

der potentiometrischen Titrationskurven von Polysäuren die Berücksichtigung der ersten und vielleicht auch der zweiten Nachbargruppenwechselwirkung nötig ist. Daher ist es sehr interessant, das Verhalten von Polysäuren zu untersuchen, die sich nur hinsichtlich ihrer Stereospezifität unterscheiden. Während zwischen stereoregulärer und ataktischer Polyacrylsäure keine Unterschiede gefunden werden konnten [24], stellte *Loebl* im Falle der Polymethacrylsäuren deutliche Unterschiede fest. Die isotaktische Säure ist eine schwächere Säure als die ataktische; die gemessenen Säuredissoziationskonstanten unterscheiden sich um etwa 0,3 *pK*-Einheiten, und zwar unabhängig vom Neutralisationsgrad und praktisch auch von der Gegenwart von Fremdsalzen. Die Dissoziationsenthalpie der isotaktischen Säure beträgt bei jedem Neutralisationsgrad ungefähr null, während die der ataktischen Säure negativ ist und mit steigendem Neutralisationsgrad sinkt:

$$\Delta H_{\text{Diss}} = -0,7 \text{ kcal}$$

$$\frac{d(\Delta H_{\text{Diss}})}{d\alpha} = -0,3 \text{ kcal/Neutralisationsgrad}$$

[24] *M. L. Miller, M. C. Botty u. C. E. Rahn*, *J. Colloid Sci.* **15**, 83 (1960).

Gleichgewichtsmessungen haben gezeigt, daß die isotaktische Säure Kupfer(II)-Ionen bedeutend fester bindet als die ataktische Form. Daß diese Unterschiede im Ionenbindungsvermögen (Protonen und Kupfer(II)-Ionen) auch bei hohen Salzkonzentrationen fortbestehen, beweist eindeutig die Bedeutung der Nachbargruppenwechselwirkung.

## Ausblick

Man muß aus diesen Ergebnissen den Schluß ziehen, daß die Mikrotaktizität der Polymerketten einen grundlegenden und zugleich neuartigen Aspekt für die Polymerchemie darstellt, der zur Interpretation gewisser Reaktionen und physikalischer Eigenschaften polymerer Verbindungen heranzuziehen ist. Andererseits bietet die Synthese von Polymeren, die sich in ihrer Taktizität unterscheiden, eine Reihe neuer Möglichkeiten für die organische Chemie und für ihre Anwendungsgebiete.

Eingegangen am 28. September 1961 [A 190]

Übersetzt von Dr. Günter Koch, Heidelberg

# Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion und Biosynthese

VON PROF. DR. H. G. SCHLEGEL UND DIPL.-CHEM. G. GOTTSCHALK

INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

*Zahlreiche Bakterien enthalten Einschußkörper von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure. Die Biosynthese aus organischen Substraten einerseits und aus Kohlendioxyd und Wasserstoff andererseits werden erörtert. Es wird dargelegt, unter welchen Bedingungen diese Speichersubstanz angehäuft, abgebaut und wieder verwertet wird.*

## I. Einleitung

Die Fähigkeit Reservestoffe zu speichern ist unter den Organismen weit verbreitet. Indessen wurden nur für wenige Bakterien Speichersubstanzen mit Sicherheit nachgewiesen, ihrer Natur nach erkannt und hinsichtlich der Wege und der Dynamik ihres Auf- und Abbaues untersucht. Wie Tiere, höhere Pflanzen und Pilze vermögen auch Bakterien Polysaccharide und Neutralfette intracellulär anzusammeln. Damit werden reduzierte Kohlenstoffverbindungen zur Vorratshaltung zeitweise aus dem Stoffwechselgetriebe der Zelle herausgezogen und in reaktionsträger, osmotisch inerte Form festgelegt. Bei Bakterien ist neben den genannten als dritter typischer Reservestoff Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure verbreitet. Da sie bei der Fraktionierung der Zellbestandteile nach den üblichen analytischen Verfahren nicht erfaßt und mit den Fetten bestimmt wird, hat sie erst seit kurzem Beachtung gefunden, obwohl sie bereits vor 35 Jahren entdeckt wurde.

*M. Lemoigne* [1] stellte 1923 fest, daß beim Stehen von *Bacillus megaterium* in destilliertem Wasser unter anaeroben Bedingungen eine Ansäuerung eintritt; sie geht im wesentlichen auf die Freisetzung von  $\beta$ -Hydroxybuttersäure zurück [2]. Als Quelle dieser autolytisch entstandenen Säure ist eine chloroform-lösliche amorphe Substanz erkannt worden, die schließlich als Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure  $(C_4H_5O_2)_n$  identifiziert wurde [3,4]. Trotz weiterer Arbeiten aus derselben Arbeitsgruppe [5–9] blieb diese Kenntnis lange auf einen kleinen Kreis beschränkt.

[1] *M. Lemoigne*, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. **176**, 1761 (1923).

[2] *M. Lemoigne*, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. **180**, 1539 (1925); *M. Lemoigne*, Ann. Inst. Pasteur **39**, 144 (1925).

[3] *M. Lemoigne*, Bull. Soc. Chim. biol. **8**, 770 (1926).

[4] *M. Lemoigne*, Ann. Inst. Pasteur **41**, 148 (1927).

