

cis-1,2,3-Tribenzoyl-cyclopropan. 3 g ω -Diazo-acetophenon werden in 20 ccm *iso*-Amyläther $\frac{1}{2}$ Stunde unter Rückfluß gekocht. Kurz vor Beginn des Siedens tritt äußerst heftige Reaktion unter Aufwallen ein. Bei dem Abkühlen auf Zimmertemperatur setzt sich ein braunroter harziger Niederschlag an den Kolbenwänden ab, von dem man die nunmehr klare Amylätherlösung abgießt. Der Niederschlag wird in 5 ccm Essigester heiß gelöst, die Lösung scheidet nach 3-tägigem Stehen 25 mg *cis-Tribenzoyl-cyclopropan* in weißen glänzenden Nadelchen ab, die nach dem Waschen mit Äther sofort rein sind. Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit einem Präparat anderer Herkunft lagen bei 217—218°.

Auch bei Verarbeitung größerer Mengen von ω -Diazo-acetophenon war nie ein Anhaltspunkt für das Auftreten der von G. Schröter (a. a. O.) beschriebenen, schwer löslichen, hochschmelzenden Verbindung zu finden. Stets war das Rohprodukt in wenig heißem Essigester restlos löslich. Auch die Ausführung der Zersetzung in Xylol lieferte keine anderen Ergebnisse.

[Mitteilungen aus dem Chemischen Laboratorium
der Bayer. Akad. der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 22. Juli 1938.)

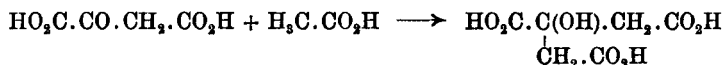
Die aerobe Bildung der Citronensäure aus Essigsäure durch Hefe;

von Robert Sonderhoff† und Michael Deffner.

Wieland und Sonderhoff¹⁾ haben bei der enzymatischen Oxydation von Essigsäure durch Hefe, außer CO₂ und H₂O, den Endprodukten der Oxydation, unter bestimmten Bedingungen *Bernsteinsäure* und *Citronensäure* erhalten, und zwar an *Bernsteinsäure* gegen 5 Proc., an *Citronensäure* etwa 10 Proc. von der umgesetzten Essigsäure. *Bernsteinsäure* wurde sowohl aus Na-Acetat wie auch aus Ba-Acetat erhalten, die *Citronensäure* dagegen nur bei Verwendung

¹⁾ A. 499, 213 (1932).

von Ba-Acetat. Hinsichtlich der Bildung der Citronensäure wurde vermutet, daß sie durch aldolartige Kondensation von Essigsäure und Oxalessigsäure entstanden sei:



In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht, einmal die geeigneten Bedingungen zur Bildung der Citronensäure zu finden, und dann ihre Bildungsweise zu erklären.

Zuerst wurde festgestellt, ob die Citronensäure nur aus Ba-Acetat oder auch aus anderen Acetaten entsteht.

1 g Hefe (Trocken-Gew.), 24 Stunden verarmt. 100 ccm Flüssigkeit. Bei 30° 24 Stunden geschüttelt. In den Ansätzen 1 wurde unter Sauerstoff geschüttelt, bei 2 wurde während des Versuchs Luft durchgeleitet. Die Aufarbeitung geschah in der früher¹⁾ beschriebenen Weise.

Acetat	Mmol		Citronensäure	
	inges.	umges.	in mg	in Proc.
Na 1	60	27,4	—	—
Na 2	60	26,4	4	0,25
K 1	60	33,2	—	—
K 2	60	36,3	20	0,9
Ca 1	59,4	33,2	41	2,0
Ca 2	59,4	50,0	37	1,2
Ba 1	47	14,7	115	13,0
Ba 2	47	7,7	89	19,3

Aus Na- und K-Acetat läßt sich fast keine Citronensäure isolieren, aus Ca-Acetat dagegen bis zu 2 Proc. und aus Ba-Acetat bis zu 20 Proc.

