

Unternehmung der Gesellschaft das finanzielle Ergebnis klar zum Ausdruck kommt. Der Vorstand stimmt diesem Wunsche zu.

48. Der Vorstand überträgt die Funktion eines stellvertretenden Redakteurs der »Berichte« dem bisherigen Hilfsarbeiter der Redaktion, Hrn. Prof. Dr. F. Sachs.

Auszug aus 52. Auf Antrag des Hrn. W. Nernst beschließt der Vorstand, daß die besonderen Sitzungen, in welchen die zusammenfassenden Vorträge gehalten werden, zukünftig schon um 7 Uhr abends beginnen sollen.

Auszug aus 53. Der Generalsekretär berichtet, daß der für die Umsatzsteuer (vergl. Ber. 43, 620 [1910]) im Jahre 1909 gezahlte Betrag von 5670 Mk. seitens der Stadt Berlin am 18. März 1910 zurückerstattet ist.

Der Vorsitzende:
H. Wichelhaus.

Der Schriftführer:
F. Mylius.

212. A. W. van der Haar: Untersuchungen über Pflanzen-Peroxydasen.

I. Eine neue Methode der Peroxydasen-Gewinnung.

(Eingeg. am 15. April 1910; mitget. in der Sitzung von Hrn. G. Lockemann.)

Obwohl meine Untersuchungen über die An- oder Abwesenheit von Mangan in Peroxydasen noch nicht abgeschlossen sind, erscheint es mir nötig, einen Teil derselben hier wiederzugeben, nachdem A. Bach und Tscherniak im Jahre 1908¹⁾ einen Artikel mit dem Titel »Zur Reinigung der Peroxydase« und vor kurzem A. Bach²⁾ einen Aufsatz über »Mangan- und eisenfreie Oxydasen« veröffentlicht haben. In der letzten Arbeit schließt Bach in derselben Weise auf völlige Mangan-Freiheit der Oxydasen, wie er es in der ersten bei den Peroxydasen getan hatte.

Bei der genauen Durchsicht beider Artikel fällt besonders ein sehr wichtiger Punkt auf, daß Bach nirgends Angaben über die physiologische und allgemein chemische Reinheit seiner Oxydasen macht und nirgends die Reaktionen und Methoden angibt, mit welchen er die Abwesenheit von Mangan in der Asche konstatiert hatte.

¹⁾ Diese Berichte 41, 2345 [1908].

²⁾ Diese Berichte 43, 364 [1910].

Die unten von mir mitgeteilte Reinigungsmethode geht weiter als die Bachsche, da es mir gelang, alle koagulierbaren Eiweißstoffe zu entfernen (ein sehr wichtiger Punkt); doch konnte ich die Hedera-Peroxydase nicht bis auf weniger als $\frac{1}{1000}$ Milligramm vom Mangan befreien. Es kommt darauf an, was man »völlig manganfrei« nennt. Wie Bach dies auffaßt, wird nirgends angegeben. Es geht mit dem »völlig manganfrei« wie mit dem »völlig arsenikfrei«. Ob ein Stoff für arsenikfrei gehalten wird oder nicht, hängt ganz von der Methode, nach welcher man arbeitet, von der Reinheit und der Substanzmenge ab. Oft findet man einen Stoff arsenikfrei, in dem nach schärferen Methoden doch Arsenik nachzuweisen ist. Bei Stoffen wie Fermenten, wo es noch garnicht möglich ist, den Grad der »chemischen Reinheit« festzustellen, ist es eine Hauptbedingung, anzugeben: in so und so viel Substanz von der angegebenen Reinheit fand ich nach folgender Arbeitsmethode kein oder so und so viel Mangan. So lange Bach seine Peroxydasen und Oxydasen sowie seine Arbeitsmethode nicht näher beschreibt, ist dem »völlig manganfrei« nicht der große Wert beizulegen, wie es Bach tut.

Ich benutzte stets den Mennige-Salpetersäure-Versuch, nach welchem noch $\frac{1}{1000}$ Milligramm Manganoxyd unter allen notwendigen Vorsichtsmaßregeln (Chlor-Freiheit usw.) in 1 ccm Flüssigkeit nachgewiesen werden kann.

