

GÄRUNG UND PHYTOCHEMISCHE REDUKTION

von

CARL NEUBERG

Polytechnic Institute of Brooklyn, New York, N.Y. (U.S.A.)

Rein chemische Erfahrungen haben vor Decennien den Gedanken nahe gelegt, dass der Abbau der Hexosen in der Natur über Stoffe der 3-Kohlenstoffreihe erfolge. Es ist namentlich die 1871 von HOPPE-SEYLER aufgefundene Entstehung von *d,l*-Milchsäure aus Traubenzucker¹ gewesen, die auf diesen Gedanken geführt hat. Er wurde befestigt durch bestätigende und erweiternde Beobachtungen² von SCHÜTZENBERGER (1876), NENCKI UND SIEBER (1881) und KILIANI (1882). Eine Umwandlung etwa von *d*-Glucose zu einer der optisch aktiven* Raumformen der Milchsäure oder auch nur eine einfache Depolymerisation zu Triosen, zu optisch aktivem Glycerinaldehyd oder zu Dioxyaceton, war nicht ausgeführt. Der umgekehrte Vorgang, die Condensation von Triosen zu racemischen Hexosen, war in den Jahren 1887-1890 verwirklicht; er bildet eine der Grundlagen der Zuckersynthesen von EMIL FISCHER. In frühe Zeit (1904) fallen die ersten physiologischen Versuche mit Glycerose, dem Gemisch von Dioxyaceton und *d,l*-Glycerinaldehyd, das schon damals⁴ in ziemlich reinem Zustande erhältlich war. Mit diesem Material haben NEUBERG UND BLUMENTHAL⁵ den ersten experimentellen Beweis dafür geliefert, dass Triosen im Tierkörper zu optisch aktiven Hexosen condensiert werden, und Glycogenbildner sind. Diese Feststellung ist dann vielfach bestätigt worden, so von MOSTOWSKY, PARNAS, EMBDEN und Mitarbeitern, RINGER UND FRANKEL, STÖHR⁶ u.a. Diese und eine Reihe ähnlicher Befunde, d.h. Biosynthesen von Hexosen mittels niederer Zucker, waren als Beispiele einer Aldolcondensation verständlich. Der stereochemische gerichtete Verlauf war mit den Prinzipien der asymmetrischen Synthese erklärlich. Dagegen war der Mechanismus des biochemischen Zuckerabbaus unerforscht. Es fehlten z.B. alle Grundlagen für die Herleitung der Methylgruppe, wie sie für die typischen Produkte der Glycolyse, für Milchsäure und Weingeist, charakteristisch ist. Dieses Problem ist der Lösung zugeführt mit der 1911 begründeten Lehre von der Rolle der Brenztraubensäure für den Umsatz der Zucker. Damit war die Aera eingeleitet, in der die biochemische Zerreissung** der 6-Kohlenstoffkette, die Desmolyse der Zymohexosen, zu Substanzen der 3-Kohlenstoffreihe experimentell bewiesen wurde. Mit der hälftigen Aufteilung der Hexose in 2 Mol Methylglyoxal-hydrat ($C_6H_{12}O_6 = 2C_3H_6O_3$), die 1928-1929 NEUBERG UND KOBEL⁸ mit verschiedenen Enzympräparaten pflanzlicher und tierischer Provenienz herbeiführten, schien das Problem gelöst. MEYERHOF UND LOH-MANN⁹ zeigten 1934, dass unmittelbare Vorläufer des isolierten Methylglyoxals die

* Die Behauptung DUCLAUX's, dass im Sonnenlicht aus einer alkalischen Glucoselösung *d*-Milchsäure in grosser Ausbeute entstehe, ist nach JACOBSON³ auf eine Verwechslung mit optisch aktiven Saccharinsäuren zurückzuführen.

** Für den Vorgang der enzymatischen Trennung von -C-C- Bindungen hat sich die 1925 von NEUBERG UND OPPENHEIMER⁷ eingeführte Bezeichnung Desmolyse eingebürgert.

Triosen sind, und zwar in Form ihrer unter den Versuchsbedingungen zum Zerfall in Methylglyoxal neigenden Phosphorsäureester¹⁰. Das Ausgangsmaterial für das desmolytisch gebildete Methylglyoxal ist das Fructosediphosphat gewesen. Schon diese Tatsache sprach für eine hierbei massgebliche Rolle der Phosphorylierung. Eine solche war niemals abgelehnt. Es ist jedoch in manchen Darstellungen nicht beachtet, dass in den damaligen Formulierungen die Beteiligung der Phosphorsäure der Vereinfachung wegen fortgelassen wurde und ausdrücklich bemerkt ist, dass phosphorylierte Zwischenstufen und die Triosen dem gegebenen Abbild ungezwungen eingefügt werden können, sobald sie nachgewiesen sein würden¹¹.

