

362. Felix Ehrlich und Fritz Lange: Über die biochemische Umwandlung von Betain in Glykolsäure.

[Aus dem Landwirtschaftlich-technologisch. Institut der Universität Breslau.]

(Eingegangen am 11. August 1913.)

Das Betain, der Hauptstickstoffkörper der Zuckerrübe, ist eine gegen chemische Eingriffe ungemein beständige Substanz. Man kann sie mit konzentrierter Schwefelsäure auf 140° und mehr erhitzen oder längere Zeit mit Königswasser kochen, ohne daß eine Zersetzung der Verbindung zu bemerken ist. Auch in physiologischer Beziehung zeigt sich das Betain merkwürdig indifferent. Den Organismus des Menschen und der meisten Tiere passiert es völlig unverändert, nur im Körper der Wiederkäuer scheint die Substanz gespalten zu werden¹⁾.

Über die Einwirkung von Mikroorganismen auf Betain liegen bisher nur vereinzelte Angaben vor, die sich auf das Wachstum in Betainlösungen beziehen. Es geht daraus nur soviel hervor, daß Kulturhefen Betain nicht anzugreifen vermögen, daß dagegen einzelne Schimmelpilze und Bakterien den Betain-Stickstoff verwerten können²⁾.

Gelegentlich unserer Arbeiten über das Verhalten von Mikroorganismen gegen Aminosäuren haben wir auch das Betain in den Kreis unserer Untersuchungen gezogen. Wir konnten dabei ebenfalls feststellen, daß untergärige und obergärige Bierhefen und Brennereiheden Betain nicht assimilieren können. Auch eine Reihe bekannter Heferassen, wie *Saccharomyces Logos*, *S. exiguus*, *S. pastorianus*, *S. ellipsoideus* usw., sind, wie wir außerdem fanden, hierzu nicht imstande. Dagegen zeigte es sich, daß die meisten Haut bildenden und an Oxydasen reichen Hefen, wie Kahlhefen, *Willia anomala* Hansen, *Pichia farinosa* und *-membranefaciens*, auf Betain ausgezeichnet gedeihen und die Substanz intensiv abbauen. Ebenso verhielten sich eine große Anzahl von Schimmelpilzarten, wie *Penicillium*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Oidium*, *Dematium* usw., die gleichfalls Betain besonders gut für ihren Eiweißaufbau ausnutzen können.

Da sich hier ähnliche Unterschiede geltend machten, wie sie früher von F. Ehrlich und Pistschimuka³⁾ bei der Assimilation

¹⁾ Andrlík, Velich und Staněk, Z. f. Zuckerind. i. Böhm. **27**, 161 [1902/03]; **29**, 205 [1904/05]. — W. Völtz, Arch. ges. Physiol. **116**, 307 [1907].

²⁾ V. Staněk und Miškovský, Z. f. Zuckerind. i. Böhm. **32**, 583 [1907/08].

³⁾ F. Ehrlich und Pistschimuka, B. **45**, 1006 [1912].

von primären Aminen durch Hefen und Schimmelpilze beobachtet waren, so schien eine weitere Untersuchung darüber von Interesse, ob in Analogie zu dem früher gefundenen biochemischen Abbau der Amine zu Alkoholen, auch das Betain bei der Assimilation durch Mikroorganismen eine ähnliche chemische Zerlegung erfährt.

In der Mehrzahl der Fälle ließen sich zunächst keine Abbauprodukte des Betains fassen, da die meisten angewandten Organismen, die Betain überhaupt angreifen, dieses sehr weitgehend zersetzen, und da außerdem in allen Versuchen, bei denen dem Pilz Zucker als Kohlenstoffquelle geboten wurde, die Abtrennung von den Zucker-Zerstellungsprodukten große Schwierigkeiten bereitete.

Wurde indes Alkohol statt Zucker als Kohlenstoffmaterial verwendet, so ließ sich in einem Falle beim Wachstum von *Willia anomala* Hansen auf Betainlösungen, die neben Alkohol nur noch anorganische Nährsalze enthielten, ein stickstoffreies Abbauprodukt des Betains, nämlich die Glykolsäure, isolieren. Sie bildet sich offenbar aus Betain durch Wasseranlagerung und Trimethylamin-Abspaltung nach der Gleichung:



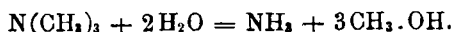
Die Zerlegung des Betains durch den Pilz erfolgt also offenbar in gleicher Weise wie auf rein chemischem Wege durch Erhitzen mit Natronlauge¹⁾.

