

Über die Malzoxydase.

Von

W. Issajew.

(Mitteilung aus dem Laboratorium für Technologie der Kohlehydrate des Polytechnischen Instituts zu Warschau.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Juni 1905.)

Man findet in der Literatur nur vereinzelte Angaben, aus welchen das Vorhandensein eines Oxydationsenzym im Malze sich vermuten läßt. So war es schon lange bekannt, daß fast alle Pflanzen und Tierorgane die Eigenschaft besitzen, das Wasserstoffsuperoxyd zu katalysieren: man benutzt, um diese Zersetzung zum Vorschein zu bringen, die bekannte Guajacreaktion. Die Fähigkeit der Malzauszüge, diese Reaktion zu geben, wurde zuerst, wie es scheint, von van den Broek¹⁾ bemerkt. Die Reaktion ist so empfindlich, daß Schönbein²⁾ empfahl, mittels Malzauszuges die Spuren von H_2O_2 z. B. im Wasser nachzuweisen. Er weist ausdrücklich darauf hin, daß die Substanzen, welche das Wasserstoffsuperoxyd katalysieren und im Pflanzen- und Tierreich sehr verbreitet sind, nicht organisiert sind und zur Klasse der fermentartigen Substanzen gehören. Infolgedessen ist die Guajacreaktion eine spezifische Enzymreaktion und man benutzte dieselbe zum Nachweis der Enzyme überhaupt.³⁾ Jetzt aber wissen wir, daß die Erscheinung viel komplizierter ist: die Guajacreaktion ist keine allgemeine Enzymreaktion, sondern eine Oxydasenreaktion. Dabei sind verschiedene Fälle zu unterscheiden: Zuweilen tritt die Bläuung der Tinktur ohne Zusatz von H_2O_2 ein, in anderen Fällen ist der letztere nötig: die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds kann auch durch be-

¹⁾ Jahresber. von Liebig u. Kopp, 1849, S. 455; 1850, S. 515.

²⁾ Zeitschrift f. Biologie, 1868, S. 367.

³⁾ Oppenheimer, Die Fermente, S. 44; Effront, Les Enzymes, S. 27.

sondere Enzyme, Katalasen, bewirkt werden, dabei wird der Sauerstoff nicht aktiviert. Man unterscheidet somit drei Enzymklassen dieser Kategorie: Oxydasen, Peroxydasen und Katalasen.

Die Eigenschaft des Malzauszuges, Oxydationen hervorzubringen, wurde von Struve¹⁾ beobachtet. Versetzt man eine Pyrogallollösung mit Gummiarabicumlösung oder Malzauszug, so scheiden sich nach einiger Zeit Kristalle von Purpurogallin ab. Struve erklärt diese Eigenschaft des Malzauszugs durch dessen Gehalt an Gummi: wir wissen aber jetzt, daß auch im Gummiarabicum sich eine Oxydase befindet. Lepine²⁾ hat bei seinen Studien über die Glykolyse gefunden, daß die Malzdiastase durch Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure in das glykolytische Enzym verwandelt werden kann. Es handelte sich gewiß um die der Diastase stets beigemischte Oxydase: dieselbe wird durch Schwefelsäure abgeschwächt oder ganz vernichtet.

Grüss³⁾ studierte die Frage näher. Er benutzte bei seinen Untersuchungen das Tetrapapier d. h. Papierstreifen mit Tetramethylparaphenyldiaminlösung getränkt. Legt man auf das angefeuchtete Tetrapapier ein zerschnittenes Gerstenkorn, so färbt sich letzteres in Berührung mit Luft violett. Erhöhte Temperatur und Alkohol verhindern das Auftreten der Reaktion. Bei der Keimung tritt die Reaktion zuerst stärker, dann aber schwächer hervor. Grüss schreibt diese Reaktion einem Oxydationsenzym, der Spermase zu. Er machte aber keine Versuche zur Isolierung des Enzyms.

1. Untersuchungsmethoden.

Ich führte meine Versuche ausschließlich mit Auszügen aus Gerste, Malz und Mercks Diastase aus. Man kann zur Extraktion mit fast dem gleichen Erfolg Wasser, wässriges Glycerin oder 20%igen Alkohol anwenden. Am bequemsten benutzt man 50%iges Glycerin, weil dadurch die Sterilisation der Auszüge mittels Bakterienfilter entbehrlich wird. In meinem Laboratorium befinden sich mehr als ein Jahr alte

¹⁾ Liebigs Ann., Bd. CLXIII, S. 160.

²⁾ Comptes rendus, Bd. CXX, S. 139.

³⁾ Wochenschrift für Brauerei 1899, S. 522.

Glycerinauszüge, welche vollkommen klar, infektionsfrei und oxydasereich bleiben. Die Glycerinauszüge aber filtrieren infolge ihrer Zähigkeit ziemlich langsam und durch Wasser wird jedenfalls mehr Oxydase extrahiert. Man kann deswegen auch folgendermaßen verfahren. Das Malz wird mit chloroform-gesättigtem Wasser 48 Stunden extrahiert, filtriert und das Filtrat mit dem gleichen Volumen absoluten Glycerins versetzt. Die Anwendung der Glycerinauszüge bietet noch den großen Vorteil, daß man sich größere Mengen davon vorbereiten und also mehrere Versuche mit gleichmäßigem Material ausführen kann.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden auch in 50%igem Glycerin gelöst und zwar in solcher Quantität, daß ihre schließliche Konzentration nach dem Zusatz der Enzymlösung 1%ig war: im Falle einer geringen Löslichkeit wurden die Substanzen in entsprechender Quantität als solche zugesetzt.

