

331. A. Bach: Peroxydosen als specifisch wirkende Enzyme.  
(Eingegangen am 6. Juni 1906.)

Bertrand<sup>1)</sup> hat in gewissen Pflanzen ein von ihm Tyrosinase genanntes, oxydirendes Enzym aufgefunden, welches von der gewöhnlichen Oxydase (Laccase) sich dadurch unterscheidet, dass es weder Phenole, noch aromatische Amine oxydirt, dagegen Tyrosin in ein schwarzes Oxydationsproduct verwandelt. Von der gewöhnlichen Oxydase wird andererseits Tyrosin nicht angegriffen. Es liegt also hier ein Fall von specifischen Fermentwirkungen vor.

Mit Rücksicht auf die Thatsache, dass sämmtliche Oxydations-reactionen der gewöhnlichen Oxydase auch durch die gewöhnliche Peroxydase im Verein mit Hydroperoxyd bewirkt werden können, schien es mir von Interesse, das Verhalten des Tyrosins gegen das System Peroxydase—Hydroperoxyd zu ermitteln. Die von mir mit Peroxydase aus Meerrettigwurzeln und Hydroperoxyd angestellten Versuche ergaben, dass Tyrosin durch das genannte Oxydationsmittel unter keinen Umständen zu dem charakteristischen schwarzen Product oxydirt wird. Da die Oxydosen nichts anderes als Gemenge von Peroxydosen und Oxygenasen<sup>2)</sup>, d. i. von peroxydaktivirenden und peroxydbildenden Enzymen, sind, so liess sich das Ausbleiben der Oxydation des Tyrosins in zweifacher Weise erklären: entweder ist die in der Tyrosinase enthaltene Peroxydase von der gewöhnlichen Peroxydase verschieden, oder das von der Oxygenase erzeugte Peroxyd übt seine Wirkung auf Tyrosin in einer anderen Richtung, als Hydroperoxyd, aus. Mit anderen Worten, die specifische Wirkung der Tyrosinase ist entweder auf die specifische Natur ihrer Peroxydase oder auf die specifische Natur ihrer Oxygenase zurückzuführen.

Um der Lösung dieses Problems näher zu treten, versuchte ich, die in der Tyrosinase enthaltene Peroxydase darzustellen. Der peroxydbildende Anteil der Oxydosen — die Oxygenase — ist bekanntlich in den meisten Fällen ziemlich unbeständig, während die Peroxydase fast unbegrenzt haltbar ist. Es war daher Aussicht vorhanden, durch Verarbeitung von geeigneten tyrosinasehaltigen Materialien die betreffende Peroxydase direct oxygenasefrei zu erhalten. Wie aus Folgendem ersichtlich wird, ist mir dies theilweise gelungen.

Fein zerkleinerte, junge Kartoffelknollen wurden abgepresst, der erhaltene Saft (300 ccm) wurde mit wenig starkem Alkohol (30 ccm) versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Der Zusatz von Alkohol bewirkt die Coagulation von schleimigen Substanzen, welche das Filtriren sonst ausserordentlich er-

<sup>1)</sup> Bull. Soc. chim. Paris 15, 793, 1218 [1896].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 36, 606 [1903].

schweren. Die klar filtrirte, braune Flüssigkeit wurde mit dem vierfachen Volumen absolutem Alkohol versetzt, der entstandene Niederschlag wurde an der Wasserstrahlpumpe filtrirt, mit absolutem Alkohol nachgewaschen und im Vacuum über Chlorcalcium getrocknet. In dieser Weise wurde eine schwärzlich-graue Masse erhalten, welche in Wasser nur zu einem geringen Theil löslich war. Die Lösung war vollkommen klar und farblos. Die Prüfung der Lösung auf Oxydationsfermente ergab, dass dieselbe neben sehr viel gewöhnlicher Peroxydase und wenig gewöhnlicher Oxygenase auch die Elemente der Bertrand'schen Tyrosinase, aber nicht mehr im ursprünglichen Verhältniss, enthielt. Denn, während der frische Saft der Knollen Tyrosin verhältnismässig rasch oxydirte, schwärzte sich die erhaltene Lösung auf Zusatz von Tyrosin erst nach 36—48 Stunden.

