

Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie

6. Die Benutzung biochemischer Oxydationen und Reduktionen für präparative Zwecke

Von Prof. Dr. F. G. FISCHER

Chemisches Institut
der Universität Würzburg

Inhalt: A. Übersicht der Reaktionstypen. — B. Oxydoreduktionen von Carbonyl-Hydroxyl-Verbindungen. — C. Oxydation von Aldehyden zu Säuren. — D. Hydrierung von Äthylenverbindungen. — E. Hydrierungen mit Hefe [a) Primäre Alkohole, b) Aldehyde, c) Ketone, d) Ketosäuren]. — F. Hydrierungen mit Bakterien und im Tierkörper. — G. Hydrierungen und Dehydrierungen bei Steroiden. — H. Sterine und Gallensäure. — I. Steroide Hormone [a) Reduktionen von Ketosteroïden, b) Dehydrierungen von Oxysteroiden, c) Hydrierungen ungesättigter Steroile]. — J. Oxydation von Methylgruppen.

Einleitung.

Seit der Erkenntnis der „vitalistischen“ Ursache von Gärung und Fäulnis besteht die rationelle Möglichkeit, Stoffwechselarten von bestimmten Organismen zur Durchführung erwünschter chemischer Umsetzungen auszunutzen. In breitestem Umfange geschieht das in den Gärungsindustrien, die mit Hefen, Schimmelzügen und Bakterien Alkohol, Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure und verschiedene andere Stoffe erzeugen.

Diese Erzeugnisse sind, unter den angewandten Gärbedingungen, die hauptsächlichen Endprodukte des Stoffwechsels der betreffenden Mikroorganismen. Es ist aber auch möglich, durch Veränderung der Bedingungen derart in die Reaktionsabläufe einzutreten, daß auch andere Stoffe hervortreten, die sonst nur Zwischen- oder Nebenprodukte des Stoffwechsels wären. Als Beispiel ist die Glyceringärung der Hefe nach Sulfitzusatz bekannt.

Nun ist der Wirkungsbereich von Fermenten nicht eng auf die Substanzen beschränkt, die natürlicherweise am Stoffwechsel teilnehmen; auch andere, fremde Stoffe können Fermentwirkungen unterworfen sein, da diese wohl das Vorhandensein bestimmter struktureller Eigenschaften des Substrats verlangen, aber oft große Stoffklassen umfassen.

Daher kommt es z. B., daß Indigo blau in Gärungsvorgänge einbezogen und dadurch verküpft werden kann, oder daß viele Pharmaka im tierischen und menschlichen Körper Veränderungen erleiden.

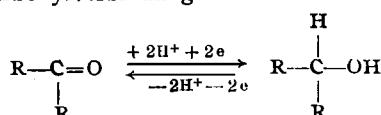
Aus solchen, zum Teil Jahrhunderte alten Erfahrungen ergibt sich die weitere Möglichkeit, auch an Stoffen, die nicht oder jedenfalls nicht in größerer Menge am Stoffwechsel bestimmter Organismen teilnehmen würden, eine erwünschte Reaktion durchzuführen.

Die im folgenden erwähnten Anwendungen biochemischer Oxydationen und Reduktionen werden sich auf diese dritte Möglichkeit beschränken.

A. Übersicht der Reaktionstypen.

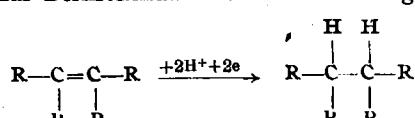
Groß ist die Anzahl der präparativ durchführbaren Typen biochemischer Oxydoreduktionen nicht. Sie steht bisher in starkem Mißverhältnis zur übergreifenden Bedeutung dieser Umsetzungen bei den Spaltungen und Synthesen des energieverändernden Stoffwechsels und zur Zahl der dabei wahrscheinlichen Reaktionsarten.

1. Am häufigsten durchgeführt, am besten bekannt und präparativ am leichtesten zugänglich ist die Reduktion von Aldehyden und Ketonen zu entsprechenden Alkoholen bzw. die Umkehrung dieser Reaktion, die Dehydrierung von primären und sekundären Alkoholen zu den dazugehörigen Carbonylverbindungen:

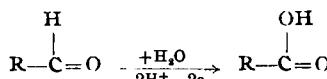


Hier schließt sich auch die Reduktion von Chinonen und chinoid gebauten Stoffen an bzw. die Oxydation von Hydrochinonen.

2. Die Hydrierung von Äthylenbindungen, deren Durchführung bisher nur auf bestimmte Gruppen ungesättigter Stoffe beschränkt ist. Eine Umkehrung der Reaktion, die Bildung eines Äthylen aus dem Äthan, ist mit Sicherheit nur beim Stoffpaar Bernsteinsäure-Fumarsäure nachgewiesen.



3. Die Oxydation von Aldehyden zu Säuren, der besonders in der Zuckerguppe Bedeutung zukommt:



4. Die Oxydation von Methylgruppen aliphatischer, alicyclischer und aromatischer Stoffe zu Carboxylgruppen im Tierkörper: $\text{R}-\text{CH}_3 \longrightarrow \text{R}-\text{COOH}$

Zwar ist noch eine Reihe von anderen Typen biologischer Oxydationen und Reduktionen bekannt, wie die umkehrbare, enzymatische Dehydrierung von d-Aminosäuren und von L-(+)-Glutaminsäure zu den entsprechenden Iminosäuren, die weiter zu Ketosäuren hydrolysiert werden¹⁾, die Oxydation von Benzol²⁾ und Pyridinderivaten³⁾ zu Phenolen im tierischen Organismus, die Reduktion von Nitro-, Nitroso- und Hydroxylamino-Verbindungen zu Aminen durch Hefe⁴⁾, und schließlich die Hydrierung von Thioaldehyden⁵⁾ und Disulfiden⁶⁾ zu Thioalkoholen ebenfalls durch Hefe.

Doch wird nur ausnahmsweise diesen und den übrigen bekannten Umsetzungen eine präparative Bedeutung zukommen.

Für alle diese Typen von Oxydationen und Reduktionen stehen auch andere, nicht biochemische Verfahren zur Verfügung. Doch ist ihnen in manchen Fällen die Anwendung von Mikroorganismen oder von Fermentpräparaten infolge der Spezifität der erzielbaren Wirkung überlegen. Das ist der Fall, wenn z. B. im Molekül des Substrats sonstige empfindliche Gruppen vorhanden sind, die keine Veränderung erfahren sollen, vor allem aber, wenn eine sterisch ausgewählte Umsetzung gewünscht wird.

So hat z. B. die Reduktion einfacher Aldehyde durch gärende Hefe keinen präparativen Sinn, wohl aber die von Ketonen mit verschiedenen Radikalen, wenn die Gewinnung optisch aktiver sekundärer Alkohole erwünscht ist. Bei mehrfach konjugiert ungesättigten Aldehyden oder Alkoholen ist die biochemische Hydrierung wiederum die einzige bekannte Möglichkeit, um ausschließlich in α,β -Stellung Absättigung zu erreichen.

Bei einigen der im folgenden erwähnten Reaktionen bietet die biochemische Durchführung an den bisher bekannten Beispielen keine Vorteile; sie werden trotzdem erwähnt, weil zu erwarten ist, daß ihre Anwendung an anderen Beispielen nützlich sein wird. Daher wurde auch mehr Wert darauf gelegt, die Gesetzmäßigkeiten der Umsetzungen darzulegen, als interessante Einzelfälle zu schildern.

Bezüglich der Methodik zur Erkennung und Behandlung von Mikroorganismen und zur Gewinnung von Fermentpräparaten sei auf die einschlägigen bakteriologischen, mikrobiologischen und fermentchemischen Werke verwiesen⁷⁾.

¹⁾ Siehe z. B.: H. v. Euler, E. Adler, G. Günther u. N. B. Das, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 254, 61 [1938].

²⁾ Literatur bei K. Fromherz, Bethes Handb. d. normalen u. pathologischen Physiologie V, 996, Berlin 1929.

³⁾ Siehe z. B. K. Bernhard, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 258, 96 [1939].

⁴⁾ C. Neuberg u. E. Welde, Biochem. Z. 67, 18 [1914]; C. Neuberg u. E. Reinhardt, ebenda 188, 561 [1928].

⁵⁾ F. F. Nord, Ber. dtsch. chem. Ges. 52, 1207 [1919].

⁶⁾ C. Neuberg u. E. Schwenk, Biochem. Z. 71, 118 [1915].

⁷⁾ Z. B. K. Bernhard: Gärungsschemisches Praktikum; 2. Aufl., Berlin 1939; Glaubitz: Atlas der Gärungsorganismen, Berlin 1934; W. Henneberg: Handb. der Gärungsbakteriologie, Berlin 1928; A. Janke: Allgemeine technische Mikrobiologie: I. Die Mikroorganismen, Dresden u. Leipzig 1924; A. Jorgensen: Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie, 6. Aufl., A. Hansen u. A. Lund, Jena 1940; R. Kraus u. P. Uhlenhuth: Handb. der mikrobiologischen Technik, Berlin u. Wien 1928; Lindner: Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde, 6. Aufl., Berlin 1928; C. Oppenheimer: Fermente u. ihre Wirkungen, Leipzig 1926, u. Supplement-Bände, den Haag 1939; C. Oppenheimer u. L. Pincussen: Die Methodik d. Fermente, Leipzig 1928.

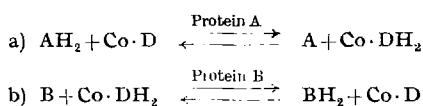
B. Oxydoreduktionen von Carbonyl-Hydroxyl-Verbindungen.

1. Allgemeines.

Die Reduktion der Carbonylgruppe ist schon mit zahlreichen einfachen aliphatischen und aromatischen Aldehyden durchgeführt worden, und zwar meistens durch gärende Hefe („phytochemische Reduktion“). Doch ist sie auch bei Bakterien, höheren Pflanzen und im tierischen Organismus nachgewiesen. Die umgekehrte Reaktion, die Dehydrierung von Alkoholen, findet präparativ am besten durch Bakterien statt, bei Äthanol und den mehrwertigen Alkoholen Glycerin und Sorbit z. B. mit Essigbakterien, bei Steroiden durch ein Coryne-Bakterium, das aus Hefeaufschlaimungen isoliert wurde.

Die fermentchemischen Fragen dieser umkehrbaren Umwandlungen von Carbonyl-Hydroxyl-Verbindungen sind schon weitgehend geklärt, besonders sofern sie die Oxydoreduktionen des Kohlenhydratabbaues betreffen. Nicht näher untersucht sind dagegen bisher die Dehydrasen höherer Alkohole, z. B. der Steroide. Den meisten dieser Carbonyl-Hydroxyl-Oxydoredukasen ist gemeinsam, daß sie Co-Dehydrase I als prosthetische Gruppe benötigen, so z. B. bei den Reaktionen: Äthylalkohol-Acetaldehyd, α -Glycerophosphat-Phospho-glycerinaldehyd, Milchsäure-Brenztraubensäure, Apfelsäure-Oxalessigsäure und β -Oxy-buttersäure-Acetessigsäure⁸⁾.

Die Hydrierung einer Carbonylverbindung B, sei es im unbeeinflußten Zellgeschehen, sei es bei einer mit präparativen Absichten durchgeföhrten zymochemischen Wasserstoffanlagerung, wird daher unter der spezifischen Wirkung des Proteins der entsprechenden Dehydrase in den meisten Fällen durch Oxydoreduktion mit Dihydro-Co-Dehydrase (CoD·H₂) nach Gleichung (b) zustande kommen:



Als wasserstoffliefernde Stoffe AH₂ kommen alle die in Frage, welche durch Einwirkung einer Dehydrase entweder direkt nach Gleichung a) Co-Dehydrase reduzieren, wie Hexosephosphat, Triose-phosphat, Milchsäure, Äthylalkohol, oder auch indirekt über andere Fermentsysteme hinweg. Der Menge nach werden als korrelierte, wasserstoffliefernde Reaktionen in den allermeisten Fällen die des Kohlenhydratabbaus vorherrschen, also hauptsächlich die Dehydrierung des Triose-phosphats (nach Negelein u. Brömel 1,3-Glycerinaldehyd-diphosphorsäure⁹⁾).

Mit den gleichen Verknüpfungen über die Co-Dehydrase hat man natürlich auch bei der gegenläufigen Reaktion der Dehydrierung einer Hydroxylverbindung BH₂ zu rechnen. Führt diese Dehydrierung bis zur Reaktion mit Sauerstoff, dann verläuft sie nach den gegenwärtigen Kenntnissen¹⁰⁾ von der Dihydro-Co-Dehydrase in der Hauptmenge über die iso-Allooxazin-Gruppe „gelber Fermente“ (Diaphorase) und bei Aerobiern schließlich über das Cytochrom-System weiter. Auf die Vorstellungen über die Bedeutung der Einschaltung des C₄-Dicarbonsäure-Cyclus¹¹⁾ oder des Citronensäure-Cyclus¹¹⁾ kann hier nur hingewiesen werden.

Bei einigen Dehydrasen ist wahrscheinlich gemacht worden, daß sie keine dissoziierende Gruppe enthalten, daß sie jedenfalls zu ihrer Wirkung keine der beiden bekannten Co-Dehydrasen brauchen¹²⁾. So ist z. B. in tierischem Gewebe, Pflanzensamen und Hefe außer der Co-Zymase bedürftigen auch eine von ihr unabhängige Glycerophosphat-Dehydrase enthalten. Die Umwandlung Milchsäure-Brenztraubensäure durch Fermentpräparate aus Hefe benötigt, im Gegensatz zu der mit Dehydrasen aus Bakterien oder tierischem Gewebe, offenbar keine Co-Zymase.

Mit Ausnahme dieser wenigen Fälle, in denen die oxydoreduzierende Fermentgruppe noch unbekannt ist, besteht aber, wie erwähnt, die Carbonyl-Hydroxyl-Umwandlung in

⁸⁾ Eine Zusammenstellung findet sich bei F. G. Fischer, Niedermolekulare Überträger biologischer Oxydo-Reduktionen, Ergeb. Enzymforsch. 8, 185 [1939].

