

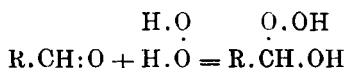
152. Gertrud Woker: Ein Beitrag zur Theorie der Oxydationsfermente. Über »Peroxydase«- und »Katalase«-Reaktionen des Formaldehyds und Acetaldehyds.

(Eingegangen am 2. März 1914.)

Vor kurzem habe ich über den inneren Zusammenhang der als Peroxydase, Katalase und Reduktase bezeichneten Fermente die folgende Auffassung¹⁾ entwickelt:

1. Die drei verschiedenartigen »Fermentwirkungen«, die als Sauerstoff-Übertragung in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd (Bläuung von Benzidin und Oxydation anderer Chromogene zum Farbstoff), als Zersetzung von Wasserstoffperoxyd zu Wasser und Sauerstoff und als Reduktion von Farbstoff-Lösungen (Methylenblau, Indigo-sulfonsäure) bei pflanzlichen und tierischen Säften beobachtet werden, sind an ein und denselben Träger, der identisch ist mit der Oxygenase von Chodat und Bach, gebunden. Es würde sich mit anderen Worten bei jenen ungleichartigen Wirkungen nur um verschiedene Reaktionen der nämlichen Substanz handeln, und zwar wird vorausgesetzt, daß diese letztere den Charakter eines Aldehyds besitzt.

2. Bei der Einwirkung von Wasserstoffperoxyd auf den fraglichen Aldehyd bildet sich zunächst in Übereinstimmung mit der Auffassung von Chodat und Bach ein Peroxyd von der Konstitution der sekundären Peroxyde im Sinne Englers²⁾:



3. Das unter allen Umständen beim Zusammentreffen von Aldehyd und Wasserstoffperoxyd zuerst gebildete Peroxyd, $\text{R.HC} \begin{smallmatrix} \text{O.OH} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$ ist zweier verschiedener Umsetzungen fähig:

a) Es kann sich mit dem vorhandenen überschüssigen Wasserstoffperoxyd unter Sauerstoff-Entwicklung umsetzen (Katalase-Reaktion).

b) Es kann Sauerstoff auf eine oxydable Substanz übertragen. Ist diese ein Chromogen, so tritt Farbstoffbildung auf (Peroxydase-Reaktion).

c) Ist gleichzeitig ein Überschuß von Wasserstoffperoxyd und ein Chromogen zugegen, so finden im allgemeinen beide Reaktionen

¹⁾ Gertrud Woker, Zur Theorie der Oxydationsfermente, Z. f. allg. Physiologie 16, 340 [1914], sowie im Abschnitt über die Oxydationsfermente in dem demnächst herauskommenden spez. Teil von Woker, die Katalyse, Abt. 2 (Bd. 3: Biologische Katalysatoren), Stuttgart 1914.

²⁾ s. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Leipzig 1909/10.

gleichzeitig statt. Wasserstoffperoxyd-Zerlegung und Bläuung von Benzidin, Guajactinktur usw. können dann also neben einander beobachtet werden.

d) Der simultane Verlauf der beiden Reaktionen des nämlichen Peroxyds ($\text{R.HC} \begin{smallmatrix} \text{O.OH} \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$) ist gleichbedeutend mit einer Konkurrenz der Wasserstoffperoxyd-Zerlegung und der Sauerstoff-Übertragung, denn beide Reaktionen verbrauchen das nämliche Ausgangsmaterial in irreversibler Umwandlung.

