

Zur Kenntnis biologisch wichtiger Oxydationen.

I. Mitteilung.

Von

Hans Euler und Ivan Bolin.

Mit 2 Kurvenzeichnungen.

(Aus dem Laboratorium für allgemeine und organische Chemie der Hochschule Stockholm).

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juli 1908.)

Die physiologische Rolle der Stoffe, welche im Tier- und Pflanzenkörper die Oxydationen vermitteln, der sogenannten Oxydasen, läßt sich auf Grund unserer heutigen Kenntnisse noch nicht überblicken oder einheitlich darstellen. Wenn auch durch Arbeiten von Yoshida, Bertrand, Aso, Bach und Chodat, Kastle und Loevenhart wichtige Tatsachen festgestellt worden sind, so herrscht doch über fundamentale Punkte in diesem Gebiet noch große Unklarheit.

Die nächstliegende Aufgabe ist jetzt, die verschiedenen Oxydasen bzw. oxydierenden Extrakte durch Vergleich ihres Wirkungsbereichs zu einander und zu Oxydationskatalysatoren nicht organischen Ursprungs in Beziehung zu setzen und die Frage nach der Spezifität der einzelnen Oxydasen experimentell zur Entscheidung zu bringen.

Besonders notwendig erschien es uns aber, diejenigen Tatsachen zu kontrollieren, auf Grund welcher gegenwärtig alle Oxydasen als Enzyme angesehen werden. Unsere hier mitgeteilten Versuche sind in Rücksicht auf diejenigen Körper angestellt, welche speziell die Oxydation von Phenolen zu Chinonen beschleunigen.

Das von Yoshida im Milchsaft von *Rhus vernicifera* entdeckte Agens hat Bertrand näher studiert und es als oxydierendes Enzym «Laccase» bezeichnet. Bertrand verdanken wir die wesentliche Beobachtung, daß die *Rhus*-Laccase

Mangan enthält und daß dieses bei der Oxydation des Hydrochinons eine bedeutende Rolle spielt. Nach Bertrand besteht also die Rhus-Laccase wesentlich aus einem organischen Teil und Mangan. Den organischen Bestandteil glaubt Bertrand auch in anderen Pflanzen gefunden zu haben, so in *Medicago sativa* und *Lolium perenne*, und er spricht also die daraus gewonnenen Präparate als «Laccase» an.¹⁾ Hiernach wären «Laccasen» weit verbreitete oxydierende Enzyme des Pflanzenreiches.

Diese Auffassung ist in der folgenden Zeit von zahlreichen chemischen und besonders botanischen Forschern angenommen worden, deren Arbeiten zu zitieren hier zu weit führen würde; es sei nur an die kürzlich erschienenen Mitteilungen von W. Palladin²⁾ erinnert, in welchen die wichtigsten pflanzlichen Oxydationen den Enzymen vom Typus der Laccase zugeschrieben werden.

Allerdings sind auch einige Zweifel an der Zugehörigkeit der Laccase zu den Enzymen aufgetaucht; wir erinnern nur an eine diesbezügliche Bemerkung von Oppenheimer³⁾ bzw. Ruff, ferner an die Versuche von Trillat⁴⁾ und die ganz neuerdings erschienenen von Dony-Hénault,⁵⁾ welche zeigen, daß in schwach alkalischen Lösungen von Mangansalzen Hydrochinon ebenfalls (zu Chinon) oxydiert wird.⁶⁾

Durch den Nachweis dieser Tatsachen ist aber offenbar nur dargetan, daß die Mangankatalyse des Hydrochinons empfindlich gegen kleine Zusätze von Säuren und Alkalien ist, wie dies Bertrand⁷⁾ für Rhus-Laccase festgestellt hat, aber es ist

¹⁾ Bull. Soc. chim. de Paris (3), Bd. XVII, S. 621 (1897).

²⁾ Das Blut der Pflanzen. Ber. d. D. bot. Ges., Bd. XXVIa, S. 125; Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 207 [1908].

³⁾ Die Fermente, 2. Aufl., S. 367.

⁴⁾ Compt. rend., Bd. CXXXVIII, S. 94 u. 274 [1904].

⁵⁾ Bull. de l'Acad. roy. de Belgique 1908, S. 105. Vgl. auch Dony-Hénault und J. Van Duuren, ebenda, 1907, S. 537.

⁶⁾ Die beschleunigende Wirkung der Alkalien auf die Autooxydation von Hydrochinon und verwandten Körpern kennen wir besonders durch die eingehenden Untersuchungen von Manchot (Über die freiwillige Autooxydation. Göttingen 1899).

⁷⁾ Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. XXI, S. 673, 1907.

keineswegs gezeigt, daß die Wirkung der Laccase und verwandter Stoffe ausschließlich von dem darin enthaltenen oder zugesetzten Mangan und der Mitwirkung von freiem Alkali herrührt.

Andererseits fehlen Anhaltspunkte, ob wirklich Bertrands Rhus-Präparate und seine Medicago- und Lolium-Präparate als «Laccase» zusammengefaßt werden dürfen.

Eine Entscheidung läßt sich nur auf Grund eines eingehenderen Vergleichs der Wirkungen von Mangansalzen + NaOH einerseits und Mangansalzen + «Laccasen» andererseits erreichen. Aus den Arbeiten unserer Vorgänger haben wir dabei nur eine erste Orientierung gewinnen können. Erstens spielt, da wir es mit einem heterogenen System zu tun haben, die Form und Größe des Apparates eine Rolle, sodaß mit verschiedenen Apparaten angestellte Messungen der Oxydationsgeschwindigkeit nicht ohne weiteres vergleichbar sind. Zweitens sind die quantitativen Versuche besonders über Laccasewirkung nur sehr dürftig. So teilt Bertrand über die Oxydation durch Laccase vom Medicago-Typus nur folgenden einzelstehenden Versuch¹⁾ mit:

Löst man 0,1 g des Medicagofermentes in 50 ccm einer 2%igen Hydrochinonlösung, so beobachtet man, selbst nach 24stündigem Schütteln mit Luft, nur eine rote Färbung; versetzt man hingegen diese Lösung mit 1 mg Mangan (z. B. in Form des Sulfates), so genügen ungefähr 2 Stunden, um die ersten Krystalle von Chinhydron erscheinen zu lassen. Führt man den Versuch nach Bull. Soc. chim. de Paris (3) 13, p. 361, quantitativ aus, so findet man nach 6stündigem Schütteln folgende Mengen O₂ absorbiert:

- | | |
|--|---------------------|
| 1. Mit Mangan allein (Kontrollversuch) . . . | 0,3 ccm |
| 2. Mit Laccase allein (aus Medicago sativa) | 0,2 » ¹⁾ |
| | 0,4 » |
| 3. Mit Laccase und Mangan | 0,3 » |

Aber auch die anderen vorliegenden Messungen der Reaktionsgeschwindigkeiten und deren Variation mit den Konzentrationen beschränken sich in den meisten Fällen auf eine einzige Beobachtung, und zwar nach Verlauf einer ziemlich

¹⁾ Der Versuch ist offenbar durch einen Druckfehler entstellt.

