

305. Carl Neuberg und Maria Kobel: Vorführung der Methylglyoxal- und Brenztraubensäure-Stufe bei der alkoholischen Zuckerspaltung als Demonstrationsversuch.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.]

(Vorgetragen in der Sitzung der Deutschen chemischen Gesellschaft vom 12. Mai 1930; eingegangen am 29. Juli 1930.)

Die von der Gärungstheorie geforderte intermediäre Bildung des Acetaldehyds sowie die Vergärung der Brenztraubensäure lassen sich, wie früher beschrieben wurde¹⁾, als Vorlesungsversuche zeigen. Inzwischen ist es möglich geworden, die voraufgehenden Stufen des biochemischen Zucker-Zerfalls zu fassen. In voller Übereinstimmung mit dem entwickelten und in den letzten 20 Jahren durch Versuche mannigfacher Art gestützten Gärungsschema sind Neuberg und Kobel dazu gelangt, Methyl-glyoxal²⁾ und Brenztraubensäure^{2) 3)} in praktisch 100-proz. Ausbeute des umgesetzten Zuckers zu isolieren. Als Ausgangsmaterial dient zweckmäßig Hexose-diphosphat, und zwar aus folgendem Grunde. Der erste Angriff auf das Zuckermolekül kommt in der Phosphorylierung der Hexose zum Ausdruck. An der Phosphat-Bindung ist ein Coferment beteiligt (H. v. Euler, Myrbäck, Virtanen). Ein damit identisches oder verwandtes Coferment wirkt auch mit bei der Weiterverarbeitung des zunächst erzeugten 3-Kohlenstoff-Körpers Methyl-glyoxal. Um Methyl-glyoxal anzureichern, muß deshalb das normalerweise an seiner Umwandlung beteiligte Coferment entfernt oder abgeschwächt werden. Dabei muß der Apozymase, dem im Idealfall vom Coferment ganz befreiten zymatischen System, die Aufgabe der Phosphorylierung abgenommen sein, d. h. die Versuche sind mit Hexose-phosphorsäure anzustellen. Wir verwenden ihr Magnesiumsalz⁴⁾. Die Schädigung bzw. Beseitigung des Coferments haben wir früher, durch Plasmolyse frischer Hefen, durch Herstellung von Trocken-Hefen, Aceton-Präparaten, Alkohol-Äther-Zubereitungen oder durch Verdünnung bzw. Dialyse von Hefen-macerationssaft vorgenommen; dabei ist stets die Menge des den Zuckerabbau bewirkenden Agens (Glykolase) richtig zu dosieren, insofern als nur wenig Enzym auf viel Substrat zur Anwendung kommen darf. Dann reichert sich Methyl-glyoxal an. Bei Verwendung von mehr Hefe und gegebenenfalls bei längerer Ausdehnung der Versuche tritt an seine Stelle Brenztraubensäure. Jene bewährten Maßnahmen sind für die Anstellung von Demonstrationsversuchen zu zeitraubend.

Bei Heranziehung von plasmolysierenden Agenzien, die abgepreßte Hefe verflüssigen, kann man, auch ohne daß diese Prozedur eigentlich ausgeführt wird, die gewünschten Effekte erzielen, indem man einfach frische obergärige Hefe auf Lösungen von hexose-diphosphorsaurem Magnesium bei Gegenwart bestimmter Plasmolytica einwirken läßt. Als plasmolytische Mittel sind viele Stoffe brauchbar, z. B. Kochsalz, Glycerin, Äther, Essigester, Butyl-

¹⁾ B. 44, 2477 [1911]; Ztschr. f. Botanik 11, 180 [1918]; B.52, 1703 [1919]; Biochem. Zeitschr. 152, 203 [1924].

²⁾ Biochem. Ztschr. 203, 463 [1928]; 210, 466 [1929].

³⁾ Biochem. Ztschr. 216, 493 [1929]; 219, 490 [1930].

⁴⁾ Die Bereitung desselben aus Zucker ist genau bei Neuberg und Kobel in „Oppenheimer-Pincussens Handbuch der Biochemie“, Teil III, Methodik der Fermente, S. 406 [1929] angegeben.