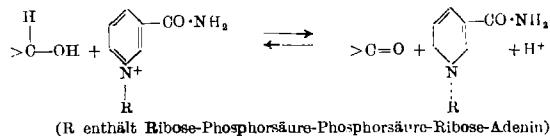
⁹⁾ Biochem. Z. 301, 135 [1939].

¹⁰⁾ Siehe z. B.: E. E. Lockhart, Biochemical J. 33, 613 [1939].

¹¹⁾ Siehe z. B.: C. Martius, Die tierische Gewebsatmung, Ergeb. Enzymforsch. 8, 247 [1939].

¹²⁾ Zusammenstellung bei F. G. Fischer, I. c. 8), S. 185.

einer gekoppelten Oxydoreduktion mit dem Pyridin-Dihydro-pyridin-Kern der beiden Oxydationsstufen der Co-Zymase.



Die Lage des Gleichgewichts bei diesen Oxydoreduktionen liegt weit auf der Seite des reduzierten Substrats, zu ungünsten der Dihydro-Co-Zymase¹³⁾. Auch für die präparative Ausführung der Reaktionen ist die pH-Abhängigkeit des Gleichgewichts wichtig: Bei zunehmender Alkalität geht die Dehydrierung der Oxy-Verbindung mit steigender Geschwindigkeit, die Hydrierung der Oxo-Verbindung mit abnehmender Geschwindigkeit vor sich. Mit steigender Alkalität verschiebt sich daher das Gleichgewicht der oben formulierten Reaktion stark nach rechts. Es wäre also zu erwarten, daß auch präparative enzymatische Dehydrierungen von Alkoholen am besten im schwach alkalischen Medium durchgeführt werden, sofern nicht andere Faktoren überwiegen.

Für die Reduktion chinoider Verbindungen durch Fermentsysteme der Hefe und des tierischen Gewebes ist es nach neueren Feststellungen erforderlich, daß außer dem Dehydrase-Co-Dehydrase-Komplex auch ein Flavinprotein anwesend sei. Es muß also gewissermaßen der Substratwasserstoff von der hydrierten Co-Dehydrase noch über den iso-Allooxazin-Kern gehen, um das Chinon, z. B. Methylenblau, in das Hydrochinon zu verwandeln. Diese Befunde machen es verständlich, daß die meisten Zellarten nur solche Chinone zu reduzieren vermögen, deren Normalpotentiale nicht wesentlich tiefer liegen als die von Flavengruppen (etwa -0,22 bis 0,27 V¹⁴⁾). Im Stoffwechsel verschiedener Bakterien kann jedoch die Reduktionsintensität der Wasserstoffelektrode erreicht und in umkehrbarer Reaktion molekularer Wasserstoff gebildet werden¹⁵⁾.

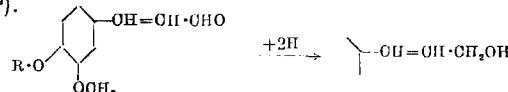
Für präparative Zwecke wird die zymochemische Reduktion chinoider Stoffe, nach dem historischen Beispiel der Gärungsverküpfung von Indigo, gegenwärtig kaum Vorteile zu bieten vermögen.

2. Die zymochemische Reduktion von Aldehyden und Ketonen.

Seit den ersten Feststellungen über die Reduktion von Carbonylverbindungen durch gärende Hefe^{16,17)} ist diese Methode vor allem durch C. Neuberg sehr eingehend bearbeitet worden¹⁸⁾. An 30 aliphatischen und cyclischen Aldehyde und an 20 Ketone wurden schon der „phytochemischen Reduktion“ unterworfen. Das Verfahren ist einfach: Die Carbonylverbindung wird in Lösung oder feiner Verteilung lebhaft gärender Hefe zugesetzt und die Gärung durch weitere Zugaben von Zucker und, falls erforderlich, von Hefe, einige Tage bis zu einem Monat in Gang gehalten. Aldehyde werden viel schneller reduziert als Ketone. Empfindliche Aldehyde können mit Vorteil als Ammoniakverbindungen der Hefewirkung ausgesetzt werden. Eine genauere Schilderung der Methode erübrigt sich hier, da eine zusammenfassende Darstellung von C. Neuberg u. G. Gorr vorliegt¹⁹⁾.

Es sei nur darauf hingewiesen, daß man in den meisten Fällen eine wesentliche Verkürzung der in der Literatur als erforderlich angegebenen Gärzeiten durch starke mechanische Rührung erzielen kann. Über die Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit zugesetzter Carbonylverbindungen von der Acidität des Gärgetes fehlen bisher systematische Versuche.

Als Beispiel einer Anwendung des Verfahrens auf einen empfindlichen Stoff sei die Reduktion von Tetraacetyl-Glucoconiferylaldehyd zum zugehörigen Alkohol erwähnt²⁰⁾.



¹⁶⁾ Literatur bei F. G. Fischer, I. c. 8), S. 190.

¹⁷⁾ Literatur bei F. G. Fischer, I. c. 8), S. 207ff.

¹⁸⁾ Literatur bei L. F. Hewitt: Oxidation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry, London 1936.

¹⁹⁾ C. J. Lindner u. H. J. v. Liebig, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 72, 449 [1911].

²⁰⁾ C. Neuberg u. H. Steenbock, Biochem. Z. 52, 494 [1911].

²¹⁾ Literatur in Oppenheimer's „Fermente“, Bd. II, S. 1547ff.

²²⁾ In Oppenheimer-Picassus: Methodik der Fermente, S. 1212. S. a. K. Bernhauer, I. c. 7).

²³⁾ H. Pauly u. K. Feuerstein, Ber. dtsc. chem. Ges. 60, 1031 [1927].

Weitere neuere Beispiele aus der Gruppe steroider Hormone sind im entsprechenden Abschnitt beschrieben. In dieser Stoffklasse ist in den letzten Jahren auch die Reduktion von Carbonylgruppen durch Bakterien untersucht worden, die an einfacheren Carbonylverbindungen schon früher festgestellt worden war^{21).}

Im tierischen Organismus ist an mehreren Beispielen ebenfalls die Reduktion zugeführter Ketone nachgewiesen worden^{22);} einen präparativen Wert haben die bisher beschriebenen Fälle jedoch nicht.

Die Bedeutung der zymochemischen Reduktionen als präparative Methode hat stark abgenommen durch die Auffindung des schönen Reduktionsverfahrens nach Meerwein (in der Ausführung von Ponndorf)^{23).} Mit iso-Propylalkohol in Anwesenheit von Aluminiumalkoholat lassen sich auch viele ungesättigte oder sonst empfindliche Carbonylverbindungen in Alkohole überführen, für die ehedem nur die enzymatische Behandlung in Frage gekommen wäre. Unangetastet bleibt die Bedeutung der Gärungsmethode für sterisch spezifisch gerichtete Reaktionen.

3. Die Dehydrierung von Alkoholen.

Wie schon im vorletzten Abschnitt erwähnt, ist die Fähigkeit zur Dehydrierung einwertiger und mehrwertiger Alkohole sowohl bei den verschiedensten Bakterien, als auch bei Pilzen, höheren Pflanzen und im tierischen Organismus nachzuweisen. Präparativ brauchbar ist bei einigen einwertigen, dem Äthanol nahestehenden Alkoholen und auch bei mehrwertigen Zuckeralkoholen vor allem die Wirkung von Bakterien der Gruppe Acetobacter^{24).}

a) Einwertige Alkohole.

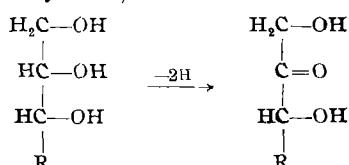
Bei einfachen primären Alkoholen wird die biochemische Dehydrierung zum Aldehyd präparativ kaum je in Frage kommen. Ihre Schwierigkeit besteht im Festhalten der Aldehydstufe, die in den meisten Fällen schnell unter Bildung der Säure überschritten wird, so wie es im Grundbeispiel der Essigsäuren Gärung geschieht. Durch Abfangen mit Calciumsulfit lässt sich jedoch der Aldehyd anreichern^{25).}

Auch bei ungesättigten oder sonstwie an anderen Stellen des Moleküls empfindlichen Alkoholen wird meistens eine nicht enzymatische Methode vorzuziehen sein, z. B. der Austausch der Oxydationsstufen mit Ketonen in Anwesenheit von Aluminiumalkoholaten. Bei der Dehydrierung von Vitamin A zum entsprechenden Aldehyd z. B. hat sich diese Methode bei Anwendung von Diäthylketon und Aluminium-tert. Butylat bewährt^{26).}

Bei sekundären Oxygruppen hat hingegen die bakterielle Dehydrierung zur Ketoverbindung besonders in der Gruppe der Zuckeralkohole Bedeutung erlangt; auch bei steroiden Oxyverbindungen, die weiter unten im geschlossenen Zusammenhang dargestellt werden, ist sie mehrfach durchgeführt worden.

b) Mehrwertige Alkohole.

Seit der Entdeckung Bertrands (1896), daß sein „Sorbose-Bakterium“ (*Acetobacter xylinum*) verschiedene Polyalkohole in die entsprechenden Ketosen umwandelt, ist diese Fähigkeit bei verschiedenen anderen Spezies der Gruppe Acetobacter festgestellt worden. Typisch ist die Beschränkung der Oxydation auf die sekundären Alkoholgruppen, denen nach Bertrand eine weitere Hydroxylgruppe in gleichgerichteter Lage (cis-ständig in der Projektion) benachbart sein muß. Xylit und



Dulcit werden daher nicht angegriffen, wohl aber Erythrit zu Erythrulose^{27),} 1-Arabin zu 1-Xyloketoze, Adonit zu

1-Adonose²⁸⁾, d-Sorbit zu 1-Sorbose²⁹⁾ und Mannit zu d-Fructose^{27).} Doch ist offenbar auch die Nachbarschaft einer Carboxylgruppe zureichend, denn Gluconsäure kann außer zu d-5-Ketogluconsäure auch zu 2-Ketoglucon-säure dehydriert werden^{30).}

Wesentlich für die Methodik dieser bakteriellen Dehydrierungen ist außer der Anwendung eines aktiven Bakterienmaterials (junge, auf neutralem Nährboden vorgezüchtete Kulturen) eine ausreichende Belüftung. Durch schnelle Bewegung des Gärgetes wird die Oxydationszeit erheblich verkürzt.

Das rationellste und auch für andere oxydative Gärungen aussichtsvollste Verfahren zur technischen Gewinnung der 1-Sorbose (als Ausgangsmaterial für die Darstellung der l-Ascorbinsäure) verwendet eine sich sehr schnell um ihre horizontale Achse drehende Aluminiumgärtrommel; in ihrem Innern wird das Gärgete durch Rührschaufeln fortwährend heftig versprüht und so mit Luft, die unter 2–3 at Überdruck durchgeleitet wird, reichlich versorgt. Die Oxydation von 15–20%igen Sorbitlösungen gelingt in dieser Weise in etwa 30 h zu über 90%^{31).}

Oxydation von Sorbit zu Sorbose^{29).} Die Nährlösung mit 15% Sorbit und 0,1% Eisessig in Hefewasser (oder mit 0,5% des Hefeextraktes Difco) wird in ein Durchlüftungsgefäß mit unten eingeschmolzener Glasfilterplatte (Durchlüftungsgefäß nach Kluyver) nach der Sterilisation mit einer 2 Tage alten Kultur des *A. suboxydans* geimpft und bei 25–30° dauernd kräftig mit entkeimter Luft (Wattefilter) durchlüftet.

Sobald das Reduktionsvermögen der Lösung, das in kleinen Proben zeitweilig bestimmt wird, nicht mehr steigt (6–8 Tage), wird die Lösung filtriert und im Vakuum zum Sirup eingedampft.

Die 1-Sorbose kristallisiert schon fast rein aus (Schmp. 160° bis 161°); sie wird abgesaugt und mit Methanol gewaschen. Einschließlich der kleineren Mengen, die durch entsprechende Behandlung der Mutterlauge noch erhältlich sind, beträgt die Ausbeute 70–80%.

Oxydation von Glycerin zu Dioxyaceton^{32).} Diese oxydative Gärung kann in gleicher Weise durchgeführt werden, wie im vorhergehenden Versuch beschrieben. Die Lösung enthält 6% Glycerin und 0,5% Difco-Hefeextrakt. Das Maximum des Reduktionsvermögens bei Durchlüftung des Ansatzes ist nach 2–3 Tagen erreicht, während nach dem Ruheverfahren durchschnittlich 7 Tage benötigt werden. Zur Aufarbeitung wird die Lösung mit Tierkohle, Calciumcarbonat und Kieselgur versetzt (je 10 g/l), geschüttelt, filtriert, im Vakuum auf 1/4 des Volumens eingedampft und unter Röhren mit 3–4 Vol. absol. Alkohol versetzt.

Nach Abtrennen des Niederschlags wird die Lösung im Vakuum eingedampft und der verbleibende Sirup unter kräftigem Rühren in 10 Vol. Aceton eingegossen. Nach Stehen über Nacht, Zugabe von Tierkohle, Filtration wird die klare Lösung im Vakuum möglichst weitgehend eingedampft.

Der dicke Sirup kristallisiert bei der Entfernung der Lösungsmittelreste im Vakuumexsiccator, besonders schnell nach Animpfen. Der Kristallbrei wird mit kaltem Aceton verrieben, abgesaugt und mit kaltem Methanol gewaschen.

Nach entsprechender Aufarbeitung der Mutterlauge beträgt die Ausbeute 80% der nach dem Reduktionsvermögen bestimmten Menge Dioxyaceton (etwa 75% d. Th.).

Eine weitere Reinigung kann durch Kristallisation aus Aceton erfolgen.

