

## 51. Hans Pringsheim und Margot Winter: Die Zucker-Eiweiß-Kondensation.

Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.

(Eingegangen am 17. Dezember 1926.)

Bringt man Eiweißstoffe und reduzierende Zucker in wäßriger, Kochsalz-haltiger oder Kalkwasser-Lösung zusammen, so erfolgt z. B. bei Glucose augenblicklich Kondensation zu einer Verbindung, in der der Zucker nicht mehr durch Fehlingsche Lösung nachweisbar ist<sup>1)</sup>. Die Kondensation geht mit verschiedenen Eiweißstoffen vor sich, wie das aus der Übersichtstabelle auf S. 279 zu entnehmen ist. Eine Ausnahme macht nach den bisherigen, noch erweiterungsbedürftigen und z. B. auf Histone und Protamine auszudehnenden Versuchen (II) nur die Gelatine, wobei es jedoch verfrüht wäre, etwa einen Zusammenhang mit dem Mangel dieses Proteins an Tyrosin und Tryptophan herleiten zu wollen.

Die Verdauung der Eiweißstoffe mit Pepsin behebt nicht ihre Fähigkeit zur Zucker-Kondensation (III); wir haben die Beobachtung zuerst an pepsin-verdauten Proteinen gemacht<sup>2)</sup>, ja, die pepsin-verdauten Eiweißstoffe, die Albumosen und Peptone (IVa), sind für Zucker noch aufnahmefähiger als die natürlichen Proteine. Die weitere Verdauung in alkalischem Medium mit Trypsin verstärkt das noch (IVb), soweit sich das in Vorversuchen mit Trypsin (Kahlbaum) feststellen ließ. Dagegen reagieren Aminosäuren, z. B. Alanin und Tyrosin (V), nicht in gleicher Weise mit dem Zucker-Molekül, jedenfalls nicht so, daß sich der Nachweis einer Kondensation bei der starken Alkalität der Fehlingschen Lösung führen ließe<sup>3)</sup>. Es wird notwendig sein, die vorstehend geschilderten Versuche in genauere Beziehung zum nach modernen Methoden charakterisierten Eiweiß-Abbau zu bringen. Eine direkte Beziehung zur Formol-Titration oder dem van-Slyke-Stickstoff besteht nicht.

Die Zucker-Eiweiß-Kondensate lassen sich aus ihren Lösungen durch Ammoniumsulfat aussalzen, wobei der kondensierbare Zucker am Eiweiß bleibt und der „Überschuß-Zucker“ in Lösung geht (VI). Daß der so gefundene Überschuß-Zucker im richtigen Verhältnis zu dem kondensierten Zucker steht, gibt eine Gewähr für die Richtigkeit unserer Beobachtungen. Noch beweisender hierfür ist, daß im Salzsäure-Hydrolysat des Zucker-Eiweiß-Kondensates der Zucker wieder quantitativ nachzuweisen ist (VII).

Die Menge des vom Eiweiß gebundenen Zuckers ist in Anbetracht der relativen Größe ihrer Moleküle durchaus nicht gering; so bindet z. B. 1 g Hühner-Albumin 32.4 mg Glucose, das Kondensat besteht also zu ca. 3% aus dem Zucker-Anteil. Die Mengenverhältnisse bei anderen Eiweißstoffen, wie Blut-Albumin, Casein, Legumin, Konglutin und Vitellin, weichen hiervon nur wenig ab (II), während bei pepsin-verdauten Eiweißstoffen (III) und

<sup>1)</sup> In besonderen Versuchen (I) haben wir uns davon überzeugt, daß das Kupferoxydul auch in Gegenwart von großen Eiweißmengen quantitativ faßbar ist und nicht etwa in komplexe Lösung geht.

<sup>2)</sup> Biochem. Ztschr. **177**, 406 [1926].

<sup>3)</sup> vergl. die unter 2 angegebene Literaturstelle, außerdem H. von Euler und E. Brunius, Ztschr. physiol. Chem. **161**, 265 [1926].

Albumosen und Peptonen (IVa) wesentlich mehr, beim pepsin-verdauten Eier-Albumin z. B. 48.6 mg Glucose gebunden werden. Nachherige Trypsin-Verdauung vermehrt die Menge des kondensierbaren Zuckers, beim Eier-Albumin bis zu 63 mg.

Übersichtstabelle.

