

## Studien Über Die Kristallisierte Katalase (IV) : Molekulargestalt Und Molekulargewicht

Shirakawa, Masaharu  
Biochemical Laboratory, Department of Agriculture, Kyushu University

<https://doi.org/10.5109/22622>

---

出版情報 : 九州大学大学院農学研究院紀要. 9 (2), pp.173-184, 1949-05. Kyushu University  
バージョン :  
権利関係 :



## STUDIEN ÜBER DIE KRISTALLISIERTE KATALASE (IV) MOLEKULARGESTALT UND MOLEKULARGEWICHT

MASAHARU SHIRAKAWA

Früher ermittelte Stern<sup>1)</sup> die Diffusionskonstante von Leberkatalase (Pferde, Rinder und Schweine) nach der Northropschen Glasmembranmethode<sup>2)</sup> und berechnete daraus ein Molekulargewicht von 61,900 für Katalase. Aus seinen weiteren Versuchen<sup>3, 4)</sup> über die Sedimentationskonstante bei Ultrazentrifugierung, schloss er aber auf ein Molekulargewicht von 250,000 bis 300,000 für dasselben Ferment. Sumner und Gralén<sup>5)</sup> entschieden einmal ein Molekulargewicht von 248,000 für die nach ihrer eigenen Methode<sup>6)</sup> kristallisierten Leberkatalase auf Grund von Sedimentations- und Diffusionsbestimmungen<sup>7)</sup>, was aber später zu 225,000 korrigiert wurde<sup>8)</sup>. Die früheren Versuche von Zeile<sup>9)</sup>, Diffusionskonstante der Katalase durch Glasmembranmethode zu bestimmen, waren ihm dadurch missglückt, dass die Katalase durch Passierung der Membran stark inaktiviert wurde. Stern<sup>1)</sup> zeigte später, dass die von Zeile beobachtete Inaktivierung der Katalase durch Regulierung<sup>1)</sup> von pH der Enzymlösung vermieden werden kann; z. B. bei pH 7.0 bis 7.2 wurde keine Inaktivierung mehr beobachtet. Das von Stern zuerst ermittelte Molekulargewicht der Katalase, 68,000 sieht allzu klein gegenüber dem Wert, 225,000 nach Sumner und Gralén aus, und es scheint dem Verfasser, dass Stern selbst die Ungenauigkeit seiner Bestimmung des Molekulargewichtes anerkannt haben sollte, weil er im späteren Bericht über das Molekulargewicht desselben Fermentes keinen früher ermittelten Wert anführte. Es kann daher angenommen werden, dass unter den vorgeschlagenen Mole-

kulargewichten der Katalase der Wert von 225,000 nach Sumner und Gralén am vertrauenswürdigsten sei.

Zur Bestimmung der Diffusionskonstante ist die Glasmembranmethode von Northrop im Vergleich mit der häufig angewandten Methode nach Lamm beträchtlich vorteilhaft dadurch, dass eine einfachere Einrichtung und kürzere Bestimmungszeit genügen, und dass bei Behandlung der biowirksamen Substanzen, wie Fermenten, ihre Diffusionsgeschwindigkeit mittels der biochemischen Wirkungen bestimmt werden kann. Infolge mancher theoretischen und praktischen Prüfungen hat man neuerdings eine erfolgreiche Anwendbarkeit dieser Methode gefunden.<sup>10)</sup>

Die Genauigkeit des von uns selbst hergestellten Diffusionsapparates nach Northrop wurde vorher für Carboxyhämoglobin bestätigt und dann die Diffusionskonstante der kristallisierten Leberkatalase, welche nach der in letzterem Berichte<sup>11)</sup> erwähnten Methode isoliert und umkristallisiert wurde, liess sich bestimmen. Daraus ergab sich eine Diffusionskonstante von  $3.34 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/Sek. bei 10°C. Rechnet man diesen Wert auf 20°C um, so wird  $4.4 \times 10^{-7}$  gewonnen, was mit dem früher von Sumner vorgeschlagenen Werte,  $4.5 \times 10^{-7}$ , in guter Übereinstimmung steht. Angenommen, dass Katalasemoleküle monodispers und kugelförmig sich in der Lösung befinden, kann ein Molekulargewicht von 357,000 leicht aus der Diffusionskonstante berechnet werden. Diese Annahme ist aber nicht ganz richtig, weil das Viskositätsverhalten der Katalaselösung, wie später erwähnt, einen deutlichen Charakter von nichtkugelförmigen Teilchen zeigte.

