

## REAKTIONEN ENOLISCHER ZUCKERDERIVATE

TEIL VIII. DIE WIRKUNG VON  $\beta$ -D-GLUCOSIDASE UND  
 $\beta$ -D-GALAKTOSIDASE AUF D-GLUCAL UND D-GALAKTAL\*

JOCHEN LEHMANN UND EKKEHARD SCHRÖTER

*Chemisches Laboratorium der Universität, D-7800 Freiburg i. Br. (Deutschland)*

(Eingegangen am 16. November 1971; angenommen am 27. Dezember 1971)

## ABSTRACT

D-Glucal and D-galactal were converted into the corresponding 2-deoxy-D-hexoses by  $\beta$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-galactosidase, respectively. The enzymic hydration of D-glucal compared to that of D-galactal occurred at a faster rate and also yielded a byproduct of yet unknown structure. In the presence of glycerol as acceptor, D-glucal as well as D-galactal formed glyceryl 2-deoxy- $\beta$ -D-glycosides. In this case also D-glucal yielded two byproducts which, according to preliminary investigations, seem to be glyceryl pseudoglucal derivatives. The enzymic hydration is irreversible. Glyceryl 2-deoxy- $\beta$ -D-*lyxo*-hexopyranoside was hydrolyzed by  $\beta$ -D-galactosidase to give glycerol and 2-deoxy-D-*lyxo*-hexose. The mechanism of the enzymic hydration and glycosylation of glycals is discussed.

## ZUSAMMENFASSUNG

D-Glucal und D-Galaktal werden durch  $\beta$ -D-Glucosidase bzw.  $\beta$ -D-Galaktosidase unter Bildung der 2-Desoxy-D-hexosen hydratisiert. D-Glucal reagiert dabei sehr viel rascher als D-Galaktal und ergibt im Gegensatz zu diesem neben 2-Desoxy-D-*arabino*-hexose ein weiteres Reaktionsprodukt bisher unbekannter Struktur. In Gegenwart von Glycerol als Acceptor werden sowohl aus D-Glucal als auch aus D-Galaktal mit den entsprechenden  $\beta$ -D-Glykosidasen Glyceryl-2-desoxy- $\beta$ -D-glykoside gebildet. Auch hier treten bei der Umsetzung des D-Glucals neben Glyceryl-2-desoxy- $\beta$ -D-*arabino*-hexosid zwei Nebenprodukte bisher unbekannter Konstitution auf. Vorläufige Untersuchungen deuten darauf hin, daß es sich um Glycerylpseudo-glucal-Derivate handelt. Die enzymatische Hydratisierung ist irreversibel. Die Behandlung von Glyceryl-2-desoxy- $\beta$ -D-*lyxo*-hexopyranosid mit  $\beta$ -D-Galaktosidase liefert als Spaltprodukte 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose und Glycerol. Der Mechanismus der enzymatischen Hydratisierung und Glykosylierung wird diskutiert.

\*Teil VII, siehe Zit. 8.

## EINFÜHRUNG

Die Glykale und einige ihrer Derivate sind zu folgenden, für diese Substanzklasse typischen Reaktionen befähigt<sup>1</sup>: Additionen an die enolische Doppelbindung und Umlagerungen. Diese miteinander konkurrierenden Reaktionen sind säurekatalysiert. Je nach Bedingungen, Art des Glykals und Art des Addenden R-O-H überwiegt entweder die Additionsreaktion unter Bildung eines 2-Desoxyzuckers bzw. 2-Desoxyglykosids oder die Umlagerungsreaktion, die zur Bildung von Pseudoglykalderivaten und Folgeprodukten, z.B. einem stabilen Furanderivat<sup>2</sup> führt.

Von Lee<sup>3</sup> wurde 1969 zum ersten Mal beobachtet, daß D-Galaktal eine außergewöhnliche und spezifische Hemmwirkung auf  $\beta$ -D-Galaktosidase ausübt. Dagegen wird  $\beta$ -D-Glucosidase durch D-Glucal nur geringfügig gehemmt<sup>4</sup>. In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe  $^{14}\text{C}$ - und  $^3\text{H}$ -markierter Reaktionspartner gezeigt, daß  $\beta$ -D-Glucosidase und  $\beta$ -D-Galaktosidase analog dem säurekatalysierten Vorgang die entsprechenden Glykale\* durch Additionsreaktionen zu 2-Desoxyhexosen bzw. 2-Desoxyhexosiden umsetzen und daß  $\beta$ -D-Glucosidase wahrscheinlich auch die Umlagerung von D-Glucal in Pseudoglucalderivate katalysiert. Jüngste enzymatische Untersuchungen von Blachnitzky *et al.*<sup>5</sup> ergaben, daß D-Galaktal unter der katalytischen Wirkung von  $\beta$ -D-Galaktosidase hydratisiert wird und daß die dabei gebildete 2-Desoxy-D-lyxo-hexose nicht für die von Lee<sup>3</sup> beobachtete Enzymhemmung verantwortlich ist. Diese Befunde stimmen mit unseren Ergebnissen überein. Die Untersuchung der enzymatischen Umwandlung der D-Glykale und der dabei entstandenen Produkte soll zur weiteren Klärung der Wirkungsweise der Glykosidasen beitragen.

