

5.1 g (95% d.Th.). Es wird aus heißem absol. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 4.2 g (78% d.Th.); Schmp. 110—112° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: -7.8° (Wasser).

$C_{14}H_{27}O_{10}N$ (369.4) Ber. C 45.5 H 7.4 N 3.8 Gef. C 46.1 H 7.9 N 3.7

1-Piperidino-cellobiose (H.): 5 g Cellobiose werden in 75 ccm absol. Äthanol und 40 ccm Piperidin 3 Stdn. unter starkem Rühren auf dem Wasserbade erhitzt. Dann wird i. Vak. auf die Hälfte eingedampft und das Reaktionsprodukt im Kühlschrank auskristallisieren gelassen. Ausb. 4 g (67% d.Th.), dreimal aus Methanol-Äther umkristallisiert 2.9 g (49% d.Th.); Schmp. 158—160° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: +3.2° (Wasser).

$C_{17}H_{31}O_{10}N$ (409.4) Ber. C 49.9 H 7.6 N 3.4 Gef. C 50.3 H 7.7 N 3.5

165. Fritz Micheel und Franz-Peter van de Kamp: Die Umsetzung von Proteinen mit Aminosukern

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)]

(Eingegangen am 29. April 1952)

Es werden Kondensationsprodukte von 1-Amino-*d*-glucose, 1-Amino-cellobiose und *d*-Glucosamin mit Proteinen dargestellt. Die colorimetrischen Methoden zur Bestimmung von Zuckern und Glucosamin in Proteinen werden einer eingehenden und kritischen Überprüfung unterzogen und die Fehlerquellen untersucht.

In einer kurzen Mitteilung¹⁾ wurde darüber berichtet, daß Proteine sich in wäßriger Lösung mit 1-Amino-*d*-glucose unter Aufnahme von Glucose-Resten umsetzen. Nach dem damaligen Stande der Untersuchungsmethodik ergaben sich gewisse Regelmäßigkeiten in der Kohlenhydrat-Aufnahme bei verschiedenen Proteinen, die im Zusammenhange mit deren Molekulargewichten zu stehen schienen.

Die Menge des aufgenommenen Kohlenhydrates wurde nach der Orcinmethode²⁾ bestimmt, und zwar gelangte ein Stufenphotometer (Leitz) zur Anwendung, das allein seinerzeit zur Verfügung stand. Da die erhaltenen Versuchsergebnisse bei Verwendung verschiedener 1-Amino-monosaccharide und -disaccharide³⁾ jedoch widerspruchsvoll waren, wurden die Untersuchungen mit dem inzwischen zur Verfügung stehenden Stufenphotometer nach Pulfrich-Zeiß (später auch mit photoelektrischem Vorsatzgerät) und dem Spektralphotometer der Firma Unicam (Cambridge) einer gründlichen kritischen Nachprüfung und Erweiterung unterzogen. Insbesondere mit letzterem Instrument gelang es durch Aufnahme der gesamten Absorptionskurven, ein klares und zuverlässiges Bild über die von den Proteinen aufgenommenen Kohlenhydratmengen zu gewinnen. Es zeigte sich, daß nicht nur der Kohlenhydratanteil der erhaltenen Kohlenhydrat-Eiweiß-Verbindungen mit Orcin eine charakteristische Absorption gibt, sondern daß auch die Hydrolysenprodukte der Eiweißstoffe eine gewisse, jedoch bei den einzelnen Versuchen nicht immer gleichartige Absorption im sichtbaren Gebiete geben. Diese lassen sich im Leitzschen Stufenphotometer auch bei Verwendung der Farbfilter nicht genügend von der Kohlenhydrat-Orcin-Färbung trennen. Besser geht dies mit dem Zeiß-Pulfrich-Photometer, wenn auch in recht mühevoller Weise, während es mit dem Unicam-Instrument

¹⁾ F. Micheel u. B. Herold, Naturwiss. **36**, 157 [1949].