Gleichfalls in die 3-Kohlenstoffreihe führten drei andere biochemische Reaktionen der Zymohexosen: die 1917 bekannt gegebene Spaltung in Glycerin, Kohlendioxyd und Acetaldehyd $C_6H_{12}O_6 = CH_2OH\cdot CHOH\cdot CH_2OH + CO_2 + CH_3\cdot CHO$ (II. Vergärungsform), die 1919 beschriebene Zerlegung in Glycerin, Kohlendioxyd, Aethanol und Essigsäure $2C_6H_{12}O_6 + H_2O = 2CH_2OH\cdot CHOH\cdot CH_2OH + 2CO_2 + C_2H_5OH + CH_3\cdot COOH$ (III. Vergärungsform), und schliesslich die Aufteilung der Hexose in aequimolekulare Mengen Glycerin und Brenztraubensäure $C_6H_{12}O_6 = CH_2OH\cdot CHOH\cdot CH_2OH + + CH_3\cdot CO\cdot COOH$ (IV. Vergärungsform). Die letzte ist experimentell am spätesten (1929) begründet. Infolge der Ausschaltung des Carboxylase-Systems findet man hier Primärprodukte. Unter den Bedingungen des Abfangverfahrens ist dagegen noch carboxylatische Spaltung der Brenztraubensäure möglich, und es entstehen die Erzeugnisse der 2. Vergärungsform, während bei schwach alkalischer Reaktion, welche die biochemische Dismutation* des Acetaldehyds begünstigt, die Stoffe der 3. Vergärungsform auftreten. MEYERHOF, LOHMAN und KISSLING¹² haben gelehrt, dass Glycerin wie Brenztraubensäure phosphorylierte Vorstufen haben, *l*-Glycerin- 1-phosphorsäure einerseits, Enol-phosphobrenztraubensäure, bzw. in Position 2 und 3 phosphorylierte *d*-Glycerinsäure anderseits. Phosphoglycerinsäure, die schon 1928 synthetisiert war¹³, ist 1930 in einer denkwürdigen Arbeit NILSSON's¹⁴ als Produkt einer von Fluorid beeinflussten Zuckerspaltung durch Hefe entdeckt worden. Die ursprünglich schwer erhältliche Substanz konnten NEUBERG und KOBEL¹⁵ mit biochemischer Methodik als schön kristallisierendes saures Bariumsalz leicht zugänglich machen. Sie zogen, wie auch NILSSON¹⁶, die Schlussfolgerung, dass die Verbindung als normales Zwischenprodukt der Glycolyse fungieren möge, da sie diese Substanz mittels Hefen und Milchsäurebakterien in Brenztraubensäure überführen und im Gegensatz zu freier Glycerinsäure** vergären konnten. In Würdigung ihrer sich immer mehr offenbarenden Bedeutung ist sie von MEYERHOF und EMBDEN als Glied in die Kette der obligatorischen Zwischenprodukte der Desmolyse eingereiht worden. Substrate der Carboxylase und Ketonaldehydmutase sind Brenztraubensäure und Methylglyoxal, und die später nachgewiesenen umbauenden Enzyme Isomerase, Phosphoglyceromutase, Enolase u.s.w. greifen ebenfalls an 3-Kohlenstoffverbindungen an. Somit ist es selbstverständlich, dass diese Substanzen in jedem

* Wenn Hefe Acetaldehyd statt zur Dismutation zu carboligatischer Erzeugung von Acyloin verwendet, so ist nach L. ELION (Biochem. Z., 169 (1926) 471) auch unter diesen Bedingungen, wie bei der 2., 3. und 4. Vergärungsform, Glycerin das Reduktionsäquivalent zur Oxydationsstufe Acetaldehyd.

** Freie Glycerinsäure wird unter keiner Bedingung von Hefe vergoren. Das ist schon von C. NEUBERG und J. KERB (Ber., 47 (1914) 1308) und unter kritischer Berücksichtigung der Literatur später wieder von O. v. SCHÖNEBECK (Biochem. Z., 276 (1935) 421) dargetan. Dagegen greifen Bakterien, die Hefe evtl. verunreinigen, nach C. ANTONIANI (Biochem. Z., 267 (1933) 380) freie Glycerinsäure an. Siehe auch A. I. VIRTANEN, (Biochem. Z., 279 (1935) 262) und I. TIKKA (Biochem. Z., 279 (1935) 264).

Schema der glycolytischen Prozesse zentrale Plätze einnehmen. Das Kernstück bleibt immer die primäre Desmolyse zur Stufe der 3-Kohlenstoffverbindungen. Das kommt in dem Schema von NEUBERG¹⁷ zum Ausdruck, das die bis zum Jahre 1933 festgestellten Tatsachen zu erklären versucht, und in den fortentwickelten Paradigmen von EMBDEN, DEUTICKE UND KRAFT¹⁸, sowie von MEYERHOF¹⁹ und CORI²⁰, wo die vor der eigentlichen Desmolyse liegenden Umformungen und die generelle Rolle der Phosphorylierung und Dephosphorylierung ausführlich berücksichtigt sind. Erhebliche Fortschritte sind zu verzeichnen, namentlich ist die Beteiligung der Cofermente und anorganischen Ergänzungsstoffe, sowie die Reversibilität der meisten Reaktionsfolgen erkannt. Was die primäre Desmolyse als den charakteristischen Ausdruck der Glycolyse anbelangt, so ist der Übergang der Hexosen zur Wertigkeitsstufe der Triosen die integrierende Reaktion geblieben. Auch die Massnahmen, die zur Abfangung, Anhäufung und Isolierung von Intermediärbilden oder zu Stabilisierungsprodukten (Essigsäure, Glycerin) führen, sind prinzipiell von gleicher Art. Durch künstliche Eingriffe wird irgendwie die normale Korrelation der Biokatalysatoren gestört und die Weiterverarbeitung unterbunden, mag dies durch Fixierung eines Zwischenproduktes, Abschwächung eines der Partialagentien, durch Zusätze oder Verdünnung*, durch Ferment- oder Coferment- ausschaltung oder spezielle Begünstigung einer der Enzymreaktionen geschehen.