Die Theorien über die Beziehung zwischen Reibungsverhalten und Gestalten kolloider Teilchen, wie Kohlenhydrate und Eiweissstoffe, entwickelten sich neuerdings auffallend, und dadurch ist häufig die Nichtkugelförmigkeit von Gestalten verschiedener Proteine diskutiert worden.<sup>12)</sup>

Aus der gefundenen Diffusionskonstante und den Viskositätsdaten kann man nach Polson<sup>12)</sup> leicht sowohl das Achsenverhältnis als das Molekulargewicht eines kolloiden ellipsoiden Teilchens berechnen. Der Verfasser gewann einen Wert von 3.4 für das Achsenverhältnis des als ein ellipsoides Teilchen gedachten Katalasemoleküls und dann mit Rücksicht auf die Diffusionskonstante ein Molekulargewicht von 249,900 und 252,800 für längliche und abgeplattete ellipsoide Teilchen beziehungsweise. Es ist heute

noch nicht zu sagen, ob eine längliche oder abgeplattete Gestalt für das Katalasemolekül gelten sollte.

## I. BESTIMMUNG VON DIFFUSIONSKONSTANTE

### 1) Apparatur und Ausführung.

Der Glasfilter (Jena G<sub>4</sub>), dessen Filterplatte mit Schmirgelstein bis zur Dicke von 0.6 bis 0.8 mm dünn gehobelt wurde, kam zur Verwendung. Die apparativen Einzelheiten gehen aus Abb. 1 hervor.

Bei der Bestimmung lässt sich die zu versuchende Fermentlösung in die innere Kammer (b) einsaugen. Wenn die in der Glasmembran (a) eingesperrten Blasen völlig vertreibt werden, schliesst man den Hahn (d), wäscht die äussere Wand der inneren Kammer schnell mit Lösungsmittel und wischt weiter sorgfältig mit Filterpapier ab. Die innere Kammer wird dann in dem im Thermostat festgehaltenen äusseren Zylinder (f), der mit 25 ccm von demselben Lösungsmittel beschickt war, in der Weise vorgeordnet, wie die Glasmembran 1 bis 2 mm unter dem Maniskus zum Eintauchen kommt. Gleich

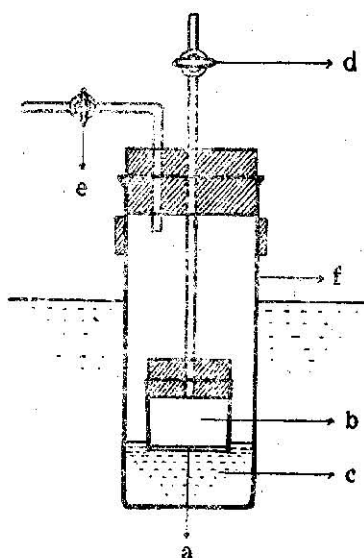


Abb. 1. Diffusionsapparat.

mit Eintauchen beginnt Diffusion und hört durch Abreissen auf. Es ist dabei sehr wichtig, die Glasmembran wasserrecht und fest zu halten. Während dieses Verfahren anscheinend ziemlich grob für Bestimmung von Diffusionskonstante aussieht, kann man jedoch durch sorgfältige Übungen mit Verbindungen von bekannten Diffusionskonstanten genügend genaue Ergebnisse erreichen. Das äussere Lösungsmittel dient zur Analyse. Alle Bestimmungen wurden bei 10°C ausgeführt.