Die Reinigungsmethode, welche Bach (l. c.) gebrauchte, ist die fraktionierte Fällung mittels Alkohols, nachherige Dialyse und Fällung mittels basischen Bleiacetats. Ich habe u. a. bei Kartoffel-Peroxydase beobachtet, daß nach dieser Reinigung ein großer Teil der koagulierbaren Eiweißstoffe noch nicht entfernt war. Da Bachs Reinigung nicht weiter geht als bis zur Anwendung von basischem Bleiacetat, muß in manchen Fällen seine Peroxydase mit fremden Eiweißstoffen gemischt sein, weil diese durch Alkohol-Fraktionierung und Dialyse nicht von der Peroxydase geschieden werden können.

In derselben Weise wie für Peroxydasen erklärt Bach in der zweiten Arbeit (1910) (l. c.) seine Pilz-Oxydase für »völlig manganfrei«. Er findet in 0.907 g Lactarius-Oxydase 8.01 % Asche, in welcher kein Mangan nachgewiesen werden konnte. Bach gibt nichts über die physiologische Reinheit der Peroxydasen an, da Katalasen stets mit Oxydasen und in Pilzen mit Tyrosinase gemischt vorkommen und eine Trennung noch nicht möglich ist. Dabei spricht Bach garnicht von der Ab- oder Anwesenheit der sehr oft als Begleitstoffe auftretenden anderen Fermente, wie Emulsin, Invertase, Amylase usw., ohne von den möglicherweise anwesenden Eiweißstoffen zu reden. Wir können also getrost die Frage stellen, wieviel von den 0.987 g Oxydase ist nun wirklich Oxydase?

Aus meinen Untersuchungen wird sich ergeben, daß es sehr schwierig ist, eine Peroxydase »völlig manganfrei« zu erhalten, und es ist mir nicht gelungen, eine solche unter die Hände zu bekommen. Es ist öfters vorgekommen, daß ich Peroxydasen aus verschiedenen Pflanzen für »völlig manganfrei« erklärte. Bei schärferer Reinigung usw. konnte ich dann noch eine Spur Mangan, ev. nur $\frac{1}{1000}$ mg, finden. Es ist leicht möglich, und ich bin sehr geneigt, dies anzunehmen, daß Bach mit seiner Behauptung Recht hat, daß Mangan nicht zum Peroxydase-Molekül gehört, aber einigermaßen sichergestellt hat er es meines Erachtens keinesfalls.

Als Versuchsobjekt wählte ich zunächst die Knollen von *Solanum tuberosum*, von welchen ich zu jeder Zeit große Quantitäten bekommen konnte. Für die Verarbeitung benutzte ich folgende Methode, die nur die Alkohol-Fällung mit der Bachschen gemeinsam hat.

Der Saft aus 25 kg Kartoffeln wurde durch Auspressen gewonnen. Durch fraktionierte Alkohol-Fällung konnte ich schon eine gewisse Reinigung herbeiführen; es ist aber notwendig, den Alkohol-Gehalt langsam zu steigern. Wurde nämlich dem Saft zunächst ein gleiches Volumen Alkohol von 96 % beigemischt, so entstand ein dunkel gefärbter Niederschlag. Fügte ich dann zu der Flüssigkeit wieder soviel starken Alkohol, daß der Gehalt $\pm 60\%$ betrug, so wurde der Niederschlag vermehrt. Die starke, dunkelgefärbte Fällung wurde gesammelt. Nach dem Auswaschen gab sie keine Peroxydase-Reaktion, das Filtrat dagegen stark. Ich empfand dieselben Vorteile von dieser Fraktionierung wie Bach (l. c.). Wurde nun die nur gelb gefärbte Flüssigkeit mit soviel Alkohol versetzt, daß ihr Gehalt 80 % betrug, so schlug sich die unreine Peroxydase völlig als ein grau gefärbter Stoff nieder. Die erhaltene Peroxydase wurde in chloroformhaltigem Wasser gelöst; in dieser Lösung entstand nach einem Tage ein Niederschlag, der keine Peroxydase-Reaktion gab und entfernt wurde. Nun wurde die Lösung während einer Woche gegen 25 l alle 24 Stunden erneuertes Wasser dialysiert.

