

RUDOLF WEIDENHAGEN und GERHARD BERNSEE

Über ein bakterielles Dehydrierungsprodukt der Fructose (6-*aldo*-D-Fructose)¹⁾

Aus dem Zentrallaboratorium der Süddeutschen Zucker-Aktiengesellschaft,
Neuoffstein (Pfalz)

(Eingegangen am 11. August 1960)

Herrn Professor Dr. Richard Kuhn zum 60. Geburtstage

Aus einer wild infizierten Saccharoselösung wurde ein *Acetobacter*-Stamm isoliert, der bei Bebrütung in fructosehaltiger Lösung 6-*aldo*-D-Fructose bildet, die in schön kristallisierter Form isoliert werden konnte. Einige Reaktionen und Derivate des neuen Dicarbonylzuckers werden beschrieben.

Dicarbonylzucker wurden in der Natur offenbar bisher nicht gefunden²⁾. Dagegen ist eine Reihe von Verbindungen dieser Klasse auf synthetischem Wege dargestellt worden. Nur zwei Vertreter sind nach unseren Literaturkenntnissen kristallisiert erhalten worden. B. HELFERICH und E. HIMMEN³⁾ haben über die kristallisierte 5-Keto-D-isorhamnose berichtet. Der Zucker ist eine Methyl-ketoaldopentose und entsteht durch Verseifung des β -Methyl-D-glucoseenids mit Säuren. Ferner haben F. G. FISCHER und H. SCHMIDT⁴⁾ kürzlich die kristallisierte D-glucos-Hexo-dialdose durch Reduktion von D-Glucuron gewonnen. Als dritten Vertreter kann man das von F. MICHEEL⁵⁾ aus Mannit über mehrere Zwischenstufen in kristallisierter Form erhaltene 3,4-Dihydroxy-2,5-diketo-hexan ansehen, das man auch als Dimethyldiketose auffassen kann.

Wir haben nun den ersten Dicarbonylzucker aus natürlichem Material isoliert. Im Rahmen unserer Untersuchungen über den bakteriellen Saccharose-Stoffwechsel stießen wir auf einen *Acetobacter suboxydans*-Stamm, der den Fructoseteil dieses Disaccharids durch Dehydrierung in 6-Stellung in die 6-*aldo*-D-Fructose überführte, die in schön kristallisierter Form aus der bebrüteten Lösung isoliert werden konnte. Der Glucoseteil der Saccharose wird dabei nahezu quantitativ durch den gleichen Organismus in D-Gluconsäure verwandelt. Der Einfachheit halber haben wir daher später D-Fructose direkt in 10-proz. Lösung mit unserem Bakterium bebrütet und konnten Ausbeuten von 20% und mehr erzielen.

Das die dehydrierende Wirkung verursachende Bakterium ist ein Kurzstäbchen, das einzeln, zu zweit oder in Ketten angeordnet auftritt. Es konnte auf Grund der Arbeiten von S. WINDISCH⁶⁾ zur Systematik der Essigbakterien der Gruppe *Acetobacter suboxydans* zugeordnet werden. Der Stamm zeigt eine positive Katalasereaktion, eine Ketonbildung im Oxydogramm neben Gluconsäurebildung aus Glucose. Negativ hingegen waren die Oxydation von Essigsäure zu Kohlendioxyd und Wasser, ebenso die Oxydation von Calciumlactat und die Bildung von Calciumcarbonat.

¹⁾ Vgl. die Kurzmitteilung v. 7. 2. 1960 in Angew. Chem. **72**, 109 [1960].

²⁾ F. MICHEEL, Chemie der Zucker und Polysaccharide, S. 162, Akad. Verlagsges. Leipzig 1956.

³⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **62**, 2136 [1929]. ⁴⁾ Chem. Ber. **93**, 658 [1960].

⁵⁾ Liebigs Ann. Chem. **496**, 94 [1932]. ⁶⁾ Branntweinwirtschaft **76**, 18 [1954].