e) Da bei gleichzeitigem Verlauf zweier um das nämliche Ausgangsmaterial konkurrierender Reaktionen diejenige obsiegt, die die raschere ist, so tritt mehr die Katalase- oder mehr die Peroxydase-Wirkung in den Vordergrund, je nachdem die Wasserstoffperoxyd-Zerlegung oder die Sauerstoff-Übertragung in irgend einem Fall günstigere Bedingungen für ihren Verlauf vorfindet. Die in einem pflanzlichen oder tierischen Saft (oder daraus hergestellten Anteilen von fermentativer Wirksamkeit) vorliegenden Bedingungen, d. h. im wesentlichen der Gehalt an aktivierenden oder hemmenden Begleitstoffen der beiden Reaktionen, können so beschaffen sein, daß sich das Verhältnis, in dem die Geschwindigkeit der Katalase- und der Peroxydase-Reaktion zu einander stehen, ganz zugunsten der Katalase- oder auch der Peroxydase-Reaktion verschiebt. Diese Grenzfälle entsprechen einer reinen Katalase- oder einer reinen Peroxydase-Wirkung. Bei der Untersuchung eines solchen Saftes gewinnt man, mit andren Worten, den Eindruck, daß nur Katalase oder nur Peroxydase vorhanden sei.

4. Ist kein Wasserstoffperoxyd zugegen und der Luftsauerstoff sorgfältig abgesperrt, so kommt das Sauerstoff-Bedürfnis des den vorigen Reaktionen zugrunde liegenden Aldehyds dadurch zum Ausdruck, daß gleichzeitig anwesenden, disponiblen Sauerstoff enthaltenden Körpern Sauerstoff entzogen wird. Ist der reduktionsfähige Körper ein Farbstoff, so tritt Reduktion zur Leukobase ein (Reduktase-Wirkung).

Wie steht es nun mit den Beweisen für die im Vorigen in knappen Umrissen dargelegte Auffassung, die dem fast immer gemeinsamen Vorkommen der erwähnten Enzyme ebensowohl wie dem z. B. von Wolfgang Ostwald beobachteten Antagonismus von Peroxydase und Katalase gerecht zu werden versucht?

Durch Versuche, welche Otto Begemann¹⁾ auf meine Veranlassung hin unternommen hat, ließ sich in Bezug auf die Identität

¹⁾ Über seine im Frühjahr 1912 begonnenen Versuche hat Hr. Begemann, Z. f. allg. Physiologie 16, 350 [1914] kurz berichtet. Eingehendere Angaben finden sich in seiner Inaug.-Dissert., eingereicht d. h. phil. Fakultät d. Universität Bern.

von »Katalase« und »Peroxydase« in Pflanzensäften Folgendes zeigen:

1. Bei der Erwärmung von wäßrigen Pflanzenextrakten erlischt die Wirkung der »beiden Fermente« bei der nämlichen Temperatur. Bei 78° ist der »Katalase«- wie der »Peroxydase«-Effekt noch merklich, bei 79° nur mehr sehr schwach nachweisbar, und bei 80° ist die Fähigkeit, Wasserstoffperoxyd zu zerlegen, ebenso vollständig verschwunden, wie die Fähigkeit, Benzidin zu bläuen.

2. Bei normalen, im Dunkeln und unter verschiedenfarbigem Licht gezogenen Maiskeimlingen waren »Peroxydase«- und »Katalase«-Gehalt fast immer parallel.

3. Durch Dialyse änderte sich das gegenseitige Verhältnis von »Katalase« und »Peroxydase« nicht.

4. Bei Pilzsäften, den einzigen Materialien, bei denen keine Peroxydase-Reaktion nachweisbar war, verlief die Katalase-Wirkung so stürmisch, daß binnen weniger Minuten das mit dem Pilzextrakt und Wasserstoffperoxyd beschickte Gärungsröhrchen überschäumte, während unter den gleichen Bedingungen angesetzte Versuche mit Auszügen anderer Pflanzen nach zwei Stunden nur einige ccm Sauerstoff entwickelt hatten. Es war dies diejenige Beobachtung, die nebst der Feststellung, daß die Peroxydase-Reaktion um so schwächer ausfällt, je länger das Pflanzenextrakt vor Ausführung des Versuches (Benzidin-Reaktion) mit Wasserstoffperoxyd in Berührung steht, mich auf die vorhin erwähnte Konkurrenzhypothese der Katalase- und der Peroxydase-Reaktion geführt hatte.