Wir sind über die biochemische Bildungsweise diverser 3-Kohlenstoffkörper unterrichtet. Ungeklärt ist bis heute, wie das *Glycerin* entsteht, das in kleinen Mengen bei der normalen alkoholischen Gärung auftritt. Die Herleitung aus den Triosen läge nahe, da die rein chemische Reduktion des Dioxyacetons²² wie des Glycerinaldehyds²³ zum Glycerin keine Schwierigkeiten bietet. Schon bevor MEYERHOF die bedeutsame Isolierung der phosphorylierten Triosen in Substanz geglückt war, hat man mehrfach in Gärflüssigkeiten und Zellelementen kleine Mengen eines Materials beobachtet** (IWANOFF, V. EULER, WARKANY, KLUYVER, STRUYK, BOYLAND, DISCHE u.a.), das bei der Destillation mit H_2SO_4 von 20% das leicht nachweisbare Methylglyoxal liefert. Wahrscheinlich handelt es sich um gebundene, nicht um freie Triosen. Dass erstere durch Dismutationsreaktionen Glycerophosphat liefern können, haben MEYERHOF UND KIESSLING²⁴ dargetan. Die erste in der Hefe aufgefundene Phospho-monoesterase ist die Glycerophosphatase. Sie spaltet, wie frühzeitig²⁵ dargetan ist, leicht die Salze der Glycerinphosphorsäure. So erscheint es möglich, dass die bei der 2. und 3. Vergärungsform gebildeten Stoffe, insbesondere das Glycerin, über phosphorylierte Vorstufen entstehen. Es wäre bei den jetzt erkannten Beziehungen zwischen enzymatischer Zuckerspaltung und Bioreduktion²⁶ auch denkbar, dass die Triosenphosphate zunächst der Dephosphorylierung anheimfallen und dann der phytochemischen Reduktion zu Glycerin unterliegen. Die nachstehend beschriebenen Versuche mit monomolekularem Dioxyaceton und *d,l*-Glycerinaldehyd lehren, dass keiner dieser Stoffe durch gärende Ober- und Unterhefe in Glycerin übergeführt wird. Da beide Triosen quantitativ übrigbleiben, scheidet auch die Eventualität aus, dass

* Zur Theorie des Verdünnungseffekts, siehe F. LYNNEN²¹.

** Lit. s. bei M. KOBEL UND C. NEUBERG, 35. Meeting of the Soc. of American Bacteriologists, Philadelphia 1933; *Biochem. Z.*, 269 (1934) 411 und 273 (1934) 445. Sie konnten durch zweckmässige Versuchsanordnung die bis dahin nur als minimal befindene Quantität < 1% auf 31% steigern. Hinzuzufügen ist als allem Anschein nach älteste einschlägige Angabe eine Notiz von F. BORDAS UND DR RAZKOWSKI (*Compt. rend.*, 126 (1898) 1050). Ihr zufolge sollen in umgeschlagenen (turned) französischen Weinen 3 Bakterienarten vorkommen, die Glucose spurenhaft in Dioxyaceton umwandeln. Experimentell ist diese Behauptung nicht hinreichend gestützt, vielleicht hat es sich um Acetyl-methylcarbinol gehandelt.

eine Komponente des racemischen Glycerinaldehyds in Reaktion träte. Im Gegensatz zu den Triosenphosphaten sind somit die freien Triosen für gewöhnliche Hefe (s. S. 174) unter den obwaltenden anaeroben Bedingungen keine angreifbaren Substrate. Dass Phosphorylierung die biologische Dignität einer Substanz völlig verändert, ist ausser an dem erwähnten Beispiel der Glycerinsäure (s. S. 172) auch sonst beobachtet, so von PRINGSHEIM²⁷ bei *d*-Galactose-phosphat und namentlich von WARBURG²⁸ und DICKENS²⁹ für die Oxydasen der Glucose-6-phosphorsäure bzw. 6-Phosphogluconsäure. Die P-freien Stoffe sind keine Substrate für diese Enzyme.

Die Resistenz der Triosen beruht nicht auf einer Schädigung der benutzten Hefe durch die 3-Kohlenstoffzucker. Die abzentrifugierte Hefe erweist sich als ungeschwächt. In Gegenwart beider Triosen werden zugesetzte Zymohexosen glatt vergoren*. Der von LEHMANN UND NEEDHAM³⁰ angegebene Einfluss des Glycerinaldehyds auf die glycolytischen Vorgänge macht sich nicht geltend, er ist auch in den Versuchen von NEUBERG UND HOFMANN³¹ nicht zu Tage getreten.

