

wurden 0.05 g nicht weiter gereinigtes Bariumacetat isoliert, während sich nach der Berechnung 0.04 g erwarten ließen.

Durch konzentrierte Salzsäure wird der Äther überraschenderweise in das schon beschriebene Acetobufotalien übergeführt. Man löst in wenig konzentrierter Salzsäure, läßt etwa 10 Minuten lang stehen, fällt dann mit Eis aus und krystallisiert wie oben aus wenig Alkohol um. Das erhaltene Produkt war nach Schmelzpunkt, Mischprobe, Krystallform und Eigenschaften mit dem auf dem beschriebenen Wege dargestellten Präparat in jeder Beziehung identisch.

429. Heinrich Wieland: Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge.

[Aus dem Chem. Laborat. der Kgl. Akademie d. Wissensch. zu München.]

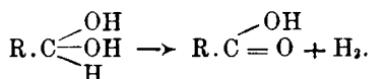
(Eingegangen am 10. Oktober 1913.)

Im letzten Jahre habe ich an mehreren Beispielen gezeigt, daß man imstande ist, mit fein verteilten Platinmetallen schon bei gewöhnlicher Temperatur aus vielen Verbindungen Wasserstoff herauszunehmen, sie zu dehydrieren¹⁾). Das Palladium, das zumeist verwendet wurde, verliert dabei in dem Maße, als es sich mit Wasserstoff sättigt, seine Aktivität, da man aber mit Sauerstoff oder anderen Wasserstoff-Akzeptoren, wie Chinon, Methylenblau usw., den Wasserstoff entfernen kann, so läßt sich im Sinne der Übertragung das Palladiumschwarz allgemein als Katalysator bei Oxydations-, genauer Dehydrierungs-Prozessen benutzen. Nach dieser Betrachtungsweise besteht also die katalytische Wirkung des Palladiums oder Platins nicht darin, daß diese Metalle den molekularen Sauerstoff (unter intermediärer Bildung von Peroxyden) aktivieren, es handelt sich vielmehr um eine durch das Metall bewirkte Aktivierung des Wasserstoffs, wie sie auch bei der Vereinigung des Knallgases zum Ausdruck kommt.

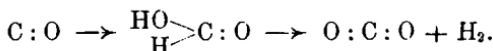
Versuche, einen gleichen Reaktionsverlauf auch bei andren Oxydationsvorgängen festzustellen, haben dann zu dem Resultat geführt, daß auch scheinbar echte Oxydationen, bei denen also Sauerstoff in das zu oxydierende Molekül hineingetragen wird, durch eine Dehydrierung zustande kommen können. So lassen sich Aldehyde (über

¹⁾ B. 45, 484 [1912].

ihre Hydrate) in gleicher Art wie Alkohole zur Carbonsäure dehydrieren¹⁾:



Für das Kohlenoxyd wurde als Zwischenprodukt der Verbrennung zu Kohlendioxyd die Ameisensäure nachgewiesen²⁾:



Von den so gewonnenen Resultaten als Grundlage aus habe ich dann die Bearbeitung der wichtigsten Vorgänge dieser Art, der biologischen Oxydationen, in Angriff genommen, mit dem Ziel, zu prüfen, ob nicht diese zum größten Teil in ihrem Mechanismus noch unerklärten Reaktionen durch die Dehydrierungs-Theorie dem Verständnis nähergebracht werden könnten. Bekanntlich geht die fast allgemein herrschende Auffassung der Biologen und auch der Chemiker, die sich mit diesem Thema befaßt haben, dahin, daß die in den Zellen vor sich gehenden Oxydationen und Verbrennungen ihren raschen Verlauf der Mithilfe von sauerstoff-aktivierenden Fermenten verdanken.

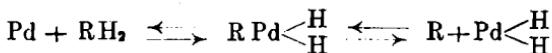
Für die experimentelle Bearbeitung des Problems waren folgende Gesichtspunkte maßgebend: Zuerst mußte festgestellt werden, daß, in Anlehnung an die bisher erhaltenen Resultate, die Stoffe, die das Material für die biologischen Oxydationen bilden, überhaupt dehydrierbar sind. Es mußte also möglich sein, sie bei Ausschluß von Sauerstoff durch Palladiumschwarz in Wasserstoff und ihr Oxydationsprodukt zu zerlegen. Von dieser Umsetzung ist zu erwarten, daß sie sich in dem Maße verlangsamen wird, als sich das Metall mit Wasserstoff belädt. Sie wird aber kontinuierlich verlaufen, wenn man den aufgenommenen Wasserstoff durch einen geeigneten Akzeptor dauernd entfernt. Ein solcher ist natürlich vor allem der Sauerstoff, aber da wir ihn gerade hier ausschließen wollen, nehmen wir statt seiner, wie oben, andre Substanzen, die leicht aktivierten Wasserstoff aufnehmen, z. B. Chinon oder Methylenblau. Es gilt also zuerst zu zeigen, daß Oxydationen, die von biologischer Wichtigkeit sind, bei Gegenwart von Palladium auch ohne Beteiligung von Sauerstoff verlaufen können. Damit ist aber an sich nur eine Nachahmung des biologischen Oxydationsvorganges mit einem durchaus zellfremden Material als Katalysator erreicht. Bewiesen wird die Dehydrierung als treibende Ursache von biologischen Oxydationen erst dann, wenn wir das Palla-

¹⁾ B. 45, 2606 [1912].

²⁾ B. 45, 679 [1912].

diumschwarz durch ein organisches Ferment ersetzen können, das uns mit einem andren Wasserstoff-Akzeptor als Sauerstoff dasselbe leistet. Wieweit bis jetzt die experimentelle Bearbeitung der Frage, die mich naturgemäß für längere Zeit beschäftigen wird, erfolgreich gewesen ist, soll im Folgenden dargetan werden.