Die geringen Ausbeuten an Glykolsäure, die bei den Versuchen sowohl mit kürzerer als mit längerer Wachstumsdauer erzielt wurden, erklären sich daraus, daß Glykolsäure kein Endprodukt, sondern ein Zwischenprodukt bei der Assimilation des Betains darstellt, das im Verlauf des Stoffwechselprozesses weiteren Abbau durch den Pilz erfährt. So ließ sich zeigen, daß in einer Lösung von Harnstoff und Glykolsäure als einziger Kohlenstoffquelle *Willia anomala* gut gedeiht, und daß dabei Glykolsäure vollständig aus der Lösung verschwindet, während auf einer Lösung von Harnstoff allein nicht das geringste Wachstum zu erzielen war.

Das im Sinne der obigen Gleichung zu erwartende Trimethylamin konnten wir in keinem Falle in Betainlösungen, auf die Hefen und Schimmelpilze eingewirkt hatten, auch nur in Spuren nachweisen. Offenbar entsteht es intermediär bei der Assimilation des Betains, erfährt aber in statu nascendi durch Wasseranlagerung einen

¹⁾ Abderhalden, Biochemisches Handlexikon Bd. IV, S. 834. — Stanek, Z. f. Zuckerind. i. Böhm. 27, 479 [1903].

weiteren Abbau zu Ammoniak und Methylalkohol etwa zufolge der Gleichung:



Auch das hierbei entstehende Ammoniak war in den Lösungen nach Wachstum von *Willia anomala* und andern Heferassen auf Betain nicht auffindbar. Ganz analog wie bei der Assimilation der Aminosäuren¹⁾ dient offenbar das intermediär abgespaltene Ammoniak für die Eiweißsynthese der Pilze, wobei wahrscheinlich gleichzeitig der nebenher gebildete Methylalkohol durch weitere Oxydation in irgend einer Weise Verwertung findet. Als Beweis für diese Ansicht kann gelten, daß nach unseren Versuchen die Heferasse *Willia anomala* auf Trimethylamin-phosphat oder Ammoniumphosphat, wenn ihr gleichzeitig Zucker oder Alkohol geboten wird, sehr üppig gedeiht, aber selbst deutliche, wenn auch schwache Vegetation zeigt, sobald nur Methylalkohol als einzige Kohlenstoffquelle zugegen ist.

Als chemisch bemerkenswertes Resultat dieser Untersuchungen ergibt sich, daß trimethylierte Aminosäuren vom Typus des Betains durch bestimmte Heferassen ähnlich wie einfache Aminosäuren durch Schimmelpilze²⁾ zu Oxysäuren abgebaut werden.

Als Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche diente ein reines Betainpräparat, das nach dem Verfahren von F. Ehrlich aus Melasse-Schlempe hergestellt war³⁾.

1. 2 g Betain wurden zusammen mit 0.3 g KH_2PO_4 , 0.1 g $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g NaCl und Spuren FeSO_4 in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Die sterilisierte Lösung wurde vorsichtig mit 15 ccm Äthylalkohol versetzt und mit einer Reinkultur von *Willia anomala* Hansen geimpft. Schon am folgenden Tage konnte die für *Willia anomala* charakteristische Kahmhaut an der Oberfläche der Versuchslösung beobachtet werden. Das Wachstum nahm von Tag zu Tag zu und schon nach kurzer Zeit ließ sich ein deutlicher Geruch nach Essigester wahrnehmen, der für gärende *Willia anomala* typisch ist. Nach etwa 3 Wochen wurde der Lösung nochmals steril 10 ccm Alkohol zugefügt. Als nach 8 Wochen kein wesentliches Fortschreiten der Pilzvegetation zu beobachten war, wurde der Versuch abgebrochen, indem man die entstandene Hefe durch ein gewogenes Filter von der Flüssigkeit trennte. Die bei 105° getrocknete Hefesubstanz wog 2.24 g und enthielt 0.113 g N, entsprechend 0.94 g zersetztem Betain. Es ist also ungefähr die Hälfte des angewandten Betains von der Hefe assimiliert worden. Die gesammelten Filtrate, die stark nach Essigester rochen und eine Gesamtazidität entsprechend verbrauchten 16 ccm $\frac{1}{10}$ NaOH gegen Phenolphthalein aufwiesen, wurden auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, der Rückstand mit dem mehrfachen

¹⁾ F. Ehrlich, B. 40, 1027 [1907].

²⁾ F. Ehrlich und Jacobsen, B. 44, 888 [1911].

³⁾ B. 45, 2409 [1912].

