

(Aus dem Laboratorium für medic. Chemie der k. Universität zu Odessa.)

## Ueber die oxydativen Leistungen der thierischen Gewebe.

Dritte Mittheilung.

Von

**An. Medwedew.**

In dieser Mittheilung, deren frühere Veröffentlichung durch verschiedene Umstände verhindert wurde, berichte ich zunächst über einige neue Versuche, gehe sodann zu einer in gedrängter Kürze abgefassten systematischen Darstellung aller von mir erlangten Resultate über, um ein mehr oder weniger volles Bild des zu studirenden Processes zu ermöglichen.

Als Untersuchungsmaterial dienten mir — wie bei den in meinen vorhergehenden Mittheilungen<sup>1)</sup> angeführten Arbeiten — Auszüge resp. Extracte des Lebergewebes. Die Anordnung der Versuche, die Bezeichnung der Oxydationsgemische und die Bestimmung der Salicylsäure waren im Allgemeinen dieselben wie früher.

### I. Ueber die Natur des in der Leber enthaltenen Oxydations- fermentes.

In einer interessanten Arbeit „Ueber das Aldehyde oxydirende Ferment der Leber und Nebenniere“ stellt sich M. Jacoby<sup>2)</sup> die Aufgabe, das uns interessirende Ferment der Leber zu isoliren. Bei fractionirter Fällung der Leberauszüge durch neutrale Salze erhielt er eine Substanz, welche folgende Eigenschaften aufwies: sie war im

---

1) Ueber die oxydativen Leistungen der thierischen Gewebe. Erste Mittheilung. Pflüger's Archiv Bd. 74. — Zweite Mittheilung. Pflüger's Archiv Bd. 81.

2) Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 30. 1900.

Wasser löslich, verlor ihre oxydativen Eigenschaften beim Kochen und unter dem Einfluss geringer Mengen freier Säuren und Alkalien; Alkohol, Tannin und essigsaures Uranyl fällten diese Substanz; durch Lösungen von schwefelsaurem Ammonium von bestimmter\* Concentration wurde dieselbe ausgesalzen; sie diffundirt nicht durch Membranen aus Pflanzenpergament und gibt in den Concentrationen, bei welchen sie ein ausgeprägtes Oxydationsvermögen in Bezug auf das Salicylaldehyd besitzt, keine Eiweissreactionen.

Auf Grund dieser Angaben glaubt Jacoby, dass der von ihm isolirte Körper, den er für ein wahres Ferment hält und in Betracht seiner Specificität „Aldehydase“ nennt, ein Colloidstoff sei, aber kein Eiweisskörper.

Nach eigenen Versuchen kann ich mich der Meinung Jacoby's nicht anschliessen. Bei der Erörterung der Frage, ob das zu untersuchende Oxydationsferment zu den Eiweisskörpern gehört oder nicht, diene mir als Criterium sein Verhalten zu proteolytischen Agentien, nämlich zum Trypsin. Hätte sich herausgestellt, dass das Leberferment seine Eigenschaften unter dem Einfluss von Trypsin verliert, so könnte man auf Grund dieser Thatsache mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen, dass der Verlust der specifischen Eigenschaften des Leberfermentes unter diesen Bedingungen durch eine Zerstörung desselben hervorgerufen wird; und da das Trypsin ein Gruppenreagens auf Eiweisskörper ist, so würde die Zerstörbarkeit des Leberfermentes durch Trypsin — in Zusammenhang mit seinem Verhalten zu hohen Temperaturen — einen nicht zu unterschätzenden Beweis dafür geben, dass die „Aldehydase“ ein Eiweisskörper ist. Die Versuche haben in dieser Beziehung ein positives Resultat ergeben.

#### Versuch I.

Mittelst einer Lösung, welche in 100 ccm 1 g NaCl und 0,02 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  enthielt und mit Chloroform gesättigt worden war, wurde ein Auszug aus frischer Kalbsleber bereitet, in zwei gleiche Theile von der Zusammensetzung (0,16) 0,7 getheilt und bis zu der Temperatur des Versuches (38°) erwärmt.

Zu dem einen dieser Theile wurden 20 ccm eines nach Wittich bereiteten Glycerinauszuges der Pankreas hinzugefügt, zu dem anderen 20 ccm desselben Auszuges, welcher aber vorher, während einiger Minuten, auf 100° erwärmt worden war.

Darauf wurden den beiden Gemischen je 0,5 ccm Salicylaldehyd hinzugefügt, beide Gemische gut durchgeschüttelt und in einen Wärmeschrank gestellt, wo sie 18 Stunden bei 38° verblieben.

Die Zusammensetzung der Oxydationsgemische war also folgende:

$A_2$  . . . . (0,16) 0,7 + 0,5 ccm S.-A. + 20 ccm Glycerinpankreatin,

$A_1$  . . . . (0,16) 0,7 + 0,5 ccm S.-A. + 20 ccm Glycerinpankreatin vorher auf 100° erwärmt.

Es bildete sich Salicylsäure in Milligramm:

in  $A_1$  . . . . . 79,

in  $A_2$  . . . . . 41.

Die Oxydationsfähigkeit des Auszuges verminderte sich unter dem Einfluss von Pankreatin auf 48 %.

## Versuch II.

Mittelt derselben Extractionsflüssigkeit werden zwei gleiche Portionen von der Zusammensetzung (0,16) 0,7 zubereitet. In 220 ccm dieser Extractionsflüssigkeit wurde Grubler's Trypsin klar gelöst; 100 ccm der Lösung wurden in die erste Portion ( $A_2$ ) gegossen; der übrige Theil der Trypsinlösung wurde aufgekocht, abgekühlt und der zweiten Portion ( $A_1$ ) hinzugefügt; darauf wurde beiden Portionen je 1 ccm Salicylaldehyd hinzugesetzt. —

Die beiden Oxydationsgemische von der Zusammensetzung:

$A_1$  . . . . . (0,16) 0,7 + 1 ccm S.-A. + 100 ccm inactiver Trypsinlösung,

$A_2$  . . . . . (0,16) 0,7 + 1 ccm S.-A. + 100 ccm activer Trypsinlösung.

wurden in einen Thermostat bei 38° auf 72 Stunden gestellt.

Es bildete sich Salicylsäure in Milligramm:

in  $A_1$  . . . . . 163,

in  $A_2$  . . . . . 106.

Die Oxydationsfähigkeit verminderte sich unter dem Einfluss von Trypsin auf 35 %.

In diesen Versuchen konnte das Trypsin bei Gegenwart von Salicylaldehyd und gleichzeitig mit der vor sich gehenden Oxydation dieser Substanz wirken. In dem folgenden Versuch wurde das Trypsin der Fermentlösung vor Einführung des Aldehydes in das Gemisch hinzugefügt; auf einen und denselben Auszug wirkte es das erste Mal während 18, das zweite Mal während 48 Stunden ein.

## Versuch III.

Der Leberauszug wurde mittelst derselben Extractionsflüssigkeit zubereitet und in vier gleiche Theile von der Zusammensetzung (0,18) 0,6 getheilt.

Zweien dieser Theile ( $A_2$ ,  $A_4$ ) wurden je 50 ccm des Glycerinauszuges der Pankreas hinzugefügt, den beiden anderen ( $A_1$ ,  $A_3$ ) ebenfalls je 50 ccm desselben Auszuges, welcher aber vorher der Einwirkung einer Temperatur von ca. 100° ausgesetzt worden war. Alle vier Gemische wurden mit Chloroform gesättigt und in den Thermostat bei 38° gestellt.

Die Gemische:

$A_1$  . . . . . (0,18) 0,6 + 50 ccm der inactiven Pankreatinlösung und

$A_2$  . . . . . (0,18) 0,6 + 50 ccm der activen Pankreatinlösung

blieben im Thermostat während 18 Stunden; darauf wurde denselben je 1 ccm Salicylaldehyd hinzugesetzt.