Eiweißstoffe	Kondensat. mit Zucker	pepsin-verdaut. Eiweißstoffe	Kondensat. mit Zucker	Peptone, Albumosen, Amino-säuren	Kondensat. mit Zucker
Eier-Albumin ...	+	pepsin-verdautes	Eier-Albumin .	Pepton ex albumine .....	+
Blut-Albumin ...	+		Blut-Albumin .	Fibrin-Albumosen .....	+
Gelatine .....	—		Gelatine .....	Horn-Albumosen .....	+
Casein .....	+		Casein .....	trypsin-verdaut. Pepton...	+
Legumin .....	+		Legumin .....	trypsin-verdaut. Fibrin-Albumosen .....	+
Konglutin .....	+		Konglutin ....	trypsin-verdaut. Horn-Albumosen .....	+
Vitellin .....	+		Vitellin .....	pepsin-trypsin-verdaut. Eier-Albumin .....	+
			Myosin .....	Tyrosin .....	—
				Alanin .....	—

Genau ebenso erfolgt die Kondensation auch quantitativ mit Fructose und Galaktose (VIII). Reduzierende Disaccharide, wie Maltose und Lactose, bedürfen infolge ihrer geschwächten aldehydischen Funktion einer gewissen Zeit bis zur maximalen Kondensation, die jedoch in 24 Stdn. erreicht ist. Aber auch hier ist das konstante Mengenverhältnis zwischen Eiweiß und Zucker gewahrt: vom Disaccharid sind für die Absättigung naturgemäß äquimolekulare Mengen (190%) der Monosen erforderlich; das Kondensat enthält dann schon etwa 6% Zucker. Dieses stöchiometrische Verhältnis zwischen Eiweiß und Zucker macht die Annahme sehr wahrscheinlich, daß irgendeine im Eiweiß-Molekül vorhandene Atomgruppierung für die Kondensation verantwortlich zu machen ist. Es ist besser, über die Art dieser Bindungsstellen zwischen den Amino-säuren im Hinblick auf die herrschende Unsicherheit in der Konstitution der Eiweißstoffe nicht zu spekulieren, und auch den Hinweis auf den Eingriff der Aldehydgruppe in eine Aminogruppe im Sinne der Schiffschen Basen zu vermeiden. Als wahrscheinlich kann nur hingestellt werden, daß der Zucker glykosidisch gebunden ist, nicht nur wegen der durch das Ausbleiben der Reduktionskraft angezeigten Festlegung der Carbonylgruppe, sondern vornehmlich im Hinblick auf die große Resistenz der Kondensate in alkalischer Lösung im Gegensatz zu ihrer größeren Empfindlichkeit gegenüber freien Wasserstoff-Ionen. In einer Versuchsreihe (IX), in welcher wir Eier-Albumin mit Pufferlösungen und Fructose zusammenbrachten, maßen wir nach dem Ausfällen des Zucker-Eiweiß-Kondensates mit Ammoniumsulfat die in Gegenwart des Eiweißes durch den Zusatz der Puffer tatsächlich erreichten Aciditäten. Wir stellten fest, daß maximale Kondensation bei  $p_{11} = 6.4$  vorhanden war; bei  $p_H = 5.6$  beobachteten wir schon einen gewissen Rückgang, der sich bei 5.2 und noch mehr bei 4.4 verstärkte.

Besonders eigenartig ist die Beobachtung, daß Hefe in stande ist, den Zucker, auch wenn er an Eiweiß gebunden ist, zu vergären; ob man die Annahme machen soll, daß der Zucker auf ferment-hydrolytischem Wege vom Eiweiß getrennt und in statu nascendi von der Zymase vergoren wird, oder ob man die Deutung vorzieht, daß der Zucker bei der Gärung immer an Eiweiß gebunden wird und diese Kondensation eine Voraussetzung für die alkoholische Gärung des Zuckers bedeutet, können wir zurzeit nicht entscheiden. Mit Toluol verflüssigte Hefe setzte die Glucose aus ihrem Kondensat mit Eier-Albumin nicht in Freiheit. Aber eine derartige Fermentation war auch gar nicht zu erwarten, wenn nicht gleichzeitig für die Beseitigung des durch Hydrolyse abgespaltenen Zuckers auf irgendeinem Wege, z. B. durch alkoholische Gärung, gesorgt wird. Denn die Ferment-Hydrolyse der Zucker-Eiweiß-Kondensate ist ihrer Natur nach anderen enzymatischen Hydrolysen nicht vergleichbar, da ja in unserem Falle die Bedingungen für die sofortige Wiedervereinigung der Bruchstücke hemmungslos gegeben sind, was natürlich bei den bisher beschriebenen Betätigungen der Hydrolasen nicht der Fall ist.

