

## 151. Die Aufnahme von Sauerstoff bei der enzymatischen Oxydation ungesättigter Fettsäuren

von H. Süllmann.

(30. X. 41.)

Aus Leguminosensamen und auch aus tierischen Geweben lassen sich Enzymlösungen gewinnen, die unter aeroben Bedingungen ungesättigte Fette zu oxydieren vermögen. Für die hier in Frage kommenden Enzyme verwenden wir, im Anschluss an André und Hou<sup>1)</sup>, die Bezeichnung „Lipoxydasen“, ohne damit eine Substratspezifität dieser noch wenig untersuchten Enzyme schon festlegen zu wollen. Die Wirkung der Lipoxydasen auf ungesättigte Fette zeigt sich vor allem in einer Abnahme der Jodzahl und in einer Zunahme der Peroxydzahl des Substrates. Unter der Wirkung dieser Enzyme kommt es also zu einer Absättigung von Äthylenbindungen, offenbar durch „peroxydartige“ Anlagerung von Sauerstoff an dieselben. Es ist anzunehmen<sup>2)</sup>, dass die Sauerstoffanlagerung in mehreren Stufen erfolgt, und dass sich ihr weitere Umwandlungen (Umlagerungen, Molekelzerfall, evtl. Polymerisationen) anschliessen können.

Mit Hilfe des angelagerten, „aktiven“ Sauerstoffs lässt sich eine Anzahl anderer Stoffe oxydieren, so Carotinoide<sup>3)</sup><sup>4)</sup><sup>5)</sup>, Guajakharz<sup>5)</sup> und, wie an anderer Stelle kurz mitgeteilt wurde<sup>6)</sup>, p-Phenyldiamin, 3,4-Dioxypyrenylalanin und Adrenalin. Aus den zuletzt genannten Stoffen entstehen gefärbte Verbindungen. Diese Wirkung des „lipoxydatischen Systems“ (Enzym + ungesättigte Fette bzw. Fettsäuren + Sauerstoff) dürfte in entsprechenden Fällen die Spezifität der auf gleicher oder ähnlicher Farbstoffbildung beruhenden Nachweisreaktionen für bestimmte Oxydasen verringern. Die Frage, ob das Enzym bei diesen sekundären oder gekoppelten Oxydationsreaktionen mitwirkt, oder ob die Fettsäuren-Sauerstoffverbindungen unabhängig davon reagieren, lässt sich noch nicht für alle Fälle beantworten. Die nach Einwirkung des Enzyms vorliegenden Fettperoxydverbindungen allein oxydieren Carotinoide nur sehr langsam<sup>3)</sup><sup>7)</sup>, so dass für die mit Hilfe eines wässrigen Extraktes aus der Sojabohne und von ungesättigtem Fett mit grosser Geschwindigkeit erfolgende Carotinoid-Oxydation die Gegenwart der Lipoxydase oder anderer in den Extrakten vorhandener Enzyme offenbar von irgendeiner Bedeutung ist. Entsprechende Versuche mit den anderen genannten Substanzen stehen noch aus.

<sup>1)</sup> E. André und K. Hou, C. r. **194**, 645 (1932); **195**, 172 (1932).

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu die Vorstellungen über die chemischen Vorgänge bei der Autoxydation ungesättigter Fette, z. B. die Abschnitte „Das Trocknen der Öle“ sowie „Das Verderben der Fette“ in Hefter-Schönfeld, „Chemie und Technologie der Fette und Fettprodukte“ Bd. I, S. 336 u. f., S. 415 u. f. (Berlin 1936).

<sup>3)</sup> J. B. Sumner und R. J. Sumner, J. Biol. Chem. **134**, 531 (1940).

<sup>4)</sup> H. Tauber, Am. Soc. **67**, 2251 (1940).

<sup>5)</sup> H. Süllmann, Helv. **24**, 646 (1941).

<sup>6)</sup> H. Süllmann, Verh. Schweiz. Physiol., Juli 1941.

<sup>7)</sup> Vgl. hierzu auch die Oxydation von Vitamin A durch Fettperoxyde: E. L. Smith, Biochem. J. **33**, 201 (1939).

Sekundäroxydationen lassen sich — in geringem Umfange — auch bei der „Autoxydation“ ungesättigter Fettsäuren beobachten. In den von uns bisher untersuchten Fällen treten diese jedoch quantitativ stark hinter den durch das lipoxydatische System bewirkten Oxydationen zurück.

Über die Natur des Enzyms lassen sich noch keine genauen Aussagen machen. Es ist hierzu zunächst zu fragen, ob es mit einer der bekannten Oxydasen und Peroxydasen identisch ist. Peroxydasen können auch Oxydationen mit molekularem Sauerstoff katalysieren<sup>1)</sup>. Die Enzymlösung aus Sojabohnen zeigt mit Wasserstoffperoxyd und Guajakharz starke, diejenige aus den Samen von Phaseolus vulgaris nur ganz schwache Peroxidase-Aktivität<sup>2)</sup>; beide Enzimlösungen oxydieren aerob ungesättigte Fettsäuren. Das hat bereits André und Hou<sup>2)</sup> veranlasst, eine Verschiedenheit von Peroxydase und „Lipoxydase“ anzunehmen. Die in tierischen und pflanzlichen Geweben verbreiteten Cytochromoxydase-Cytochromsysteme vermögen außer dem viel verwendeten, physiologisch aber nicht im Betracht kommenden Indophenolreagenz eine Anzahl anderer Stoffe aerob zu oxydieren<sup>4)</sup>. Ob mit ihrer Hilfe auch ungesättigte Fettsäuren oxydiert werden können und sie somit als „Lipoxydasen“ wirken, wurde unseres Wissens noch nicht untersucht. Lea<sup>5)</sup>) gelangt zu der Annahme, dass die Lipoxydase aus tierischen Geweben nicht mit der Indophenoxydase (= Cytochromoxydase) identisch ist.

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse von Versuchen mitgeteilt, in denen die Aufnahme von Sauerstoff bei der Oxydation einiger ungesättigter Fettsäuren unter Verwendung wässriger Lösungen aus der Sojabohne bestimmt wurde. Dabei wurde ferner das Verhalten der Enzimlösung gegenüber Wärme, Dialyse und Blausäure geprüft, sowie der Einfluss von Carotin auf die enzymatische Fettsäuren-Oxydation untersucht.

### Versuche.

**Methodisches.** Die Enzimlösungen wurden durch meistens 2-stündige Extraktion von 2,5 g entfettetem Sojabohnenpulver mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser und anschliessendes Zentrifugieren gewonnen. Die Lösungen sind noch nach tagelangem Aufbewahren bei etwa 10° aktiv; es kann dann in ihnen jedoch zu einer starken Bakterienvermehrung kommen, weshalb frische oder höchstens 24 Stunden alte Enzimlösungen zur Verwendung gelangten. Für einige Versuche wurden aus diesen Lösungen Verdünnungen hergestellt, wenn es sich darum handelte, sehr geringe Enzymmengen zu verwenden. Alle Mengenangaben beziehen sich auf die ursprüngliche Enzimlösung.

Als ungesättigte Fettsäuren wurden untersucht: Oleinsäure („für wissenschaftliche Zwecke“ Kahlbaum und Ph. H. V), Rieinolsäure (Kahlbaum), Leinölsäure (Ac. linolicum, Kahlbaum) und Linolensäure (Kahlbaum). Ölsäure wurde für einige Versuche noch über das Lithiumsalz gereinigt. Die Säuren wurden in der Regel mit der berechneten Menge Natronlauge in Wasser gelöst. Verdünnte Fettsäurelösungen (0,02-m. bis 0,005-m.) wurden ohne Abstumpfung ihrer alkalischen Reaktion verwendet, konzentriertere Lösungen (bis 0,1-m.) wurden mit Salzsäure oder Essigsäure annähernd lackmus-neutral gemacht, wodurch Emulsionen erhalten wurden. In einigen Versuchen wurden die Fettsäuren als solche, d. h. ohne vorherige Lösung in Wasser, der Reaktionslösung zugesetzt.

<sup>1)</sup> H. Theorell, Ark. Kem., Min. Geol. **14** B, Nr. 20 (1941).

<sup>2)</sup> E. André und K. Hou, C. r. **195**, 172 (1932).

<sup>3)</sup> H. Süllmann, Verh. Schweiz. Physiol., Juli 1941.

<sup>4)</sup> D. Keilin und E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. London [B] **125**, 171 (1938); **127**, 167 (1939).

<sup>5)</sup> C. H. Lea, J. Soc. chem. Ind. **56**, Trans. 376 (1937).

