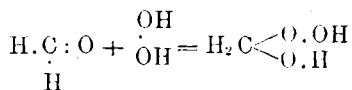


242. Gertrud Woker: Der Formaldehyd als Diastase-Modell. Ein Beitrag zur Theorie der Diastase-Wirkung.

(Eingegangen am 3. August 1916.)

Vor einiger Zeit habe ich über die Eigenschaften des Formaldehyds als Peroxydase- und Katalase-Modell berichtet¹⁾, als deren Ursache ich die Bildung eines Additionsproduktes des Formaldehyds und des Wasserstoffperoxyds von peroxydartiger Struktur betrachtete.

Dieses sekundäre Peroxyd würde sich also nach der Gleichung:



bilden. Ist kein Chromogen zugegen, so würde dieses Peroxyd nur mit dem überschüssigen Wasserstoffperoxyd unter Gasentwicklung (Katalase-Reaktion) reagieren. Ist dagegen eine zum Farbstoff oxydierbare Leukoverbindung oder ein Chromogen irgend welcher Art zugegen, so vermag das Peroxyd, Sauerstoff auf dieselben zu übertragen, d. h., es findet gleichzeitig mit der Katalase-Reaktion und daher mit dieser konkurrierend Farbstoffbildung statt.

Da der Formaldehyd imstande ist, sowohl die klassische Peroxydase-Reaktion: die Bläuung des Guajac-Terpentinöl-Gemisches, wie, im Gemisch mit Wasserstoffperoxyd, die Blaufärbung des alkoholischen Benzidins auf Fließpapier und der Lösungen der Benzidinsalze im Reagensglas, sowie der Mischung von Guajacol und *p*-Phenyldiamin zu geben, so habe ich auf Grund dieser Modelleigenschaften angenommen, daß auch bei den Oxydationsfermenten eine Aldehydgruppe für die Peroxydase-, Katalase- und auch Reduktase-Wirkungen verantwortlich zu machen seien²⁾, indem diese den Fermenten ja schon lange auf Grund anderer Überlegungen zugeschriebene Aldehydgruppe in gleicher Weise wie beim Formaldehyd mit Wasserstoffperoxyd oder einem andern Peroxyd unter Bildung eines zu starken Oxydationswirkungen und zugleich zur Reaktion mit Wasserstoffperoxyd befähigten Additionsproduktes zu reagieren vermöchte.

Zu den Fermenten, welche peroxydierende und katalysierende Eigenschaften zeigen, gehört nun außer den Oxydationsenzymen im engeren Sinne bekanntlich die Diastase, die sogar vermöge dieser

¹⁾ B. 47, 1024 [1914].

²⁾ Reduktase-Wirkungen können dann einsetzen, wenn der Aldehyd keine Gelegenheit hat, mit Sauerstoff oder einem Peroxyd ein Additionsprodukt von starken oxydativen Eigenschaften zu bilden.

Fähigkeit für den Wasserstoffperoxyd-Nachweis verwendet wird. Es wurde jedoch von Jacobson¹⁾, gestützt auf seine in jeder Hinsicht einwandfreien experimentellen Untersuchungen, die Auffassung vertreten, daß jene oxydierenden bzw. katalysierenden Wirkungen nicht dem Stärke spaltenden Enzym selber zukommen, und die Gründe, welche Jacobson ins Feld geführt hat, waren so einleuchtend, daß jeder Gedanke an eine Zusammengehörigkeit der Diastase mit oxydierenden Enzymen seither ohne weiteres beiseite geschoben wurde. Als daher Grüß²⁾ in jüngster Zeit mittels seiner capillar-analytischen Methode keine Trennung von Diastase und Peroxydase bewerkstelligen konnte, zog Grüß daraus nur den Schluß, daß beide Wirkungen zwar am selben Molekül, jedoch an verschiedenen Gruppen desselben haften. Der bedeutungsvolle Befund von Grüß hat jedoch zweifellos der alten Auffassung der Identität von Diastase und Peroxydase wiederum Boden gewonnen.