G. Die Oxydation von Aldehyden zu Säuren.

Die Oxydation der Aldehydgruppe ist in den Reaktionsfolgen des Abbaues der Hauptnährstoffe einbezogen; es ist daherverständlich, daß sie schon bei zahlreichen Organismen nachgewiesen und mit vielen Aldehyden durchgeführt worden ist. Auch Enzympräparate verschiedenster Herkunft (aus Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und tierischen Organen) sind zu ihrer Katalyse verwandt und untersucht worden. Zahlreich sind z. B. die Untersuchungen über das aldehyd-oxydierende, sog. Schardingersche Ferment aus frischer Milch. Ohne die fermentchemischen Fragen näher behandeln zu wollen, sei darauf hingewiesen, daß bei einigen dieser Dehydrasen die prothetische Gruppe bekannt ist. Die Dehydrasen aus Hefe

²¹⁾ C. Neuberg u. E. Simon, Biochem. Z. **190**, 226 [1927].

²²⁾ Literatur bei K. Fromherz, I. c. 1).

²³⁾ Vgl. dazu den Aufsatz von Berlin, Reduktion nach Meerwein-Ponndorf und Oxydation nach Oppenauer, diese Zeitschr. **58**, 266 [1940].

²⁴⁾ Literatur bei K. Bernhauer, I. c. 7), S. 214ff., u. K. Bernhauer, Biochemie der Essigsäurerkterien, Ergeb. Enzymforsch. **7**, 246 [1938].

²⁵⁾ C. Neuberg u. F. F. Nord, Biochem. Z. **96**, 158 [1919].

²⁶⁾ E. Haworth, I. M. Heilborn, W. T. Jones, A. L. Morrison u. J. B. Polya, J. chem. Soc. London **1939**, 128. ²⁷⁾ Hermann u. Neuschul, Biochem. Z. **233**, 129 [1931].

²⁸⁾ Reichstein, Helv. chim. Acta **17**, 996 [1934].

²⁹⁾ J. Boeseken u. J. L. Leefers, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **54**, 861 [1935]; E. I. Fulmer, J. W. Dunlap, J. F. Guyuron u. L. A. Underkofler, J. Amer. chem. Soc. **58**, 1012 [1936], S. a. K. Bernhauer, I. o. 7), S. 227.

³⁰⁾ K. Bernhauer u. Görlich, Biochem. Z. **280**, 367 [1935].

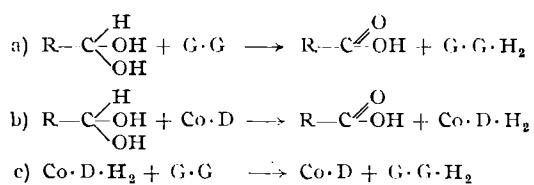
³¹⁾ Herrick, Hellbach u. May, Ind. Engng. Chem. **27**, 681 [1935]; Wells, Stubbs, Lockwood u. Rue, ebenda **29**, 1385 [1937].

³²⁾ Underkofler u. Fulmer, J. Amer. chem. Soc. **59**, 301 [1937]; vgl. auch K. Bernhauer, I. c. 7), S. 228.

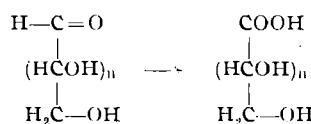
und aus tierischem Gewebe, welche Triose-phosphat in Phosphoglycerinsäure überführen, benötigen Co-Dehydrase I; die Glucose-Dehydrase aus Leber kann sowohl Co-Dehydrase I als auch II brauchen; die Hexose-monophosphat-Dehydrase aus Hefe oder roten Blutzellen enthält Co-Dehydrase II als dissoziierende Gruppe³³⁾.

In neuester Zeit ist bei zwei dieser Aldehyd-Dehydrasen der Nachweis gelungen, daß es sich um „gelbe Fermente“ handelt, also um Fermente mit Riboflavinderivaten als prosthetische Gruppe, die offenbar keine leicht abdissoziierende Co-Dehydrase benötigen. Gereinigte Präparate der sog. Glucose-Oxydase aus den Schimmelpilzen Aspergillus niger und Penicillium glaucum enthalten eine gelbe Gruppe, und zwar in desto höherer Konzentration, je wirksamer sie sind³⁴⁾. Eine Abtrennung und Wiedervereinigung dieser Flavingruppe ist allerdings noch nicht beschrieben worden. Weiterhin wurde die Aldehyd-Dehydrase aus Leber als Flavoproteid mit dem Dinucleotid aus Riboflavin-phosphorsäure und Adenylsäure als prosthetische Gruppe gekennzeichnet³⁵⁾.

Nach diesen Befunden würden also die Aldehyd-Dehydrasen entweder ohne Mitwirkung einer leicht dissoziierenden Co-Dehydrase die Oxydoreduktion zwischen Aldehyd (formuliert als Hydrat) und gelber Gruppe (G.G.) katalysieren nach Reaktion a), oder die Wasserstoffverschiebung zur Co-Dehydrase bewirken nach Reaktion b), die dann zur Gruppe eines Flavoproteids gelit nach Reaktion c):



Für die präparative Durchführung der Reaktion kommt in erster Linie die Anwendung von essigsäurebildenden Bakterien in Frage³⁶⁾. Die eingehendsten Untersuchungen sind über die Umwandlung von Aldosen in Aldonsäuren gemacht worden.



Glucose wird z. B. mit 70—80%iger Ausbeute durch *A. suboxydans* oder *xylinum* in Gluconsäure übergeführt, Galaktose durch substratgewöhntes *A. gluconicum* in d-Galaktonsäure, Mannose in d-Mannonsäure. Auch die Pentosen L-Arabinose und L-Xylose sind schon bakteriell in brauchbarer Weise zu L-Arabonsäure bzw. L-Xylonsäure oxydiert worden.

Bei der Bildung von Gluconsäure aus Glucose werden jedoch die Essigbildner in ihrer Leistung durch Schimmelpilze übertroffen. Die meisten säurebildenden Aspergillaceen und viele sonstige Mycelpilze verändern Glucose in dieser Art; manche tun es mit guter Ausbeute nur in abgepuffertem Medium (durch Calciumcarbonat wird die entstehende Säure gebunden), andere auch in saurer Lösung.

Die wirksamsten technischen Verfahren arbeiten mit submersem Mycel und sorgen für intensive Belüftung und Rührung in einer rotierenden Gärtröpfel (in gleicher Weise, wie bei Darstellung von Sorbose erwähnt wurde). Durch Anwendung von *Aspergillus-niger*-Kulturen, die in besonderer Weise bis zur Keimung der Sporen aufgezogen waren, ließen sich so z. B. 91 kg Glucose in 530 l Flüssigkeit in weniger als 24 h zu Gluconsäure oxydieren. Die Ausbeute betrug 95% des ursprünglich vorhandenen Zuckers, über 97% des vergorenen³⁷⁾. Auch Mannose und Galaktose werden durch Schimmelpilze oxydiert³⁸⁾.

³³⁾ Literatur bei F. G. Fischer, I. c.⁸⁾.

³⁴⁾ W. Franke u. M. Deffner, Liebigs Ann. Chem. **541**, 117 [1939].

³⁵⁾ V. Subrahmanyam, D. E. Green u. A. H. Gordon, Nature, London **144**, 1010 [1939].

³⁶⁾ Literatur bei K. Bernhauer, Ergebn. Enzymforsch. **VII**, 257 [1938] und K. Bernhauer I. c.³⁾, S. 230ff.

³⁷⁾ E. A. Gastrack u. N. Porges, P. A. Wells u. A. I. Moyer, Ind. Engng. Chem. **30**, 782 [1938].

³⁸⁾ Angaben über die Herstellung und Anwendung von Glucose-Oxydase-Präparaten finden sich bei Müller, Ergebn. Enzymforsch. **5**, 270 [1936] und W. Franke u. M. Deffner, Liebigs Ann. Chem. **541**, 117 [1939]; solche ille die Führung von Versuchen mit Essigbakterien und Schimmelpilzen zur Darstellung von Gluconsäure bei K. Bernhauer, I. c.³⁾, S. 230ff. u. S. 237ff.

D. Die Hydrierung von Äthylenverbindungen.

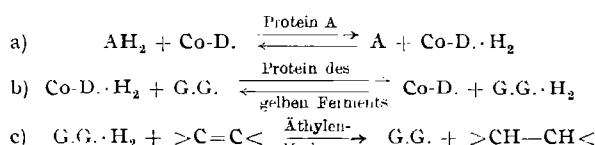
1. Allgemeines.

Die zymochemische Hydrierung von Äthylenverbindungen als allgemeinere Reaktion ist bei der Einwirkung von gärenden Hefe auf ungesättigte α -Ketosäuren aufgefunden worden: Außer der zu erwartenden Decarboxylierung und Reduktion des entstehenden Aldehyds zum Olefinkohol tritt auch die Bildung des entsprechenden gesättigten Alkohols ein³⁹⁾. Diese Beobachtung einer biochemischen Wasserstoffanlagerung an die C=C-Doppelbindung hat sich alsbald auch auf ungesättigte Aldehyde, Ketone und primäre Alkohole erweitern und mit Fermentlösungen durchführen lassen. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß auch Bakterien zu derartigen Hydrierungen fähig sind und daß auch im tierischen Organismus die Absättigung bestimmter Äthylenkörper stattfindet.

Voraussetzung für die biochemische Hydrierung einer Äthylenverbindung ist in der Mehrzahl aller bisher untersuchten Fälle ihre α , β -ständige Lage zu einem Carbonyl oder primären Hydroxyl. Olefinkohole und -ketone, deren Äthylenbindung nicht zur charakteristischen Gruppe konjugiert gelagert ist, werden durch gärende Hefe jedenfalls nicht angegriffen. Ebensowenig olefinische Säuren und sekundäre Alkohole, auch wenn sie α , β -ungesättigt sind. Die Verhältnisse im tierischen Organismus und bei bakteriellen Hydrierungen sind noch zu wenig untersucht, um Verallgemeinerungen zu erlauben. Einzelne Beispiele sind in den folgenden Abschnitten erwähnt.

Auch die enzymatischen Teilvergänge, die sich bei einer Äthylenhydrierung abspielen, haben bisher nur am Beispiel der Hefefermente eine Bearbeitung erfahren⁴⁰⁾. Ihre vorwiegende Koppelung mit den Oxydoreduktionen des Kohlenhydratabbaus ergibt sich schon aus der Beobachtung, daß in zuckerfreiem Hefesuspensionen nur eine sehr langsame Absättigung zugegebener Olefinkohole eintritt, die fast ganz ausbleibt, wenn die Hefe vorher durch längeres Lüften arm an Reservekohlenhydraten gemacht wird. Auch die Abhängigkeit des Hydrierungsvorganges von der Acidität der Gärflüssung weist auf den Zusammenhang mit dem Kohlenhydratabbau hin: In gärenden Lösungen mit frischer Bierhefe nimmt die Geschwindigkeit der Hydrierung von Zintalkohol, z. B. im geprüften pH-Bereich von 4—8,5, mit steigender Alkalität stetig zu. Bekanntlich treten mit steigendem pH auch die disproportionierenden Vorgänge des Kohlenhydratabbaus mehr hervor, so daß bei einem pH von 8,5 z. B. die normale Bildung von Äthylalkohol zurückgedrängt ist und aus der Triose zum großen Teil Glycerin entsteht, aus dem Acetaldehyd neben dem Alkohol Essigsäure. In alkalischen Medien ist das Gleichgewicht der Oxydoreduktion zwischen Triose oder Alkohol einerseits und Co-Zymase andererseits stark zugunsten des Co-Ferments verschoben⁴¹⁾, so daß gewissermaßen mehr „Gärungswasserstoff“ über die Dihydro-Co-Zymase für andere Reaktionen zur Verfügung steht.

Aus Versuchen mit gereinigten Fermentpräparaten aus Hefe⁴²⁾ ergibt sich, daß außer einem Co-Dehydrase reduzierendem System (nach Gleichung a), auch die Anwesenheit von einem „gelben Ferment“ erforderlich ist (nach b), damit die Absättigung des Olefins (nach c) eintritt:



Von der Dihydro-Co-Dehydrase muß also zunächst eine Oxydoreduktion mit einer gelben Gruppe (G.G.) eintreten, bevor der Wasserstoff sich an die Äthylenbindung anlagert. Die große Unbeständigkeit der „Äthylenhydrase“ hat bisher ihre Reindarstellung verhindert; eine Abtrennung der Proteinkomponente und die nähere Kennzeichnung der gelben prosthetischen Gruppe ist noch nicht gelungen. Es ist daher noch

³⁹⁾ F. G. Fischer u. O. Wiedemann, Liebigs Ann. Chem. **513**, 260 [1934].

⁴⁰⁾ F. G. Fischer u. H. Eysenbach, ebenda **529**, 87 [1937]. Dieselben: Unveröffentlichte Versuche; vgl. H. Eysenbach: Enzymatische Hydrierungen ungesättigter Verbindungen, Diss. Freiburg i. Br., 1937.

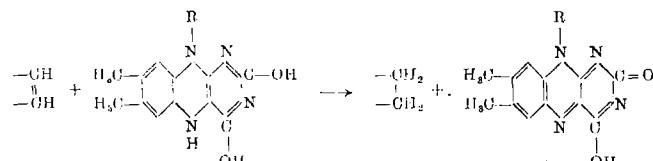
⁴¹⁾ V. Eysenbach, Adler u. Hellström, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **241**, 289 [1934].

⁴²⁾ F. G. Fischer u. H. Eysenbach, Liebigs Ann. Chem. **529**, 87 [1937].

unterschieden, ob Reaktion b vom gleichen Protein katalysiert wird wie Reaktion c, oder ob die Oxydoreduktion zwischen Co-Dehydrase und Alloxazinderivat von einer anderen Eiweißkomponente bewirkt wird als die zwischen Alloxazin und Äthylenbindung.

Auch die Fragen nach dem genauen Spezifitätsbereich der Äthylenhydrasen sind naturgemäß noch unbeantwortet. Nur bei einer besonderen Äthylenhydrase, der Fumarathydrase⁴³⁾, die zur irreversiblen Hydrierung von Fumarsäure fähig ist, ist die Abtrennung und Wiedervereinigung der gelben Gruppe vom Fermenteiweiß und ihre Kennzeichnung als Alloxazin-Adenin-Dinucleotid gelungen⁴⁴⁾.