Als Pufferlösungen dienten 0,2-m. Phosphatlösungen, von denen 0,5 bis 1 cm<sup>3</sup> in 3,8 oder 4 cm<sup>3</sup> der Reaktionslösung zur Anwendung kamen.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs geschah manometrisch nach O. Warburg in Gefäßen von etwa 15 cm<sup>3</sup> Inhalt und bei 180 Schüttelungen pro Minute. In der Regel wurde die Enzymlösung in den Anhang der Atmungsgefässe gegeben und nach Ausgleich der Temperatur in den Hauptraum gekippt. Im Innengefäß befand sich 0,2 cm<sup>3</sup> 10-proz. Natriumhydroxylösung, um etwa gebildetes Kohlendioxyd zu absorbieren. In den Versuchen mit Natriumcyanid blieb das Innengefäß leer. Im Gasraum befand sich Luft; die Versuchstemperatur betrug 35°. Die Ergebnisse werden in mm<sup>3</sup> aufgenommenen Sauerstoffs ausgedrückt.

Zur Feststellung des Reinheitsgrades der verwendeten Fettsäurenpräparate mussten wir uns auf die Bestimmung der Jodzahlen beschränken<sup>1)</sup>. Diese erfolgten nach Rosenmund und Kuhnhenn mit Pyridinsulfat-dibromid und in einem Falle zur Kontrolle nach v. Hübl mit Jodmonochlorid.

Die Fettsäuren wurden der Versuchslösung in verschiedenen physikalischen Zustandsformen zugefügt: als Emulsionen (dann enthielten sie von der Neutralisation her noch Natriumchlorid oder Natriumacetat), als Natriumseifen in Wasser, oder auch in ihrer unverdünnten Form. In der grössten Anzahl der Versuche befand sich im Atmungsgefäß Phosphatpuffer vom p<sub>H</sub> = 6,5. Unter diesen Verhältnissen ist anzunehmen, dass Enzym und Sauerstoff im wesentlichen auf die kolloid verteilten Fettsäuren bzw. auf die in den Grenzflächen befindlichen Fettsäuremolekülen zur Einwirkung kommen. (Dass keine echte Lösung des Substrates für die Enzymwirkung erforderlich ist, geht ferner daraus hervor, dass auch die in Wasser unlöslichen Glyceride der ungesättigten Fettsäuren oxydiert werden.) Soweit die Fettsäuren als Emulsionen oder als Seifen in Wasser zur Anwendung kamen, wurde darauf geachtet, dass in den Atmungsgefässen nach der immer mehrstündigen Versuchszeit keine Entmischung der Emulsionen stattgefunden hatte. Es ist wahrscheinlich, dass der Verteilungsgrad der Fettsäuren, der durch verschiedene Faktoren, wie p<sub>H</sub>, Anwesenheit von Elektrolyten, organischen Lösungsmitteln, Temperatur, beeinflusst werden kann, für den Reaktionsverlauf von Bedeutung ist. Wir wissen nicht, ob in dem heterogenen System zu jedem Zeitpunkt der Messung die Gesamtmenge der vorhandenen Fettsäuremolekülen in reaktionsfähigem Zustand vorliegt und ob somit eine einfache Beziehung zwischen der zugefügten Substratmenge und der Anzahl der reaktionsfähigen Molekülen besteht. Das kann möglicherweise die quantitativen Enzym-Substratbeziehungen (Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den Enzym- und Substratmengen) komplizieren. Aus diesen Gründen erfolgt vorläufig nur eine allgemeinere Kennzeichnung des Reaktionsverlaufs (s. Abschnitt 2, c), wie er sich unter den bei den einzelnen Versuchen angegebenen Bedingungen darbietet. Für eigentliche reaktionskinetische Messungen sollen die notwendigen Versuchsbedingungen noch ausgearbeitet werden. Hierfür erscheint auch die Verwendung gereinigter Enzymlösungen und absolut einheitlicher Substrate, die uns bei den mehrfach ungesättigten Säuren zur Zeit nicht zur Verfügung stehen, wünschenswert.

Ohne Substratzusatz bewirken die frisch hergestellten Enzymlösungen keine nennenswerten Druckänderungen. Unmittelbar verwertbare Atmungssubstrate enthalten sie demnach kaum. Mehrere Tage alte Enzymlösungen können manchmal einen beträchtlichen Sauerstoffverbrauch aufweisen. Wahrscheinlich handelt es sich hier um die Stoffwechselaktivität von Bakterien, die in diesen Fällen im mikroskopischen Präparat zahlreich nachweisbar waren. Derartige Enzymlösungen sind ungeeignet.

<sup>1)</sup> Zur Kritik der Anwendbarkeit und Genauigkeit der verschiedenen Verfahren vgl.: A. Grün, „Analyse der Fette und Wachse“ Bd. I (Berlin 1925); ferner: A. Bömer und J. Grossfeld, im „Handb. der Lebensmittelchemie“, Bd. IV (Berlin 1939).

## 1. Einfach ungesättigte Säuren.

a) Sauerstoffverbrauch. Die untersuchten Präparate der Ölsäure,  $\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{CH}=\text{CH} \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$ , nehmen nach Zugebung der Enzymlösung merkliche Mengen Sauerstoff auf (Tabelle I); der Sauerstoffverbrauch ist am grössten mit der Ölsäure Ph. H. V., am geringsten mit der aus Ölsäure „*Kahlbaum*“ über das Lithiumsalz dargestellten Säure. Die in dem Versuch III (Tabelle I) mit dieser gereinigten Ölsäure nach 6 Stunden aufgenommene Sauerstoffmenge entspricht rund 0,1 Mol  $\text{O}_2$  pro Mol Ölsäure; in Versuch IIIa ist sie noch geringer. Auch in den Versuchen mit den anderen Präparaten wird maximal nicht mehr als 0,16 Mol  $\text{O}_2$  pro Mol angewandter Ölsäure aufgenommen. Eine eindeutige stöchiometrische Beziehung zwischen angewandter Ölsäuremenge und aufgenommenem Sauerstoff kann nicht angegeben werden. In manchen dieser Versuche mit Ölsäure fiel auf, dass die Sauerstoffaufnahme bereits bald nach dem Zufügen des Enzyms zum Stillstand kam. Die mit Ricinolsäure,  $\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_5 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}=\text{CH} \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{COOH}$ , unter gleichen Bedingungen gefundene Sauerstoffaufnahme entspricht etwa der für Ölsäure angegebenen. Nach diesen Ergebnissen scheint die Doppelbindung der Ölsäure und der Ricinolsäure einer durch die Lipoxydase katalysierten, beständigen Sauerstoffanlagerung nur schwer zugänglich zu sein (s. unten).

Tabelle I.

Ölsäure und Ricinolsäure.

2 cm<sup>3</sup> Enzym, Fettsäuren als Natriumsalze, Phosphatpuffer  $p_{\text{H}} = 6,5$ .

	Fettsäure	mg	mm <sup>3</sup> $\text{O}_2$ nach Stunden			mm <sup>3</sup> $\text{O}_2$ mit Enzym allein nach 6 Std.
			½	3	6	
I	Ölsäure Ph. H. V . . . . .	2,82	25	30	36	3
Ia		5,64	51	58	75	
II	„ „ <i>Kahlbaum</i> „ . . . . .	2,82	23	27	40	3
IIa		5,64	30	36	42	
III	„ aus Lithiumsalz . . . . .	1,41	7	10	12	5
IIIa		5,64	21	28	29	
IV	Ricinolsäure . . . . .	1,49	9	17	15	2
IVa		2,98	15	22	22	

In den Versuchen der Tabelle Ia wurden Ölsäure und Ricinolsäure als solche und in grösseren Mengen verwendet. Anders als in den vorhergehenden Versuchen tritt die „Autoxydation“<sup>1)</sup> der beiden Säuren deutlich in Erscheinung. In Anwesenheit des Enzyms ist

<sup>1)</sup> Von Autoxydation sprechen wir in dieser Arbeit dann, wenn ein Sauerstoffverbrauch ohne Enzymzusatz beobachtet wurde. Ob mit den übrigen Reagenzien z. B. Spuren wirksamer Schwermetalle zugesetzt wurden, kann unentschieden bleiben.

die Sauerstoffaufnahme merklich erhöht. Die nach 7 Stunden aufgenommene Sauerstoffmenge beträgt bei Ölsäure + Enzym rund  $350 \text{ mm}^3$  und bei Ricinolsäure + Enzym  $300 \text{ mm}^3$ . Gegenüber dem autoxydativ aufgenommenen Sauerstoff tritt die Enzymwirksamkeit bei der Ricinolsäure mehr hervor als bei der Ölsäure. Dem zeitlichen Verlauf des Sauerstoffverbrauchs nach ist in diesen Versuchen mit den grossen Fettsäuremengen die Sauerstoffaufnahme noch längst nicht abgeschlossen.

Tabelle Ia.

Je  $1 \text{ cm}^3$  Fettsäure (etwa 800—900 mg) angewandt;  $1 \text{ cm}^3$  Enzym; 0,04-m. Phosphatpuffer  $p_H = 6,5$ .