Die Peroxydase war durch die Reinigung so widerstandsfähig geworden, daß sie von sehr verdünnter Essigsäure nicht verändert wurde. Nachdem einige Tropfen verdünnter Essigsäure bis zu schwach saurer Reaktion zugegeben waren, entstand in einem Tage ein reichlicher Niederschlag, der, abfiltriert und ausgewaschen, keine Peroxydase enthielt. Das Filtrat, das nur noch gelblich gefärbt war, gab eine starke Reaktion. Nun wurde weiter dialysiert und das umgebende Wasser, alle 24 Stunden, und 12-mal erneuert; die letzten 6 Male wurde destilliertes Wasser verwendet. Nach Beendigung der Dialyse war die Peroxydase-Reaktion stark.

In dieser Lösung entstand mit basischem Bleiacetat keine Trübung; die Bach-Tscherniaksche Reinigungsmethode konnte mich also nicht weiter zum Ziele führen.

Dennoch war in der Lösung viel koagulierbares Eiweiß zugegen.

Die Peroxydase war so resistent geworden, daß ich die Eiweißstoffe vorsichtig bei 90° koagulieren konnte, ohne daß die Peroxydase ihre Wirkung verlor.

Ich wiederholte die kurze Erwärmung so oft, als sich noch Eiweißstoffe niederschlugen. Dann waren auch alle koagulierbaren Eiweißstoffe entfernt, denn beim Kochen der Lösung entstand nicht die geringste Trübung. Kartoffel-Peroxydase wird also bei 80° nicht unwirksam, wie allgemein für Enzyme angegeben wird; sie wird nur unwirksam durch Mitreißen bei Fällungen.

Auch Mineralsäuren gegenüber ist die reine Peroxydase nicht mehr so empfindlich wie die unreine.

2 ccm der Peroxydase-Lösung blieben noch nach Zugabe von 1 Tropfen ¼-prozentiger Salzsäure aktiv, 3 ccm der Lösung, gemischt mit 1 Tropfen 6-prozentiger Salzsäure wirkten noch gerade bläugend auf Guajac-Harz ein.

Die erhaltene Peroxydase gab, wenn auch schwach, noch Eiweiß-Reaktionen, u. a. Millons und die Xanthoprotein-Reaktion.

Jedenfalls gehört die Kartoffel-Peroxydase nicht zu den koagulierbaren Eiweißstoffen.

Die übrig gebliebenen 1.2 g Peroxydase gaben bei der Verbrennung 27 mg Asche = 2.2 %. Diese Asche wurde unter allen Vorsichtsmaßregeln auf Mangan mit der Mennige-Salpetersäure-Reaktion untersucht: $\frac{1}{250}$ mg = 0.0003 % der Peroxydase oder 0.015 % der Asche.

Später will ich versuchen, ob dieser minimale Rest Mangan nicht verkleinert werden oder sogar ganz entfernt werden kann, ohne daß die Peroxydase ihre Wirkung einbüßt.

Da ich bis jetzt also noch nicht sicher nachweisen konnte, ob die Spur Mangan für die oxydative Wirkung entbehrlich ist oder nicht, hielt ich es für besser, Schritt für Schritt zu Werke zu gehen und zunächst zu versuchen, durch quantitative Versuche festzustellen, daß die oxydierende Kraft gar nicht parallel mit der Manganmenge verläuft, was mir an der Hand meiner Reinigungsmethode auch gelang.

Aufs neue wurde aus 25 kg Kartoffeln die Peroxydase gewonnen, und bei jedem Reinigungsfortschritt wurde die Wirkung auf Pyrogallol quantitativ studiert; zu gleicher Zeit wurde eine Aschenbestimmung gemacht und in der Asche wie oben das Mangan quantitativ bestimmt.