Danach sättigt sich also die Äthylenbindungsgruppe durch Oxydoreduktion mit dem Iso-alloxazin-Kern von Leuko-Flavinproteiden ab:

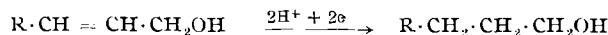


Die Methodik der Durchführung von zymochemischen Hydrierungen der Äthylenbindungen ist grundsätzlich dieselbe wie bei Reduktionen der Carbonylgruppe: Der ungesättigte Stoff wird, gelöst oder in feiner Verteilung, mit einer Aufschlämmung der gärenden Mikroorganismen in zuckerhaltiger Lösung gerührt. Eine intensive Bewegung des Gärgetes kürzt die Reaktionszeiten stark ab.

2. Hydrierungen mit Hefe.

a) Primäre Alkohole⁴⁵⁾.

Am schnellsten verläuft die Hydrierung α, β -ungesättigter primärer Alkohole bei den niederen, noch hinreichend wasserlöslichen Vertretern; Crotylalkohol (Ia) wird in 1%iger Lösung in einem lebhaft gärenden Ansatz (mit etwa 3% Trockengewicht Bierhefe) schon im Laufe eines Tages zur Hälfte zu Butylalkohol (Ib) hydriert:



Bei einer Gärzeit von 2–3 Tagen wird die Hydrierung vollständiger, die Ausbeute an gesättigtem Alkohol aber kleiner, vermutlich infolge einer Assimilation durch die Hefe. Nahezu ebenso schnell wird auch Zimtalkohol (IIa) in Hydrozimtalkohol (IIb) verwandelt, während die Hydrierung von Tiglinalkohol (IIIa) zu linksdrehendem iso-Amylalkohol (IIIb) etwa doppelt so lange dauert. Eine Verzweigung an der Äthylenbindung verlangsamt also ihre Absättigung. Das zeigt sich auch beim Geraniol (IVa), welches in ein rechtsdrehendes Citronellol (IVb) verwandelt wird; weiter geht die Hydrierung auch bei sehr langen Gärzeiten nicht. In Übereinstimmung damit wird weder Citronellol (IVb) noch das leicht wasserlösliche, die Gärung nicht merklich hemmende Allylcarbinol (VII) durch Hefe verändert. Eine zum Hydroxyl nicht konjugierte Äthylenbindung wird also durch Hefe nicht hydriert: Es besteht daher die Möglichkeit, durch Hefegärung eine der Alkoholgruppe benachbarte Doppelbindung abzusättigen und dabei eine isolierte unberührt zu lassen.

Auch bei den zwei- bzw. dreifach konjugiert ungesättigten Alkoholen Sorbinalkohol (Va) und Octatrienol (VIa) hält die zymochemische Hydrierung nach Absättigung nur einer Doppelbindung an. Aus dem oxydativen Abbau der mit 50–70% Ausbeute gebildeten wasserstoffreicher Stoffe geht hervor, daß sie ausschließlich aus Hexen-(4)-ol-(1) (Vb) bzw. Octadien-(4,6)-ol-(1) (VIb) bestehen⁴⁶⁾.

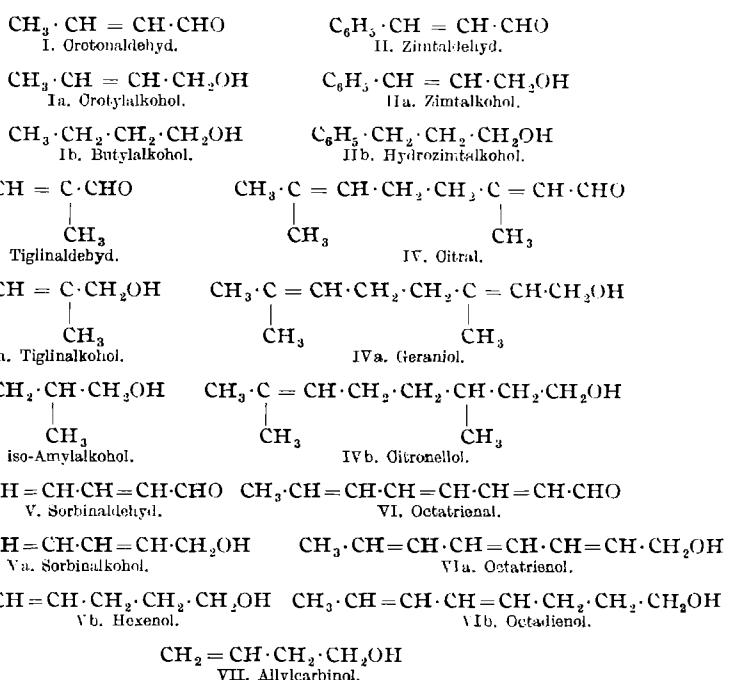
Die konjugierten Systeme werden also nur in α, β -Stellung hydriert, ohne daß daneben auch eine endständige Hydrierung erfolgen würde. Diese Spezifität der zymochemischen Hydrierung wird von keiner nichtenzymatischen Methode erreicht.

⁴³⁾ F. G. Fischer u. H. Eysenbach, Liebigs Ann. Chem. **530**, 99 [1937].

⁴⁴⁾ F. G. Fischer, A. Roedig u. K. Rauch, Naturwiss. **27**, 107 [1939].

⁴⁵⁾ F. G. Fischer u. O. Wiedemann, Liebigs Ann. Chem. **513**, 200 [1934].

⁴⁶⁾ Dieselben, ebenda **522**, 1 [1936].



b) Aldehyde⁴⁷⁾.

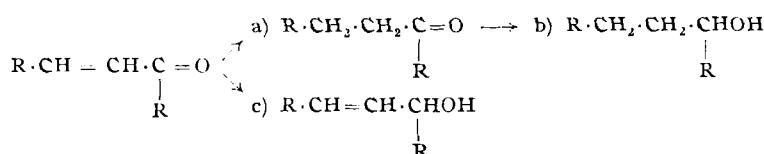
Die Wasserstoffanlagerung an die Carbonylgruppe α, β -ungesättigter Aldehyde erfolgt unabhängig von jener an ihre Äthylenbindung. Da aber die Carbonylreduktion, zumindest bei Verwendung lebender, gärender Hefe, schneller vor sich geht, ist anzunehmen, daß die Olefinaldehyde in der Hauptmenge erst nach Umwandlung in die Alkohole eine Hydrierung der Äthylenbindung erfahren:



Die Endprodukte der Hefeeinwirkung sind jedenfalls dieselben wie bei den entsprechenden ungesättigten Alkoholen. Crotonaldehyd (I), Tiglinaldehyd (III), Citral (IV), Zimtaldehyd (II), Sorbinaldehyd (V) und Octatrienal (VI) geben die um 4 Wasserstoffatome reicheren Alkohole (Ia) bis (VIa). Auch bei den Polyenaldehyden tritt, wie bei den Polyenalkoholen, ausschließlich α, β -Hydrierung ein⁴⁸⁾. Neben den oben formulierten Reaktionsfolgen müssen aber, besonders bei den niederen aliphatischen Gliedern, in stärkerem Maße als bei den Alkoholen auch andere Reaktionen stattfinden, die vermutlich zur Assimilation durch die Hefezelle führen. Die Ausbeute an gesättigten Alkoholen ist jedenfalls meistens geringer (20–60%), als wenn von den Olefinalkoholen ausgegangen wird. Eine Cannizzarosche Disproportionierung ist nicht zu beobachten, jedenfalls nicht in größerem Umfange.

c) Ketone⁴⁹⁾.

Auch bei den α, β -ungesättigten Ketonen gehen die Hydrierung des Carbonyls und die der Äthylenbindung als offenbar unabhängige Reaktionen nebeneinander vor sich. Doch sind die Geschwindigkeiten beider Wasserstoffanlagerungen durchweg viel kleiner als bei den Olefinaldehyden, und das Verhältnis dieser Geschwindigkeiten ist stark zu ungünstigen der Carbonylreduktion verschoben.



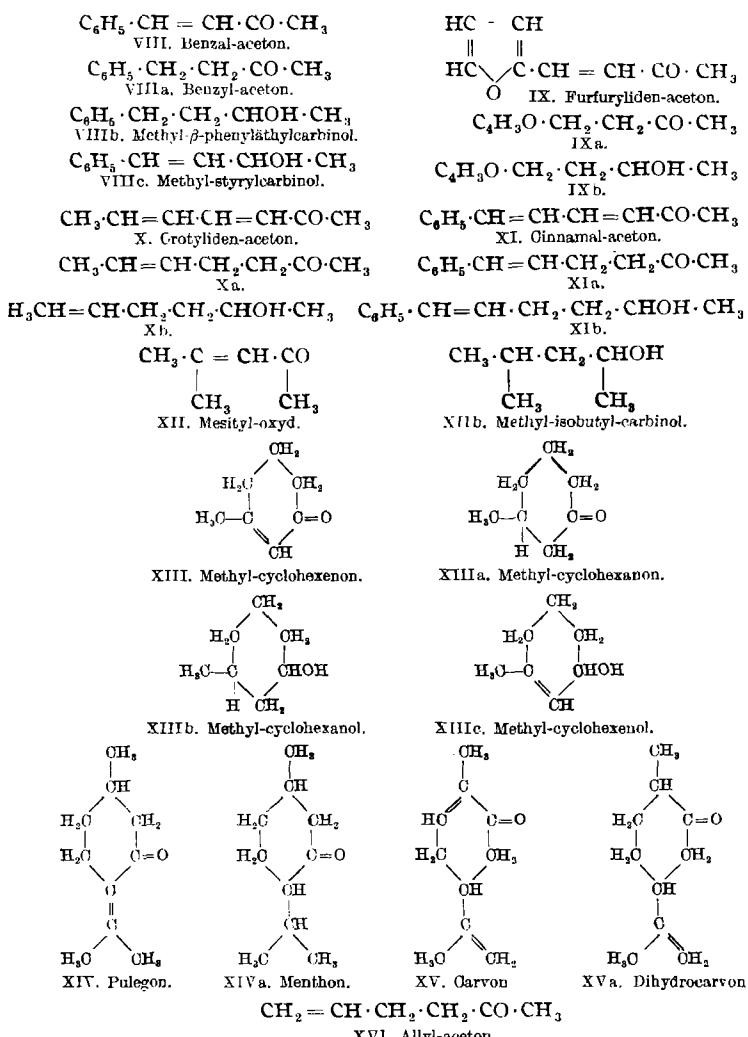
Es entstehen daher in der Hauptmenge zunächst die entsprechenden gesättigten Ketone (a); als zweite Reaktion setzt dann die Reduktion des Carbonyls ein, die in den lang dauernden Versuchen zu größeren Mengen des gesättigten Alkohols führt (b).

⁴⁷⁾ F. G. Fischer u. O. Wiedemann, Liebigs Ann. Chem. **513**, 260 [1934].

⁴⁸⁾ Dieselben, ebenda **522**, 1 [1936].

⁴⁹⁾ Dieselben, ebenda **520**, 52 [1935].

Am schnellsten noch erfolgt die Äthylenabsättigung bei Ketonen, deren Doppelbindung, konjugiert zum Carbonyl, zwischen sekundären Kohlenstoffen liegt. Benzal-aceton (VIII) läßt sich in 5- bis 10tägigen Gärversuchen nahezu vollständig hydrieren, wesentlich schneller das wasserlöslichere Furfurylidien-aceton (IX) und auch höher ungesättigte Furanderivate, wie Furfurylidien-crotylidien-aceton. Vergleichsweise recht rasch (4—6 Tage Gärdaue) lagert das zweifach ungesättigte Crotylidienaceton (X) zwei Wasserstoffatome an, und zwar ausschließlich in α , β -Stellung, ebenso, wenn auch schlechter, infolge seiner Wasserunlöslichkeit, Cinnamal-aceton (XI). Bedeutend langsamer und daher bei den üblichen Gärzeiten von höchstens 1 Woche nur zu einem geringen Bruchteil lassen sich Ketone absättigen, in denen die Äthylenbindung einerseits von einem tertiären Kohlenstoff ausgeht. Hierbei scheint es gleichgültig zu sein, ob sie in einer aliphatischen Kette oder in einem hydroaromatischen Ring liegt. Sowohl Mesityloxyd (XII) als auch Methyl-cyclohexenon (XIII), Pulegon (XIV) und Carvon (XV) werden nach 7tägigen Gärungen nur zu wenigen Prozenten hydriert. Die hemmende Wirkung der Verzweigung ist ja auch bei Olefin-aldehyden zu beobachten, wenn auch nicht so stark.



Völlig unberührt bleibt auch bei den Ketonen die Äthylenbindung, wenn sie isoliert liegt: Allyl-aceton (XVI) ist auch nach langer Gärung nur am Carbonyl reduziert und nach wie vor ungesättigt; bei Crotylidien-aceton (X) und Cinnamal-aceton (XI) steht, wie erwähnt, die Wasserstoffanlagerung nach Sättigung der α, β -Bindung still^{60).}

Das Verhältnis der Geschwindigkeiten der C=O- und C=C-Hydrierungen ist, wie eingangs erwähnt, bei Olefin-Ketonen ganz anders als bei Olefinaldehyden. Nach einwöchigen Gärungen bestanden die Reaktionsprodukte aus den Ketonen (VIII) bis (XV), aus 80—95% des entsprechenden wasserstoffreicherem Ketons (VIIIa) bis (XVa) und nur aus 20—25% des wasserstoffreicherem Alkohols (VIIIb) bis (XVb).

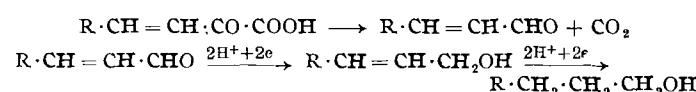
Die Bildung des sekundären Olefinkohols (c) findet bei den meisten Stoffen nicht nachweisbar statt. Nur im Versuch mit Benzal-aceton (VIII) enthält die Alkoholfaktion (im ganzen nur 5% der Reaktionsprodukte) neben zwei Dritteln des gesättigten Alkohols (VIIIb) ein Drittel des Olefin-alkohols (VIIIc). Ausnahmsweise und in geringem Umfang kann also neben der überwiegenden Addition an die Doppelbindung (a) auch eine Addition an das Carbonyl allein stattfinden (c).

