

IV.

Arbeiten aus dem pharmakologischen Institut der deutschen
Universität in Prag.

53. Zur Kenntniss des oxydativen Fermentes.

von

Prof. Dr. Julius Pohl,
Assistent am Institut.

In Verfolgung der Anschauungen Schmiedeberg's über die Anwesenheit von Enzymen in den Geweben hat Jaquet¹⁾ nachgewiesen, dass auch wässrige Extracte von Organen aromatischen Adehyden gegenüber oxydativ zu wirken vermögen. Da das oxydirende Agens in diesen wässrigen Lösungen durch Erhitzen zerstört, durch Alkohol in den Organen gefällt wird, ohne seine Wasserlöslichkeit zu verlieren, so spricht Jaquet von einem oxydativen Fermente. Der Fortschritt der Jaquet'schen Mittheilung liegt darin, gezeigt zu haben, dass das Oxydationsvermögen nicht an das Unverletztsein thierischer Zellen gebunden ist.

Es hat ferner G. Bertrand²⁾ aus dem Saft des Lackbaumes ein Ferment gewonnen, Laccase genannt, das auf den Lackfarbstoff, das Laccol, ausserdem aber auch auf Hydrochinon und Pyrogallol, Tannin und Gallussäure oxydirend wirkt. Da es neben diesen 2 Fermenten noch ein hydroxylirendes Ferment (Nasse³⁾, ein glycolytisches Ferment (Lépine) geben soll, wir ausserdem in der Bildung von Indophenol mit Hülfe von Gewebsextracten durch Spitzer (s. S. 69) ein wasserstoffabspaltendes Ferment kennen gelernt haben, so stellte ich mir die Frage: ob diese Oxydationsfermente unter einander verschieden sind oder nicht, d. h. ob eine Fermentlösung, die sich nach einer Richtung hin wirksam erweist, auch nach einer anderen leistungsfähig ist. Ich begann damit, festzustellen, ob die nach

1) Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. XXIX. S. 386.

2) Comptes rendus 1895. 5./II.

3) Sepr.-Abdr. der Rostocker Zeitung. 1895. Nr. 3.

Jaquet gewonnenen oxydirenden Fermentlösungen auch Stoffen der Fettreihe gegenüber wirksam sind.

Während des Anstellens der zu schildernden Versuche sind Arbeiten veröffentlicht worden, in denen mit diesem Thema in Bezug stehende Fragen erörtert werden.

Spitzer¹⁾ zeigte, dass gewisse Organextracte Glycose zu oxydiren vermögen, Salkowski²⁾ brachte eine Notiz über die Verbreitung des oxydirenden Fermentes in den Geweben. Abelous³⁾ und Bierné fanden das Optimum der Leistungsfähigkeit des Fermentes bei 60° und zeigten, dass dasselbe nicht in Glycerin überführbar sei.

Die nachstehend mitgetheilten Versuche sind mit frischer Leber, theils Hunde-, theils Rindsleber durchgeführt. Als Maass der Oxydationskraft wurde der Uebergang von Formaldehyd in Ameisensäure (letztere nach Scala⁴⁾ bestimmt) benutzt.⁵⁾

Die zerkleinerten Lebern wurden mit Alkohol durch 24 Stunden stehen gelassen, dann durch Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung digerirt (bei 38°), die Colatur nach Zusatz von kohlensaurem Natron zum Versuche verwendet. Die eine Hälfte der von Fett und Zelldetritus trübten Colatur wird nach dem Kochen, die andere Hälfte direct mit 2 cem 40 proc. Formaldehydlösung versetzt. Die angeführten Zahlen sind also, wo nichts weiter bemerkt ist, die Differenzwerthe von ungekochter und gekochter Fermentlösung.

I. Versuche mit Lebereextracten.

a) In welchem Umfange vermögen dieselben Formaldehyd zu oxydiren?