Die Wirkung des Bariumions, das auch die Sauerstoffaufnahme hemmt, beruht wohl darauf, daß es die intermediär gebildete Citronensäure als sehr schwer lösliches Salz²⁾ aus der Reaktionslösung ausfällt und so der weiteren Umsetzung entzieht. Eine Bestätigung dieser Erklärung ist auch die Tatsache, daß die Ausbeuten an Citronensäure steigen, wenn man konzentrierter und bei p_{H} 7—7,4 arbeitet.

Es wurde in der früher beschriebenen Weise bei 30° und mit frischer Hefe oder mit wenigen Stunden lang verarmter Hefe gearbeitet.

¹⁾ R. Sonderhoff u. M. Deffner, A. 525, 136 (1936).

²⁾ 100 g Wasser lösen bei 25° 0,0572 g Ba-Citrat und 0,0959 g Ca-Citrat.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Hefe mikroskopisch auf Bakterien untersucht. Es war entweder keine oder eine sehr geringe, für den Umsatz unwesentliche Infektion vorhanden. Das p_H wurde durch Zusatz von Essigsäure oder Barytlauge verändert und wurde jeweils am Anfang und am Ende des Versuches bestimmt.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt.

*Abhängigkeit der Citronensäurebildung
von der Acetat-Konzentration.*

Hefe Stamm Ra₇. 7 g Trocken-Gew. 22 Stunden geschüttelt.

Mmol Acetat		Konzentration der Lösung	KH ₂ PO ₄ in mg	Citronensäure	
einges.	umges.			in mg	in Proc.
50,8	50	$\frac{m}{4}$	—	833	27,77
50,8	50	$\frac{m}{2}$	—	588	19,6
101,6	—	$\frac{m}{1}$	—	84,35	—
101,6	8,7	$\frac{m}{1}$	100	269,5	~ 50

Bei den zwei letzten Versuchen, Konzentration $\frac{m}{1}$, ist die Essigsäure-Bestimmung ungenau, weil der Umsatz im Vergleich zu der zugesetzten Essigsäure zu klein ist.

Bemerkenswert ist hier die Erhöhung der Ausbeute bei Gegenwart von Phosphat, die aber, wie die folgende Tabelle zeigt, bei geringerer Acetat-Konzentration und mit anderen Hefestämmen nicht in Erscheinung trat.

Abhängigkeit von p_H und Zusatz von Phosphat.

3,5 g Hefe (Trocken-Gew.), 22 Stunden geschüttelt.

Stamm	Mmol Acetat		Kon- zentr.	KH ₂ PO ₄ in mg	p_H		Citronensäure	
	einges.	umges.			Anf.	Ende	in mg	in Proc.
Rw ₆	30	1,4	$\frac{m}{4}$	—	8,0	6,7	25,1	29,9
Rw ₆	30	12,9	$\frac{m}{4}$	—	6,7	7,2	202,3	25,9
Rw ₆	30	29,4	$\frac{m}{4}$	120	6,8	7,5	286,4	16,35
Rr ₇	30	8	$\frac{m}{4}$	—	6,6	7,2	131,9	27,5
Rr ₇	40	40	$\frac{m}{4}$	160	6,7	7,5	502,1	20,9
Rr ₇	40	39	$\frac{m}{4}$	160	7,1	7,5	568	24,2
Rr ₈	30	7,9	$\frac{m}{4}$	—	6,5	7,5	141,3	33,5
Rr ₈	30	2,6	$\frac{m}{4}$	—	7,6	6,3	8,6	5,5
R ₆	20	18	$\frac{m}{5}$	—	7,2	7,7	276,1	25,6
R ₆	20	16,3	$\frac{m}{5}$	—	6,6	7,6	245	25,05
R ₆	20	1,15	$\frac{m}{5}$	—	4,8	4,8	Spuren	—
R ₆	20	1,35	$\frac{m}{5}$	—	3,4	4,0		—
R ₆	30	—	$\frac{m}{3}$	—	4,6	4,6		—
R ₆	30	2,83	$\frac{m}{3}$	—	2,9	3,6		—
R ₆	30	—	$\frac{m}{3}$	—	—	—		—

Der Verlauf der Essigsäure-dehydrierung.

99 Mmol Ba-Acetat wurden in 300 ccm einer Hefesuspension (12 g Trocken-Gew.) gelöst und durch Zusatz von Ba(OH)₂ das p_H auf 7,35 eingestellt. Nach 2 Stunden war das p_H immer noch 7,35. Nach 5, 9, 16 und 24 Stunden wurden jeweils 50 ccm, entsprechend 16,5 Mmol Acetat, entnommen und analysiert.