Die Oxydation mit Luft wurde unter fortwährendem Schütteln und bei erhöhter Temperatur (38°) ausgeführt. Dazu benutzte ich die in dieser Zeitschrift¹⁾ beschriebene Vorrichtung. Die Flaschen waren von dunklem Glase und die Versuche wurden hauptsächlich während der Nacht ausgeführt, um die Wirkung des Lichtes, welche speziell untersucht werden soll, zu eliminieren. Die Versuche dauerten gewöhnlich 16—18 Stunden. Vergleichbar sind gewiß nur die Versuche eines und desselben Tages. Ich führe die Beschreibung eines Versuchs an, um die Anordnung und Berechnung der Versuche an einem Beispiel zu erläutern, in der Folge werde ich nur die Resultate angeben.

50 ccm 1%iger Pyrogallollösung in 50%igem Glycerin wurden mit 30 ccm Auszug aus lufttrockenem Malz versetzt. Volumen der Reaktionsflasche: 505 ccm. Anfang des Versuchs 2 Uhr nachmittags, Druck 760,9 mm, Temperatur 18,7°. Schluß des Versuchs 8 Uhr früh, Druck 757,7 mm, Temperatur 18,5°. Unterschied der Quecksilberhöhen in beiden Schenkeln des Manometers — 30 mm.

Zur Analyse wurden 40,55 ccm Gas genommen: gefunden: Kohlensäure — 0,9 ccm = 2,21%, Sauerstoff — 5,85 ccm = 14,42%.

¹⁾ Bd. XLII, S. 135 (1904).

Anfangsvolumen der Luft in der Flasche bei 0° und 760 mm 396,5 ccm, Sauerstoff 82,9 ccm. Volumen der Luft nach der Reaktion 376,8 ccm, Sauerstoff 54,3 ccm, Kohlensäure 8,3 ccm.

Es wurden also 28,6 ccm Sauerstoff absorbiert und 8,3 ccm Kohlensäure entwickelt. Die Farbe der Flüssigkeit war dunkelbraun, undurchsichtig.

Die Auszüge, welche zur Ausführung der unten beschriebenen Versuche dienten, wurden größtenteils aus lufttrockenem Malz durch Extraktion mit 4 Teilen 50%igen Glycerins bei 25° im Thermostaten zubereitet. Nach 48 Stunden wurden sie filtriert, neutralisiert und 18 Stunden lang in meinem beweglichen Thermostaten geschüttelt, um den größten Teil der reduzierenden Körper wegzuoxydieren. Die Flüssigkeit färbt sich dabei dunkel und es scheidet sich ein flockiger Niederschlag aus. 100 ccm Malzauszug absorbieren dabei etwa 4 ccm Sauerstoff und entwickeln etwa 2 ccm Kohlensäure. Die oxydierte Flüssigkeit wurde mittels Kieselgur klar filtriert und zu den Hauptversuchen verwendet.

2. Qualitative Reaktionen.

Für qualitative Reaktionen benutzte ich Guajactinktur, Tetrareagens — Tetramethylparaphenylendiaminchlorhydratlösung und alkoholische Guajacollösung. Die Gersten- und Malzauszüge verhalten sich gegen diese Reagentien durchaus gleich.

Mit frisch bereiteter Guajactinktur und mit Guajacol bekommt man keine Färbung; mit Tetralösung eine schwache violette Färbung; setzt man aber ein paar Tropfen schwachen Wasserstoffsperoxyds hinzu, so tritt sofort eine intensiv blaue Färbung mit Guajac, eine braune mit Guajacol und eine violette mit Tetrareagens ein; zugleich wird eine starke Wasserstoffsperoxydkatalyse beobachtet, was auf die Anwesenheit einer Katalase hindeutet. Mit einem Tag alter Guajactinktur bekommt man auch ohne H_2O_2 eine schwache grüne Färbung.

Man sollte auf Grund dieser qualitativen Reaktionen die Malzoxydase in die Klasse der sogenannten indirekten Oxydasen.

β -Oxydasen, Peroxydasen¹⁾ einreihen, aber wir werden weiter sehen, daß Malzauszüge auch direkte Oxydationen verschiedener Substanzen beschleunigen. Wir haben wahrscheinlich in Malzauszügen beide Arten von Oxydasen und außerdem noch eine Katalase.

Die Auszüge, 10—15 Minuten im Wasserbade erwärmt, geben keine Farbreaktionen, obgleich ihre oxydativen Eigenschaften auch bei höherer Temperatur nicht vernichtet werden, wenigstens in Glycerinlösungen.

Läßt man den Malzauszug in offenem Reagenscylinder einige Tage stehen, so färbt sich die Flüssigkeit dunkel, indem diese Färbung sich allmählich von oben nach unten verbreitet. Sie deutet auf die Anwesenheit leicht oxydierbarer Substanzen, deren Natur uns vorläufig unbekannt ist; wir können sie nach Grüss' Vorschlage unter dem Namen reduzierende Körper zusammenfassen.

3. Einfluß der Konstitution autoxydabler Substanzen.

Um die untersuchte Oxydase näher zu charakterisieren, prüfte ich eine Reihe von Substanzen in bezug auf ihre Oxydierbarkeit durch Luft in Gegenwart von Malzauszug. Dabei zeigte sich, wie dies von Bertrand²⁾ bei Laccase gefunden wurde, daß die Malzoxydase sehr spezifisch wirkt und der Laccase ähnlich ist.

