

neben geringen Mengen der β -Säure. Zur Trennung wird die verschiedene Löslichkeit der Calciumsalze²²⁾ in Wasser und Alkohol herangezogen. Man behandelt zu diesem Zweck die wäßrige Lösung der Pyridiniumsalze mit Calciumhydroxyd, entfernt zuerst das dadurch in Freiheit gesetzte Pyridin, dann durch Einleiten von Kohlensäure und Erhitzen den überschüssigen Kalk und dampft auf ein kleines Volumen ein. Es scheidet sich im wesentlichen das schwer lösliche Calciumsalz der β -Sulfonsäure ab. Es wird abgesaugt und mit Alkohol gut ausgewaschen. Die aus Wasser umkrystallisierte Substanz enthält in Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur kein Krystallwasser. Ausbeute 0.8 g.

0.0668 g Sbst.: 0.0201 g CaSO_4 . — $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{S}_2\text{O}_6\text{Ca}$. Ber. Ca 8.82. Gef. Ca 8.86.

Das wäßrige, mit dem Wasch-Alkohol vereinigte Filtrat wird eingedunstet, wobei 3 g Calciumsalz der α -Sulfonsäure zurückbleiben. Es zeigt die von dieser Verbindung verlangte Löslichkeit in Wasser und Alkohol und einen Gehalt von 2 Mol. Krystallwasser.

Zur Analyse wurde eine aus Wasser umkrystallisierte Substanzprobe verwendet. 0.1130 g Sbst.: 0.0304 g CaSO_4 . — $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{S}_2\text{Ca} + 2\text{H}_2\text{O}$. Ber. Ca 8.17. Gef. Ca 7.92.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sei auch an dieser Stelle für ihre bereitwillige Unterstützung dieser Arbeit mein verbindlichster Dank ausgesprochen.

310. H. Pringsheim: Über Reversions-Synthesen, II¹⁾:

J. Bondi und J. Leibowitz: Gentiobiose und Isomaltose.

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

(Eingegangen am 13. August 1926.)

Bei der Fortsetzung unserer Versuche zur Gewinnung der Revertose¹⁾ verwendeten wir unter anderem ein Trockenpräparat von Untergärhefe der Schloßbrauerei Schöneberg. Hier nahm die Reversion einen ganz anderen Verlauf als bei unseren früheren Versuchen mit frischer Bäckerhefe. Die weitestgehende Resynthese, gemessen an der Abnahme des Reduktionsvermögens, wurde in 50-proz. Glucose-Lösung bei $p_{\text{H}} = 6.6$ erreicht. Wir fanden nun zu unserer Überraschung, daß der größte Teil des Reversionsproduktes durch die Bäckerhefe nicht vergoren wurde; dieser Teil konnte also nicht aus Maltose und Revertose bestehen.

Nach Isolierung des Produktes in der im experimentellen Teil beschriebenen Weise erhielten wir ein Disaccharid, dessen Drehung und Reduktionskraft den entsprechenden Konstanten der Gentiobiose nahe kamen und das in verd. Lösung von demselben Hefe-Auszug wieder in Glucose gespalten wurde. Aus Mangel an Impfmateriel haben wir keine direkten Krystallisationsversuche vorgenommen und die Identifizierung des Körpers durch Überführung in gut krystallisierende Derivate durchgeführt. Wir stellten das Phenyl-osazon von richtigem Schmelzpunkt und richtiger Drehung und Mutarotation dar, sowie das charakteristische β -Oktacetat, dessen Identität mit β -Oktacetyl-gentiobiose durch Vergleich mit einem uns von Hrn. B. Helferich (Greifswald) zur Verfügung gestellten

²²⁾ V. Merz und H. Mühlhäuser, B. 3, 710 Ann. [1870].

¹⁾ I. Mitt.: H. Pringsheim und J. Leibowitz, B. 57, 1576 [1924]

Präparat gesichert wurde²⁾. Die Höchstaubeute an Gentiobiose bei unseren Versuchen betrug 4% der angewandten Glucose-Menge.