Ich habe zugunsten einer anschaulichen Auseinandersetzung im Vorstehenden immer von einer direkten Wegnahme des Wasserstoffs durch den Katalysator gesprochen. In der Tat wird in den meisten Fällen bei Anwendung von Palladiumschwarz der Wasserstoff auch als solcher weggenommen und von dem Metall absorbiert. Es haben sich aber auch Beispiele gefunden, bei denen der Wasserstoff, ohne seine Bindung ganz aufzugeben, nur aktiviert wird. Charakteristisch hierfür sind die Alkohole, die allein durch Palladium nur langsam in Aldehyd und Wasserstoff zerlegt werden, die aber in weit stärkerem Maße, als der Konzentration des abgespaltenen Wasserstoffs entsprechen könnte, Chinon und chinoide Farbstoffe reduzieren. Ich habe daher angenommen, daß die erste Stufe der durch ein verteilt Metalle bewirkten Dehydrierung sich in einer (wahrscheinlich chemischen) Vereinigung der Komponenten zu einer labilen Additionsverbindung ausdrückt; in ihr ist der Wasserstoff ähnlich wie im Palladiumwasserstoff aktiv geworden. Durch das Schema:



möchte ich diese Auffassung und dabei auch die Gleichgewichtsbeziehungen zwischen Hydro- RH_2 und Dehydro-Körper R zur Wiedergabe bringen. Die getrennt geschriebenen Wasserstoffatome sollen aktiven Wasserstoff bedeuten. Bei den organischen Fermenten, von denen im Späteren die Rede sein wird, wird die Phase $\text{R} + \text{Pd} \begin{smallmatrix} \text{H} \\ \diagdown \\ \diagup \end{smallmatrix}$ meist fehlen.

1. Kapitel. Die Verbrennung der Kohlehydrate.

Von den oxydatischen Abbauprozessen, die im Innern der Zelle vor sich gehen, ist die langsame Verbrennung des Traubenzuckers zu Kohlendioxyd und Wasser, der Atmungsprozeß, der wichtigste. Es hat mit Recht von jeher die Verwunderung der Chemiker und Physiologen erregt, daß das nicht sonderlich leicht oxydierbare Molekül der Glucose durch den reaktionsträgen Sauerstoff der Atmosphäre in den Geweben schon bei niedrigen Temperaturen glatt zu Kohlendioxyd und Wasser verbrannt wird. Schon aus Gründen der Definition kann es keinem Zweifel unterliegen, daß Katalysatoren irgend welcher Art bei der Beschleunigung dieser an sich unendlich langsam verlau-

fenden Reaktion beteiligt sein müssen, nur hat man diese wohl ihrer Empfindlichkeit wegen bis jetzt nicht vom Lebensprozeß lostrennen können. Von ihrer Wirkungsweise hat man allgemein die Vorstellung, daß sie in einer Aktivierung des Sauerstoffs bestehe, der in peroxydartiger Bindung aufgenommen werde. Ich habe nun mit sauerstofffreiem Palladiumschwarz schon bei Bluttemperatur (ca. 40°) eine ziemlich rasch verlaufende Dehydrierung des Traubenzuckers herbeiführen können, bei der (und das ist das wichtige) schon von Anfang an eine reichliche Bildung von Kohlendioxyd auftrat. Mit der zunehmenden Sättigung des Metalls durch Wasserstoff schwächt sich seine Wirksamkeit ab. Man erreicht aber ein Weiterschreiten der Reaktion, wenn man den abgespaltenen Wasserstoff an Chinon oder Methylenblau bindet. Es ist also möglich, bei Ausschluß von Sauerstoff den Traubenzucker mit Hilfe von Palladiumschwarz allein oder mit ihm und chinoiden Verbindungen als Wasserstoff-Akzeptoren bei niedrigen Temperaturen weitgehend zu verbrennen.

Zu den Versuchen wurde das Palladiumschwarz nach der beschriebenen Methode hergestellt; es befand sich stets unter Stickstoff, der in einem Gasbehälter über alkalischer Hydrosulfitlösung vollkommen von Sauerstoff befreit war. Die Reaktionen mit der Traubenzuckerlösung vollzogen sich in der Willstätter-Waserschen Schüttelbirne, die für die vorliegenden Zwecke seitlich mit einem eingeschmolzenen Einleitungsrohr versehen war. Dieses Rohr stand mit dem Stickstoffreservoir und durch ein T-Rohr mit einem kleinen Tropftrichter in Verbindung, der die Einführung der Reaktionslösung bei Sauerstoffausschluß ermöglichte. Die beiden Röhren der Birne waren durch gute Gummischläuche mit Schraubhahn absolut dicht verschließbar. Es wurde nun zuerst das Palladium im Stickstoffstrom in die Birne eingefüllt, dann wurde evakuiert, hierauf die Birne mit Stickstoff gefüllt, von neuem evakuiert und schließlich durch das seitliche mit Tropftrichter und Stickstoffbehälter verbundene Ansatzrohr die Lösung in die zur Vermeidung von Temperaturerhöhung in Eis gekühlte Birne hineingesaugt. Die beiderseits verschlossene Birne kam dann an den Schüttelapparat. Zur Bestimmung der gebildeten Kohlensäure wurden an die wie vorher geschaltete Birne zwei mit titriertem Barytwasser beschickte Waschflaschen angesetzt. Sie wurden evakuiert, dann gegen die Pumpe geschlossen und langsam mit der Birne in Verbindung gesetzt. Durch wiederholtes Evakuieren und Nachfüllen von Stickstoff konnte so alles entstandene Kohlendioxyd in den Waschflaschen aufgefangen werden. Der im Palladium festgehaltene Wasserstoff wurde wie früher bestimmt.

I. 10 ccm einer 12.5-prozentigen Traubenzuckerlösung wurden mit 2.7 g Palladiumschwarz 12 Stunden bei 40° geschüttelt. Erhalten wurden 0.028 g CO₂ und 41 ccm Wasserstoff. Der Titer der sauren Lösung entsprach 6.3 ccm H_{10} -Ionen.

II. 30 ccm einer 12-prozentigen Lösung wurden 8 Stunden bei 40° mit 7.5 g Palladiumschwarz geschüttelt. Erhalten 0.052 g CO₂ und 125 ccm Wasserstoff. Titer 22 ccm H_{10} -Ionen.

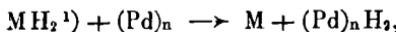
III. 20 ccm einer 9 prozentigen Lösung wurden 10 Stunden mit 16 g Palladiumschwarz bei 40° geschüttelt. Erhalten 0.058 g CO₂ und 315 ccm Wasserstoff. Titer 24 ccm H_{10} -Ionen.

IV. 15 ccm einer 10-prozentigen Lösung mit 2 g Palladiumschwarz 6 Stunden bei 60° geschüttelt. Erhalten 52 ccm Wasserstoff.