[5] *M. Lemoigne u. N. Roukhelman*, Annales Fermentat. **5**, 527 (1940).

[6] *M. Lemoigne u. H. Girard*, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. **217**, 557 (1943).

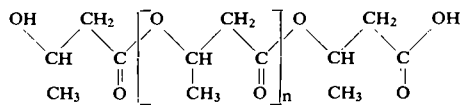
[7] *M. Lemoigne, P. Delaporte u. M. Croson*, Ann. Inst. Pasteur **70**, 224 (1944).

[8] *M. Lemoigne, G. Milhaud u. M. Croson*, Bull. Soc. Chim. biol. **31**, 1587 (1949).

[9] *M. Lemoigne, N. Grelet, M. Croson u. M. Le Treis*, Bull. Soc. Chim. biol. **27**, 90 (1945).

## II. Eigenschaften, Nachweis- und Bestimmungsmethoden

Aus Mikroorganismen gewonnene Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure ist der Polyester der D(-)- $\beta$ -Hydroxybuttersäure.



Das Molekulargewicht eines Präparates aus *Bacillus megaterium* wurde durch potentiometrische Titration der freien Säuregruppen in einer wäßrigen Dioxan-Lösung bei 70 °C zu 500 bis 10000 ermittelt; es entspricht einer Kette von 6 bis 110 Monomeren [10]. Ob es sich bei den erfaßten Kettenlängen um Spaltprodukte handelt und das native Polymere eine einheitliche Kettenlänge hat, ist nicht nachgeprüft worden. Das Molekulargewicht aus *Bacillus cereus* AC isolierter Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure wurde durch isotherme Destillation in Chloroform zu 5000 bestimmt [11].

Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure ist unlöslich in Paraffinkohlenwasserstoffen, Äther, Aceton, niederen Alkoholen, Tetrachlorkohlenstoff, Wasser und alkalischer Hypochlorit-Lösung; löslich hingegen in Eisessig, in Alkoholen mit mehr als 3 C-Atomen, in Chloroform, Dichlormethan, Pyridin und wäßrigem Phenol. Enthalten diese Lösungsmittel mehr als 1 % Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure, so tritt gel-artige Verfestigung ein. Nach dem Verdunsten der Lösungsmittel bleibt eine halbdurchsichtige Membran von der Konsistenz eines Plastikfilms und einem spez. Gewicht von 1,23 bis 1,25 zurück [11]. Aus Chloroform wird die Säure bei 0 °C durch Zusatz von 1,2 Vol. Äther vollständig gefällt [12].

Ein einfaches Verfahren zur Gewinnung von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure beruht auf der Beobachtung von A. Meyer [13], daß vegetative Zellen von *Bacillus*-Arten durch Kaliumhypochlorit-Lösung bis auf die „Fett“-Einschlüsse fast völlig aufgelöst werden. Bei allen Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure speichernden Organismen erhält man mit dieser zuerst von Williamson und Wilkinson [11] angewendeten Methode eine überwiegend aus Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure bestehende Fraktion, die leicht durch Umfällen aus Chloroform gereinigt werden kann. Unter entsprechenden Bedingungen läßt sich Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure nach dem Auflösen der Zellen in KOCl-Lösung auch turbidimetrisch quantitativ bestimmen. Quantitative Extraktion gefriergetrockneter Zellen erreicht man am besten mit Chloroform. Sind die so erhaltenen Mengen zur gravimetrischen Analyse zu gering, kann man die im Chloroform-Rückstand enthaltene Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure durch Erhitzen mit konz. Schwefelsäure in Crotonsäure überführen; durch Extinktionsmessung der in Schwefelsäure gelösten Crotonsäure bei 235 m $\mu$  läßt sich auf die ursprüngliche Menge Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure schließen [14]. Durch Hydrolyse

von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure gewonnene Hydroxybuttersäure kann mit Chromschwefelsäure zu Aceton oxydiert und nach Mikrodifusion in alkalischem Salicylaldehyd kolorimetrisch bestimmt werden [15]. An nicht wachsenden Zellen wurde die Speicherung von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure auch an der Trübungszunahme verfolgt [12]. Viele *Bacillus*-Arten sind auf ihre Fähigkeit, Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure anzuhäufen, durch Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der Ester-carbonyl-Bande (5,7 bis 5,8  $\mu$ ) im Infrarotspektrum der Zellen getestet worden [16–18].

In den bisher untersuchten Bakterien liegt Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure in Form von Granula vor. Bei *Chromatium okenii* können sich diese zu Konglomeraten zusammenschließen und Schollen von 3  $\mu$  Durchmesser bilden (Abb. 1). Diese Plasmaeinschlüsse werden durch Sudan III (rot) oder Sudanschwartz B (blauschwarz) angefärbt [19]. Dagegen zeigen isolierte Granula entweder kein oder nur schwaches sudanophiles



Abb. 1. *Chromatium okenii* mit Einschußkörpern von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure (im Bild hell erscheinend) und von Schwefel (schwarz erscheinend); Vergr. 1000-fach

Verhalten. Aus *Bacillus cereus* isolierte Granula enthielten 89 % Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure und 11 % ätherlösliche Fette [11]; die aus *Pseudomonas methanica* 91 % Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure und 8 % Monopalmitin [20].