Danach kann es durchaus nicht mehr als absurd betrachtet werden, wenn man noch einen Schritt weiter geht und Peroxydase- und Diastase-Wirkung als gebunden an ein und dieselbe Gruppe des nämlichen Moleküls betrachtet. Eine solche Auffassung würde auch chemisch im Bereich der Möglichkeit liegen. Wurden Peroxydase- und Katalase-Reaktion durch die Fähigkeit einer Aldehydgruppe, Wasserstoffperoxyd zu einem sekundären Peroxyd im Sinne Englers zu addieren, vermittelt, so konnte daran gedacht werden, daß die fragliche Aldehydgruppe auch imstande sei, die Elemente des Wassers H und OH zu einem unbeständigen Aldehydhydrat $R \cdot CH \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \diagup \text{OH} \end{smallmatrix}$ zu addieren.

Vermöge ihrer beiden OH-Gruppen am selben Kohlenstoffatom würde jedoch eine solche Verbindung sofort wieder Wasser abspalten, und dieses Wasser könnte im Entstehungszustand (bzw. H und ·OH vor ihrer Vereinigung zu Wasser) zu energischeren hydrolytischen Wirkungen befähigt sein, als das gewöhnliche Lösungswasser. Die Aldehydgruppe würde so zur Wasser-Überträgerin gegenüber der Stärke. Eine solche Annahme steht durchaus in Übereinstimmung mit demjenigen, was wir über das Verhalten der Aldehyde wissen. Daß die Aldehydgruppe Wasser in dem angegebenen Sinne zu addieren vermag, zeigt das Chloral $CCl_3 \cdot C : O$, welches mit dem Wasser

H

zu einem in diesem Falle beständigen Hydrat, dem Chloralhydrat, $CCl_3 \cdot CH \begin{smallmatrix} \text{O} \cdot \text{H} \\ \diagup \text{OH} \end{smallmatrix}$ zusammentritt, und in zahlreichen andern Fällen ist die

¹⁾ Jacobson, H. 16, 340 [1892].

²⁾ Grüß, Biologie und Capillaranalyse der Enzyme (Berlin 1912), S. 46—53.

Bildung eines Aldehyds an die primäre Entstehung der entsprechenden Hydratform geknüpft.

Entsprach nun die angegebene Theorie über die Wirkungsweise diastatischer Enzyme der Wirklichkeit, so war zu erwarten, daß ein Modell für Peroxydase und Katalase, wie es der Formaldehyd darstellt, zugleich ein Modell für die Diastase in mehr oder weniger ausgeprägtem Grade sein würde.

Dies scheint nun in der Tat der Fall zu sein, wie ich auf Grund einer Reihe von Vorversuchen schließen möchte, die allerdings in Bezug auf ihre Eindeutigkeit Zweifel zulassen, die nur durch eine eingehende Untersuchung, die inzwischen von Hrn. Maggi in meinem Laboratorium in Angriff genommen worden ist, gehoben werden können.

Zunächst habe ich mir die Frage vorgelegt:

Verhält sich der Formaldehyd der Diastase analog, wenn die bekannten Methoden der Diastase-Bestimmung auf ihn angewendet werden?

Nach den praktisch gebräuchlichsten chemischen Methoden wird dabei entweder auf das Verschwinden der Blaufärbung der Stärke mittels Jodlösung innerhalb einer gewissen Zeit abgestellt, oder aber auf die Bestimmung des im Reaktionsgemisch entstehenden Zuckers.

Die erstere Methode wurde nach dem Verfahren ausgeführt, welches Wohlgemuth¹⁾ zur quantitativen Bestimmung der Diastase im Blut angegeben hat. Nur kamen statt der Serum-Verdünnungen Formaldehyd-Verdünnungen der käuflichen 38-proz. Formalinlösung von 1 bis 1:10 in Anwendung, also relativ konzentrierte Lösungen. Die Reaktion wurde entsprechend der Vorschrift im Wasser-Thermostaten von 38° vollzogen und nach $\frac{1}{2}$ Stunde durch Einstellung der Gläschen in kaltes Wasser unterbrochen. Hierauf erhielt ein jedes Gläschen einen Zusatz von einigen Tropfen $\frac{1}{50}$ -normaler Jodlösung.

