

Zur Kenntnis der Oxydaseeinwirkung.

I. Mitteilung.

Von

R. O. Herzog und A. Polotzky.

Mit fünf Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem chemischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juni 1911.)

In der Mitteilung von C. Engler und R. O. Herzog «Zur chemischen Erkenntnis biologischer Oxydationsreaktionen»¹⁾ sind Versuche zitiert worden, deren Wiedergabe hier erfolgen soll. Mischt man «Peroxydase», Wasserstoffsperoxyd und ein sogenanntes Oxydasereagens miteinander, so hängt der Reaktionsverlauf von einer Reihe von Bedingungen ab, die den Gegenstand dieser und der folgenden Untersuchung bilden.

Darstellung der Peroxydase. Nach der Vorschrift von Bach und Tscherniak²⁾ wurde Peroxydase aus weißer Rübe dargestellt. In den ersten Versuchen wurde genau nach der Vorschrift verfahren, später wurde eine Veränderung in der Darstellung insofern vorgenommen, als der Preßsaft der Rüben durch Ausfrieren in etwa $\frac{3}{4}$ m hohen, 10 cm weiten Glaszylindern konzentriert wurde. Zum Ausfrieren nach Meisenheimer³⁾ dienten Zylinder, welche nach unten verjüngt und mit einem Abflaßhahn versehen waren. Nach dem Wiederauftauen war das unterste Viertel des Zylinderinhaltes etwa 10mal so wirksam wie das oberste. Zur Verarbeitung gelangte nur die untere Hälfte. Diese Konzentrierungsmethode gestattet

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 327 (1909).

²⁾ B. B., Bd. 41, S. 2345 (1908).

³⁾ In «Zymesgärung» von E. und H. Büchner und M. Hahn (1903) S. 227 beschrieben.

die Ersparnis großer Mengen Alkohol. Im übrigen wurde nach Bach und Tscherniak vorgegangen.

1. Abhängigkeit des optimalen Reaktionsverlaufes von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer.

Variiert man bei konstant erhaltenem Peroxydasegehalt die Konzentration der beiden anderen oben genannten Teilnehmer der Reaktion, so findet man für jeden derselben ein Optimum. Im folgenden sind die Versuche 1. mit der Leukobase von Brillantgrün, 2. mit Vanillin und 3. mit einem Gemisch von p-Phenylendiamin und Dimethylanilin wiedergegeben. Bei 1 und 3 tritt als Reaktion Farbstoffbildung, bei 2 die Ausfällung von Dehydrodivanillin ein. Die in den Tabellen angeführten Minuten bedeuten die Zeit bis zum Eintritt der Reaktion. Die Kreuze geben die Intensität der Farbstoff- bzw. Niederschlagsbildung an. Aus der Tabelle ist die Abhängigkeit der Lage des Optimums von den jeweiligen Bedingungen ohne weiteres ersichtlich (s. Tab. I).

2. Chemismus der Reaktion zwischen Peroxydase, H_2O_2 und der Leukobase von Brillantgrün.

Bringt man innerhalb bestimmter Konzentrationsgrenzen die genannten 3 Stoffe zusammen, so wird das farblose Gemisch allmählich intensiv grün, blaßt hierauf aber wieder langsam ab bis zu einem schwachen Gelb. Dieser Vorgang wurde quantitativ auf kolorimetrischem Wege untersucht. Die Fragestellung ging dahin, durch successive Vermischung zu erweisen, ob und welche Bindungen unter den Reaktionsteilnehmern stattfinden, ob sich eine zeitliche Zerlegung der Teilreaktionen auffinden ließ und wie weit sich diese durch den Verlauf der Farbstoffbildung und evtl. dessen Verschwinden bemerkbar machte.

Die erwähnte, der Farbstoffbildung folgende Bleichung stellt gleichfalls einen Oxydationsprozeß dar, was sich besonders auch dadurch zeigen läßt, daß die Peroxydase durch Ferrosulfat ersetzt werden kann. Der Reaktionsverlauf gleicht bei

Tabelle I.