Unter den vielen von mir geprüften Stoffen wurden folgende gar nicht oder ziemlich schwach oxydiert: Phenol, Kresole, m-Xylenol, Carvacrol, Guajacol, Orcin, Gallussäure, Gerbsäure, Vanillin, Acetaldehyd, Butylaldehyd, Benzaldehyd, Salicylaldehyd,³⁾ Terpinhydrat, Terpeneol, Glykokoll, Asparagin, Tyrosin, Leucin, Glukose, Fruktose, Maltose, Chinon, Glutaminsäure, Caffein, Morphin, Anilin, Benzoylphenylhydrazin, Dimethylhydrochinon, Dimethylresorcin, Ameisensäure, Milchsäure und arsenige Säure (Kaliumsalze).

¹⁾ Oppenheimer, Die Fermente, S. 349, 350 u. 369.

²⁾ Comptes rendus, Bd. CXXII, S. 1132.

³⁾ Um die Säuren abzustumpfen, wurde bei Aldehyden CaCO_3 zugesetzt.

Folgende Substanzen dagegen oxydierten sich merklich und zum Teil ziemlich stark: p-Amidophenol, Brenzkatechin, Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol, Phloroglucin, Oxyhydrochinon, gallussaures Kalium.

Die Versuche wurden folgenderweise angestellt.

1. 50 ccm 1 $\frac{1}{2}$ %iger Lösung des untersuchten Körpers + 25 ccm Malzauszug.

2. 50 ccm 1 $\frac{1}{2}$ %iger Lösung des untersuchten Körpers + 25 ccm Glycerin (50%).

3. 50 ccm 50%igen Glycerins + 25 ccm Malzauszug.

Täglich wurde nur ein Körper untersucht: da aber alle Versuche mit demselben Malzauszug und bei annähernd gleichen Bedingungen ausgeführt wurden, so sind die Versuche verschiedener Tage bis zu gewissem Grade unter sich vergleichbar.

Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Untersuchter Stoff	Ab-sorbierter O			Ent-wickelte CO ₂			Farbe der Lösung	
	1	2	3	1	2	3	1	2
p-Amidophenol . . .	35.4	29.5	2.0	—	—	—	dunkelbraun, Nied.	do.
Brenzkatechin . . .	6.8	1.8	0.9	—	—	—	dunkelrot	hellrot
Resorcin	3.5	1.9	1.0	—	—	—	fast unverändert	
Hydrochinon	4.2	2.0	1.5	—	—	—	rosa	unverändert
Pyrogallol	15.6	2.7	2.5	2.6	—	—	dunkelbraun	gelb
Phloroglucin	4.1	0.4	1.4	—	—	—	unverändert	
Oxyhydrochinon . .	48.7	17.0	1.3	5.9	—	—	dunkelbraun	rot
Gallussaures Kalium	62.0	28.2	1.8	32.0	5.6	—	»	braun
Gallussäure	2.4	1.6	1.4	—	—	—	unverändert	

Es folgt aus den oben angeführten negativen Versuchen und aus dieser Tabelle, daß nur Körper von ganz bestimmtem Charakter und Konstitution durch die Malzoxydase oxydiert werden. Sie alle sind autoxydabel, d. h. mehr oder weniger leicht an der Luft oxydierbar, und diese Autoxydation wird durch die Malzoxydase nur beschleunigt: diese Beschleunigung

ist verschieden stark, je nach der Konstitution der Stoffe. Sie gehören fast alle zu den Polyphenolen: p-Amidophenol oxydiert sich leichter als Hydrochinon, so daß die Amidgruppe die Oxydierbarkeit der Benzolderivate erhöht: im Gegensatz dazu erniedrigt die Methylgruppe dieselbe, was aus dem Beispiel des Orcins folgt. Je mehr Hydroxyle vorhanden sind, desto energischer werden die Phenole oxydiert. Gallussäure wird am stärksten oxydiert, aber nur in Gestalt von Salz, freie Säure wird nicht oxydiert. Aus den Stellungisomeren werden, wie es scheint, am stärksten Orthoverbindungen oxydiert, dann die Para-, am schwächsten die Meta-. Bertrand fand für die Laccasé etwas abweichende Anordnung: para, ortho, meta. Es muß allerdings bemerkt werden, daß die Malzoxydase bei einiger Ähnlichkeit der Laccase auch wesentlich abweichende Eigenschaften besitzt. Die von mir erhaltenen Oxydationseffekte sind viel schwächer als die von Bertrand beobachteten, besonders bei Hydrochinon; dies kann allerdings durch einen geringeren Gehalt an Enzym erklärt werden, obgleich wir gleichzeitig mit einer schwachen Oxydation des Hydrochinons eine starke Oxydation des Pyrogallols, dann des Brenzkatechins beobachteten. Viel wichtiger ist die Empfindlichkeit der Malzoxydase gegen saure Reaktion: Gallussäure wird von derselben gar nicht oxydiert, von der Laccase dagegen sehr energisch. Wir werden weiter den Unterschied im Verhalten gegen Mangansalze sehen.