Die weitere systematische Differenzierung nach dem Bestimmungsschlüssel für Essigbakterien von J. FRATEUR⁷⁾ ließ nun die Einordnung unter *Acetobacter* var. *muciparum* zu (Agarstrich: breit, viskos, durchsichtig, leicht zerfließend; und auf Frateur-Agar in alternden Kulturen Bildung großer Mengen braunen Farbstoffes, Fructosezersetzungsprodukte *).

Die Entdeckung der Substanz geschah über den Fleck, den diese bei der papierchromatographischen Kontrolle der bebrüteten Zuckerlösungen zeigte. Bei Anwendung von Propanol/Essigester/Wasser (7:1:2) als Fließmittel und nach Entwicklung mit Benzidin als Sprühmittel erschien in Höhe zwischen Saccharose und Glucose ein Fleck mit dem R_F -Wert 0.24 (absteigend, Schleicher & Schüll 2043a; gegenüber 0.20 für Saccharose), der bei Betrachtung im UV-Licht in der Farbe deutlich von dem etwa in gleicher Höhe liegenden Galaktosefleck verschieden war. Die erste Isolierung des Dicarboxylzuckers erfolgte in sehr geringer Menge durch Extraktion aus Papierchromatogrammen durch die Methode des „Querschneidens“⁸⁾, später in etwas größeren Mengen durch Abtrennung der gesuchten Substanz über eine Cellulosepulversäule unter Benutzung eines elektronischen Fraktionssammlers. Auf diesem Wege konnten etwa 2 mg kristallisierte Substanz erhalten werden. Nunmehr wurde versucht, den Dicarboxylzucker auf präparativem Wege unmittelbar aus der bebrüteten Fructoselösung zu gewinnen, was mit Hilfe der vorhandenen Impfkristalle verhältnismäßig schnell gelang, so daß die 6-*aldo*-D-Fructose nunmehr als leicht zugänglich bezeichnet werden darf.

Die aus Alkohol umkristallisierte Substanz zeigt einen Schmp. von 157–158°, und eine spezif. Drehung in Wasser von $[\alpha]_D^{20}$: -86.8° ($c = 1$). Die Drehung ist von der der Fructose wenig verschieden, was damit zusammenhängt, daß alle Asymmetriezentren und die Konfigurationen an diesen bei der Dehydrierung der Fructose erhalten geblieben sind. Mutarotation wurde nicht beobachtet. Das erste inzwischen aufgenommene Infrarotspektrum deutet auf das Vorhandensein eines Pyran- und eines Furanringes hin, doch müssen für die endgültige Konstitutionsaussage weitere Messungen abgewartet werden.

Wie die bekannten Dicarboxylzucker zeigt auch der neue Vertreter Kaltreduktion von alkalischer Kupferlösung. Nach $\frac{1}{2}$ stdg. Stehenlassen bei 24° ist bereits eine Reduktion von BERTRANDScher Lösung von 60% des Glucosewertes vorhanden. Bei Heißreduktion steigt der Wert allerdings nur auf 95% des Traubenzuckersolls, was wohl wieder darauf hindeutet, daß die neue Carbonylgruppe gar nicht unmittelbar an der Reduktionswirkung beteiligt ist, aber den Zerfall in die reduzierenden C₃-Körper beschleunigt. Die Substanz ist mit Bier- oder Bäckerhefe nicht vergärbbar.

Die Titration der Aldehydgruppe mit alkalischer Jodlösung nach F. AUERBACH und E. BODLÄNDER⁹⁾ ergab nach 2 stdg. Stehenlassen einen Wert von ca. 90% d. Th., so daß trotz der schwachen Alkalität der Lösung wohl bereits eine gewisse Molekülsplaltung eintritt.

* Für die wertvollen Ratschläge bei der Reinzucht und Identifizierung des Stammes sind wir Fräulein Dr. S. LORENZ in unserem Laboratorium zu großem Dank verpflichtet.

⁷⁾ La Cellule, S. 371, Verlag C. Uystpruyst, Louvain 1950.

⁸⁾ F. CRAMER, Papierchromatographie, 2. Aufl., S. 42, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1953.

⁹⁾ A. BEYTHIEN, vgl. Laboratoriumsbuch f. d. Lebensmittelchemiker, S. 353, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig 1951.

