

Versuche über die bei der Fäulnis von l-Asparaginsäure entstehenden Abbaustufen. Eine neue Methode zum Nachweis von β -Alanin.

Von

Emil Abderhalden und Andor Fodor.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.)
(Der Redaktion zugegangen am 12. April 1913.)

Die Asparaginsäure ist schon verschiedentlich der Fäulnis unterworfen worden. Als Abbaustufen werden genannt: Bernsteinsäure, Propionsäure, Ameisensäure¹⁾ und β -Alanin.²⁾ Hervorgehoben seien besonders die Arbeiten von Carl Neuberg und Cesare Cappezzuoli und ferner von Ackermann. Wir wollen gleich erwähnen, daß wir bei der Fäulnis der Asparaginsäure Bernsteinsäure, Propionsäure und Ameisensäure mit Sicherheit nachweisen konnten und damit besonders die Angaben von Neuberg und Cappezzuoli bestätigen können. Beim Nachweis der genannten Verbindungen hat uns die Estermethode ausgezeichnete Dienste erwiesen. Sie ist ohne Zweifel zur Trennung von Säuren, die als Abbaustufen bei der Fäulnis von Aminosäuren usw. entstehen, ganz ausgezeichnet geeignet und in vieler Beziehung den bisher angewandten, zum Teil sehr umständlichen Isolierungsmethoden überlegen. Von besonderem Vorteil ist der Umstand, daß die unveränderten Aminosäuren bei der Veresterung Esterchlorhydrate bilden, während die desaminierten Säuren gleich die freien Ester ergeben. Diese lassen sich leicht von den Esterchlorhydraten

¹⁾ Carl Neuberg und Cesare Cappezzuoli, Biochemische Umwandlung von Asparagin und Asparaginsäure in Propionsäure und Bernsteinsäure. Biochemische Ztschr., Bd. 18, S. 424, 1909. Vgl. weitere Literatur: O. Neubauer, Biochemisches Handlexikon, Bd. 4, S. 363, 1911.

²⁾ D. Ackermann, Über das β -Alanin als bakterielles Aporrhagma. Z. f. Biologie, Bd. 56, S. 87, 1911.

z. B. mittels Äther trennen. Man kann auch, bevor man die Veresterung vornimmt, mit Wasserdampf destillieren, um niedere Fettsäuren zu entfernen. Selbstverständlich kann man auch basische Produkte mit Phosphorwolframsäure usw. abscheiden und die nicht fällbaren Produkte der Veresterung unterwerfen.

Wie Neuberg¹⁾ auch schon hervorgehoben hat, ist es nicht ganz leicht, Fäulnisversuche unter gleichen Bedingungen durchzuführen. Unsere Erfahrungen ergeben die strikte Forderung, daß jeweilen außer den Versuchsbedingungen genau angegeben wird, welche Mikroorganismen in der Fäulnisflüssigkeit vorhanden waren. Wir haben diese unerläßliche Forderung zunächst in der Art erfüllt, daß wir am Schlusse des Versuches eine exakte bakteriologische Untersuchung vornehmen ließen. Vielleicht genügt das noch nicht, denn es ist wohl möglich, daß im Laufe des Versuches bestimmte Mikroorganismen, die anfangs wirksam und für den Verlauf des Abbaus entscheidend waren, von anderen Arten ganz überwuchert worden sind. Man müßte, streng genommen, an jedem Tage eine Analyse der anwesenden Mikroorganismen vornehmen. Ferner wäre zu prüfen, ob Reinkulturen bestimmte Arten des Abbaus hervorbringen, oder ob die Zusammenarbeit mehrerer Mikroorganismenarten zur Bildung bestimmter Abbaustufen notwendig ist. Die bloße Angabe, daß Fäulnis erzeugt worden ist, genügt keinesfalls, wenn man Resultate festlegen will, die stets wieder unter den gleichen Bedingungen gefunden werden sollen. Es liegt hier noch ein sehr großes Forschungsgebiet vor, das der Vertiefung ganz außerordentlich bedarf.

Ackermann hat mitgeteilt, daß bei der Fäulnis von Asparaginsäure β -Alanin entsteht. Er isolierte diese Verbindung nach Anwendung des Verfahrens von Kutscher als Platinsalz. Wir haben auf einem ganz anderen Wege versucht β -Alanin unter den Abbauprodukten der Asparaginsäure festzustellen. Wir stellten die Ester

¹⁾ Carl Neuberg, Biochemische Umwandlungen von α -Pyrrolidin-carbonsäure in n-Valeriansäure und δ -Aminovaleriansäure. Biochem. Ztschr., Bd. 37, S. 490 (500), 1911.

der entstandenen Verbindungen dar und benutzten die leichte Überführbarkeit des β -Alaninesters in Acrylsäureester, um die erwähnte Aminosäure zu identifizieren. Schon Spuren von Acrylsäureester sind am Geruch zu erkennen.

Zunächst studierten wir die Eigenschaften des β -Alanins und stellten dessen Ester dar. Ferner stellten wir fest, daß es leicht gelingt, β -Alanin, das einem Fäulnisgemisch zugesetzt wird, wieder aufzufinden.

Es ist uns in keinem Falle geglückt, auch nur Spuren von β -Alanin bei der Fäulnis von Asparaginsäure nachzuweisen. Selbstverständlich wollen wir damit nicht die Angaben von Ackermann in Zweifel ziehen. Unser Befund beweist nur in völlig eindeutiger Weise, daß unter den vorhandenen Bedingungen keine Spur von β -Alanin entstanden ist resp. nachweisbar war. Wünschenswert ist es, wenn Ackermann in Zukunft genaue Angaben über die bei seinen Versuchen wirksamen Bakterien macht und die Gewinnung der Abbaustufen eingehender beschreibt.