Weitere Beweise für die Identität von Katalase und Peroxydase, sowie für den Zusammenhang dieser Fermente mit der Reduktase zu sammeln, habe ich, gemeinsam mit Julius Briesenmeister unternommen. Da die Annahme einer Identität eng mit der Vorstellung zusammenhängt, daß das »fermentative« Grundprinzip der drei in Frage kommenden Wirkungen Aldehyd-Natur besitzt, so wurde zunächst versucht, ob Aldehyde, außer ihrer bekannten reduzierenden Funktion (»Reduktase«-Wirkung), auch »Katalase«- und »Peroxydase«-Funktionen übernehmen können. Dies ist nun tatsächlich der Fall. Gleich der erste, nach dieser Richtung hin geprüfte Aldehyd, der Formaldehyd, erwies sich als ein prächtiges Modell für »Katalase« und »Peroxydase«¹⁾. Mit Wasserstoffperoxyd und Benzidin (je 1 Tropfen) auf

¹⁾ Die Reduktionswirkungen des Formaldehyds: die Silberspiegel-Bildung, die Reduktion von Farbstoff-Lösungen (Indigo-sulfonsäure, Methylenblau usw.) sind allbekannt. In der Kälte vermag der Aldehyd, das Methylenblau nur in Gegenwart von sauerstoff-anziehenden Katalysatoren (vergl. außer Wieland im Folgenden auch Sabatier, la Catalyse, Paris [1913]), so dem Platin, und den natürlichen Reduktasen zu reduzieren, s. die ausgezeichneten Arbeiten

Filtrierpapier zusammengebracht, sowie beim Übersichten eines Guajactinktur-Terpentinöl-Gemisches mit Formaldehyd im Reagensglas, wurde eine schöne Blaufärbung erhalten, deren Intensität und zeitlicher Eintritt von der Formaldehyd-Konzentration abhängig ist. Werden nach der von O. Begemann und mir ausgearbeiteten Bestimmungsmethode der Peroxydase in Pflanzensäften und im Blut zunächst 0.05 ccm der Formaldehyd-Verdünnung auf Filtrierpapier, sodann hierzu 1 Tropfen alkoholischer Benzidinlösung (4-prozentig), und dann 1 Tropfen 3-prozentiges Wasserstoffperoxyd (aus Perhydrol) getropft, so tritt bei einer Verdünnung der käuflichen 38-prozent. Formaldehyd-Lösung auf das 400-fache nach ca. 55 Sekunden¹⁾ eine Blaufärbung ein, bei 200-facher Verdünnung nach ca. 27 Sekunden, bei 100-facher Verdünnung nach ca. 15 Sekunden u. s. f. Bei sehr starker Konzentration kann die Oxydationswirkung so intensiv werden, daß sofortige Weiteroxydation des Benzidinblaus stattfindet. Mit der Abkürzung des zeitlichen Eintritts nimmt zugleich die Intensität der Blaufärbung mit steigender Konzentration zu, geradeso wie bei den entsprechenden Versuchen mit natürlicher »Peroxydase«, weshalb sich Formaldehyd-Lösungen als Testlösungen bei der quantitativen Feststellung des »Peroxydase-Wirkungsgrades« verwenden lassen. Der Peroxydase ähnlich verhält sich die Formaldehyd-Lösung aber auch bei Prüfung auf Katalase. Wurde der Aldehyd mit Wasserstoffperoxyd in einem Gärungsröhrchen sich selbst während einiger Tage überlassen, so war nach dieser Zeit fast der ganze längere Schenkel mit Gas gefüllt, während die Kontrolle mit Wasserstoffperoxyd allein nur eine einzige Gasblase während dieser Zeit entwickelt hatte.

