

Coenzyme*)

Von Prof. Dr. H. von EULER, Stockholm

Biochemisches Institut der Universität

Eingeg. 13. August 1937

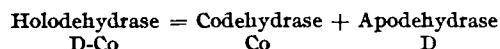
Als Coenzyme hat man ursprünglich Stoffe anorganischer oder organischer Natur bezeichnet, welche enzymatische Reaktionen beschleunigen. Der Name Coenzym ruft den Eindruck von Hilfsstoffen der Enzyme hervor, von Katalysatoren sekundärer Natur. Aber gerade umgekehrt hat sich in den letzten Jahren gezeigt, daß die Coenzyme die wichtigsten, nämlich die reaktionsvermittelnden Teile der Enzymsysteme sind. Sie bilden die sog. koeptischen Gruppen derselben. Die freien Coenzyme sind unter die Wirkstoffe oder Ergone einzureihen, zu denen man sowohl Vitamine als Hormone rechnet. Tatsächlich sind bereits zwei Vitamine ihrer Funktion nach als Coenzyme bzw. als deren Vorstufen erkannt, nämlich Vitamin B₁, Aneurin, und Vitamin B₂, Lactoflavin, und man kann vermuten, daß auch andere Vitamine und Hormone — zwischen diesen Stoffen besteht kein grundsätzlicher Unterschied — als Coenzyme fungieren.

Die Coenzyme, die also physiologisch eine ganz zentrale Rolle spielen, verdienen auch in rein chemischer Hinsicht durch Bau und Eigenschaften unser Interesse. Das erste organische Coenzym entdeckte Arthur Harden 1905; er zeigte, daß im Preßsaft der Hefe neben den hochmolekularen Enzymen auch eine dialysierbare, niedrig molekulare, verhältnismäßig thermostabile Substanz existiert, durch welche der Komplex der Gärungsenzyme, die Zymase Buchners, erst zur Wirkung kommt. Das Dialysat des Hefepreßsaftes und der Rückstand, beide für sich unwirksam als Gärungskatalysator, bilden durch Mischung wieder ein gärfähiges System. Die dialysierbare Substanz, das Coenzym der alkoholischen Gärung, oder kürzer die Cozymase¹⁾, findet sich nicht nur in der Hefe, sondern in fast allen tierischen und pflanzlichen Zellen. Man kann dieses Coenzym aus frischer Hefe auskochen und den Kochsaft nach Konzentration weiter reinigen.

Noch bevor wir eine Vorstellung von der chemischen Natur der Cozymase hatten, zeigte sich, daß der gleiche Stoff, der den Komplex der Gärungsenzyme aktiviert, auch an enzymatischen Oxydationen und Reduktionen, an Dehydrierungen und Hydrierungen, beteiligt ist, daß er also als Coredoxase (Coreduktase) oder Codehydrase wirkt. Ich will mich nicht weiter bei der historischen Entwicklung der Coenzymforschung aufhalten, sondern gleich auf den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse eingehen, und zwar will ich die Cozymase als Beispiel benutzen, um an ihr deutlich zu machen, was wir über die Wirkungsweise der Coenzyme im allgemeinen wissen. Ich will dabei die Rolle der Cozymase nicht an der Gesamtgärung besprechen — in diesen Reaktionskomplex gehen zahlreiche Vorgänge ein, die an sich von der Cozymase unabhängig sind, — sondern ich will einen besonderen Teilvorgang der Gärung ins Auge fassen, und zwar denjenigen, in welchem der Alkohol aus einem Zwischenprodukt der Gärung, dem Acetaldehyd, gebildet wird.

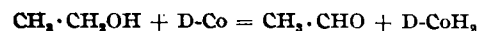
Die Hydrierung des Acetaldehyds geschieht unter dem gemeinsamen Einfluß einer spezifischen Dehydrase und der Cozymase. Wir haben diese reversible Reaktion, auf deren Gleichgewicht ich noch zurückkomme, in einem synthetischen Enzymsystem studiert, das wir aus den einzelnen gereinigten Komponenten zusammenstellen. Die Anwendung solcher synthetischen Enzymsysteme zur Aufklärung komplizierter biologischer Vorgänge hat sich in einer mehrere Jahre durchgeführten Untersuchungsreihe als fruchtbar erwiesen²⁾.

Wir gehen davon aus, daß das vollständige Enzym, welches wir Holoenzym nennen, sich im Dissoziationsgleichgewicht mit seinen zwei Komponenten befindet, nämlich mit dem als Wirkungsgruppe fungierenden Coenzym und mit dem hochmolekularen Rest von Eiweißnatur, den man Apoenzym nennt. In dem speziellen Fall einer Dehydrierung, den wir hier betrachten wollen, gilt also die Gleichung:



Man wird nun zunächst fragen, welche Funktion dem Coenzym der Dehydrase zukommt, wodurch also die Aktivierung der Apodehydrase eintritt. Die Einsicht in den Wirkungsmechanismus der Cozymase wurde vor etwa 3 Jahren durch Versuche von Adler und Hellström³⁾ angebahnt, welche die Cozymase als Wasserstoffüberträger kennzeichneten. Dies geschah durch den Nachweis, daß nach Einwirkung von Alkohol und Apodehydrase auf die Cozymase ein Reduktionsprodukt, die Dihydrocozymase⁴⁾ entsteht. Auf diese Versuche bauen sich unsere Kenntnisse vom Wirkungsmechanismus der Cozymase auf.

Dihydrocozymase hat, wie wir später sehen werden, die Fähigkeit, das in tierischen und pflanzlichen Organen weitverbreitete Flavinenzym, das sog. gelbe Ferment Warburgs, zu Leukoflavinenzym zu reduzieren; dabei wird die Dihydrocozymase selbst wieder zu Cozymase oxydiert. Cozymase vermittelt andererseits viele enzymatische Dehydrierungen, indem sie zwei Wasserstoffatome aufnimmt, wodurch die erste Reaktionsphase des Reduktionsprozesses zustande kommt:



Hier bedeutet D-Co die Verbindung von Alkohol-Dehydrase mit Cozymase und D-CoH₂ das Reduktionsprodukt dieser Verbindung.

Bevor wir nun eine solche biologische Wasserstoffübertragung betrachten, müssen wir versuchen, an Hand der chemischen Strukturformel uns über diejenige Gruppe klar zu werden, welche der reversiblen Hydrierung unterliegt. Nachdem durch die älteren Versuche von

*) Zusammenfassender Vortrag anlässlich des Reichstreffens der Deutschen Chemiker in Frankfurt a. M. am 7. Juli 1937.

