

671. Adolf Ernest und Heinr. Berger: Peroxydasen aus der Zuckerrübe.

(Eingegangen am 13. November 1907.)

Mit Bezug auf die Arbeiten von A. Bach und R. Chodat¹⁾ sprach Julius Stoklasa die Vermutung aus, daß Peroxydasen wahrscheinlich in der Zuckerrübe vorhanden seien. Auf seine Aufforderung unterzogen wir uns der Arbeit in dieser Richtung und zwar mit positivem Erfolge. Die ersten vorläufigen Versuche hat einer von uns direkt mit Rübenbrei, welcher aus den äußeren Partien der Zuckerrübe gewonnen war, ausgeführt.

Der Brei wurde zunächst der Einwirkung von 80-proz. Äthylalkohol ausgesetzt. Nach Abgießen und Abpressen des Alkohols wurde der Brei einerseits mit Guajactinktur, andererseits mit Pyrogalllösung und Wasserstoffhyperoxyd geprüft.

Obwohl die Guajactinktur eine Reaktion auf Peroxydasen lieferte, erachteten wir dieselbe (nach den mit diesem ziemlich heiklen Reagenz gewonnenen Erfahrungen) nicht für maßgebend.

Die komparativen Versuche, bei welchen einerseits Pyrogalllösung mit Wasserstoffhyperoxyd in destilliertem Wasser, ohne Hinzutun von Rübenbrei, andererseits unter Hinzufügung von Rübenbrei verwendet wurden, wiesen, je nach der Raschheit der Entstehung von Purpurogallin, auf die Gegenwart von Peroxydasen hin. Die Zersetzung des Wasserstoffhyperoxyds in der wäßrigen Lösung zeugte von der gleichzeitigen Anwesenheit von Katalase.

Um die Wirkung der Oxydasen aus Zuckerrübe besser studieren zu können, bemühten wir uns, sie zu isolieren, zum Zwecke der Ausscheidung des Einflusses der übrigen in der Zelle vorkommenden Enzyme.

Bei der Isolierung der Peroxydasen gingen wir teils nach der Auleitung Bachs vor, teils haben wir den Vorgang einigermaßen modifiziert.

Die von uns gewonnenen Präparate wiesen die Eigenschaften der Peroxydasen auf, und bloß in einem Falle, in welchem zur Darstellung derselben junge Rüben verwendet wurden, zeigte das Präparat auch katalytische Eigenschaften, welche nach Lösung der Substanz in Wasser und abermaliger Niederschlagung durch Alkohol-Äther vollständig verschwanden.

¹⁾ In diesen »Berichten« publiziert.

Darstellung der Peroxydasen aus Zuckerrübe.

10 kg Rübe (zur Herbstzeit gerade vom Felde geholt) wurden nach erfolgter Waschung mit Wasser mittels eines Reibeisens abgerieben, so daß von jeder einzelnen Rübe bloß eine etwa 4 cm starke Schicht der obersten Partie zur Verwendung gelangte. Der Brei wurde einerseits direkt mit 80-proz. Äthylalkohol in einer Porzellanschale übergossen, andererseits in seiner zweiten Hälfte unter einem Druck von ca. 300 Atmosphären ausgepreßt und der gewonnene Preßsaft in einen Glaszylinder gegossen, und hierauf die doppelte Menge 96-prozentigen Alkohols nachgefüllt.

Im ersten Falle wurde der Alkohol vom Rübenbrei nach 4 Tagen entfernt. Den Rest preßten wir bei niedrigerem Druck ab und übergossen hernach den Brei mit 40-prozentigen Äthylalkohol und ließen ihn zum Zwecke der Extraktion 8 Tage stehen. Der alkoholische Extrakt wurde hierauf von dem Brei, teils durch Filtration, teils durch Abpressen so schnell als möglich geschieden und bei 40—50° abgedampft, der konzentrierte Extrakt sodann mit absolutem Alkohol und Äther niedergeschlagen und der entstandene flockige (einen Stich ins Graue zeigende) Niederschlag durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt und bei 50° getrocknet. Nachdem die Masse vollständig erhärtet war, zerrieben wir sie zu einem feinen Pulver und bewahrten das letztere in einem hermetisch verschlossenen Gefäß im Exsiccator für weitere Versuche auf.