1. Leukobase von Brillantgrün			2. Vanillin			3. p-Phenylendiamin + Dimethylanilin		
Oxydase-reagens	0,05 %	0,01 %	0,002 %	1 %	0,1 %	0,01 %	0,01 %	0,001 %
Peroxydase-konzentration	0,1 %	—	—	—	—	—	nach 1/4 Min. nach 1/2 Min.	nach 1/2 Min. nach 1/4 M.
	0,05 %	—	—	—	—	—	nach 1 Min. nach 1/4 M.	nach 1/4 M. nach 1/4 M.
	0,025 %	—	—	—	—	—	nach 12 Std. (violett)	—
Peroxydase-konzentration	0,1 %	nach 35 Min. (intensiv)	nach 40 Minuten	sofort	nach 2 Min.	nach 12 Std. (Trübung)	sofort	sofort
	0,05 %	nach fast 2 Stunden	nach fast 2 Stunden	+	nach 2 Min. nach 4 Min.	—	+	nach 1/4 Min. nach 1/4 Min.
	0,025 %	—	—	+	nach 4 Min. nach 8 Min.	—	+	nach 1/2 Min. nach 1/2 Min.
Peroxydase-konzentration	0,1 %	nach 4 Min. (schnell zunehmend)	nach 1/3 Minute	sofort	nach 3 Minuten	—	sofort	nach 1/4 Min. nach 1/4 Min.
	0,05 %	—	nach 2 Minuten	+	nach 4 Minuten	—	sofort	nach 1/2 Min. nach 1/2 Min.
	0,025 %	—	nach 10 Min. (langsam zunehmend)	+	nach 7 Minuten	—	nach 1 Min. nach 1/4 Min.	nach 3/4 Min. nach 3/4 Min.
Peroxydase-konzentration	0,1 %	nach 25 Minuten	nach 1/2 Minute	—	—	nach 12 Std. (schwache Trübung)	sofort	nach 1/4 Min. nach 1/4 Min.
	0,05 %	—	nach 2 Minuten	—	—	nach 12 Std. (schwache Trübung)	sofort	nach 1/4 Min. nach 1/4 Min.
	0,025 %	—	nach 10 Minuten	—	—	nach 12 Std. (schwache Trübung)	nach 1 Min. nach 1/4 Min.	nach 3/4 Min. nach 3/4 Min.

Gegenwart dieses Stoffes vollständig dem durch Peroxydase ausgelöst.

Da beobachtet worden war, daß in einigen Fällen nach längerem Stehen in gewissen Gemischen eine vollständige Bleichung eintrat, während sie in anderen ausblieb, wurden einige orientierende Versuche über diese Erscheinung angestellt, die zu folgendem Ergebnis führten. Die vollständige Ausbleichung tritt nur bei Mangel an Leukobase gegenüber einem Überschuß von H_2O_2 ein, der natürlich nicht an die Giftigkeitsgrenzen desselben reichen darf. Voraussetzung ist selbstverständlich ein genügender Überschuß an Peroxydase.

Da als Kennzeichen und Maß der stattfindenden chemischen Veränderungen allein die Anwesenheit der Färbung dienen konnte, liegt die Schwierigkeit der Deutung darin, daß die vorhandene Farbtintensität durch Superposition der beiden genannten Prozesse gebildet sein kann. Andererseits geht aber aus den Versuchen mit großer Wahrscheinlichkeit hervor, daß die Bildung des Farbstoffes sehr viel schneller verläuft als die Bleichung. Es erscheint daher in erster Annäherung gestattet, den Bleichprozeß gegenüber dem der Farbstoffbildung zu vernachlässigen.

Ferner ist möglicherweise die maximale Menge des gebildeten Farbstoffes von der Bleichung wesentlich abhängig, sodaß also nicht das Farbstoffmaximum, sondern nur die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung zur Aufklärung des Prozesses verwendet werden darf. Unter diesen noch näher zu begründenden Voraussetzungen führen die folgenden Versuche zu einer Orientierung über die statthabenden Verhältnisse.

Über die Versuchsanordnung sei folgendes vorausgeschickt: Aus Tabelle I ergab sich, daß die geeignetsten Reaktionsverhältnisse bei 0,001 % H_2O_2 , 0,01 % Leukobase und innerhalb 0,05 % und 0,025 % Peroxydase lagen; mit diesen Konzentrationen sind die folgenden Versuche angestellt. Nur in den auf einmal ausgeführten, mit einer Versuchsnummer bezeichneten Experimentalreihen sind die einzelnen Versuche unter sich vergleichbar.

Versuch 1. Oxydasekonzentration 0,05 %.

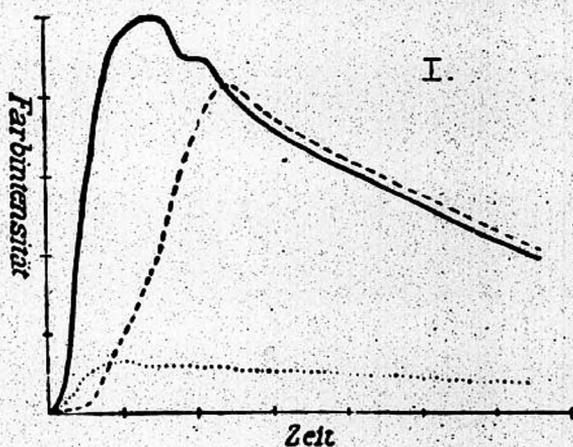
Es wurden die 3 möglichen Kombinationen von Mischungen je zweier der Reaktionsteilnehmer hergestellt und bei Zimmertemperatur etwa 14 Stunden stehen gelassen. Hierauf wurde die dritte fehlende Komponente hinzugefügt.

