

205. A. Bach und R. Chodat: Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle.

VIII. Ueber die Wirkungsweise der Peroxydase.

(Eingegangen am 23. März 1904.)

Nach dem von uns<sup>1)</sup> in der IV. Mittheilung angegebenen Verfahren gelingt es leicht, aus Meerrettigwurzeln (*Cochlearia armoriaca*) Peroxydasepräparate darzustellen, welche völlig frei von anderen Enzymen sind und ausser der Peroxydactivirung keine andere spezifische Function zeigen. Die Peroxydasepräparate wurden auf Oxygenase, Katalase, Amylase, Invertase, Emulsin und proteolytische Enzyme mit negativem Erfolg untersucht.

Oxygenase. 0.1 g Peroxydase wurde in 10 ccm Wasser gelöst und mit einer Lösung von 2 g frisch dargestelltem Pyrogallol in 25 ccm Wasser vermisch. Nach 5 Tagen farbte sich die Flüssigkeit braungelb, sie blieb aber vollkommen klar und lieferte keine Spur von Purpurogallin. In Vereinigung mit der äquivalenten Menge Hydroperoxyds (s. u.) fällt 0.1 g Peroxydase aus 2 g Pyrogallol binnen weniger Minuten ca. 0.180 g Purpurogallin aus.

Katalase. 0.1 g Peroxydase wurde in 10 ccm Wasser gelöst und in einem Apparate, welcher das Auffangen und Messen des entweichenden Gases gestattete, mit 10 ccm einer 1-procentigen Hydroperoxydlösung versetzt. Nach 5 Tagen sammelte sich kaum 1 ccm Gas in dem Messrohr. 0.005 g Katalase (aus *Sterigmatocystis nigra*) machen binnen 2 Minuten aus der gleichen Hydroperoxydmenge ca. 30 ccm Sauerstoff frei. Da unseres Wissens eine völlig katalasefreie Peroxydase bis jetzt noch nicht dargestellt worden ist, so ist das Ergebniss obigen Versuches als ein einwandsfreier Beweis dafür anzusehen, dass die Activirung des Hydroperoxyds und die Zersetzung desselben unter Sauerstoffentwicklung zwei von einander ganz verschiedene Processe sind.

Amylase. 100 g eines 2-procentigen Stärkekleisters wurden mit einer Lösung von 0.1 g Peroxydase in 10 ccm Wasser versetzt; hierauf wurde das Gemisch bei 30° stehen gelassen. Nach 24 Stunden zeigte der Kleister keine Verflüssigung und reducirte Fehling'sche Lösung nicht. Da Amylasepräparate stets beträchtliche Mengen Peroxydase enthalten, so suchten wir zu ermitteln, ob Letztere etwa einen activirenden Einfluss auf Amylase auszuüben im Stande ist. 3 g Amylase (Diastase absolut. Merck) wurden während 15 Tagen mit je 100 ccm 40-procentigem Alkohol fünf Mal extrahirt, und von dem Rückstande, welcher eine nur sehr schwache Peroxydasereaction zeigte, wurden je 0.01 g zu Verzuckerungsversuchen mit und ohne Zusatz von 0.1 g Peroxydase angewendet. Der Verzuckerungsprocess wurde während 3 Tage durch Titration mit Fehling'scher Lösung sorgfältig verfolgt. Hier soll nur als Ergebniss dieser Versuche erwähnt werden, dass Peroxydase auf die Verflüssigung und die Verzuckerung der Stärke durch Amylase keinerlei Einfluss ausübt.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 36, 602 [1903].

Die vereinigten alkoholischen Extracte wurden mit absolutem Alkohol ausgefällt, und der erhaltene Niederschlag wurde mit absolutem Alkohol gewaschen, im Vacuum bei Zimmertemperatur getrocknet und untersucht. Er zeigte sehr ausgeprägte Peroxydaseeigenschaften; sein hydrolytisches Vermögen war dagegen ziemlich gering. Von der Annahme ausgehend, dass die Amylase sich durch die von ihr abgeschiedene Peroxydase vielleicht besser activiren lassen würde als durch die Meerrettig-Peroxydase, stellten wir vergleichende Versuche mit den beiden Amylasefractionen an. Dabei ergab sich, dass die vereinigten Fractionen nicht mehr Stärke verzuckerten, als wenn sie getrennt auf dieselbe einwirkten.