Im zweiten Falle, in welchem der gepreßte Saft zur Verwendung gelangte, wurde der Alkohol mit dem Wasser von dem schmierigen Teile abgeschieden und der nach 24 Stunden sich absetzende Rest einer Extraktion mit 40-prozentigem Alkohol unterworfen. Nach 8 Tagen wurde die alkoholische Lösung abfiltriert, konzentriert und getrocknet, ganz so, wie wir früher angegeben haben.

Wir gewannen auf diese Weise 2.3 g rohen, gegenüber 1.7 g des vorgenannten Präparates.

Wiewohl diese Differenzen nicht bedeutend sind, scheint es doch, daß von dem erwähnten Rübenbrei etwas von der Substanz direkt in den Saft überging. Die so gewonnenen 4 g der Substanz wurden geprüft und erwiesen sich als Peroxydasen. 0.2 g der Substanz wurden in 20 ccm destillierten Wassers aufgelöst, filtriert und 20 ccm 1-prozentigen Wasserstoffhyperoxyds in Wasser mit 2 g Pyrogallol hinzugefügt. Parallel wurde derselbe Versuch nur mit dem Unterschiede durchgeführt, daß keine Peroxydasen hinzugefügt wurden; an ihrer Statt verwendeten wir eine Lösung von 2 g Pepton, und schließlich unternahmen wir einen analogen dritten Versuch, wobei zu 20 ccm 1-prozentiger Wasserstoffhyperoxydlösung mit 2 g Pyrogallol 20 ccm destillierten Wassers ohne irgendwelche Zutat gefügt wurde. Alle drei Versuche unternahmen wir unter Einhaltung derselben äußeren Bedingungen (Temperatur, Licht usw.). Nach Verlauf von etwa 5 Minuten zeigte die Lösung, in welche Peroxydasen getan worden waren, eine intensiv rote, in dunkelrot übergehende Verfä-

bung, während die übrigen beiden Lösungen in derselben Zeit ohne Veränderung blieben.

Nach dieser qualitativen Prüfung betreffs der Aktivität der Peroxydasen und Ausschluß der Gegenwart der Katalasen und Oxydasen untersuchten wir die Aktivität quantitativ, wobei uns das ausgeschiedene Purpurogallin als Indicator diente. Bei diesem Vorgang trachteten wir, die Wirkung aller drei Faktoren, die bei der Bildung von Purpurogallin von Einfluß sind, zu erkennen und zwar der Peroxydasen, des Wasserstoffhyperoxyds und des Pyrogallols, indem wir alle äußeren Einflüsse durch Einhaltung derselben Bedingungen bei Durchführung der Versuche ausschlossen. Das entstandene Purpurogallin wurde auf einem getrockneten und gewogenen Filter gesammelt.

I. Versuchsreihe.

Bei steigender Menge der Peroxydasen in einer konstanten Menge Wasserstoffhyperoxyds und Pyrogallols; Parallelversuche in Abwesenheit von Peroxydasen, Einhaltung derselben Konzentration auch bei den weiteren Versuchen.

Innerhalb 24 Stunden.

Peroxydasen g	1-proz. H ₂ O ₂ -Lösung in Wasser ccm	Pyrogallol g	Purpurogallin g	Unter denselben Bedingungen, ohne Hinzufügen von Peroxydasen entstandenes Purpurogallin
0.05	15	1.5	0.0191	0.0082
0.1	15	1.5	0.0229	0.0082
0.15	15	1.5	0.0251	0.0082
0.2	15	1.5	0.0298	0.0082

Gleichzeitige
Versuche

II. Versuchsreihe.

Bei konstanter Menge der Peroxydasen und des Wasserstoffhyperoxyds, bei steigender Menge des Pyrogallols. Parallelversuche in Abwesenheit von Peroxydasen.

Innerhalb 24. Stunden.

