

206. Zur Kenntnis der Lipoxydase

von H. Süllmann.

(29. X. 43.)

Die Oxydation von ungesättigten Fettsäuren kann durch eine Reihe von biologisch vorkommenden Stoffen mit bekannter Struktur wirksam beschleunigt werden. Es ist deshalb für die Kenntnis der Lipoxydase¹⁾ von Bedeutung, sie von anderen, nicht-enzymatischen „Biokatalysatoren“ abzugrenzen. Hierzu haben wir²⁾ das Verhalten der Lipoxydase bei der Dialyse, gegenüber Fällungsmitteln, proteolytischen Enzymen, Säure und Oxydationsmitteln geprüft. Weitere Versuche befassen sich mit der Verbreitung der bisher nur aus Leguminosensamen erhaltenen (pflanzlichen) Lipoxydase.

Versuche und Ergebnisse.

Methodisches. Die Enzymlösungen aus Sojabohnen wurden durch 3–6-stündige Extraktion von entfettetem Pulver mit Wasser (in der Regel im Verhältnis von 5 g Pulver und 100 cm³ Wasser), 12–16-stündige Dialyse der Lösung im Cellophanschlauch gegen fließendes Leitungswasser und Abtrennung von den ausgefallenen Globulinen erhalten („dialysierte Enzymlösung“). Von den übrigen Pflanzen wurden Pressäfte verwendet.

Die Messung der Sauerstoffaufnahme geschah manometrisch nach *O. Warburg* bei 37°. Im Einsatz der Gefässe befand sich Natronlauge. Als Substrate dienten Leinölsäure oder Lecithin (ex ovo, *Kahlbaum*) in Form wässriger Emulsionen. Das Volumen betrug meistens 4 cm³. Im Gasraum befand sich reiner Sauerstoff.

Zu den Messungen ist zu bemerken, dass keine einfache Proportionalität zwischen Enzymmenge und Sauerstoffverbrauch besteht. Abgesehen von einem Bereich sehr kleiner Enzymmengen steigt unter den Versuchsbedingungen der Sauerstoffverbrauch langsamer an, als den Enzymmengen entspricht. Das (sowie auch der zeitliche Reaktionsverlauf) erschwert es, für die Enzymaktivität einen allgemeinen (von der jeweils vorliegenden Enzymmenge unabhängigen) quantitativen Ausdruck zu geben. Soweit in den folgenden Versuchen ein Vergleich der Aktivitäten verschiedener Enzymlösungen durchgeführt wird, kann sich dieser zur Entscheidung der aufgeworfenen Fragen auf die Feststellung des Vorliegens oder der Abwesenheit von grösseren, aus dem Sauerstoffverbrauch eindeutig erkennbaren Unterschieden beschränken.

Die Lipoxydase oxydiert mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer ausserordentlich grossen Geschwindigkeit, so dass etwa 10 Minuten nach Zusammenfügen von Enzym (z. B. 0,5–1 cm³ dialysiertes Sojaenzym) und Substrat (1 cm³ 0,05-m. Leinölsäure) bereits mehrere hundert Kubikmillimeter Sauerstoff aufgenommen sein können. Unter diesen Umständen muss die Diffusion des Sauerstoffs als limitierender Faktor der Reaktionsgeschwindigkeit in Betracht gezogen werden. Die zur Verfügung stehende Apparatur erlaubt keine Erhöhung der Schüttelintensität über 90 volle Schwingungen pro Minute. Vergleichende Messungen mit Luft bzw. reinem Sauerstoff im Gasraum zeigten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Sauerstoffspannung beträchtlich zunimmt.

¹⁾ Vgl. die vorhergehenden Mitteilungen: *H. Süllmann*, *Helv.* **24**, 465, 646, 1360 (1941); **25**, 521 (1942); **26**, 1114 (1943). — *Verh. Schweiz. Physiol.*, Juli 1941; Juni 1942.

²⁾ Kurze Mitteilung: *Verh. Schweiz. Physiol.*, Juni 1942.

1. Dialyse.

Frühere Dialyseversuche¹⁾ haben bereits erkennen lassen, dass es sich bei der Lipoxydase aus Sojabohnen kaum um einen dialysablen Körper handeln kann, wenn auch dialysierte Lösungen in einigen Versuchen eine geringe Abschwächung ihrer Wirkung aufwiesen. Diese Versuche wurden fortgesetzt und dabei untersucht, wie weit die Dialyse zu einer Abtrennung von Ballaststoffen herangezogen werden kann.

