

261. Burckhardt Helferich und Edgar Weber: Die Synthese von β -*d*-Cellobiosid und β -*d*-Maltosid des Vanillins und die Einwirkung von Mandel-Emulsin auf diese Substanzen (XXVII. Mitteil. über Emulsin¹⁾).

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

(Eingegangen am 20. Mai 1936.)

Es ist bisher in der Literatur nur selten ein Beispiel beschrieben dafür, daß einfache Glykoside von Oligosacchariden durch fermentative Spaltung in Oligosaccharid und Aglykon gespalten werden: Nach älteren Literaturangaben werden Methyl- und Phenol- β -*d*-maltosid durch geeignetes Emulsin unter Bildung von Maltose hydrolysiert²⁾. Mehrfache, in letzter Zeit unternommene Versuche³⁾ haben aber ergeben, daß wohl nicht die gewöhnliche β -glukosidatische Wirkung des Emulsins für diese Spaltung verantwortlich zu machen ist. Abgesehen von der durch quantitative Versuche einwandfrei festgestellten Langsamkeit der Maltosid-Spaltung mit den heute gebräuchlichen Mandel-Emulsin-Präparaten³⁾ spricht dafür, daß Phenol- β -*d*-maltosid kaum schneller gespalten wird als Methyl- β -*d*-maltosid, während sonst beim Übergang vom Methyl zum Phenyl eine erhebliche Steigerung der Spaltgeschwindigkeit durch β -*d*-Glucosidase auftritt.

In letzter Zeit ist als besonders schnell spaltbar das Vanillin- β -*d*-glucosid aufgefunden worden⁴⁾. Wir haben daher nochmals das Problem aufgenommen, Fermente zu suchen, die bei der Spaltung von Glykosiden der Disaccharide diese Disaccharide entstehen lassen. Es wurden das Vanillin- β -*d*-cellobiosid und das Vanillin- β -*d*-maltosid nach bekannten Methoden, beide rein und in schön krystallisierter Form, dargestellt und die Einwirkung von Süßmandel-Emulsin⁵⁾ auf diese beiden Substrate geprüft.

Bei dieser Prüfung verhalten sich, wie zu erwarten, beide Substanzen grundsätzlich verschieden. Das Cellobiosid hat zwei glucosidische β -Bindungen im Molekül, eine zwischen den beiden Glucose-Bausteinen, eine zwischen dem Vanillin und einem Glucose-Baustein. Die erste ist genau so wie in der Cellobiose selbst dem Angriff β -*d*-glucosidatisch wirksamen Mandel-Emulsins zugänglich. Es konnte aber immerhin sein, daß auch die zweite β -Bindung zwischen Zucker und Vanillin schon im Cellobiosid für Süßmandel-Emulsin angreifbar ist und daß, wenn diese Angreifbarkeit der zweiten Stelle — veranlaßt durch das Vanillin — wesentlich größer ist als die Angreifbarkeit der ersten Stelle, sich doch Cellobiose im Verlauf der Spaltung vorübergehend würde nachweisen lassen.

Die Spaltversuche wurden in der üblichen Weise für verschiedene Zeiten durchgeführt und sowohl polarimetrisch wie auch reduktometrisch (Bertrand) verfolgt. Wertet man in beiden Fällen die Spaltung unter der Voraussetzung aus, daß nur Glucose entstanden ist, so stimmen die gefundenen prozentualen Spaltungen nach beiden Bestimmungsmethoden einigermaßen überein. Sicher ist jedenfalls, daß keinerlei Andeutung für vorübergehendes Auftreten von Cellobiose gefunden wurde; denn sonst hätte die reduktometrische Spaltung, ausgerechnet für Glucose, einen sehr viel niedrigeren

¹⁾ XXVI. Mitteil.: Ztschr. physiol. Chem. **239**, 241 [1936].

²⁾ E. Fischer u. E. F. Armstrong, B. **34**, 2896 [1901]; **35**, 3154 [1902]; B. Helferich u. J. Becker, A. **440**, 18 [1924].