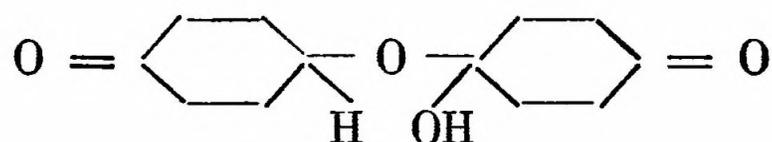
großen Reaktionszeit; man befindet sich dadurch in einem Reaktionsgebiet, in welchem der primäre Verlauf durch verschiedene Einflüsse, auf die wir unten hinweisen (vgl. S. 85), gestört wird.

Im Interesse einer endgültigen Lösung der Frage und in Anbetracht ihrer biologischen Bedeutung geben wir in dieser ersten Mitteilung auch solche Versuchsreihen ausführlich wieder, bei welchen pflanzliche Extrakte bzw. «Oxydasen» nicht beteiligt sind.

Oxydation des Hydrochinons.

1. Hydrochinon ist zum qualitativen Nachweis der Oxydasen vielfach verwendet worden. Seine Überführung in Chinon darf wohl als typisch für die Oxydationen der zahlreichen Phenole in den Pflanzensäften angesehen werden.

Als Zwischenprodukt der Oxydation des Hydrochinons zu Chinon entsteht bekanntlich das Chinhydron. Auf die vielfach diskutierte chemische Konstitution dieser Verbindung einzugehen, ist hier nicht der Ort. Mit der Formel



glauben wir die Eigenschaften des Chinhydrons besser zum Ausdruck zu bringen, als dies durch die bisher in Vorschlag gebrachten geschehen ist.

Da Chinhydron in Wasser schwer löslich ist und also im Verlauf der Reaktion ausfällt, entzieht sich ein großes Teil dieses Produktes der direkten weiteren Einwirkung. Die Löslichkeit des Chinhydrons im Wasser wird durch die Konzentration der gelösten Komponenten beeinflusst; dies ist auch zu erwarten, da nach Berthelot, Biltris und Valeur das Chinhydron in Lösung fast vollständig in seine beiden Komponenten dissoziiert ist.

Versuchsanordnung.

Die Oxydationsgeschwindigkeit wurde durch den Verbrauch des Sauerstoffs verfolgt. Verdünnte Lösungen von Hydrochinon, welche verschiedene Katalysatoren enthielten,

wurden in einem weiten röhrenförmigen Apparat in einer reinen Sauerstoffatmosphäre gleichmäßig und energisch geschüttelt. Der Apparat stand während der ganzen Reaktion in Verbindung mit einer Gasbürette, in welcher der Stand des Quecksilber-niveaus bei Atmosphärendruck in kurzen Zwischenräumen abgelesen wurde.

Die Füllung des Apparates geschah in der Weise, daß zuerst ein abgemessenes Volumen der Hydrochinonlösung eingelassen, hierauf die Luft durch den Sauerstoff verdrängt und schließlich der Katalysator in solcher Verdünnung zugegeben wurde, daß das Gesamtvolumen der Lösung 50 ccm betrug.

Bei denjenigen Versuchen, bei welchen die höchsten Mn- und NaOH-Konzentrationen zur Anwendung kamen, hatte die Schüttelgeschwindigkeit einen nicht unbeträchtlichen Einfluß; wir werden darauf an anderer Stelle zurückkommen. Bei verdünnteren Lösungen, wie sie zur Untersuchung der «Laccase» in Anwendung kamen, ist der Einfluß der Schüttelgeschwindigkeit gering. Um quantitativ vergleichbare Resultate zu erzielen, wurde der Gang des Motors auf 180 Umdrehungen in der Minute eingestellt.

Einfluß des Sauerstoffdruckes. Bei allen Versuchen wurden die zu oxydierenden Lösungen in reinem Sauerstoff von Atmosphärendruck geschüttelt. Nur vier Versuche mit Luft wurden angestellt, um den Einfluß des Sauerstoffdruckes festzustellen. Der (Partial-)Druck des Sauerstoffs und die Oxydationsgeschwindigkeit erwiesen sich dabei als angenähert proportional.

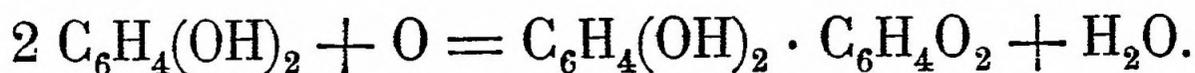
Der Einfluß der Temperatur wurde zunächst festgestellt, um zu erfahren, in welchen Grenzen die Temperatur bei unseren Versuchen konstant gehalten werden mußte, bzw. durch welchen Temperaturkoeffizienten die einzelnen Versuchsserien vergleichbar gemacht werden konnten. Dabei ergab sich das auffallende Resultat, daß der Temperaturkoeffizient der Reaktion zwischen 0° und 40° sehr klein ist. Die mit steigender Temperatur abnehmende Löslichkeit des Sauerstoffs vermag diese Tatsache, auf welche wir bald zurückkommen werden, nur zum Teil zu erklären. Einstweilen ist als praktisches Re-

sultat mitzuteilen, daß unsere bei Zimmertemperatur angestellten Versuche ohne weiteres mit einander vergleichbar sind.