Volumen Alkohol aufgenommen, der Alkohol aus dem Filtrat verdampft, der hinterbleibende Sirup in wenig Wasser gelöst und nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure erschöpfend mit Äther extrahiert. Der mit geglühtem Na_2SO_4 getrocknete Ätherextrakt lieferte beim Verdunsten 0.33 g eines gelblichen Sirups, der im Exsiccator über H_2SO_4 nach 2 Tagen krystallinisch erstarrte. Die auf Ton vom Sirup befreiten Krystalle (0.14 g) gaben beim Umkrystallisieren aus Wasser Nadelchen vom Schmp. 78° von den Eigenschaften der Glykolsäure. Nach den Angaben im Beilstein schmilzt Glykolsäure bei $78-79^\circ$.

2. Eine sterile Lösung von 8 g Betain, 1.2 g KH_2PO_4 , 0.4 g $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g NaCl und Spuren FeSO_4 in 4 l Wasser wurde nach Zusatz von 60 ccm Äthylalkohol mit *Willia anomala* Hansen geimpft. Nach 7 Wochen hatte sich 4.99 g Hefetrockensubstanz gebildet. Gesamtazidität der vergorenen Lösung entsprechend verbrauchten 44 ccm $\frac{1}{10}\text{-NaOH}$ gegen Phenolphthalein. Aus den sauren Ätherextrakten der eingedampften und wie oben behandelten Flüssigkeiten ließ sich 0.5 g Glykolsäure vom Schmp. 77° isolieren, die nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Wasser unter Zusatz von Kohle den richtigen Schmelzpunkt von 78° gab (0.25 g). Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0.1249 g Sbst.: 0.1433 g CO_2 , 0.0603 g H_2O .

$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$. Ber. C 31.58, H 5.26.

Gef. » 31.29, » 5.40.

Die Ausbeute an Glykolsäure aus Betain ist wahrscheinlich bedeutend höher als sie bei unseren Versuchen gefunden wurde, da die Ätherextraktion dieser Substanz nur unvollkommen verläuft. Wir haben jedoch auch mit anderen Isolierungs-Verfahren keine besseren Erfolge erzielt.

3. 1 g Trimethylamin-phosphat wurde unter Zugabe der üblichen Nährsalze in 1 l Wasser gelöst, sterilisiert, mit 20 ccm Äthylalkohol versetzt und mit *Willia anomala* Hansen beimpft. Nach 4-wöchentlichem, intensivem Wachstum hatte sich 0.89 g Hefetrockensubstanz mit 0.0532 g Stickstoff gebildet. Diese assimilierte Stickstoffmenge würde 0.22 g Trimethylamin entsprechen. In der vergorenen Flüssigkeit war noch reichlich Trimethylamin vorhanden, doch ließ sich Ammoniak darin nicht nachweisen.

4. Auf einer wie in Versuch 3 hergestellten Lösung von 1 g Trimethylamin-phosphat, die statt Äthylalkohol die gleiche Menge Methylalkohol enthielt, wuchs *Willia anomala* anfangs merkbar, doch trat schon nach einigen Tagen offenbar eine Hemmung ein. In der einige Wochen aufbewahrten Flüssigkeit war die Hefe deutlich weiter gewachsen, ihre Gesamtmenge indeß so gering, daß sich eine Bestimmung der Trockensubstanz nicht verlohnte. Durch Auszählung mit Hilfe von Plattenkulturen wurde im Vergleich mit der eingeimpften Anzahl eine beträchtliche Vermehrung der Hefezellen festgestellt.

Eine Vergleichslösung mit Trimethylamin-phosphat allein ergab unter gleichen Bedingungen keine Spur von Wachstum, dagegen wurde analog dem obigen Versuche auf einer Lösung von $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ und Methylalkohol eine merkbare Vegetation des Pilzes festgestellt.

5. Eine sterile Lösung, enthaltend 0.5 g Glykolsäure, 0.1 g Harnstoff und anorganische Nährsalze zeigte, mit *Willia anomala* beimpft, intensives Wachstum. Nach 4 Monaten waren 0.51 g Hefetrockensubstanz mit 0.019 g Stickstoff entstanden. Aus der nach der obigen Methode aufgearbeiteten Flüssigkeit ließ sich keine Spur Glykolsäure isolieren, so daß also diese Substanz von dem Pilz bei der Assimilation vollkommen aufgebraucht war.

Ein Parallelversuch zeigte, daß ohne eine andere organische Substanz der Pilz auf Harnstoff allein nicht zu wachsen vermag.