### 2) Eichung der Membran mit N/10-HCl.

Um eine normale Diffusionskonstante zu gewinnen, hatten Northrop und Anson die von Öholm<sup>13)</sup> ermittelten Daten für N/10-

HCl auf 5°C extrapoliert und, dann einen Wert von 1.85 cm<sup>2</sup>/Tag. erreicht. Wie auch von Zeile schon erwähnt wurde, ist diese Extrapolierung unrichtig. Als eine normale Diffusionskonstante nahm der Verfasser den folgenden Wert nach James und Gorden<sup>14)</sup> auf:

$$D_{10}(\text{N}/10\text{-HCl}) = 2.03 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Sek.}$$

Nach zweistündiger Vordiffusion von 0.104 N-HCl gegen CO<sub>2</sub>-freies Wasser, wodurch die HCl-Konzentration der inneren Kammer auf etwa 0.100 N sank und weiter ein bestimmtes Diffusionsgleichgewicht in der Membran sich erreichen liess, wurde der äussere Zylinder durch einen frischen ersetzt. Die diffundierte HCl-Menge wurde stundenweise titrimetrisch bestimmt und in Kubikzentimeter der entsprechenden Mutterlösung (Q<sub>ccm</sub>) ausgedrückt. Bei nacheinander folgenden Messungen, wurde die Konzentrationsabnahme der Mutterlösung mit Rücksicht auf die dabei diffundierte HCl-Menge korrigiert. Ergebnisse der Versuche zeigt Tabelle I.

Tabelle I. Bestimmung der Membrankonstante mit 0.1N-HCl bei 10°C.

Diffusionszeit (Min.)	0.01 N-NaOH (ccm)	Q (ccm)
60	1.90	0.190
60	1.88	0.189
60	1.88	0.191
	Mittelwert	0.190

Die zu suchende Membrankonstante (K) lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$D = \frac{K G}{t},$$

darin ist:  $D = 2.03 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Sek.}$ ,  $Q = 1.90 \text{ ccm}$  und  $t = 60 \times 60 \text{ Sek.}$  Daraus geht hervor,  $K = 0.385 \text{ cm.}^{-1}$

### 3) Bestimmung von Diffusionskonstante des Carboxyhämoglobin.

Zur Mikroanalyse einer äusserst kleinen Menge des diffundierten Proteins wie Carboxyhämoglobin oder Katalase dient die nephelometrische Methode nach Franceschetti und Wieland.<sup>15)</sup> Fünf ccm Probenlösung wurde mit 5 ccm von 5% HCl und 10 ccm von 10% Na-sulfosalicylatlösung versetzt und die dabei entstandene Trübung nephelometrisch bestimmt. Zur Standardtrübung wurde eine Suspension angewant, welche dadurch hergestellt wurde, dass sich

eine geeignete Proteinlösung von bekannter Konzentration in ganz gleicher Weise behandeln liess. Nach dieser Methode konnten wir 0.1 mg Protein mit Fehler kleiner als  $\pm 1.5\%$  bestimmen; dieser Fehler ist aber beträchtlich stärker im Vergleich mit 0.2% von Franceschetti, was auf der Unvollkommenheit von Nephelometer beruht. Bei dieser Gelegenheit kann man sich jedoch mit der Genauigkeit dieses Grades begnügen, weil die Proteinanalyse nichts anders als ein Hilfsmittel für Diffusionsbestimmung ist.

Eine 2%ige Lösung des Carboxyhämoglobins in physiologischer Salzlösung, welches nach Heiderberger<sup>16)</sup> aus Rinderblut hergestellt wurde, war an Diffusionsversuche gestellt worden. Zur Standardlösung bei Nephelometrie diente eine verdünnte Lösung (1:500) von 2%iger Lösung des Carboxyhämoglobins. Tabelle II zeigte die Ergebnisse.

Tabelle II. Bestimmung von Diffusionskonstante des Carboxyhämoglobins in 0.85 %iger NaCl-Lösung bei 10°C (nach Nephelometrie).

