

Nachtrag. Die Rechtsdrehung der β -Monoaceton-fructose zeigt wiederum, daß Folgerungen aus dem Drehungssinn auf die Ringstruktur unzulässig sind. Irvine¹⁴⁾ ist auch neuerdings von dieser Ansicht abgekommen.

Aus Formel VIII folgt für Diaceton-glucose die Konstitution einer 1.2.5.6-Diisopropyliden-glucose (-1.4). Zu der gleichen Formulierung kommen auf Grund neuer Versuche Levine und Meyer¹⁵⁾.

312. Hans Pringsheim und Jesaia Leibowitz: Über Reversions-Synthesen, I.: Die Wirkung der Hefe-Maltase.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 15. August 1924.)

Der Zweck der hier geplanten Versuchsreihe ist es, die große Verwirrung zu beheben, welche noch heute bezüglich der synthetischen Wirkung von Fermenten und Säuren hauptsächlich bei Zuckern herrscht; im besonderen aber soll geprüft werden, ob das Nebeneinanderlaufen zweier derartiger reversionskatalytischer Wirkungen, wie es z. B. in der gleichzeitigen Bildung von Gentiobiose und Cellobiose unter dem Einfluß von Emulsin¹⁾ zutage tritt, nicht durch eine Aufteilung der Fermente in ihre einzelnen wirksamen Bestandteile nach den modernen Methoden der Ferment-Anreicherung erreicht werden kann.

Bisher haben wir uns mit der Wirkung der Hefe-Maltase auf eine konz. Traubenzucker-Lösung beschäftigt und den Versuch gemacht, die ersten und grundlegenden Versuche des angeschnittenen Gebietes von Croft Hill²⁾ zu wiederholen, der bei seiner Ferment-Synthese zu einem krystallisierten Disaccharid, der sogenannten Revertose, und daneben zu einem zweiten gelangt ist, welches er als Maltose ansprach; gerade der letzte Befund ist jahrelang Gegenstand der wissenschaftlichen Kontroverse gewesen³⁾; ja es hat eine Zeit gegeben, in der die Anschauung verfochten wurde, daß die Fermente nicht dieselben Zucker synthetisieren, die sie spalten⁴⁾. Diese Auffassung ist falsch, und sie wird im speziellen durch das Ergebnis unserer Untersuchungen widerlegt, die uns die Maltose als synthetisches Produkt der Hefe-Maltase in krystallinischem Zustand in die Hand gab.

Wir haben dieses Ergebnis innerhalb von vier Wochen bei 37° in 40-proz. Glucose-Lösung mit einer nach den Angaben von Willstätter⁵⁾ gewonnenen Hefe-Maltase erreicht, wobei wir die Reaktion bei der optimalen Wasserstoffionen-Konzentration der Maltase-Wirkung von $p_H = 6.4$ verlaufen ließen. Nach der Vergärung der nicht revertierten Glucose mit *Saccharomyces Marxianus* gewannen wir die Maltose aus dem alkohol-löslichen Anteil, während

¹⁴⁾ vergl. Irvine und Burt, Soc. 125, 1344 [1924].

¹⁵⁾ Journ. Biol. Chem. 60, 173 [1924].

¹⁾ Bourquelot, Herissey und Coirre, C. r. 157, 732 [1913]; Journ. Ph. Ch. [7] 8, 441 [1913]; Bourquelot u. Bridel, C. r. 168, 1016 [1919]; Journ. Ph. Ch. [7] 21, 129 [1920].

²⁾ Soc. 73, 634 [1898], 83, 578 [1903].

³⁾ Emmerling, B. 34, 600 [1901]; Hill, B. 34, 1380 [1901]; Bayliß, Journ. Phys. 46, 236 [1913].

⁴⁾ Armstrong, Proc. Roy. Soc. 76, B, 592 [1905].

⁵⁾ Willstätter, Oppenheimer und Steibelt, H. 110, 232 [1920]; Willstätter und Steibelt, H. 111, 157 [1920].

die Revertose zugleich mit den Verunreinigungen unserer Lösung durch Alkohol gefällt wurde. Dieses Präzipitat ergab nach der Reinigung mit Bleiacetat die Revertose von einer mit den Angaben Hills nahezu übereinstimmenden Drehung und Reduktionskraft. Im Gegensatz zu dem klassischen Versuch trat jedoch bei uns die Menge der Revertose weit hinter der der Maltose zurück, weshalb wir mit ihr noch keinen Krystallisationsversuch ausführen konnten.

Die reichlichere Maltose-Bildung fällt bei der optimalen Acidität mit der größeren Reaktionsgeschwindigkeit zusammen, was sehr verständlich ist, da die Hefe-Maltase von Willstätter nach seinen eigenen Angaben die Maltose viel energischer spaltet als die nach Croft Hill präparierte Hefe. Wahrscheinlich wird bei der von Hill geübten Darstellungsform zwar die Maltase stärker geschädigt, die Revertase jedoch besser erhalten. Der Versuch, den wir mit der nach Hill hergestellten Hefe angestellt haben, verläuft langsam, entsprechend den Angaben dieses Forschers, und kann erst in zwei Monaten beendet sein.

