

**330. Burckhardt Helferich, Erich Günther und William Ward Pigman\*): Die Spaltbarkeit von *d*-Xylosiden, *l*-Xylosiden und *d*-*l*-Xylosiden durch Süßmandel-Emulsin (Emulsin XLII\*\*)).**

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

(Eingegangen am 10. Oktober 1939.)

Die Frage der fermentativen Spaltbarkeit von Glykosiden enantiomorpher Zucker ist nur sehr selten geprüft worden<sup>1)</sup>, da geeignetes Material, Substrat sowohl wie Ferment, nur in seltenen Fällen zur Verfügung steht. Nun spaltet das Süßmandel-Emulsin  $\beta$ -*d*-Xyloside<sup>2)</sup>, wenn auch langsam. Für diese Spaltung ist nach unserer heutigen Kenntnis die Annahme einer besonderen  $\beta$ -*d*-Xylosidase nicht nötig, sondern es kann die  $\beta$ -*d*-xylosidatische Wirkung der  $\beta$ -*d*-Glucosidase des Süßmandel-Emulsins zugeordnet werden. Wir haben uns die Aufgabe gestellt, die Spaltbarkeit von  $\beta$ -*d*-Xylosiden und von  $\beta$ -*l*-Xylosiden durch Süßmandel-Emulsin zu vergleichen.

1) Die Synthese des Phenol- $\beta$ -*d*-Xylosids ist schon früher beschrieben worden<sup>3)</sup>. In ganz der gleichen Weise gelingt es auch, den optischen Antipoden aus *l*-Xylose herzustellen. Während das *d*-Xylosid die schon früher festgestellte Spaltbarkeit durch Süßmandel-Emulsin zeigt, konnte beim *l*-Xylosid trotz Verwendung hoher Fermentkonzentrationen und langer Zeitdauer eine wirkliche Spaltung so gut wie nicht festgestellt werden. Die entsprechenden Wertigkeiten sind aus der Tafel 1 ersichtlich.

Beim Zusammengeben von gesättigten Lösungen der einzelnen optischen Antipoden, des Phenol- $\beta$ -*d*-xylosids und des Phenol- $\beta$ -*l*-xylosids, fällt rasch und in recht guter Ausbeute eine schöne krystalline, in Wasser nur mäßig lösliche Racem-Verbindung. Ihre Krystalle unterscheiden sich unter anderem von den aktiven Komponenten auch dadurch, daß sie zwischen gekreuzten Nicols nicht aufhellen.

Es war interessant, zu untersuchen, ob in der wäßr. Lösung der Racem-Verbindung eine Beeinflussung der fermentativen Spaltbarkeit des *d*-Xylosids durch die Anwesenheit des *l*-Xylosids feststellbar war. Aus den Werten der Tafel 1 (s. u.) für die Wertigkeit geht hervor, daß diese Beeinflussung in verzögerndem Sinne, wenn überhaupt vorhanden, dann nur sehr klein ist. Vermutlich wird in der wäßr. Lösung nur in ganz geringem Maße eine racemische Verbindung vorliegen, sondern fast oder ganz ausschließlich ein Gemisch der optischen Antipoden.

Die Unspaltbarkeit des *l*-Xylosids durch Süßmandel-Emulsin beweist erneut, daß das  $\beta$ -*d*-xylosid-spaltende Ferment, vermutlich also die  $\beta$ -*d*-Glucosidase, einen asymmetrischen Bau hat.

Die Möglichkeit, von den zwei Antipoden eines racemischen Glykosids den einen fermentativ zu spalten, ergibt einen bisher wohl noch nicht be-

\*) Der Lalor Foundation, Wilmington, U. S. A., sind wir für die Gewährung eines Stipendiums an Hrn. Pigman zu großem Dank verpflichtet.

\*\*) XI. Mitteil. siehe Ztschr. physiol. Chem. **261**, 189 [1939].

1) z. B. E. Fischer, B. **27**, 3483 [1894].

