

schiebung der Nuance von blau nach rot hin. Am deutlichsten zeigt sich dieser Unterschied bei den Oxazolderivaten; bei den Imidazolen tritt er am schärfsten bei der Kombination mit Amidonaphtoldisulfosäure (H) hervor.

Zürich, Universitätslaboratorium.

### 384. A. v. Lebedew: Über den Mechanismus der alkoholischen Gärung.

[Mitteilung aus dem Biochemischen Laboratorium des Pasteurschen Instituts.]

(Eingegangen am 29. Juli 1911.)

Baeyer<sup>1)</sup> (1870) war der erste, welcher die Vermutung ausgesprochen hat, daß bei der Vergärung der Hexosen Zwischenverbindungen entstehen, die ihrerseits zur Milchsäure führen; die letztere spaltet sich dann in Alkohol und Kohlensäure. Im Jahre 1904 hat Wohl<sup>2)</sup> ein Schema vorgeschlagen, nach welchem als Zwischenprodukte Glycerinaldehyd, Dioxyaceton, Methylglyoxal und Milchsäure anzusehen seien. 1906 hat Löb<sup>3)</sup> ein Schema angegeben, nach welchem sich ebenso Glycerinaldehyd oder Dioxyaceton als Zwischenprodukte bilden sollen. 1905 haben E. Buchner und J. Meisenheimer<sup>4)</sup> eine Beobachtung gemacht, daß bei der Zymase-Gärung in einigen Fällen Milchsäure entsteht; sie glaubten, daß sie eine experimentelle Bestätigung der Baeyerschen Ansichten gegeben hätten, doch hat im Jahre 1906 Slator<sup>5)</sup> gezeigt, daß Milchsäure nicht vergärbar ist, sie könnte darum höchstens nur ein Nebenprodukt sein. 1909 haben Buchner und Meisenheimer<sup>6)</sup> hauptsächlich aus demselben Grunde die Hypothese, daß Milchsäure ein Zwischenprodukt der Gärung ist, endgültig aufgegeben. Im Jahre 1907 hat L. Iwanoff<sup>7)</sup> durch Fällung der vergorenen Flüssigkeit mit Kupferacetat einen Zuckerphosphorsäureester isoliert, welchen er als Triosephosphorsäure betrachtete. Später ist es auch Young<sup>8)</sup> gelungen, durch

<sup>1)</sup> B. 3, 70, 75 [1870].

<sup>2)</sup> E. v. Lippmann: Chemie der Zuckerarten [1904] S. 1891; Bio. Z. 5, 54 [1907].

<sup>3)</sup> Landw. Jahrb. 1906, 541. <sup>4)</sup> B. 37, 419 [1904], und 38, 620 [1905].

<sup>5)</sup> Soc. 89, 141 [1906]; 93, 231 [1908]. B. 40, 123 [1907].

<sup>6)</sup> Thiels Landw. Jahrb. 38, Erg.-Bd. 5, 272 [1909]. B. 43, 1773 [1910].

<sup>7)</sup> H. 50, 281 [1907]. Zentralbl. f. Bakt. II, 24, 1 [1909].

<sup>8)</sup> P. Ch. S. 23, 65 [1907].

Fällung mit Bleinitrat einen Zuckerester zu isolieren, der die empirische Formel  $C_3H_5O_2(PO_4Pb)$  besaß, dabei hat dieser Autor aber keine Ansicht über die Natur des Zuckers ausgesprochen. 1908 habe ich bei den kinetischen Untersuchungen über den Verlauf der Gärung festgestellt, daß das Verschwinden des Zuckers und die Entwicklung von Kohlensäure zwei nebeneinander unabhängig verlaufende Prozesse (konsekutive Reaktionen) sind<sup>1)</sup>. Im folgenden Jahre<sup>2)</sup> habe ich bei den Ultrafiltrationsversuchen, als ich ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung suchte, aus dem gärenden Preßsaft einen Zuckerester durch Fällung mit Aceton isoliert, der mit Phenylhydrazin ein Osazon von der Formel  $C_{24}H_{31}N_6O_7P$  gab und Metallsalze bildete. Danach sollte der Ester eine Verbindung von Phosphorsäure mit einer Hexose sein. Damit wurde zum ersten Male die Natur des Zuckers experimentell festgestellt. Ich stellte durch Schmelzpunktsbestimmung außerdem fest, daß das Produkt aus Glucose oder Lävulose dasselbe Osazon lieferte<sup>3)</sup>. Als ich im Jahre 1910 die Untersuchung des zusammengesetzten Osazons fortsetzte, habe ich diese Tatsache auch durch Stickstoffbestimmung bestätigt und die Überzeugung gewonnen, daß auch das Produkt aus Mannose dasselbe Osazon liefern mußte<sup>4)</sup>, was auch später von Young bestätigt wurde<sup>5)</sup>. Ich habe dabei, mich auf die Zusammensetzung des Osazons stützend, angenommen, daß der Zuckerester auf 1 Mol. Hexose 1 Mol. Phosphorsäure enthält. Da aber diese Formel mit der von Young<sup>6)</sup> provisorisch angegebenen (auf 1 Mol. Hexose 2 Mol. Phosphorsäure) im Widerspruch stand, so habe ich nur die einzige Möglichkeit, denselben zu erklären, nämlich, daß bei der Einwirkung von Phenylhydrazin auf den Ester 1 Mol. Phosphorsäure abgespalten wird<sup>7)</sup>. In derselben Arbeit habe ich auch die Phenyl- und *p*-Bromphenylhydrazone des Zuckeresters beschrieben; doch ist es mir nicht gelungen, sie umzukristallisieren, und aus diesem Grunde habe ich auf die weitere Analyse vorläufig verzichtet.