Das Verhalten der Triosen ist insofern unerwartet, als die nahestehenden Substanzen Milchsäurealdehyd, $\text{CH}_3\text{CHOH}\text{CHO}$, und Acetol, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{OH}$, die als Desoxyderivate vom Glycerinaldehyd und Dioxyaceton aufgefasst werden können, und das Anhydrid der Triosen, das Methylglyoxal, $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{OH})\text{CHO}$, der Bioreduktion zu dem mit Glycerol nahe verwandten Propylenglycol zugänglich sind²³.

Die normale Funktion der benutzten Hefe offenbart sich ferner in Versuchen, die im Anschluss beschrieben seien, obzwar sie mit der Glycerinfrage als solcher nichts zu tun haben. Die *phytochemische Reduktion* des Cyclopentanons zum Cyclopentanol sowie die des *d*- und *d,l*-Campherchinons (*2,3-Dioxycamphans*) gelingt ohne Schwierigkeiten. Sie wird im letzten Falle halbseitig vollzogen, indem in der Hauptsache 3-Oxy-campher entsteht. Die Bioreduktion des *d,l*-Campherchinons verläuft partiell asymmetrisch. Dasselbe trifft für die *phytochemische Reduktion* des *d,l-Methyl-n-propylacetaldehyds* (Isocapronaldehyds) zu, die 2-Methyl-pentanol-1 mit einem Überschuss an linksdrehender Form liefert.

Auf Kosten vergärender Zucker ist somit die Bioreduktion in der Cyclopentanreihe und bei einem *o*-Chinon der hydroaromatischen Reihe möglich. Selbst ein so oberflächenaktiver Stoff wie der erwähnte Hexylalkohol verhindert den Eintritt der Bioreduktion nicht.

Der Beginn der hier mitgeteilten Versuche reicht länger zurück. Zu verschiedenen Zeiten haben daran mitgearbeitet Prof. DR N. N. IWANOFF, Leningrad, DR HILDA LUSTIG, New York, und DR ELISABETH PEISER, Berlin. Ihnen allen schulde ich Dank. Ich statte ihn in trauernder Erinnerung ab, alle drei weilen nicht mehr unter den Lebenden.

A. VERSUCHE MIT GLYCERINALDEHYD

Kristallisierter *d,l*-Glycerinaldehyd ist jetzt unschwer zugänglich³². Wird er in wässriger Lösung 24h bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so vollzieht sich nach WOHL UND NEUBERG³³ der Übergang in die monomolekulare Form. Er wurde in 1.0, 0.5 und 0.25% Concentration verwendet.

In je 100 ml der Glycerinaldehydlösung wurden 10 g Rohrzucker oder Glucose gelöst. Auf Zugabe von 2-3 g obergäriger Brennereihefe trat bei 25° schnelle Gärung ein,

* Glycerinaldehyd kann sogar als Aktivator der alkoholischen Zuckerspaltung fungieren: C. NEUBERG UND M. EHRLICH, *Biochem. Z.*, 101 (1920) 242.

Literatur S. 177/178.

die 2-3 Tage anhielt. Dann war alle Hexose verschwunden. Mit mehr Hefe wurde keine neue Gärung entfacht. Die schon in der Kälte eintretende Reduktion von FEHLING'scher Mischung lehrte, dass unveränderte Triose vorhanden war.

Obgleich Methoden zur Bestimmung von Triose neben Hexose ausgearbeitet sind³⁴, erübrigte sich deren Anwendung, da keine Hexosen mehr zugegen waren. Die zentrifugierten Flüssigkeiten, die kein Drehungsvermögen aufwiesen, zeigten gegen FEHLING'sche Mischung dasselbe Reduktionsvermögen, wie die ursprüngliche Glycerinaldehydlösung; die Reduktionskraft der Triose ist schon von WOHL³⁵ ermittelt.

Verdoppelung der Mengen von Hexose und Hefe sowie erneuter Zusatz von Glucose und Hefe nach beendeter Gärung (in toto 3 Mal) änderte nichts an dem Ergebnis, so wenig wie die Heranziehung einer anderen Hefesorte (untergäriger Bierhefe). Eine phytochemische Reduktion des *d,l*-Glycerinaldehyds war nicht nachweisbar.

B. VERSUCHE MIT DIOXYACETON

Die Versuche mit monomolekularem Dioxyaceton wurden wie die mit Glycerinaldehyd ausgeführt. Das Ergebnis war gleich, alle Ketotriose blieb unverändert.

Kristallisiertes Dioxyaceton ist nach NEUBERG UND HOFMANN³⁶ in einfacher Weise erhältlich. Bei richtiger Arbeitsweise kristallisiert die Ketotriose direkt in einer Ausbeute von 77%, berechnet auf das in Arbeit genommene Glycerin, praktisch rein aus*. Durch Aufarbeitung der Mutterlauge über das 2,4-Dinitrophenylhydrazon³⁷ kann man noch 10-14% an kristallisiertem Dioxyaceton, in toto also 90%, gewinnen. Der Rest dürfte das von LEVENE UND WALT³⁸ beschriebene polymere Condensationsprodukt enthalten.