Vgl. auch Albers, „Wesen und Wirkung der Fermente“, diese Ztschr. 49, 448 [1936].

¹⁾ Euler u. Myrbäck, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 181, 180 [1923].

²⁾ Euler u. E. Adler, Über die Komponenten der Dehydrasensysteme I—XV, ebenda 226—248 [1934/1937].

³⁾ Euler, Adler u. Hellström, Svensk kem. Tidskr. 47, 290 [1935].

⁴⁾ Die Dihydrocozymase konnte kürzlich als sehr haltbares Ba-Salz gewonnen werden (Adler u. Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 12 B, Nr. 36 [1937]).

Myrbäck⁵⁾ festgestellt war, daß die Cozymase eine Adenosinphosphorsäure enthält, wurde das Studium dieses Stoffes in Stockholm durch *Albers* und *Fritz Schlenk* wieder aufgenommen⁶⁾, und an der nunmehr in fester Form gewonnenen Substanz wurde nachgewiesen, daß die Cozymase außer einem Adenylsäurerest noch Nicotinsäureamid enthält, und daß die Cozymase als ein Dinucleotid aufzufassen ist. Dies entspricht dem Ergebnis, das *Warburg* und *Christian*⁷⁾ an dem von ihnen entdeckten Coferment aus roten Pferdeblutzellen (Codehydrase II) gewonnen hatten. In den Arbeiten von *Fritz Schlenk*⁸⁾ wurde dann die Summenformel der Cozymase, $C_{21}H_{27}O_{14}N_7P_2$, ermittelt, und auf Grund dieser Formel und anderer Tatsachen, besonders aus dem Ergebnis der sauren Hydrolyse, konnte gezeigt werden, daß die Cozymase aus 1 Mol Adenin, 1 Mol Nicotinsäureamid und 2 Mol Pentosephosphorsäure besteht, welche unter Austritt von 3 Mol Wasser zusammengetreten sind. Für die Strukturermittlung waren die in alkalischer Lösung ausgeführten Spaltungsversuche entscheidend. Zunächst spaltet Alkali das Nicotinsäureamid ab. Besonders aufschlußreich war die Isolierung des Spaltproduktes Adenosindiphosphorsäure⁹⁾, weil sie bewies, daß das Adeninribosid mit dem Pyridinribosid durch Vermittlung einer Pyrophosphatgruppe zusammenhängt.

Im Einklang mit dieser Formel steht die Tatsache, daß die Cozymase als einbasische Säure fungiert. Durch Abspaltung von Nicotinsäureamid steigt der Alkaliverbrauch durch Freilegung einer weiteren Hydroxylgruppe auf 2 Äquivalente, und das Spaltprodukt Adenosindiphosphorsäure erweist sich als dreibasisch.

Die chemische Aufklärung über die wasserstoffübertragende Atomgruppierung hat sich aus den Modellversuchen ergeben, welche *Karrer*¹⁰⁾ im Anschluß an *Warburgs* Untersuchung über sein Coferment angestellt hat. An den *Karrerschen* Modellen mit fünfwertigem Ringstickstoff, Nicotinsäureamidjodmethylat und Glykosido-1-pyridiniumbromid konnte die früher an Codehydrase II gefundene reversible Hydrierung durchgeführt werden. Bei der Aufnahme von 2 Wasserstoffatomen geht der Ringstickstoff in dreiwertigen Zustand über. Eine weitgehende Analogie zwischen den Codehydrasen und *Karrerschen* Modellen ergab sich auch bezüglich charakteristischer Veränderungen im Absorptionsspektrum bei der Hydrierung. Das Reduktionsprodukt ist eine o-Dihydroverbindung des N-Methyl-nicotinsäureamids. Freies Nicotinsäureamid kann nicht zu einer Dihydroverbindung reduziert werden; die Reduktion findet nur an Pyridiniumverbindungen statt.

Die Reduktion der Cozymase zur Dihydroverbindung haben wir zunächst enzymatisch durchgeführt (sie gelingt auch durch Hydrosulfit, wie dies im Dahlemer Institut für das Coferment aus roten Pferdeblutzellen gezeigt war).

Die reduzierte Cozymase, CoH_2 , ist ausgezeichnet durch ihre Stabilität in alkalischer Lösung. Während die Stabilität der natürlichen Cozymase bei der Acidität $p_H = 3-4$ am größten, im alkalischen Gebiet aber sehr gering ist, wurde reduzierte Cozymase selbst in $\frac{1}{10}$ NaOH sehr hitzestabil gefunden. Diese große Beständigkeit in alkalischer Lösung gestattet, die Dihydrocozymase in Zellen und Geweben neben der Cozymase nachzuweisen, und es hat sich

gezeigt, daß überall neben der oxydierten Form der Cozymase auch ihre reduzierte Form in erheblicher Menge vorkommt. Einen großen Überschuß der Dihydroverbindung haben wir stets in Sarkomen gefunden.

Wirkt Hydrosulfit in ausgesprochen alkalischem Medium auf Cozymase ein, so entsteht ein gelbes Produkt, welches wahrscheinlich ein semichinonartiges Radikal¹¹⁾ darstellt. Über das natürliche Auftreten dieser „gelben Stufe“ können wir noch nichts aussagen.

Was das Vorkommen der Cozymase im Tier- und Pflanzenkörper betrifft, so enthalten die meisten Zellen und Gewebe dieses wichtige Coenzym, allerdings in sehr verschiedenen Mengen. Vergleicht man die Konzentration der Cozymase mit derjenigen anderer Coenzyme, wie z. B. der als Vitaminderivat bekannten Cocarboxylase und des Flavinphosphates, so sind die verhältnismäßig großen Mengen der Cozymase, wie übrigens auch der Cocarboxylase, bemerkenswert. Das Muskelfleisch von Kaninchen enthält z. B. je Kilo etwa 400 mg Cozymase. Noch größer ist die Konzentration der Adenylsäure.

Bemerkenswert ist auch, daß sowohl Cozymase als Codehydrase II in tierischen Organen nach dem Tod sehr rasch inaktiviert werden.

