

beschäftigt, die obige Synthese, die ja bei Verwendung von *l*-Threonensäure-ester zur Ascorbinsäure selbst führen könnte, durch Heranziehung weiterer  $\alpha$ -Oxy-säuren auszubauen.

Die Oxy-tetronsäure ist nach Versuchen aus der biologischen Abteilung der Firma Merck in Gaben von 10 mg täglich (Meerschweinchen) anti-scorbutisch unwirksam.

### Beschreibung der Versuche.

1 Mol. Benzoyl-glykolsäure-äthylester (aus Glykolsäure-äthylester mit Benzoylchlorid in Pyridin-Chloroform erhalten) wird mit 1–2 Mol. Kalium 3–4 Std. unter zeitweisem Schütteln auf dem Wasserbade erhitzt. Gleichzeitig wird ein trockner Stickstoffstrom durch die Apparatur geleitet. Danach wird mit der berechneten Menge verd. Schwefelsäure unter Benzol zerlegt und die benzolische Schicht abgetrennt<sup>4)</sup>. Die wäßrige Lösung wird im Vakuum bei 25–30° Badtemperatur unter CO<sub>2</sub> eingedampft und der Rückstand gründlich mit Essigester ausgezogen. Die Essigester-Lösungen hinterlassen nach dem Trocknen und Abdampfen einen Krystallbrei, der durch Umkrystallisieren aus Äther gereinigt wird. Schmp. 153°.

4.902 mg Sbst.: 7.460 mg CO<sub>2</sub>, 1.670 mg H<sub>2</sub>O. — 5.063 mg Sbst.: 7.740 mg CO<sub>2</sub>, 1.740 mg H<sub>2</sub>O. — 2.011 mg Sbst.: 0.365 ccm NaOH (F = 0.0477). und nach dem Ansäuern mit Essigsäure 3.244 n/100-Jodlsg. — 9.9 mg Sbst. in 106.6 mg Campher:  $\Delta t = 30.0^\circ$ .

C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 41.36, H 3.47, Molgew. 116.03.

Gef. „ 41.50, 41.68, „ 3.81, 3.84, „ 124.

Äquiv.-Gew. gegen Lauge: Ber. 116.03, gef. 115.5. Äquiv.-Gew. gegen Jod: Ber. 58.01, gef. 62.0.

## 272. Paul Ohlmeyer und Hans Pringsheim: Über Inulin und die Inulinase (XIII. Mitteil. <sup>1)</sup>).

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

(Eingegangen am 4. August 1933.)

In einer für die Inulin-Chemie sehr wichtigen Arbeit hat kürzlich Schlubach<sup>2)</sup> gezeigt, daß das bisher mit einer Drehung zwischen  $-33^\circ$  und  $-38^\circ$  beschriebene Inulin durch zwei Begleitstoffe verunreinigt ist; es kann von ihnen so befreit werden, daß ihm eine endgültige Linksdrehung von etwa  $-40^\circ$  zukommt. Das hierzu von Schlubach beschriebene Verfahren besteht in einem häufigen abwechselnden Auflösen, Ausfrieren und Schütteln mit Wasser. Wir fanden nun, daß sich die Reinigung des Inulins erheblich abkürzen läßt, wenn man nicht ausfriert, sondern eine 5-proz. wäßrige Inulin-Lösung einige Tage bei Zimmer-Temperatur aufbewahrt. Bekanntlich scheidet sich dann das Polysaccharid wieder aus, und dabei

<sup>4)</sup> Aus der Benzol-Schicht lassen sich weitere Mengen der Oxy-tetronsäure, ferner Benzoessäure-äthylester (mehr als 1 Mol.), Benzoesäure und unverbrauchter Benzoyl-glykolsäureester gewinnen.

<sup>1)</sup> Vorgetragen auf d. Hauptversammlung d. Vereins Deutsch. Chemiker in Würzburg, Juni 1933, von P. Ohlmeyer; XII. Mitteil. B. 65, 1242 [1932].

