

**297. C. B. van Niel und F. Visser 't Hooft: Die fehlerhafte Anwendung biologischer Agenzien in der organischen Chemie.****Eine Warnung.**

(Eingegangen am 12. Juni 1925.)

Schon längst hat man eingesehen, daß biochemische Methoden außerordentlich wichtige Hilfsmittel sind zur Aufklärung verschiedener Probleme der organischen Chemie, und in den Händen hervorragender Forscher hat die Anwendung dieser Methoden glänzende Resultate geliefert, z. B. bei der Konstitutions- und Konfigurations-Ermittlung der Zuckerarten und ihrer Abkömmlinge. Es sei hier nur an die Arbeiten Pasteurs, Bertrands, Fischers und vieler anderer erinnert.

Leider können diese Methoden in den Händen der Nicht-Biologen Anlaß zu völlig irreführenden Schlußfolgerungen geben. Es ist dies die Folge einer ungenügenden Kenntnis der Faktoren, die beim Arbeiten mit Mikroorganismen zu berücksichtigen sind. Diesen fehlerhaften Schlüssen begegnet man zumal in den Arbeiten, in denen lebende Hefe als biochemisches Agens verwendet wird. Fast immer geht man dann von der Voraussetzung aus, die lebende Hefe (Preßhefe) sei ein einheitliches Prinzip, wie z. B. Schwefelsäure. Diese Voraussetzung aber ist durchaus unzulässig.

Die Preßhefe des Handels z. B. ist in mikrobiologischer Hinsicht niemals rein. Selbst wenn man in mikroskopischen Präparaten auch auf Millionen von Hefezellen keine einzige andere Mikrobe auffinden kann, so darf man hieraus nie auf die Abwesenheit fremder Keime schließen. Wenn man dann auch mit der reinsten Preßhefe Versuche anstellt, die sich entweder auf längere Zeit ausdehnen oder die durch abnorm für die Hefe zu nennenden Bedingungen gekennzeichnet sind, so gelangt man immer zu der Überzeugung, daß in dem anscheinend reinen Aussaatmaterial eine relativ kleine, jedoch absolut große Anzahl der verschiedensten Mikroorganismen anwesend sein muß. So kann man immer mit Leichtigkeit aus jeder Preßhefe die folgenden Mikrobenarten isolieren: Milchsäure-Bakterien — von denen man je nach den Versuchsbedingungen eine oder mehrere Arten nachweisen kann. Man vergleiche hierzu die Arbeiten von Beijerinck, Henneberg, van Steenberghe usw. Der letztgenannte Forscher fand z. B. in einer erstklassigen Preßhefe nicht weniger als 13 verschiedene Arten Milchsäure-Bakterien<sup>1)</sup> —; Essigsäure-Bakterien, auch mehrere Arten; Kahlm-Hefen (Mycoderma-, Willia- und Torula-Arten); sporenbildende Bakterien; Schimmelpilze, wie z. B. *Oidium lactis*.

Also erscheint uns die Preßhefe als ein Gemisch verschiedenartiger Mikroben, und es leuchtet ein, daß man in Kulturversuchen mit solchen Gemischen darauf achten muß, daß sich in den Kulturen ein Kampf ums Dasein entwickeln wird, wo diejenigen Arten, welche den herrschenden Bedingungen am besten gewachsen sind, auf Kosten der übrigen Mikroben die Oberhand erlangen werden.

Ein einziges Beispiel möge das Obengesagte erläutern. Wenn man nadelknopfige Stückchen Preßhefe in ganz mit Würze gefüllte Flaschen bringt, mit den Stopfen schließt und dann bei 25°, 35° oder 45° während 24 Stdn. stehen läßt, dann wird man nach dieser Zeit in den verschiedenen Flaschen

<sup>1)</sup> Ann. Inst. Past. 34, 803 [1920].

neben der Hefe je nach der Temperatur verschiedene Arten Milchsäure-Bakterien beobachten können, die sich unter diesen Umständen (Luftabschluß) reichlich entwickelt haben. Benützt man einen Tropfen dieser Flüssigkeit als Impfmateriel für eine zweite Flasche, so bekommt man in der Regel nur eine Entwicklung der Milchsäure-Bakterien: die Hefe ist völlig verschwunden.