Es muß bemerkt werden, daß der Ersatz des Wasserstoffs der Hydroxyle durch Methylgruppen die Oxydierbarkeit aufhebt (Dimethylhydrochinon, Dimethylresorcin). Charakteristisch ist auch das negative Verhalten gegen Tyrosin — die Malzoxydase ist also von der Tyrosinase Bertrands¹⁾ verschieden. Gegen Guajacol verhält sich dieselbe auch indifferent, nach dem Zusatz von H_2O_2 tritt, wie wir oben gesehen haben, eine Oxydation ein.

Die Produkte der Oxydation bedürfen noch der Erforschung. Was z. B. Pyrogallol betrifft, so beobachtete ich niemals charakteristische rote Kristalle von Purpurogallin; führt man aber die Reaktion in Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd aus, so scheidet sich sofort Purpurogallin ab. Es ist möglich, daß in

¹⁾ Comptes rendus Bd. CXXII, S. 1215; Bd. CXXIII, S. 463.

beiden Fällen die Reaktion nach verschiedenen Richtungen verläuft.

4. Einfluß der Temperatur.

Wir haben oben gesehen, daß 10 bis 15 Minuten Erwärmung bei 100° genügen, um gewisse qualitative Farbreaktionen zu vernichten. Es ist aber viel schwieriger, die oxydativen Eigenschaften der Auszüge zum Verschwinden zu bringen. Vielleicht erklärt sich diese Stabilität der Oxydase damit, daß ich mit konzentrierten Glycerinlösungen arbeitete: bekanntlich erhöht die Abwesenheit von Wasser die Stabilität der Enzyme.

Gleiche Quantitäten des Malzauszuges wurden erwärmt: 1. 30 Minuten im siedenden Wasserbad. 2. 1 Stunde im Wasserbad. 3. 30 Minuten im Autoklaven bei $1\frac{1}{2}$ Atmosphäre. Nach dem Erkalten wurde das verdampfte Wasser ersetzt und die abgeschiedenen Niederschläge abfiltriert. Zum Kontrollversuch wurde der unveränderte Malzauszug genommen. Je 25 ccm Auszugs wurden zu 50 ccm $1\frac{1}{2}^{\circ}$ iger Pyrogallollösung in 50% iger Glycerin¹⁾ zugesetzt.

	1	2	3	Kontroll- versuch
Absorbierter O in ccm . . .	10.1	10.3	6.6	33.3
Entwickelte CO ₂	2.0	1.8	—	9.9
Farbe der Flüssigkeit . . .	hellbraun	hellbraun	gelb	dunkelbraun

Wir sehen, daß erhöhte Temperatur die oxydative Wirkung bedeutend vermindert, aber auch $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen bei $1\frac{1}{2}$ Atmosphäre dieselbe nicht vollkommen vernichtet.

Wird Grünmalz einer höheren Temperatur ausgesetzt, so tritt auch bedeutende Abschwächung des Enzyms ein (siehe weiter unten).

Es soll bei weiteren Versuchen untersucht werden, ob

¹⁾ Alle unten beschriebenen Versuche wurden mit Pyrogallol ausgeführt.

wir hier nicht mit verschiedenartigen Substanzen zu tun haben, von welchen einige, welche einfacherer Natur sind, hohen Temperaturen widerstehen und auch die Autoxydation beschleunigen.

5. Einfluß der Säuren und Alkalien.

Setzt man bei der Malzextraktion 0,1% von Schwefelsäure hinzu, so bekommt man Auszüge, die nach der Neutralisation der Säure keine qualitativen Reaktionen geben. Nimmt man statt Schwefelsäure Soda, so bleiben die Farbreaktionen erhalten. Man könnte vermuten, daß die Malzoxydase besonders gegen Säuren empfindlich ist. Dies wird durch quantitative Versuche bestätigt: bei kurzer Säureeinwirkung wird die Oxydase nicht vernichtet, sondern nur gebunden, denn nach der Neutralisation erlangt die oxydatische Wirkung ihre ursprüngliche Stärke.

1. 50 ccm Malzauszugs wurden mit 2 ccm $n/10$ - H_2SO_4 versetzt und nach 30 Minuten mit NaOH neutralisiert.

2. 50 ccm Malzauszugs wurden mit entsprechender Menge Na_2SO_4 versetzt.

Je 25 ccm dieser Auszüge wurden mit 50 ccm $1\frac{1}{2}\%$ iger Pyrogallollösung vermischt.

	1	2
Absorbierter O	30,5	30,8
Entwickelte CO_2	9,8	9,1

Die $n/260$ -Schwefelsäure zerstört also die Oxydase nicht.

1. Malzauszug in $n/26$ -NaCl.

2. Malzauszug 1 Stunde mit $n/104$ -HCl behandelt.

3. Malzauszug 1 Stunde mit $n/52$ -HCl behandelt.

4. Malzauszug 1 Stunde mit $n/26$ -HCl behandelt.

In 2 und 3 bildet sich nach dem Säurezusatz eine Trübung, die nach der Neutralisation verschwindet; in 4 entsteht dagegen die Trübung erst nach der Neutralisation; sie wurde abfiltriert.

	1	2	3	4
Absorbierter O	38,2	37,0	36,8	34,7
Entwickelte CO ₂	12,6	12,2	12,0	11,1

Wir sehen, daß die Zerstörung der Oxydase allmählich eintritt und erst bei $n_{/26}$ -HCl merklich wird. Läßt man aber die Säure nicht neutralisiert, so ist die Wirkung der Oxydase paralysiert.

