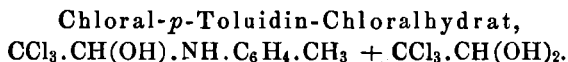


Die Annahme, dass hier eine Verbindung des Chloralanilins mit Chloralhydrat vorliegt, für deren Bildung das nöthige Wasser der Luft entstammt, und nicht eine 1 Mol. Krystallwasser enthaltende Krystallisation eines Dichloralanilins, stützt sich auf die Thatsache, dass es nicht gelang, bei vollständigem Ausschluss von Wasser und Anwendung stark überschüssigen Chlorals ein Dichloralanilin zu erhalten. Dabei hinterblieb schliesslich das Wallach'sche Trichloräthyliden-diphenamin,  $\text{CCl}_3 \cdot \text{CH}(\text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5)_2$ . Uebrigens entsteht das Chloral-Anilin-Chloralhydrat auch, wenn bei der obigen Art der Darstellung weniger als 2 Mol. Chloral auf 1 Mol. Anilin in Anwendung gebracht werden, nur in schlechterer Ausbeute.

Das Chloral-Anilin-Chloralhydrat nimmt schon bei mehrstündigem Stehen an der Luft eine gelbliche Farbe an, und es erfolgt dann eine immer weitergehende Zersetzung; dagegen ist es im Dunkeln und im trocknen Raume etwas länger haltbar.



Dieser Körper kann auf demselben Wege wie der entsprechende Anilinabkömmling erhalten werden und gleicht demselben in Aussehen und Verhalten. Er schmilzt nach dem Umkrystallisiren aus Ligroin bei  $58-59.5^\circ$ ; die Schmelztemperatur ist etwas abhängig von der Schnelligkeit des Anheizens.

0.1252 g Sbst.: 0.1444 g  $\text{CO}_2$ , 0.0403 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{NCl}_6$ . Ber. C 31.45, H 3.10.

Gef. » 31.46, » 3.57.

## 257. A. Bach: Einfluss der Peroxydase auf die alkoholische Gährung.

(Eingegangen am 20. April 1906.)

Die oxydirende Wirkung des Systems Peroxydase-Hydroperoxyd erstreckt sich auf eine verhältnissmässig grosse Anzahl von Verbindungen; als eine tiefgreifende ist sie aber nicht zu bezeichnen. Der Hauptsache nach beschränkt sie sich auf die Oxydation des beweglichen Wasserstoffs der Phenole<sup>1)</sup>, der aromatischen Amine, sowie des der Jodwasserstoffsäure. Von den in physiologischer Hinsicht wichtigen Körpern wird Zucker, z. B., überhaupt nicht angegriffen, mindestens nicht unter den von mir bis jetzt untersuchten Verhältnissen.

<sup>1)</sup> Pyrogallol wird allerdings dabei theilweise zu Kohlensäure oxydirt.

Da es nicht ausgeschlossen ist, dass im Organismus Zucker nicht als solcher, sondern erst nach vorausgehender Spaltung verbrannt wird, so versuchte ich, Zucker der gleichzeitigen Einwirkung eines zuckerspaltenden Enzyms und des Systems Peroxydase-Hydroperoxyd auszusetzen, in der Hoffnung, dass dabei eine Oxydation des Kohlehydrates, bzw. irgend eines seiner Spaltstücke stattfinden würde. Als besonders geeignet für derartige Versuche erschien mir das alkoholbildende Enzym der Hefe, da es eine tiefgehende Zertrümmerung des Zuckermoleküls hervorruft.

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurde die Buchner'sche Aceton-Dauerhefe, d. h. mit Aceton behandelte Presshefe, angewandt. Durch hinreichende Behandlung der Hefe mit diesem Lösungsmittel werden bekanntlich sämtliche Hefezellen getötet, während die darin enthaltenen Enzyme nahezu ungeschädigt bleiben.

Die Aceton-Dauerhefe wurde von der Hefefabrik A. Schröder, München, als »Zymin pur« in Pastillen- und Pulver-Form, bezogen. Die angewandte Peroxydase wurde in der früher beschriebenen Weise aus Meerrettigwurzeln dargestellt. Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt:

Zwei Flaschen von 400 ccm Inhalt wurden mit je 100 ccm 15-procentiger Saccharoselösung, 1 g Peroxydase in 15 ccm Wasser, 10 ccm einer 10-procentigen Hydroperoxydlösung, in dünnwandigen, zugeschmolzenen Reagensgläsern enthalten, und 5 g Zymin beschickt. In einer der Flaschen wurde die zugesetzte Peroxydase durch vorhergehendes, zweimaliges Aufkochen ihrer Lösung zerstört. Die so beschickten Flaschen wurden mit je 3 Waschflaschen verbunden, welche abgemessene Mengen titrirtes Barytwasser enthielten. Reactions- und Wasch-Flaschen wurden in einen Thermostaten bei 30° gestellt. Die letzte Waschflasche von jeder Reihe wurde mittels eines dickwandigen Schlauches und Dreiweghahnes mit einer Gasbürette, welche Quecksilber als Sperrflüssigkeit enthielt, verbunden.

