

Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carboligase).

Von

Carl Neuberg und Julius Hirsch.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Voll Staunen steht täglich der Biochemiker der Fülle synthetischer Vorgänge gegenüber, die sich in erster Linie im Organismus der Pflanzen, aber auch im Tierkörper abspielen. Es entspricht unserer gegenwärtigen Auffassung, letzten Endes die aufbauenden Prozesse auf Leistungen von Katalysatoren zurückzuführen.

Die große Zahl bekannter Enzyme dient vornehmlich der Molekülzerkleinerung, dem Abbau; die Wirkungen der verschiedenen Carbohydrasen, Esterasen und Proteasen bilden die typischen und wichtigsten Erscheinungen dieser Art. Auch die Umkehr solcher fermentativen Hydrolysen, die enzymatische Anhydrierung, ist bekannt.

In Erfüllung der von G. Tammann und van t'Hoff aufgestellten Forderung ist mit Hilfe von Fermenten eine Anzahl glucosidischer Molekülverknüpfungen vorgenommen worden. A. Croft Hills, O. Emmelings sowie Armstrongs Arbeiten über den Zusammenschluß von Traubenzuckerresten zu einem Disaccharide mittels der Maltase, die von E. Fischer und E. F. Armstrong vollzogene Vereinigung von Glucose und Galaktose durch Kefirlactase, van t'Hoffs, Bayliss' sowie Bourquelots in Gemeinschaft mit Aubry, Bridel und Hérisséy erfolgreich ausgeführten biochemischen Darstellungen von mannigfachen β - und α -Glucosiden nebst Galaktosiden sowie von Gentiobiose und Cellobiose sind Beispiele für diesen Vorgang in der Gruppe der Kohlenhydrate. Auch P. A. Levenes und G. M. Meyers Angaben über die kondensierende Wirkung von Gewebs-extrakten auf Hexosen sowie Cremers und Rubners Beobachtungen über die Polymerisation von Zucker zu komplizierten Sacchariden (zu sogenanntem Glykogen) im Preßsaft von Hefe gehören hierher, während nach Lintners, Sallingers und Samecs neuesten Forschungen alle Annahmen einer Rückbildung von Stärke aus Dextrinen unter dem Einflusse der Amylase auf Trugschlüssen beruhen.

Ein analoger Aufbau von Estern unter Mitwirkung spezifischer Katalysatoren ist, und zwar bei fettähnlichen Stoffen, Kastle und Loewenhart, Pottevin, Bodenstein und Dietz, Welter, Hamsik, Taylor nebst anderen mit verschiedenen Lipasen gelungen, während ein Ester mit anorganischem Säurerest von Iwanoff, Lebedew, Harden und Young, v. Euler sowie Neuberg aus Hexosen und Phosphaten durch Digestion mit Hefenferment erhalten worden ist.

Auch in der Proteinreihe sind seit Danilevskys u. Okunews Entdeckung der Plasteine solche reversiblen Prozesse der Polypeptidbildung bekannt geworden. Die Eiweißnatur der betreffenden, aus abgebauten Proteinen erhaltenen Produkte wurde durch die Arbeiten von Kurajeff, Lawrow und anderen russischen Forschern sowie von Levene und van Slyke wahrscheinlich gemacht. V. Henriques und Gjaldbæk haben alsdann gezeigt, daß diese Koagulosen wirklich dem Eiweiß gleichen, indem sie durch Wasseraustritt zwischen der charakteristischen Amid- und Carboxylgruppe von Aminosäureaggregaten entstehen, also Säureamidstruktur besitzen dürften. Die erwähnte „Eiweißrückbildung“ vollzieht sich unter dem Einflusse der Magenenzyme Pepsin bzw. Lab sowie des Papayotins; auch Organsäfte, die nach Abderhalden unter bestimmten Bedingungen selbst bis zu Aminosäuren aufgespaltenes Eiweiß wieder zu höheren Molekülverbänden zusammenzufügen scheinen, wirken ähnlich. Als substituierte Phosphaminsäuren komplizierten Baues können vielleicht die Produkte angesprochen werden, die nach T. B. Robertsons Erfahrungen Pepsin aus Caseinalbumosen erzeugt. Einfachere Stoffe von Carbamidcharakter sind gleichfalls auf diesem Wege gewonnen worden, was Schmiedeberg sowie Abelous und Ribaut an dem Beispiele der Hippursäureentstehung gezeigt haben.

Wie aber bei den Abbaureaktionen lediglich Kohlenstoff-Sauerstoff- oder Kohlenstoff-Stickstoffbindungen gelöst werden, so erstreckt sich der Erfolg einer Wiedervereinigung auf die Herstellung eben derselben Bindungen, deren Grundformen in der Glucosid-, Ester- oder Säureamidstruktur vorliegen. Somit sind alle diese Reaktionen ihrem Wesen nach enzymatische Anhydrierungen: rückläufig gemachte Hydrolysen, an deren Zustandekommen keinerlei Oxydationen, Reduktionen oder Kohlenstoffverknüpfungen Anteil haben.

Nicht gelungen ist bisher eine entsprechende enzymatische Synthese von Kohlenstoff-Kohlenstoffketten, also etwa eine Umdrehung der Vorgänge, die sich bei den Gärungsprozessen abspielen; und gerade solche Kernsynthesen beanspruchen das allergrößte biochemische Interesse. Treten sie uns doch in Gestalt von Gesamtleistungen lebender Zellen

als besonders bedeutungsvoll vor Augen. Die natürliche Entstehung der Fette durch Condensation bestimmter Umwandlungsprodukte der Zuckerarten im Tier- und Pflanzenreiche, weiterhin die Bildung der komplizierten Proteingrundsteine und Alkaloide in ihrer kaum erschöpften Mannigfaltigkeit, die Erzeugung der lebenswichtigen Hormone und Vitamine sind derartige Handlungen, welche die Organismen in reichhaltigstem Maße vollbringen.

Geleitet von dem Gedanken, daß solche rmaßen aufbauende Enzyme vorhanden sein müssen, haben wir nach ihnen gefahndet und nach längeren vergeblichen Versuchen in der Hefe, dem Fundorte auch des einfachsten Kohlenstoffketten zerreisenden Enzyms, der Carboxylase, das erste derartige geradlinige Kohlenstoffketten zusammenfügende Ferment angetroffen. Wir nennen es, da es unmittelbar C—C-Bindungen knüpft, Carboligase.

Folgende Beobachtungen, die sich im Verlaufe unserer Gärungsarbeiten ergaben, waren richtungweisend:

Bei den phytochemischen Reduktionen, die nach den Untersuchungen von Neuberg und Mitarbeitern bei einfachen und zusammengesetzten Aldehyden, bei Ketonen und Diketonen, Thioaldehyden und Disulfiden, aliphatischen nebst aromatischen Nitro-, Nitroso- und Hydroxylaminokörpern sowie anorganischem Material verwirklicht werden können, findet im Grunde ein Wettbewerb zwischen der zugefügten Substanz und dem bei der Zuckerspaltung intermediär auftretenden Acetaldehyd um den „labilen Gärungswasserstoff“ statt¹⁾. Theoretisch müßte für die phytochemisch bewirkte Aufnahme je zweier Wasserstoffatome ein Mol. Acetaldehyd übrigbleiben. Tatsächlich fanden Neuberg und Lewite, Nord sowie Neuberg und Nord bei der biochemischen Umwandlung von Methylheptonon, Thioaldehyden, verschiedenen Ketonen und Diketonen in Methylheptenol, Mercaptane und sek. Alkohole den Acetaldehyd im Gärgut, aber im allgemeinen nicht in einer Ausbeute, die der Menge des Reduktionsproduktes entsprach. Sie schlossen²⁾ daraus, daß sekundäre Veränderungen mit dem Acetaldehyd vor sich gehen; denn in irgendeiner Form muß das Oxydationsäquivalent für den voll-

¹⁾ Vgl. hierzu C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. 98, 146. 1919.

²⁾ C. Neuberg und A. Lewite, diese Zeitschr. 91, 257. 1918; F. F. Nord, B. 52, 1210. 1919; C. Neuberg und F. F. Nord, B. 52, 2242 und 2251. 1919.

zogenen Reduktionsprozeß vorliegen. Eine Dismutation¹⁾ des zu reduzierenden Körpers selbst kommt bei gleichzeitigem Zuckerzerfall²⁾ nicht in Frage; denn bei den Aldehyden sprach der Ertrag an zugehörigem Alkohol, der sich bis auf 85% der Theorie beläuft, gegen eine Mitwirkung der Cannizzaroschen Reaktion. Bei den Ketonen, Disulfiden sowie Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen war eine einfache Disproportionierung überhaupt nicht möglich.

Wir untersuchten daher die vor Jahren von C. Neuberg und E. Welde³⁾ beschriebene phytochemische Umwandlung von Benzaldehyd in Benzylalkohol von neuem unter besonderer Berücksichtigung des Auftretens von weiteren Produkten; an diesen hatte bei den ersten Studien über die phytochemische Reduktion, deren Ziel in der Darlegung des allgemeinen Charakters dieser Prozesse gelegen war, kein Interesse bestanden, und auch die Methodik war nicht auf ihre Isolierung gerichtet gewesen. Ferner schien uns jetzt die Zeit reif, diesen ganzen Komplex von Erscheinungen in eine durchsichtigere Beziehung zu den gleichzeitig sich abspielenden Vorgängen des Kohlenhydratumsatzes zu bringen. Denn in einem Sonderfalle, bei der reduktiven Bildung des Glycerins (aus einer hydrierbaren Abbaustufe des Zuckers), ist es seither möglich gewesen, den vollständigen Zusammenhang zwischen Oxydationshub und Reduktionsleistung sowohl hinsichtlich der quantitativen als bezüglich der zeitlichen Verhältnisse klarzulegen⁴⁾.

