

Neuere Untersuchungen über die biologische Oxydation*).

Von HEINRICH WIELAND, München.

(Eingeg. 10. Juni 1931.)

Man hat versucht, den Vorgang des vitalen Verbrennungsprozesses auf ein einziges Schema zu bringen, auf das einer katalytischen Oxydation, die sich an einer durch ein Schwermetall (Eisen oder Kupfer) aktiv gewordenen Oberfläche abspielt. In den letzten Jahren glaubt man diesen universellen Katalysator im sogenannten „Atmungsferment“ angetroffen zu haben, das seinem chemischen Wesen nach dem Hämin nahestehen soll (Warburg). Wenn man sich die bereits von Liebig geäußerte Annahme, das Eisen als solches wirke als Beschleuniger der vitalen Oxydation, zu eigen machen will, so versteht man schwer, warum der durch das Metall aktiv gewordene Sauerstoff nicht wahllos jede organische Substanz oxydiert, die sich ihm in der Zelle darbietet. Man versteht z. B. nicht, warum Ameisensäure und Oxalsäure im Organismus so schwer oxydiert werden, während allen Erfahrungen nach der Abbau der Essigsäure und der höheren Fettsäuren glatt und leicht vor sich geht.

Überall wo im Stoffwechsel große Molekeln in irgendeiner Weise chemisch zerkleinert werden, geschieht dies unter der Mithilfe von Enzymen, und zwar zeigt sich auch hier eine in bestimmter Richtung eingestellte Wirkungsweise. Es ist nicht etwa ein einziges Fermentsystem, dem der überragende Vorgang der biologischen Hydrolyse obliegt, sondern jede Art von Substrat, Kohlehydrate, Proteine, Fette, wird von ihrem ganz spezifischen Ferment gespalten. Ja, die auswählende Wirkung, die von der Natur des Substrats gefordert wird, geht noch viel weiter. Chemisch einander so nahestehenden Stoffen wie den Biosen (Saccharose, Maltose, Lactose) sind jeweils eigene Fermente untertan. Damit soll nur ein Beispiel für die Vielfältigkeit der Enzymwirkung gegeben sein.

Wenn schon eine so einfache chemische Reaktion, wie die Öffnung von Äther-, Ester- oder Amidbindungen unter Eintritt von Wasser die Beteiligung mehrerer Helfer verlangt, wird der ungleich kompliziertere Prozeß der oxydativen Zerstörung organischer Molekeln wohl kaum mit einem einzigen Katalysator auskommen. Dieser Gedanke drängt sich wenigstens auf, wenn man den ungemein feinen Reaktionsmechanismus berücksichtigt, der die chemische Veränderung in der lebenden Substanz reguliert.

Die Fermentsysteme, die der hydrolytischen Spaltung der Nahrungsstoffe dienstbar sind, finden sich in kolloider Lösung, sei es im Zellsaft, sei es in der Sekretion bestimmter Organe, vor. Sie lassen sich meist ohne Schwierigkeit vom lebenden Organismus abtrennen, und es gelingt leicht, auf kürzere oder längere Zeit hinaus die katalytische Leistung aufrechtzuerhalten, die ihnen im Lebensprozeß als Aufgabe gestellt ist. Ja, man hat Methoden, zu großer Vollkommenheit von Willstätter und seiner Schule ausgebaut, die es erlauben, das Enzymmaterial von unwirksamen Begleitstoffen zu befreien und so seine Wirksamkeit auf das Vielfache von dem seines ursprünglichen vitalen Zustands zu konzentrieren.

Auch trifft man nicht auf grundsätzliche Unterschiede des Enzymcharakters, wenn man die gewaltige Stufenfolge der Lebewesen von der einzelnen Pilzzelle bis zum Menschen hinansteigt. Der Rohrzucker wird vom Invertin der Hefe in der gleichen Weise gespalten

wie vom Ferment der Bauchspeicheldrüse, und die aus diesem Organ sezernierte Amylase verzuckert die Stärke nicht anders als die Amylase des Malzes. Auch der hydrolytische Abbau der Fette und der Eiweißkörper weist in der gesamten Lebewelt keine erheblichen Unterschiede auf. Es ist besonders bemerkenswert, daß die neueste Forschung auf dem Gebiet der Proteasen in der Hefe fast alle Enzymsysteme angetroffen hat, die auch in den Organen des Säugetiers erzeugt werden.

Im Gegensatz zu diesen der Untersuchung günstigen Verhältnissen ist die Lostrennung des biologischen Oxydationssystems von der lebenden Substanz eine Aufgabe, deren Lösung bisher nur in besonderen Fällen geglückt ist. Die vitale Oxydation ist in ihren wichtigsten Reaktionen an das Leben gebunden. Mit dem Tod geht der spontane Verfall der enzymatischen Funktion Hand in Hand. Wir besitzen noch kein Mittel, um ein der Zelle vertrautes Substrat mit dem toten Material bis zum Ende abzubauen, so wie es im Lebensprozeß geschieht. Der Bestand der enzymatischen Wirksamkeit scheint hier, wenigstens soweit wir den Gesamtkomplex der Atmung ins Auge fassen, an das regulierende Prinzip gebunden zu sein, mit dem wir aus Mangel an genauerer Kenntnis den Begriff des Lebens umschreiben.