1. Der Malzauszug wurde 2 Stunden mit $n_{/54}$ -HCl behandelt, der gebildete Niederschlag abfiltriert.

2. Salzsäure war $1_{/11}$ normal: es bildete sich kein Niederschlag.

3. Salzsäure war $1_{/51}$ normal: nach 2 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert und die Säure neutralisiert.

4. Kontrollversuch mit dem ursprünglichen Malzauszug.

	1	2	3	4
Absorbierter O	1,5	2,1	26,9	32,2
Entwickelte CO ₂	—	—	8,0	10,6
Farbe der Flüssigkeit .	hellgelb	hellgelb	dunkelbraun	dunkelbraun

Prüft man die Enzymlösung 2 mit Guajaktinktur und H₂O₂ vor der Neutralisation der Säure, so bekommt man keine Färbung, nach der Neutralisation tritt eine blaue Färbung ein, die etwas schwächer ist als sonst.

In ähnlicher Weise wurde die Wirkung der Alkalien untersucht.

1. Der Malzauszug wurde 1½ Stunden mit $n_{/51}$ -NaOH behandelt, dann neutralisiert.

2. Kontrollversuch.

	1	2
Absorbierter O	7,4	8,3
Entwickelte CO ₂	2,1	1,4

Die n_{51} -Natronlauge ist also ohne Wirkung auf die Malzoxydase: qualitative Reaktionen werden auch nach 24stündiger Behandlung des Auszuges mit n_{51} -NaOH beobachtet.

1. 50 ccm Pyrogallollösung in $0,0015/n$ -NaOH + 25 ccm Malzauszuges (die Konzentration von NaOH also n_{1000}).

2. Statt des Auszuges wurden 25 ccm 50%igen Glycerins zugesetzt.

3. Pyrogallollösung ohne NaOH + 25 ccm Auszuges.

4. 50 ccm 50%igen Glycerins in $0,0015/n$ -NaOH + 25 ccm Auszuges.

	1	2	3	4	Summa von 2, 3 u. 4
Absorbierter O .	26,9	7,9	16,9	3,2	28,0
Entwickelte CO ₂	8,1	1,4	4,7	—	6,1

Man sieht, daß die n_{1000} -Natronlauge keine wesentliche Wirkung auf die Oxydase ausübt. Ähnliche Resultate wurden mit konzentrierterer Lauge erhalten.

1. Pyrogallollösung in n_{400} -KOH mit Malzauszug (die schließliche Konzentration der Kalilauge n_{600}).

2. Statt des Auszuges wurde 50%iges Glycerin zugesetzt.

3. Pyrogallollösung ohne KOH mit dem Malzauszug.

4. Statt der Pyrogallollösung wurde 50%iges Glycerin in n_{400} -KOH mit dem Malzauszug genommen.

	1	2	3	4	Summa von 2, 3 und 4
Absorbierter O	38,1	12,7	23,9	3,1	39,7
Entwickelte CO ₂	12,7	3,2	5,4	—	8,6

Wir sehen hier, ebenso wie bei NaOH, einen merklichen Unterschied in bezug auf den Kohlensäuregehalt: vielleicht geht die Oxydation in Gegenwart von Lauge etwas anders, die Sauerstoffabsorption bleibt jedenfalls die ursprüngliche. Weiter mit der Konzentration der Lauge hinaufzugehen, schien nicht ratsam, weil schon bei unseren Konzentrationen eine merkliche Oxydation des Pyrogallols allein stattfindet.

Man konnte vermuten, daß bei der Extraktion des Malzes mit schwachen Alkalien mehr Oxydase in die Lösung übergeht, wie dies z. B. bei den Katalasen der Fall ist. Diese Vermutung wurde jedoch durch Versuche nicht bestätigt.

4 Portionen lufttrockenen Malzes wurden 24 Stunden extrahiert mit 100 ccm: 1. Chloroformwasser, 2. $n/100$ -Kalilauge, 3. $n/50$ -Kalilauge und 4. $n/25$ -Kalilauge. Die Auszüge wurden nach der Filtration neutralisiert, mit gleichem Volumen wasserfreien Glycerins versetzt, mit Luft in gewöhnlicher Weise behandelt und wieder filtriert. 25 ccm jeden Auszugs wurden mit 50 ccm Pyrogalllösung vermischt.

	1	2	3	4
Absorbierter O .	24,2	19,1	21,8	22,6
Entwickelte CO ₂ .	3,8	3,2	5,9	6,2

Alkalische Extraktionsmittel ziehen also eher weniger Oxydase aus. Aus allen oben angeführten Versuchen folgt, daß die Malzoxydase am besten in neutralem Medium funktioniert. Unsere Auszüge sind freilich immer sauer wegen der Anwesenheit von Phosphaten, aber dies bedeutet keinesfalls, daß die Oxydase auch in Samenzellen bei saurer Reaktion funktionieren soll. In dieser Hinsicht sind die Versuche von Boidin und Moussin¹⁾ interessant: sie zeigen, daß die Getreidesamen eher alkalisch als sauer sind.

6. Einfluß auf die Reaktion fremder Substanzen.

Die Malzoxydase wird von der Knochenkohle, wenigstens bei gewöhnlicher Temperatur, nur teilweise absorbiert.

Der Malzauszug wurde 15 Minuten mit Knochenkohle behandelt und dann mittels Kieselgur abfiltriert. Vom Filtrate wurden 35 ccm 30 Minuten in kochendem Wasserbade gleichzeitig mit 35 ccm ursprünglichen Auszuges erwärmt; das verdampfte Wasser wurde ersetzt und die Niederschläge abfiltriert.

