\circ). Ordinate links für a und b: Gesamtumsatz; rechts für c (+): Quotient aus Umsatz bei 37° /Umsatz bei 0° . Enzym: kristallisierte Leberkatalase; Substrat: Na-Perborat 0,06-m.

Wie aus Fig. 2 hervorgeht, nimmt die Grösse des resultierenden Q_{10} -wertes mit der Versuchsdauer stetig ab. Durch Extrapolation nach $t = 0$ lässt sich für die Katalase-Aktivität von Leberhomogenat ein Quotient $37^\circ/0^\circ$ von 1,5–1,6 errechnen, was einem durchschnittlichen Q_{10} -Wert von 1,12 entspricht. Analoge mit kristallisiertem Reinzym ausgeführte Versuche haben für das Temperaturintervall von $0-37^\circ$ einen Q_{10} -Wert von 1,07 ergeben, was formell einer Aktivierungsenergie von 1100 Cal/Mol entspricht. BEERS & SIZER³) haben darauf hingewiesen, dass die

Katalase-Aktivität dann eine stark erhöhte Temperaturabhängigkeit zeigt, wenn Inhibitoren im Ansatz vorhanden sind. Wie im Abschnitt 4 gezeigt werden soll, trifft dies für bestimmte Inhibitoren wie z. B. Na-Azid zu; bei andern ist jedoch das Gegenteil der Fall. Da die Temperaturabhängigkeit der nach FEINSTEIN (d. h. mit Perborat) bestimmten Katalase-Aktivität nur unwesentlich stärker ist als bei Verwendung von freiem H₂O₂, so darf die ohnehin nur sehr geringe Hemmwirkung des Borats als praktisch temperaturunabhängig angesehen werden.

Zwecks weiterer Klärung dieser auffallend geringen Temperaturabhängigkeit ist die Katalase-Aktivität bei 0°, 22° und 37° als Funktion der Enzymkonzentration untersucht worden. Dabei hat sich bei allen 3 Temperaturen innerhalb des gesamten experimentell zugänglichen Konzentrationsbereiches direkte Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Perboratspaltung ergeben. Bei graphischer Darstellung der Werte resultieren Gerade, deren Steigungen für 37°, 22° und 0° lediglich um 5–10% differieren (vgl. FEINSTEIN⁴) Fig. 2, VON HAHN⁷) Fig. 1).

4. *Katalase-Hemmung durch Azid bei Verwendung verschiedener Substrate und bei Variation der Versuchstemperatur.* Die Rolle, welche die Art des Substrates und die Versuchstemperatur beim Zustandekommen von Inhibitorwirkungen spielen, ist am Beispiel des Na-Azids untersucht worden. Vergleicht man den Effekt einer bestimmten Azidkonzentration in Gegenwart verschiedener Peroxydträger, so lässt sich kein gesicherter Unterschied hinsichtlich Hemmbarkeit der Katalase

Tabelle 2. *Hemmung der Katalase-Aktivität durch Azid bei Verwendung verschiedener Substrate*
Enzym: Katalase «BOEHRINGER», Versuchstemperatur 4°

Substrat (Konzentration: 0,06-m.)	Peroxydspaltung in mÄq KMnO ₄ bei NaN ₃ -Zusatz von			H ₂ O ₂ -Spaltung, % (Kontrolle = 100%) bei NaN ₃ -Zusatz von		50% Hemmung bei NaN ₃ -Konzentra- tion von
	ohne	10 ⁻⁷ -m.	10 ⁻⁶ -m.	10 ⁻⁷ -m.	10 ⁻⁶ -m.	
Na-Perborat . . .	5,08	4,15	1,30	81,6	25,6	3,6 · 10 ⁻⁷ -m.
Harnstoff · H ₂ O ₂ . .	5,57	4,27	1,30	76,6	23,4	3,1 · 10 ⁻⁷ -m.
freies H ₂ O ₂ . . .	5,82	4,80	1,15	82,5	19,8	3,2 · 10 ⁻⁷ -m.