Im Verlaufe der Dialyse entsteht ein Niederschlag, bei dem es sich im wesentlichen um Globuline handeln dürfte. Es wurden auf ihre Lipoxydase-Aktivität geprüft: A. die nicht dialysierte Lösung, B. die 16 Stunden gegen Leitungswasser dialysierte Lösung mit dem suspendierten Niederschlag, C. die dialysierte Lösung nach Abtrennung des Niederschlags und D. der in Wasser suspendierte Niederschlag. Das Volumen der Lösung A wurde um 10 % mit Wasser vermehrt, entsprechend der Volumzunahme bei der Dialyse. Der Niederschlag (D) wurde zweimal mit Wasser gewaschen und in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge Wasser suspendiert. Von allen Lösungen wurden die Mengen an Trockensubstanz und an dem mit Trichloressigsäure fällbaren Eiweiss (*Kjeldahl-N* × 6,5) bestimmt.

Tabelle I.
Dialyse.

mm³ O₂ mit den angegebenen Enzymmengen + 1 cm³ 0,05-m. Leinölsäure + 1 cm³ 0,2-m. Phosphat (p_H = 6,8); Volumen 4 cm³.

Minuten	A		B	
	0,125 cm ³	0,50 cm ³	0,125 cm ³	0,50 cm ³
30	270	431	290	472
120	386	617	400	655
Minuten	C		D	
	0,125 cm ³	0,50 cm ³	0,125 cm ³	0,50 cm ³
30	227	403	7	20
120	314	554	26	61

Tabelle Ia.

Lösung	Trockensubstanz mg/1 cm ³	Eiweiss mg/1 cm ³
A.	18,2	5,5
B.	12,7	5,7
C.	7,3	2,2
D.	5,2	3,4

¹⁾ Helv. 24, 646, 1360 (1941).

Tabelle I gibt den mit den Lösungen erhaltenen Sauerstoffverbrauch wieder und Tabelle Ia enthält die Werte für Trockensubstanz und Eiweiss.

Die dialysierte Lösung (B) zeigt die volle Aktivität; nach Abtrennung des Niederschlags erfolgt nur eine geringe Abnahme des Sauerstoffverbrauchs (Lösung C) und der Niederschlag für sich (D) ist dementsprechend nur sehr wenig aktiv. Die dialysierte, vom Niederschlag befreite Lösung (C) enthält nur noch 40% der in der nicht dialysierten Ausgangslösung (A) vorhandenen Mengen an Trockensubstanz und Eiweiss. Durch Dialyse und Entfernung des Niederschlags wird also schon eine gewisse Befreiung der Lipoxydase von unwirksamen Begleitstoffen erzielt.

Die in diesen Versuchen durchgeführte 16-stündige Dialyse gegen Leitungswasser ist natürlich keine erschöpfende. In einem anderen Versuch wurde die Dialyse auf 7 Tage ausgedehnt (4 Tage gegen Leitungswasser und 3 Tage gegen destilliertes Wasser). Auch diese langdauernde Dialyse verminderte die Aktivität praktisch nicht (verglichen mit der gleich lange aufbewahrten nicht dialysierten Lösung). Die dialysierte, vom Niederschlag befreite Lösung enthielt aber nur noch 16% der in der nicht dialysierten Lösung vorhandenen Menge Trockensubstanz.

Die 12—16 Stunden dialysierten und zentrifugierten Lösungen sind völlig klar und gelb gefärbt¹⁾. Die Färbung blasst auf Zusatz von Säure ab und wird tiefer auf Zusatz von Lauge. Nach länger dauernder Dialyse (sowie nach Fällungen, s. den nächsten Abschnitt) werden schwächer gefärbte Lösungen erhalten.

2. Fällung durch Ammoniumsulfat und Aceton.

Die Lipoxydase wird sowohl von Ammoniumsulfat als auch von Aceton gefällt.

Die Fällungen wurden mit den dialysierten, vom Niederschlag befreiten Sojaextrakten bei + 5° vorgenommen. Ammoniumsulfat wurde bis zur Sättigung eingetragen; von Aceton wurde das doppelte Volumen des Extraktes zugesetzt. Nach 1-stündigem Stehen bei 5° wurde zentrifugiert, die Fällung mit etwas weniger Wasser, als dem ursprünglichen Extraktvolumen entsprach, aufgenommen und die Lösungen über Nacht dialysiert. Die dialysierten Lösungen wurden auf das Ausgangsvolumen gebracht, und von Ungelöstem wurde abzentrifugiert. Die überstehenden, schwach gelblich gefärbten Lösungen — sowie zum Vergleich der ursprüngliche dialysierte Extrakt — wurden auf ihre Aktivität geprüft (Tabelle II, S. 2256).