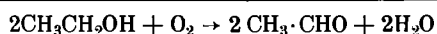
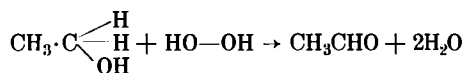
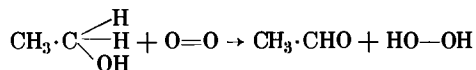
So bietet der Hauptakt der vitalen Oxydation am höher differenzierten Organismus der Forschung bisher nicht überwundene Schwierigkeiten dar. Glücklicherweise jedoch zeigt dieser enzymatische Prozeß, anders als wie dies für die hydrolysierenden Enzyme gilt, eine Vereinfachung des chemischen Bildes und eine geringere Labilität des Fermentsystems, wenn man vom Warmblüter zu den einzelligen Mikroorganismen zurückgeht. Man kann ja deutlich erkennen, wie die Fähigkeit der lebenden Substanz, die energieliefernden Prozesse auszugestalten, mit der phylogenetischen Entwicklung sich steigert. Auf der niedersten Stufe steht wohl das Leben ohne Sauerstoff, das seinen Energiebedarf aus hydrolytischen und auch aus wasserstoffverschiebenden Prozessen deckt. Es sind die Vorgänge, die man zweckmäßig unter dem Begriff der Gärung zusammenfaßt. Der größere Energiebedarf der morphologisch und physiologisch fortgeschrittenen Arten führt — diese Vorstellung ist wohl erlaubt — den atmosphärischen Sauerstoff in den Stoffwechsel der lebenden Substanz ein.

Betrachtet man das Gebiet der biologischen Oxydationsvorgänge vom Standpunkt der Hypothese, daß sich ihre Natur mit aufsteigender phylogenetischer Ordnung der Organismen verfeinert und kompliziert, so weist die Taktik der Forschung auf aerobische Pilze als erste Angriffspunkte hin. Hier bietet die enzymatische Autoxydation von Alkoholen und Aldehyden zur Säure in der Zelle der Essigsäurebakterien ein geradezu ideales, nicht zu übertreffendes Untersuchungsobjekt. Unter Bedingungen, die leicht herzustellen sind, wird der reagierende Sauerstoff ausschließlich zur Erhöhung der Oxydationsstufe des Substrats und schließlich zur Säuerung verwendet. Dieser elementare biologische Oxydationsprozeß läßt sich mit voller analytischer Schärfe in allen Einzelheiten verfolgen.

Schon an diesem einfachsten Beispiel enzymatischer Oxydation kann man experimentell zeigen, daß die Lehre von der Aktivierung des molekularen Sauerstoffs den Vorgang nicht hinreichend erklären kann. Eine andere Betrachtungsweise, die in erster Linie das Substrat

*) II. Pedler Lecture, gehalten am 6. März 1931 vor der Chemical Society in London.

der Oxydation mit dem Enzym in Beziehung bringt, scheint hier weiter zu führen. Nimmt man an, daß nicht die Wirkungsstärke des Oxydationsmittels, sondern vielmehr die Aktivität des vom Prozeß betroffenen Wasserstoffs gesteigert wird, so erscheint die Sauerstoffmolekel als die Komponente, die den aktivierten Wasserstoff über die Stufe des Hydroperoxyds zu Wasser bindet, z. B.:



Da nach dieser Vorstellung die enzymatische Wirkung nicht am Sauerstoff, sondern am Wasserstoff angreift, bezeichnet man die Umsetzung zweckmäßig als Dehydrierung. Sie führt von der Stufe des Aldehyds aus über dessen Hydrat in der oben formulierten Weise weiter zur Säure.

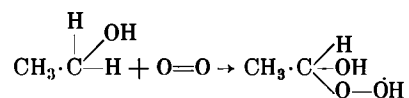
Der Kernpunkt des Beweises für diese Auffassung liegt in der Tatsache, daß die Essigsäuregärung des Sauerstoffs entbehren kann. Bei gleicher Konzentration vermögen die Bakterien unter Ersatz des Sauerstoffs durch Chinon, und zwar mit noch größerer Geschwindigkeit als mit diesem, Alkohol und Aldehyd in Essigsäure überzuführen. Die Kinetik der beiden Vorgänge stimmt fast haarscharf überein. In gleicher Weise, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit, vermag Methylenblau den Sauerstoff bei der biologischen Säuerung des Alkohols zu vertreten.