Eines steht jedenfalls fest, daß unter biologischen Bedingungen häufig Gelegenheit für die von uns beschriebene Zucker-Eiweiß-Kondensation geboten sein wird, und daß Zucker mit freien Carbonylgruppen in Gegenwart von Eiweiß in den geschilderten Konzentrations-Verhältnissen nicht existenzfähig sind. Die Bedeutung der Zucker-Eiweiß-Kondensate, denen wir vorläufig Namen wie Gluco-Albumin, Fructo-Vitellin usw. geben wollen, muß also im lebenden Organismus keine geringe sein. Besonders beim Blutzucker wird sie hervortreten und dazu beitragen, manche der zahlreichen Unstimmigkeiten in der heutigen Erkenntnis der Art, Bildung und Weiterverarbeitung des Blutzuckers klären zu helfen. Denn das, was man heutzutage als „Blutzucker“ bestimmt, kann in unserem Sinne nur ein „Überschuß-Zucker“ sein, wenn die gelösten Eiweißstoffe des Blutes nicht durch andere carbonyl-haltige Stoffe abgesättigt sind. Durch Salzsäure-Hydrolyse lassen sich aus dem Blut auch nach unseren Feststellungen keine wesentlichen Zuckermengen abspalten. Auch mit Hilfe der Hefe-Gärung ließ sich kein Protein-Zucker im Blut nachweisen. Bisher bieten nur die von B. Glassmann<sup>4)</sup> vor wenigen Wochen mitgeteilten Versuche einen Anhalt dafür, daß im Blut tatsächlich etwa 8-mal soviel Zucker vorhanden ist, wie man im allgemeinen als freien Blutzucker nachweisen kann.

### **Beschreibung der Versuche.**

Nach der Vereinigung der wie nachstehend zusammengestellten Lösungen wurde nach der Methode von Bertrand titriert.

#### **I. Blindversuch zur Prüfung des Einflusses von Eiweiß auf Kupferoxydul.**

Aus einer Lösung von bekanntem Zucker-Gehalt wurde mit Fehlingscher Lösung Kupferoxydul gefällt. Das abfiltrierte  $\text{Cu}_2\text{O}$  wurde dann nochmals 3 Min. mit einer Lösung von 1 g Eier-Albumin in 15 ccm Wasser gekocht. Die Titration ergab den theoretischen Zucker-Wert: ohne Eiweiß 33.9 mg Cu, mit Eiweiß 33.7 mg Cu.

<sup>4)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 158, 113 (1926), hier die ältere Literatur.

II. Kondensations-Versuche von Glucose mit Eiweißstoffen.

a)	b)	c)	d)
etwa 1-proz. Glucose-Lösung	1 g Eier-Albumin 15 ccm Wasser	1 g Blut-Albumin 15 ccm Wasser	1 g Gelatine 15 ccm Wasser
e)	f)	g)	h)
1 g Vitellin 15 ccm 5-proz. NaCl-Lösung	1 g Casein 15 ccm Kalkwasser	1 g Legumin 15 ccm 5-proz. NaCl-Lösung	1 g Konglutin 15 ccm 5-proz. NaCl-Lösung
I.	II.	III.	IV.
5 ccm a	5 ccm a	5 ccm a	5 ccm a
25 „ Wasser	5 „ b	5 „ c	5 „ d
	20 „ Wasser	20 „ Wasser	20 „ Wasser
V.	VI.	VII.	VIII.
5 ccm a	5 ccm a	5 ccm a	5 ccm a
5 „ e	5 „ f	5 „ g	5 „ h
20 „ Wasser	20 „ Wasser	20 „ Wasser	20 „ Wasser

Die Titration wurde mit 5 ccm Lösung ausgeführt.

Zusammensetzung der Versuchslösung	mg Cu	mg Glucose	auf 1 g Eiweiß kondensiert mg Glucose
I. Glucose + Wasser	15.3	7.6	—
II. Glucose + Eier-Albumin	11.8	5.8	32.4
III. Glucose + Blut-Albumin	12.2	6.0	28.8
IV. Glucose + Gelatine	15.1	7.5	—
V. Glucose + Vitellin	12.1	5.9	30.6
VI. Glucose + Casein	11.6	5.7	34.2
VII. Glucose + Legumin	11.4	5.6	36.0
VIII. Glucose + Konglutin	12.1	5.9	30.6