Die Details der Versuchsanordnung und der Methodik ergeben sich aus den folgenden Daten.

Darstellung von β -Alanin.

100 g β -Jodpropionsäure (Kahlbaum) wurden unter Kühlung in der 10fachen Menge 25%igen Ammoniaks aufgelöst und die Lösung 8 Tage hindurch bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung bei 14 mm Druck eingeeengt und die konzentrierte Lösung mit Bleioxyd am Wasserbade eingedampft.

Das Filtrat vom Bleijodid und vom überschüssigen Fällungsmittel wurde mit Schwefelwasserstoff entbleit und das Filtrat vom Bleisulfid bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgelöst und die Lösung mit überschüssigem Alkohol zur Fällung gebracht. Das zunächst ausfallende, hellgelbe Öl wurde zum zweiten Male mit Alkohol umgefällt, und das wiederum als Öl ausgefallene Produkt längere Zeit in der Kälte aufbewahrt, wobei es all-

mählich krystallinisch wurde. Die Krystalle wurden abgesaugt, mit verdünntem Alkohol gewaschen und behufs Reinigung in wenig Wasser gelöst und die Fällung mit Alkohol wiederholt. Auf diese Weise wurden 12 g ganz reines, in schönen farblosen Nadeln krystallisiertes β -Alanin vom Schmp. 200° dargestellt. Die verschiedenen Mutterlaugen lieferten noch weitere 10 g des gleichen Körpers, jedoch von minderem Reinheitsgrad.

Darstellung von β -Alanin-äthylesterchlorhydrat.

8 g des bei 200° schmelzenden β -Alaninpräparates wurden in der 3fachen Menge absoluten Alkohols suspendiert und in das Gemisch bei Eistemperatur trockenes Salzsäuregas eingeleitet. Während des Einleitens wurde eine deutliche Änderung des Krystallhabitus der Suspension beobachtet. Eine dem Reaktionsgemisch entnommene kleine Probe zeigte eine leichte Löslichkeit in warmem Alkohol, eine Eigenschaft, die dem ursprünglichen Produkt nicht zukommt. Noch vor der vollständigen Sättigung mit dem Salzsäuregas wurde daher das Einleiten unterbrochen und das Reaktionsgemisch etwa eine Stunde lang bei tiefer Temperatur aufbewahrt. Hierauf wurden die Krystalle abgesaugt. Das Filtrat verriet schon während des Filtrierens eine starke Neigung zur Krystallisation, indem an dem Kolbenrand prachtvoll ausgebildete, eisblumenartige Krystalle zur Ausscheidung gelangten.

Der mit Alkohol gewaschene Filtrerrückstand besaß nach dem Trocknen im Exsikkator $F. = 120^{\circ}$ (unkorr.) und erwies sich nach den Eigenschaften als β -Alaninchlorhydrat.^{1) 2)} Dieses Produkt wurde für sich weiter behandelt. Zu diesem Zwecke wurde es mit einer neuen Alkoholmenge unter beständiger Eiskühlung so lange mit Salzsäuregas behandelt, bis es vollständig in Lösung ging. Die hellgelbe Lösung wurde

¹⁾ F. H. Holm, Archiv f. Pharmazie, Bd. 242, S. 590 (1904); zitiert nach dem Biochemischen Handlexikon, Bd. 4, S. 733.

²⁾ F. Lengfeld und J. Stieglitz, Amer. Chem. Journ., Bd. 15, S. 507 (1893). Die Autoren fanden für β -Alaninesterchlorhydrat $F. = 65,5^{\circ}$ (Korr. ?); zitiert nach dem Biochemischen Handlexikon, Bd. 4, S. 733.

bei vermindertem Druck bis zur Sirupdicke eingedampft und der Rückstand mit überschüssigem Äther zur Krystallisation gebracht. Der so entstandene, dicke Brei von farblosen, perlmutterartig glänzenden Blättchen wurde durch ein gehärtetes Filter abgesaugt und der Filtrerrückstand mit Äther gewaschen und getrocknet. Behufs vollständiger Reinigung wurde nochmals in wenig Alkohol gelöst und die Ätherfällung wiederholt. Auf diesem Wege wurden 3,2 g eines bei 64^{01} (unkorr.) schmelzenden Produktes erhalten. Die sich bei diesen Operationen ergebenden Filtrate wurden vereinigt, eingedampft und der Rückstand, bestehend aus einer sirupösen Masse, mit dem ursprünglichen, vom β -Alaninchlorhydrat abgetrennten Filtrate in Lösung gebracht. Diese wurde, gleichfalls unter Eiskühlung, mit Salzsäuregas gesättigt, die gesättigte Lösung unter vermindertem Druck eingedampft und, wie oben geschildert, weiterbehandelt. Die Ausbeute an β -Alanin-äthylesterchlorhydrat betrug in diesem Falle 3,5 g. Das Produkt besaß nach der doppelten Umfällung seiner konzentrierten alkoholischen Lösung mit Äther $F. = 64^{\circ}$.

Analyse ($F. = 64^{\circ}$).

0,1356 g Subst. nach Volhard: 8,94 ccm n_{10} -AgNO₃.

