

Zur Kenntnis biologisch wichtiger Oxydationen. ¹⁾

II. Mitteilung.

Über die Reindarstellung und die chemische Konstitution der Medicago-Laccase.

Von

Hans Euler und Ivan Bolin.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. Juni 1909.)

Über die chemische Zusammensetzung von sogenannten Oxydasen ist bis jetzt folgendes bekannt geworden:

G. Bertrand nimmt in seinen ersten Mitteilungen²⁾ an, daß die Laccase zu den Eiweißstoffen gehört und daß somit der Stickstoffgehalt seiner Laccasepräparate nicht von Verunreinigungen herrührt. In seiner letzten diesbezüglichen Untersuchung äußert er in bezug auf die chemische Natur seiner Laccase: Est-ce un acide de la série des polysaccharides? est-ce un acide aminé, une substance protéique? C'est un point au sujet duquel nous sommes pour le moment réduits aux suppositions.³⁾

Wesentlich andere Werte erhielt für die sogenannte Schinoxydase Sarthou,⁴⁾ nämlich 6,18 % N und 0,2 % S nebst Asche, und er schloß auf ein Nucleoprotein.

Aso und Loew halten die Oxydasen für Albumosen.

Auch nach Rosenfeld⁵⁾ enthält die Oxydase aus *Raphanus sativus* Stickstoff, indessen soll sie krystallisierbar und kein Protein sein.

¹⁾ Aus Svenska Vetenskaps-Akademiens Arkiv f. Kemi, Bd. III, Nr. 19, Februar 1909.

²⁾ Annales de Chimie et de Physique (7), Bd. XII (1897).

³⁾ Annales de l'Institut Pasteur, Bd. XXI, S. 673 (1907).

⁴⁾ Journ. Pharm. chim. (6), Bd. XIII, S. 464.

⁵⁾ Dissertation. Petersburg 1906.

Slowtzoff¹⁾ hat aus den Kartoffeln eine «Laccase» erhalten. Sein reinstes Präparat enthielt 12,80% N und 0,530% S.

Nach Tschirch und Stevens²⁾ zeigt die Oxydase der japanischen Rhuspräparate die Pyrrolreaktion. Nun besteht nach Chodat und Bach diese Oxydase aus einer Peroxydase und einer Oxygenase, von welchen auch die Peroxydase allein die Pyrrolreaktion geben soll (Bach).³⁾ Chodats Peroxydase aus *Cochlearia armoracia* gibt keine Eiweißreaktionen.⁴⁾ Aus dem Chodatschen Laboratorium kommt endlich neuerdings eine Untersuchung von E. de Stoecklin, nach welcher diese Oxydase kein Eiweißkörper, aber auch nicht krystallisierbar, sondern ein amorpher Stoff ist, welcher besonders von Phosphaten der Metalle Ca, Mg, Na und K begleitet ist.

Wie ersichtlich sind die vorliegenden Angaben über die Zusammensetzung der Oxydasen außerordentlich schwankende. Sie sind außerdem, soweit sie sich auf Oxydasen vom *Medicago*-Typus beziehen, fast ausnahmslos unzutreffend.

Als Material haben wir die *Medicago*-Laccase in Arbeit genommen. Es ist dies die Laccase, welche Bertrand im Anschluß an seine Studien über Rhus-Laccase zuerst studiert hat und über deren Darstellung die genauesten Angaben vorliegen. Genügende Quantitäten von *Medicago sativa* — wir haben aus 45 kg blühenden Pflanzen nur die Blätter von etwa 22 kg Gewicht verwendet — wurde uns in dankenswerter Weise vom landwirtschaftlichen Institut in Ultuna geliefert.

Darstellung der *Medicago*-Laccase.

Die Darstellung des Enzyms aus *Medicago sativa* — einer Ernte, welche sich im Beginn der Blüte befand — geschah anfangs genau nach den Vorschriften von G. Bertrand.⁵⁾ Die ganz frischen, von den Stengeln befreiten Pflanzen — es

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 227 (1901).

²⁾ Arch. de Pharm., Bd. XLIII, S. 504 (1905).

³⁾ Arch. de sc. phys. et nat. 1907 und Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 226 (1908).

⁴⁾ Schweiz. Woch. Chem. u. Pharm., Bd. XLIII, 1905.