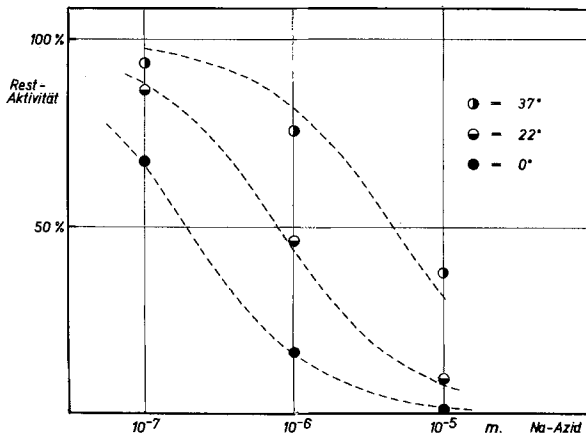


Fig. 3. *Hemmung der Katalaseaktivität durch Na-Azid in Abhängigkeit von der Versuchstemperatur.* Enzym: kristallisierte Leberkatalase. Substrat: Na-Perborat 0,06-m. Versuchsdauer 5 Min. Es resultiert unter diesen Versuchsbedingungen eine Hemmung von 50% bei a) 1,9 · 10⁻⁷-m. Azid für 0°, b) 8,0 · 10⁻⁷-m. für 22° und c) 4,7 · 10⁻⁶-m. für 37°. ----- theoretischer Verlauf der Dissoziationskurve

7) H. v. HAHN, Helv. 42, 49 (1959).

beobachten, weder bei 37° noch bei 4° (vgl. Tab. 2). Jedoch ist bei allen Substraten eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Hemmwirkung von Azid festzustellen. Wie aus Fig. 3 hervorgeht, bedarf es bei der FEINSTEIN-Methode (Substrat: Perborat; T = 37°) zur Erzielung einer 50-proz. Hemmung einer Azidkonzentration von $4,7 \cdot 10^{-6}$ -m. Bei 0° wird die Katalase-Aktivität dagegen bereits bei einer ca. 25mal geringeren Inhibitorkonzentration ($1,9 \cdot 10^{-7}$ -m. Azid) in gleichem Ausmass gehemmt. Die Temperaturabhängigkeit der Azid-gehemmten Katalase-Aktivität ist somit beträchtlich. Auf Grund der bei 37°, 22° und 0° gemessenen Rest-Aktivitäten ergibt sich ein Q_{10} -Wert von 2,4, was formal einer Aktivierungsenergie von 14600 Cal/Mol (0–37°) entspricht.

Diskussion

Perborat ist für Reihenuntersuchungen wohl das geeignetste Katalase-Substrat. Abgesehen davon, dass dieses relativ beständig ist, zeigen Borat bzw. Borsäure im Vergleich zu andern H_2O_2 -Trägern einen nur geringen Hemmeffekt, welcher in der Praxis bei Vergleichsmessungen kaum stören dürfte. Bei Anwendung der FEINSTEIN-schen Standardmethode (d. h. 0,06-m. Perborat und 5 Min. Versuchsdauer) gibt sich diese Wirkung als 12–15-proz. Hemmung zu erkennen, wobei der Verlauf der Zeit-Umsatzkurve – wenigstens innerhalb der ersten 5 Min. – kaum verändert wird. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass das Gleichgewicht $BO_2^-(H_2O_2) \rightleftharpoons BO_2^- + H_2O_2$ unter den hier gewählten Versuchsbedingungen (pH = 7,0) stark nach rechts verschoben ist; Perboratlösung darf somit – wenigstens als Katalase-Substrat – praktisch freiem H_2O_2 gleichgesetzt werden. Die auffallenden Diskrepanzen, wie sie bei Benützung verschiedener Methoden zur Bestimmung der Katalase-Aktivität gelegentlich beobachtet werden, sind somit nicht auf die Natur des Substrates zurückzuführen.

Auf das nahezu völlige Fehlen einer Temperaturabhängigkeit der H_2O_2 -Spaltung durch Katalase ($\Delta E = 600$ Cal/Mol) ist von BEERS & SIZER³⁾ hingewiesen worden. Dieses Verhalten stellt für ein Enzym einen Sonderfall dar und dürfte mit der sehr hohen Wechselzahl der Katalase ($2-3 \cdot 10^7$ sec⁻¹)³⁾ in Zusammenhang stehen. Da im gesamten Bereich von 0–37° zwischen Enzymmenge, d. h. der Zahl aktiver Teilchen, und der Peroxydspaltung direkte Proportionalität besteht, ist eine Begrenzung des Gesamtumsatzes durch Diffusion anzunehmen. Dazu passt auch die Beobachtung von BEERS & SIZER, dass eine Sättigung der Katalase mit Substrat unter den üblichen experimentellen Bedingungen nicht erreicht werden kann. Da aber die Wirksamkeit verschiedener Katalase-Inhibitoren von der Versuchstemperatur stark abhängt, hat deren Gegenwart einen starken Einfluss auf die Grösse der experimentell bestimmten Aktivierungsenergie. So bewirkt z. B. Na-Azid, welches bei 0° als Katalase-Inhibitor ca. 25mal stärker wirksam ist als bei 37°, eine (scheinbare) Erhöhung der Aktivierungsenergie auf 14600 Cal/Mol. Andere Inhibitoren zeigen eine solche Temperaturabhängigkeit in nur wesentlich geringerem Ausmass oder überhaupt nicht. Es ergibt sich daraus, dass die bei 0° und die bei 37° ausgeführte Bestimmung der Katalase-Aktivität durch dieselbe «Effektorengarnitur» in ganz unterschiedlicher Weise beeinflusst wird. Die verschiedene Temperaturabhängigkeit der Katalase-Aktivität von Leberhomogenat und von kristallisiertem Reinenzym ist somit nicht nur auf die ungleiche Stabilität, sondern auch auf die verschiedenartige Effektorenwirkung zurückzuführen.