Nach sorgfältiger Prüfung der Apparate auf ihre Dichtigkeit wurden dieselben im Thermostaten stehen gelassen, bis eine merkbare Trübung in der ersten Waschflasche entstanden war. Dann wurden die das Hydroperoxyd enthaltenden Reagensgläser zertrümmert. Es erfolgte sofort eine stürmische Gasentwicklung; der entweichende Sauerstoff wurde in den Waschflaschen von Kohlensäure befreit, in den Büretten aufgefangen und gemessen, wobei Letztere durch die Vermittelung des Dreiweghahnes rasch entleert und wieder gefüllt werden mussten, da sämtliches Hydroperoxyd durch die Katalase der Hefe fast augenblicklich unter Sauerstoffentwicklung zersetzt wurde. Nach Verlauf von 72 Stunden wurde durch die Apparate ein kohlenstofffreier Luftstrom durchgesogen und die vereinigten Waschflüssigkeiten — in den letzten Waschflaschen blieb das Barytwasser vollkommen klar — durch trockne Filter rasch filtrirt; in den Filtraten wurde dann das vorhandene Baryumhydroxyd mittels Oxalsäurelösung, von der 1 ccm 2 ccm Kohlendioxyd entsprach, zurücktitrirt und die entstandene Kohlensäure berechnet. In der Gährflüssigkeit wurde die Acidität mittels decinormaler Natronlauge bestimmt.

Ein zweiter Versuch wurde mit Hydroperoxyd und Zymin in Abwesenheit von Peroxydase und mit Zymin allein unter genau gleichen Bedingungen ausgeführt. In folgender Tabelle sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengestellt:

	I.	II.	III.	IV.
	Active Peroxydase, Hydroperoxyd, Zymin	Gekochte Peroxydase, Hydroperoxyd, Zymin	Hydroperoxyd, Zymin	Zymin
Entwickelter Sauerstoff .	304 ccm	300 ccm	310 ccm	—
Entstandene Kohlensäure	184.5 »	482.2 »	492.5 »	486.3 ccm
Gesamttacidität . . .	162.5 »	168.3 »	166.7 »	164.6 »

Aus dieser Tabelle ergibt sich 1. dass sämtliches Hydroperoxyd durch die Hefekatalase unter Sauerstoffentwicklung zersetzt wurde (ber. 321 ccm; gef. 304, 300, 310 ccm Sauerstoff. Berücksichtigt man den im Barytwasser und in der Reactionsflüssigkeit gelöst gebliebenen Sauerstoff, so ist die Zersetzung des Hydroperoxyds als eine quantitative zu bezeichnen); 2. dass die Anwesenheit von activer Peroxydase auf die alkoholische Gährung stark hemmend wirkt, während inactiv gewordene Peroxydase, sowie Hydroperoxyd in Abwesenheit von Peroxydase auf den Verlauf der Gährung ohne Einfluss sind, und 3. dass die Anwesenheit von Peroxydase und Hydroperoxyd auf den Säuregrad der vergohrenen Flüssigkeit keinen Einfluss ausübt.

Um den Einfluss der Peroxydase auf die zellfreie alkoholische Gährung näher kennen zu lernen, stellte ich eine Anzahl von vergleichenden Versuchen mit activer und gekochter Peroxydase an, wobei der zeitliche Verlauf der Reaction durch Messen der in der Bürette direct aufgefangenen Kohlensäure verfolgt wurde. Durch mehrere Controllversuche wurde festgestellt, dass Kohlensäure das einzige gasförmige Product der Gährung war. Diese vergleichenden Versuche ergaben, dass die hemmende Wirkung der Peroxydase auf die alkoholische Gährung mit den einzelnen Peroxydase- und Zymin-Präparaten variirt, dass sie aber nie ausbleibt. In folgender Tabelle sind beispielsweise die Ergebnisse resumirt, welche mit 2 Zymin-Präparaten und einer und derselben Peroxydase erhalten wurden.

	Entwickelte Kohlensäure (auf 0° und 760 mm reducirt)			
	Active Peroxydase		Gekochte Peroxydase	
	Zymin I	Zymin II	Zymin I	Zymin II
Am 1. Tage	158.2 ccm	147.4 ccm	267.8 ccm	251.4 ccm
» 2. »	35.6 »	19.3 »	190.0 »	149.6 »
» 3. »	7.8 »	0.6 »	51.2 »	20.6 »
	194.6 ccm	167.3 ccm	509.0 ccm	421.6 ccm

Nach etwa 60 Stunden hört die Kohlensäureentwicklung vollkommen auf, vorausgesetzt, dass im Zymin keine lebensfähigen Zellen vorhanden sind. In letzterem Falle stellt sich am 4. und 5. Tage eine lebhaftige Gährung ein, welche etwa 100 ccm Kohlensäure pro Stunde liefert und ein paar Tage dauert.