2) Unter *d*-Xylose ist, entsprechend der modernen Nomenklatur (vergl. A. Wohl u. K. Freudenberg, B. **56**, 309 [1923]), die in der Natur vorkommende mit der *d*-Glucose konfiguratив nahe verwandte Xylose gemeint. Unter *l*-Xylose verstehen wir den in der Natur bisher nicht aufgefundenen Antipoden.

3) B. Helferich u. F. Schmitz-Hillebrecht, B. **66**, 382 [1933].

schriftlichen neuen Weg zur präparativen Trennung von racemischen Zuckern in ihre optisch aktive Komponenten. Vielleicht kann dieser neue Weg bei synthetisch hergestellten Zuckern rascher als nach den bisherigen Methoden die beiden optisch aktiven Komponenten liefern.

2) Im Anschluß an die verschiedentlich untersuchten Spaltungen von Bisglykosiden mehrwertiger Alkohole und Phenole<sup>4)</sup> wurde in das Molekül des Protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-glucosids-(4)<sup>5)</sup> sowohl die  $\beta$ -*d*-Xylose, wie auch die  $\beta$ -*l*-Xylose an das freie (3)-Hydroxyl eingeführt. Die so erhaltenen Verbindungen, das Protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-glucosid-(4)- $\beta$ -*d*-xylosid-(3) und das Protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-glucosid-(4)- $\beta$ -*l*-Xylosid-(3) wurden auf ihre Spaltbarkeit durch Süßmandel-Emulsin geprüft. In beiden Fällen ist die Abspaltung der  $\beta$ -*d*-Glucose, wie zu erwarten, feststellbar.

Die erste der beiden Verbindungen, der die beiden Zucker der *d*-Reihe angehören, wird von Süßmandel-Emulsin etwa in der gleichen Größenordnung gespalten wie die anderen bisher bekannten Bisglykoside des Protocatechualdehyds<sup>4)</sup> (s. Tafel 1). Dieses Ergebnis ist sicher, trotzdem die zahlenmäßig genaue, quantitative Verfolgung der Spaltbarkeit nicht möglich ist. Denn das Ferment greift nicht nur die  $\beta$ -*d*-glucosidische Bindung an, sondern spaltet auch die  $\beta$ -*d*-Xylose ab. Wenn auch diese zweite Abspaltung langsamer als die erste verläuft, so ist der Unterschied in den beiden Abspaltungen (von  $\beta$ -*d*-Glucose und  $\beta$ -*d*-Xylose) nicht so groß, daß bei Berechnung der Wertigkeit, auch im Anfangsstadium, die Abspaltung der Xylose ohne Fehler vernachlässigt werden kann (s. Versuchs-Teil Tafel 3). Trotz dieser Schwierigkeit läßt sich aber sicher ein großer Unterschied gegenüber der Spaltbarkeit des Bisglucosids erkennen, das als zweiten Zucker die fermentiv nicht abspaltbare *l*-Xylose enthält. Die Spaltbarkeit der  $\beta$ -*d*-glucosidischen Bindung ist in diesem Fall wesentlich geringer (Tafeln 1 u. 3), nämlich nur  $\frac{1}{100}$ . Vielleicht „besetzt“ die  $\beta$ -*l*-Xylose mit ihrem der  $\beta$ -*d*-Glucose enantiomorphen Pyranring die benachbarte Glucose noch wesentlich vollkommener als die *d*-Xylose, so daß das Ferment mit seiner Haftstelle viel seltener Zutritt hat.

Mit hochwertigem Ferment wurde die Spaltung des Protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-Glucosid-(4)- $\beta$ -*l*-xylosids-(3) bis zur vollständigen Abspaltung der Glucose durchgeführt (Tafel 4). Aus der dann beobachteten Enddrehung läßt sich die spezifische Drehung für das Protocatechualdehyd- $\beta$ -*l*-xylosid-(3) und damit dann auch für den optischen Antipoden, das *d*-Xylosid, berechnen.

Tafel 1. Wertigkeiten (W) gegen Süßmandel-Emulsin vom  $\beta$ -Glucosidase-wert 1.1.