Wird bei der Dehydrierung des Traubenzuckers Chinon zugegeben, so zeigt die bald erfolgende Krystallisation von Chinhydrion an, daß hier der abgespaltene Wasserstoff zur Bildung von Hydrochinon verwendet wird. Die Kohlensäure wurde hier ebenfalls nachgewiesen. Methylenblau wird sehr rasch entfärbt.

Ein quantitativer Versuch der Verbrennung von Traubenzucker durch Palladiumschwarz und Methylenblau wurde in der Weise angestellt, daß zu einer Lösung von 0.18 g Glucose in 20 ccm Wasser bei Gegenwart von 5 g Palladiumschwarz die Farbstofflösung unter Beobachtung der angeführten Kautelen nach und nach zugegeben wurde. Die Kohlensäure wurde im Verlauf des Versuches und nach seiner Beendigung ausgepumpt und bestimmt. Nach 1½-stündigem Schütteln bei Zimmertemperatur wurden 30 ccm H_{100} -Methylenblaulösung entfärbt. Dabei wurden 0.022 g CO₂ gebildet. Dann wurde mit weiteren 15 ccm H_{20} -Lösung 2 Stunden bei 35° bis zur Entfärbung geschüttelt, wobei weitere 0.014 g CO₂ entstanden. Das gesamte Kohlendioxid entspricht einer Totalverbrennung der angewandten Glucose von 14%.

Es ist aus folgenden Gründen nicht möglich, die Verbrennung mit Methylenblau bis zum Ende durchzuführen. Von einer gewissen Konzentration des Leukomethylenblaus an bleibt die Hydrierung des Farbstoffs stehen, da sie durch die entgegengesetzte Reaktion, die Dehydrierung des Leukosalzes



zum Stillstand gebracht wird. Es besteht hier dasselbe Gleichgewicht, wie es für das System Chinon-Hydrochinon beobachtet wurde. Dazu kommt, daß sowohl der Farbstoff, wie sein Leukosalz vom Palladiumschwarz mechanisch absorbiert werden und dadurch dessen Wirksamkeit außerordentlich stark herabsetzen. Man darf aus diesem zweiten Grunde bei allen derartigen Untersuchungen sich nicht mit der Entfärbung der Methylenblaulösung begnügen, sondern muß jeweils durch Oxydation die gebildete Leukoverbindung besonders nachweisen. Durch

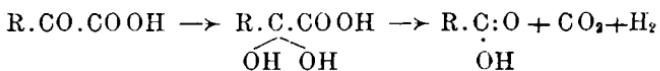
¹⁾ M = Methylenblau, MH₂ = Leukomethylenblau.

einen eigenen Versuch wurde der Kontrolle halber festgestellt, daß bei der Adsorption von Methylenblau durch Palladiumschwarz keine chemische Reaktion stattfindet, daß insbesondere keine Spur von Kohlendioxyd dabei entwickelt wird.

Den chinoiden Wasserstoff-Akzeptoren gegenüber hat natürlich der Sauerstoff, dessen Hydrierung nur das indifferente Wasser liefert, ganz beträchtliche Vorteile. Nachdem über das Prinzip seiner Wirkungsweise durch das Ausgeführte Klarheit geschaffen war, habe ich in Gemeinschaft mit Hrn. K. Schwarz auch den Sauerstoff zur dehydrierenden Verbrennung der Glucose herangezogen. Dabei konnten 2 g Traubenzucker in 10-prozentiger Lösung bei 40° mit relativ wenig Palladiumschwarz (1 g) innerhalb 80 Stunden zu über 20% total verbrannt werden; es wurden 0.607 g CO₂ aufgefangen.

Es war nun weiter von Interesse zu erfahren, an welcher Stelle des Moleküls die Dehydrierung zuerst einsetzt. Man könnte geneigt sein, die rasche Verbrennbarkeit auf eine etwa vorhandene Aldehydgruppe zurückzuführen. Versuche mit Gluconsäure haben aber ergeben, daß hier die Dehydrierung noch schneller verläuft als bei der Glucose, 20 ccm einer 5-prozentigen Lösung (von Kahlbaum) gaben mit 4 g Schwarz nach einer Stunde bei 35° 0.034 g CO₂. Dann wurden 10 ccm ^{n/10}-Methylenblaulösung zugegeben; nach weiteren 8 Stunden waren wieder 0.031 g CO₂ gebildet worden.

Es scheint nach diesem Ergebnis, als ob der Zerfall des Traubenzucker-Moleküls in der Weise stattfindet, daß die jeweils entstehende Oxycarbonsäure durch die Dehydrierung in die Ketocarbonsäure übergeführt wird, die dann in CO₂ und in den nächstniederen Aldehyd oder unter weiterer Dehydrierung direkt in CO₂ und in die nächstniedere Säure zerfällt:



Milchsäure, die vielfach für das erste Produkt der Traubenzucker-Verbrennung in den Geweben gehalten wird, konnte nie gefunden werden. Die Untersuchung der Zwischenprodukte beansprucht eine eigene Untersuchung, als deren Ergebnis sich ein exakter Einblick in den Gang des Abbaues erhoffen läßt.

Mit Rücksicht auf ihre biologische Bedeutung wurde auch die Dehydrierung der Milchsäure untersucht. Sie führt, wie zu erwarten, zur Brenztraubensäure, während das Palladium gleichzeitig den Wasserstoff aufnimmt.

16 ccm ^{n/1}-Milchsäure wurden bei Zimmertemperatur 8 Stunden lang mit 1.53 g Palladiumschwarz geschüttelt. Das Metall enthielt 20 ccm Wasserstoff, in der Lösung ließ sich Brenztraubensäure

als Phenylhydrazone nachweisen. Daneben wurde in geringer Menge Kohlendioxyd erhalten. Gibt man der Reaktion den Charakter einer Übertragungskatalyse, indem man durch Schütteln mit Sauerstoff den im Palladium gebundenen Wasserstoff wegnimmt, so entsteht — am besten bei 40—50° — soviel Brenztraubensäure, daß sich die Reaktion zu deren präparativer Gewinnung vorschlagen läßt. Außerdem wird dann das Kohlendioxyd in größerer Menge und, zu ihm gehörig, Essigsäure angetroffen. Es ist noch zu untersuchen, ob diese Spaltung des Moleküls auf Grund einer Hydrolyse vor sich geht. Dann besäße das Palladiumschwarz die Wirkung einer Carboxylase, eines Fermentes, das in den letzten Jahren durch wichtige Arbeiten von Neuberg bekannt geworden ist. Denkbar wäre auch, daß das Hydrat der Ketosäure, wie oben vermutet, direkt zu Kohlensäure und Essigsäure dehydriert wird, denn auch Oxalsäure reagiert mit Palladiumschwarz sofort unter Aufbrausen, indem sie in Wasserstoff und Kohlendioxyd zerfällt.