¹⁾ Bull. de l'Assoc. de chimistes de distill., Oktober 1904.

Je 25 cem des so behandelten Auszuges wurden mit 50 cem Pyrogallollösung vermischt.

1. Der Auszug ohne Knochenkohle und unerwärmt; 2. der Auszug erwärmt; 3. der Auszug mit Knochenkohle behandelt, unerwärmt; 4. der Auszug ebenso behandelt und erwärmt.

	1	2	3	4
Absorbierter O .	27.2	11.1	18.0	8.7
Entwickelte CO ₂ .	9.0	1.8	5.0	2.8

HgCl₂ vernichtet die Oxydase vollständig: dieselbe wird wahrscheinlich mit dem nach HgCl₂-Zusatz sich bildenden Niederschlag mitgerissen.

1. Kontrollversuch (ohne HgCl₂); 2. Gehalt an HgCl₂ etwa 0.13^o/_o; 3. 50^o/_oiges Glycerin mit Auszug und HgCl₂; 4. Pyrogallollösung mit HgCl₂ ohne Auszug.

	1	2	3	4
Absorbierter O .	22.2	1.7	2.0	0.9
Entwickelte CO ₂ .	7.8	—	—	—

Gerbsäure schlägt die Malzoxydase auch nieder; das ist wahrscheinlich die Ursache, warum sie vom Malzauszug nicht oxydiert wird (siehe S. 335).

Alkohol bei nicht zu großer Konzentration wirkt auf die Reaktion günstig ein.

Es wurden folgende Versuche angestellt: 1. in 50^o/_oigem Glycerin wie gewöhnlich; 2. in 20^o/_oigem Alkohol und 3. in 40^o/_oigem Alkohol.

	1	2	3
Absorbierter O . .	20.9	35.6	14.9
Entwickelte CO ₂ . .	5.6	12.2	2.8

Man sieht, daß in 20^o/_oigem Alkohol die Reaktion viel

energischer verläuft als in Glycerin, es bildet sich ein reichlicher Niederschlag: aber schon 40%iger Alkohol schwächt die Oxydase bedeutend ab.

Ich versuchte das Glycerin bei der Malzextraktion durch Alkohol verschiedener Konzentration oder durch Wasser zu ersetzen.

3 Portionen des Malzes zu je 50 g wurden extrahiert: 1. mit 200 ccm 50%igen Glycerins; 2. mit 200 ccm 20%igen Alkohols; 3. mit 200 ccm Chloroformwasser. Nach 48 Stunden wurden die Auszüge abfiltriert und versetzt: 1. mit gleichem Volumen von 50%igem Glycerin; 2. von wasserfreiem Glycerin und 3. von 20%igem Alkohol. Die Auszüge wurden neutralisiert und mit Luft behandelt. Die Versuche wurden in gewöhnlicher Weise angestellt. Mit dem Auszuge 3 wurde noch ein Versuch 4 ausgeführt: mit Pyrogallol, nicht in Glycerin, sondern in 20%igem Alkohol gelöst.

	1	2	3	4
Absorbierter O	27.8	32.5	22.2	45.1
Entwickelte CO ₂	7.9	9.8	5.6	15.5

In den Flaschen 2 und 4 bildete sich ein ziemlich reichlicher Niederschlag. Am besten wirkt also alkoholischer Auszug, besonders in alkoholischer Lösung. 4 Malzportionen zu je 50 g wurden extrahiert: 1. mit 150 ccm Chloroformwasser, 2. mit 150 ccm 50%igen Glycerins, 3. mit 150 ccm 20%igen Alkohols und 4. mit 150 ccm 50%igen Alkohols. Nach 48 Stunden wurden die Auszüge abgesaugt, mit gleichen Volumina entsprechender Flüssigkeiten versetzt und mit Luft behandelt (ohne vorherige Neutralisation).

	1	2	3	4
Absorbierter O	12.9	5.6	4.4	3.2
Entwickelte CO ₂	2.9	0.8	0.8	—
Farbe	braun	hellbraun	hellbraun	dunkelgelb

Dieselben Auszüge wurden dann neutralisiert.

	1	2	3	4
Absorbierter O	28,6	19,8	24,0	11,8
Entwickelte CO ₂	8,3	4,9	5,4	1,9
Farbe	dunkelbraun	heller als 1	heller als 1	braun

Aus diesen Versuchen folgt, wie wesentlich die Neutralisation der Auszüge ist; wir sehen weiter, daß auch 50%iger Alkohol die Oxydase extrahiert. Es muß noch bemerkt werden, daß Pyrogallol in Glycerinlösung angewandt wurden. Die qualitativen Reaktionen gelangen mit dem Auszuge 4 schwach, mit Guajacol zeigte sich sogar keine Reaktion.

Sehr charakteristisch und unerwartet war die Wirkung der Mangansalze (vorläufig habe ich nur Mangansulfat geprüft). Man setzt oft, wie bekannt, die oxydativen Eigenschaften der Pflanzenextrakte in Abhängigkeit von deren Gehalt an Mangansalzen. Bertrand¹⁾ zeigte durch direkte Versuche, daß Laccasepräparate mit geringem Mangangehalt die Polyphenole schwach oxydieren, ihre Wirkung aber durch Zusatz minimaler Mengen von Mangansulfat bedeutend verstärkt werden kann. Ich stellte Versuche mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Mangansulfat an: einerseits mit sehr geringen, etwa den von Bertrand angewandten gleichen, andererseits mit viel stärkeren. Man bekommt aber in beiden Fällen Resultate, die von den Angaben Bertrands abweichen.