³⁾ S. R. Petersen, Ber. sächs. Akad. Wiss. **1933**, 159.

⁴⁾ A. **518**, 211 [1935].

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **208**, 95 [1932].

Spaltungsgrad ergeben müssen als die für diesen Fall wenig charakteristische polarimetrische Untersuchung. Es liegen aber — auf Grund unbekannter Versuchsfehler — die reduktometrisch festgestellten Spaltungsgrade höher als die polarimetrisch festgestellten. Anzeichen für eine „cellobiosidatische Wirkung“ (Entstehung von Cellobiose aus Cellobiosid) konnte also auch bei Verwendung dieses Vanillin-cellobiosids nicht aufgefunden werden.

Auch die Einwirkung von Süßmandel-Emulsin auf Vanillin- β -d-maltosid ergab keine Sicherheit über eine „maltosidatische Wirkung“ (Entstehung von Maltose aus Maltosid) in dem angewandten Süßmandel-Emulsin. Im Gegensatz zu früheren Versuchen, in denen das Auftreten von Maltose als Spaltprodukt der Einwirkung von Mandel-Emulsin auf andere Maltoside sehr wahrscheinlich gemacht werden konnte²⁾, ist sogar im Fall des Vanillin- β -d-maltosids die bei Einwirkung von Süßmandel-Emulsin beobachtete sehr geringe und sehr langsame Spaltung auch erklärbar durch die im Süßmandel-Emulsin stets vorhandene, sehr geringe Fähigkeit, α -glucosidische Bindungen zu lösen. Alle Versuche, Maltose auch nur vorübergehend als Osazon zu fassen, sind in dieser Arbeit nicht gelungen.

Maltosidasen oder Cellobiosidasen konnten im Süßmandel-Emulsin demnach nicht nachgewiesen werden.

Der Rockefeller Foundation und der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Unterstützung bei dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche.

Heptacetyl-vanillin- β -d-cellobiosid.

Man vermischt frisch bereitete Lösungen von 11.9 g Aceto-bromcellobiose (1 Mol.) in 90 ccm Aceton und 8.0 g Vanillin (2.5 Mol.) in wäbr. Kalilauge (2.9 g KOH = 2.5 Mol. in 23 ccm Wasser). Die zunächst klare Lösung färbt sich grün, dann braun. Nach 7-stdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur wird das Reaktionsprodukt durch Eingießen der Mischung in 1 l Wasser und Ausschütteln mit im ganzen 200 ccm Benzol (in 3 Portionen) gewonnen. Nach mehrfachem Ausschütteln mit 2-n. Natronlauge, Trocknen mit Chlorcalcium, Verdampfen des Benzols unter vermindertem Druck und Umkrystallisieren des Rückstandes aus 75 ccm gewöhnlichem Alkohol erhält man das Heptacetyl-vanillin- β -d-cellobiosid in feinen Nadelchen. Ausbeute 5.2 g, das ist etwa 40% d. Th. Die Substanz schmilzt bei 206⁰ (unkorr.). Sie zeigt die Löslichkeiten der Acetylzucker. Zur Analyse und Drehungsbestimmung diente ein im ganzen 3-mal aus gewöhnlichem Alkohol umkrystallisiertes und bis zur Gewichtskonstanz unter vermindertem Druck getrocknetes Präparat.

3.830 mg Subst.: 7.499 mg CO₂, 1.826 mg H₂O.

C₃₄H₄₈O₃₀ (770). Ber. C 52.98, H 5.44. Gef. C 53.40, H 5.34.

$[\alpha]_D^{20} = -1.25^{\circ} \times 5.2020 / 0.0917 \times 1.474 \times 1 = -48.0^{\circ}$ (in Chloroform).

Vanillin- β -d-cellobiosid.