Nach Stunden	p _H	Mmol Acetat umges.	Citronensäure	
			in mg	in Proc.
5	6,97	2,5	39,5	26,3
9	7,6	5,2	96,2	30,8
16	7,6	6,9	161,0	38,9
24	7,6	8,3	170,0	36,2

Aus diesen Versuchen und anderen, die diese Ergebnisse bestätigen, ziehen wir folgende Schlüsse:

Mit frischer Hefe sind die Umsätze kleiner als mit verarmter Hefe. Es gibt Hefestämme, die bis zur Konzentration $\frac{m}{1}$ die Essigsäure dehydrieren können, andere, die höchstens bis zu $\frac{m}{4}$ diese Fähigkeit besitzen. Die Geschwindigkeit der Dehydrierung ist bei verschiedenen Stämmen verschieden, und es besteht immer eine kurze (2 Stunden) Induktionszeit. Die besten Ausbeuten erhält man bei p_H 7—7,4.

Die Ausbeute beträgt bei einer Konzentration von $\frac{m}{3}$ bis $\frac{m}{5}$ 25—35 Proc. der umgesetzten Essigsäure.

Geringer Zusatz von KH₂PO₄ — auch von Ammoniumnitrat — beschleunigt die Reaktion oft über das 4-fache. Die Ausbeute an Citronensäure ist dabei in Prozent der umgesetzten Essigsäure immer etwas kleiner als ohne Phosphat.

Die Dehydrierung der Essigsäure bei Gegenwart von Äpfelsäure und Zucker.

Chrzaszcz und Zakomorny¹⁾ haben bei der Dehydrierung von Acetat durch Pilze festgestellt, daß ein kleiner Zusatz von l-Äpfelsäure oder Zucker — 5 Proc. der zugesetzten Acetat-Menge —, eine große Erhöhung der Citronensäure-Ausbeute bewirkt, und zwar um ~ 300 Proc. In dieser Tatsache sehen sie einen Beweis für die zuerst von Chrzaszcz und Tiukow²⁾ vorgeschlagenen Theorie, daß die Citronensäure durch Dehydrierung von je 1 Mol Äpfelsäure und Essigsäure entsteht.

¹⁾ Bio. Z. 285, 348 (1936).

²⁾ Bio. Z. 229, 343 (1930).

Wir haben analoge Versuche mit Hefe angestellt, deren Ergebnisse in den folgenden Tabellen wiedergegeben sind.
2 g Hefe (Trocken-Gew.), 16 Stunden geschüttelt. Konzentration $\frac{m}{5}$.

Mmol Acetat		l-Äpfelsäure (als Ba-Salz) in mg	Zucker in g	Citronensäure	
inges.	umges.			in mg	in Proc.
22	22	75	—	150	11,4
22	22	—	—	101	7,6
30	17,9	—	—	204,8	19,06
30	2,8	—	1,8	94,5	56,3

Es wurden auch Versuche angestellt, bei denen die Äpfelsäure am Ende des Versuches nach F. B. Straub¹⁾ bestimmt wurde.

2 g Hefe, 15 Stunden geschüttelt. Konzentration $\frac{m}{10}$.

Mmol Acetat		mg l-Äpfelsäure		Citronensäure	
inges.	umges.	inges.	umges.	in mg	in Proc.
50	34,4	150	19,3	308	14,9
50	40,6	—	—	258	10,6

Mit einer Hefe (Stamm Rr₇), die Essigsäure sehr schlecht dehydrierte, wurde folgendes Ergebnis erhalten.

2,5 g Hefe, 22 Stunden geschüttelt. Konzentration $\frac{m}{3}$.