Das Bild, das die Gläschen hierbei boten, war von demjenigen bei dem entsprechenden Versuch mit diastasehaltigem Serum nicht zu unterscheiden. Bei den schwächsten Formaldehydlösungen zeigte sich noch die unveränderte Blaufärbung der reinen Stärke (2 ccm 1-prom. Lösung), bei den stärkeren Konzentrationen war dieselbe einem Violettröt-Rubinrot gewichen, wie es für Erythroextrine charakteristisch ist, und bei den formaldehydreichsten Lösungen war nur noch die gelbliche (Jod-) Färbung vorhanden (Achroodextrin-Stufe).

Die erste Art der Methoden: Die Diastasebestimmung auf Grund des Verschwindens der für das Ausgangsmaterial — die Stärke —

¹⁾ Wohlgemuth, Grundriß der Fermentmethoden (Berlin 1913), S. 56.

charakteristischen Blaufärbung ergab demnach ein positives Resultat. Es muß jedoch der mögliche Einwand nach allen Richtungen hin geprüft werden, ob nicht das Verschwinden der Stärkereaktion mit einem andern Vorgang als einer Spaltung in Zucker, in Zusammenhang gebracht werden könnte, wobei die Bildung einer Verbindung zwischen Stärke und Formaldehyd die wahrscheinlichste Annahme wäre. Die den verschiedenen Abbaustufen (Dextrine) entsprechenden Farben¹⁾, welche das Reaktionsgemisch mit Jod zu geben vermag, sprechen allerdings gegen eine solche Kondensationsreaktion. Ferner zeigte sich, wie Hr. Maggi inzwischen festgestellt hat, auch bei Verwendung von Glykogen an Stelle von Stärke die nämliche Abnahme der Jodreaktion (rotbraun) unter dem Einfluß des Formaldehyds.

Bei der zweiten Bestimmungsart kommen zunächst die Reduktionsmethoden in Betracht. Das Reduktionsvermögen des Stärke-Formaldehyd-Gemisches muß im Falle einer Stärke-Spaltung durch den hinzukommenden reduzierenden Zucker eine Zunahme erfahren. Dies scheint auch der Fall zu sein, doch müssen die gebräuchlichen Reduktionsmethoden für die Bestimmung des Formaldehyds und seiner Mischungen mit Maltose, ev. auch mit Glucose und Stärke auf ihre Zuverlässigkeit hin geprüft werden, da zweifellos Komplikationen vorhanden sind. Aus diesem Grunde habe ich mit Hrn. Maggi versucht, das Auftreten von Zucker nach einem nicht auf dem Reduktionsprinzip beruhenden Verfahren festzustellen. Besonders geeignet ist zu diesem Zweck die Moore-Hellersche Reaktion, bei der sich der Zucker durch eine Gelb- bis Braunfärbung beim Erhitzen der mit Alkali versetzten Lösungen verrät, und es ist diese Methode auch von Kübel für die Ermittlung der Diastase selbst in Vorschlag gebracht worden. Eine Gelb- bis Braunfärbung zeigt sich nun in der Tat beim Erhitzen der mit verschiedenen Formaldehyd-Verdünnungen und Alkali versetzten Stärkelösungen im Wasserbad, während die formaldehydfreien Stärkelösungen und Formaldehyd allein unter den gleichen Bedingungen keine oder nur eine geringe Farbenveränderung aufweisen. Da zudem der sehr charakteristische Geruch nach verbranntem Zucker bei Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure nur in formaldehydhaltigen Stärkelösungen eintritt, so kann kein Zweifel darüber bestehen, daß sich Zucker oder ein sehr einfach zusammengesetztes Dextrin in diesen Lösungen gebildet hat. Ein Zusammenhang zwischen der Formaldehyd-Konzentration und der Intensität der Bräunung besteht erst von einem gewissen Verdünnungsgrade an. Zu starke Konzentrationen wirken

¹⁾ Blau, violett, rot, gelb (Jodfarbe).

im Gegenteil, wie Hr. Maggi gefunden hat¹⁾, hemmend auf den Reaktionsverlauf ein.

Das gleichzeitige Auftreten gerade der beiden für die Stärkespaltung charakteristischen Reaktionen: das Verschwinden der Jodstärke-Reaktion und zwar unter Auftreten des den Stärkeabbau zu verschiedenen Dextrinen bzw. Zucker kennzeichnenden Farbwechsels und die Entstehung von Zucker bzw. einfachen Dextrinen bildet eine wesentliche Stütze für die Annahme, daß der Formaldehyd als Diastase-Modell betrachtet werden kann.