0,1098 » » » Kjeldahl: 7,30 » n_{10} -H₂SO₄.

Berechnet f. β -Alanin-äthylesterchlorhydrat (C₅H₁₁O₂NHCl, Mol.-Gew. 153,56): 23,09% Cl, 9,12% N.

Gefunden: 23,38% Cl, 9,31% N.

Die reine Substanz ist nach zwei Monate langem Aufbewahren im Exsikkator über Schwefelsäure unverändert geblieben.²⁾

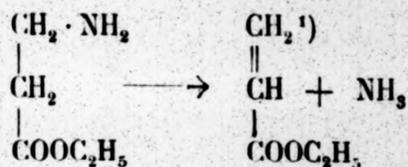
Infreiheitsetzung des β -Alaninäthylesters.

6 g des reinen Esterchlorhydrats wurden in 15 ccm absoluten Methylalkohol aufgelöst. Die Lösung wurde mit einer dem Chlorgehalte entsprechenden genau berechneten Menge norm. Natriummethylatlösung versetzt. Bei dieser Operation wurde

¹⁾ vgl. F. Lengfeld und T. Stieglitz, l. c.

²⁾ F. H. Holm (loc. cit.) gibt die Unbeständigkeit dieser Substanz bei längerem Stehen im Exsikkator an.

Kühlung angewendet. Die sich bald abscheidenden Kochsalzkrystalle wurden durch ein Faltenfilter abfiltriert. Dann wurde das Filtrat bei 14 mm destilliert. Zunächst ging bei 25° Badtemperatur der Methylalkohol über. Aus der konzentrierten Lösung schieden sich weitere Kochsalzmengen aus, so daß eine zweite Filtration notwendig wurde. Nach völligem Abdunsten des Methylalkohols wurde der Rückstand möglichst rasch auf 70° Badtemperatur erwärmt. Bei 12 mm Druck destillierte bei 54° (unkor.) konstanter Temperatur eine farblose Flüssigkeit über (3 g). Sie roch typisch nach Aminosäureestern und besaß stark alkalische Reaktion. Daneben war ein Geruch nach Ammoniak deutlich zu empfinden. Es stellte sich bei zahlreichen Wiederholungen dieser geschilderten Destillation heraus, daß diese Operation mit einer teilweisen Zersetzung des β -Alaninesters verbunden ist. Die Produkte dieser Zersetzung sind einerseits das entweichende Ammoniak und andererseits der ölige Rückstand der Destillation. Derselbe reduziert kräftig Kaliumpermanganatlösung. Erwärmt man den Rückstand unter gewöhnlichem Druck ganz allmählich, so entwickeln sich äußerst stechend riechende Dämpfe, die bei 100—105° überdestillieren. Dieselben stellen die charakteristisch riechenden Dämpfe des Acrylsäureesters dar, der seine Bildung der Zersetzung des β -Alaninesters, im Sinne der Gleichung



zu verdanken hat. Da die Temperatur während der Destillation des rückständigen Acrylsäureesters allmählich bis 200° ansteigt, so deutet dies auf eine allmähliche Veränderung dieser Substanz beim Erhitzen hin. (Offenbar wird diese Zersetzung durch Verunreinigungen begünstigt.)

¹⁾ In Beilsteins Handbuch (Bd. 1, S. 501) findet sich die Angabe, daß umgekehrt Acrylsäureester die Fähigkeit besitzt, sich mit alkoholischem NH_3 zu β -Alaninester zu verbinden. Vgl. Caspary, Tollens, Annalen der Chemie, B. 167, S. 248.

Der β -Alaninester wurde der Rektifikation unterworfen. Der Siedepunkt war bei 14 mm 58° (unkorr.).

Wesentlich ist die Beobachtung, daß auch hier wieder eine partielle Zersetzung unter Ammoniakabspaltung auftrat, unter Hinterlassung von Acrylsäureester. Die Menge des zersetzten Anteiles betrug ungefähr $\frac{1}{3}$ der ganzen Menge und wird wohl, in Anbetracht des Umstandes, daß der Siedepunkt bei 12–14 mm und der Zersetzungspunkt sehr nahe beisammen liegen, stets von der Geschwindigkeit der Destillation abhängig sein.

Analyse.

Zur Analyse wurde eine Probe des Esters im guten Vakuum (12 mm) bei gewöhnlicher Temperatur mittels einer Kapillare durchgelüftet, um eventuell aufgelöstes Ammoniak auf diesem Wege zu entfernen.

0,1380 g Öl: 12,05 ccm n_{10}° -H₂SO₄ (n. Kjeldahl).

Ber. f. β -Alaninäthylester (C₅H₁₁O₂N = 117,09): 11,96% N.

Gef. 12,23% N.

Eigenschaften des β -Alaninäthylesters.

Eine sehr scharfe Reaktion schon auf ganz geringe Mengen dieses Körpers besteht im Auftreten der stechend riechenden Acrylsäuredämpfe beim Überhitzen. Man nimmt diese Probe am geeignetsten in einem ganz kleinen Reagenzglase vor. Daneben entweicht Ammoniak. Erwärmen mit Natronlauge auf mäßige Temperatur bewirkt die gleiche Erscheinung.

Auch das Chlorhydrat des Esters zeigt beim Erwärmen das gleiche Verhalten, nur sublimiert hier, statt des Entweichens von Ammoniak, Ammonchlorid fort.

Beim längeren Aufbewahren in einem geschlossenen Gefäß verwandelte sich der Ester in eine farblose Krystallmasse, die nicht näher untersucht wurde.