Das Phenylhydrazinsalz des Osazons lieferte bei der Einwirkung von  $\frac{1}{20}$  *n*-Alkali zuerst ein Hexosazon mit dem Schmp. 215° ( $\frac{1}{16}$  Teil des angewandten Osazons) und bei längerem Erwärmen auf dem Wasserbade das Glyoxalosazon ( $\frac{1}{6}$  Teil). Nun konnte ich später feststellen, als ich nämlich mit der Hefe von Moritz (Paris) arbeitete, daß das Hexosazon bei der Spaltung des zusammengesetzten Osazons nicht immer erscheint, d. h. daß sich bei der Vergärung des Rohr-

<sup>1)</sup> Bio. Z. 10, 456 [1908].

<sup>2)</sup> Ibid. 20, 124—125 [1909].

<sup>3)</sup> Ibid. 20, 123 [1909].

<sup>4)</sup> Ibid. 28, 214 [1910].

<sup>5)</sup> Ibid. 32, 179 [1911].

<sup>6)</sup> Proc. Roy. Soc., Serie B, 81, 544 [1909].

<sup>7)</sup> l. c. S. 225.

zuckers unter gewissen Umständen zwei Zuckerester bilden, welche ihrer Zusammensetzung nach sehr ähnlich sind; von beiden tritt einer nur in sehr kleiner Menge und auch nicht immer auf. Es bleibt noch zu entscheiden, ob dies von der zur Vergärung des Zuckers angewandten Hefeart abhängt oder von der Zeit, nach der man die Gärung unterbricht. Als ich in diesem Jahre die Untersuchung der oben genannten Hydrazone des Esters fortsetzte, ist es mir gelungen, durch Einwirkung von Formaldehyd auf das Phenylhydrazon den Ester zurückzugewinnen, dessen Calciumsalz die Zusammensetzung  $C_3H_5O_2CaPO_4$  besaß. Außerdem konnte ich aus Methylalkohol das *p*-Bromphenylhydrazon umkrystallisieren und feststellen, daß diese Verbindung auf 1 Mol. Hexose 2 Mol. Phosphorsäure enthält<sup>1)</sup>.

Schon im Jahre 1909 hatte ich mir vorbehalten<sup>2)</sup>, die Eigenschaften der Ester, welche sich im Preßsaft bei der Zugabe anderer Zuckerarten eventuell bilden, zu untersuchen. In Erfüllung dieser Absicht habe ich im vorigen Jahre<sup>3)</sup> versucht, den Zuckerester von der Vergärung des Dioxyacetons durch trockene Hefe und Zymin (Aceton-Dauerhefe) zu isolieren, jedoch vergeblich, obwohl eine ziemlich lebhaft Gärung stattfand. Daß das Dioxyaceton durch Hefe vergärbar ist, wurde zum ersten Male von G. Bertrand<sup>4)</sup> nachgewiesen. 1908 hat Boysen-Jensen<sup>5)</sup> eine vorläufige Mitteilung über das Auftreten des Dioxyacetons in der Gärflüssigkeit gemacht, welche meines Wissens nach keine Bestätigung gefunden hat. 1910 haben E. Buchner und J. Meisenheimer<sup>6)</sup> die interessanten Versuche über die Vergärung des Dioxyacetons durch Preßsaft veröffentlicht, nach welchen es den Verfassern gelungen ist, 2-proz. Lösungen eben so gut wie Glucose selbst zu vergären, allerdings unter etwas künstlichen Bedingungen, da sie, um diese günstigen Ergebnisse zu erzielen, sich gezwungen sahen, den Preßsaft für die Versuche im Vakuum zu konzentrieren und dazu noch ebenso im Vakuum konzentriertes Koenzym (Kochsaft) zu geben<sup>7)</sup>. Wenn aber die Konzentration des Dioxyacetons 2% überstieg, so bildete sich bei diesen Versuchen nur ebensoviel Kohlensäure, als ob es sich um 2-proz. Lösungen handelte.