Allerdings sind die Diastasemodell-Eigenschaften beim Formaldehyd bei weitem nicht so ausgeprägt, wie seine Eigentümlichkeit, als Peroxydase-Modell zu fungieren, da er nur in relativ hohen Konzentrationen gegenüber Stärke, Glykogen und höheren Dextrinen wirksam ist, und da er auch in solchen Konzentrationen, infolge der erwähnten Hemmungswirkung nur unvollständig abbaut. Doch würde dies eher einen graduellen als einen prinzipiellen Unterschied bedeuten. Es ist sehr wohl denkbar, daß das Vermögen der verschiedenen Aldehyde zur Wasser-Anlagerung und -Abspaltung — als der Voraussetzung der Diastasewirkung — und zur Wasserstoffperoxyd-Anlagerung — als der Voraussetzung der Peroxydasewirkung — ein ungleich und von einander unabhängig ausgeprägtes sein kann.

Ein weiterer naheliegender Einwand, es könnte sich um eine Wirkung der Wasserstoffionen der dem Formaldehyd meist (infolge Oxydation) beigemengten Ameisensäure handeln, fällt dahin, da sämtliche mit Ameisensäure an Stelle des Formaldehyds angestellten Kontrollen negativ ausfielen, und da sogar die Wirkung des Formaldehyds nach Maßgabe seines Ameisensäure-Gehaltes abnahm.

Schwerwiegender ist ein anderer Einwand, der sich aus meinen viscosimetrischen Untersuchungen über die Einwirkung von Formaldehyd auf Stärke ergibt. Während bei Einwirkung von Diastase auf Stärke eine Abnahme der Viscosität zu konstatieren ist, zeigte das Formaldehyd-Stärke-Gemisch eine beständige Zunahme, die mit einer Volumenverminderung einhergeht. Möglicherweise überwiegt die durch die Volumenverminderung bewirkte Viscositätszunahme die durch die Spaltung veranlaßte Abnahme, oder aber es liegen in der feinen Capillare des

¹⁾ Hr. Maggi setzte zu dialysierten »Spaltgemischen« und dadurch von Formaldehyd befreiten »Dextrinen« wechselnde Mengen Formaldehyd zu und stellte hierbei fest, daß die die höchste Konzentration an Formaldehyd enthaltenden, mit Alkali versetzten Gemische beim Erhitzen keine Bräunung gaben. Erst von der Konzentration 1,4 an setzte die Bräunung mit maximaler Intensität ein, um bei weiteren Verdünnungen des Formaldehyds sukzessive wieder abzunehmen.

Viscosimeters von Hess die Bedingungen für eine Retrogradation der Stärke, d. h. für eine der Hydrolyse entgegengesetzte Bildung komplexerer Moleküle, besonders günstig. In diesem Fall würde die Analogie mit der Diastase noch zu Recht bestehen, da mit und ohne den Einfluß von Diastase unter gewissen Bedingungen Stärke-Rückbildung aus Dextrinen und löslicher Stärke festgestellt werden kann¹⁾, und da auch in Gegenwart von Formaldehyd, wie die Verfasserin mit Hrn. Maggi konstatiert hat, die Jodreaktion beim Stehen der Spaltungsgemische namentlich bei hoher Temperatur zurückgeht (d. h. sich mehr der Jodreaktion der Stärke nähert). Doch könnte auch die Bildung einer Formaldehyd-Stärke-Verbindung die Viscositätsvermehrung veranlassen, und in diesem Fall wäre der Vorgang natürlich von einer Diastasewirkung scharf zu trennen.