Für die biochemische Umwandlung des Benzaldehyds ergaben sich nun folgende bemerkenswerten Verhältnisse. Läßt man z. B. eine 4proz. Lösung von Saccharose oder Glucose unter Zugabe von Benzaldehyd (10% der angewendeten Zuckermenge) bei Zimmertemperatur oder 37° vergären, so riecht das Gärgut nach 24 Stunden kaum noch und zum Schluß, d. h. nach 3—5 Tagen,

¹⁾ Vgl. hierzu C. Neuberg, J. Hirsch und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 105, 308. 1920.

²⁾ Ohne jenen kann sie eintreten, wie demnächst dargetan wird.

³⁾ C. Neuberg und E. Welde, diese Zeitschr. 62, 478. 1914.

⁴⁾ C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238. 1916; C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365 und 92, 234. 1918; C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. 98, 141. 1919; 103, 307. 1920.

gar nicht nach Bittermandelöl. Das filtrierte Gärgut, das keinen Zucker mehr enthält, aber selbst wenn man von Glucose ausgegangen ist, nach links dreht, scheidet auffallenderweise aus Fehlingscher Mischung schon in der Kälte nach ganz kurzem Stehen Kupferoxydul ab. Das Gärgut zeigt ferner einen positiven Ausfall der Legal sehen Probe. Der reduzierende Körper ist mit Wasserdampf, wenn auch schwierig, flüchtig und reagiert mit Phenylhydrazin; er geht ferner in Äther, Benzol od. dgl. über und hinterbleibt beim Abdampfen des Extraktionsmittels als schwach gelbliches Öl, das gleichfalls optisch aktiv, und zwar lävo gy r, ist. Ein Tropfen des so gewonnenen Liquidums reduziert alkalische Kupferlösung augenblicklich in der Kälte. Alle diese Eigenschaften sind weder mit dem Vorliegen unveränderten Benzaldehyds noch mit der Anwesenheit von Benzylalkohol als seines einzigen Umsetzungserzeugnisses vereinbar. Mannigfaltige Schwierigkeiten waren zu überwinden, da das neue phytochemische Produkt empfindlich ist, solange Gemische vorliegen; nach geeigneter Reinigung gelang es, seine Natur festzustellen. Es handelt sich um einen optisch-aktiven α , β -Ketonalkohol. Wir haben ihn in freiem Zustande isoliert, ferner sein Phenylhydrazon nebst seinem p-Nitrophenylosazon dargestellt, das Semicarbazon und Thiosemicarbazon sowie die Bisulfidverbindung erhalten. Unzweifelhaft hat die Substanz die Zusammensetzung $C_9H_{10}O_2$ und besitzt, wie im experimentellen Teile dargelegt wird, die Konstitution $C_6H_5 \cdot CO \cdot \overset{*}{CHOH} \cdot CH_3$ oder $C_6H_5 \cdot \overset{*}{CHOH} \cdot CO \cdot CH_3$; wahrscheinlicher erscheint uns vorläufig die erste Formel. (Eine sichere Entscheidung zwischen beiden werden hoffentlich Versuche erbringen, die noch im Gange sind.)

Die anfangs auch in Betracht zu ziehende Aldolkonfiguration ($C_6H_5 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CHO$) mußten wir bald außer Betracht lassen. Für die Ablehnung der Aldehydstruktur war weniger der negative Ausfall der Fuchsin-Schwefligsäure-Reaktion von Belang; denn diese tritt auch mit verwandten aromatischen Aldehyden¹⁾, ferner selbst bei bestimmten aliphatischen Oxyaldehyden, wie den Zuckern usw.²⁾, nicht ein. Den Ausschlag für die Ketonformel gab die Fähigkeit der Substanz, bei längerem Erhitzen mit p-Nitrophenylhydrazin 2 Moleküle des Reagenzes unter Bildung des

¹⁾ Tiffeneau und Dorlencourt, Chem. Centralblatt 1909. I. 1335.

²⁾ B. Helferich und W. Dommer, B. 53, 2006. 1920; H. Hammarsten. Ann. 421, 302. 1920.

Osazons aufzunehmen, und namentlich das Unvermögen des Körpers, bei Behandlung mit wasserentziehenden Mitteln in Zimtaldehyd überzugehen. Nach dem Verhalten des methylhomologen Benzaldehyd-propionaldols, $C_6H_5 \cdot CHOH \cdot CH(CH_3) \cdot COH$, wäre diese Anhydrierung unbedingt zu erwarten gewesen¹⁾. Sie vollzieht sich bekanntlich so leicht, daß bei allen bisherigen Versuchen, Benzaldehyd-acetaldol darzustellen, sofort der ungesättigte Aldehyd, eben der Zimtaldehyd, entsteht. Daß nicht etwa das Diketon $C_6H_5 \cdot CO \cdot CO \cdot CH_3$ vorlag, ging in erster Linie aus der optischen Aktivität hervor, folgte ferner aus dem verlangsamten Eintritt des zweiten Hydrazinradikals, wie er für die Osazonbildung bei Oxycarbonylverbindungen üblich ist, und sodann aus den Reaktionen mit gewöhnlichem und geschwefeltem Semicarbazid, die nur Monoderivate lieferten, ferner auch aus dem erwähnten Verhalten gegen Fehlingsche Mischung, das besonders Substanzen mit benachbarter Stellung des CO-Restes und der Alkoholgruppe zukommt.

Die einfache phytochemische Reduktion hatten wir nun früher in mehreren Fällen²⁾ rein enzymatisch, mit zellfreien Hefesäften, bewerkstelligen können. Es bestand daher die Hoffnung, auch den neuen kernsynthetischen Prozeß vollkommen mit einer Fermentlösung durchzuführen. Das gelingt in der Tat ganz glatt. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ist bei Verwendung von Hefemacerationssäften etwas schwieriger, sie liefert aber den durch Kohlenstoffketten-Verknüpfung entstandenen Körper.

Die Synthese vollzieht sich formal zwischen je einem Molekül Benzaldehyd und Acetaldehyd. Nachdem durch die Arbeiten von C. Neuberg mit E. Färber, J. Hirsch und E. Reinfurth (l. c.) die Entstehung des Acetaldehyds als Zwischenstufe bei der Vergärung des Zuckers durch lebende Hefen wie bei seiner rein enzymatischen Spaltung bewiesen worden ist, kann es keinem Zweifel unterliegen, daß das in Aktion getretene Molekül Acetaldehyd dem zerfallenen Zucker entstammt. In dieser Hinsicht stellt die Fixierung eines mol. Acetaldehyds

¹⁾ Th. Hackhofer, M. 22, 95. 1901.

²⁾ Vgl. C. Neuberg und H. Steenbock, diese Zeitschr. 59, 190. 1914; C. Neuberg und W. H. Peterson, diese Zeitschr. 67, 32. 1914; C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. 67, 46. 1914.

durch einen zugesetzten fremden Aldehyd unter Bildung eines Ketonalkohols eine weitere Abfangmethode, nunmehr die dritte, dar.

Neuartig ist es auch, daß es einen Fermentprozeß gibt, der auf den Zusammenschluß zweier Aldehyde zu einem Keton hinausläuft.

Schon im Jahre 1908 hat der eine¹⁾ von uns auf eine derartige physiologische Verwendungsmöglichkeit des Acetaldehyds hingewiesen. Für die Erklärung des Auftretens von Acetyl-methylcarbinol bei einigen Bakterien-gärungen wurde damals eine solche in vitro noch nicht verwirklichte, der Benzoinkondensation analoge Umsetzung des Acetaldehyds in Betracht gezogen. Vier Jahre später vermochten in der Tat A. Harden und D. Norris²⁾ durch Züchtung von *B. lactis aerogenes* auf verdünnten Lösungen von Acetaldehyd kleine Mengen von 2,3-Butylenglykol zu gewinnen. Daß ein solcher zweiwertiger Alkohol aus der entsprechenden Oxy-carbonylverbindung durch biochemische Reduktion hervorgehen kann, ergibt sich aus den Arbeiten von Neuberg mit Schwenk sowie mit Kérb, Nord und Färber³⁾.

Die physiologische Bildung eines (optisch-aktiven) Ketonalkohols, der sich aus gleichen Molekülen Acetaldehyd und Benzaldehyd zusammensetzt, ist um so bemerkenswerter, als rein chemisch eine derartige Vereinigung nicht erfolgt und auch kein einfacher Katalysator bekannt geworden ist, der einen aliphatischen und aromatischen Aldehyd in solcher Weise aneinanderreicht. In diesen Verhältnissen liegt zugleich eine Berechtigung, die erwähnte Kohlenstoffketten-Verknüpfung gemäß unseren derzeitigen Benennungen als einen fermentativen Vorgang zu betrachten.

Freilich, es ist nicht ausgemacht, daß im vorliegenden Falle die Entstehung unseres aliphatisch-aromatischen Ketonalkohols auf die einfache „Benzoinkondensation“ der formelmäßigen Komponenten zurückgeführt werden darf. In orientierenden Versuchen ist es uns nämlich bisher nicht geglückt, Benzaldehyd und fertigen Acetaldehyd mittels Hefeferment zu verbinden. Dagegen gelang

¹⁾ C. Neuberg in C. Oppenheimers Handb. der Biochemie 1, 225. 1908.

²⁾ A. Harden und D. Norris, Chem. Centralblatt 12, I, 1045.

³⁾ C. Neuberg und E. Schwenk, diese Zeitschr. 71, 114. 1915; C. Neuberg und E. Kérb, diese Zeitschr. 92, 96. 1918; C. Neuberg und F. Nord, B. 52, 2248. 1919; E. Färber, F. Nord und C. Neuberg, diese Zeitschr. 112, 313. 1920.

die Kernsynthese, wenn an Stelle des Acetaldehyds seine biologische Vorstufe, der Carboxy-acetaldehyd, d. h. Brenztraubensäure¹⁾, verwendet wurde. Ob die bei der Carboxylasespaltung der Brenztraubensäure obwaltende Molekülbewegung vielleicht im Verein mit einer im Entstehungszustande besonders reaktionsbereiten Form des Acetaldehyds für die Kohlenstoffketten-verknüpfung nötig ist oder ob die biologische Kondensation sich zunächst zwischen Benzaldehyd und Brenztraubensäure etwa unter Bildung von α, α_1 -Benzoyl-oxy-propionsäure $C_6H_5 \cdot CO \cdot C(OH) \cdot CH_2$ vollzieht, die dann unter Kohlen-



säureverlust den Ketonalkohol liefert, bleibt dahingestellt.