Fettsäure	Enzym	$\text{mm}^3 \text{ O}_2$ nach Stunden			
		$\frac{1}{2}$	1	3	7
Ölsäure . . . . .	—	17	37	117	285
" . . . . .	+	50	85	186	347
Ricinolsäure . . . . .	—	2	6	20	38
" . . . . .	+	90	154	239	301
Leinölsäure . . . . .	—	28	62	242	1011
" . . . . .	+	507	771	1656	2711

b) Sekundäroxydation von Carotin in Gegenwart von Ölsäure. Ölsäure-äthylester wird von *Sumner* und *Dounce*<sup>1)</sup> unter den von der „Carotinoxydase“ (= Lipoxydase) oxydierbaren Substraten aufgezählt. Wir prüften das Verhalten von Ölsäure im Test der Carotinentfärbung:

Versuche. 1. 0,2 mg Carotin (in  $1 \text{ cm}^3$  Dioxan) +  $0,5-5 \text{ cm}^3$  0,1-m. Ölsäure „Kahlbaum“ (in Aceton) +  $90 \text{ cm}^3$  Wasser +  $5 \text{ cm}^3$  0,2-m. Phosphatpuffer  $p_H = 6,5 + 2 \text{ cm}^3$  Enzym. Nach 90 Minuten: Versuch mit  $0,5 \text{ cm}^3$  0,1-m. Ölsäure fast entfärbt, mit  $1 \text{ cm}^3$  0,1-m. Ölsäure vollständig entfärbt, mit 2 und  $5 \text{ cm}^3$  0,1-m. Ölsäure nur teilweise Entfärbung. — In diesen Versuchen mit 2 und  $5 \text{ cm}^3$  0,1-m. Ölsäure Ausscheidung von Ölsäuretröpfchen.

2. 0,1 mg Carotin +  $1 \text{ cm}^3$  0,1-m. Ölsäure, weitere Zusätze wie im vorhergehenden Versuch. Entfärbung nach 30 Minuten.

3. 0,05 mg Carotin +  $1 \text{ cm}^3$  0,1-m. Ölsäure, weitere Zusätze wie oben. Entfärbung in 11 Minuten.

4. Vergleichsweise sei ein Versuch mit Leinölsäure aufgeführt. 1 mg Carotin +  $0,5 \text{ cm}^3$  0,1-m. Leinölsäure, weitere Zusätze wie in den vorhergehenden Versuchen. Vollständige Entfärbung nach 20 Minuten.

Es zeigt sich, dass in Gegenwart des Enzyms und von Ölsäure eine Oxydation von Carotin stattfindet. Ölsäure ist hierbei ganz augenscheinlich weit weniger wirksam als Leinölsäure, auch bei Berücksichtigung der Unterschiede in der Ungesättigtheit beider Säuren. Entsprechende Versuche mit Ricinolsäure wurden früher mitgeteilt<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Enzymol. 7, 130 (1939).

<sup>2)</sup> Helv. 24, 646 (1941).

c) Einfluss von Carotin auf den Sauerstoffverbrauch. Es ist denkbar, dass eine Aufnahme von Sauerstoff durch Ölsäure in grösserem Umfange sichtbar wird, wenn die gebildeten Anlagerungsverbindungen mit Carotin oder einem anderen Akzeptor sofort weiter reagieren können. In der gewählten Versuchsanordnung vermögen die Entfärbungsversuche hierüber keine genauere Auskunft zu geben. Deshalb wurde der Sauerstoffverbrauch von Ölsäure „*Kahlbaum*“ in Gegenwart von Carotin bestimmt (Tabelle II). In dem Versuche mit Enzym + Ölsäure + Carotin (Versuch II) ist die Sauerstoffaufnahme um einen geringen Betrag höher als in dem entsprechenden Versuch I ohne Carotin. Die Bedeutung dieses an sich schon geringen Unterschiedes fällt aber dahin, wenn man die beträchtliche Menge Sauerstoff in Betracht zieht, die Carotin für sich — mit oder ohne Enzym (Versuche III und V) — aufnimmt. In Gegenwart von Ölsäure ist die Autoxydation des Carotins allerdings auffallend gehemmt (Versuch VI); es lässt sich schwerlich sagen, wie weit das auch im Versuch mit Enzym + Ölsäure + Carotin der Fall ist. Auf alle Fälle hat Carotin keinen beträchtlichen Einfluss auf eine enzymatisch bewirkte Anlagerung von Sauerstoff an Ölsäure.

Tabelle II.  
Ölsäure + Carotin.

Ölsäure als Natriumsalz in Wasser, Carotin in Dioxan; 0,025-m. Phosphatpuffer  $\text{pH} = 6,5$ . — Den Versuchen ohne Carotin wurde die entsprechende Menge Dioxan ( $0,25 \text{ cm}^3$ ) zugesetzt. Beim Zukippen des Enzyms zu der dioxanhaltigen Versuchslösung entstand ein Unterdruck entsprechend  $17 \text{ mm}^3 \text{ O}_2$ , der in den Versuchen I, II und III in Abzug gebracht worden ist.

	Enzym $\text{cm}^3$	Ölsäure mg	Carotin mg	$\text{O}_2$ -Verbrauch nach Stunden			
				1	2	4	6
I	1	5,6	—	23	23	25	28
II	1	5,6	1,0	29	29	31	37
III	1	—	1,0	83	114	122	141
IV	—	5,6	—				0
V	—	—	1,0	68	87	105	121
VI	—	5,6	1,0				0

Versuche über den Einfluss von Carotin auf die enzymatische Oxydation der Leinölsäure werden weiter unten aufgeführt; dort soll auch das Verhalten des Carotins selber besprochen werden.

Es stellt sich die Frage, ob die an sich geringe Wirksamkeit der Ölsäure und der Ricinolsäure — sowohl bei der Sauerstoffaufnahme als auch bei der Sekundäroxydation des Carotins — nicht auf Beimengungen von höher ungesättigten Verbindungen beruht. Jodzahlbestimmungen, die besonders mit der Ölsäure „*Kahlbaum*“ wiederholt durchgeführt wurden, ergaben hierfür keine Anhaltspunkte; die ermittelten J.-Z. lagen zwischen 86,5

und 89, also nicht über der für reine Ölsäure berechneten J.-Z. von 90. Trotzdem soll allein auf Grund der Jodzahlen das Vorhandensein geringer Verunreinigungen nicht ganz ausgeschlossen werden. Ein den Sauerstoffwerten in Tabelle I vollständig entsprechender Gehalt der Ölsäure an Linol- oder Linolensäure hätte jedoch in den J.-Z. zum Ausdruck kommen müssen.

Diese Befunde über das Verhalten der einfach ungesättigten Fettsäuren bei der enzymatischen Oxydation stehen in gewisser Übereinstimmung zu Ergebnissen von *Warburg*<sup>1)</sup> sowie von *Meyerhof*<sup>2)</sup>, wonach die Oxydation von Ölsäure und von einigen anderen einfach ungesättigten Säuren durch Eisensalze<sup>1)</sup> oder Sulphydrylverbindungen<sup>2)</sup> nicht merklich katalysiert wird. Dass aber auch die einfach ungesättigten Säuren der Oxydationskatalyse zugänglich sind, ist auf Grund ihrer Autoxydation zu erwarten und wurde besonders für Ölsäure in zahlreichen Untersuchungen mit verschiedenen Katalysatoren gezeigt<sup>3)</sup>. Es handelt sich also nur um eine relative Beständigkeit der Äthylenbindung in der Ölsäuremolekel, die eine partielle Oxydation, wie sie etwa in unseren Versuchen mit den löslichen Soja-Enzymen erzielt wurde, verständlich erscheinen lassen kann. Hingewiesen sei hierzu auch auf Untersuchungen von *Franke* und *Jerchel*<sup>4)</sup>, wonach die bei der Autoxydation von Ölsäure und Ricinolsäure stattfindenden, sich in der Beziehung zwischen Sauerstoffaufnahme, Peroxydwert und Jodzahl der Reaktionsprodukte ausdrückenden Prozesse nicht so einfach zu formulierende Vorgänge darstellen wie bei der Autoxydation höher ungesättigter Fettsäuren.

## 2. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren.

a) Sauerstoffverbrauch. Im Gegensatz zu den untersuchten einfach ungesättigten Säuren wird die Oxydation der mehrfach ungesättigten Säuren von dem Enzym sehr wirksam katalysiert. Um die Gesamtmenge aufgenommenen Sauerstoffs zu bestimmen, wurden geringe Mengen Säuren (zwischen 0,05 und 1,4 mg) verwendet. Die Oxydation verläuft dann in einigen Stunden praktisch zu Ende (vgl. Fig. 1). Leinölsäure nahm pro Mol 1,25—1,35, im Mittel 1,31 Mol O<sub>2</sub> auf (Tabelle III). Mit Linolensäure wurde ein Sauerstoffverbrauch entsprechend 1,63—1,72, im Durchschnitt 1,67 Mol O<sub>2</sub> gefunden (Tabelle IV).