Die Portionen:

$A_3$  . . . . . (0,18) 0,6 + 50 ccm der inactiven Pankreatinlösung,  
 $A_4$  . . . . . (0,18) 0,6 + 50 ccm der activen Pankreatinlösung  
 wurden während 48 Stunden digerirt und darauf denselben je 1 ccm Salicylaldehyd hinzugefügt.

Nach Zugabe des Salicylaldehyds wurden alle vier Gemische während vier Mal 24 Stunden digerirt.

Es bildete sich Salicylsäure in Milligramm:

in $A_1$ . . . . .	184,
in $A_2$ . . . . .	110,
in $A_3$ . . . . .	184,
in $A_4$ . . . . .	0.

Es verminderte sich also die Oxydationsfähigkeit des Auszuges nach 18stündiger Wirkung des Pankreatins auf 40 %; nach 48stündiger Wirkung wurde sie vollständig aufgehoben.

Dieser Versuch in Zusammenhang mit den zwei vorhergehenden, lässt nur eine Erklärung zu, und zwar die, dass das Leberferment durch Trypsin zerstört wird. Man kann nicht annehmen, dass das Trypsin die Wirkung der „Aldehydase“ nur unterdrückt, ohne dieselbe zu zerstören. Wenn dieses der Fall wäre, so würde die unterdrückende Wirkung des Trypsins gewiss unabhängig davon sein, wie lange das letztere in Berührung mit der „Aldehydase“ blieb; und doch war nach 18stündiger Einwirkung des Trypsins die Oxydationsfähigkeit der Aldehydase nur abgeschwächt (40 %), nach 48stündiger aber vollständig aufgehoben. Man darf ferner nicht annehmen, dass die Wirkung des Glycerin-Pankreatins nicht vom Trypsin, sondern von irgend einem anderen Ferment abhängt; das relativ reine Trypsin Grubler's zeigte in dem zweiten Versuch dieselbe Wirkung, wie das Pankreatin, und doch enthielt dieses Präparat weder amyloisches noch lypolitisches Ferment und besass keine Wirkung auf Amygdalin.

Wenn nun die Aldehydase, wie dieses aus den angeführten Versuchen hervorgeht, durch Trypsin zerstört wird, so folgt daraus — in Zusammenhang mit der leichten Zerstörbarkeit derselben bei hohen Temperaturen — dass der Aldehydase die Eiweisskörpersnatur zugeschrieben werden muss, — ein Schluss, der mit der Meinung Jacoby's in Widerspruch steht.

Das Verhalten der Aldehydase zum Trypsin ist noch insofern interessant, als dadurch vielleicht die Abwesenheit derselben in der

Pankreas erklärt werden kann. Bekanntlich konnten weder Salkowski und Jamagiwa einerseits, noch Abelous und Biarnès andererseits bei ihren Studien über die Vertheilung des Oxydationsfermentes im Organismus dasselbe in den Pankreasauszügen constatiren. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die Aldehydase in diesen Auszügen sich vorfindet, jedoch sehr schnell durch das Trypsin zerstört wird.

## II. Vergleichung der Oxydationsvorgänge des Salicylaldehyds in saurem und alkalischem Medium.

Bei orientirenden Versuchen, aus welchen die vorliegende Untersuchung entstand<sup>1)</sup>, wurden die Leberauszüge mittelst neutraler Kochsalzlösung (0,75 %) bereitet. Schon nach einigen Stunden Digerirens mit Salicylaldehyd im Thermostat reagirte das Oxydationsgemisch deutlich sauer auf Lackmus. Die saure Reaction wurde zweifellos durch Salicylsäure bedingt, denn, wie Controlversuche zeigten, behielten die neutralen Leberauszüge, die mit Chloroform gesättigt worden waren, ohne Salicylaldehyd, bei denselben Temperaturen (38°—40°), während einiger Tage ihre neutrale Reaction.

Bei diesen Bedingungen wurde gefunden, dass die Menge der sich bildenden Salicylsäure, bei der gegebenen Menge des Ferments, sowohl von der Menge des Salicylaldehyds als auch von dem Volumen des Gemisches abhängt. Es ist nämlich — für die gegebene Menge des Fermentes  $m$  — die Menge des Oxydationsproductes umgekehrt proportional der Quadratwurzel aus dem Volumen des Gemisches und umgekehrt proportional der Quadratwurzel aus der Menge des Aldehyds.

Diese Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

Die Menge des Fermentes	Die Menge des Salicylaldehyds	Das Volumen des Oxydationsgemisches	Die Menge der gebildeten Salicylsäure	Verhältniss
$m$	$a$	$v$	$s$	$\left. \begin{array}{l} s \sqrt{v} = s_1 \sqrt{v_1} \\ s \sqrt{a} = s_1 \sqrt{a_1} \end{array} \right\}$
$m$	$a$	$v_1$	$s_1$	
$m$	$a$	$v$	$s$	$\left. \begin{array}{l} s \sqrt{v} = s_1 \sqrt{v_1} \\ s \sqrt{a} = s_1 \sqrt{a_1} \end{array} \right\}$
$m$	$a_1$	$v$	$s_1$	

1) Ueber die Oxydationskraft der Gewebe. Pflüger's Arch. Bd. 65. 1896.

Ferner wurde gefunden, dass die Menge des Oxydationsproductes proportional dem Quadrat der Concentration des Fermentes zunimmt.

Es fällt nicht schwer, sich zu überzeugen, dass diese letzte Regelmässigkeit eine Folge der zwei ersten ist.

Die zwei ersten Regelmässigkeiten als bewiesen angenommen, wollen wir drei Oxydationsgemische folgender Zusammensetzung betrachten:

	Die Menge des Fermentes	Die Menge des Salicyl- aldehyds	Das Volumen des Gemisches
I	1	$a$	$v$
II	1	$a_1$	$v_1$
III	1	$a$	$v_1$

Es seien die Mengen der gebildeten Salicylsäure in diesen Gemischen:  $s$ ,  $s_1$ ,  $s_2$ .

Wenn die ersten zwei Regelmässigkeiten statthaben, so gelangen wir zu folgenden Verhältnissen:

$$s \sqrt{v} = s_2 \sqrt{v_1}$$

$$s_1 \sqrt{a_1} = s_2 \sqrt{a}.$$

Daraus:

$$s \sqrt{av} = s_1 \sqrt{a_1 v_1},$$

und nach einfacher Umbildung:

$$\frac{s}{v} : \frac{s_1}{v_1} = \frac{1}{v^2} \sqrt{\frac{a}{v}} : \frac{1}{v_1^2} \sqrt{\frac{a_1}{v_1}},$$

oder:

$$\frac{s}{v} \sqrt{\frac{a}{v}} : \frac{s_1}{v_1} \sqrt{\frac{a_1}{v_1}} = \frac{1}{v^2} : \frac{1}{v_1^2}.$$

Für eine und dieselbe Concentration des Aldehyds, d. h. bei  $\frac{a}{v} = \frac{a_1}{v_1}$ , z. B. für die Combination:

$$\begin{array}{ccc} 1 & a & v \\ 1 & 2a & 2v, \end{array}$$

erhalten wir:

$$\frac{s}{v} : \frac{s_1}{v_1} = \frac{1}{v^2} : \frac{1}{v_1^2},$$

d. h. die Menge des Oxydationsproductes in der Volumeinheit ist dem Quadrat der Concentration des Fermentes proportional.

Die Möglichkeit, diese Regelmässigkeit aus den zwei ersteren abzuleiten, erscheint desshalb interessant, weil es nicht leicht ist, dieselbe direct durch den Versuch zu constatiren. In der citirten Arbeit sind vier Versuche angeführt, in welchen die Regelmässigkeit sich deutlich äussert; aber diese Versuche sind einer ganzen Reihe anderer entnommen, in welchen die Regelmässigkeit bei Weitem nicht so genau ausgedrückt war; später habe ich Versuche in dieser Richtung wiederholt und dabei stets dieselbe Unbeständigkeit der Resultate erhalten: in den einen Versuchen war die erwähnte Abhängigkeit sehr genau ausgedrückt, — in den anderen waren die Versuchsergebnisse nur annähernde.