Neuerdings habe ich eine kurze Mitteilung in den Comptes Rendus de l'Acad. des sciences<sup>8)</sup> gemacht, in welcher ich die Isolierung

<sup>1)</sup> Diese Arbeit, die den Gegenstand meiner zweiten Mitteilung über Hexosephosphorsäure bildet, wird demnächst an anderer Stelle erscheinen.

<sup>2)</sup> loc. cit. **20**, 121 [1909].      <sup>3)</sup> loc. cit. **28**, 214 [1910].

<sup>4)</sup> A. ch. [8] **3**, 181 [1904].

<sup>5)</sup> Ber. Deutsch. Bot. Ges. **26a**, 666 [1908].      <sup>6)</sup> B. **43**, 1773 [1910].

<sup>7)</sup> B. **43**, 1779 [1910].      <sup>8)</sup> C. r. **153**, 136 [1911].

des Zuckeresters bei der Vergärung des Dioxyacetons durch den nach meiner Methode<sup>1)</sup> dargestellten Hefemacerationssaft beschrieb. Ich möchte nun einige Gärversuche mit Dioxy-aceton, die mich zur Isolierung des Esters führten, an dieser Stelle beschreiben.

### Vergärung des Dioxy-acetons.

Für diese Versuche wurde Dioxyaceton nach der ausgezeichneten Methode<sup>2)</sup> G. Bertrands dargestellt. Zu der Gewinnung des Macerationssaftes habe ich trockene, nach meiner Vorschrift von Hrn. Schroder (München) vorbereitete Hefe angewandt. Die Hefe wurde mit 3 Gewichtsteilen Wasser 2 Stunden bei 35° stehen gelassen, dann abfiltriert. Das Filtrat (Macerationssaft) zeigte keine Selbstgärung und besaß, nach E. Buchner<sup>3)</sup> bestimmt, eine Gärkraft von 2.8.

Versuch 1. Tabelle I. In 3 Erlenmeyer-Kölbchen (A, B, C) mit Meisslschem Gärverschuß wurden je 20 ccm Macerationssaft + 0.2 ccm Toluol gegeben, außerdem wurden zum Kölbchen A 1 g Dioxyaceton, zum Kölbchen B 1 g Rohrzucker und zum Kölbchen C 1 g Dioxyaceton + 0.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zugefügt. Alle 3 Kölbchen wurden im Thermostaten bei 25° stehen gelassen und dann in bestimmten Zeitperioden gewogen.

Tabelle I.

Kölbchen	CO <sub>2</sub> in g pro Stunde				Dauer der Gärung	CO <sub>2</sub> in g
	2	22	24	24		
A	0.110	0.200	0.075	0.00	48	0.390
B	0.185	0.185	0.02	0.00	48	0.385
C	0.80	0.05	0.165	0.00	48	0.295

Tabelle II.

Kölbchen	CO <sub>2</sub> in g pro Stunde		Dauer der Gärung	CO <sub>2</sub> in g
	30	40		
A	0.100	0.060	70	0.17
B	0.135	0.015	70	0.15

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß das Dioxyaceton bis zu 5% Konzentration ebenso gut gärt wie der Rohrzucker, nur etwas langsamer, was auf die schädliche Wirkung des Dioxyacetons auf die Zymase zurückzuführen ist. Bei Zusatz von großen Mengen Phosphat wird die Geschwindigkeit des Prozesses bedeutend verlangsamt. Dasselbe gilt auch für Rohrzucker, wie es der folgende Versuch zeigt.

<sup>1)</sup> C. r. 152, 49 und 1129 [1911]; Bl. [4] 9, 76, 411, 672, 744. Die ausführlichere Arbeit wird in Annales de l'Institut Pasteur, bedeutend kürzer abgefaßt, im nächsten Heft der Zeitschr. f. physiol. Ch. erscheinen.

<sup>2)</sup> A. ch. [8] 3, 181 [1904]. <sup>3)</sup> Die Zymasegärung [1903], S. 86.