6. Eine Reihe von parallel angestellten Versuchen, bei denen Harnstoff als Stickstoffkörper und Zucker einerseits, Alkohol andererseits als Kohlenstoffmaterial verwendet wurden, ergaben nach längerem Wachstum von *Willia anomala* bei gleicher Aufarbeitung der Lösung keine Spur von Glykolsäure. Es erscheint also ausgeschlossen, daß sich bei den obigen Versuchen mit Betain Glykolsäure aus Alkohol gebildet hat.

Nachschrift.

Erwiderung auf die Bemerkungen von H. Stoltzenberg über meine Arbeit betr. Darstellung des Betains aus Melasse-Schlempe.

In einer längeren Abhandlung geht H. Stoltzenberg¹⁾ ausführlich auf die Einwände ein, die ich²⁾ gelegentlich einer Mitteilung über die Gewinnung des Betains aus Melasse-Schlempe gegen eine frühere Arbeit von Stoltzenberg³⁾ über das gleiche Thema hier in den Berichten erhoben habe. Da die Diskussion über spezielle Einzelheiten eines technischen Verfahrens, dessen wissenschaftliche Seite längst erledigt ist, die Leser dieser Berichte kaum interessieren dürfte, kann ich mich in meiner Erwiderung kurz fassen.

In seiner ersten Arbeit hatte H. Stoltzenberg abweichend von der allgemein üblichen Gepflogenheit, alle früheren Verfahren zur Darstellung von Betain, besonders auch das von mir angegebene, das sich derselben Agentien, Salzsäure und Alkohol, wie das von Stoltzenberg, nur in umgekehrter Reihenfolge bedient, vollkommen ignoriert, so daß der unbefangene Leser den Eindruck gewinnen mußte, daß vor Stoltzenberg überhaupt kein brauchbares Verfahren zur Gewinnung von Betain aus Melasse-Schlempe existiert hat. Es freut mich, daß Stoltzenberg dieses von mir gerügte Versäumnis in seiner letzten Mitteilung nachholt, indem er auf die früheren Darstellungsmethoden des Betains und auch auf die meinige näher eingeht. Stoltzenberg benutzt nun aber diese Gelegenheit, um aus einer Reihe mißverständlicher Literaturangaben den Schluß zu ziehen, daß mein Verfahren nicht neu sei, sondern daß das Prinzip der Alkohol-Extraktion von Betain aus Schlempe bereits in den alten Arbeiten über das Betain enthalten sei. Ich verschmähe es, mich demgegenüber auf die Autorität des Patentamts zu berufen, das mir ja s. Z. die Neuheit meines Verfahrens durch Erteilung eines Patents testiert hat⁴⁾. Um der irr-

¹⁾ B. 46, 558 [1913]. ²⁾ B. 45, 2409, [1912]. ³⁾ B. 45, 2248 [1912].

⁴⁾ D. R.-P. Nr. 157173.

tümlichen Auffassung Stoltzenbergs zu begegnen, möchte ich nur darauf hinweisen, daß ich niemals behauptet habe, als erster die Alkohol-Löslichkeit des Betains gefunden zu haben, die ja tatsächlich längst bekannt war. Alle früheren Verfahren erforderten aber, wie ich an anderer Stelle näher ausgeführt habe, eine komplizierte Vorbehandlung der Melasse oder Schlempe durch Fällungen usw., ehe an die eigentliche Extraktion des aus den Niederschlägen angereicherten oder anderweitig isolierten Bateins gedacht werden konnte.

Ich war daher berechtigt, mein Verfahren gegenüber den früheren als einen Fortschritt zu bezeichnen, weil es die direkte Extraktion des Betains aus der Schlempe mit Alkohol ohne jede Vorbehandlung des Rohmaterials mit größter Leichtigkeit gestattet. Da außerdem bei allen Methoden bis dahin chemische Eingriffe vorgenommen wurden, die eine hypothetisch vermutete Betain-Verbindung zur Spaltung bringen konnten, nach meiner äußerst schonenden Behandlungsweise sich aber mit Alkohol allein fast das gesamte Betain direkt aus der Schlempe herauslösen läßt, so war mit meinen Versuchen auch zum ersten Male der exakte Beweis geliefert, daß Betain frei und nicht gebunden in der Melasse-Schlempe usw. vorkommt.