Die Antwort liefert folgende Zusammenstellung der Versuche:

1. Versuch. Extract aus $\frac{1}{2}$ Hundeleber liefert 0,0036 g Ameisensäure.
2. Versuch. Extract aus $\frac{1}{2}$ Kilo frischer Rindsleber liefert 0,0087 g Ameisensäure.
3. Versuch. Extract aus 200 g Rindsleber liefert innerhalb 1 Stunde 0,00679 g Ameisensäure, Extract aus 200 g Rindsleber liefert innerhalb 15 Stunden 0,03298 g Ameisensäure.
4. Versuch. Der Extract aus 250 g Leber bleibt 16 Stunden im Eiskasten. Er liefert dann 0,031 g Ameisensäure.

1) Berliner klinische Wochenschr. 1894. Nr. 42.

2) Centralbl. f. med. Wissenschaften. 1894. Nr. 52.

3) Arch. de phys. 1895. No. 2. „Mécanisme des oxydations organiques.

4) Chem. Ber. Bd. XXIII. Ref. 599.

5) Siehe meine Arbeit über Methylalkohol. Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. XXXI. S. 281.

5. Versuch. Extract aus 220 g frischer Leber liefert 0,0055 g Ameisensäure. Der gekochte Extract lieferte ebenfalls 0,0056 g Ameisensäure. Der Versuch ist somit negativ ausgefallen.

Es vermag somit der Gewebsextract, ebenso wie aromatische Aldehyde, auch Formaldehyd zu oxydiren; beide Leistungen können auf ein Ferment bezogen werden. Die erhaltenen Werthe sind klein, jedoch im Durchschnitte nicht kleiner als die Zahlen Jaquet's für die Oxydation des Benz- und Salicylaldehyds, wenn man die aufgenommenen Sauerstoffmengen berechnet. Ferner gibt es (Vers. 5) Fälle, wo, trotz gleicher äusserer Versuchsbedingungen, die Extracte überhaupt nicht wirken.

Ebenso stellte sich bei Extraction der Organe mit Fluornatriumlösung und mit Chloroformwasser die Unwirksamkeit der Extracte heraus. Der Einwand, dass die beobachtete Oxydation überhaupt nur Fäulnissphänomen gewesen, wird durch die kräftige antiseptische Wirkung des Formaldehyds einerseits, anderseits durch die negativen Versuche widerlegt; ferner gaben auch Versuche, wo die Digestion der Organextracte im Brütöfen nur 3—4 Stunden dauerte, den obigen gleiche Werthe.

Zur Beantwortung der Frage: ist das oxydative Princip aus bereits verwendeten Lösungen wieder gewinnbar, d. h. besitzt es gleich anderen Fermenten eine relative Unzerstörbarkeit, wurde der folgende Versuch angestellt. Ein Leberextract wurde in beschriebener Weise mit Formaldehyd versetzt. Nach 12 Stunden wurde in einem Theile die gebildete Ameisensäure bestimmt, wobei sich der Extract als oxydationstüchtig erwies. Der andere Theil wurde mit dem fünffachen Volumen Alkohol gefällt, der Niederschlag abfiltrirt, abgepresst, durch 3½ Stunden mit physiologischer Kochsalzlösung extrahirt, der neuerliche Extract in 2 Hälften getheilt, die eine Hälfte gekocht, die andere nativ nach Aldehydzusatz 12 Stunden im Brütöfen gehalten: es wurde keine Ameisensäure gebildet.

Die Anwendung der Wittich'schen Methode des Ausziehens mit Glycerin, Alkoholfällung, Extraction dieser mit 0,6 proc. Kochsalzlösung ergab ein negatives Resultat.

b) Die Indophenolreaction durch Organextracte.