Versuch 2. Tabelle II. In 2 Erlenmeyer-Kölbchen (A und B) wurden je 60 ccm Saft gegeben, ferner zum Kölbchen A 3 g Dioxyaceton + 2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 1 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , zum Kölbchen B 3 g Rohrzucker + 3 g Phosphatmischung. Nach 1 Stunde 10 Minuten wurde die Gärung in Kölbchen A zur Isolierung des gebildeten Esters unterbrochen. Das Kölbchen B (mit Rohrzucker) wurde nach 24 Stunden noch einmal gewogen, Differenz 0.165 g, d. h. im ganzen 0.265 g. Die beiden Versuche zeigen auch, daß der Zusatz des Phosphats die Vergärung des Rohrzuckers etwas stärker hemmt als die des Dioxyacetons.

Um den Einfluß der Konzentration des Dioxyacetons auf seine Vergärbarkeit nachzuweisen, möchte ich hier folgenden Versuch anführen.

Versuch 3. Tabelle III. Zu den 6 Erlenmeyer-Kölbchen (A, B, C und A', B', C') wurden je 20 ccm Saft, außerdem zu den Kölbchen A, B und C entsprechend 2, 3, 4 g Dioxyaceton, zu den Kölbchen A', B' und C' 2, 3, 4 g Rohrzucker zugefügt. Die Tabelle IV zeigt die Resultate der Versuche 1 und 3 zusammen (R = Rohrzucker, D = Dioxyaceton).

Tabelle III.

Kölbchen	Konzentration in %	CO <sub>2</sub> in g pro Tag				CO <sub>2</sub> in g
		1	2	3	4	
A	10	0.35	0.10	0.04	0.00	0.49
A'	10	0.70	0.10	0.02	0.00	0.90
B	15	0.42	0.09	0.01	0.00	0.52
B'	15	0.88	0.20	0.04	0.00	1.12
C	20	0.48	0.12	0.03	0.00	0.63
C'	20	0.95	0.35	0.12	0.02	1.44

Tabelle IV.

Zucker	Konzentration in %	Dauer d. Gärung i. Tagen	CO <sub>2</sub> in g	Prozente des vergorenen Zuckers
D	5	2	0.39	78
R	5	2	0.39	74
D	10	3	0.49	49
R	10	3	0.90	81
D	15	3	0.52	35
R	15	3	1.12	70
D	20	3	0.63	32
R	20	4	1.44	69

In der letzten Spalte der Tabelle IV ist der Rohrzucker als Hexose berechnet. Die Menge des vergorenen Zuckers wurde der Einfachheit wegen durch Verdoppeln der Menge der entwichenen Kohlensäure erhalten.

Man sieht daraus, daß, wenn die Konzentration des Dioxyacetons höher als 5 % ist, es ungefähr 2-mal schwächer vergoren wird als der Rohrzucker. Andererseits habe ich gezeigt<sup>1)</sup>, daß auch beim Vergären des Rohrzuckers die Menge des vergorenen Zuckers, wenn dessen Konzentration höher als 7 % ist, mit steigender Konzentration

<sup>1)</sup> Bl. [4] 9, 678 [1911].

stark abnimmt. So werden z. B. bei der Konzentration von 7 % (auf Hexose berechnet) 83 % des zugegebenen Zuckers vergoren, bei der Konzentration von 56 % aber nur 24.5 %. Daraus folgt, daß der Unterschied im Vergären des Dioxyacetons und Rohrzuckers bloß ein quantitativer und nicht qualitativer ist. Wie ich schon oben bemerkt habe, läßt sich die schwache Vergärbarkeit des Dioxyacetons durch die Annahme der schädlichen Wirkung der starken Konzentration (über 5 %) auf die Zymase leicht erklären. Und diese Erklärung ist nicht nur eine Vermutung, sondern sie stützt sich auf die Tatsache, daß der Hefesaft durch eine große Menge Dioxyaceton viel schneller koaguliert wird als durch die entsprechende Menge des Rohrzuckers, wodurch selbstverständlich auch seine Wirksamkeit leidet. Die starken Konzentrationen des Rohrzuckers verzögern im Gegenteil die Koagulation der Eiweißstoffe des Saftes<sup>1)</sup>. Buchner und Meisenheimer<sup>2)</sup> haben gezeigt, daß Glycerinaldehyd ebenso wie Methylglyoxal besonders schädigend auf den Preßsaft wirkt. Sie haben infolgedessen die Vermutung ausgesprochen, daß die schädliche Wirkung des Dioxyacetons darauf beruht, daß das Dioxyaceton sich in Glycerinaldehyd verwandelt, doch konnten sie keine Bildung von Glycerinaldehyd nachweisen. Ich werde weiter unten Gelegenheit haben zu zeigen, daß das Dioxyaceton bei der Gärung unverändert bleibt; man ist darum berechtigt anzunehmen, daß das Dioxyaceton selbst ebenso wie Glycerinaldehyd, obwohl nicht in gleichem Grade, schädigend auf den Hefesaft wirkt.