Wenn man nun den gleichen Versuch ausführt unter Bedingungen, wo der Luft-Sauerstoff freien Zutritt hat, so findet man nach kürzerer oder längerer Zeit (2—4 Tagen) neben den Hefezellen Kamm-Hefen und Essigsäure-Bakterien, welche sich nun tüchtig entwickeln können, während die meisten anderen anwesenden Mikrobenarten, ebenso wie die Hefe selbst, von dem hohen Alkoholgehalt der Flüssigkeit geschädigt werden.

Aus diesen Ausführungen wird ersichtlich sein, daß sog. „Gärversuche“ nur dann auf die Wirkung der Alkohol-Hefe bezogen werden dürfen, wenn die Versuchsdauer so kurz genommen wird, daß die fremden Organismen sich nicht merklich vermehrt haben können. Meistens ist eine Versuchsdauer von mehr als 8—10 Stdn. nicht zulässig. Wenn man die Versuche auf längere Zeit ausdehnt, dann ist es sehr wohl möglich, daß ein Verhältnis der Hefezellen zu den Milchsäure-Bakterien, welches z. B. anfangs 1000000:1 war, nach einiger Zeit sich völlig geändert hat in der Weise, daß die Anzahl der lebenden Hefezellen zu der der lebenden Bakterienzellen sich wie 1:100000 verhält.

Man findet in der Literatur zahlreiche Arbeiten, aus denen hervorgeht, daß die Autoren die Beschaffenheit der Hefe als nicht-einheitliches biochemisches Agens ungenügend berücksichtigt haben. So sollen hier als auffallendes Beispiel aus der älteren Literatur die Arbeiten von Karczag<sup>2)</sup> genannt werden. Karczag behauptet nämlich, die Hefe werde in stände sein, Weinsäure und weinsaure Salze zu vergären, und diese Behauptung wird nur gegründet auf Versuche mit Hefe, welche er sogar 10 Wochen im Brutschrank bei 38° (!) verweilen läßt. Es kann wohl kaum bezweifelt werden, daß hier die angebliche Wirkung der Hefe durch Bakterien hervorgerufen wurde.

Als zweites Beispiel sei hier eine Abhandlung Pellets<sup>3)</sup> angeführt, in der behauptet wird, die Hefe sei in stände, Pentosen zu vergären. Für jeden Mikrobiologen ist es offensichtlich, daß es hier die Milchsäure-Bakterien sind, welche die Arabinose und Xylose verarbeitet haben. Pellet kann nämlich nur eine Vergärung der Pentosen wahrnehmen, wenn er den Versuch über längere Zeit (3—4 Tage!) ausdehnt. Innerhalb dieser Frist haben die Milchsäure-Bakterien sich immer in zuckerhaltigen Nährlösungen, mit Preßhefe beschickt, schon kräftig entwickelt. Der Beweis, daß die Hefe zu einer Pentose-Vergärung in stände ist, wurde also von Pellet jedenfalls nicht geliefert.

Ein letztes Beispiel einer fehlerhaften Anwendung eines biochemischen Agens findet man in der Arbeit von M. Hönlig und F. Tempus<sup>4)</sup>. Diese Autoren wenden zur Identifizierung der von ihnen bei der Oxydation von Glykose mit Brom erhaltenen Keto-glykonsäure den Gärversuch an, aus welchem sie schließen, daß die Ketogruppe der genannten Säure in 2-Stellung anwesend sei. Es soll nämlich durch die in der Hefe enthaltene Carboxylase aus der Säure neben Kohlensäure *d*-Arabinose gebildet worden sein, was, angesichts der Versuche Neubergs nur eine Deutung als  $\alpha$ -Ketosäure zuläßt. Die Versuche Hönligs und Tempus' berechtigen jedoch keinesfalls zu dieser Schlußfolgerung.

<sup>2)</sup> Bio. Z. 38, 516 [1912], 43, 44 [1912].