Dagegen zeigen sowohl die Versuche mit variablem Volumen des Reaktionsgemisches als auch Versuche mit Aenderung der Concentration bloss von Salicylaldehyd die entsprechenden Regelmässigkeiten sehr deutlich und genau. Die Ursache der Schwankung der Resultate bei alleiniger Aenderung der Concentration des Fermentes ist mir nicht vollkommen klar.

Wenden wir uns jetzt zur Oxydation des Salicylaldehydes im alkalischen Medium. Versuche nach dieser Richtung wurden in folgender Mittheilung beschrieben. Die Leber wurde mittelst schwacher Kochsalzlösung extrahirt bei Gegenwart geringer Mengen von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , die aber genügend waren, um dem Oxydationsgemische eine alkalische Reaction während der ganzen Digestionsdauer zu sichern.

In diesen Versuchen äusserten sich Verhältnisse ganz anderer Art. Die Menge der gebildeten Salicylsäure (bis zur völligen Erschöpfung der Oxydationsfähigkeit des Auszuges) ist der Concentration des Fermentes streng proportional (nicht aber dem Quadrat der Concentration) und ist unabhängig von der Concentration der zu oxydirenden Substanz; diese Verhältnisse finden aber nur dann statt, wenn die zu oxydirende Substanz diejenige Menge bedeutend übersteigt, welche überhaupt durch das gegebene Quantum des Fermentes oxydirt werden kann.

Zur Vervollständigung des Vergleiches will ich in Folgendem Versuche anführen, welche beweisen, dass im alkalischen Medium das Volumen des Gemisches ebenfalls keinen Einfluss auf die Menge des Oxydationsproductes ausübt. In diesen Versuchen diente als Extractionsflüssigkeit eine Lösung, die in 100 ccm 1 g NaCl und 0,04 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  enthielt und mit Chloroform gesättigt war.

#### Versuch I.

Die Zusammensetzung der Oxydationsgemische:

	Volumen des Gemisches
$A_1$ . . . . (0,15) 0,6 + 2 ccm S.-A. . . . .	0,6 Liter,
$A_2$ . . . . {(0,15) 0,6} 1,8 + 2 ccm S.-A. . . . .	1,8 „

Die Dauer des Versuches: 70 Stunden. Temperatur: 38°.

Es bildete sich Salicylsäure in Milligramm:

in $A_1$ . . . . .	118,
in $A_2$ . . . . .	120.

### Versuch II.

Die Zusammensetzung der Oxydationsgemische:

	Volumen des Gemisches
$A_1$ . . . . (0,15) 0,6 + 0,5 ccm S.-A. . . . .	0,6 Liter,
$A_2$ . . . . {(0,15) 0,6} 1,8 + 0,5 ccm S.-A. . . .	1,8 „

Die Dauer des Versuches: 68 Stunden. Temperatur: 38°.

Es bildete sich Salicylsäure in Milligramm:

in $A_1$ . . . . .	116.
in $A_2$ . . . . .	116.

### Versuch III.

Die Zusammensetzung der Oxydationsgemische:

	Volumen des Gemisches
$A_1$ . . . . (0,07) 0,6 + 1,5 ccm S.-A. . . . .	0,6 Liter,
$A_2$ . . . . {(0,07) 0,6} 1,2 + 1,5 ccm S.-A. . . .	1,2 „

Die Dauer des Versuches: 50 Stunden. Temperatur: 38°.

Es bildete sich Salicylsäure in Milligramm:

in $A_1$ . . . . .	40,
in $A_2$ . . . . .	36.

Das Volumen des Reaktionsgemisches in alkalischem Medium übt also keinen Einfluss aus auf die Menge des Oxydationsproductes, — folglich ein ganz anderes Verhalten als in saurem Medium.

Die Regelmässigkeiten, welche für die Reaction sowohl in alkalischem als auch in saurem Medium gefunden wurden, sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle II.

	Menge des Fermentes	Menge des Salicyl- aldehydes	Volumen des Gemisches	Menge des Oxydations- productes	
				in saurem Medium	in alkal. Medium
Com- bination I. {	$m$	$a$	$v$	$s$	$p$
	$m$	$n \cdot a$	$v$	$s_1 = \frac{s}{\sqrt{n}}$	$p_1 = p$
Com- bination II. {	$m$	$a$	$v$	$s$	$p$
	$m$	$a$	$n \cdot v$	$s_1 = \frac{s}{\sqrt{n}}$	$p_1 = p$
Com- bination III. {	$m$	$a$	$v$	$s$	$p$
	$n \cdot m$	$a$	$v$	$s_1 = n^2 s$	$p_1 = np$



In dieser Tabelle bezeichnen  $s$ ,  $s_1$  und  $p$ ,  $p_1$  die Maximalmengen der Salicylsäure, welche sich in Gegenwart von gegebenem Quantum des Fermentes bilden, d. h. diejenigen Grenzwerte, nach deren Erreichung die Oxydationsfähigkeit des Fermentes sich als erschöpft erweist. Man muss annehmen, dass das Ferment dabei zerstört oder inactivirt wird.

Was nun die Regelmässigkeiten in alkalischem Medium anbetrifft, so sind sie im Wesentlichen ganz verständlich. Die Verhältnisse zwischen  $p$  und  $p_1$ , bei allen in der Tabelle angeführten Combinationen sind eine directe Folge der Thatsache, dass eine gegebene Menge des Fermentes fähig ist, eine ganz bestimmte Menge des Aldehyds zu oxydiren.

Was aber die Bedingungen des Stillstandes der Reaction in saurem Medium anbelangt, so erweisen sich die letzteren als bedeutend complicirter. Dabei muss man vor Allem in Betracht ziehen, dass im Allgemeinen, wenn alle anderen Bedingungen gleich sind (Gleichheit der Reaktionsvolumina, gleiche Concentrationen des Fermentes und der zu oxydirenden Substanz),  $s$  (die Menge des Oxydationsproductes in saurem Medium) immer kleiner als  $p$  (die Menge des Oxydationsproductes in alkalischem Medium) ist. Man darf also vermuthen, dass der Stillstand der Reaction in saurem Medium nicht dann eintritt, wenn die Oxydationsfähigkeit des Fermentes erschöpft ist, sondern schon früher, in Folge irgend eines störenden Einflusses der Säure, die sich während des Processes bildet.

Ausserdem ist der Betrag der Umwandlung um so geringer, je stärker die Concentration der zu oxydirenden Substanz ist (Combination II). Kurz, der Stillstand der Reaction wird in diesem Falle nicht durch einen Factor, wie in alkalischem Medium, hervorgerufen, sondern durch die Wechselwirkung verschiedener Einflüsse.

Welcher Art muss diese Wechselwirkung sein? Ist es vielleicht möglich, aus den gefundenen Zahlenverhältnissen auf den Mechanismus dieser Wechselwirkung zu schliessen? — Bevor wir zu diesen Fragen übergehen, ist es nothwendig, die Frage nach der Geschwindigkeit der zu studirenden Reaction bei verschiedenen Bedingungen zu erforschen, was im nächsten Abschnitte geschehen wird.

### III. Ueber die Geschwindigkeit des Oxydationsprocesses bei verschiedenen Concentrationen des Aldehyds.

Wenn der Wirkung des Gewebsauszuges eine solche Menge von Salicylaldehyd unterliegt, welche wesentlich diejenige Menge überschreitet, die von der im Extracte enthaltenen Fermentmenge noch oxydirt werden kann, so ist sowohl die Geschwindigkeit der Oxydation als auch die Geschwindigkeit der Erschöpfung der Oxydationsfähigkeit proportional der Quadratwurzel aus der Concentration der zu oxydirenden Substanz. Unter diesen Bedingungen kann, wie in der zweiten Mittheilung gezeigt wurde, die Reaktionsgeschwindigkeit so ausgedrückt werden:

$$\frac{dx}{dt} = k \sqrt{A} (a-x) \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (1)$$

Hier bezeichnet:

$A$  — die ganze vorhandene Menge Salicylaldehyds,

$a$  — diejenige Menge Aldehyds, welche durch die gegebene Fermentmenge oxydirt werden kann bis zur vollständigen Erschöpfung der Oxydationsfähigkeit derselben,

$x$  — diejenige Menge Aldehyds, welche in dem seit dem Anfange der Reaction verstrichenen Zeitraume ( $x$ ) oxydirt wurde,

$\frac{dx}{dt}$  — ist dann die Geschwindigkeit des Salicylsäurebildung.