Es gibt eine größere Anzahl von Substanzen, die auf biologische Oxydationsvorgänge hemmend wirken. Unter ihnen ist am ausführlichsten untersucht die Wirkung der Blausäure. Es ist nun sehr auffallend, daß die Reaktion bei Gegenwart von Chinon oder Methylenblau durch nicht zu hohe Konzentration an Blausäure keine Störung erfährt, und man hat daraus den Schluß gezogen, daß der Sauerstoff einer Anregung, und zwar von metallkatalytischer Seite bedürfe, deren er unter dem Einfluß der Blausäure auf das Ferment verlustig gehe. Folgender Versuch läßt eine einfachere Erklärung zu und macht die Annahme der Sauerstoffaktivierung entbehrlich: Wenn man die Dehydrierung des Alkohols durch Essigsäurebakterien bei gleichzeitiger Gegenwart von Sauerstoff und Chinon prüft, so findet man, daß der aerobe Prozeß durch ungefähr gleiche Konzentration von Chinon in ungefähr gleichem Grad gehemmt wird wie durch Blausäure. In dem Maße, in dem Chinon zu Hydrochinon hydriert wird, kommt der Sauerstoff wieder zum Zuge. Der Unterschied in der Hemmung der aeroben Reaktion durch Chinon und Blausäure besteht offensichtlich nur darin, daß das Chinon an der enzymatischen Reaktion teilnimmt, die Blausäure aber nicht. Beiden ist die große Affinität zur wirksamen Oberfläche gemeinsam, die für den konkurrierenden Sauerstoff Reaktionshemmung bedeutet.

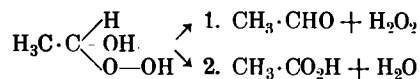
Wenn man die Funktion der cellularen Oxydationskatalysatoren darin sieht, daß sie den Wasserstoff der Substanzen, die oxydiert werden, reaktionsfähig machen, so muß dieser Wasserstoff in der ersten Stufe der Reaktion mit dem molekularen Sauerstoff zu Hydroperoxyd zusammentreten. Der Nachweis der Bildung dieses primären Produktes bei biologischen Oxydationen ist daher von größter Bedeutung. Aber er ist nicht leicht zu erbringen, denn überall, wo eine Zelle in ihrem Stoffwechsel Sauerstoff verbraucht, finden wir sie ausgestattet mit den Fermenten, deren Funktion die Zersetzung des

Hydroperoxyds in Sauerstoff und Wasser bildet, mit den Katalasen. Die Katalasen, die sich vom System der Dehydrasen in der Regel nicht abtrennen lassen, sind auch blausäureempfindlich wie diese, und die Methodik des Hydroperoxydnachweises kann sich auf die Überlegung gründen, die Katalasewirkung durch dosierte Hemmung auszuschalten, ohne die Tätigkeit der Dehydrase völlig stillzulegen. Im Falle der Essigsäurebakterien ist das Verhältnis der beiden Enzymsysteme, gemessen an der Empfindlichkeit gegenüber Blausäure, so ungünstig, daß es bisher nicht gelungen ist, Hydroperoxyd als Zwischenprodukt der Alkoholsäuerung aufzufinden.

Es ist vielleicht nicht unnütz, die Möglichkeit einer noch weiter gehenden Zerlegung des Reaktionsverlaufes, für die einige Unterlagen vorhanden sind, in wenigen Worten zu diskutieren. Die Auflockerung des Wasserstoffs, die sich nach unserer Meinung an der Enzymoberfläche vollzieht, braucht nicht mit seinem sofortigen paarweisen Übergang an die Sauerstoffmolekel verbunden zu sein. Das Auftreten eines primären Additionsproduktes, im Falle des Alkohols gemäß der Gleichung



entstanden, liegt durchaus im Rahmen der Theorie. Sein Zerfall könnte nach zwei Richtungen gehen, nämlich einmal zur Bildung von Aldehyd und Hydroperoxyd, dann aber auch zu Essigsäure und Wasser führen.



Da in jüngster Zeit Rieche in Erlangen Verbindungen von der Art solcher hypothetischer Zwischenprodukte dargestellt hat, wird man in der Lage sein, die hier diskutierte Frage experimentell zu prüfen. —

Bereits vor mehreren Jahren hatte der englische Forscher McLeod in Leeds die wichtige Entdeckung gemacht, daß anaerobe Bakterien, denen die Katalase fehlt, im aeroben Stoffwechsel Hydroperoxyd bilden. Die Milchsäurebakterien führen sogar unter diesen Bedingungen den aufgenommenen Sauerstoff vollständig in Hydroperoxyd über (Bertho).