In einer die bisherigen Oxydationsarbeiten kritisch beleuchtenden Studie hat W. Spitzer¹⁾ die bereits von Ehrlich beobachtete Bildung von Indophenol aus α -Naphtol und Paraphenyldiamin durch

1) Pflüger's Archiv. Bd. LX. S. 303: „Die zuckerzerstörende Kraft des Blutes und der Gewebe.“

thierische Gewebe zu einer Reaction auf die oxydative Leistung der Gewebe ausgearbeitet. Meine Erfahrungen stehen in einem gewissen Gegensatze zu Spitzer. Ich erhielt die Reaction mit Leberauszug in einigen Fällen nur schwach, in der Ueberzahl der Fälle überhaupt nicht, obwohl der quantitative Versuch mit dem betreffenden Leberextracte seine oxydative Leistungsfähigkeit gegenüber Formaldehyd ergab. Das Beginnen Abelou's¹⁾, die Indophenolreaction zu einer Topographie des gesammten oxydativen Leistungsvermögens zu benutzen, ist daher einseitig und wenig aussichtsvoll. Serumglobulin, Myogen, Speichel geben, beiläufig bemerkt, nach meinen Erfahrungen die Reaction auch.

II. Oxydationen mit Pflanzenextracten.

Die Oxydation spielt im Pflanzenleben eine der Reduction und Synthese gleich bedeutende Rolle. Schon zum Zwecke einer einheitlichen Auffassung dieses elementaren Vorganges des Stoffwechsels bei allen lebenden Organismen war es nothwendig, über die Gegenwart und Natur des oxydativen Fermentes bei Pflanzen Versuche durchzuführen. Indem ich an die Angaben Bertrand's (s. oben) über die Laccase erinnere, sei über Versuche berichtet, die das Ziel hatten, festzustellen, ob auch Pflanzenextracte die Aldehydoxydation zu beschleunigen, aber auch die Indophenolreaction einzuleiten vermögen.

Blätter von *Sambucus nigra*, *Syringa vulgaris* oder *Ailanthus glandulosa* wurden 24 Stunden mit Alkohol stehen gelassen, abgepresst; der Rückstand (die Blattreste), mit physiologischer Kochsalzlösung digerirt, gab eine Lösung, die die Indophenolreaction kräftig zeigte.

Ausserdem gaben diese wässrigen Lösungen flockige Fällungen mit Alkohol, und es gaben die Flocken wieder, in Wasser gelöst, neuerlich die Reaction — kurz das typische Verhalten einer „Ferment“-lösung. Formaldehyd jedoch wurde von diesen Lösungen nicht oxydirt. Besonders deutlich war die Indophenolreaction, wenn man zur Mischung aus Alkali, α -Naphtol, Phenylendiamin und Pflanzenextract noch Chloroform oder Aether hinzufügte; das gebildete Indophenol geht in Lösung. Eine quantitative Bestimmung des gebildeten Indophenols durch Wägung oder colorimetrisch wäre leichtthin auszuführen.

Noch bemerkenswerther sind die Resultate mit wie oben behandelten Tannennadeln. Die Extracte sind ungemein kräftig wirksam in Betreff der Indophenolbildung. Das „Ferment“ ist aber mit Alkohol diesmal nicht fällbar, denn die Extracte geben mit Alkohol

1) Compt. r. de l. soc. de biologie 1896.

überhaupt keinen Niederschlag. Fällt man die Tannennadelextracte mit neutralem Bleiacetat, das Filtrat hiervon mit schwefelsaurem Natron, filtrirt neuerdings, so gibt das letzte Filtrat eine so kräftige Indophenolreaction, wie man sie niemals mit thierischem Gewebe sieht. Salicylaldehyd, Formaldehyd, Mannit aber oxydirt der Extract nach meinen Erfahrungen nicht.

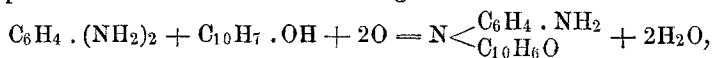
Kurz dauerndes Erhitzen raubt dem Extracte das Vermögen, die Indophenolreaction zu geben, nicht, andauerndes, insbesondere bei alkalischer Reaction, bringt es zum Schwinden. Es sei ausdrücklich hervorgehoben, dass altes Terpentinöl die Indophenolreaction nicht giebt.

Schwächer als mit Tannennadelextract geht diese Reaction mit Hefeextract. Ein Versuch, aus *Mycoderma aceti* eine wirksame Lösung zu erhalten, verlief negativ.