Doch geht diese Reduktion des Carbonyls α , β -ungesättigter Ketone viel schwieriger vor sich als die des Carbonyls vom entsprechenden gesättigten Keton. Die Konjugation mit einer Äthylenbindung setzt also die Geschwindigkeit der Reduktion einer Carbonylgruppe durch Hefe stark herab. Daher werden α , β -ungesättigte Ketone, deren Äthylenbindung der zymo-chemischen Hydrierung schwer zugänglich ist, wie Pulegon oder Carvon, auch an der C=O-Gruppe nicht verändert. Weitere Beispiele bietet die Gruppe steroider Hormone (siehe dort). Eine isolierte Doppelbindung hemmt hingegen die Carbonylreduktion nicht.

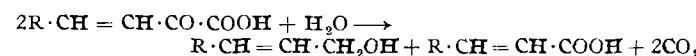
Die gesättigten sekundären Alkohole (b) entstehen nur aus den hydrierten Ketonen (a), wie im obigen Formelbild angegeben. Die weitere, möglich erscheinende Bildung aus den sekundären Olefinkoholen (c) findet nicht statt, da solche in den bisher geprüften Beispielen von gärender Hefe nicht hydriert zu werden vermögen.

d) Ketosäuren⁵¹⁾.

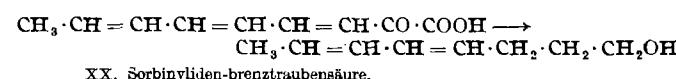
α, β -ungesättigte Ketosäuren werden unter der Einwirkung gärender Hefe hauptsächlich in folgender Weise umgesetzt:



Es findet also zunächst die von der Brenztraubensäure und einigen anderen gesättigten α -Ketosäuren her bekannte, fermentative Decarboxylierung statt; der so entstandene ungesättigte Aldehyd wird in der für Aldehyde nachgewiesenen Weise über den Olefinkohol in den wasserstoffreicherem Alkohol übergeführt. Die Bildung des Olefinaldehyds lässt sich zwar nicht direkt nachweisen, da Trockenhefe ungesättigte Ketosäuren nicht zu decarboxylieren vermag, lebende gärende Hefe aber gleich zum Olefinkohol reduziert. Bei Verwendung von „verarmter“ lebender Hefe tritt außer der Kohlendioxyd-abspaltung eine Disproportionierung ein, so daß äquimolare Mengen von Olefinkohol und -säure entstehen.



Durch Einwirkung stark gärender Hefe entsteht aus Benzyliden-brenztraubensäure (XIX) mit 75% Ausbeute reiner Hydrozimtalkohol, aus Sorbinaliden-brenztraubensäure (XX) mit 60% Ertrag dasselbe Octadien-(4,6)-ol-(1), wie aus Octatrienal und Octatrienol⁵².



Die präparativen Möglichkeiten der Äthylenhydrierung durch gärende Hefe lassen sich aus den dargelegten Beispielen erkennen. In einzelnen Fällen wird die zymochemische Hydrierung eines Olefinkohols oder -ketons geeignet erscheinen, um andere empfindliche Stellen eines Moleküls unangetastet zu lassen. Furfurylidien-aceton (IX) z. B., welches durch Hefewirkung, wie erwähnt, nur an der Äthylenbindung und dann weiter am Carbonyl Wasserstoff anlagert, erleidet bei katalytischen Hydrierungen auch eine Aufspaltung des Furanringes.

Am meisten willkommen wird jedoch die Gärungshydrierung sein, entweder wenn die Bildung optisch aktiver Hydrierungsprodukte durch Absättigung einer Äthylenbindung an einem sekundären C-Atom mit ungleichen Resten erwünscht ist (Beispiel: Geraniol zu (+)-Citronellol), oder wenn die spezifische α , β -Hydrierung mehrfach ungesättigter Alkohole

⁵⁰) E. G. Fischer u. C. Wiedemann, Liebigs Ann. Chem. 529, 1 [1936].

⁵¹) F. O. Fischer u. O. Wiedemann, Liebigs Ann. Chem. **513**, 260 [1934].
⁵²) Dieselben, ebenda **520**, 1 [1936].

⁵²) Dieselben, ebenda 522, 1 [1936].

und Ketone durchgeführt werden soll (Beispiel: Octatrienol zu Octadien-(4,6)-ol-(1)). Denn in beiden Fällen leistet die zymochemische Hydrierung etwas, was sich durch keine andere nichtenzymatische Methode erreichen läßt.

Hydrierung von Sorbinaldehyd zu Hexen-(4)-ol-(1)⁵³⁾. 25 g Sorbinaldehyd mit 70 g Zucker in 2,5 l Wasser gelöst, werden im Laufe von 3 h in den Gäransatz aus 1,5 l Hefebrei getropft.

Nach 20 h werden weitere 0,5 l Hefe zugegeben und bis zur Unterbrechung des Versuchs nach 4 Tagen im ganzen noch 300 g Zucker.

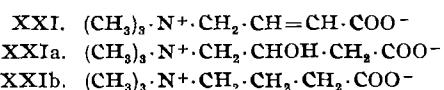
Die nach der Aufarbeitung durch Destillation mit Wasserdampf erhaltenen 12 g Rohprodukt bestehen ausschließlich aus Hexen-(4)-ol-(1), (Sdp. 156—158°).

In einigen anderen, kürzer dauernden Versuchen waren noch 10—20% Sorbinalkohol darin enthalten, die sich durch sorgfältige Fraktionierung mit Hilfe einer Widmer-Kolonne abtrennen ließen (Sdp. 160—163°).

Octadien-(4,6)-ol-(1) aus Sorbinylidene-brenztraubensäure⁵²⁾. 1,3 l einer zuckerhaltigen Lösung des Natriumsalzes (aus 8,5 g der Ketosäure) wurden langsam zu 1,5 l gärender Hefe gegeben. Es war erforderlich, nach 4, 22 und 30 h noch 3mal Hefe (je 1 l) und im ganzen 600 g Zucker zuzugeben, um 46 h lang eine starke Gärung zu unterhalten. Es wurden 3,8 g (gleich 60% d. Th.) eines ölgigen Destillates erhalten (Sdp. 101—102°, 14 mm), das aus reinem Octadien-(4,6)-ol-(1) bestand.

3. Hydrierungen mit Bakterien und im Tierkörper.

Die Absättigung von Äthylenbindungen durch bakterielle Gärungen hat noch keine systematische Untersuchung erfahren, und zwar weder in bezug auf die geeigneten Bakteriengruppen noch auf ihre Spezifitätsregelmäßigkeiten. Aus verschiedenen Beispielen geht aber hervor, daß durch Bakterienwirkung auch Doppelbindungen erfaßt werden, die der Hydrierung durch Hefe nicht zugänglich sind. Wohl die erste Feststellung einer solchen Absättigung überhaupt liegt in der Beobachtung von Linneweh vor, daß Crotonbetain (XXI), gleich Carnitin (XXIa), durch Saprophyten in γ -Butyrobetain (XXIb) übergeht⁵⁴⁾.



Crotylalkohol wird durch gärende Colibakterien zu Butylalkohol hydriert⁵⁵⁾; da die Absättigung am schnellsten bei pH 7—8 verläuft, ist es erforderlich, die bei Coli-Gärungen entstehenden Säuren abzupuffern.

Auch bei Olefinsäuren, wie Ölsäure und Sorbinsäure, ist die Hydrierung durch verschiedene Bakterien (B. coli, B. subtilis, B. fluorescens u. a. m.) beobachtet worden, ohne daß jedoch bisher die Reaktionsprodukte gekennzeichnet worden wären⁵⁶⁾. Mehrere, auch präparativ interessierende Beispiele der Hydrierung ungesättigter Steroide durch ein Bacillus der Art putrificus sind im nächsten Abschnitt erwähnt.

Die Intensität und Mannigfaltigkeit des bakteriellen Stoffwechsels lassen weitere Untersuchungen über zymochemische Hydrierungen mit Bakterien aussichtsreich erscheinen.

Auch im tierischen Stoffwechsel ist in neuerer Zeit die Hydrierung von Olefinen direkt nachgewiesen worden⁵⁷⁾. Der oxydative Abbau ist jedoch in den meisten Fällen derart vorherrschend, daß eine präparative Anwendung dieser Beobachtungen schon aus diesem Grunde sich verbietet. Nur einige Stoffe können zu 10—30% hydriert aus dem Harn der Versuchstiere gewonnen werden. So z. B. Geraniol, das allerdings gleichzeitig zu einer Dicarbonsäure oxydiert wird⁵⁸⁾ (s. Abschnitt F) und aliphatisch-aromatische Olefinketone⁵⁹⁾, die außerdem zum Teil eine Reduktion am Carbonyl erleiden. Bei entsprechend gebauten Stoffen zeigte es sich, daß auch im Tierkörper der Wasserstoff asymmetrisch an die Äthylenbindung angelagert wird unter Bildung optisch aktiver Produkte.

⁵³⁾ F. G. Fischer u. O. Wiedemann, Liebigs Ann. Chem. 513, 260 [1934].

⁵⁴⁾ Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 181, 54 [1929].

⁵⁵⁾ F. G. Fischer, W. Robertson, Liebigs Ann. Chem. 529, 84 [1937].

⁵⁶⁾ J. Schönbrunner, Biochem. Z. 304, 26 [1940].

⁵⁷⁾ Literatur bei F. G. Fischer: Biochemische Hydrierungen in „Fortschritte d. Chemie organischer Naturstoffe“, 111, 45, Wien 1939.

⁵⁸⁾ R. Kuhn, F. u. L. Koehler, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 242, 171 [1936].

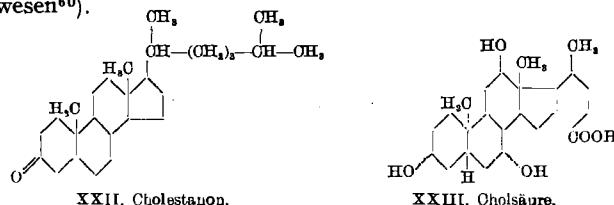
⁵⁹⁾ F. O. Fischer u. H. J. Bieltz, ebenso im Druck.

E. Hydrierungen und Dehydrierungen bei Steroiden.

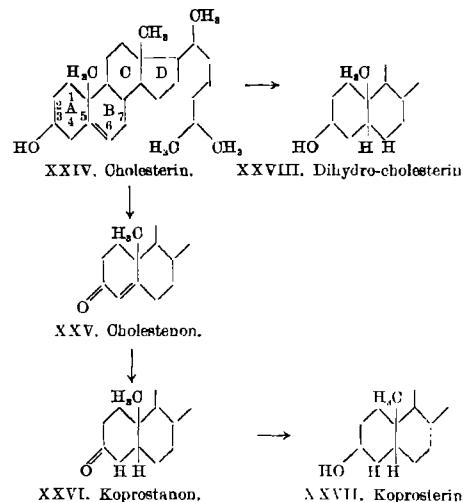
Die verschiedenen Gruppen natürlich vorkommender steroider Stoffe umfassen viele Vertreter, die sich nur durch ihre Oxydationsstufe unterscheiden und daher durch einfache Oxydoreduktion von Carbonyl-Hydroxyl-Gruppen oder Hydrierungen von Äthylenbindungen ineinander überführen lassen.

1. Sterine und Gallensäuren.

Die Dehydrierung der Oxygruppe von Sterinen ist bisher zymochemisch nicht durchgeführt worden; die umgekehrte Reaktion, die Hydrierung einer Oxogruppe, ist beim Cholestanon (XXII) mit Hefe und Bakterien nicht zu erreichen gewesen⁶⁰⁾.



Ebensowenig ist bisher eine biochemische Umwandlung ungesättigter Sterine in gesättigte in vitro verwirklicht worden. Zwar ist mit Sicherheit bekannt, daß die Umwandlung von Cholesterin (XXIV) in Koprosterin (XXVII), die gewöhnliche Form der Ausscheidung des Cholesterins im Kot des Menschen und der Carnivoren, durch Darmbakterien bewirkt wird; doch gelang diese Hydrierung mit Bakterienkulturen aus Kot nicht⁶¹⁾. Nachdem der Weg dieser Umwandlung, der vom Cholesterin über Cholestenon (XXV) und Koprostanon (XXVI) zum Koprosterin führt, also vor der Hydrierung eine Dehydrierung der Oxygruppe einbegreift, nun mit Hilfe deuteriumhaltiger Stoffe sicher nachgewiesen wurde⁶²⁾, ist aber zu erwarten, daß sich auch eine Durchführung der Reaktionsfolge mit Bakterien finden läßt. Die katalytische Hydrierung von Cholesterin führt bekanntlich ausschließlich zur Bildung des Dihydrocholesterins (XXVIII), in dem, im Gegensatz zum Koprosterin, die Ringe A und B trans-ständig verknüpft sind.



Auch bei Gallensäuren ist bisher die biochemische Absättigung einer Äthylenbindung nicht beschrieben worden. Hingegen ist durch zahlreiche Untersuchungen aus dem Physiologisch-chemischen Institut in Okayama die Reduktion von Carbonylgruppen in verschiedenen Keto-cholansäuren bekanntgeworden⁶³⁾. Sie interessieren im Zusammenhang mit der Frage nach der hypothetischen Umwandlung von Sterinen in Gallensäuren und der Epimerisierung des C(3)-Hydroxyls, die dabei stattfinden müßte (s. die Formel der Cholsäure, XXIII). Für präparative Zwecke kommen diese Reduktionen, die in der Mehrzahl mit Kröten als Versuchstier, zum Teil aber auch mit Kaninchen, mit Hefe, B. coli und B. proteus durchgeführt wurden, kaum in Frage.

⁵⁸⁾ L. Mammoli u. A. Vercellone, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 470 [1937].

⁵⁹⁾ R. Schoenheimer, H. v. Behring, R. Hammel u. L. Schindel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 192, 78 [1930].

⁶⁰⁾ M. Anchel u. R. Schoenheimer, J. biol. Chemistry 125, 23 [1938]; vgl. auch Enders, „Isotope in der biochemischen Forschung“, diese Ztschr. 53, 28 [1940].