2. Kapitel. Die Oxydasen.

Während es bis jetzt noch nicht gelungen ist, den Vorgang der eigentlichen Atmung vom anatomischen Substrat der Zelle loszulösen, kennt man seit längerer Zeit schon eine Reihe aus Sekreten oder auch aus Preßsäften tierischer und pflanzlicher Organe isolierbarer Fermente, die die Eigenschaft haben, bestimmte Oxydationen, deren biologische Bedeutung vielfach noch unerkannt ist, zu beschleunigen. Ihre Wirkung ist spezifischer Natur. Sie aktivieren nach der herrschenden Anschauung teils den molekularen Sauerstoff, indem sie ihn peroxydartig addieren und in reaktionsfähiger Form weitergeben (Oxydasen), teils sind sie auch imstande, vorhandene Peroxyde (z. B. Hydroperoxyd), wie man glaubt, nach Art der Ferrosalze zu aktivieren (Peroxydasen). Da die Oxydationsreaktionen, die durch die Beteiligung dieser Fermentgruppe beschleunigt werden, fast ausnahmslos in der Wegnahme locker gebundenen Wasserstoffs bestehen, so enthalten sie rein chemisch betrachtet nichts, was ihrer Auffassung als Dehydraturungsvorgänge im oben dargelegten Sinne widerspräche. Die wichtigsten Reaktionen, bei denen die katalytische Beteiligung solcher Oxydationsfermente festgestellt worden ist, sind die folgenden:

- I. Oxydation von Ameisensäure und Oxalsäure zu Kohlendioxyd,
- II. " " Phenolen zu Chinonen. Bläbung von Guajactinktur,
- III. " " aromatischen Aminen,
- IV. " " Alkoholen zu Säuren und
- V. " " Aldehyden " " .

Auch für diese Gruppe bestand die Vorarbeit darin, zu zeigen, daß durch die anorganische Dehydrase, das Palladiumschwarz, bei Aus-

schluß von Sauerstoff eine Zerlegung der zu oxydierenden Substanzen in Wasserstoff und das Dehydro(Oxydations-)Produkt möglich sei. Dieser Nachweis liegt für die Ameisensäure schon seit langem vor, er ist auch für die Oxalsäure (vergl. S. 3333) und durch meine letzjährigen Arbeiten für die Alkohole und Aldehyde ebenfalls schon erbracht. Auch für ein Phenol, das Hydrochinon, ist eine teilweise, durch ein Gleichgewicht eingeschränkte Dehydrierung zu Chinon festgestellt worden. Andre Phenole werden ebenfalls dehydriert. Diese Beobachtung wurde jetzt am Phenol selbst, am *m*-Kresol, Guajacol und am Pyrogallol erweitert. Da die Dehydrierungsprodukte in Wasser unlöslich sind und sich auf dem feinverteilten Metall niederschlagen, so ist dessen Aktivität eine rasche Grenze gesteckt. Auch hier wurden die Versuche dahin ausgedehnt, daß mit der Dehydrierung die gleichzeitige Hydrierung von Methylenblau verbunden wurde.

Phenol. 0.5 g Phenol in 30 ccm Wasser wurden mit 2 g Palladium-schwarz 6 Stunden lang in der evakuierten Birne geschüttelt. Die anfangs bräunliche, zum Schluß farblose Lösung wurde in Stickstoff-Atmosphäre von dem schwer filtrierbaren Niederschlag abgesaugt, dieser öfters durch Waschen mit Wasser von überschüssigem Phenol befreit. Dann wurde das unlösliche Dehydroprodukt mit Aceton vollständig herausgelöst, das Aceton wiederholt mit Wasser weggeschwemmt, und im Palladium durch Glühen im Quarzrohr der Wasserstoff bestimmt. 0.8 g enthielten 9.4 ccm; im ganzen waren also 23.5 ccm Wasserstoff aus dem Phenol abgespalten worden. Die Acetonlösung hinterließ nach dem Verdunsten ca. 0.02 g eines braunen amorphen Körpers, der wohl ein Oxydationsprodukt des *p*-Diphenols darstellt.

0.3 g Phenol in 20 ccm Wasser, mit 1.5 g Palladiumschwarz und 20 ccm H_{100} -Methylenblaulösung geschüttelt. Nach 10 Minuten war die Lösung entfärbt, sie wurde durch Eisenchlorid wieder blau, enthielt also Leukomethylenblau. Phenol und Methylenblau reagieren allein nicht mit einander.

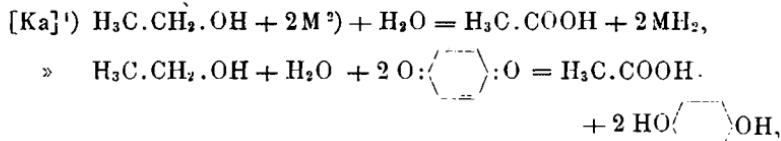
Guajacol. 0.2 g in 30 ccm Wasser, mit 1.2 g Palladiumschwarz 10 Stunden lang geschüttelt. Anfangs wird die Lösung rot, zum Schluß ist sie farblos infolge der Unlöslichkeit des Dehydrokörpers. Er wurde, wie beim Phenol, mit Aceton isoliert und in Gestalt eines roten, amorphen Pulvers (0.025 g) erhalten. Das Palladium enthielt 42 ccm Wasserstoff. Bei dieser Dehydrierung entsteht ebenso wie bei der des Pyrogallols Kohlensäure.

Beim Pyrogallol waren die Erscheinungen die gleichen. Hier entstand neben Wasserstoff (und Kohlensäure) das rote Purpurogallin. Die Lösung färbt sich beim Schütteln alsbald orange. Sucht man den abgespaltenen Wasserstoff auf Methylenblau abzuladen — Pyrogallol und Methylenblau reagieren für sich nicht mit einander —, so erhält man einen tiefgrünen unlöslichen Farbstoff, der durch Aceton dem Metall entzogen werden kann.

