

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

V. Zerlegung der sogenannten Oxydasen in Oxygenasen und Peroxydasen.

(Eingeg. am 3. Februar 1903; mitgeth. in der Sitzung von Hrn. P. Jacobson.)

Zur Erklärung der Oxydasewirkung stellte bekanntlich Bertrand¹⁾ folgende Theorie auf: Oxydasen seien eiweissartige, hydrolytisch dissociirbare Manganverbindungen, bei welchen das Mangan in Form des Oxyduls die Rolle eines Sauerstoffüberträgers spiele. Das Sauerstoffmolekül werde durch das Manganoxydul in der Weise gespalten, dass ein Sauerstoffatom zur Bildung von Mangandioxyd in Anspruch genommen, während das andere auf den oxydablen Körper übertragen werde. Das entstandene Mangandioxyd werde dann durch das säureartige Eiweissradical unter Sauerstoffentbindung und Regenerierung der ursprünglichen Manganverbindung weiter zersetzt.

Wie in der voranstehenden Mittheilung angegeben wird, ist die von uns dargestellte Peroxydase manganhaltig und übt trotzdem in Abwesenheit von Peroxyden keine oxydirende Wirkung aus. Dieses Verhalten ist mit der Bertrand'schen Auffassung der Rolle des Mangans bei der Oxydasewirkung nicht vereinbar, und die Frage stellte sich nunmehr so: Sind die sogenannten Oxydasen überhaupt einheitliche Enzyme, oder sind sie Gemenge von sauerstoffaufnehmenden, peroxydbildenden Körpern und Peroxydasen?

Schon Bertrand²⁾ fand, dass die Laccase durch fractionirte Fällung mit Alkohol in einen manganärmeren, schwächer oxydirenden und einen manganreicheren, stärker oxydirenden Antheil zerlegt werden kann. Dass aber dabei die Verringerung des Oxydationsvermögens der Laccase mit einer Abscheidung von Peroxydase in Zusammenhang stand, wurde von ihm nicht vermuthet. Fünf Jahre später schlug Aso³⁾ die fractionirte Fällung mit Alkohol als ein Mittel zur Trennung der Peroxydase von Oxydase vor. Er suchte aber nicht zu erörtern, ob die Peroxydase eine zufällige Beimengung oder ein normaler Bestandtheil der Oxydase ist. Diese Sachlage veranlasste uns, die fractionirte Fällung der Oxydasen mit Alkohol näher zu verfolgen.

Wird eine Lösung von Lactarius-Oxydase einer methodischen fractionirten Fällung mit Alkohol unterworfen, wobei gleichwerthige Fractionen vereinigt und dann weiter gefällt werden, so gelangt man

1) Compt. rend. 124, 1356 [1897]. 2) l. c.

3) Bull. Coll. Agric. Tokyo 5, 2, 233 [1902].

schliesslich zu zwei Endfractionen, deren eine nur schwach oxydirend wirkt, während die andere gar keine oxydirenden Eigenschaften besitzt. Erstere, welche in 40-procentigem Alkohol so gut wie unlöslich ist, lässt sich durch Peroxydase verschiedener Herkunft stark activiren; Letztere ist alkohollöslich und activirt selbst Hydroperoxyd, sowie abgeschwächte Oxydasen — sie verhält sich also wie eine echte Peroxydase. Die schwach oxydirende Fraction, welche der Hauptsache nach nur als Sauerstoffträger fungirt, indem sie den molekularen Sauerstoff unter Peroxydbildung aufnimmt, wollen wir nunmehr als Oxygenase bezeichnen, während wir für den nicht oxydirenden, peroxydactivirenden Antheil die Bezeichnung Peroxydase behalten. Es sei hier bemerkt, dass, während es verhältnissmässig leicht ist, aus Lactarius-Oxydase oxygenasefreie (Guajactinctur nicht bläuende) Peroxydasepräparate darzustellen, es uns bisher noch nicht gelang, eine völlig peroxydasefreie Oxygenase zu gewinnen. Dementsprechend giebt auch Bertrand¹⁾ an, dass er nicht im Stande war, seine Laccase von Mangan völlig zu befreien. Dass Peroxydase an Oxygenaseniederschlägen haftet, ist kein Wunder, da Enzyme überhaupt durch Niederschläge verschiedener Natur sehr leicht mitgerissen und festgehalten werden.

Eine theilweise Trennung der Oxygenase von Peroxydase kann weiter durch anhaltende Extraction der Gemenge beider mit 30—50-proc. Alkohol oder durch Dialyse gegen reines Wasser erzielt werden. In letzterem Falle geht Peroxydase in das Dialysat über.