²⁾ M. Sörensen u. G. Haugaard, Biochem. Ztschr. **260**, 247 [1933].

³⁾ E. Plate, Dissertat., Münster 1951, Diplomarbeiten T. Lüßling, Münster 1950, A. Hiller, Münster 1950, K. Schröder, Münster 1950, E. Neufeld, Münster 1951.

durch Auswahl eines geeigneten Spektralgebietes ohne Schwierigkeiten gelingt. Bei der Messung des Gesamtspektrums der mit Orcin erhaltenen Farblösung ergab sich, daß die bei Proteinhydrolysaten mit Orcin auftretenden Nebenfärbungen bei etwa 425 m μ zu vernachlässigen sind. Die Messungen der Kohlenhydratgehalte der Kondensationsprodukte wurden deshalb mit dem Unicam-Spektralphotometer bei 425 m μ und mit dem Zeiß-Pulfrich-Stufenphotometer unter Vorschaltung des Filters S 43, das ein Maximum der Durchlässigkeit bei 430 m μ besitzt, ausgeführt. Einen Vergleich verschiedener Hydrolysate von Kohlenhydrat-Eiweiß-Verbindungen in beiden Apparaten zeigt folgende Tafel:

Kohlenhydratgehalt (%), gemessen mit

Zeiß-Pulfrich-Stufenphotometer	0.14	0.22	0.29	0.52	0.54	0.58	0.82	0.84	0.68	0.70
Unicam-Spektrophotometer ..	0.15	0.22	0.32	0.50	0.57	0.57	0.82	0.62	0.71	0.87

Da der mittlere Fehler bei mehr als 200 Zeiß-Pulfrich-Messungen an Proteinhydrolysaten bei $\pm 5\%$ vom Werte und bei reinen Glucose-Lösungen bei $\pm 3\%$ vom Werte lag, so zeigt der Vergleich, daß auch die mit dem Pulfrichschen Photometer gefundenen Werte brauchbar sind.

Als Endergebnis sei vorweggenommen, daß die durch Umsetzung von 1-Amino-Zuckern mit Proteinen erhaltenen Kohlenhydrat-Eiweiß-Verbindungen geringere Mengen an Kohlenhydrat enthalten, als sich aus den seinerzeit angegebenen Messungen ergab¹⁾, und daß die ursprünglich zwischen der Menge des aufgenommenen Kohlenhydrats und den mit der Ultrazentrifuge gefundenen Molekulargewichten scheinbar bestehenden Beziehungen nicht bestätigt werden konnten. Wir haben ferner die 2-Amino-*d*-glucose (*d*-Glucosamin) in die Untersuchungen einbezogen.

Im folgenden wird eine Zusammenfassung der weiteren Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung aller Fehlermöglichkeiten gegeben.

Die Darstellung der Kondensationsprodukte von Proteinen mit 1-Amino-*d*-glucose und 1-Amino-*d*-cellobiose wurde unter den im Versuchsteil beschriebenen Bedingungen bei 38° in wäßriger Lösung bei pH 8.2–8.5 durchgeführt.

Die für die Dialyse der Reaktionsprodukte verwendeten Cellophanschläuche wurden vorher sorgfältig gewässert, um auszuschließen, daß etwa an den Innenraum abgegebene wasserlösliche Abbauprodukte der Cellulose eine Kohlenhydrat-Aufnahme des Proteins vortäuschen. Daß kleine Mengen Kohlenhydrat aus nicht gewässerten Schläuchen abgegeben werden, zeigt folgende Übersicht:

	Kohlenhydrat gef.	
	in gewässertem Schlauch	in nicht gewässertem Schlauch
Gelatine dialysiert	0.62%	0.70%
	0.62%	0.66%