Substrat	W.
Phenol- $\beta$ - <i>d</i> -xylosid .....	0.0058
Phenol- $\beta$ - <i>l</i> -xylosid .....	0.000005
Phenol- $\beta$ - <i>d,l</i> -xylosid .....	0.0051*)
Protocatechualdehyd- $\beta$ - <i>d</i> -glucosid-(4)- $\beta$ - <i>d</i> -xylosid-(3) .....	etwa 0.1
Protocatechualdehyd- $\beta$ - <i>d</i> -glucosid-(4)- $\beta$ - <i>l</i> -xylosid-(3) .....	etwa 0.001

\*) Berechnet nur für *d*-Xylosid.

4) Siehe z. B. B. Helferich, *Ergebn. d. Enzymforsch.*, Bd. VII, 87 usw.

5) B. Helferich, H. E. Scheiber, R. Streeck u. F. Vorsatz, *Ann.* **518**, 221 [1935].

## Beschreibung der Versuche.

## Substrate.

Tetraacetyl- $\beta$ -*d*-xylopyranose.

150 g *l*-Xylose werden mit der gleichen Menge wasserfreiem Natriumacetat in 900 ccm Essigsäureanhydrid durch Erhitzen auf dem Wasserbad in etwa 10 Min. in Lösung gebracht und dann 2 Stdn. ebenso weiter erhitzt. Durch Eingießen in 8 l Eiswasser, Absaugen des flockigen, fast weißen Niederschlags (nach mehrstündigem Aufbewahren bei Zimmertemperatur) und Umkrystallisieren aus 7 l heißem Wasser unter Zusatz von Carboraffin, erhält man die reine Verbindung in einer Ausbeute von 173 g (54% d. Th.) vom Schmp. 123—125°.

5.056 mg Sbst.: 9.115 mg CO<sub>2</sub>, 2.570 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub> (318.1). Ber. C 49.04, H 5.70. Gef. C 49.17, H 5.69.

$[\alpha]_D^{21}$ :  $+1.08 \times 5.3584 / 0.1560 \times 1 \times 1.469 = +25.3^\circ$  (in Chloroform).

Triacetyl-phenol- $\beta$ -*l*-xylopyranosid.

Die Substanz wurde nach der gleichen Vorschrift wie das *d*-Xylosid hergestellt<sup>3)</sup>. Die Ausbeute aus 20 g der Tetraacetylverbindung betrug 8.4 g, der Schmelzpunkt der reinen Substanz war 143—145°.

4.742 mg Sbst.: 10.085 mg CO<sub>2</sub>, 2.440 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub> (352.2). Ber. C 57.93, H 5.72. Gef. C 58.22, H 5.78.

$[\alpha]_D^{21}$ :  $+2.85 \times 3.0403 / 0.1165 \times 1 \times 1.468 = +50.7^\circ$  (in Chloroform).

Phenol- $\beta$ -*l*-xylopyranosid.

Die Entacetylierung wurde nach Zemplén in der Hitze durchgeführt. Der nach Eindampfen des Methanols verbleibende Rückstand (aus 10 g Triacetyl-xylosid) wurde 2-mal aus einem Gemisch von je 100 ccm Essigester und 5 ccm gewöhnl. Alkohol umkrystallisiert. Ausb. 5 g. Schmp. 178—180°. Die Substanz reduziert Fehlingsche Lösung bei längerem Kochen.

4.940 mg Sbst.: 10.565 mg CO<sub>2</sub>, 2.730 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> (226.1). Ber. C 58.38, H 6.24. Gef. C 58.33, H 6.18.

$[\alpha]_D^{20}$ :  $+1.51 \times 3.1459 / 0.0954 \times 1 \times 1.009 = +49.5^\circ$  (in Wasser).

Phenol- $\beta$ -*d,l*-xylopyranosid (Racem-Verbindung).

Bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen von *d*- und von *l*-Xylosid (1 Tl. Xylosid auf etwa 31 Tle. Wasser) geben beim Vermischen in kurzer Zeit einen reichlichen krystallinen Niederschlag der Racem-Verbindung. Ausb. (exsiccator-trocken) 80% der Summe beider Glykoside. Die Krystalle unterscheiden sich von den optisch aktiven Komponenten dadurch, daß sie zwischen gekreuzten Nicols unter dem Mikroskop nicht aufhellen. Der Schmelzpunkt liegt bei 187° (korr.), d. h. also 10° höher als bei den optisch aktiven Komponenten. Die Mischschmelzpunkte mit den einzelnen optisch aktiven Komponenten sind unscharf und niedriger, die Drehung der Racem-Verbindung in wäbr. Lösung ist Null.

Aceto-brom-*l*-xylose.

Die Substanz wurde aus Tetraacetyl-*l*-xylose nach den von Hudson und Johnson<sup>6)</sup> für die *d*-Verbindung veröffentlichten Angaben hergestellt. Nur wurde die Einwirkungsdauer des Bromwasserstoffs von 10 Min. auf 1 Stde. heraufgesetzt. Die Ausbeute aus 10 g Tetraacetyl-*l*-xylose betrug 8.3 g kristallisiertes Bromid vom Schmp. 95—97°. Die Substanz wurde stets sofort weiter verarbeitet.

Heptaacetyl-protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-glucosid-(4)- $\beta$ -*l*-xylosid-(3).

Zu einer Lösung von 1 g Ätznatron (1.1 Mol.) in 30 ccm Wasser und 120 ccm Aceton werden 15.2 g (1.3 Mol.) Protocatechualdehyd-tetraacetyl- $\beta$ -*d*-glucopyranosid-(4)<sup>5)</sup> und danach 8.3 g (1 Mol.) Acetobrom-*l*-xylose gegeben. Nach 15-stdg. Stehen bei Zimmertemperatur wird die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft, der Rückstand mehrmals mit 200 ccm Wasser verrieben, und der wasserunlösliche Anteil 2-mal mit je 200 ccm Benzol je 1 Stde. ausgekocht. Die vereinigten Benzollösungen werden 3-mal mit je 250 ccm 2-*n*.Natronlauge ausgeschüttelt, einmal mit Wasser gewaschen, mit Chlorcalcium getrocknet und schließlich unter vermindertem Druck eingedampft. Der zurückbleibende Sirup wird aus 40 ccm gew. Alkohol kristallin erhalten und durch erneutes Umkrystallisieren auf die gleiche Weise gereinigt. Ausb. 4.9 g, Schmp. 148—150°.

Der bei der Benzolextraktion ungelöst gebliebene Anteil ist unverändertes Protocatechualdehyd-tetraacetyl- $\beta$ -*d*-glucosid, das (nach einmaligem Umkrystallisieren aus gewöhnl. Alkohol) wieder verwandt werden kann.

4.993 mg Sbst.: 9.680 mg CO<sub>2</sub>, 2.340 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub> (726.3). Ber. C 52.87, H 5.27. Gef. C 52.85, H 5.24.

$[\alpha]_D^{21}$ : +0.50  $\times$  2.5842/0.0934  $\times$  1  $\times$  1.469 = +9.4° (in Chloroform).

Protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-glucosid-(4)- $\beta$ -*l*-xylosid-(3).

Die Entacetylierung wird durch Kochen von 4.9 g Heptaacetylverbindung in 100 ccm Methanol und 5 ccm *n*/<sub>10</sub>-Natriummethylat durchgeführt. Die Substanz geht rasch in Lösung, das acetylfreie Bisglykosid kristallisiert schon aus der kochenden Lösung aus. Seine Abscheidung wird durch Abkühlen vervollständigt. Ausb. 2.8 g, die durch 2-maliges Umkrystallisieren aus je 25 ccm Wasser gereinigt werden. Schmp. 235—237°.

4.924 mg Sbst.: 9.045 CO<sub>2</sub>, 2.500 H<sub>2</sub>O.

