

0.0902 g Subst.: 0.0122 g Rh, 0.1100 g AgBr.
 Cs_2RhBr_5 . Ber. Rh 13.40, Br 52.02.
 Gef. » 13.52, » 51.90.

4. Rubidium-pentabromorhodiä, $\text{Rb}_2[\text{RhBr}_5]$.

Wie das Caesiumsalz erhalten und behandelt; etwas dunkler grün gefärbt.

0.1060 g Subst.: 0.0163 g Rh, 0.1480 g AgBr.
 Rb_2RhBr_5 . Ber. Rh 15.28, Br 59.34.
 Gef. » 15.37, » 59.42.

Hrn. H. Gebhard sprechen wir auch an dieser Stelle unseren herzlichsten Dank für die freundliche Unterstützung aus.

39. A. Bach: Zur Kenntnis der in Tyrosinase tätigen Peroxydase.

(Eingegangen am 9. Januar 1908.)

Vor einiger Zeit berichtete ich¹⁾ über Versuche, welche behufs Abscheidung der in Tyrosinase vermutlich enthaltenen spezifischen Peroxydase angestellt worden waren. Durch Verarbeiten von jungen Kartoffelknollen auf Tyrosinase wurde ein Präparat erhalten, welches allein Tyrosin nur langsam oxydierte, dagegen in Anwesenheit von Hydroperoxyd schon nach wenigen Stunden die charakteristische Melaninbildung bewirkte. Aus diesen Versuchen wurde der Schluß gezogen, daß Tyrosinase, ähnlich der gewöhnlichen Oxydase, aus einer Oxygenase, d. h. einem Körper, welcher Peroxyde unter Sauerstoffaufnahme bildet und durch Hydroperoxyd ersetzbar ist, und einer Peroxydase, welche die entstehenden Peroxyde oder das zugesetzte Hydroperoxyd aktiviert, zusammengesetzt ist.

R. Chodat²⁾ wiederholte meine Versuche, konnte aber dieselben nicht bestätigen. Er fand sogar, daß Hydroperoxyd auf die Tätigkeit der Tyrosinase nicht einen fördernden, sondern einen hemmenden Einfluß ausübt. Dieser Befund erklärt sich aber ganz einfach dadurch, daß Chodat zu konzentrierte Hydroperoxydlösungen für seine Versuche angewandt hatte. In meiner oben erwähnten Mitteilung³⁾ wird ausdrücklich darauf hingewiesen, daß Tyrosinase, bezw. die in derselben tätige Peroxydase gegen Hydroperoxyd sehr empfindlich ist, und daß die Versuche daher nur mit stark verdünnten Hydroperoxydlösungen ausführbar sind.

¹⁾ Diese Berichte **39**, 2126 [1906].

²⁾ Archives des Sciences phys. et nat. **34**, 173 [1907].

³⁾ Diese Berichte **39**, 2128 [1906].

Daß tatsächlich die Wirkung der Tyrosinase durch Zusatz von Hydroperoxyd in hohem Maße beschleunigt wird, ist neuerdings von O. v. Fürth und E. Jerusalem¹⁾ in einer umfangreichen Arbeit über fermentative Melaninbildung mit voller Bestimmtheit bewiesen worden. Diese Forscher stellten die Grenze fest, oberhalb welcher Tyrosinase durch Hydroperoxyd geschädigt wird, und führten ihre sämtlichen Versuche mit Tyrosinase in Gegenwart von Hydroperoxyd aus, dabei ausschließlich die Wirkung der in diesem Ferment tätigen Peroxydase ins Auge fassend.

Auf Grund obiger Tatsachen kann die Existenz einer Peroxydase in Tyrosinase als ziemlich wahrscheinlich angesehen werden, der direkte Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme fehlt aber noch. Ich bemühte mich daher, durch weitere Versuche die Bedingungen festzustellen, unter welchen die Trennung der Tyrosinase in ihre Bestandteile bewirkt werden kann.