Die Infreiheitsetzung des β -Alaninesters läßt sich ebenso glatt nach der Methode von E. Fischer, d. h. mit Natronlauge + Kaliumcarbonat und Ausäthern, bei tiefer Temperatur, vornehmen. Man muß hierbei nur auf besonders rasche Opera-

tion Gewicht legen. Die Ausbeute an β -Alaninester war bei Anwendung dieser Methode ziemlich die gleiche, wie bei der oben beschriebenen.

In diesem Zusammenhange sei die Beobachtung erwähnt, daß reines β -Alanin gegenüber Alkalien sehr wenig widerstandsfähig ist. Diese Eigenschaft tritt insbesondere in der Wärme hervor. Beim gelinden Erhitzen einer kleinen Probe von β -Alanin mit einigen Tropfen verdünntem Alkali entweicht NH_3 . Beim Erhitzen mit Bleioxyd ebenfalls. Auf diese Art ist es verständlich, weshalb die Ausbeuten an β -Alanin bei seiner Darstellung aus β -Jodpropionsäure und Ammoniak und nachherigem Fällen des Jodes mit Bleioxyd in der Wärme so geringe sind. Offenbar zersetzt sich ein wesentlicher Teil bei diesem Vorgang. Es wäre daher viel geeigneter, das Halogen mit Silbersulfat zu fällen, mit Schwefelwasserstoff zu entsilbern und die Schwefelsäure mit Barythydrat vorsichtig als Baryumsulfat abzuscheiden.

Die mit verdünnten Alkalien oder Bleioxyd erwärmten β -Alaninlösungen reduzieren KMnO_4 -Lösung bereits in der Kälte momentan. Das ursprüngliche β -Alaninpräparat zeigte dieses Verhalten nicht.

Ein weiterer Versuch zeigte, daß eine schwach sodaalkalische, verdünnte β -Alaninlösung nach 4 stündigem Verweilen im Brutschrank bei 38° nicht verändert wird. Wenigstens zeigte diese Lösung im Vergleich mit der neutralen Kontrollösung in bezug auf das Verhalten zu KMnO_4 -Lösung keinen merkbaren Unterschied.

Fäulnis von Asparaginsäure.

Versuch I.

Zum Versuch wurden folgende zwei Lösungen angesetzt:

Lösung A. ¹⁾	50 g Asparaginsäure in berechneter Menge Sodalösung gelöst,	} Auf 2 l verdünnt und konzentrierte Sodalösung bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzugefügt.
	5 g Pepton Witte,	
	10 „ Glukose (wasserfrei),	
	2,5 „ NaCl,	
	Spuren von MgSO_4 ,	
	„ „ Na_2HPO_4 .	

¹⁾ D. Ackermann, l. c.

Lösung B. (Kontrollversuch).

5 g Pepton Witte,
10 » Glukose (wasserfrei),
2,5 » NaCl,
MgSO₄ und Na₂HPO₄ wie oben.

In 2 l H₂O gelöst
und mit Sodalösung
schwach alkalisch
gemacht.

Beide Lösungen wurden aus technischen Gründen in Flaschen zu je 500 ccm umgefüllt, die einzelnen Portionen mit gefaulter Rinderpankreasdrüse geimpft und sodann 35 Tage im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Schon nach etwa 5 Tagen konnte man in Lösung A eine deutliche Ammoniakentwicklung wahrnehmen, welche Beobachtung durch das Bläuen von Lackmuspapier bestätigt wurde. Diese Lösungen nahmen außerdem bereits nach ungefähr einer Woche einen intensiven Fäulnisgeruch an. In den Kontrollflüssigkeiten setzten diese beiden Erscheinungen, Ammoniakentwicklung und Fäulnisgeruch, um etwa 8 Tage später ein. Beide Lösungen wurden durch das Wachsen der Fäulnisbakterien stark getrübt, und es entstand an den Böden der einzelnen Flaschen ein dicker schlammiger Bodensatz.

Der Vorgang der Desaminierung wurde von Zeit zu Zeit durch N-Bestimmungen nach Kjeldahl verfolgt.

Die folgende Tabelle zeigt die Stickstoffverluste während der Fäulnisperiode an:

	N-Gehalt	
	Lösung A	Lösung B
Vor Beginn des Versuchs	6,2240 g N	0,9594 g N
Für Analysenproben entnommen . . .	0,1977 » »	0,0258 » »
Am Schluß des Versuchs	4,5593 » »	0,6366 » »
Als NH ₃ während des Versuches entwichen	1,4670 » »	0,5665 » »

Wie die Weiterbehandlung der beiden Lösungen erweisen wird, bestand der Hauptanteil der am Schlusse des Fäulnisversuches vorhandenen Stickstoffmengen gleichfalls aus Ammoniakstickstoff, das offenbar als Ammoniumcarbonat in Lösung gehalten wurde. Die für die Bildung des letzteren erforderliche Kohlensäure entstammte der Verbrennung von organischer Substanz durch die Mikroorganismen.

Verarbeitung von Lösung A.

Die am Ende des Versuches 1840 ccm betragende filtrierte Lösung wurde behufs Austreibung des darin enthaltenen Ammoniaks unter Minderdruck bei 40° zur Trockene verdampft. Am Schlusse wurde zur trockenen Masse absoluter Alkohol hinzugefügt und das Verdampfen wiederholt. Der Trockenrückstand wurde in 450 ccm Wasser aufgenommen und in einem aliquoten Teil der Lösung der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Er betrug 0,2660 g. Die Differenz d. h. 4,2933 g N ist während des Eindampfens der schwach sodaalkalischen Lösung als NH_3 entfernt worden.