Reaktionsverlauf: Bei fast allen Versuchen mit Hydrochinon waren die Lösungen Phenolphthalein gegenüber sauer oder neutral. Die Beschränkung der Versuche auf solche Lösungen war notwendig in Rücksicht auf den Zweck der Versuche, das Studium der Mangankatalyse. Selbst in schwach alkalisch reagierenden Lösungen wird nämlich Hydrochinon auch ohne Zusatz eines Katalysators mit erheblicher Geschwindigkeit oxydiert, und zwar zu Chinon. Indessen ist Hydrochinon als Säure so stark, daß die Lösung, mit welcher folgender Versuch angestellt ist, auf Lackmus noch vollkommen neutral reagiert.

$1/5$ -n-Hydrochinon	} Minuten	5	10	20	30
$1/1000$ -n-NaOH		ccm	1,4	2,2	3,2

Geht die Oxydation in neutraler oder schwach saurer Lösung vor sich, so fällt alsbald Chinhydron in Form glänzender Krystalle aus. Dadurch entzieht sich nahezu die Hälfte des Hydrochinons der weiteren Oxydation, und in der Tat wird gefunden, daß der maximale Sauerstoffverbrauch bei der Oxydation des Hydrochinons durch Mangansalze nie über den Betrag steigt, welcher sich aus der Gleichung ergibt:



Die meist angewandten 50 ccm einer $1/5$ -n-Hydrochinonlösung entsprechen 59 ccm O_2 von 15° und 76 mm Hg.

Den normalen Reaktionsverlauf ersieht man z. B. aus folgenden Zahlen:

$1/5$ -n-Hydrochinon	} Minuten	5	10	15	20	
$1/50$ -n- $\text{Mn}(\text{Ac})_2$		ccm	8,6	15,5	21,0	25,5
$1/1000$ -n-NaOH		100 k	1,37	1,32	1,27	1,22

Da während des Reaktionsverlaufs die Konzentration des gelösten Sauerstoffs konstant bleibt, so ändert sich die Konzentration nur einer Molekülart, und es wäre zunächst die Gültigkeit des Ausdrucks $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} = k$ zu erwarten. Indessen wird die Reaktion in zweierlei Weise verzögert. Erstens fällt, sobald die Löslichkeitsgrenze des Chinhydrons über-

schritten ist, mit jedem gebildeten Chinonmolekül ein Hydrochinonmolekül aus, wodurch die Konzentration sowohl des Reaktionsproduktes als des Substrates geändert wird, in vorläufig unberechenbarer Weise, da die Löslichkeits- und Dissoziationsverhältnisse des Chinhydrons nicht näher bekannt sind. Zweitens ändert sich die Verteilung der katalysierenden Basen $Mn(OH)_2$ und $NaOH$ im Verlauf der Reaktion dadurch, daß Chinon und Chinhydron stärkere Säuren sind als Hydrochinon, es wird also durch das Reaktionsprodukt dem Hydrochinon Base entzogen. Auch hierdurch entsteht eine Verzögerung des Reaktionsverlaufes gegenüber der einfachen logarithmischen Kurve.

Tabelle A. Konzentration des Hydrochinons: 0,20.

Konzentration von $\frac{1}{2}$ Mn	Konzentration von Na in der Reaktionsmischung.				
	0,002	0,001	0,0005	0,00025	0
0,02	$k_3 = 44$	14,1	5,25	—	0,65
	$k_5 = 42,6$	13,8	5,00	—	—
0,005	$k_3 = 25,1$	7,1	2,72	—	0,28
	$k_5 = 24,0$	6,6	2,00	—	—
0,002	$k_3 = 16,1$	4,3	1,41	—	0,15
	$k_5 = 15,4$	3,4	1,00	—	—
0,001	$k_3 = 10,8$	3,0	0,90	0,25	0,081
	$k_5 = 10,0$	2,1	0,53	—	—
0,0005	$k_3 = 8,7$	2,4	0,50	0,22	—
	$k_5 = 8,5$	—	—	—	—
0	$k_3 = [3,8; \text{Lösung schwach alkalisch}]$	1,3	0,15	—	—

Die einzelnen Versuchsreihen werden S. 87 u. ff. mitgeteilt. Zum Vergleich können die Geschwindigkeiten ausgedrückt werden durch die Zeiten, welche zum Verbrauch gewisser Sauerstoffmengen notwendig sind, oder durch die Größen $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{(a-x)}$,

welche für diesen Sauerstoffverbrauch berechnet sind.¹⁾ Wir geben also in obiger Tab. A für die verschiedenen Lösungen²⁾ die Zeiten t in Minuten an, in welchen 3 bzw. 5 ccm O_2 bei Zimmertemperatur absorbiert wurden, und berechnen daraus die Konstanten k_3 bzw. k_5 .

1. 0,02-n-MnAc ₂ 0,002-n-NaOH		2. 0,02-n-MnAc ₂ 0,001-n-NaOH		3. 0,02-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH	
t	ccm	t	ccm	t	ccm
3	12,6	3	5,4	3	2,2
5	20,8	5	8,6	5	3,5
8	30,4	8	13,0	8	5,1
10	35,0	10	15,0	10	5,9
15	42,8	15	21,0	15	8,7
		20	25,4	20	11,0
4. 0,005-n-MnAc ₂ 0,002-n-NaOH		5. 0,005-n-MnAc ₂ 0,001-n-NaOH		6. 0,005-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH	
t	ccm	t	ccm	t	ccm
3	9	3	3,4	3	1,7
5	13,4	5	4,4	5	2,2
8	20,3	8	6,1	8	2,9
10	23,0	10	7,4	10	3,4
15	27,6	15	10,3	15	4,3
20	30,5	30	15,8	30	5,8
7. 0,002-n-MnAc ₂ 0,002-n-NaOH		8. 0,002-n-MnAc ₂ 0,001-n-NaOH		9. 0,002-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH	
t	ccm	t	ccm	t	ccm
3	5,7	3	1,8	3	0,8
5	9,0	5	2,7	5	1,2
8	12,1	8	4,1	8	1,6
10	13,4	10	4,5	10	1,9
15	15,9	15	6,0	15	2,8
18	16,8	20	7,2	20	3,4
				30	4,4
				60	5,4

¹⁾ Nach dem Verbrauch von 3 bzw. 5 ccm O_2 ist der Reaktionsverlauf noch nicht durch das Auskrystallisieren von Chinhydrin gestört.