## ERGEBNISSE

*Wasser als Reaktionspartner.* — Die Inkubation von D-Glucal- $^{14}\text{C}_6$  (U) (1) und D-Galaktal-1- $^{14}\text{C}$  (2) mit vergleichbaren Aktivitäten der entsprechenden  $\beta$ -D-Glykosidasen bei pH 6,8 liefert mit sehr unterschiedlicher Geschwindigkeit 2-Desoxy-

TABELLE I

HYDRATISIERUNG VON GLYKALEN DURCH  $\beta$ -D-GLYKOSIDASEN<sup>a</sup>

Substrat-Enzym

D-Glucal- $\beta$ -D-Glucosidase	Zeit (h) Umsatz (%)	0,25 12	0,5 17	3,5 66	6,5 83	11 93
D-Galaktal- $\beta$ -D-Galaktosidase	Zeit (h) Umsatz (%)	0,5 7	2 22	5 44	12 66	25 71

<sup>a</sup>Ansatz: Glykal- $^{14}\text{C}$  (10 nMol), Enzym (25 µg), 0,2M Natriumphosphat-Puffer, pH 6,8 (50 µl), 40°.

\* Die enzymatischen Reaktionen sind spezifisch. D-Glucal wird nicht durch  $\beta$ -D-Galaktosidase und D-Galaktal nicht durch  $\beta$ -D-Glucosidase umgesetzt.

D-*arabino*-hexose- $^{14}C$  (U) (3) bzw. 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose-1- $^{14}C$  (4) (Tabelle I)\*. Die Umsetzungen sind im Rahmen der Meßgenauigkeit quantitativ. Bei Inkubation von D-Glucal- $^{14}C$  (1) mit  $\alpha$ -D-Glucosidase (Maltase) treten unter den von uns angewendeten Bedingungen keine radioaktiv markierten Produkte auf.

Die Umsetzung von D-Glucal- $^{14}C$  (1) liefert neben dem Hauptprodukt 2-Desoxy-D-*arabino*-hexose- $^{14}C$  (3) ein Nebenprodukt (5), das bei der vergleichbaren Umsetzung des D-Galaktals 2 nicht beobachtet wird. Obwohl die Strukturaufklärung von 5 noch aussteht, nehmen wir an, daß es sich um ein Umlagerungsprodukt\*\* handelt.

Weder die Hydratisierung des D-Glucals noch die des D-Galaktals ist reversibel. Bei längerer Inkubation (mindestens 8 Tage bei 40°) von 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose-1- $^{14}C$  (4) mit  $\beta$ -D-Galaktosidase entsteht zwar ein markiertes Produkt (6) mit einem  $R_F$ -Wert ähnlich dem des D-Galaktals (Tabelle II). Fingerprint-Chromatographie sowie Cokristallisation mit unmarkiertem Galaktal zeigten jedoch, daß 6 mit diesem nicht identisch ist. Die Behandlung mit Osmiumtetroxid ergab, daß 6 keine Doppelbindung enthält. Ausgeschlossen wurde zudem eine reduzierende Gruppe in 6, da Natriumborhydrid- $t_4$  keine Veränderung hervorrief. Behandlung mit verdünnter Mineralsäure in der Wärme führt zur Zerstörung von 6 unter Bildung polymerer Produkte. Diese vorläufigen Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, daß 6 ein inneres Glykosid (1,6-Anhydro-Typ) der 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose ist. Die endgültige Strukturaufklärung von 6 ist in Angriff genommen.

Bei Inkubation von 2-Desoxy-D-*arabino*-hexose- $^{14}C$  (3) mit  $\beta$ -D-Glucosidase konnte keine Veränderung des Substrats beobachtet werden.