<sup>3)</sup> C. r. 163, 274 [1916].

<sup>4)</sup> B. 57, 787 [1924].

Dies leuchtet sofort ein, wenn man bedenkt, daß der Gärversuch während 8 Tage (!) bei 38–40° mit gewöhnlicher Preßhefe durchgeführt wurde. Unter diesen Umständen darf nicht nur mit großer Wahrscheinlichkeit, sondern mit Gewißheit auf eine üppige Entwicklung von Bakterien in der untersuchten Lösung geschlossen werden. Daher ist es klar, daß die Zersetzung der Keto-glykonsäure sehr wohl von diesen Bakterien bewirkt sein kann, wobei zu bedenken ist, daß die Bakterienwirkung durchaus nicht auf eine  $\alpha$ -Carboxylase-Wirkung beschränkt ist.

Wir würden dieser Sache keinen so großen Wert beigelegt haben, wenn nicht Pringsheim in seinem vor kurzem erschienenen Buche „Zuckerchemie“<sup>5)</sup> die Schlußfolgerungen Hönigs und Tempus' ohne jegliche Kritik übernehme und sogar hierauf die Ansicht stützte, daß die von Boutroux<sup>6)</sup> und später von Bertrand<sup>7)</sup> mittels biochemischer Oxydation aus Glykose bereitete Oxy-glykonsäure nicht, wie diese Autoren aus triftigen Gründen annehmen, 5-Keto-glykonsäure, sondern 2-Keto-glykonsäure sei. Pringsheim sagt nämlich ausdrücklich (S. 230): „Neuerdings ist sie (die ‚Oxy-glykonsäure‘ Boutroux') aber, wie wir schon erwähnten, als 2-Keto-glykonsäure identifiziert worden.“

Diese „Identifizierung“ ist nun folgendermaßen begründet. Erstens nimmt Pringsheim ohne weiteres an, daß die von Hönig und Tempus hergestellte Säure eine 2-Ketosäure sei. Zweitens nimmt er als feststehend an, daß die von diesen Autoren erhaltene Substanz identisch ist mit der von Kiliani<sup>8)</sup> durch Oxydation mittels Salpetersäure aus Glykose hergestellte Säure, wofür letzterer Forscher tatsächlich die Identität mit der Oxy-glykonsäure Boutroux' durchaus wahrscheinlich gemacht hat.

Hiergegen möchten wir an erster Stelle bemerken, daß Hönig und Tempus von der von ihnen studierten Substanz nur sagen, daß sie „nicht unwahrscheinlich identisch sei mit der Verbindung Kilianis“. Irgendwelche tatsächlichen Beweise für diese Identität werden jedoch nicht angeführt. Es ist also mindestens verfrüht, auf die Identität der Oxy-glykonsäure Boutroux' mit dem Produkte Hönigs und Tempus' zu schließen.

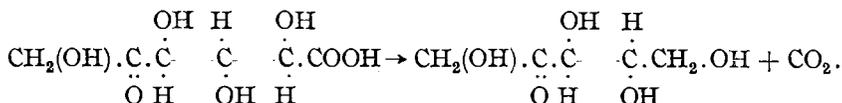
Doch sogar, wenn diese Identität bestünde, ist es gar nicht erwiesen, daß die untersuchte Säure 2-Keto-, und nicht, wie Boutroux für sein Produkt aus guten Gründen behauptet hat, 5-Keto-glykonsäure war.

Wir würden mit der Ansicht Hönigs und Tempus' übereinstimmen, wenn wirklich von ihnen der Beweis geliefert wäre, daß erstens die beobachtete Umwandlung der Säure durch die zugesetzte Hefe bewirkt, und zweitens, daß dabei wirklich Arabinose gebildet worden war. Beide Punkte sind jedoch durchaus anfechtbar. Oben wiesen wir schon darauf hin, daß unter den genannten Bedingungen die Umwandlung nicht unter dem Einfluß der Hefe verlaufen ist, sondern daß sie vielmehr der Bakterientätigkeit zuzuschreiben ist.