## III. Verbreitung

Für die Systematik großer Gruppen dürfte der Gehalt an Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure kein Merkmal abgeben. So speichern einige Pseudomonaden Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure (Tabelle 1), während sich in anderen diese Speichersubstanz nicht nachweisen ließ [21, 23]. Wenn die Fähigkeit, Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure anzuhäufen, überhaupt von taxonomischer Bedeutung ist, dann vermag sie nur innerhalb einer Gattung zur Artabgrenzung zu dienen [7]. Unter den Angehörigen der Gattungen *Bacillus*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Spirillum*, *Hydrogenomonas* und in Purpurbakterien sowie in

- [10] A. Képès u. C. Péaud-Lenoel, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 234, 756 (1952).  
[11] D. H. Williamson u. J. F. Wilkinson, J. gen. Microbiol. 19, 198 (1958).  
[12] H. G. Schlegel, G. Gottschalk u. R. v. Bartha, Nature (London) 191, 463 (1961).  
[13] A. Meyer, Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde, Infektionskrankh. I. Abt. 29, 809 (1901); A. Meyer: Die Zelle der Bakterien, Fischer-Verl., Jena 1912.  
[14] J. H. Law u. R. A. Slepecky, Analytic. Chem. 32, 1697 (1960); J. Bacteriol. 82, 33 (1961).

- [15] C. Thin u. A. Robertson, Biochem. J. 51, 218 (1952).  
[16] A. C. Blackwood u. A. Epp, J. Bacteriol. 74, 266 (1957).  
[17] W. C. Haynes, E. H. Melvin, J. M. Locke, C. A. Glass u. F. R. Senti, Appl. Microbiol. 6, 298 (1958).  
[18] K. P. Norris u. J. E. S. Greenstreet, J. gen. Microbiol. 19, 566 (1958).  
[19] H. G. Schlegel, Arch. Mikrobiol. 42, 110 (1962).  
[20] R. E. Kallio u. A. A. Harrington, J. Bacteriol. 80, 321 (1960).  
[21] W. G. C. Forsyth, A. C. Hayward u. J. B. Roberts, Nature (London) 182, 800 (1958).

den Knöllchen zahlreicher Leguminosen scheint Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure weit verbreitet zu sein.

Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure wurde bisher nur in streng aerophilen Bakterien, nicht hingegen in Organismen mit ausgeprägtem Gärungsstoffwechsel gefunden [24]. Eine so weitgehende Verallgemeinerung darf man indessen bestenfalls auf die chemoorganotrophen Bakterien, nicht aber auf die Photosynthese betreibenden Purpurbakterien ausdehnen.

Organismus	Gehalt (%)	Fp [°C]	Lit.
<i>Azotobacter chroococcum</i>	20		[6]
<i>Azotobacter chroococcum</i>	80	150–155	[12]
<i>Azotobacter vinelandii</i>	24	178	[21]
<i>Azotobacter agilis</i>			[21]
<i>Bacillus megaterium</i>	25–30		[2]
<i>Bacillus mycoides</i>			[25]
<i>Bacillus cereus</i>			[25]
<i>Bacillus anthracis</i>			[25]
<i>Bacillus subtilis</i>	0,029		[25]
<i>Bacillus cereus</i>	10–40		[11]
<i>Chromobacterium violaceum</i>	37	164	[21]
<i>Chromobacterium spec.</i> 19 Stämme	33	167	[21]
<i>Chromatium okenii</i> St. Ostrau	20	186–188	[19]
<i>Hydrogenomonas spec.</i> Stamm H 1		162–166	[12]
<i>Hydrogenomonas spec.</i> Stamm H 16	65	158–162	[12]
<i>Hydrogenomonas spec.</i> Stamm H 20		167–172	[12]
Knöllchen von			
<i>Mimosa pudica</i>	6		[21]
<i>Pueraria spec.</i>			[21]
<i>Canavalia maritima</i>	11,8	167	[22]
<i>Vigna unguiculata</i>	7,3	172	[22]
<i>Erythrina poeppigiana</i>	8,1	170	[22]
<i>Trifolium pratense</i>	5,1		[26]
<i>Trifolium incarnatum</i>	31,4		[26]
<i>Micrococcus halodenitrificans</i>	3		[27]
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	30	172	[21]
<i>Pseudomonas antimycetica</i>	8	167	[21]
<i>Pseudomonas spec.</i> 15 Stämme	31	168	[21]
<i>Pseudomonas methanica</i>	30		[20]
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	48,4	171,5	[28]
<i>Pseudomonas spec.</i>			
(Phenazinpigmentbildner)	32	168	[23]
<i>Pseudomonas saccharophila</i>			[29]
<i>Rhodobacillus</i>	2		[30]
<i>Rhodospirillum rubrum</i>			[29]
<i>Rhizobium spec.</i> (Indigofera 4 Stämme)	19	164	[21]
<i>Rhizobium spec.</i> ( <i>Pueraria</i> )	57	164	[21]
<i>Spirillum serpens</i> (mehrere Stämme)	10–34,2		[22]

Tabelle 1. Verbreitung von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure

#### IV. Funktion

Über die Biosynthese und den Abbau von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure sowie über ihre Rolle als Speicherstoff ist noch sehr wenig bekannt. Die Annahme, daß gespeicherte Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure ein bevorzugtes Substrat der endogenen Atmung und Proteinsynthese darstellt, hat sich für *Bacillus megaterium* nicht bestätigen lassen [31].