Die Lösung wurde jetzt mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und zur Bestimmung der bei der Fäulnis entstandenen flüchtigen Säuren mit Wasserdampf destilliert. Es wurden 6 l Destillat aufgefangen. Er reagierte stark sauer und roch nach niederen Fettsäuren.

25 ccm des Destillates verbrauchten gegen Phenolphthalein als Indikator 1,84 ccm $n/10$ -NaOH; auf 6000 ccm entfallen somit 44,16 ccm norm. Lauge.

Das Destillat wurde mit der berechneten Menge norm. NaOH neutralisiert (die Flüssigkeit, zu der Phenolphthalein gegeben wurde, war schwachrot) und hierauf bei 40° unter Minderdruck bis 100 ccm eingedampft. Eine Probe dieser Lösung wurde mit Mercurisulfat in schwach schwefelsaurer Lösung auf Ameisensäure geprüft. Die Reaktion fiel positiv aus.

Der Rest der alkalischen Lösung wurde hierauf zur Trockene verdampft und der sirupöse Rückstand am Wasserbade nochmals mit absolutem Alkohol eingedunstet. Der nunmehr trockene Rückstand wurde mit Alkohol extrahiert und der Extrakt heiß filtriert. Das Filtrat gab nach kurzem Eindampfen beim Abkühlen eine krystallinische Ausscheidung, die abgesaugt, zunächst mit Alkohol, dann mit Äther gewaschen wurde (2 g). Die Mutterlauge gab noch weitere 2 g des Natriumpropionates.¹⁾ Daneben waren nicht unerhebliche Mengen Natriumformiat zugegen.

¹⁾ C. Neuberg und C. Cappezzuoli. l. c.

Die aus der Dampfdestillation hervorgehende schwefelsaure Lösung wurde mit norm. NaOH schwach alkalisch gemacht, um die Schwefelsäure an das Alkali zu binden, und hierauf mit verdünnter Salzsäure übersäuert. Die salzsaure Lösung wurde bei 40° und Minderdruck vollständig verdampft und der teilweise flüssige, teilweise salzartige Rückstand mit 300 ccm absolutem Alkohol versetzt. Das Gemisch wurde unter ständiger Eiskühlung mit trockenem Salzsäuregas gesättigt und während des Einleitens dauernd umgeschüttelt. Die an der Kolbenwand haftende Salzkruste hatte sich nach kurzer Zeit vollständig losgelöst, so daß die ganze Salzmasse bequem abgesaugt werden konnte. Der Filtrerrückstand enthielt nur anorganische Salze. Das violett-rot gefärbte Filtrat wurde nochmals unter Eiskühlung mit Salzsäure gesättigt und hierauf bei 35° im Vakuum eingedampft. Der Verdampfungsrückstand stellte ein dunkelrotbraunes, nicht zu dickflüssiges Öl dar. Es wurde in einem Scheidetrichter mit Äther erschöpfend ausgezogen und der hellgelbe ätherische Auszug mit Magnesiumsulfat entwässert. Der getrocknete Auszug wurde verdampft und ein hellgelber Ölrückstand erhalten, der ohne Vorlauf und beinahe restlos bei 115 bis 120° (gew. Druck) in farblosen Tropfen überdestillierte (Gewicht 24 g). Nach dem Siedepunkt und den Reaktionen (positive Pyrrolreaktion nach Neuberg) ist dieses Produkt Bernsteinsäureester. Zur Identifizierung wurde ein Teil desselben mit Natronlauge verseift, hierauf mit Salzsäure angesäuert und die saure Lösung mit Äther extrahiert. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels hinterblieb eine Krystallmasse, die zur Reinigung aus siedendem Wasser umkrystallisiert wurde. Beim Abkühlen erstarrte die Lösung krystallinisch. Nach dem Absaugen, Waschen und Trocknen besaß das Produkt $F. = 185-186^{\circ}$ und ist somit als Bernsteinsäure¹⁾ anzusprechen.

Analyse.

0,1617 g Substanz · 0,2427 g CO₂
 0,0759 » H₂O.

Berechnet für C₄H₆O₄ (118,04): 40,67% C und 5,12% H
 Gefunden: 40,93%, » » 5,25% »

¹⁾ C. Neuberg und C. Cappezzuoli, l. c.

Der von dem Bernsteinsäureester durch Ausäthern befreite Rückstand sollte nunmehr die in Äther unlöslichen Chlorhydrate der Aminosäureester, also auch des etwa vorhandenen β -Alaninesters enthalten. Dieser sirupöse Rückstand, der dem Volumen nach 8–10 ccm betrug, enthielt indessen keine Spur von Chlorionen (höchstens geringe Spuren von Schwefelsäure). Eine kleine Probe dieser Substanz gab beim Erwärmen für sich oder mit Natronlauge keine Spur von den stechend riechenden Acrylsäuredämpfen. Ihr Auftreten ist eine scharfe Reaktion auf β -Alaninester, wie es aus dem auf Seite (118) Gesagten hervorgeht. Das Ausbleiben der Reaktion schließt somit die Anwesenheit dieser Verbindung aus. Zur Sicherheit wurde der Sirup nach der Methode von E. Fischer mit NaOH, K_2CO_3 und Äther behandelt, um vorhandene Ester in Freiheit zu setzen, doch hinterließ der strohgelbe, getrocknete ätherische Auszug beim Abdampfen bei 25° bloß Spuren eines nach Aminosäureestern riechenden Rückstandes.