Die Bestimmung der oxydierenden Wirkung geschah wie folgt:

25 ccm der Peroxydase-Lösung wurden während 24 Stdn. mit einer Lösung von 1 g Pyrogallol in 5 ccm Wasser und 10 ccm einer neutralen einprozentigen Wasserstoffsuperoxyd-Lösung gemischt, und gleich-

zeitig mit einem blinden Versuch (dieser gab stets nur Dunkelfärbung) beiseite gestellt. Die abgeschiedene Menge Purpurogallin wurde auf tariertem Filter gesammelt, stets mit derselben Quantität Wasser gewaschen und bei 100° getrocknet. Zu gleicher Zeit wurden 10 ccm der Peroxydase-Lösung zur Trockne verdampft; ich konnte so feststellen, wieviel Peroxydase in den verbrauchten 25 ccm Lösung enthalten war. Der Trockenrückstand wurde eingeäschert und in der Asche der Mangan-Gehalt bestimmt.

Für jedes Stadium der Reinigung konnte ich also den Zusammenhang zwischen oxydierender Kraft und Mangangehalt aufzeichnen, wie aus Figur I ersichtlich ist.

Von A aus wurde auf der Abszisse die Menge MnO (in 0.001 mg) aufgetragen, welche in 1 g aschefreier Peroxydase bei Anfang der Dialyse enthalten sein würde ($Aa''' = 0.001$ mg MnO). Auf diese Weise wurde Punkt a' aufgefunden. Auf der Ordinate in a' wurde dann die Quantität Purpurogallin aufgezeichnet, welche 1 g aschefreie Peroxydase beim Anfang der Dialyse geben würde ($a'a'' = 100$ mg Purpurogallin). So wurde Punkt A' gefunden.

Während der Dialyse wurden jeden Tag die oben stehenden Bestimmungen gemacht und auf diese Weise $b'c'$ und die Punkte $B'C'$ ermittelt, bis bei Punkt D' die Quantität MnO in den untersuchten 10 ccm Flüssigkeit unter $\frac{1}{1000}$ mg, oder bis nahezu auf Null (Punkt A) gesunken war. Wenn also ein direkter Zusammenhang zwischen der oxydierenden Kraft und dem Mangangehalt der Peroxydase im Sinne der Bertrandschen Theorie bestände, würde die oxydierende Kraft in D' (Mangan-Gehalt < 0.001 mg) nahezu Null sein, und Punkt D' würde mit A zusammenfallen. Die oxydierende Kraft war aber in D am größten.

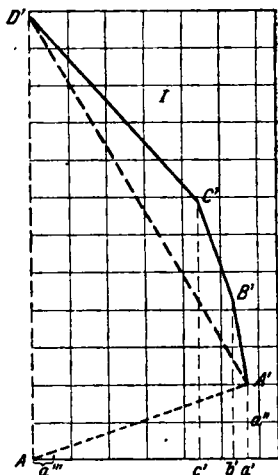


Fig. I.

Die Fig. I und die weiter zu beschreibenden Diagramme deuten auch gar nichts anderes an, haben also keinen absoluten, sondern nur relativen Wert.

Fig. II illustriert nun den ganzen Reinigungsprozeß; A', B', C', D' entspricht denselben Punkten wie in Fig. I ($a', b',$ usw. = 2 Dialysiertage.)

Bei D' geht das Diagramm II weiter, wo Diagramm I aufhört. Bei Punkt D' findet eine Eiweiß-Präzipitation statt. Bei L' wird Essigsäure zugegeben. Bei Punkt M' findet die Koagulation aller koagulierbaren Eiweißstoffe statt, und nach Erwärmung wurde Punkt N' erhalten. Punkt A' ist also der Anfangspunkt bei unreiner Peroxydase, Punkt N' entspricht dem gereinigten Ferment. Aus dem Verlauf der Linien $A'N'$ und $A'n'$ ersehen wir, daß das Reinigungsverfahren praktisch gute Resultate gibt, und daß kein direkter Zusammenhang zwischen oxydierender Wirkung und Mangangehalt besteht.

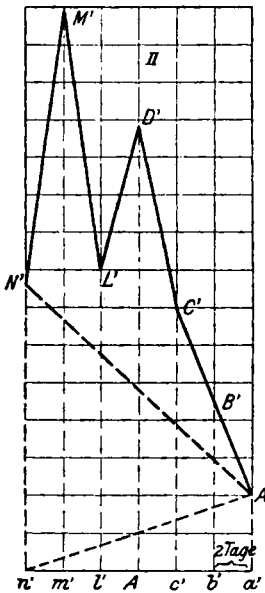


Fig. II.