Gegen eine solche Stärke-Formaldehyd-Verbindung und für das tatsächliche Vorhandensein einer dem diastatischen Stärkeabbau verwandten Hydrolyse spricht aber andererseits wiederum (wie auch der von Hrn. Maggi in Angriff genommene Vergleich der Gefrierpunkterniedrigung von Formaldehyd- und Stärke-Lösungen allein und deren Gemisch), daß ich aus den Formaldehyd-Stärke-Gemischen mittels Phenylhydrazins nach den gewöhnlichen Methoden der Osazondarstellung einen gelben Niederschlag erhalten konnte, der in Pyridin-Alkohol aufgenommen, nach dem sehr allmählichen Verdunsten dieses Lösungsmittels die typischen Krystallrosetten der Osazone zeigte. Der Schmelzpunkt der Krystalle stimmte jedoch weder mit dem des Maltosazons, noch mit dem des Glucosazons überein. Er war wesentlich niedriger (ca. 180°) und könnte, wenn es sich überhaupt um ein Osazon handelte, wofür allerdings der Habitus sprach, am ehesten ein solches einer Trisaccharose oder eines einfachsten Dextrins sein. Doch könnten natürlich aus solchen komplizierten Gemischen isolierte Krystalle noch Verunreinigungen enthalten, die für die Depression des Schmelzpunktes und für Modifikationen der Krystallform verantwortlich zu machen wären. Erst die Darstellung einer größeren Substanzmenge wird hier Klarheit bringen

¹⁾ S. hierüber Maquin und Roux (Bl. [3] 33, 723 [1905]; A. ch. [8] 9, 179 [1906]; C. r. 142, 1387 [1906]. Reichert, Univers. Pennsylvania medical Bull. 23, 57 [1910]. Lisbonne, Soc. Biol. 71, 140 [1911]. Fernbach und Wolff, Ann. Inst. Past. 18, 165 [1904]; C. r. 144, 645 [1907]. Wolff, Wochenschrift für Brauerei 21, Nr. 24 [1904] machen allerdings ein von der spaltenden Diastase verschiedenes aufbauendes Enzym, die Amylokoagulase, für diesen Prozeß verantwortlich. S. ferner hierzu Wohl und Glimm, Bio. Z. 27, 349 [1910].

können und auch eine scharfe Abgrenzung ermöglichen von dem Formaldehyd-phenylhydrazon, von dem es sich, nach den Literaturangaben über diese Verbindung, durch den wesentlich höheren Schmelzpunkt unterscheidet. Doch sind die Angaben über den Schmelzpunkt des Phenylhydrazons sehr variierend (zwischen 126° und 168°), so daß ein direkter Vergleich der beiden Verbindungen notwendig erscheint¹⁾).

Endlich läßt sich zugunsten der Auffassung, daß der Formaldehyd tatsächlich Modelleigenschaften der Diastase besitzt, eine eigentümliche Angabe verwerten, die sich in der Literatur findet.

Somlo und Laszloffy²⁾ haben nämlich angegeben, daß eine 2–5-prozentige Formaldehydlösung nicht nur die Diastase nicht schädige, sondern sogar in ihrer Wirkung zu beschleunigen vermöge. Da Formaldehyd ein heftiges Enzymgift ist, so ist wohl die zugrunde liegende Beobachtung dahin zu interpretieren, daß zwar die Diastase zerstört, aber die gleichsinnige und hier offenbar stärker hydrolytische Wirkung des Formaldehyds zur Beobachtung gekommen ist.

Trotz der angegebenen Gründe möchte ich mir jedoch erst nach Abschluß der eingehenden Versuche von Hrn. Maggi ein Urteil darüber gestatten, ob der Formaldehyd wie als echtes Peroxydase-Modell³⁾, so

¹⁾ Inzwischen ist durch Hrn. Maggi das Formaldehyd-phenylhydrazon in geringen Mengen dargestellt worden. Es bildet farblose, unter dem Mikroskop meist in beidseitig abgestumpften, ovalen Tafeln erscheinende Krystalle, deren höchster Schmp. 168° ist. Demgegenüber hat Hr. Maggi aus den Spaltungsgemischen von Stärke- wie von Glykogenlösungen mit Formaldehyd durch Einwirkung von Phenylhydrazin in der Hitze aus Benzol farblos krystallisierende Prismen erhalten, die scharf bei 182 – 183° schmolzen.

²⁾ Somlo und Laszloffy, Österr. Chemikerztg. 7, 126.

