

Die Ausbeuten beider Versuche stimmen untereinander nicht ganz überein, da äußerer Gründe halber zur Herstellung der Borid-Proben unterschiedliche Ausgangsmaterialien verwandt wurden (die Reaktion zwischen Beryllium und Bortrioxyd erfolgt je nach den äußeren Umständen — Verteilungsgrad der Substanzen, Art des Erhitzens usw. — mehr oder weniger quantitativ). Innerhalb jedes Versuchs ergibt sich jedoch übereinstimmend beim Ersatz von Salzsäure durch Phosphorsäure eine Steigerung der Borwasserstoff-Ausbeute auf das Doppelte (von 1.6¹⁰⁾ auf 3.3 und von 1.1 auf 2.3 %). Die gewonnene Borsäure-Lösung war auch hier phosphorsäure-frei.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und der Karlsruher Hochschul-Vereinigung danken wir bestens für die Unterstützung der Arbeit.

356. Burckhardt Helferich, Ulrich Lampert und Georg Sparmberg: Zur Kenntnis der α -Glucosidase aus Hefe.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]
(Eingegangen am 10. Oktober 1934.)

Für die β -Glucosidase des Mandel-Emulsins ist es seit langem bekannt, daß Salicin, das β -Glucosid des Saligenins, erheblich rascher gespalten wird als Phenol- β -*d*-glucosid¹⁾. Aus diesem Grunde und wegen der leichten Zugänglichkeit wird Salicin zum qualitativen und quantitativen Nachweis der β -Glucosidase bevorzugt. Neuerdings wurde gefunden, daß *o*-Kresol- β -*d*-glucosid noch mehrfach schneller als Salicin gespalten wird²⁾.

Bei der umstrittenen Frage der α -Glucosidase schien es uns interessant festzustellen, ob durch die α -Glucosidase der Hefe (Maltase) auch die α -Glucoside des Saligenins und des *o*-Kresols schneller als das des Phenols gespalten werden. Beide Substanzen ließen sich nach bekannten Methoden gewinnen, das Saligenin- α -*d*-glucosid allerdings nicht in reinem, krystallisiertem Zustand. Wesentliches an den Ergebnissen der Spaltung wird aber auch seine Reindarstellung nicht mehr ändern.

Wie die folgende Übersicht ergibt, tritt im Gegensatz zur β -Glucosidase des Mandel-Emulsins bei der α -Glucosidase der Hefe keine Steigerung der Spaltbarkeit ein, wenn man vom Phenol- α -*d*-glucosid als Substrat zum Saligenin- α -*d*-glucosid (α -Salicin) oder zum *o*-Kresol- α -*d*-glucosid übergeht. Dieser Befund beweist erneut³⁾ die weitgehende Verschiedenheit der beiden Fermente, er gibt aber andererseits kein besseres, d. h. rascher spaltbares, Substrat für die α -Glucosidase als Phenol- α -*d*-glucosid.

¹⁰⁾ Da nach früheren Ergebnissen eine aus feinstgepulverten, reinsten Materialien hergestellte Beryllumborid-Probe bei der Zersetzung mit Salzsäure bis zu 3 % Borwasserstoff liefert, dürfte die Borwasserstoff-Ausbeute bei Verwendung von Phosphorsäure in günstigen Fällen auf 6 % zu erhöhen sein.

¹⁾ z. B.: Willstätter, Kuhn u. Sobotka, Ztschr. physiol. Chem. **134**, 233 [1924].

²⁾ B. Helferich u. H. Scheiber, Ztschr. physiol. Chem. **226**, 272 [1934].

³⁾ B. Helferich, W. Klein u. W. Schäfer, B. **59**, 79 [1926].

Der Wert für das α -Salicin ist wegen seiner Unsicherheit (s. o.) eingeklammert. Die Werte für die Glucoside des Methanols und der Glucose sind zum weiteren Vergleich hinzugefügt.

Verhältnis der Wertigkeiten für

α -Glucosidase aus Hefe gegen die α - <i>d</i> -Glucoside von					
Methanol	Glucose (= Maltose)	Phenol	Saligenin (α -Salicin)	o-Kresol	
1	: 2.3	: 12	: (2.4)	: 11.7	
β -Glucosidase aus Mandeln gegen die gleichen β - <i>d</i> -Glucoside ⁴⁾ 2)					
1	: 2.1	: 5.2	: 26	: 60	

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft haben wir für Gewährung eines Stipendiums an Hrn. Lampert und für sonstige Unterstützung zu danken. Ebenso danken wir der Rockefeller-Foundation für ihre Hilfe.

Beschreibung der Versuche.

Tetracetyl-*o*-kresol- α -*d*-glucosid⁵⁾.