Von großem Interesse ist die Frage nach der Synthese der Cozymase in lebenden Organismen. Die Hefe ist offenbar imstande, die Totalsynthese zu vollziehen, dagegen scheinen daraufhin untersuchte Bakterien diese Fähigkeit nicht zu besitzen (*Lwoff, Knight*). *Staphylococcus aureus* benötigt z. B. zum Wachstum Zusatz von Nicotinsäureamid oder Nicotinsäure. Ob Nicotinsäureamid zwecks Synthese von Cozymase einen der notwendigen, noch unbekannten B-Faktoren des Wachstums¹²⁾ darstellt, wird weiter geprüft. Rechnet man Cozymase zu den lebenswichtigen Wirkstoffen etwa von Vitamincharakter, so wird man fragen, ob nicht durch Verarmung des Körpers an Cozymase infolge Cozymasemangels in der Nahrung eine diesbezügliche Avitaminose auftritt. Versuche von verschiedenen Gesichtspunkten aus zeigten, daß schon bei einer verhältnismäßig geringen Abnahme des Cozymasegehaltes der Organe Tod der Versuchstiere eintritt. Man wird daraus den Schluß ziehen, daß eine gewisse Cozymasekonzentration, welche nahe an der Normalkonzentration liegt, in den Zellen nicht unterschritten werden darf. Der normale Cozymasegehalt ist offenbar für die meisten Zellen eine Lebensnotwendigkeit, so daß spezielle Avitaminosen, bei denen ja die Verarmung in erster Linie gewisse Organe betrifft, hinsichtlich der Cozymase nicht auftreten können. Ebenso wenig ist bisher an Ratten eine Überproduktion an Cozymase durch Eingabe von Nicotinsäureamid gelungen.

Ein Kaninchen enthält in runder Zahl etwa 300 mg Cozymase. Das Blut enthält etwa 12 mg Cozymase pro Liter Zellen, und zwar in den roten Blutzellen, während das Serum so gut wie cozymasefrei ist. Daher kommt es, daß nach Versuchen von *U. S. v. Euler* die Injektion von 1 mg Cozymase bei Kaninchen den Blutdruck um etwa 35% heruntersetzen kann.

Unsere Versuche über die Bilanz der beiden Dehydrasen und des Nicotinsäureamids sind noch nicht abgeschlossen; es scheint, daß erheblich mehr gebundenes Nicotinsäureamid im Muskel (nach Hydrolyse) gefunden wird, als der nach der Gärungsmethode ermittelten Cozymasemenge entspricht (*Heiwinkel*).

Im Rattenharn wurden nach Verfütterung von 10 mg Nicotinsäureamid nur 25% der verfütterten Menge nach 24 h wiedergefunden.

⁵⁾ Euler u. Myrbäck, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 177, 237 [1928].

⁶⁾ Euler, Albers u. Schlenk, ebenda 237, I [1935], 240, 113 [1936].

⁷⁾ Warburg u. Christian, Biochem. Z. 275, 464 [1935].

⁸⁾ F. Schlenk u. Euler, Svensk kem. Tidskr. 48, 135 [1936]; Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 12 B, Nr. 20 [1936].

⁹⁾ Vestin, Schlenk u. Euler, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 1369 [1937].

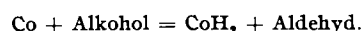
¹⁰⁾ Karrer, Schwarzenbach, Benz u. Solmsen, Helv. chim. Acta 19, 811 [1936]; siehe auch Karrer u. Warburg, Biochem. Z. 285, 297 [1936]; Karrer u. Ringier, Helv. chim. Acta 20, 622 [1937].

¹¹⁾ Adler, Hellström u. Euler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 242, 225 [1936].

¹²⁾ Euler u. Malmberg, Biochem. Z. 278, 351 [1935].

Wirkungsmechanismus der Cozymase als Co-dehydrase. Ich habe bereits erwähnt, daß die Cozymase in Verbindung mit einer Apodehydrase einen Teilvorgang der Gärung vermittelt, indem die Dihydrocozymase die Reduktion des als Zwischenprodukt auftretenden Acetaldehyds zu Alkohol vollzieht.

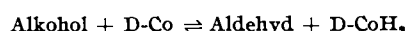
Adler und Hellström haben das Gleichgewicht der Reaktion Cozymase—Dihydrocozymase gemessen. Die Ergebnisse sprachen dafür, daß folgende einfache Reaktionsgleichung statthat:



Die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion im neutralen Medium

$$K_1 = \frac{\text{Co} \cdot \text{Alkohol}}{\text{CoH}_2 \cdot \text{Aldehyd}}$$

wurde zu $0,7 \cdot 10^4$ gefunden. Bei der Berechnung der Gleichgewichtskonstante war die Apodehydrase D nicht einbezogen worden. Die wahre Reaktion



zeigt, daß, falls die Dissoziation von D-Co und D-CoH₂ nicht gleich ist, die Dissoziationskonstanten K₁ und K₂ für die nicht reduzierte und reduzierte Holodehydrase in die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten eingehen müssen¹³⁾.

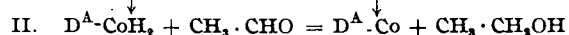
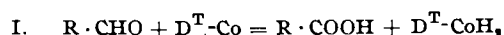
Die Tatsache, daß schon bei Gegenwart verhältnismäßig sehr geringer Aldehydmengen das Gleichgewicht



sehr weitgehend nach links verschoben ist, hat zum Schluß geführt, daß bei der alkoholischen Gärung gerade die reduzierte Alkoholdehydrase die Reduktion des intermediär gebildeten Acetaldehyds zum Alkohol bewirkt. Was nun die Nachlieferung der reduzierten Holodehydrase beim Gärungsverlauf, überhaupt im anaeroben System betrifft, so ist anzunehmen, daß bei der Gärung diese Nachlieferung der Dihydrocozymase durch ein Donatorsystem, nämlich das System Triosephosphorsäure—Phosphoglycerinsäure erfolgt.

Wir hatten erwogen, ob ein einziges Enzym die Überführung des Wasserstoffs vom Donator zum Acceptor bewirkt, oder ob zwei auf Donator und Acceptor spezifisch eingestellte Enzyme wirksam sind. In unserem Fall erhebt sich also die Frage, ob die Apodehydrase der Triosephosphatdehydrierung identisch ist mit der Alkoholapodehydrase, oder ob es zwei spezifische Apodehydrasen für diese beiden Substrate gibt. Diese Frage haben wir im letzteren Sinne beantwortet.