Durch dieselbe Gleichung kann man auch die Geschwindigkeit der Inactivirung des Ferments ausdrücken, wenn man durch  $m$  — die im gegebenen Extracte enthaltene Fermentmenge bezeichnet.

Die Gleichung gestaltet sich dann folgendermassen:

$$\frac{dx}{dt} = k \sqrt{A} (m-x) \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (1');$$

$x$  — bezeichnet hier die Fermentmenge, welche in der Zeit  $t$  vom Beginne des Versuches inactivirt wurde.

In der ersten Mittheilung war ausserdem die Reaktionsgeschwindigkeit unter solchen Bedingungen studirt, wenn das Aldehyd dem Extracte in Mengen beigefügt wurde, die wesentlich geringer waren als diejenigen, welche von der vorhandenen Fermentmenge oxydirt werden können. Dann wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch folgende Gleichung ausgedrückt:

$$\frac{dx}{dt} = k (a-x)^2 \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (2),$$

während die Geschwindigkeit der Inactivirung des Fermentes so darzustellen wäre:

$$\frac{dx}{dt} = k (m_a - x)^2 \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad . \quad (2')$$

$a$ ,  $t$  und  $x$  haben hier dieselbe Bedeutung wie im ersten Falle,  $m_a$  — bezeichnet die Fermentmenge, welche bei der Oxydation von der Menge  $\alpha$ -Aldehyd inactivirt wird.

Im zweiten Falle ist die Geschwindigkeit in jedem Moment der Reaction proportional dem Quadrate der Concentration der zu oxydirenden Substanz, im ersten Falle dagegen der Quadratwurzel aus der Concentration. Im zweiten Falle verläuft die Reaction im Verhältniss zum Ferment — bimoleculär, im ersten — monomoleculär.

Wie ist diese Verschiedenheit des Reactionsverlaufes für einen und denselben Process zu verstehen?

Dieser Frage kann eine relativ einfache Erklärung gegeben werden.

In der zweiten Mittheilung waren Angaben darüber gemacht worden, dass der Oxydation des Salicylaldehyds eine vorherige Verbindung des Ferments mit der zu oxydirenden Substanz vorangeht und dass das Zustandekommen dieser Verbindung eine unerlässliche Bedingung ist, ohne welche die Oxydation nicht vor sich gehen kann.

Dieses im Auge behaltend, wollen wir die Oxydationsbedingungen des Aldehyds bei verschiedenen Concentrationen desselben besprechen.

Erster Fall: Die Reaction findet im schwach alkalischen Medium statt; die vorhandene Menge Salicylaldehyds ist eine wesentlich geringere als die, welche durch die gegebene Fermentmenge oxydirt werden kann.

Nennen wir  $A$  — das Verbindungsgewicht des Aldehyds und  $F$  — das Verbindungsgewicht des Fermentes; bezeichnen wir ferner die Verbindung beider Substanzen, welche wir, der Einfachheit wegen, als reinen Additionsvorgang ansehen wollen,

durch  $FA$ . —

Da im gegebenen Falle mehr Ferment vorhanden ist, als durch die vorhandene Menge Aldehyds gebunden werden kann, so wird, wenn

$M_a$  — die Masse des Aldehyds und

$M_F$  — die Masse des Fermentes ist, die Masse der Verbindung  $FA = M_a + M'_F$ , wobei  $M'_F < M_F$ ; mit anderen Worten, zur Bildung der Verbindung  $FA$  wird die ganze vorhandene Menge des Aldehyds und nur ein Theil der vorhandenen Fermentmenge verbraucht werden; in der Oxydationsfähigkeit wird kein freies Aldehyd, wohl aber ein Ueberschuss des freien Fermentes sein  $= M_F - M'_F$ .

Im besprochenen Falle verläuft, wie der Versuch lehrt, die Reaction bimoleculär, worauf hin man annehmen muss, dass nicht eine Oxydation der Producte  $FA$ , sondern der Systeme  $(FA + FA)$  stattfindet. Es ist einleuchtend, dass die Entstehung solcher Systeme mit einer Geschwindigkeit vor sich gehen soll:

$$\frac{dx}{dt} = k (a - x)^2,$$

wo  $a$  — die ganze vorhandene Menge des Aldehydes bezeichnet.

Da nun die Erscheinung im Ganzen bimoleculär verläuft, so müssen wir annehmen, dass von den drei Phasen des Processes nur eine, und zwar die zweite, Bildung des Condensationsproductes oder Complexes  $(FA + FA)$  mit messbarer Geschwindigkeit vor sich geht, die erste und dritte Phase aber praktisch als Momentreactionen aufzufassen sind.

Zweiter Fall. Die Reaction geht in alkalischem resp. neutralem Medium vor sich; die vorhandene Menge Salicylaldehyd übersteigt wesentlich die Menge, welche von der vorhandenen Fermentmenge oxydirt werden kann.

Nennen wir:

$M_F$  — die Fermentmenge,

$M_a$  — die Menge des Aldehyds,

so müssen wir bei den gegebenen Verhältnissen die Menge der Verbindung  $FA$  mit  $M'_a + M_F$  bezeichnen, wo  $M'_a < M_a$ , weil für Bildung dieser Verbindung die ganze vorhandene Fermentmenge und nur ein geringer Theil der vorhandenen Aldehydmenge verbraucht werden. Der Versuch lehrt, dass die Oxydationsgeschwindigkeit proportional der Quadratwurzel aus der Concentration des Al-

dehyds ist. Diese Thatsache war durch die Voraussetzung erklärt<sup>1)</sup>, dass das Aldehyd schwach ionisirt sei, und dass als active Masse desselben der ionisirte Theil functionire, welcher, entsprechend dem Ostwald'schen Verdünnungsgesetze, proportional der Quadratwurzel der Concentration ist.

Der besprochene Fall wird erklärlich, wenn man annimmt, dass die Oxydation im Systeme  $FA + A$  vor sich gehe; die Oxydationsgeschwindigkeit wird dann gleich sein der Entstehungsgeschwindigkeit dieses Systemes, d. h. proportional der Masse  $FA$  und der activen Masse  $A$ ; für die Zeit  $t$  kann dieselbe durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$\frac{dx}{dt} = k \sqrt{A} (m - x), \text{ wo}$$

$m$  — die ganze vorhandene Fermentmenge ist,

oder:

$$\frac{dx}{dt} = k \sqrt{A} (a - x), \text{ wo}$$

$a$  — die mit dem Fermente gebundene Aldehydmenge ist.

Dementsprechend können die Ergebnisse des Versuches einfach durch folgende Voraussetzung erklärt werden:

Vorherige Bildung der Verbindung  $FA$  und darauf folgendes Entstehen des Complexes  $FA + A$ ; das Aldehyd wird erst nach Eintritt in diese letzte Verbindung oxydirt, und die Oxydationsgeschwindigkeit des Aldehyds wird proportional sein der Entstehungsgeschwindigkeit von  $FA + A$ .

Selbstverständlich muss im gegebenen wie auch im ersten Falle die Bildung der Systeme  $FA + FA$  neben den Systemen  $FA + A$  vor sich gehen.