Diffusionszeit (Stunden)	Diffundierte Menge (mg/25 ccm)	Q (ccm)
10	1.03	0.0538
10	1.08	0.0540
10	1.06	0.0538
	Mittelwert	0.0538

Für die Diffusionskonstante einer Substanz von bekannten K und Q, wie obenerwähnt, gilt die folgende Formel:

$$D_{10^\circ} = \frac{K Q}{t},$$

wobei  $K = 0.385$ ,  $Q = 0.0538$  und  $t = 10/24$  Tag, bedeutet. Daraus ergibt sich,  $D_{10^\circ} = 0.0496$  cm<sup>2</sup>/Tag. Korrigiert diesen Wert für reines Wasser, so kann man 0.0502 cm<sup>2</sup>/Tag. an Stelle von 0.0496 erreichen. Wenn man hiervon das Molekulargewicht des als kugelförmig gedachten Carboxyhämoglobins, wie allgemein angenommen wird, nach Einsteinscher Formel berechnet, so gewinnt man 68,800, was mit 68,000 nach Northrop und Anson, 68,600 nach Zeile, 68,700 nach Stern und 69,000 nach Svedberg<sup>17)</sup> gut übereinstimmt.

#### 4) Bestimmung der Diffusionskonstante der Katalase.

Die Katalase, die durch viermalige Umkristallisierung und mehrmaliges Waschen mit M/20-Phosphatpuffer (pH 7.0) gereinigt

wurde, wurde in derselben Pufferlösung bis zur Sättigung aufgelöst. Es ist nötig hierbei zu bemerken, dass die Katalase, mehrere Stunden bei 10°C stehen gelassen, mehr oder weniger inaktiviert wird, besonders stark in verdünnter Lösung. Bei der Diffusion durch die Membran ist das gerade der Fall. Daher muss man in diesem Falle diese Inaktivierung in Berücksichtigung ziehen.

Unter diesen Bedingungen steht die diffundierte Menge von Katalase (Q) mit Diffusionszeit (t) im linearen Verhältnis. Dies macht es möglich, den Grad der auf Diffusion beruhenden Inaktivierung zu ermitteln. Zur Bestimmung der diffundierten Mengen von Katalase dienten die Aktivitätsbestimmung der Katalase und auch Proteinbestimmung nach Nephelometrie. Tabelle III zeigt die gesamten Ergebnisse, und in Abb. 2 wird die Beziehung zwischen Q und t dargestellt.

Tabelle III. Diffundierte Mengen der Katalase ausgedrückt in der katalatischen Wirkung und Proteinmenge (10°C).

Kat. f. = 29,000, Katalasekonz. = 0.975%, k/ccm = 224)

Diffusionszeit (Stunden)	Diffundierte Mengen der Katalase			
	Katalasewirkung		Protein	
	k/5 ccm*	Q ccm	mg Prot./5 ccm	Q ccm
1.0	0.0844	0.00189	—	—
2.0	0.260	0.00580	—	—
3.0	0.408	0.00911	—	—
5.0	0.676	0.0150	—	—
8.0	1.05	0.0235	—	—
11.0	1.30	0.0290	0.0605	0.0311
14.5	1.47	0.0328	0.0850	0.0395
18.0	1.60	0.0356	0.0940	0.0477

\*) k: Die Geschwindigkeitskonstante der monomolekularen Reaktion, in welcher Katalase beteiligt.

Es geht aus Abb. 2 hervor, dass bei mehr als 8 stündiger Diffusion die Inaktivierung der Katalase allmählich mit steigender Versuchszeitdauer(t) zunimmt. Der Q-Wert aus Proteinbestimmung ist dagegen zu der Zeitdauer annähernd proportional. Innerhalb 8 Stunden stimmen die Ergebnisse aus beiden Methoden gut überein. Der Verfasser wählte daher dreistündige Diffusionszeit aus. Die Ergebnisse des Diffusionsversuches bei 10°C über Katalase wurden in Tabelle IV gezeigt.