Als Versuchsmaterial diente mir eine Pilzart (*Russula delica*), von der mir etwa 2.5 kg zur Verfügung standen. Das Material wurde in drei Portionen getrennt verarbeitet: I. junge, tadellose Pilze, II. ältere, mehr oder wenig geschädigte Pilze, und III. bereits in Fäulnis begriffene Pilze. Die in der Hackmaschine fein zerkleinerten Pilze wurden abgepreßt, der gewonnene schleimige Saft wurde mit Toluol übersättigt und in gut verschließbaren, bis zum Hals gefüllten Flaschen aufbewahrt. Um die Wirkung der Tyrosinase quantitativ zu verfolgen, ging ich von einer bereits bei den früheren Versuchen gemachten Beobachtung aus, nämlich, daß das schwarze Oxydationsprodukt, welches bei der Einwirkung von pflanzlicher Tyrosinase auf Tyrosin entsteht, sich durch verdünnte Kaliumpermanganatlösung in Gegenwart von Schwefelsäure leicht entfärben läßt. Es zeigte sich, daß diese Reaktion einer ebenso genauen, wie einfachen Methode zur Bestimmung der relativen Melaninmengen zugrunde gelegt werden kann. Es genügt, das schwarze Reaktionsgemisch mit 0.002-normaler Permanganatlösung unter Zusatz von Schwefelsäure bis zur Entfärbung zu titrieren, um gut übereinstimmende Resultate zu erhalten. Unter Benutzung obiger Titrationsmethode wurden zunächst die frisch ausgepreßten Pilzsäfte auf ihre Fähigkeit, Tyrosin zu oxydieren, untersucht.

Von den auf das 10-fache mit destilliertem Wasser verdünnten Säften wurden je 10 ccm mit 10 ccm Tyrosinlösung (0.05 % Tyrosin und 0.04 % Natriumcarbonat enthaltend) und 30 ccm Wasser zusammengebracht, nach Verlauf von 24 Stunden wurden die Proben mit je 1 ccm 10-prozentiger Schwefelsäure angesäuert und mit 0.002-normaler Permanganatlösung bis zur

¹⁾ Beitr. zur Chem. Physiologie und Pathologie **10**, 46, 131 [1907].

Entfärbung titriert. Unter Abzug der Permanganatmengen, welche zur Entfärbung der ursprünglich bräunlich gefärbten Fermentlösungen erforderlich waren, wurden folgende Zahlen erhalten:

	Saft I	Saft II	Saft III
Aussehen der Reaktionsgemische nach 24 Stunden	Tiefschwarz, schwarzes Sediment	Schwarzviolett —	Dunkelbraun —
Verbrauchte Permanganatlösung	37.8 ccm	13.6 ccm	8.3 ccm.

Um weiter das Verhalten der Säfte gegen Hydroperoxyd zu prüfen, habe ich den Versuch in der Weise wiederholt, daß je 1 ccm 0.05-prozentige Hydroperoxydlösung zu jedem Reaktionsgemisch gegeben wurde. Obleich die Säfte Katalase enthielten, bewirkte der Zusatz von Hydroperoxyd in den Proben II und III eine beträchtliche Beschleunigung der Melaninbildung. Nach Verlauf von 24 Stunden waren auch diese Reaktionsgemische tintig schwarz. Nachdem das etwa unverbraucht gebliebene Hydroperoxyd durch Zusatz von je 1 ccm Katalaselösung zerstört worden war (diese Menge genügte, um 10 ccm 1-prozentige Hydroperoxydlösung binnen 1 Minute zu zersetzen), wurden die Reaktionsgemische angesäuert und titriert.

Verbrauchte Kaliumpermanganatlösung:

Saft I 37.3 ccm Saft II 26.7 ccm Saft III 23.2 ccm.