²⁾ Die Konzentration des Hydrochinons war stets 0,2 normal.

10. 0,001-n-MnAc ₂ 0,002-n-NaOH	11. 0,001-n-MnAc ₂ 0,001-n-NaOH	12. 0,001-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH
t ccm	t ccm	t ccm
3 4	3 1,5	3 0,4
5 6	5 2,2	5 0,7
8 8,9	8 3,0	8 1,2
10 10,6	10 3,6	10 1,3
15 13,7	15 4,4	15 2,1
18 15,5	18 5,0	30 3,3
	25 5,6	60 4,6
	30 6,1	90 5,3
		135 6,0
13. 0,001-n-MnAc ₂ 0,00025-n-NaOH	14. 0,0005-n-MnAc ₂ 0,002-n-NaOH	15. 0,0005-n-MnAc ₂ 0,001-n-NaOH
t ccm	t ccm	t ccm
5 0,3	3 3,3	3 1,2
10 0,6	5 5,4	5 2,0
20 1,2	8 7,9	8 2,8
30 1,6	10 9,0	10 3,1
60 2,5	15 10,8	15 3,8
90 3,0	18 11,7	20 4,5
150 4,0		
16. 0,0005-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH	17. 0,0005-n-MnAc ₂ 0,00025-n-NaOH	18. 0,01-n-MnAc ₂ 0,001-n-NaOH
t ccm	t ccm	t ccm
5 0,6	5 0,2	3 3,8
8 0,9	8 0,3	5 6,3
10 1,1	10 0,4	8 10,1
15 1,5	15 0,7	10 13,2
30 2,5	30 1,1	15 18,5
60 3,8	60 2,0	
90 4,6	150 3,6	
19. 0,0025-n-MnAc ₂ 0,001-n-NaOH	20. 0,02-n-MnAc ₂ ohne NaOH	21. 0,005-n-MnAc ₂ ohne NaOH
t ccm	t ccm	t ccm
3 2,2	5 0,8	10 0,5
5 3,4	10 1,4	20 1,2
8 5,0	20 2,3	50 2,2
10 5,5	30 2,8	60 2,5
15 6,9	40 3,1	100 3,5
20 7,8		
30 9,0		

22. 0,002-n-MnAc₂
ohne NaOH

t	ccm
10	0,7
30	1,4
60	2,0
90	2,4
150	3

23. 0,001-n-MnAc₂
ohne NaOH

t	ccm
10	0,3
30	0,7
60	1,1
120	1,8
240	2,7

24. 0,001-n-NaOH
ohne Mn

t	ccm
5	1,4
10	2,2
20	3,2
30	3,6

25. 0,0005-n-NaOH
ohne Mn

t	ccm
5	0,5
10	0,8
20	1,1
30	1,4
60	2,0
100	2,5

26. 0,2-n-Hydrochinon
ohne Zusätze

t	ccm
10	0,2
20	0,3
60	0,3

Siehe Fig. I und II.

Fig. I.