*Glycerol als Reaktionspartner.* — Glycerol ist ein ausgezeichneter Acceptor für enzymatische Transglykosylierungen<sup>6</sup>. Dank seiner hohen Affinität zu den beiden  $\beta$ -D-Glykosidasen vermag es trotz weit geringerer Konzentration mit dem Wasser des Mediums um die Aufnahme eines Glykosylrestes erfolgreich zu konkurrieren. Die formale Ähnlichkeit der enzymatisch katalysierten Addition an Glykal mit einer Transglykosylierungsreaktion wird durch die sehr leicht erfolgende enzymatisch katalysierte Addition von Glycerol an Glykale demonstriert. Schlechte Acceptoren für eine Transglykosylierung, wie etwa Methanol, Phenol oder o-Nitrophenol, werden bei der Enzymreaktion nicht addiert. Bei Inkubation von inaktivem D-Galaktal und Glycerol- $^{14}C$ (U) sowie von D-Galaktal-1- $^{14}C$  (2) und inaktivem Glycerol mit  $\beta$ -D-Galaktosidase erhält man wie bei analogen Transglykosylierungen<sup>7,8</sup> die entsprechenden radioaktiv markierten Glyceryl-2-desoxy- $\beta$ -D-*lyxo*-hexoside, deren Identität durch Spaltung in die Komponenten Glycerol und 2-Desoxy-D-*lyxo*-hexose mittels  $\beta$ -D-Galaktosidase gesichert ist.

\* Entsprechende Versuche in T<sub>2</sub>O ergeben 2-T-markierte 2-Desoxyhexosen. Diese Markierung ist in wäßrigem Medium nicht stabil. Umgekehrt bauen nicht markierte 2-Desoxyhexosen beim Aufbewahren in T<sub>2</sub>O-Puffer Tritium ein.

\*\*Pseudoglucal, das als Umlagerungsprodukt in Frage kommt, ist nur in Form substituierter Derivate nachgewiesen und isoliert worden<sup>1</sup>. Unter den Bedingungen der säurekatalysierten chemischen Umlagerung unsubstituierter Glykale sollen Pseudoglykale als instabile Zwischenstufer auftreten<sup>1</sup>.

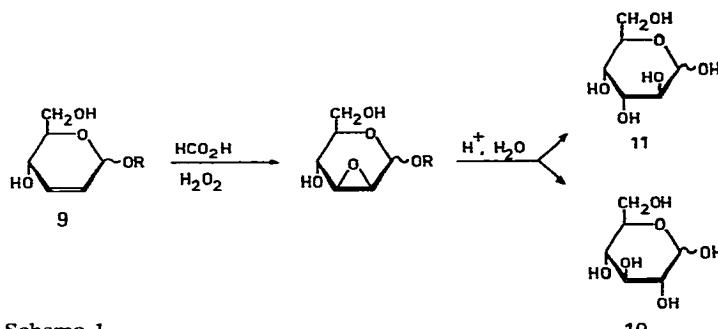
TABELLE II  
CHROMATOGRAPHISCHE DATEN UND IDENTIFIZIERUNGSMETHODEN

Verbindung	R <sub>F</sub>	Nachweis	Röntgenfilm	Radiofilterchromatogramm	Kokristallisation	Fingerprint	Sprühreagenz
D-Glucal	0,68	+	+		+ <sup>a</sup>		+ <sup>b</sup>
D-Galaktal	0,63	+	+	+	+ <sup>c</sup>		+ <sup>b</sup>
2-Desoxy-D-arabinose	0,52	+	+	+	+ <sup>d</sup>		+ <sup>b</sup>
2-Desoxy-D-lyxo-hexose	0,47	+	+	+	+ <sup>d</sup>		+ <sup>b</sup>
Glycerol	0,57	+	+	+	+ <sup>a</sup>	+	+ <sup>e</sup>
Phenol	0,93	+					
D-Glucose	0,36	+	+	+			
D-Glucitol	0,32		+	+			
Glyceryl-2-desoxy-D-lyxo-hexosid	0,40	+	+	+	(+) <sup>f</sup>		
5	0,39	+	+	+			
6	0,60	+	+	+			
7	0,69	+	+	+			
8	0,46	+	+	+			
	0,44	+					
	0,44	+					

<sup>a</sup>Tritzenzoat aus Äthanol. <sup>b</sup>Sprühen mit Artilinphthalat in 1-Butanol, anschließend während 15 Min. auf 110° erhitzen. <sup>c</sup>Aus Essigester. <sup>d</sup>Acetat aus Äthanol.

<sup>e</sup>Sprühen mit Perjodat, dann Rütteln mit Schwefeldioxid und Sprühen mit fuchsin schwefiger Säure. <sup>f</sup>In Form der Spaltprodukte Glycerol und 2-Desoxy-D-lyxo-hexose.

Die Umsetzung von D-Glucal mit  $\beta$ -D-Glucosidase in Gegenwart von Glycerol- $^{14}C$  (U) liefert neben einer geringen Menge Additionsprodukt\* als Hauptprodukte zwei  $^{14}C$ -markierte Verbindungen (7 und 8) mit höherem  $R_F$ -Wert. Beide Verbindungen entstehen—allerdings in sehr geringen Mengen—auch bei zweitägiger Behandlung von D-Glucal und Glycerol- $^{14}C$  (U) mit 30 % iger Essigsäure bei 40°. Bis zur endgültigen Strukturaufklärung wird angenommen, daß es sich um Glycerylpseudoglykale handelt.