Es gibt im genannten System zwei Apodehydrasen mit ausgeprägter Substratspezifität. Beide Apodehydrasen verbinden sich spezifisch mit Cozymase zu den wirksamen Holodehydrasen. Die Cozymase pendelt also zwischen diesen beiden Dehydrasen und bewirkt so die Wasserstoffübertragung vom Donator zum Acceptorsystem, also vom System Triosephosphorsäure—Phosphoglycerinsäure zum Acceptorsystem Acetaldehyd—Äthylalkohol. Man kann dies schematisch folgendermaßen darstellen:



Wir kommen damit auf die Spezifität der Dehydrasen. Die bereits von Thunberg betonte weitgehende Substratspezifität der Dehydrasen hat sich in den Arbeiten

mit synthetischem Enzymsystem durchaus bestätigt. Die große Mehrzahl der Dehydrasen wird erst in Verbindung mit der Cozymase wirksam, welche, wie gesagt, Codehydrase I genannt wird. Auch daß es eine zweite Codehydrase gibt, nämlich das von Warburg entdeckte Coferment aus roten Pferdeblutzellen, wurde schon erwähnt. Diese Codehydrase II wirkt in Verbindung mit spezifischen Apodehydrasen auf besondere Substrate. In erster Linie auf Glucosemonophosphat, den sog. Robison-Ester, der zum entsprechenden Gluconsäure-6-Phosphat dehydriert wird. Über die physiologische Rolle dieser Robison-Ester-Dehydrase und ihres Coenzym ist bis jetzt nicht viel bekanntgeworden. Erwähnen möchte ich noch den Befund (Adler, Steenhoff-Eriksen), daß auch die Glutaminsäuredehydrase aus Hefe von Codehydrase II aktiviert wird, Glutaminsäuredehydrase aus Leber (N. B. Das) und höheren Pflanzen (U. Heyman) aber von Cozymasen.

Eine kleine Übersicht über die bis jetzt untersuchten Systeme gibt folgende Tabelle:

Dehydrase für	Herkunft der Dehydrase	Coenzym
Alkohol	Hefe; Erbsensamen; Leber	Cozymase
Milchsäure	Herzmuskel	Cozymase
Äpfelsäure	Herzmuskel	Cozymase
Dioxyacetonphosphorsäure	Hefe	Cozymase
Glycerinaldehydphosphorsäure	Hefe	Cozymase
Glycerinphosphorsäure	Gurkensamen; Muskel	Cozymase
Amfelsäure	Erbsensamen	Cozymase
Robison-Ester	Rote Blutzellen; Hefe	Codehydrase II
Gluconsäure-6-Phosphorsäure	Hefe	Codehydrase II
Glutaminsäure	Hefe	Codehydrase II
Glutaminsäure	Leber	Cozymase
Glutaminsäure	Höhere Pflanzen	Cozymase
Glucose	Leber	Cozymase und Codehydrase II

Chemisch steht diese Codehydrase II der Cozymase sehr nahe, sie enthält nämlich die beiden gleichen Nucleotide wie die Cozymase, aber einen Phosphorsäurerest mehr (Warburg). Versuche zu einer reversibeln Umwandlung der beiden Stoffe hatten zunächst ein positives Ergebnis insofern, als nach unseren Versuchen Codehydrase II nach Behandlung mit Apozymase eine Wirkung als Gärungscoenzym annimmt. Andererseits hat Vestin¹⁴⁾ gezeigt, daß aus Cozymase in Gegenwart von Apozymase und Adenosintriphosphat ein Stoff gebildet wird, der imstande ist, im System der Robison-Ester-Dehydrase die Codehydrase II zu ersetzen. Gleichzeitig erhielt Schlenk^{14a)} aus Cozymase einen wie Codehydrase II wirksamen Stoff durch nicht-enzymatische Phosphorylierung.

Was den hochmolekularen Bestandteil des Holoenzym, etwa die Alkoholapodehydrase, betrifft, so liegt die Vorstellung nahe, daß das Protein, indem es sowohl den Alkohol als die Cozymase bindet, diese beiden Stoffe in einer solchen Reaktionsnähe hält, daß die Anzahl der erfolgreichen Stöße zwischen den beiden Komponenten sehr groß wird. Natürlich ist nicht ausgeschlossen, daß durch die Bindung der Apodehydrase an das Substrat eine Aktivierung des Wasserstoffs, also etwa eine Lockerung der übertragbaren Wasserstoffatome statthat. Bis jetzt spricht aber nichts dafür, daß der am Substrat aktivierte Wasserstoff intermediär auf die Apodehydrase übertragen wird.

Zu den anaeroben Oxydoreduktionen, an welchen die Cozymase beteiligt ist, indem sie die Überführung des

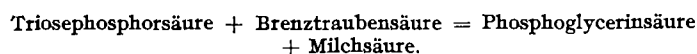
¹³⁾ Vgl. Hellström, Adler u. Euler, Svensk kem. Tidskr. 49, 194

[1937]. In dieser Mitteilung sind 2 Druckfehler zu berücksichtigen: Auf S. 195 ist für die Konstante K₁ wie oben der inverse Wert einzusetzen und in 5 Zeilen sind die Konstanten k₁ und k₂ durch K₁ und K₂ zu ersetzen.

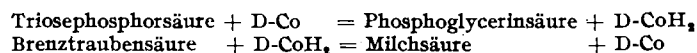
¹⁴⁾ Vestin, Naturwiss., im Druck.

^{14a)} Schlenk, ebenda, im Druck; Euler, Adler, Steenhoff-Eriksen, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 248, 227 [1937].

Wasserstoffs von einem Donatorsystem auf ein Acceptor-system bewirkt, gehört noch der biologisch wichtige Vorgang der Glykolyse¹⁶⁾, also die Milchsäurebildung aus den in tierischen Geweben zugänglichen Hexosen. Man weiß aus früheren in Frankfurt und in Heidelberg ausgeführten Arbeiten, daß die Bildung der Milchsäure aus Brenztraubensäure durch folgende Oxydoreduktion zustande kommt:



Diese Formulierung entspricht völlig der des analogen Vorganges der Alkoholbildung bei der Hefegärung, wo an Stelle der Brenztraubensäure Acetaldehyd, an Stelle der Milchsäure Äthylalkohol tritt. Der Gesamtvorgang läßt sich in zwei Reaktionsphasen aufteilen:



Letztere Reaktion ist weitgehend zugunsten der Milchsäure verschoben, d. h. bei Gegenwart der Lacticoapodehydase wird Brenztraubensäure durch Dihydrocozymase zu Milchsäure reduziert. Auch bei der Glykolyse pendelt die Cozymase zwischen den beiden spezifischen Dehydrasen der Triosephosphorsäure und der Milchsäure und wirkt also als Wasserstoffüberträger.

