

Einwirkung der Oxydationsenzyme auf Kohlehydrate.

Von
N. Sieber.

Aus dem chemischen Laboratorium des Kaiserlichen Instituts für experimentelle
Medizin zu St. Petersburg.

Der Redaktion zugegangen am 10. September 1903.

I. Teil.

Die Oxydationsenzyme, resp. Oxydasen, von denen hier die Rede sein wird, werden einerseits aus Kalbs-, Schafs-, Hunde- und Pferdeblutplasmafibrin, andererseits aus Kalbs- und Hundemilz dargestellt.

Zur Darstellung der im Blute vorkommenden oxydierenden Enzyme bietet das Plasmafibrin besondere Vorteile. In erster Linie ist es frei von Blutfarbstoff und braucht deswegen nicht erst lange ausgewaschen zu werden, sondern es kann direkt zur Darstellung des Oxydationsfermentes oder Enzyms verwendet werden.

Die verwendeten Fibrinsorten waren verschiedener Herkunft, 1. von normalen Tieren (Hund, Schaf, Pferd und Kalb), 2. von immunisierten Tieren und zwar hauptsächlich von gegen Diphtherie, Streptokokken, Staphylokokken, sowie Bubonenpest immunisierten Pferden. Es wurden 3 Enzyme: 1. wasserlösliche, 2. in Neutralsalzen lösliche und 3. in Wasser und Alkohol lösliche Oxydationsenzyme erhalten.

Darstellung und Eigenschaften der Enzyme aus dem Blute.

Was die Darstellung der 3 genannten Enzyme anbetrifft, so sei hier kurz folgendes erwähnt. Das aus Blutplasma nach Entfernung des Serums durch Abpressen gewonnene Fibrin

normaler Pferde besitzt, wie bekannt, faserige, opake, elastisch-zähe Konsistenz. Das aus dem Blutplasma von Pferden, welche gegen Streptokokken und Staphylokokken, sowie Bubonenpest immunisiert worden waren, gewonnene Fibrin unterscheidet sich durch nichts von dem Fibrin normaler Pferde, dagegen ist das von gegen Diphtherie immunisierten Pferden gewonnene Fibrin dickflüssig und fadenziehend, nicht opak, sondern eher durchsichtig: erst nach Behandlung mit destilliertem Wasser wird es opak, undurchsichtig, weiß; hierbei geht ein bedeutender Teil des Fibrins in Lösung über. Die wässrige Lösung wird abgossen, filtriert, dann das Fibrin von neuem mit der 10fachen Menge Wasser übergossen und dieses solange wiederholt, bis das Wasser, mit Guajactinktur versetzt, keine Reaktion auf Oxydation mehr zeigt. Die wässrigen Lösungen werden alle zusammengegossen und filtriert, wobei sie nicht klar werden, sondern opalescent bleiben; sie werden zur Darstellung des wasserlöslichen Oxydationsenzym durch Ausfällung mittels gasförmiger Kohlensäure oder mit schwefelsaurem Ammon verwandt. Ganz anders verhält sich gegenüber destilliertem Wasser das Fibrin normaler Tiere: das Wasser nimmt kaum etwas von ihm auf und mit Guajactinktur auf oxydierende Enzyme geprüft, gibt die wässrige Lösung kaum eine Andeutung auf grünlichblaue Färbung. Das Fibrin von Pferden, welche gegen Strepto- und Staphylokokken, sowie gegen Bubonenpest immunisiert worden waren, besitzt, wie oben erwähnt, Konsistenz und Aussehen von Fibrin normaler Tiere. In Bezug auf den Gehalt an wasserlöslichem Oxydationsenzym verhält sich jedoch das Fibrin der gegen Strepto- und Staphylokokken immunisierten Pferde anders: es gibt gleich dem Fibrin von gegen Diphtherie immunisierten Tieren an destilliertes Wasser lösliches Oxydationsenzym ab. Dagegen besitzt das Fibrin von Pferden, welche gegen Bubonenpest immunisiert worden waren, die zähe, opake Konsistenz des Fibrins normaler Tiere und enthält nur Spuren von wasserlöslichem Oxydationsenzym. Trotz lange fortgesetzter Extraktion, sogar bei Bruttemperatur (was gewöhnlich bei dem Fibrin von anders immunisierten Tieren nicht nötig ist) enthält das Fibrin von Pferden, welche gegen Bubonenpest immunisiert

worden waren, gleich wie das normale, nur Spuren von wasserlöslichem Oxydationsenzym.

Das wasserlösliche Oxydationsenzym ist, wie man sieht, in dem normalen Blutplasmafibrin nur in minimalen Mengen enthalten. Seine Quantität nimmt aber bei der Immunisation gegen Diphtherie, sowie gegen Strepto- und Staphylokokken bedeutend zu, dagegen ist sie nach Immunisation gegen Bubonenpest kaum vermehrt. Aus dem entweder durch Ausfällen mit schwefelsaurem Ammon und darauffolgender Dialyse oder mittels gasförmiger CO_2 gewonnenen wasserlöslichen Oxydationsenzym kann durch ein- oder zweimalige Wiederholung der Operation ein entsprechend viel reineres Präparat dargestellt werden, welches sich klar in Essigsäure, sowie in essigsaurem Ammon auflöst. In gelöster Form (in verdünnter oder konzentrierter Essigsäure oder in essigsaurem Ammon) verliert das Enzym sehr rasch die ihm zukommende Fähigkeit, Guajactinktur zu bläuen. Aus der essigsauren Lösung scheidet sich beim Stehen ein flockiger Niederschlag aus.

Zur Verwendung kam das Enzym entweder in wässriger Emulsion, d. h. zum Teil gelöst, zum Teil suspendiert, oder in essigsaurem NH_3 gelöst. Mit Reagentien auf sein Oxydationsvermögen untersucht, verhält sich das wasserlösliche oxydierende Enzym folgenderweise:

Reagentien	Wässrige Emulsion	In essigsaurem NH_3 gelöst	2 Tage nach Auflösung in essigsaurem NH_3
Guajactinktur	+ +	+ + +	—
Guajactinktur + H_2O_2 . .	+	—	—
1% Guajacol	+ +	—	+
1% Guajacol + H_2O_2 . .			—
p-Phenylendiamin +			
α -Naphthol + 10% CO_3Na_2	+ + +	+	+

Keine Reaktion auf Katalase.

In essigsaurem Ammon gelöstes wasserlösliches, oxydierendes Enzym ergibt bei der Prüfung mit sämtlichen, für Eiweißkörper charakteristischen Reagentien folgendes: Das Millonsche

Reagens erzeugt in der Kälte einen weißen Niederschlag, welcher sich beim Kochen auflöst, wobei Gelbfärbung eintritt; die Biuretreaktion fällt positiv, aber schwach, mit einem Stich ins Violette, aus, die Liebermansche Reaktion schwach positiv; die Xanthoproteinreaktion, Adamkiewiczische und Hellersche Probe, sowie die Reaktionen mit Ferrocyankalium (und Essigsäure), mit Phosphorwolframsäure und mit essigsaurem Kupfer (auf primäre Albumosen) fallen alle positiv und deutlich aus; die Reaktion von Molisch ebenfalls positiv, aber schwach. Beide Reaktionen auf Pentosen (mit Phloroglucin und Orcin) ergaben ein negatives Resultat.

Weiter wurden Bestimmungen ausgeführt, welche die Zusammensetzung des dreimal gelösten und ausgefallten Präparates betrafen. Der Trockenrückstand des Präparates betrug 2,32—2,12%; davon entfielen 0,0168% auf unorganische Bestandteile. Auf den Trockenrückstand berechnet betrug die Asche also 0,73%. In der Asche konnten Eisen (in geringerer Quantität, als wie in den beiden nächstfolgenden Oxydationsenzymen), Mangan (in geringerer Menge, als wie in dem in Neutralsalzen löslichen Enzym, und in größerer, als in dem in Alkohol und Wasser löslichen Enzym), sowie Phosphorsäure, aber kein Kupfer nachgewiesen werden. Quantitative Aschebestimmungen werden später mitgeteilt werden.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab

1. für 10 cem Enzymemulsion = 33,77 mg N.
2. „ „ „ „ = 33,92 „

Um das zweite oxydierende Enzym aus dem Fibrin zu isolieren, wird das letztere nach voraufgehender Behandlung mit destilliertem Wasser mit irgend einer Neutralsalzlösung übergossen: meistens habe ich dazu eine 8%ige Kaliumnitratlösung verwandt; und zwar kommt man schneller zum Ziele, wenn man die Extraktion bei Bruttetemperatur im Thermostaten ausführt. Aus der Lösung kann das Enzym durch verschiedene Agentien ausgeschieden werden: durch Kohlensäure, Alkohol, am besten jedoch durch Aussalzen mit schwefelsaurem Ammon. Durch fraktionierte Fällungen erhält man, was Reinheit anbe-

trifft, verschiedene Präparate, welche durch Dialyse weiter gereinigt und namentlich vom schwefelsauren Ammon, sowie vom salpetersauren Kali befreit werden müssen. Meine Versuche, welche bezwecken, ein möglichst reines Präparat dieses Oxydationsenzym zu erhalten, sind noch nicht abgeschlossen und werden fortgesetzt.