Schema 1

Diese Annahme bezüglich der Struktur von 7 und 8 wird durch folgendes Experiment gestützt: Werden 7 und 8 aus D-Glucal- $^{14}C$  (1) und Glycerol- $^{14}C$  (U) gebildet und nach Isolierung mit Perameisensäure behandelt unter Bedingungen, die zur *trans*-Hydroxylierung einer Doppelbindung führen<sup>9</sup>, so treten nach Spaltung mit Salzsäure Glycerol- $^{14}C$  (U) sowie D-Glucose- $^{14}C$  (U) (10) und eine weitere radioaktiv markierte Verbindung mit den chromatographischen Eigenschaften eines Monosaccharids auf. D-Glucose- $^{14}C$  (10) kann neben D-Altrose- $^{14}C$  (U) (11), die bisher noch nicht identifiziert wurde, nur aus dem Pseudoglucal 9 entstanden sein (Schema 1), wenn man eine sehr unwahrscheinliche Doppelbindung zwischen C-3 und C-4 in 7 und 8 ausschließt. Die D-Glucose- $^{14}C$  (10) kann auch nicht aus einem D-Glucal-Derivat gebildet worden sein, da die Doppelbindung zwischen C-1 und C-2 bereits bei der Glycerol-Addition aufgehoben wurde. Zudem war die bei der *trans*-Hydroxylierung eines D-Glucal-Derivats auch zu erwartende D-Mannose nicht nachzuweisen.

#### DISKUSSION

Die Experimente zeigen, daß die enzymatisch katalysierten Umsetzungen von Glykalen in neutralem wäßrigem Medium hinsichtlich der Produkte große Ähnlichkeit mit entsprechenden säurekatalysierten Reaktionen haben. Damit erhebt sich die Frage nach der katalytischen Wirkungsweise der Enzyme auf die Glykale, die keine „normalen“ Substrate der Glykosidasen sind.

\*Die enzymatische Rückspaltung in Glycerol und 2-Desoxy-D-arabinohexose war bisher nicht möglich, da nicht genügend radioaktives Material zur Verfügung stand.

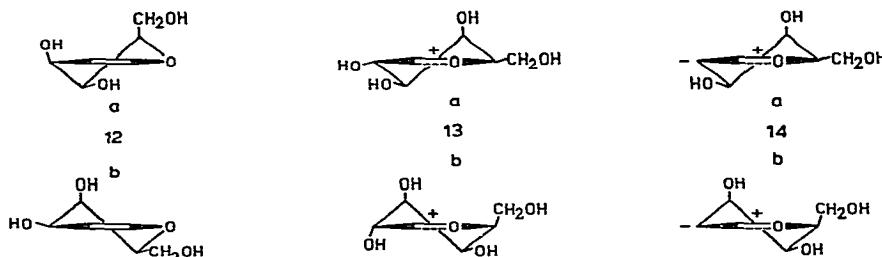
Die enzymatisch katalysierte Glykosidspaltung verläuft in zwei—wenigstens gedanklich trennbaren—Schritten:

1. Aktivierung der Bindung vom C-1 des Pyranoseringes zum glykosidischen Sauerstoffatom durch Anlagerung eines Protons an das Sauerstoffatom<sup>8,10</sup>.

2. Entweder (a) vorübergehende Bildung eines cyclischen Carbonium-Oxonium-Ions nach Dissoziation der aktivierte glykosidische Bindung, oder (b) nucleophile Substitution am C-1 durch eine geeignete funktionelle Gruppe des Enzyms unter vorübergehender Bindung des Glykosylrestes an das Enzym<sup>10,11</sup>.

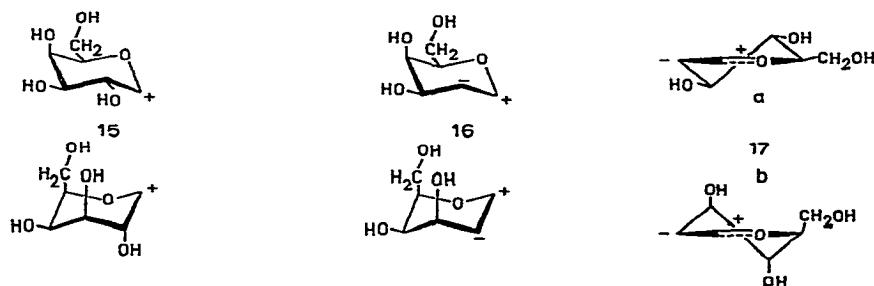
Die Bildung des Endproduktes erfolgt dann durch stereospezifische Absättigung des Carbonium-Oxonium-Ions (a) bzw. durch Substitution (b) mit einem geeigneten Nucleophil. In jedem Fall muß ein nucleophiler Angriff am C-1 des Glykosylrestes erfolgen.