III. Kondensations-Versuche von Glucose mit pepsin-verdauten (24 Stdn., 37°) Eiweißstoffen.

a)	b)	c)	d)
etwa 1-proz. Glucose-Lösung	1 g Eier-Albumin 13 ccm Wasser	1 g Blut-Albumin 13 ccm Wasser	1 g Gelatine 13 ccm Wasser
	2 „ Puffer $p_H=2$ 0.5 g Pepsin	2 „ Puffer $p_H=2$ 0.5 g Pepsin	2 „ Puffer $p_H=2$ 0.5 g Pepsin
e)	f)	g)	
1 g Legumin 13 ccm Wasser	1 g Konglutin 13 ccm Wasser	1 g Vitellin 13 ccm Wasser	
2 „ Puffer $p_H=2$ 0.5 g Pepsin	2 „ Puffer $p_H=2$ 0.5 g Pepsin	2 „ Puffer $p_H=2$ 0.5 g Pepsin	
I.	II.	III.	IV.
5 ccm a	5 ccm a	5 ccm a	5 ccm a
25 „ Wasser	5 „ b	5 „ c	5 „ d
	20 „ Wasser	20 „ Wasser	20 „ Wasser
V.	VI.	VII.	
5 ccm a	5 ccm a	5 ccm a	
5 „ e	5 „ f	5 „ g	
20 „ Wasser	20 „ Wasser	20 „ Wasser	

Die Titration wurde mit 5 ccm Lösung ausgeführt.

Zusammensetzung der Versuchslösung	mg Cu	mg Glucose	auf 1 g Eiweiß kondensiert mg Glucose
I. Glucose + Wasser .....	15.5	7.7	—
II. Glucose + pepsin-verdaut. Eier-Albumin	10.2	5.0	48.6
III. Glucose + pepsin-verdaut. Blut-Albumin	10.8	5.3	43.2
IV. Glucose + pepsin-verdaut. Gelatine ...	15.3	7.6	—
V. Glucose + pepsin-verdaut. Legumin ..	10.2	5.0	48.6
VI. Glucose + pepsin-verdaut. Konglutin .	11.0	5.4	41.4
VII. Glucose + pepsin-verdaut. Vitellin ....	10.4	5.1	46.8

Kondensations-Versuche mit pepsin-verdaut. Casein und Myosin siehe H. Pringsheim und M. Winter, Biochem. Ztschr. **177**, 406 [1926].

IVa. Kondensations-Versuche von Glucose mit Albumosen und Pepton.

a) etwa 1-proz. Glucose-Lösung	b) 1 g Fibrin- Albumosen 15 ccm Wasser	c) 1 g Horn-Albumosen 15 ccm Wasser	d) 1 g Pepton ex albumine 15 ccm Wasser
I. 5 ccm a 25 „ Wasser	II. 5 ccm a 5 „ b 20 „ Wasser	III. 5 ccm a 5 „ c 20 „ Wasser	IV. 5 ccm a 5 „ d 20 „ Wasser

Die Titration wurde mit 5 ccm Lösung ausgeführt.

Zusammensetzung der Versuchslösung	mg Cu	mg Glucose	auf 1g Eiweiß kondensiert mg Glucose
I. Glucose + Wasser .....	17.9	8.9	—
II. Glucose + Fibrin-Albumosen .....	12.2	6.0	52.2
III. Glucose + Horn-Albumosen .....	12.8	6.3	46.8
IV. Glucose + Pepton ex albumine .....	13.3	6.6	41.4

IVb. Kondensations-Versuche von Glucose mit trypsin-verdauten Albumosen und Pepton und pepsin-trypsin-verdautem (je 24 Stdn., 37°) Eier-Albumin.

a) etwa 1-proz. Glucose-Lösung	b) 1 g Pepton ex albumine 13 ccm Wasser 2 „ Puffer p <sub>H</sub> = 8.4 0.5 g Trypsin	c) 1 g Eier-Albumin 13 ccm Wasser 2 „ Puffer p <sub>H</sub> = 8.4 0.5 g Trypsin
d) 1 g Horn-Albumosen 13 ccm Wasser 2 „ Puffer p <sub>H</sub> = 8.4 0.5 g Trypsin	e) 1 g Eier-Albumin 10 ccm Wasser 2 „ Puffer p <sub>H</sub> = 2 0.5 g Pepsin Puffer-Umstellung 0.5 g Trypsin	

I.	II.	III.	IV.	V.
5 ccm a				
25 „ Wasser	5 „ b	5 „ c	5 „ d	5 „ e
	20 „ Wasser	20 „ Wasser	20 „ Wasser	20 „ Wasser

Die Titration wurde mit 5 ccm Lösung ausgeführt.