Man kann sich von den mitgeteilten Tatsachen auch durch Anstellung der Versuche in kleinstem Umfange überzeugen. Statt eines titrimetrischen Verfahrens wählt man dann die Methode der Destillation mit H_2SO_4 ³⁹. Es entsteht dabei quantitativ Methylglyoxal, und dieses kann jetzt in γ -Bereichen bestimmt werden⁴⁰. Voraussetzung ist natürlich, dass keine Spezialhefen in Anwendung kommen, die Triosen angreifen, sei es durch Condensation zu Hexosederivaten⁴¹, sei es durch wirkliche Vergärung³¹.

C. VERSUCHE MIT CYCLOPENTANON

Die Anstellung kann in der früher²⁶ für 2-Methylcyclohexanon angegebenen Weise geschehen. Zur Trennung von unverändertem Keton schaltet man zweckmäßig eine Rektifikation über *p*-Nitrophenylhydrazin oder 2,4-Dinitrophenylhydrazin ein. Das Cyclopentanol vom Siedepunkt 141° wurde in einer Ausbeute von 42% isoliert.

D. VERSUCHE MIT *d*- UND *d,l*-CAMPHERCHINON

Die phytochemische Reduzierbarkeit der Diketone ist am Beispiel des Diacetyls aufgefunden²⁶. Auch andere Polyketone sind der Hydrierung durch gärende Hefe zugänglich, solche der aliphatischen, aromatischen und heterocyclischen Reihe²⁶. Im

* Mit sehr ähnlicher Methodik haben auch UNDERKOFLER UND FULMER^{37a} gute Resultate erzielt. Die von ihnen erhaltene Ausbeute ist etwas geringer gewesen. Die von ihnen angegebenen 80% beziehen sich nämlich nicht auf eingesetztes Glycerin, sondern auf Prozente von reduzierender Substanz. Diese besteht außerdem nicht nur aus Triose, vielmehr ist nach BOUSFIELD, WRIGHT UND WALKER^{37b} ein stärker reduzierender Körper beigemengt.

Campherchinon liegt ein bequem zugänglicher Vertreter von Diketonen der hydroaromatischen Reihe vor.

d-Campherchinon und *d,l*-Campherchinon werden von gärender Hefe unschwer und in erheblichem Ausmaße reduziert. Die Hydrierung konnte zum 2,3-Dioxycamphan führen, aber auch zu einem Oxy-oxo-campher. Das angewendete Campherchinon ging in einen Oxycampher über. Drehungen und Schmelzpunkte der Derivate liegen denen des 3-Oxy-campfers (2-Oxo-3-oxy-camphans) am nächsten. Die physikalischen Daten stimmten nicht genau damit überein, sondern sind ganz ähnlich wie bei dem Material, das durch Verfütterung von 2,3-Dioxocamphan an Hunde entsteht. Hier tritt neben 2-Oxy-3-oxo-campher ein nicht näher charakterisierter 3-Oxycampher auf⁴². Auch die rein chemische Reduktion des Campherchinons liefert ein Isomerengemisch⁴³.

Auf alle Fälle findet eine partielle Bioreduktion statt. Sie ergreift nur eine der beiden Carbonylgruppen. Dass die phytochemische Reduktion in Stufen erfolgt, ist für die Umwandlungen des Diacetyls, des Furils und auch sonst nachgewiesen²⁶. Oxyketone sind Zwischenglieder bei der Entstehung der Glycole. Beim Benzil ist bislang überhaupt nur die biochemische Bildung von Benzoin zu erzielen gewesen²⁶. Ob unter den Bedingungen einer forcierten langanhaltenden phytochemischen Reduktion, die nach F. G. FISCHER auch Doppelbindungen erfasst²⁶, die zweite Carbonylgruppe betroffen werden kann, bleibe dahingestellt.

Das *d*-Campherchinon wurde nach der Vorschrift von EVANS, RIDGION UND SIMONSEN⁴⁴ bereitet; aus Ligroin umkristallisiert schmolz es bei 198°. $[\alpha]_D = -92^\circ$.

Eine Lösung von 10 g *d*-Campherchinon in 50 ml Alkohol lässt man zu dem gärenden Gemisch von 250 g Bäckerhefe und 2.5 Litern 10% Rohrzuckerlösung fließen. Bei langsamem Zusatz wird die CO₂-Entwicklung nicht unterbunden. Der Eintritt der Umwandlung ist ohne weiteres daran zu erkennen, dass die vom Chinon herrührende gelbe Farbe verschwindet. Nach 2-tägiger Digestion bei Zimmertemperatur saugt man die Hefe ab und schüttelt das Filtrat mit Aether aus. Nach Trocknen des Aetherextraktes über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Es hinterblieb ein farbloser kristallinischer Rückstand, der, aus Petroläther umkristallisiert, bei 200–202° schmolz. *a* in 11%iger alkoholischer Lösung im 1 dm – Rohr = + 3.83°. $[\alpha]_D = + 34.9^\circ$. Ausbeute 6.3 g. Aus dem Hefeschlamm liess sich mit Wasserdampf nur eine ganz geringe Menge einer flüchtigen Substanz abtreiben, die vernachlässigt werden kann.