Mit essigsaurem Phenylhydrazin entsteht schon in der Kälte nach kurzem Aufbewahren das in Wasser sehr schwer lösliche, schwach gelbgrüne Bisphenylhydrazon.

Partielle katalytische Reduktion liefert unter Aufnahme von 2 H-Atomen Fructose zurück, die in Kristallen isoliert und papierchromatographisch identifiziert wurde. Die Konstitution des neuen Zuckers als 6-*aldo*-D-Fructose ist damit sichergestellt.

Auffallend ist die starke Verfärbung von Lösungen der Ketoaldose bei Gegenwart von N-haltigen Substanzen, insbesondere Aminosäuren und Peptiden (MAILLARD-Reaktion)¹⁰⁾, die teilweise bereits in der Kälte eintritt. Welche Rolle die neue Verbindung beim physiologischen Zuckerabbau spielt, wird untersucht.

Hinsichtlich der Nomenklatur für Ketoaldosen ist auf den Vorschlag von HELFERICH und HIMMEN¹¹⁾ zu verweisen, wonach solche Zucker zweckmäßig als -onosen zu bezeichnen sind. Setzt man im vorliegenden Falle zuckerchemischem Brauch entsprechend die Aldehydgruppe an die 1-Stelle, so ist der neue Zucker demnach als 5-D-Mannonose oder 5-D-Gulonose zu benennen, da infolge Aufhebung der Asymmetrie in 5-Stellung (frühere Ketogruppe der Fructose) die Zugehörigkeit zur D- oder L-Reihe nicht eindeutig ist. Wir ziehen daher für solche Fälle, wo eine Drehung des Moleküls zur Kennzeichnung der Aldose erfolgen muß, die Beibehaltung des ursprünglichen Ketozuckers im Namen, hier 6-*aldo*-D-Fructose, vor, womit auch die Herkunft der zweiten Carbonylgruppe eindeutig gekennzeichnet ist.

Da bei der aufgefundenen mikrobiellen Reaktion neben der isolierten Substanz noch mehrere Ketohexonsäuren entstehen, ist der gefäße Dicarbonsäure wohl eine Zwischenstufe auf dem Wege zu solchen Ketosäuren. Anscheinend findet die dehydrierende Wirkung des Bakteriums sowohl an der 1- als auch an der 6-Stellung der Fructose statt. Wie weit die Reaktion einen statistischen Verlauf nimmt, oder die primäre Hydroxylgruppe in 6-Stellung vorgezogen wird, läßt sich noch nicht mit Sicherheit beweisen. Auch über das wirksame Enzym sind Aussagen verfrüht. Die Dehydrase ist außerordentlich donatorspezifisch, da von allen untersuchten Zuckern bisher nur D-Fructose als angreifbares Substrat gefunden wurde, so daß mit dem Namen D-Fructose-Dehydrase die Wirksamkeit des Enzyms zunächst genügend umrissen ist. Die nähere Definition im Sinne von O. HOFFMANN-OSTENHOF¹²⁾ muß bis zur Klärung der Acceptorspezifität zurückgestellt werden.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Herstellung des Dicarbonsäures: Der *Acetobacter*-Stamm wurde in Petrischalen bei 20–25° auf Hefeagar folgender Zusammensetzung vorgezüchtet: 1 l Wasser, 3 g Liebig's Fleischextrakt, 10 g Pepton, 5 g Kochsalz, 20 g Saccharose, 5 g Hefeextrakt, 15 g Agar, der nach Filtration und Sterilisation einen *pH*-Wert von 6.8–7.0 haben muß. Nach ca. 5 Tagen wurde die Bakterienkultur von 12 Platten abgekratzt und in 500 ccm 10-proz. sterile Fructose-Lösung übergeführt. Nach 3–4 tägiger Bebrütung bei 20–25° waren in Papierchromatogrammen die ersten schwachen Flecke des Dicarbonsäures zu sehen. Nach ca. vier Wo-

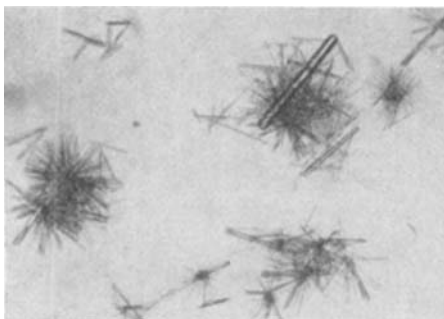
¹⁰⁾ G. P. ELLIS in *Advances Carbohydrate Chem.*, Vol. XIII, S. 63 ff., Academic Press Inc. Publ., New York und London 1959.