Mmol Acetat		l-Äpfelsäure in mg	BaCl ₂ in mg	pH		Citronensäure in mg
inges.	umges.			Anf.	Ende	
20	wenig	—	—	6,6	6,2	57,3
20	4	60	—	6,6	7,2	129,0
20	wenig	—	110	6,6	6,3	62,0

Obwohl wir bei Zusatz von l-Äpfelsäure stets eine größere Ausbeute an Citronensäure bekommen haben und in einigen Fällen, wo die Hefe kaum die Fähigkeit hatte, Acetat zu dehydrieren, durch Zusatz von Äpfelsäure einen kleinen Umsatz feststellen konnten, glauben wir nicht, daß bei der Hefe der Hauptweg der Citronensäurebildung nach der Annahme der polnischen Autoren verläuft. Die zugesetzte Äpfelsäure wird kaum abgebaut und die Ausbeute ist, was zu erwarten wäre, meist kaum größer als ohne sie.

¹⁾ H. 244, 123 (1936).

In geringer Menge stört Äpfelsäure die Citronensäure-Bestimmung nach Kometiani nicht; bei Gegenwart größerer Mengen findet man immer zu wenig Citronensäure.

Die Dehydrierung der Essigsäure
bei Gegenwart von Oxalessigsäure oder Alkohol.

Obwohl nach früheren Versuchen von Wieland und Sonderhoff¹⁾ eine Kondensation von Essigsäure und Oxalessigsäure zu Citronensäure durch Hefe *anaerob* nicht zustande kommt, haben wir gleichartige Versuche wie mit Äpfelsäure auch mit Oxalessigsäure angestellt.

Um in kurzer Zeit größere Umsätze zu erhalten, wurde die Hefe vorher verarmt. Die Oxalessigsäure wurde mit Ba(OH)₂ neutralisiert und in 5 Portionen zugegeben.

Da ein Zusatz von geringen Mengen Alkohol die Dehydrierung der Essigsäure um das Vielfache beschleunigt²⁾, wurden auch parallele Versuche mit Alkohol-Zusatz angestellt.

Die Hefe wurde 2-mal gewaschen und zentrifugiert, 15 Stunden verarmt und noch einmal zentrifugiert. Der Versuch mit ^m/₅-Ba-Acetat lief 9 Stunden.

Stamm	Mmol Acetat		Oxalessigs. in mg	Alkohol Mmol	Citronensäure		Bernsteinsäure	
	inges.	umges.			in mg	in Proc.	in mg	in Proc.
Ra ₅ 1,5 g Tr.-Gew.	40	5,5	—	—	68,3	20,7	10	3
	40	12	120	—	145,0	20,1	—	—
	50	28	—	0,5	304,5	18,1	183	10,9
Ra ₇ 2,5 g Tr.-Gew.	40	13,3	—	—	170,6	21,4	27,3	3,4
	40	23,0	120	—	376,0	27,3	—	—
	40	28,9	—	0,5	381,5	22,0	195,3	11,3
Z ₄ 3,5 g Tr.-Gew.	40	39,3	—	—	297,5	12,6	—	—
	40	38,5	120	—	448,0	19,4	—	—
	—	—	120	—	—	—	—	—

Die Bernsteinsäure wurde nur in einem Teil der Versuche bestimmt.

Es wurde noch folgender Versuch angestellt.

Hefe Stamm Ra₅, wie oben behandelt, 2,5 g Trocken-Gew. Konzentration ^m/_{6,5}.

a) 40 Mmol Acetat. Nach 5 Stunden wurde ein Teil analysiert. 19,2 Mmol Acetat abgebaut — bezogen auf die ganze Menge. Citronensäure 104 mg bzw. 11,2 Proc.

¹⁾ A. 503, 69 (1933).

²⁾ A. 536, 58 (1938).

Nach 8 Stunden alle Essigsäure abgebaut, Citronensäure 414,7 mg bzw. 17,3 Proc.

b) wie a) + 120 mg Oxalessigsäure. Nach 5 Stunden 21,4 Mmol Acetat abgebaut. Citronensäure 177,45 mg bzw. 13,9 Proc. Nach 8 Stunden alle Essigsäure abgebaut. Citronensäure 566,2 mg bzw. 23,6 Proc.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß ein Zusatz von 0,5 Mmol Alkohol den Umsatz an Essigsäure um das 2- bis 6-fache steigert. Die proc. Ausbeute an Citronensäure bleibt dieselbe, dagegen wird die Ausbeute an Bernsteinsäure fast 4-mal so groß.