Beschreibung der Versuche.

Der zu den Versuchen verwandte Traubenzucker wurde vorher durch je einmaliges Umkrystallisieren aus Wasser und aus 80-proz. Alkohol gereinigt. Die Maltase-Lösung wurde aus Bäckerhefe genau nach der Vorschrift von Willstätter und Steibelt (l. c.) dargestellt. Wir überzeugten uns durch einen Vorversuch, daß sie Maltose stark spaltete:

Versuch A.	25 ccm	1-proz. Maltose-Lösung	} bei 37°
	10 „	Phosphat-Puffer $p_{11} = 6.2$	
	13 „	Wasser	
	2 „	Hefe-Auszug	

Titrationen mit je 10 ccm:

Zeit	mg Cu	% Spaltung
0 Std.	26.3	—
30 „	44.7	ca. 80

Versuch B.	20 g	Traubenzucker	} bei 37°
	10 ccm	Phosphat-Puffer $p_{11} = 6.4$	
	10 „	Ferment	
	10 „	Wasser	

Zeit in Tagen	α in 1-dm-Rohr	Reduktion in mg Cu für 0.2 ccm
0	21.48°	173.7
7	22.15	166.2
12	22.49	160.2
19	22.79	157.4
24	22.97	155.5
26	22.99	154.8

Zu den Reduktionsproben entnahmen wir der Lösung je 1 ccm, füllten auf 10 ccm auf und verwandten 2 ccm der verdünnten Lösung.

Wir konnten im Verlaufe des Versuches die Angabe Croft Hills, daß die revertierende Wirkung der Maltase an die hohe Konzentration des Substrats gebunden ist, bestätigen. Nach der Verdünnung tritt die invertierende Kraft des Ferments sofort zutage:

3 ccm der Lösung wurden am 19. Tage abpipettiert und auf 100 ccm verdünnt. Der Wiederanstieg der Reduktionskraft zeigte die Rückverwandlung des Reversionsproduktes in Glucose an:

Versuch C. Titration mit je 2 ccm: nach	0 Stdn.	49.1 mg Cu.
„ „ „ 2 „ „	24 „	54.7 mg Cu.
„ „ „ 2 „ „	38 „	55.9 mg Cu.

Der Versuch B kam nach etwa 4 Wochen zum Stillstand. Wir erhitzten nun die Lösung auf dem Wasserbade zur Entfernung des Toluols, verdünnten auf ca. 500 ccm und entfernten die unveränderte Glucose durch Vergärung mit *Saccharomyces Marxianus*⁶⁾. Wir züchteten die Hefe durch Umpflanzen auf sterilisierte Bierwürze, in der sie rasch wuchs. Als sich die Hefe nach 4–5 Tagen vollständig abgesetzt hatte, dekantierten wir die überstehende Flüssigkeit ab und wuschen die Hefe durch mehrmaliges Aufschlänmen mit Wasser und Zentrifugieren. Die so gereinigte Hefe verursachte in unserer Zuckerlösung eine kräftige Gärung, die 3–4 Tage anhielt. Hierauf überzeugten wir uns durch Zusatz einer weiteren Probe *Saccharomyces Marxianus*, die keine neue Gärung hervorrief, daß die Glucose quantitativ zerstört war. Die vergorene Lösung, die Fehlingsche Lösung noch stark reduzierte, wurde nun filtriert und im Vakuum bei 40–50° auf 50 ccm eingedampft. Die konz. Lösung wurde nach Klärung mit Tierkohle in 75 ccm siedenden Alkohol gegossen und von dem ausgefallenen Eiweiß, anorganischen Salzen usw. heiß filtriert. Beim Erkalten schied sich ein Teil der Revertose als schmutziger, weißer Niederschlag aus, der abgesaugt wurde. Das Filtrat wurde auf 20 ccm eingedampft und erneut mit 50 ccm Alkohol versetzt. Beim Stehen im Eisschrank konnte eine noch größere Fällung erzielt werden. Beim nochmaligen Fällen der auf 10 ccm eingedampften Lösung mit 50 ccm Alkohol schied sich nur noch wenig Substanz ab. Die drei Niederschläge wurden vereinigt und, wie weiter beschrieben, verarbeitet.