1. 50 ccm Pyrogallollösung + 25 ccm Malzauszuges;
 2. 50 ccm Pyrogallollösung + 25 ccm Malzauszuges, mit Zusatz von MnSO₄, sodaß der Mn-Gehalt 300 mg pro 100 ccm der Versuchsflüssigkeit betrug; 3. 50 ccm Pyrogallollösung mit MnSO₄ und 25 ccm Glycerins statt des Malzauszuges; 4. 50 ccm Glycerins statt der Pyrogallollösung mit MnSO₄ und 25 ccm des Malzauszuges.

¹⁾ Comptes rendus, Bd: CXXIV, S. 1032, 1355.

	1	2	3	4
Absorbierter O	26.7	7.4	4.4	1.5
Entwickelte CO ₂	9.9	2.2	0.9	—

Die zweite Versuchsreihe wurde mit viel geringerem Gehalt an Mangan, nämlich 4 mg pro 100 ccm Versuchsflüssigkeit ausgeführt.

	1	2	3	4
Absorbierter O	27.7	26.5	2.3	3.1
Entwickelte CO ₂	8.9	8.8	—	—

Aus diesen Versuchsreihen folgt, daß schwache Mangankonzentrationen keinen wesentlichen Einfluß auf den Oxydationseffekt der Oxydase ausüben, die stärkeren dieselben bedeutend abschwächen, obgleich Pyrogallol allein von Mangansulfat etwas oxydiert wird. Es muß bemerkt werden, daß im letzten Falle (bei viel Mangan) sofort nach dem Salzzusatz sich ein reichlicher Niederschlag bildet, die Oxydase wird wahrscheinlich mitgerissen.

Wir sehen hier also einen wesentlichen Unterschied zwischen Bertrands Laccase und der Malzoxydase. Diese Frage beabsichtige ich näher zu studieren.

7. Verhalten der Oxydase bei der Keimung.

Ich habe schon erwähnt, daß auch Rohgerste Oxydase enthält: es war von Interesse, zu untersuchen, wie sich die Oxydase während der Keimung verhält. Um möglichst vergleichbare Resultate zu erhalten, wurde in folgender Weise verfahren. Es wurden 900 g sortierte Gerste für neun Proben genommen, die erste Portion, d. h. 100 g, wurde unmittelbar zerkleinert und der Extraktion mit 400 ccm 50%igen Glycerins unterworfen, die übrige Gerste wurde eingeweicht. Nach drei Tagen wurde $\frac{1}{8}$ der eingeweichten Gerste (158 g) im Mörse

zerkleinert und der Extraktion mit 400 ccm 50%igen Glycerins unterworfen: nach weiteren zwei Tagen wurde $\frac{1}{7}$ der schon »gespitzten« Gerste zerkleinert usw., d. h. es wurde immer eine den ursprünglichen 100 g Gerste entsprechende Portion des Malzes für den Versuch entnommen. Von den letzten zwei Malzportionen wurde die eine an der Luft bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet (Luftmalz), die zweite erst 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur vorgetrocknet, dann 4 Stunden bei 90—100° getrocknet (Darrmalz). Die Extraktion jeder Malzportion dauerte 48 Stunden und deren weitere Behandlung und Versuchsanordnung waren die üblichen.

Es wurden somit neun Auszüge erhalten: 1 aus Rohgerste, 2 aus geweichter Gerste, 3, 4, 5, 6 und 7 aus zwei-, vier-, sechs-, acht- und zehntägigem Malz, 8 aus Luftmalz und 9 aus Darrmalz. Täglich wurden immer zwei Auszüge verglichen: ¹⁾ man untersuchte die Autoxydation der Auszüge selbst und deren Verhalten gegen Pyrogallol, d. h. an einem Tage wurden z. B. die Auszüge 1 und 2 untersucht, am folgenden Tage die Auszüge 2 und 3, dann die Auszüge 3 und 4 usw., so daß man schließlich aus der ganzen Kette der Beobachtungen ein Gesamtbild bekommen konnte. Ich will nicht behaupten, daß die von mir gewählte Methode einwandfrei und die einzig mögliche ist, sie erlaubt jedenfalls allgemeine Schlüsse zu ziehen. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Was die Selbstoxydation der Auszüge selbst betrifft, so ist sie gering und beträgt pro 25 ccm Auszugs etwa 1 bis 2,5 ccm absorbierten Sauerstoffs.

Man sieht aus den Versuchen 1 und 2, daß der Auszug 2 energischer wirkt als der Auszug 1: aus den Versuchen 2 und 3, daß der Auszug 3 energischer wirkt als der Auszug 2, also auch als der Auszug 1 usw. Die Oxydasewirkung wächst also im allgemeinen während der Keimung bis zum achten Tag und bleibt dann konstant. Schon das »Schwelken« an der Luft schwächt etwas diese Wirkung ab und das Trocknen bei höherer Temperatur erniedrigt dieselbe sehr bedeutend. Die Malzoxydase

¹⁾ Mehr als vier Versuche an einem Tage auszuführen, war nicht möglich.

ist in diesem allgemeinen Verhalten anderen Malzenzymen, z. B. Diastase ähnlich.