⁵⁾ Bull. Soc. chim. de Paris (3), Bd. XVII (1897).

wurden zuerst 8 kg in Arbeit genommen — wurden zerkleinert, gehackt 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 wieder mit Wasser in Lösung und fällten nochmals. Diese Umfällung wurde dreimal wiederholt. Das so erhaltene Präparat ist nach dem Trocknen im Exsikkator ein staubfeines, weißes, in Wasser sehr leicht lösliches und sehr hygroskopisches Pulver. Mit diesem Präparat wurden die ersten Versuche angestellt. Es zeigte die von Bertrand angegebenen katalytischen Eigenschaften bei der Oxydation von Hydrochinon.¹⁾ Für die weitere Ausarbeitung der Methodik war der Befund ausschlaggebend, daß eine Lösung unseres Präparates in seiner oxydierenden Wirkung durch kürzeres Kochen nicht geschwächt wurde.

Wir konnten demgemäß, bei einer folgenden Darstellung, bei welcher wir von 12 kg stielfreien Medicago-Pflanzen ausgingen, den Preßsaft durch kurzes Kochen von Eiweißstoffen befreien, die, wie wir uns überzeugten, mit der Oxydationswirkung auf Hydrochinon in keinem Zusammenhang standen. Die beim Kochen eintretende Fällung löst sich übrigens nicht mehr in kaltem Wasser. Der Preßsaft wurde darauf noch ein wenig eingeeengt und hierauf mit gut wirkender Tierkohle gekocht. Die Kohle war sehr sorgfältig gereinigt durch Kochen mit schwacher Salzsäure und dann mit destilliertem Wasser bis zum Verschwinden jeder Chlorreaktion. Der ganz farblose Preßsaft wurde dann mit dem dreifachen Volumen 96%igem Alkohol gefällt, der schneeweiße Niederschlag nach mehreren Stunden abgesogen und im Vakuum-Exsikkator getrocknet.

Das so gewonnene Medicago-Präparat wurde, bevor noch Versuche über seine Einheitlichkeit angestellt waren, einer Totalanalyse unterworfen.

Zunächst wurde der Aschengehalt der Substanz festgestellt, und die qualitative Prüfung ergab an Metallen nur Calcium nebst geringen Beimengungen von Eisen. So ergaben 0,7076 g

¹⁾ Vgl. Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 92 (1908).

der bei 60° getrockneten Substanz 0,2174 g CaO und 0,0063 g Fe₂O₃ entsprechend 21,95% Ca und 0,62% Fe (Analyse IV).

Die Elementaranalysen wurden teils mit Kaliumbichromat ausgeführt, teils so, daß die reine Substanz im Sauerstoffstrom verbrannt wurde, worauf aus dem Rückstand das noch gebundene Kohlendioxyd nach Mohr ermittelt wurde (III). Das Analysenmaterial für I und II war bei 60% getrocknet worden, Material III bei 100°.

Gefunden in %	I	II	III	IV
C	24,3	23,0	22,7	—
H	3,1	3,1	2,9	—
Ca	—	—	21,97	21,95

Die Analysenresultate deuteten bereits darauf hin, daß das Präparat aus neutralen Calciumsalzen mehrbasischer Pflanzensäuren bestand und zwar stimmen sie, in Anbetracht dessen, daß unser natürliches Präparat nicht einheitlich sein konnte, auffallend gut auf das neutrale Calciumglykolat, welches enthält:

	C	H	Ca
%	25,3	3,2	21,05

Die darauf folgende Fraktionierung der Substanz und Isolierung der in derselben enthaltenen Säuren bestätigte in der Tat, daß diese Medicago-Laccase zum größeren Teil aus Calciumglykolat bestand. Daneben enthält sie aber auch nicht unbeträchtliche Mengen von Calciumsalzen von zweibasischen und dreibasischen Säuren, welche die analytischen Differenzen erklären, wie unten gezeigt wird.

Dieses Ergebnis wurde auch sehr gut bestätigt durch die Fällung des Laccasegemisches mit Silbernitrat. Die Laccase wurde partiell gelöst und der im Filtrat anwesende Teil in das Silbersalz übergeführt; da hierbei das Calciumglykolat von den schwerer löslichen Calciumsalzen größtenteils befreit worden war, zeigte die Analyse des erhaltenen Silbersalzes eine befriedigende Übereinstimmung mit Silberglykolat.