¹¹⁾ Siehe l. c. ³⁾, und zwar S. 2137; vgl. auch F. MICHEEL und K. HORN, *Liebigs Ann. Chem.* 515, 2 [1934].

¹²⁾ O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Enzymologie*, S. 104, Springer-Verlag, Wien 1954.

chen hatte die Stärke der Flecke unter Absinken des p_H -Wertes auf ca. 3.5 ein Maximum erreicht. Die Inkubation wurde unterbrochen, die Lösung über Kieselgur filtriert und unter Zusatz von Calciumcarbonat auf p_H ca. 6.0 gebracht. Vom CaCO_3 -Überschuß wurde wieder filtriert und nach Zusatz von 5 g Bäckerhefe die überschüssige Fructose weggegoren, was ca. 24 Stdn. in Anspruch nahm (papierchromatographische Kontrolle). Nach abermaliger Filtration wurde i. Vak. zum Sirup eingeeengt. Bei Aufnahme in Methanol fielen neben Bakterien-eiweiß hauptsächlich die Calciumsalze der Ketosäuren aus, von denen abgetrennt wurde. Es wurde wieder eingeeengt und der Sirup abermals mit Methanol versetzt. Bei etwaigem weiteren Ausfallen von Calciumsalzen wurde nochmals filtriert und abermals i. Vak. eingeeengt. Der Sirup wurde nach Anreiben mit Methanol angeimpft und der Kristallisation überlassen. Nach mehreren Tagen können bis 30%, bez. auf die eingesetzte Fructose, kristallisierte 6-*aldo*-D-Fructose gewonnen werden. In dieser Weise wurden im Zeitraum von 10 Monaten 60 Ansätze von jeweils 500 ccm 10-proz. Fructoselösung aufgearbeitet. Zur Umkristallisation des Rohproduktes wurde dieses in der gleichen Wassermenge in der Hitze gelöst und sofort mit der 4–5fachen Menge absol. Äthanol versetzt, mit Kohle entfärbt und schnell filtriert. Der Dicarbonsäurekristallisierte dann beim Stehenlassen meist ohne Animpfung beim Erkalten in schönen, zu Büscheln angeordneten prismatischen Nadeln aus (s. Abbild.). Die Ausbeute bei der Umkristallisation beträgt infolge ungünstiger Löslichkeitsverhältnisse nur 35–40%. Schmp. 157–158°. $[\alpha]_D^{20}$: -86.8° ($c = 1$, in Wasser).

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$ (178.2) Ber. C 40.45 H 5.65 Gef. C 40.43 H 5.65



Kristalle von
6-*aldo*-D-Fructose

Bisphenylhydrazon: Die Lösung von 0.5 g 6-*aldo*-D-Fructose in wenig Wasser wurde in der Kälte mit einer wäßrigen Lösung von 1 g Phenylhydrazin-hydrochlorid und 1.5 g Natriumacetat versetzt. Nach kurzem Stehenlassen begann die Abscheidung von 0.7 g (70% d. Th.) kristallisierten Bisphenylhydrazons. Nach Umkristallisation aus 50-proz. Äthanol erhielt man schwach gelbgrüne prismatische Kristalle vom Schmp. 123–124°. $[\alpha]_D^{20}$: -138.5° ($c = 0.25$, in Pyridin).