Zur Identifizierung wurde das Semicarbazone dargestellt.

Nach der Vorschrift von BREDT UND AHRENS⁴⁵ wurden 0.42 g Semicarbazid-chlorhydrat und 0.35 g Kaliumacetat in Wasser gelöst, 0.5 g Substanz und soviel Methylalkohol hinzugegeben, dass eine klare Lösung entstand. Nach eintägigem Stehen schied sich ein Öl ab, das nach starker Abkühlung und Reiben mit einem Glasstab kristallinisch erstarrte. Es wurde auf Ton abgepresst und aus Petroläther umkristallisiert. Die Verbindung schmolz bei 189°. *a* in 6% alkoholischer Lösung im 1 dm – Rohr = + 0.26° $[\alpha]_D = + 4.4^\circ$.



8 g *d,l*-Campherchinon (aus synthetischem *d,l*-Campher bereitet) wurden mit 200 g Zucker und 200 g Hefe in 2 l Wasser vergoren. Das Filtrat wurde mit Aether extrahiert und der Aetherrückstand aus Petroläther umkristallisiert. Er schmolz bei 200–203°. Ausbeute 5 g an "3-Oxycampher". *a* im 1 dm – Rohr in 10% alkoholischer Lösung = + 0.47°. $[\alpha]_D = + 4.7^\circ$. Die phytochemische Reduktion verläuft also partiell asymmetrisch.

E. VERSUCHE MIT ISOCAPRONALDEHYD (*d*,*l*-METHYL-*n*-PROPYL-ACETALDEHYD)

Die Arbeitsweise für die phytochemische Reduktion des verwendeten Isocapronaldehyds schloss sich an diejenige an, welche für die entsprechende Umwandlung des Isovaleraldehyds angegeben ist²⁶.

10 g des racemischen Ausgangsmaterials (Kp 115–116°) lieferten 6.5 g 2-Methylpentanol-1 (Kp 147–149°). Dieser Hexylalkohol zeigte (unverdünnt) im 2 dm – Rohr eine Linksdrehung von $\alpha = -0.9^\circ$. Für ein synthetisch gewonnenes Produkt, das vielleicht keine maximale Drehung besessen hat, ist in der Literatur⁴⁶ $[\alpha]_D = -1.25^\circ$ angegeben.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Anschluss an Betrachtungen über Entstehung, Verhalten und Bedeutung der 3-Kohlenstoffkörper, insbesondere der freien wie phosphorylierten Triosen, wird folgendes gezeigt: Gewöhnliche obergärige und untergärige Hefen, die Dioxyacetone und Glycerinaldehyd nicht vergären, bewirken keine phytochemische Reduktion der beiden Triosen zu Glycerin. Die 3-Kohlenstoffzucker werden nicht verändert. Sie sind in Konzentrationen von 1% für Hefe ungiftig und verhindern die glatte Vergärung zugefügter Zymohexosen nicht. Die Resistenz der Triosen gegen phytochemische Reduktion ist insofern bemerkenswert, als die Desoxytriosen, Acetol und Milchsäurealdehyd, ebenso wie das Anhydrid der Triosen, das Methylglyoxal, unter vergleichbaren Bedingungen zu dem mit Glycerol nahe verwandten Propylenglykol reduziert werden.

Die verwendeten Hefen sind zu Bioreduktionen durchaus geeignet befunden worden. Sie führen Cyclopentanon in Cyclopentanol, *d*- und *d,l*-Campherchinon durch Bioreduktion einer Carbonylgruppe in Oxycampher und Isocapronaldehyd in 2-Methylpentanol-1 über. Sobald dazu die Möglichkeit besteht, verläuft die phytochemische Reduktion asymmetricisch. Diese selber ist nunmehr auch in der Cyclopentanreihe und bei einem Diketon der hydroaromatischen Reihe verwirklicht worden.

SUMMARY

In connection with considerations about the origin, behaviour, and significance of C₃-substances, particularly free as well as phosphorylated trioses, it has been shown that: Ordinary top and bottom fermentation yeasts, which do not ferment dihydroxyacetone or glyceraldehyde, effect no phytochemical reduction of the two trioses to glycerol. The C₃-sugars are unchanged. They are not toxic to yeast in concentrations of 1%, nor do they inhibit the smooth fermentation of added zymohexoses. The resistance of the trioses to phytochemical reduction is noteworthy insofar as the desoxytrioses, monohydroxyacetone and lactic aldehyde, just like the triose anhydride, methylglyoxal, are reduced to propylene glycol (which is closely related to glycerol) under comparable conditions.

The yeasts used have been found to be entirely suitable for bioreductions. They convert cyclopentanone into cyclopentanol, *d*- and *d,l*-camphorquinone by bioreduction of a carbonyl group into hydroxycamphor, and isocapric aldehyde into 2-methylpentanol-1. As soon as the possibility exists, the phytochemical reduction takes an asymmetric course. This has now been carried out in the cyclopentane series and with a diketone of the hydroaromatic series.