Peroxydasen g	1-proz. H ₂ O ₂ -Lösung in Wasser ccm	Pyrogallol g	Purpurogallin g	Unter denselben Bedingungen, ohne Hinzufügen von Peroxydasen entstandenes Purpurogallin
0.3	20	2	0.0882	0.0117
0.3	20	2.5	0.0866	0.0119
0.3	20	3	0.0820	0.0129
0.3	20	3.5	0.0757	0.0129

Gleichzeitige
Versuche

III. Versuchsreihe.

Bei konstanter Menge der Peroxydasen und des Pyrogallols und steigender Menge des Wasserstoffperoxyds. Parallelversuche ohne Peroxydase.

Innerhalb 24 Stunden.

Peroxydasen	1-proz. H ₂ O ₂ -Lösung in Wasser	Pyrogallol	Purpurogallin	Unter denselben Bedingungen, ohne Hinzufügen von Peroxydasen entstandenes Purpurogallin
g	ccm	g	g	
0.2	20	1.5	0.0267	0.0086
0.2	30	1.5	0.0298	0.0099
0.2	40	1.5	0.0458	0.0148
0.2	50	1.5	0.0497	0.0175

Gleichzeitige Versuche

Zur Bereitung des weiteren Präparats wurden 12 kg junger Rüben (gegen Ende Juli ausgehoben) verwendet. Das im Wege der Extraktion gewonnene Präparat (da eine Presse nicht zur Disposition war) wurde dahin geprüft, ob nur Oxydasen vorhanden waren und nachstehende Untersuchungen durchgeführt:

Auf Oxydasen: 0.1 g roher Peroxydasen wurden in 10 ccm Wasser gelöst und diese Lösung zur Pyrogallollösung zugegeben, 2 g in 20 ccm Wasser. Purpurogallin wurde selbst nach drei Tagen nicht ausgeschieden. Die Flüssigkeit färbte sich nur braun.

Katalase: 0.1 g roher Peroxydasen wurden in 10 ccm Wasser gelöst, filtriert und im volumetrischen Apparate geprüft; mit 1-prozentiger Wasserstoffperoxydlösung entwickelte sich Gas, was das Vorhandensein von Katalase beweist.

Amylase: 100 ccm 2-prozentiger sterilisierter Stärkekleister wurden mit 2 g Peroxydasen in 10 ccm Wasser gemengt und durch 24 Stunden bei 30° im Thermostaten gehalten. Der Kleister reduzierte Fehlingsche Lösung nach dem Versuche nicht, Amylase war also nicht vorhanden.

Invertase: Die Probe wurde in der üblichen Weise mit 2-prozentiger Saccharoselösung durchgeführt mit negativem Erfolge.

Emulsin: 0.2 g roher Peroxydasen wurden in 10 ccm Wasser gelöst und zur Lösung Amygdalin (1:20) in Wasser hinzugeben. Es wurde weder ein Geruch nach Benzaldehyd, noch eine Entwicklung von Cyanwasserstoff wahrgenommen. Die Lösung reduzierte auch Fehlingsche Lösung nicht.

Proteolytische Enzyme: Die Lösung von Peroxydasen löste in der Hitze koaguliertes Eiweiß nicht. Der Versuch wurde bei einer Temperatur von 30° unter Hinzufügung von 3 Tropfen Toluol ausgeführt.

Mit Rücksicht auf die Gegenwart der Katalase wurde ihre Wirkung geprüft. Zu diesem Zweck wurden zwei Nitrometer verwendet, welche mit 2-prozentiger Wasserstoffperoxydlösung gefüllt wurden. In das eine wurde ein abgewogenes Quantum roher Peroxydase in

wäßriger Lösung hinzugefügt, in das zweite gleichzeitig dieselbe Menge Pepton, in dem gleichen Quantum Wasser gelöst. Das entbundene Gas (Sauerstoff) haben wir gleichzeitig in den gleichen Zeitintervallen gemessen.

Auf den normalen Barometerdruck und 0° Temperatur berechnet.

