

läßt sich ein Bromid oder Jodid gewinnen (30 ccm Eisessig und 2 ccm Bromwasserstoffsäure bzw. 50 ccm Eisessig und 3 ccm Jodwasserstoffsäure auf 1 g Acridon).

3-Methyl-9-acridon zeigt in Bezug auf Löslichkeitsverhältnisse und Fluorescenz große Ähnlichkeit mit Acridon. Zu Büscheln vereinigte, mikroskopische Nadelchen (aus Eisessig).

0.1876 g Sbst.: 0.5521 g CO<sub>2</sub>, 0.0925 g H<sub>2</sub>O. — 0.1743 g Sbst.: 10.95 ccm N (22.5°, 718.5 mm).

C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ON. Ber. C 80.38, H 5.26, N 6.70.

Gef. » 80.26, » 5.48, » 6.86.

Wie mir Hr. Bamberger im Dezember 1908 mitteilte, hat auch er, allerdings nach mir, aber ohne von meinen Versuchen Kenntnis zu haben, die Umlagerung von Arylanthraniilen in Acridone ausgeführt und zwar auf ganz anderem Wege. Wir kamen überein, unsere Arbeiten Ende Januar gleichzeitig an die Redaktion dieser Berichte zuzenden, aber eine Erkrankung, die Hrn. Bamberger in den ersten Tagen 1909 befiel, hat die Ausführung dieses Planes verhindert. Hr. Bamberger wird, sobald er gesundheitlich in der Lage ist, seine Publikation nachfolgen lassen.

## 90. A. Bach: Zur Kenntnis der Tyrosinase.

(Eingegangen am 2. Februar 1909.)

Die Tatsache, daß Hydroperoxyd bei der Oxydation von drei verschiedenen Körperlklassen (Phenolen, aromatischen Aminen und Jodwasserstoffsäure) durch Peroxydase aktiviert wird, läßt in letzterer die Existenz von drei verschiedenen, spezifisch wirkenden Enzymen vermuten. Trotz aller Bemühungen ist es aber bisher noch nicht gelungen, die vermutlichen Enzyme von einander zu trennen, bzw. eine der Funktionen der Peroxydase aufzuheben, ohne dabei auch die übrigen zu vernichten<sup>1)</sup>. Bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse sind wir also zu der Annahme berechtigt, daß für das Zustandekommen des Aktivierungsprozesses nicht die chemische Natur der durch Hydroperoxyd oxydierbaren Körper, sondern die Anwesenheit von labilen Wasserstoff in ihnen maßgebend ist. Mit anderen Worten, die Peroxydase verhält sich als ein nicht spezifisches Enzym. Bei der vollen Gleichwertigkeit des Systems Peroxydase-Hydroperoxyd

<sup>1)</sup> Vergl. A. Bach, diese Berichte **40**, 230, 3186 [1907]; **41**, 2349 [1908].

und der gewöhnlichen Oxydase dürfte auch dieser keine Spezifität zukommen. Mit dieser Folgerung steht aber die Tatsache im Widerspruch, daß Tyrosin von gewöhnlicher Oxydase nicht angegriffen wird; wohl aber wird es durch Tyrosinase, eine von Bourquelot und Bertrand<sup>1)</sup> entdeckte Oxydase, verhältnismäßig rasch oxydiert. Dementsprechend ist auch das System Peroxydase-Hydroperoxyd auf Tyrosin ohne jede Einwirkung<sup>2)</sup>. Es scheint also hier ein Fall von spezifischer, an die chemische Struktur des Substrats gebundener Fermentwirkung vorzuliegen. Zur Aufklärung dieses Widerspruchs wurden von mir systematische Versuche angestellt. In Folgendem soll über die Ergebnisse dieser Versuche kurz berichtet werden.