Dieser erstmalige exakte Nachweis einer Gentiobiose-Synthese durch Hefe-Fermente interessiert besonders im Zusammenhang mit der Frage nach dem Vorkommen β -glucosidatischer Fermente in der Hefe. Zunächst ist festzustellen, daß unsere neue Gentiobiase von der altbekannten Amygdalase, die Gentiobiose nicht spaltet, vollkommen verschieden ist³⁾. Das gelegentliche Vorkommen einer echten Gentiobiase in Hefen neben dem der weitverbreiteten Amygdalase findet seine Analogie in der Existenz einer auf bestimmte Malzsorten beschränkten Gluco-Maltase⁴⁾, die von der gewöhnlichen Gerstenmalz-Maltase⁵⁾ spezifisch verschieden ist. Der eine von uns hat schon früher vermutet⁶⁾, daß die beiden, die Gentiobiose-Bindungen lösenden Fermente im selben Verhältnis zueinander stehen wie die Gluco- und Glucosido-Maltasen oder die Gluco- und Fructo-Saccharasen⁷⁾.

Unsere Versuche zeigen des weiteren, daß die Revertose, entgegen der von anderer Seite geäußerten Vermutung⁸⁾, von der Gentiobiose verschieden ist. Schwieriger zu entscheiden ist die Frage nach der möglichen Identität der Gentiobiose mit dem wenig charakterisierten Disaccharid, das Emmerling⁹⁾ und Armstrong¹⁰⁾ aus Glucose durch Synthese mit Hefe-Fermenten erhalten haben und das sie als β -Glucosido-glucose und als identisch mit der Isomaltose von E. Fischer¹¹⁾ ansprachen. Neuerdings ist behauptet worden¹²⁾, daß die sog. Isomaltose weiter nichts als eine verunreinigte Gentiobiose sein soll. Demgegenüber steht der Befund von Georg und Pictet¹³⁾, die durch die Fischersche Synthese zu einem Gemisch von wenig Gentiobiose mit einer großen Menge eines anderen amorphen Disaccharids gelangten, das sie eingehend untersuchten und als reine Isomaltose ansprechen. Die Schweizer Forscher kommen zum Schluß, daß drei gänzlich verschiedene Disaccharide im Laufe der Zeit mit demselben Namen „Isomaltose“ belegt worden sind: die eigentliche Isomaltose, die Revertose und ein Abbauprodukt der Stärke. Auch wir haben bei der Wiederholung der Fischerschen Synthese die Isomaltose in Gestalt eines amorphen Körpers von $[\alpha]_D = +98^0$ neben einem schwach reduzierenden Dextrin von $[\alpha]_D = \text{ca.} +110^0$ isolieren können. Wir verzichten auf die eingehende Beschreibung dieser Versuche, da sich ihr Ergebnis mit den inzwischen veröffentlichten, noch weitergehenden Befunden von Georg und Pictet

²⁾ Wir danken Hrn. Prof. Helferich für sein freundliches Entgegenkommen.

³⁾ Die einzige Angabe über das Vorkommen von echter Gentiobiase in gewissen Hefen macht C. Oppenheimer (Die Fermente und ihre Wirkungen, V. Aufl., Bd. I, S. 586) nach unveröffentlichten Versuchen R. Kuhns.

⁴⁾ H. Pringsheim und J. Leibowitz, *Bio. Z.* **161**, 456 [1925].

⁵⁾ vergl. z. B. L. Maquenne, *C. r.* **176**, 804 [1923]; A. R. Ling und D. R. Nanji, *Bioch. Journ.* **17**, 593 [1923].

⁶⁾ J. Leibowitz, *H.* **149**, 184, und zwar 190 [1925].

⁷⁾ J. Leibowitz und P. Mechlinski, *H.* **154**, 64 [1926].

⁸⁾ C. Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen, V. Aufl., Bd. I, 534, 584, 587.

⁹⁾ O. Emmerling, *B.* **34**, 600 [1901].

¹⁰⁾ E. F. Armstrong, *Proc. Roy. Soc. B.* **76**, 592 [1905].

¹¹⁾ E. Fischer, *B.* **23**, 3687 [1890], **28**, 3024 [1895].