Die von Lee<sup>3</sup> beobachtete Hemmwirkung von D-Galaktal auf  $\beta$ -D-Galakto-sidase scheint die Möglichkeit a zu unterstützen, da das D-Galaktal (2) eine dem Carbonium-Oxonium-Ion 13 ähnliche Ringkonformation 12 (Halbsessel) einnehmen kann. Angesichts der strengen sterischen Bedingungen für den Glykonteil spaltbarer Galaktoside<sup>12</sup> darf diese Hypothese jedoch bezweifelt werden. Abgesehen von der möglichen gemeinsamen Halbsessel-Konformation des Hydropyrangerüstes sind die Positionen entsprechender Substituenten relativ zu diesem Gerüst in 12 und in 13 völlig verschieden.

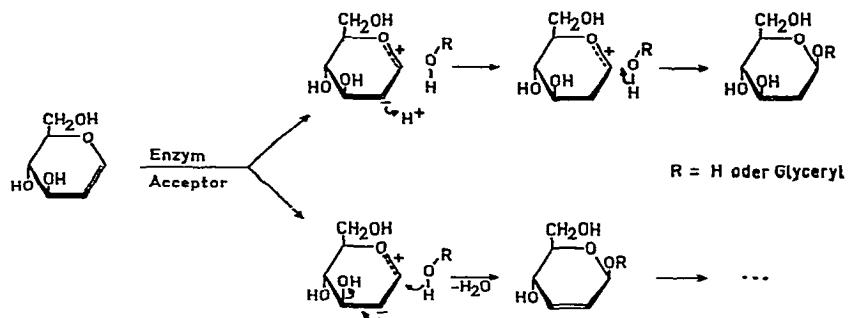


Weitgehende sterische Übereinstimmung zwischen Glykosylkation und Glykal besteht dann, wenn das Glykal in einer polaren Form an das Enzym gebunden ist. Die konformative Ähnlichkeit zwischen einem Glykosylkation in Halbsesselkonformation (z.B. 13) oder Sesselkonformation (z.B. 15) und den entsprechenden polaren Formen eines Glykals (z.B. 14 und 16) ist deutlich. Da eine Ladungstrennung ohne mesomere Beteiligung des Ringsauerstoffes (z.B. 16) energetisch sehr ungünstig ist, wird der mesomeriestabilisierten Form (z.B. 14) der Vorzug gegeben.

Damit ist erst erklärbar, weshalb die Glykale überhaupt Substrate der entsprechenden  $\beta$ -D-Glykosidasen sind und mit Wasser oder einem Alkohol wie Glycerol bei pH 6,8 reagieren können. Die katalytische Wirkung des Enzyms bestünde also darin, das Glykalmolekül durch spezifische Wasserstoffbrückenbindung in eine Konformation zu zwingen, in der die C=C-Doppelbindung stark polarisiert ist. Das auf diese Weise aktivierte Glykal addiert an C-2 spontan ein Proton unter Bildung



eines Carbonium-Oxonium-Ions. Die Absättigung durch ein Nucleophil könnte anschließend (Schema 2, oben) oder synchron erfolgen.



Schema 2

Da bei der Umsetzung von D-Glucal mit  $\beta$ -D-Glucosidase nicht nur das Additionsprodukt sondern allem Anschein nach auch Umlagerungsprodukte entstehen, ist die vinylog Reaktion offenbar wie bei der Säurekatalyse auch bei der Enzymkatalyse möglich (Schema 2, unten). Die ausgeprägte Neigung der D-Glucal-Derivate zur Pseudoglykalykalumlagerung wird auf die *trans*-Stellung der Substituenten an C-3 und C-4 zurückgeführt<sup>1</sup>. Da die Nachbargruppenbeteiligung des Substituenten am C-4 bei der Eliminierung des Substituenten am C-3 nur bei *anti*-Stellung optimal ist (anchimerer Effekt), kann für die Enzymreaktion geschlossen werden, daß die polare Form des Glykalmoleküls (z. B. 17) und somit auch der Glykosylrest als alternativer Halbsessel (13b, 14b, 17b) fixiert werden. Eine über Wasserstoffbrücken erfolgende Fixierung des Glykons in der alternativen Halbsesselkonformation erhöht zweifellos den Energieinhalt des Substrats und wäre damit in der Lage, zur Aktivierung des zu spaltenden Glykosids beizutragen.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

**Papierchromatographie.** — Alle Chromatogramme wurden auf Chromatographiepapier Whatman Nr. 1 absteigend mit 1-Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3, v/v) angefertigt. Inaktive Substanzen wurden mit Anilinphthalat oder mit Fuchsin-

Perjodat sichtbar gemacht, radioaktive Substanzen durch Autoradiographie oder durch Auszählen in einem Radiopapierchromatographen. Die  $R_F$ -Werte sind in Tabelle II zusammengefaßt.