Die in diesen Versuchen vorgenommenen Operationen sind mit einem gewissen Enzymverlust verbunden. Unter Berücksichtigung der Trockensubstanzmengen dürfte durch die Fällungen und die an-

¹⁾ Aus Sojabohnen wurden Isoflavone isoliert, vgl. z. B. K. Okano und J. Beppu, C. 1939, II, 4010.

schliessende Dialyse aber eine relative Wirkungssteigerung erzielt worden sein.

Tabelle II.

Fällungen mit Ammoniumsulfat und Aceton.

A.: Dialysierter Sojaextrakt: 1 cm³ = 7,3 mg Trockensubstanz

B.: Ammoniumsulfatfällung: 1 cm³ = 3,2 mg „

C.: Acetonfällung: 1 cm³ = 2,0 mg „

mm³ O₂ mit 0,5 cm³ der Lösungen + 1 cm³ 0,05-m. Leinölsäure + 1 cm³ 0,2-m. Phosphat (p_H = 6,8); Volumen 4 cm³.

Minuten	mm ³ O ₂		
	A.	B.	C.
30	457	335	417
120	610	477	548

Behandlung des aus 66-proz. acetonischer Lösung ausgefällten Niederschlags mit konzentriertem Aceton schwächt die Lipoxydase-wirkung deutlich ab. Auf diese Weise kann aber trotzdem noch ein sehr wirksames (in Wasser nicht völlig lösliches) Acetontrockenpulver erhalten werden, das nur einen Bruchteil der in der Ausgangslösung vorhandenen Menge an Trockensubstanz enthält. Die Lösung des Trockenpulvers gibt Peroxydasereaktion.

3. Inaktivierung durch proteolytische Enzyme.

Es wurde die Aktivität von Sojaextrakten nach Einwirkung von Pepsin (Ph. H. V), Trypsin (*Kahlbaum*) und Papain (*Witte*) untersucht. Für Kontrollversuche wurden Lösungen der Proteinasen durch 15—20 Minuten langes Erhitzen im kochenden Wasserbad inaktiviert.

Tabelle III enthält eine Versuchsreihe mit Pepsin.

Tabelle III.

Einwirkung von Pepsin.

Ansätze: 4 cm³ dial. Enzymlösung, 0,3 cm³ 1-n. Essigsäure, die angegebenen Mengen Pepsin, 1 Tropfen Toluol. Nach Inkubation (4 Stunden 38°) mit 0,28 cm³ 1-n. NaOH neutralisiert. (Im Kontrollversuch der letzten Spalte statt Essigsäure Zusatz von 2 cm³ 0,2-m. Phosphat, p_H = 7). — Volumen: 8 cm³. — mm³ O₂ mit je 2 cm³ der Versuchslösungen + 0,5 cm³ Lecithin (5,4-proz.) + 1 cm³ 0,2-m. Phosphat (p_H = 6,8) + 0,5 cm³ Wasser.

Minuten	Ohne Pepsin	mit Pepsin			Kontrollen	
		10 mg	20 mg	50 mg	+ inaktiv. Pepsin	+ Pepsin bei p _H = 7
30	86	17	8	13	71	86
60	144	17	8	13	136	125
120	200	21	10	17	205	172

Pepsin vernichtet die Lipoxydase-wirkung bis auf einen gering-fügigen Rest. Die beiden Kontrollversuche mit inaktiviertem Pepsin

(50 mg) und mit aktivem Pepsin (50 mg) — letzteres in diesem Versuch bei $p_H = 7$ während 4 Stunden zur Einwirkung gebracht — zeigen, dass Pepsin die Lipoxydase selbst angreift. 100 mg Pepsin, den bei $p_H = 6,8$ gepufferten Ansätzen unmittelbar vor Beginn der Messung zugesetzt, waren ebenfalls ohne wesentlichen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch.

Zu dem gleichen Ergebnis führten Versuche mit Trypsin (Tabelle IV), nur dass die nach Einwirkung dieser Proteinase verbleibende Aktivität grösser war als nach Einwirkung von Pepsin.

Tabelle IV. Einwirkung von Trypsin.

Ansätze: 4 cm³ dialysierte Enzymlösung, 2 cm³ 0,2-m. Na₂HPO₄, die angegebenen Mengen Trypsin, Toluol. Nach Inkubation (16 Stunden 38°) Zusatz von 2 cm³ 0,2-m. KH₂PO₄. — Volumen: 9 cm³. — Sauerstoffverbrauch (mm³ O₂) wie in der vorhergehenden Tabelle.

Minuten	Ohne Trypsin	+ Trypsin		+ inaktiv. Trypsin (100 mg)
		50 mg	100 mg	
60	138	66	48	111
120	201	95	65	167

Tabelle V enthält eine Versuchsreihe mit Papain.