In der Voraussetzung, dass die Abschwächung der Tyrosinasewirkung einer theilweisen Zerstörung ihrer Oxygenase zuzuschreiben war, versuchte ich, letztere durch Hydroperoxyd zu ersetzen. Zu meiner Befriedigung ergaben die Versuche glatt positive Resultate. Fermentlösungen, welche Tyrosin erst nach längerer Einwirkung (36—48 Stunden) oxydirten, färbten sich auf Zusatz von Hydroperoxyd schon nach kurzer Zeit (1 Stunde) schwarzbraun<sup>1)</sup>.

Ganz ähnliche Ergebnisse wurden mit einem aus *Lactarius velutinus* gewonnenen Gemenge von gewöhnlicher Oxydase und Tyrosinase erhalten. Auch hier wurde durch Hydroperoxyd die Oxydation des Tyrosins sehr stark beschleunigt. Während also Hydroperoxyd im Verein mit gewöhnlicher Peroxydase auf Tyrosin ohne jede Einwirkung ist, greift es diese Substanz kräftig an, wenn es durch die in der Tyrosinase enthaltene Peroxydase aktivirt wird. Es ergiebt sich daraus, dass der specifischen Wirkung der Tyrosinase die specifische Natur ihrer Peroxydase zu Grunde liegt. Das Aehnliche gilt auch für die gewöhnliche Oxydase und die gewöhnliche Peroxydase. So weit sich die bisherige Erfahrung erstreckt, ist daher für die specifische Wirkung der Oxydationsfermente die specifische Natur der betreffenden Peroxydases maassgebend.

#### Theoretisches.

Die Ansicht, welche den Oxydationsfermenten die Rolle allgemeiner Vermittler der Athmungsprocesse zu verleihen sucht, scheiterte bisher an dem Umstand, dass die am besten bekannten und am weitesten verbreiteten Vertreter dieser Enzymklasse Oxydationen anlösen,

<sup>1)</sup> Die in der Tyrosinase enthaltene Peroxydase ist gegen chemische Agentien und Wärme bei weitem empfindlicher, als die gewöhnliche Peroxydase. Zur Ausführung der Oxydationsversuche mit Tyrosin sind dement sprechend sehr verdünnte Hydroperoxydlösungen anzuwenden, da sonst die Peroxydase rasch zu Grun'e geht.

welche zu den eigentlichen Athmungsvorgängen in ganz entfernter Beziehung stehen. Da der Zweck der Athmung die vollständige Verbrennung von Reserve- und Nähr-Stoffen behufs Umwandlung der darin enthaltenen potentiellen Energie in Arbeit und Wärme ist, so dürften die Oxydationsfermente, falls ihnen diese Rolle zukommt, in erster Linie derartige Stoffe angreifen können. Dem ist aber bekanntlich nicht so. Kohlehydrate, Fette u. s. w. werden durch die bekannten Oxydationsfermente nicht oxydiert, wohl aber gewisse, verhältnismässig leicht oxydable Körper, welche beweglichen Wasserstoff enthalten. Ist damit gesagt, dass mit den eigentlichen Athmungsvorgängen die Oxydationsenzyme nichts zu thun haben? Im Hinblick auf die feststehende Thatsache, dass die Oxydationsfermente, wie andere Enzyme, specifisch wirken, wäre, meiner Ansicht nach, eine derartige Schlussfolgerung voreilig.

Zieht man die chemischen Wirkungen der bekannten Oxydationsfermente näher in Betracht, so fällt es auf, dass letztere meistens gleichzeitige Oxydations- und Condensations-Vorgänge auslösen. So wird durch die gewöhnliche Oxydase, sowie durch die gewöhnliche Peroxydase in Gegenwart von Hydroperoxyd Pyrogallol zu Purpurogallin, Hydrochinon zu Chinchylon, Guajacol<sup>1)</sup> zu dem Körper  $[C_6H_3(O.CH_3).O.]$  unter theilweiser Oxydation verwandelt. Die Oxydation von aromatischen Aminen zu verschiedenen Farbstoffen, sowie die Oxydation des Tyrosins durch Tyrosinase, ist ebenfalls als eine gleichzeitige Oxydation und Condensation aufzufassen. Man wird kaum irre gehen, wenn man die bekannten Oxydationsfermente als Agentien betrachtet, welche die Aufgabe haben, oxydative Synthesen in der lebenden Zelle zu befördern. Diese oxydativen Synthesen finden in der Bildung von mannigfaltigen Farb- und Riech-Stoffen, Harzen, sowie von anderen, näher noch nicht erforschten Körpern ihren Ausdruck<sup>2)</sup>.