¹²⁾ H. Berlin, *Am. Soc.* **48**, 1107 [1926].

¹³⁾ A. Georg und A. Pictet, *Helv.* **9**, 444, 612 [1926].

deckt. Wir schließen uns den Schweizer Forschern in der Anschauung an, daß das von Emulsin (α -Amylase?)¹⁴⁾ spaltbare Disaccharid, das Ling und Nanji¹⁵⁾ auf Umwegen aus Stärke erhielten, nichts mit der Isomaltose zu tun hat; dagegen liegt es nach Vergleich der Konstanten unserer und der Pictetschen Isomaltose mit denjenigen der Revertose nahe, eine Identität dieser beiden Disaccharide zu vermuten. Besonders stimmen die Drehung und die Reduktionskraft¹⁶⁾ der Revertose, wie wir sie in unserer ersten, von Pictet offenbar übersehenen, Mitteilung¹⁾ beschrieben haben, genau mit den Pictetschen Angaben über Isomaltose überein. Auch die „pseudo-krystallinische Struktur“ der Isomaltose haben wir inzwischen an der Revertose beobachtet; endlich zeigt auch das merkwürdige Verhalten der Pictetschen Isomaltose gegen Emulsin, daß es sich kaum um ein normales β -glucosidisches Disaccharid handeln dürfte.

Zum Schluß wollen wir nicht verschweigen, daß die Identifizierung der Isomaltose durch ihr Osazon recht bedenklich erscheint, nachdem Berlin¹²⁾ aus scheinbar reinem krystallisiertem Isomaltosazon durch Umkrystallisieren Gentiobiosazon von einem um 20° höheren Schmelzpunkt isolieren konnte. Bemerkenswert ist, daß wir ebenso wie Berlin für Gentiobiosazon einen Schmelzpunkt von 180° fanden, d. h. um ca. 15° höher als alle früheren Angaben der Literatur, darunter auch diejenigen Pictets, lauten.

Die Untersuchungen über Revertose werden fortgesetzt.

Beschreibung der Versuche.

Die Ferment-Lösungen wurden durch 24-stdg. Ausziehen einer Trockenhefe der Schloßbrauerei Schöneberg (Oktober 1925) mit der 5-fachen Menge Toluol- oder Chloroform-Wasser unter Zugabe von Phosphat-Puffer von $p_H = 6.8$ im Eisschrank hergestellt. Die Auszüge wurden durch 2-maliges Zentrifugieren mit nachfolgendem Filtrieren geklärt. Die Ferment-Lösungen waren sehr maltase- und saccharase-reich; die spalteten auch Gentiobiose, dagegen waren sie unwirksam gegenüber Cellobiose und Arbutin.

Ansätze: 25 g Glucose, 20 ccm Wasser, 10 ccm Puffer, 20 ccm Hefe-Auszug, 5 ccm Toluol bei 37°. Für die Bestimmungen wurde 1 ccm entnommen, auf 50 ccm verdünnt und von der verd. Lösung 5 ccm zur Titration verwendet.

Zeit in Tagen	ccm n_{10} -KMnO ₄		
	$p_H = 5$	$p_H = 6.6$	$p_H = 7.4$
0	10.47	11.01	10.97
3	10.46	11.23	11.40
8	10.48	11.30	11.40
12	10.27	11.10	11.17
60	10.32	10.54	10.33

¹⁴⁾ H. Pringsheim und E. Schapiro, B. **59**, 997 [1926].

¹⁵⁾ A. R. Ling und D. R. Nanji, Soc. **123**, 2666 [1923], **127**, 629 [1925].

¹⁶⁾ Die Angabe von Georg und Pictet (loc. cit., S. 613), die Revertose habe ein Reduktionsvermögen von 69% (bezogen auf Glucose) gegenüber 42% der Isomaltose, ist irrig: Croft Hill gibt für Revertose $R = 47\%$ an, wir fanden $R = 45\%$.