Auch Anilin läßt sich auf diese Weise dehydrieren. 0.5 g der Base wurden in essigsaurer Lösung mit 1.8 g Palladiumschwarz

4 Stunden lang geschüttelt. Bei der gleichen Behandlung wie oben wurden dann 58 ccm Wasserstoff gefunden, denen ein violettroter, unlöslicher Dehydrokörper gegenüberstand.

Tyrosin und Harnsäure lassen sich durch Palladium nicht oxydieren, d. h. dehydrieren. Man kann mit ihm also die Wirkung der Tyrosinase und Urikase nicht erreichen. Da aber ohne Zweifel hier die Funktion der spezifischen Oxydase mit der eines hydrolysierenden Ferments gepaart ist, so ändert dieser negative Befund nichts an der Tatsache, daß die bekannten durch oxydierende Fermente beschleunigten Reaktionen durch die Mithilfe von Palladium-schwarz bei Ausschluß von Sauerstoff nachgeahmt werden können. Für den Mechanismus der Ferment-Tätigkeit selbst wird damit eine gleiche Anschauung zwar nahegelegt, bewiesen ist sie aber erst dann, wenn sich der Oxydationsprozeß bei Gegenwart des Ferments unter Ersatz des Sauerstoffs durch irgend einen andren Wasserstoff-Akzeptor durchführen läßt. Dann kann natürlich von einer Sauerstoff-Aktivierung nicht mehr die Rede sein. Diesen Beweis kann ich nun für den am längsten bekannten und wohl auch wichtigsten biologischen Oxydationsprozeß, dessen Katalysator man kennt, für die Verwandlung des Alkohols in Essigsäure durch das Ferment der Essigsäure-Bakterien erbringen. Sowohl mit lebenden Bakterien wie mit Dauerpräparaten, die nach Buchner gewonnen waren, ließ sich Alkohol ohne jede Spur von Sauerstoff durch Methylenblau und auch durch Chinon direkt in Essigsäure überführen. Dabei lieferten quantitative Versuche genau so viel Essigsäure als dem reduzierten Farbstoff entsprach. Es gelten also die Gleichungen:

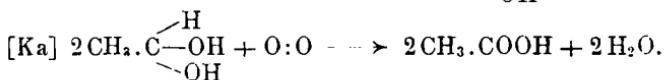
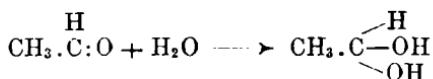


daher auch $[\text{Ka}] \quad \text{H}_3\text{C}.\text{CH}_2.\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}: \text{O} = \text{H}_3\text{C}.\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$.

Die Phase des Acetaldehyds (vergl. unten) bildet dabei natürlich die Zwischenstufe, und man kommt daher, wenn man den Verlauf der Essigsäure-Gärung in seine einzelnen Bestandteile zerlegt, zu folgendem Bild:

¹⁾ Mit diesem Symbol soll kurz ausgedrückt werden, daß die Reaktion unter Mitwirkung eines Katalysators vor sich geht.

²⁾ $\text{M} = \text{Methylenblau}$, $\text{MH}_2 = \text{Leukomethylenblau}$.



Das erste Hydrierungsprodukt des molekularen Sauerstoffs, das Hydroperoxyd, $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH} + \text{O}: \text{O} \longrightarrow \text{CH}_3 \cdot \overset{\text{H}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}} \text{:O} + \text{HO} \cdot \text{OH}$, tritt bei der Geschwindigkeit, mit der es durch aktiven Wasserstoff in 2 Mol. Wasser zerlegt wird, nicht in Erscheinung.

Für die ersten Versuche wurden Schnellessigbakterien verwandt, die auf Buchenholzspänen direkt dem Betrieb entnommen waren¹⁾). Hierbei ließ sich jedoch kein eindeutiges Resultat erzielen, da der Farbstoff ziemlich rasch von der Holzsubstanz verschluckt wurde. Schleimessigkulturen, für deren Überlassung ich Hrn. Obermedizinalrat Prof. von Gruber und Hrn. Dr. A. Fürst zu lebhaftem Dank verpflichtet bin, entfärbten Methylenblau überhaupt nicht. Hier bildet offenbar der Schleim für den Farbstoff ein Hindernis, ins Innere der Zelle zu gelangen. Dagegen erhielt ich mit *Bacterium aceti* (Hansen), auf Bierwürze gezüchtet, alsbald ein klares positives Resultat. Die reifen Kulturen wurden auf einem feinmaschigen Sieb gründlich mit frischem Wasser gewaschen, hierauf in einer Menge, entsprechend ca. 2 g Trockensubstanz, in einen kleinen Fraktionierkolben gebracht, dort mit reinem Stickstoff von aller Luft befreit und hierauf aus einem oben aufgesetzten Tropftrichter mit 25 ccm 5-prozentigen wäßrigen Alkohols übergossen. Dazu gab man zuerst 4 ccm $\text{n}/_{100}$ -Methylenblaulösung; sie wurde im Verlauf einer Stunde entfärbt. Über Nacht wurden 2 ccm $\text{n}/_{10}$ -Lösung ebenfalls verbraucht. So kounten im Verlauf von 12 Tagen weitere 16 ccm $\text{n}/_{10}$ -Methylenblaulösung sukzessive zugesetzt und zur Entfärbung gebracht werden, entsprechend 0.051 g gebildeter Essigsäure. Es scheint, daß das Essigsäurebacterium imstande ist, unter diesen neuen Bedingungen wenigstens eine Zeitlang weiter zu existieren; die Menge des umgesetzten Alkohols ist nämlich bei lebendem Material erheblich größer als mit Dauerpräparaten, in denen nur das gerade vorhandene Ferment zur Wirkung kommt. Trotzdem habe ich für die quantitativen Be-

¹⁾ Hrn. Dr. Rob. Riemerschmid danke ich bestens für die Bereitwilligkeit, mit der er mir das für diese Versuche nötige Material zur Verfügung stellte.

stimmungen die mit Aceton und Äther getötete Bakterienmasse benutzt, da sie leichter und vollständiger zu reinigen und weit bequemer zu handhaben ist. In der Züchtung und Verarbeitung habe ich mich an die Angaben von Buchner und Gaunt¹⁾ gehalten mit dem einzigen Unterschied, daß ich das Waschen, wie schon erwähnt, auf einem engmaschigen Sieb (1600 Öffnungen pro qcm) vornahm. Die Präparate wurden so in Gestalt eines fast farblosen, staubenden Pulvers erhalten; sie wurden im Vakuum über Schwefelsäure und Ätzkali aufbewahrt und haben bis jetzt ihre Aktivität 6 Wochen lang beibehalten. Die Anordnung war bei all den zu beschreibenden Versuchen die gleiche wie oben. Man hat vor allem für absoluten Luftausschluß Sorge zu tragen, was bei dem trocknen toten Material besonders leicht dadurch zu erreichen ist, daß man das Pulver zu Anfang im Reaktionskolben unter Vakuum setzt, das Vakuum mit Stickstoff ausfüllt und dann wieder erneuert. Es seien im Folgenden zwei quantitative Versuche mit Bakteriensubstanz von verschiedener Herstellung aufgeführt.