Im übrigen haben mich auch die letzten eingehenden Ausführungen Stoltzenbergs und seine experimentellen Belege nicht von der Richtigkeit seiner Behauptung überzeugen können, daß sein Verfahren besser ist als das von mir angegebene. Daß der Salzsäureverbrauch bei dem Stoltzenbergsehen Verfahren ein unvergleichlich höherer ist, da unnützer Weise fast die gesamten Alkali- und Calciumsalze und viele andre Substanzen der Schlempe erst von der Salzsäure gebunden werden müssen, ist unbestreitbar. Auch dürfte die Wiedergewinnung des Alkohols aus dem mit Salzsäure gesättigten Gemisch nach diesem Verfahren sehr große Schwierigkeiten bieten, da die Abtrennung des Alkohols vom Salzsäuregas eine recht mühselige und verlustreiche Operation darstellt, während sich nach meiner Methode der salzsäurefreie Alkohol immer wieder leicht regenerieren läßt, so daß also, wie ich schon früher betont habe, praktisch weniger Alkohol und Salzsäure bei meinem Verfahren benötigt wird.

Wenn Stoltzenberg nach einem besonders von ihm angestellten Versuch in einem Falle mit seiner Methode 2% Ausbeute an Betain mehr erhält als bei meinem Verfahren, so beweist diese geringe Differenz auch nichts gegen die Brauchbarkeit des letzteren. Hätte Stoltzenberg bei der Anwendung meiner Darstellungsmethode die Schlempe energischer und längere Zeit mit Alkohol geschüttelt, so würde sich zweifellos die Ausbeute entsprechend erhöht haben.

Daß nach den Angaben Stoltzenbergs Versuche, die mit meinem Verfahren von »Praktikanten und Assistenten eines fachwissenschaftlichen Instituts« ausgeführt wurden, schlechte Resultate ergeben haben, kann ich schließlich ebenfalls nicht als einen Beweis gegen die Güte meines Verfahrens anerkennen. Ich kann mich demgegenüber auf meine langjährigen Erfahrungen als Ab-

teilungsvorsteher an demselben fachwissenschaftlichen Institut berufen, in dem von einer großen Anzahl von Schülern die Darstellung von Betain aus Melasse-Schlempe nach meinen Angaben als Übungsbeispiel regelmäßig mit bestem Erfolge durchgeführt wurde.

Im übrigen überlasse ich das Urteil über Wert oder Unwert meines Verfahrens getrost der chemischen Praxis, die danach bereits seit 8 Jahren technisch in großem Maßstabe Betain-hydrochlorid von großer Reinheit gewinnt und sich meines Wissens bisher nicht veranlaßt gefühlt hat, von dieser Methode abzugehen.

363. L. Tschugaeff und A. Glebko: Zur Kenntnis der optischen Superposition.

[Aus dem chemischen Laboratorium der K. Universität St. Petersburg.]
(Eingegangen am 7. August 1913.)

Als Prinzip der optischen Superposition wird bekanntlich der folgende, von van't Hoff zuerst im Jahre 1875 angedeutete¹⁾ und in bestimmterer Form 20 Jahre später in der zweiten Auflage seines berühmten Werkes »Lagerung der Atome im Raume« ausgesprochene Satz bezeichnet: Für jede aktive Substanz ist die gesamte, von derselben bewirkte Drehung gleich der algebraischen Summe, der von den einzelnen asymmetrischen Kohlenstoffatomen herrührenden Partialdrehungen. Hierbei wird also »die von einem gegebenen asymmetrischen Kohlenstoffatom herrührende Drehung als unabhängig betrachtet von der Konfiguration der Gruppen um die anderen asymmetrischen Kohlenstoffatome im Molekül.«

Die viel umstrittene Frage über die Stichhaltigkeit dieses Prinzips darf auch jetzt noch keineswegs als definitiv entschieden gelten. Obschon die ausführlichen experimentellen Untersuchungen von Pb. A. Guye²⁾ mit seinen Schülern und von P. Walden³⁾ keine Zweifel an der Richtigkeit der van't Hoff'schen Hypothese zu lassen schienen, haben neuerdings Rosanoff⁴⁾ und Patterson⁵⁾ fast gleichzeitig Einwände gegen die Stichhaltigkeit der von den eben genannten Forschern geübten Beweisführung erhoben und darauf hingewiesen, daß die vorliegenden Tatsachen vielmehr gegen als für die Zulässigkeit des Superpositionsprinzips zu sprechen vermögen.

¹⁾ Bl. [2] 23, 298 [1875].

²⁾ C. r. 119, 790, 953 [1894]; Bl. 11, 1170 [1894]; 13, 457 [1895].

³⁾ Ph. Ch. 15, 638 [1894]; 17, 720 [1895].

⁴⁾ Ph. Ch. 56, 565 [1906].

⁵⁾ Soc. 87, 40 [1905]; 89, 1884 [1906]; 91, 705 [1907].