Isobutyl-, Amyl-, Heptyl- und Octyl-alkohol, Benzol, Toluol, Brom-benzol, Tetrachlorkohlenstoff und Chloroform. Sie alle bewirken Methylglyoxal-Anhäufung. Als sicher wirksame und auch zur Ansammlung von Brenztraubensäure geeignete Agenzien empfehlen wir die Benutzung von Toluol oder Brom-benzol. Zur Isolierung von Brenztraubensäure verwende man 10% des Flüssigkeitsvolumens an Hefe, für die Isolierung des Methylglyoxals den 6. Teil dieses Quantum.

Beschreibung der Demonstrations-Versuche.

Versuch 1: Methylglyoxal-Ansammlung.

30 ccm 8-proz. Lösung von Magnesium-hexose-diphosphat (exsiccator-trocken, rund $\frac{1}{3}$ des Gewichts Wasser enthaltend) und 0.5 g frische Bäckerhefe, werden mit 1 oder 2 ccm Toluol in einer Glasstöpselflasche zusammengebracht. Durch gutes Schütteln verteile man die Hefe ganz gleichmäßig. Das Gemisch kommt dann für 1–2 Tage in einen Thermostaten von 37°. Nach 24 Stdn. entnimmt man eine Probe von 10 ccm, entweißt durch Zusatz von 2 ccm 20-proz. Trichlor-essigsäure und filtriert am besten durch ein mit Kieselgur imprägniertes Macherey-Filter oder mangels eines solchen durch ein Baryt-Filter. Zu dem spiegelklaren Filtrat setzt man 2 ccm einer Lösung von 0.5 g 2.4-Dinitro-phenylhydrazin in 30 ccm 2-n. HCl. Augenblicklich trübt sich die Flüssigkeit, und bei kräftigem Umschütteln scheidet sich ein flockiger Niederschlag von Methylglyoxal-bis-2.4-dinitro-phenylhydrazon ab. Nach 1–1 $\frac{1}{2}$ -stdg. Stehen filtriert (oder zentrifugiert) man den orangefarbenen Niederschlag ab und wäscht ihn nacheinander mit n/2-HCl und Wasser gründlich aus. Das Methylglyoxal-Derivat ist sowohl in Salzsäure als in Wasser unlöslich. Bis zu 2 Stdn. liefert durch De-phosphorylierung aus dem Hexose-diphosphat frei gewordener und ev. noch nicht desmolysierter Zucker sowie das Ausgangsmaterial selber mit dem Dinitro-phenylhydrazin in stark salzsaurer Lösung keine unlöslichen Produkte. Die abgeschiedene Verbindung ist somit frei von Abkömmlingen des Zuckers. Unter Umständen kann sie aber — abhängig von dem Zustande der Hefe — bereits Spuren des Brenztraubensäure-hydrazons enthalten. Man wäscht deshalb die Substanz auf dem Filter (oder im Zentrifugen-Becher) mit 25-proz. Lösung von Krystallsoda so lange, bis die abfiltrierte Flüssigkeit ungefärbt ist; alsdann wäscht man den unlöslichen Rückstand mit Wasser aus. Es hinterbleibt praktisch reines Methylglyoxal-bis-2.4-dinitro-phenylhydrazon. Erkannt wird dasselbe durch folgende Reaktion: Man gießt auf die feste Substanz etwa 0.5 proz. alkohol. Kalilauge. Diese färbt sich sofort tief blauviolett und zeigt etwa den Farbton einer starken Methylenblau-Lösung. Ist die Flüssigkeit zu dunkel, so ist sie mit Alkohol zu verdünnen.

Falls in der 24 Stunden entnommenen Probe die sich abscheidende Menge des Methylglyoxal-Derivats nur spärlich sein sollte, digeriert man das Versuchsgemisch noch einen weiteren Tag im Thermostaten und wiederholt die Methylglyoxal-Fällung in einer erneut abgenommenen und entweißten Probe unter Innehaltung derselben Versuchsbedingungen.

Versuch 2: Brenztraubensäure-Ansammlung.