[22] A. C. Hayward, W. G. C. Forsyth u. J. B. Roberts, J. gen. Microbiol. 20, 510 (1959).

[23] M. B. Morris u. J. B. Roberts, Nature (London) 183, 1538 (1959).

[24] A. C. Hayward, J. gen. Microbiol. 21, 11 (1959).

[25] M. Lemoigne, Helv. chim. Acta 29, 1303 (1946).

[26] H. G. Schlegel, Flora, im Druck.

[27] W. R. Smithies, N. E. Gibbons u. S. T. Bayley, Can. J. Microbiol. 1, 605 (1955).

[28] H. B. Levine u. H. Wolochow, J. Bacteriol. 79, 305 (1960).

[29] M. Doudoroff u. R. Y. Stanier, Nature (London) 183, 1440 (1959).

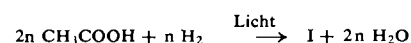
[30] H. Gaffron, Biochem. Z. 260, 1 (1933); 275, 301 (1935).

[31] C. E. Clifton u. J. M. Sobek, J. Bacteriol. 81, 284; 82, 252 (1961).

*Bacillus megaterium* baut nach Untersuchungen von Macrae und Wilkinson [32] Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure in einem glucose-armen Nährmedium während der Oxydation von Brenztraubensäure, Hydroxybuttersäure und Glucose auf. Während mit Essigsäure als einzigem Substrat keine Synthese eintritt, wird durch kombinierte Verabreichung eines der drei genannten Substrate mit Essigsäure eine wesentliche Beschleunigung der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure-Synthese erzielt. Gewaschene Zellsuspensionen dieses Organismus bauen gespeicherte Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure unter aeroben Bedingungen rasch und anaerob langsam unter Ausscheidung geringer Mengen von Hydroxybuttersäure, Acetessigsäure und Essigsäure ab; der überwiegende Teil wird endoxydiert. Die Rate der endogenen Atmung der Zellen ist um so höher und ihre Autolyserate um so niedriger je höher der Gehalt der Zellen an Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure ist. Ein Einbau des in Form von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure gespeicherten Kohlenstoffs in Zellproteine ist nicht beobachtet worden, so daß man hier der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure nur die Funktion eines Energiespeichers zuschreiben kann.

Eine besondere Rolle dürfte Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure bei sporenbildenden Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure speichernden *Bacillus*-Stämmen spielen. Während der Sporulation wird der Speicherstoff aufgebraucht [33]. Das Verschwinden von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure geht dabei der Sporenbildung voran [34].

Das zu den schwefel-freien Purpurbakterien gehörende *Rhodospirillum rubrum* verfügt [29] über zwei Speicherstoffe, ein stärkeähnliches Polysaccharid und Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure. Die Reservestoffe werden besonders intensiv während der Inkubation der Zellen mit einem Substrat im Licht in Abwesenheit einer Stickstoff-Quelle angehäuft. Welche von den beiden Speicherstoffen sich anreichert, wird in erster Linie von der Natur des Substrats bestimmt. Während die Synthese mit Essigsäure, Buttersäure und Hydroxybuttersäure vorwiegend in Richtung Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure geht, fördern Bernsteinsäure, Äpfelsäure oder  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  die Synthese von Polysacchariden. Besonders in Gegenwart von molekularem Wasserstoff geht Essigsäure zu einem hohen Prozentsatz in Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure (I) ein:



Generell läßt sich formulieren: Substrate, die zu Essigsäure oder Acetessigsäure umgesetzt werden, ohne die Stufe von Brenztraubensäure zu durchlaufen, führen zur Synthese von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure. Zur Proteinsynthese unter Einbeziehung von Essigsäure oder gespeicherter Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure ist  $\text{CO}_2$  notwendig. Die Möglichkeit, Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure zu bilden und intrazellulär abzulagern, stellt hier einen außerordentlich sinnvollen Mechanismus dar: Von

[32] R. M. Macrae u. J. F. Wilkinson, J. gen. Microbiol. 19, 210 (1958).

[33] R. Tinelli, Ann. Inst. Pasteur 88, 212 u. 364 (1955).

[34] R. A. Slepecky u. J. H. Law, J. Bacteriol. 82, 37 (1961); M. Kondo, M. Yoneda, Y. Nishi u. F. Fukai, Biken's J. 4, 41 (1961); M. Yoneda u. M. Kondo, ibid. 2, 247 (1959).

außen gebotene Kohlenstoff-Verbindungen, die unter gewissen Bedingungen (CO<sub>2</sub>- oder N-Mangel) nicht direkt zur Cytoplasmasythese verwertet werden können, werden durch die rasch verlaufende Synthese von Poly-β-hydroxybuttersäure vorübergehend physiologisch inert festgelegt [35].

*Azotobacter chroococcum* speichert in einer Glucose-nährlösung bei optimaler O<sub>2</sub>-Versorgung Poly-β-hydroxybuttersäure in Mengen, die bis zu 80 % des Trockengewichts der Zellen betragen können [36, 12]. Anscheinend werden hier Proteinsynthese und Zellvermehrung durch die Kapazität des Systems der N<sub>2</sub>-Bindung begrenzt, so daß ein Teil der durch den Abbau der Glucose entstehenden Intermediärprodukte in die Speicherstoffsynthese fließt.