Man hat, bevor die hier vertretene Auffassung vom Wesen der biologischen Oxydationsvorgänge formuliert war, den oxydierenden Fermenten die reduzierenden gegenübergestellt, nachdem vielfach in der Zelle Reduktionswirkungen beobachtet worden waren. Die Reduktion ist aber nur der korrelative Anteil der Dehydrierung. Wird z. B. Chinon als Wasserstoffakzeptor eingesetzt, so erscheint das entstehende Hydrochinon als Produkt eines Reduktionsprozesses. Hier hebt sich eben die Hydrierung des Wasserstoffakzeptors eindrucksvoller hervor als bei der grundsätzlich ganz gleichartigen Reaktion des Übergangs von molekularem Sauerstoff in Wasser. Im Umsatz der Zelle werden demgemäß Reduktionsprodukte durch den Eintritt verschiedener Wasserstoffakzeptoren in den Dehydrierungsprozeß gebildet werden. Umgekehrt wird man auch schließen dürfen, daß überall da, wo vitale Reduktion stattfindet, sich auch der Vorgang der aeroben Dehydrierung wird feststellen lassen. Die Vorherrschaft des Sauerstoffs gründet sich nicht allein auf sein hohes Hydrierungspotential, sondern auch auf die chemische und physikalische Indifferenz seines Hydrierungsproduktes, des Wassers. Und doch gibt es bemerkenswerterweise dehydrierende Systeme, die durch Sauerstoff rasch zerstört werden. Sie

sind namentlich in Früchten beobachtet worden, und es erscheint von hohem pflanzenphysiologischem Interesse, einen tieferen Einblick in diese Zusammenhänge zu erhalten.

Das bekannteste Reduktionsferment, das zuerst experimentell als Dehydrase festgelegt wurde, findet sich in der frischen keimfreien Kuhmilch. Schar dinger hat gefunden, daß Formaldehyd in Milch Methylenblau entfärbt, eine Reaktion, die in gekochter Milch nicht mehr zustande kommt. Untersucht man diese Reaktion, bei der aus dem Aldehyd die Säure entsteht, ohne den Farbstoff bei Gegenwart von Luft, so beschleunigt das gleiche Enzym die Dehydrierung des Aldehyds zur Säure, indem der aktivierte Wasserstoff von der Sauerstoffmolekel aufgenommen wird. Neben der Aldehydrase enthält die Milch ein Enzym, das die Purinbasen Xanthin und Hypoxanthin auf dem Wege der Dehydrierung, mit Sauerstoff wie auch mit Methylenblau als Wasserstoffakzeptoren, in Harnsäure überführt. Diese interessante Fermentwirkung ist von H o p k i n s und seinen Schülern im Cambr idger Laboratorium aufgefunden worden, und es ist auch gelungen, das Gemisch der beiden Fermente aus der Milch in angereichertem Zustand zu isolieren. Da die Katalase bei der Reinigung abgetrennt werden kann, so besteht hier die Möglichkeit, die Frage nach dem Auftreten von Hydroperoxyd bei der aeroben Dehydrierung messend zu verfolgen.

Es ist nun bei den dehydrierenden Enzymen der Milch, sowohl bei der Xanthindehydrase wie auch bei der Aldehydrase, geglückt, das als intermediäres Zwischenprodukt zu erwartende Hydroperoxyd quantitativ zu fassen. Die Voraussetzung dazu bildete die Befestigung eines Abfangmittels, das das Hydroperoxyd chemisch band, so weiteren Umsetzungen entzog und gleichzeitig das Enzym vor seiner Wirkung schützte. Denn auch den Enzymen der Milch bringt der Sauerstoff Zerstörung, und zwar von seiner ersten Hydrierungsstufe, dem Hydroperoxyd aus.

Als vorzüglich geeignetes Reagens hat sich das Cer-3-hydroxyd erwiesen, das Hydroperoxyd mit großer Geschwindigkeit zu dem gelbbraunen Cerperoxyd $\text{Ce}(\text{OH})_3\text{O} \cdot \text{OH}$ bindet. In Gegenwart dieses Abfangmittels verbrauchten Xanthin wie auch die Aldehyde genau 1 Mol. Sauerstoff, das zu nahezu 100% als Hydroperoxyd bestimmt wurde. Damit ist die erste Stufe der aeroben Dehydrierung mit aller Schärfe quantitativ festgelegt.

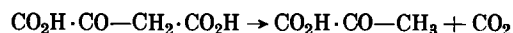
Die enzymatischen Reaktionen der Milch haben auch für die Wirkung der Katalase einen wichtigen Beitrag erbracht. Aus der Tatsache, daß überall, wo die Zelle Sauerstoff umsetzt, auch Katalase vorhanden ist, ließ sich mit einigem Recht der Schluß ziehen, daß ihre spezifische Funktion, die katalytische Zersetzung von Hydroperoxyd, damit aus biologischen Gründen im Zusammenhang stehe.

Es wurde bereits der Sauerstoffempfindlichkeit der Milchdehydrase Erwähnung getan, die sich darin äußert, daß Enzymlösungen, die man unter Luft gegen Xanthin oder Aldehyde einsetzt, nach einiger Zeit ihre Wirksamkeit verlieren. Fügt man jedoch der Reaktionslösung von Anfang an eine geringe Menge Katalase hinzu, so schreitet die Reaktion, wie zuerst von Dixon mit Xanthin als Substrat beobachtet worden ist, ohne Störung in linearem Gang weiter. Genau ebenso verhält sich die Reaktion der Aldehyde. Damit ist die Rolle der Katalase als Schutzferment experimentell erwiesen.

