

32. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd. V. Über das Verhalten der ϵ -Aminogruppen des Lysins und der Peptidgruppen

von Hs. Nitschmann und H. Hadorn.

(20. I. 44.)

Einleitung.

In der IV. Arbeit dieser Publikationsreihe¹⁾ wurde der Einfluss der Formaldehydgerbung auf das Quellungsvermögen des Caseins näher untersucht. Es wurde dort bereits darauf hingewiesen, dass die Verminderung des Quellungsvermögens in Wasser und die Unlöslichkeit gegerbten Caseins in Caseinlösungsmitteln, wie verdünnter Natronlauge, starker Harnstoff- oder Calciumrhodanidlösung usw. durch die Theorie der Brückenbildung erklärt werden kann. In der Tat ist die Bildung von $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ -Brücken bei der Formaldehydgerbung der Proteine bereits von verschiedenen Forschern angenommen und diskutiert, jedoch nie experimentell bewiesen worden.

Eine fast lückenlose Zusammenstellung der diesbezüglichen Arbeiten hat neuestens *Gustavson*²⁾ in seiner Publikation „Die Natur der Formaldehyd-Verbindungen der Eiweisskörper“ gegeben. Wir können uns deshalb damit begnügen, nur noch auf jene Arbeiten einzugehen, die zu unseren eigenen Untersuchungen in einer näheren Beziehung stehen. Der erste Autor, der die Bildung von Methylenbrücken bei der Formaldehydgerbung annahm, war *K. H. Meyer*³⁾. *Küntzel*⁴⁾ hat den Gedanken dahin präzisiert, dass Peptidgruppen sich berührender Eiweissmolekeln durch $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ -Brücken verknüpft werden sollen. Den experimentellen Beweis hierfür hat er nicht erbracht. *Highberger* und *O'Flaherty*⁵⁾ sowie *Holland*⁶⁾ wiederum erachten nach ihren quantitativen Versuchen die *Küntzel*'sche Brückentheorie als unwahrscheinlich. Die erste Arbeit, in der der experimentelle Nachweis der Methylenbrücken erbracht werden sollte, stammt von *Dyachenko* und *Shelpakowa*⁷⁾. Da von diesen Autoren die Formaldehydgerbung gerade am Casein untersucht wurde, soll gezeigt werden, dass der Beweis in Wirklichkeit nicht erbracht worden ist. Gegerbt wurde ausschliesslich in wässriger 3-proz. Formaldehydlösung. Die Gerbdauer betrug immer 5 Tage. Variiert wurde das p_H der Gerblösung. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass bei höherem p_H mehr Formaldehyd gebunden wird, was sich vollständig mit den Angaben einer Reihe anderer Forscher deckt. Den Schluss, dass bei neutraler oder schwach saurer Reaktion der Gerblösung zwischen je zwei primären Aminogruppen eine Methylenbrücke gebildet wird, ziehen die genannten Autoren aus folgenden zwei Experimenten:

1. wurde der vom Casein gebundene Formaldehyd analytisch bestimmt;
2. wurde das OH'-Bindungsvermögen von unbehandeltem und von gegerbtem Casein bestimmt.

¹⁾ Helv. **26**, 1084 (1943).

³⁾ Bioch. Z. **208**, 23 (1929).

²⁾ Koll. Z. **103**, 43 (1943).

⁴⁾ Angew. Chem. **50**, 308 (1937).

⁵⁾ J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 549 (1939).

⁶⁾ J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 215 (1939).

⁷⁾ J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 12 (1939).