Verarbeitung der Lösung B.

Nachdem der Hauptversuch in bezug auf die Anwesenheit von β -Alanin unter den Fäulnisprodukten ein negatives Resultat ergab, konnte von einem Forschen nach dieser Substanz in der Kontrollösung B Abstand genommen werden. Diese letztere wurde vielmehr zur Nachprüfung der Frage verwendet, ob eine eigens hinzugefügte geringe Menge von β -Alanin sich unter den Fäulnisprodukten des Peptons und des Traubenzuckers überhaupt isolieren und nachweisen läßt. Wie der folgende Versuch zeigt, ist diese Frage zu bejahen.

Die Lösung B wurde zunächst der Lösung A analog behandelt. Der N-Gehalt nach erfolgtem Eindampfen im Vakuum bei 35° war 0,1429 g. Die Lösung enthielt somit 0,4937 g Ammoniak-N.

Der Rückstand des Eindampfens wurde ebenfalls genau so weiter behandelt, wie oben bei Lösung A dargetan wurde. Die Dampfdestillation der mit Schwefelsäure angesäuerten Lösung ergab in diesem Falle 2 l Destillat, die gegen Phenolphthalein bloß 2,18 ccm norm. NaOH verbrauchten. Das Destillat besaß

keinen Geruch nach Propionsäure. Von einer weiteren Prüfung wurde abgesehen. Der Rückstand der Dampfdestillation wurde auch hier mit Natronlauge abgestumpft und sodann wieder salzsauer gemacht. Der Eindampfrückstand wurde nun mit 1 g reinem β -Alanin vermengt und das Gemisch mit 300 ccm Alkohol und Salzsäuregas, wie früher, verestert. Nach erfolgtem Abdestillieren des Alkohols im Vakuum wurde der braune sirupöse Rückstand auch hier mit Äther ausgeschüttelt (der ätherische Auszug hinterließ fast gar keinen Rückstand) und hernach in 100 ccm absolutem Methylalkohol aufgelöst. In einem aliquoten Teil wurde der Chlorgehalt nach Volhard ermittelt und die ganze Lösung mit der berechneten Menge methylalkoholischen Natrons versetzt. Nach der Abtrennung vom ausgeschiedenen Kochsalz wurde der Methylalkohol bei 25° abgedunstet und der Rückstand bei 14 mm Druck auf 70° Badtemperatur erwärmt. Bei etwas über 50° gingen 0,9 g eines farblosen Destillates über, das den Reaktionen nach β -Alaninester darstellte. Der Destillationsrückstand roch außerordentlich intensiv nach Acrylsäure.

2. Versuch.

In Anbetracht der Tatsache, daß β -Alanin gegenüber der Einwirkung von Alkalien wenig widerstandsfähig ist, könnte vermutet werden, daß durch das Eindampfen der ursprünglichen, schwach sodaalkalischen Lösungen A und B in Versuch 1 etwa vorhandenes β -Alanin unter Ammoniakabspaltung zerstört worden sei. Desgleichen könnte auch der Verdacht erhoben werden, daß bei der viele Stunden dauernden Dampfdestillation ein Körper, wie die β -Aminopropionsäure, der eine erheblich geringere Widerstandsfähigkeit besitzt als die Substanzen der α -Reihe, der Zerstörung anheim fiel. Beide Einwände werden durch die Anordnung in diesem Versuch 2 ausgeschaltet, indem hier die sodaalkalischen Lösungen vordem Eindampfen mit Essigsäure angesäuert wurden, ferner wurde unter Umgehung der Dampfdestillation auf die Ermittlung der flüchtigen Säuren verzichtet.

Die Konzentration der zur Fäulnis gelangenden Lösungen war die gleiche, wie in Versuch 1, mit dem Unterschiede, daß hier mit den doppelten Mengen gearbeitet wurde.

Lösung A ¹ : 100 g Asparaginsäure, 10 » Pepton Witte, 20 » Glukose (wasserfrei), 5 » NaCl, Spuren von MgSO ₄ , » » Na ₂ HPO ₄ .	}	Auf 4 l verdünnt und mit Sodalösung schwach alka- lisch gemacht.
--	---	--

Lösung B¹ (Kontrolle).

Bereitung genau wie A¹, bloß ohne Asparaginsäure.

Volumen auch hier 4 l.

Fäulnisdauer: 40 Tage.

Aufarbeitung von Lösung A¹.

Die einzelnen Portionen, die von den Fäulnisbakterien stark getrübt waren und nunmehr nicht mehr ammoniakalisch, sondern nach einem milden Käse rochen, wurden vereinigt. Die Lösung wurde hierauf kurz aufgeköcht, mit Essigsäure eben neutralisiert, filtriert und bei 40° (12 mm) eingedampft.

Als Rückstand verblieb eine bräunlich gefärbte Krystallmasse, die ziemlich trocken aussah und käseartig roch. Er wurde mit 300 ccm absolutem Alkohol übergossen und in die Suspension bei Eistemperatur Salzsäuregas eingeleitet. Die Salzkruste an der Kolbenwand lockerte sich allmählich, und die Flüssigkeit gewann eine rotbraune Farbe. Nun wurde von der Kochsalzmasse abgesaugt und das alkoholische Filtrat F nach nochmaliger Sättigung mit Salzsäuregas unter Eiskühlung bei 35° (12 mm Druck) eingedampft. Der feste Salzurückstand enthielt nur anorganische Substanzen.