Analyse:

C ₂ H ₃ O ₃ Ag:	Berechnet	Gefunden
C	13,11%	14,3%
H	1,64%	1,5%
Ag	59,0%	59,8%

Scheidung und Isolierung der Pflanzensäuren der Medicago-Oxydase.

Da die Silbersalze der Medicago-Säuren wegen ihrer Schwerlöslichkeit und ihrer Reduzierbarkeit zur Trennung der Säuren ungeeignet waren, die Calciumsalze andererseits zur fraktionierten Krystallisation zu leicht löslich sind, wurden die Calciumsalze der Laccase in die Baryumsalze übergeführt, und zwar nach folgender Methode. Für die Unterstützung bei der Isolierung und Analyse der Baryumsalze sind wir Dr. Astrid Euler zu Dank verpflichtet.

Methode.

Von dem in oben beschriebener Weise dargestellten, gereinigten Medicago-Präparat wurden 2 Portionen von je 6 g in je 20 g Wasser gelöst, wobei die Lösung noch opalisierte. Dieselbe wurde in der Kältemischung gut abgekühlt und mit einer ebenfalls gekühlten Lösung von 4 g Schwefelsäure in 10 g Wasser versetzt (etwas mehr als die berechnete Menge). Es fällt sofort Calciumsulfat aus, zur Vervollständigung der Fällung wurden 150 ccm kalten Alkohols zugefügt und alles eine Stunde in die Kältemischung gestellt. Der quantitativ gefällte Gips wurde abgesogen. (Trockengewicht 5 g.) Das Filtrat wurde mit Baryumcarbonat versetzt und dann auf dem Wasserbade vorsichtig eingedunstet. Nach weitgehendem Eindampfen unter stetigem Umrühren trat eine lebhafte Kohlensäureentwicklung ein, und die Masse nimmt durch Ausfallen der organischen Baryumsalze eine breiartige Konsistenz an. Die Masse wird im kochenden Wasserbad dreimal mit je 200 ccm Wasser ausgelaugt; man filtriert von der körnigen Masse ab und konzentriert die Filtrate in flachen Schalen, wobei bald eine charakteristische halbkrySTALLINISCHE Haut auftritt. Nach Einengen auf etwa 75 ccm und Abkühlen wird das krySTALLINISCHE Rohprodukt abgesogen, seine Menge betrug 3 g. Die weiter eingeeengte, etwas bräunliche Mutterlauge erstarrte bei Alkoholzusatz zu einem dicken Brei von weißen Baryumsalzen, welche nach Absaugen, Waschen mit Alkohol und Abpressen 3 g wogen. Das Filtrat enthielt noch etwa 1 g durch Alkohol nicht fällbaren Sirup.

Es wurden also im ganzen aus 2 mal 6 g Calciumsalzen

12 g rohe, lösliche Baryumsalze erhalten, welche im folgenden unter der Bezeichnung A näher besprochen werden. Da aber nach der S. 4 erwähnten Totalanalyse aus 12 g Calciumsalzen 18 g Baryumsalze zu erwarten gewesen wären, so ist offenbar ein Drittel der gesamten Baryumsalze als unlöslich zusammen mit dem überschüssigen Baryumcarbonat abfiltriert worden. Die nähere Untersuchung dieser unlöslichen Salze behalten wir uns noch vor. Indessen kann schon jetzt angegeben werden, daß ein großer Teil der genannten Fraktion aus Citrat bestand.

Führt man nämlich die Neutralisation der durch Schwefelsäure in Freiheit gesetzten Säuren nicht mit Baryumcarbonat, sondern mit Baryumhydroxyd aus, so erhält man neben den körnig krystallinischen löslichen Baryumsalzen auch eine unlösliche Fällung von fast gallertartigem Aussehen, ganz ähnlich derjenigen, welche man mit Citronensäurelösungen erhält. Besonders zu suchen sind ferner in dieser Fraktion noch Weinsäure und Tartronsäure, deren Baryumsalze äußerst schwer löslich sind.

Die weitere Zerlegung des löslichen Baryumsalzgemisches A geschah durch fraktionierte Krystallisation.