	1	2	2	3	3	4	4	5
Absorbierter O	20,6	24,2	19,7	24,7	22,4	28,7	34,2	31,9
Entwickelte CO ₂	5,1	6,1	4,6	6,6	7,7	8,5	11,8	10,3
	5	6	6	7	7	8	8	9
Absorbierter O	31,9	43,2	43,2	43,2	38,1	32,5	31,6	7,0
Entwickelte CO ₂	10,3	14,4	14,4	14,1	13,0	9,2	10,6	1,4

8. Reduzierende Körper.

Es wurde schon öfters erwähnt, daß in der Gerste und Malz leicht oxydierbare Substanzen vorhanden sind. Ihre Menge ist nicht allzu groß, oder vielmehr sie werden verhältnismäßig langsam durch Luftwirkung oxydiert und es gelingt nicht, sie auf diesem Wege vollkommen zu entfernen. Bei der Extraktion des Malzes aus verschiedenen Keimungsstadien bestimmte man immer die Menge von Sauerstoff, die erstens der vorherigen Behandlung mit Luft und zweitens gleichzeitig mit dem Hauptversuch absorbiert wurde. So z. B. absorbierten 150 ccm des Auszuges (aus Rohgerste) bei der ersten Oxydation 4,4 ccm Sauerstoff und entwickelten 1,4 ccm Kohlensäure, bei der zweiten absorbierten 25 ccm desselben Auszuges 2 ccm Sauerstoff. Diese Zahlen haben allerdings keine quantitative Bedeutung, weil bei geringen Gasquantitäten die Versuchsfehler sehr groß sind. Die Auszüge färben sich so bei dieser Oxydation dunkel und es bildet sich ein flockiger Niederschlag.

Ich versuchte diese Substanzen durch Behandlung der Gerste oder des Malzes vor der eigentlichen Extraktion mit 80%igem Alkohol zu entfernen. In der Tat wurden in dieser Weise viel hellere Auszüge erhalten, welche sich nach der

Oxydation wenig änderten. Leider schwächte die Einwirkung des Alkohols auch die Oxydase.

Die nähere Natur des «reduzierenden» Körpers ist vorläufig unbekannt: es sind weitere Versuche in dieser Richtung geplant.

9. Oxydation in Gegenwart von H_2O_2 .

Man konnte auf Grund der Guajacreaktion, welche nur in Anwesenheit von H_2O_2 erhalten wird, vermuten, daß diese Reaktion von einem besonderen Enzym, Peroxydase, bewirkt wird oder daß die Malzoxydase außer der Oxydation verschiedener Substanzen durch Luftsauerstoff auch deren Oxydation durch Wasserstoffsperoxyd beschleunigen kann. Ich stellte in dieser Richtung einige qualitative Vorversuche an und gedenke diese Frage näher zu untersuchen.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt.

1. 50 ccm wässriger Lösung des untersuchten Körpers wurden mit 40 ccm schwachen $[^{0.0172/n}]$ Wasserstoffsperoxyds und dann mit 5 ccm des Malzauszuges versetzt.

2. Der Malzauszug wurde vorher im Wasserbad erwärmt;

3. Der Malzauszug wurde nicht zugesetzt, um das Verhalten des Körpers zu H_2O_2 allein zu prüfen.

Die Reaktion wurde in schmalen kleinen Zylindern von gleicher Größe ausgeführt. Sie wurde abends angestellt und über Nacht stehen gelassen.

I. Pyrogallol. 1. Die Flüssigkeit wird nach kurzer Zeit rot: es scheiden sich Kristalle von Purpurogallin aus: 2. und 3. Die Flüssigkeit färbt sich nur gelblich.

II. Hydrochinon. Nach 14 Stunden 1. Die Flüssigkeit war kirschrot ohne Niederschlag: 2. hellrosa: 3. gelb.

III. p-Amidophenol. 1. Reichlicher braunvioletter Niederschlag: 2. geringer Niederschlag, Flüssigkeit dunkel: 3. geringer Niederschlag, Flüssigkeit gelb.

IV. Brenzkatechin. 1. Die Flüssigkeit war dunkelbraun: 2. die Färbung sehr schwach: 3. farblos.

Ähnliche Resultate wurden mit Resorcin, Oxyhydrochinon und anderen Substanzen erhalten. Bei längerem Stehen bildet

sich an der Oberfläche der Flüssigkeiten ein dunkler Ring, was auf die Wirkung der Oxydase hindeutet. Der Fall des Pyrogallols ist unter gewissen Bedingungen besonders charakteristisch: an der Oberfläche bildet sich ein dunkelbrauner Ring, am Boden sammelt sich der rote Niederschlag. Dies deutet auf zwei verschiedene, gleichzeitig verlaufende Reaktionen hin, wobei zwei verschiedene Enzyme mitwirken: eine Oxydase und eine Peroxydase.

Man darf wohl aus allen oben angeführten Versuchen den Schluß ziehen, daß in Gerste wenigstens ein Stoff mit allen Eigenschaften eines oxydaseartigen Enzyms vorhanden ist: seine Fähigkeit, die Oxydationen zu beschleunigen, sein Verhalten gegen Temperatur und gegen verschiedene Reagentien, seine Spezifität etc., alles dies deutet auf die enzymatische Natur dieses Stoffes hin. Seine Rolle bei verschiedenen Prozessen, besonders bei der Keimung ist zweifellos sehr wichtig.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.

Warschau, den 1. Juni 1905.