Knallgasbakterien (*Hydrogenomonas*) sind insofern ungewöhnliche Organismen, als sie entweder chemolithotroph (CO<sub>2</sub> als C-Quelle; H<sub>2</sub> als H-Donator, H<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> als Energiequelle) oder organotroph (organische Verbindungen als C- und Energiequelle) wachsen und Poly-β-hydroxybuttersäure speichern können. Die Speicherung unter chemolithotrophen Bedingungen setzt am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ein [12]. Der Zeitpunkt des Beginns der Speicherung läßt sich vorverlegen, wenn Stickstoff oder Phosphor in wachstumsbegrenzenden Mengen gegeben werden. Sind diese Nährkomponenten aufgebraucht, so verhalten sich die Organismen wie „ruhende“ Zellen und fixieren CO<sub>2</sub> unter ausschließlicher Poly-β-hydroxybuttersäure-Synthese nach



Die Zunahme des Trockengewichts entspricht dann der Anhäufung von Poly-β-hydroxybuttersäure. Die organotrophe Poly-β-hydroxybuttersäure-Synthese geschieht vor allem aus organischen Säuren, nicht aber aus Zuckern. Mit Hydroxybuttersäure, Crotonsäure, Milchsäure und Essigsäure als Substrat unter Luft ist die Geschwindigkeit der Poly-β-hydroxybuttersäure-Synthese gleich groß oder größer als unter C-autotrophen Bedingungen [37]. Ersetzt man Luft durch ein Gemisch von 20 % O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub> + 75 % H<sub>2</sub>, so erhöht sich die Syntheserate mit einigen Säuren über die C-autotrophe oder organotrophe Leistung hinaus, erreicht aber nicht die Summe beider Raten, was auf eine Beeinträchtigung der chemolithotrophen CO<sub>2</sub>-Fixierung durch alle verwertbaren organischen Substrate zurückzuführen ist.

Die endogene Atmung speicherstoff-reicher Zellen ist beträchtlich größer als die speicherstoff-ärmer. Bei ersteren bewirkt Zugabe von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> noch eine zusätzliche Steigerung der Sauerstoff-Aufnahme über die Ruheatmung hinaus, was darauf hindeutet, daß gespeicherte Poly-β-hydroxybuttersäure wieder in den Stoffwechsel einbezogen und zur Proteinsynthese verwertet werden kann. Durch Poly-β-hydroxybuttersäure- und Proteinbestimmungen konnte sichergestellt werden, daß in

Gegenwart von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sowohl unter Luft als auch (mehr ausgeprägt) unter Knallgas eine Abnahme von Poly-β-hydroxybuttersäure und eine Zunahme des Proteingehalts der Zellen erfolgt.

Die Poly-β-hydroxybuttersäure der Knallgasbakterien stellt somit einen echten Speicherstoff dar, der bei Abwesenheit einer Kohlenstoff-Quelle wieder in den Stoffwechsel einbezogen werden kann und bei Vorhandensein einer Stickstoff-Quelle eine Eiweißsynthese ermöglicht. Poly-β-hydroxybuttersäure erfüllt hier also nicht nur die Funktion eines Kohlenstoffspeichers, sondern darüber hinaus auch die eines Energiespeichers [38]. Die Fähigkeit, Poly-β-hydroxybuttersäure zu speichern, versetzt Knallgasbakterien in die Lage, verfügbare C-haltige Substrate auch unter Bedingungen zu verwerten, die kein Wachstum zulassen.

Damit genügt Poly-β-hydroxybuttersäure wenigstens in einigen Organismen den Kriterien, die eine Substanz zu erfüllen hat, welche als Speichersubstanz bezeichnet werden kann: 1. Die Substanz wird gespeichert, wenn der Zelle von außen her mehr Material zur Energiegewinnung und zum Substanzaufbau geboten wird als zu diesem Zeitpunkt zum Wachstum verwertet werden kann. 2. Die Substanz kann bei ungenügender Substratzufuhr wieder in den Stoffwechsel einbezogen werden.

Die vergleichende Betrachtung der Speicherstoffsynthese bei verschiedenen Organismen vermittelt einen Einblick in die Beziehungen zwischen der chemischen Natur von Substrat und Endprodukt einerseits und den potentiellen Stoffwechselwegen, die einem Organismus eigen sind, andererseits. Ist ein Mikroorganismus zur Bildung nur einer einzigen Art von C-Speicherstoff (Glykogen, Stärke, Poly-β-hydroxybuttersäure oder Neutralfette) befähigt, so ist die Synthese dieses Speicherstoffs von der Natur des Substrats weitgehend unabhängig. Mit Glucose als Substrat wird von einigen Bakteriengattungen Poly-β-hydroxybuttersäure gespeichert (*Bacillus megaterium*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas saccharophila*). Das gleiche Substrat führt zum Beispiel bei den *Enterobacteriaceae* [39–41] und bei *Sarcina* [42] zur Anhäufung von Glykogen und glykogen-ähnlichen Polysacchariden. Bei Verabfolgung anderer Nährstoffe werden die gleichen Reservestoffe gespeichert.