Nach der Dialyse ist das oxydierende Enzym zum Teil in der Lösung, hauptsächlich aber in dem Niederschlage enthalten. Beim Schütteln erhält man eine ziemlich gleichmäßige Emulsion, welche, wie aus untenfolgender Tabelle ersichtlich ist, auf Guajactinktur sehr intensiv reagiert. In Essigsäure, sowie in essigsauerm Ammon ist dieses oxydierende Enzym, wie auch das vorhergehende, leicht löslich, jedoch büßt es seine spezifische Eigenschaft, Guajactinktur zu bläuen, durch Essigsäure sofort, in Ammonium aceticum gelöst in wenigen Tagen ein. In Ammoniumacetat (5%) gelöst und im Vacuum bis zur Trockene verdunstet und dann von neuem mittels Ammonium aceticum aufgenommen, zeigt es zwar schwach, aber doch immerhin deutlich die Reaktion mit Guajactinktur.

Dieses in Neutralsalzen lösliche oxydierende Enzym ist in dem Fibrin sämtlicher Tiere, d. h. sowohl normaler, als auch immunisierter, enthalten. In betreff des quantitativen Gehaltes an diesem Enzym in verschiedenen Fibrinsorten, namentlich im Fibrin normaler Tiere gegenüber demjenigen immunisierter, kann ich mich vorläufig noch nicht bestimmt äußern.

Zur Orientierung über die elementare Zusammensetzung dieses Enzyms wurde ein mittels fraktionierter, mehrmals wiederholter Fällungen und darauffolgender Dialyse besonders sorgfältig gereinigtes Präparat entweder in Form einer ganz feinen Emulsion, oder in getrocknetem Zustande verwandt.

1. 0,2608 g im Vacuum getrockneter Substanz gaben beim Verbrennen mit Kupferoxyd und Überschichtung der Substanz selbst mit chromsaurem Blei 0,4971 g CO_2 und 0,1777 g H_2O , was in Prozenten ausgedrückt 51,94% C und 7,57% H entspricht.

2. 0,2197 g Substanz ergaben 0,4172 g CO_2 und 0,1495 g H_2O oder in Prozenten 51,76% C und 7,55% H.

Stickstoffbestimmungen wurden im trockenen Präparat

durch Verbrennen mit Kupferoxyd volumetrisch, und in der Emulsion selbst nach Kjeldahl ausgeführt.

Die volumetrischen Stickstoffbestimmungen ergaben folgende Zahlen:

1. 0,2255 g Substanz gaben bei 24,8° und 759 Bar. 29,8 ccm Gas, was in Prozenten = 14,81% N ist.

2. 0,2110 g Substanz gaben bei 24,5° und 758 Bar. 28,8 ccm Gas, was in Prozenten = 15,2% N ist.

Die Emulsion wurde auf ihren Trockenrückstand untersucht und hierbei in 100 ccm 0,571 g Rückstand gefunden, wovon auf die Asche 0,0042 g kommen: es entspricht also die Asche 0,75% des Trockenrückstandes.

Vier mit der Emulsion nach Kjeldahl ausgeführte Stickstoffbestimmungen ergaben folgende Zahlen. In je 10 g wurden a) 11,96 mg N, b) 12,22 mg N, c) 12,71 mg N und d) 13,17 mg N gefunden. 10 ccm Emulsion, welche 0,0534 g Trockenrückstand entsprechen, enthalten also im Mittel 12,50 mg N. Auf Eiweiß umgerechnet (d. h. mit 6,25 multipliziert) ergibt dieses 14,62%.

In der Asche fanden sich: Eisen (weniger als im vorhergehenden Präparate), Mangan (mehr als in den zwei übrigen Enzymen), Phosphorsäure, aber kein Kupfer.

Bei der Prüfung auf ihr Oxydationsvermögen ergab die Emulsion als solche oder in Ammoniumacetat aufgelöst folgendes:

Reagentien	Emulsion	In essigsauerm NH ₃ sofort nach Auflösung	In essigsauerm NH ₃ einige Tage nach Auflösung
Guajactinktur	+ + +	+ + +	+
Guajactinktur + H ₂ O ₂ . .	—	—	—
1% Guajacol	+	+ +	+
1% Guajacol + H ₂ O ₂ . .	+		
Röhmnn-Spitzersches Reagens	+	+ + +	+

Keine Reaktion auf Katalase.

In 5% essigsauerm Ammon aufgelöst verhält sich das Enzym wie folgt zu den Reagentien auf Eiweißstoffe: mit dem Millonschen Reagens erhält man einen reichlichen Niederschlag, welcher sich beim Kochen dunkelrot färbt; die Biuret-

reaktion fällt in violetter Färbung positiv aus: die Hellersche Probe, die Xanthoproteinreaktion, die Reaktionen mit Ferrocyankalium (und Essigsäure), mit Phosphorwolframsäure, sowie mit essigsaurem Kupfer fallen sämtlich schön positiv aus: die Liebermannsche Reaktion ist kaum wahrnehmbar, die von Molisch positiv, aber sehr schwach, und die Adamkiewiezsche negativ: die Reaktionen auf Pentosen mit Phloroglucin, sowie mit Orcin und Salzsäure fallen beide charakteristisch und schön aus.

Das dritte Oxydationsenzym, welches nicht als solches, sondern nur in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd Oxydationen zu bewirken imstande ist, wurde entweder aus dem Filtrate nach Ausfällen mittels schwefelsauren Ammons oder beim Dialysieren des zweiten, eben beschriebenen Enzyms aus dem Wasser gewonnen. Das Filtrat oder Dialysenwasser, welche große Mengen von schwefelsaurem Ammon enthalten, werden zwecks Darstellung des dritten Enzyms bei möglichst niedriger Temperatur, nicht über 37° , im Vacuum auf ein geringes Volumen eingeeengt. Das hierbei sich ausscheidende schwefelsaure Ammon muß drei- bis viermal abfiltriert werden. Sobald die eingeengte Flüssigkeit nicht mehr als 100 cem beträgt, wird sie mit der fünffachen oder auch einer noch größeren Menge absoluten Alkohols versetzt, um den Rest des $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sowie alle anorganischen Bestandteile zu entfernen. Die in dieser Weise dargestellte alkoholhaltige Flüssigkeit kann wiederum im Vacuum auf ihr ursprüngliches Volumen oder auch darüber eingeeengt werden, wobei sie eine bräunlichgelbe Färbung annimmt: diese Veränderung schwächt jedoch die Fähigkeit des Enzyms, in Gegenwart von Hydroperoxyd zu oxydieren, nicht nur nicht ab, sondern verstärkt sie eher.

Um zu erfahren, wieviel von dem wirksamen Prinzip das Enzym enthält, bestimmte ich auch darin den festen Rückstand: in 100 cem fand ich 0,134 g oder p. Ct.: davon entfielen 0,016 g oder p. Ct. auf die Asche, was, auf den Trockenrückstand berechnet, einen sehr hohen Aschegehalt ($\approx 12.1\%$) ergibt: derselbe ist jedoch wahrscheinlich auf Verunreinigung zu beziehen, worüber ich bald aufgeklärt zu

sein hoffe. In der Asche konnten Eisen und Mangan, sowie Phosphorsäure, aber kein Kupfer, ebenso wie in den zwei vorigen Enzymen nachgewiesen werden.

Auf Ammoniak wurde nach der Methode von Nencki und Zaleski, auf Stickstoff nach Kjeldahl untersucht: in je 10 ccm Flüssigkeit wurden einmal 1,43 mg NH_3 , das andere Mal 1,34 mg NH_3 gefunden: zwei parallele Stickstoffbestimmungen ergaben in je 10 ccm in dem einen Falle 3,63 mg, in dem anderen 3,33 mg Stickstoff.

Die Fähigkeit, in Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd Oxydationen auszulösen, besitzen die meisten Organe und Körperflüssigkeiten des tierischen Organismus. Gegenwärtig kann ich jedoch nicht mit Bestimmtheit entscheiden, ob diese Eigenschaft nur einem und demselben Enzym oder nicht vielmehr verschiedenen bezüglich ihrer Wirkung gleichartigen Enzymen zukommt.