Wir haben im vorhergehenden die Rolle der Cozymase in Systemen betrachtet, in welchen anaerobe Oxydoreduktionen vor sich gehen, also die Überführung des Wasserstoffs von einem Donatorsystem in ein Acceptorsystem. Solche Reaktionen, für deren chemische Aufklärung die Arbeiten von *Wieland* grundlegend gewesen sind, spielen bekanntlich beim Kohlenhydratabbau im Tier- und Pflanzenkörper eine große Rolle.

Es ist das große Verdienst *Wielands*, gezeigt zu haben, daß die gesamte biologische Oxydation mit der Aktivierung des Substratwasserstoffs beginnt. Der Begriff der Wasserstoffaktivierung hat dann durch die neueren Ergebnisse über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung eine noch festere valenzmäßige Fassung erhalten, da gezeigt werden konnte, wie der Substratwasserstoff durch die Co-dehydrasen, die den Wasserstoff in Verbindung mit dem Enzym aufnehmen und ihn wieder abgeben, aktiviert wird. Die Rolle des Wasserstoffs ist vom Eingreifen der Co-dehydase an nunmehr stöchiometrisch festgelegt.

Die Cozymase ist nun aber nicht nur an anaeroben Oxydoreduktionen, sondern auch am aeroben Stoffwechsel beteiligt. Es sei nochmals an die Tatsache erinnert, daß viele Zellen ein spezifisches Oxydationsmittel für die Dihydrocozymase besitzen, nämlich das Flavinenzym, das Enzym, dessen Wirkungsgruppe wir als Vitamin-B₂-Phosphat oder Vitamin kennen und ebenfalls als Coenzym auffassen können, wie schon *Kuhn* erwähnt hat.

Wir knüpfen an unser früheres synthetisches System Alkohol—Alkoholdehydrase—Cozymase an und kombinieren es mit Flavinenzym. Die Dihydrocozymase, welche bei der Dehydrierung von Alkohol zu Acetaldehyd entsteht, wird durch Flavinenzym wieder oxydiert, und zwar unter Bildung von Leukoflavinenzym. Die Annahme lag nun nahe, daß wir hier das Atmungssystem vor uns haben und daß das Flavin im Flavinenzym den Sauerstoffüberträger bildet. Tatsächlich ist eine solche Reoxydation des Leukoflavinenzyms durch molekularen Sauerstoff in vitro und in einzelnen biologischen Fällen möglich. *Warburg* hat schon erwähnt, daß dieser Vorgang nicht den Hauptweg der Zellatmung bilden kann, weil die Wechselzahl des Flavinenzyms viel zu klein ist; die Zellatmung verläuft viel schneller als die einfache Zwischenschaltung des Flavinenzyms erlauben würde.

¹⁶⁾ *Euler, Adler, Günther u. Hellström*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **245**, 217 [1936].

Nun geht aber nach einer Untersuchung von *Theorell* die Reoxydation des Flavinenzyms durch Cytochrom so schnell, daß bei den in Geweben herrschenden Sauerstoffdrücken der weit überwiegende Teil des Leukoflavinenzyms vom Cytochrom oxydiert wird.

Es gibt dann zwei Möglichkeiten für den Eingriff des Sauerstoffs: Entweder ist die Wechselzahl des Flavinenzyms in vivo sehr erheblich größer als in synthetischen Systemen, oder aber es ist in den Oxydationsgang noch ein anderes System, u. U. ein anderes Substrat, eingeschaltet, vielleicht ein Äthylensystem, welches durch das Leukoflavinenzym reduziert wird. Unsere diesbezügliche Arbeitshypothese bestand darin, daß Leukoflavinenzym seinen Wasserstoff in Gegenwart von Succinodehydase an Fumarsäure abgibt¹⁸⁾, welche dadurch zu Bernsteinsäure reduziert wird. Von der Bernsteinsäure aus konnte in bekannter Weise durch das *Keilin-Warburg*-System der Wasserstoff an den Sauerstoff weitergeleitet werden. Diese Hypothese ermöglicht eine Verknüpfung der Codehydrasesysteme mit dem in die *Szent-Györgyische* Atmungstheorie eingehenden System Fumarsäure—Bernsteinsäure. Während der Ausarbeitung dieser Hypothese erschien ganz neuerdings eine Arbeit von *Gottwalt Fischer*¹⁷⁾, welche interessante experimentelle Beiträge zur Kenntnis des Vorganges liefert. *Fischer* nimmt an, daß ein besonderes Enzym, die „Hydrase“, die Anlagerung des Wasserstoffs an ungesättigte Stoffe vermittelt.

Auffallend ist, daß Cytochrom c nicht imstande ist, die Dihydrocozymase direkt zu oxydieren (*H. Theorell*).

Das Flavinenzym, welches wir als das spezifische Oxydationsmittel der Dihydrocozymase kennengelernt haben, bietet ein weiteres Beispiel einer vollständigen Dehydase, welche aus einem Coenzym und einem Apoenzym besteht, und deren spezifische Substrate die Dihydrocodehydrasen sind.

Das Lactoflavin, dessen Vitaminnatur *Kuhn, György* und *Wagner-Jauregg*¹⁸⁾ entdeckt haben, ist ein Isoalloxazin; um die Aufklärung und Synthese haben sich *Karrer*¹⁹⁾ und *Kuhn*²⁰⁾ und ihre Mitarbeiter besonders verdient gemacht. Lactoflavin ist ein lebensnotwendiger Stoff, dessen Mangel in der Nahrung sich bei jungen Tieren (Ratten) durch Hemmung des Wachstums bald bemerkbar macht. Schon vor Verlust der Lactoflavinreserven in den Organen tritt der Tod ein.

Wenn wir Lactoflavin, das in den meisten grünen Pflanzen und auch in vielen tierischen Organen vorkommt, mit der Nahrung aufnehmen, so wird es vermutlich sofort phosphoryliert und dann an ein spezifisches Protein, welches wir als eine Apodehydase betrachten können, gebunden. Mischt man die Lactoflavinphosphorsäure, welche von *Theorell*²¹⁾ als Bestandteil des Flavinenzyms erkannt worden ist, mit dem spezifischen Apoenzym, so treten die beiden Komponenten zu einer Verbindung zusammen, welche in bezug auf katalytische Wirkung und Farbe dem natürlichen Flavinenzym entspricht.