Diesen „Ein-Speicherstoff-Organismen“ stehen Organismen gegenüber, die zwei C-haltige Speicherstoffe, Polysaccharide und Poly-β-hydroxybuttersäure, nebeneinander führen. Zu ihnen zählen unter den bisher daraufhin untersuchten Bakterien die schwefel-freien Purpurbakterien (*Rhodobacillus*, *Rhodospirillum rubrum*) sowie als Vertreter der *Thiorhodaceae* *Chromatium okenii*. *Rhodospirillum rubrum* häuft mit Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Brenztraubensäure oder CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> als Substraten Polysaccharide an, hingegen führen Essigsäure und Substrate, die über Essigsäure abgebaut werden, zur Anreicherung von Poly-β-hydroxybuttersäure. Ähnliche Verhältnisse findet man bei den Grünalgen *Scenedesmus* und *Chlorella*, die Zucker und einige organische Säuren zur Bildung von Stärke, Essigsäure hingegen zur Synthese von Neutralfetten verwerten [43].

[38] J. F. Wilkinson, Exp. Cell Res., Suppl. 7, 111 (1959).

[39] J. F. Wilkinson, J. P. Duguid u. P. N. Edmunds, J. gen. Microbiol. 11, 59 (1954); H. Palmstierna, Acta chem. Scand. 10, 567 (1956); T. Holme u. H. Palmstierna, Acta chem. Scand. 10, 578 (1956).

[40] T. Holme: Bacterial synthesis during limited growth, Uppsala; Almqvist and Wiksells Boktryckeri AB. 1957.

[41] N. D. Gary, L. L. Kupferberg u. L. H. Graf, J. Bacteriol. 76, 359 (1958).

[42] B. Binnie, E. A. Dawes u. W. H. Holms, Biochim. biophys. Acta 40, 237 (1960).

[43] M. Calvin u. Mitarb., Symposia Soc. exper. Biol. 5, 284 (1951); H. G. Schlegel, Planta 47, 510 (1956).

[35] R. Y. Stanier, M. Doudoroff, R. Kunisawa u. R. Contopoulou, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 1246 (1958).

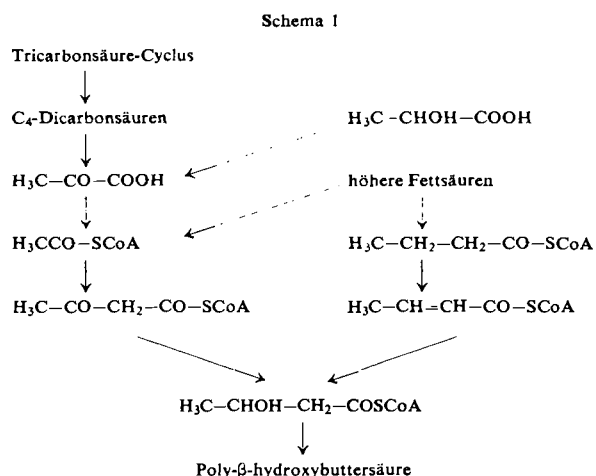
[36] F. Radler, Arch. Mikrobiol. 22, 335 (1955).

[37] E. Wilde, Dissert. Göttingen 1961.

## V. Biosynthese aus organischen Verbindungen

Aus den vorstehenden Befunden läßt sich der Schluß ziehen, daß Crotonsäure und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure durch schwefel-freie Purpurbakterien und durch Knallgasbakterien als Einheit zu Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure eingebaut werden. Bei letzteren folgt das unter anderem aus der im Vergleich zur chemolithotrophen Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure-Synthese gleichen oder größeren Synthesegeschwindigkeit aus Crotonsäure und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure und aus der gleichen Syntheserate unter Luft und Knallgas in Gegenwart von  $\text{CO}_2$  entziehenden Substanzen.

Für einen unmittelbaren Einbau von Acetat-Einheiten sprechen die Versuche an *Rhodobacillus* [30] und an *Bacillus megaterium* [32] über die die Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure-Synthese steigernde Wirkung von Essigsäure. Eine einwandfreie Entscheidung darüber war uns bei Knallgasbakterien durch Ermittlung der Isotopenverteilung in der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure von Zellen möglich, denen in kurzfristigen Versuchen unter einer  $\text{CO}_2$ -freien Knallgasatmosphäre 2- $^{14}\text{C}$ -Essigsäure gegeben wurde. Da 96 % der Aktivität noch nach 15 min zu gleichen Teilen in den C-Atomen 2 und 4 der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure lokalisiert waren, kann mit Sicherheit angenommen werden, daß Essigsäure über die bekannten Schritte der Fettsäuresynthese direkt zu Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure verarbeitet wird. Diese Synthese verläuft mit so guten Ausbeuten, daß sie in bequemer Weise die Darstellung von 1,3- bzw. 2,4- $^{14}\text{C}$ -Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure und somit von 1,3- bzw. 2,4- $^{14}\text{C}$ -Croton- und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure hoher spezifischer Aktivität gestattet. Milchsäure und Bernsteinsäure werden – wie radioaktive Markierungsversuche ergaben – im Zuge der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure-Synthese von Knallgasbakterien erst zu Essigsäure abgebaut, so daß von beiden Säuren nur die C-Atome 2 und 3 direkt für den Aufbau von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure genutzt werden können.