Unsere Kenntnisse in betreff dieser Körper sind überhaupt noch sehr dürftige: Die besonderen Eigentümlichkeiten der Enzyme, ihre ganz ausgesprochene Veränderlichkeit, Labilität einerseits und ihre Empfindlichkeit gegen äußere physikalische und chemische Einflüsse andererseits erschweren einen schnellen Fortschritt auf diesem Gebiete. Die Art und Weise der Darstellung der oxydierenden Enzyme überhaupt und dieses letzten Enzyms im speziellen läßt so viele Fehlerquellen und Verunreinigungen zu, daß es wohl noch viel Mühe kosten wird, bis es gelingt, ein nicht nur im chemischen, sondern auch im biologischen und funktionellen Sinne charakteristisches Präparat zu erhalten.

Auf sein Oxydationsvermögen geprüft, ergab das dritte Enzym folgendes:

Reagentien	Die Lösung als solche ohne H_2O_2	Lösung mit H_2O_2
Guajactinktur	—	+++
Guajactinktur + H_2O_2	+++	+++
1% Guajacol	—	+++
1% Guajacol + H_2O_2	+++	+++
Reagens von Röhmann und Spitzer	++	+++

Auf Katalase wurde mit negativem Resultat geprüft.

Die Reaktionen auf Eiweißkörper nahmen folgenden Verlauf: Nach Zusatz des Millonschen Reagens bildet sich ein Niederschlag, der beim Kochen rötliche Färbung annimmt: die Adamkiewiczse und die Liebermannsche Reaktion fallen negativ aus; die Biuretreaktion fällt in blauer Farbe schwach, aber positiv aus: Hellersche Probe — positiv: Ferrocyankalium mit Essigsäure — schwach positiv; Phosphorwolframsäure gibt kaum eine schwache Trübung: die Reaktion von Molisch — deutlich positiv: dagegen beide Reaktionen auf Pentosen — negativ.

Einwirkung hoher Temperaturen auf die drei Enzyme. Durch besondere Versuche wurde ermittelt, daß das in Neutralsalzen lösliche Enzym von allen drei gegen hohe Temperaturen das empfindlichste ist. Erwärmen auf 65° während 5 Minuten wirkt auf das Enzym abschwächend; mit Guajactinktur versetzt, färbt es dieselbe nicht sofort blau: später tritt aber die Färbung doch noch ein, aber auch verspätet und weniger intensiv. Erwärmen auf 70° bis 78° im Laufe von 2—3 Minuten vernichtet das Vermögen der Farbensynthesen des Enzyms ganz und gar. Was das wasserlösliche Enzym anbetrifft, so beobachteten wir, daß die ersten Anzeichen von Abschwächung sich nach 5 Minuten langem Erwärmen auf 70° zeigen: Versetzung mit Guajactinktur ruft hiernach eine weniger intensive Blaufärbung mit einem Stich ins Grüne hervor. Weiteres Erwärmen während 5 Minuten auf 75° wirkt auf das Vermögen der Farbensynthesen des Enzyms zerstörend ein. Das dritte, in Wasser und Alkohol lösliche Enzym ist von den drei beschriebenen das resistenteste: Temperaturen gegen 90° wirken auf dasselbe nur abschwächend ein; erst 2—7 Minuten langes Erwärmen auf 97° vernichtet auch das Vermögen der Farbensynthesen dieses Enzyms.

Im allgemeinen aber sind die 3 oxydierenden Enzyme, im Dunkeln mit Thymolzusatz aufbewahrt, namentlich in Form von Emulsion oder im Vacuum getrocknet, sehr gut haltbar.

Es wäre verfrüht, schon jetzt die 3 beschriebenen Oxydationsenzyme klassifizieren zu wollen. Nach gewissen, ihnen

zukommenden Eigenschaften und nach der Ansicht einiger Autoren sind sie zu einer Gruppe, nach anderen Eigenschaften und anderen Autoren einer anderen Gruppe zuzurechnen. Unsere Kenntnisse über die oxydierenden Enzyme sind überhaupt und im speziellen in diesem Punkte noch zu ungenügende. Halten wir uns an die neueste Klassifikation von A. Bach und B. Chodat,¹⁾ so müssen wir 2 von ihnen den Oxygenasen, das dritte den Peroxyden zurechnen. Ich will noch später auf diese Frage zurückkommen.

Nach Bertrand sind die Oxydasen Eiweißverbindungen, welche zu den hydrolytischen, dissociierbaren Manganverbindungen gehören. Die Rolle des Sauerstoffüberträgers spielt in ihnen das Mangan, welches in Form von Oxydul in ihnen enthalten ist. Manganoxydul spaltet das Sauerstoffmolekül, indem ein Sauerstoffatom zur Bildung von Mangandioxyd dient, während das andere auf oxydable Körper übertragen werden kann. Durch das säureartige Eiweißradikal der Oxydase wird das Mangandioxyd unter Sauerstoffabspaltung wiederum zu der ursprünglichen Manganverbindung regeneriert. Nach A. Bach und Chodat übt jedoch die Oxydase, trotzdem sie manganhaltig ist, keine oxydierende Wirkung aus, wenn keine Peroxydverbindungen zugegen sind.

Die Ansichten über das Zustandekommen der Oxydationsprozesse sind bis heute noch sehr verschieden. Viele Forscher teilen immer noch die Ansicht Schönbeins,²⁾ daß die langsam verlaufenden Oxydationen durch atomistischen Sauerstoff ausgelöst werden. Die Theorien über die Aktivierung des Sauerstoffs sind gleichfalls sehr mannigfaltige.

Van t'Hoff³⁾ und Jerissen⁴⁾ haben gezeigt, daß ein langsam oxydierender Körper ebensoviel Sauerstoff aktiviert, als er selbst bei der Bildung seines primären Oxydationsproduktes aufnimmt. Beide Autoren, sowie Evan⁵⁾ nehmen weiter an,

¹⁾ Biochem. Centralb. B. 1. Nr. 11, S. 417.

²⁾ Verh. Basl. Naturw. Gesellsch. N. F. 1. 467. 2. 113.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. XVI, S. 411. Chem. Zeitschr. 1896. 867.

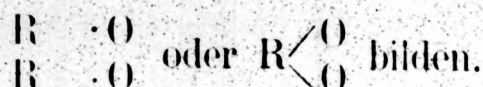
⁴⁾ Ber. 29. 1707. Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 34. 59.

⁵⁾ Diese Zeitschr., Bd. XVI, S. 342.

daß der gewöhnliche Sauerstoff in Atome dissociiert werden muß, um Oxydationen zu verursachen.

Pflüger und Nencki sowie andere, meinen, daß das lebendige Protoplasma dank seiner stark reduzierenden Eigenschaft imstande ist, den Sauerstoff zu aktivieren. Traube erklärte das Entstehen des Hydroperoxyds bei den Oxydationen durch Reduktionsprozesse; er dachte sich, daß das Wassermolekül gespalten wird, nicht aber das Sauerstoffmolekül: dieses nicht in Atome gesplattene Sauerstoffmolekül setzt sich mit den 2 Wasserstoffatomen des Wassers in Verbindung, um Hydroperoxyd zu bilden. A. Bach hat für die Aktivierung des Sauerstoffes eine neue Theorie aufgestellt, nach welcher für das Zustandekommen der Oxydationen nicht die Spaltung des Sauerstoffmoleküls in Atome, sondern eine intermediäre Peroxydbildung nötig ist. Fast zu gleicher Zeit haben C. Engler und W. Wild¹⁾ eine ähnliche Ansicht über die Entstehung der Peroxyde geäußert.

Nach der Meinung der 3 ebengenannten Forscher werden bei den Autoxydationsprozessen nicht einzelne Sauerstoffatome, sondern ganze Sauerstoffmoleküle aufgenommen, indem unter Sprengung der doppelten Bindung des Moleküls sich zunächst Superoxydverbindungen von der Formel



Diese Verbindungen können, wie das Wasserstoffsuperoxyd, ein Sauerstoffatom an andere oxydable Substanzen abgeben, indem sie hierbei in normale, einfache Oxyde übergehen. Der «aktivierte» Sauerstoff ist also nicht Sauerstoff in Gestalt freier Atome, sondern er ist chemisch gebundener, aber «leicht abspaltbarer Sauerstoff».

A. Bach und Chodat ist es gelungen, die Bildung von Superoxyden bei den Oxydationsvorgängen tatsächlich durch entsprechende Reagentien nachzuweisen.