Bei der Erörterung der Ursache der scheinbaren Spezifität der Tyrosinase war in erster Linie die von Gonnermann<sup>3)</sup> aufgestellte Hypothese zu berücksichtigen. Dieser Forscher hält die Tyrosinase nicht für ein oxydierendes, sondern für ein hydrolytisches Enzym. Tyrosin sei durch Tyrosinase hydrolytisch in der Weise gespalten, daß aus ihm leicht oxydable, sich an der Luft freiwillig oxydierende Spaltungsprodukte entstehen. Sollte sich diese Annahme als den Tatsachen entsprechend erweisen, so würde hiermit das erwähnte Problem der Spezifität der Tyrosinase eine ebenso klare, wie einfache Lösung erhalten. Die Gonnermannsche Hypothese wurde daher von mir in verschiedenen Richtungen nachgeprüft. Zunächst versuchte ich, die zwei genannten Prozesse — Hydrolyse des Tyrosins und Oxydation der entstandenen Spaltungsprodukte — zeitlich von einander zu trennen. Zu diesem Zwecke wurde folgender Versuch angestellt:

0.2 g durch Fällen mit Alkohol gereinigte Tyrosinase aus *Russula delica* wurden in 400 ccm ausgekochtem und im Wasserstoffstrom abgekühltem Wasser gelöst. Andererseits wurde in derselben Weise eine heißgesättigte, sauerstofffreie Tyrosinlösung dargestellt. Von den beiden Lösungen wurden je 200 ccm in einem mit Wasserstoff gefüllten Kolben zusammengebracht (Gemisch A). Ursprüngliche Lösungen und Gemisch wurden im Thermostaten bei 25° unter Luftabschluß stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurden von dem Gemisch A 200 ccm in ein Becherglas gegeben, und gleichzeitig wurde aus den im Thermostaten getrennt aufbewahrten, ursprünglichen Ferment- und Tyrosinlösungen ein gleiches Gemisch dargestellt (Gemisch B). Beide Gemische wurden dann unter gleichen Bedingungen der Einwirkung des Luftsauerstoffs ausgesetzt. Der Verlauf der Oxydation des Tyrosins wurde in beiden Fällen mittels

<sup>1)</sup> Bourquelot et Bertrand: Les ferment oxydants dans les champignons. Soc. mycol. de France **12**, 17 [1896].

<sup>2)</sup> R. Chodat, Journ. suisse chim. pharm. **46**, 48 [1906]; A. Bach, diese Berichte **39**, 2126, 3329 [1906].

<sup>3)</sup> M. Gonnermann, Pflügers Archiv **1900**, 82.

der von mir<sup>1)</sup> früher beschriebenen Permanganatmethode messend verfolgt, indem nach gleichen Zeiten den Gemischen je 20 ccm entnommen, mit Schwefelsäure angesäuert und mit 0.002-normaler Permanganatlösung bis zur Entfärbung titriert wurden.

Verbrauchte Permanganatlösung.

Zeit in Stunden:	1	2	3	4	5
Gemisch A:	3.7 ccm	5.1 ccm	6.9 ccm	10.2 ccm	16.4 ccm
» B:	3.8 »	5.3 »	6.8 »	10.3 »	16.3 »

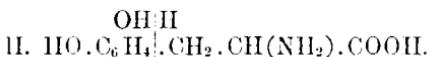
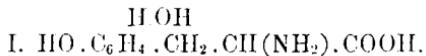
Aus diesem Versuch geht hervor, daß das Vorbehandeln des Tyrosins mit Tyrosinase unter Sauerstoffsabschluß keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der nachträglichen Oxydation des Gemisches ausübt. Dieser Befund spricht entschieden gegen die Annahme, daß der Oxydation des Tyrosins eine Hydrolyse vorausgeht.

Daß bei der Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin unter Luftsabschluß keine leicht oxydablen Produkte entstehen, wurde weiter durch folgenden Versuch festgestellt:

Sofort nach dem Entnehmen von 200 ccm für den obigen Versuch wurde der Rest des Gemisches A beabsichtigt Zerstörung der Tyrosinase eine kurze Zeit erhitzt und dann der Einwirkung des Luftsauerstoffs ausgesetzt. Das Gemisch blieb wochenlang farblos. Zusatz von Peroxydase und Hydroperoxyd änderte nichts an dem Resultat. Die Gonnermannsche Annahme bestätigte sich auch in dieser Richtung nicht.

Vorbehandeln des Tyrosins mit Trypsin (48 Stunden im Thermo- staten bei 37° unter Toluolzusatz) und mit dem peptolytischen Enzym des Buchnerschen Zymins ergab ein ähnliches negatives Resultat.