Schema 1 möge die bei den Knallgasbakterien an der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure-Synthese aus organischen Säuren beteiligten Reaktionen veranschaulichen.

Die ersten Befunde zur enzymatischen Polymerisation von  $\beta$ -Hydroxybuttersäure zu Poly- $\beta$ -hydroxybutter-

säure wurden an *Bacillus megaterium* und *Rhodospirillum rubrum* erhoben [44]. Eine aus zellfreien Extrakten von *Bacillus megaterium* abgetrennte, mit Phosphatpuffer gewaschene Fraktion, die hauptsächlich Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure-Granula enthält, baut markiertes  $\beta$ -Hydroxybutyryl-Coenzym A in Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure ein; mit freier  $\beta$ -Hydroxybuttersäure wurde weder mit noch ohne Coenzym A eine Polymerisation erzielt. Gleichsinnige Ergebnisse brachten Versuche mit der Teilchenfraktion aus *Rhodospirillum rubrum*; auch hier ließ sich  $\beta$ -Hydroxybutyryl-Coenzym A nicht durch freie Säure, ATP und Coenzym A ersetzen; die Versuche wurden durch eine sehr wirksame Depolymerase erschwert.

## VI. Biosynthese aus $\text{CO}_2$ und $\text{H}_2$

Der Weg des Kohlenstoffs bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung durch Knallgasbakterien ist schon mehrfach untersucht worden. Den Arbeiten liegen Versuche zugrunde, die unter Wachstumsbedingungen (in Gegenwart einer verwertbaren Stickstoffquelle) angestellt wurden. Unter den Primärprodukten der  $\text{CO}_2$ -Fixierung wachsender Zellen von *Hydrogenomonas facilis* wurden Essigsäure und Ameisensäure nachgewiesen [45]. Die aus der wasserdampf-flüchtigen Fraktion gewonnene Essigsäure war uniform markiert. Am selben Organismus wurde eine aktive Phosphoenolbrenztraubensäure - Carboxylase nachgewiesen [46]. Schließlich sind in Kurzzeitexperimenten (5-600 sec) Phosphoglycerinsäure und Hexosephosphate als Primärprodukte der  $\text{CO}_2$ -Fixierung erkannt worden [47]. Weitere frühzeitig markierte Produkte der  $\text{CO}_2$ -Fixierung wie Sedoheptulose-7-P und Ribulose-DP wurden radiopapierchromatographisch identifiziert [48]. Der Schluß, daß an der chemolithotrophen  $\text{CO}_2$ -Fixierung der Knallgasbakterien die Reaktionen des reduktiven Pentosephosphat-Cyclus beteiligt sind, wurde durch den Nachweis des Ribulosediphosphat-carboxylierenden Enzyms in zwei *Hydrogenomonas*-Arten auch von enzymchemischer Seite her bekräftigt [49].

Chemolithotroph herangezogene Knallgasbakterien [50] bauen unter Speicherbedingungen  $^{14}\text{CO}_2$  zunächst in die Phosphatester ein [51]. Die durch Fraktionierung und chromatographische Trennung der alkohollöslichen Zellauszüge gewonnenen Ergebnisse lassen erkennen, daß auch an der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure-Bildung durch Knallgasbakterien der von der photosynthetischen

[44] J. M. Merrick u. M. Doudoroff, Nature (London) 189, 890 (1961).

[45] G. Orgel, N. E. Dewar u. H. Koffler, Biochim. biophys. Acta 21, 409 (1956).

[46] J. Judis, D. L. Powelson u. H. Koffler, Bact. Proc. 1954, 117.

[47] F. H. Bergmann, J. C. Towne u. R. H. Burris, J. Biol. Chem. 230, 13 (1958).

[48] B. A. McFadden, J. Bacteriol. 77, 339 (1959).

[49] M. Santer, M. H. Heimsath u. W. Vishniac, zit. n. W. Vishniac, B. L. Horecker u. S. Ochoa, Advances in Enzymol. 19, 1 (1957).

[50] H. G. Schlegel, H. Kaltwasser u. G. Gottschalk, Arch. Mikrobiol. 38, 209 (1961).

[51] P. Hirsch, unveröffentlicht.

CO<sub>2</sub>-Fixierung her bekannte Mechanismus beteiligt ist. Bereits nach acht Sekunden sind Essigsäure und  $\beta$ -Hydroxy-buttersäure und nach vierzig Sekunden auch die Poly- $\beta$ -hydroxy-buttersäure so stark markiert, daß die Isotopenverteilung in den isolierten und gereinigten Säuren ermittelt werden konnte. Nach kurzen Versuchszeiten (8, 20, 40, 60, 120 sec) waren Essigsäure,  $\beta$ -Hydroxy-buttersäure und Poly- $\beta$ -hydroxy-buttersäure völlig gleichmäßig markiert, so daß uniform markierte Essigsäure an irgendeiner Stelle aus dem „Calvin-Cyclus“ austreten muß.