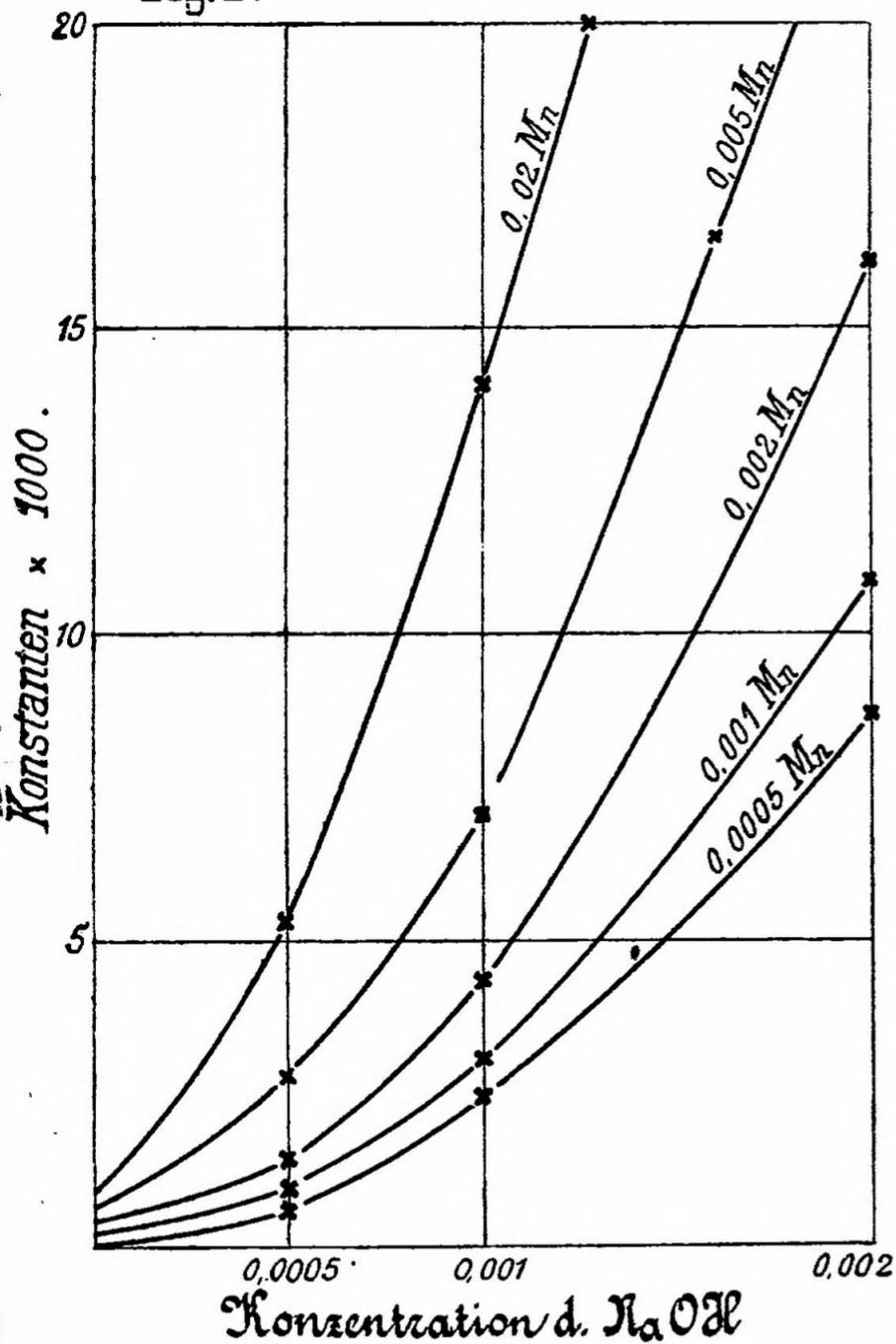
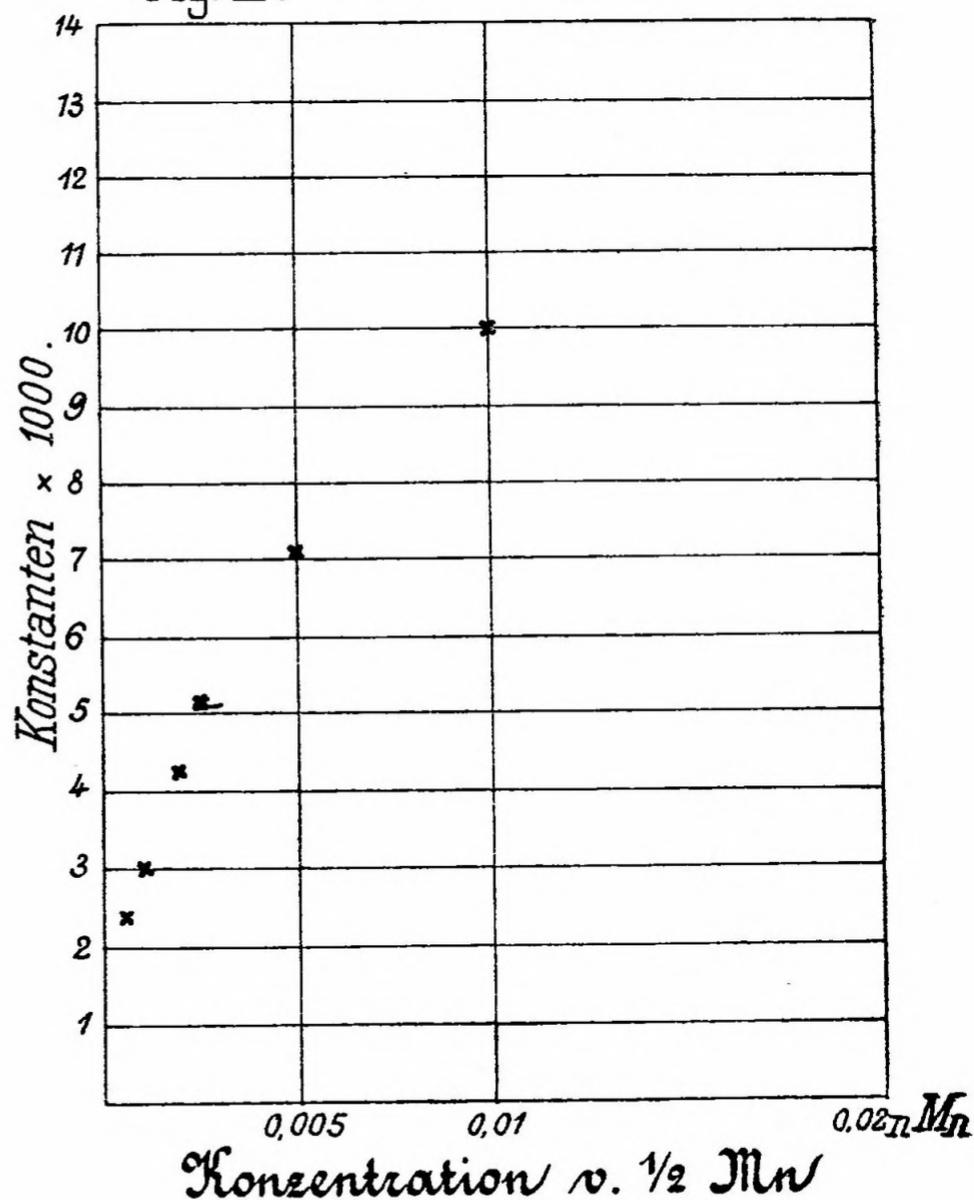


Fig. II.



Die mitgeteilten Zahlen und Figuren liefern ein ziemlich vollständiges Bild vom Einfluß des Mangans auf die Oxydationsgeschwindigkeit des Hydrochinons. Direkt zeigt sich folgendes: 1. Auch in neutraler bzw. schwach saurer Lösung beschleunigten Mangansalze erheblich die Reaktion. 2. Bei gleichen Zusätzen von NaOH steigt die Oxydationsgeschwindigkeit langsamer als der Mangangehalt; vergleiche die Vertikellreihen der Tabelle A. 3. Bei gleichem Mangangehalt steigt die Oxydationsgeschwindigkeit erheblich schneller als die Mengen des den Lösungen zugesetzten Natrons. Will man aus den gefundenen empirischen Funktionen einen Schluß auf den Mechanismus der Reaktion ziehen, so wird man zunächst versuchen, für die verschiedenen Lösungen die Konzentrationen der Molekülararten $+Mn$, $Mn(OH)_2$, besonders aber $+Mn(OH)$ zu ermitteln. Leider fehlt uns hierzu noch die Kenntnis der Stärke (Dissoziationskonstante) des Manganhydroxyds. Ferner aber ist zu berücksichtigen, daß sich nicht nur die Essigsäure des zugesetzten Manganacetates zwischen den Kationen Mn und Na verteilt, sondern daß auch das Hydrochinon am Gleichgewicht der Basen einen, und zwar wesentlichen Anteil nimmt. Hydrochinon ist nämlich eine Säure von nicht ganz unbedeutender Stärke; die genaue Messung seiner Dissoziationskonstante steht noch aus, ihr Wert läßt sich aber auf 10^{-10} schätzen. Hydrochinon ist demgemäß als Säure etwa so stark wie p-Chlorphenol.