Invertase. Durch ähnliche Versuche wurde festgestellt, dass unsere Peroxydasepräparate Rohrzucker nicht invertiren und auf die Inversion desselben völlig wirkungslos sind.

Emulsin. Beim Zusammenbringen von Peroxydase mit Amygdalin in wässriger Lösung macht sich weder der Geruch nach Blausäure, noch nach Benzaldehyd wahrnehmbar, und die Flüssigkeit reducirt nicht Fehling'sche Lösung.

Proteolytische Enzyme. In Glasröhrchen coagulirtes Eiweiss (nach Mett), wurde mit einer Lösung von 0.1 g Peroxydase in 10 ccm Wasser übergossen und bei 30° mehrere Tage unter Toluolzusatz stehen gelassen. Das Eiweiss wurde nicht angegriffen.

Zu erwähnen ist noch, dass bei der fractionirten Fällung mit starkem Alkohol oder starkem Aceton die Peroxydase — was ihre spezifische Function betrifft — sich wie ein einheitliches Agens verhält. Die einzelnen Fractionen besitzen annähernd dieselben Eigenschaften und activiren sich gegenseitig nicht.

Die Thatsache, dass die von uns dargestellten Peroxydasepräparate sich als physiologisch rein und insbesondere als frei von Oxygenase und Katalase erwiesen, veranlasste uns, die Wirkungsweise der Peroxydase bei der Activirung des Hydroperoxyds einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen. Dies schien uns umsomehr von Interesse, als bis jetzt über diesen Gegenstand noch keinerlei experimentelle Angaben vorliegen.

Die Wirkungsweise der hydrolytischen Enzyme ist vielfach untersucht worden, die dabei erhaltenen Ergebnisse sind aber, der Natur der Sache gemäss, unvollständig. Bei einem hydrolytischen, durch ein Enzym bewirkten Processe, z. B. bei der Inversion des Rohrzuckers durch Invertase, kommen drei Hauptfactoren in Betracht: die Substanz, welche hydrolysiert wird, das Enzym und das Wasser. Von diesen Factoren sind nur die ersten zwei variabel, der dritte, das Wasser, bleibt stets constant, seine quantitative Betheiligung an dem Processe ist unbestimmbar, da Letzterer in wässriger Lösung vor sich geht. Nun ist es kaum nöthig, hervorzuheben, dass das Wasser hier eine wichtige Rolle spielt, und dass sämmtliche enzyma-

fische, hydrolytische Processe nur als eine Activirung des Wassers durch die betreffenden Enzyme aufzufassen sind. Rohrzucker z. B. wird durch Wasser allein, wenn auch äussert langsam, invertirt; die Invertase beschleunigt nur unermesslich diesen von selbst langsam verlaufenden Process. Bleibt die quantitative Bethheiligung des Wassers an dem hydrolytischen Processe unbestimmt, so ist die Ermittlung der Wirkungsweise des Enzyms nur eine ganz einseitige.

Anders gestalten sich die Verhältnisse bei der Activirung des Hydroperoxyds durch die Peroxydase. Hier sind alle drei Hauptfactoren — oxydirbare Substanz, Peroxydase und Hydroperoxyd — quantitativ bestimmbar. Für ein näheres Erkennen der Wirkungsweise des Katalysators liegt also in diesem Falle eine bessere Aussicht vor als bei den hydrolytischen Enzymen.

Es galt nunmehr, ein für die Oxydationsversuche geeignetes Substrat aufzufinden. Als solches erwies sich das vielfach benutzte Pyrogallol. In reinem Zustande wird Letzteres während der Versuchsdauer weder von Peroxydase allein, noch von Hydroperoxyd allein merklich angegriffen<sup>1)</sup>.

Das Oxydationsproduct, das Purpurogallin, ist in kaltem Wasser unlöslich, während das Ausgangsmaterial darin sehr leicht löslich ist, sodass das Reactionsproduct ohne Schwierigkeit in reinem Zustande isolirt werden kann. Ein weiterer Vortheil des Pyrogallols liegt darin, dass in Folge der Unlöslichkeit des Reactionsproductes die Wirkung des Katalysators durch das Eintreten eines Gleichgewichtszustandes, wie es bei anderen Enzymen der Fall ist, nicht gestört wird.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, dass bestimmte Mengen von Peroxydase, Hydroperoxyd und Pyrogallol in wässriger Lösung zusammengebracht wurden, worauf das entstandene Purpurogallin, nach 24 Stunden auf tarirten Filtern gesammelt, mit 100 ccm Wasser ausgewaschen, bei 110° bis Gewichtsconstanz getrocknet und gewogen wurde. Um mehrere Versuche mit einem einheitlichen Peroxydasepräparat ausführen zu können, stellten wir uns 7 g Peroxydase dar, welche zufällig die Eigenschaft besass, genau ihren Gewichtstheil Hydroperoxyds zu activiren (s. u.). Wir betonen aber ausdrücklich, dass dieses Verhältniss ein bloss zufälliges war, da andere Peroxydasepräparate dasselbe nicht zeigten. Für die Versuche wurde je 1 g Peroxydase in 100 ccm Wasser gelöst, und von der Lösung wurden genau abgemessene Mengen angewendet. Die 1-procentige Hydro-