Die beiden dehydrierenden Enzyme der Milch sind auch in der Leber und in anderen Organen gefunden

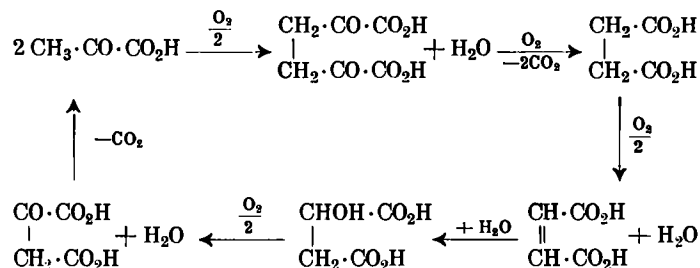
worden. Dadurch wird der Einwand entkräftet, daß ihnen keine biologische Bedeutung zukomme. Für die Ernährung des Kalbes spielen sie allerdings keine Rolle. Die Milch dient offenbar als Überlauf für die den Bedarf des Stoffwechsels überschreitende Produktion, etwa in gleicher Weise, wie die Sexualhormone mit dem Harn ausgeschieden werden.

Ein drittes, in seinem chemischen Umsatz scharf umschriebenes Enzymsystem hat im Jahr 1915 Th u n b e r g im Muskelgewebe angetroffen. Es ist seit dieser Zeit von verschiedenen Seiten sehr ausführlich untersucht worden. Seine Leistung besteht vornehmlich darin, daß in seiner Gegenwart Bernsteinsäure zu Fumarsäure dehydriert wird, und zwar in gleicher Weise mit Sauerstoff wie mit Methylenblau. Diese Reaktion ist deshalb von besonderem Interesse, weil sie biologisch weiter verfolgt werden kann bis zur Stufe der Brenztraubensäure und wahrscheinlich, wie wir sehen werden, darüber hinaus. Die Wirkung der ausgewaschenen Muskulatur beschränkt sich auf den erwähnten Vorgang, dem sich, durch ein besonderes Ferment beschleunigt, die Hydratation der Fumarsäure zu Äpfelsäure anschließt. Verwendet man aber den gesamten Muskelbrei, so läßt sich nach A. H a h n die Dehydrierungsreaktion von der Äpfelsäure aus weiterführen über Oxalessigsäure bis zur Brenztraubensäure. Bei der Reaktion

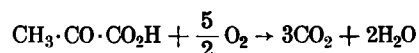


sehen wir Kohlendioxyd, das Endprodukt der „Verbrennung“ des Kohlenstoffs, als Endglied einer ausschließlichen Dehydrierungskette auftreten. Eine zweite Molekel CO_2 könnte die enzymatische Decarboxylierung der Brenztraubensäure liefern. Aber von der Stufe der Essigsäure aus, die aus gleichzeitig entstehendem Acetaldehyd hervorgehen kann, verliert man die experimentelle Sicherung, obwohl die Fähigkeit, Acetat in Succinat überzuführen, neuerdings an Schimmelpilzen nachgewiesen worden ist (B u t k e w i t s c h).

Bei dieser Sachlage ist es von größtem Interesse, daß in jüngster Zeit T o e n n i e s s e n in der überlebenden Leber vom Hund den Übergang von Brenztraubensäure in Bernsteinsäure festgestellt hat. Wenn sich diese Angabe bestätigt, wenn auch α, α' -Diketo-adipinsäure, das dimere Dehydrierungsprodukt der Brenztraubensäure, im Gewebe zu Bernsteinsäure umgeformt wird, dann ist der Ring des dehydratischen Abbaus dieser Säure zu Kohlendioxyd und Wasser experimentell geschlossen.



Die Summe dieser Reaktionen, von denen nur für die erste der Beweis der Ersetzbarkeit von Sauerstoff durch einen anderen Wasserstoffakzeptor, wie Methylenblau, noch aussteht, stellt sich in folgender elementarer Gleichung dar:

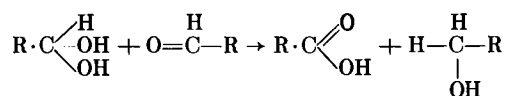


Die Brenztraubensäure befindet sich als Produkt der Dehydrierung von Milchsäure in der direkten Linie des biologischen Abbaus.

Die Schwierigkeiten, die dem Nachweis von Hydroperoxyd bei der aeroben Dehydrierung von Bernsteinsäure entgegenstehen, sind deshalb besonders große, weil das Muskelgewebe mit außerordentlicher katalytischer Kraft ausgerüstet ist. Hat man durch Blausäure die Dehydrase vollkommen zum Erliegen gebracht, so findet man die Katalase immer noch imstande, zugefügtes Hydroperoxyd zu zerstören.