Während also eine exakte Berechnung der Gleichgewichtsverhältnisse auf eine künftige Mitteilung verspart werden muß, läßt sich doch schon jetzt der Schluß ziehen, daß die Oxydationsgeschwindigkeit in den oben bezeichneten Lösungen proportional ist dem Konzentrationsprodukt $[+MnOH] \times [-OC_6H_4OH]$, und also proportional dem Quadrat der Konzentration des Salzes HOC_6H_4OMnOH .

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einerseits von der Konzentration des Mangans, andererseits von der Menge des zugesetzten Natrons erinnert an das Zusammenwirken von Enzymen mit ihren sogenannten Co-Enzymen oder Aktivatoren bei enzymatischen Reaktionen. Um eine einigermaßen erhebliche Geschwindigkeit zu erzielen, ist die Gegenwart beider

Stoffe notwendig; ¹⁾ es sei zunächst an den Einfluß der Alkalinität auf die Spaltungen durch Trypsin und Erepsin erinnert. So fand der eine von uns in einem Versuch, bei welchem 0,1 n-Glycyl-glycin durch Erepsin (5 g in 100 ccm) gespalten wurde, folgende Werte: ²⁾

Alkalikonzentration	0	0,04	0,05
1000 × Reaktionskonstante	< 0,05	7,0	6,2

Im Gegensatz zu unserem Oxydationsvorgang wird bei der Erepsinspaltung ein Optimum der Alkalinität gefunden. Dies rührt daher, daß in letzterem Falle durch das Alkali das Substrat aktiviert, ³⁾ das Enzym aber bald geschädigt wird, während bei der Mangankatalyse sowohl Substrat als Katalysator aktiviert wird.

Wir erinnern ferner an eine andere enzymatische Reaktion, nämlich die zellfreie, alkoholische Gärung, für welche durch interessante Versuche von Buchner, Meisenheimer und Klatt einerseits, von Harden und Young andererseits die Mitwirkung eines «Co-Enzyms» festgestellt wurde.

Wir finden in beiden Fällen analoge Abweichungen vom einfachen Reaktionsgesetz $k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{(a-x)}$.

Chinhydronbildung		Alkoholische Gärung ⁴⁾	
Reaktionsdauer in Minuten	$k \cdot 10^2$	Reaktionsdauer in Minuten	$k \cdot 10^4$
5	1,37	140	2,43
10	1,32	281	2,01
15	1,27	403	1,82
20	1,22	493	1,79

¹⁾ Sofern man sich nämlich auf die Betrachtung der in neutraler oder schwach saurer Lösung vor sich gehenden Bildung von Chinhydron beschränkt. In alkalischer Lösung tritt allerdings auch in Abwesenheit von Mangan eine Oxydation ein, dieselbe führt aber noch über das Chinon hinaus zu den noch nicht näher erforschten Umwandlungsprodukten dieses Körpers.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 213 [1907].

³⁾ Es scheint, daß besonders die Alkalisalze bzw. Anionen der Peptide der Erepsinspaltung unterliegen.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 53 [1905].

Die Oxydation des Hydrochinons ist gewiß nicht das einzige Analogon der durch «Co-Enzym» beschleunigten Enzymwirkungen; indessen zeigen die angestellten Vergleiche, daß prinzipielle Unterschiede zwischen dem Zusammenwirken von Enzym und «Co-Enzym» und der hier studierten Reaktion zwischen Hydrochinon, Mangansalz und Natron nicht bestehen. Auch die «Co-Enzyme», die wohl besser allgemein als «Aktivatoren»¹⁾ bezeichnet werden, vermehren — soweit sich die einzelnen Fälle bis jetzt überblicken lassen — die Konzentration der die Reaktion vermittelnden Moleküle bzw. Ionen, sei es direkt, sei es, indem sie zur Bildung des eigentlichen Katalysators oder Substrates beitragen.

2. Wir kommen nun zur Frage, wie sich die hier studierte Oxydation des Hydrochinons durch Mangansalze + Natron von den Wirkungen der Oxydasen vom Typus der sogenannten Laccase unterscheidet.

Wir haben zu unseren Versuchen die «Laccase» aus *Medicago sativa* nach der Vorschrift von G. Bertrand dargestellt. Die von den Stielen befreiten Pflanzen, welche sich im Beginn der Blüte befanden, wurden zerkleinert und abgepreßt. Der Preßsaft schied beim Stehen dunkle Flocken ab, von welchen er durch Filtrieren befreit wurde. Wir fällten hierauf, wie Bertrand angibt, mit Alkohol, saugten den reichlichen Niederschlag ab, brachten den größten Teil davon wieder mit Wasser in Lösung und fällten wieder. Das so erhaltene Präparat ist nach dem Trocknen im Exsikkator ein staubfeines, weißes, in Wasser sehr leicht lösliches Pulver.

Mit diesem Präparat wurden die nachstehenden Versuche angestellt und zwar ganz in der oben beschriebenen Weise. Das Gesamtvolumen der geschüttelten Mischung war 50 ccm, die Konzentration des Hydrochinons war 0,2 normal, diejenige des Manganacetates 0,001 äquivalentnormal; Natronlauge war nicht zugesetzt worden.

¹⁾ Die sog. Co-Enzyme sind keine Enzyme, wie man dem Namen nach vermuten würde, da sie ja wohl der Mehrzahl nach anorganische Stoffe sind und auch dem Rest das eigentlich einzige Kriterium der Enzyme, die Wärme-Unbeständigkeit, nicht zutrifft.

27. 0,2 g in 50 ccm		28. 0,1 g in 50 ccm		29. 0,2 g Präp. b in 50 ccm	
t	ccm	t	ccm	t	ccm
5	1,3	5	1,0	5	1,3
10	2,3	10	1,7	10	2,3
15	3,0	15	2,2	15	3,0
20	4,1 (kryst.)	20	2,5	20	3,6
30	5,9	30	3,1	30	4,9

Ein unabhängig von dem vorigen in der gleichen Weise dargestelltes Präparat b wurde ein drittes Mal in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Trotzdem war seine Wirksamkeit genau die gleiche wie die des oben genannten, was in Rücksicht auf die Reproduzierbarkeit der Laccasepräparate von Interesse ist.