<sup>2)</sup> A. 497, 208 [1932], 504, 19 [1933].

dürften die leichter löslichen Begleitstoffe nicht der Ausscheidung wie beim Ausfrieren unterliegen. Denn das auf diese Weise in 55-proz. Ausbeute gewonnene Produkt zeigte schon bei einmaliger Wiederholung des Verfahrens ein Drehungsvermögen von  $-40.2^{\circ}$  und hatte auf Fehlingsche Lösung keine reduzierende Wirkung. Eine dritte Ausfällung führte zu keiner weiteren Veränderung der Drehung mehr.

In unserer letzten Mitteilung<sup>1)</sup> beschrieben wir die fermentative Spaltung des Inulins bis zu 95 % der theoretischen Zucker-Ausbeute. Bei Verwendung des  $-40^{\circ}$  drehenden Inulins ist uns nun die quantitative Hydrolyse durch die gereinigte *Aspergillus*-Inulinase gelungen. Auf dem früher beschriebenen Wege gewannen wir jetzt aus dem Methylalkohol. Zucker-Sirup 90–92 % der Fructose in krystallisierter Form und mit der richtigen Drehung und Reduktionskraft. In der Mutterlauge blieb der gesamte Hexose-Rest zurück. In ihr war also in angereichertem Zustande etwa bei der Spaltung gebildete Glucose vorhanden, von der wir früher 1.5 % der möglichen Hexose-Ausbeute im Hydrolysat ermittelt hatten.

Um die Frage zu entscheiden, ob etwa die 5 %, die uns bisher entgangen waren, noch mehr Glucose hergaben, arbeiteten wir die Mutterlauge sorgfältig auf. Wir fanden in ihr aber wiederum nur die 1.5 % Glucose; sie war infolge der Anreicherung nach der Entfernung der Hauptmenge Fructose durch Differenz-Titration (vergl. Versuchs-Teil) einwandfrei zu bestimmen. Ferner schieden wir aus der Mutterlauge die Fructose als Methyl-phenyl-osazon aus. Die gewonnene Menge stimmte mit ausreichender Genauigkeit auf die berechnete, wenn wir die Ausbeute an Methyl-phenyl-osazon aus reiner Fructose in Vergleich setzten.

Die Angabe von Weidenhagen<sup>3)</sup>, daß ihm die quantitative Umwandlung des Inulins auf fermentativem Wege in Fructose gelungen sei, wird durch seine an dem verdünnten, nicht durch Krystallisation der Fructose angereicherten, Hydrolysat ausgeführten Titrationen nicht in genügender Weise gestützt.

Man hat das Auftreten der Glucose bei der Inulin-Hydrolyse durch die Annahme zu erklären versucht, daß die im sauren Medium freiwerdende *h*-Fructose der Umwandlung in Glucose unterliegen könne. Gegen diese Vorstellung spricht zunächst der Umstand, daß der Unterschied zwischen der Spaltung mit 0.05-*n*. Schwefelsäure und der durch Ferment-Hydrolyse bei  $p_H = 3.8$  sich quantitativ nicht greifbar auswirkt, und in beiden Fällen fast gleichviel Glucose auftritt<sup>4)</sup>. Außerdem ist es uns auch gelungen, den enzymatischen Abbau mit dem gleichen Resultat bei  $p_H = 6.0$  durchzuführen: so nahe beim Neutralpunkt dürfte für die genannte Umwandlung noch geringere Wahrscheinlichkeit bestehen. Um diese Auffassung zu stützen, haben wir, wie Schlubach bei der Säure-Hydrolyse, fermentative Parallelversuche mit Rohrzucker angestellt. Bekanntlich haben Irvine und Haworth durch Gewinnung von 3.4.6-Trimethyl-fructose aus Inulin den Beweis erbracht, daß hier die Fructose wie im Rohrzucker in ihrer *h*-Form vorliegt. Wenn wir nun unser Ferment unter den gleichen Bedingungen wie beim Inulin auf Saccharose einwirken ließen und die Menge der freiwerdenden Glucose bestimmten, so zeigte sich, daß das gefundene Mengen-

<sup>3)</sup> Ztschr. Ver. Dtsch. Zucker-Industr. 82, 912 [1932].