Der Zusatz von Oxalessigsäure beschleunigt in vielen Fällen die Essigsäuredehydrierung, und die Ausbeute an Citronensäure erhöht sich bis zu 50 Proc.

Versuche mit Oxalessigsäure und Brenztraubensäure.

Nach F. Knoop und C. Martius¹⁾ war noch an die Möglichkeit der Bildung der Citronensäure aus Brenztraubensäure und Oxalessigsäure zu denken. In einer großen Reihe von Versuchen mit Hefe und Ba-pyruvat + Ba-oxalacetat wurde sichergestellt, daß aus diesen Komponenten keine Citronensäure entsteht. Es wurde zwar am Ende der Versuche nach Kometiani Citronensäure scheinbar bestimmt, wir konnten sie aber nicht als Chininsalz isolieren. Aus den Ba-Salzen der Brenztraubensäure und Oxalessigsäure entsteht nämlich auch ohne Hefe die Verbindung $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{C}(\text{OH})(\text{COOH}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$, die mit Brom ebenfalls Pentabromaceton liefert. Demnach wird dieses Kondensationsprodukt von Hefe nicht abgebaut. Wir möchten nur 2 Versuche erwähnen.

2 g Hefe (Trocken-Gew.), 2 Stunden verarmt. 16 Stunden geschüttelt. 1,76 g frisch destillierte Brenztraubensäure + 2,64 g Oxalessigsäure in 600 ccm Wasser gelöst und mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ titriert. Nach Kometiani wurden, auf Citronensäure berechnet, 714 mg gefunden, außerdem 0,3077 g unveränderte Brenztraubensäure (als Dinitrophenylhydrazon bestimmt). Die Reaktionsflüssigkeit wurde i. V. auf 50 ccm eingedampft. Durch Äther-Extraktion wurden 0,8378 g einer öligen Säure erhalten.

¹⁾ H. 242, I (1936).

die, über das Quecksilbersalz gereinigt, nicht krystallisierte. Mit BaCl_2 wurde aus essigsaurer Lösung + Alkohol das Ba-Salz gefällt. ($\text{Ba} = 42,78$, $\text{C} = 22,7$, $\text{H} = 2,01$). Es handelt sich offenbar um eine polymerisierte Brenztraubensäure. Die gereinigte Säure gab kein Pentabromaceton. Dieses wurde aus der verbleibenden wäßrigen Lösung mit Brom gefällt. Jedoch ließ sich aus dieser Lösung kein krystallisiertes Chininsalz erhalten. Es lag also keine Citronensäure vor.

Derselbe Ansatz wurde mit 8 g Hefe (Trocken-Gew.) wiederholt. Nach Kometiani 705,6 mg Citronensäure. Es ließ sich auch hier keine Citronensäure als Chininsalz isolieren.

Daß aus Oxalessigsäure und Brenztraubensäure keine Citronensäure entsteht, beweisen auch unsere Befunde mit Tridenteroessigsäure¹⁾. Dagegen sind diese mit der Theorie der Bildung der Citronensäure aus Essigsäure und Oxal-essigsäure vereinbar.

Die Tatsache, daß die Citronensäure anaerob durch Bakterien zu Essigsäure und Oxalessigsäure abgebaut wird²⁾, macht es wahrscheinlich, daß sie aerob aus diesen Bestandteilen gebildet wird. Dafür spricht außerdem die Feststellung, daß bei Gegenwart von Oxalessigsäure die Essigsäure schneller dehydriert wird und gleichzeitig mehr Citronensäure liefert. Man könnte sich vorstellen, daß der anaerobe Versuch deshalb negativ verläuft, weil der Essigsäure die zur Kondensation erforderliche Anregungsenergie fehlt, die ihr beim aeroben Abbau, der ja wahrscheinlich über Bernsteinsäure und die ihr folgenden Dicarbonsäuren immer wieder zur Essigsäure zurückführt, zuteil wird.

Michael Deffner dankt der Universität Athen für das ihm gewährte Stipendium aus der Voltos-Stiftung.

¹⁾ R. Sonderhoff u. H. Thomas, A. 530, 200 (1937); Z. f. Elektr. 44, 94 (1938).

²⁾ M. Deffner, A. 536, 44 (1938).