Tabelle V. Einwirkung von Papain.

Ansätze: 4 cm³ dialysierte Enzymlösung, 1 cm³ 1-m. Essigsäure-Acetat-Puffer ($p_H = 5,3$), die angegebenen Mengen Papain, Toluol. Nach Inkubation (14 Stunden 38°) Zusatz von 0,18 cm³ 1-n. NaOH. — Volumen: 6,2 cm³. — Sauerstoffverbrauch (mm³ O₂) wie in Tabelle III.

Minuten	Ohne Papain	+ Papain		+ inaktiv. Papain		+ Papain (ohne Inkub.)	
		12,5 mg	50 mg	12,5 mg	50 mg	12,5 mg	50 mg
30	73	24	26	47	59	35	39
60	131	42	42	86	109	55	57
90	171	55	51	126	146	68	68

In den beiden Versuchen mit Papain (3. und 4. Spalte der Tabelle) ist die Aktivität der Lösung gegenüber dem Vergleichsversuch ohne Papain bedeutend herabgesetzt. Auch gegenüber den Versuchen mit inaktiviertem Papain ist diese Aktivitätsverminderung deutlich.

In den Versuchen mit Papain haben sich jedoch einige Unsicherheiten ergeben, die eine Folgerung auf eine proteolytische Inaktivierung der Lipoxydase durch Papain zunächst nicht unbedingt zwingend erscheinen lassen: 1. In der Versuchsreihe der Tabelle V bewirkt inaktiviertes Papain bereits eine gewisse Hemmung des Sauerstoffverbrauchs; in anderen, hier nicht angeführten Versuchen, war der Sauerstoffverbrauch der mit inaktiviertem Papain (100 mg) inkubierten Enzymlösung dagegen wesentlich (etwa auf das Doppelte) erhöht. Das lässt den Verdacht aufkommen, dass sich in dem Papainpräparat (vielleicht als Aktivatoren des Papains zugesetzte) Stoffe finden, die den Oxydationsvorgang — je nach den besonderen Bedingungen hemmend oder fördernd — beeinflussen. 2. Aktives Papain, den Ansätzen bei annähernd neutraler Reaktion unmittelbar (etwa

30 Minuten) vor Beginn der Messung zugesetzt, hemmt die Sauerstoffaufnahme etwa ebenso stark, wie Papain nach 14-stündiger Inkubation bei $p_H = 5,3$. Es ist nicht einwandfrei zu entscheiden, ob die kurze, bis zum Messbeginn verstreichende Zeit bereits genügt, damit Papain die Lipoxydase proteolytisch inaktiviert, oder ob für die „Inaktivierung“ etwa vorhandene Inhibitoren der Fettsäureoxydation von wesentlicher Bedeutung sind. Diese letzten Versuche können daher nicht als eigentliche Kontrollversuche dienen. Betrachtet man die Versuche mit inaktiviertem Papain als die massgebenden Kontrollversuche, so ist auf eine proteolytische Inaktivierung der Lipoxydase auch durch Papain zu schliessen.

Zusammenfassend ist aus den Versuchen über die Einwirkung von Proteinase auf die Lipoxydase zu folgern, dass letztere einem proteolytischen Abbau unterliegen kann und dementsprechend von eiweissartiger Natur ist.

5. Inaktivierung durch Säure.

Folgende Beobachtungen, die im Zusammenhang mit Reinigungsversuchen gemacht wurden, zeigen, dass die Lipoxydase durch Einwirkung von verdünnter Salzsäure inaktiviert werden kann.

1. Dialyse von 25 cm³ vorher gegen Wasser dialysiertem Sojaenzym während 24 Stunden bei 5° gegen 0,004-n. Salzsäure (2 mal je 800 cm³) führt zu einer nahezu völligen Inaktivierung.

2. Auch ohne Dialyse kann dasselbe erreicht werden. Hierzu muss die Enzymlösung unter sonst gleichen Bedingungen mit mehr Salzsäure versetzt werden, als einer Endkonzentration von 0,004-n. entspricht.

3. Extraktion von 5 g Sojapulver mit 100 cm³ 0,1-n. Salzsäure während einer Stunde bei 5° liefert fast völlig inaktive Lösungen. Diese Lösungen zeigen auch keine Peroxydasenreaktion.

Die Lösungen wurden mit Natronlauge bis p_H etwa 6,5 neutralisiert und im manometrischen Versuch mit Leinölsäure auf ihre Aktivität geprüft.