Die folgenden Tabellen geben die kolorimetrisch bestimmten Farbintensitäten (durch Vergleich mit dem aus der Leukobase entstammenden Farbstoff erhalten) nebst den zugehörigen Zeiten an.

Tabelle II.

a) Mischung von Leukobase + H_2O_2 nach 14 Stunden Peroxydase-zusatz		b) Mischung von H_2O_2 + Peroxydase nach 14 Stunden Leukobasezusatz		c) Mischung von Peroxydase + Leukobase nach 14 Stunden H_2O_2 -Zusatz	
Zeit in Minuten	Farbintensität	Zeit in Minuten	Farbintensität	Zeit in Minuten	Farbintensität
5	3,8	3	0,24	4	0,15
12	16,2	9	1,88	11	0,43
19	23,4	16	2,75	17	3,6
25	24,1	23	3,01	24	6,6
31	24,9	29	2,83	30	10,3
37	22,4	35	2,60	36	15,1
44	22,0	41	2,70	43	19,4
50	19,8	48	2,51	49	20,6
57	18,6	55	2,50	56	19,2
2 Std. 12 Min.	9,8	2 Std. 9 Min.	1,51	2 Std. 11 Min.	10,1

In der folgenden Kurventafel entspricht die ausgezogene Linie der Mischung a, die punktierte der Mischung b, die gestrichelte der Mischung c.

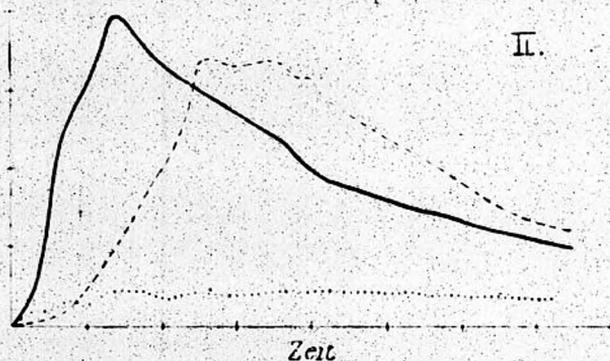


Versuch 2. Bedingungen wie bei 1.

(Für die Kurve b ist der kleinen Werte halber in dieser Tafel die Farbintensität mit 10 multipliziert worden.)

Tabelle III.

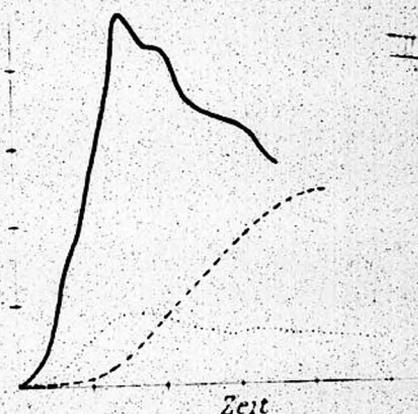
a) Mischung von Leukobase + H_2O_2 nach 14 Stunden Peroxydase- zusatz		b) Mischung von H_2O_2 + Peroxydase nach 14 Stunden Leukobase- zusatz		c) Mischung von Peroxydase + Leuko- base nach 14 Stunden H_2O_2 -Zusatz	
Zeit in Minuten	Farb- intensität	Zeit in Minuten	Farb- intensität	Zeit in Minuten	Farb- intensität
4	2,43	3	0,15	3	0,16
9	10,26	8	0,18	9	0,27
15	26,10	13	0,25	14	1,86
20	30,30	20	0,25	23	6,35
28	39,75	26	0,42	27	9,19
36	34,92	34	0,42	35	15,97
44	32,00	41	0,32	42	20,36
54	28,62	51	0,42	52	34,32
1Std. 5Min.	25,52	1Std. 2Min.	0,39	1Std. 3Min.	33,10
1 » 12 »	22,27	1 » 7 »	0,43	1 » 11 »	33,95
2 » 29 »	10,48	2 » 27 »	0,37	1 » 16 »	31,68
29 » — »	2,92	29 » — »	0,31	1 » 20 »	31,43
				1 » 27 »	27,90
				1 » 45 »	23,19
				2 » 9 »	15,77
				2 » 28 »	12,92
				29 » — »	2,48



Versuch 3. Peroxydasekonzentration 0,025%.