I 3 g Bakterien, 25 ccm 5-prozentiger Alkohol, Temperatur 28°. 2 ccm $n/100$ -Methylenblau waren nach 10 Minuten entfärbt. Weitere 7 ccm $n/20$ nach 50 Minuten. Über Nacht wurden noch 8 ccm der gleichen Lösung aufgebraucht. Jetzt wurde der Kolben zur Abtötung des Ferments 5 Minuten lang in ein siedendes Wasserbad gesetzt, hierauf der Inhalt durch ein Koliertuch filtriert, gut gewaschen und dann das Filtrat zum Zweck der Essigsäurebestimmung destilliert. Es wurde auf wenige Kubikzentimeter eingedampft, dann nach Zugabe von 10 ccm Wasser von neuem destilliert. Dies wurde dreimal wiederholt, bis die zum Schlusse übergehenden Tropfen nicht mehr die mindeste saure Reaktion zeigten. Die vereinigten Destillate wurden, mit 5 ccm $n/10$ -Kalilauge neutralisiert, auf dem Wasserbade auf ca. 5 ccm eingeengt; sie brauchten jetzt 0.8 ccm $n/50$ -Salzsäure zur Neutralität. Es waren somit bei dem Versuch 24.2 ccm $n/50$, das sind 0.029 g Essigsäure entstanden.

Davon ist in Abzug zu bringen die Menge Essigsäure, welche die toten Bakterienleiber enthalten. Es wurde zu ihrer Bestimmung 1 g Substanz mit 10 ccm Wasser übergossen und 30 Minuten lang bei 100° inaktiviert. Hierbei verliert das Präparat seine Wirksamkeit vollkommen, es konnten nicht einmal 5 Tropfen $n/100$ -Methylenblau im Verlauf eines Tages bei 28° entfärbt werden. Bei der genau wie oben durchgeföhrten Verarbeitung dieses Kontrollversuches wurden die 1.2 ccm $n/50$ entsprechende Menge, das sind 0.0015 g gefunden. Man hat also oben $0.029 - 0.0045 = 0.0245$ g Essigsäure, während den verbrauchten 15.4 ccm $n/20$ -Methylenblaulösung 0.0231 g Essigsäure entsprechen würden.

II. 4 g Bakteriensubstanz, 30 ccm 5-prozentiger Alkohol, Temperatur 30°. Nach 15 Minuten waren 10 ccm $n/100$ -Methylenblau entfärbt, nach 55 Minuten 3 ccm $n/20$, nach 215 Minuten weitere 6 ccm, über Nacht weitere

¹⁾ A. 349, 151 [1906].

7 ccm, im ganzen also 18 ccm H_2O . Die Verarbeitung ergab 0.030 — 0.006 = 0.024 g Essigsäure gegenüber den berechneten 0.027 g.

Zur völligen Sicherheit wurde die durch sauerstofffreie Gärung gewonnene Essigsäure in das Silbersalz übergeführt, dieses aus heißem Wasser umkristallisiert und zur Analyse gebracht.

11.76 mg, im Quarziegel mit Salzsäure abgeraucht, gaben 10.06 mg AgCl.

$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Ag}$. Ber. Ag 64.67. Gef. Ag 64.42.

Essigsäure-Gärung mit Chinon. 0.7 g Dauerpräparat wurden unter Ausschluß von Luft wie bisher mit einer Lösung von 0.02 g Chinon in 5 ccm 5-prozentigem Alkohol zusammengebracht. Die anfangs auftretende braun-gelbe Färbung war nach dem Stehen über Nacht mit dem Chinon verschwunden. Die Lösung reagierte jetzt deutlich sauer und gab an Äther vollkommen reines, farbloses Hydrochinon. Die gleichzeitig entstandene Essigsäure war außer durch die saure Reaktion auch durch den Geruch (als Rückstand vom Äther) deutlich wahrnehmbar.

Weitere Versuche mit dem Essigsäure-Ferment ergaben, daß auch, wie zu erwarten war, Acetaldehyd mit Methylenblau zu Essigsäure dehydriert werden kann. Eine 5-prozentige Lösung entfärbte in 30 Minuten 2 ccm H_2O -Lösung. Methylalkohol wird erheblich langsamer vergoren als Äthylalkohol, doch trat auch deutliche Entfärbung ein. Nach Verbrauch von 1 ccm obiger Lösung wurde der Versuch abgebrochen. Das Gleiche gilt für Formaldehyd, der in 1.5-prozentiger Lösung bei Gegenwart des Fermentes Methylenblaulösung ebenfalls, wenn auch langsam, entfärbte. Dagegen wirkt Ameisensäure überhaupt nicht ein; eine 2-prozentige Lösung vermochte nach 45 Minuten noch nicht 5 Tropfen Methylenblaulösung zu entfärben.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß Traubenzucker durch Essigsäure-Ferment und Methylenblau sehr energisch dehydriert wird. Auch dabei treten, wie oben bei Anwendung von Palladiumschwarz, beträchtliche Mengen von Kohlendioxyd auf, und wir haben somit den ersten experimentellen Beleg für den Vorgang der Kohlehydrat-Verbrennung im Sinne der Dehydrierungstheorie.

Die behandelten Reaktionen stimmen mit Ausnahme des Formaldehyds, dessen Vergärung strittig ist¹⁾, mit den durch die lebenden Bakterien mit Hilfe von Sauerstoff ausgeführten überein.