Um etwa vorhandene kohlenhydrathaltige mechanische Verunreinigungen des Dialysen-Innenraumes zu entfernen, wurden die Lösungen vor dem Eindampfen durch eine Glasfritten-Nutsche G 3 gesaugt. Ferner wurde, um auszuschließen, daß die Kohlenhydrat-Aufnahme der Proteine durch eine hochmolekulare, nicht dialysierende Kohlenhydrat-Verunreinigung der angewandten Aminoszucker bedingt wurde, die 1-Amino-glucose und die 1-Amino-cellobiose daraufhin geprüft, ob sie bzw. ihre Hydrolysenprodukte vollständig durch Cellophan dialysierten. Es zeigte sich, daß je 2 g 1-Amino-glucose und 1-Amino-cellobiose (Mengen, wie sie für normale Umsetzungen verwendet wurden) bei der Dialyse im Innenraum 0.204 mg bzw. 0.212 mg Kohlenhydrat (also 0.1%₀) zurückließen, was bei den im Versuchsteil beschriebenen üblichen Ansätzen mit Proteinen eine Zunahme von 0.04% Kohlenhydrat bedeutet. Dieser geringe Fehler läßt sich so kompensieren.

sieren, daß der Kohlenhydratgehalt der Kondensationsprodukte nicht mit dem der Ausgangsproteine verglichen wird, sondern mit dem eines Gemisches, das aus dem dialysierten Ausgangsprotein und dem Innenraum der Lösung des davon getrennt dialysierten Aminozuckers erhalten wird. Um zu zeigen, daß die Aminozucker und nicht die durch Hydrolyse daraus gebildeten freien Zucker die Kondensation mit den Proteinen eingingen, wurde ferner in Parallelversuchen mit den freien Zuckern gezeigt, daß keine Kohlenhydrat-Aufnahme stattfand.

Die Ergebnisse an verschiedenen Proteinen seien in der folgenden Übersicht zusammengefaßt (bei den Werten sind die oben angegebenen Fehlerquellen berücksichtigt):

Protein	Kohlenhydrat im Ausgangs- protein %	Kohlenhydrat-Aufnahme (%) mit	
		1-Amino-glucose	1-Amino-cellobiose
Gelatine	0.56	0.03	—
Pferdeserumalbumin ⁴⁾	0.12	0.12	0.21
Rinderserumalbumin ⁴⁾ ...	0.24	0.10	0.23
Pferdeserumglobulin	3.30	0.0	—

Die Ergebnisse zeigen, daß in der Tat gewisse Proteine mit Sicherheit eine Kondensation mit 1-Amino-Zuckern eingehen. Die Kohlenhydrat-Aufnahme liegt bei der Kondensation mit 1-Amino-cellobiose dementsprechend doppelt so hoch wie beim Glucose-Derivat.

Es ist jedoch noch nicht möglich, über die Art der Bindung der Kohlenhydrat-Reste Aussagen zu machen. Eine salzartige Bindung der 1-Amino-Zucker an Carboxygruppen der Proteine konnte ausgeschlossen werden: 1. durch eine Dialyse in stark salzsaurer Lösung, die eine Bildung des dialysierbaren Hydrochlorides des Aminozuckers zur Folge haben müßte, 2. durch Elektrodialyse. In beiden Fällen veränderte sich der Kohlenhydratgehalt der Kondensationsprodukte nicht. Um zu prüfen, ob bei dieser Reaktion die 1-Aminogruppe wegen ihrer großen Reaktionsfähigkeit abgespalten wird oder nicht, schien es aussichtsreich, das Verhalten der 2-Amino-glucose (Glucosamin) unter analogen Bedingungen zu prüfen. Letztere enthält die NH₂-Gruppe ganz außerordentlich viel fester gebunden. Die quantitative Bestimmung der bei der Kondensation aufgenommenen Mengen an *d*-Glucosamin wurde mit Acetyl-aceton und *p*-Dimethylamino-benzaldehyd⁵⁾ durchgeführt. Wenn auch diese Farbreaktion, die von gewöhnlichen Zuckern nicht gegeben wird, bei der colorimetrischen Bestimmung eine größere Fehlerbreite als die Bestimmung der letztgenannten mit Orcin hat, so fielen doch von vorneherein einige Fehlerquellen aus: die Cellophanschläuche konnten kein glucosaminhaltiges Material abgeben, eventuell vorhandene Filterfasern nicht stören. Ferner enthält das Glucosamin wegen seiner Darstellung durch energische Hydrolyse aus Chitin mit starker Salzsäure keine hochmolekularen nicht dialysierenden Verunreinigungen. Trotzdem wurden alle bei der Untersuchung der 1-Amino-Zucker angewandten Vorsichtsmaßnahmen auch bei der Glucos-

