

**403. B. Helferich und U. Lampert: Glucosid-Synthesen mit Emulsin (Über Emulsin, XXIV. Mittel. <sup>1)</sup>).**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 9. Oktober 1935.)

Der fermentativen Synthese von Glucosiden zu präparativen Zwecken steht die in den bisherigen Versuchen beschriebene lange Versuchsdauer hindernd im Wege. Es schien uns daher nützlich, reinere Emulsin-Präparate als bisher zur Verbesserung solcher Synthesen zu prüfen. Die Resultate der sehr zahlreichen und z. T. zeitraubenden Versuche sind in der Hauptsache die folgenden:

1) Wird eine Lösung von 5 g wasser-freier Glucose in 500 ccm wäßrigem Methanol von 85% mit 1 g Mandel-Emulsin ( $\beta$ -Glucosidase-Wert 1.2) bei 20° dauernd und kräftig gerührt, so ist das Synthese-Gleichgewicht nach 43 Tagen erreicht (keine Drehungsänderung mehr). Wird die 5-fache Menge des gleichen Ferments angewandt, also 5 g, so ist das Gleichgewicht schon nach 13 Tagen erreicht.

2) Wird bei höherer Temperatur gerührt, so stellt sich das Gleichgewicht rascher ein. Allerdings ist dafür Methanol kein geeigneter Alkohol, da er das Ferment, besonders das hochwertige, zu rasch schädigt. Dagegen tritt bei einem Gemisch von 4 g Glucose in 200 g 95-proz. Benzylalkohol mit 1 g Ferment der Vorteil höherer Temperatur sehr schön hervor: Die Gleichgewichts-Einstellung ist bei dem Ferment vom  $\beta$ -Glucosidase-Wert 1.2 bei 20° in 12 Tagen, bei 37° in 9 Tagen erreicht. Ferment vom  $\beta$ -Glucosidase-Wert 10 führte bei 37° sogar schon nach weniger als einem Tage zum Gleichgewicht.

3) Steht Emulsin eines höheren  $\beta$ -Glucosidase-Wertes zur Verfügung, so geht allgemein die Synthese entsprechend schneller. Verwendet man in dem unter 1) genannten Beispiel 1 g Mandel-Emulsin vom  $\beta$ -Glucosidase-Wert 10, so ist das Gleichgewicht bei 20° schon in 5 Tagen erreicht.

4) Das Ferment-Präparat kann nach dem Abzentrifugieren erneut zu Synthesen verwandt werden. Allerdings muß man jedesmal eine Schädigung, eine Verschlechterung der Wirksamkeit, in Kauf nehmen, die hauptsächlich von dem verwendeten Aglucon abhängt.

5) Es wurde festgestellt, daß fermentative Synthese auch statthat (wenn auch sehr viel langsamer), wenn ein möglichst indifferentes Lösungsmittel, wie Aceton oder Dioxan, zur Auflösung des Aglucons verwandt wird. Wie zu erwarten, liegt aber das erreichbare (falsche?) Gleichgewicht ungünstiger. Eine noch halbwegs erträgliche Zeitdauer der Synthese ist nur möglich, bei erheblicher Konzentration des Aglucons in der Lösung<sup>2)</sup>.

6) Sehr stark ist die Geschwindigkeit der Gleichgewichts-Einstellung abhängig von der Natur des Aglucons. In der Reihe der normalen aliphatischen Alkohole steigt die Geschwindigkeit der Synthese mit der Zahl der Kohlenstoffatome, bis zum höchsten der von uns untersucht wurde, dem *n*-Octanol, an. Doch hat bei den letzten Gliedern wegen der sehr ungünstigen Lage des erreichbaren (falschen?) Gleichgewichts dies leider praktisch keine Bedeutung. Butanol dagegen ist ein Beispiel dafür, daß bei geeigneten Bedingungen und mit guten Ferment-Präparaten die fermentative

<sup>1)</sup> XXIII. Mittel. s. A. 520, 156 [1935].

<sup>2)</sup> s. a. J. Vintilesco, C. N. Ionesco, C. 1935, I 3554.