⁶¹⁾ Literatur bei F. G. Fischer, I. c.⁵⁷⁾, S. 56; M. Tukamoto, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 260, 210 [1939].

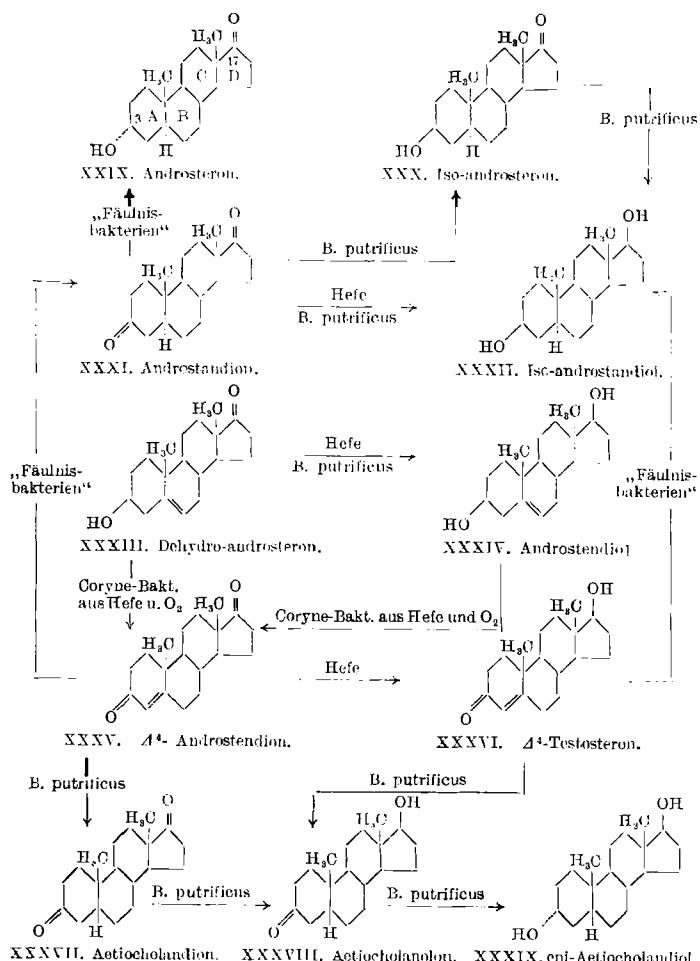
2. Steroide Hormone.

Die präparativen Möglichkeiten der biochemischen Hydrierung und Dehydrierung haben in dieser Stoffgruppe eine besonders eingehende und erfolgreiche Bearbeitung erfahren. Es haben sich sowohl Reduktionen von Carbonylgruppen ketonischer Keimdrüsenhormone als auch Dehydrierungen von Hydroxylen in Oxy-Steroiden durchführen lassen.

a) Reduktionen von Ketosteroiden.

Das Verfahren der zymochemischen Reduktion mit Hefe läßt sich ohne wesentliche technische Abänderung auch auf ketonische Keimdrüsenhormone ausdehnen.

Schon beim ersten daraufhin geprüften Stoff, beim Δ^5 -Dehydroandrosteron (XXXIII) erhielten Mamoli u. Vercellone⁶⁴⁾ den Alkohol (Δ^5 -Androstendiol [XXXIV]) in 20%iger Ausbeute. Die gleiche Behandlung⁶⁵⁾ des ungesättigten Diketons Δ^4 -Androstendion (XXXV) führte lediglich zur Reduktion des C₍₁₇₎-Carbonyls unter Bildung von Δ^4 -Testosteron (XXXVI), dem Testikelhormon von Laqueur. Die Unfähigkeit des C₍₃₎-Carbonyls zur Anlagerung von Wasserstoff ist nicht etwa auf seine Lage im Molekül zurückzuführen, sondern auf seine Konjugation zur Doppelbindung. Denn das gesättigte Diketon Androstendion (XXXI) liefert, unter gleichen Bedingungen der Gärung unterworfen⁶⁶⁾, zu 75 % Iso-androstendiol (XXXII). Δ^5 -Androstendion (XL) gibt bei der zymochemischen Reduktion in der Hauptmenge Iso-androstendiol (XI,I), daneben in kleiner Menge Testosteron (XXXVI)⁶⁷⁾. Die zum C₍₃₎-Carbonyl β - γ -ständige Äthylenbindung verhindert also seine Reduktion nicht; überraschend ist es, daß sie selbst abgesättigt wird. Die Bildung des Testosterons ist so zu verstehen, daß die Doppelbindung sich vor der Enzymwirkung zum Teil nach 4,5 verschiebt und dann auch das Carbonyl sperrt. Auch beim Δ^1 -Androstendion (XLII) zeigt sich die hemmende Wirkung der carbonylkonjugierten Äthylenbindung, so daß nur Δ^1 -Androsten-ol-(17)-on-(3) (XLIII) entsteht⁶⁸⁾.



⁶⁴⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **245**, 93 [1937].

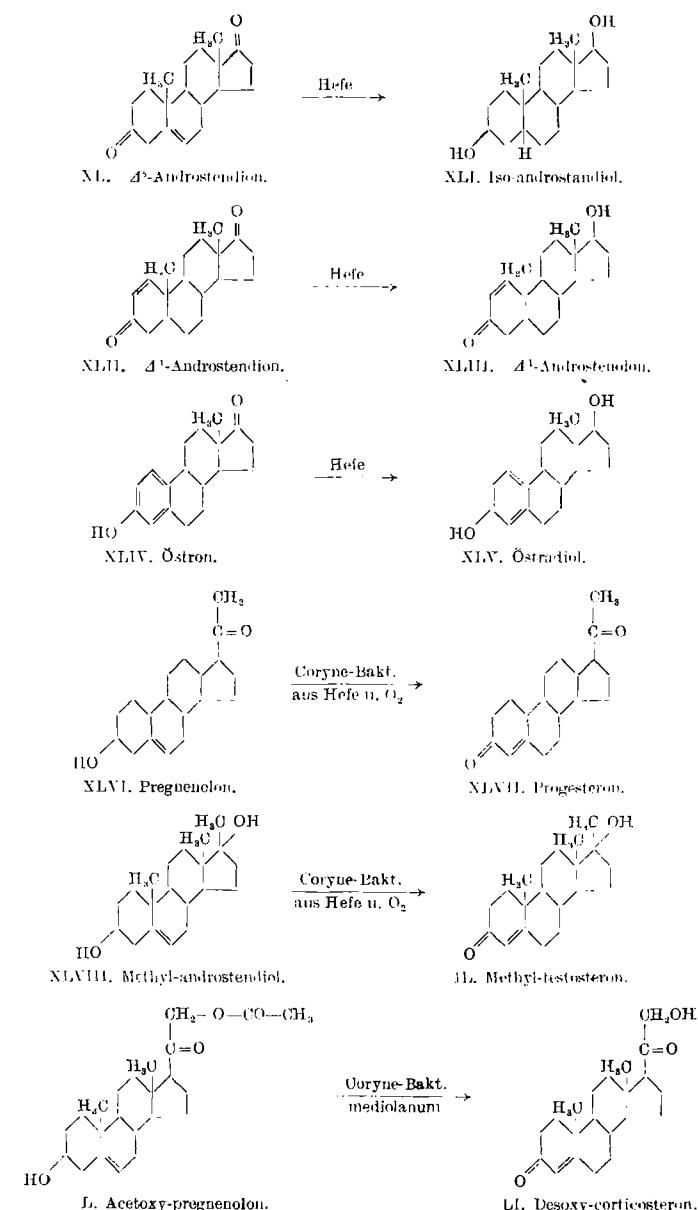
⁶⁵⁾ Mamoli u. Vercellone, Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 470 [1937].

⁶⁶⁾ Vercellone u. Mamoli, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **248**, 277 [1937].

⁶⁷⁾ Mamoli u. Vercellone, Ber. dtsch. chem. Ges. **70**, 2079 [1937].

⁶⁸⁾ A. Butenandt u. H. Dannenberger, ebenda **71**, 1681 [1938].

Es macht sich also bei steroiden Ketonen die gleiche Erscheinung geltend, die auch bei einfacheren, α , β -ungesättigten Ketonen mit der Doppelbindung an einem tertiären Kohlenstoff (Pulegon, Carvon) beobachtet wird: Eine durch Hefeinwirkung nur langsam abzusättigende Äthylenbindung hemmt, zum Carbonyl konjugiert, auch dessen Reduktion.



Auch in der Gruppe der östrogenen Hormone läßt sich die zymochemische Reduktion des C₍₁₇₎-Carbonyls durchführen: Aus Östron (XLIV) entsteht α -Östradiol (XLV), der physiologisch im Allen-Doisy-Test wirksamste Stoff der Östrongruppe. Nach Mamoli⁶⁹⁾ ist es erforderlich, Ester des Östrons mit niederen Fettsäuren der Hefeeinwirkung zu unterwerfen, da das freie Phenol unter den von diesem Autor angewandten Bedingungen nicht befriedigend hydriert wurde. Doch läßt sich, wie Wetstein⁷⁰⁾ zeigen konnte, auch Östron selbst in kurzen Zeiten mit 70% Ausbeute in α -Östradiol überführen. Die Bildung des 17-epimeren β -Östradiols scheint, wenn überhaupt, nur in kleinen Mengen einzutreten.

Reduktion von Östron zu α -Östradiol durch Hefe⁷⁰⁾. „Man ließ ein Gemisch von 200 g reiner Glucose, 100 g frischer Preßhefe und 1,2 l Leitungswasser in verschlossenem Gefäß mit Gasableitungsrohr unter heftigem Rühren bei 37° kurz angären, nachdem die ganze Apparatur und die Reagentien (außer Hefe) sorgfältig bei 105° sterilisiert worden waren. Jetzt wurde eine Lösung von 1 g neuem Östron in 50 cm³ frisch destilliertem Dioxan eingetropft und das Ganze weiter 24 h bei 37° gerührt. Dann gab man erneut 100 g Hefe, 200 g Glucose sowie 300 g Wasser zu und wiederholte die Zugabe nach je 24-stündiger Gärung viermal. Schließlich wurde noch 42 h gerührt.“

⁶⁹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 2646 [1938].

⁷⁰⁾ Helv. chim. Acta **22**, 250 [1939].

Nach dem erschöpfenden Ausäthern des Reaktionsgemisches, Entsäubern, Waschen und Eindampfen des Ätherauszuges wurde der Rückstand nach Girard in Keton- und Nichtketonanteile getrennt. Es wurden so etwa 300 mg Östron zurückhalten und etwa 500 mg reines α -Östradiol gewonnen.

Außer durch Hefe ist die Carbonylreduktion von Ketonsteroiden auch durch Einwirkung von Fäulnisbakterien herbeizuführen.

Bei 20tägiger Einwirkung nicht steriler Auszüge aus Hengsthoden⁷¹⁾ entsteht aus Testosteron (XXXVI) nach Absättigung der Äthylenbindung (s. im übernächsten Abschnitt) zu Ätiocholanolon (XXXVIII) schließlich epi-Ätiocholandiol-(3,17) (XXXIX). Bei einem weiteren Versuch mit absichtlich verfaulten Extrakten aus Stierhoden wurde aus dem Testikelhormon neben epi-Ätiocholandiol auch iso-Androstandiol-(3,17) (XXXII) erhalten⁷²⁾. Die Reduktion von Androstandion (XXXI) mit nicht näher definierten Fäulnisbakterien erzeugt außer kleinen Mengen Diolen ein Gemisch der beiden am C₍₃₎ isomeren Ketoalkohole iso-Androsteron (XXX) und Androsteron (XXIX), verläuft also nach beiden sterisch möglichen Richtungen⁷³⁾.

Eine ausgesprochene stereochemische Spezifität der Reduktion in bezug auf die Konfiguration der Substrate ist indessen festzustellen⁷³⁾ bei Anwendung eines reinen Bakterienstammes (der Art *B. putrificus*). In einer sterilen Hefesuspension als Bakteriennährboden gebracht, lagert Androstendion (XXXV) nach Infektion mit diesem Stamm nicht nur Wasserstoff an der Äthylenbindung an, sondern auch an den Carbonylen unter Bildung von Ätiocholanol-(17)-on-(3) (XXXVIII) und epi-Ätiocholandiol-(3,17) (XXXIX). Unter gleichen Bedingungen liefert Androstandion (XXXI) iso-Androsteron (XXX) und iso-Androstandiol (XXXII); aus Testosteron (XXXVI) entsteht Ätiocholanol-(17)-on-(3) (XXXVIII) und epi-Ätiocholandiol-(3,17) (XXXIX), aus Dehydro-androsteron (XXXIII) in guter Ausbeute Androstendiol (XXXIV).

Nachdem also im Androstendion unter cis-Verknüpfung der Ringe A und B zunächst Ätiocholanion entstanden ist, wird in diesem Diketon zunächst das C₍₁₇₎-Carbonyl reduziert, und zwar nur so, daß die neu gebildete Hydroxylgruppe transständig zur Methylgruppe an C₍₁₈₎ gelagert ist; dann folgt die Reduktion des C₍₃₎-Carbonyls in der Weise, daß das entstehende Hydroxyl in trans-Stellung zur angulären CH₃-Gruppe am C₍₁₀₎ zu stehen kommt.

Beim Androstandion, in dem eine trans-Verknüpfung der Ringe A und B vorliegt, verläuft die bakterielle Reduktion anders: Hier wird zunächst die C₍₃₎-, dann die C₍₁₇₎-Oxogruppe reduziert. Und zwar führt die zunächst eintretende Reduktion, wie aus der Bildung des iso-Androsterons erkennbar, zur cis-Lagerung des C₍₃₎-Hydroxyls, auf die C₍₁₈₎-Methylgruppe bezogen. Die folgende Reduktion des C₍₁₇₎-Carbonyls geht im gleichen sterischen Sinne wie beim Ätiocholandiol vor sich.