*Identifizierung radioaktiv markierter Verbindungen.* — Die Auswertung der Papierchromatogramme mit radioaktiven Verbindungen erfolgte entweder durch Autoradiographie mit Kodak-Röntgenfilm (blauempfindlich, einseitig beschichtet) oder durch Auszählen im Packard 7200 Radiochromatogram Scanner System (2 fensterlose Gasdurchflußkammern). Kristallivate wurden gemessen im Nuclear Chicago Liquid Scintillation System 720 Series.

**D-Glucal (1)- $^{14}\text{C}(U)$  und D-Galaktal (2)-1- $^{14}\text{C}$ .** — Zur Präparation im Mikromaßstab wurde die Literaturvorschrift<sup>13</sup> folgendermaßen modifiziert: Glucose- $^{14}\text{C}(U)$  (50  $\mu\text{Ci}$ , spez. Akt. 2,9 mCi/mMol; The Radiochemical Centre Amersham) bzw. D-Galaktose-1- $^{14}\text{C}$  (50  $\mu\text{Ci}$ , spez. Akt. 3,0 mCi/mMol; The Radiochemical Centre Amersham) wurden in Pyridin-Essigsäureanhydrid (200  $\mu\text{l}$ , 1:1) gelöst, nach 2 Std. im Vakuum zur Trockne eingedampft, mit einer gesättigten Lösung (200  $\mu\text{l}$ ) von Bromwasserstoff in Eisessig versetzt und wiederum während 2 Std. stehen gelassen. Unterdessen wurde Natriumacetat (Trihydrat, 200 mg) in Wasser (300  $\mu\text{l}$ ) gelöst, Eisessig (200  $\mu\text{l}$ ) zugefügt, auf  $-20^\circ$  gekühlt, Zinkstaub (110 mg) und darauf eine Lösung von krist. Kupfersulfat (11 mg) in Wasser (40  $\mu\text{l}$ ) zugegeben und diese Mischung schließlich bei  $-18^\circ$  mit dem Bromierungsgemisch vereinigt. Unter gutem Rühren wurde während 1 Std. bei  $-18^\circ$  und danach noch während 3 Std. bei  $0^\circ$  gehalten. Nach Zugabe von Eis (3 g) wurde dreimal mit je 3 ml Chloroform extrahiert, über Calciumsulfat (Sikkon) getrocknet und unter vermindertem Druck eingedampft. Zur Entacetylierung wurde mit 50 mM Natriummethylatlösung in Methanol (2 ml) versetzt und nach 1 Std. auf Papier aufgetragen und neben einer inaktiven Probe chromatographiert.

**2-Desoxy-D-arabino-hexose (3)- $^{14}\text{C}(U)$  und 2-Desoxy-D-lyxo-hexose (4)-1- $^{14}\text{C}$ .** — Die Darstellung erfolgte durch Hydratisierung der entsprechenden Glykale ähnlich wie in der Literatur<sup>14</sup> beschrieben: Die gewünschte Menge Glykal- $^{14}\text{C}$  wurde mit Wasser vom Papier eluiert, mit so viel kalter 50%iger Schwefelsäure versetzt, daß die resultierende Lösung 5%ig an Schwefelsäure war, und während 24 Std. im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde mit der entsprechenden Menge Natriumacetat abgestumpft und sofort neben einer authentischen Probe der jeweiligen 2-Desoxyhexose auf Papier aufgetragen und chromatographiert.

*Enzymatische Umsetzungen.* — *Enzyme.*  $\alpha$ -D-Glucosidase (Maltase) aus Hefe (Boehringer, Mannheim); Kristallsuspension, 2 mg/ml; spez. Aktivität ca. 50 U/mg (Maltose).  $\beta$ -D-Glucosidase aus Süßmandeln (Boehringer, Mannheim); Kristallsuspension, 5 mg/ml; spez. Aktivität ca. 40 U/mg (Salicin).  $\beta$ -D-Galaktosidase aus *Escherichia coli* (Boehringer, Mannheim); Kristallsuspension, 5 mg/ml; spez. Aktivität ca. 30 U/mg (Lactose). Die Enzymsuspensionen wurden wie vom Hersteller geliefert eingesetzt. Die Aktivitäten der  $\alpha$ -D-Glucosidase,  $\beta$ -D-Glucosidase und  $\beta$ -D-Galaktosidase, getestet mit *o*-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid, *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid und *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid nach Lederberg<sup>15</sup>, verhielten

sich wie 1:0,1:2 (bezogen auf Protein) oder wie 1:0,5:5 (bezogen auf gleiche Volumina der verwendeten Kristallsuspensionen).