Wie weit dieses gleichsinnige Verhalten von Formaldehyd und den natürlichen »Peroxydase« und »Katalase« gegenüber Chromogenen bzw. einem Wasserstoffperoxyd-Überschuß bei der seuchenpolizeilichen Kontrolle der Milch (wo bekanntlich die »Ferment-Prüfung« von großer Bedeutung ist) wegen des häufigen Zusatzes von Formaldehyd als Konservierungsmittel in Betracht gezogen werden

von Bredig und seinen Mitarbeitern, Bredig und Sommer, Ph. Ch. **70**, 34 [1909]. Platinwirkung als Analogon der Schardingerschen Reaktion. Bredig, B. **47**, 546 [1914], sowie die schönen Untersuchungen von Wieland, ebenda **45**, 484, 679, 2606 [1912]; **46**, 3327 [1913], welch letzterer, wunöglich von anderen Voraussetzungen ausgehend, ebenfalls zu der Vorstellung gelangt ist, daß Oxydase und Reduktase das nämliche Prinzip sind. S. ferner hierzu Hoppe-Seylers Arbeiten und die kürzlich im Chem. Zentralbl. referierten von Oberstadt. Vergl. dagegen Bach, B. **46**, 3864 [1913].

¹⁾ Benzidin allein gibt mit H_2O_2 unter diesen Bedingungen erst nach 2 Minuten eine sehr allmählich sich verstärkende Bläuung.

muß, behalten wir uns vor, genau zu untersuchen¹⁾, ebenso wie die eingehende Prüfung des Verhaltens dieses und anderer Aldehyde²⁾, von denen sich der Acetaldehyd dem Formaldehyd in Bezug auf die Peroxydase-Reaktion mit Benzidin³⁾ und die schwankendere Katalase-Reaktion ähnlich verhält. Der Benzaldehyd gibt nur nach mehrmaliger Fraktionierung in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd eine schöne Blaufärbung. Gestandener Benzaldehyd gibt dagegen infolge seines Gehalts an Peroxyden schon für sich allein eine Bläuung des Benzidins, er zeigt also in diesem Zustand die Reaktionen der »Direkt-Oxydase«, die ohne die Gegenwart von Wasserstoffperoxyd, ozonisiertem Terpentinöl usw. Sauerstoff-Übertragung veranlasst. Zusatz von Wasserstoffperoxyd wirkt hier wohl infolge der raschen gegenseitigen Umsetzung der beiden Peroxyde, im Gegenteil zerstörend.

Eine Katalase-Reaktion konnte beim Benzaldehyd nicht nachgewiesen werden, weder in Gegenwart von Alkohol, der zur Lösung des Benzaldehyds zugesetzt wurde, noch bei Verwendung von Benzaldehyd in Substanz. Vielmehr war der Benzaldehyd imstande, die Sauerstoff-Entwicklung wochenlang vollständig zu unterdrücken. Er ließe sich also vielleicht als Wasserstoffperoxyd-Konservierungsmittel benutzen.

Auch Traubenzucker wurde der Peroxydase-Reaktion unterzogen, doch ohne Erfolg. Ebenso fand eine Blaufärbung mit Benzidin bei Oxy-aldehyden der aromatischen Reihe: Salicylaldehyd, Protocatachualdehyd, Vanillin, Orthovanillin, *o*-Nitro-vanillin, Veratrumaldehyd, sowie beim Methyl-vanillin und Piperonal nicht statt, oder es wurde wenigstens diese Färbung durch die Bildung intensiver, gelber bis orangeroter Farbstoffe verdeckt, die durch eine Reaktion der betreffenden Aldehyde mit Benzidin allein ohne die Beteiligung von Wasserstoffperoxyd, vermutlich durch das Eingreifen der Aldehydgruppe in eine oder beide Aminogruppen des Benzidins zustandekommen. Die Weiterverfolgung der Bildungsbedingungen und der Eigenschaften dieser Farbstoffe, die soweit sie zwei freie Hydroxyle in *o*-Stellung besitzen, außer dem direkten Beizenziehungsvermögen auf Baumwolle, das den Benzidin-Farbstoffen zukommt, auf Metall-oxydbeizen ziehen, ist inzwischen schon mit meinem Einverständnis von anderer Seite in Angriff genommen worden.