Fest steht, daß sowohl bei der zellfreien Vergärung von Zucker als von Brenztraubensäure wie auch bei der Umsetzung beider durch frische Hefen in Gegenwart von Benzaldehyd die Knüpfung einer unverzweigten Kohlenstoffkette zwischen Benzaldehyd und Acetaldehyd zustande kommt. Da die Reaktion auch ohne Mitwirkung ebender Zellen, also nach unserer heutigen Ausdrucksweise, rein enzymatisch herbeigeführt werden kann und ebenfalls mit anderen Aldehyden, wie Valeraldehyd, Önanthol, Zimtaldehyd usw.²⁾ vor sich geht, so ist für das zugrunde liegende Agens der Name Carboligase am Platze. Bisher ist kein Ferment bekannt, das solche Körper von „Benzoinstruktur“ spaltet; wir haben auch keine Anhaltspunkte dafür finden können, daß unser Ketonalkohol, fertig zugesetzt, von der Hefe in die Komponenten zerlegt würde.

Die Verhältnisse dürften bei den an Kernsynthesen und Spaltungen von Kohlenstoffketten beteiligten Katalysatoren vollkommen anders liegen als bei den hydrolysierenden Enzymen. Die Leistung der Carboligase braucht ebensowenig umkehrbar zu sein wie die der Carboxylase oder Zymase!

Dadurch unterscheidet sich der Vorgang auch scharf und grundsätzlich von der Cyanhydrinreaktion, die durch Emulsin aktiviert werden kann, und zwar nach den ausgezeichneten Untersuchungen L. Rosenthalers (1908) in asymmetrischem Sinne, indem z. B. die enzymatische Förderung

¹⁾ Ihre Rolle bei einer anderen biochemischen Kohlenstoffkettenvereinigung werden demnächst C. Neuberg und B. Arinstein darlegen.

²⁾ Auf die entstehenden Produkte denken wir später einzugehen.

dieser Anlagerung d-Benzaldehydcyanhydrin ergibt. Durch die in ihrer ganzen Bedeutung für die Fermentchemie vielleicht noch nicht voll ausgeschöpften Feststellungen von G. Bredig, K. Fajans und P. S. Fiske besteht dem Wesen nach kein Unterschied mehr zwischen der diesbezüglichen Wirkung von Emulsinarten und chemisch definierten Katalysatoren; denn optisch-aktive Basen erzeugen gleichfalls drehende Oxynitrile aus den Komponenten. Es wäre denkbar, daß die Emulsinsubstanz sowohl als Ampholyt wie als unsymmetrisches Material einen Einfluß ausübt. Daß die einzelnen Emulsinsorten (sowie vielleicht Benzaldehyde verschiedener Herkunft) bald zur d-, bald zur l-, bzw. d, l-Form führen, würde mit den Erfahrungen von K. Feist über die unsymmetrische Spaltung racemischen Cyanhydrins im Einklange stehen und soll nach V. K. Kriehle mit dem Gehalte des Emulsins an Teilfermenten zusammenhängen, die auf die verschiedenen natürlichen Raumformen des Amygdalins eingestellt sind. Ob es neben dem zerlegenden Agens ein ausschließlich revertierendes gibt, m. a. W., ob in Eulers Bezeichnungweise, neben der Oxynitrilase (Benzocyanase) eine besondere Oxynitrilase vorkommt, ist ungeklärt. W. M. Bayliss sowie A. Harden lehnen jedenfalls eine solche Scheidung ab, und ersterer erklärt die scheinbaren Äußerungen von eigenen Fermenten mit entgegengesetzter Betätigung für eine Täuschung; denn bei Ausschluß sekundärer Beeinflussungen von Fermenten (oder auch vielleicht von Fermentaktivatoren, Ko-Enzymen?) soll derselbe Zustand des Gemisches beim Spaltungswie Anlagerungsversuch erreicht werden. Das System würde demnach durch die Gleichgewichtslage der reversiblen katalytischen Reaktionen wie bei den Hydrolysen im engeren Sinne beherrscht. In der Tat stehen die Erscheinungen bei den cyanogenen Fermenten den hydrolytischen Vorgängen nicht ganz fern, besonders wenn man berücksichtigt, daß die Zerlegung unter Wasseraufnahme die Aldehydhydrate ergibt. Durch hydrolysierende Agenzien — Alkalien und Säuren — werden die Cyanhydrine unschwer gespalten. Die Blausäureverbindungen gleichen in mancher Hinsicht den Additionsprodukten von Aminen, Alkoholen, Sulfiten, Halogenwasserstoffsäuren, Ferro-, Ferri- und Cobaltcyanwasserstoff, Platinchloridchlorwasserstoffsäure usw. an Carbonylsubstanzen. Erinnert sei auch an die leichte Loslösung des Cyanrestes durch Silbersalze, auf der A. Wohls bekannte Abbaumethode in der Zuckerreihe sowie analytische Verfahren beruhen. Erst durch die Verseifung zur Oxyssäure oder deren Amid wird die Kombination von HCN mit Aldehyden so festgestellt, daß beispielsweise das Anlagerungserzeugnis an Benzaldehyd sich unzweifelhaft nach der Struktur des α -Oxybenzocyanids umsetzt, während vorher die Doppelverbindung den Charakter einer komplexen Säure zeigt; einen Beweis dafür haben A. Lapworth durch Herstellung des Kaliumsalzes und H. Franzen durch Gewinnung der Erdalkaliverbindungen erbracht, die bereits durch heißes Wasser in die Aldehyde und Cyanide zerlegt werden, wie Benzoxynitril selbst schon bei der Behandlung mit Wasser dissoziieren kann.

Die Verhältnisse liegen also so, daß sich Benzaldehyd und Blausäure freiwillig mit beträchtlicher Energie vereinigen; gleich in ihrer Kon-

stitution bekannten mineralischen und organischen Mittlern katalysiert auch das Emulsin diesen Vorgang. Dagegen findet keine Kohlenstoffkettensynthese zwischen Acetaldehyd und Benzaldehyd von selber statt, und wenn eine Reaktion zwischen beiden mit rein chemischen Methoden erzwungen werden kann, so führt sie zum Zimtaldehyd, nicht aber zu einer Kohlenstoffkettenvereinigung, wie sie in unserem optisch-aktivem Ketonalkohol vorhanden ist. Daß übrigens die biochemische Synthese des letzteren auch nicht dem Vorgange der oxydativen Molekülvergrößerung an die Seite gestellt werden kann, geht u. a. daraus hervor, daß sie — gleich der ihr entgegengesetzten der Gärung — anaerob verläuft.

Nicht unerwähnt bleibe, daß nach vorhandenen Anhaltspunkten neben dem Ketonalkohol noch anderer Produkte entstehen. Keiner besonderen Deutung bedarf der Umstand, daß auch bei der von uns getroffenen Versuchsanordnung, obgleich die Mengenverhältnisse etwas anders gewählt sind als in den älteren, nur auf die Gewinnung von Benzylalkohol gerichteten Experimenten von Neuberg und Welde (l. c.), die letztgenannte Substanz auftritt. Ob die unbedeutende Menge Benzoesäure, die wir gelegentlich antrafen, auf eine unspezifische Oxydation des Benzaldehyds zurückzuführen ist oder welchen Vorgängen sie ihre Entstehung verdankt — einer sekundären Zersetzung des Ketonalkohols oder Dismutation von angewandtem Benzaldehyd —, ist noch aufzuklären. Im Besitze aller dieser Daten wird man dazu gelangen, eine vollkommene Bilanz der phytochemischen Reduktion ziehen zu können. So viel aber zeigt sich schon heute, daß unsere früher ausgesprochenen Anschauungen über die Rolle des Acetaldehyds bzw. der Brenztraubensäure als primäres Oxydationsäquivalent bei der phytochemischen Reduktion sowie die Ansicht von der Verwendung beider zu synthetischen Zwecken durch die Auffindung der Carboligase eine Bestätigung gefunden haben.

Wie die Carboxylase das einfachste Enzym ist, das der Sprengung von Kohlenstoffketten dient, so ist die Carboligase ein Agens des einfachsten Aufbaues solcher Gebilde. Beide Katalysatoren haben gemeinsam eine ziemlich weite Temperaturgrenze ihrer Wirksamkeit. Im Hinblick auf die Frage, welchen Anteil die Carboligase an der biochemischen Bildung von Kohlenstoffketten nimmt, muß man die Möglichkeit nicht außer acht lassen, daß die unverzweigten Ketonalkohole durch Isomerisierung primär erzeugter Aldole

entstehen¹⁾ oder durch umlagernde Agenzien darin übergehen könnten²⁾; Aldole vermögen aber durch eine Saccharinumlagerung Fettsäuren zu liefern³⁾.

Die slichte Beobachtung der Vorgänge in der grünen Pflanze hat bereits frühzeitig zu der Annahme geführt, daß die Assimilate, die Kohlenhydrate, im Verein mit anorganischen Stoffen das Baumaterial aller übrigen Leibessubstanzen bilden. In welcher Weise der Zucker sich dabei betätigen kann, zeigt der hier beschriebene Fall einer fermentativen Kohlenstoff-Ketten-Synthese. Es scheint uns bedeutungsvoll, daß dieselben Spaltungsprodukte, Brenztraubensäure und Acetaldehyd, die wir mit guten Gründen heute als die Abbaustufen des Zuckers bei einer Reihe biochemischer Umsetzungen — insbesondere bei der alkoholischen Zuckerspaltung sowie bei verschiedenen Pilz- und Bakteriengärungen — betrachten, auch hier beteiligt sind.