Kontrollversuche zeigten, daß die Medicagopräparate allein, ohne Mitwirkung von Manganacetat die Oxydation des Hydrochinons nicht beschleunigten.

Die Präparate erwiesen sich, mit Phenolphthalein als Indikator untersucht, als sehr schwach sauer. Es wurde dieser Nachweis besonders sorgfältig geführt, und es ist nach unseren Versuchen ausgeschlossen, daß, wie Dony-Hénault angibt, die Wirkung der Laccase, wenigstens derjenigen aus Luzerne, auf ihre eigene Alkalinität zurückzuführen sei.

Damit fällt natürlich die Annahme von Dony-Hénault: «Dans la laccase, les molécules manganeuses agissent avec beaucoup moins d'intensité que les ions hydroxyliques pris à nombre égal.» Selbst wenn man nicht von der katalytischen Wirkung der freien Hydroxylionen spricht, was hier an sich geeignet ist, die Kritik herauszufordern, sondern nur die Mengen freien Alkalis in Betracht zieht, welche den Hydrochinonlösungen zugesetzt worden sein können, so braucht man nur folgenden Vergleich anzustellen:

Um in einer 0,2-n.-Hydrochinonlösung, welche 0,001 normal in Bezug auf $MnAc_2$ ist, eine Oxydationsgeschwindigkeit zu erreichen, welche mit der durch 0,2 g Medicagolaccase gleich ist, muß dieser Lösung soviel Alkali zugegeben werden, daß sie 0,0008 normal würde. Es müssen also der Hydrochinonlösung statt 10 ccm der 20%igen Laccaselösung

10 ccm eines $1/250$ -normalen Alkalis zugesetzt werden. Die Reaktion einer solchen Lösung ist so stark alkalisch, daß sie niemand mit derjenigen eines gelösten Laccasepräparates verwechseln wird.

Übrigens läßt selbst ein Zusatz von 10 ccm einer 0,0001 normalen Salzsäure die Wirkung der «Luzernenlaccase» fast unverändert, wie folgender Versuch zeigt:

	t	ccm
30a. 20 ccm 0,2-n-Hydrochinon	5	1,4
10 » 20%ige Laccaselösung	10	2,2
10 » 0,005-norm.-MnAc ₂	15	3,1
10 » 0,0001-norm.-HCl	20	3,6
	30	4,7

Auch in solchen Hydrochinonlösungen, welche mit geringen Mengen Alkali versetzt sind, also das Alkalisalz des Hydrochinons enthalten, beschleunigt Laccase erheblich den Oxydationsverlauf.

30b. 0,001-n-MnAc ₂ 0,0001-n-NaOH 0,2 g Laccase in 50 ccm	30c. 0,001-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH 0,1 g Laccase in 50 ccm	Vgl. hierzu Nr. 12, Seite 88.
t	t	
5	5	2,2
10	10	3,6
15	15	4,6 (kryst.)
20	20	5,7
30	30	8,4

Es ist hervorzuheben, daß die Lösungen Nr. 30a und b keine Spur alkalischer Reaktion mit Phenolphthalein zeigen. Dieser Indikator läßt bekanntlich Hydroxylionen noch in einer Konzentration von 0,00001 Normalität deutlich erkennen.

Wenn also freies Alkali das wirksame Agens in Laccasen nicht sein kann, und die diesbezüglichen Annahmen hinfällig werden, so mußte zunächst untersucht werden, ob die «Laccasen» vom Medicagotypus als «enzymhaltig» zu betrachten sind. Nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse definiert man Enzyme als Katalysatoren tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, welche durch längeres oder kürzeres Erhitzen ihrer Lösung unwirksam werden. Daß ein Kriterium wie die Wärmedenaturierung nicht befriedigend sein kann, ist schon früher

gelegentlich betont worden; immerhin haben wir keinen anderen Anhaltspunkt, gewisse Katalysatoren unter der Bezeichnung Enzyme zu einer besonderen Gruppe zusammenzufassen.

Wir haben einen Teil der in Versuch 29 angewandten Laccaselösung je 3 Minuten unter Rückfluß zum starken Sieden erhitzt. Nach Abkühlung fanden wir:

29. Ungekocht		31. Gekocht	
t	ccm	t	ccm
5	1,3	5	2,3
10	2,3	10	3,2
15	3,0	15	4,0
20	3,6	20	4,7
30	4,9	30	5,6

Die katalysierende Wirkung der Luzernlaccase wird also auch durch starkes Erhitzen, welches hydrolysierende Enzyme unfehlbar inaktiviert, nicht gemindert, im Gegenteil noch etwas erhöht (hierauf werden wir später zurückkommen). Es besteht also kein Anlaß, den oxydationsbeschleunigenden Anteil der «Laccasen» vom Medicagotypus zu den Enzymen zu rechnen.

3. Wir kommen schließlich zu den wichtigsten Fragen des Gebietes: welche Stoffe üben die gleiche Wirkung aus wie Laccase, und welches ist die chemische Zusammensetzung dieses bisher als Enzym betrachteten Stoffes?

Man hat vielfach angenommen, daß die Enzyme durchgehends Kolloide, besonders Eiweißkörper sind, da viele der untersuchten Präparate Stickstoff enthalten. Dies war wohl auch der Grund, weshalb Trillat¹⁾ den organischen Bestandteil der Laccase durch Eiweißkörper, Albumine, Gelatine u. a. zu ersetzen suchte. Die von Trillat angewandten Lösungen enthalten indessen freies Alkali und ihre Oxydationswirkungen sind daher mit denjenigen der Laccase nicht vergleichbar. Vermeidet man diese störende Nebenreaktion, indem man die Lösung neutral hält, so zeigt sich, daß weder Serumalbumin noch Casein die Oxydation beschleunigt. Die im Versuch Nr. 12 mitgeteilte Geschwindigkeit verblieb durch den Zusatz von etwa 1 0/0 dieser Stoffe fast unverändert.

¹⁾ Compt. rend., Bd. CXXXVIII, S. 94 u. 274 [1904].