³⁾ Es sei mir an dieser Stelle gestattet, darauf hinzuweisen, daß van der Haar (Archives de chim. phys. et nat. 41, 312 [1916]) im Hinblick auf meine Theorie der Peroxydasewirkung (B. 43, 1321, 1327 [1910]) seine Angabe anführt, daß die Hedera-Peroxydase ein Glykoprotein sei. So sehr ich es bedaure, daß mir diese Arbeiten bei der großen Zahl der Veröffentlichungen über Peroxydasen bisher entgangen sind, und daß ich sie daher auch nicht zitiert habe, so dürfte doch kaum der Kohlenhydrat-Anteil für die peroxydierende Wirkung verantwortlich gemacht werden. Gehört doch z. B. gerade die Glykose zu den Aldehyden, die — wie ich seinerzeit festgestellt habe — nicht als »Peroxydase« zu fungieren vermag.

Was van der Haars Hinweis auf seinen Befund der sehr stark erhöhten Temperatur (Säure- und Cyanwasserstoff)-Resistenz der gereinigten Peroxydase betrifft, so spielt derselbe — so interessant er an und für sich ist — für die Frage nach der Identität von Katalyse und Peroxydase kaum eine Rolle. Denn bei den rigorosen Reinigungsoperationen dürfte das Molekül

auch als echtes Diastase-Modell zu fungieren vermag, so verlockend es auch ist, der Aldehydgruppe ebensowohl Wasser- wie Wasserstoffperoxyd-anlagernde und übertragende Fähigkeiten zuzuschreiben und damit zugleich der noch völlig im Dunkeln liegenden Theorie der fermentativen Hydrolysen in der einleitend angeführten Weise Boden zu gewinnen.

Sollte dies gelingen, dann würde die intermediäre Hydratbildung der aldehydischen Fermente wohl auch bei andern fermentativen Hydrolysen eine Rolle spielen können. Eine Stütze hierfür bietet vielleicht das Vermögen des Formaldehyds, Tischlerleim zu verflüssigen.

Da die nähere Aufklärung der hier erwähnten Fragen den Gegenstand einer Dissertation bildet, die gegenwärtig in meinem Laboratorium von Hrn. cand. phil. Maggi ausgeführt wird, so möchte ich um Reservierung dieses Arbeitsgebiets bitten.

Institut für physik.-chem. Biologie der Universität Bern.

der Peroxydase selbst stark in Mitleidenschaft gezogen worden sein. Ein neues Individuum mit anderen Eigenschaften aber noch starkem Oxydationsvermögen wäre daraus hervorgegangen. Doch selbst wenn die thermostabile und insofern der Blutperoxydase vergleichbare Peroxydase mit der thermolabilen identisch wäre, deren Thermolabilität hier wie bei der Katalase nur auf der Mitfällung durch die bei 80° ausfallenden Eiweißkörper bedingt sein würde, wie dies van der Haar annimmt, so könnte zwar nicht die gleiche Tötungstemperatur, aber das gleiche Adsorptionsvermögen an die koagulierenden Eiweißkörper für die Identität von Peroxydase und Katalase geltend gemacht werden. Allerdings müßte es bei der van der Haarschen Annahme, daß der Tötungspunkt der Enzyme mit der Hitze-koagulation der Eiweißkörper des Mediums zusammenfällt, und daß nur die Mitfällung für den Inaktivierungsprozeß verantwortlich zu machen sei, seltsam erscheinen, daß nicht jene, mit dem an und für sich nach van der Haars Annahme doch thermostabilen Enzym beladenen Koagula, die oxydativen und sonstigen Eigentümlichkeiten des zuvor in der Lösung enthaltenen Enzyms annehmen, wie es bei anderen Fermentfällungen der Fall ist, und wie sich auch aus formaldehydhaltiger Milch, wie ich mit Hrn. Briesenmeister feststellen konnte, der Formaldehyd mit dem Casein bei dessen quantitativer Ausfällung nach Hoppe-Seylers Vorschrift ausscheidet und dem Niederschlag »Peroxydase-Reaktionen« erteilt. Merkwürdig muß nach der van der Haarschen Auffassung auch der gleiche Tötungspunkt der Peroxydase von Milch und Pflanzensäften (80°) erscheinen; da die Ungleichartigkeit der in beiden Fällen vorliegenden Eiweißkörper auch einen verschiedenen Koagulationspunkt und damit also nach van der Haar eine verschiedene Tötungstemperatur für die fraglichen Enzyme erwarten läßt.