Setzt man zu der Eiweißkomponente statt Lactoflavinphosphorsäure Lactoflavin, so entsteht eine weitgehend dissoziierte Verbindung; sie zeigt, wenn auch in recht geringem Grad, nach *Kuhn* die Eigenschaften des natürlichen Flavinenzyms; auch das Lactoflavin selbst kann demnach als Coenzym fungieren. Die Bindung der Lactoflavinphosphorsäure an das Protein wird nicht nur durch den Phosphor-

¹⁸⁾ *Adler u. Euler*, Svensk Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **12** B, Nr. 36 [1937].

¹⁷⁾ *G. Fischer*, Liebigs Ann. Chem. **529**, 87 [1937].

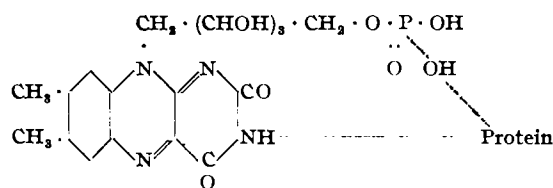
¹⁸⁾ *Kuhn, György u. Wagner-Jauregg*, Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 313 [1933].

¹⁹⁾ *Karrer, Salomon, Schöpp, Schlittler u. Fritzsche*, Helv. chim. Acta **17**, 1010 [1933/1934].

²⁰⁾ *Kuhn, Reinemund u. Weygand*, Ber. dtsch. chem. Ges. **67**, 1460 [1934].

²¹⁾ *Theorell*, Biochem. Z. **275**, 37 [1934].

säurerest der Wirkungsgruppe vermittelt, sondern auch, wie *Kuhn* und *Boulanger*²²⁾ nachweisen, durch die NH-Gruppe



des Flavinringsystems. Den Proteinteil (die Apodehydase) des Flavinenzyms hat *Theorell*²³⁾ kürzlich eingehend untersucht.

Die hier besprochenen Coenzyme, die Cozymase, die Codehydrase II und das Lactoflavinphosphat sind als reine Wasserstoffüberträger erwiesen worden. Andererseits wissen wir, daß die Wasserstoffübertragung in den biologischen Vorgängen der Gärung und der Glykolyse mit Phosphatübertragungen verknüpft ist.

In der Hefe kommt ein nunmehr „Phosphorylase“ genanntes Enzym vor, welches die Überführung einer Phosphorsäuregruppe von der Adenosintriphosphorsäure auf Hexose vollzieht²⁴⁾. Diese Bildung eines organischen Phosphates durch Aufnahme von Phosphorsäure aus Adenosintriphosphat stellt eine besondere Form der Phosphorylierung dar. Durch die Untersuchungen von *Lohmann*²⁵⁾ ist bereits gezeigt worden, daß die Adenylsäure im Muskelextrakt bei der Glykolyse als Phosphatacceptor unter Übergang in Adenosintriphosphat fungieren kann, und daß auf dem reversiblen Übergang Adenylsäure = Adenosintriphosphorsäure die Coenzymwirkung der Adenosinphosphorsäuren bei der Glykolyse beruht. Die Umesterung der Adenosintriphosphorsäure mit Hexose erfolgt nun in Gegenwart der Phosphorylase auch dann, wenn eine Oxydoreduktion im System nicht stattfindet. Adenosintriphosphorsäure, welche nach Abgabe von Phosphorsäure durch Phosphobrenztraubensäure rephosphoryliert oder u. U. durch anorganisches Phosphat regeneriert wird, funktioniert als Phosphatüberträger, als Cophosphorylase, ganz analog wie die Codehydrasen als Wasserstoffüberträger wirken.

Tatsächlich sind an der Umphosphorylierung drei Stufen des Coenzyms beteiligt, nämlich Adenylsäure, Adenosindiphosphorsäure und Adenosintriphosphorsäure. Der Übergang der Adenosindiphosphorsäure in die Triphosphorsäure spielt bei der Umphosphorylierung die Hauptrolle²⁸⁾.

Die Rolle der Cophosphorylase bei der Phosphatübertragung ist noch nicht so klar, wie die Rolle der Co-dehydrase bei der Wasserstoffübertragung. Es ist immerhin möglich, daß die Cophosphorylase an ihr Enzym, die Phosphorylase, Phosphat überträgt, und daß dieses Molekül seinerseits die Umphosphorylierung vermittelt. Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß man in Geweben, wie z. B. im Muskel, größere Mengen Adenylsäure findet als Cozymase. In ähnlicher Weise könnten auch gewisse Phosphatasen verhältnismäßig fest gebundenes Coenzym enthalten, welches seinerseits organisch gebundenes Phosphat aufnimmt und in freier Form wieder abgibt (*Albers*).

Es ist eine seit mehreren Jahren oft diskutierte Frage, ob bei der Glykolyse im Muskel außer Adenylsäure oder statt Adenylsäure auch Cozymase eine Funktion ausübt. Wir halten es nunmehr für erwiesen, daß an der Glykolyse zwei Coenzyme beteiligt sind, nämlich

1. die Cozymase als Coreduktase und
2. die Adenosinpolyphosphorsäure als Cophosphorylase.

Auch bei der Hefegärung können Adenosinpolyphosphorsäuren Bestandteile des Coenzymsystems ausmachen.

Durch Arbeiten des Stockholmer Instituts ist gezeigt worden, daß die Cozymase, welche in ihrem natürlichen Zustand die Adenylsäure nicht ersetzen kann, diese Fähigkeit erhält, wenn sie durch Erhitzen in alkalischer Lösung ihrer wasserstoffübertragenden Wirkung beraubt wird, m. a. W., wenn sie ihren Nicotinsäureamidrest verliert. Bei dieser alkalischen Behandlung entstehen mehrere Spaltprodukte, u. a. Adenylsäure. Bei gelinder Alkaliwirkung bildet sich, nach den Versuchen von *Schlenk* und *Vestin*, Adenosindiphosphorsäure; diese ist, wie erwähnt, eine Stufe des Adenylsäuresystems.