⁴⁾ Bezogen von den Behringwerken (Marburg).

⁵⁾ K. Meyer, I. Palmer u. E. Smyth, Journ. biol. Chem. 119, 491 [1937].

amin-Bestimmung angewandt. Die Ergebnisse zeigt die folgende Zusammenstellung:

Protein	Glucosamin im Ausgangsprotein	Zunahme im Glucosamingehalt
Gelatine	0.12	0.13
Pferdeserumalbumin ⁴⁾ ...	0.10	0.26
Rinderserumalbumin ⁴⁾ ..	0.19	0.24
Edestin	0.00	0.15
Zein	0.04	0.08

Die Daten zeigen, daß die Aufnahme an Glucosamin wesentlich größer ist als an 1-Amino-Zuckern. Daß es sich auch hier nicht um eine salzartige Bindung handelt, geht daraus hervor, daß weder eine Dialyse in salzsaurer Lösung (p_H 4.8) noch eine Elektrodialyse zu einer nennenswerten Verringerung des Glucosamin-Gehaltes der Kondensationsprodukte führen. Auch hier läßt sich über die Art der Bindung noch keine Vermutung äußern. Sie dürfte jedoch anders sein als bei den Kondensationsprodukten der 1-Amino-Zucker mit Proteinen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeiten.

Beschreibung der Versuche

1-Amino-d-glucose wurde nach der Vorschrift von A. Schmuck⁶⁾ hergestellt und durch mehrmaliges Umkristallisieren aus absol. Methanol gereinigt.

1-Amino-cellobiose wurde nach einer Vorschrift von F. Micheel und E. Plate⁷⁾ hergestellt.

Umsetzungen von 1-Amino-Zuckern mit Proteinen

Die nicht eingeklammerten Zahlen der folgenden Ansätze beziehen sich auf Umsetzungen mit 1-Amino-glucose, die eingeklammerten auf solche mit 1-Amino-cellobiose.

500 mg des Proteins werden in 30 (70) ccm Wasser gelöst und 2 (1) g 1-Aminozucker hinzugegeben. Zur Vermeidung enzymatischer Zersetzungen werden alle Operationen unter Toluol durchgeführt. Die Lösung wird 3 Tage im Brutschrank bei 38° aufbewahrt. Da durch Hydrolyse des 1-Amino-Zuckers Ammoniak entsteht, wird der p_H -Wert der Lösung täglich 3–4 mal mit verd. Salzsäure auf 8.2–8.5 eingestellt. Dann wird die Lösung in vorher gewässerten und gut ausgespülten Cellophanschläuchen 5 Tage lang 15 mal gegen je 3 l dest. Wasser (also insgesamt 45 l) dialysiert, wobei der Cellophanschlauch langsam rotiert. Der Innenraum wird durch eine G 3-Glasfritten-Nutsche (Schott) gesaugt, um Verunreinigungen zu entfernen. Dann wird i. Vak. bei 35° eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen und die Lösung in eine Glasschale gegeben. Die letzten Reste Wasser werden im Vakuumexsiccator über Natriumhydroxyd entfernt. Zur Kohlenhydrat-Bestimmung wird nur Material benutzt, das vorher in der Trockenpistole bei 56° über Diphosphorpentoxyd getrocknet worden ist. Es werden jeweils 3 voneinander unabhängige Bestimmungen gemacht und das Mittel daraus genommen. Die Ergebnisse sind in der Tafel 1 (s. S. 1100) zusammengestellt.