Bei den Erscheinungen der Dissimilation und des Umbaues spielt der Acetaldehyd eine ähnliche Rolle wie der Formaldehyd bei der Kohlensäure-assimilation.

Experimenteller Teil.

I. Die Auffindung der Carboligasewirkung.

II. Die chemische Natur der durch die Carboligase synthetisierten Verbindung.

- a) Fällbarkeit durch Phenylhydrazin.
- b) Unmittelbare Abscheidung des durch Kondensation gleicher Moleküle Acetaldehyd und Benzaldehyd bei der Gärung entstandenen Körpers.
- c) Darstellung des Phenylhydrazons.
- d) Isolierung des Semicarbazons.
- e) Bereitung des Thiosemicarbazons.
- f) Gewinnung des p-Nitrophenylosazons.

¹⁾ C. Neuberg in Oppenheimers Handb. d. Biochemie I. 224. 1909 und Ergänzungsband, S. 608. 1913; A. Fernbach und M. Schoen, Ann. Inst. Past. 28, 709. 1914.

²⁾ Vgl. C. Neuberg und P. Mayer, H. 37, 530. 1902; C. L. Gatin, C. r. soc. biol. 64, 903. 1908; F. Röhm, diese Zeitschr. 72, 26. 1916.

³⁾ Siehe die in Kürze erscheinende Mitteilung von C. Neuberg und B. Arinstein.

III. Untersuchungen über das biochemische Verhalten der Carboligase.

- a) Das Vorkommen der Carboligase in den einzelnen Heferassen.
- b) Wirksamkeit der Carboligase bei Umsetzung verschiedener Gärsubstrate (Zuckerarten, Brenztraubensäure).
- c) Die Carboligase als tätiges Enzym nach Abtrennung von der lebenden Zelle.
- d) Versuche zur Verknüpfung von Acetaldehyd und Benzaldehyd ohne gleichzeitig ablaufende Gärungen.
- e) Über den Zusammenhang zwischen Zucker- oder Brenztraubensäurespaltung und synthetischer Leistung.

I. Die Auffindung der Carboligasewirkung.

Zu einem Ansatz von 280 g Rohrzucker und 280 g obergärende Hefe (Senst) in 7 l Wasser wurden nach dem Angären 25 cm frisch destillierter, benzoensäurefreier Benzaldehyd gefügt. Das Gemenge, das bei Zimmertemperatur belassen wurde, wies am nächsten Tage nur noch einen spurenhafte Geruch nach Bittermandelöl auf. Nach Zugabe von weiteren 15 cm Benzaldehyd blieb das Gärgut noch 48 Stunden bis zum Aufhören der Kohlensäureentwicklung und bis zum Verschwinden des Benzaldehydgeruches stehen. Bei der Prüfung mit Fehlingscher Mischung auf etwa noch vorhandenen Zucker machte sich eine starke Reduktionswirkung geltend, die auffallenderweise nach kurzem Stehen schon in der Kälte einsetzte. Da jedoch die Seliwanoffsche Reaktion mit dem Gärgut negativ verlief und zugefügte frische Hefe keine Gärung mehr hervorzurufen vermochte, so war aller Zucker umgesetzt und der positive Ausfall der Fehlingschen Probe lediglich durch die Anwesenheit einer bisher noch nicht beobachteten Substanz bedingt, deren Auftreten mit der phytochemischen Umwandlung des Benzaldehyds in irgendeinem Zusammenhange stehen mußte.

Neben der Reduktionsprobe gab die ausgegorene Maische eine positive Nitroprussidreaktion und lieferte mit essigsäurem Phenylhydrazin einen flockigen Niederschlag, der von dem Phenylhydrazon unveränderten Benzaldehyds völlig verschieden war,

da er, mit 30% iger Schwefelsäure erhitzt, kein Bittermandelöl abspaltete, ferner weit niedriger schmolz und in organischen Lösungsmitteln optisch aktiv war. Auch das Gärgut selbst zeigte deutliches Drehungsvermögen; es war lävozyr.

Wir versuchten zunächst die fragliche Substanz mittels Wasserdampfdestillation aus dem Gärgut abzusondern. 1,5 l desselben wurden dementsprechend behandelt, bis das doppelte Volumen übergegangen war. Das Destillat reduzierte Fehlingsche Lösung, gab positive Legalsche Reaktion und lenkte das polarisierte Licht nach links ab. Da jedoch auch der Rückstand noch die gleichen Eigenschaften besaß, so erwies sich die gesuchte Verbindung als schwer flüchtig und auf diese Weise nur als unvollständig abtrennbar.

Für die Isolierung ist die Extraktion mit Äther zweckmäßig, da es gelingt, durch 3—4 maliges Ausziehen die reduzierende Substanz nahezu restlos aus dem Gärgut zu gewinnen. 3 l desselben wurden so oft mit Äther durchgeschüttelt, bis der Rückstand Fehlingsche Mischung auch beim Kochen nicht mehr reduzierte. Nach Verjagen des Äthers auf dem Wasserbade hinterblieb ein hellgelbes Öl, dem neben dem charakteristischen Geruch des Benzylalkohols ein etwas stechender Geruch anhaftete. Dieses Öl war in Wasser fast gar nicht, in organischen Solventien (mit Ausnahme von Petroläther und Ligroin) leicht löslich, gab eine stark positive Nitroprussidreaktion und schied aus Fehlingscher Lösung schon in der Kälte augenblicklich Kupferoxydul ab. 0,1 ccm in 10 ccm absoluten Alkohol gelöst hatten ein Drehungsvermögen von $-0,75^\circ$ im 1-dm-Rohr. Nach tagelangem Aufbewahren im Exsiccator zeigte das Öl keinerlei Neigung zum Krystallisieren; es machte sich jedoch beim Verweilen an der Luft mit der Zeit ein zunehmender Geruch nach Benzaldehyd bemerkbar, der das Zeichen einer Zersetzung und zugleich auch einen Hinweis auf die Herkunft der Substanz aus dem Bittermandelöl bildete.

II. Die chemische Natur der durch die Carboligase synthetisierten Verbindung.

a) Fällbarkeit durch Phenylhydrazin.

Zur ersten Charakterisierung der neuen Substanz schien uns das bei Behandlung mit essigsäurem Phenylhydrazin erhältliche Derivat geeignet. Neues Material bereiteten wir diesmal unter Verwendung einer untergärigen Heferasse.

Das Gärgut enthielt 300 g Rohrzucker und 300 g Hefe (untergärige Bierhefe des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe) in 7,5 l Wasser. Nach erfolgter Angärung wurden 30 ccm fraktionierten Benzaldehyds hinzugefügt und das Gemisch 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Beendigung der Gärung stellten wir jetzt, wie in den späteren Saccharose-versuchen, durch den negativen Ausfall der Fehlingschen Reaktion in einer Probe fest, die zuvor viermal mit Äther extrahiert worden war. Von der klar filtrierten ausgegorenen Maische wurden 3000 ccm mit einer Lösung von essigsäurem Phenylhydrazin versetzt, die auf 1 Teil dieser Base 2 Teile 33proz. Essigsäure enthielt. Es bildete sich alsbald eine weiß-gelbe Emulsion, die sich beim Stehen zu einem flockigen Niederschlag verdichtete. Dieser wurde abgenutscht, mit verdünnter Essigsäure, dann mit Wasser ausgewaschen und über Schwefelsäure im Exsiccator getrocknet. Das so erhaltene Produkt war in Wasser unlöslich, ging aber in Alkohol, Äther und Benzol leicht über. Die alkoholische und ätherische Lösung drehten das polarisierte Licht beträchtlich nach rechts, die benzolische nach links, ein Verhalten, auf das wir bei der Besprechung weiterer Versuche noch zurückkommen werden.

Die Umkrystallisation war durch die Neigung zu öligem Ausscheidung erschwert, besonders bei der Anwendung von verd. Alkohol. Als am geeignetsten erwies sich die Isolierung der Substanz aus benzolischer Lösung durch Beigabe von Petroläther, doch muß letzterer zur Vermeidung einer Verschmierung tropfenweise zugefügt werden. Nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Benzol-Petroläther erhielten wir kleine weiße Blättchen, die scharf bei 96° schmolzen.

0,1496 g Substanz: 0,4111 g CO_2 und 0,0918 g H_2O .

0,1435 g Substanz: 14,4 ccm N (20° , 766 mm).

Daraus ergibt sich C = 74,94%, H = 6,81% und N = 11,56%. Die gefundenen Zahlen stimmen für ein Produkt von der Zusammensetzung $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ON}_2$; diese verlangt:

C = 75,00%, H = 6,87% und N = 11,67%.

Es handelt sich also um das Phenylhydrazon eines Körpers $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$, der durch einen Zusammentritt gleicher Moleküle Benzaldehyd und Acetaldehyd entstanden erscheint, wobei die Frage nach der Konstitution — Aldol- oder Benzoinform — zunächst noch offen blieb. Zur Entscheidung zwischen beiden Möglich-

keiten haben wir versucht, durch die Einwirkung von Kaliumacetat bei 120° im zugeschmolzenen Rohr auf den weitgehend gereinigten Körper (s. u.) den ungesättigten Zimtaldehyd zu erhalten. Es waren jedoch nach 4stündiger Digerierung nicht einmal Spuren dieser Substanz nachzuweisen, die sich schon durch den charakteristischen Geruch hätten bemerkbar machen müssen.

Später (s. S. 301) gelang es, das p-Nitrophenylosazon, also eine Verbindung mit zwei Hydrazinresten, darzustellen und so den Beweis für den „Benzoincharakter“ der Substanz zu erbringen, wobei wir jedoch zwischen den beiden Isomeren $C_6H_5 \cdot CO \cdot \overset{*}{C}HOH \cdot CH_3$ und $C_6H_5 \cdot \overset{*}{C}HOH \cdot CO \cdot CH_3$ vorerst keine bestimmte Auswahl treffen wollen.

b) Unmittelbare Abscheidung des durch „Kondensation“ gleicher Moleküle Acetaldehyd und Benzaldehyd bei der Gärung entstandenen Körpers.