Es ist gegenwärtig unmöglich, sich definitiv darüber aus-

¹⁾ Ber. 30, S. 1669.

zusprechen, ob die eben angeführte Anschauung imstande sein wird, sämtliche Oxydationsvorgänge aufzuklären. Es unterliegt keinem Zweifel, daß sie viel für sich hat und daß sie in vielen Hinsichten den beobachteten Tatsachen entspricht.

Seit einigen Jahren mit Untersuchungen über Oxydationsvorgänge und speziell über Oxydationsenzyme oder Fermente beschäftigt, bin ich jedoch durch verschiedene Umstände abgehalten worden, meine Untersuchungen über die theoretische Seite der Frage zum gewünschten Abschluß zu bringen. Deshalb will ich hier nur einen Teil meiner Untersuchungen, nämlich über die physiologische Rolle der Oxydationsenzyme mitteilen.

Um die physiologische Bedeutung der Oxydationsenzyme zu ermitteln, schien es am zweckmäßigsten, gerade die Substanzen der oxydierenden Wirkung der Fermente zu unterwerfen, welche ihrer Verbreitung nach, sowie als Nahrungstoff für die Pflanzen- und Tierwelt von besonderer Bedeutung sind, nämlich die Kohlehydrate. In erster Linie suchten wir das Verhalten der Oxydationsenzyme gegen Monosaccharide, resp. Hexosen festzustellen. Schon die ersten diesbezüglichen Versuche ergaben, daß die in Rede stehenden Enzyme die Fähigkeit, verschiedene Zuckerarten in neutraler Reaktion zu oxydieren, in sehr ausgiebiger Weise besitzen. Nachdem durch Vorversuche konstatiert worden war, daß Hexosen (Dextrose und Galactose) durch die 3 in Rede stehenden Oxydationsenzyme zersetzt werden, bezweckten weitere Versuche, den Gang und die Details dieser Reaktion, resp. die Geschwindigkeit, mit welcher die Zersetzung des Zuckers vor sich geht, zu bestimmen. Diese letzteren Versuche wurden derartig angeordnet, daß Proben in bestimmten Zeitintervallen entnommen werden konnten, um einerseits den Zuckergehalt quantitativ zu bestimmen, andererseits auch die Zersetzungsprodukte zu untersuchen (unter diesen wurde auch die Kohlensäure quantitativ, und zwar sowohl volumetrisch als auch durch Wägung bestimmt). Bevor ich jedoch zur Beschreibung der Versuche selbst übergehe, will ich kurz über ihre Anordnung und die bei ihnen verwandten Apparate berichten.

Beschreibung der Apparate zur Untersuchung der Enzymwirkung.

Zur Ermittlung der Gasentwicklung bei Einwirkung von oxydierenden Enzymen war die Versuchsanordnung folgende. Der zum Versuche dienende Apparat bestand aus einem dicken Standgefäß mit einem Rauminhalt von 360 oder 500 ccm. Der enge Hals des Gefäßes war mit einem 2- oder 3mal durchbohrten Kautschukstopfen verschlossen und mit einem dickwandigen Kautschukrohr, einer Art Trichtervorrichtung, in welche Quecksilber gegossen wurde, um während der Dauer des Versuches die Diffusion der Gase zu verhindern, versehen. In dem Falle, wo die sich entwickelnden Gase untersucht werden sollten, wurde das Gefäß mit einem doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen: durch die eine Öffnung ging ein Trichter, durch welchen die dem Oxydationsprozess zu unterwerfende Substanz in wässriger Lösung und dann das Enzym in Form von Emulsion (oder umgekehrt) gegossen wurde, worauf die Verbindung des Gefäßes mit dem Trichter, in welchen nach der Enzymemulsion Quecksilber gegossen wurde, durch Hahn und Klemmvorrichtung unterbrochen wurde; durch die zweite Bohrung des Kautschukkorkes ging ein entsprechend gebogenes Gasableitungsröhrchen, dessen unteres Ende zuerst zugeschmolzen war, nachher aber unter Quecksilber abgebrochen und unter ein mit Quecksilber gefülltes Endiometer, in welchem die Gase aufgefangen werden sollten, geführt wurde. In den Fällen, in welchen die Bestimmung des Zuckergehaltes ohne Öffnen des Gefäßes und ohne Unterbrechung des Versuches ausgeführt werden sollte, wozu Proben zeitweise zu entnehmen waren, wurde ein dreimal durchbohrter Kautschukstopfen aufgesetzt: in die dritte Öffnung dieses Stopfens wurde ein Glasröhrchen gesteckt, dessen unteres Ende bis zum Niveau und im nötigen Falle in die Lösung getaucht werden konnte, dessen anderes Ende, mit Kautschukrohr samt Klemme versehen, mit einem leeren Zylinder von bekanntem Rauminhalt in Verbindung stand. Dieser Zylinder war dazu bestimmt, in gewissen Zeiträumen vermittelt einer Saugvorrichtung eine bestimmte Menge der zuckerhaltigen Lösung aus dem Standgefäß aufzunehmen.

In denjenigen Versuchen, wo die Menge der Kohlensäure durch Wägung bestimmt werden sollte, wurde an Stelle des leeren Zylinders ein am oberen Ende spitz ausgezogenes, mit 50%iger Kalilauge gefülltes und vorher mitsamt dieser letzteren gewogenes Röhrchen, welches die Kohlensäure absorbieren sollte, mit dem Standgefäß verbunden.

Die eben beschriebenen Vorrichtungen waren derartig eingerichtet, daß sie zu jeder Zeit, sei es zum Wägen, sei es zum Zwecke der Zuckerbestimmung, mit Leichtigkeit abgenommen und von neuem mit dem Hauptgefäß in Verbindung gesetzt oder durch entsprechende neue ersetzt werden konnten, ohne daß der Versuch unterbrochen zu werden brauchte. Dank diesen Vorrichtungen konnten einige Versuche auf eine längere Beobachtungszeit ausgedehnt werden.

Es wurden in jeder Richtung mehrere Parallelversuche mit verschiedenen Modifikationen, unter Zusatz von antiseptischen Substanzen, meist Thymol und Chloroform, angestellt und das Ergebnis all dieser Versuche war, was die Zersetzung der Monosaccharide durch die 3 oxydierenden Enzyme anbetrifft, stets ein positives. Ich will nur einzelne von ihnen genau wiedergeben.

Versuche über die Zersetzung der Kohlehydrate durch die Oxydasen.

1. Wasserlösliches Enzym.

2.0 g chemisch reiner Glukose (Traubenzucker) wurden in 80 ccm sterilen, kalten destillierten Wassers gelöst und in den oben beschriebenen, vorher sterilisierten Apparat gebracht, dann 20 ccm Enzymemulsion (speziell in diesem Falle das wasserlösliche Enzym) nachgegossen. Der Apparat befand sich von Anfang an samt der ganzen Vorrichtung im Thermostaten, wo er auch während der ganzen Dauer des Versuches blieb. Die erste Probe, nach welcher wir uns über den Gang der Zuckerzersetzung durch das wasserlösliche Oxydationsenzym ein Urteil zu bilden trachteten, wurde nach Verlauf von 2 Stunden entnommen: sie betrug 20 ccm des Gemisches: hiervon wurden 10 ccm nach 10 facher Verdünnung und Ent-

eiweißen mit Fehlingscher Lösung titriert, wobei 80 ccm des verdünnten Gemisches nötig waren, um 10 ccm Fehlingscher Lösung zu zersetzen, was, auf den Zuckergehalt umgerechnet, 0.62 g Zucker entspricht. Hieraus ergibt sich, daß im Laufe von 2 Stunden durch das wasserlösliche Oxydationsenzym 1.32 g Glukose, also $\frac{2}{3}$ oder 69% des angewandten Zuckers zersetzt werden und $\frac{1}{3}$ oder 31% unzersetzt bleiben. Die übrigen 10 ccm der entnommenen Probe wurden nach Versetzen mit Kalilauge bis zu alkalischer Reaktion destilliert und dann das Destillat in der Kälte mit reinem Jod und Kalilauge bis zur Entfärbung der Lösung versetzt: hierbei war starke Jodoformreaktion zu bemerken.

Eine nach 4 Stunden entnommene Probe ergab einen Zuckergehalt von 0.53 g oder 26%.

Nach 3 Tagen konnten noch 0.23 g oder 11.5% Zucker nachgewiesen werden.

Im Destillate der nach 3 Tagen entnommenen Probe erhielten wir in ausgiebiger Menge Jodoform in Krystallen. Außerdem besaß das Destillat in der Kälte bedeutende Reduktionskraft.