¹⁾ Die Isolierung des in natürlichen Säften die erwähnten Fermentreaktionen erzeugenden Prinzips auf Grund seiner Aldehyd-Eigenschaften (Bisulfit-Reaktion) ist von uns ebenfalls in Angriff genommen worden.

²⁾ Von Ketonen wurde nur Aceton geprüft. Es zeigte keine Peroxydase-Reaktion, jedoch eine geringfügige Gasentwicklung mit H_2O_2 .

³⁾ Mit Guajac-Terpentinöl wurde dagegen keine Blaufärbung erhalten.

Nicht unmöglich wäre es, daß durch Ersatz des Benzidins durch ein Chromogen, das zu einer Reaktion mit aromatischen Aldehyden allein nicht befähigt ist, auch in diesen Fällen die beim Formaldehyd und Acetaldehyd gefundene »Peroxydase-Reaktion« erzeugt werden könnte. Doch verlief beim Vanillin ein mit dem Guajactinktur-Terpentinöl-Gemisch angestellter Versuch negativ, während das nämliche Gemisch durch Formaldehyd intensiv gebläut¹⁾ wurde.

Bern, Institut für physikalisch-chemische Biologie der Universität.

153. F. W. Semmler und K. E. Spornitz:
Zur Kenntnis der Bestandteile ätherischer Öle.
(Notiz über das Sesquiterpen β -Gurjunen.)

(Eingegangen am 9. März 1914.)

Deussen und Philipp²⁾ fanden im Gurjunbalsamöl zwei Sesquiterpene, das α -Gurjunen und das β -Gurjunen. Von letzterem geben sie an, daß sein Siedepunkt bei ca. 122.5–123.5° (bei 12 mm Druck) liegt, und daß es schwach rechts dreht.

Es ist uns nun gelungen, diesen Kohlenwasserstoff β -Gurjunen zu isolieren und seine tricyclische Natur, die auch Deussen und Philipp vermuteten, nachzuweisen.

Wir benutzten hierzu das verschiedene Verhalten von α - und β -Gurjunen gegen Kaliumpermanganat. Während ersteres sich leicht von Permanganat in wäßriger Acetonlösung oxydieren läßt, wird letzteres nur schwer angegriffen.

Die niedrig siedenden Anteile aus den Oxydationsprodukten mit Permanganat in Acetonlösung wurden von uns zur Entfernung der sauerstoffhaltigen Produkte über Natrium destilliert. Zur vollständigeren Trennung dieser niedrig siedenden Sesquiterpene oxydierten wir wiederholt unter Eiskühlung mit einem Atom Sauerstoff auf Permanganat pro Molekül $C_{15}H_{24}$ in wäßriger Lösung und gelangten schließlich zum β -Gurjunen; es hatte die physikalischen Konstanten: $Sd_{pr.}$ 113.5–114°, $\alpha_D = +19^\circ$, $d_{20} = 0.9329$, $n_D = 1.50526$ ³⁾.

¹⁾ Erst nach längerer Zeit wird das Guajacblau enthaltende Reaktionsgemisch durch die Weiteroxydation des Farbstoffes entfärbt.

²⁾ A. 374, 105.

³⁾ In Gemeinschaft mit Hrn. cand. chem. Jakubowicz fand ich, daß das β -Gurjunen noch stärker nach rechts dreht, wie aus einer im nächsten Heft erscheinenden Publikation ersichtlich ist; im übrigen bleiben die Daten dieselben.

Semmler.