Der Rückstand von Filtrat F war zum größten Teil flüssig und roch nach Fettsäureestern. Das Eindampfen wurde zur Entfernung der Salzsäure mit einer neuen Portion absoluten Alkohols wiederholt. Der sich ergebende Rückstand wurde hierauf in absolutem Methylalkohol aufgelöst und die Lösung auf 250 ccm gebracht.

Der Salzsäuregehalt dieser Lösung war sehr gering: 5 ccm verbrauchten 5,10 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Silberlösung. Die Hauptmenge der Lösung wurde mit der genau berechneten Menge einer Natriummethylatlösung versetzt (letztere war ungefähr normal) und der Methylalkohol bei 25° Badtemperatur im Vakuum ab-

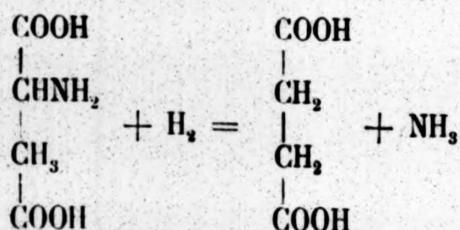
destilliert. Hierauf wurde nach Wechseln der Vorlage die Wasserbadtemperatur rasch auf 70° gesteigert (vgl. die Versuche über β -Alanin). Bei dieser Außentemperatur sollte bei 12—14 mm β -Alaninester überdestillieren. Es destillierten bei 33—34° (Innenthermometer) und 14 mm wenige Tropfen eines farblosen Öls über.

Bei Steigerung der Außentemperatur auf 110° destillierte bei 14 mm zunächst ein aus wenigen Tropfen farbloser Flüssigkeit bestehender Vorlauf bei 36—37° über, sodann stieg die Temperatur plötzlich auf 98—110° und unter stürmischem Sieden destillierte eine Fraktion über, die bis 125° Ölbadtemperatur konstant den gleichen Siedepunkt (98—110°) besaß. Gesamtausbeute 44 g. Dieses Destillat erwies sich nach seinen schon im Versuche 1 beschriebenen Eigenschaften als Bernsteinsäureester.

Im Destillierkolben hinterblieb ein dunkelbraun gefärbter, noch öliges Rückstand, der bei 0,2 mm Druck der Destillation unterworfen wurde, um die noch unveränderte Asparaginsäure zurückzugewinnen. Bei 125—160° Ölbadtemperatur destillierte ein bei 105—9° siedendes Öl alkalischer Reaktion über, dessen Geruch aminosäureesterartig war, dessen Menge aber nur wenige Dezigramme betrug. Es hat sich somit beinahe die ganze Asparaginsäuremenge umgewandelt.

Das bei 33—34° überdestillierte Öl betrug, wie angegeben, wenige Tropfen. reagierte schwach alkalisch, stellte also offenbar den Ester einer Aminosäure dar. Es erwies sich mit aller Sicherheit nicht als β -Alaninester. Es gab weder NH_3 ab beim Überhitzen, noch traten hierbei die stechenden Dämpfe von Acrylsäure und Acrylester auf. Da diese Dämpfe schon in ganz geringen Mengen äußerst leicht am Geruch erkennbar sind, so war die Anwesenheit von β -Alaninester ausgeschlossen.

Die Hauptreaktion der Fäulnis war also auch hier die folgende:



Aufarbeitung der Lösung B¹, (Kontrollversuch.)

Die Aufarbeitung von Lösung B¹ geschah zunächst genau so, wie die von Lösung A¹. Die dem Filtrat F entsprechende Lösung soll hier mit Filtrat G bezeichnet werden.

Filtrat G wurde im Vakuum bei 35° eingedampft und der von der überschüssigen Salzsäure durch nochmaliges Verdampfen mit absolutem Alkohol befreite Rückstand in 100 ccm absolutem Methylalkohol gelöst. Diese Lösung wurde in zwei gleiche Teile geteilt: I und II.

Lösung I. 1 ccm derselben verbrauchte 3,58 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Silberlösung. Nach Hinzufügen der berechneten Menge (ungef. normaler) Natriummethylatlösung wurde der Methylalkohol bei 25—28° Wasserbadtemperatur abdestilliert. Hierauf wurde das Bad rasch auf 100° erhitzt, indes das innere Thermometer langsam auf 45° stieg. Das entstandene Destillat bestand aus wenigen Tropfen eines alkalisch reagierenden Öls, vom gleichen Aussehen, wie die Fraktion 33—34°, gewonnen aus Lösung A¹. Offenbar stellen diese beiden Fraktionen Ester von Aminosäuren dar, die durch den Abbau des Peptons entstanden sind. Auch hier blieben alle Reaktionen des β -Alaninesters aus.

Der Destillationsrückstand bestand aus einer dunkelbraunen, sozusagen festen Masse, von Kochsalz herrührend, das diesmal nach der Neutralisation nicht zur Ausscheidung gelangt war.