Aus diesen Bestimmungen geht hervor, daß der Zucker durch wasserlösliches Oxydationsenzym ziemlich rasch zersetzt wird. Weitere Bestimmungen haben jedoch erwiesen, daß der Rest des Zuckers bedeutend langsamer dem Oxydationsprozeß unterliegt. Nach 10—20tägiger Versuchsdauer fanden sich immer noch geringe Zuckermengen. Die Erklärung dieses Befundes läßt dreierlei Möglichkeiten zu. Die eine wäre die, daß eine bestimmte Menge Oxydationsenzym nicht imstande ist, unbegrenzte Mengen Substanz, in unserem Falle Zucker, zu zersetzen. Zweitens könnte man annehmen, daß die entstehenden Zersetzungsprodukte die weitere Zersetzung verhindern. Drittens besitzen möglicherweise die oxydierenden Enzyme ebenso, wie das von anderen Fermenten bekannt ist, reversible Eigenschaften. Diese Frage will ich übrigens noch später berühren.

In einem zweiten parallelen Versuche wurden von dem gleichen Enzym sogar 75% des angewandten Zuckers in einem

Zeitraume von zwei Stunden oxydiert und nur 25% blieben unzersetzt.

In zwei weiteren Versuchen, wo 50 ccm des wasserlöslichen Oxydationsenzym zur Verwendung kamen, wurden in einem Falle von 5,0 g Traubenzucker 0,65 g, also 13%, in dem anderen 0,502 g, also 10% nach drei Tagen unzersetzt gefunden: es waren also in diesem Zeitraume durch 50 ccm Enzymemulsion, welche 1,16 g Trockensubstanz entsprechen, das erste Mal 87%, das zweite Mal 90% Zucker zersetzt worden.

Ähnliche Versuche mit den beiden anderen Oxydationsenzymen ergaben folgendes:

2. In Neutralsalzen lösliches Enzym.

1. 50 ccm des in Neutralsalzen löslichen Enzyms, welche 0,285 g Trockensubstanz entsprechen, ließen im Laufe von 3 Tagen von 5 g Traubenzucker 0,564 g oder 11,2% unzersetzt.

2. In einem zweiten Versuche, wo 50 ccm des gleichen Enzyms, welche 0,205 g Trockensubstanz entsprachen, zur Anwendung kamen, blieben in dem gleichen Zeitraume von 5,0 g Glukose 0,97 g oder 19,2% unzersetzt.

Es wurden also durch 50 ccm des in Neutralsalzen löslichen Oxydationsenzym im ersten Falle 88,8%, im zweiten Falle 80,8% Glukose während 3 Tagen zersetzt.

3. Wasser- und alkohollösliches Enzym.

Das dritte, in Wasser und Alkohol lösliche Oxydationsenzym (die Superoxydase) verhielt sich ebenfalls gegenüber Traubenzucker aktiv.

50 ccm dieses Enzyms, welche 0,067 g Trockensubstanz entsprachen, ließen, mit 10 ccm 2%igen Hydroperoxyds versetzt, nach 3 Tagen von 5,0 g Traubenzucker in einem Falle 0,98 g oder 19,6%, in einem zweiten Versuche 0,79 g oder 15,8% Zucker unzersetzt.

Es wurden also durch dieses Enzym im Laufe von 3 Tagen in einem Falle 80,4%, in dem anderen Falle 84,2% Zucker zersetzt.

In einer anderen Versuchsreihe wurde die Menge der bei Einwirkung der 3 Enzyme auf Glukose entstehenden Kohlensäure durch Wägung bestimmt. Die Wägungen des 50%ige Kalilauge enthaltenden Apparates wurden anfangs allstündlich ausgeführt; nachdem sich jedoch herausgestellt hatte, daß die Kohlensäurezunahme ohne Saugvorrichtung im ersten Stadium der Einwirkung des Oxydationsenzym auf Traubenzucker eine sehr geringe ist, wurde in längeren Zeitintervallen gewogen. Von allen in dieser Richtung ausgeführten Bestimmungen will ich hier nur je 2 Versuchsreihen für jedes der 3 Enzyme anführen.

Zur besseren Übersicht sind die Zahlen in untenstehender Tabelle zusammengestellt.

Kohlensäurebestimmung durch Wägung.

Gewichtszunahme der Apparate	Wasserlösliches Oxydationsenzym		In Neutralsalzen lösliches Oxydationsenzym		In Alkohol und Wasser lösliches Oxydationsenzym	
	1,6 g Glucose 50 ccm Enzym 10 ccm Wasser	4 g Glucose 75 g Enzym 10 ccm Wasser	1,6 g Glucose 50 ccm Enzym 10 ccm Wasser	4,0 g Glucose 75 ccm Enzym 10 ccm Wasser	1,6 g Glucose 50 ccm Enzym 10 ccm 2% H_2O_2	4,0 g Glucose 75 ccm Enzym 10 ccm 2% H_2O_2
Nach Verlauf von 24 Stunden	0,0085 g	0,0103 g	0,0013 g	0,0025 g	0,001 g	0,0016 g
Nach Verlauf von 3 Tagen	0,015 g	0,0263 g	0,0086 g	0,0098 g	0,0072 g	0,0045 g
Nach Verlauf von 9 Tagen	0,0314 g	0,0795 g	0,0201 g	0,0446 g	0,0189 g	0,0238 g
Nach Verlauf von 15 Tagen	0,048 g	0,1339 g	0,0286 g	0,0646 g	0,0208 g	0,0476 g
Nach Verlauf von 20 Tagen	0,0753 g	0,2041 g	0,035 g	0,0902 g	0,0283 g	0,0991 g
Nach Verlauf von 25 Tagen	0,0878 g	0,2103 g	0,0477 g	0,0953 g	0,0364 g	0,1025 g
Nach Verlauf von 30 Tagen	0,1041 g volumetrisch 52,93 ccm	0,2339 g volumetrisch 118,95 ccm	0,0506 g volumetrisch 25,66 ccm	0,1150 g volumetrisch 58,47 ccm	0,0483 g volumetrisch 24,55 ccm	0,1319 g volumetrisch 67,08 ccm

Aus dieser Tabelle ersieht man, daß sich aus 50 ccm des wasserlöslichen oxydierenden Enzyms und 1,6 g Traubenzucker in dem Zeitraum von 30 Tagen 0,1041 g = 52,93 ccm Kohlensäure, aus 4,0 g Traubenzucker und 75 ccm des wasserlöslichen Enzyms im gleichen Zeitraume 0,2339 g = 118,95 ccm Kohlensäure gebildet wurden. In den Versuchen mit dem in Neutralsalzen löslichen Enzym entwickelten sich im Verlaufe von 30 Tagen aus 1,6 g Glukose und 50 ccm Enzym 0,0506 g = 25,68 ccm Kohlensäure, aus 4,0 g Glukose und 75 ccm Enzym 0,1150 g = 58,48 ccm Kohlensäure. In den Versuchen mit dem in Wasser und Alkohol löslichen oxydierenden Enzym entstanden im Laufe von 30 Tagen aus 1,6 g Traubenzucker und 50 ccm Enzym 0,0483 g = 24,55 ccm Kohlensäure und aus 4,0 g Traubenzucker und 75 ccm Enzym 0,1319 g = 67,08 g Kohlensäure.

In 6 anderen parallelen Versuchen wurde nicht nur die gebildete Kohlensäure, sondern auch der Verbrauch an Sauerstoff gasvolumetrisch festgestellt. Es wurden von 6 Apparaten mit doppelt durchbohrtem Korken, durch deren Löcher 1. ein Ableitungsröhrchen und 2. ein Trichter gesteckt war, 3 mit dem Enzym allein und 3 mit einem Gemisch von Enzym und Traubenzucker beschickt, worauf sämtliche Apparate in den Brutschrank kamen. Nach Verlauf von 3 Tagen wurde aus jedem Apparat durch Eingießen von Quecksilber eine gewisse Menge Gas in ein Endiometer getrieben, um in dem gesammelten Gasgemisch Kohlensäure und Sauerstoff quantitativ zu bestimmen. Bei der Füllung der Apparate betrug die Temperatur 21° und der Barometersland 758 mm.

Wasserlösliches oxydierendes Enzym.

1.

20 ccm Enzym.

Volumen des Gefäßes 365 — 20 = 345 ccm Red. = 313 ccm.

Gasvolumen = 35,6 ccm bei 20,28° T und 745 mm Bst. Red. = 31,88 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen = 34,3 ccm bei 20,3° T und 745 mm Bst. Red. = 30,71 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen = 27.5 ccm bei 18.9° T und 745 mm Bst. Red. = 23.67 ccm.