Vergleichende Versuche mit Oxygenasen und Peroxydasen verschiedener Herkunft enthüllten die bemerkenswerthe Thatsache, das Pilzoxxygenasen (aus Russula und Lactarius) durch die von denselben abgeschiedenen Peroxydasen beträchtlich kräftiger activirt werden als durch die Rettig- oder Kürbis-Peroxydase. Andererseits wird Hydroperoxyd durch die Russula- oder Lactarius-Peroxydase viel schwächer als durch die Rettig- oder Kürbis-Peroxydase activirt. Es scheinen demnach mindestens zwei Peroxydasen zu existiren: die Eine activirt stark Oxygenasen und schwach Hydroperoxyd; die Andere zeigt ein gerade entgegengesetztes Verhalten. Da die betreffenden Peroxydasen als chemisch reine Verbindungen bisher noch nicht identificirt worden sind, so kann man die erhaltenen Resultate als streng vergleichbar selbstverständlich nicht betrachten. Wir suchten aber diesem Uebelstande dadurch vorzubeugen, dass wir für die Versuche stets als überschüssig erkannte Peroxydasemengen anwendeten.

Die Versuche wurden wie in vorstehender Mittheilung angegeben, ausgeführt. Hier sollen nur die Ergebnisse der quantitativen Oxydationsversuche

¹⁾ l. c.

erwähnt werden. Zur Verwendung kamen je 1 g Pyrogallol, zwei Peroxydasen und zwei Oxygenasen, deren eine fast peroxydasefrei war und allein nur sehr schwach oxydierend wirkte.

Je 1 g Pyrogallol und:	Absorbirter Sauerstoff	Entwickelte Kohlensäure
15 ccm Rettigperoxydase	0.5 ccm	0.1 ccm
15 » Lactariusperoxydase	0.2 »	0.0 »
0.05 g Lactariusoxygenase I	3.1 »	1.1 »
0.05 » » I, 15 ccm Rettigperoxydase	9.9 »	5.9 »
0.05 g Lactariusoxygenase I, 15 ccm Lactariusperoxydase	11.0 »	6.8 »
0.05 g Lactariusoxygenase II	1.2 »	0.4 »
0.05 » » II, 15 ccm Rettigperoxydase	12.4 »	3.6 »
0.05 g Lactariusoxygenase II, 15 ccm Lactariusperoxydase	15.8 »	5.1 »

Aus obigen Versuchen geht unzweideutig hervor, dass die Lactarius-Oxygenase durch die Vermittelung von Peroxydasen stark activirt wird; das Oxydationsvermögen der Ersteren konnte bis auf das 13-fache gesteigert werden. Dabei ist die von der Oxygenase abgeschiedene Lactariusperoxydase beträchtlich wirksamer als die Rettigperoxydase. Die qualitativen Versuche ergaben ein ähnliches Resultat.

Die Menge der von uns bisher erhaltenen Oxygenase war zu gering, um eine nähere Untersuchung derselben zu gestatten. Wir beabsichtigen daher, im nächsten Herbst grössere Mengen von *Russula*- und *Lactarius*-Pilzen auf »Oxydase« zu verarbeiten und das erhaltene Rohproduct durch eine methodische Fractionirung in seine Componenten — Oxygenase und Peroxydase — zu zerlegen.

Durch den Befund, dass die bisherigen Oxydasen Gemenge von Oxygenasen und Peroxydasen sind, lässt sich in ganz einfacher Weise die Thatsache erklären, dass die Oxydasereaction bei zahlreichen Pflanzen ausbleibt, während es kaum ein Pflanzenobject giebt, welches die Peroxydasereaction nicht zeigt. Als Peroxyde sind die Oxygenasen, je nach der Natur der Radicale, welche mit der für Peroxyde charakteristischen .O.O-Gruppe verbunden sind, mehr oder weniger haltbar. Wenig beständige Oxygenasen, oder solche, welche sich leicht mit Wasser zu Hydroperoxyd umsetzen, werden sofort nach der Entstehung im Respirationsprocesse verbraucht und lassen sich nicht nachweisen. Die Peroxydasen, deren ausserordentliche Beständigkeit von verschiedenen Autoren constatirt worden ist, verbleiben dagegen in den Pflanzentheilen und sind stets mittels Hydroperoxyd nachweisbar.

Genf, Pflanzenchem. Laboratorium des Botanischen Institutes.