Lösung II. Die methylalkoholische Lösung wurde wie sonst eingedampft und zum Rückstand, dem auf S. (123) mitgeteilten Gedankengange folgend, 1 g β -Alanin hinzugefügt. Das Gemisch wurde hierauf bei Eiskälte mit 50 ccm absolutem Methylalkohol unter Einleiten von Salzsäuregas verestert. Die filtrierte, dunkelbraune Flüssigkeit wurde nunmehr bei 35° (Vakuum) verdampft, diese Operation mit einer neuen Alkoholmenge wiederholt und nach Ermittlung des Chlorgehaltes (1,5 ccm verbrauchten 4,13 ccm $\frac{1}{10}$ -n-AgNO₃) die berechnete Menge Natriummethylates hinzugefügt. Außerdem wurden zur Sicherheit 5 g Bernsteinsäureester zugegeben, um zu prüfen, ob nicht etwa die Anwesenheit des letzteren die Acrylreaktion verhindern könnte.

Jetzt wurde der Methylalkohol bei 25—30° (Vakuum) abdestilliert und der Rest bei 12—15 mm und 70° Badtemperatur überdestilliert. Bei 35—40° Innentemperatur destillierten auch hier wenige Tropfen eines farblosen Öls über, das aber in diesem Falle deutlich nach Acrylderivaten roch.

Der vorwaltende Geruch ist aber auch hier der von Aminosäureestern. Der β -Alaninester hatte sich zum größten Teil zersetzt, denn beim Erwärmen des Kolbenrückstandes über 100° (gew. Druck) gingen einige Tropfen eines gelblichen Öls vom heftig stechenden Geruch des Acrylsäureesters über. Beim weiteren Erwärmen erhielt man den Bernsteinsäureester.

Bakteriologische Untersuchung der Lösungen A und B (Versuch 1).

(Ausgeführt von Herrn Dr. Ungermann, Hygienisches Institut.)

Lösung A enthielt folgende 3 Arten:

1. eine Pseudodiphtherieart (am reichlichsten vertreten),
2. eine Art aus dem Colistamm (sehr selten),
3. eine Coccenart (wie in Lösung B).

Lösung B enthielt:

1. Kartoffelbacillus (am reichlichsten),
2. Proteus,
3. die Coccenart von Lösung A.

Es wurde eine Lösung mit den genau gleichen Mengenverhältnissen, wie Lösung A (Versuch 1) bereitet, dieselbe in 5 gleiche Portionen geteilt und jede derselben sterilisiert. Die in der Hitze etwas bräunlich gewordenen sodaalkalischen Lösungen wurden mit den Reinkulturen der 5 Bakterienarten geimpft und 26 Tage hindurch bei 37° aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit zeigten die 5 Proben nur ein ganz geringes Wachstum bestehend. Es war bei der Pseudodiphtherieart und bei der Coliart besonders schwach.

Aus jeder der geöffneten Proben entwich Ammoniak, das schon am Geruch deutlich erkennbar war. Fäulnisgeruch war nicht vorhanden.

Die Aufarbeitung der 5 Proben geschah ganz genau so, wie es in Versuch 1 bei der Verarbeitung der Lösungen A und B dargetan wurde.

Die Destillation mit Wasserdampf lieferte 5 Destillate von saurer Reaktion. Die Reduktion von Mercurisalz ergab die Anwesenheit von Ameisensäure. Propionsäure wurde nicht gefunden.

Beim Eindampfen der schwach salzsauer gemachten Lösungen (vgl. Versuch 1) wurde ein Rückstand erhalten, der diesmal keine merkbaren öligen Anteile enthielt, vielmehr aus einer festen, braun gefärbten Masse bestand. Die Extraktion mit Äther ergab hellgelb gefärbte Auszüge, die in allen 5 Proben geringe Mengen von öligen Rückständen hinterließen. Diese zeigten eine sehr starke Pyrrolreaktion. Die Anwesenheit von Bernsteinsäureester konnte jedoch durch den Siedepunkt nicht sichergestellt werden.

Die Infreiheitsetzung der Ester im ausgeätherten Rückstande erfolgte nach Fischers Methode mit $\text{NaOH} + \text{K}_2\text{CO}_3$ und Äther bei tiefer Temperatur. Jeder der so erhaltenen, getrockneten, braun gefärbten ätherischen Auszüge wurde für sich bei 12 mm fraktioniert destilliert. Ein dem β -Alaninester entsprechendes Destillat beim Erwärmen des Außenbades bis 100° wurde auch hier in keinem Falle erhalten. Es destillierten jedesmal 1—2 Tropfen einer farblosen Flüssigkeit über, die wohl aminosäureesterartig rochen, jedoch die Reaktion des β -Alaninesters nicht gaben.

Im Rückstand der Destillation befand sich der Asparaginsäureester. Er betrug dem Gewichte nach in

- Probe 1 (Kartoffelbacillus): 2 g,
- » 2 (Proteus): 2,5 g,
- » 3 (Coccenart): 2 g,
- » 4 (Pseudodiphtherie): 3,2 g,
- » 5 (Coli): 3,2 g.

Zur Identifizierung der Asparaginsäure wurde der Rückstand mit der 10fachen Wassermenge 30 Stunden hindurch bei Siedehitze verseift, die Lösung mit Tierkohle entfärbt und das

Kupfersalz der Asparaginsäure mittels Kupferoxyds nach der bekannten Methode dargestellt.

Das tiefblau gefärbte Kupfersalz wurde nach dem Trocknen bei 100—105° hellblau.

0,1513 g Substanz gaben 0,0587 g CuO.

Gef.: 31,00% Cu

Für $C_4H_4O_4Cu \cdot \frac{1}{2} H_2O$ (Mol.-Gew. = 203,65) Ber.: 31,23% »

Das $\frac{1}{2}$ Mol. Krystallwasser ließ sich beim 24 stündigem Trocknen (100—105°) nicht austreiben.