Nach den Versuchsbedingungen erscheint eine direkte Einwirkung der Säure auf die Lipoxydase (Denaturierung des Enzymproteins, Abspaltung einer Wirkgruppe) wahrscheinlicher als ein proteolytischer Abbau infolge Aktivwerdens allenfalls vorhandener Proteinase bei der sauren Reaktion.

6. Inaktivierung durch Oxydationsmittel.

Jod und Wasserstoffperoxyd inaktivieren die Lipoxydase (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Ansätze: In je 20 cm³ befanden sich: 10 cm³ dialysiertes Sojaenzym, 5 cm³ 0,2-m. Phosphatpuffer ($p_H = 6,8$), Oxydationsmittel in den angegebenen Endkonzentrationen. — Nach Zusatz der Oxydationsmittel blieben die Versuchslösungen 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen; anschliessend Dialyse über Nacht. — mm³ O₂ mit je 1 cm³ der Ansätze + 1 cm³ 0,05-m. Leinölsäure + 1 cm³ 0,2-m. Phosphat ($p_H = 6,8$); Volumen 4 cm³.

Minuten	Ohne Zusatz	0,0025-n. J ₂	0,01-n. J ₂	0,0025-m. H ₂ O ₂	0,01-m. H ₂ O ₂	0,025-m. H ₂ O ₂
30	455	246	22	254	34	
120	570	342	90	346	80	21

Die Oxydationsmittel kommen in geringerer Konzentration zur Einwirkung, als den zugesetzten Mengen entspricht, da ein Teil von Begleitsubstanzen verbraucht wird und — im Falle des Wasserstoffperoxyds — durch die in den Lösungen vorhandene Katalase zerstört wird.

Die Empfindlichkeit der Lipoxydase gegenüber Oxydationsmitteln lässt an die Möglichkeit denken, dass auch die peroxydischen Reaktionsprodukte inaktivierend wirken können.

Die Frage der Reversibilität der oxydativen Inaktivierung der Lipoxydase ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

7. Vorkommen in anderen Pflanzen.

*Strain*¹⁾ fand eine Lipoxydase („unsaturated fat oxidase“) in den Samen von 11 Leguminosenarten, nicht in den Samen von Ricinus, Mandel, Sonnenblume und Mais. Von *Kirssanowa*²⁾ wurde das Vorkommen einer Carotinoxydase in der Kartoffel und in Radieschen angegeben.

Wir haben Presssäfte aus verschiedenen Teilen von 20 Pflanzenarten auf ihr Vermögen zur Oxydation von Leinölsäure und in einigen Fällen von Lecithin untersucht.

Die Ergebnisse waren negativ mit Lösungen aus den Samen von Hanf und Ricinus, aus dem Fruchtfleisch von Apfel, Birne, Pflaume, Pfirsich und Tomate, aus der Mohrrübe, ferner aus Pilzen (Champignon, Lärchenröhrling, Butterpilz). Eine gewisse Beschleunigung der Oxydation von Leinölsäure bewirkten Presssäfte z. B. aus den Wurzelteilen von Meerrettich, Radieschen, Sellerie und Kohlrabi („blaue“ Varietät), sowie aus grünen Teilen verschiedener Pflanzen. Das Ausmass der in diesen Fällen beobachteten Oxydationsbeschleunigung war, im Vergleich zu der Wirksamkeit von Auszügen aus der Sojabohne, meist gering, und wir lassen vor eingehenderen Untersuchungen die Frage offen, ob hier überhaupt eine Enzymwirkung vorliegt³⁾.

Eine beträchtliche, mit der Aktivität der Enzymlösungen aus Leguminosen vergleichbare Wirksamkeit war nur mit Lösungen aus der Kartoffelknolle festzustellen. Tabelle VII zeigt die Beschleunigung der Sauerstoffaufnahme von Leinölsäure und von Lecithin durch dialysierten Kartoffelsaft.

Geweberei aus den äusseren und aus den inneren Teilen von ungeschälten Kartoffeln wurde mit der gleichen Menge Wasser versetzt und nach 2 Stunden durch ein Tuch ausgepresst. Die Presssäfte wurden 14 Stunden dialysiert und dann zentrifugiert. Die braun gefärbten Lösungen waren völlig klar. Ohne Zusatz von Lecithin oder Leinölsäure verbrauchten sie keinen Sauerstoff. Je 1 cm³ der Lösungen enthielt 6 mg Trockensubstanz.

¹⁾ *H. H. Strain*, Am. Soc. **63**, 3542 (1941).

²⁾ *W. A. Kirssanowa*, C. **1938**, II, 4080.