Wenn man das Prinzip der enzymatischen Wasserstoffverschiebung neben dem der Hydrolyse und der Kondensation im Zellstoffwechsel als beherrschend anerkennt, so lassen sich, worauf in letzter Zeit namentlich Knoop aufmerksam gemacht hat, die Energieänderungen, die das Leben der Zelle ausmachen, zwanglos verstehen. Ohne auf diese experimentell noch nicht geprüften Verhältnisse näher einzugehen, sei auf das Beispiel der Umwandlung von Kohlehydraten in Fette hingewiesen. Nur von der nach Cannizzaro benannten Reaktion der korrelativen Oxydation der Aldehyde soll noch in unserem Zusammenhang die Rede sein. Man hat schon vor mehr als 20 Jahren beobachtet, daß im Lebergewebe ein Enzym enthalten ist, unter dessen Wirkung zwei Molekeln Aldehyd sich in Alkohol und Säure aufteilen. Der Fall liegt nun ganz ähnlich wie beim Scharinger'schen Enzym der Milch. Das erwähnte Enzym der Leber beschleunigt nicht allein die Cannizzarosche Reaktion, es beschleunigt gleichzeitig auch die „Oxydation“ des Aldehyds durch molekularen Sauerstoff und seine Dehydrierung durch Methylenblau. Zufällig hat man die erste Wirkung zuerst beobachtet.

Man versteht nun auch, daß die Aldehydrase der Milch, die anfangs als reduzierendes Ferment beschrieben, später gleichzeitig als Oxydase erkannt wurde, ebenfalls der Cannizzaroschen Dismutation der Aldehyde fähig ist. Es hat sich gerade an diesem Beispiel beweisen lassen, daß es ein und dasselbe Ferment ist, von dem die drei scheinbar ganz verschiedenartigen Wirkungen ausgehen. Hat man die Geschwindigkeit einer der drei Reaktionen unter bestimmten Bedingungen gemessen und schädigt man nun das Ferment in irreversibler Weise, etwa indem man es zur aeroben Dehydrierung von Aldehyd heranzieht, so findet man, daß die drei Funktionen in proportionalem Maße geschädigt wurden. Die enzymatische Dismutation der Aldehyde ist demgemäß aufzufassen als Dehydrierung von Aldehydhydrat durch Aldehyd als Wasserstoffakzeptor.



Wenn Sauerstoff, Methylenblau und Aldehyd gleichzeitig zugegen sind, so hängt die Beteiligung dieser drei Akzeptoren an der Reaktion von ihrer Affinität zur wirksamen Oberfläche ab, die für Methylenblau am größten ist. Aber da es sich dabei um Adsorptionsgleichgewichte handelt, so werden die drei hier vornehmlich besprochenen Reaktionen nebeneinander herlaufen, und es nimmt nicht wunder, daß unter den Bedingungen der aeroben Dehydrierung auch die Cannizzarosche Reaktion in untergeordnetem Maße zum Zuge kommen kann.

Die Lehre vom Wesen der biologischen Oxydation hat sich aus der Hypothese von der Beteiligung eines Schwermetalls, insbesondere des Eisens, entwickelt. Sie hat sich für eine Anzahl von Reaktionen und Erscheinungen des Gebietes, namentlich durch die Arbeiten von Warburg, zu einer gewissen Wahrscheinlichkeit aus-

gestaltet. Vor allem ist es der Charakter der durch chemische Mittel bedingten Hemmung, der eine Parallelität aufweist zwischen dem Wirken der Oxydationsfermente und der katalytischen Rolle, die das Eisen bei nicht biologischen Oxydationsvorgängen spielt. Mit der Anerkennung des Eisens als Bestandteil oxydierender Enzyme ist seine Funktion als Sauerstoffaktivator jedoch keineswegs verbunden. Über das Problem der katalytischen Eisenwirkung sind vielmehr Feststellungen gemacht worden, die ihm den ausgesprochenen Charakter eines dehydrierenden Katalysators zuerteilen. Zum ersten ist es nur das Eisen der zweiwertigen Stufe, von dem die „sauerstoffaktivierende“ Wirkung ausgeht. In dieser Form vermag das Eisen nicht nur mit Sauerstoff, sondern auch bei Gegenwart von Methylenblau oder Chinon die Oxydation geeigneter Substanzen zu beschleunigen. Seine Beteiligung gleicht also durchaus der eines dehydrierenden Enzyms. Die geeignetste Vorstellung, zu der diese Verhältnisse führen, ist die, das zweiwertige Metall trete mit dem Substrat der Oxydation zu einem labilen Komplex zusammen, in dem die von der Dehydrierung zu erfassenden Wasserstoffatome reaktionsfähig werden. An Stelle der Aktivierung von Sauerstoff tritt also auch hier die von Wasserstoff.