Nach dieser Abschweifung, die für das Folgende von Bedeutung wird, möchte ich nun weiter die Versuche beschreiben, welche zeigen, daß bei der Vergärung des Dioxyacetons die im Hefesaft anwesende Phosphorsäure in organische (veresterte) Form übertritt. L. Iwanoff<sup>3)</sup> war der erste, der die wichtige Beobachtung gemacht hat, daß bei der Vergärung der Hexosen die Menge der durch Magnesiamischung fällbaren Phosphorsäure abnimmt. Ein Jahr später haben auch Harden und Young<sup>4)</sup> unabhängig von Iwanoff dieselbe Beobachtung gemacht. Die genannten Autoren haben dann den Zuckerester isoliert, der, wie ich zuerst gezeigt hatte<sup>5)</sup>, ein Hexose-phosphorsäureester ist.

#### Isolierung des Zucker-phosphorsäureesters bei der Vergärung des Dioxy-acetons.

Versuch 1. 60 cm Saft + 3 g Dioxyaceton + 1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0.5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  wurden in ein Erlenmeyer-Kölbchen mit Meißelschem Verschuß

<sup>1)</sup> l. c. S. 680.      <sup>2)</sup> l. c.

<sup>3)</sup> Travaux de la Soc. des Natural. de St. Pétersbourg, **34** [1905].

<sup>4)</sup> Proc. Roy. Soc., Serie B, **77**, 405 [1906].      <sup>5)</sup> l. c. S. 124.

gebracht und nach der Auflösung die Menge der durch Magnesiamischung fällbaren Phosphorsäure bestimmt. Dabei wurde auf folgende Weise verfahren. 1 ccm von dieser Lösung wurde zu 10 ccm normaler Schwefelsäure hinzugefügt und gleich darauf mit 10 ccm normaler Natronlauge neutralisiert. Dann wurden die gefällten Eiweißstoffe abfiltriert und 10 ccm des Filtrats mit Urannitrat titriert. Daß der Zuckerester dabei nicht gefällt wird, wurde schon von L. Iwanoff<sup>1)</sup> gezeigt. Die Menge des Phosphorsäureanhydrids betrug 0.7431 g. Das Kölbchen wurde gewogen und im Thermostaten bei 25° stehen gelassen. Nach 1¼ und 2¼ Stunden wurde es wieder gewogen und die Phosphorsäure in der oben angegebenen Weise bestimmt.

Nach 1¼ Stunden:  $\text{CO}_2 = 0.13 \text{ g}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5 = 0.1339 \text{ g}$ .  
 » 2¼ »  $\text{CO}_2 = 0.17 \text{ g}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5 = 0.2535 \text{ g}$ .

Nach 1¼ Stunden sind also 0.6092 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  in organische Form übergegangen. Die Gärung wurde dann durch Zusatz von 4 Vol. Alkohol (94-proz.) unterbrochen.

Versuch 2. Dieselben Bedingungen; nur wurden statt 1.5 g Phosphatmischung 3 g genommen. Der Gehalt an fällbarer Phosphorsäure war 1.1907 g  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Nach 1 Stunde 25 Minuten wurde das Kölbchen gewogen, die Phosphorsäure wieder bestimmt und die Gärung danach unterbrochen.  $\text{CO}_2 = 0.195 \text{ g}$ ;  $\text{P}_2\text{O}_5 = 0.5292 \text{ g}$ , d. h. es ist fast ebenso viel Phosphorsäure wie oben (0.6615 g) in eine organische Form übergegangen. Da auf 2 Mol. Dioxyaceton 1 Mol.  $\text{P}_2\text{O}_5$  gebunden wird, wie aus dem, was unten folgt, zu ersehen ist, so wurden im 1. Versuche 0.7736 g, im 2. 0.8385 g Dioxyaceton verestert.

Der 1. Versuch lehrt, daß der Zuckerester sich im Anfang der Gärung bildet, um bald wieder gespalten zu werden. Die Gärung bei der Bildung des Esters ist besonders lebhaft, ähnlich wie bei der Vergärung des Rohrzuckers<sup>2)</sup>, dann aber, wenn eine große Menge des Esters gebildet ist, geht sie sehr langsam weiter. Die direkten vergleichenden Versuche, die ich an anderer Stelle veröffentlichen werde, haben nämlich gezeigt, daß auch der Zuckerester, wenn er eine gewisse Konzentration übersteigt, viel langsamer durch den Hefesaft vergoren wird, als die entsprechende Menge des Rohrzuckers, mit anderen Worten, daß die starke Konzentration des Esters hemmend auf die Geschwindigkeit des Gärungsprozesses wirkt. Man nimmt gewöhnlich an, daß eine Zwischenverbindung sich schneller zersetzt als der Ausgangsstoff; nun findet man hier einen sehr interessanten Fall, daß es, unter gewissen Bedingungen, auch umgekehrt sein kann. Es gibt, wie man sieht, auch Zwischenverbindungen, deren Rolle nicht so sehr

<sup>1)</sup> H. 50, 281 [1907].