Im Preßsaft von Essigsäure-Bakterien war kein dehydrierendes Ferment anzutreffen, was vollkommen im Einklang steht mit den Beobachtungen von Buchner und Gaunt²⁾, die den Preßsaft für

¹⁾ Vergl. F. Lafar, Die Essigsäure-Gärung, Jena, Verlag F. Fischer, 1913.

²⁾ a. a. O. S. 179.

die normale, mit Sauerstoff vor sich gehende Essigsäuregärung auch unwirksam fanden.

3. Kapitel. Die reduzierenden Fermente.

Betrachtet man die Oxydationsvorgänge als Dehydrierungen, wie dies nach den bisherigen Resultaten wenigstens für einige wichtige Fälle exakt bewiesen ist, so enthalten sie gleichzeitig in sich eingeschlossen einen Reduktionsprozeß, da ja der durch das Ferment aktivierte Wasserstoff von irgend einem Akzeptor aufgenommen werden muß. Dabei ist naturgemäß die Hydrierung des molekularen Sauerstoffes zu Wasser $O = O + 4 H \rightarrow 2 H_2O$ dem Wesen nach ebenso gut eine Reduktion, wie die Hydrierung des Methylenblaus, des Chinons, von Pflanzenfarbstoffen¹⁾ oder die von Nitraten²⁾ zu Nitriten und Ammoniak, und andre. Auch die Mitwirkung des Wasserstoffperoxyds an Oxydationsreaktionen denke ich mir so, daß es als leicht hydrierbarer Stoff die Funktion hat, Wasserstoff aufzunehmen:



zu dehydrieren. Hydroperoxyd ist ja auch bekanntlich die erste Hydrierungsstufe des Sauerstoffmoleküls.

Durch die dargelegte Beziehung verlieren die vielfach in der Literatur behandelten sogenannten Reduktionsfermente ihre Sonderstellung, wenn man den Nachweis führen kann, daß ihre augenfällige Reduktionswirkung, z. B. die Entfärbung eines Farbstoffes durch irgend ein Substrat, sich auch für die Hydrierung des Sauerstoffmoleküls verwenden läßt, wenn man, im Sinne der bisherigen Anschauung gesprochen, zeigen kann, daß die »Reduktase« gleichzeitig auch als »Oxydase« fungieren kann. Das am eingehendsten untersuchte Reduktionsferment, das von Schardinger in der Milch entdeckte Enzym, erlaubte diesen Nachweis. Seine typische Wirkung besteht darin, daß in seiner Gegenwart Methylenblau durch Aldehyde ziemlich rasch entfärbt, d. h. reduziert wird. Die Aldehyde geben dabei naturgemäß in die entsprechenden Säuren über. Ersetzt man nun den Farbstoff durch molekularen Sauerstoff, so vermittelt das Ferment in gleicher Weise die Dehydrierung des Aldehyds; wir haben die Wirkung einer Oxydase. Die hier gegebene Theorie umfaßt ja, worauf nicht mehr näher eingegangen zu werden braucht, Reduktion

¹⁾ Vergl. die wichtigen Arbeiten von Palladip und seinen Schülern über die sogenannten Atmungspigmente z. B. H. 55, 209 [1908]. Bio. Z. 18, 151 [1909], 42, 325 [1912], 44, 317 [1912], 49, 381 [1913].

²⁾ O. Löw, B. 23, 675 [1890]. Bach, Bio. Z. 33, 288 [1911].

und Oxydation als die beiden Äußerungen eines Vorganges, der Dehydrierung.

Die bei der Schardingerschen Reaktion verwendeten Aldehyde, Formaldehyd und Acetaldehyd, waren für den vorliegenden Zweck ungeeignet, da sie sich einmal bei der einzuhaltenden Optimaltemperatur von 60–60° schon von selbst autoxydieren, und daß außerdem die entstehenden Säuren, Ameisensäure und Essigsäure, nicht leicht quantitativ aus der Milch herauszubringen sind. Vorzüglich brauchbar war aber der Salicylaldehyd, und vergleichende Versuche mit ihm haben ergeben, daß er unter denselben Bedingungen ebenso wie durch Methylenblau so auch durch molekularen Sauerstoff zu Salicylsäure oxydiert, d. h. dehydriert wird. Von mehreren Versuchen seien die folgenden angeführt:

I. 130 ccm frische rohe Milch wurden bei 30° 15 Minuten lang unter Eintritt von Stickstoff im Vakuum ausgekocht. Dann wurden 0.32 g reiner Salicylaldehyd und bei 65° solange n/50-Methylenblaulösung zugegeben, als Entfärbung erfolgte. Nach Erhitzen auf 100° — zur Abtötung des Ferments — wurde die Milch in der Hitze mit 5 ccm 20-prozentiger Schwefelsäure koaguliert und nach der Klärung durch ein Koliertuch filtriert, zweimal heiß-nachgewaschen und dann wiederholt ausgeäthert. Der Äther wurde bis auf 5 ccm abdestilliert, hierauf schüttelte man kräftig mit Bisulfatlösung durch, entzog die gebildete Salicylsäure durch verdünnte Sodalösung, säuerte diese wieder an, ätherte mehrere Male aus, trocknete mit Chlorcalcium und verdampfte den Äther im Reagensglas. Die sofort krystallisierende Salicylsäure wurde nach scharfem Trocknen im Vakuum mit n/100-Lange titriert. Erhalten wurden 0.0145 g.

II. 130 ccm Milch aus der gleichen Flasche wurden gleichzeitig 2 Stdn. lang mit 0.32 g Salicylaldehyd in Sauerstoff bei 65° geschüttelt. Aufarbeitung wie bei I. Erhalten wurden 0.011 g Salicylsäure.

Bei einem weiteren Versuch wurde die Milch gekocht und dann wie eben behandelt. Dabei wurde auch nicht die Spur von Salicylsäure (Eisenchlorid-Reaktion) isoliert.

Gegen die Deutung dieser Resultate könnte folgender Einwand erhoben werden. Es ist durch verschiedene Arbeiten, von denen die wichtigen von Parnas¹⁾ und von Battelli und Stern²⁾ erwähnt seien, bekannt geworden, daß unter Mitwirkung gewisser, in vielen Organen vorkommender Fermente auch bei Ausschluß von Sauerstoff ein Übergang von Aldehyd in Säure stattfindet. Gleichzeitig entsteht der dazu gehörige Alkohol; man hat also den Effekt der Cannizzaro-schen Reaktion, durch ein Ferment, von Parnas als Aldehydmutase bezeichnet, vermittelt. Dieses Ferment konnte auch in der Milch enthalten und für die Bildung der scheinbar unter Beteiligung von

¹⁾ Bio. Z. 28, 274 [1910].