CO₂ gefunden 1.17 ccm = 3.62% . **Im ganzen = 11.33 ccm.**

O gefunden 7.04 ccm = 22.0% .

O-Verbrauch = 0.

2.

20 ccm Enzym + 1.3 g Zucker + 10 ccm Wasser.

Volumen des Gefäßes 365 - 30 = 335 ccm. Red. = 304 ccm.

Gasvolumen 44.7 ccm bei 20.2° T und 745 mm Bst. Red. = 40.03 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen = 41.61 ccm bei 20.3° T und 745 mm Bst. Red. = 37.25 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen = 35.3 ccm bei 18.9° T und 748 mm Bst. Red. = 31.66 ccm.

CO₂ gefunden 2.78 ccm = 6.94% . **Im ganzen = 21.09 ccm.**

O gefunden 5.59 ccm = 13.96% .

O-Verbrauch = 6.9% . **Im ganzen = 20.97 ccm.**

In Neutralsalzen lösliches Oxydationsenzym.

Nr. 3.

20 ccm Enzym + 10 ccm Wasser.

Volumen des Gefäßes 365 - 20 = 345 ccm. Red. = 313 ccm.

Gasvolumen 26.6 ccm bei 20° T und 745 mm Bst. Red. = 23.83 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen 25.1 ccm bei 20.3° T und 745 mm Bst. Red. = 22.47 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen 20.4 ccm bei 18.9° T und 745 mm Bst. Red. = 18.3 ccm.

CO₂ gefunden 1.35 ccm = 5.67% . **Im ganzen 17.74 ccm.**

O gefunden 4.17 ccm = 17.5% .

O-Verbrauch = 3.3% . **Im ganzen 10.33 ccm.**

Nr. 4.

20 ccm Enzym + 1.3 g Traubenzucker + 10 ccm H₂O.

Volumen des Gefäßes = 500 - 30 = 470 ccm. Red. = 426 ccm.

Gasvolumen 41.0 ccm bei 20.2° T und 745 mm Bst. Red. = 36.71 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen 38.4 ccm bei 20.2° T und 745 mm Bst. Red. = 34.37 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen 31.8 ccm bei 18.9° T und 745 mm Bst. Red. = 28.53 ccm.

CO₂ gefunden 2.34 ccm = 6.37%. **Im ganzen 27.13 ccm.**

O gefunden 5.84 ccm = 15.9%.

O-Verbrauch 4.94%. **Im ganzen 20.9 ccm.**

In Wasser und Alkohol lösliches Oxydationsenzym.

Nr. 5.

17.5 ccm Enzym + 2.5 ccm 2% H₂O₂.

Volumen des Gefäßes = 365 - 20 = 345 ccm. Red. = 313 ccm.

Gasvolumen 26.8 ccm bei 20.2° T und 745 mm Bst. Red. = 24.0 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen 25.65 ccm bei 20.2° T und 745 mm Bst. Red. = 22.97 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen 20.5 ccm bei 18.9° T und 745 mm Bst. Red. = 18.39 ccm.

CO₂ gefunden 1.03 ccm = 4.02%. **Im ganzen 12.58 ccm.**

O gefunden 4.58 ccm = 19.49%.

O-Verbrauch 1.31%. **Im ganzen 4.1 ccm.**

Nr. 6.

17.5 ccm Enzym + 2.5 ccm 2% H₂O₂ + 1.3 g Traubenzucker.

Volumen des Gefäßes = 360 - 20 = 340 ccm. Red. = 308 ccm.

Gasvolumen 35.7 ccm bei 20.2° T und 745 mm Bst. Red. = 31.79 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen 33.4 ccm bei 20.2° T und 745 mm Bst. Red. = 29.91 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen 27.2 ccm bei 18.5° T und 745 mm Bst. Red. = 17.23 ccm.

CO₂ gefunden 2.06 ccm = 6.13%. **Im ganzen 18.88 ccm.**

O gefunden 2.68 ccm = 17.23%.

O-Verbrauch 3.57%. **Im ganzen 11.01 ccm.**

Aus diesen Gasanalysen ersieht man also, daß bei ganz gleichen Versuchsbedingungen von dem wasserlöslichen Oxydationsenzym für sich allein in der Menge von 20 ccm = 0.444 g Trockensubstanz während 3 Tagen kein Sauerstoff verbraucht

wurde, aber dennoch 3,62% und im ganzen 11,33 ccm Kohlensäure entwickelt wurden. 20 ccm (= 0,114 g Trockensubstanz) des in Neutralsalzen löslichen Enzyms verbrauchten 3,3%, im ganzen 10,33 ccm Sauerstoff und entwickelten 5,67% oder im ganzen 17,74 ccm Kohlensäure. 20 ccm (= 0,0268 g Trockensubstanz) des in Wasser und Alkohol löslichen Enzyms verbrauchten 1,31% oder im ganzen 4,1 ccm Sauerstoff und bildeten 4,02% oder im ganzen 12,58 ccm Kohlensäure.

Viel bedeutender war der Sauerstoffverbrauch und die Kohlensäurebildung in den 3 Versuchen mit Beimengung von 1,6 g Glukose zu den Enzymen, und zwar wurde 1. von dem wasserlöslichen Enzym 6,9% = 20,97 ccm Sauerstoff mehr verbraucht und 3,32% = 9,76 ccm CO₂ mehr entwickelt; 2. von dem in Neutralsalzen löslichen Enzym 1,64% = 10,57 ccm Sauerstoff mehr verbraucht und 0,70% = 9,3 ccm Kohlensäure mehr entwickelt, und 3. von dem in Wasser und Alkohol löslichen Enzym 2,26% = 6,91 ccm Sauerstoff mehr verbraucht und 2,11% = 6,3 ccm Kohlensäure mehr gebildet.

Schließlich wurde mit dem in Neutralsalzen löslichen Enzym noch ein Versuch angestellt, in welchem die Gasanalysen nacheinander wiederholt wurden, und zwar die erste mit dem Enzym allein, die zweite 24 Stunden, die dritte 48 Stunden und die vierte 3 Tage nach Zuckerzusatz ausgeführt wurden. Der vorher sterilisierte Apparat, welcher zum Versuche benutzt wurde, stand während der ganzen Dauer des Versuches im Thermostaten.

Nr. 1.

Gasanalyse von 75 ccm in Neutralsalzen löslichen Enzyms nach 3tägigem Verbleiben im Thermostaten.

Die Füllung des Apparates fand bei 28° T und 758 mm Bst. statt.

Inhalt des Apparates — 360 — 75 = 285 ccm. Red. = 252.

Gasvolumen 19,4 ccm bei 20,7° T und 758 mm Bst. Red. — 17,55 ccm.

Nach Absorption mit 50% KOH.

Gasvolumen 18,3 ccm bei 20° T und 753 mm Bst. Red. — 16,51 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen 15,0 ccm bei 20,5° T und 752 mm Bst. Red. = 13,47 ccm.

CO₂ gefunden 1.01 ccm = 5.6% oder im ganzen 14.39 ccm.

O gefunden 3.04 ccm = 17.3%.

O-Verbrauch = 3.5% oder im ganzen 8.12 ccm.

Nr. 2.

Gasanalyse 24 Stunden nach Zusatz von 30 ccm 4%iger
Zuckerlösung zu dem Enzym.

Inhalt des Gefäßes = 360 - (75 + 30) = 255 ccm. Red. = 227.15 ccm.

Gasvolumen 87.2 ccm bei 19.2° T und 757 mm Bst. Red. = 79.75 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen 82.1 ccm bei 19.5° T und 758 mm Bst. Red. = 75.01 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen 68.0 ccm bei 19.8° T und 760 mm Bst. Red. = 62.23 ccm.

CO₂ gefunden 4.74 ccm = 5.94% oder im ganzen = 13.48 ccm.

O gefunden 12.78 ccm = 16.02%.

O-Verbrauch 4.78% oder im ganzen 10.85 ccm.

Nr. 3.

Gasanalyse 48 Stunden nach Zusatz von 30 ccm
Zuckerlösung.

Gasvolumen 14.2 ccm bei 19.3° T und 755 mm Bst. Red. = 12.93 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen 13.3 ccm bei 19.4° T und 758 mm Bst. Red. = 12.14 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen 11.2 ccm bei 18.7° T und 758 mm Bst. Red. = 10.2 ccm.

CO₂ gefunden 0.79 ccm = 6.1% oder im ganzen 13.84 ccm.

O gefunden 1.94 ccm = 15.0%.

O-Verbrauch 5.84% oder im ganzen 13.174 ccm.