Welche Produkte bei dem Bakterien-Stoffwechsel entstanden sind, läßt sich natürlich nicht ohne weiteres übersehen. Doch möchten wir darauf hinweisen, daß es sich sehr gut denken läßt, daß, analog dem von Milchsäure-Bakterien bewirkten Abbau der Äpfelsäure im Wein, gemäß der Gleichung:  $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{COOH}$ , die 5-Keto-glykonsäure Boutroux' von ähnlichen Bakterien zersetzt worden ist nach der Gleichung:

<sup>5)</sup> Leipzig, 1925.      <sup>6)</sup> C. r. **127**, 1224 [1898].

<sup>7)</sup> A. ch. [8] **3**, 181 [1904].      <sup>8)</sup> B. **55**, 2817 [1922].



In diesem Falle wäre also eine Keto-pentose gebildet, deren Osazon identisch mit dem Xylosazon ist.

Von Hönig und Tempus ist nun überhaupt nicht mit Gewißheit dargestellt, daß die gebildete Pentose Arabinose war. Sie gründen diese Ansicht nur auf den Schmelzpunkt des von ihnen hergestellten Osazons, den sie auf 158.5° bestimmten. Wenn man nun in Betracht zieht, daß der Schmelzpunkt des *d*-Arabinosazons in der Literatur angegeben wird als 162–163°<sup>9)</sup> und der Schmelzpunkt des *d*-Xylosazons als 152–155°, 160°, 161°, 166°, 163°<sup>9)</sup>, dann wird man nicht verneinen können, daß die aus Boutroux' Säure auf Grund der angegebenen Umsetzung zu erwartende Keto-pentose ebensogut vorgelegen haben kann.

Es erscheint uns also angebracht, die von Boutroux für seine Oxyglykonsäure aus guten Gründen gegebene Auffassung als 5-Keto-glykonsäure bis auf weiteres beizubehalten.

Die gegebene Auseinandersetzung dürfte außerdem dazu beitragen, daß die wertvollen biochemischen Methoden der Konfigurations-Bestimmung in Zukunft mit größerer Rücksicht auf die biologische Seite angewendet werden.

Delft, Laborat. f. Mikrobiologie d. Techn. Hochschule, im Juni 1925.

#### Nachschrift.

Nach Absendung des Manuskriptes waren wir noch imstande, die Veräuerbarkeit der Oxy-glykonsäure Boutroux' durch Hefe in Reinkultur nachzuprüfen. Als Ausgangsmaterial diente uns ein Präparat des oxy-glykonsäuren Calciums, das von Hrn. F. J. G. de Leeuw mit Hilfe des Acetobacter suboxydans Kluyster et de Leeuw aus Glykose hergestellt war<sup>10)</sup>. Die Gärversuche wurden ausgeführt im van-Iterson-Kluyster'schen Gärapparat<sup>11)</sup>.

Es wurden folgende Versuche angestellt:

a) 7.6 ccm Hefenwasser wurden unter Zusatz von 300 mg des Ca-Oxy-glykonats in einem sterilen Kölbchen aufgeköcht. Nach dem Erkalten wurden 2.4 ccm einer sterilen Lösung von Phosphorsäure zugefügt, welche die zur gänzlichen Umsetzung des Ca-Salzes in Oxy-glykonsäure und tertiäres Ca-Phosphat benötigte Menge Mineralsäure enthielten. Von dieser Mischung wurde nach Beschickung mit einer Reinkultur von Saccharomyces cerevisiae 1 ccm in den Gärapparat gebracht.

b) Im wesentlichen derselbe Versuch, wie unter a) angegeben; nur wurde statt Phosphorsäure zur Umsetzung des Ca-Oxy-glykonats in Oxy-glykonsäure die berechnete Menge steriler Schwefelsäure benutzt.

c) Wie a), aber mit der berechneten Menge Oxalsäure statt Phosphorsäure.

Die Apparate wurden nach der Abfüllung bei 30° aufgestellt und jeden Tag kontrolliert. Es war aber sogar nach Verlauf von zwei Wochen keine CO<sub>2</sub>-Entwicklung nachweisbar.