Verwendete Menge der Peroxydasen in 10ccm destilliert. Wassers g	Dauer des Versuchs Minuten	Frei gewordener Sauerstoff	Bei denselben Verhältnissen unter Anwendung von Pepton frei geword. Sauerstoff ccm	Durch katalyt. Wirkung der Peroxydasen frei gewordener Sauerstoff
0.1	15	1.98	0.27	1.71
0.15	15	2.88	0.27	2.61
0.2	15	3.60	0.18	3.42
0.1	30	2.79	0.27	2.52
0.2	30	4.77	0.36	4.41

Der Rest dieses Präparates, von dem ursprünglich 5.705 g vorhanden waren, wurde in Wasser aufgelöst und mit absolutem Alkohol und Äther nochmals niedergeschlagen, bei 40° getrocknet und neuerlich untersucht. Katalytische Wirkungen wurden jetzt nicht beobachtet. Bei Hinzufügung von Pyrogallollösung und Wasserstoffhyperoxyd zur wäßrigen Lösung hat die so neugewonnene Substanz Purpurogallin ausgeschieden, welche sodann gewogen wurde.

IV. Versuchsreihe.

Bei konstanten Mengen Wasserstoffsperoxyds und Pyrogallols bei steigenden Peroxydasenquantitäten.

Verwendete Menge der Peroxydasen in 10 ccm destilliert. Wassers g	1-proz. Wasserstoffhyperoxydlösung ccm	Pyrogallol g	Purpurogallin g	Purpurogallin im Parallelversuche ohne Hinzufügung von Peroxydasen g
0.1	30	2	0.0093	0.0097
0.2	30	2	0.0142	0.0085
0.25	30	2	0.0255	0.0089
0.3	30	2	0.0276	0.0102

(Gleichzeitige Versuche)

Ein weiteres Präparat, ebenso gewonnen aus 15 g Samenrube im Gewichte von 6.52 g, enthielt auch keine Oxydasen, Katalasen, Amylase, Invertase, Emulsin oder proteolytische Enzyme und zeigte die Eigenschaften der Peroxydasen.

V. Versuchsreihe.

Bei konstanten Quantitäten Pyrogallol, Wasserstoffhyperoxyd und steigenden Mengen von Peroxydasen.

Peroxydasen in 10 ccm dest. Wassers	1-proz. H ₂ O ₂	Pyro- gallol	Purpuro- gallin	Ohne Hinzufügung von Peroxydasen entst. Purpurogallin
g	ccm	g	g	g
0.05	20	2	0.0156	0.0123
0.1	20	2	0.0282	0.0147
0.15	20	2	0.0345	0.0103
0.2	20	2	0.0367	0.0114
0.3	20	2	0.0473	0.0113
0.4	20	2	0.0499	0.0135

(gleichzeitige
Versuche)

Aus dem Angeführten geht hervor:

1. die Zellen der Zuckerrüben enthalten Peroxydasen;
2. diese Peroxydasen (Rohprodukt) lassen sich isolieren unter Ausscheidung der Wirksamkeit anderer Enzyme mittels Alkohols und Äthers;
3. die Menge des durch die Wirkung der Peroxydasen entstehenden Purpurogallins steigt mit der wachsenden Menge der angewendeten Peroxydasen und des Wasserstoffhyperoxyds, während die steigende Menge des Pyrogallols ihre Wirksamkeit lähmt. (Bei Berücksichtigung der Grenzen, innerhalb welcher unsere Versuche sich bewegten.)

II. Teil.

Ein weiteres Präparat wurde aus 50 kg Samenrüben nach der bereits früher angegebenen Methode hergestellt (Bach). Die Prüfung der Aktivität des Präparats, von dem im ganzen 3.4482 g gewonnen worden waren, erfolgte durch Wägung des aus der Lösung des Pyrogallols in Wasserstoffhyperoxyd durch die Einwirkung von Peroxydasen ausgefallten Purpurogallins.

0.2 g Peroxydasen scheiden aus der Lösung von 2 g Pyrogallol in 20 ccm Wasser und 20 ccm 2-prozentigen Wasserstoffhyperoxyds innerhalb 12 Stunden 0.0372 g Purpurogallin aus, während ohne Peroxydasen unter denselben Bedingungen nur 0.0092 g Purpurogallin ausgeschieden wurden.