Die Entacetylierung wurde nach Zemplén durchgeführt: 4 g Heptacetyl-Verbindung in 10 ccm absol. Chloroform werden mit 10 ccm Natriummethylat-Lösung (2 g Natrium auf 100 ccm absol. Methanol) zunächst in Kältemischung (–20⁰), dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Eine Stde. nach Beginn einer gallertartigen Abscheidung wird mit 15 ccm

Eiswasser versetzt, durch vorsichtigen Zusatz von Essigsäure neutralisiert (Lackmus) und die von der Chloroform-Schicht getrennte wäbr. Lösung auf 0° abgekühlt. Ein Teil des Cellobiosids scheidet sich gallertartig, aber in filtrierbarer Form (absaugen) ab, die Mutterlauge liefert durch Eindampfen unter vermindertem Druck auf etwa $\frac{1}{4}$ ihres Volumens einen weiteren Anteil. Die gesamte Glykosid-Menge wird (ohne vorheriges Trocknen) durch Umkrystallisation aus 30 ccm warmem Wasser, dann (ohne trocknen) durch 25 ccm absol. Alkohol (nur gelinde bis zur Lösung erwärmt) umkrystallisiert. Durch Verreiben mit Äther kann die Substanz als weißes, sehr fein und meist undeutlich krystallisiertes Pulver erhalten werden. Ausbeute 1 g (40% d. Th.). Die Substanz beginnt sich von etwa 170° ab zu verfärben und schmilzt unter vollständiger Zers. bei 214—216°.

Die Substanz ist unlöslich in Chloroform, sehr schwer löslich in Aceton, schwer löslich in Methanol und Alkohol, ebenso in kaltem Wasser. In heißem Wasser ist sie leicht löslich. Die Löslichkeit in Alkohol und Wasser erklärt es, daß beim Trocknen der alkohol- oder wasserfeuchten Substanz eine hornartige Masse zurückbleibt, die sich nur sehr langsam wieder auflöst.

3.394 mg Sbst.: 6.275 mg CO₂, 1.852 mg H₂O.

C₂₀H₄₆O₁₃ (476). Ber. C 50.42, H 5.88. Gef. C 50.42, H 6.11.

$[\alpha]_D^{22} = -1.76^\circ \times 4.9674/0.0594 \times 1.002 \times 2 = -73^\circ$ (in Wasser).

Zur Charakteristik des Glykosids, speziell zum Nachweis der intakten Aldehyd-Gruppe im Vanillin, wird eine Lösung von 0.1 g Cellobiosid in 5 ccm Warmwasser mit einer Lösung von 0.06 g *p*-Nitrophenylhydrazin in 3 ccm Alkohol 1 Stde. auf 80° erhitzt. Die beim Abkühlen sich abscheidende rote Gallerte wird durch 2-maliges Verreiben mit wenig absol. Alkohol, dann ebenso mit Äther als pulvrige Substanz erhalten. Ausbeute fast quantitativ. Schmp. 251—252° (unt. Zers.); unlöslich in Äther, nur sehr wenig löslich in Wasser und absol. Alkohol, nicht erkennbar krystallin.

3.138 mg Sbst.: 0.190 ccm N₂ (18°, 752 mm).

C₂₆H₃₃O₁₄N₂ (611). Ber. N 6.88. Gef. N 7.03.

Heptacetyl-vanillin- β -*d*-maltosid.

Die Substanz wird wie beim entsprechenden Cellobiosid beschrieben hergestellt. Nur genügen für die Lösung der Aceto-brom-maltose 66 ccm Aceton (statt 90 ccm). Der nach Verdampfen des Benzols verbleibende Rückstand wird aus 25 ccm gewöhnlichem Alkohol umkrystallisiert (wenn nötig Entfärbungskohle) und so die Heptacetyl-Verbindung in feinen Nadelchen erhalten. Ausbeute 7 g (54% d. Th.); Schmp. 144—145°. Die Substanz zeigt die Löslichkeit der Acetylzucker.

3.718 mg Sbst.: 7.231 mg CO₂, 1.839 mg H₂O.

C₃₄H₄₂O₂₀ (770). Ber. C 52.98, H 5.44. Gef. C 53.04, H 5.49.

$[\alpha]_D^{21} = +0.79^\circ \times 7.2191/0.1400 \times 1.472 \times 1 = +27.7^\circ$ (in Chloroform).

Vanillin- β -*d*-maltosid.