*Acceptoren.* Glycerol-<sup>14</sup>C (U), spez. Aktivität 5,4 mCi/mMol (New England Nuclear Corp.). Methanol-<sup>14</sup>C, spez. Aktivität 0,9 mCi/mMol (Farbwerke Hoechst AG). Phenol-<sup>14</sup>C(U), spez. Aktivität 25,9 mCi/mMol (The Radiochemical Centre, Amersham).

*Bedingungen.* Puffer: 0,2M Natriumphosphat, pH 6,8; 40°.

*Ansätze:* a) Glykal (10 mg, 68 μMol), Puffer (50 μl), Enzym (5 μl); b) Glykal-<sup>14</sup>C (1 bzw. 2) (30 nCi, 10 nMol), Puffer (50 μl), Enzym (5 μl); c) Glykal (10 mg, 68 μMol), Glycerol-<sup>14</sup>C (U) (10 μCi, 1,9 μMol), Puffer (50 μl), Enzym (5 μl); d) Glykal (10 mg, 68 μMol), Methanol-<sup>14</sup>C (6,2 μCi, 7 μMol), Puffer (50 μl), Enzym (5 μl); e) Glykal (10 mg, 68 μMol), Phenol-<sup>14</sup>C (U) (3,1 μCi, 120 nMol), Puffer (50 μl), Enzym (5 μl); f) Glykal-<sup>14</sup>C (1 bzw. 2) (30 nCi, 10 nMol), Glycerol (10 mg, 92 μMol), Puffer (50 μl), Enzym (5 μl); g) Glykal-<sup>14</sup>C (1 bzw. 2) (30 nCi, 10 nMol), Glycerol-<sup>14</sup>C (U) (10 μCi, 1,9 μMol), Puffer (50 μl), Enzym (5 μl). Den Inkubationsgemischen a–g wurden von Zeit zu Zeit 5 μl-Proben entnommen (je nach Umsatz erste Probe 15 Min. bis 1 Std. nach Start, letzte Probe nach 1 bis 14 Tagen), auf Papier aufgetragen und chromatographiert. h) 2-Desoxyhexose-<sup>14</sup>C (2-Desoxy- $\beta$ -D-arabino-hexose **3** bzw. 2-Desoxy-D-lyxo-hexose **4**) (100 nCi, 33 nMol), Puffer (30 μl), Enzym ( $\beta$ -D-Glucosidase bzw.  $\beta$ -D-Galaktosidase) (20 μl); i) Glyceryl-2-desoxy- $\beta$ -D-lyxo-hexopyranosid-1-<sup>14</sup>C (eluiert) (ca. 4 nCi), Puffer (30 μl),  $\beta$ -D-Galaktosidase (20 μl). Nach 1, 8 und 14 Tagen wurden je 10 μl entnommen, auf Papier aufgetragen und chromatographiert.

Parallel zu jedem Enzymansatz wurde eine Probe ohne Enzym unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Aktivität der Enzyme wurde jeweils nach Beendigung der Inkubation mit den entsprechenden *o*-Nitrophenylglykopyranosiden getestet. Bei Ansätzen von mehr als 3 Tagen Inkubationsdauer wurde die Enzymaktivität auch zwischendurch kontrolliert und, wenn nötig, entsprechend der Aktivitätsabnahme Enzym ergänzt. (Bei der  $\alpha$ -D-Glucosidase traten regelmäßig bereits nach 2 bis 3 Tagen erhebliche Aktivitätsverluste ein.)

*Untersuchung der Verbindung 6.* — Auf einem Bogen Chromatographiepapier Whatman Nr. 1 wurde das Inkubationsgemisch 2-Desoxy-D-lyxo-hexose- $\beta$ -D-Galaktosidase chromatographiert, ein Streifen quer zur Laufrichtung mit der Zone **6** ausgeschnitten und der Bereich **6** dreimal im Abstand von 10 Min. mit einer Lösung von Osmiumtetroxid (40 mg) in abs. 2-Methyl-2-propanol (2 ml) besprührt. Während der drei 10-Min.-Intervalle wurde das Papier in einer gesättigten 2-Methyl-2-propanol-Atmosphäre aufbewahrt. Ein Papierstreifen mit D-Galaktal-1-<sup>14</sup>C (**2**) (ca. 5 nCi) wurde in gleicher Weise behandelt, anschließend wurde chromatographiert. Die Galaktalprobe war zu über 90% umgesetzt, **6** blieb unverändert. Verbindung **6** (ca. 3 nCi) wurde eluiert und das wässrige Eluat mit Wasser auf 60 μl aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurde Natriumborhydrid-t<sub>4</sub> (0,5 mg, spez. Aktivität 480 mCi/mMol, The Radiochemical Centre, Amersham) gegeben und während 1 Std. stehen gelassen. D-Glucose (0,1 mg) wurde in gleicher Weise behandelt. Die Lösungen wurden quantitativ auf Papier aufgetragen und chromatographiert. Während die Glucose fast