100 g Pentacetyl- β -*d*-glucose werden in 84 g *o*-Kresol auf dem Wasserbade gelöst. In diese Lösung wird unter dauerndem Rühren und Erwärmen im Ölbad von 125–130° fein zerriebenes Chlorzink (6.8 g) eingetragen, 1 Stde. weiter erhitzt und gerührt; die etwas abgekühlte Mischung wird mit 200 ccm Benzol aufgenommen, mit Wasser (3-mal mit je 400 ccm), mit Natronlauge (etwa 10-proz., 350 ccm, portionsweise), wieder mit Wasser gewaschen, mit Chlorcalcium getrocknet, das Benzol unter vermindertem Druck verdampft und der Rückstand in 200 ccm absol. Alkohol (heiß) aufgenommen. Es krystallisiert die β -Verbindung⁶⁾ aus. Die in der Mutterlauge verbleibenden Anteile können nach dem Verdampfen zur Trockne durch Verseifen mit Natriummethylat direkt auf das freie *o*-Kresol- α -*d*-glucosid verarbeitet werden, das aus Wasser gut krystallisiert (s. u.). Engt man die Mutterlauge auf etwa die Hälfte ein, so krystallisiert — meist ziemlich langsam — vorwiegend das Tetracetat der α -Verbindung aus. Es wird durch mehrfaches Umkrystallisieren aus 2–3 Vol.-Tln. absol. Alkohol bis zur Konstanz der Drehung gereinigt:

$[\alpha]_D^{20} = +7.22^\circ \times 0.8682/0.0276 \times 1 \times 1.469 = +155^\circ$ (in Chloroform), Schmp. 101° bis 102° (nach Sintern).

3.845 mg Sbst.: 8.166 mg CO₂, 2.051 mg H₂O.

C₂₁H₂₆O₁₀ (438.2). Ber. C 57.51, H 5.98. Gef. C 57.79, H 5.96.

o-Kresol- α -*d*-glucosid.

Das freie Glucosid wird aus der Tetracetyl-Verbindung durch katalytische Verseifung mit Natriummethylat in guter Ausbeute gewonnen (18.5 g Tetracetyl-Verbindung in 50 ccm absol. Methanol mit 5 ccm

⁴⁾ B. Helferich, R. Gootz u. G. Sparmberg, Ztschr. physiol. Chem. **205**, 202 [1932]. ⁵⁾ B. Helferich u. Schmitz-Hillebrecht, B. **66**, 378 [1933].

⁶⁾ A. Kunz, Journ. Amer. chem. Soc. **48**, 262 [1926].

$n/5$ -Natriummethylat 2 Stdn. rückfließend gekocht, nochmals 5 ccm $n/5$ -Natriummethylat zugegeben, weitere 2 Stdn. gekocht und zur Trockne verdampft). Nach 2-maligem Umkrystallisieren aus wenig Wasser schmilzt die Substanz bei 170–172°.

$$[\alpha]_D^{20} = +2.64^{\circ} \times 2.1701 / 0.0366 \times 1 \times 1.009 = +156^{\circ} \text{ (in Wasser).}$$

4.473 mg Sbst.: 9.477 mg CO₂, 2.673 mg H₂O.

C₁₃H₁₈O₈ (270.14). Ber. C 57.75, H 6.72. Gef. C 57.78, H 6.69.

Tetracetyl- $[\omega$ -brom-*o*-kresol]- α -*d*-glucosid: Die Substanz wird durch Bromieren des Kresol-glucosids nach der früher für das β -*d*-galaktosid⁷⁾ angegebenen Methode hergestellt und durch Umkrystallisieren aus Chloroform mit Petroläther gereinigt. Schmp. 94–95.5°, korr. (nach Sintern).

$$[\alpha]_D^{20} = +3.85^{\circ} \times 0.9716 / 0.0350 \times 0.5 \times 1.468 = +145.6^{\circ} \text{ (in Chloroform).}$$

3.914 mg Sbst.: 7.034 mg CO₂, 1.750 mg H₂O. — 4.672 mg Sbst.: 1.700 mg AgBr.

C₂₁H₂₅O₁₀Br (517.12). Ber. C 48.73, H 4.87, Br 15.46.

Gef. „ 49.01, „ 5.00, „ 15.49.

Durch Schütteln der Bromverbindung in wasser-haltigem Aceton mit Silbercarbonat bei 15–20° wird das Brom durch Hydroxyl ersetzt. Durch Kochen mit Methanol und wenig Natriummethylat werden die Acetylgruppen abgespalten. Das „ α -Salicin“ wird so als amorphes, hygroskopisches Pulver erhalten, das Fehlingsche Lösung erst nach der Hydrolyse reduziert.

$$[\alpha]_D^{20} = +118^{\circ} \text{ (in Wasser).}$$

Vergleich der Spaltung zwischen

α -Phenol-glucosid	und	„ α -Salicin“
87		34 % Spltg.

nach 120 Min. in äquimol. Lösung (0.14-n.) durch α -Glucosidase aus Hefe⁸⁾ bei p_H 6.8 und 37.0°. Bestimmung der Glucose nach Bertrand.

Spaltung des *o*-Kresol- α -*d*-glucosids durch α -Glucosidase.