<sup>2)</sup> E. und H. Buchner und M. Hahn: Die Zymasegärung [1903] S. 142. Harden und Young: P. Ch. S. 21, 189 [1905]; Proc. Roy. Soc., Serie B, 77, 405 [1906].

in der Beschleunigung der Reaktion bestehen, sondern in der Überführung der primären Substanz in eine Verbindung, die weiter gespalten werden kann, sonst wäre der ganze Prozeß überhaupt unmöglich. Ich habe vor, Versuche auszuführen, um die volle Balance des Zuckers, der Phosphorsäure und des Esters kinetisch festzustellen.

Wie ich schon erwähnt habe, wurde die Gärung des Dioxyacetons durch Zusatz von 4 Volumen 97-prozentigem Alkohol unterbrochen. Das Ganze wurde nach einer Nacht abfiltriert und der Rückstand auf dem Filter mit der Hand abgepreßt. Der Preßkuchen wurde mit 60 ccm Alkohol wieder zerrieben und abgepreßt. Diese Operation wurde noch einmal wiederholt. Die klaren Filtrate wurden zusammengossen, im Vakuum konzentriert und dann mit Phenylhydrazin in der Kälte behandelt. Das nach einer Nacht gebildete Osazon (Blättchen) wurde aus wäßrigem Alkohol 5-mal umkrystallisiert und der Schmp. 131° bestimmt.

0.1211 g Sbst.: 22.6 ccm N (24°, 755 mm).

$C_{15}H_{16}N_4O$ . Ber. N 20.82. Gef. N 20.70.

Außerdem wurde das Oxim nach Piloty und Ruff<sup>1)</sup> dargestellt, Schmp. 82—83°. Aus diesen Analysenergebnissen geht hervor, daß das Filtrat noch Dioxyaceton enthält.

Der abgepreßte Rückstand wurde 1 Stunde lang mit 100 ccm Wasser stehen gelassen, dann filtriert und wieder abgepreßt. Diese Operation wurde noch 2-mal mit je 50 ccm Wasser wiederholt. Es wurden drei vereinigte Filtrate im Vakuum bis 30 ccm konzentriert, in ein Becherglas übergossen und mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt. Sofort nach dessen Zugabe entstand eine Emulsion, und auf dem Boden des Becherglases erschien eine gelbbraune, dicke Flüssigkeit. Nach einer Nacht wurde die obenstehende acetonhaltige Flüssigkeit dekantiert und der Rückstand mit Bleiacetatlösung behandelt. Der entstandene Niederschlag wurde an der Nutsche abgesaugt, mit schwacher Bleiacetatlösung ausgewaschen, bis das Filtrat wasserklar wird, in Wasser aufgeschlämmt und mit  $H_2S$  behandelt. Das Filtrat gab beim Erwärmen mit Phenylhydrazin auf dem Wasserbade schon nach einigen Minuten ein Osazon; nach 1 Stunde fällt sich die ganze Flüssigkeit mit verfilzten gelben Nadeln und bildet einen dicken Brei. Das Osazon wurde abgesaugt, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen, dann aus 85-prozentigem Alkohol umkrystallisiert. Es bestand aus sehr schönen, sternartig zusammengesetzten, sehr langen, makroskopischen Nadeln und besaß den Schmp. 150—152° (unkorr.), der identisch ist mit dem Schmelzpunkt des von mir früher dargestellten Osazons des Zuckeresters, welcher sich bei der Vergärung des Rohrzuckers bildet. Das Osazon ist orangegelb und enthält 1 Mol. Krystallwasser. Beim Trocknen bei 60° im Vakuum wird es kanariengelb. Bei  $\frac{1}{2}$ -stündiger

<sup>1)</sup> B. 30, 1656 [1897].

Einwirkung von  $\frac{1}{20}$ n. Natronlauge in alkoholischer Lösung auf dem Wasserbade entsteht nur Glyoxalosazon.

0.1192 g Sbst.: 16.1 ccm N ( $22^{\circ}$ , 764 mm). — 0.2036 g Sbst.: 0.0427 g  $Mg_2P_2O_7$ . — 0.1835 g Sbst.: 0.355 g  $CO_2$ , 0.096 g  $H_2O$ .