Androstendion zu Ätiocholanol-(17)-on-(3) und epi-Ätiocholandiol-(3,17)⁷³⁾. „Eine Suspension von 10 g Bäckerhefe in 60 cm³ Leitungswasser wurde mit 10 cm³ m_{1/2}-sek. Natriumphosphat und 10 cm³ m_{1/2}-prim. Kaliumphosphat gepuffert, mit 200 mg fein pulverisiertem 21-Acetoxy-pregnenol-(3)-on-(20) versetzt und 1 h im Dampftopf sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde mit einigen Tropfen des frisch in Hefewasser gezüchteten Coryne-Bakteriums Mediolanum infiziert. Das Reaktionsgemisch wurde dann bei 36—37° unter Sauerstoff 6 Tage geschüttelt. Danach wurde der Versuch unterbrochen und die Suspension filtriert, der Filterrückstand mit Aceton aufgenommen, durch Filtrieren vom Bakterium befreit und das Aceton abgedampft. Der verbliebene Rückstand wurde vorsichtig aus verd. Aceton umkristallisiert. Es fielen zunächst 54 mg Ausgangsmaterial an; die Mutterlauge wurde getrocknet, der Rückstand in wenig Aceton gelöst und mit Äther versetzt: 48 mg Desoxy-corticosteron vom Schmp. 139—140° (unkorr.) (Mischprobe). Aus den restlichen Mutterlaugen wurden durch Destillation im Hochvakuum weitere 12 mg Desoxy-corticosteron gewonnen.“

Nach dem Waschen, Trocknen und Eindampfen der ätherischen Lösung wurden in dem erhaltenen Rückstand mit Hilfe des Ketonreagens T nach Girard die Keton- und Alkoholbestandteile abgetrennt und so 20 mg epi-Ätiocholandiol und 60 mg Ätiocholanol-(17)-on-(3) gewonnen.

Progesteron zu Pregnandion. In einem gleichartig durchgeföhrten Versuch wurden aus 150 mg fein pulverisiertem Progesteron 130 mg Pregnandion erhalten.

b) Dehydrierungen von Oxysteroiden.

Nachdem Vercellone u. Mamoli⁷⁴⁾ die Dehydrierung von Androstendiol (XXXIV) zu Androstendion (XXXV) beim zweitägigen Schütteln unter Sauerstoff mit „verarmer“ Hefe beobachtet hatten und zunächst die Reaktion auf die

Fermente der Hefe glaubten zurückführen zu können, zeigten Schramm u. Mamoli⁷⁵⁾, daß für diese Wirkung aerobe Bakterien verantwortlich zu machen sind, die aus Mailänder Hefe gewonnen und in Hefewasser gezüchtet werden konnten.

Dehydro-androsteron (XXXIII) läßt sich damit in vorzüglicher Ausbeute in Androstendion (XXXV) verwandeln⁷⁶⁾. Diese Dehydrierung geht so glatt, daß eine Isolierung des Diketons gar nicht erforderlich ist, wenn seine Teilreduktion zu Testosteron (XXXVI) mit gärender Hefe beabsichtigt ist. Die Reaktionsfolge liefert eine Ausbeute von 80%⁷⁷⁾.

Mit den gleichen Bakterien aus Hefe findet auch die Dehydrierung des C₍₃₎-Hydroxyls von Pregnenolon (XLVI) statt, unter Bildung von 40% des Corpus-luteum-Hormons Progesteron (XLVII). Cholesterin hingegen bleibt völlig unverändert⁷⁸⁾. Methyl-androstendiol (XLVIII) läßt sich mit 75% Ertrag in Methyl-testosteron (IL) überführen⁷⁹⁾.

Nach Mamoli, Koch u. Teschen⁸⁰⁾, denen es gelang, ein einheitliches Bakterium zu züchten, stimmen die Eigenschaften dieses sekundären Steroidalkohole dehydrierenden Bakterienstamms mit den für das Corynebakterium helvolum (Lehmann u. Neumann) in der Literatur angegebenen überein; sie nannten es nach seinem Stammort Coryne-Bakterium Mediolanum.

Mit diesen Bakterien läßt sich auch ein Stoff aus der Cortingruppe, das 21-Acetoxy- Δ^5 -pregnenol-(3)-on-(20) (L) mit 34% Ausbeute unter gleichzeitiger Verseifung der Acetoxygruppe in Desoxy-corticosteron (LI), den bisher physiologisch wirksamsten Stoff dieser Gruppe, überführen⁸¹⁾.

Die primäre, während der Behandlung frei werdende Oxygruppe an C₍₂₁₎ wird nicht angegriffen.

Acetoxy-pregnenolon zu Desoxy-corticosteron. „60 cm³ steriles Hefewasser wurden durch Zugabe von 10 cm³ m_{1/2}-sek. Natriumphosphat und 10 cm³ m_{1/2}-prim. Kaliumphosphat gepuffert, mit 200 mg fein pulverisiertem 21-Acetoxy-pregnenol-(3)-on-(20) versetzt und 1 h im Dampftopf sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde mit einigen Tropfen des frisch in Hefewasser gezüchteten Coryne-Bakteriums Mediolanum infiziert. Das Reaktionsgemisch wurde dann bei 36—37° unter Sauerstoff 6 Tage geschüttelt. Danach wurde der Versuch unterbrochen und die Suspension filtriert, der Filterrückstand mit Aceton aufgenommen, durch Filtrieren vom Bakterium befreit und das Aceton abgedampft. Der verbliebene Rückstand wurde vorsichtig aus verd. Aceton umkristallisiert. Es fielen zunächst 54 mg Ausgangsmaterial an; die Mutterlauge wurde getrocknet, der Rückstand in wenig Aceton gelöst und mit Äther versetzt: 48 mg Desoxy-corticosteron vom Schmp. 139—140° (unkorr.) (Mischprobe). Aus den restlichen Mutterlaugen wurden durch Destillation im Hochvakuum weitere 12 mg Desoxy-corticosteron gewonnen.“

Es soll hier, wie auch in den anderen Abschnitten, nicht im einzelnen diskutiert werden, in welchen Fällen die bakterielle Dehydrierung steroider Alkohole wesentliche Vorteile gegenüber den „rein chemischen“ Verfahren bietet, von denen die Chemie der Steroide bekanntlich einige kennt. Es sei nur darauf hingewiesen, daß sich auch bei dieser Stoffgruppe die Umkehrung der Meerweinschen Reaktion, d. h. der Austausch der Oxydationsstufen durch die Einwirkung von Ketonen in Gegenwart von Aluminiumalkoholaten oder -phenolaten bewährt hat⁸²⁾. Eine sehr interessante Ausweitung hat diese Umsetzung durch A. Wettstein⁸³⁾ in jüngster Zeit erfahren, der durch Verwendung von Benzochinon als Wasserstoffacceptor von Δ^5 -Oxy-steroiden zu $\Delta^{4,6}$ -3-Keto-Verbindungen gelangt. Hierbei wird also gleichzeitig eine zweite Doppelbindung eingeführt.

c) Hydrierungen ungesättigter Steroide.

Die Absättigung der Äthylenbindungen in Steroiden durch Bakterien ist bei der Prüfung der Wirkung tierischer Fermente gefunden worden. Ercoli u. Mamoli⁸⁴⁾ ließen Δ^4 -Androstendion (XXXV) 20 Tage mit einem Auszug aus Hengsthoden stehen und wiesen seine Umwandlung in Ätiocholan-dion(3,17) (XXXVII) nach. Mit dem gleichen Auszug aus Hoden führte Ercoli⁸⁵⁾ Testosteron (XXXVI) durch 10tägige Einwirkung in Ätiocholan-ol-(17)-on-(3) (XXXVIII) und weiter durch 20tägige Einwirkung in das auch aus Männerharn isolierte epi-Ätiocholan-diol-(3,17) (XXXIX) über.

⁷¹⁾ L. Mamoli u. A. Vercellone, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 650 [1938].

⁷²⁾ L. Mamoli, ebenda **71**, 2278 [1938].

⁷³⁾ L. Mamoli, Gazz. chim. ital. **69**, 237 [1939].

⁷⁴⁾ L. Mamoli, R. Koch u. H. Teschen, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **261**, 287 [1939].

⁷⁵⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 152 [1938].

⁷⁶⁾ Ebenda **71**, 1686 [1938].

⁷⁷⁾ R. Oppenauer, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **58**, 137 [1937]; s. a. II. H. Inhoffen, W. Logemann, W. Hohlweg u. A. Srinivas, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1032 [1938].

⁷⁸⁾ Helv. chim. Acta **23**, 388 [1940].

⁷⁹⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 156 [1938].

⁸⁰⁾ Ebenda **71**, 650 [1938].

Doch hat die Annahme dieses Autors, daß die Wasserstoffanlagerungen auf eine „Testishydrase“ zurückzuführen seien, sich nicht bestätigen lassen. Schramm u. Mamoli konnten zeigen, daß diese Hydrierungen ungesättigter männlicher Wirkstoffe durch Bakterienwirkung eintreten⁸⁶⁾. Steril gehaltene oder durch Hitze keimfrei gemachte Hodenextrakte hydrieren nicht. Wohl aber läßt sich nach Impfung von Kochsäften mit Fäulnisbakterien die Wasserstoffanlagerung an Androstendion bzw. Testosteron zu epi-Ätiocholandiol durchführen⁸⁷⁾. In einer weiteren Untersuchung⁸⁸⁾ wurde neben dem vorher allein aufgefundenen epi-Ätiocholandiol in etwa gleicher Menge auch Iso-androstanol-(3, 17) (XXXII) nachgewiesen. In diesem Falle hatte also die Hydrierung der Doppelbindung sowohl zur cis-Reihe (Ätiocholanreihe) als auch zur trans-, d. h. zur Androstanreihe geführt.

Diese in sterischer Beziehung verschiedene Wirkung ist auf die wechselnde, vom Zufall der Infektion abhängige Zusammensetzung des Bakteriengemisches zurückzuführen.

Hydrierungen mit einem reinen, aus faulenden Stierhodenextrakten isolierten Bakterienstamm, der sehr wahrscheinlich mit dem *Bacillus putrificus* (Bienstock) identisch ist, zeigen jedenfalls eine bemerkenswerte stereochemische Spezifität⁸⁹⁾.

Gepulvertes Androstendion (XXXV), in sterilen, neutral gepuffertem Hefewasser nach der Infektion mit *B. putrificus* bei 37° 6 Tage lang unter Stickstoff geschüttelt, ergibt nur Ätiocholandion (XXXVII) mit 70—80% Ausbeute. In gleicher Weise wird Testosteron (XXXVI) in Ätiocholanol-(17)-on-(3) (XXXVIII) übergeführt (70 bis 80%) und das Schwangerschaftshormon Progesteron (XLVII) in Pregnandion mit 90% Ausbeute.

In Hefewasser stoppt also die bakterielle Wasserstoffanlagerung nach Absättigung der Doppelbindung; bei dieser Hydrierung erfolgt die Verknüpfung der Ringe A und B ausschließlich in cis-Stellung (Cholansäurerreihe). Da durch katalytische Hydrierung die Überführung in diese Reihe nicht befriedigend verläuft, besitzt in den erwähnten Fällen die biochemische Methode große Vorteile.

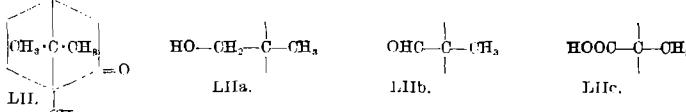
Verwendet man statt Hefewasser als Nährboden für die Bakterien eine sterile Hefesuspension, so greift bei Androstendion und Testosteron die Hydrierung über die Äthylenbindung hinaus auch auf die Ketogruppe, wie schon im vorletzten Abschnitt ausgeführt wurde.

Androstendion zu Ätiocholandion⁸⁹⁾. „60 cm³ steriles Hefewasser wurden durch Zugabe von 10 cm³ m₆-sek. Natriumphosphat und 10 cm³ m₆-prim. Kaliumphosphat gepuffert (pH 6,8), mit 150 mg fein pulverisiertem Androstendion versetzt und 1 h im Dampftopf sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde mit einigen Tropfen des von uns isolierten, frisch in Hefebrei gezüchteten reinen Stammes von *B. putrificus* infiziert. Das Reaktionsgemisch wurde dann bei 36—37° unter Stickstoff 6 Tage lang geschüttelt. Danach wurde der Versuch unterbrochen und die Suspension filtriert (pH 6,6). Der auf dem Filter verbliebene Rückstand wurde mit Aceton ausgekocht und durch Filtrieren von den Bazillen befreit. Die Acetonlösung wurde zur Trockne gebracht und der Rückstand aus verdünntem Methanol und verdünntem Aceton umkristallisiert: 115 mg Ätiocholandion vom Schnp. 130—131° (unkorr.) (Mischprobe).“

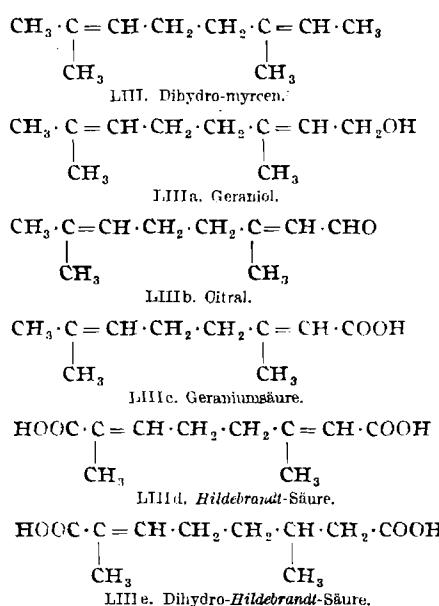
F. Oxydation von Methylgruppen.