Die Annahme der hydrolytischen Spaltung des Tyrosins durch Tyrosinase wurde schließlich noch in einer anderen Richtung nachgeprüft. Die einfachste Spaltung des Tyrosins dürfte entweder im Sinne der Formel I oder im Sinne der Formel II vor sich gehen:



In ersterem Falle dürften als Spaltstücke Phenol und Serin, im letzteren Hydrochinon und Alanin entstehen. Bekanntlich treten Phenol, Serin und Alanin als Produkte der Hydrolyse der Proteinstoffe auf, und die Annahme einer derartigen Spaltung ist wohl zulässig. Geht nun der Oxydation des Tyrosins eine Spaltung im Sinne der obigen Formeln voraus, so dürfte Tyrosinase aus den

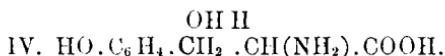
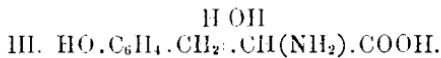
<sup>1)</sup> Diese Berichte 41, 217 [1908].

Spaltungsstücken dasselbe Oxydationsprodukt, wie aus Tyrosin, erzeugen.

Äquivalente Mengen von Phenol und *dl*-Serin<sup>1)</sup> einerseits und von Hydrochinon und Alanin andererseits (je 0.0001 Mol. in 20 ccm Wasser) wurden mit Tyrosinase zusammengenbracht und an der Luft stehen gelassen. Gleichzeitig wurden Kontrollversuche mit den entsprechenden Phenolen ohne Zusatz von Aminosäuren angestellt. Es zeigte sich, daß *dl*-Serin auf die Oxydation des Phenols hemmend wirkte, indem die Reaktion etwa 2 Stunden später, als bei dem Kontrollversuch, eintrat. Nach 48 Stunden war kein Unterschied zwischen beiden Proben wahrnehmbar. Beide zeigten die gleiche 1:1:1-Färbung. Die charakteristische Schwarzfärbung trat in dem Phenol-Seri-Gemisch auch nach Verlauf von 10 Tagen nicht ein. Was die Oxydation Hydrochinon-Alanin-Gemisches anbelangt, so ging sie genau wie die des Hydrochinons in Abwesenheit von Alanin vor sich.

Die genannten Gemische wurden auch mit tyrosinasefreier Oxydase (aus *Lactarius vellereus*) und mit Peroxydase (aus Meerrettich) und Hydroperoxyd versetzt. Die Oxydation verlief hier genau, wie die der entsprechenden Phenole für sich. Zusatz von Tyrosin zu den obigen Gemischen übte keinen Einfluß auf die Oxydation aus.

Es ist weiter denkbar, daß die hydrolytische Spaltung des Tyrosins in der  $\beta$ -Stellung gemäß den Formeln III oder IV unter Bildung von *p*-Kresol und Oxyaminoessigsäure oder *p*-Oxybenzylalkohol und Glykokoll erfolgen könnte:



Oxyaminoessigsäure ist meines Wissens weder unter den Produkten der Hydrolyse der Proteinstoffe aufgefunden, noch künstlich dargestellt worden, wahrscheinlich weil sie leicht in Ammoniak und Glyoxylsäure zerfällt. Bei der Einwirkung von Tyrosinase auf ein Gemisch von *p*-Kresol und *dl*-Serin (dem nächsten Homologen der Oxyaminoessigsäure) nahm die Flüssigkeit eine prachtvolle rotviolette Färbung an. Die für das Oxydationsprodukt des Tyrosins charakteristische Schwarzfärbung trat auch nach mehreren Tagen nicht ein. Mit Peroxydase und Hydroperoxyd versetzt, ergab das Gemisch von *p*-Kresol und *dl*-Serin eine milchige Trübung, welche sich später zu einem weißen Niederschlag zusammenballte. Bei der Einwirkung von Tyrosinase auf ein Gemisch von *p*-Oxybenzylalkohol (aus *p*-Oxybenzamid durch Reduktion mit Natriumamalgam dargestellt) und Glykokoll

<sup>1)</sup> Das angewandte *dl*-Serin wurde mir von Hrn. Prof. E. Abderhalden zu Verfügung gestellt, wofür ich ihm auch an dieser Stelle meinen besten Dank sage.

wurde nach 3 Tagen ein rotbrauner Niederschlag erhalten. Unter gleichen Bedingungen ergab das genannte Gemisch in Gegenwart von Peroxydase und Hydroperoxyd einen braungelben Niederschlag.