<sup>1)</sup> *O. Warburg*, Z. physiol. Ch. **92**, 231 (1914).

<sup>2)</sup> *O. Meyerhof*, Pflüger's Arch. ges. Physiol. **199**, 531 (1923).

<sup>3)</sup> Vgl. *R. Kuhn* und *K. Meyer*, Z. physiol. Ch. **185**, 193 (1929). — *W. Franke*, ebenda, **212**, 234 (1932). — *K. Täufel* und *A. Seuss*, Fettchem. Umschau **41**, 107, 131 (1934); zit. n. C. **1934**, II, 2768. — Bezüglich der speziellen Versuchsbedingungen, unter denen eine Oxydation der Ölsäure erfolgt oder nicht erfolgt, sei auf die zitierten Arbeiten verwiesen.

<sup>4)</sup> *W. Franke* und *D. Jerchel*, A. **533**, 46 (1938). — Vgl. ferner über die Bildung von Oxydoverbindungen der Elaidinsäure: *G. W. Ellis*, Biochem. J. **30**, 753 (1936).

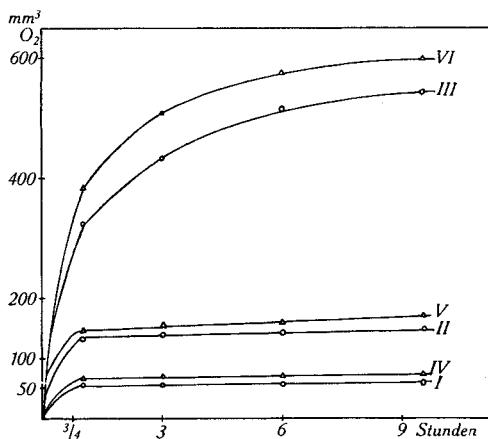


Fig. 1.

1  $\text{cm}^3$  Enzym, Fettsäuren als Natriumsalze, 0,05-m. Phosphat  $p_{\text{H}} = 6,5$ .

I: 0,56 mg Leinölsäure	IV: 0,556 mg Linolensäure
II: 1,4 mg „	V: 1,39 mg „
III: 5,6 mg „	VI: 5,56 mg „

**Tabelle III.****Leinölsäure.**

In Reihe I 0,5  $\text{cm}^3$ , II—IV 1  $\text{cm}^3$  Enzym; Leinölsäure als Natriumsalz in Wasser; Phosphatpuffer  $p_{\text{H}} = 6,5$ . Werte nach 4—7 Stunden Versuchsdauer.

Vers.-Reihe	mg Leinölsäure	$\text{mm}^3 \text{O}_2$	entspricht Mol $\text{O}_2$ pro Mol „Leinölsäure“	Mol $\text{O}_2$ für 1 Mol Linolensäure (berechnet)
I	0,56	59,7	1,33	1,18
	1,40	140	1,25	1,11
II	0,56	60	1,34	1,19
	1,40	146	1,31	1,15
III	0,56	57,5	1,28	1,11
	1,12	120	1,34	1,19
IV	1,40	151	1,35	1,20
	Mittel:		1,31	1,16

Die verwendete Leinölsäure hatte die Jodzahl 197,5, enthielt mithin neben dem Hauptbestandteil Linolsäure (J.-Z. 181,2) noch höher ungesättigte Verbindungen, wohl hauptsächlich Linolensäure (J.-Z. 273,8). Aus der gefundenen Jodzahl und unter der Annahme, dass neben Linolsäure nur Linolensäure vorhanden ist, berechnet sich für die Leinölsäure ein Gehalt von 82,4 % Linolsäure und 17,6 % Linolensäure. Da sich für Linolensäure unter Berücksichtigung der Jodzahl ein Verbrauch von annähernd 2 Mol  $\text{O}_2$  ergibt (s. unten), lässt sich die auf die in der Leinölsäure vorhandene Menge Linolsäure entfallende Sauerstoffaufnahme berechnen. Diese Berechnung ist

für die verschiedenen Versuche in der letzten Spalte der Tabelle III durchgeführt. Es ergibt sich ein durchschnittlicher Verbrauch von 1,16 Mol O<sub>2</sub> für ein Mol Linolsäure. Der über ein Mol hinausgehende Sauerstoffverbrauch entspricht etwa dem mit Ölsäure gefundenen, ist jedoch in Anbetracht des indirekten Vorgehens zu seiner Ermittlung nicht sicher zu bewerten.

Bei der enzymatischen Oxydation nimmt 1 Mol Linolsäure, CH<sub>3</sub>·(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>·CH=CH·CH<sub>2</sub>·CH=CH·(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>·COOH, also im wesentlichen 1 Mol O<sub>2</sub> auf<sup>3)</sup>.

Tabelle IV.  
Linolensäure.

I und II 1 cm<sup>3</sup>, III und IV 2 cm<sup>3</sup> Enzym. Versuchsbedingungen wie in der vorigen Tabelle.

Vers.-Reihe	mg Linolensäure	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	entspricht Mol O <sub>2</sub> pro Mol angew. Linolensäure <sup>1)</sup>
I	0,556	74,2	1,65
II	0,0556	7,5	1,67
	0,138	19,3	1,72
	0,278	37,6	1,68
	0,278	36,4	1,63
III	1,39	184,2	1,65
IV	1,39	188,0	1,68
		Mittel:	1,67 <sup>2)</sup>

Die Jodzahl der zur Verfügung stehenden Linolensäure, CH<sub>3</sub>·CH<sub>2</sub>·CH=CH·CH<sub>2</sub>·CH=CH·CH<sub>2</sub>·CH=CH·(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>·COOH, fanden wir zu 240, also niedriger als zu erwarten ist (berechnete J.-Z. = 273,8)<sup>4)</sup>. Der „Reinheitsgrad“ der verwendeten Säure betrug somit 88 %. Setzen wir diesen summarisch in Anrechnung, so ergibt der Mittelwert in Tabelle IV einen Verbrauch von 1,9 Mol O<sub>2</sub> pro Mol Linolensäure. Hier ist die Voraussetzung gemacht, dass die drei Doppelbindungen der Linolensäure für die enzymatische Oxydation gleichwertig sind. Diese Voraussetzung trifft, wie der für Linolsäure ermittelte Sauerstoffverbrauch erkennen lässt, wahrscheinlich nicht zu. Es ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass infolge einer

<sup>1)</sup> Jodzahl der angewandten Linolensäure: 240.

<sup>2)</sup> Daraus berechnet für 1 Mol reine Linolensäure (Jodzahl 273,8): 1,9 Mol O<sub>2</sub>.

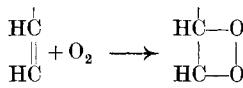
<sup>3)</sup> Rona, Asmus und Steineck (Bioch. Z. 250, 149 (1932)) schliessen aus kinetischen Messungen, dass bei der Autoxydation von Linolsäure-methylester in Gegenwart von Pyridin 2 Mol Sauerstoff pro Mol Ester aufgenommen werden. Franke und Jerchel (A. 533, 46 (1938)) gewinnen in ihren Untersuchungen Anhaltspunkte dafür, dass bei der Autoxydation der Linolsäure die Aufnahme der ersten O<sub>2</sub>-Molekel, bei der Linolensäure die der ersten beiden O<sub>2</sub>-Molekülen erheblich schneller erfolgt als der spätere Sauerstoffverbrauch.

<sup>4)</sup> Als höchste Jodzahl fanden wir mit dem Verfahren nach v. Hübl 248.

teilweisen Autoxydation der verwendeten Linolensäure diejenigen Doppelbindungen bevorzugt abgesättigt sind, die auch bei der enzymatischen Katalyse in erster Linie in Frage kommen. Die übrigbleibenden, nicht oder schwer oxydierbaren Doppelbindungen werden aber bei der Jodzahlbestimmung mit erfasst. Die für die enzymatische Oxydation in Betracht kommenden doppelt gebundenen Kohlenstoffatome dürften also in etwas niedrigerer Anzahl vorhanden sein, als durch die Jodzahl von 240 angegeben wird. Entsprechend ist die Sauerstoffaufnahme wahrscheinlich etwas höher als 1,9 Mol O<sub>2</sub> pro Mol Linolensäure.

Aus den Versuchen kann gefolgert werden, dass bei der enzymatischen Oxydation pro Mol Linolensäure etwa 2 Mole Sauerstoff aufgenommen werden<sup>1)</sup>.