<sup>1)</sup> 1 g Pyrogallol wurde in 10 ccm 1-procentiger Hydroperoxydlösung gelöst und die Flüssigkeit bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 48 Stunden war keine Spur von Purpurogallin entstanden. Die Flüssigkeit war braungelb und vollkommen klar.

peroxydlösung wurde aus dem Merck'schen chemisch reinen 30-procentigen Hydroperoxyd durch passende Verdünnung mit Wasser bereitet.

Wir stellten 3 Versuchsreihen an:

- A) mit wechselnden Peroxydasmengen bei constanten Hydroperoxyd- und Pyrogallol-Mengen,
- B) mit wechselnden Hydroperoxydmengen bei constanten Peroxydase- und Pyrogallol-Mengen, und
- C) mit wechselnden Pyrogallolmengen bei constanten Peroxydase- und Hydroperoxyd-Mengen.

Sämmtliche Versuche wurden unter sonst gleichen Bedingungen bei Zimmertemperatur (15—17°) ausgeführt. Das Volumen der Flüssigkeit betrug in jedem Falle 35 ccm.

## A.

	Angewandte Peroxydase	Angewandtes Hydroperoxyd	Angewandtes Pyrogallol	Entstandenes Purpurogallin
I.	0.01 g	0.10 g	1 g	0.021 g
II.	0.02 »	0.10 »	1 »	0.042 «
III.	0.03 »	0.10 «	1 «	0.066 «
IV.	0.04 »	0.10 »	1 «	0.083 »
V.	0.05 »	0.10 »	1 »	0.102 «
VI.	0.06 »	0.10 »	1 »	0.123 »
VII.	0.07 »	0.10 »	1 »	0.145 »
VIII.	0.08 »	0.10 »	1 »	0.166 »
IX.	0.09 »	0.10 »	1 «	0.167 »
X.	0.10 »	0.10 «	1 »	0.162 »

Die von den Niederschlägen abfiltrirten, braungelben bis braunrothen Flüssigkeiten gaben bei den Versuchen I—VII auf Zusatz von Peroxydase weitere Mengen von Purpurogallin. Sie enthielten daher überschüssiges Hydroperoxyd. Zu bemerken ist noch, dass die Hauptreaction (entsprechend ca. 90 pCt. Purpurogallin) nach wenigen Minuten vorüber ist.

## B.

	Angewandte Peroxydase	Angewandtes Hydroperoxyd	Angewandtes Pyrogallol	Entstandenes Purpurogallin
I.	0.10 g	0.01 g	1 g	0.205 g
II.	0.10 »	0.02 »	1 »	0.42 »
III.	0.10 »	0.03 »	1 »	0.60 »
IV.	0.10 «	0.04 »	1 »	0.78 »
V.	0.10 »	0.05 »	1 »	0.99 »
VI.	0.10 »	0.06 »	1 »	0.121 »
VII.	0.10 »	0.07 »	1 »	0.142 »
VIII.	0.10 »	0.08 »	1 »	0.168 »
IX.	0.10 »	0.09 »	1 »	0.168 »
X.	0.10 »	0.10 »	1 »	0.165 »

In den Filtraten I—VI konnte noch durch Hydroperoxyd die Anwesenheit von überschüssiger Peroxydase nachgewiesen werden.