Beim Eindampfen des Filtrats verblieb ein schmutzig gelber Sirup. Wir lösten in Wasser, entfärbten mit Tierkohle und Kieselgur und dampften wieder zum Sirup ein. Bei längerem Digerieren mit 95-proz. Alkohol ging er fast restlos in Lösung. Die alkohol. Lösung wurde nochmals mit Tierkohle behandelt und eingedampft. Wir gewannen die Maltose so als klaren farblosen Sirup, der bei mehrtägigem Stehen keine Veränderung erfuhr. Dagegen setzte nach dem Impfen mit einigen Maltose-Krystallen eine rasche Krystallisation ein; nach 48 Stdn. war die Hauptmenge erstarrt. Als die Krystalle sich nicht weiter vermehrten, befreiten wir sie vom adhätierenden Sirup durch starkes Abpressen auf Filtrierpapier und trockneten im Vakuum über Schwefelsäure. Ausbeute 0.38 g. Folgende Daten beweisen, daß es sich um fast reine Maltose handelt:

$$[\alpha]_D = \frac{+3.21^{\circ} \times 1.0}{0.025} = +128.4^{\circ} \text{ (spez. Dreh. v. Maltose-Hydrat + } 130.5^{\circ}\text{)}$$

Reduktion: 25 mg Substanz 27.1 mg Cu (103% von R_{Maltose}).

Osazon: 0.2 g Substanz mit 0.25 g Phenyl-hydrazin in essigsaurer Lösung 1 Stde. auf dem Wasserbad erhitzt, nach dem Erkalten Niederschlag abfiltriert und aus heißem Wasser umkrystallisiert.

Drehung: 20 mg Stbst., gelöst in 0.4 ccm Pyridin + 0.6 ccm Alkohol. $\alpha_D = +1.46^{\circ}$ (theoretisch: + 1.50⁹⁷⁾).

Die auf die oben beschriebene Weise gewonnene Revertose war noch nicht rein; Reduktion: 25 mg 11.2 mg Cu = 40% R_{Maltose} . Die sehr

⁶⁾ Die Hefekultur wurde uns vom Institut für Gärungsgewerbe freundlichst zur Verfügung gestellt, wofür wir hier bestens danken.

⁷⁾ Neuberg, B. 32, 3384 [1899].

geringe Reduktionskraft deutet auf die Beimengung eines Nichtzuckers. Wir lösten in Wasser, fällten das Eiweiß mit Bleiacetat und dampften nach der Entbleiung mit Schwefelwasserstoff auf ein kleines Volumen ein. Auf Zusatz von Alkohol fiel ein amorpher, rein weißer Niederschlag aus, der abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet wurde. Ausbeute 0.11 g.

$$[\alpha]_D = \frac{+0.98^\circ \times 1.0}{0.010} = +98^\circ \text{ (spez. Dreh. der Revertose } +92^\circ).$$

Reduktion: 25 mg.....23.2 mg Cu = 45 % RGlucose (nach Hill 47 %).

Wir danken der Rockefeller-Foundation für ihre Unterstützung.

313. Hans Pringsheim und Arnold Steingroever: Über die Halogenverbindungen der Polyamylosen. (Beiträge zur Chemie der Stärke, XI.¹⁾.)

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 15. August 1924.)

Vor kurzem hat Bergmann, gestützt auf seine Untersuchungen²⁾ über „Jodverbindungen einfacher 1,2-Cyclo-acetale vom Typus der Jodstärke“, den Schluß gezogen, daß die Absorption des Jod in der Stärke letzten Endes zurückzuführen sei auf gewisse strukturell bedingte Affinitätsreste des Stärkemoleküls. Er fußt hierbei auf der Beobachtung, daß die oben genannte Körperklasse neben Halogen auch Halogenwasserstoffsäure aufnimmt, wie das von Mylius für die Stärke³⁾ beobachtet wurde. In einer soeben erschienenen Arbeit weisen Bergmann und Ludewig⁴⁾ darauf hin, daß auch acetylierte Stärke noch die typische Affinität zum Jod-Jodkalium besitzt.

Diese experimentellen Studien scheinen die in letzter Zeit vorherrschende Meinung, daß die Jodstärke eine reine Adsorptionsverbindung sei, zu entkräften. Gestützt wird die Bergmannsche Anschauung dadurch, daß wir nunmehr auch bei den Polyamylosen neben der Aufnahme von freiem Halogen, und zwar von Jod sowohl wie von Brom, eine beträchtliche Halogenid-Bindung feststellen konnten. Bisher läßt sich kein System in das Verhältnis zwischen Gesamthalogen und freiem Halogen bei den verschiedenen Vertretern der Polyamylosen bringen. Wir haben bei der Brom- α -tetraamylose den Aschegehalt durch Abrauchen mit Schwefelsäure bestimmt, konnten aber ebensowenig wie Bergmann eine dem gefundenen Halogen-Ion äquivalente Kaliummenge auffinden; auch bei uns blieb dieser Wert beträchtlich unter dem theoretischen.

Die Bestimmung des gesamten Halogens durch Titration nach Volhard gab uns Gelegenheit, unsere neuen Werte mit den früher gefundenen⁵⁾ zu vergleichen und daraufhin auch durch Gravimetrie einige Korrekturen an den alten Werten vorzunehmen: Die nachstehende Tabelle enthält unsere Resultate.

¹⁾ X.: B. 57, 887 [1924]. ²⁾ B. 57, 753 [1924]. ³⁾ B. 20, 688 [1887].

⁴⁾ B. 57, 961 [1924].

⁵⁾ Hans Pringsheim u. Eißler, B. 46, 2968 [1913], 47, 2571 [1914].