Die Versuche, auch in dieser Untersuchungsreihe Hydroperoxyd als Zwischenprodukt der Sauerstoffhydrierung nachzuweisen, sind beim Eisen ergebnislos geblieben. Aber die Ursache der Mißerfolge wurde erkannt, als man die Reaktionsgeschwindigkeit im gleichen System mit Sauerstoff und mit Hydroperoxyd vergleichend maß. Sie ist unter den ungünstigsten pH-Bedingungen für Hydroperoxyd rund 1000mal größer als für Sauerstoff. Damit ist die grundsätzliche Unmöglichkeit des Hydroperoxydnachweises bei Eisenkatalysen dargetan, während in den analogen Reaktionen des Kupfers und des Kobalts, wo das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten ungleich günstiger liegt, Hydroperoxyd als Zwischenprodukt der katalytischen Dehydrierung gefaßt werden kann.

Es steht außer Zweifel, daß die im letzten Jahrzehnt von verschiedenen Forschern bearbeiteten Dehydrierungsvorgänge in ihren Ergebnissen noch keineswegs erlauben, den Komplex der biologischen Oxydation im klaren Bild ihres Ablaufs zu verstehen. Wir glauben aber, daß es unvermeidlich ist, vor allen anderen, chemisch übersichtliche Teilvorgänge, die sich in allen Einzelheiten exakt verfolgen lassen, zu studieren und von ihnen aus Schritt für Schritt weiterzugehen. So wertvoll es für den Fortschritt unseres Wissens auch ist, über die Natur des Gesamtkomplexes des Atmungsfermentes, sei es nun die dem Hämin nahestehende Eisenverbindung Warburgs oder das Cytochrom Keilins, Näheres zu erfahren, darüber, in welcher Art das zum Abbau bestimmte Material in der Zelle umgesetzt wird, geben diese Untersuchungen vorläufig keine Auskunft, weil ihr Objekt viel zu kompliziert ist.

Es ist hier nochmals hervorzuheben, daß wir im Sinne der hier vorgetragenen Auffassung den radikalen Abbau der Nahrungsstoffe der Organismen als das Produkt vielfältiger Reaktionsstufen betrachten. Von der Grundlage dieses Standpunktes aus kann der Einwand, oxydative Einzelvorgänge, wie sie hier in einer kleinen Auswahl geschildert worden sind, seien von der lebenden Zelle losgelöst, ihr fremd geworden, sozusagen denaturiert, nicht als stichhaltig anerkannt werden. Wenn aus der Leber eines getöteten Tieres ein Fermentsystem isoliert wird, das die Dehydrierung von Aldehyden und von Purinbasen beschleunigt, so ist es widersinnig oder zum mindesten durch nichts begründet, darin eine nach

dem Tod des Lebewesens entstandene Äußerung zu sehen, die dem lebenden Organ nicht eigentümlich wäre. So besteht auch meines Erachtens nicht der geringste Anlaß, dem lebenden Muskelgewebe die Fähigkeit abzusprechen, Bernsteinsäure aerob zu dehydrieren, um so mehr, als diese Säure aus Muskelfleisch isoliert worden ist. Gerade in dieser Reaktionsreihe ist die Stabi-

lität der dem Gesamtprozeß dienenden Einzelsysteme in besonders deutlicher Weise abgestuft.

Die gesamte Fermentforschung steht auf der Voraussetzung, daß die in vitro studierten Erscheinungen im Grunde das Abbild in der Zelle sich abspielender Vorgänge sind. Warum sollte diese Voraussetzung für die Enzyme der biologischen Oxydation nicht gelten? [A. 77.]

Neuere enzymchemische Resultate.

Von H. v. EULER, Stockholm.

Vorgetragen in der Fachgruppe für organische Chemie auf der Hauptversammlung des V. d. Ch. in Wien am 27. Mai 1931.

(Eingeg. 13. Juni 1931.)

Buchners Annahme eines einzigen zentralen Gärungsenzymes mußte bald durch die Auffassung ersetzt werden, daß ein Komplex von Teilenzymen den Gärungsabbau der Hexosen vermittelt. Vor 25 Jahren entdeckte Harden, daß dieser Komplex nicht in Wirklichkeit treten kann, wenn er nicht durch einen besonderen Stoff, der den Namen Cozymase erhalten hat, aktiviert wird. Damit war der erste organische Aktivator bzw. nichtenzymatische Biokatalysator aufgefunden, welcher in den Zuckerabbau eingreift. In den letzten Jahren hat sich nun unsere Kenntnis über die nichtenzymatischen Anteile des Enzymsystems der Atmung und Gärung durch Beiträge von verschiedenen Seiten wesentlich erweitert, und einige neuere, an diesen Stoffen gewonnene Ergebnisse möchte ich Ihnen heute mitteilen.

Der Mechanismus der Atmung und Gärung, das alte Problem, um dessen Lösung sich seit mehr als 100 Jahren viele führende Chemiker bemüht haben, ist noch recht weit entfernt von der endgültigen Klarstellung. Was in den letzten Dezennien ausgearbeitet wurde, sind Bausteine, aber es ist noch nicht gelungen, diese zu einem einheitlichen Ganzen zusammenzufügen. Wenn ich mit diesen Bausteinen Ihre Aufmerksamkeit in Anspruch nehme, so kann ich dies nur wagen, weil die ganze Lehre vom Zuckerabbau, in welche unsere Spezialforschungen eingefügt werden, eine so wichtige Rolle im chemischen Geschehen aller Zellen spielt.