Zusammensetzung der Versuchslösung	mg Cu	mg Glucose	auf 1 g Eiweiß kondensiert mg Glucose
I. Glucose + Wasser .....	17.5	8.7	—
II. Glucose + trypsin-verdaut. Pepton .....	12.2	6.0	48.6
III. Glucose + trypsin-verdaut. Fibrin-Albumosen .....	11.2	5.5	57.6
IV. Glucose + trypsin-verdaut. Horn-Albumosen .....	11.4	5.6	55.8
V. Glucose + pepsin-trypsin-verdaut. Eier-Albumin .....	10.6	5.2	63.0

#### V. Kondensations-Versuche von Glucose mit Amino-säuren.

a)	b)	c)
etwa 1-proz. Glucose-Lösung	etwa 1-proz. Lösung von Tyrosin	etwa 1-proz. Lösung von Alanin
I.	II.	III.
5 ccm a	5 ccm a	5 ccm a
25 „ Wasser	5 „ b	5 „ c
	20 „ Wasser	20 „ Wasser

Die Titration wurde jeweils mit 5 ccm Lösung ausgeführt.

Zusammensetzung der Versuchslösung	mg Cu	mg Glucose
I. Glucose + Wasser .....	17.5	8.7
II. Glucose + Tyrosin .....	17.7	8.8
III. Glucose + Alanin .....	17.5	8.7

#### VI., VII. Fällung und Hydrolyse des Zucker-Eiweiß-Kondensates.

VI. Es wurde eine Lösung von 1 g Eier-Albumin und 30 mg Glucose in 90 ccm Wasser hergestellt. Eine solche Lösung reduziert Fehlingsche Lösung nicht. Das Albumin wurde sodann durch Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat gefällt, nach Erwärmen auf dem Wasserbade auf 50° abfiltriert und mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung gründlich ausgewaschen. Das Filtrat reduziert nicht.

VII. Die gleiche Lösung wie unter VI wurde mit so viel Salzsäure versetzt, daß sie 10% HCl enthielt, und 10 Min. im kochenden Wasserbade hängend erhitzt. Der Eiweiß-Niederschlag wurde abfiltriert und mit HCl-haltigem Wasser gut ausgewaschen. Nach Erkalten wurde das Filtrat mit Soda neutralisiert. Die Bertrand-Bestimmung ergab 29.4 mg Glucose.

## VIII. Vergleichende Kondensations-Versuche von verschiedenen Zuckern mit Eier-Albumin.

Es ist die Menge Zucker in der Tabelle angegeben, die 1 g Eier-Albumin zu binden vermag.

mg Zucker.

Zeit in Stdn.	Glucose + Albumin	Fructose + Albumin	Galaktose + Albumin	Maltose + Albumin	Lactose + Albumin
1/4	32.5	34.0	34.8	37.0	35.8
8	konstant	konstant	konstant	49.4	50.6
24	konstant	konstant	konstant	61.5	66.2

## IX. Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration auf die Kondensation von Fructose mit Eier-Albumin.

a)	b)	c)
etwa 1-proz. Fructose-Lösung	1 g Eier-Albumin 10 ccm Puffer $p_H = 2$ 5 „ Wasser	1 g Eier-Albumin 10 ccm Puffer $p_H = 4$ 5 „ Wasser
d)	e)	
1 g Eier-Albumin 10 ccm Puffer $p_H = 6$ 5 „ Wasser	1 g Eier-Albumin 10 ccm Puffer $p_H = 8$ 5 „ Wasser	

I.	II.	III.	IV.	V.
10 ccm a				
50 „ Wasser	10 „ b	10 „ c	10 „ d	10 „ e
	40 „ Wasser	40 „ Wasser	40 „ Wasser	40 „ Wasser

Das Eiweiß wurde in diesen Lösungen durch Zugabe von je 25 g Ammoniumsulfat und Erhitzen auf dem Wasserbade auf 50° gefällt und abfiltriert. 30 ccm des Filtrats wurden titriert, in der übrigen Lösung die wirkliche Wasserstoff-Ionen-Konzentration (siehe Tabelle) durch Indicatoren ermittelt.

Zusammensetzung der Versuchslösung	$p_H$	mg Cu	mg Fructose	auf 1 g Eiweiß kondensiert mg Fructose
I. Fructose + Wasser . . . . .	—	92.4	48.3	—
II. Fructose + Eier-Albumin.	4.4	77.5	40.0	24.9
III. Fructose + Eier-Albumin.	5.2	75.8	39.2	27.3
IV. Fructose + Eier-Albumin.	5.6	74.8	38.7	28.8
V. Fructose + Eier-Albumin.	6.4	73.6	37.8	31.5