Es ist aber einleuchtend, dass die Entstehungsgeschwindigkeit von  $FA + FA$  verschwindend klein sein muss im Vergleich zur Entstehungsgeschwindigkeit von  $FA + A$ ; deshalb wird auch die Geschwindigkeit der ganzen Reaction durch die Geschwindigkeit des letzten Prozesses bedingt werden.

Zusammenfassend, können wir den ganzen Vorgang folgendermaassen präcisiren:

1. Das Ferment bildet mit der zu oxydirenden Substanz eine präliminäre Verbindung ( $FA$ ).

---

1) Zweite Mittheilung, Abschnitt II und III.

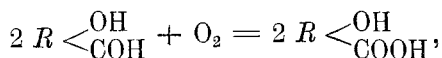
2. Letztere reagirt weiter entweder nach dem Typus:



oder nach dem Typus:  $FA + A \rightarrow FA_2$ .

Die Oxydationsgeschwindigkeit wird durch die Entstehungsgeschwindigkeit dieser condensirten Systeme bedingt. Beim Ueberschuss des Fermentes bilden sich die Systeme  $(FA + FA)$ , und die Geschwindigkeit dieses Processes ist proportional dem Quadrate der Concentration der zu oxydirenden Substanz; beim Ueberschuss der letzteren, wobei sich hauptsächlich die Systeme  $(FA + A)$  bilden, wird die Entstehungsgeschwindigkeit proportional der activen Masse des Aldehyds, d. h. proportional der Quadratwurzel aus der Concentration des letzteren sein.

3. In beiden Fällen verläuft die Oxydation des Salicylaldehyds bimoleculär, d. h. nach dem Schema:



und in beiden Fällen findet die Oxydation erst dann statt, nachdem die zu oxydirende Substanz in den Bestand der condensirten Systeme des einen oder anderen Typus eingetreten war, d. h. die Oxydation verläuft stets intramoleculär.

#### IV. Oxydationsbedingungen im sauren Medium.

Im zweiten Abschnitte dieser Mittheilung waren vergleichende Angaben über die Oxydation des Salicylaldehyds bei Einwirkung von „Leberferment“ in saurem und alkalischem Medium gemacht worden. In alkalischem Medium und bei Gegenwart eines grossen Ueberschusses des Aldehyds erfolgt die Inactivirung des Fermentes nach Oxydation einer bestimmten Menge des Aldehyds, unabhängig von der ursprünglichen Masse desselben, d. h. bei der gegebenen Menge des Fermentes geben die Massen:  $a_1, a_2, a_3 \dots$  Aldehyd eine und dieselbe (bestimmte) Menge ( $p$ ) Salicylsäure. Anders gestalten sich die Verhältnisse in saurem Medium: hier ist — bei der gegebenen Menge des Fermentes — die Menge des Oxydationsproductes um so geringer, je mehr von der zu oxydirenden Substanz vorhanden ist, und zwar bildet die gegebene Menge des Fermentes bei den Mengen:

$a_1, a_2, a_3 \dots$  Salicylaldehyds,

$s_1, s_2, s_3 \dots$  Mengen Salicylsäure,

wobei  $s_1 \sqrt{a} = s_2 \sqrt{a_2} = s_3 \sqrt{a_3} = \dots$

d. h. die Menge des Oxydationsproductes ist umgekehrt proportional der Quadratwurzel aus der Concentration der zu oxydirenden Substanz.

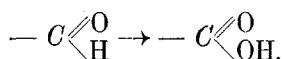
Allem Anscheine nach wird die Inactivirung des Fermentes und das dadurch bedingte Stillstehen der Reaction durch eine eigenartige Wechselwirkung zwischen der gebildeten Säure und der ganzen vorhandenen Menge des Aldehyds hervorgerufen.

Auf Grund der früher festgestellten Verhältnisse und unter Annahme einiger speciellen Voraussetzungen kann man sich den Mechanismus der Reaction folgendermaassen vorstellen.

Hierbei hat man vor allen Dingen mit folgender Beobachtung zu rechnen: wenn die gegebene Menge des Fermentes — bei der Menge der zu oxydirenden Substanz, die  $= A$  ist — in alkalischem Medium einen Theil des letzteren —  $p$  und in saurem Medium einen Theil desselben —  $s$  oxydirt, so ist unter sonst gleichen Bedingungen  $s < p$ .

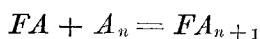
Dieses kann davon abhängen, dass in saurem Medium das Ferment nicht nur durch die Oxydation des Aldehyds — wie solches im alkalischen Medium der Fall ist — inactivirt wird, sondern auch noch durch andere Reactionen, die in alkalischem Medium nicht vor sich gehen können. Von dieser Voraussetzung gehe ich bei den folgenden Betrachtungen aus.

Im vorigen Abschnitt war gezeigt worden, dass das Aldehyd mit dem Fermente eine vorläufige Verbindung eingeht —  $FA_2$ , und dass erst nach dem Entstehen dieser Verbindung eine intramoleculäre Oxydation des Aldehyds und gleichzeitig eine Inactivirung des Fermentes statthaben. Da beim Eintritt in diese Verbindung das Aldehyd die Fähigkeit zur Oxydation erhält, so kann man diese Verbindung eine active nennen, und wir wollen dieselbe durch  $FA_2$  *activ* bezeichnen. In dieser Verbindung befinden sich zwei Aldehydgruppen in solchem Zustande, welcher einen Uebergang möglich macht:



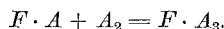
Diese Gruppen sind also entweder gar nicht mit einander verbunden — wohl aber nur mit dem Fermente —, oder wenn sie mit einander verbunden sind, so jedenfalls nicht durch Vermittelung des Sauerstoffs, sondern der Kohlenstoffatome.

Was nun die Verhältnisse in saurem Medium anbetrifft, so kann man wohl annehmen, dass auch hier eine vorläufige Verbindung:



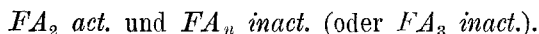
stattfindet, dass aber — dank dem Einflusse der Säure — zwischen den Aldehydgruppen in diesem Falle eine andere Gruppierung bestehen kann als im alkalischen Medium: die Aldehydgruppen sind im gegebenen Falle durch die Sauerstoffatome verbunden, was die Möglichkeit der Oxydation der Aldehydgruppen ausschliesst. Aus diesem Grunde erweist sich die Verbindung des Aldehyds mit dem Fermente als inactiv:  $FA_n$  *inact.*

Man kann z. B. annehmen, dass — dank der Gegenwart der Säure — sich eine inactive Verbindung bildet, in welche drei Moleküle Aldehyd eintreten, analog dem Paraldehyd:



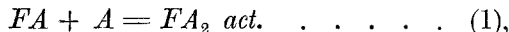
Wenn man annimmt, dass die eine oder die andere inactive Verbindung unter dem Einfluss der Säure entsteht und folglich auch mit einer Geschwindigkeit, die proportional der Concentration der Säure ist, so kommt man zu Schlüssen, die dem Versuche entsprechen.

In der That, im sauren Medium nehmen wir schliesslich doch die Bildung von zweierlei Verbindungen des Fermentes mit der zu oxydierenden Substanz an — oxydable und inoxydable — resp. active und inactive:



Mit welcher Geschwindigkeit gehen diese beiden Processe vor sich?