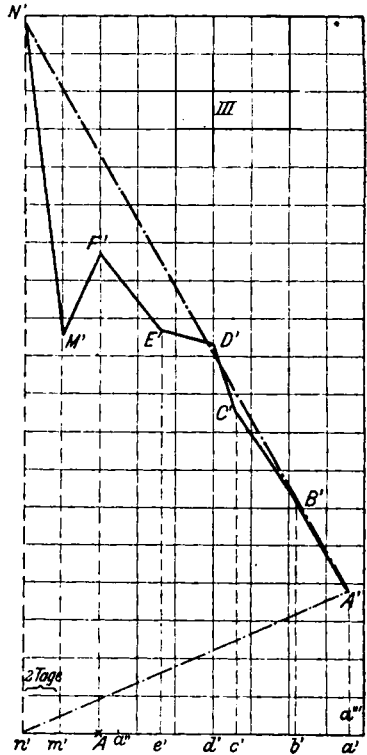


Fig. III.

Analoge Resultate erhielt ich mit der Peroxydase aus den Blättern von *Hedera helix*. Hier gelang es mir, mit basischem Bleiacetat nach Bach und Tscherniak eine Reinigung herbeizuführen. Die Methode hat hier gute Dienste geleistet.

Auch die *Hedera*-Peroxydase gehört nicht zu den koagulierbaren Eiweißstoffen.

Aus Fig. III ist alles ersichtlich. Man vergleiche wieder den Verlauf von $A'N'$ und $A'n'$. ($Aa'' = 1/1000$ mg MnO und $An' = 4$ Dialysiertage.) Bei Punkt F' fängt die Dialyse mit Essigsäure an, bei Punkt M' die Reinigung mittels basischen Bleiacetats.
Utrecht (Holland).

213. A. W. van der Haar: Untersuchungen über Pflanzen-Peroxydasen.

II. Die Hedera-Peroxydase, ein Glucoproteid.

(Eingeg. am 15. April 1910; mitget. in der Sitzung von Hrn. G. Lockemann.)

Bei einer frischen Aufarbeitung nach der in der voranstehenden Mitteilung beschriebenen Methode wurde die Peroxydase aus 21 kg frischen Blättern von Hedera helix erhalten.

Im Anfang der Dialyse der Roh-Peroxydase ließen 25 ccm der erhaltenen 800 ccm Flüssigkeit 827.5 mg Peroxydase zurück, mit einem Aschengehalt von 37.9 %. 827.5 mg Peroxydase = 515 mg aschefreie Substanz gaben nach der in der vorigen Mitteilung angegebenen Methode 202 mg Purpurogallin, also 100 mg gaben 39 mg. Nach Entfernung des koagulierbaren Eiweißes wurde während 7 Tagen dialysiert. Der Aschengehalt sank dabei auf 6.66 %.

Die Peroxydase-Lösung wurde mittels basischen Bleiacetats gereinigt und das fast farblose Filtrat lange in fließendem Wasser dialysiert. Die Lösung hatte dann folgende Eigenschaften:

1. Die daraus abgeschiedene Peroxydase hatte einen Aschengehalt von fast 2 %.
2. 100 mg derselben gaben 107 mg Purpurogallin.
3. Beim Kochen der Lösung entstand keine Trübung.
4. Beim Sättigen der Lösung mit Ammoniumsulfat entstand auch in der Wärme keine Trübung.
5. Von den übrigen Enzymen waren Amylase, proteolytische Fermente, Reduktase und Emulsin nicht anwesend.
6. In der Lösung war viel Peroxydase anwesend, neben wenig Katalase und sehr wenig Invertase (zweifelhaft).
7. Mit Sublimat entstand keine Trübung.
8. Mit Essigsäure und Ferrocyankalium eine schwache Trübung.
9. Millons und die Xanthoprotein-Reaktion fielen positiv aus, ebenso die Biuret-Reaktion (blauviolett).
10. Die reine Peroxydase-Lösung ist Säuren gegenüber weniger empfindlich als die unreine: 5 ccm der Lösung mit 1 Tropfen 3-pro-