Der zur Verbrennung führende Angriff des Zuckers im Muskel und in anderen tierischen und auch pflanzlichen Geweben beginnt bekanntlich mit einer Serie anaerober Vorgänge, welche der bei der alkoholischen Gärung eintretenden ganz analog ist. Erst nachdem die Zymohexosen in zwei Teilmoleküle zu je drei C-Atomen gespalten sind, setzt der oxydative Teil des Zuckerabbaues ein, der zum Endprodukt CO₂ führt.

Die Gärwirkung des Zymase-Systems (Pan-Zymase) in der Hefe.

Manche Tatsachen sprechen dafür, daß in der lebenden Hefe die Zymase ganz oder wenigstens überwiegend an das Plasma gebunden ist, wodurch die Eigenschaften der Zymase in mancher Hinsicht modifiziert werden. Diese Modifikationen halten manche Gärungsschemiker für so wesentlich, daß sie die enzymatische Gärung in Gegensatz zu derjenigen in der lebenden Zelle stellen, und diese Frage möchte ich mit ein paar Worten berühren, ehe ich auf die nichtenzymatischen Biokatalysatoren der Gärung eingehe.

Man hat früher nur einen kleinen Teil der Gärkraft der Hefe von der lebenden Zelle abtrennen können, und andererseits haben Preßsäfte, Trockenhefen und Dauerpräparate immer noch eine gewisse Zahl lebender Zellen enthalten.

Vor einigen Jahren haben der Bakteriologe Barthel und ich¹⁾ eine Versuchsanordnung beschrieben, nach welcher bei gründlicher Entwässerung mit Alkohol, Äther und Chloroform mehr als 70% der ursprünglichen Gärkraft beibehalten wird, während 99,98% der gesamten Gärleistung auf die nichtfortpflanzungsfähigen Zellen zurückgeführt werden konnte. Dieses Resultat ist nun in diesem Jahr noch verbessert worden²⁾. Durch Anwendung einer Apparatur, welche jede Infektion ausschloß, wurde durch die Entwässerung und Entfettung die Fortpflanzungsfähigkeit der Hefe total aufgehoben; sie lieferte, auf besten Nährboden übergeführt, keine einzige Kolonie und war also vollkommen tot. Dabei war die Gärkraft noch besser als früher erhalten und unterschied sich nicht wesentlich von derjenigen der lebenden Hefe. Unabhängig davon, ob die Zymase der frischen Hefezellen an das Plasma oder sonstwie gebunden ist, so steht nunmehr jedenfalls fest, daß man die Hefe durch geeignete Entwässerung vollkommen fortpflanzungsunfähig machen und dabei wenigstens 80% der normalen Gärwirkung bewahren kann.

Die Aktivatoren der Zymase.

Ich wende mich jetzt den Aktivatoren zu. Die bereits erwähnte Entdeckung der Cozymase machte Harden am Hefepreßsaft, den er in einen enzymatischen, thermolabilen Teil, die Zymase, und einen hitzebeständigen Teil, das Coenzym der alkoholischen Gärung oder die Cozymase, zerlegen konnte. Getrennt sind beide Stoffe bekanntlich unwirksam, durch ihre Vereinigung wird die ursprüngliche Gärkraft des Preßsaffes wiederhergestellt.

Die Cozymase ist in fast allen Zellen und Geweben, in welchen Zucker abgebaut wird, vorhanden, denn sie ist ja zu dieser Spaltung unentbehrlich, aber sie findet sich stets nur in sehr kleinen Mengen. Ihre Anreicherung und Isolierung, mit der wir uns in Stockholm seit etwa acht Jahren beschäftigen, ist um so schwieriger, als dieser Aktivator selbst, wie auch viele seiner Salze einen ausnehmend hohen Grad von Wasserlöslichkeit besitzt.

In welcher Weise die Anreicherung der Lösungen bei der Reinigungsarbeit verfolgt wird, ist in den Arbeiten von Myrbäck und mir^{2a)} mehrmals erwähnt worden. Die Wirksamkeit per Trockengewicht, A Co, mißt man an ausgewaschenen, cozymasefreier Trockenunterhefe. Der Reinheitsgrad eines Cozymasepräparates wird durch den Ausdruck definiert:

$$A_{Co} = \frac{\text{Anzahl Co-Einheiten}}{\text{g Trockengewicht}}$$

Hinsichtlich der Reinigung der Cozymaselösungen ist in Ergänzung früherer Angaben folgendes zu sagen:

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. 159, 85 [1926]; 183, 237 [1929].

²⁾ Barthel, Euler u. Nilsson, ebenda 198, 251 [1931].

^{2a)} Ztschr. physiol. Chem. 190, 93 [1930]; 198, 219, 236 [1931].