vollständig zu D-Glucitol-*I-t* reduziert worden war, blieb **6** unverändert. Verbindung **6** (*ca.* 3 nCi) wurde mit Wasser eluiert und das Eluat mit dem gleichen Volumen 2M Salzsäure versetzt. Die Mischung wurde während 15 Min. bei 95° gehalten, anschließend auf Papier aufgetragen und chromatographiert. Die gesamte Radioaktivität blieb am Start zurück.

*Untersuchung der Verbindungen 7 und 8.* — Die Verbindungen **7** und **8** (*je ca.* 4 nCi) wurden mit Wasser eluiert und die Eluate gefriergetrocknet. Die Rückstände wurden mit einer Mischung aus 90% iger Ameisensäure (30 µl) und 30% igem Wasserstoffperoxid (1 µl) versetzt, während 1 Std. auf 40° erwärmt und 16 Std. stehen gelassen. Anschließend wurden Wasser (50 µl) und conc. Salzsäure (10 µl) zugegeben und die Lösung während 20 Std. bei 95° gehalten, danach auf Papier aufgetragen und chromatographiert. D-Glucal-<sup>14</sup>C (**1**) (30 nCi, 10 nMol) wurde mit 30% iger Essigsäure (50 µl) während 2 Tage bei 40° aufbewahrt, anschließend eine Probe (10 µl) auf Papier aufgetragen und chromatographiert.

*Cokristallisation.* — Die Radioaktivität wurde vom Papier eluiert, mit authentischem inaktivem Material (200 mg) versetzt und gefriergetrocknet. Die Rückstände (ausgenommen D-Galaktal) wurden mit Pyridin-Essigsäureanhydrid oder Pyridin-Benzoylchlorid acyliert und aus einem geeigneten Lösungsmittel (vgl. Tabelle II) bis zu konstanter spezifischer Aktivität umkristallisiert.

#### DANK

Herrn Dr. H. Reinshagen sowie den Herren Professor K. Wallenfels und Dr. G. Kurz danken wir für anregende Diskussionen. Der Deutschen Forschungsmeinschaft sei für eine Sachbeihilfe gedankt.

#### LITERATUR

- 1 B. HELFERICH, *Advan. Carbohyd. Chem.*, 7 (1952) 210; R. J. FERRIER, *Advan. Carbohyd. Chem.*, 20 (1965) 67; R. J. FERRIER, *Advan. Carbohyd. Chem.*, 24 (1969) 199.
- 2 E. ALBANO, D. HORTON UND T. TSUCHIYA, *Carbohyd. Res.*, 2 (1966) 349.
- 3 Y. C. LEE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35 (1969) 161.
- 4 E. T. REESE, F. W. PARRISH UND M. ETTLINGER, *Carbohyd. Res.*, 18 (1971) 381.
- 5 E. O. BLACHNITZKY, G. KURZ, A. SCHIMZ UND K. WALLENFELS, unveröffentl.
- 6 K. NISIZAWA UND Y. HASHIMOTO, in W. PIGMAN UND D. HORTON (Hrsg.), *The Carbohydrates*, Vol. IIA, Academic Press, New York, 2nd ed., 1970, pp. 264, 273; G. KURZ, A. SCHIMZ UND K. WALLENFELS, unveröffentl.
- 7 W. BOOS, J. LEHMANN UND K. WALLENFELS, *Carbohyd. Res.*, 1 (1966) 419.
- 8 J. LEHMANN UND H. REINSHAGEN, *Ann.*, 732 (1970) 112.
- 9 A. I. VOGEL, *Practical Organic Chemistry*, Longman Green, London, 3rd ed., 1956, p. 894.
- 10 G. LEGLER, *Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 767.
- 11 K. WALLENFELS UND O. P. MALHOTRA, *Advan. Carbohyd. Chem.*, 16 (1961) 239.
- 12 K. NISIZAWA UND Y. HASHIMOTO, in W. PIGMAN UND D. HORTON (Hrsg.), *The Carbohydrates*, Vol. IIA, Academic Press, New York, 2nd ed., 1970, p. 272.
- 13 W. ROTH UND W. PIGMAN, *Methods Carbohyd. Chem.*, 2 (1963) 405; F. SHAFIZADEH, *Methods Carbohyd. Chem.*, 2 (1963) 409.
- 14 F. SHAFIZADEH, *Methods Carbohyd. Chem.*, 1 (1962) 190.
- 15 J. LEDERBERG, *J. Bacteriol.*, 60 (1950) 381.