RÉSUMÉ

A la suite de considérations sur la formation, le comportement et l'importance des corps à trois atomes de carbone, spécialement des trioses, tant libres que phosphorylées, on montre ce qui suit:

Des levures hautes ou basses ordinaires, qui ne font pas fermenter la dioxyacétone et l'aldéhyde glycérique, ne provoquent pas davantage de réduction phytochimique de ces deux trioses en glycérine. Les deux corps ne sont pas transformés. A la concentration de 1%, ils ne sont pas toxiques pour la levure et n'inhibent pas la fermentation régulière de zymohexoses additionnés. La résistance des trioses à la réduction phytochimique est d'autant plus remarquable que les désoxytrioses, l'acétol et l'aldéhyde lactique, de même que l'anhydride des trioses, le méthylglyoxal, sont réduits en propylène-glycol, proche parent de la glycérine, dans des conditions comparables.

Les levures utilisées ont été trouvées parfaitement aptes à effectuer des réductions biochimiques.

Elles transforment la cyclopentanone en cyclopentanol; la *d*- et la *d,l*-camphoquinone donnent, par réduction de l'un des deux groupes carbonyle, de l'oxycamphre; l'aldéhyde isocaproïque fournit le 2-méthylpentanol-1. Dès que la possibilité en est donnée, la phytoréduction prend un cours asymétrique. Cette phytoréduction a maintenant été réalisée aussi dans la série cyclopentanique et chez une dicétone de la série hydroaromatique.

LITERATUR

- ¹ F. HOPPE-SEYLER, *Ber.*, 4 (1871) 346.
- ² P. SCHUETZENBERGER, *Bull. soc. chim.* [2] 25 (1876) 289; M. NENCKI UND N. SIEBER, *J. prakt. Chem.* [N.F.] 24 (1881) 498; H. KILIANI, *Ber.*, 15 (1882) 136 u. 699.
- ³ K. P. JACOBSON, *Biochem. Z.*, 215 (1929) 216.
- ⁴ E. FISCHER UND J. TAFEL, *Ber.*, 21 (1888) 2634; 22 (1889) 106; H. J. H. FENTON UND H. JACKSON, *J. Chem. Soc.*, 75 (1899) 4.
- ⁵ C. NEUBERG UND F. BLUMENTHAL, *Verhandl. Berliner Physiolog. Ges. Sitzung vom 25. März 1904; Arch. Anat. u. Physiol. Abt.* (1904) 571.
- ⁶ ST. MOSTOWSKY, *Compt. rend.*, 152 (1911) 1276; J. K. PARNAS, *Centr. Physiol.*, 26 (1912) 671; G. EMBDEN, K. BALDES UND E. SCHMITZ, *Biochem. Z.*, 45 (1912) 108; A. J. RINGER UND E. M. FRANKEL, *J. Biol. Chem.*, 15 (1914) 233; R. STÖHR, *Z. physiol. Chem.*, 206 (1932) 211, u. 212 (1932) 85.
- ⁷ C. NEUBERG UND C. OPPENHEIMER, *Biochem. Z.*, 166 (1925) 451; C. OPPENHEIMER, *Die Fermente*, 5. Aufl. II, 1213 (1926); C. H. WERKMAN UND H. G. WOOD in BAMANN-MYRBECK, *Methoden der Fermentforschung* 1941, 1191; J. B. SUMNER UND G. F. SOMERS, *Chemistry and Methods of Enzymes*, 2nd. Ed. 1947, 317.
- ⁸ C. NEUBERG UND M. KOBEL, *Biochem. Z.*, 203 (1928) 463; 207 (1929) 232; 210 (1929) 466. Vergl. auch C. NEUBERG UND M. SCHEUER, *Monatsh.*, 53, 54 (1929) 1031 (*Wegscheider-Festschrift*).
- ⁹ O. MEYERHOF UND K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, 271 (1934) 89; 273 (1934) 73 u. 413; O. MEYERHOF, *Bull. soc. chim. biol.*, 20 (1938) 1033 u. 1345; 21 (1938) 965; O. MEYERHOF UND R. JUNOWICZ-KOCHOLATY, *J. Biol. Chem.*, 149 (1943) 71.
- ¹⁰ Siehe neuerdings auch E. BAER UND H. O. L. FISCHER, *J. Biol. Chem.*, 150 (1943) 223; J. A. SIBLEY UND A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 859.
- ¹¹ C. NEUBERG in C. OPPENHEIMERS *Handbuch der Biochemie*, II. Aufl., 2 (1925) 442; M. KOBEL UND C. NEUBERG, *Klein's Handbuch der Pflanzenanalyse*, 4 (1933) 1253.
- ¹² K. LOHMANN UND O. MEYERHOF, *Biochem. Z.*, 273 (1934) 60; O. MEYERHOF UND W. KIESLING, *Biochem. Z.*, 283 (1935) 83. Siehe namentlich auch H. O. L. FISCHER, *Naturwissenschaften*, 25 (1937) 589; W. KIESLING UND PH. SCHUSTER, *Ber.*, 71 (1938) 123.
- ¹³ C. NEUBERG, F. WEINMANN UND M. VOGT, *Biochem. Z.*, 199 (1928) 248; M. VOGT, *Biochem. Z.*, 211 (1929) 1.
- ¹⁴ R. NILSSON, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* 10 A No. 7 (1930) 121.
- ¹⁵ C. NEUBERG UND M. KOBEL, *Biochem. Z.*, 263 (1933) 219; 264 (1933) 456. Siehe auch *Arch. Biochem.* 1 (1942) 311.
- ¹⁶ R. NILSSON, *Svensk. Kem. Tid.*, 45 (1933) 129.
- ¹⁷ C. NEUBERG UND E. SIMON, *Ergeb. Enzymforsch.*, 2 (1933) 118.
- ¹⁸ G. EMBDEN, H. J. DEUTICKE UND G. KRAFT, *Klin. Wochschr.*, 12 (1933) 213.
- ¹⁹ O. MEYERHOF, *Ergeb. Physiol.*, 39 (1937) 10; *Symposium on Respiratory Enzymes*, The University of Wisconsin Press, Madison, 1942, 9; *Experientia*, 4 (1948) 169.
- ²⁰ C. F. CORI, *Symposium on Respiratory Enzymes*, The University of Wisconsin Press, Madison, 1942, 188.
- ²¹ F. LYNEN, *Ann.*, 539 (1939) 1.
- ²² O. PILOTY, *Ber.*, 30 (1898) 3161.
- ²³ I. ST. NEUBERG, *Biochem. Z.*, 255 (1932) 1.
- ²⁴ O. MEYERHOF UND W. KIESLING, *Biochem. Z.*, 267 (1933) 313.
- ²⁵ C. NEUBERG UND L. KARCZAG, *Biochem. Z.*, 36 (1911) 64.
- ²⁶ C. NEUBERG, *Advances in Carbohydrate Chem.*, 4 (1949) 75.
- ²⁷ H. PRINGSHEIM, *Biochem. Z.*, 156 (1925) 109.
- ²⁸ O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 242 (1931) 206; O. WARBURG, W. CHRISTIAN UND A. GRIESE, *Biochem. Z.*, 282 (1935) 167.
- ²⁹ F. DICKENS, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1626, 1645.
- ³⁰ H. LEHMANN UND J. NEEDHAM, *Enzymologia*, 5 (1938) 98.
- ³¹ C. NEUBERG UND E. HOFMANN, *Biochem. Z.*, 280 (1935) 167.
- ³² H. COLLATZ UND I. ST. NEUBERG, *Biochem. Z.*, 255 (1932) 27.
- ³³ A. WOHL UND C. NEUBERG, *Ber.*, 33 (1900) 3095.
- ³⁴ BEILSTEIN, *Handb.*, E. I. 429, E. II. 892; A. I. VIRTANEN UND B. BAERLUND, *Biochem. Z.*, 169 (1926) 169.