<sup>4)</sup> Schlubach (l. c.) fand bei der Säure-Hydrolyse maximal 2 %.

verhältnis Glucose/Fructose genau der Zusammensetzung des Rohrzuckers entsprach, daß also eine Umwandlung von Fructose in Glucose nicht erfolgt war. Dies ist ein weiterer Anhaltspunkt für die Annahme, daß die Aldose nicht erst beim hydrolytischen Inulin-Abbau gebildet wird.

Es bleibt die Frage offen, ob die Quelle für die Glucose vielleicht noch in Begleitstoffen des Inulins zu suchen wäre. Nun hat aber bisher kein Reinigungsverfahren zu einer stärkeren Linksdrehung als  $-40.2^{\circ}$  geführt, ein solches Inulin scheint also rein zu sein. Auch die Beobachtung, daß bei fortschreitender Abtrennung der Begleitstoffe keine Abnahme in der Menge der durch Hydrolyse entstehenden Glucose eintritt, dürfte für die Nichtverantwortlichkeit von Fremdsubstanzen sprechen. Für endgültig geklärt halten wir das Problem jedoch noch nicht.

Will man nun aber die Annahme machen, daß die Glucose ein Konstituent des Inulin-Moleküls ist, so könnte man daran denken, daß die Aldose die Endgruppe einer aus Ketosen bestehenden Kette darstellt. Die Rechnung ergäbe dann, daß das Inulin-Molekül aus etwa 70  $C_6$ -Einheiten bestände und dementsprechend ein Molekulargewicht von rund 11000 besäße.

### Beschreibung der Versuche.

#### Reinigung von Inulin.

Eine 5-proz. wäßrige Lösung von Inulin „Kahlbaum“ wurde kurze Zeit mit viel Tierkohle gekocht, filtriert, abgekühlt und mit  $n/_{10}$ -Salzsäure genau neutralisiert. Die völlig klare Lösung schied in 4 Tagen 130 g des Polysaccharids wieder aus. Dieses wurde abzentrifugiert und in dünnen Schichten im Exsiccator getrocknet. Es zeigt eine durchschnittliche Drehung von  $-38.5^{\circ}$ . Nach Wiederholung des Verfahrens betrug die Menge 98 g, und die Drehung der 60 Min. im Vakuum über  $P_2O_5$  getrockneten Substanz war:

$$[\alpha]_D^{20} = (0.5 \times -0.94^{\circ}) : (2 \times 0.0585) = -40.2^{\circ} \text{ (weitere Werte } -40.1^{\circ}, -39.9^{\circ}).$$

Sie reduzierte Fehlingsche Lösung auch beim Kochen nicht und hatte einen Asche-Gehalt von 0.035 %. Die Drehung des Acetats betrug in Chloroform  $-34.8^{\circ}$ , in Eisessig  $-42.3^{\circ}$ .

#### Bestimmung des Spaltungsgrades.

277.8 mg Inulin (entspr. 250 mg wasser-freiem Inulin) wurden mit 10 ccm des gereinigten Fermentes auf 25 ccm aufgefüllt. Nach 48 Stdn. verbrauchten 5 ccm der Lösung 15.7 ccm  $n/_{10}$ -Kaliumpermanganat. Diese entsprechen 55.5 mg Hexose. Als Gesamtmenge wurden also 277.5 mg gefunden, gegenüber der berechneten Menge von 277.7 mg (weitere Werte 277.5, 277.2 mg). Mithin war das Inulin quantitativ gespalten.

#### Bestimmung der Glucose.

10.410 g Inulin (enth. 10 % Wasser) wurde bei  $p_H = 3.8$  mit 200 ccm Ferment-Elution innerhalb von 2 Tagen gespalten. Sie lieferten 10.386 g Hexosen, davon 10.226 g Fructose, die, in der früher beschriebenen Weise in einen methylalkohol. Sirup verwandelt, 9.299 g, also 90.5 % d. Th., an Fructose auskrystallisieren ließen.