Die zuerst erhaltene schwerlösliche Fraktion ließ sich durch zweimaliges Umlösen in 2 Salze aufteilen. Am wenigsten löslich war ein Salz, welches folgendes Verhalten zeigte. Seine heiße Lösung bedeckt sich beim Eindunsten mit einer gut zusammenhängenden mikrokristallinen Haut und bildet später weiche, dünne Krystallschuppen, welche nach dem Absaugen und Waschen mit Alkohol nicht die harte, sandige Beschaffenheit der Tartrate und Malate besitzen. Die Schuppen lösen sich nicht merkbar in kaltem Wasser und erst langsam beim Kochen.

Analyse: 0,1544 g abgepreßtes, lufttrockenes Salz verlor bei 100° 0,0182 g Wasser = 11,8% H₂O. Berechnet für C₃H₂O₆Ba + 2 H₂O. 2 H₂O = 11,7%. 0,1336 g bei 100° getrocknet gab 0,1134 g BaSO₄ = 50,0% Ba.

Um die Natur dieses Baryumsalzes zu ermitteln, wurde die Säure selbst durch die genau berechnete Menge Schwefelsäure in Freiheit gesetzt. Die filtrierte Lösung wurde vorsichtig

bei 50—60° eingedampft, bis Sirupkonsistenz erreicht war, und hierauf mit Äther ausgezogen. Der größte Teil löste sich in Äther ohne besondere Schwierigkeit und erstarrte nach Abdunsten des Lösungsmittels beim Reiben in der Kälte bald krystallinisch. Die stark sauer schmeckenden Kryställchen wurden im Vakuumexsikkator getrocknet. Im Kapillarrohr erhitzt, begannen sie erst über 110° zu erweichen und schmolzen unscharf bei 120°. Schon bei dieser Temperatur fingen sie an Kohlendioxyd zu entwickeln. Bei der Elementaranalyse würde die Kohlensäureentwicklung bei dieser relativ niedrigen Temperatur so lebhaft, daß die Absorption des Gases sogar im Thiele'schen Apparat nicht ganz vollständig war. Die Analyse gab deshalb einen etwas zu kleinen Wert für C. Zu einer Kontrollanalyse muß erst neues Material beschafft werden.

Analyse: 0,1690 g bei 100° getrocknete Säure gaben 0,1549 g CO₂ und 0,0459 g H₂O.

	Berechnet für C ₃ H ₄ O ₆	Gefunden
C	26,5%	25,0%
H	2,9%	3,0%

Sowohl aus den Eigenschaften und der Zusammensetzung der freien Säure als aus dem Verhalten und der Analyse des Baryumsalzes (gefunden 50,0% Ba, berechnet für Baryummesoxalat + H₂O 50,6% Ba) kann kaum ein anderer Schluß gezogen werden, als daß die untersuchte Substanz mit Mesoxalsäure identisch ist. Besonders entscheidend ist die verhältnismäßig erhebliche Löslichkeit in Äther und die leichte Zersetzlichkeit der Säure unter CO₂-Entwicklung. Durch dieses Verhalten unterscheidet sie sich z. B. deutlich von der Äpfelsäure, deren Baryum Salz sehr angenähert den gleichen Baryumgehalt besitzt.

Zur weiteren Sicherstellung des gewonnenen Ergebnisses wurde das Baryum Salz der Mesoxalsäure (aus Alloxan) synthetisch dargestellt. Dasselbe verhielt sich mit unserem Salz in jeder Hinsicht identisch.

Durch diesen Befund ist die Mesoxalsäure zum ersten mal im Pflanzenreich nachgewiesen worden. Die Gegenwart dieser Säure im Pflanzenorganismus beansprucht ein bedeutendes

Interesse besonders in Anbetracht der gleichzeitigen Anwesenheit von Glyoxylsäure im selben Pflanzenpräparat. Beide Säuren sind besonders zur Vermittlung des bei der Atmung stattfindenden Gasaustausches geeignet. Einerseits zersetzt sich Mesoxalsäure ungemein leicht unter Kohlensäureentwicklung und übertrifft in dieser Hinsicht sogar die Oxalsäure, andererseits liefert die Mesoxalsäure bei ihrer leicht eintretenden Zersetzung neben Kohlendioxyd Glyoxylsäure, welche als Aldehydsäure stark reduzierende Eigenschaften besitzt, und also in Gegenwart eines geeigneten Katalysators Luftsauerstoff aufnimmt, indem sie in Oxalsäure übergeht.