Es läßt sich mithin das Präparat als aktives zu weiteren Versuchen verwenden. Zur Prüfung dieses Präparats wurde die Methode von W. Palladin angewendet¹⁾.

Es wurde 1 g des Peroxydasepräparats in 25 ccm Wassers aufgelöst und diese Lösung in 80 ccm 20-prozentiger, wäßriger Lösung von

¹⁾ W. Palladin, Ztschr. f. physiol. Chem. 47, 407.

Pyrogallol gegossen und zwar in einen Kolben, der dem Apparat von Stoklasa zur Prüfung der enzymatischen Tätigkeit betreffs der Kohlendioxydproduktion angeschlossen war.

Temperatur 20°.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des produzierten CO ₂ in mg
7	21.6
20	34.9
6	7.3
16	0.1
49	63.9
Hinzufügen von 80 ccm 30-prozentigem H ₂ O ₂ . Temperatur 20°.	
24	285.6
24	30.4
24	13.7
72	329.7

Der Versuch wurde mit einer neuen Partie des Präparates wiederholt. Es wurde 1 g Peroxydase abgewogen.

8	24.0
14	14.2
24	7.1
46	45.3
Hinzufügung von 80 ccm 3-prozentigem H ₂ O ₂ .	
24	192.4
24	44.5
24	17.4
24	9.8
96	264.1

Der Rest des Peroxydasepräparats wurde bei einer Temperatur von 140° durch 8 Stunden getrocknet, worauf genau so vorgegangen wurde, wie bei dem vorherbeschriebenen Versuch.

Das Präparat wog nach der Trocknung 1.0257 g und löste sich nicht mehr so gut im Wasser. (Vor dem Trocknen wog es 1.1067 g.)

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des produzierten CO ₂ in mg
6	4.0
24	4.8
30	8.8
Hinzufügung von 80 ccm 3-prozentigem H ₂ O ₂ .	
24	36.0
24	10.8
48	46.8

Ein weiteres Peroxydasepräparat wurde aus Radieschen bereitet, und zwar aus 10 kg junger Radieschen, zu dem Zweck, um die Wirkung des Radieschenpräparats¹⁾ mit dem Präparat aus Zuckerrübe vergleichen zu können.

Zur Herstellung des Präparats wurde nur die obere Partie der Radieschen in einer Tiefe von 3 mm verwendet. Im ganzen wurden 0.8 g Peroxydasepräparat gewonnen.

0.2 g dieses Präparats schieden aus einer Lösung von 2 g Pyrogallol in 20 ccm Wasser und 20 ccm 2-prozentiger Wasserstoffperoxydlösung innerhalb 12 Stunden 0.0296 g Purpurogallin aus, während ohne Peroxydasen unter denselben Bedingungen nur 0.0116 g ausgeschieden worden sind.

Eine weitere Partie von 0.5 g des Präparats wurde abermals wie das Präparat aus Zuckerrübe in 25 ccm Wasser aufgelöst und die Lösung in 80 ccm 20-prozentigen, in Wasser gelösten Pyrogallols in einen Kolben gegossen, welcher wieder an den Apparat zur Prüfung enzymatischer Wirkungen angefügt war, worauf wie bei dem früheren Versuch nach der Methode von W. Palladin vorgegangen wurde. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen angeführt.

In 20-prozentiger Pyrogallol-Lösung.

Dauer des Versuches in Stunden	Menge des produzierten CO ₂ in mg
16	13.2
24	12.6
24	0.8
64	26.6
Nach Hinzufügung von 3-prozentigem H ₂ O ₂ .	
24	31.4
30	87.3
24	29.7
24	10.1
102	158.5

Was die Beziehungen zwischen der Entwicklung der Rübe in verschiedenen Vegetationsperioden, den aus ihnen gewonnenen Mengen von Peroxydasen und ihrer Wirksamkeit anbelangt, so wollen wir uns von den, durch unsere Versuche sichergestellten Tatsachen nicht in weitere Deduktionen vorwagen und behalten uns die Durcharbeitung in dieser Richtung für die nächste Zeit vor.

¹⁾ Radieschen hat Bach bei seinen Versuchen verwendet.