Aus diesen Versuchen geht mit voller Klarheit hervor, dass bei steigenden Peroxydasemengen und constanten (überschüssigen) Hydroperoxydmengen, die Mengen des entstandenen Purpurogallins den angewandten Peroxydasemengen genau proportional sind, wie durch folgende Zusammenstellung veranschaulicht wird<sup>1)</sup>:

Peroxydasemengen: 1:2:3 :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10

Purpurogallinmengen: 1:2:3.14:3.95:4.85:5.85:6.90:7.90:7.95:7.70

Bei wechselnden Hydroperoxydmengen und constanten (überschüssigen) Peroxydasemengen ist dagegen der Umsatz den Ersteren proportional:

Hydroperoxydmengen: 1:2 :3 :4 :5 :6 :7 :8 :9 :10

Purpurogallinmengen: 1:2.04:2.42:3.80:4.63:5.40:6.42:8.19:8.19:7.91

Ein etwaiger Ueberschuss an Peroxydase oder an Hydroperoxyd ist auf die Oxydationsleistung des Systems Peroxydase-Hydroperoxyd ohne jeden Einfluss. Daraus folgt der wichtige Schluss, dass Peroxydase und Hydroperoxyd stets in constanten Verhältnissen an der Reaction betheiligt sind. Dieses Ergebniss findet seinen chemischen Ausdruck in der Annahme, dass die Peroxydase mit dem Hydroperoxyd eine definirte Verbindung bildet, welche kräftigere oxydirende Eigenschaften als das Hydroperoxyd besitzt. Derartige Verbindungen sind bereits bekannt. So fand J. Brode<sup>2)</sup>, dass die bei der Reaction zwischen Hydroperoxyd und Jodwasserstoffsäure als Katalysator fungirende Molybdänsäure sich zuerst mit Hydroperoxyd zu Permolybdänsäure vereinigt, durch welche dann die Jodwasserstoffsäure viel rascher als durch Hydroperoxyd oxydirt wird<sup>3)</sup>. Obige Versuche zeigen weiter, dass die Peroxydase, ebenso wie das Hydroperoxyd, im Oxydationsprocesse verbraucht wird. Würde sie aus dem Zwischenproducte regenerirt, so dürfte überschüssiges Hydroperoxyd auf die Grösse des Umsatzes einen unterschiedenen Einfluss ausüben, was nicht der Fall ist.

Bei den Versuchen I—VIII (Tabellen A und B) wurden auf je 0.01 g Peroxydase und 0.01 g Hydroperoxyd durchschnittlich 0.0205 g Purpurogallin erhalten. Unter IX und X hörte aber diese Proportio-

<sup>1)</sup> Die Ursache, durch welche diese Proportionalität bei den Versuchen IX und X aufgehoben worden ist, wird weiter unten aufgeklärt.

<sup>2)</sup> Inaugural-Dissertation, Leipzig 1901; Zeitschr. für physik. Chemie 37, 3.

<sup>3)</sup> Die Ansicht, dass Peroxydase und Hydroperoxyd sich zu einer peroxydartigen Verbindung vereinigen, ist bereits von Kastle und Loewenhardt (Amer. chem. Journ. 26, 593 [1901]) ausgesprochen worden.

nalität plötzlich auf, und die gebildeten Purpurogallinmengen blieben, trotz der steigenden Mengen von Peroxydase-Hydroperoxyd, bei ca. 0.165 g stehen. Die Vermuthung lag nahe, dass die angewandte Pyrogallolmenge (1 g) für die völlige Ausnutzung des Oxydationsmittels nicht mehr hinreichend war. Wir führten daher ergänzende Versuche mit je 1.5 g Pyrogallol aus und erhielten dabei folgende Resultate:

	Angewandte Peroxydase	Angewandtes Hydroperoxyd	Angewandtes Pyrogallol	Entstandenes Purpurogallin
VIII bis	0.08 g	0.08 g	1.5 g	0.164 g
IX bis	0.09 »	0.09 »	1.5 «	0.186 »
X bis	0.10 »	0.10 »	1.5 »	0.207 »

Die entstandenen Purpurogallinmengen bleiben also stets den angewandten Mengen von Peroxydase-Hydroperoxyd proportional, vorausgesetzt, dass Pyrogallol in hinreichender Menge vorhanden ist.

Wir suchten weiter, den Einfluss, welchen die Concentration des Pyrogallols auf die Oxydationsleistung des Systems Peroxydase-Hydroperoxyd ausübt, zu ermitteln. Wir stellten dazu Versuche mit wechselnden Pyrogallolmengen bei constantem Peroxydase- und Hydroperoxyd-Gehalt an.