Bei obigen Versuchen wurde auch die Katalase in den vergohrenen Flüssigkeiten bestimmt, indem das Sauerstoffvolumen ermittelt wurde, welches durch 5 ccm der betreffenden Flüssigkeit aus 15 ccm 1-procentiger Hydroperoxydlösung in 10 Minuten entwickelt wurde. Dabei wurde der interessante Befund gemacht, dass die Fähigkeit des Zymins, Sauerstoff aus Hydroperoxyd frei zu machen, in fast genau derselben Weise, wie seine Fähigkeit, Kohlensäure aus Zucker abzuspalten, durch die Anwesenheit von activer Peroxydase herabgedrückt wird:

	Zymin I		Zymin II	
	Active Per- oxydase	Ge- kochte Per- oxydase	Active Per- oxydase	Ge- kochte Per- oxydase
Entwickelte Kohlensäure	194.6	: 509.0 = 0.382	167.3	: 421.6 = 0.397
Entwickelter Sauerstoff	8.4	: 22.4 = 0.379	8.2	: 20.2 = 0.405

Bei anderen Versuchen mit denselben Peroxydase- und Zymin-Präparaten wurden ähnliche Verhältnisse beobachtet. Diese bemerkenswerthe Proportionalität liess der Voraussetzung Raum, dass zwischen den betreffenden Enzymen der Hefe irgend ein causaler Zusammenhang besteht. Durch weitere Versuche wurde aber festgestellt, dass dieser Zusammenhang ein nur zufälliger war. Mit einem dritten Zymin-Präparat und einer reineren, viel kräftigeren Peroxydase wurden folgende Zahlen erhalten.

	Zymin III	
	Active Peroxydase	Gekochte Peroxydase
Entwickelte Kohlensäure:		
Am 1. Tage . . .	0.0 ccm	265.6 ccm
» 2. » . . .	6.2 »	79.0 »
» 3. » . . .	13.4 »	2.0 »
	19.6 ccm	: 346.6 ccm = 0.056
Entwickelter Sauerstoff	22.5 »	: 31.0 » = 0.726.

Hier war also die Katalase viel weniger als das zuckerspaltende Enzym der Hefe durch die Peroxydase geschädigt.

Die Thatsache, dass active Peroxydase auf die zellfreie alkoholische Gährung einen hemmenden Einfluss ausübt, ist insofern von Interesse, als die Hefe zu den wenigen Organismen gehört, welche

keine Peroxydase enthalten<sup>1)</sup>. Es sieht demnach aus, als ob die Spaltung des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure mit der Anwesenheit von Peroxydase nicht vereinbar wäre.

Was das Ausbleiben von jeder Oxydation bei der gleichzeitigen Einwirkung von Zymin und Peroxydase-Hydroperoxyd auf Zucker anbelangt, so bin ich auf Grund meiner bisherigen Erfahrungen geneigt, dasselbe nicht der Anwesenheit von Katalase im Zymin, sondern der Nichtoxydirbarkeit der hier in Betracht kommenden Substanzen durch das System Peroxydase Hydroperoxyd zuzuschreiben. Denn wie gross der Katalasegehalt des Zymins auch sein mag, so verhindert er doch nicht das Auftreten der bekannten Färbungs-Reactionen, welche durch Peroxydase in Gegenwart von Hydroperoxyd hervorgerufen werden. 1 g Zymin ist im Stande, 3.5 kg 1-procentiger Hydroperoxydlösung binnen 10 Minuten unter Entwicklung von ca. 1 l Sauerstoff zu zersetzen. Verreibt man 1 g Zymin mit Peroxydase und 20 ccm Wasser und setzt Hydroperoxyd und bald darauf Guajacollösung zu, so entsteht keine Färbung. Giebt man einen weiteren Tropfen Hydroperoxydlösung oder fügt man von vornherein die Guajacollösung vor der Hydroperoxydlösung zu, so nimmt das Gemisch eine tiefrothe Färbung an. Letztere verschwindet nach einiger Zeit und erscheint auf Zusatz von Hydroperoxyd wieder. Bei Anwendung von Katalase, welche frei von reducirenden Substanzen ist, verschwindet die Färbung überhaupt nicht. Pyrogallol, Guajactinctur, aromatische Amine verhalten sich bei der gleichzeitigen Einwirkung von Peroxydase-Hydroperoxyd und Zymin wie Guajacol. Peroxydase wird also durch die Anwesenheit von sehr grossen Mengen Katalase bei der Ausübung ihrer specifischen Function nicht gestört. Dass auch das Entgegengesetzte der Fall ist, soll in einer weiteren Mittheilung nochmals bewiesen werden.

Genf, Privatlaboratorium.

---

<sup>1)</sup> Dass Hefe, welche Hydroperoxyd unter Sauerstoffentwicklung sehr rasch zersetzt, dasselbe nicht activirt, wurde bereits von Schönbein beobachtet (Münch. Akad. 2, 100 [1893]).