Aus den im obigen mitgeteilten Versuchen ergibt sich, daß die Ursache der Spezifität der Tyrosinase nicht auf die Fähigkeit dieser Oxydase, Tyrosin vor der eigentlichen Oxydation zu spalten, zurückzuführen ist.

Eine andere, auf die Wirkung der Tyrosinase bezügliche Hypothese wurde von Gessard<sup>1)</sup> aufgestellt. Gessard unterscheidet in der Wirkung der Tyrosinase zwei Prozesse: die Oxydation des Tyrosins zu einem roten Körper und die nachträgliche Kondensation des letzteren zu dem bekannten schwarzen Produkt. Die Oxydation kann sowohl durch Oxydationsfermente, wie durch chemische Oxydationsmittel (Millonsches Reagens) bewirkt werden, während zur Umwandlung des roten Körpers in das schwarze Kondensationsprodukt die Mitwirkung der in der Tyrosinase enthaltenen Mineralsalze erforderlich sei.

Zur Nachprüfung dieser Hypothese wurde ein kräftiges, durch mehrfaches Fällen mit Alkohol gereinigtes Tyrosinase-Präparat in Wasser gelöst und die Lösung zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit Tyrosin versetzt und zu je 20 cem auf 3 Gläser verteilt. In das erste wurden noch 5 cem Wasser, in das zweite 2 cem 1-prozentige Hydroperoxydlösung und 3 cem Wasser, in das dritte 2 cem Hydroperoxydlösung, 2 cem Peroxydaselösung und 1 cem Wasser gegeben. Sämtliche Proben verblieben wochenlang farblos.

Ein ähnlicher Versuch wurde unter Anwendung von Oxydase anstatt Peroxydase und Hydroperoxyd ausgeführt. Die Oxydase wurde aus Pilzen (*Lactarius vellereus*) dargestellt und zur Zerstörung der Tyrosinase auf 75° erhitzt. Auch hier blieb die Oxydation des Tyrosins völlig aus. Die Versuche wurden bei verschiedenen Gelegenheiten mehrfach wiederholt und ergaben stets dasselbe Resultat.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß die Ursache der Spezifität der Tyrosinase nicht in ihrem Gehalt an anorganischen Stoffen liegt.

Die Gessardsche Hypothese konnte indessen im Sinne der modernen Lehre von den Kofermenten erweitert werden. Es war nämlich denkbar, daß Tyrosinase aus gewöhnlicher Oxydase, bzw. Peroxydase und Oxygenase, und irgend einem Koferment, durch welches der Oxydationsprozeß in eine bestimmte Bahn gelenkt wird, besteht. Ich bemühte mich daher, die etwaige Existenz eines derartigen Koferments im Pflanzenreich festzustellen. Es wurden von

<sup>1)</sup> C. Gessard, Compt. rend. 130, 1327 [1900].

mir mehr als 100 Pflanzensaft- und Pflanzenextrakte und ca. 40 Tyrosinase-Fraktionen verschiedener Herkunft auf ihre Fähigkeit, die Oxydation des Tyrosins durch Peroxydase und Hydroperoxyd auszulösen, untersucht. Dabei wurden folgende Tatsachen festgestellt.

I. Die Oxydation des Tyrosins unter der Einwirkung von Peroxydase, Hydroperoxyd und einem Pflanzensaft oder Fermentpräparat findet nur dann statt, wenn Saft oder Präparat für sich dem Tyrosin gegenüber sich als aktiv erweisen, d. h. Tyrosinase enthalten.