Die nächsten Versuche waren darauf gerichtet, die durch ihr Phenylhydrazon in ihrer Zusammensetzung erkannte Substanz möglichst rein darzustellen.

Zu der Lösung von 600 g Rohrzucker in 15 l Wasser wurden 600 g Hefe Senst und alsbald 60 ccm Benzaldehyd gegeben. Nach 3tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wurde ein Quantum von 12,5 l filtrierten Gärgutes mit Äther erschöpfend ausgezogen, das Lösungsmittel nach Trocknung über geglühtem Glaubersalz auf dem Wasserbade verjagt, und der Rückstand im Vakuum destilliert. Bei 15 mm ging — weit oberhalb des Siedepunktes von Benzaldehyd — zwischen 102—156° eine ölige Flüssigkeit über, ohne daß es trotz wiederholter Rektifikation glückte, innerhalb engerer Temperaturgrenzen sich verflüchtigende einheitliche Fraktionen zu isolieren. Bei erneuter Destillation unter Atmosphärendruck haben wir sodann zwischen 202° und 262° in willkürlich gewählten Abständen von je 10° sechs Einzelportionen aufgefangen, von denen die zwischen 223—232° und die zwischen 253—262° siedende der Elementaranalyse unterworfen wurden. Nur die für die letztere gefundenen C- und H-Zahlen standen jedoch mit den Werten für die Substanz $C_9H_{10}O_2$ einigermaßen in Einklang.

Fraktion 253—262°.

0,1658 g Substanz: 0,4472 g CO_2 und 0,1049 g H_2O .

Berechnet für $C_9H_{10}O_2$: C = 72,00%; H = 6,67%; gef. C = 73,56%; H = 7,03%.

Bessere Resultate hat später mit der über die Bisulfitverbindung gereinigten Substanz Herr Dr. Ohle erzielt, der mit der weiteren Untersuchung beschäftigt ist.

Übrigens hat auch K. v. Auwers¹⁾ bei der auf chemischem Wege dargestellten Racemform dieses Körpers oder seines Isomeren keine ganz scharfen Daten erhalten.

Die Verbindung löst sich außer in Alkohol und Äther in Benzol, Toluol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff sowie Essigester, dagegen nicht oder kaum in Petroläther und Ligroin. Beim Erhitzen mit Natronlauge erfolgt Dunkelfärbung und Entwicklung von Benzaldehydgeruch; Sodalösung wirkt ebenso, aber weniger verfärbend.

Wie schon mehrfach erwähnt, reduziert der Ketonalkohol Fehlingsche Mischung augenblicklich bei gewöhnlicher Temperatur. Aus Ostscher Lösung sowie aus Cupriacetat wird jedoch nur in der Siedehitze Kupferoxydul abgeschieden; hingegen wird ammoniakalisch-alkalische Silberlösung in der Kälte sofort geschwärzt. Das gleichfalls bereits angeführte Verhalten zu Nitroprussidnatrium gestaltet sich im einzelnen folgendermaßen: a) Bei der gewöhnlichen Legalschen Probe (Zusatz von Nitroprussidnatrium und Lauge) wird das Gemisch rotbraun und auf Zugabe von Essigsäure blauviolett. b) Nimmt man an Stelle der Lauge Ammoniak, so tritt eine nicht übermäßig starke kirschrote Färbung ein, die auf Essigsäurezusatz ins Blaue umschlägt und schnell verblaßt. c) Wählt man als basische Komponente Piperidin, so wird das Gemenge feurig-amarantrot, um nach Ansäuerung mit Essigsäure sich über Blau ebenfalls zu entfärben.

Die Beziehungen unseres Ketonalkohols zum Benzaldehyd ergaben sich auch daraus, daß nach Zufügen von verdünnter Permanganatlösung und Erhitzen sich zunächst ein Geruch nach Bittermandelöl verbreitete. Das eingeeengte Filtrat von Braunstein schied nach Ansäuerung reichliche Mengen Benzoesäure ab.

Wir haben mit den Ätherextrakten verschiedener Gäransätze wiederholt den Versuch gemacht, die bei der phytochemischen Umsetzung des Benzaldehyds auftretenden Erzeugnisse durch einfache fraktionierte Destillation vollkommen zu trennen, jedoch

¹⁾ K. v. Auwers, B. 50, 1177. 1917.

ohne Erfolg. Bei den verschiedensten Drucken erstreckte sich stets der Destillationsbereich des Gemisches vom Siedepunkt des Benzylalkohols ab kontinuierlich über etwa 50°, und alle von uns in beliebigen Zwischenräumen aufgefangenen Anteile zeigten die für unsere Substanz als charakteristisch erkannte Reduktionskraft gegen kalte Fehlingsche Lösung und ein nach links gerichtetes optisches Drehungsvermögen, das in seinem Umfang mit steigendem Siedepunkte zunahm, dann jedoch bei der höchsten Fraktion wieder sank. Wir haben darauf versucht, den Körper durch seine — übrigens kristallisierende — Bisulfitverbindung von dem durch phytochemische Reduktion entstandenen Benzylalkohol und anderen Stoffen abzutrennen. Hierbei ging jedoch ein Teil unserer Substanz, deren Ausbeute sich durch die Gewichte der über dem eigentlichen Siedepunkte des Benzylalkohols liegenden Fraktionen und des daraus gewonnenen Osazons sowie durch die optischen Drehungswerte einigermaßen abschätzen ließ, infolge Zersetzung verloren.

Leichter gelang es uns, das Produkt durch eine Reihe von Abkömmlingen sicher zu kennzeichnen und uns in diesen Derivaten brauchbare Handhaben für die Lösung verschiedener biochemischer Fragestellungen zu schaffen.

c) Darstellung des Phenylhydrazons.

Zunächst mußte sich das zuvor beschriebene, stark optisch aktive Phenylhydrazon, das wir bis dahin nur durch direkte Fällung aus dem Gärgut selbst dargestellt hatten, auch aus dem verdampften ätherischen Auszuge gewinnen lassen.

600 g Hefe (Senst) wurden in 15 l Wasser suspendiert, die 600 g Rohrzucker gelöst enthielten. Nachdem die Kohlensäureentwicklung eingesetzt hatte, trugen wir 60 g reinen Benzaldehyd ein, digerierten 4 Tage bei Zimmertemperatur und weitere 24 Stunden bei 37° bis zum völligen Verbrauch des Zuckers. 11 l der klar filtrierte Maische wurden mit Äther ausgeschüttelt, die Extrakte durch Abdampfen vom Lösungsmittel befreit und vereint der Destillation unter vermindertem Druck unterworfen. Bei 16—17 mm gingen über:

zwischen	94—116°	19,28 g.
„	116—139°	22,29 g.
„	140—156°	5,82 g.
insgesamt		47,39 g.

Alle drei Fraktionen zeigten in der Kälte augenblicklich einen positiven Ausfall der Fehlingschen Reaktion und waren lävogyr. 1 g der mittleren Fraktion (116—139°) wurden in wenigen cem reinen Alkohols gelöst und mit Wasser zu einer homogenen Emulsion verdünnt, aus der mittels einiger cem essigsaurer Phenylhydrazins ein gelblicher Niederschlag ausgefällt wurde. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther erhielten wir das Hydrazon in weißen Krystallen vom Schmelzpunkte 96°.

0,1486 g Substanz: 0,4068 g CO₂ u. 0,0924 g H₂O.

C₁₅H₁₆ON₂. Ber. C = 75,00%; H = 6,67%;

gef. C = 74,66%; H = 6,93%.

Bestimmung der Drehung:

0,067 g Substanz, in 10 cem Benzol gelöst, zeigten im 2-dcm-Rohr — 2,20°;

$$[\alpha]_D = -164,2^\circ.$$

0,042 g Substanz, in 10 cem abs. Alkohol gelöst, polarisierten im 2-dcm-Rohr = + 1,83°;

$$[\alpha]_D = +217,8^\circ.$$

Zur Kontrolle dieser Daten wurde aus 3 l desselben Ansatzes in gleicher Weise, wie schon eingangs (s. S. 295) beschrieben ist, durch direkte Ausfällung mit essigsaurer Phenylhydrazin das optisch-aktive Hydrazon dargestellt, das den Smp. 96° hatte.

0,1396 g Substanz: 13,2 cem N (12° und 764 mm).

C₁₆H₁₆ON₂. Ber. N = 11,87%; gef. N = 11,28%.

Bestimmung der optischen Drehung:

Für 0,216 g Substanz, in 10 cem Benzol gelöst, war im 2-dcm-Rohr $\alpha = -7,30^\circ$;

$$[\alpha]_D = -169,0^\circ.$$

0,426 g Substanz, in 10 cem abs. Alkohol gelöst, drehten im 2-dcm-Rohr = + 18,17°;

$$[\alpha]_D = +213,3^\circ.$$

Die Elementaranalyse und die Übereinstimmung des aus dem Ätherextrakt dargestellten Phenylhydrazons in seinen charakteristischen Konstanten¹⁾ (z. B. in den Drehungswerten usw.) mit dem aus dem Gärgut direkt gewonnenen Derivat zeigen die Identität beider Verbindungen an.

¹⁾ Ob die optisch-aktive Komponente völlig frei vom Racemkörper ist, läßt sich nicht angeben.

d) Isolierung des Semicarbazons.

1,2 g Semicarbazidchlorhydrat wurden in wenig Wasser gelöst, mit 1,2 g Kaliumacetat in alkoholischer Lösung sowie mit 1,5 ccm des im Vakuum übergetriebenen Erzeugnisses der biochemischen Reaktion (Kp_{16} 116—139°) versetzt. Nach einiger Zeit fiel beim Stehen in der Kälte ein weißer krystallinischer Niederschlag aus, der abgenutscht und getrocknet wurde. Die gewonnene Substanz schied sich gut aus absolutem Alkohol ab und zeigte nach wiederholter Krystallisation den konstanten Schmelzpunkt 189°.