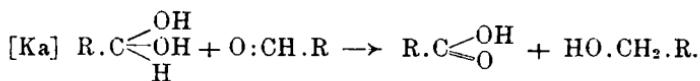
²⁾ Bio. Z. 29, 130 [1910].

Sauerstoff entstandenen Salicylsäure verantwortlich sein. In der Tat habe ich feststellen können, daß in roher Milch, die sorgfältig im Vakuum von aller Luft befreit ist, für sich schon Salicylaldehyd teilweise in Salicylsäure übergeführt wird, daß also unzweideutig jene Mutasewirkung in ihr vorhanden ist. Bei einem in allen Einzelheiten gleichartig durchgeführten Versuch bei Gegenwart von Luft betrug aber die gebildete Salicylsäuremenge um 33% mehr, und damit ist meiner Ansicht nach sichergestellt, daß auch der Sauerstoff an der Reaktion beteiligt ist.

100 ccm frische, rohe Milch, bei 30° im Vakuum vollständig von Luft befreit, lieferten mit 0.3 g Salicylaldehyd, 30 Minuten bei 65° gehalten, 0.0027 g Salicylsäure, 130 ccm Milch gaben unter den gleichen Bedingungen nach 1½ Stunden 0.0076 mg Salicylsäure.

Je 130 ccm frische, rohe Milch der gleichen Herkunft wurden gleichzeitig mit je 0.4 g Salicylaldehyd, eine Portion in Luft-, die andre in Stickstoffatmosphäre 1¾ Stunden lang unter öfterem Schütteln im Wasserbade bei einer Temperatur von 65° gehalten. Dann wurde das Ferment bei 100° abgetötet und nun wie oben die Salicylsäure isoliert. Mit größter Sorgfalt wurde in allen Einzelheiten bei beiden Versuchen gleich verfahren. Aus dem Versuch mit Luft wurden 0.011, aus dem ohne Luft 0.0083 g Salicylsäure isoliert.

Soweit ich nach den wenigen bisherigen Versuchen die Verhältnisse übersehe, haben wir in der Mutasewirkung nur eine besondere Form der Dehydrierungsreaktion, indem dabei eben ein zweites Molekül Aldehyd für den durch das Ferment gelockerten Wasserstoff als Akzeptor benutzt wird:



Eine ähnliche Vermutung hat auch Parnas ausgesprochen.

Man kann sich leicht vorstellen, daß der Verlauf eines Dehydrierungsvorganges in der Richtung des Hydroproduktes von der Art der anwesenden Akzeptoren abhängig sein wird, derart, daß die dehydrierenden Fermente, die sicherlich mit der mannigfachsten Spezifität gegenüber dem zu dehydrierenden wie dem zu hydrierenden Agens ausgestattet sein werden, einmal in dem Substrat selbst (Mutase), ein andres Mal im molekularen Sauerstoff (Oxydase), schließlich auch in einem Farbstoff, in Nitrat oder dergl. (Reduktase) den geeigneten Wasserstoff-Akzeptor finden werden. Sind alle drei Arten von Akzeptoren zugegen, so wird einzig und allein die Hydrierungsgeschwindigkeit darüber entscheiden, welchen Verlauf der Dehydrierungsprozeß — der in allen Fällen das gleiche Dehydro-(Oxydations-)Produkt liefert — nach der Seite der Hydrierung hin nimmt. Das eingehende Studium dieser Verhältnisse ist in Angriff genommen.

Als bemerkenswerte Tatsache sei noch erwähnt, daß es mit der Dehydrase der Milch nicht gelungen ist, molekularen Wasserstoff zu aktivieren, d. h. es ist nicht möglich, Methylenblau in Wasserstoff-Atmosphäre zu entfärben. Ein vergleichender Versuch, einmal in Stickstoff, das andre Mal in Wasserstoff, auf den Zeitraum von 6 Stunden ausgedehnt, führte für den Wasserstoffversuch zu einer kaum merkbar rascheren Entfärbung geringer Farbstoffmengen.

Auf die wichtigen Zusammenhänge, in denen eine Reihe grundlegender biologischer Arbeiten, wie die von Schmiedeberg, von P. Ehrlich »Über das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus¹⁾, die schon angeführten von Paladin über die Atmung der Pflanzen, die von Unna²⁾ über Oxydationen und Reduktionen in der Zelle, endlich die zahlreichen über das Problem der alkoholischen Gärung und noch manche andre, zu den hier behandelten Fragen stehen, möchte ich erst in einer späteren Abhandlung eingehen.

Der Königl. Bayerischen Akademie der Wissenschaften spreche ich meinen ergebenen Dank dafür aus, daß sie mir aus den Zinsen der A. v. Baeyer-Jubiläumsstiftung einen ansehnlichen Betrag für die vorliegende Untersuchung zur Verfügung gestellt hat.

— — — — —

**430. Amé Pictet und Maurice Bouvier: Über
die Destillation der Steinkohle unter verminderter Druck.**

(Eingegangen am 9. Oktober 1913.)

Durch Extrahieren einer Steinkohle von Montrambert (Loire) mit siedendem Benzol erhielt vor zwei Jahren der eine von uns in Gemeinschaft mit L. Ramseyer³⁾ ein Gemisch von Kohlenwasserstoffen der hydroaromatischen Reihe, unter denen ein Hexahydrofluoren, $C_{13}H_{16}$, in reinem Zustande isoliert und charakterisiert werden konnte. Beim Destillieren durch ein rotglühendes Rohr wurde dieser Körper dehydriert und in Fluoren übergeführt. Unter der Voraussetzung, daß die übrigen, in der Steinkohle nachgewiesenen, hydroaromatischen Kohlenwasserstoffe sich bei hoher Temperatur ebenso verhalten würden, wurde die Vermutung ausgesprochen, daß sich in diesem Prozeß eine Erklärung für die Bildung der aromatischen Bestandteile des Steinkohlenteers findet; sie sollten, zum Teil wenigstens,

¹⁾ Berlin 1885. Verlag A. Hirschfeld. Vergl. auch A. Herter, H. 42, 493 [1904].

²⁾ Waldeyer-Festschrift 1912.

³⁾ B. 44, 2486 [1911].