$C_{24}H_{31}N_6O_7P$ . Ber. C 52.75, H 5.68, N 15.38, P 5.68.

Gef. » 52.75, » 5.81, » 15.43, » 5.84.

Um zu sehen, ob eventuell auch eine Hexose durch Aceton mitgefällt ist, habe ich, nach der Behandlung des abgeschiedenen Esters mit Bleiacetatlösung, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt, vom Bleisulfid abfiltriert und das Filtrat mit Phenylhydrazin auf dem Wasserbade erwärmt. Dabei entstand kein Osazon.

Kontrollversuche. 1. 60 ccm Saft ohne Zusatz von Dioxyaceton wurden genau in der oben angegebenen Weise behandelt, es wurde jedoch kein Osazon erhalten. 2. 0.6 g Dioxyaceton + 0.6 g Phosphatmischung wurden in 10 ccm Wasser gelöst, im Thermostaten bei  $35^{\circ}$  2 Tage stehen gelassen und dann nach obigem Verfahren behandelt. Es wurde nur Glycerosazon erhalten.

Nachdem ich festgestellt hatte, daß die Osazone der Ester, welche sich bei der Gärung des Rohrzuckers und Dioxyacetons bilden, identisch sind, habe ich auch deren Bariumsalze dargestellt und analysiert. Dabei habe ich zur Reinigung des Salzes die von L. Iwanoff<sup>1)</sup> zuerst gemachte Beobachtung — daß die meisten Metallsalze des Esters in warmem Wasser schwerer löslich sind, als in kaltem — benützt.

Um den Ester von der ihn immer begleitenden Phosphorsäure zu befreien, habe ich ihn mit Magnesiamischung versetzt,  $\frac{1}{4}$  Volumen Ammoniak zugefügt, eine Nacht stehen gelassen, den Niederschlag abfiltriert und das überschüssige Ammoniak im Vakuum abdestilliert. Die übriggebliebene Flüssigkeit wurde dann neutralisiert und Chlorbariumlösung bis zum Erscheinen des Niederschlags zugefügt, letzterer abfiltriert und das klare Filtrat auf dem Wasserbade erwärmt. Dabei fiel ein weißer, pulveriger Niederschlag aus. Man löst ihn unter Zusatz einiger Tropfen 50-prozentiger Essigsäure in Wasser, fügt Ammoniak bis zum Erscheinen der Trübung zu, filtriert und erwärmt wieder. Diese Operation wurde 3-mal wiederholt. Der Niederschlag wurde schließlich — bis das Filtrat mit Salpetersäure enthaltender Silbernitratlösung keine Trübung gab — mit heißem Wasser, dann mit Alkohol und Äther ausgewaschen und bei  $37^{\circ}$  im Vakuum getrocknet. Wenn man das Bariumsalz des Esters bei höherer Temperatur, z. B. bei  $60^{\circ}$ , trocknen läßt, so wird es gelblich.

Die Analyse des Bariumsalzes vom Zuckerphosphorsäureester, der sich bei der Vergärung des Rohrzuckers (A) bildet, ergab:

0.2972 g Sbst.: 0.1285 g  $CO_2$ , 0.0519 g  $H_2O$ . — 0.2588 g Sbst.: 0.1966 g  $BaSO_4$ . — 0.2852 g Sbst.: 0.1042 g  $Mg_2P_2O_7$ .

<sup>1)</sup> l. c.

Bei der Vergärung des Dioxyacetons (B):

0.2921 g Sbst.: 0.1233 g CO<sub>2</sub>, 0.0497 g H<sub>2</sub>O. — 0.2243 g Sbst.: 0.1706 g BaSO<sub>4</sub>, 0.0839 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>(BaPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> oder C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>BaPO<sub>4</sub>.

Ber. C 11.79, H 1.64, Ba 44.99, P 10.12.

Gef. A » 11.78, » 1.97, » 44.70, » 10.18.

B » 11.51, » 1.89, » 44.76, » 10.42.

Da die beiden Formeln C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>BaPO<sub>4</sub> und C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>(BaPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> identisch sind, ist es nur Dank den von mir dargestellten Osazonen und Hydrazonen möglich geworden, die Natur des veresterten Zuckers festzustellen, denn bei der Hydrolyse des Zuckeresters durch mehrstündiges Kochen (Young) oder beim Behandeln mit Säuren und Alkalien (Lebedew) würde die Triose, falls sie ein Bestandteil wäre, sicher zerstört.