Bei den zahlreichen, in dieser Richtung ausgeführten Versuchen wurde keine einzige Ausnahme von dieser Regel beobachtet. Bei manchen Säften und Extrakten wird die Wirkung der Tyrosinase durch die Anwesenheit von reduzierenden oder anderweitigen, näher nicht untersuchten Stoffen verdeckt. Dies ist besonders der Fall bei Säften und Extrakten, welche dem Angriff von Fäulnisbakterien ausgesetzt waren. Durch Ausfällen mit Alkohol können aber die hemmenden Stoffe zum größten Teil beseitigt werden, und dann kommt die Wirkung der Tyrosinase unzweideutig zum Vorschein. Mehrere Säfte und Extrakte enthalten phenolartige Substanzen, welche unter der Einwirkung von Peroxydase und Hydroperoxyd sich rotbraun färben. Auf Zusatz von Tyrosin kann sogar eine Beschleunigung der Farbstoffbildung beobachtet werden. Dieser Oxydationsprozeß hat aber mit der Tyrosinase-Wirkung nichts zu tun, denn erstens wird eine gleiche Beschleunigung auch durch Essigsäure oder Milchsäure hervorgerufen, und zweitens geht die Oxydation nie bis zur Bildung des charakteristischen schwarzen Produkts.

II. Gereinigte, völlig neutrale Peroxydase wirkt sowohl in Anwesenheit wie in Abwesenheit von Hydroperoxyd auf die Oxydation des Tyrosins durch gereinigte Tyrosinase unbedingt hemmend.

Als Beispiel sollen aus dem Beobachtungsmaterial folgende Zahlen angeführt werden:

Drei Bechergläser A, B und C wurden mit je 150 ccm heiß gesättigter Tyrosinlösung und 20 ccm Tyrosinaselösung (0.01 g gereinigte Tyrosinase in 100 ccm Wasser) beschickt. Glas A erhielt noch 30 ccm Wasser; Glas B erhielt 2 ccm 1-prozentige Hydroperoxydlösung, 2 ccm Peroxydaselösung (Äquivalent des zugesetzten Hydroperoxyds) und 26 ccm Wasser; Glas C erhielt 2 ccm Peroxydaselösung und 28 ccm Wasser. Nach gleichen Zeiten wurden den Gemischen je 20 ccm entnommen, mit gleichen Mengen Katalaselösung zur Zerstörung des in B vorhandenen Hydroperoxyds versetzt, mit Schwefelsäure angesäuert und mit 0.002-n. Permanganatlösung bis zur Entfärbung titriert.

Zeit in Std.:	Verbrauchte Permanganatlösung in ccm.						
	2	4	8	12	20	32	42
A	4.2	7.8	12.3	14.7	18.3	18.2	18.2
B	1.1	2.3	4.1	6.3	10.1	14.2	16.1
C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	5.2
							10.4

Bemerkenswert ist hier die Tatsache, daß der hemmende Einfluß der Peroxydase auf die Wirkung der Tyrosinase durch die Anwesenheit von Hydroperoxyd verringert wird.

Daß die Tyrosinase-Wirkung durch Zusatz von Peroxydase gehemmt wird, ist bereits von W. Staub<sup>1)</sup> bei einigen qualitativen Versuchen beobachtet worden.

III. Enthält der Pflanzensaft oder das Tyrosinase-Präparat reduzierende oder andere hemmende Stoffe, so tritt auf Zusatz von Peroxydase und Hydroperoxyd eine vorübergehende Beschleunigung der Oxydation ein, dann kommt aber wiederum der hemmende Einfluß der Peroxydase zum Vorschein.

Beispiel: Durch Ausfällen eines älteren, durch Bakterien stark getrübten Saftes von *Russula delica* mit Ammoniumsulfat wurde ein Präparat dargestellt, welches neben Tyrosinase auch auf die Oxydation des Tyrosins hemmend wirkende Stoffe enthielt. Von diesem Präparat wurden 0.05 g in 100 ccm Wasser gelöst; die Lösung wurde für folgende Versuche angewandt.