³⁾ Insbesondere ist mit Lösungen aus grünen Pflanzenteilen an die beschleunigende Wirkung zu denken, die Chlorophyll in Gegenwart von Licht auf die Oxydation ungesättigter Fette besitzt. Vgl. *K. Täufel* und *R. Müller*, Bioch. Z. **304**, 137 (1940); *K. Täufel*, Fette und Seifen, **50**, 387 (1943).

Tabelle VII.

Enzymlösungen aus Kartoffeln.

mm³ O₂ mit den angegebenen Enzymmengen, 0,5 cm³ Lecithin (5,6-proz.) bzw. 1 cm³ 0,05-m. Leinölsäure, 1 cm³ 0,2-m. Phosphat (p_H = 6,8); Volumen: 4 cm³. — Reihe A: mit Lecithin; Reihe B: mit Leinölsäure.

Minuten	A. Rinde		A. Mark		B. Rinde		B. Mark	
	0,25 cm ³	1,0 cm ³	0,25 cm ³	1,0 cm ³	0,25 cm ³	1,0 cm ³	0,25 cm ³	1,0 cm ³
10	28	58	13	69	286	578	215	433
20	68	165	46	148	322	675	244	505
30	82	259	56	218	334	704	255	527
60	99	380	67	306	370	768	281	570
120	116	440	74	334	427	850	321	625
180	140	457	76	342	483	906	364	665

Pressäfte aus den Rindenteilen sind aktiver als die aus den Markteilen (Tabelle VII). (Auch einige andere Enzyme (Polyphenoloxydase, Katalase) finden sich bekanntlich reichlicher in der Rinde als im Mark der Kartoffel).

Die Lipoxydase der Kartoffel wird durch 15 Minuten langes Erwärmen auf 80° vollständig inaktiviert. Ammoniumsulfat liefert aktive Fällungen. Pepsin zerstört die Lipoxydasewirkung auch des Kartoffelsaftes (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Einwirkung von Pepsin auf Kartoffelenzym.

Ansätze mit 4 cm³ dialysierter Enzymlösung, 0,3 cm³ 1-n. Essigsäure, 50 mg Pepsin. Im ersten Ansatz an Stelle von Essigsäure 0,3 cm³ 1-m. Natriumacetat. Toluol. Volumen: 8 cm³; 3 Stunden 38°. — Neutralisation mit 0,28 cm³ 1-n. NaOH. — mm³ O₂ mit je 2 cm³ der Ansätze + 0,5 cm³ Lecithin (5,6-proz.) + 1 cm³ 0,2-m. Phosphat (p_H = 6,3); Volumen: 4 cm³.

Minuten	Ohne Pepsin + Natriumac.	Ohne Pepsin + Essigsäure	Pepsin + Essigsäure	inakt. Pepsin + Essigsäure
30	197	117	35	119
60	250	150	42	149
120	287	181	52	175

Die Lipoxydase des Kartoffelsaftes ist, ähnlich wie das Sojaenzym, gegenüber der Einwirkung von Säure empfindlich: Nach Zusatz von Salzsäure bis zu einer Endkonzentration von 0,02-n. und 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur war keine Aktivität mehr festzustellen, ebensowenig nach 15 Minuten langer Einwirkung von 0,1-n. Salzsäure. Nach 24-stündiger Dialyse gegen 0,004-n. Salzsäure war die Aktivität des Kartoffelsaftes wohl deutlich abgeschwächt, aber nicht so weitgehend wie in den erwähnten Versuchen mit Sojaenzym.

In der Kartoffel finden sich als Inhibitoren wirksame Stoffe. Gekochter und dann filtrierter Pressaft hemmte die Sauerstoffaufnahme im Versuch mit Sojaenzym und Leinölsäure. Kochsäfte von

dialysierten Lösungen zeigten eine geringere Inhibitorwirkung als solche von nicht dialysierten Lösungen.

Innerhalb der Kartoffelpflanze findet sich die Lipoxydase vornehmlich oder ausschliesslich in der Knolle, da Pressäfte aus den oberirdischen Teilen nur eine geringfügige Wirksamkeit zeigten.

Kartoffelsäfte vermögen mit Hilfe ihres Polyphenol-oxydase-Systems verschiedene Substanzen auf indirekte Weise zu oxydieren¹⁾. Es stellt sich die Frage, ob auch die lipoxydatische Wirkung des Kartoffelsaftes auf eine solche oder eine ähnliche (z. B. peroxydatisch bedingte) indirekte Oxydation zurückzuführen ist. Diese Frage kann auf Grund der bisherigen Versuche mit ungereinigten Enzymlösungen nicht sicher beantwortet werden. Immerhin ist anzuführen, dass nicht alle Pflanzensäfte, die Polyphenol-oxydase enthielten, zur Oxydation von ungesättigten Fettsäuren befähigt waren.