Der Ansatz ist folgendermaßen zusammenzustellen: 30 ccm 8-proz. Lösung von exsiccator-trocknem Magnesium-hexose-diphosphat, 3 g

frische Bäckerhefe, 1–2 ccm Toluol. Nach gleichmäßiger Verteilung der Hefe bewahrt man das Gemenge der Ingredienzien unter öfterem Umschütteln und Lüften des Stopfens (besonders am Anfang) 1–2 Tage bei 37° auf. Nach 24 Stdn. entnimmt man eine Probe von 10 ccm, entweißt (wie zuvor) und fällt das klare Filtrat mit 2 ccm der Dinitro-phenylhydrazin-Lösung, wie bei Versuch 1 beschrieben ist. Der sich beim Umschütteln abscheidende Niederschlag von Brenztraubensäure-2.4-dinitro-phenylhydrazon ist hellgelb und setzt sich schnell als schweres Pulver ab. Nach einstündigem Stehen wird er filtriert oder zentrifugiert, erst mit $n/2$ -HCl und dann mit Wasser ausgewaschen. Der Niederschlag kann je nach der Beschaffenheit der Hefe etwas Methylglyoxal-bis-dinitro-phenylhydrazon, ev. auch etwas Hydrazon des durch carboxylatische Spaltung aus Brenztraubensäure bereits entstandenen Acetaldehyds einschließen.

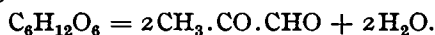
Zur Trennung der Hydrazin-Derivate benutzt man Sodalösung. Das Brenztraubensäure-2.4-dinitro-phenylhydrazon ist darin sehr leicht löslich, das Methylglyoxal-bis-2.4-dinitro-phenylhydrazon (und die Acetaldehyd-Verbindung) ist unlöslich. Bringt man also auf das Filter oder in den Zentrifugen-Becher 3–5 ccm der 25-proz. Sodalösung, so löst sich das Brenztraubensäure-Derivat sofort mit dunkelbrauner Farbe. Man filtriert. Sollte die Lösung nicht klar sein, so muß sie nochmals klar filtriert werden. Aus dem Filtrat wird dann durch Zugabe von Salzsäure bis zum Farbumschlag nach Hellgelb das Dinitro-phenylhydrazon der Brenztraubensäure wieder als hellgelber Niederschlag ausgefällt. Sobald dieser sich abgesetzt hat, wird er erneut filtriert und mit $n/2$ -Salzsäure und Wasser nachgewaschen. Die Erkennung geschieht durch seine Farbreaktion mit alkohol. Kalilauge: In einer 0.5-proz. alkohol. Kalilauge lösen sich schon Spuren der Substanz mit roter, ins Bräunliche spielender Farbe.

Sofern die Menge des nach 24 Stdn. erhältlichen Brenztraubensäurehydrazons gering gewesen ist, so wird die gleiche Probe noch einmal nach weiterem 24-stdg. Stehen des Ansatzes wiederholt.

Statt des für beide Versuche benutzten Toluols kann man sich ebensogut des Brom-benzols bedienen. Am besten nimmt man Parallelversuche mit je 1 und 2 ccm des Plasmolyticums vor. Es bestehen nämlich kleine Unterschiede in der Leistungsfähigkeit der käuflichen Hefen. Nach unseren Erfahrungen eignet sich zur Vorführung der Versuche käufliche Bäckerhefe. Die in Berlin im Handel befindlichen Hefen haben sich uns bewährt; unseres Wissens werden sie von der Firma Sinner und der Norddeutschen Hefenindustrie, Wandsbeck-Hamburg, fabriziert.

Durch Vergrößerung der Gäransätze im beliebigen Maßstabe kann man sowohl das Derivat des Methyl-glyoxals als das der Brenztraubensäure in solchen Mengen erhalten, daß es durch Umkrystallisieren analysenrein gewonnen und eine Bilanz der Umsetzungen aufgestellt werden kann, wie wir das in den letzten 3 Jahren wiederholt durchgeführt haben.