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$ (358.4) Ber. C 60.10 H 6.40 N 15.63 Gef. C 60.39 H 6.24 N 15.91

Bis-*p*-nitrophenylhydrazon: Eine wäßrige Lösung von 0.65 g Dicarbonsäurekristall wurde mit einer heißen Lösung von 1 g *p*-Nitrophenylhydrazin in 5 ccm Essigsäure versetzt. Man erhielt 1.5 g (nahezu theoret. Ausb.) intensiv rotes Bis-*p*-nitrophenylhydrazon, das sich aus 50-proz. Alkohol mit schlechter Ausbeute umkristallisieren ließ. Schmp. 173–174°.

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_8$ (448.4) Ber. N 18.75 Gef. N 18.83

Die Titration nach Willstätter und Schudel in der Modifikation nach Auerbach und Bodländer ergab nach 2stdg. Stehenlassen 95.3% des für eine Aldehydgruppe berechneten Wertes.

Die katalytische Hydrierung erfolgte in einer Mikroapparatur nach C. WEYGAND¹³⁾, die durch eine Vorrichtung zur Konstanthaltung der Temperatur des Reaktionsgefäßes vervollständigt wurde. Als Katalysator diente Platinoxid nach R. ADAMS.

Einwaage: 20.0 mg 6-*aldo*-D-Fructose. Wasserstoffverbrauch (20°, 760 Torr): 2.36 ccm (Halbhydrierung zu Fructose, theoret. 2.73 ccm), 4.68 ccm (Vollhydrierung zu Mannit und Sorbit, theoret. 5.47 ccm).

Die bei der Halbhydrierung entstandene Fructose wurde kristallin abgeschieden und papierchromatographisch identifiziert (*Benzidin* als Sprühreagenz). Von den Hexiten kristallisierte Mannit; Sorbit verblieb in der Mutterlauge. Beide wurden wieder papierchromatographisch identifiziert (*Vanillin* als Sprühreagenz).

Bei der Ausführung der Untersuchungen wurden wir von Fräulein G. KLEIN aufs beste unterstützt.

¹³⁾ C. WEYGAND, Organ.-Chem. Experimentierkunst, 2. Aufl., S. 695, Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig 1948; vgl. auch PREGL-ROTH, Quantitat. organ. Mikroanalyse, S. 211, Springer-Verlag, Wien 1958.

ERICH HECKER und ELISABETH WALK

Zur Chemie der *p*-Chinole, III¹⁾

o-Chinon-diacetate und weitere Aminoanaloge der natürlichen Östrogene

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Eingegangen am 12. September 1960)

Herrn Prof. Dr. R. Kuhn zum 60. Geburtstag gewidmet

Neben den Steroid-*p*-chinol-acetaten werden bei Oxydation von Östron und Östradiol-(17 β)-monoacetat mit Bleitetraacetat in Eisessig die entsprechenden *o*-Chinon-diacetate erhalten. Die Darstellung von 3,17 β -Diamino- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -östratrien und von 3-Amino- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -östratrienon-(17), ausgehend von 17-Oxo-östra-*p*-chinol-(10 ξ), sowie von 3-Hydroxy-17 β -amino- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -östratrien aus Östron-2,4-dinitrophenyl-hydrazon wird beschrieben. Die 17-Aminogruppe ist β -orientiert. Damit sind sämtliche Aminoanalogen der natürlichen Östrogene bekannt.

Aminoanaloge der natürlichen Östrogene waren lange Zeit unbekannt, obwohl sie von hohem biochemischem Interesse sind. Ihre Darstellung ist vor allem daran gescheitert, daß es bis vor kurzem kein Verfahren gab, das den Austausch einer phenolischen Hydroxyl- gegen eine Aminogruppe am Benzolring gestattet¹⁾. Präparative Möglichkeiten dazu wies erstmals die Chemie der *p*-Chinole^{2,3)}, so daß die Darstellung der 3-Aminoanalogen des Östradiols und des Östrons auf verschiedenen Wegen^{1,4)}

¹⁾ II. Mitteil.: E. HECKER, Chem. Ber. **92**, 3198 [1959].

²⁾ E. HECKER und G. C. MUELLER, J. biol. Chemistry **233**, 991 [1958].

³⁾ E. HECKER, Chem. Ber. **92**, 1386 [1959].

⁴⁾ A. M. GOLD und E. SCHWENK, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2198 [1959].