Tabelle IV.

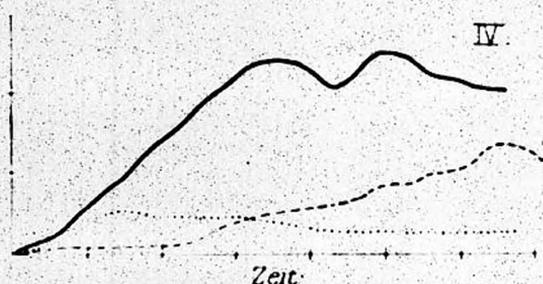
a) Mischung von Leukobase + H ₂ O ₂ nach 14 Stunden Peroxydase-zusatz		b) Mischung von H ₂ O ₂ + Peroxydase nach 14 Stunden Leukobase-zusatz		c) Mischung von Peroxydase + Leukobase nach 14 Stunden H ₂ O ₂ -Zusatz	
Zeit in Minuten	Farbintensität	Zeit in Minuten	Farbintensität	Zeit in Minuten	Farbintensität
5	0,88	3	0,13	4	0,10
11	5,29	9	0,31	10	0,11
17	10,34	15	1,81	16	0,23
23	15,81	21	3,36	22	0,76
29	23,48	27	4,42	29	1,98
36	21,50	34	4,23	35	3,17
41	21,17	40	4,05	41	4,57
47	18,00	45	3,84	46	5,86
54	16,67	52	3,43	53	7,27
1 Stunde	16,45	58	3,36	59	8,75
1 Std. 10 Min.	14,31	1 Std. 14 Min.	2,23	1 Std. 5 Min.	10,07
—	—	1 » 47 »	2,38	1 » 9 »	10,63
—	—	—	—	1 » 15 »	11,53
—	—	—	—	1 » 23 »	11,93



Versuch 4. Wie 3.

Tabelle V.

a) Mischung von Leukobase + H ₂ O ₂ nach 14 Stunden Peroxydase-zusatz		b) Mischung von H ₂ O ₂ + Peroxydase nach 14 Stunden Leukobase-zusatz		c) Mischung von Peroxydase + Leukobase nach 14 Stunden H ₂ O ₂ -Zusatz	
Zeit in Minuten	Farbintensität	Zeit in Minuten	Farbintensität	Zeit in Minuten	Farbintensität
6	0,57	4	0,36	5	0,21
14	1,03	11	0,35	12	0,20
19	2,17	17	1,18	17	0,33
25	3,62	22	2,06	23	0,34
32	4,93	29	2,24	30	0,41
39	6,73	36	2,09	37	0,43
48	8,47	42	1,82	46	0,47
57	10,51	54	2,10	55	1,22
1 Std. 4 Min.	11,58	1 Std. 1 Min.	2,07	1 Std. 2 Min.	1,89
1 „ 17 „	12,09	1 „ 14 „	1,64	1 „ 15 „	2,38
1 „ 26 „	10,43	1 „ 22 „	1,40	1 „ 23 „	2,83
1 „ 32 „	10,48	1 „ 29 „	1,38	1 „ 30 „	3,01
1 „ 39 „	12,80	2 „ 14 „	1,26	1 „ 36 „	3,93
1 „ 46 „	12,70	28 „ — „	0,66	1 „ 43 „	4,25
1 „ 53 „	11,35	—	—	1 „ 51 „	4,93
2 „ — „	11,35	—	—	2 „ 3 „	5,55
2 „ 6 „	10,68	—	—	2 „ 8 „	6,48
2 „ 11 „	10,62	—	—	2 „ 14 „	6,75
2 „ 16 „	10,68	—	—	2 „ 19 „	6,15
28 „ — „	1,91	—	—	—	—



Die zu verschiedenen Zeiten angestellten Versuche zeigen, wie besonders aus den Kurventafeln hervorgeht, folgendes durchaus gleichartiges Verhalten:

Die Mischung a (Leukobase + H_2O_2), welcher die Peroxydase nach 14 Stunden zugesetzt ist, ergibt den steilsten Anstieg unter Erreichung der höchsten Farbintensität, die Reaktion verläuft am schnellsten. Die Färbung verschwindet relativ schnell wieder, doch geht das Abblässen erheblich langsamer vor sich als die Entstehung der Färbung.

Die Mischung b (Peroxydase + H_2O_2), welcher die Leukobase zugesetzt wird, zeigt einen schwächeren Anstieg, also eine kleinere Reaktionsgeschwindigkeit als a und ein sehr viel tiefer liegendes Maximum der Farbstärke. Die Bleichung tritt ebenfalls langsam ein.