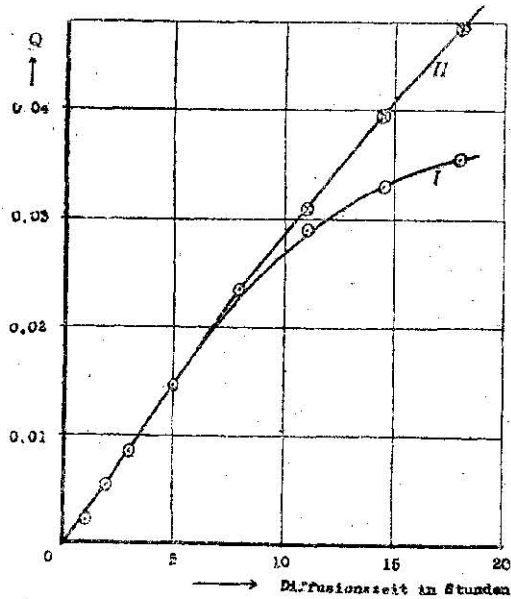


Abb. 2.

I: ausgedrückt in Katalasewirkung.

II: ausgedrückt in Proteinmenge.

Tabelle IV. Diffusionsgeschwindigkeit der Katalase für M/20-Phosphatpuffer (pH 7.0) bei 10°C (Kat. f. = 31,000).

Konz. der Katalase (%)	Diffusionszeit (Stunden)	Diffundierte Menge (k/5 ccm)	Q (ccm)
0,765	3.0	0.457	0.00933
	3.0	0.449	0.00916
	3.0	0.452	0.00922
0.153	3.0	0.0880	0.00906
	3.0	0.0890	0.00916
	3.0	0.0886	0.00912
		Mittelwert	0.00918

## II. BESTIMMUNG VON REIBUNGSKONSTANTE

Die bestimmung von Reibungskonstante wurde nach Ostwaldscher Viskosimetrie bei 10°C für Katalaselösungen ausgeführt, welche 0.25 bis 1.00 %ige Katalase in M/20-Phosphatpuffer (pH 7.0) enthielten. Die in Tabelle V angeführten Werte von  $t$  und  $s$  sind Mittelwerte bei dreimaligen Messungen.



Tabelle V. Reibungsmessungen von Katalaselösungen bei 10°C.

Konz. der Katalase (%)	t (Sekunden)	s	$\frac{\eta}{\eta_0}$	ln A
0	130.7	5.0772	1.0000	—
1.00	135.0	5.1062	1.0386	0.0380
0.75	133.9	5.0990	1.0285	0.0375
0.50	132.8	5.0915	1.0191	0.0380
0.25	131.7	5.0843	1.0091	0.0380
		Mittelwert		0.0378

Hierin bedeutet t die Zeit, welche die Lösung verbraucht, um von der oberen Markierung bis an die untere des Apparates auszufließen, s das Gewicht der Lösung, im Piknometer eingenommen,  $\eta/\eta_0$  die relative Reibungskonstante, ln A relative Reibungskonstante bei unendlicher Verdünnung nach Polson.<sup>14)</sup>

### III. BESTIMMUNG DES SPEZIFISCHES PARTIALVOLUMENS VON KATALASE

Um die Molekulargestalt aus Reibungsversuchen zu erhalten, soll man zuvor das spezifische Partialvolumen bestimmen, welches das von Katalase eingenommenen Volumen in Volumeneinheit der Lösung bedeutet. Zur Zwecke diene die Piknometrie nach folgender Formel:

$$d_0 + s - V \cdot s \cdot d_0 = d_1$$

Hierbei ist,  $d_0$  = die Dichte des Lösungsmittels,  $d_1$  = die Dichte der Katalaselösung, s = das Gewicht der in 1 ccm Lösungsmittel aufgelösten Substanz und V = das spezifische Partialvolumen.

Diese Formel kann auf Grund von der folgender Tatsache abgeleitet werden. Versetzt man 1 ccm Lösungsmittel mit s g Substanzen, so nimmt das Volumen um  $s \cdot V$  ccm zu, und beträgt das gesamte Gewicht  $(d_0 + s)$  g. Daher soll das Gewicht von 1 ccm Lösung, welche s g Substanzen in Volumeneinheit enthält, nämlich  $d_1$  g, dem Wert von  $(d_0 + s - s \cdot V \cdot d_0)$  g gleich stehen, worin  $s \cdot V \cdot d_0$  das Gewicht desjenigen Lösungsmittels bedeutet, welches mit dem zugenommenen Volumen korrespondiert.