Bei einem zweiten Versuche fanden wir bei $p_H = 6.6$:

Zeit in Tagen	ccm n_{10} -KMnO ₄
0	11.54
10	10.07
20	9.72
27	9.92

Die Lösung wurde nach der Erreichung eines konstanten Reduktionswertes auf ca. 1 l verdünnt, durch Erhitzen auf dem Wasserbade vom Toluol befreit und mit je 20 g frischer Bäckerei-Hefe (Ostwerke Wandsbeck) versetzt. Nach 2 Tagen war die Glucose restlos vergoren: beim Erhitzen mit essigsäurem Phenyl-hydrazin erfolgte nur noch die Bildung reichlicher Mengen wasser-löslichen Osazons. Durch einen Kontrollversuch überzeugten wir uns, daß die Hefe auch Maltose glatt vergor. Nach Beendigung der Gärung filtrierten wir von der Hefe ab und enteiweißten die Lösung durch Fällern mit kolloidalem Eisenhydroxyd. Die schwach gelb gefärbte Lösung wurde im Vakuum bis zum Sirup eingedampft und mit Alkohol gefällt, der Niederschlag durch Lösen in wenig Wasser und Fällern mit Alkohol-Äther gereinigt. Die so erhaltenen Rohprodukte zeigten spezif. Drehungen von $+20^{\circ}$ bis $+30^{\circ}$. Durch fraktionierte Fällung mit Alkohol-Äther konnte daraus einmal ein Produkt gewonnen werden, das ziemlich reine Gentiobiose darstellt:

$[\alpha]_D^{20} = +0.04 \times 5/0.0214 = +9.3^{\circ}$ (spez. Drehung der Gentiobiose $+11^{\circ}$).
Reduktionsvermögen: 27 mg ... 28.5 mg Cu = 98 % R Gentiobiose¹⁷⁾.

Bei einem anderen Versuch stellten wir aus dem Rohprodukt das Phenyl-osazon dar. Nach 2-maligem Umkrystallisieren aus Wasser erhielten wir gelbe Nadeln: Schmp. $179-181^{\circ}$ (Schmelzpunkt von Gentiobiosazon nach Berlin¹²⁾ $179-181^{\circ}$, nach Pictet¹³⁾ 164°).

Eine 0.36-proz. Lösung des Osazons in Pyridin-Alkohol zeigte im 0.5-dm-Rohr gleich nach Auflösung -0.13° , nach 18 Stdn. -0.08° . Hieraus berechnet sich für die Anfangsdrehung $[\alpha]_D^{20} = -72.2^{\circ}$, für die Enddrehung $[\alpha]_D^{20} = -44.4^{\circ}$ (für Gentiobiosazon werden angegeben: Anfangsdrehung -75° ¹⁸⁾, -70.8° ¹²⁾, Enddrehung -48.2° ¹²⁾).

Zur Darstellung des Acetates wurden 0.4 g der synthetischen Gentiobiose mit 2 g Pyridin und 4 g Essigsäure-anhydrid 2 Stdn. auf dem Wasserbade erhitzt und über Nacht bei Zimmer-Temperatur stehen gelassen. Die klare Lösung wurde in Wasser gegossen, wobei sich ein Öl ausschied, das nach Verreiben mit Eiswasser zu einer festen Masse erstarrte, die abgesaugt und getrocknet wurde. Sie läßt sich aus wenig heißem Methylalkohol oder aus viel Äther umkrystallisieren. Lange, seidenglänzende Nadeln, Schmp. 192° ; Misch-Schmelzpunkt mit β -Oktacetyl-gentiobiose 191° .

5.120 mg Sbst.: 9.270 mg CO₂, 2.81 mg H₂O.

C₁₂H₁₄O₁₁(CO·CH₃)₈ (678.4). Ber. C 49.6, H 5.6. Gef. C 49.4, H 6.1.

$[\alpha]_D^{20} = -0.05 \times 5/0.0646 = -4^{\circ}$ (in Chloroform); spez. Drehung der β -Oktacetyl-gentiobiose $= -5^{\circ}$.

Wir danken der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft für ihre Unterstützung.

¹⁷⁾ E. Bourquelot und H. Hérissey, A. ch. [7] 27, 397, und zwar 420 [1902].

¹⁸⁾ G. Zemplén, B. 48, 237 [1915].