C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub> (432.2). Ber. C 49.98, H 5.60. Gef. C 50.10, H 5.68

$[\alpha]_D^{20}$ : -0.64  $\times$  4.0619/0.0788  $\times$  1  $\times$  1.006 = -32.7° (in Wasser).

Heptaacetyl-protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-glucosid-(4)- $\beta$ -*d*-xylosid-(3).

Der Ansatz zur Darstellung dieser Verbindung war der gleiche, wie bei dem entsprechenden *l*-Xylosid (s. o.). Ausb. aus 10 g Acetobrom-*d*-xylose 5.2 g. Schmp. nach 2-maligem Umkrystallisieren aus je 50 ccm 96-proz. Alkohol 147—149°.

4.754 mg Sbst.: 9.155 CO<sub>2</sub>, 2.240 H<sub>2</sub>O.

C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub> (726.3). Ber. C 52.87, H 5.27. Gef. C 52.52, H 5.27.

$[\alpha]_D^{20}$ : -3.86  $\times$  3.0717/0.1155  $\times$  1  $\times$  1.469 = -69.9° (in Chloroform).

<sup>6)</sup> C. S. Hudson u. J. M. Johnson, Journ. Amer. chem. Soc. **37**, 2748 [1915].

Protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-glucosid-(4)- $\beta$ -*d*-xylosid-(3).

5 g Heptacetylverbindung werden durch 10 Min. langes Kochen in 40 ccm Methanol mit 4 ccm  $n_{10}$ -Natriummethylat entacetyliert. Der nach dem Eindampfen unter vermindertem Druck zurückbleibende Sirup wird aus 40 ccm gewöhnl. Alkohol krystallin erhalten und durch mehrmaliges Umkrystallisieren auf die gleiche Weise gereinigt. Die lufttrockne Substanz enthält  $\frac{1}{2}$  Mol. Krystallalkohol, das beim Trocknen abgegeben wird (2 mm,  $P_2O_5$ , 3 Stdn. bei  $56^\circ$ , dann 15 Stdn. bei  $100^\circ$ ). Die krystallalkoholhaltige Substanz sintert von etwa  $72^\circ$  ab. Die alkoholfreie Substanz schmilzt bei  $128-130^\circ$ .

Analyse und Drehung wurden mit der alkoholfreien getrockneten Substanz durchgeführt. Der Alkohol der ungetrockneten Substanz wurde qualitativ durch die Jodoformprobe nachgewiesen.

5.043 mg Sbst.: 9.185  $CO_2$ , 2.520  $H_2O$ .

$C_{18}H_{24}O_{12}$  (432.2). Ber. C 49.98, H 5.60. Gef. C 49.67, H 5.59.

$[\alpha]_D^{20}$ :  $-2.70 \times 4.0687 / 0.1211 \times 1 \times 1.01 = -89.8^\circ$  (in Wasser).

## Fermentspaltungen der Phenol-xyloside.

Substratlösungen: 0.309 g Phenol- $\beta$ -*d*-xylosid in 100 ccm Acetatpuffer (etwa  $m_{10}$ ),  $p_H$  5.0. Die Konzentration konnte wegen der geringen Löslichkeit der Racemverbindung nicht höher gewählt werden.

0.882 g Phenol- $\beta$ -*l*-xylosid in 50 ccm Acetatpuffer (etwa  $m_{10}$ ),  $p_H$  5.0.

0.6175 g Phenol- $\beta$ -*d,l*-xylosid in 100 ccm Acetatpuffer (etwa  $m_{10}$ ),  $p_H$  5.0.

Enzymlösung: 2.5 g Rohferment<sup>7)</sup> wurden mit 100 ccm Wasser angerührt, über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und dann klar zentrifugiert.  $\beta$ -Glucosidase-Wert 1.1. Rückstand aus 10.0 ccm 0.1876 g für Spaltung des *l*-Xylosids, 0.2014 g für Spaltung der anderen beiden Xyloside.