Ich habe schon oben gesagt, daß das Produkt aus Dextrose, Lävulose und Mannose dasselbe Osazon liefert, mit anderen Worten, daß die entsprechenden Zuckerester identisch sind. Diese Tatsache wurde später auch von Young<sup>1)</sup> auf anderem Wege festgestellt.

Nachdem ich hier den Beweis führen konnte, daß das Dioxyaceton denselben Ester liefert (zweifellos auch der Glycerinaldehyd), so ist man berechtigt, die folgende Regel aufzustellen: alle gärfähigen Zuckerester bilden beim Anfang der Gärung denselben Zuckerester, nämlich Hexosebiphosphat. Das kann, wie es mir scheint, nur dadurch erklärt werden, daß die Hexose bei der Gärung zuerst in 2 Moleküle Triose gespalten wird, welche dann mit Phosphorsäure einen Ester, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>RPO<sub>4</sub> bildet, der sich sofort zu C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>(RPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> kondensiert.

Im vorigen Jahre<sup>2)</sup> habe ich schon die Ansicht ausgesprochen, die ich jetzt nochmals betone: »Die Rolle der Phosphorsäure liegt bei dem Gärungsprozesse höchstwahrscheinlich nur darin, daß Dextrose bezw. Lävulose durch den Übergang in die Esterform mit nachstehender Spaltung in eine instabile Modifikation übergeführt wird, die ihrerseits viel leichter durch ein entsprechendes Enzym gespalten wird. . . . Wenn nun von beiden Reaktionen die eine — Spaltung des Esters — mit meßbarer Geschwindigkeit vor sich geht, was in Wirklichkeit der Fall ist, die zweite aber praktisch mit unendlich großer Geschwindigkeit sich abspielt, so wird man nie imstande sein, die Zwischenprodukte zu isolieren. Nur eine einzige Möglichkeit besitzt man, um dies zu erzielen, man muß auch die zweite Reaktion durch einen ge-

<sup>1)</sup> Proc. Roy. Soc., Serie B, 81, 528 [1909].    <sup>2)</sup> l. c. S. 224.

eigneten spezifischen, negativen Katalysator zu verlangsamen und dadurch meßbar zu machen suchen.\* Ich will nur noch hinzufügen, daß die Hexose, welche sich bei der Gärung bildet und durch Alkoholase unter Bildung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{OH}$  gespalten werden kann, höchst wahrscheinlich eine Acrose ist.

Die Tatsache, daß Dextrose oder Lävulose in größerer Konzentration besser vergoren wird, als die entsprechende Menge der Triose, läßt sich leicht durch die Annahme erklären, daß bei der Spaltung der Hexose die gebildete Triose nur in kleiner Konzentration auftritt, in diesem Falle aber wird sie leicht und ebenso schnell vergoren, wie es aus oben angeführten Versuchen genügend klar hervorgeht.

Alle hier mitgeteilten experimentellen Ergebnisse, ebenso wie die entwickelten theoretischen Betrachtungen veranlassen mich, das folgende Schema des Gärungsprozesses zu geben, nach welchem dessen erste Stufe im Einklang mit festgestellten Tatsachen erklärt wird.

1.  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 2\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ,
2.  $2\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 + 2\text{RHPO}_4 = 2\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{RPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ,
3.  $2\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{RPO}_4 = \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4(\text{RPO}_4)_2$ ,
4.  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4(\text{RPO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}$   
 $= \text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{RPO}_4 + \text{RHPO}_4$ ,
5.  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4(\text{RPO}_4)_2 + 2\text{H}_2\text{O} = 2\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{OH} + 2\text{CO}_2 + 2\text{RHPO}_4$ .

In der Zuversicht, daß sich dieses Schema mit der Zeit als richtig erweist, bleibt noch die zweite und wichtigste Stufe zu erklären — die Bildung von Kohlensäure und Alkohol —, was mir nach oben Gesagtem auch nicht hoffnungslos scheint.

Ich behalte mir vor, diese Untersuchung, ebenso wie eine ähnliche am Glycerinaldehyd, fortzusetzen.

### 385. W. Borsche: Über Tetrahydro-piperin und Tetrahydro-piperinsäure.

[Vorl. Mitteilung a. d. Allgemeinen Chem. Institut der Universität Göttingen.]

(Eingegangen am 5. Oktober 1911.)

Wie ich vor kurzem in diesen Berichten<sup>1)</sup> gezeigt habe, läßt sich die bisher nur schwierig zugängliche  $\delta$ -Phenyl-valeriansäure auf verhältnismäßig bequeme Weise gewinnen, indem man Cinnamalacetone durch Schütteln mit  $\text{H}_2 + \text{Pd}$  zu Methyl- $\delta$ -phenylbutyl-

<sup>1)</sup> B. 44, 2594 [1911].