Durch den Zusatz von Hydroperoxyd wurde also Saft I in seiner Wirkung nicht beeinflußt, die Wirkung des Saftes II wurde verdoppelt, die des Saftes III beinahe verdreifacht. Demnach wirkt Hydroperoxyd auf die Tätigkeit der Tyrosinase um so mehr fördernd, je schwächer die ursprüngliche Fermentlösung ist. Am einfachsten läßt sich dieser Befund in der Weise erklären, daß die Abschwächung der Tyrosinase auf eine teilweise Zerstörung ihrer durch Hydroperoxyd ersetzbaren Oxygenase zurückzuführen ist.

Saft III geriet nach einigen Tagen in eine widrige Fäulnis und wurde zerstört, Saft II, von dem nur etwa 100 ccm vorhanden waren, wurde beiseite gestellt, und Saft I (470 ccm) wurde weiter verarbeitet. Die schleimige, braune Flüssigkeit reagierte sauer und konnte ihrer Beschaffenheit wegen nicht filtriert werden. Um die Säure abzustumpfen und zugleich die Schleime zu koagulieren, habe ich die Flüssigkeit mit 10 g Magnesiumcarbonat durchgeschüttelt und filtriert. Das klare, hellbraune Filtrat ließ nach einiger Zeit auf den Wänden der Flasche einen geringen krystallinischen Überzug erscheinen. Die Flüssigkeit wurde möglichst völlig entfernt, der Überzug wurde abgeschabt und mit 30 ccm Wasser behandelt. Er erwies sich als sehr wenig löslich in Wasser. Von dem abgossenen Wasser wurden 10 ccm mit

dem gleichen Volumen Tyrosinlösung vermischt. Nach 24 Stunden war das Gemisch vollkommen farblos. Als ich aber dasselbe mit 0.5 ccm 0.05-prozentiger Hydroperoxydlösung versetzte, beobachtete ich eine ziemlich rasche Oxydation des Tyrosins. Nach Verlauf von 10 Stunden war das Gemisch schwarz gefärbt. Der Versuch wurde mit dem Rest des wäßrigen Auszuges wiederholt und ergab dasselbe Resultat. In Gegenwart von Hydroperoxyd färbte sich das Reaktionsgemisch schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit schwarz, während in Abwesenheit von Hydroperoxyd dasselbe sich erst am 3. Tage zu färben begann. Es schien demnach, als ob beim Behandeln des Pilzsaftes mit Magnesiumcarbonat eine schwer lösliche Verbindung entstünde, welche von den Bestandteilen der Tyrosinase beträchtlich mehr Peroxydase als Oxygenase zurückhielte. Dementsprechend dürfte auch der abfiltrierte Magnesiumcarbonatschlamm mehr Peroxydase als Oxygenase enthalten. Diese Voraussetzung erwies sich als richtig.

Der klare Saft wurde nochmals mit 10 g Magnesiumcarbonat ausgeschüttelt und das Gemisch an der Wasserstrahlpumpe filtriert, um den Schlamm möglichst scharf von dem anhaftenden Saft zu befreien. Der lufttrockne Schlamm wurde dann mit 100 ccm Wasser verrieben und der wasserhelle, beinahe farblose Auszug untersucht.

- A. 20 ccm Auszug, 10 ccm Tyrosinlösung, 29 ccm Wasser, 1 ccm Hydroperoxydlösung.
- B. 20 ccm Auszug, 10 ccm Tyrosinlösung, 30 ccm Wasser, kein Hydroperoxydzusatz.

Nach 30 Minuten zeigte Probe A eine deutliche Braunfärbung, welche rasch zunahm. Nach 10 Stunden erschien das Reaktionsgemisch tintig schwarz. Nach Zusatz von 1 ccm Katalaselösung wurde dasselbe angesäuert und mit 0.002-normaler Permanganatlösung titriert. Verbraucht: 18.4 ccm Permanganatlösung. Probe B begann am 3. Tage sich langsam zu färben, am 7. Tage war sie schwarz gefärbt. Die Titration ergab dann 20.1 ccm Permanganatlösung.