Tafel 2.

t/Min.	ccm $n_{10}$ -Jod*)	% Spaltung	$k \times 10^4$	$W \times 10^4$
Phenol- $\beta$ - <i>d</i> -xylosid				
261	5.47	25.0	4.8	58
358	6.87	31.4	4.6	56
Phenol- $\beta$ - <i>l</i> -xylosid				
4695	0.10	0.2	0.002	0.02
12960	0.60	1.4	0.005	0.05
27300	1.30	3.1	0.005	0.05
Phenol- $\beta$ - <i>d,l</i> -xylosid (berechnet für das <i>d</i> -Xylosid allein)				
250	5.01	22.9	4.5	54
363	6.62	30.3	4.3	52
935	12.65	57.9	4.0	48

\*) Der Jodverbrauch des Ferments allein unter den gleichen Bedingungen ist berücksichtigt. Er betrug 6.13 ccm, beim Ferment der *l*-Xylosid-Spaltung 2.60 ccm.

<sup>7)</sup> B. Helferich u. S. Winkler, Ztschr. physiol. Chem. **209**, 272 [1935].

Durchführung und Messung der Spaltung: Ein bestimmtes Volumen der Xylosid-Lösung (25 ccm der *l*-Verbindung, 20 ccm der *d*- und der *d,l*-Verbindung) wurden bei 30.0° mit einem abgemessenen Vol. der Fermentlösung (12.5 ccm bei dem *l*-Xylosid, 7.5 ccm in den beiden anderen Fällen) versetzt, die Zeit *t* (Min.) bei 30.0° aufbewahrt und dann 27.5 ccm (im Fall des *l*-Xylosids nur 10.0 ccm) zu einer Mischung von 65 ccm (im Fall des *l*-Xylosids 60 ccm) 2 $\frac{1}{2}$ -proz. Kaliumcarbonatlösung mit 50.00 ccm  $n_{10}$ -Jod gegeben. Nach 15 Min. bei Zimmertemperatur wurde die Lösung mit 2-*n*. Schwefelsäure angesäuert und das unverbrauchte Jod mit Thiosulfat zurücktitriert.

Bei vollständiger Spaltung würden verbraucht: 21.86 ccm  $n_{10}$ -Jod für das *d*-Xylosid, 41.64 ccm für die *l*-Verbindung und 43.8 ccm für die Racemsubstanz.

#### Fermentspaltung der Protocatechualdehyd-bis-glykoside.

Substratlösungen: 0.844 g Substanz wurde in 25.0 ccm Acetatpuffer (etwa  $n_{10}$ ),  $p_H$  5.0, unter Erwärmen gelöst und auf 30.0° abgekühlt. Die Verbindung der *l*-Xylose ist dann in übersättigter Lösung, muß also gleich weiter verarbeitet werden.

Fermentlösung: Ein Teil der für die Spaltung des *d*- und des *d,l*-Xylosids verwandten Fermentlösung (s. o.) wurde auf das 2 $\frac{1}{2}$ -fache mit Wasser verdünnt.

Durchführung der Spaltung: 2.0 ccm der Substratlösung wurden bei 30.0° mit 1.0 ccm der Fermentlösung versetzt, *t* Min. bei 30.0° aufbewahrt (unter Toluolzusatz), dann nach Zusatz von 20 mg festem Kaliumcarbonat filtriert und die Drehung  $\alpha_t$  im 2-dm-Rohr bestimmt. In 50.0 ccm Bestimmungsgemisch also 0.1343 g Fermentpräparat (= g).

In der folgenden Tafel 3 sind die Werte: % Spaltung<sub>1</sub>,  $k_1 \times 10^3$  und  $W_1$  für die Abspaltung von *d*-Glucose errechnet, während dieselben Werte mit

Tafel 3.