Im schwerlöslichen Anteil war außer Mesoxalsäure Äpfelsäure vorhanden, dessen Baryumsalz sich in rauhen Krusten am Boden des Krystallisationsgefäßes ausschied. Mit den zu Gebote stehenden Mengen konnte jedoch das Salz noch nicht analysenrein erhalten werden, sondern war immer einerseits mit etwas Mesoxalat, andererseits mit dem Baryumsalz der Glykolsäure vermengt (vgl. unten). Eine umkrystallisierte Quantität enthielt bei 100° getrocknet 49,4% Ba; für reines, wasserfreies Baryummalat berechnet sich 51,0%. Zur Ergänzung wird die freie Säure noch isoliert und verarbeitet.

Die leichter lösliche Baryumsalzfraktion zeichnet sich durch folgendes Verhalten aus. Sie läßt sich in der Wärme sehr weitgehend einengen, ohne krystallisierende Salze auszuscheiden, zum Unterschied von den Salzen der zwei- und mehrbasischen Pflanzensäuren. Zuletzt erhält man eine dickflüssige Lösung mit starker Oberflächenspannung, die beim Umrühren zuerst klebrige, amorphe Salze ausscheidet. Beim Abkühlen und beim Zusatz von ein wenig Wasser vermehrt sich die Salzfallung stark und wird zugleich krystallinisch. Diese Krystallflocken lösen sich ziemlich leicht in Wasser. Nach Umkrystallisieren wurde das Salz analysiert.

0,1323 g lufttrockenes Salz verlor bei 100° 0,0125 g H₂O = 9,45%. Der Rückstand gab 0,0960 g BaSO₄. Das bei 100° getrocknete Salz enthielt also 47,2% Ba, ein Wert, welcher mit dem für Baryumglykolat berechneten (47,8%) am besten übereinstimmt. Der endgültige Beweis, daß es sich hier um

Glykolat handelt, kann indessen erst durch die Isolierung der Säure selbst erbracht werden. Bis dahin äußern wir unsere Vermutung mit aller Reservation.

Die leichtest löslichen Baryumsalze der Mutterlauge des vorhergenannten Salzes wurden zuletzt durch Alkohol gefällt, gewaschen und bei 100° getrocknet. Auch hier stimmte die Analyse auf Baryumglykolat.

Die nähere Beschreibung der Säuren dieser leichter löslichen Baryumsalzfraktion bleibt einer folgenden Mitteilung vorbehalten. Daß sich Glyoxylsäure darunter befindet, kann schon jetzt als sehr wahrscheinlich bezeichnet werden.

Gleichzeitig mit der *Medicago*-Laccase haben wir auch andere ähnliche Oxydasen aus verschiedenen Pflanzenteilen dargestellt. Wie vorläufige Versuche, besonders mit der Oxydase aus *Sedum telephium*, ergeben haben, bestehen auch diese Oxydasen aus Salzen (allerdings nicht nur Calciumsalzen) von Oxysäuren.

Steht es nun einerseits fest, daß die gereinigten Laccasen vom *Medicago*-Typus aus Salzen ein- und mehrbasischer Oxysäuren bestehen, so ist natürlich sofort zu untersuchen, ob nicht durch den Reinigungsprozeß wesentliche, wirksame Teile des Präparates entfernt worden sind. Wir können sagen, daß dies nicht der Fall ist; was die Kohle absorbiert, sind einerseits die Reste von dextrinartigen Stoffen, welche durch die Vorbehandlung mit Alkohol nicht vollständig entfernt worden sind, andererseits Bruchteile derjenigen Salze, welche das reine Präparat ausmachen. Man kann dies erstens dadurch zeigen, daß man die Wirksamkeit der durch die Kohle absorbierten Stoffe mißt. Zweitens aber dadurch, daß man quantitative Vergleiche zwischen der Wirkung der gereinigten und der rohen Oxydase anstellt.

Nun haben wir bereits vor einem Jahr und ganz unabhängig von den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung gefunden,¹⁾ daß die neutralen Salze der aliphatischen Oxy-

¹⁾ H. Euler und I. Bolin, Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 80 [1908]. Siehe das daselbst über die Ausführung der quantitativen Messungen Gesagte.

säuren die gleichen Wirkungen ausüben, wie die *Medicago-Laccase*. Wir erinnern an die l. c. Seite 94—98 mitgeteilten Tabellen.