## C.

	Angewandte Peroxydase	Angewandtes Hydroperoxyd	Angewandtes Pyrogallol	Entstandenes Purpurogallin
I.	0.10 g	0.10 g	1.5 g	0.205 g
II.	0.10 »	0.10 »	2.0 »	0.203 »
III.	0.10 »	0.10 »	3.0 »	0.208 »
IV.	0.10 »	0.10 »	4.0 »	0.202 »

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass die Concentration des Pyrogallols auf die Grösse des Umsatzes ohne Einfluss ist.

Wie oben erwähnt, wird die Peroxydase im Oxydationsprocesse verbraucht. Dass die Zerstörung der Peroxydase nicht durch die Oxydationsproducte des Pyrogallols bewirkt wird, folgt daraus, dass im Ueberschuss angewandte Peroxydase nach beendigter Oxydation noch weitere Purpurogallinmengen auf Zusatz von Hydroperoxyd liefert. Sie behält also hier ihre spezifische Function bei. Da, wie wir<sup>1)</sup> es schon früher beobachteten, die Peroxydase durch Hydroperoxyd zerstört wird, so suchten wir diese Einwirkung quantitativ zu verfolgen.

Je 0.10 g Peroxydase, 0.10 g Hydroperoxyd und 20 ccm Wasser wurden in 5 Erlenmeyer-Kolben gebracht und die Gemische nach 1—5 Tagen untersucht. Dabei ergab sich, dass auf Zusatz von je 1.5 g Pyrogallol in 15 ccm Wasser nur das erste, 1 Tag alte Gemisch, eine Braunfärbung zeigte; die übrigen blieben farblos. Die Peroxydase war also schon nach 24 Stunden

<sup>1)</sup> Diese Berichte 36, 603 [1903].

durch die äquivalente Menge Hydroperoxyd fast vollständig vernichtet. Um das in den Gemischen etwa vorhandene, unzersetzte Hydroperoxyd zu bestimmen, fügten wir denselben je 0.10 g Peroxydase zu und wogen das entstandene Purpurogallin. Wir erhielten dabei folgende Zahlen:

Gemische:	I	II	III	IV	V
Versuchsdauer:	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage
Entstandenes Purpurogallin:	0.174 g	0.168 g	0.170 g	0.168 g	0.166 g.

Aus diesen Zahlen lässt sich berechnen, dass die Gemische noch ca. 0.085 g, also 85 pCt. der ursprünglichen Hydroperoxydmenge enthielten (2.05 Gew.-Th. Purpurogallin = 1 Gew.-Th. Hydroperoxyd). Da bei der Einwirkung von Hydroperoxyd auf Peroxydase keine nennenswerthe Sauerstoffentwicklung stattfindet, so scheint der fehlende Antheil des Hydroperoxyds zur Oxydation des Substrates der Peroxydase verbraucht worden zu sein. In welcher Weise aber die Inactivirung der Peroxydase durch Hydroperoxyd erfolgt, lässt sich nicht ermitteln. Sauer reagirende Verbindungen entstehen dabei nicht, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht:

10 ccm einer Lösung, welche 0.10 g Peroxydase enthielten, wurden mit  $\frac{1}{100}$ -normaler Natronlauge unter Anwendung von Phenolphthaleïn als Indicator titirt. Verbraucht: 3.1 ccm  $\frac{1}{100}$ -NaOH.

10 ccm derselben Lösung wurden 48 Stunden mit 70 ccm einprocentiger Hydroperoxydlösung stehen gelassen und dann titirt. Verbraucht: 3.15 ccm  $\frac{1}{100}$ -NaOH.

Bei den im Obigen besprochenen Oxydationsversuchen zogen wir nur die Grösse des Umsatzes, nicht aber die Geschwindigkeit des Oxydationsvorganges, in Betracht. Um weitere Aufschlüsse über die Wirkungsweise der Peroxydase zu gewinnen, beabsichtigen wir, die Geschwindigkeit der Katalyse des Hydroperoxyds durch die Peroxydase auf einem anderen Wege zu bestimmen. Schon jetzt aber steht fest, dass bei der Activirung des Hydroperoxyds die Peroxydase sich als eine definirte chemische Verbindung verhält und mit Letzterem in constanten Verhältnissen reagirt. Ist damit gesagt, dass die Peroxydase aus der Klasse der Enzyme zu streichen ist? Unserer Ansicht nach liegt dazu noch keine dringende Veranlassung vor. Diese Frage soll aber in einer späteren Mittheilung besprochen werden.

Genf. Pflanzenchemisches Laborat. des Botanischen Institutes.