Nr. 4.

Gasanalyse 9 Tage nach Zuckerzusatz zu dem Enzym.

Gasvolumen 10.3 ccm bei 19.5° T und 749 mm Bst. Red. = 9.29 ccm.

Nach Absorption mit 50% KHO.

Gasvolumen 9.0 ccm bei 18.8° T und 749 mm Bst. Red. = 8.15 ccm.

Nach Absorption mit 25% Pyrogallol.

Gasvolumen 7.7 ccm bei 19.4° T und 749 mm Bst. Red. = 6.95 ccm.

CO₂ gefunden 1.14 ccm = 11.2% oder im ganzen 29.9 ccm.

O gefunden 1.2 ccm = 12.91%.

O-Verbrauch 7.9% oder im ganzen 21.15 ccm.

Aus den eben angeführten Analysen geht hervor, daß von 75 cem (= 0,428 g Trockensubstanz) des in Neutralsalzen löslichen Oxydationsenzym im Laufe von 3 Tagen bei Brutttemperatur $3,5^{\circ}$ = 8,12 cem Sauerstoff verbraucht und $5,6^{\circ}$ = 14,39 cem Kohlensäure gebildet werden. 24 und 48 Stunden nach Zuckerzusatz wurde der Kohlensäuregehalt unverändert gefunden, während der Sauerstoffverbrauch nach 24 Stunden $1,28^{\circ}$ = 2,73 cem und nach 48 Stunden $2,34^{\circ}$ = 5 cem betrug. Nach 9 Tagen wurden $5,6^{\circ}$ oder im ganzen 15,51 cem Kohlensäure mehr gebildet und $4,4^{\circ}$ = 13,0 cem Sauerstoff mehr verbraucht. Wie bekannt, wird der Traubenzucker nach den früheren Untersuchungen von M. Nencki und N. Sieber¹⁾ in neutraler Reaktion nicht zersetzt und infolge dessen absorbiert er weder Sauerstoff noch bildet sich Kohlensäure. Außerdem stellten wir noch folgende zwei Parallelversuche an.

20 cem einer $1,63^{\circ}$ igen Traubenzuckerlösung, welche mittels Fehlingscher Lösung genau bestimmt worden war, wurden einerseits mit 10 cem des unveränderten wasserlöslichen Oxydationsenzym, andererseits mit 10 cem des nämlichen, aber auf 100° erwärmten Oxydationsenzym versetzt und unter aseptischen Kautelen in den auf $37,7^{\circ}$ temperierten Brutschrank gestellt. Nach Verlauf von 1 Stunde wurden beiden Lösungen Proben entnommen und titrimetrisch auf ihren Zucker-gehalt untersucht.

In dem ersten Versuche mit ungekochtem Enzym waren im Laufe einer Stunde von 0,326 g Traubenzucker 0,2116 g = 64° zersetzt worden. Im zweiten Versuche waren 0,0881 g = 27° zersetzt worden. Hieraus ersieht man, daß durch Erwärmen auf 100° die Fähigkeit, Zucker zu oxydieren, bei dem wasserlöslichen Oxydationsenzym etwa auf $\frac{1}{3}$ vermindert, jedoch nicht vollkommen vernichtet wird, da in dem Versuch mit aufgekochtem Enzym immer noch $\frac{1}{3}$ des vorhandenen Zuckers zersetzt werde. Um zu ermitteln, worauf die Zuckerzersetzung in diesem Falle beruht, stellten wir in verschiedenen Richtungen weitere Versuche an: die in dieser Beziehung erlangten Resultate sollen nächstens mitgeteilt werden.

¹⁾ Journal f. prakt. Chemie, Bd. 26, S. 8.

Nach den Beobachtungen von Martin Hahn¹⁾ besitzt der Saft aus dem Kolben von *Arum maculatum* ein stark glykolytisches, sowie invertierendes Vermögen, welches mit der Gegenwart der Oxydasen in Zusammenhang gestellt wird.

Daß Traubenzucker im Blute rasch zersetzt wird, ist längst bekannt. Diese Beobachtung rührt noch von Claude-Bernard²⁾ her. Sie wurde auch von Lépine³⁾ bestätigt. Noch früher hatte Scheremetjewski⁴⁾ gefunden, daß in zuckerhaltigem Blute der Sauerstoff im Laufe von 5¹/₂ Stunden um 3,25% abnimmt, während der Kohlensäuregehalt in demselben Zeitraume um 3,75% zunimmt. Nach Kraus⁵⁾ erfolgt die Glykolyse im Blute unter Abspaltung von Kohlensäure infolge fermentativer Umsetzung. Röhm⁶⁾ und seine Schüler, namentlich Spitzer,⁷⁾ haben nachgewiesen, daß nicht allein das Blut, sondern auch wässrige Auszüge sämtlicher Organe in diesem Zustande sind, durch Oxydation Zucker zu zerstören. Röhm und Spitzer äußern, daß sie nicht wissen, welche Zellbestandteile hierbei als Sauerstofferreger wirken, sie zweifeln jedoch nicht, daß hierbei Oxydationsenzyme mitwirken.

Nach Spitzer ist die Glykolyse nicht von einem im Serum enthaltenen Ferment, noch vom Hämoglobin, sowie dessen Zersetzungsprodukten, ebensowenig von uns bekannten Eiweißkörpern des Blutplasmas abhängig. «Die glykolytische Wirkung des Blutes ist eine fermentative. Sie ist möglich bei der Anwesenheit von atmosphärischem resp. in Oxyhämoglobin vorhandenem Sauerstoff. Die glykolytische Substanz ist mittels Alkohol fällbar. Das glykolytische Prinzip wurde in sämtlichen Organen und Zellen nachgewiesen. Nach Spitzer

1) Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. 33. S. 3555.

2) Vorlesungen über Diabetes. 1878.

3) Comptes rendus. 1890—1893.

4) Berichte der königl. sächs. Gesellschaft d. Wissensch. Sitzung vom 12. XII. 1868.

5) Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 21. 1892.

6) Centralblatt für die medizinischen Wissenschaften. 1893. Nr. 51. S. 849.

7) Berliner klin. Wochenschr. 1894. S. 949.

ist die Fähigkeit, Traubenzucker zu zersetzen, von dem Protoplasma abhängig.

Aus diesen Angaben geht hervor, daß, wie die Beobachtungen und Untersuchungen anderer Autoren beweisen, der Zucker aus dem Blute infolge eines Oxydationsprozesses verschwindet. Die früheren Beobachtungen und Ansichten haben, wie man sieht, durch die vorliegende Untersuchung eine neue Bestätigung gefunden. Durch diese Untersuchungen ist es uns gelungen nachzuweisen, daß die aus dem Blutplasmafibrin, welches, wie bekannt, in ständiger Umwandlung ist, Fermente mechanisch einzuschließen oder zu fixieren, dargestellten drei oxydierenden Enzyme auf die untersuchten Monosaccharide eine oxydierende Wirkung ausüben. Gleiche Wirkung auf Zuckerstoffe besitzt auch das in Neutralsalzen lösliche Oxydationsenzym aus normaler Kalbs- und Hundemilch, die sogenannte Globulinoxidase von Abelous et Biarnés.

Aus den noch nicht ganz abgeschlossenen Untersuchungen, welche demnächst mitgeteilt werden sollen, geht außerdem hervor, daß auch Di- und Polysaccharide ebenfalls durch die genannten drei Enzyme angegriffen werden.

Auf Rohrzucker wirken die 3 Enzyme weniger energisch und nicht in gleichem Maße ein. Von den 3 Enzymen war das in Alkohol und Wasser lösliche, welches nur in Gegenwart von Hydroperoxyd oxydierend wirkt, das erste, welches auf Rohrzucker eine invertierende Wirkung zeigte. Versuche, in denen 10 g Rohrzucker in 20 ccm Wasser gelöst, mit je 50 ccm von jedem der 3 Oxydationsenzyme vermischt und dann zur Kontrolle auf Reduktion mittels Trommerscher Probe geprüft wurden, ergaben sämtlich ein negatives Resultat. Nach 24stündigem Stehen im Thermostaten wurde in den aus dem Gemisch entnommenen Proben, welches aus dem in Alkohol und Wasser löslichen Enzym hergestellt war, mit der Trommerschen Probe Reduktion des Kupferoxyds beobachtet. In den anderen Versuchen mit den 2 Enzymen konnte erst nach Verlauf von einigen Tagen in den entnommenen Proben Reduktion des Kupfers konstatiert werden.

Hier sei nur eine Tabelle angeführt, aus welcher zu

ersehen ist, daß bei Einwirkung der 3 Enzyme auf Rohrzucker sich ebenfalls Kohlensäure entwickelt, welche durch Wägung bestimmt wurde.