Die Gefundenen Werte bei 10°C für 1.65 % ige Katalaselösung M/20-Phosphatpuffer (pH 7.0) sind die folgenden:  $d_0 = 1.0075$ ,  $d_1 = 1.0117$ ,  $s = 0.0165$ . Daraus ergibt sich

$$V = (d_0 + s - d_1) / (s \cdot d_0) = 0.740.$$

## IV. BERECHNUNGEN

## 1) Molekulargewicht aus Diffusionskonstante.

Nach Einsteinscher Diffusionsgleichung,

$$D = \frac{RT}{N} \cdot \frac{1}{6\pi\eta r}, \dots\dots\dots (1)$$

kann man aus den bekannten Werten von Diffusionskonstante (D) und Reibungskonstante ( $\eta$ ) des Lösungsmittels bei T° den Radius (r) des kugelförmigen Moleküls berechnen. Unter Berücksichtigung des spezifischen Gewichtes der gelösten Substanz ergibt sich weiter das Molekulargewicht.

Über die Katalaselösung sind folgende Werte bekannt worden.  $D = 0.0289 \text{ cm}^2/\text{Tag.}$  od.  $0.3346 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{Sek.}$ ,  $\eta = 0.0136 \text{ g/cm. Sek.}$ ,  $R = 8.3 \times 10^{-7} \text{ Erg/Grad.Mol.}$ ,  $N = 6.06 \times 10^{23}$ ,  $T = 283.1$ . Daraus errechnet sich der Radius des als kugelförmig gedachten Katalasemoleküls, wie folgt:

$$r = 4.706 \times 10^{-7} \text{ cm.}$$

Für das Molekulargewicht gilt

$$M = (4/3) \pi r^3 g N, \dots\dots\dots (2)$$

darin bedeutet g das spezifische Gewicht der Katalase, welches in erster Näherung mit der reziproken Zahl von dem spezifischen Volumen (V) übereinstimmt. Es ergibt sich daraus:  $M = 357,000$ .

## 2) Achsenverhältnis aus Reibungskonstante.

Einstein war der erste, der eine hydrodynamische Beziehung zwischen dem Volumen der in Lösung befindlichen Substanz und der Viskosität der Lösung ableitet. Für starre sphärische Teilchen gab er die folgende Formel an:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2.5 G,$$

worin  $\eta/\eta_0$  das Verhältnis zwischen der Viskosität der Lösung und der des Lösungsmittels bedeutet; G ist das Volumen gelöster Substanz in der Volumeneinheit der Lösung. Die obenerwähnte Formel gilt allerdings nicht für Teilchen, deren Gestalt von der Kugel abweicht.

Wo. Ostwald<sup>18)</sup>, W. Kuhn<sup>19)</sup> u.a. wiesen darauf hin, dass auch der Einfluss der Brownschen Bewegung dem orientierenden Einfluss der hydrodynamischen Kräfte entgegensteht. Wenn die Brownsche

Bewegung so stark ist, dass eine dauernde isotrope Anordnung der Teilchen zu erwarten ist, gilt nach Kuhn die Formel:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2.5 G + \frac{G}{16} \left( \frac{b}{a} \right)^2, \quad \dots\dots\dots (3)$$

wobei  $b/a$  das Verhältnis der langen Achse eines Ellipsoids zur kurzen bedeutet. Bei der Behandlung von Proteinlösungen soll  $G$  das hydrierte Molekularvolumen bedeuten, das die "nicht-hydrierte" Proteinmoleküle in 1 ccm von ihrer 1%igen Lösung einnehmen.