Die Beobachtung der bevorzugten Oxydation abgezweigter oder endständiger Methylgruppen im Tierkörper ist, zum Teil seit einigen Jahrzehnten, schon an recht verschiedenen Stoffen mit dieser Atomgruppierung gemacht worden⁹⁰⁾. So wird z. B. Antipyrin vom Hund zum Teil als Oxy-antipyrin-glucuronsäure ausgeschieden⁹¹⁾. Bei n-Alkylbenzolen setzt die Oxydation zunächst sehr wahrscheinlich endständig an der Seitenkette an⁹²⁾. Aus Campher (LII) entsteht im Tierkörper ein Gemisch von Oxyderivaten, das sogenannte Campherol, das größtenteils als gepaarte Glucuronsäure im Harn ausgeschieden wird. Außer den darin enthaltenen 3-, 5-, cis- π - und trans- π -Oxycamphenen (LIIa) sind als Oxydationsprodukte trans- π -Oxo-campher (LIIb) (der Träger der analeptischen Campherwirkung) und die dazugehörige Säure

trans- π -Apo-campher-7-carbonsäure (LIIc) nachzuweisen⁹³⁾.



Bei einigen Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen wird die neben dem Abbau vom Carboxylenende her eintretende ω -Oxydation der Methylgruppe aus der Ausscheidung von Dicarbonsäuren mit gleicher Anzahl von C-Atomen ersichtlich⁹⁴⁾.



Geraniol (LIIIa), Citral (LIIIb) und Geraniunsäure (LIIIc) werden ebenfalls zum Teil als Dicarbonsäure mit unverminderter C-Anzahl ausgeschieden⁹⁵⁾. Bei der näheren Untersuchung der letztgenannten Umwandlung unter Einbeziehung weiterer Stoffe mit Methylverzweigungen zeigte sich deutlich, daß die bevorzugte Oxydation an Methylgruppen eine allgemeine Reaktion ist⁹⁶⁾. Z. B. lieferte auch Dihydro-myrcen (LIII) die gleiche Dicarbonsäure C₁₀H₁₄O₄ wie die schon genannten aliphatischen Terpene. Dieser Dicarbonsäure, die aus Geraniol, Citral und Geraniunsäure mit etwa 10% Ausbeute entsteht, kommt die Konstitution (LIIId) zu. Außerdem bildet sich unter Hydrierung der α , β -Äthylenbindung in etwa gleicher, beim Geraniol sogar größerer Menge eine Dihydrosäure (LIIIE).

In geeigneten Fällen, d. h. bei Stoffen, deren völliger oxydativer Abbau erschwert ist, z. B. durch eine zur Oxy- oder Oxogruppe β -ständige Verzweigung, kann diese biologische Oxydation von Methylgruppen eine wertvolle präparative Möglichkeit bieten.

Als Versuchstiere können Kaninchen dienen. Flüssige Stoffe werden den Kaninchen unverdünnt mit der Schlundsonde gegeben, und zwar z. B. 2 mal 5 g je Tag und Tier. Feste Stoffe können in Olivenöl gelöst und dann mit Wasser emulgiert oder einfach sehr fein zerrieben in Wasser aufgeschlämmt werden. Säuren werden vor der Verabreichung durch genaue Neutralisation mit der berechneten Menge Natronlauge in ihre Salze übergeführt. In einigen Fällen können sie auch in Form von Methylestern verabreicht werden. Flüssige Substanzen können auch injiziert werden, z. B. in Mengen von 3—6 cm³ abwechselnd in die rechte und die linke Oberschenkelmuskulatur.

Der Harn wird während der Fütterung und auch zwei weitere Tage, darüber hinaus täglich aus den Gefäßen der Stoffwechselkäfige entnommen, durch Zugabe von etwas Chloroform vor Fäulnis bewahrt und, wenn mit dem Vorhandensein luftempfindlicher Stoffe zu rechnen ist, zweckmäßig bis zur Aufbereitung in braunen Flaschen unter Stickstoff im Eisschrank aufbewahrt. Die Gewinnung der darin enthaltenen Stoffe kann durch erschöpfende Extraktion mit Äther nach Spaltung der gepaarten Verbindungen, bei Säuren auch durch Fällung der Bleisalze durchgeführt werden.

⁸⁶⁾ Ber. dtach. chem. Ges. **71**, 1322 [1938].

⁸⁷⁾ L. Mamoli, u. G. Schramm, ebenda **71**, 2083 [1938].

⁸⁸⁾ Dieselben, ebenda **71**, 2698 [1938].

⁸⁹⁾ L. Mamoli, R. Koch u. H. Teschen, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **261**, 287 [1939].

⁹⁰⁾ Literatur bei K. Fromherz, I. c. *).

⁹¹⁾ Lawrow, Ber. dtach. chem. Ges. **33**, 2344 [1900]; Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **32**,

111 [1901].

⁹²⁾ H. Thierfelder u. E. Klenk, ebenda **141**, 13, 29 [1924].

⁹³⁾ P. Asahina u. M. Ishidate, Ber. dtach. chem. Ges. **61**, 533 [1928]; **63**, 947 [1935].

⁹⁴⁾ P. E. Verkade u. Mitarb., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **215**, 225 [1935].

⁹⁵⁾ H. Hildebrandt, Naunyn-Schmeidebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **45**, 110 [1901].

⁹⁶⁾ R. Kuhn, F. Köhler u. L. Köhler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **242**, 171 [1936].

Die Gewinnung der sauren Produkte aus Geraniol ist z. B. folgendermaßen durchgeführt worden⁹⁷⁾: Der Harn wird zunächst mit gesättigtem Barytwasser versetzt, solange noch ein Niederschlag ausfällt, bis zum beginnenden Sieden erhitzt, abgesaugt und die Fällung mit heißem Wasser gewaschen. Nach dem Versetzen des Filtrats mit Bleiessig (bis nichts mehr ausfällt) wird die Bleifällung kalt filtriert, mit kaltem Wasser gewaschen und in der Kälte mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die Bleisulfidniederschläge werden 3—4 mal mit Wasser ausgekocht und die erhaltenen Lösungen zusammen mit dem ersten Filtrat eingeeengt. Dabei scheidet sich die *Hildebrandt-Säure* zum allergrößten Teil in schneebulumenartigen Nadelchen ab; nur eine kleine Menge findet sich in dem ausfallenden, dunkelbraun gefärbten Öl, aus welchem die *Dihydro-Hildebrandt-Säure* durch Aufnahme in Äther, Verdampfen des Lösungsmittels, Entfärbung ihrer wässrigen Lösung mit Tierkohle isoliert wird (Gesamtausbeute an beiden Säuren 27% d. Th.).

Zur vollständigen Gewinnung der im Harn enthaltenen ätherlöslichen Stoffe⁹⁸⁾ und Unterscheidung von gepaarten und nicht gepaarten Anteilen wird der schwach alkalisch reagierende Harn zunächst unverändert mit Äther ausgezogen, dann nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion 20 min zum Sieden erhitzt und nochmals erschöpfend mit Äther extrahiert. Die Säuren werden mit verdünnter Natronlauge den beiden Ätherextrakten entzogen, die Neutralteile nach dem Waschen, Trocknen

und Verdampfen gewonnen. Die weitere Reinigung geschieht durch Destillation im Hochvakuum.

Schlüß.

In dem vor hundert Jahren in Liebigs Annalen gedruckten Aufsatz über „Das enträtselte Geheimnis der geistigen Gährung“⁹⁹⁾ beschreibt S. C. H. Windler (F. Wöhler), wie Bierhefe sich zu kleinen Tieren entwickelt, in Gestalt einer *Beindorf'schen Destillierblase* (ohne den Kühlapparat), die durch ihren mit Borsten besetzten Saugrüssel Zucker fressen und aus dem Darmkanal Weingeist, aus den Harnorganen Kohlensäure entleeren. Die Satire galt den mikroskopischen Beobachtungen von Th. Schwann und Cagniard de Latour.

Die „mechanistische“ Auffassung Liebigs ist unterdessen schon längst mit der „vitalistischen“ Theorie zusammengeschmolzen, und heute zweifelt der Chemiker nicht daran, daß Mikroorganismen, wie in diesem „Spaß über die Gährung“¹⁰⁰⁾, als chemische Fabriken, d. h. zur Durchführung spezifischer Umsetzungen angewendet werden können, und er erwartet durch weitere Untersuchung ihres Stoffwechsels und ihrer Fermentsysteme die Auffindung neuer Möglichkeiten.

Einr. 11. Juni 1940. I.A. 691

⁹⁷⁾ R. Kuhn, F. Köhler u. L. Köhler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **242**, 171 [1936].
⁹⁸⁾ F. G. Fischer u. H. J. Bieling, ebenda im Druck; H. J. Bieling, Diss., Würzburg 1939.

⁹⁹⁾ Liebigs Ann. Chem. **29**, 100 [1839].

¹⁰⁰⁾ J. Liebigs Brief an F. Wöhler vom 18. Nov. 1838.

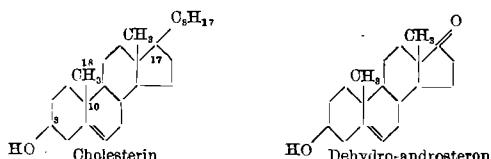
Übergang von Sterinen in aromatische Verbindungen*)

Von Dr. H. H. INHOFFEN

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A. G., Berlin

Die Sterine sind bekanntlich alicyclische Verbindungen mit dem charakteristischen Vierringsystem des Cyclopentano-polyhydro-phenanthrens. Sie enthalten am Kohlenstoffatom 17 eine paraffinartige Seitenkette, im Ringsystem am Kohlenstoffatom 3 eine sekundäre Alkoholgruppe und können ein- oder mehrfach ungesättigt sein; das bekannteste Sterin des Tierreiches ist das Cholesterin.

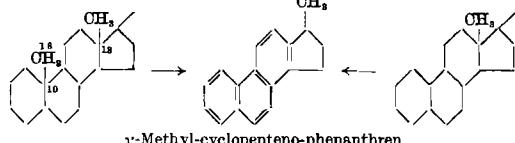
Abb. 1.



Zur Gruppe der Steroide zählt man heute allgemein alle Verbindungen, die ein solches Vierringsystem besitzen, die jedoch am Kohlenstoffatom 17 außer durch einen aliphatischen Rest auch andersartig substituiert sein können, wie z. B. beim Dehydro-androsteron lediglich durch ein Sauerstoffatom.

Für die Kennzeichnung einer Verbindung als Steroid hat man eine besondere Aromatisierungsreaktion mit Erfolg herangezogen, nämlich die Selendehydrierung von *Diels*¹⁾. Sterine bzw. Steroide, wie z. B. Herzgiftgenine, Saponagine, werden hierbei zum γ -Methyl-cyclopenteno-phenanthren abgebaut.

Abb. 2.



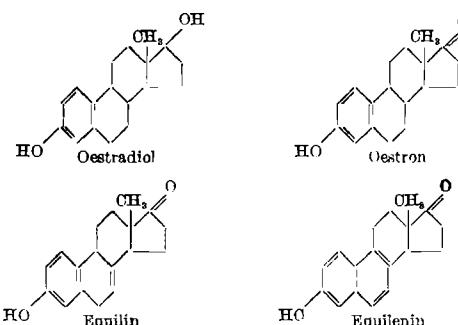
Diese Überführung in die aromatische Verbindung γ -Methyl-cyclopenteno-phenanthren war bereits vielfach für die rasche Konstitutionsaufklärung vieler Verbindungen und Naturstoffe von außerordentlicher Bedeutung²⁾.

Ein charakteristisches Konstitutionsmerkmal der Sterine und der überwiegenden Zahl der Steroide sind die beiden angulären Methylgruppen an den Kohlenstoffatomen 10 und 13. Im Methyl-cyclopenteno-phenanthren ist nur das quartäre Methyl von C₁₀ durch Wanderung an das nicht ringverknüpfende Kohlenstoffatom 17 erhalten geblieben; das

von C₁₀ ist bei der Selenbehandlung abgespalten worden. Man kann hieraus ersehen, daß auch Steroide, die von vornherein kein Methyl am Kohlenstoffatom 10 tragen, bei der Selenbehandlung γ -Methyl-cyclopenteno-phenanthren liefern können.

Es gibt eine Gruppe von Steroiden, denen diese Methylgruppe am Kohlenstoffatom 10 fehlt; das sind die Verbindungen der Östranreihe. Hierzu gehören die Vertreter der Follikelhormongruppe, das Östradiol und das Östron, die im Ovarium wichtige Funktionen auszuüben haben, und ferner auch das im Harn trächtiger Stuten vorkommende Equilin und Equilenin. Das in der Placenta vorkommende Östriol besitzt noch eine Hydroxylgruppe an C₁₆.

Abb. 3.



Das Fehlen dieser Methylgruppe steht in Zusammenhang mit einem anderen besonderen Merkmal dieser Stoffe, sie enthalten einen bzw. zwei Benzolringe, stellen also einen ersten Übergang des voll alicyclischen Ringsystems in ein partiell aromatisches System dar. Denn eine Dehydrierung, z. B. der Ringe A und/oder B zu einem Benzol- oder Naphthalin-System kann erst erfolgen, wenn die anguläre Methylgruppe von dem ringverknüpfenden Kohlenstoffatom 10 entfernt ist.

Aus diesem Grunde führte auch die Dehydrierungsmethode von Zelinsky³⁾, nämlich Erhitzen mit Platin, bei Sterinen zu keinem positiven Ergebnis. Nach dieser Methode werden nur Hexamethylenderivate ohne quartäres Kohlenstoffatom zu Benzolderivaten dehydriert, dagegen nicht Cyclopentan- und Cyclohexanderivate mit quartärem Kohlenstoff, wie z. B. das 1,1-Dimethyl-cyclohexan.

In der Stabilisierung der hydroaromatischen Natur der überwiegenden Zahl der Steroide kommt die wesentlichste Bedeutung der beiden quartären Methylgruppen zum Ausdruck: sie sollen die Aromatisierung des alicyclischen Ringsystems verhindern.

¹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. **44**, 3121 [1911]; **45**, 3677 [1912]; **56**, 787, 1716 [1923] usw.

²⁾ Vorgetragen am 12. Juli 1940 in Jena in der Sitzung des Bezirksvereins Thüringen des VDCh und am 18. Juli 1940 in der Münchener Chemischen Gesellschaft.

³⁾ Diels, Gädke u. Körding, Liebigs Ann. Chem. **459**, 1 [1927].

⁴⁾ Vgl. hierzu auch Dane, „Synthesen in der Reihe der Steroide“, diese Ztschr. **52**, 655 [1939].