Es würde zu weit führen, die verschiedenen Acceptoren der Phosphatübertragung aufzuzählen, also die Substrate, welche durch Umesterung mit Adenosintri-phosphorsäure phosphoryliert worden sind. Erwähnt sei nur noch ein Stoff, der mit unserem Thema in mehrfachem Zusammenhang steht, nämlich das antineuritische Vitamin B₁, seit seiner chemischen Aufklärung Aneurin genannt.

Seine synthetische Darstellung bildet einen der zahlreichen Erfolge der I. G. Farbenindustrie A.-G. auf dem Vitamingebiet. Die enzymatische Phosphatüberführung von Adenosintriphosphorsäure auf Aneurin ist uns ganz neuerdings gelungen²⁷⁾, nachdem *Lohmann*²⁸⁾ diesen Phosphorsäureester aus der Hefe isoliert hatte. Wie das Lactoflavin gewinnt das Aneurin durch Phosphorylierung die Funktion eines Coenzym. Hierüber ist in aller Kürze noch folgendes zu sagen:

Schon durch *Peters*²⁹⁾ wußte man, daß Vitamin B₁ an der Umsetzung der Brenztraubensäure beteiligt ist. Die Reduktion der Brenztraubensäure zu Milchsäure, die im Muskel durch Vermittlung einer Dehydrase und der Cozymase vor sich geht, haben wir bereits kennengelernt. Bei der Hefegärung erfährt die Brenztraubensäure eine andere Umwandlung, sie wird nämlich durch das Enzym Carboxylase in Acetaldehyd und CO₂ gespalten. Vor fünf Jahren hat nun *Auhagen*³⁰⁾ in Stockholm gefunden, daß auch die Carboxylase ein Apoenzym ist, das erst in Verbindung mit einer Cocarboxylase zur Wirkung kommt, und *Lohmann* entdeckte vor wenigen Monaten, daß die *Auhagensche* Cocarboxylase den Aneurinpyrophosphorsäureester darstellt. Über die *Auhagensche* Cocarboxylase und ihre Beziehung zu Vitamin B₁ hat dann *P. E. Simola*³¹⁾ interessante Untersuchungen angestellt.

Für die Biochemie des Vitamins B₁ bedeuten die genannten Arbeiten einen Fortschritt, indem dadurch die Funktion dieses Vitamins in der Hefe als Cocarboxylase klargestellt ist³²⁾. Ungeklärt ist noch die Wirkungsweise der Cocarboxylase. Man kann vermuten, daß die NH₂-Gruppe wesentlich ist für die decarboxylierende Wirkung auf Brenztraubensäure, und diese Vermutung erhält durch die Carboxylasemodelle von *Langenbeck* eine

²²⁾ *Kuhn u. Boulanger*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **241**, 233 [1936].

²³⁾ *Theorell*, Biochem. Z. **290**, 293 [1937].

²⁴⁾ Euler u. Adler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **245**, 217 [1937].

²⁵⁾ *Lohmann*, *Biochem. Z.* **271**, 264 [1934],

²⁶⁾ Vgl. hinsichtlich der Cophosphorylasen auch Vestin, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **240**, 99 [1936]; Euler, Adler, Günther u. Vestin, Svensk Vet. Akad. Arkiv f. Kemi **12** B, Nr. 24 u. 25 [1936]; Euler u. Adler, ebenda **12** B, Nr. 12 [1935]; Lutwak-Mann u. Mann, Biochem. Z. **281**, 140 [1935]; Ohlmeyer, ebenda **287**, 212 [1936].

²⁷⁾ Euler u. Vestin, Naturwiss. **25**, 416 [1937].

²⁸⁾ *Lohmann*, ebenda **25**, 26 [1937]; diese *Ztschr.* **50**, 221 [1937].

²⁹⁾ Peters, Rydin u. Thompson, *Biochemical J.* **29**, 53 [1935].

³⁰⁾ *Auhagen*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **204**, 149 [1932]; **209**, 20 [1932]; Biochem. Z. **258**, 330 [1933].

³¹⁾ *Simola*, *Biochem. Z.* **254**, 229 [1933] und *Suomen Kemistilehti* (*Acta chem. fenn.*) **4**, 20—21 [1936].

³²⁾ Die Theorie des Brenztraubensäurezerfalls im Tierkörper, die Krebs, Nature **138**, 288 [1936], aufgestellt hat, wird ergänzt durch eine Hypothese von Lipmann, nach welcher Aneurin als Wasserstoffüberträger wirkt (Skand. Arch. Physiol. **76**, 255 [1937]).

gewisse Stütze. Vielleicht sind diese *Langenbeckschen Modelle*³³⁾ geeignet, einen Einblick in den Reaktionsmechanismus der enzymatischen Decarboxylierung zu vermitteln.

Zusammenfassung.

Der Fortschritt, welchen uns das Studium der Coenzyme, besonders der Codehydrasen, gebracht, liegt — abgesehen von einer vertieften Einsicht in die Erscheinungskomplexe der Atmung, Gärung und Glykolyse — in der Aufklärung des Mechanismus einer Anzahl von enzymatischen Katalysen.

An speziellen Beispielen konnte gezeigt werden, wie ein Enzym-Coenzym-System eine Reaktion vermittelt. Bei enzymatischen anaeroben Oxydoreduktionen nimmt die als Wirkungsgruppe fungierende Codehydrase den Wasserstoff vom Donatorsystem nach stöchiometrischen Mengen auf und gibt ihn an ein Acceptor-system ab. Cozymase als Wasserstoffüberträger pendelt zwischen den beiden Dehydrasen des Donators und des Acceptors.

Bei reinen Dehydrierungen (Oxydationen) nimmt die Cozymase ebenfalls den Wasserstoff nach stöchiometrischen Mengen auf; die Dihydrocozymase wird reoxydiert durch Vermittlung eines auf sie eingestellten Farbstoffenzym, dessen Leukoverbindung auf verschiedenen Wegen unspezifisch reoxydiert werden kann, entweder durch Sauerstoff oder durch einen weiteren Oxydationskatalysator wie Cytochrom c oder schließlich durch gewisse Äthylenverbindungen, für deren Hydrierung *Gottwalt Fischer* die Mitwirkung einer besonderen Hydrase annimmt.