Im Anschluß an die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sind dann diese Messungen wiederholt worden und haben zu Zahlen geführt, welche mit den früher erhaltenen vollständig übereinstimmen. Von den Versuchen mit weiteren Salzen sei dann noch einer mit Calciummalat und einer mit Calciumglykolat angeführt, während wir uns die ausführliche Wiedergabe der quantitativen Oxydationsversuche für eine folgende Mitteilung vorbehalten. Bei Mesoxalsäure scheint die Oxydationsreaktion in Gegenwart von Mangan eine erheblich kompliziertere zu sein. Tabelle 4, welche sich auf die oben angegebenen Hydrochinon- und Mangankonzentrationen bezieht, zeigt, daß eine Mischung dieser in der *Medicago-Laccase* enthaltenen Calciumsalze die Wirkung der natürlichen Laccase noch etwas übertrifft.

Die Versuche sind wie früher mit Lösungen angestellt worden, welche in bezug auf Hydrochinon 0,2 normal, in bezug auf Manganacetat 0,001 äquivalent-normal waren. Die Tabellen geben die in der Zeit t Minuten von 50 ccm Lösung absorbierten Kubikzentimeter Sauerstoff an.

Tabelle 1.

0,2 g Calciumglykolat in 50 ccm

t	ccm O ₂
5	1,1
10	1,7
15	2,3
20	2,6
30	3,1

Tabelle 2.

0,2 g Calciummalat in 50 ccm

t	ccm O ₂
5	1,8
10	2,9
20	4,5
30	5,7

Tabelle 3.

0,1 g Calciumglykolat

0,05 > Calciummalat

0,05 > Calciummesoxalat

t	ccm O ₂
5	2,3
10	3,4
15	4,1
20	4,8
30	5,9

Tabelle 4.

0,2 g Laccase

t	ccm O ₂
5	1,3
10	2,2
15	3,0
20	3,5
30	4,9

In unserer vorhergehenden Mitteilung haben wir darauf hingewiesen, daß eigentlich keine Veranlassung vorliegt, die Oxydasen vom *Medicago*-Typus als Enzyme zu bezeichnen.

Einerseits haben wir es hier offenbar mit einer reinen Definitionsfrage zu tun. Da für die Bezeichnung Enzym keine andere Bedingung existiert, als die Herkunft aus einem Organismus, und kein bindendes Kriterium — daß ein Kriterium wie die Wärmedenaturierung nicht befriedigen kann, haben wir bereits mehrfach hervorgehoben — so ist es schwer, zwischen Enzymen und anderen Katalysatoren des Tier- und Pflanzenreiches eine Grenze zu ziehen. Durchaus berechtigt ist es ohne Zweifel, einen enzymatisch wirksamen Stoff, sei er wärmeempfindlich oder nicht, sobald seine Konstitution klargelegt worden ist, aus der Reihe der Enzyme auszuschneiden und fortan einfach unter die Katalysatoren zurechnen.

Andererseits haben sich Bezeichnungen wie Oxydase, Laccase u. a. so eingebürgert, daß man sie ohne zwingende Veranlassung nicht aufgeben wird. Wir haben einstweilen die von Bertrand auch für die *Medicago*-Oxydase eingeführte Bezeichnung Laccase beibehalten, obwohl, wie in einer folgenden Mitteilung gezeigt wird, die *Medicago*-Laccase und die *Rhus*-Laccase sehr wenig Beziehungen zu einander haben.

Zusammenfassung.

Es ist durch die vorliegende Untersuchung zum erstenmal gelungen, über die chemische Natur einer Oxydase Aufschluß zu erhalten. Die von G. Bertrand 1897 dargestellte *Medicago*-Laccase wurde nämlich als ein Gemisch von Calciumsalzen ein-, zwei- und dreibasischer Oxysäuren erkannt. Unter den Säuren sind besonders nachgewiesen: Citronensäure, Äpfelsäure und Mesoxalsäure. Die Gegenwart von viel Glykolsäure wurde sehr wahrscheinlich gemacht.

Wie zum Teil schon in einer früheren Arbeit der Verfasser gezeigt worden ist, üben die neutralen Salze dieser Säuren qualitativ und quantitativ die gleiche Oxydationswirkung auf Polyphenole aus, durch welche Bertrand seine *Medicago*-Laccase charakterisiert hat.