Für die Beziehung der Reibungskonstante zur Konzentration gilt eine praktische und häufiger angewandte Formel, die von Arrhenius empirisch abgeleitet wurde:  $\eta/\eta_0 = A^c$ , hierin ist  $A$  eine Konstante und  $c$  die Konzentration der in der Lösung befindlichen Substanz. Die Anwendbarkeit dieser Formel auf Proteinlösungen wurde von Loeb<sup>20)</sup> und später Haugaard und Johnson<sup>21)</sup> gezeigt. Bei der Berechnung der Gestalt von Proteinmolekülen wurde  $\eta/\eta_0$  bei unendlicher Verdünnung benutzt, wo die Teilchen nicht gegenseitig aufeinander wirken. Um diesen Wert leicht zu erlangen, empfiehlt es sich, nach der Konzentration ( $c$ ) zu differenzieren:

$$d(\eta/\eta_0)/dc = A^c \ln A.$$

Bei der unendlichen Verdünnung,  $c = 0$ ,

$$d(\eta/\eta_0)/dc = \ln A.$$

Daher kann die Viskositätsformel von Polson folgenderweise umgeschrieben werden:

$$1 + \ln A = 1 + 4.0 V + 0.098 V (b/a)^2. \quad \dots\dots\dots (4)$$

### 3) Molekulargewicht und Gestalt.

Herzog, Illig und Kudar<sup>21)</sup> und Perrin<sup>22)</sup> leiteten theoretisch eine Beziehung zwischen Reibungskonstante und Achsenverhältnis bei der Diffusion ellipsoider Teilchen ab. Für längliche ellipsoide Teilchen gilt

$$\frac{f}{f_0} = \frac{D_0}{D} = \frac{\sqrt{1-\rho^2}}{\rho^2 \ln \frac{1+\sqrt{1-\rho^2}}{1-\sqrt{1-\rho^2}}}, \quad \dots\dots\dots (5)$$

und zwar für abgeplattete ellipsoide Teilchen gilt

$$\frac{f}{f_0} = \frac{D_0}{D} = \frac{\sqrt{\rho^2-1}}{\rho^2 \tan^{-1} \sqrt{\rho^2-1}}. \quad \dots\dots\dots (6)$$

Hierin ist  $\rho = b/a$ ,  $b$  gleich dem Radius am Äquator und  $a$  gleich der halben Länge der Rotationsachse, während  $f$  die Reibungs-

konstante des Teilchens und  $f_0$  dieselben des sphärischen Teilchens darstellt, das die gleiche Masse besitzt.  $f/f_0$  bedeutet somit den Abweichungsgrad des Teilchens von der Kugelform, was von Svenberg als die asymmetrische Konstante bezeichnet worden ist. Ersetzt den aus Gl.(4) erhaltenen Wert von  $b/a$  in Gl.(5) oder (6), so kann man  $f/f_0$  leicht berechnen.

Zwischen Molekulargewicht, Diffusionskonstante und  $f/f_0$  gibt es eine bequeme Beziehung, die aus Ergebnissen der Ultrazentrifugierungsversuchen von Svedberg<sup>23)</sup> abgeleitet wurde, wie folgt:

$$M = \frac{K (f/f_0)^3}{D^3 V}, \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$K = \frac{(R T)^3}{162 \pi^2 \eta^3 N_2}$$

$$\text{z.B. bei } 10^\circ\text{C, } K = 0.998 \times 10^{-16}$$

Wie obenerwähnt, sind wir nun imstande, das Molekulargewicht irgendeines Proteins aus Diffusions- und Reibungsdaten zu berechnen. Polson erwies die erfolgreiche Anwendbarkeit dieser Methode auf verschiedene Proteine durch Vergleichung mit Ergebnissen aus Ultrazentrifugierungsversuchen von Svedberg.

Aus dem spezifischen Partialvolumen und  $b/a$  kann man weiter die absolute Gestalt der als rotierende Ellipsoide angenommenen Proteinmoleküle berechnen. Für das Volumen des rotierenden ellipsoiden Teilchens gilt

$$V_0 = \frac{4}{3} \pi a^2 b, \quad \dots\dots\dots (8)$$

wobei  $V_0$  das Volumen eines Moleküls in der Lösung bedeutet.