Das zur Spaltung angewandte Ferment wurde aus frischer, untergäriger Brauerei-Hefe, für deren Überlassung wir der Bierbrauerei E. Bauer zu Dank verpflichtet sind, nach der Vorschrift von Weidenhagen⁹⁾ jedesmal frisch bereitet. Die Eigendrehung der Ferment-Lösung schwankt zwischen -0.06° und -0.13° .

0.2500 g Maltose bzw. die äquiv. Menge der anderen Glucoside werden in 9.0 ccm Phosphat-Puffer gelöst (p_H etwa 6.94), mit 1.0 ccm Ferment-Lösung (= 0.067 g Trockenrückstand) versetzt und t Min. bei 30° gespalten. Abgestoppt wurde die Spaltung durch Zugabe von 0.5 g festem Kaliumcarbonat. Die Enddrehung für die Glucoside beträgt $+0.66^{\circ}$, bei der Maltose = $+1.31^{\circ}$, bei 100-proz. Spaltung.

⁷⁾ B. Helferich u. R. Gootz, B. **65**, 407 [1932].

⁸⁾ R. Willstätter u. E. Bamann, Ztschr. physiol. Chem. **151**, 242 [1926].

⁹⁾ R. Weidenhagen, Ztschr. Ver. Dtsch. Zucker-Ind. **80**, 155 [1930].

Tabelle 1.

Substrat α -D-Glucoside von	Anfangs- drehung	Zeit t'	Drehung*) nach t'	% Spaltung	Wertig- keit ¹⁰⁾
Glucose (= Maltose)	+3.23	20	+2.31	48	0.095
Methanol	+2.14	30	+1.83	21	0.042
Phenol-	+3.20	3	+2.32	34.5	0.50
<i>o</i> -Kresol-	+2.93	3	+2.20	32.2	0.49

*) Nach Berücksichtigung der Ferment-Eigendrehung.

357. Walter Hückel und Ulrich Lampert: Über Cyclohexan-dicarbonensäuren vom Typus der Weinsäure¹⁾.

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

(Eingegangen am 12. Oktober 1934.)

Die vorliegende Arbeit sollte einmal Beiträge zur Frage der Waldenschen Umkehrung bei Reaktionen von Säuren bringen, welche dem Weinsäure-Typus entsprechen; ferner war dabei die Möglichkeit ins Auge gefaßt, einen Dreiring, und zwar einen Äthylenoxyd-Ring, an den Cyclohexan-Ring anzugliedern, um festzustellen, ob dies außer in *cis*- auch in *trans*-Stellung möglich ist. Mit der Frage nach dem sterischen Verlauf der Reaktionen und nach der Konfiguration solcher Säuren der acyclischen Reihe haben sich R. Kuhn und Mitarbeiter²⁾ beschäftigt; die in diesen Arbeiten gezogenen Schlüsse gründen sie letzten Endes nur auf das Verhältnis der ersten und zweiten Dissoziationskonstanten, nach dem sie die Zuordnung zu bestimmten Konfigurationen vornehmen. Ob diese Schlüsse sicher genug sind, sollte an Beispielen entsprechend gebauter cyclischer Säuren, die allerdings die Substituenten an tertiären Kohlenstoffatomen tragen, also eigentlich der Dimethylweinsäure entsprechen, geprüft werden. Die tertiäre Natur der Substituenten ließ jedoch nicht die Herstellung aller in Betracht kommenden Isomeren zu, so daß die aufgeworfenen Fragen unbeantwortet bleiben mußten; doch liefern die Untersuchungen einen Beitrag zur Kenntnis der ersten und zweiten Dissoziationskonstanten von Dicarbonensäuren.

Der Gang der Untersuchungen war kurz folgender: Für die Δ^1 -Tetrahydro-*o*-phthalsäure wurde ein neues Darstellungs-Verfahren ausgearbeitet, das außerdem noch zu einer Cyclohexan-1-oxy-1.2-dicarbonensäure vom Schmp. 178° führte. Aus der Δ^1 -Tetrahydro-phthalsäure wurde durch Anlagerung von unterchloriger Säure eine der beiden möglichen Cyclohexan-1-chlor-2-oxy-1.2-dicarbonensäuren vom Schmp. 186° hergestellt; die Gewinnung der stereoisomeren Säure gelang auf keine Weise. Aus der Chlor-oxy-säure wurde einmal durch Hydrolyse des Chlors ein Gemisch der beiden stereoisomeren Cyclohexan-1.2-dioxy-1.2-

¹⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem. **205**, 246 [1932].

¹⁾ s. die gleichlautende Dissertation von U. Lampert, Greifswald 1933. Einige Vorversuche hat Hr. Dr. E. Kamenz in Freiburg i. Br. ausgeführt.

²⁾ R. Kuhn u. Mitarbeiter, B. **58**, 919 [1925], **59**, 2512 [1926], **61**, 481, 483, 504 [1928].