Von den 5 eingehend studierten Coenzymen, die hier besprochen wurden, sind 2 bereits als Vitamine bekannt-

³³⁾ *Langenbeck: Erg. d. Enzymforsch.*, 1933. Bd. 2, S. 314.

geworden, nämlich Lactoflavin und Aneurin. Man kann fragen, zu welcher Gruppe der Wirkstoffe die Adenylsäure und die beiden Nucleotide, die Codehydrase I und II, gehören. Ob sie zu den Vitaminen zu zählen sind oder eher mit den Hormonen übereinstimmen, ist schließlich nur eine Angelegenheit der Definition, denn zwischen Vitaminen und Hormonen bestehen, wie schon erwähnt, keine festen Unterschiede. Vermutlich müssen wir das Nicotinsäureamid in irgendeiner Weise mit der Nahrung aufnehmen.

Die Erhöhung der Wirksamkeit des reinen Wirkstoffes durch sein spezifisches Protein ließ die Vermutung aufkommen, daß auch andere Stoffe als die bis jetzt bekanntgewordenen Coenzyme, also Vitamine und Hormone³⁴⁾, wie z. B. Ascorbinsäure, Adrenalin, Glutathion und Tyroxin, im Körper erst in Verbindung mit Apoenzymen, also als Vitazyme oder Hormozyme zur Wirksamkeit kommen.

Die Mehrzahl der Wirkstoffe kann in freier Form im Blut kreisen, wodurch die bekannte schnelle Verteilung der Ergone nach der Injektion ermöglicht wird. Wirksam werden diese Stoffe in der Regel aber erst da, wo sie ihre spezifischen Apoenzyme finden, die, als hochmolekulare Körper, in den Geweben verfestigt sind.

Die verschiedenartige Wirkung von Ergonen in verschiedenen Tierarten und Individuen ist auf die verschiedene Konzentration ihrer Apoenzyme zurückzuführen, wofür bereits in einigen besonderen Fällen Anhaltspunkte vorliegen.

Die nahen Beziehungen zwischen Wirkstoffen (Ergonen) und Coenzymen werden tiefere Einblicke in die Rolle der Vitamine und Hormone gestatten, und das Studium der Coenzyme, das erst in seinen Anfängen steht, wird, glaube ich, sowohl in der Bakteriologie als auch in der Therapie bald fruchtbar werden. [A. 100.]

³⁴⁾ *Euler* 1933.

ZUSCHRIFTEN

Das Teatini-Verfahren zur Reinigung von Zuckersäften.

Von W. E. Callingham,
Chemotechniker und Zuckertechniker, London.

In seinem Aufsatz über die moderne Saftreinigung¹⁾ macht *O. Spengler* auch einige Bemerkungen über das von *Teatini* vor etwa 7 Jahren ausgearbeitete und seitdem in zahlreichen Zuckerfabriken in Anwendung stehende Saftreinigungsverfahren. Da diese Bemerkungen weder die theoretischen Grundlagen noch die praktischen Erfolge des *Teatini*-Verfahrens richtig kennzeichnen, ist zu befürchten, daß sie bei denjenigen Lesern, welche das Verfahren nicht schon aus der engeren Fachliteratur kennen, ein falsches Bild von dem Zweck und der Leistungsfähigkeit des Verfahrens hervorrufen werden.

Nach *Spengler* wurde „von *Teatini* ein Verfahren angegeben, bei welchem die Filtrationsfähigkeit der Schlämme eine wesentlich bessere sein sollte. Das *Teatinische* Verfahren baut sich auf dem *Kowalskischen* Verfahren auf“. Und weiterhin: „Auch diesem Verfahren war ein Erfolg in der Praxis nicht beschieden, da *Teatini* bei weitem nicht alle erforderlichen Bedingungen klar erkannt hatte.“

Gegenüber diesen Angaben muß folgendes festgestellt werden:

1. Das *Teatini*-Verfahren soll nicht nur die Filtrierbarkeit der Schlämme verbessern, sondern eine allgemeine Verbesserung bzw. Verbilligung der Zuckerfabrikation in allen Stufen des Fabrikationsprozesses herbeiführen. Dies wird durch Anwendung neuer wissenschaftlicher Grundsätze der Kolloidreinigung erreicht, und eines der hierbei erzielten Ergebnisse ist eine merkliche Verbesserung der Filtrierbarkeit der Schlämme. Von

weiteren, in erster Linie wirtschaftlichen Vorteilen des Verfahrens soll weiter unten noch die Rede sein.

2. Es ist nicht richtig, daß das *Teatini*-Verfahren „sich auf dem *Kowalskischen* Verfahren aufbaut“. Der einzige Berührungspunkt zwischen dem Verfahren von *Teatini* und demjenigen von *Kowalski* und *Kozakowski*²⁾ ist, daß zur Saftreinigung bei beiden Verfahren nicht, wie sonst meistens üblich, eine ein für allemal feststehende Kalkmenge (2%) angewendet, sondern die tatsächlich erforderliche Kalkmenge durch besondere Versuche von Fall zu Fall festgestellt wird. Aber sowohl die Feststellung dieser „optimalen“ Kalkmenge als auch die praktische Durchführung des Saftreinigungsverfahrens erfolgen bei *Teatini* ganz anders als bei *Kowalski* und *Kozakowski*.

Teatini will die kolloidalen Verunreinigungen des Rohsaftes durch Einstellung ihres „optimalen isoelektrischen Punktes“, und zwar des im alkalischen Gebiet liegenden, möglichst vollständig ausflocken. Hierzu behandelt er eine Probe des Rohsaftes im Laboratorium mit verschiedenen Mengen Kalk bzw. Kalk und anschließend SO₂ und stellt durch ultramikroskopische Prüfung des filtrierten Saftes fest, bei welchen Zusatzmengen und dementsprechend bei welchem pH die im Saft gebliebene Menge kolloider Verunreinigungen am geringsten ist. Die so ermittelten optimalen Bedingungen werden dann der Betriebsarbeit zugrunde gelegt.

Kowalski dagegen führt die Vorsecheidung in zwei Stufen durch: zuerst fällt er bei etwa 40° diejenigen Fremdstoffe, die sich bei dieser Temperatur in Form von Kalksalzen gut ausfällen lassen, durch Zusatz der genau berechneten Kalkmenge; die restlichen Nichtzuckerstoffe werden mittels eines geringen, ebenfalls genau berechneten Kalküberschusses bei 85° gefällt.

Die Art, wie er die erforderlichen Kalkmengen ermittelt, beweist, daß er dabei ausschließlich an die Ausfällung saurer Verunreinigungen in Form ihrer Kalksalze gedacht hat; denn

¹⁾ Diese Ztschr. 48, 369 [1935].

²⁾ D. R. P. 138693 [1903].