Bestimmung der Kohlensäure, welche bei Einwirkung des oxydierenden Enzyms auf Rohrzucker entwickelt wurde.

Gewichtszunahme der 50% KHO enthaltenden Apparate.

Wasserlösliches Enzym 50ccm + 10g Rohrzuck. + 10 ccm Wasser	In Neutralsalzen lös- liches Enzym	In Alkohol und Wasser lösliches Enzym
Nach 7 Tagen 0.0168 g	Nach 7 Tagen 0.1085 g	Nach 7 Tagen 0.0377 g
Nach 30 Tagen 0.0852 g volumetrisch 43.32 ccm	Nach 30 Tagen 0.2741 g volumetrisch 137.39 ccm	Nach 30 Tagen 0.170 g volumetrisch 86.45 ccm

Aus dieser Tabelle ersieht man, daß in dem Versuche mit dem in Neutralsalzen löslichen Enzym am meisten Kohlensäure, nämlich 0,2741 g = 137,39 ccm ausgeschieden wurde; im Versuche mit dem in Wasser und Alkohol löslichen Enzym wurden 0,170 g = 86,45 ccm ausgeschieden; am geringsten war die Kohlensäureausscheidung in dem Versuch mit dem wasserlöslichen Enzym, nämlich 0,0852 g = 43,32 ccm. Nach Verlauf von 7 Tagen entnommene Proben ergaben in den Versuchen mit dem in Neutralsalzen, sowie mit dem in Wasser und Alkohol löslichen Enzym Reduktion von Kupferoxyd in alkoholischer, sowie in essigsaurer Lösung (d. h. mit dem Barfoedschen Reagens). In dem Versuche mit dem wasserlöslichen Enzym fiel jedoch nur die Trommersche Probe positiv aus, während die Barfoedsche ein negatives Resultat ergab, was auf Abwesenheit der Glukose hindeutet. Dieser Befund wurde auch durch das Verhalten zu dem Phenylhydrazin bestätigt.

In dem Versuch mit dem in Neutralsalzen löslichen Oxydationsenzym und Rohrzucker wurde mittels essigsauren

Phenylhydrazins ein Osazon erhalten, welches den für Glukose charakteristischen Schmelzpunkt, nämlich zwischen 205 und 206°C., besaß. Das in dem Versuche mit dem in Wasser und Alkohol löslichen Enzym und Rohrzucker erhaltene Osazon zeigte einen Schmelzpunkt zwischen 190 und 193°C. In dem Versuche mit dem wasserlöslichen Enzym konnte kein Osazon dargestellt werden. Wurster¹⁾ hat bekanntlich gefunden, daß durch Wasserstoff-superoxyd der Rohrzucker zunächst invertiert, dann wie Traubenzucker unter CO₂ Entwicklung oxydiert wird.

Gegen Polysaccharide, speziell gegen Stärke, erwies sich das wasserlösliche oxydierende Enzym am wirksamsten. Durch weitere Untersuchungen soll festgestellt werden, ob allen Oxydationsenzymen die Fähigkeit, Kohlehydrate, speziell die Zuckerarten, zu zersetzen, zukommt, oder ob es solche gibt, die diese Fähigkeit nicht besitzen. Hier sei nebenbei bemerkt, daß der wässrige Fleischauszug glykolytisches Vermögen besitzt, z. B. 20 ccm des Fleischauszuges mit 10 ccm Wasser, in welchem 0,589 g Zucker gelöst waren, versetzt, haben bei Bruttemperatur im Laufe von drei Stunden 0,232 g = 39,3% Traubenzucker bei Luftzutritt ohne Gasentwicklung zersetzt.

Um diese Erscheinungen klarzustellen, haben wir auch die Oxydationsenzyme pflanzlicher Herstammung in gleicher Richtung untersucht und gefunden, daß nicht allein aus dem Tierkörper stammende Oxydationsenzyme die Zersetzung der Kohlehydrate resp. des Zuckers zu bewirken imstande sind, sondern die gleiche Wirkung kommt auch den pflanzlichen Oxydationsenzymen zu. Z. B. wir haben beobachtet, daß wässrige Auszüge verschiedener Pflanzen resp. Pilze imstande sind, ebenfalls sehr energisch den Traubenzucker im Laufe von wenigen Stunden zu zersetzen. Hierüber sollen genaue Zahlenangaben in einer demnächst erscheinenden Publikation mitgeteilt werden.

Wir haben Grund, anzunehmen, daß es verschiedene Oxydationsenzyme gibt, und daß sie außerdem, was ihre Wirkung

¹⁾ Zentralbl. f. Physiologie, S. 33—35.

anbetrifft, verschiedenartige sind. Außerdem haben wir gesehen, und auch andere Autoren bestätigen dieses, daß nämlich nicht jedes oxydierende Enzym imstande ist, alle leicht oxydablen Körper zu oxydieren. Im Gegenteil scheinen diese Enzyme eine elektive Wirkung zu besitzen: sie oxydieren nur gewisse Körper, während sie dagegen andere, verhältnismäßig leicht oxydable Körper entweder gar nicht angreifen oder in ganz anderer, für sie spezifischer Art und Weise verändern resp. verbrennen. Wir haben z. B. gefunden, daß die 3 Oxydationsenzyme, welche, wie wir sahen, mit Leichtigkeit die Monosaccharide angreifen und zersetzen, nicht imstande sind, so leicht oxydable Substanzen, wie die Salicyl-, Benz- und Formaldehyde zu den entsprechenden Säuren, der Salicyl-, Benzoe- und Ameisensäure, zu oxydieren, sondern nach einem ganz anderen Modus und viel tiefgreifender auf sie einwirken, nämlich sie in Farbstoffe umwandeln. Wir wollen in einer nächsten Veröffentlichung über diese Untersuchungen berichten.

Schon dieses Faktum allein genügt, um uns zu dem Schlusse zu berechtigen, daß es verschiedene Oxydationsfermente geben muß: denn wir wissen, daß verschiedene Organ- und Gewebsauszüge (Jacoby, Salkowski), dank der Anwesenheit eines Oxydationsenzym, imstande sind, den Salicylaldehyd zu Salicylsäure zu oxydieren. Vorläufig kann nicht behauptet werden, daß die Oxydationsfermente keine tiefgreifende Wirkung ausüben: es ist möglich, daß die einen von ihnen eine weniger energische, die anderen aber eine tiefergreifende Wirkung ausüben.

Durch die höchst interessanten Untersuchungen von Julius Stoklasa und F. Czerny¹⁾, welche in diesem Jahre veröffentlicht worden sind, haben wir erfahren, daß es nicht nur in den pflanzlichen, sondern auch in den tierischen Zellen Enzyme gibt, welche die Glukose anaërobiotisch durch alkoholische Gärung zersetzen. Den erwähnten Autoren ist es gelungen, aus verschiedenen Pflanzenteilen und tierischen Organen, wie Herz, Nieren, Lunge usw. (eine besonders energische alkoholische

¹⁾ Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 36, S. 622.

Gärung riefen Lungen- und Leberextrakte hervor), ein Enzym nach Art der Hefezymase darzustellen und mittels Alkoholäther zu isolieren. In isoliertem Zustande behalten jedoch die Enzyme ihre gärungserregende Kraft nicht lange bei: nach 5 Tagen ist sie bereits herabgesetzt und nach 7 Tagen ganz verschwunden. Weitere Untersuchungen, sowohl in dieser Richtung als auch in betreff der Oxydationsfermente oder -Enzyme werden unsere Anschauungen erweitern und uns darüber aufklären, unter welchen Bedingungen die einen und die anderen Enzyme in Tätigkeit treten.

Jedenfalls ist der Nachweis, daß oxydierende Enzyme an der Zersetzung der Kohlehydrate resp. des Zuckers teilnehmen können, in biologischer Hinsicht ohne Zweifel von Bedeutung. Da wir nun wissen, daß die Oxydationsenzyme die Fähigkeit besitzen, die Spannkraft, welche dem Tierkörper für Wärmeerzeugung und Arbeitsleistung nötig ist, in lebendige Kraft umzusetzen, müssen wir diesen Enzymen mehr Bedeutung einräumen, als wir das bis dahin getan haben. Die weite Verbreitung der oxydierenden Enzyme in der Pflanzen- und Tierwelt, sowie andererseits die ihnen zukommende schützende resp. entgiftende Wirkung auf Toxine gibt uns einen weiteren Beweis dafür, daß sie in der Natur eine ganz und gar nicht untergeordnete Rolle zu spielen bestimmt sind.