Wie schon im theoretischen Teil erwähnt, wird als Kohlenhydrat-Gehalt des Ausgangsproduktes der Wert zugrunde gelegt, der sich ergibt, wenn das Protein und der

⁶⁾ B. 56, 1817 [1923].

⁷⁾ Vorstehende Mitteilung.

Aminozucker getrennt dialysiert, dann die Innenräume vereinigt und wie üblich aufgearbeitet werden. Auf diese Art werden minimale Mengen von nicht dialysierbaren Kohlenhydrat-Verunreinigungen der Aminozucker rechnerisch ausgeschaltet.

Tafel I. Umsetzungen von l-Amino-Zuckern mit Proteinen

Ansatz Nr.	Aminozucker	Kohlenhydrat-(%) - Gehalt		Zunahme %
		des Aus- gangsproteins	des Um- setzungsproduktes	
a) Gelatine (Holborn-Gelatine mit 0.56% Kohlenhydrat)				
1.	Aminoglucose	0.56	0.57	0.01
2.	Aminoglucose	0.56	0.57	0.01
3.	Aminoglucose	0.56	0.57	0.01
4.	Aminoglucose	0.56	0.62	0.06
5.	Aminoglucose	0.56	0.62	0.06
b) Pferdeserumalbumin „Behring“ (mit 0.12% Kohlenhydrat)				
6.	Aminoglucose	0.20	0.30	0.10
7.	Aminoglucose	0.16	0.29	0.13
8.	Aminoglucose	0.16	0.30	0.14
9.	Aminoglucose	0.16	0.26	0.10
10.	Aminocellobiose	0.14	0.36	0.22
11.	Aminocellobiose	0.27	0.50	0.23
12.	Aminocellobiose	0.27	0.48	0.21
13.	Aminocellobiose	0.21	0.41	0.20
c) Rinderserumalbumin „Behring“ (mit 0.24% Kohlenhydrat)				
14.	Aminoglucose	0.25	0.35	0.10
15.	Aminoglucose	0.25	0.35	0.10
16.	Aminocellobiose	0.24	0.52	0.28
17.	Aminocellobiose	0.24	0.43	0.19
18.	Aminocellobiose	0.24	0.47	0.23
d) Pferdeserumglobulin (mit 3.30% Kohlenhydrat)				
19.	Aminoglucose	3.30	3.32	0.02
20.	Aminoglucose	3.30	3.26	-0.04

Ausführung der Kohlenhydrat-Bestimmung

Mit gewissen Abänderungen wurde die Methode von Sørensen und Haugaard²⁾ angewandt:

Eine Menge Protein, die etwa 0.1—0.25 mg Kohlenhydrat enthalten soll, wird in einen 50-ccm-Erlenmeyerkolben eingewogen, 1 ccm Wasser hinzugegeben, der Kolben mit einem Gummistopfen, der mehrmals mit verd. Natronlauge und verd. Schwefelsäure behandelt worden ist, gut verschlossen und das Protein durch leichtes Erwärmen in Lösung gebracht. Dann werden 2 ccm einer 1-proz. Orcin-Lösung hinzugegeben, die folgendermaßen hergestellt wird: 10 g Orcin (zweimal aus Benzol umkristallisiert) werden in 500 ccm Wasser gelöst und 500 ccm 40-proz. reine Schwefelsäure hinzugegeben; dann wird die Lösung durch eine Glasfritte gesaugt und in einer gut verschlossenen, braunen Flasche aufbewahrt. Die Lösung ist so monatelang haltbar.