Auch in den erwähnten Versuchen von *O. Warburg*<sup>2)</sup> über die Katalyse mit Eisensalzen wurden annähernd 2 Mole Sauerstoff pro Mol Linolensäure aufgenommen. Nehmen wir für die enzymatische Oxydation eine peroxydische Anlagerung von Sauerstoff an die Doppelbindungen an:



so bleibt sowohl in der Linolsäure- als auch in der Linolensäuremolekel eine Doppelbindung unberührt. Im Falle der Linolsäure lassen unsere Ergebnisse vorläufig noch zu, dass an die zweite Doppelbindung eine Sauerstoffanlagerung in dem geringen Umfange erfolgt, wie sie etwa bei Ölsäure beobachtet wurde. Unter den bisherigen Versuchsbedingungen kommt es aber nicht zur Absättigung aller Doppelbindungen der mehrfach ungesättigten Säuren, da sowohl in den Versuchen mit den geeigneten Mengen Leinölsäure als auch Linolensäure die enzymatisch katalysierte Sauerstoffaufnahme viel früher zum Stillstand kommt. Ob in dieser Beziehung mit angereichertem Enzym grössere Wirkungen zu erzielen sind, bleibt zu untersuchen.

b) Einfluss von Carotin auf die Leinölsäureoxydation. In einigen Versuchen wurde geprüft, ob Carotin, das als Akzeptor für den an die ungesättigten Fettsäuren angelagerten Sauerstoff wirken kann, die enzymatische Oxydation der Leinölsäure beeinflusst<sup>3)</sup>. In diesen Versuchen zeigte sich meist eine geringe

<sup>1)</sup> Bei der üblichen Darstellung und Reinigung der Linolensäure über die Hexabrom-stearinsäure werden Isomere erhalten (*Erdmann* und *Bedford*, B. **42**, 1324 (1909)), deren natürliches Vorkommen ungewiss ist. Die Frage, ob die Konfiguration der verschiedenen Linolensäuren für die enzymatisch bewirkte Oxydation eine Rolle spielt, muss noch ganz ausser Betracht gelassen werden.

<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. **92**, 231 (1914).

<sup>3)</sup> Über den Einfluss von Carotin auf die Autoxydation von Leinölsäure s. *W. Franke*, Z. physiol. Ch. **212**, 234 (1932). — *B. R. Monaghan* und *F. O. Schmidt*, J. Biol. Chem. **96**, 387 (1932).

Verzögerung der Leinölsäure-Oxydation in Gegenwart von Carotin, um etwa 5—20 %. In der in Tabelle V aufgeführten Versuchsreihe beträgt die Verzögerung über alle Messzeiten 6 %. Gelegentlich war dieser Einfluss des Carotins bei Reaktionsbeginn am deutlichsten, um im weiteren Verlauf abzunehmen. Diese in Gegenwart von Carotin schwach verzögerte enzymatische Leinölsäure-Oxydation dürfte noch etwas grösser sein, als die Sauerstoffwerte des vollständigen Ansatzes (Versuch III in Tabelle V) ohne weiteres erkennen lassen, da Carotin für sich — mit oder ohne Enzym (Versuche II und V) — ansehnliche Mengen Sauerstoff aufnimmt. In den Versuchen der Tabelle Va mit Linolensäure wird in Gegenwart von Carotin etwas mehr (10 %) Sauerstoff aufgenommen (vgl. Vers. I, IV und V). Dieser nur wenig erhöhte Sauerstoffverbrauch dürfte aber einer Autoxydation des Carotins zuzuschreiben sein.

**Tabelle V.**  
Leinölsäure + Carotin.

Leinölsäure in NaOH gelöst, mit HCl neutralisiert; 1,0 mg Carotin in 0,25 cm<sup>3</sup> Dioxan; 0,04-m. Phosphat p<sub>H</sub> = 6,5. — Der im Kontrollversuch ermittelte Unterdruck (entsprechend 20 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>), der beim Zukippen des Enzyms zur Dioxan enthaltenden Versuchslösung entsteht, wurde in den Versuchen I, II und III in Abzug gebracht.

	Enzym cm <sup>3</sup>	Leinöl- säure mg	Carotin mg	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach Stunden		
				½	3	6
I	1	14	—	359	752	914
II	1	—	1,0	33	70	104
III	1	14	1,0	338	707	860
IV	—	14	—	3	3	12
V	—	—	1,0	17	31	45
VI	—	14	1,0	6	16	32

**Tabelle Va.**  
Linolensäure + Carotin.

Linolensäure mit der berechneten Menge NaOH gelöst; Carotin in Dioxan (1 cm<sup>3</sup> = 4 mg Carotin); 0,04-m. Phosphat p<sub>H</sub> = 6,5.

	Enzym cm <sup>3</sup>	Linolen- säure mg	Carotin mg	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach Stunden		
				¼	4	7
I	1	2,78	—	214	344	350
II	1	—	0,4		10	22
III	1	—	1,0		19	45
IV	1	2,78	0,4	240	373	391
V	1	2,78	1,0	235	363	384
VI	—	2,78	—			7
VII	—	—	0,4			28
VIII	—	—	1,0			15

In Gegenwart von Leinölsäure ist die Autoxydation des Carotins sichtlich geringer (Versuch VI in Tabelle V); die gleiche Beobachtung wurde bei den Versuchen mit Ölsäure gemacht (Versuch VI in Tabelle II). Ob hier eine spezifische Wirkung der ungesättigten Fettsäuren oder lediglich eine unspezifische Milieubeeinflussung (z. B. eine „Emulgator“-Wirkung der Fettsäuren) vorliegt, bleibe dahingestellt. Die in den vollständigen Versuchen mit Enzym + Leinölsäure + Carotin von letzterem allein infolge Autoxydation aufgenommene Sauerstoffmenge ist nicht genau anzugeben; sie ist wahrscheinlich auch hier — wie die aufgeföhrten Zahlen erkennen lassen — viel geringer, als Carotin allein bei Abwesenheit von Leinölsäure aufnimmt.

Carotin nimmt in manchen Versuchen in Gegenwart der Enzymlösung etwas mehr Sauerstoff auf als ohne Enzym (vgl. Tabellen II und V). Ob hier eine katalytische Wirkung vorliegt, ist unsicher; wahrscheinlicher dürften die Bedingungen für die Autoxydation des Carotins infolge einer besseren Dispergierung desselben etwas günstiger sein.

Die Feststellung, dass Carotin in dem System: Lipoxydase + Leinölsäure bzw. Linolensäure keine in Betracht kommende Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs<sup>1)</sup> bewirkt, gibt einen Hinweis auf den Mechanismus der Sekundäroxydation des Carotins: Die ungesättigten Fettsäuren vermögen höchstens so viel Sauerstoff auf Carotin zu übertragen, wie sie bei der enzymatischen Oxydation in Abwesenheit von Carotin aufnehmen; sie unterliegen bei diesem Vorgang offenbar einer Veränderung, vermutlich oxydativer Art, die eine wiederholte Reaktion mit dem Enzym und Sauerstoff ausschliesst. Diese Folgerung hat sich auch in den früher mitgeteilten Versuchen<sup>2)</sup> über die Abhängigkeit der Carotin-Oxydation von der Menge ungesättigten Fettes bzw. ungesättigter Fettsäuren ergeben.

e) Über den Reaktionsverlauf. Der zeitliche Verlauf der enzymatischen Oxydation und seine Abhängigkeit von der Enzym- und Substratmenge soll an einigen Beispielen gezeigt werden, deren Ergebnisse in Tabelle VI und den Kurven der Figg. 1—4 wiedergegeben sind. In diesen Versuchen wurde die Fettsäure in wässriger Lösung als Natriumsalz bzw. als Emulsion der Reaktionslösung zugefügt.

Die Menge des von Leinölsäure und Linolensäure aufgenommenen Sauerstoffs steigt erwartungsgemäss mit der Enzymmenge, wenn auch unter den Versuchsbedingungen in der Regel keine strenge Proportionalität zwischen Enzymmenge und Sauerstoffverbrauch festzustellen ist.

In den Versuchen der Tabelle VI, sowie der Figg. 2 und 3, wurden sehr geringe Mengen Enzym verwendet, um eine „Sättigung“ des Enzyms mit Substrat (s. die hierauf bezügliche Vorbemerkung im methodischen Abschnitt) über eine möglichst lange Versuchszeit

<sup>1)</sup> Vgl. besonders die Versuche in Tabelle Va, in denen die Oxydation von Linolensäure bis zu ihrem Ende und darüber hinaus verfolgt wurde. Würde die Linolensäure bei dem Vorgang der Sekundäroxydation unverändert regeneriert werden, so sollte in Gegenwart von Carotin die Sauerstoffaufnahme um ein Mehrfaches erhöht sein, was nicht der Fall ist.

<sup>2)</sup> Helv. **24**, 465, 646 (1941).

zu erreichen. Der Sauerstoffverbrauch ist in diesen Versuchen relativ am grössten mit den mittleren Enzymmengen; die kleinsten, noch gut messbaren Sauerstoffverbrauch liefernden Enzymmengen (etwa  $0,02 \text{ cm}^3$  Enzymlösung) ergeben meistens über die ganze Versuchszeit auffallend niedrige Werte.

Tabelle VI.

$\text{O}_2$ -Aufnahme mit kleinen Enzymmengen.  
Leinölsäure in  $\text{NaOH}$  gelöst, mit  $\text{HCl}$  neutralisiert.