Bei meinem Bemühen, weitere Pflanzen und in den Pflanzen vorkommende Stoffe auf ihre Reactionsfähigkeit zu untersuchen, stiess ich nach zahlreichen vergeblichen Versuchen endlich auf einen sonst chemisch indifferenten Körper, der die Indophenolreaction äusserst kräftig und rasch giebt: das Amygdalin. Reines, zur grösseren Sicherheit zweimal aus heissem Alkohol umkrystallisirtes Amygdalin gab die Reaction aufs deutlichste, Formaldehyd wird jedoch dadurch nicht oxydirt. Unter den als negativ befundenen Körpern seien hier angeführt: Benzaldehyd, Cyannatrium, Traubenzucker, Arbutin, Salicin, Digitalin, Santonin, Cumarin, eine Reihe von Alkaloiden, Pepton, die Extracte aus *Semina Sinapis*, *Lini*, *Colchici* u. s. w., Mandeln waren natürlich wirksam.

Aus dem Mitgetheilten folgt, dass man die Indophenolreaction durchaus nicht als ein Maass der oxydativen Potenz überhaupt ansehen darf: trotz kräftigen Ausfalles kann dem betreffenden Extract jegliches Oxydationsvermögen in anderer Richtung abgehen; was muthmasslich von der Verschiedenheit der betreffenden Oxydationsvorgänge abhängt.

Bei der Indophenolreaction handelt es sich um Wegoxydiren von Wasserstoffatomen aus 2 Körpern unter Zusammentreten der beiden Komponenten im Sinne der Gleichung:



somit um eine oxydative Synthese unter Wasserstoffabspaltung; ein Indicator für eine andersartige Oxydation, z. B. eine Hydroxyilirung, für eine Verwandlung der COH-Gruppe in die Carboxylgruppe oder gar einen oxydativen Abbau unter Kohlensäureabspaltung — und

das leistet der thierische Organismus bei der Oxydation — kann sie eben ihrer chemischen Natur nach nicht sein. Zu beurtheilen, in welchem Umfange sich oxydative Synthesen im Körper abspielen, dafür ist derzeit zu wenig thatsächliches Material vorhanden. Jedenfalls mahnt die nachgewiesene Unabhängigkeit der Indophenolreaction von der für thierische oder pflanzliche Zellen in Betracht kommenden Kraft der Aldehydoxydation zur Vorsicht bei ihrer Verwerthung beim Studium und Beurtheilung von Oxydationsproblemen.

Ueberblickt man Alles über das Oxydationsferment Bekannte, so gilt als festeste Stütze für die Existenz eines solchen die Möglichkeit der Gewinnung zellfreier, wässriger oxydationsfördernder Lösungen, die durch Alkohol das oxydative Agens ausfallen lassen, und deren oxydative Kraft durch Erhitzen zerstört wird.

In Vorstehenden wurde nun ein oxydirend wirkendes Pflanzenextract beschrieben, das durch Alkohol nicht gefällt wird, ferner in dem im Pflanzenreiche weit verbreiteten Amygdalin ein Körper gefunden, der auch nach Erhitzen oxydative Synthesen einleitet oder beschleunigt. Eine Regeneration des Fermentes aus einer bereits benutzten Lösung war ebenso unmöglich als seine Extraction nach der bekannten Glycerinmethode. Wenn man bei dieser Sachlage an dem Ausdrucke Oxydationsferment festhalten will, so muss man wenigstens Folgendes unterscheiden:

Es giebt in den Geweben mehrere, von einander völlig unabhängige Formen der Oxydation, die durch verschiedene, nachweislich zum mindestens 2 Fermente hervorgerufen werden. Das eine beschleunigt die Oxydation der Aldehyde der Fettsäure- und aromatischen Reihe. Das andere spielt bei der oxydativen Synthese (nach Analogie mit der Indophenolreaction) eine Rolle. Doch können derartige Synthesen im Pflanzenreiche, wie aus der Wirksamkeit des Amygdalins hervorgeht, ebenfalls durch nicht fermentartige Agentien bedingt sein.

Prag, den 7. April 1896.