Die Pentacetylierung erfolgt ebenso wie beim Cellobiosid. Das Maltosid krystallisiert mit 4 Mol. Krystallwasser. Ausbeute aus 4 g Heptacetyl-Verbindung 2 g Maltosid (70% d. Th.). Die krystallwasserhaltige Substanz schmilzt bei 85°, die wasserfreie (bei 1—2 mm bei der Siedetemperatur des Methanols über CaCl₂ getrocknet) zunächst bei 153°, dann nach dem Wieder-

erstarren schließlich und endgültig bei 220° (unt. Zers.). Die getrocknete Substanz ist recht hygroskopisch. In kaltem Wasser ist sie mäßig leicht löslich, in heißem Wasser, ebenso in Methanol und Alkohol leicht löslich.

3.275 mg Subst.: 6.106 mg CO₂, 1.714 mg H₂O.

C₂₆H₂₈O₁₃. Ber. C 50.42, H 5.88. Gef. C 50.85, H 5.86.

$[\alpha]_D^{20} = +0.43^\circ \times 5.3158 / 0.0674 \times 1.002 \times 2 = +16.9^\circ$ (in Wasser; c = 1.25 %).

Zur Darstellung eines *p*-Nitrophenylhydrazons (Nachweis der Aldehydgruppe im Vanillin) werden 0.06 g *p*-Nitrophenylhydrazin und 0.1 g Maltosid in 6 ccm absol. Alkohol 2 Stdn. bei Zimmertemperatur aufgehoben. Die Aufarbeitung erfolgt wie beim entsprechenden Cellobiosid. Ausbeute 0.1 g. Schmp. nach Sintern bei 208—209° (unt. Zers.). Unlöslich in Äther, schwer löslich in Alkohol, löslich in Wasser, nicht erkennbar kristallin.

3.628 mg Subst.: 0.230 ccm N₂ (21°, 749 mm).

C₁₆H₂₃O₄N₃ (611). Ber. N 6.88. Gef. N 7.25.

Spaltungen.

Die Spaltungen wurden bei 30° im Thermostaten durchgeführt.

Spaltung des β-Vanillin-cellobiosids mit Emulsin.

Spaltansatz: 0.4500 g β-Vanillin-cellobiosid wurden in 45.0 ccm Acetatpuffer (p_H = 5) gelöst. Davon wurden 42.0 ccm, enthaltend 0.4200 g Cellosid, zu 21.0 ccm einer 0.20-proz. Rohferment-Lösung gegeben. Nach 25, 60 und 90 Min. wurden je 18.0 ccm Spaltungsgemisch entnommen und die Einwirkung des Ferments durch Zusatz von 2.0 g Kaliumcarbonat unterbrochen. Es dienten 3.0 ccm zur Drehungsbestimmung und 15.0 ccm zur Reduktion nach Bertrand.

β-Vanillin-cellobiosid: $[\alpha]_D^{20} = -72.6^\circ$. Anfangsdrehung: ber. -0.48° , beob. -0.50° , beides ohne Berücksichtigung des Ferments und für ein Spaltungsgemisch, das 0.1000 g β-Vanillin-cellosid in 15.0 ccm Lösung enthält.

Enddrehung für Cellose als Endprodukt: $+0.17^\circ$.

Enddrehung für Glucose als Endprodukt: $+0.26^\circ$.

Eigendrehung des Ferments im Spaltungsgemisch: -0.02° .

Ferment-Rückstand in 1 ccm Ferment-Lösung: 0.0016 g.

Eigenverbrauch des Ferments bei der reduktometrischen Bestimmung: 0.03 ccm n/10 KMnO₄.

Zeit (Min.)	Drehung *	ccm ** n/10-KMnO ₄	% Spaltung ber. f. Glucose aus d. Drehung	aus KMnO ₄
25	-0.32	6.77	22	28.5
60	-0.17	10.57	42	45.2
90	-0.05	13.77	58	60.2

* Unter Berücksichtigung der Drehung des Ferments.

** Unter Berücksichtigung des Eigenverbrauchs des Ferments.