Neben diesen specifisch wirkenden Oxydationsfermenten kommen im Thier- und Pflanzen-Körper eigentliche Athmungsenzyme vor, welche die Verbrennung der Reservestoffe bewirken. Obgleich diese Enzyme bisher noch nicht isolirt worden sind, erscheint ihre Existenz auf Grund einer jüngst von Palladin<sup>3)</sup> veröffentlichten, sehr werthvollen Experimentalarbeit als unzweifelhaft. Hier ist nicht der Ort,

<sup>1)</sup> Bertrand, Ann. Inst. Pasteur 18, 118 [1904].

<sup>2)</sup> Dass die Tyrosinase an der Bildung von schwarzen Pigmenten im Thierkörper betheiligt ist, wurde bereits von O. v. Fürth und H. Schneider (Beitr. z. Chem. und Pathol. 1, 229 [1901]) und von Gessard (Ann. Inst. Pasteur 15, 543 [1901]) hervorgehoben.

<sup>3)</sup> W. Palladin, Die Arbeit der Athmungsenzyme der Pflanzen unter verschiedenen Verhältnissen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 407 [1906].

auf diese umfangreiche Arbeit einzugehen. Ich gestatte mir aber, derselben ein Beispiel, welches die Sachlage gut illustrirt, zu entnehmen.

Etiolirte Blätter von Vicia Faba wurden nach einander mit einem Luftstrom, bis keine Kohlensäure sich mehr ausschied, und dann mit Hydroperoxyd behandelt, und die entstandene Kohlensäure in beiden Fällen getrennt bestimmt. Erhalten (auf 100 g Blätter): im Luftstrom 800 mg, mit Hydroperoxyd 1694 mg Kohlensäure.

Die Thatsache, dass durch die Einwirkung von Hydroperoxyd eine so grosse Kohlensäuremenge entstanden war, ist ein klarer Beweis dafür, dass auch hier eine specifische Peroxydase thätig war, welche Reservestoffe unter Mitwirkung einer Oxygenase und, nach Verbrauch derselben, des zugesetzten Hydroperoxyds oxydirte. Dass es sich thatsächlich hier um eine enzymatische Oxydation von Reservestoffen handelt, geht weiter daraus hervor, dass auf Zuckerlösung cultivirte, etiolirte Blätter von Vicia Faba unter gleichen Bedingungen folgende Kohlensäuremengen ergaben: im Luftstrom 2743 mg, mit Hydroperoxyd 4932 mg Kohlensäure (auf 100 g Blätter). Je grösser die Menge der in den Blättern aufgespeicherten Reservematerialien war, desto mehr Kohlensäure wurde beim Behandeln der Objecte mit Luft und mit Hydroperoxyd ausgeschieden.

Ueberblickt man also sämmtliche, auf das Gebiet der biochemischen Oxydationsvorgänge bezüglichen Thatsachen, so gelangt man zum Schluss, dass dieselben im Sinne der Athmungstheorie, welche, einerseits auf der modernen Lehre von der langsamem Oxydation, andererseits auf der modernen Lehre von den Enzymwirkungen beruht, sich am besten und einfachsten erklären lassen.

Genf, Privatlaboratorium.

---

**332. G. Schroeter: Zur Frage nach der Bildung der Methronsäure.**

[Mittheilung aus dem chemischen Institut der Universität Bonn.]  
(Eingegangen am 30. Mai 1906.)

In dem letzten Heft dieser Berichte (S. 1859) macht Hypolyt Trepbilieff in einer Mittheilung »Zur Frage nach der Structur der Methronsäure« die Annahme, dass bei der Bildung der Methronsäure 2 Mol. Acetessigester auf 1 Mol. Bernsteinsäure einwirken. Ich möchte hierzu bemerken, dass ich diese Ansicht bereits in der 9. und 10. Auflage des von R. Anschütz und mir herausgegebenen »Lehrbuchs der