<i>t</i> /Min.	$\alpha_t$	% Spaltung <sub>1</sub>	$k_1 \times 10^3$	$W_1$	% Spaltung <sub>2</sub>	$k_2 \times 10^3$	$W_2$
Protocatechualdehyd- $\beta$ - <i>d</i> -glucosid- $\beta$ - <i>d</i> -xylosid							
0	−3.93						
13	−3.47	17.6	6.8	0.16	8.8	3.2	0.08
57	−2.61	50.6	5.4	0.13	25.3	2.3	0.055
165	−1.63	88.2	5.8	0.14	44.2	1.6	0.038
1040	+0.11				77.6	0.7	0.016
Protocatechualdehyd- $\beta$ - <i>d</i> -glucosid- $\beta$ - <i>l</i> -xylosid							
0	−1.38						
310	−1.18	4.3	0.06	0.0015			
1350	−0.74	13.7	0.05	0.0011			
5400	+0.31	36.3	0.04	0.0009			
21600	+1.55	62.9	0.02	0.0005			
$\infty$	+1.80	(bei Abspaltung von <i>d</i> -Glucose allein)					

Der Abfall der Wertigkeit ist wohl auf eine Zersetzung des Ferments bei der langen Versuchsdauer zurückzuführen.

dem Index  $\alpha$  für den Fall berechnet sind, daß auch *d*-Xylose mit abgespalten wird. Enddrehung bei der Spaltung des *d*-Glucosid-*d*-xylosids, wenn nur *d*-Glucose abgespalten wird:  $-1.32^\circ$ , wenn auch *d*-Xylose vollständig abgespalten ist  $+1.28^\circ$ . Die Abspaltung der *l*-Xylose bei dem zweiten Bis-glykosid kommt nicht in Frage.

Die Werte für  $k$  sind mit Briggschen Logarithmen angegeben.

Spaltung vom Protocatechualdehyd- $\beta$ -*d*-glucosid-(4)- $\beta$ -*l*-xylosid-(3) mit hochwertigem Süßmandel-Emulsin.

0.39 g über die Silberverbindung gereinigtes Süßmandel-Emulsin<sup>7)</sup> wurden in 25 ccm Wasser angerührt und diese Lösung nach Zentrifugieren mit Carboraffin geklärt. Die Wertbestimmung ergab den hohen  $\beta$ -Glucosidasewert 16.2! Über das so gereinigte Ferment soll in einer späteren Arbeit genauer berichtet werden.

12.5 ccm dieser Fermentlösung wurden zur Zeit  $t = 0$  mit einer Lösung von 0.8446 g des Bisglykosid in 25 ccm Acetatpuffer (etwa  $m/10$ ) vom  $p_H$  5.0 vermischt, die Mischung bei  $30.0^\circ$  aufbewahrt und die Drehung in größeren Zeitintervallen bestimmt. Die Konzentration des Fermentpräparats in 50 ccm Bestimmungsgemisch (= g) betrug 0.0467 g, die Eigendrehung des Ferments in der gleichen Konzentration ( $-0.09^\circ$ ) ist in den folgenden Zahlen der Tafel 4 berücksichtigt. Messung im 1-dm-Rohr.

Tafel 4.

t/Min.	$\alpha_t$	t/Min.	$\alpha_t$
0	$-0.65$	10080	$+1.57$
4320	$+1.25$	14520	$+1.62$
6660	$+1.45$	18720	$+1.64$

Die zuletzt angegebene Drehung nach fast 19000 Min. wurde als Enddrehung nach vollständiger Abspaltung der Glucose angenommen. Eine Verlängerung der Zeit hatte selbst nach Zugabe von neuem hochwertigem Ferment keine Steigerung der Drehung mehr zur Folge. Im Gegenteil sank die Drehung wieder, vermutlich wegen Abspaltung der *l*-Xylose durch die Acidität der Lösung nach so langer Zeit. Aus der ersten Beobachtung nach 4320 Min. ergibt sich — bei Verwendung der Enddrehung von  $+1.64$  — eine Spaltung von 83% und eine Wertigkeit des Ferments von 0.013. Die spezifische Drehung des (nicht isolierten) Protocatechualdehyd- $\beta$ -*l*-xylosids ergibt sich aus der Enddrehung, unter Abzug der Gleichgewichtsdrehung der Glucose zu  $[\alpha]_D$ :  $+82^\circ$ , für die Drehung des gleichen *d*-Xylosids die gleiche Zahl mit negativem Vorzeichen.