Aus Obigem geht hervor, daß durch Ausschütteln des Pilzsaftes mit Magnesiumcarbonat die in der Tyrosinase enthaltene Peroxydase von ihrer Oxygenase getrennt werden kann, indem das Magnesiumcarbonat bei weitem mehr Peroxydase als Oxygenase zurückhält.

Eine teilweise Trennung der Bestandteile der Tyrosinase kann weiter durch Methylalkohol erzielt werden.

100 ccm Pilzsaft wurden in 500 ccm starken Methylalkohol gegossen; der entstandene Niederschlag wurde rasch filtriert, mit Methylalkohol nachgewaschen und im Vakuum über Chlorcalcium vom Fällungsmittel befreit. Der trockne Niederschlag wurde mit 100 ccm Wasser verrieben, wobei nur ein geringer Anteil der Substanz in Lösung ging, und die filtrierte Flüssigkeit in obiger Weise mit Tyrosinlösung in Gegenwart und Abwesenheit von

Hydroperoxyd zusammengebracht. Während nun die mit Hydroperoxyd versetzte Probe schon nach 12 Stunden die charakteristische Schwarzfärbung zeigte, blieb die hydroperoxydfreie Probe beinahe zwei volle Tage unverändert. Permanganatverbrauch zur Entfärbung der ersten Probe nach 12 Stunden: 17.6 ccm.

Außer diesen Methoden zur mehr oder weniger weitgehenden Trennung der Bestandteile der Tyrosinase soll hier noch auf eine unter gewissen Umständen freiwillig eintretende, noch nicht näher erörterte Zerstörung der in Tyrosinase enthaltenen Oxygenase hingewiesen werden. Saft III (vergl. oben) wurde nach 6 Wochen langem Aufbewahren in Gegenwart von Toluol auf die Wirksamkeit der Tyrosinase wiederum geprüft. Dabei ergab sich, daß der Saft seine Fähigkeit, schon für sich Tyrosin zu oxydieren, fast vollkommen verloren hatte. Die mit Tyrosinlösung zusammengebrachte Flüssigkeit begann sich erst nach Verlauf von 24 Stunden langsam zu färben, während die mit Hydroperoxyd versetzte Probe nach 24 Stunden vollkommen schwarz erschien und zur Entfärbung 25.3 ccm Permanganatlösung erforderte. Vor 6 Wochen war der Permanganatverbrauch nach 24 Stunden: in Gegenwart von Hydroperoxyd 27.6 ccm, in Abwesenheit von Hydroperoxyd 13.6 ccm. Die in der Tyrosinase enthaltene Peroxydase blieb also beim Aufbewahren beinahe unverändert, während die entsprechende Oxygenase bis auf einen kleinen Rest verschwand.

Die Ergebnisse der im Obigen mitgeteilten Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

In passender Verdünnung übt Hydroperoxyd auf die Wirkung frischer, normaler Tyrosinase keinerlei Einfluß aus. Bei gewissen Veränderungen der Tyrosinase, welche künstlich erzeugt werden können oder freiwillig eintreten, wird dagegen die Wirkung derselben bei der Oxydation des Tyrosins durch Zusatz von verdünntem Hydroperoxyd außerordentlich beschleunigt. In normaler Tyrosinase scheinen also die aus der Oxygenase entstehenden Peroxyde zur vollen Ausnutzung der entsprechenden Peroxydase auszureichen. Bei den Veränderungen der Peroxydase wird aber die Oxygenase, welche a priori als ein sehr unbeständiger Körper aufzufassen ist, zunächst geschädigt und kann daher durch entsprechende Mengen Hydroperoxyds bei der Oxydation des Tyrosins ersetzt werden. Diese Erklärung steht mit den in letzter Zeit bekannt gewordenen, auf das Gebiet der Oxydationsfermente bezüglichen Tatsachen in vollem Einklang.

Genf. Privatlaboratorium.