Enzym $\text{cm}^3$	Leinöl- säure mg	mm $^3$ $\text{O}_2$ nach Minuten			
		10	30	60	180
0,02	28	10	13	20	33
0,02	56	11	14	20	32
0,05	28	60	84	107	186
0,10	28	104	163	201	312
0,15	28	106	180	228	360

In Fig. 1 und 4 kommt der Einfluss steigender Mengen Leinölsäure und Linolensäure auf die Reaktionsgeschwindigkeit zum Ausdruck. In den Versuchen der Fig. 4 mit  $0,25 \text{ cm}^3$  Enzym steigt die in gleichen Zeiten aufgenommene Sauerstoffmenge — abgesehen von dem nahezu gleich hohen Sauerstoffverbrauch in den ersten 10—20 Minuten — bis zu 70 mg Leinölsäure in  $3,8 \text{ cm}^3$  Versuchslösung stark an. Unter unseren Versuchsbedingungen ist die Reaktionsgeschwindigkeit erst bei verhältnismässig hohen Substratkonzentrationen unabhängig von der zugefügten Menge Substrat, wenigstens in den ersten Stunden. Das ist z. B. annähernd der Fall in den Versuchen I und Ia der Fig. 2 mit 28 bzw. 56 mg Leinölsäure und  $0,025 \text{ cm}^3$  Enzym in  $3,8 \text{ cm}^3$  Versuchslösung, sowie in den Versuchen VI und VII (Abb. 4) mit  $0,05 \text{ cm}^3$  Enzym und 56 bzw. 70 mg Leinölsäure (vgl. ferner Tabelle VI). Manchmal findet sich mit höheren Substratmengen eine kleine Erniedrigung in der Sauerstoffaufnahme, die aber unter den Bedingungen der bis jetzt besprochenen Versuche nur in den Anfangszeiten besteht (vgl. Fig. 2).

Die Sauerstoffaufnahme ist unmittelbar nach dem Zusammenfügen von Enzym und Substrat, d. h. in den ersten Messzeiten von 5, 10 und 20 Minuten, am grössten. Im weiteren Reaktionsverlauf treten zwischen bestimmten Versuchen bemerkenswerte Unterschiede auf. In der Regel nimmt die aufgenommene Menge Sauerstoff mit der Versuchsdauer fortschreitend ab, kenntlich an einer mehr oder weniger deutlichen Abflachung der dieses Verhältnis veranschaulichenden Kurven (vgl. Fig. 1). Diese „zweite Stufe“ der Oxydation zeigt in den Versuchen I—IV der Fig. 4 über längere Zeit annähernd linearen Verlauf. Da in diesen Versuchen mit  $0,25$ — $2 \text{ cm}^3$  Enzym

keine Absättigung des Enzyms mit Substrat über die ganze Versuchszeit gewährleistet ist, muss die Reaktionsgeschwindigkeit durch die

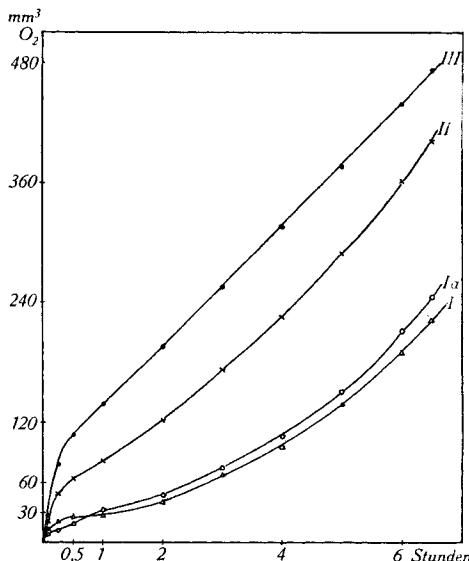


Fig. 2.

Leinölsäure mit NaOH gelöst, Lösung mit HCl neutralisiert; in der Versuchslösung 0,05-m. Phosphat  $p_H = 6,5$ .

I:  $0,025 \text{ cm}^3$  Enzym + 28 mg Leinölsäure    II:  $0,05 \text{ cm}^3$  Enzym + 28 mg Leinölsäure  
Ia:  $0,025 \text{ cm}^3$     „    + 56 mg    „    III:  $0,1 \text{ cm}^3$     „    + 28 mg    „

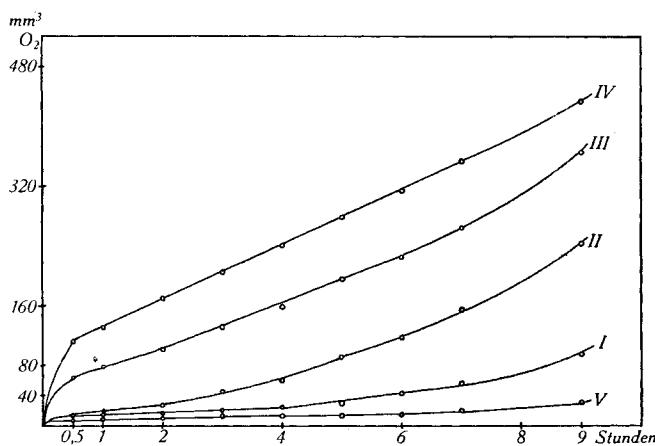


Fig. 3.

In jedem Versuch (mit Ausnahme V) die angegebenen, geringen Enzymmengen, 14 mg Leinölsäure (Na-Salz, mit HCl neutralisiert); 0,05-m. Phosphat  $p_H = 6,5$ .

I:  $0,008 \text{ cm}^3$  Enzym                  IV:  $0,064 \text{ cm}^3$  Enzym  
II:  $0,016 \text{ cm}^3$     „                  V: ohne                  „,  
III:  $0,032 \text{ cm}^3$     „

jeweils vorhandenen Substratmengen in noch nicht genau angebbarem Mass mitbestimmt werden. In anderen Versuchen erfolgt — nach dem Abklingen der auch hier vorhandenen grossen Anfangsgeschwindigkeit — umgekehrt ein Wiederanstieg der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Versuchszeit. Unter Umständen ist in diesen Versuchen die Steilheit der Kurven am Ende der Versuchszeit annähernd ebenso gross wie am Anfang. Dieser auf die Entwicklung „autokatalytischer“ Vorgänge hinweisende Reaktionsverlauf wurde dann beobachtet, wenn sehr geringe Enzymmengen zur Anwendung gelangten (vgl. Figg. 2, 3 sowie die Kurven V—VII in Fig. 4).

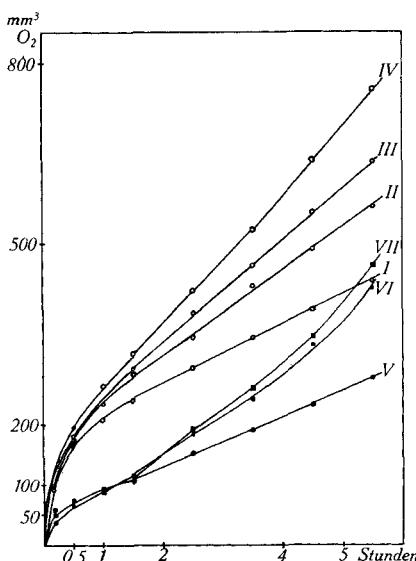


Fig. 4.

Versuche I—IV —○— mit 0,25 cm<sup>3</sup> Enzym; V—VII —●— mit 0,05 cm<sup>3</sup> Enzym.

I: 28 mg Leinölsäure	V: 28 mg Leinölsäure
II: 42 mg „	VI: 56 mg „
III: 56 mg „	VII: 70 mg „
IV: 70 mg „	

Unter etwas anderen Bedingungen wurden die in Fig. 5 wiedergegebenen Versuche durchgeführt. Hier wurden statt wässriger Lösungen 1 bzw. 2 cm<sup>3</sup> reine Leinölsäure zugesetzt und mit der gepufferten Enzymlösung geschüttelt. Am Ende der Versuche schwamm die Hauptmenge der zugefügten Leinölsäure auf der Oberfläche der Reaktionslösung; eine feinere und dauerhaftere Emulgierung liegt also nicht vor. Die Kurven I und II zeigen den Sauerstoffverbrauch bei der Autoxydation der Leinölsäure. Bei dem grossen Überschuss an Leinölsäure scheint es gerechtfertigt, auch in den entsprechenden Versuchen mit Enzym + Leinölsäure eine Autoxydation ähnlichen

Umfanges anzunehmen. Demzufolge wurden die Kurven IV—VIII nach Abzug der aus den Kurven I und II sich ergebenden Sauerstoffmengen erhalten. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist auch in diesen Versuchen am Anfang am grössten. Nach dem dann folgenden Abfall ist in den Versuchen mit  $0,25 \text{ cm}^3$  Enzym (Kurven III und IV) — und weniger deutlich auch mit  $0,5 \text{ cm}^3$  Enzym (Kurven V und VI) — ein Wiederanstieg der Reaktionsgeschwindigkeit zu erkennen. Man kann hierfür die Annahmen machen, dass in dem späteren Verlauf dieser Versuche entweder die Enzymwirksamkeit wieder zunimmt, dass es zu einer Weiteroxydation von Spaltprodukten kommt, oder — was wahrscheinlicher ist — dass es zur Entwicklung „autokatalytischer“, vielleicht im Sinne von Kettenreaktionen zu deutender Vorgänge kommt<sup>1)</sup>. Die in einer vorhergehenden Mitteilung<sup>2)</sup>

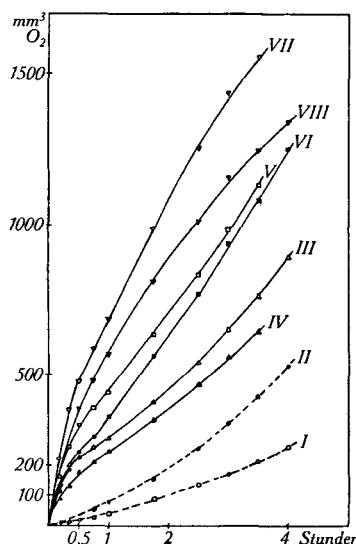


Fig. 5.