#### 4) Ergebnisse der Berechnungen.

Aus den schon im experimentellen Teil geschilderten Daten über Katalase können die folgenden in obenerwähnter Weise berechnet werden.

$$\begin{aligned} b/a &= 3.36 \\ f/f_0 &= 1.14 \text{ (für das längliche)} \\ &= 1.13 \text{ (für das abgeplattete)} \\ M &= 249,900 \text{ (für das längliche)} \\ &= 252,800 \text{ (für das abgeplattete)} \\ a &= 3.0 \times 10^{-7} \text{ cm} \\ b &= 10.1 \times 10^{-7} \text{ cm} \end{aligned}$$

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Diffusionskonstante der Katalase bei 10°C wurde nach der Northropschen Methode bestimmt.

2. Die Reibungskonstante der Katalaselösung und das spezifische Partialvolumen der Katalase wurden ermittelt, woraus nach Polson das Achsenverhältnis des als rotierendes Ellipsoid angenommenen Katalasemoleküls berechnet wurde.

3. Aus Diffusionskonstante und Achsenverhältnis wurde das Molekulargewicht der Katalase berechnet, wie 249,900 für das längliche Teilchen und 252,800 für das abgeplattete.

Ich erlaube mir hiermit dem verstorbenen Herrn Prof. Dr. M. Kitagawa für seine freundliche Anleitung und steten Ratschläge meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Ganz besonderen Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. Y. Oshima und Herrn Prof. Dr. I. Yamasaki für ihre gütigen Beratungen bei der Beschreibung dieses Berichtes.

## LITERATUR

- 1) K. G. Stern: Z. physiol. Chem., 217, 237 (1933).
- 2) J. H. Northrop und M. L. Anson: J. gen. Physiol., 12, 543 (1933).
- 3) K. G. Stern und R. W. Wyckoff: J. biol. Chem., 124, 573 (1938).
- 4) The Svedberg: Nature, 139, 1051 (1937).
- 5) J. B. Sumner und N. Gralén: J. biol. Chem., 125, 33 (1938).
- 6) J. B. Sumner und A. L. Dounce: J. biol. Chem., 121, 417 (1937).
- 7) O. Lamm und A. Polson: Biochem. J., 30, 529 (1936).
- 8) J. B. Sumner, A. L. Dounce und V. L. Frampton: J. biol. Chem., 136, 343 (1940).
- 9) K. Zeile: Biochem. Z., 258, 347 (1933).
- 10) J. H. Northrop: J. gen. Physiol., 13, 613 (1931), J. W. McBain und C. R. Dawson: Proc. Roy. Soc., A, 148, 32 (1935), J. W. McBain und T. H. Liu: J. Amer. chem. Soc., 56, 52 (1934), A. R. Gordon: J. chem. Phys., 5, 522 (1937), W. A. James, E. A. Hollingshead und A. R. Gordon: J. chem. Phys., 7, 89 (1939), H. W. Scherp: J. gen. Physiol., 16, 795 (1933).
- 11) M. Kitagawa und M. Shirakawa: J. agric. chem. Soc. Japan, 17, 794 (1941) und 22, 115 (1948).
- 12) A. Polson: Kolloid Z., 88, 51 (1939).
- 13) L. W. Öholm: Z. physik. Chem., 50, 309 (1905).
- 14) W. A. James und A. R. Gordon: J. chem. Phys., 7, 963 (1939).
- 15) A. Franceschetti und H. Wieland: Arch. Augenheilkunde, 99, 1 (1928).
- 16) M. Heiderberger: J. biol. Chem., 53, 31 (1922).
- 17) The Svedberg und R. Fahraeus: J. Amer. chem. Soc., 48, 4306 (1926).
- 18) Wo. Ostwald: Kolloid Z., 43, 204 (1927).
- 19) W. Kuhn: Kolloid Z., 72, 269 (1933), 68, 2 (1934).
- 20) J. Loeb: J. gen. Physiol., 3, 827 (1921).
- 21) R. O. Herzog, R. Illig und H. Kudar: Z. physik. Chem., 167, 330 (1933).
- 22) F. Perrin: J. physique Radium, 7, 1 (1936).
- 23) Aus Polsonschem Bericht angeführt (vgl. 12).