0,2013 g Substanz: 33,5 ccm N (14° und 762 mm).

$C_{10}H_{13}O_2N_2$. Ber. N = 20,28%; gef. N = 19,64%.

Ferner haben wir ein Gemisch der niedriger und höher siedenden Fraktion des Rohproduktes gleichfalls auf das Semicarbazon verarbeitet. Wir erhielten es wiederum nach mehrmaligem Umkrystallisieren in Blättchen vom Schmelzpunkt 188—189°.

0,1613 g Substanz lieferten 0,3206 g CO_2 und 0,0759 g H_2O .

$C_{10}H_{13}O_2N_2$. Ber. C = 57,97%; H = 6,28%;
gef. C = 57,79%; H = 5,61%.

Das Semicarbazon wurde in beiden Fällen wie auch bei späteren Präparationen optisch inaktiv befunden. Es stimmt in seinem Schmelzpunkte mit dem von K. v. Auwers (l. c.) erwähnten Abkömmling des α -Oxypropioiphenons $C_6H_5 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_2$ überein.

e) Bereitung des Thiosemicarbazons.

Als weiteres Derivat der durch das Dinitroosazon (s. S. 301) als α , β -Ketonalkohol charakterisierten Substanz haben wir noch das Thiosemicarbazon dargestellt.

1,0 g Thiosemicarbazid wurden in der nötigen Menge siedenden Wassers gelöst und mit 1,9 ccm der Fraktion II (Kp_{16} 116—139°) des letzt beschriebenen Gärgutes versetzt. Bei Durchschütteln oder auf Zugabe von wenig Sprit erstarrte die Mischung sofort zu einer festen Krystallmasse, die in Wasser unlöslich und in heißem Alkohol löslich war. Nach Umkrystallisation aus absolutem Alkohol erhielten wir weiße Nadelchen, die bei 204—205° (bei schnellem Erhitzen) unter Zersetzung schmolzen.

0,1910 g Substanz: 21,0 ccm N (18°, 770 mm).

0,1488 g Substanz: 0,2954 g CO_2 und 0,0787 g H_2O .

0,1362 g Substanz: 0,1402 g $BaSO_4$ (= 0,01922 g S).

$C_{10}H_{13}N_3OS$. Ber. C = 53,81; H = 5,82; N = 18,83; S = 14,35%;
gef. C = 54,14; H = 5,77; N = 18,67; S = 14,10%.

Das Thiosemicarbazon zeigte die von C. Neuberg und W. Neimann¹⁾ beobachtete Fähigkeit dieser Verbindungen, unlösliche Niederschläge mit Metallsalzen, namentlich mit Silbernitrat und Sublimat in alkoholischer Lösung, zu geben. Das Thiosemicarbazon ist ein besonders leicht entstehendes, ausgezeichnet krystallisierendes und charakteristisches Derivat des Ketonalkohols.

f) Gewinnung des p-Nitrophenylosazons.

Das Ausgangsmaterial war auf die mehrfach dargelegte Weise bei Vergärung von 1 kg Saccharose in 25 l Wasser mit 1 kg Patzenhofer Unterhefe in Anwesenheit von 100 g Benzaldehyd erhalten. Von dem filtrierten Gärgut wurden 23 l verarbeitet, der Rückstand des Ätherextraktes wurde in folgende Anteile zerlegt

Fraktion I: bei 15 mm	85—98°	3,50 g,
„ II: „ 15 mm	99—110°	27,31 g,
„ III: „ 15 mm	111—120°	28,42 g,
„ IV: „ 14 mm	121—135°	33,26 g,
„ V: „ 13—14 mm	136—147°	17,92 g,
Gesamtausbeute aus 97 g Benzaldehyd		= 110,41 g.

4,5 g p-Nitrophenylhydrazin wurden in 25proz. Essigsäure, der einige ccm abs. Alkohol zugesetzt waren, in der Hitze gelöst. Zu der klar filtrierten Flüssigkeit wurden 1,7 ccm der Fraktion IV gegeben. Nach 2½ stündigem Erhitzen im Wasserbade war ein dunkelroter Niederschlag ausgefallen, der auf der Nutsche mit verdünnter Essigsäure, dann mit Alkohol und Äther gewaschen wurde. Die entstandene Substanz (Rohausbeute 2,5 g) war leicht löslich in Pyridin sowie in heißem Nitrobenzol, schwer löslich in siedendem Eisessig, unlöslich in Wasser, Alkohol und Äther. Nach wiederholtem Umkrystallisieren aus einem Gemisch von Nitrobenzol und Eisessig bekamen wir purpurrote Nadelchen, die sich bei 264—265° verflüssigten und somit denselben Schmelzpunkt hatten, wie das von K. v. Auwers²⁾ dargestellte p, p-Dinitroosazon des Acetylbenzoyls.

0,1666 g Substanz: 0,3675 g CO_2 und 0,0658 g H_2O .

0,1552 g Substanz: 26,6 ccm N (19°, 766 mm).

$C_{21}H_{18}N_6O_4$. Ber. C = 60,28%; H = 4,30%; N = 20,09%;
gef. C = 60,16%; H = 4,38%; N = 19,86%.

¹⁾ C. Neuberg und W. Neimann, B. 35, 2049. 1902.

²⁾ l. c. S. 1178; an anderer Stelle (l. c. 1181) findet man freilich 256—257° als F. verzeichnet.

1,7 ccm der Fraktion V, die in gleicher Weise mit p-Nitrophenylhydrazinacetat behandelt wurden, lieferten eine Rohausbeute von 1,3 g Osazon. Wir lösten die Substanz in Pyridin und schlugen sie mit verdünnter Essigsäure nieder. Nach wiederholtem Umfällen lag gleichfalls das Produkt vom Smp. 264–265° vor.

III. Untersuchungen über das biochemische Verhalten der Carboligase.

Das Auftreten eines optisch-aktiven Kondensationsproduktes von Benzaldehyd und Acetaldehyd bei der alkoholischen Gärung in Gegenwart von Bittermandelöl wies auf die Beteiligung eines aufbauenden Agens hin. Offensichtlich steht die Bildung der Substanz in naher Beziehung zur Tätigkeit der Zymase. Denn der Acetaldehyd, über den als Zwischenstufe erwiesenermaßen die alkoholische Zuckerspaltung führt, dient — wenigstens formal — als Baustein für jene Synthese.

Wir vermögen die allgemeine Bedeutung der Carboligase einerseits durch ihr Vorkommen in verschiedenen Heferasen und andererseits durch die Verwendung wechselnder Gärsubstrate zu erweisen. Der „Fermentcharakter“ dürfte aller Unsicherheit dadurch entrückt werden, daß wir die synthetisierende Kraft auch für zellfreie Auszüge, also nach Abtrennung von den lebenden Erregern, dartun konnten.

a) Das Vorkommen der Carboligase in den einzelnen Heferasen.

Wir haben die Carboligase in sämtlichen uns zugänglichen Hefesorten feststellen können. In den vorher beschriebenen Versuchen haben wir Oberhefe der Brauerei Senst und die untergärigen Rassen des Instituts für Gärungsgewerbe sowie der Patzenhofer Brauerei mit Erfolg benutzt, ebenso später Trockenpräparate aus dem obergärigen Stamm der Brauereien Engelhardt und Senst. Alle diese Varietäten zeigten bei der Gärung in Gegenwart von Benzaldehyd das Vermögen, Kohlenstoff an Kohlenstoff zu ketten.

b) Wirksamkeit der Carboligase bei Umsetzung verschiedener Gärsubstrate.

Da die Aufspaltung der vergärbaren Kohlenhydrate letzten Endes über die Glieder der Brenztraubensäure und des Acetal-

dehyds verläuft, so war zu erwarten, daß die Carboligase, die intermediär auftretenden Acetaldehyd infolge der biologischen Synthese festhält, auch beim Wechsel mit den Gärsubstraten in Erscheinung tritt. Diese Annahme bestätigte sich durch den folgenden Versuch, zu welchem Glucose statt des bisher verwendeten Rohrzuckers diente. Später (s. S. 308) wird gezeigt, daß Brenztraubensäure die Kohlenhydrate bei dieser Reaktion ersetzen kann.

Das Gärgut enthielt 1200 g Stärkesirup¹⁾ und 1 kg Hefe Engelhardt in einem Gesamtvolumen von 25 l. Nachdem die Kohlendioxydentwicklung eingetreten war, wurden 80 ccm Benzaldehyd zugefügt. Nach 3 tägigem Stehen bei Zimmertemperatur war die Gärung beendet.

Von dem filtrierten Gärgut wurden 2 l mit essigsaurer Phenylhydrazin versetzt und eine Rohausbeute von 4,5 g Phenylhydrazon erhalten, das aus Benzol-Petroläther umkrystallisiert wurde und bei 96° schmolz.

0,2639 g, in 10 ccm Benzol gelöst, drehten im 1-dcm-Rohr = - 4,72°
 $[\alpha]_D = - 178,85^\circ$.

0,2698 g, in 10 ccm abs. Alkohol gelöst, zeigten im 1-dcm-Rohr Rechtsdrehung = + 6,11°;
 $[\alpha]_D = + 226,46^\circ$.

21,4 l Filtrat wurden ausgeäthert und nach Abdampfen des Äthers rektifiziert.

Fraktion	I	II	III	IV	V
	sott bei 12 mm		bis 80° (Vorlauf),		
	II	III	IV	V	
	12	12	12	12	12
	81–100°	101–110°	111–125°	126–150°	
	16 g,	35 g,	16,3 g,	19,3 g.	

Portion I und II reduzierten Fehlingsche Lösung in der Wärme, während die übrigen Anteile dies schon in der Kälte taten.