<sup>9)</sup> vergl. A. W. van der Haar, Anleitung zum Nachweis, zur Trennung und Bestimmung der reinen und aus Glykosiden usw. erhaltenen Monosaccharide. Berlin 1920.

<sup>10)</sup> A. J. Kluyster und F. J. G. de Leeuw, Ned. Tydschr. voor Vergeel. Geneesk. usw. 10, [1924] und Dtsch. Essigindustrie 29, 175 [1925].

<sup>11)</sup> vergl. A. J. Kluyster, Biochem. Suikerbep., Dissertat., Delft 1924.

Weil es denkbar erschien, daß die Hefe in einer Lösung, welche ziemlich viel freie Säure enthielt, nicht zur Gärung instande war, wurden später noch folgende Kontrollversuche angestellt:

d) 7.60 ccm Hefenwasser wurden mit 300 mg Ca-Oxy-glykonat und 300 mg Glykose versetzt und in einem sterilen Kölbchen aufgekocht. Nach dem Erkalten wurden wieder 2.4 ccm der sterilen Phosphorsäure-Lösung zugefügt, mit einer Reinkultur von *Saccharomyces cerevisiae* beschickt und 1 ccm in den Gärapparat gebracht.

e) Wie d), nur mit Schwefelsäure anstatt Phosphorsäure.

f) Wie d), nur mit Oxalsäure anstatt Phosphorsäure.

g) Wie d), aber jetzt ohne späteren Säure-Zusatz.

h) 10 ccm Hefenwasser, nur mit 300 mg Glykose beschickt.

Nach 36 Stdn. konnten die folgenden Gasmengen abgelesen werden (bei 22.8° und 758 mm):

Versuch:	d)	e)	f)	g)	h)
ccm CO <sub>2</sub> :	7.0	7.0	6.95	7.0	6.95

In allen diesen Versuchen ist also nur die Glykose, und, wie zu erwarten war, quantitativ in 36 Stdn. von der Hefe vergoren worden. Die Gasmengen änderten sich später nicht mehr. In den Versuchen mit Oxy-glykonsäure tritt keine größere Gasmenge auf.

Es ist also der experimentelle Beweis geliefert, daß die Oxy-glykonsäure *Boutroux'* nicht durch Hefe vergoren werden kann.

Delft, Laborat. f. Mikrobiologie d. Techn. Hochschule im Juli 1925.

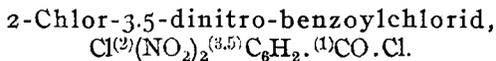
**298. Edward de Barry Barnett:  
Notiz über 2-Chlor-3.5-dinitro-benzamid.**

[Aus d. Sir John Cass Technical Institute, London.]

(Eingegangen am 3. Juni 1925.)

Zincke<sup>1)</sup> hat gezeigt, daß 2-Chlor-3.5-dinitro-benzoesäure bei der Behandlung mit Pyridin leicht in ein quaternäres Salz übergeht. Es erschien mithin wahrscheinlich, daß Amide dieser Säure sich ebenso verhalten würden; so wurde ein Versuch gemacht, Pyridiniumsalze der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anthrachinonylamide darzustellen, um sie auf ihre färberischen Eigenschaften zu untersuchen. Aber in keinem Falle wurde ein Pyridiniumsalz erhalten, ebensowenig führte Erhitzen des Amids selbst und des Anilids mit Pyridin zum Ziel; dabei entstanden vielmehr nur unlösliche, harzige Substanzen.

Da die genannten Amide bisher noch nicht dargestellt worden sind, folgt hier eine kurze Beschreibung ihrer Darstellung und ihrer Eigenschaften.



28 g fein gepulverte 2-Chlor-3.5-dinitro-benzoesäure wurden unter Rückfluß mit 100 ccm Thionylchlorid 4 Stdn. gekocht, und das Thionylchlorid wurde dann auf dem Wasserbad unter vermindertem Druck mög-

<sup>1)</sup> J. pr. [2] 82, 17 [1910].