- ³⁵ A. WOHL, VON LIPPMANN, *Chemie der Zuckerarten*, Braunschweig 1904.
- ³⁶ C. NEUBERG UND E. HOFMANN, *Biochem. Z.*, 279 (1935) 318. Vergl. auch dieselben *Biochem. Z.*, 224 (1930) 496.
- ^{37a} L. A. UNDERKOFLER UND E. J. FULMER, *J. Am. Chem. Soc.*, 59 (1937) 301.
- ^{37b} E. G. BOUSFIELD, G. G. H. WRIGHT UND T. K. WALKER, *J. Instit. Brewing*, 53 (1947) 258.
- ³⁸ P. A. LEVENE UND A. WALT, *J. Biol. Chem.*, 78 (1928) 23.
- ³⁹ C. NEUBERG, E. FAERBER, A. LEVITE UND E. SCHWENK, *Biochem. Z.*, 83 (1917) 263. Auch für Triosephosphate anwendbar siehe bei M. KOBEL UND C. NEUBERG, *Biochem. Z.*, 269 (1934) 441.
- ⁴⁰ C. NEUBERG UND E. STRAUSS, *Arch. Biochem.*, 7 (1945) 211.
- ⁴¹ C. NEUBERG UND M. KOBEL, *Ann. brass. dist.*, 27 (1928) 65; *Biochem. Z.*, 203 (1928) 452. Siehe ebenfalls O. MEYERHOF, *Ann. brass. dist.*, 27 (1928) 81; K. IWASAKI, *Biochem. Z.*, 203 (1928) 237.
- ⁴² Y. ASHABINO UND M. ISHIDATE, *Ber.*, 67 (1934) 71; F. REINARTZ UND W. ZANKE, *Ber.*, 67 (1934) 548.
- ⁴³ H. RUPE UND W. THOMMEN, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 939.
- ⁴⁴ W. C. EVANS, J. M. RIDGION UND J. L. SIMONSEN, *J. Chem. Soc.* (1934) 137.
- ⁴⁵ J. BREDT UND H. AHRENS, *J. prakt. Chem.* [2], 112 (1926) 297; J. BREDT, *ebenda*, 121 (1929) 165.
- ⁴⁶ P. A. LEVENE UND L. A. MIKESKA, *J. Biol. Chem.*, 84 (1929) 571.

Eingegangen den 12. Mai 1949