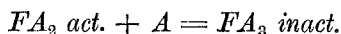
Mögen  $m$  und  $a$  die entsprechenden Mengen des Fermentes und des Aldehyds bezeichnen; nehmen wir an, dass in der Zeit  $t$  vom Anfange der Reaction sich die Menge  $x$  Salicylsäure gebildet habe, wobei  $\alpha x$  Aldehyd oxydirt und die Menge  $\mu x$  des Fermentes inactivirt werden. Nehmen wir weiter an, dass im Laufe des Zeitelementes  $\delta t$  sich die Menge  $\delta_1 x$  der Verbindung  $FA_2$  *act.* gebildet habe, nach dem Schema:



so haben wir, im Einklange damit, was im vorhergehenden Abschnitte über die Geschwindigkeit der Bildung dieser Verbindung gesagt war:

$$\delta_1 x = k \cdot f(m - \mu x) \cdot \sqrt{a - \alpha x} \cdot \delta t. \quad . \quad . \quad (1'),$$

wo  $k$  der Geschwindigkeitscoefficient des Processes (1),  $f(m - \mu x)$  — eine unbekannte Function der vorhandenen Masse des Fermentes sind. Möge schliesslich im selben Zeitraume —  $\delta t$ , unter Einwirkung der Säure, sich die Menge —  $\delta_2 x$  der Verbindung  $FA_3$  *inact.* nach dem einen der folgenden Schemata gebildet haben:



oder





Da diese Verbindungen unter dem Einflusse der Säure entstehen, die Menge der letzteren aber im Laufe der Reaction allmählich anwächst, so muss auch der Geschwindigkeitscoefficient des Processes (2) mit dem Fortschreiten der Reaction beständig grösser werden. Wir nahmen an, dass im Zeitraume  $t$ , vom Anfange der Reaction gerechnet, die Menge der gebildeten Säure  $= x$  ist, folglich muss der Geschwindigkeitscoefficient des Processes (2) durch  $k_2x$  ausgedrückt werden, wo  $k_2$  eine Constante ist. Greifen wir ausserdem zu der durchaus berechtigten Voraussetzung, dass die Geschwindigkeit des Processes (2) sowohl von der Masse des Fermentes als auch von der Menge des Aldehyds abhängt, so haben wir folgenden Ausdruck für die Menge der Verbindung  $F \cdot A_3$  *inact*, die sich im Zeitraume  $\delta t$  gebildet hat:

$$\delta_2x = k_2x \cdot f(m - \mu x) \cdot (a - \alpha x) \cdot \delta t \quad . \quad (2'),$$

wobei  $f(m - \mu x)$  wieder die unbekannte Function der Masse des Fermentes bezeichnet.

Wenn der Process (2) nicht stattfinden würde, so wäre die Menge des Salicylaldehyds, welche im Zeitraume  $\delta t$  zur Oxydation kommen würde, gleich  $\delta_1x$ ; Dank dem Processe (2) entzieht sich ein gewisser Theil  $\delta_2x$  der Verbindung  $F \cdot A_2$  *act* der Oxydation und verwandelt sich in die inactive Verbindung  $F \cdot A_2$  *inact*; es bleibt für den Zeitraum  $\delta t$  als oxydationsfähig die Menge  $\delta x$ , entsprechend der Gleichung:

$$\delta x = \delta_1x - \delta_2x,$$

d. h. gemäss (1') und (2'):

$$\delta x = \{ k_1 \sqrt{a - \alpha x} - k_2x (a - \alpha x) \} \cdot f(m - \mu x) \cdot \delta t.$$

Hieraus ergibt sich die Oxydationsgeschwindigkeit:

$$\frac{\delta x}{\delta t} = \left\{ k_1 \sqrt{a - \alpha x} - k_2x (a - \alpha x) \right\} \cdot f(m - \mu x).$$

Da es sich hier um die Versuche handelt, in denen Aldehyd in grossem Ueberschuss vorhanden war, und wo nur ein sehr geringer Theil desselben (1—5 %) der Oxydation unterworfen wurde, so kann die Grösse  $\alpha x$ , die im Vergleich zu  $a$  sehr gering ist, vernachlässigt werden. Dann bekommen wir für die Reaktionsgeschwindigkeit folgenden Ausdruck:

$$\frac{\delta x}{\delta t} = (k_1 \sqrt{a} - k_2x a) \cdot f(m - \mu x).$$

Aus näherer Betrachtung dieser Formel ist ersichtlich, dass die Reaction zum Stillstand kommt, wenn der Coëfficient bei  $f(m - \mu x)$  gleich 0 ist.

Dann haben wir:

$$k_1 \sqrt{a} - k_2 x a = 0.$$

Daraus ergibt sich:

$$x \sqrt{a} = \frac{k_1}{k_2} = k,$$

wo  $k$  — eine Constante ist, oder

$$x = \frac{k}{\sqrt{a}};$$

d. h. beim Stillstand der Reaction muss die Menge der gebildeten Salicylsäure (für die gegebene Menge des Fermentes) umgekehrt proportional der Quadratwurzel aus der Concentration der zu oxydirenden Substanz sein.

Die von uns gemachten Voraussetzungen führen also zu dem Resultate, das anfangs empirisch festgestellt war<sup>1)</sup>.

Ausser der soeben besprochenen Eigenthümlichkeit der Oxydationsprocesse in saurem Medium, macht sich noch eine andere bemerkbar, die darin besteht, dass die Menge des Oxydationsproductes nicht streng proportional der Concentration des Fermentes — wie im alkalischen Medium —, wohl aber annähernd proportional dem Quadrate der Concentration ist. Zur Erklärung dieser Verhältnisse sind weitere Untersuchungen und Thatsachen, über welche ich zur Zeit noch nicht verfüge, nöthig.

## VI. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussbetrachtungen.

1. Es war gezeigt, dass beim Extrahiren des Lebergewebes mit schwachen Salzlösungen — neutralen und schwach alkalischen — Auszüge erhalten werden, welche die Fähigkeit besitzen, Oxydation des Salicylaldehyds zu bedingen (in Uebereinstimmung mit Jaquet, Salkowski und Jamagiwa, Abelous et Biarnès, M. Jacoby). Da in wässerigen Lösungen derselben Salze und bei denselben Temperaturbedingungen das Salicylaldehyd weder durch den atmo-

---

1) Erste Mittheilung, Abschnitt III und „Ueber die Oxydationskraft der Gewebe“. Dieses Archiv Bd. 65. 1896.

sphärischen noch durch den gelösten Sauerstoff oxydirt wird, so ist es wohl erlaubt, anzunehmen, dass in den Gewebeauszügen besondere (specielle) Bedingungen vorliegen, welche die Oxydation dieser Substanz begünstigen. Die Erforschung dieser Bedingungen ergab folgende Thatsachen:

a) Die Oxydationsfähigkeit des Auszuges wird durch Kochen desselben aufgehoben, worauf zuerst von Jaquet hingewiesen worden ist.

b) Die Oxydationsfähigkeit wird geschwächt oder ganz aufgehoben, wenn der Auszug der Einwirkung von Trypsin unterworfen wird. Hieraus wurde der Schluss gezogen, dass die Oxydationsleistung des Gewebeauszuges bedingt wird durch das Vorhandensein eines oder einiger Eiweisskörper in demselben.

c) Die Oxydationsfähigkeit des Auszuges wird nicht aufgehoben, wenn der Auszug mit Chloroform gesättigt wird. Solche mit Chloroform gesättigte Auszüge behalten ihre Oxydationsfähigkeit sehr lange<sup>1)</sup>.

Da in den Auszügen unter diesen Bedingungen sich eigenartige Processe der Antodigestion (Salkowski) abspielen können, so ist es einleuchtend, dass die Oxydationsfähigkeit der Gewebeauszüge nicht an diese Processe gebunden ist.

Sie kann daher nicht erklärt werden durch den „dynamischen“ Zustand des Auszuges, sondern muss in Zusammenhang mit einem gewissen oder gewissen Stoffen gebracht werden, die in dem Auszuge in bestimmter Menge vorhanden sind und sich weder qualitativ noch quantitativ verändern durch irgend welche Processe, die sich in dem sich selbst überlassenen Extracte abspielen können.

d) Die active Substanz des Auszuges, die sich in einem sich selbst überlassenen Extracte Tage lang erhält, verliert ihre oxydirende Wirkung sehr bald bei Gegenwart von Salicylaldehyd. Die gegebene Menge der activen Substanz, welche letztere wir als Ferment bezeichnen wollen, verliert nach der Oxydation einer bestimmten (beschränkten) Quantität des Aldehyds ihre Oxydationsfähigkeit: die Oxydation hört auf, und das

---

1) Längere als sechstägige Versuche wurden nicht angestellt, aber man darf annehmen, dass die Haltbarkeit der Auszüge eine relativ unbegrenzte ist.