Glucosid-Synthese eine präparativ sehr rasche und gute, vielleicht die einfachste Methode zur Synthese von  $\beta$ -Glucosiden sein kann. Es seien daher im folgenden über diese Synthese genaue Angaben gegeben.

7) Fermentative Synthese von *n*-Butanol  $\beta$ -*d*-glucosid<sup>3)</sup>.

10 g wasser-freie Glucose werden zu einem 37° warmen Gemisch von 100 g wasser-gesättigtem (= 80-proz.) *n*-Butanol mit 3.5 g Süßmandel-Emulsin ( $\beta$ -Glucosidase-Wert 1.2) unter sehr kräftigem Rühren hinzugegeben. Trotz der Bildung zweier Schichten, einer wäßrigen Zucker-Lösung, in der auch das Ferment suspendiert ist, und einer alkohol. Schicht, die etwas Glucose gelöst enthält ( $\alpha_D = +0.80^\circ$  nach Beendigung der Mutarotation, d. i. 0.86 g), geht die Synthese bei kräftigem Rühren des Gemisches bei 37° in 3—6 Stdn. bis zum erreichbaren Gleichgewicht. Die Alkohol-Lösung zeigt dann die Drehung von  $-0.80^\circ$  ( $d_4^{20} = 0.842$ ). Dies entspricht einem Gehalt von etwa 2.7 g Glucosid (neben 0.86 g Glucose, s. o.). Zur Zerstörung des Ferments wird die abgossene alkohol. Lösung 15 Min. auf 100° erhitzt, dann unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand nach möglichst vollständigem Trocknen mit 50 ccm Aceton bei 15—20° aufgenommen. Die auf  $-20^\circ$  abgekühlte und dann von ungelöstem Zucker abgesaugte Lösung hinterläßt nach dem Eindampfen einen fast farblosen Sirup, der, aus 4 ccm absol. Essigester umkristallisiert, 1.5 g *n*-Butanol- $\beta$ -*d*-glucosid liefert. Die Mutterlauge ergibt beim vorsichtigen Versetzen mit 2 ccm Ligroin langsam (bei 0°) weitere 0.2 g. Die Gesamt-ausbeute beträgt also 1.7 g, das ist über 60% der nach der Drehung in der alkohol. Syntheseflüssigkeit vorhandenen Substanz.

Aus den zahlreichen Versuchen mit anderen Mischungen zwischen Butanol und Wasser sei noch das folgende erwähnt: Mit wasser-ärmeren Gemischen geht die Synthese wesentlich langsamer. Eine Entmischung tritt nach Zugabe des Zuckers aber auch schon bei wasser-ärmerem Butanol ein. Mit wasser-freiem Butanol konnte selbst nach mehreren Wochen keine Synthese beobachtet werden. Die Geschwindigkeit der Synthese steigt dagegen vom 80-proz. (wasser-gesättigten) Butanol an, bei Zugabe von mehr Wasser nicht mehr. Da das Ferment in der Wasser-Schicht gelöst ist, kann keine Steigerung der Geschwindigkeit bei höherem Wasser-Gehalt des Gemisches mehr erzielt werden. In Butanol, selbst in wasser-gesättigtem Butanol, löst sich Ferment nicht in nachweisbarer Menge.

Eine Synthese, wenn auch nur in bescheidenem Umfang, konnte auch in Wasser mit nur 5% Butanol noch festgestellt werden. Die beim Vermischen von Ferment-Lösung mit 5-proz. Butanol auftretenden Ferment-Fällungen geben keine neue Möglichkeit zur Ferment-Reinigung.

Bei diesen letzten Versuchen sind wir in freundlicher Weise durch Hrn. Hutson (Oxford) unterstützt worden. Auch Hrn. E. Günther danken wir für die Hilfe bei einigen Versuchen. Zu Dank verpflichtet sind wir weiter der Rockefeller-Foundation und besonders der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die durch ein Stipendium an Dr. Lampert die Durchführung der Arbeit ermöglicht hat.

<sup>3)</sup> Bourquelot, Ann. Chim. Phys. **29**, 195 [1913].