Zieht man lediglich die an anderen Bakterien nachgewiesenen Reaktionen der Bildung von aktivierter Essigsäure in Betracht, so sind insbesondere zwei Reaktionen zu erörtern, die an der Essigsäure- bzw. Poly- $\beta$ -hydroxy-buttersäure-Synthese aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> beteiligt sein können. Erstens könnte 3-Phosphoglycerinsäure über Brenztraubensäure durch oxydative Decarboxylierung Acetyl-CoA liefern; in diesem Falle würde von drei fixierten CO<sub>2</sub>-Molekülen jeweils eines wieder verloren gehen. Zweitens könnte aus Fructose-6-phosphat und/oder Xylulose-5-phosphat, die beide Intermediäre des

„Calvin-Cyclus“ sind, im Zuge einer Phosphoketolase-Reaktion [52] Acetylphosphat abgespalten werden. Dieser Fall würde eine Variante des Photosynthese-Cyclus darstellen; ein Verlust gebundenen Kohlenstoffs durch Decarboxylierung würde nicht eintreten. Bei beiden Reaktionen würde das aus dem Cyclus ausscherende Acetat uniform markiert sein und lediglich den im vorhergehenden Umlauf des Kreisprozesses der CO<sub>2</sub>-Fixierung gebundenen Kohlenstoff, nicht den frisch fixierten CO<sub>2</sub>-Kohlenstoff enthalten.

Wir sind dabei, diese Fragen durch Aktivitätsmessung der Brenztraubensäure-Dehydrogenase und Phosphoketolase an Extrakten aus organotroph und C-autotroph gezogenen Zellen zu überprüfen.

*Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.*

Eingegangen am 29. November 1961 [A 184]

[52] M. Schramm u. E. Racker, *Nature* (London) 179, 1349 (1957); M. Schramm, V. Klybas u. E. Racker, *J. biol. Chemistry* 233, 1283 (1958); J. Hurwitz, *Biochim. biophys. Acta* 28, 599 (1958); E. C. Heath, J. Hurwitz, B. L. Horecker u. A. Ginsburg, *J. biol. Chemistry* 231, 1009 (1958).

## Ringsubstitutionen und Folgereaktionen an Aromaten-Metall- $\pi$ -Komplexen II

VON DR. KLAUS PLESSKE

INSTITUT FÜR ANORGANISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

*Teil I: Angewandte Chemie 74, 301 (1962)*

### 12. Stickstoff-haltige Derivate

#### a) Aminoferrocen und Ferrocen-Aminosäuren

Als einziges Metall- $\pi$ -Komplex-Derivat mit direkt am Ring befindlicher NH<sub>2</sub>-Gruppe ist bisher Aminoferrocen beschrieben worden. Seine Darstellung ist auf verschiedenen Wegen möglich. In geringer Ausbeute bildet es sich bei der Einwirkung von O-Benzyl-hydroxylamin [129] oder günstiger O-Methyl-hydroxylamin [99] auf das Metallierungsgemisch des Ferrocens mit Lithiumbutyl. Dabei soll auch 1,1'-Diaminoferrocen in äußerst geringen Mengen entstehen [129a]. Nitroferrocen [130, 131] und Azoferrocen [132] lassen sich erwartungsgemäß mit Eisen und HCl bzw. durch katalytische Hydrierung in Aminoferrocen überführen. N-Ferrocenylbenzyl-urethan (XXXV), das durch Curtius-Umlagerung des Ferrocen-carbonsäureazids (aus C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>FeC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>-COCl

[129] A. N. Nessmejanow, E. G. Perewalowa et al., *Ber. Akad. Wiss. UdSSR* 102, 535 (1955).

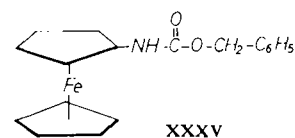
[129a] Anm. b. d. Korr.: 1,1'-Diaminoferrocen wurde von G. R. Knox, *Proc. chem. Soc. (London)* 1959, 56, dargestellt.

[130] H. Grubert u. K. L. Rinehart, *Tetrahedron Letters* 1959, Nr. 12, 16.

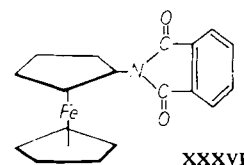
[131] J. F. Helling u. H. Shechter, *Chem. and Ind.* 1959, 1157.

[132] A. N. Nessmejanow, E. G. Perewalowa et al., *Tetrahedron Letters* 1960, Nr. 1, 1.

und NaN<sub>3</sub>) in Benzylalkohol entsteht [26], kann durch reduktive Spaltung mit Wasserstoff [26, 99] oder durch alkalische Hydrolyse [26] in Aminoferrocen umgewandelt werden.



Eine weitere Methode wurde von Nessmejanow [50, 51] in der Spaltung von N-Ferrocenyl-phthalimid (XXXVI) mit Hydrazin gefunden, wobei Aminoferrocen in 82 % Ausbeute entsteht. XXXVI wiederum kann durch Umsetzung von Kupfer-phthalimid mit Chlor- oder Bromferrocen erhalten werden [50, 51].



Aminoferrocen ist eine sublimierbare, gelbbraune Substanz vom Fp 153 bis 155 °C. Sie löst sich in Säuren und kann durch Basen wieder ausgefällt werden. Die Basenkonstante beträgt  $1,55 \cdot 10^{-9}$  [129] (Anilin  $7,2 \cdot 10^{-11}$ ). Mit Acetanhydrid, p-Toluolsulfochlorid und Ferrocen-carbonsäurechlorid setzt