Die Bildung des Methyl-glyoxals, die als erste zur Sprengung der 6-Kohlenstoffkette führende Umsetzung charakterisiert ist, vollzieht sich nach der Gleichung:



Die Bildung der Brenztraubensäure, die eine Oxydationsstufe darstellt, involviert die Entstehung der äquivalenzen Menge eines Reduktions-

produktes. Dieses ist, wie wir nachgewiesen haben³⁾, Glycerin. Die bei Anhäufung der Brenztraubensäure vor sich gehende Reaktion ist demnach folgendermaßen auszudrücken:



Den Zerfall in Methyl-glyoxal bezeichnet man als 5. Vergärungsform, die Zerlegung des Zuckers in äquimolekulare Mengen Brenztraubensäure und Glycerin als 4. Art der Vergärung.

Die beschriebenen, jetzt auf so einfache Art erkennbaren Vorgänge sind Urphänomene des abbauenden, am unmittelbaren Produkt der Assimilation ansetzenden Stoffwechsels. Sie sind demnach nicht auf Hefe beschränkt. Die Entstehung von Methyl-glyoxal, das durch Dismutation sekundär zu Milchsäure stabilisiert wird, ist als der Inbegriff der Glykolyse eine Grunderscheinung des Lebens und dementsprechend mit den Zellen von Mikroben, Pflanzen und Tieren bei analogem Vorgehen nachweisbar.

306. Arvo Juvala:

Über die Reaktionsfähigkeit der Alkenylhalogenide von den Typen $CH_2:CH.[CH_2]_n.X$ und $CH_3.CH:CH.[CH_2]_n.X$

(Eingegangen am 16. Juni 1930.)

Als die früher ausgeführten¹⁾ Bestimmungen der Verseifungs-Geschwindigkeiten von Formiaten und Acetaten der Typen $CH_2:CH.[CH_2]_n.O.CO.R$ gezeigt hatten, daß in diesen homologen Reihen die Entfernung der zwischen den Kohlenstoffatomen befindlichen Doppelbindung von dem Säure-Rest und auch überhaupt ihr ungesättigter Charakter in sehr hohem Maße auf die Reaktionsfähigkeit wirkt, entstand der Gedanke, sich auch mit der Untersuchung der Alkenylhalogenide $CH_2:CH.[CH_2]_n.X$ und $CH_3.CH:CH.[CH_2]_n.X$ in derselben Richtung zu beschäftigen. Von den Stoffen des ersteren Typus wurden die Chloride, in denen $n = 1, 2$ und 3 , und die Bromide, in denen $n = 0, 1, 2$ und 3 , von den Stoffen des letzteren Typus nur die Bromide, in denen $n = 0$ und 1 , untersucht.

Die Reaktions-Bestimmungen wurden bei den Reaktionen dieser Halogenide mit Kaliumjodid und bei den Bromadditionen der Halogenide ausgeführt.

Wenn auch schon früher²⁾ genaue quantitative Bestimmungen der Reaktionsfähigkeit der organischen Halogenide bei den zwischen ihnen und den anorganischen Jodiden stattfindenden Reaktionen ausgeführt worden sind, so hat man doch in dieser Hinsicht von den obenerwähnten Halogeniden nur allein das Allylchlorid $CH_2:CH.CH_2.Cl$ ³⁾ untersucht. Auch Mitteilungen über die Bromadditions-Fähigkeit der ungesättigten Verbindungen.

¹⁾ Palomaa und Juvala, B. **61**, 1770 [1928].

²⁾ Biilmann, C. **1918**, I 1148; Conant und Kirner, Journ. Amer. chem. Soc. **46**, 232 [1924]; van Duin, C. **1924**, II 185; Journ. Amer. chem. Soc. **47**, 585 [1925]; C. **1926**, I 3526; Conant und Hussey, Journ. Amer. chem. Soc. **47**, 476 [1925]; Conant, Kirner und Hussey, Journ. Amer. chem. Soc. **47**, 488, 587 [1925]; Kirner, Journ. Amer. chem. Soc. **48**, 2745 [1926]; **50**, 2446 [1928].

³⁾ Conant, Kirner und Hussey, Journ. Amer. chem. Soc. **47**, 498 [1925].