Leinölsäure in unverdünnter Form zugesetzt. Wässrige Phase (Enzym und Phosphatpuffer) =  $2,8 \text{ cm}^3$ . — Kurven III—VIII nach Abzug der von Leinölsäure allein (Kurven I und II) aufgenommenen Menge  $\text{O}_2$ .

I: $1 \text{ cm}^3$ Leinölsäure (ohne Enzym)	V: $0,5 \text{ cm}^3$ Enzym + $1 \text{ cm}^3$ Leinölsäure
II: $2 \text{ cm}^3$ „ „ „	VI: $0,5 \text{ cm}^3$ „ + $2 \text{ cm}^3$ „
III: $0,25 \text{ cm}^3$ Enzym + $1 \text{ cm}^3$ Leinölsäure	VII: $1,0 \text{ cm}^3$ „ + $1 \text{ cm}^3$ „
IV: $0,25 \text{ cm}^3$ „ + $2 \text{ cm}^3$ „	VIII: $1,0 \text{ cm}^3$ „ + $2 \text{ cm}^3$ „

<sup>1)</sup> Das Auftreten von Kettenreaktionen würde bedingen, dass die Sauerstoffaufnahme nach der Einleitung der Reaktion durch die Lipoxydase weiterhin unabhängig vom Mechanismus der Enzymkatalyse erfolgen kann. Die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs wurde in Versuchen (mit relativ grossen Enzym- und geringen Substratmengen) gemessen, in denen das Vorliegen von Kettenreaktionen nicht sichtbar zum Ausdruck kommt. Ob in den anderen Versuchen, in denen sich Kettenreaktionen zu entwickeln scheinen, die Sauerstoffaufnahme quantitativ anders ist, wurde nicht gemessen.

<sup>2)</sup> Helv. **24**, 465 (1941).

untersuchte Wirkung von „Antioxydantien“ auf die Sekundäroxydation des Carotins würde sich in diesen letzten Zusammenhang einordnen lassen. Hierzu sollen besondere Untersuchungen erfolgen. Weiter zeigen die Kurven eine über die ganze Versuchszeit etwas geringere enzymatische Leinölsäureoxydation mit der grösseren Menge Leinölsäure<sup>1)</sup>.

### 3. Der Einfluss von Wärme und Dialyse.

Die Wärmeempfindlichkeit einer bei  $p_H$  etwa 6,5 gepufferten Enzymlösung zeigen die Werte in Tabelle VII. Während 15 Minuten langes Erwärmen bei 55—57° die Aktivität nur andeutungsweise herabsetzt, inaktiviert eine Temperatur von 72—74° nahezu vollkommen. Ebenso wurde eine ungepufferte Enzylösung nach 20 Minuten langem Erwärmen bei 72—74° inaktiviert.

Tabelle VII.

#### Einfluss von Wärme.

Je 10 cm<sup>3</sup> Enzylösung in 0,02-m. Phosphatpuffer ( $p_H = 6,5$ ) wurden im Wasserbad erwärmt. — Versuchslösungen: Die angegebenen Mengen Enzym, 1 em<sup>3</sup> 0,2-m. Phosphat ( $p_H = 6,5$ ), 1 cm<sup>3</sup> 0,02-m. Linolensäure.

	Erwärmung	em <sup>3</sup> Enzym	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach Stunden		
			½	2	4
I	nicht erwärmt	0,5	213	267	336
Ia		1,0	277	376	420
II	15 Min. 55—57°	0,5	182	252	327
IIa		1,0	250	350	405
III	20 Min. 72—74°	0,5	3	14	28
IIIa		1,0	4	16	20
IV	20 Min. 85—87°	0,5	0	6	9
IVa		1,0	0	5	8

Durch eine länger dauernde Dialyse gegen destilliertes Wasser wird die Enzylösung deutlich geschwächt, z. B. in den Versuchen der Fig. 6 unter Zugrundelegung der 90-Minuten-Werte um 32—35 %. In einer anderen Versuchsreihe, in der die Dialyse auf 65 Stunden ausgedehnt wurde, betrug die an der Sauerstoffaufnahme gemessene Abnahme der Wirkung ebenfalls nicht über 35 %. Eine völlige Inaktivierung der Enzylösung wurde also durch die einfache Dialyse bei weitem nicht erreicht. Bei der Verfolgung der Carotinentfärbung, die kaum geringere Unterschiede in der Enzymaktivität erkennen lässt, wurde in unseren früheren Versuchen eine Schwächung

<sup>1)</sup> Diese Feststellung über den Einfluss der Substratmenge kommt nicht oder nur in der Anfangsreaktion zum Ausdruck, wenn man die bei der Autoxydation der Leinölsäure aufgenommene Sauerstoffmenge nicht in Abzug bringt.

der Enzymlösung nach 16—24-stündiger Dialyse nicht oder nur andeutungsweise beobachtet.

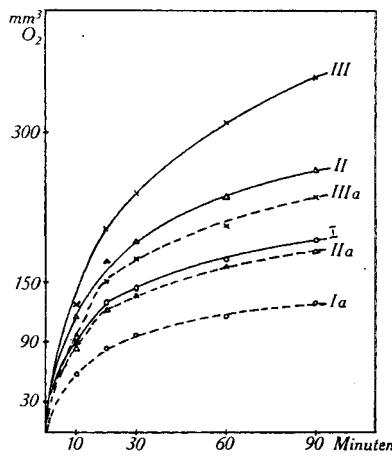


Fig. 6.  
Wirkung der Dialyse.

Ausgezogene Kurven: nicht dialysiertes Enzym; gestrichelte Kurven: 45 Stunden im Cellophanschlauch bei Raumtemperatur gegen destilliertes Wasser dialysiertes Enzym.

— Die nicht dialysierte Enzymlösung wurde mit Wasser auf das Volumen der dialysierten Enzymlösung gebracht.

I und Ia:  $0,25 \text{ cm}^3$  Enzym + 5,76 mg Linolensäure

II und IIa:  $0,5 \text{ cm}^3$  „ + 5,76 mg „

III und IIIa:  $1,0 \text{ cm}^3$  „ + 5,76 mg „

Die Oxydation ungesättigter Fettsäuren kann von einer Reihe anorganischer oder organischer Stoffe bekannter Struktur beschleunigt werden. Es erscheint deshalb von Bedeutung, dass die Wirkksamkeit des verwendeten wässrigen Auszuges aus der Sojabohne an einen thermolabilen Faktor gebunden ist, den wir demzufolge als ein Enzym im engeren Sinne ansprechen können. Der beobachtete Aktivitätsverlust der Enzylösung bei der Dialyse kann auf der Entfernung eines dialysablen Bestandteiles des Enzyms (Wirkgruppe) oder eines aktivierenden Stoffes beruhen; ebenso sehr ist aber auch eine Schädigung des Enzyms, z. B. infolge einer Denaturierung des Enzymproteins, während der lange ausgedehnten und bei Zimmertemperatur durchgeföhrten Dialyse in Betracht zu ziehen. Positiv zeigen die Dialyseversuche, dass kein leicht dialysabler Katalysator vorliegt, da nur eine Schwächung, aber kein vollständiger Aktivitätsverlust durch die Dialyse erreicht wurde.

#### 4. Die Wirkung von Cyanid.

In vorhergehenden Versuchen<sup>1)</sup>, in denen die Entfärbung von Carotin beobachtet wurde, war keine regelmässige Hemmungs-

<sup>1)</sup> Helv. 24, 646 (1941).

wirkung des Cyanids zu beobachten. In den meisten dieser Versuche bewirkte Cyanid keine Hemmung. Entsprechende Versuche wurden nun unter Messung des Sauerstoffverbrauchs gemacht. In Tabelle VIII

**Tabelle VIII.**  
Einfluss von Blausäure.

Im Hauptraum: 0,125-m. Leinölsäure, 0,05-m. Phosphat, HCN; im Seitengefäß: Enzym.