Nun werden zu der Protein-Orcin-Lösung 15 ccm 60-proz. Schwefelsäure gegeben und die Lösung genau 30 Min. im Ultrathermostaten auf 80° erwärmt, dann 5 Min. in Eiswasser gestellt. Bei allen Operationen ist Lichtzutritt möglichst zu vermeiden. Eine Kompensations-Lösung wird ebenso hergestellt, nur wird statt der Orcin-Lösung eine 20-proz. Schwefelsäure hinzugegeben. Die Meß-Lösung wird im Pulfrich-Photometer (Zeiß) in 5-mm-Cüvetten mit Filter S 43 (Durchlässigkeitsmaximum 430 m μ) mit der Kompensations-Lösung verglichen. Es werden 10 Ablesungen gemacht, der niedrigste und höchste Wert gestrichen, und aus den übrigen das Mittel genommen. An Hand einer vorher mit

reinen Glucose-Lösungen hergestellten Eichkurve wird nun der Kohlenhydrat-Gehalt — in jedem Falle bezogen auf Glucose — festgestellt. Bei Messungen mit dem Unicam-Spektrophotometer wird in 1-cm-Cüvetten bei 425 μ gemessen.

Umsetzungen von *d*-Glucosamin mit Proteinen

500 mg Protein werden in 30 ccm Wasser gelöst, 2 g reinstes Glucosamin-hydrochlorid hinzugegeben und mit Natronlauge auf den p_H -Wert 8.3—8.5 gebracht. Die Lösung wird 3 Tage im Brutschrank bei 38° gehalten. Etwa 3mal müssen einige Tropfen Natronlauge hinzugegeben werden, um den p_H -Wert konstant zu halten. Die Lösung färbt sich erst gelb, dann rotbraun. Sie wird im vorher gewässerten und gut durchgespülten rotierenden Cellophanschlauch 15 mal gegen je 3 l dest. Wasser (insgesamt 45 l Wasser) dialysiert. Der größte Teil der gefärbten Verunreinigungen geht durch die Membran, die Lösungen bleiben jedoch braun gefärbt. Dann wird durch eine G3-Glasfritten-Nutsche gesaugt, eingedampft, in eine Schale gespült und im Exsiccator der Rest Wasser abgedampft.

Für die Glucosamin-Bestimmung wird nur Material verwandt, das bei 56° über Diphosphorpentoxyd in der Trockenpistole getrocknet worden ist.

Tafel 2. Umsetzungen von *d*-Glucosamin mit Proteinen

Ansatz Nr.	Ausgangs-Protein	Glucosamin-		Zunahme %
		Gehalt des Ausgangsproteins %	Gehalt des Umsetzungsproduktes %	
1.	Gelatine	0.12	0.28	0.16
2.	Gelatine	0.12	0.23	0.11
3.	Pferdeserumalbumin „Behring“	0.10	0.34	0.24
4.	Pferdeserumalbumin „Behring“	0.10	0.38	0.28
5.	Rinderserumalbumin „Behring“	0.19	0.43	0.24
6.	Edestin	0.00	0.15	0.15
7.	Edestin	0.00	0.16	0.16
8.	Zein	0.04	0.12	0.08

Die Glucosamin-Bestimmung wurde nach der Methode von Meyer, Palmer und Smyth⁵⁾ durchgeführt. Als Kompensations-Lösung wurde nicht eine Lösung, die alle Komponenten bis auf das Protein enthält, genommen, sondern eine solche, die alle Bestandteile bis auf den *p*-Dimethylamino-benzaldehyd enthält. Da sehr kleine Glucosaminmengen zu bestimmen waren, mußte mit kleinen Flüssigkeitsmengen gearbeitet werden, worunter die Genauigkeit der Bestimmung litt; der mittlere Fehler liegt bei $\pm 10\%$ des Wertes.