Für das Vorhandensein einer Carotinoxydase in den Kartoffelpressäften fanden wir keine Anhaltspunkte. Dialysierte Lösungen entfärbten zugesetztes Carotin (0,4 mg) im Laufe mehrerer Stunden nicht, während in Gegenwart von Leinölsäure eine vollständige Entfärbung in 3 Minuten erfolgte. Die einer „Carotinoxydase“ der Kartoffel²⁾³⁾ zugeschriebene Wirkung dürfte daher auf eine Sekundäroxidation des Carotins mittels der Lipoxydase zurückzuführen sein.

Guajakharz wird durch Kartoffelsaft allein gebläut⁴⁾, während mit Sojaextrakten erst nach Zusatz einer ungesättigten Fettsäure eine intensive Färbung erreicht wird⁵⁾ (abgesehen von der Peroxydasereaktion mit Wasserstoffperoxyd). Die im System der Lipoxydase (Enzym + Leinölsäure + Sauerstoff) mit Guajakharz auftretende Blaufärbung verschwindet häufig ziemlich schnell, entweder infolge einer Weiteroxydation oder — wahrscheinlicher — infolge einer Reduktion des Farbstoffs. Das in einem früheren Versuch⁶⁾ beschriebene Ausbleiben der Guajakbläuung in späteren Reaktionszeiten dürfte auf derartige sekundäre Umstände (z. B. Anwesenheit reduzierender Substanzen) zurückzuführen sein. Jedenfalls wird Carotin zu jedem Zeitpunkt der Reaktion oxydiert, wenn auch — entsprechend dem Verlauf der Sauerstoffaufnahme — in den ersten Reaktionszeiten weitaus am schnellsten.

Besprechung.

Das geringe Interesse, das der zuerst von *André* und *Hou*⁷⁾ angegebenen Existenz eines ungesättigte Fette oxydierenden Enzyms der Sojabohne in der enzymologischen Literatur bisher entgegengebracht worden ist, dürfte zum Teil wohl auf Zweifel an der Enzymnatur⁸⁾ dieses Agens beruhen. Solche Vorbehalte haben in dem vor-

¹⁾ Vgl. *A. v. Szent-Györgyi* und *K. Vietorisz*, *Bioch. Z.* **233**, 236 (1931). — *F. Kubowitz*, *Bioch. Z.* **292**, 221 (1937). — *S. W. Johnson* und *S. S. Zilva*, *Biochem. J.* **31**, 438 (1937).

²⁾ *W. A. Kirssanowa*, *C.* **1938**, II, 4080.

³⁾ Nach dem zur Verfügung stehenden Referat²⁾ wurde eine Oxydation von Carotin durch Kartoffelsaft allerdings ohne Zusatz einer ungesättigten Fettsäure beobachtet.

⁴⁾ Vgl. *A. v. Szent-Györgyi*, *Bioch. Z.* **162**, 399 (1925).

⁵⁾ *H. Süllmann*, *Helv.* **24**, 646 (1941).

⁶⁾ *Helv.* **25**, 521 (1942).

⁷⁾ *E. André* und *K. Hou*, *C. r.* **194**, 645 (1932); **195**, 172 (1932).

⁸⁾ Vgl. *C. Oppenheimer* und *K. G. Stern*, „Biological Oxidation“, S. 122 (Den Haag 1939).

liegenden Fall zunächst auch ihre besondere Berechtigung (s. Einleitung). Das Verhalten der Lipoxydase bei der Dialyse, ihre Thermolabilität, Fällbarkeit durch Eiweissfällungsmittel und ihre Zerstörung durch proteolytisch wirkende Enzyme zeigen ihre kolloide und eiweissartige Natur. Damit sind für die Lipoxydase Eigenschaften aufgezeigt, die im allgemeinen für die Zurechnung eines katalytisch wirkenden Stoffes zu den Enzymen als notwendig erachtet werden.

Der Wirkungsbereich der Lipoxydase erstreckt sich nach den bis jetzt vorliegenden Befunden¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ auf ungesättigte Fettsäuren (bzw. deren Ester). Nach *Strain*⁴⁾ werden von dem Enzym nur Verbindungen mit der Gruppierung: $-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CO}-$ in *cis*-Konfiguration oxydiert. Wir fanden mit dem Sojaenzym und den folgenden Verbindungen keinen Sauerstoffverbrauch (bzw. keinen über die Autoxydation von manchen der Verbindungen deutlich hinausgehenden Sauerstoffverbrauch): Palmitinsäure, Erucasäure, Undecylen-säure, Fumarsäure, Maleinsäure, Ascorbinsäure, Brenzcatechin, Hydrochinon, Bixin⁵⁾, Carotin⁶⁾, Cholesterin⁷⁾. Die Untersuchung von weiteren ungesättigten Verbindungen, insbesondere von Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen, ist in Aussicht genommen.