In 3 Bechergläser A, B und C wurden je 150 ccm heiß gesättigte Tyrosinlösung und 20 ccm Fermentlösung gegeben. B erhielt noch 2 ccm 1-prozentige Hydroperoxydlösung, C erhielt 2 ccm Hydroperoxydlösung und 2 ccm Peroxydaselösung (Äquivalent); der Inhalt der 3 Gläser wurde mit Wasser auf 200 ccm gebracht. Es zeigte sich, daß nach Verlauf von 2 Stunden die Flüssigkeit in A noch völlig farblos war, während in B die Flüssigkeit rosa-rot und in C tief weinrot war. Nach 4 Stunden war kein Unterschied zwischen den Färbungen der drei Flüssigkeiten bemerkbar. Nach 8 Stunden war dagegen die Flüssigkeit in A dunkler, als in B, und in letzterer dunkler, als in C. Die Titration mit Permanganatlösung ergab folgende Zahlen:

Zeit in Stunden:	Verbrauchte Permanganatlösung in ccm.					
	2	3	4	8	20	32
A	0.0	0.2	1.9	8.2	13.7	13.6
B	0.3	1.0	1.8	6.7	10.1	13.8
C	1.1	1.5	2.1	5.7	8.5	13.2

Aus diesen Zahlen ist klar ersichtlich, daß die Beschleunigung des Oxydationsprozesses während der ersten Stunden nicht auf den Angriff des Tyrosins durch Peroxydase und Hydroperoxyd, sondern auf die Zerstörung von hemmenden Stoffen zurückzuführen ist.

<sup>1)</sup> W. Staub, Nouvelles recherches sur la tyrosinase. Genève 1908, S. 40.

In einem Falle wurde in unerwarteter Weise eine Beschleunigung der Tyrosinasewirkung durch Peroxydase für sich (ohne Hydroperoxydzusatz) beobachtet. Eine nähere Untersuchung ergab, daß die angewandte Peroxydaselösung sauer reagierte. Bei der Wiederholung des Versuches mit einer frisch dargestellten, völlig neutralen Peroxydaselösung fand, wie früher, eine Hemmung der Tyrosinase-Wirkung statt. Andererseits bewirkten Spuren von Milchsäure oder Essigsäure eine ähnliche Beschleunigung des Oxydationsprozesses, wie die säurehaltige Peroxydase. Die angewandte Tyrosinase-Fraktion zeigte einen ungemein hohen Aschegehalt (32.4 %).

Faßt man nun die Ergebnisse vorliegender Untersuchung zusammen, so kommt man zur Schlußfolgerung, daß die Wirkung der Tyrosinase von der gewöhnlichen Oxydase, bzw. des Systems Peroxydase-Hydroperoxyd, völlig verschieden ist. Allem Anschein nach gehört die Tyrosinase zu einer besonderen Klasse von Oxydationsfermenten, deren oxydierende Wirkung sich auf Körper mit weniger labilem Wasserstoff erstreckt.

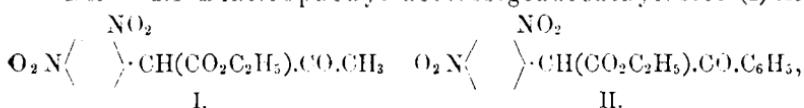
Genf, Privatlaboratorium.

## 91. W. Borsche: Über $\alpha$ -Dinitrophenyl-acetessigester und verwandte Verbindungen. I.

[Aus dem Allgemeinen Chemischen Institut der Universität Göttingen.]

(Eingegangen am 9. Februar 1909.)

Der  $\alpha$ -2.4-Dinitrophenyl-acetessigsäureäthylester (I) ist



zuerst auf Veranlassung von J. Wislicenus von J. Heckmann aus Natriumacetessigester und 2.4-Dinitrobrombenzol dargestellt, aber nur ziemlich flüchtig untersucht worden<sup>1)</sup>. Heckmann beschränkte sich darauf, das Verhalten der neuen Verbindung gegen siedende zehnprozentige Schwefelsäure, durch die sie in Dinitrophenyl-essigsäure, Essigsäure und Alkohol gespalten, und gegen alkoholische Kalilauge, durch die sie in komplizierter Weise zersetzt wird, zu studieren. Später wird der Ester noch einmal von V. v. Richter erwähnt. Er fand bei einer Wiederholung der Heckmannschen Versuche, daß

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. **220**, 128 [1883].