Die Bestimmung der Glucose in der auf 100 ccm aufgefüllten Mutterlauge ergab folgende Resultate: Der Vergleich der beobachteten Drehung

von  $-0.43^{\circ}$  im dm-Rohr mit der nach Bertrand bestimmten Zucker-Menge (726 mg) läßt auf ein Mischungsverhältnis von Fructose zu Glucose wie 57:16 schließen. Daraus geht hervor, daß sich die 726 mg auf 566 mg Fructose und 160 mg Glucose verteilen. Die gefundene Glucose-Menge entspricht etwa 1.5 % Glucose im Inulin-Hydrolysat. Der Verbrauch von 1.7 ccm  $n/_{10}$ -Jodlösung (Fructose-Fehler abgezogen) nach Willstätter-Schudel für 10 ccm der Lösung lieferte 16 mg Glucose. Folglich ergibt auch die Titration für 726 mg Hexose 566 mg Fructose und 160 mg Glucose.

Von 10 g bei  $p_{H} = 6.0$  fermentativ gespaltenem Inulin ließen sich 80 % an Fructose krystallisiert gewinnen. Die Bestimmung der Glucose in der Mutterlauge führte wieder zu 1.5 % der Gesamt-Zuckermenge.

Eine 1-proz. Lösung von Fructose (3 g), welche die bei der Spaltung verwandte Menge Ferment enthielt, wurde genau wie ein Hydrolysat auf Sirup, Krystallisation und Mutterlauge verarbeitet. Letztere verbrauchte an Jod nur den Fructose-Fehler (etwa 0.3 ccm Lösung für 100 mg). Demnach enthielt sie keine Reste von Fermentstoffen, die mit Hypojodit reagiert haben.

#### Abtrennung der Fructose als Methyl-phenyl-osazon.

Die Gewinnung von Methyl-phenyl-osazon nach Neuberg<sup>5)</sup> aus 300 mg Fructose führte bei genauer Einhaltung der Bedingungen (mit der Einschränkung, daß Umkrystallisieren aus 50-proz. Alkohol vorteilhafter schien als aus 10-proz. Alkohol) zu einer Ausbeute von 346 mg Osazon, also etwa 55 % d. Th. Das Ergebnis wurde mehrfach bestätigt. Aus einer gleich behandelten Mutterlauge, die nach der Differenz-Titration 349 mg Fructose enthielt, gewannen wir 402 mg Osazon, eine Menge, die unter Zugrundelegung des Ausbeute-Versuchs 349 mg Fructose entspricht. In einem anderen Fall ergaben 142 mg Fructose 158 mg Osazon, d. h. 52 % d. Th.

#### Versuche mit Rohrzucker.

50 mg Fructose und 50 mg Glucose reiner Form, in 5 ccm Wasser gelöst, verbrauchten 28.5 ccm  $n/_{10}$ -Permanganat.

950 mg reinsten Rohrzuckers wurden mit 20 ccm Fermentsaft von  $p_{H} = 3.8$  auf 50 ccm aufgefüllt. Davon verbrauchten 5 ccm nach 48 Stdn. 28.65 ccm Permanganat. Der Verbrauch von 10 ccm an Jodlösung betrug 11.50 ccm.

Von 20 ccm Fermentsaft in 50 ccm Wasser wurden 5 ccm nach Bertrand titriert. Verbrauch: 0.15 ccm Permanganat. 10 ccm reduzierten 0.13 ccm Jodlösung.

Zieht man nun von dem Permanganat-Verbrauch des Hydrolysats den Leerwert für das Ferment ab, so ergibt sich die 100-proz. Spaltung des Rohrzuckers, nämlich gefunden 1000 mg, berechnet 1000 mg.

Nach Abrechnung des Jodverbrauches für Ferment (0.13 ccm) und Fructose (0.3 ccm) bleiben 11.07 ccm Jodlösung für die vorhandene Glucose. Dies entspricht für die Gesamtmenge 500 mg.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir für die zur Verfügung gestellten Mittel und besonders für die Verleihung eines Forschungs-Stipendiums an den einen von uns.

<sup>5)</sup> B. 35, 959 [1902].