Das Vorkommen von Gummi in vielen Laccasepräparaten hat dann bei Bertrand, Tschirch u. a. auch die Vermutung angeregt, daß die Laccase eine gummiartige Substanz sei. Setzt man aber arabischen Gummi zu den in Versuch Nr. 12 und 23 untersuchten Lösungen, so findet man eine Verzögerung, keinesfalls eine Beschleunigung des Reaktionsverlaufs.

Ein Bestandteil der Laccase, deren Bedeutung bisher — abgesehen vom Mangan der Rhus-Präparate — übersehen wurde, ist der auffallend hohe Aschengehalt, welcher 20—30% der Präparate ausmacht. Auf die Zusammensetzung dieser Asche kommen wir in der nächsten Mitteilung zurück. Der hohe Aschengehalt hat uns nun zur Vermutung geführt, daß wir es in der Laccase mit organischen Salzen zu tun haben, welche neben dem Mangan die wesentliche Rolle bei der Oxydation des Hydrochinons spielen.

Wir haben deswegen eine große Anzahl von Versuchen angestellt, unter welchen folgende erwähnt werden mögen:¹⁾

32. 0,001-n-MnAc ₂	33. ohne MnAc ₂	34. ohne Hydrochinon
0,2-n-Seignettesalz	0,2-n-Seignettesalz	0,001-n-MnAc ₂
t ccm		0,0005-n-NaOH
5 1,5	keine Oxydation.	keine Oxydation.
10 2,2		
15 2,9		
20 3,5		
30 4,5		
	35. 0,001-n-Mn Ac ₂	
	0,075-n-Seignettesalz	
	t ccm	
	5 0,7	
	10 1,3	
	15 1,8	
	20 2,3	
	30 2,6	

Manganhaltige Hydrochinonlösungen werden also durch Seignettesalz auch ohne Mitwirkung von Alkali stark kataly-

¹⁾ Die Salzlösungen waren stets mit Phenolphthalein genau neutralisiert bzw. sehr schwach sauer. Die Konzentration des Hydrochinons war wie immer 0,2-normal.

siert (vgl. Versuch 23, Seite 89). Wie bei den Versuchen mit Laccase macht sich die Beschleunigung auch in Gegenwart von wenig Alkali geltend (Reaktion der Lösung neutral!).

36. 0,001-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH		37. 0,001-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH 0,2-n-Seignettesalz		38. 0,001-n-MnAc ₂ 0,0005-n-NaOH 0,04-n-Seignettesalz	
t	ccm	t	ccm	t	ccm
5	0,7	5	4,1	5	2,6
10	1,3	10	5,8	10	3,5
15	2,1	15	7,2 kryst.	15	4,0
20	2,6	20	7,8	20	4,5
30	3,3	30	9,0		

Es zeigte sich bald, daß nicht alle neutral reagierenden Salze organischer oder anorganischer Säuren diese Wirkung in gleicher Weise ausüben. Wurde im Versuch 37 Seignettesalz durch äquivalente Mengen Natriumsuccinat, Natriumfumarat, Natriumlactat, Natriumacetat und Natriumchlorid ersetzt, so erwies sich die Wirkung in derselben Reihenfolge schwächer.

Noch stärker als Seignettesalz katalysiert das Natriumsalz der Zitronensäure, und das Calciumsalz der Glukonsäure, beinahe ebensogut das Natriumsalz der Schleimsäure.¹⁾

Wir haben nach diesem Befund alkalifreien Lösungen von Hydrochinon dieselben Gewichtsmengen dieser Salze zugesetzt, welche wir bei den Versuchen mit Laccase angewandt haben, nämlich 0,1—0,2 g pro 50 ccm.

¹⁾ Es scheinen solche Säuren wirksam zu sein, welche mit Mangan komplexe Anionen zu bilden vermögen. Auffallend erschien uns, daß das Salz der Pektinsäure (dargestellt aus Zitronenschalen) nicht beschleunigend wirkte. Wir geben von den Versuchen mit unwirksamen Substanzen folgende drei wieder:

0,001-n-MnAc ₂ 0,1 g Natriumpektat in 50 ccm		0,001-n-MnAc ₂ 0,2 g Natriumoxalat in 50 ccm		0,001-n-MnAc ₂ 0,2 g Natriumacetat	
t	ccm	t	ccm	t	ccm
5	0,7	5	0,5	5	0,4
10	1,0	8	0,7	10	0,5
15	1,1	15	0,9	15	0,5

23. 0,001-n-MnAc ₂ ohne Zusatz		39. 0,001-n-MnAc ₂ 0,4% Glukons. Ca		40. 0,001-n-MnAc ₂ 0,4% Natriumcitrat	
t	ccm	t	ccm	t	ccm
10	0,3	5	0,9	5	2,9
30	0,7	10	1,2	10	4,7
60	1,1	15	1,7	15	6,6
		20	2,1	20	7,6
				30	9,4

Wie ein Vergleich des Versuches 40 mit Versuch 29 zeigt, katalysiert Natriumcitrat pro Gewichtseinheit stärker als «Laccase.»

In diesen Ergebnissen erblicken wir eine feste Stütze für unsere Annahme, daß der wirksame Bestandteil der «Laccasen» vom Medicagotypus Salze organischer Säuren sind. Auf die Natur dieser Säuren und die Art ihrer Wirkung werden wir in einer folgenden Mitteilung zurückkommen.

Zusammenfassung.

1. Wir haben die Oxydationsgeschwindigkeit des Hydrochinons in neutral reagierenden Lösungen in Gegenwart verschiedener Mengen von Mn und Na untersucht und mit derjenigen verglichen, welche durch Luzernen-«Laccase» hervorgerufen wird. Es zeigt sich, daß die Wirkung dieser «Laccase» sich nicht auf ihre alkalische Reaktion zurückführen läßt.

2. Die untersuchte «Laccase» wird durch Kochen ihrer Lösung nicht geschwächt, sie ist oder enthält also zwar einen Katalysator, aber nichts, was als «Enzym» zu bezeichnen ist.

3. Die Laccase enthält reichlich Salze organischer Säuren; eine Anzahl von Natriumsalzen solcher Säuren beschleunigen die Oxydation des Hydrochinons in gleichem, teilweise noch höherem Grade wie die Laccase.