Ferment wird trotz der Gegenwart grosser Mengen der zu oxydirenden Substanz unwirksam; es wird also ganz zerstört oder inactivirt. Wir wollen diesen Zustand des Fermentes einen inactivirten nennen, da die Frage, ob das Ferment eventuell zerstört wird, in dieser wie auch in den vorhergehenden Mittheilungen von uns nicht erörtert wurde.

2. Es erwies sich, dass die Menge der Salicylsäure, welche bei Einwirkung des Fermentes gebildet wird, von verschiedenen Bedingungen abhängt, die auch Gegenstand der Untersuchung waren. Es wurde untersucht, welchen Einfluss auf die Ausbeute des Oxydationsproductes die Concentration des Fermentes und der zu oxydirenden Substanz im Zusammenhang mit den allgemeinen Bedingungen des Mediums haben, in welchem die Reaction vor sich geht. Die hierbei erhaltenen Resultate lassen sich folgendermaassen gruppieren.

Erster Fall. Der Wirkung des Gewebeauszuges wird eine solche Quantität Salicylaldehyd unterworfen, welche wesentlich die Oxydationsfähigkeit der im Extracte enthaltenen Fermentmenge überschreitet. Der Auszug hat beim Beginne der Digestion neutrale Reaction, folglich vollzieht sich der Oxydationsprocess bei beständig anwachsender Acidität des Mediums (in Abhängigkeit von der sich bildenden Salicylsäure).

Unter diesen Bedingungen wächst die Menge des Oxydationsproductes mit der Concentration des Fermentes und fällt mit der Concentration der zu oxydirenden Substanz, und zwar ist die Menge des Oxydationsproductes auf eine Volumeneinheit des Reactionsgemisches umgekehrt proportional der Quadratwurzel aus der Concentration der zu oxydirenden Substanz und annähernd proportional dem Quadrate der Concentration des Fermentes.

Bei einer und derselben Menge des Fermentes tritt — im gegebenen Falle — ein Stillstand der Reaction nach der Bildung bestimmter Mengen von Säure ein.

So bilden sich bei den Mengen Aldehyds

$$a_1, a_2, a_3 \dots$$

Mengen Säure

$$s_1, s_2, s_3 \dots,$$

wobei folgende Beziehungen Platz haben:

$$s_1 \sqrt{a_1} = s_2 \sqrt{a_2} = s_3 \sqrt{a_3} \dots$$

Zweiter Fall. Analog dem ersten Falle wird in die Fermentlösung ein grosser Ueberschuss Aldehyd eingeführt, der die Oxydationsfähigkeit des Fermentes weit überschreitet, nur verläuft die Reaction die ganze Zeit in schwach alkalischem (resp. neutralem) Medium.

Unter solchen Verhältnissen ist der ganze Werth der sich bildenden Säure streng proportional der Concentration des Fermentes und hängt nicht von der Concentration der zu oxydirenden Substanz ab. Im gegebenen Falle gibt eine und dieselbe Menge des Fermentes zum Schluss der Reaction, d. h. bis zum vollständigen Erschöpfen der Oxydationsfähigkeit, eine und dieselbe Menge Säure, unabhängig von der Concentration des Aldehyds.

3. Es war ferner untersucht worden, mit welcher Geschwindigkeit die Oxydation des Salicylaldehyds vor sich geht, wenn dieselbe in schwach alkalischem resp. neutralem Medium stattfindet.

Untersucht wurden folgende Fälle:

a) Wenn in die Fermentlösung eine überschüssige Menge Aldehyd eingeführt wird. In solchem Falle ist die Oxydationsgeschwindigkeit proportional der Quadratwurzel aus der Concentration des Aldehyds. Da nun die Oxydation mit der Inactivirung des Fermentes zusammenhängt, so kann die Inactivirungsgeschwindigkeit durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$\frac{dx}{dt} = k \sqrt{a - \alpha x} \cdot (m - x),$$

wo  $m$  — die Menge des Fermentes,

$a$  — die Menge der zu oxydirenden Substanz,

$x$  — die Menge des Fermentes, welche im Zeitraum —  $t$  inactivirt wurde,

$\alpha x$  — die während dieser Zeit entstandene Menge Salicylsäure,

$k$  — der Geschwindigkeitscoefficient.

b) In die Fermentlösung wird eine kleine Quantität Aldehyd gebracht, geringer als diejenige, welche durch die vorhandene Fermentmenge oxydirt werden kann.

In diesem Falle ist die Oxydationsgeschwindigkeit proportional dem Quadrate der Concentration der zu oxydirenden Substanz:

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x)^2,$$

wobei  $a$  — die angewandte Menge Aldehyd,

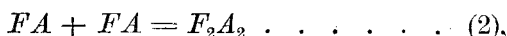
$x$  — die Menge desselben, welche im Laufe des Zeitraumes  
—  $t$  oxydirt ward, und

$k$  — den Geschwindigkeitscoefficient bezeichnen.

4. Die sub 3 a, 3 b, sowie sub 2 beschriebenen Verhältnisse sind erst dann verständlich, wenn wir annehmen, dass die zu oxydirende Substanz mit dem Fermente eine präliminäre Verbindung eingeht. Und zwar muss man annehmen, dass hier eine allmähliche, stufenweise Bildung von immer mehr und mehr complicirteren Verbindungen stattfindet. Anfangs reagiren das Ferment- $F$  und das Aldehyd- $A$  nach dem Schema:



Sodann sind zwei Möglichkeiten gegeben: Tritt in die Verbindung  $FA$  die ganze vorhandene Menge des Aldehyds, wie solches bei geringen Mengen desselben der Fall ist, so findet eine weitere Reaction statt nach dem Schema:



wenn aber das Aldehyd im grossen Ueberschusse vorhanden ist, so findet neben dieser Reaction noch eine andere statt, nach dem Schema:

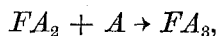


Die nach dem Schema (1) vor sich gehende Reaction verläuft mit grosser Geschwindigkeit, und nur die Reactionen (2) und (3) verlaufen langsam. Hierbei ist ohne Weiteres klar, dass die Geschwindigkeit der Reaction (2) proportional dem Quadrate der Concentration des Aldehydes sein muss, wie solches bei entsprechenden Versuchen auch thatsächlich gefunden wurde.

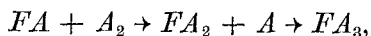
Nimmt man an, dass an der Reaction (3) nur die ionisirten Moleküle des Aldehydes betheiligt sind, so muss dieselbe, entsprechend dem Ostwald'schen Verdünnungsgesetze, mit einer Geschwindigkeit, die proportional der Quadratwurzel aus der Concentration desselben ist, vor sich gehen, was auch für die entsprechenden Versuchsbedingungen constatirt wurde.

Ferner ist klar, dass, wenn der Oxydation nur der durch das Ferment gebundene Theil unterliegt, die Menge des Oxydationsproductes proportional der Menge dieser Verbindung ( $FA_2$ ) sein wird. Da diese Menge ( $FA_2$ ) ihrerseits proportional der Fermentmenge ist, so muss die Ausbeute der Reaction beim Ueberschusse von Aldehyd proportional der Concentration des Fermentes und unabhängig von der Concentration des Aldehyds sein.

Bei der Oxydation in saurem Medium müssen wir, wie solches im Abschnitte V betont wurde, die Bildung noch complicirter Verbindungen annehmen: ausser den präliminären Verbindungen  $FA$  und  $FA_2$  finden hier unter dem Einflusse der Säure noch folgende Reactionen statt:



oder:



wobei die sich bildenden Verbindungen, dank den eigenthümlichen Structurverhältnissen (Inactivirung der Formylgruppen) eine intramolekuläre Oxydation des Aldehyds nicht zulassen.