Das Vorkommen der Lipoxydase (oder jedenfalls von gleichartig wirkenden Enzymen) in so verschiedenen Pflanzen wie Leguminosen und Kartoffeln lässt vermuten, dass sie auch noch in anderen Pflanzen anzutreffen ist. Für eine weitere Verbreitung haben sich gewisse Anhaltspunkte ergeben (s. den 7. Abschnitt). Man kann aber schon jetzt sagen, dass die Verbreitung von (löslichen) Lipoxydasen in den Pflanzen keine allgemeine ist, und dass sie sich insbesondere nicht in allen „Ölsamen“ finden (z. B. nicht in Hanf-, Lein- und Ricinussamen). Soweit man aus den bis jetzt bekannten Wirkungen des aus der Zelle herausgelösten Enzyms auf seine biologische Funktion schliessen kann, ist deshalb anzunehmen, dass es in den verschiedenen Pflanzen verschiedene Wege des Stoffwechsels der ungesättigten Fettsäuren gibt. Die starke Wirksamkeit von Kartoffelsäften darf im Hinblick auf den relativ kleinen Gehalt der Knolle an Lipoiden noch besonderes Interesse beanspruchen.

Zusammenfassung.

Die Lipoxydase aus Leguminosensamen dialysiert nicht durch Cellophanmembranen, sie ist thermolabil und kann durch Ammonium-

¹⁾ *J. B. Sumner* und *A. L. Dounce*, *Enzymologia* **7**, 130 (1939). — *J. B. Sumner* und *R. J. Sumner*, *J. Biol. Chem.* **134**, 531 (1940).

²⁾ *H. Tauber*, *Am. Soc.* **62**, 2251 (1940).

³⁾ *H. Süllmann*, *Helv.* **24**, 465, 646, 1360 (1941).

⁴⁾ *H. H. Strain*, *Am. Soc.* **63**, 3542 (1941).

⁵⁾ Freundlichst überlassen von der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co.*, Basel.

⁶⁾ Vgl. *Helv.* **24**, 1360 (1941).

⁷⁾ Es sei bemerkt, dass einige der genannten Substanzen in dem System als Suspension vorliegen, was ihre Reaktionsfähigkeit beeinträchtigen könnte.

sulfat oder Aceton gefällt werden. Proteolytisch wirkende Enzyme zerstören die Lipoxydase. Einwirkung von Oxydationsmitteln und von Säure führt zu einer Inaktivierung.

Pressäfte aus Kartoffeln besitzen eine beträchtliche Lipoxydase-wirkung.

Basel, Laboratorium der Universitäts-Augenklinik.

207. Une nouvelle réaction spécifique pour l'identification du thallium¹⁾

par Paul Wenger et Yvonne Rusconi.

(30 X 43)

Lors de notre étude critique des réactifs du thallium²⁾, l'un de nous (Mlle Y. Rusconi) a constaté que le thallium monovalent donne avec une solution de nitrate de bismuth et d'iodure alcalin un précipité rouge.

Nous avons procédé à un examen approfondi de cette réaction qui a révélé une spécificité et une sensibilité intéressantes.

Nous en exposons ci-dessous le mode opératoire et les caractéristiques:

Réactif.

Nitrate de bismuth et iodure de sodium.

Solution à 0,4 % de nitrate de bismuth ((NO₃)₃Bi) dans l'acide nitrique (NO₃H) 20 %;

solution à 10 % d'iodure de sodium (INa) dans l'eau;

solution aqueuse saturée de thiosulfate de sodium (S₂O₃Na₂) (utilisée dans certains cas pour augmenter la spécificité).

Sensibilité: 0,6 [A]^{0,03} 1 : 5 × 10⁴ 3)
1 [B]^{0,03} 1 : 3 × 10⁴
10 [D]⁵ 1 : 5 × 10⁵

Mode opératoire.

Poser une goutte de solution d'un sel de thallium dans un godet, ajouter une goutte de solution de nitrate de bismuth ((NO₃)₃Bi) puis une goutte de solution d'iodure de sodium (INa). Il se produit un précipité rouge.

¹⁾ Voir Paul Wenger, Roger Duckert et Y. Rusconi, Helv. **26** 1466—75, (1943) et précédents.

²⁾ Paul Wenger, Roger Duckert et Y. Rusconi, Helv. **26**, 338—45 (1942).

³⁾ Suivant convention adoptée par la Commission Internationale des Réactions et Réactifs analytiques nouveaux.