	Enzym cm <sup>3</sup>	Phosphat pH	HCN (Molarität)	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach Stunden				% Hemmung nach 4 Std.
				½	1	2	4	
I	0,025	5,3	—	17	27	38	67	
Ia	0,025	5,3	0,02	16	23	32	50	25
II	0,10	5,3	—	84	108	143	204	
IIa	0,10	5,3	0,02	86	103	128	177	14
III	0,10	6,5	—	102	125	154	204	
IIIa	0,10	6,5	0,02	96	111	124	155	25

ist eine Versuchsreihe mit Cyanid wiedergegeben. Die Versuche mit Cyanid zeigen einen geringeren Sauerstoffverbrauch als die entsprechenden Vergleichsversuche ohne Cyanid; jedoch beträgt diese Abnahme maximal nur 25 % des Versuchs ohne Cyanid. Auch dann, wenn das Enzym vor Zugabe der Leinölsäure etwa 45 Minuten bei 35° mit Cyanid inkubiert worden war, trat keine deutlichere Hemmungswirkung hervor. Die Anfangsgeschwindigkeit wurde in diesen und den meisten anderen Versuchen durch Cyanid am wenigsten beeinflusst. Ähnliches Ergebnis hatte folgender Versuch, in dem 1 cm<sup>3</sup> reine Leinölsäure, 0,5 cm<sup>3</sup> Enzym und 1 cm<sup>3</sup> 0,1-m. NaCN (neutralisiert) in 3,8 cm<sup>3</sup> bei pH 6,5 gepufferter Reaktionslösung angewandt wurden:

		O <sub>2</sub> -Verbrauch nach:	
		40 Min.	120 Min.
Leinölsäure . . . . .		24 mm <sup>3</sup>	105 mm <sup>3</sup>
„ + NaCN . . . . .		38 „	147 ..
„ + Enzym . . . . .		402 „	832 ..
„ + „ + NaCN . . . .		340 „	638 ..

Unter Berücksichtigung der von Leinölsäure ohne Enzym aufgenommenen Sauerstoffmenge ergibt sich eine Hemmung von 22 bis 32 %.

Die Cyanidwirkung auf die enzymatische Leinölsäureoxydation ist also — besonders in Anbetracht der hohen Cyanidkonzentration in den angeführten Versuchen — nur gering. Hierbei bleibt noch offen, ob es sich dabei überhaupt um eine spezifische Wirkung des

Cyan-ions auf das Enzym handelt; es besteht u. a. auch die Möglichkeit, dass Cyanid, ähnlich wie andere „Inhibitoren“, in den Reaktionsverlauf eingreift. In ihrer — wenigstens relativen — Cyanid-Unempfindlichkeit unterscheidet sich die Lipoxydase offenbar von den bekannten typischen Oxydasen, die infolge ihres Schwermetallgehalts meist stark Cyanid-empfindlich sind. Jedoch möchten wir betonen, dass sich allein auf Grund des wenig ausgeprägten Einflusses des Cyan-ions auf die Lipoxydase noch nicht ausschliessen lässt, dass dieses Enzym Schwermetall als wirksamen Bestandteil aufweist. Der Einfluss des Cyan-ions wird in manchen Fällen nicht von der Natur des Enzyms bzw. eines in gleicher Weise wirksamen Stoffs bestimmt, sondern kann von dem zu oxydierenden Substrat abhängen. Zum Beispiel wird die durch Hämin katalysierte Oxydation ungesättigter Fette und ungesättigter Fettsäuren durch Blausäure nicht gehemmt<sup>1)</sup><sup>2)</sup>, wohl aber die Häminkatalyse mit zahlreichen anderen Substraten<sup>3)</sup>. Die Oxydation von Leinöl mit Glutathion als Katalysator ist praktisch Cyanid-unempfindlich<sup>4)</sup>. Hier sind auch neuere Befunde von besonderem Interesse, die *H. Theorell*<sup>5)</sup> über das Verhalten von zwei verschiedenen, Protohämin enthaltenden Peroxydasen in Meerrettich und Rübe erhoben hat: Peroxydase I

„oxydiert aerob Dioxymaleinsäure direkt, II erst nach Zusatz von Hydrochinon. HCN, m/100000, hemmt in diesem Test mit I fast vollständig, mit II + Hydrochinon gar nicht. Dieser Umstand wird wohl früher schwer verständliche, partielle Hemmungserscheinungen aufklären.“

Unsere Versuche mit Natriumcyanid sollen später durch Heranziehung anderer Schwermetallgifte<sup>6)</sup>, insbesondere des mit 2-wertigem Eisen reagierenden Kohlenoxyds, ergänzt werden.

#### Zusammenfassung.

Es wird die durch die „Lipoxydase“ bewirkte Sauerstoffaufnahme ungesättigter Fettsäuren untersucht. Zur Verwendung gelangten wässrige Auszüge aus der entfetteten Sojabohne.

Die Anlagerung von Sauerstoff an die einfach ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure und Ricinolsäure) wird von dem Enzym

<sup>1)</sup> *M. E. Robinson*, Biochem. J. **18**, 255 (1924).

<sup>2)</sup> *R. Kuhn* und *K. Meyer*, Z. physiol. Ch. **185**, 193 (1929).

<sup>3)</sup> *H. A. Krebs*, Bioch. Z. **204**, 322 (1929).

<sup>4)</sup> *F. G. Hopkins*, Biochem. J. **19**, 787 (1925).

<sup>5)</sup> *Ark. Kem., Min. Geol.* **14** B, Nr. 20 (1941).

<sup>6)</sup> Die mit dem „lipoxydatischen System“ erfolgende Sekundäroxydation des Carotins wird durch Natriumsulfid (bei schwach alkalischer Reaktion) stark gehemmt. Auch Natriumazid scheint in diesem Test (bei schwach saurer Reaktion) eine gewisse Hemmungswirkung zu besitzen (Verh. Schweiz. Physiol., Juli 1941). Der unmittelbare Einfluss dieser Stoffe auf die enzymatische Fettsäuren-Oxydation wurde noch nicht untersucht.

nur in geringem Umfange katalysiert. Diese Säuren sind auch bei der Sekundäroxydation des Carotins verhältnismässig wenig wirksam.

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren nehmen in Anwesenheit des Enzyms grössere Mengen Sauerstoff auf. Unter Berücksichtigung der Jodzahlen der verwendeten Präparate ergibt sich, dass die enzymatische Oxydation der zweifach ungesättigten Linolsäure im wesentlichen zur Anlagerung von 1 Mol  $O_2$ , und die der dreifach ungesättigten Linolensäure zur Anlagerung von 2 Molen  $O_2$  pro Mol Säure führt.

Der enzymatisch bewirkte Sauerstoffverbrauch der ungesättigten Fettsäuren ist in Gegenwart von Carotin nicht wesentlich erhöht.

Die Sauerstoffaufnahme erfolgt mit grosser Anfangsgeschwindigkeit, um nach den ersten Messzeiten von etwa 5—30 Minuten abzunehmen. In bestimmten Versuchen lässt der Reaktionsverlauf die Annahme zu, dass es zur Entwicklung „autokatalytischer“, wahrscheinlich als Kettenreaktionen zu deutender Vorgänge kommen kann.

Die Lipoxydase ist thermolabil. Eine bis auf 65 Stunden ausgedehnte Dialyse vermindert die Wirksamkeit der Enzymlösung etwa um ein Drittel.

Natriumcyanid, in Konzentrationen bis zu 0,025-n. in der Versuchslösung, vermag unter den Versuchsbedingungen die Enzymwirkung höchstens um ein Drittel herabzusetzen.

Basel, Augenklinik der Universität.

---

## 152. Die Überführung von Scillaren A in Epi-allo-lithocholsäure ( $3\beta$ -Oxy-allo-cholansäure).

(17. Mitteilung über Herzglykoside<sup>1</sup>)

von Arthur Stoll und Jany Renz.

(30. X. 41.)

Durch katalytische Hydrierung von Anhydro-scillarin A ist Allo-cholansäure gewonnen worden<sup>2</sup>). Scillarin A, das Aglykon des wichtigsten Meerzwiebelglykosids, Scillaren A, wurde so ohne Verlust eines Kohlenstoffatoms in eine Grundsubstanz der Gallensäuren übergeführt; das Kohlenstoffskelett des Scillarens A und seiner Derivate ist durch diese Umsetzung sichergestellt. In der auf dieser Grundlage abgeleiteten Strukturformel von Scillaren A blieb die Lage des Zuckers und einer dazu benachbarten Doppelbindung

<sup>1</sup>) 16. Mitt. „Enzymologia“ 7, 362 (1939).

<sup>2</sup>) A. Stoll, A. Hofmann und A. Helfenstein, Helv. 18, 644 (1935).