Diese Voraussetzung führt, wie im Abschnitte V gezeigt wurde, zu quantitativen Verhältnissen, die schon sub 2 erörtert sind.

5. Die Hypothese von dem Entstehen präliminärer Verbindungen des Fermentes mit der zu oxydirenden Substanz führt zu folgenden Schlüssen:

a) Wie aus den sub 2 und 3 mitgetheilten Resultaten ersichtlich, geht der Oxydationsprozess, ungeachtet der verschiedenen kinetischen Typen der zu erforschenden Reaction, stets unter Betheiligung zweier Moleküle des Aldehyds vor sich, da die intramolekuläre Oxydation, im Sinne der Hypothese, nur in den Verbindungen  $FA_2$  oder  $F_2A_2$  zu Stande kommt.

Folglich ist der Mechanismus der Oxydation, als solcher, aller Wahrscheinlichkeit nach, immer derselbe; verschieden sind, in Abhängigkeit von äusseren Bedingungen, nur die Mechanismen der Activirung der zu oxydirenden Substanz.

b) Die Oxydationsgeschwindigkeit muss unabhängig vom Ueberschuss des Sauerstoffes sein, da, im Sinne der Hypothese, die Geschwindigkeit des ganzen Prozesses nicht von der eigentlichen Oxydationsgeschwindigkeit abhängt, sondern von der Geschwindigkeit, mit welcher sich die präliminären Verbindungen  $FA_2$  oder  $F_2A_2$  bilden. Diese Angabe wurde ebenfalls durch den Versuch bestätigt (Erste Mittheilung, VI).

6. Aus dem bisher Mitgetheilten ergibt sich, dass die Bildung präliminärer Verbindungen des Fermentes mit der zu oxydirenden Substanz unbedingt nothwendig ist, damit die Oxydation selbst zu Stande kommen kann, und dass ferner die Oxydation (intramolekuläre) der Substanz dann ein-

tritt, wenn diese Verbindungen eine gewisse Complicirtheit erlangt haben. Die ersteren Verbindungen  $FA$  sind noch nicht oxydationsfähig, und erst in den Verbindungen  $FA_2$  oder  $F_2A_2$  gewinnt das Aldehyd die Fähigkeit, oxydiert zu werden.

Schon früher hatte ich Gelegenheit, meine Ueberzeugung auszusprechen, dass der Oxydationsmechanismus sowohl im untersuchten Falle, als auch bei den im Organismus verlaufenden Oxydationsprozessen in der Hauptsache darin besteht, dass im Organismus Vorrichtungen zur Utilisation des Wasserstoffes der zu oxydierenden Substanzen vorhanden sind. Das Fixiren von Sauerstoff auf der zu oxydierenden Substanz ist, nach dieser Ansicht, eine unbedingte Folge der Elimination des Wasserstoffes; durch Sauerstoff werden die durch Entfernung des Wasserstoffes frei gewordenen Affinitäten gesättigt. Dass im untersuchten Falle der Oxydationsmechanismus dieser Vorstellung wirklich entspricht, wird durch die oben angeführte Thatsache, dass der Oxydation zwei Moleküle Aldehyd unterliegen, bestätigt. Dieser Umstand setzt seinerseits wieder die Bildung von Anhydrid- oder Hyperoxydgruppen voraus, wobei der Wasserstoff der Formylgruppen eliminirt wird. Von diesem Standpunkte aus ist das Ferment eine Substanz, welche die Rolle eines „Verzehrer“ des Wasserstoffes spielt und so zur Elimination des letzteren aus der zu oxydierenden Substanz beiträgt.

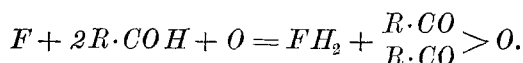
Wie ist denn das zu verstehen, dass der Uebertritt des Wasserstoffes von der zu oxydierenden Substanz zum Fermente erst dann stattfindet, wenn die Verbindung des Fermentes mit der zu oxydierenden Substanz schon eine gewisse Complicirtheit erreicht hat?

Allem Anscheine nach kann das Ferment den Wasserstoff erst dann utilisiren, wenn letzterer in den complicirten Verbindungen welche wir mit  $FA_2$  und  $F_2A_2$  bezeichnet haben, eine bestimmte Tension erreicht hat, was in der Phase  $FA$  noch nicht der Fall ist, oder aber die Ansammlungsgrenze des Wasserstoffes wird durch stöchiometrische Verhältnisse bedingt. Welche von den beiden Erklärungen angenommen werden muss, hängt natürlich davon ab, wie sich die weiteren Verhältnisse für den aus der zu oxydierenden Substanz eliminirten Wasserstoff gestalten werden. Wenn letzterer sofort zu Wasser oxydirt wird, so ist es klar, dass der Wasserstoff im Moleküle, welches eine Verbindung des Fermentes mit der zu oxydierenden Substanz darstellt, eine bestimmte Tension erreichen

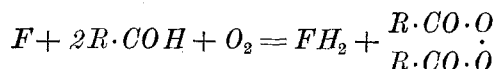


muss, die grösser ist als dieselbe im Wasser. Wenn wir uns dagegen das Ferment als eine Substanz, die hydrogenisirt werden kann, eventuell, als ungesättigte Verbindung vorstellen, so wird die Nothwendigkeit einer bestimmten Anhäufung der zu oxydirenden Substanz einfach durch stöchiometrische Verhältnisse bedingt.

Wie dem auch sei, jedenfalls sind wir genöthigt, eine Tendenz des Fermentes zur Hydrogenisation anzunehmen; deshalb lassen sich die Wechselwirkungen zwischen demselben und der zu oxydirenden Substanz durch folgendes Schema wiedergeben:



oder:



Selbstverständlich wurden durch dieses Schema die in Wirklichkeit statthabenden Verhältnisse nicht vollständig klargelegt, da durch dasselbe weder das weitere Schicksal des vom Fermente verbrauchten Wasserstoffes noch die Bildung der Verbindung des Fermentes mit der zu oxydirenden Substanz ausgedrückt werden, welche letztere Verbindungen wir, wie oben gezeigt wurde, annehmen müssen.

Wir sehen also schliesslich, dass die active Substanz in dem untersuchten Prozesse, welche zweifellos Eiweissnatur besitzt und eventuell als Ferment bezeichnet werden kann, in der einen oder anderen Weise als Wasserstoffverzehrer resp. Acceptor der zu oxydirenden Substanz wirkt. Hierbei bleiben aber noch folgende Fragen unbeantwortet.

Einmal die Frage von der Herkunft des an der Reaction theiligten Sauerstoffes. Hier ist noch zu erörtern, ob es sich um den atmosphärischen, oder gelösten, resp. freien Sauerstoff handelt, oder ob der in der einen oder anderen Weise mit dem Fermente verbundene Sauerstoff in Betracht kommt, so z. B. der Peroxyd-Sauerstoff.

Im letzteren Falle würden wir es mit einer intramolekulären Wanderung des Sauerstoffes in den Verbindungen  $FA_2$  oder  $F_2A_2$  zu thun haben, und das Ferment würde hier neben anderen Functionen auch als Sauerstoffüberträger wirken.

Sodann bleibt noch zu beantworten, ob die Umwandlungen des Fermentes, welche bei der Hydrogenisation desselben Platz haben,

reversibel sind. Solange diese Frage nicht erledigt ist, haben wir, streng genommen, kein Recht, das Leberferment den näher untersuchten Enzymen zuzuzählen.

Thatsache ist, dass in unseren Versuchen, parallel der Oxydation des Substrates, die Inactivirung des Fermentes vor sich geht.

Hieraus folgt, dass der hydrogenisirte Zustand des Fermentes eine stabile Form ist, welche unter den Bedingungen, die bei unseren Versuchen Statt hatten, nicht rückgängig gemacht werden kann.

Aus dem Gesagten ist aber noch nicht zu schliessen, dass eine Reactivirung des Fermentes unmöglich wäre unter denjenigen Bedingungen, die den physiologischen näher kommen. —