Die Ausführung dieser Arbeit erfolgte mit Unterstützung durch die *Studienkommission für Atomenergie*, welcher an dieser Stelle gedankt sei.

SUMMARY

1. A comparative study on catalase activity, as measured by FEINSTEIN's procedure, in presence of different substrates and at various temperatures has been made.

2. Catalase activity is reduced when H_2O_2 is replaced by perborate, urea- H_2O_2 or picolinic acid- H_2O_2 as a substrate. This is due to the inhibiting action of the peroxyde-carriers, which has been found smallest for borate.

3. The effect of temperature on catalase activity is small in presence of perborate ($Q_{10} = 1.07-1.12$), but can be affected by inhibitors in various ways, highest dependency resulting in presence of Na-Azide ($Q_{10} = 2.4$). Therefore, activity measurements in crude material at 37° and 0° are differently influenced by effectors present in the system.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern
Anorganisch-chemische Anstalt der Universität Basel

17. Eine neue Spaltung von DL-Threonin in die optischen Antipoden von K. Vogler und P. Lanz

Herrn Prof. Dr. W. KUHN zum 60. Geburtstag gewidmet

(12. XII. 58)

Optisch aktives Threonin ist 1937 durch Arbeiten von WEST & CARTER¹⁾ synthetisch zugänglich geworden. Die Spaltung des Racemates in die Antipoden gelang damals durch fraktionierte Kristallisation der stereoisomeren Brucinsalze von N-Formyl-O-methyl-threonin.

Seither ist eine Reihe von Spaltungen des racemischen Threonins veröffentlicht worden. ZAMBITO, PERITZ & HOWE²⁾ machten beispielsweise Gebrauch von der Löslichkeitsdifferenz einer unstablen Modifikation des Brucinsalzes von N-p-Nitrobenzoyl-D-threonin zum Brucinsalz von N-p-Nitrobenzoyl-L-threonin in Methanol. Nach BRENNER, RÜFENACHT & SAILER³⁾ scheint diese Spaltung «gelegentlich mit gewissen Schwierigkeiten verbunden zu sein». Es ist, wie wir fanden, in der Tat nicht leicht, dieses Verfahren mit guten Ausbeuten zu reproduzieren.

Eine andere verbesserte Methode³⁾ beruht auf der Trennung der diastereomeren Brucinsalze von N-Tosyl-threonin in Methanol. Die Nacharbeitung ergab, dass bei grossen Ansätzen mit dem Ausfallen des Doppelsalzes von N-Tosyl-DL-threonin, sog. partielles Racemat nach LADENBURG⁴⁾, gerechnet werden muss, wonach die Substanz erneut unter grösserer Vorsicht zu kristallisieren ist. Um einer Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak auszuweichen, werden die erhaltenen optisch aktiven N-Tosylthreonine im Bombenrohr mit konz. HCl entacyliert, was zur Herstellung grösserer Mengen nicht vorteilhaft ist. Die Totalausbeute an L- bzw. D-Threonin wird mit 44% bzw. 35% abgegeben.

¹⁾ H. D. WEST & H. E. CARTER, J. biol. Chemistry **119**, 109 (1937).

²⁾ A. J. ZAMBITO, W. L. PERITZ & E. E. HOWE, J. Amer. chem. Soc. **71**, 2541 (1949).

³⁾ M. BRENNER, K. RÜFENACHT & E. SAILER, Helv. **34**, 2102 (1951).

⁴⁾ A. LADENBURG, Ber. deutsch. chem. Ges. **27**, 75 (1894).