Die optische Untersuchung der drei höchsten Fraktionen (je 0,10 g in 5,0 ccm Alkohol gelöst) ergab im 1-dcm-Rohr folgende Werte:

für Fraktion III	- 0,71°
„ „ IV	- 1,80°
„ „ V	- 0,66°

¹⁾ Wir verwendeten ihn des Preises wegen statt reinen Traubenzuckers.

c) Die Carboligase als tätiges Enzym nach Abtrennung von der lebenden Zelle.

Bei der biochemischen Anlagerung von Acetaldehyd an Benzaldehyd gelang es uns, den enzymatischen Charakter der Reaktion dadurch nachzuweisen, daß sich der von frischer Hefe hervorbrachte Ketonalkohol auch bei zellfreier Vergärung mittels Hefemacerationssäften gewinnen ließ.

a) 4900 g Trockenhefe Senst (die wir 6 Monate vorher präpariert hatten) wurden in 15 l Wasser von 40° eingerührt und 2½ Stunden bei 37° im Brutschrank belassen. Durch Filtration wurden 5175 ccm klarer Saft gewonnen. Diese wurden mit einer Lösung von 730 g Rohrzucker auf ein Gesamtvolumen von 5875 ccm gebracht und in einen Brutschrank von 37° gestellt. Sobald die Kohlensäureentwicklung im Gange war, wurden 75 ccm frisch destillierter Benzaldehyd hinzugefügt, wodurch die Gärung nicht unterbrochen wurde. Nach 6 Stunden sowie nach weiteren 24 Stunden wurde nochmals je 5 ccm Benzaldehyd nachgegeben. Nach insgesamt 4 Tagen war die Umsetzung beendet. Das Gärgut wurde zur Koagulation des Eiweißes auf dem Wasserbade erhitzt, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat ausgeäthert. Es hinterließ nach Abdampfen des Äthers ein Rückstand von ca. 30 ccm; dieser reduzierte Fehlingsche Lösung momentan bei Zimmertemperatur und roch nur schwach nach Bittermandelöl. Durch Destillation im Vakuum wurden bei 10 mm Druck folgende Fraktionen aufgefangen:

Fraktion I	bis 83°	0,49 g (Vorlauf).
„ II	84–100°	4,83 g
„ III	101–110°	6,80 g
„ IV	111–130°	10,65 g
„ V	131–155°	1,96 g

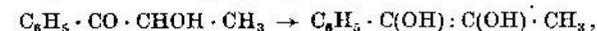
Mit Ausnahme der ersten Fraktion, die dem Geruche nach zu urteilen, hauptsächlich Benzaldehyd enthielt, gaben alle anderen Anteile eine positive Fehlingsche Reaktion in der Kälte. Bei der optischen Untersuchung zeigten die Portionen II bis IV (je 1,0 ccm in 5,0 ccm absolutem Alkohol gelöst) im 1-dcm-Rohr keine Ablenkung. 1,0 ccm der Fraktion V, in 5,0 ccm absolutem Alkohol gelöst, drehte unter gleichen Umständen nach links, und zwar = - 1,0°.

Zum Nachweise der Carboligasewirkung im zellfreien Mace-

rationssaftes stellten wir aus Fraktion IV das Phenylhydrazon dar. 5 ccm wurden in Wasser suspendiert und mit einer Lösung von 5 ccm Phenylhydrazin in 15 ccm 33proz. Essigsäure versetzt. Der sich bildende Niederschlag wurde wiederholt aus Benzol-Petroläther umkrystallisiert. Wir erzielten das reine Produkt vom Smp. 96°, dessen alkoholische sowie benzolische Lösung jedoch optisch inaktiv war.

0,1513 g Substanz gaben: 0,4167 g CO₂ und 0,0933 g H₂O.
 C₁₅H₁₆ON₂. Ber. C = 75,00%; H = 6,67%;
 gef. C = 75,11%; H = 6,85%.

Worauf die Bildung eines inaktiven Kondensationsproduktes bei der zellfreien Gärung im Gegensatz zur Entstehung einer aktiven Form bei der Gärung mit lebenden Hefen zurückzuführen ist, können wir nicht sagen. Möglicherweise kommt eine Pseudomerisierung zum Dioxy-propenyl-benzol:

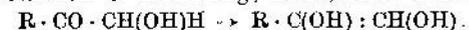


die der Enolbildung der Ketozucker¹⁾ oder den Beziehungen²⁾ zwischen Glycolaldehyd-dicarbonensäure und Dioxy-maleinsäure entspricht, in Betracht.

Daß die Art der Aufarbeitung, wenigstens das Erhitzen des Gärgutes zur Ausfällung des Eiweißes, keinen Einfluß auf die optischen Eigenschaften unseres Ketonalkohols ausübt, stellten wir durch analoge Behandlung von aktivem Ketonalkohol fest, der durch einen Gärversuch mit frischer Hefe gewonnen war. Auch an einer Besonderheit der verwendeten Trockenhefe liegt dies Verhalten nicht, wie folgender Versuch lehrt:

β) Aus 4 kg Trockenhefe Engelhardt wurden 4907 ccm Saft gewonnen, der mit einer Lösung von 800 g Rohrzucker in 700 ccm Wasser vermischt wurde. Nach dem Angären (bei 37° im Brutschrank) wurden 25 ccm Benzaldehyd und nach weiteren 7 Stunden nochmals 10 ccm Benzaldehyd zugesetzt. Nach 72 Stunden war die Gärung erloschen. Durch Erwärmung wurde wiederum das Eiweiß zum Gerinnen gebracht, das klare Filtrat dann mit Äther ausgeschüttelt, der Äther abgedampft und der Rückstand im Vakuum destilliert. Bei 10 mm wurden folgende Fraktionen aufgefangen:

¹⁾ A. Wohl und C. Neuberg, B. 33, 3099, 1900:



²⁾ CO₂H · CO · CHO · COOH → CO₂H · C(OH) : C(OH) · CO₂H.

Fraktion I	80—100°	6,78 g.
„ II	101—110°	10,55 g.
„ III	111—120°	6,68 g.
„ IV	121—130°	4,05 g.

Die Prüfung mit Fehlingscher Mischung ergab für Portion I eine positive Reaktion beim Kochen, während die übrigen Fraktionen schon in der Kälte reduzierten. Sämtliche Anteile waren optisch unwirksam.

Für optisches aktives Benzoin, das vom drehenden Mandelsäureamid aus mit Phenylmagnesiumbromid zugänglich ist, zeigte H. Wren¹⁾, daß es durch mannigfache Einflüsse leicht racemisiert wird; diese Substanz kann mit unserem Ketonalkohol durchaus verglichen werden.

Aus 5 g der Fraktion III wurden durch Einwirkung von essigsaurem Phenylhydrazin 4,5 g Hydrazon erhalten, das nach dem Umkrystallisieren aus Benzol-Petroläther scharf bei 96° schmolz.

Wir konnten somit in den gärwirksamen Auszügen aus zwei verschiedenen Hefesorten die Carboligasewirkung nachweisen.

d) Versuche zur Verknüpfung von Acetaldehyd und Benzaldehyd ohne gleichzeitig ablaufende Gärungen.

Nachdem wir so die Carboligase als Ferment charakterisiert hatten, versuchten wir, die Synthese unabhängig von dem Gärungsvorgange direkt mit den beiden Komponenten Benzaldehyd und Acetaldehyd durchzuführen.

α) 1½ l klarer Macerationssaft aus Sensthefe wurden mit 10,6 g Benzaldehyd und 4,4 g Acetaldehyd sechs Tage lang bei 37° im Brutschrank belassen. Zur Gewinnung unserer alkohollöslichen Substanz und zur Entfernung des Eiweißes wurde das Gemisch im Faust-Heimschen Apparat bei 35° eingeeengt und sodann die trockene Masse in absolutem Sprit auf dem Wasserbade extrahiert. Nachdem der Weingeist unter vermindertem Druck abgedampft war, wurde der Rückstand nochmals mit Alkohol aufgenommen und mit dem doppelten Volumen Äther versetzt. Dabei fiel ein unlöslicher Niederschlag aus, der entfernt wurde. Diese Behandlung wurde nochmals wiederholt, sodann der Alkohol-Ätherauszug abdestilliert und der Rückstand im Vakuum fraktioniert. Es gingen bei 120—135° und 15 mm Druck nur wenige Tropfen eines gelben Öles über, die Fehlingsche Lösung nicht reduzierten und optisch inaktiv waren.

1) H. Wren, Journ. Chem. Soc. 95, 1593. 1909.

Da nicht von vornherein feststand, ob der negative Ausfall dieses Ansatzes nicht auf eine Vergiftung des empfindlicheren Fermentsaftes durch die zugesetzten Aldehyde zurückzuführen war, haben wir einen entsprechenden Versuch mit lebender Hefe angestellt.

β) 450 g frische Oberhefe (Senst) wurden in 15 l Wasser suspendiert, die als Nährsalze 36 g Ammoniumsulfat, 18 g Dinatriumphosphat sowie Spuren KCl und MgSO₄ enthielten. Eine Probe dieser Hefeaufschwemmung erwies sich als gärtüchtig. Wir gaben sodann 22,5 g Benzaldehyd und 9,4 g Acetaldehyd hinzu und kontrollierten den Eintritt einer etwaigen Synthese durch die Prüfung des optischen Verhaltens. Nach 24 Stunden war die Drehung der filtrierten Maische im 2-dm-Rohr 0, obwohl die Hefe lebensfähig geblieben war, da eine Probe, mit Zucker gemengt, in Gärung geriet. Nach 48 Stunden waren wir gezwungen, wegen offensichtlicher Vergiftung der Hefezellen (die Gärprobe unter Zufügung von Zucker fiel negativ aus) 450 g frische Hefe, in 1 l Wasser suspendiert, hinzuzusetzen. Am nächsten Tage wies die polarimetrische Prüfung im 2-dm-Rohr: — 0,15° aus; die Fehlingsche Reaktion war ganz schwach angedeutet. Da eine kleine Menge der Maische mit neuem Zucker keine Gärung mehr zeigte, so gaben wir nochmals 450 g Hefe hinzu. Dasselbe taten wir nach weiteren 24 Stunden, sodaß wir im ganzen 1,8 kg Hefe angewendet hatten. Am sechsten Tage filtrierten wir ab und schüttelten 13,5 l klare Filtrat mit Äther aus. Nach Verjagen des Äthers wurde der Rückstand bei 15 mm rektifiziert.