Die Mischung c (Peroxydase + Leukobase), welcher H_2O_2 zugesetzt wird, zeigt regelmäßig nach einer erheblichen Induktionsperiode (die in geringerem Maße auch bei a deutlich ist) ein weniger steiles Ansteigen als a, die Reaktionsgeschwindigkeit ist also ebenso wie das Maximum kleiner als daselbst, während die Ausbleichung etwa der von a identisch ist.

In der Mischung a ist die Peroxydase völlig ungeschwächt, was übrigens besonders durch Kontrollversuche erwiesen ist. Sie findet auch die notwendigen Reaktionskomponenten unverändert vor, die Reaktion verläuft unter den optimalen Bedingungen.

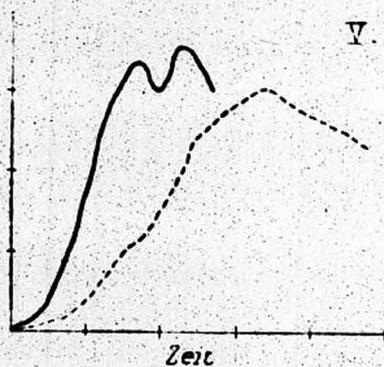
Einfach erklärt sich auch das Verhalten der Mischung b. Die Peroxydase ist durch die Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd geschädigt worden, wie das auch für dieselbe H_2O_2 -Konzentration durch spezielle Versuche nachgewiesen wurde. Die abgeschwächte Peroxydase reagiert langsam, sie bildet den Farbstoff langsam und zerstört ihn ebenso mit geringer Geschwindigkeit; sie vermag auch nur eine geringe Farbstoffintensität zu erzeugen.¹⁾

Einen charakteristischen Einblick in den Reaktionsverlauf gestattet c. Durch das Zusammensein von Peroxydase und

¹⁾ Ein innerer Zusammenhang zwischen dem Maximum der Farbstoffbildung und den übrigen Faktoren ließ sich nicht ausfindig machen.

Leukobase ist nur eine geringe Schwächung («Vergiftung») der ersteren eingetreten, wie durch besondere zur Nachprüfung angestellte Versuche und übrigens auch durch Tabelle I (starke Leukobasekonzentration verhindert das Eintreten der Reaktion) erwiesen wurde. Demgemäß sind die Geschwindigkeiten beider Oxydationsvorgänge, der Farbstoffbildung wie -zerstörung, von denen nicht sehr verschieden, welche bei der Gegenwart unveränderter Peroxydase (Fall a) auftreten. Wichtig ist aber die Induktionsperiode, die zu dem Schlusse führt, daß chemische Veränderungen, jedenfalls Additionsreaktionen, zwischen den Reaktionskomponenten auftreten müssen, bevor Farbstoffbildung eintritt.

Welcher Art diese Reaktionen zwischen den Komponenten sind, zeigt der folgende Versuch. Bringt man zur Leukobase eine bestimmte Peroxydase menge und läßt die Mischung einmal 2 Stunden (Kurve d), in einem Parallelversuche 6 Stunden (Kurve e) stehen, bevor H_2O_2 zugesetzt wird, so findet man im zweiten Falle eine sehr viel längere Induktionsperiode als im ersten. Man wird also zu dem Schlusse geführt, daß eine Verbindung aus Peroxydase + Leukobase entstanden ist. Das zugesetzte H_2O_2 verdrängt die Leukobase und verbindet sich selbst mit der Peroxydase zu einer «echten Oxydase». Dieser Vorgang gebraucht die als «Induktionsperiode» bezeichnete Zeit. Sobald die genügende Konzentration der aktiven Oxydase vorhanden ist, tritt die Farbstoffbildung ein.



(Die ausgezogene Linie entspricht d, die punktierte e.)

Tabelle VI.

d) Mischung von Peroxydase + Leukobasezusatz von H_2O_2 nach 2 Stunden		e) Mischung von Peroxydase + Leukobasezusatz von H_2O_2 nach 6 Stunden	
Zeit in Minuten	Farbintensität	Zeit in Minuten	Farbintensität
7	1,11	15	1,26
10	4,26	25	6,39
14	8,25	31	9,45
19	15,70	37	12,9
34	33,5	44	17,3
39	29,7	49	23,75
46	35,1	55	26,3
53	29,65	1 Std. 1 Min.	28,35
—	—	1 » 6 »	30,45
—	—	1 » 11 »	29,2
—	—	1 » 32 »	24,05