Fraktion I	68—75°	20,78 g.
„ II	76—105°	wenige Tropfen,
„ III	106—135°	2,80 g.

Die letzte Portion erstarrte teilweise zu einem Krystallbrei und reduzierte Fehlingsche Lösung erst beim Erhitzen; erstere erwies sich zum größten Teile als Benzoesäure. Bei der geringen Ausbeute an reduzierender Substanz gelang es uns nicht, ein Derivat unseres Ketonalkohols zu gewinnen. Die vielleicht vorhandene kleine Quantität dürfte wohl unter Mitwirkung selbstgärender Kohlenhydrate der reichlich benutzten Hefe entstanden sein. Selbstverständlich soll nicht die Möglichkeit in Abrede gestellt werden, daß sich unter geeigneten biochemischen Bedingungen die zwei Aldehyde zum Ketonalkohol vereinigen könnten.

e) Über den Zusammenhang zwischen Zucker- oder Brenztraubensäurezerlegung und synthetischer Leistung.

Da es uns nicht geglückt war, mit den beiden Bausteinen Benzaldehyd und Acetaldehyd die Kondensation direkt herbeizuführen, versuchten wir, ausgehend von der Brenztraubensäure — der unmittelbaren Vorstufe des Acetaldehyds beim Zerfall des Zuckermoleküls — die biologische Synthese zu bewerkstelligen.

Der Ablauf der durch die Arbeiten Neubergs wohlbekannten Carboxylase-Tätigkeit scheint für die Entfaltung der Carboligase von wesentlicher Bedeutung zu sein, da der Zusammenschluß von Benzaldehyd mit dem aus der Brenztraubensäure sich abspaltenden Acetaldehyd glatt erfolgt.

α) 200 g Hefe (Engelhardt) wurden in 10 l Wasser verteilt und hierzu 25 g reine, frisch fraktionierte Brenztraubensäure gegeben. Das Gemisch wurde bei 37° digeriert. Nach 24 Stunden konnten wir die Carboligasewirkung schon an dem Auftreten einer optischen Aktivität feststellen. Das filtrierte Gärgut zeigte im 2-dcm-Rohr — 0,4°. Wir setzten, da der Geruch des Bittermandelöls bereits fast völlig verschwunden war, nochmals 10 ccm Benzaldehyd hinzu. Nach 48 Stunden trugen wir weiter 100 g Hefe und 8,9 g Brenztraubensäure ein. Am nächsten Tage betrug die Drehung im 2-dcm-Rohr — 0,75°. Als nach 6 Tagen die CO₂-Entwicklung beendet war, filtrierten wir ab und ätherten 9300 ccm aus. Die Fraktionierung des Ätherrückstandes geschah bei 13 bis 14 mm Druck.

Fraktion I	bis 80°	Vorlauf,
„ II	81—100°	unbedeutend,
„ III	111—115°	2,5 g,
„ IV	116—127°	4,0 g,
„ V	128—145°	(erstarrt kristallinisch).

Anteil II bis V reduzierten Fehlingsche Lösung bei Zimmertemperatur. 3,4 g der Fraktion IV ergaben mit einer entsprechenden Menge essigsäurem Phenylhydrazin 3,5 g Reaktionsprodukt, das aus Benzol-Petroläther wiederholt umkristallisiert wurde, bei 96° schmolz und in alkoholischer Lösung das polarisierte Licht nach rechts drehte.

0,1619 g Substanz: 0,4447 g CO₂ und 0,0921 g H₂O.

C₁₅H₁₆ON₂. Ber. C = 75,00%; H = 6,67%;

gef. C = 74,91%; H = 6,36%.

Die in Fraktion V aufgetretene Krystallmasse bestand vorwiegend aus Benzoesäure; ihre Entstehung dürfte durch Dismutation zu erklären sein, die wohl bei einer Brenztraubensäure spaltung eintreten kann, während bei gleichzeitigem Umsatz des wasserstoffreicheren Zuckers der mobilisierte „Gärungswasserstoff“ am Benzaldehyd angreift und seine Disproportionierung hintanhält.

β) Ein anderer Gäransatz enthielt 25 g Brenztraubensäure und 20 g Hefe (Senst) in 10 l Gesamtvolumen. Nach dem Angären wurden 20 ccm Benzaldehyd und nach weiteren 6 Stunden nochmals 5 ccm zugegeben. Nach 3 Tagen war bei 37° die Reaktion beendet. 9480 ccm des filtrierten Gärgutes wurden ausgeäthert und der nach Abdunstung des Äthers hinterbliebene Rückstand wurde bei 11 bis 12 mm rektifiziert.

Fraktion I	bis 90°	Vorlauf,
„ II	91—105°	3,98 g,
„ III	106—120°	0,63 g,
„ IV	121—130°	3,80 g,

Sobald im Ansatzrohr Krystallbildung auftrat, wurde die Destillation abgebrochen. Anteil I. reduzierte Fehlingsche Mischung in der Hitze, jede der übrigen Portionen schon in der Kälte.

Zur Untersuchung der optischen Aktivität wurde von den verschiedenen Anteilen 1,0 ccm in 10 ccm absolutem Alkohole gelöst und die Ableseung im 1-dcm-Rohr vorgenommen:

Fraktion I	—0,48°,
„ II	—7,77°,
„ III	—
„ IV	—12,68°.

Zur Identifizierung der Substanz wurden 2,5 g der Fraktion IV in 400 ccm Wasser suspendiert und mit einer Lösung von 2,5 ccm Phenylhydrazin in 7,5 ccm verd. Essigsäure vermischt. Die Ausbeute an rohem Hydrazon belief sich auf 3,2 g; nach Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther lag der Smp. bei 96°. Das polarimetrische Verhalten dieses aktiven Phenylhydrazons stimmte mit dem der Präparate überein, die in den Gärversuchen mit Rohrzucker oder Stärkesirup gewonnen waren (s. S. 299 u. 303).

0,1074 g Substanz in 10,0 ccm abs. Alkohol drehten im 2-dcm-Rohr = + 4,75°;

[α]_D = + 221,13°.

0,1305 g Substanz in 10 ccm Benzol drehten im 2-dcm-Rohr = - 4,47°;

$$[\alpha]_D = - 171,26^\circ.$$

Somit zeigt sich, daß es für den Eintritt der Carboligasewirkung einerlei ist, ob die volle zymatische Spaltung der verschiedenen gärfähigen Zucker oder die carboxylatische Zerlegung von Brenztraubensäure abläuft.

Für die Abbaustufe, die Brenztraubensäure, ergibt sich zugleich eine neue biochemische Rolle: sie ist der Ausgangsort kernsynthetischer Funktionen.

Berichtigung

zu dem Beitrag Z. Aszódi „Beitrag zur Kenntnis der chemischen Wärmeregulation der Säugetiere. II.“

Band 113, Seite 75 unten.

Die Tabelle loc. cit. nebeneinandergestellt, ist fortlaufend zu lesen, und zwar folgendermaßen:

U	O ₂
29,1	79,1
25,7	97,8
22,0	144
19,2	152
19,5	150
16,1	145
13,4	69,7

Autorenverzeichnis.

- Aron, Hans und Richard Gralka. Die akzessorischen Nährstoff-Faktoren. I. Zum Sondernährwert verschiedener Nahrungsfette. S. 188.
- Ege, Rich. Untersuchungen über das Volumen der Blutkörperchen in gegenseitig osmotischen Lösungen. Studien über das osmotische Verhältnis der Blutkörperchen. I. S. 109.
- Der osmotische Druck im Blutkörperchen und Plasma. Studien über das osmotische Verhältnis der Blutkörperchen. II. S. 175.
- Eigenberger, Fritz s. Pribram.
- Falta, W. und M. Richter-Quittner. Über die sogenannte oligodynamische Wirkung von Schwermetallen und Schwermetallsalzen. S. 39.
- Feigl, Joh. Chemische Organuntersuchungen. I. Zusammensetzung der Leber bei akuter gelber Atrophie. S. 22.
- Über das Vorkommen und die Verteilung von Fetten und Lipoiden im Blute nach Blutentziehung. Chemische Beiträge zur Kenntnis des Lipämiegebietes. VII. S. 63.
- Fränkel, Sigmund. Über die Beziehung von Druck, Temperatur und Fermentwirkung. I. Mitteilung: Die Wirkung von Druck auf die Geschwindigkeit der Fermenthydrolysen durch Pepsin, Trypsin und Diastase. Von Gino Meldolesi (Rom). S. 85.
- Freudenberg, E. und P. György. Über Kalkbindung durch tierisches Gewebe. S. 96.
- Fühner, H. Die narkotische Wirkung des Benzins und seiner Bestandteile (Pentan, Hexan, Heptan, Octan). S. 235.
- und E. Mertens. Der toxiologische Nachweis des Cytisins. S. 262.
- Gralka, Richard s. Aron.
- György, Paul. Notiz zur Kenntnis der Senkungsgeschwindigkeit von roten Blutkörperchen. S. 204.
- s. Freudenberg.
- Hári, Paul. Über die Lichtabsorption des reduzierten Hämoglobins. S. 52.
- Hartleben, Hans. Die Adsorption der Alkalichloride an Tierkohle. S. 46.
- Herbst, Heinrich. Über Adsorption durch Kohlenstoff. S. 204.
- Hirsch, Julius s. Neuberg.
- Keller, Rudolf. Dielektrizitätskonstanten biochemischer Stoffe. S. 134.
- Meldolesi, Gino s. Fränkel.
- Mertens, E. s. Fühner.
- Michaelis, L. Weitere Beiträge zur Theorie der Invertasewirkung. S. 269.
- Neuberg, Carl und Julius Hirsch. Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carboligase). S. 282.