Auf 2 Aminogruppen soll ein Mol CH_2O gebunden werden. Zudem soll der Verlust an OH' -Bindungsvermögen bei der Gerbung gerade der Anzahl der Aminogruppen äquivalent sein, woraus geschlossen wird, dass diese alle zur Gruppierung $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ umgesetzt werden. Das OH' -Bindungsvermögen des rohen Caseins wurde durch Titration mit Natronlauge und Phenolphthalein bis zur Rotfärbung (p_{H} ca. 10) bestimmt. Das gerbte Casein dagegen wurde mit einem Überschuss an 0,1-n. Natronlauge ($p_{\text{H}} = 13$) behandelt; dieser wurde nach dem Filtrieren zurücktitriert. Im zweiten Falle bestimmt man das maximale OH' -Bindungsvermögen, im letzten Falle aber nicht¹⁾. Die beiden Werte dürfen deshalb nicht miteinander verglichen werden. Überhaupt kann man auf diesem Wege nicht zum Ziel gelangen, da ja die Aminogruppen durch die Methylenbrückenbildung ihren basischen Charakter keineswegs vollständig verlieren.

Ferner muss festgestellt werden, dass die Analysenmethode, nach welcher *Dyachenko* und *Shelpakowa* den gebundenen Formaldehyd bestimmten, zu niedrige Werte liefert. Durch blosses Destillieren mit Wasser ohne Säurezusatz gelingt es nie, den Formaldehyd quantitativ abzuspalten²⁾. Eine Formaldehydbestimmung, die wir genau nach den Angaben der genannten Autoren ausführten, ergab nur 83% des wirklich gebundenen Formaldehyds. Sämtliche Analysenwerte sind daher um rund 20% zu niedrig.

Schliesslich sind die Bedingungen, unter welchen die Verfasser gerben, willkürlich gewählt. Man braucht nur die Konzentration der Gerblösung oder die Gerbzeit zu verändern, um völlig andere Werte für den gebundenen Formaldehyd zu erhalten³⁾. Das stöchiometrische Verhältnis zwischen gebundenem Formaldehyd und Aminogruppen im Casein ist hier also rein zufällig wie 1 : 2.

Sehr gründlich hat sich *Gustavson*⁴⁾ mit der Formaldehydgerbung des Kollagens beschäftigt. Seine Versuche führen ihn zu einer Deutung der Gerbwirkung des Formaldehydes, die sich recht weitgehend mit unseren eigenen deckt. *Gustavson* fand, dass beim p_{H} 7—8 aus 1—2-proz. Formaldehydlösung leicht 0,40 bis 0,45 Mol CH_2O pro g Kollagen aufgenommen werden. Das entspricht ziemlich genau dem Lysingehalt. Bei höherem p_{H} binden auch die Argininreste noch Formaldehyd. Bei höher konzentrierten Formaldehydlösungen nehmen sogar noch die Peptidgruppen Formaldehyd auf. Die eigentliche Gerbwirkung des Formaldehyds (Erhöhung der Schrumpfungstemperatur, Resistenz gegen Trypsin, Verminderung des Schwellungsgrades) ist strikte an die Anwesenheit der ϵ -Aminogruppen des Lysins gebunden. Entfernt man diese mit salpetriger Säure, so kann das desaminierte Kollagen wohl noch Formaldehyd aufnehmen, eine Gerbung wird dadurch aber nicht mehr bewirkt. Für *Gustavson* besteht die Gerbung in einer Netzbildung zwischen den Proteinmolekeln, und er schreibt auf S. 47 seiner letzten Arbeit (loc. cit.): „Die Vernetzung der Kollagenketten muss demnach an den ϵ -Aminogruppen der Lysinreste lokalisiert werden, wahrscheinlich durch Querbindungen benachbarter Aminogruppen naheliegender Ketten.“ *Gustavson* hat nur mit Kollagen gearbeitet. Man ist aber von vornherein geneigt, anzunehmen, dass der Gerbprozess bei anderen Proteinen analog verläuft. Wir waren deshalb überrascht, als wir lasen⁵⁾, dass *E. Waldschmidt-Leitz* in einem Vortrag für die Formaldehydhärtung des Caseins eine ganz gegenteilige Ansicht vertreten hat. Er glaubt, durch fermentativen Abbau von gehärteten Caseinfasern und adsorptive Trennung der Spaltprodukte bewiesen zu haben, dass die freien Aminogruppen der Diaminocarbonsäuren bei der kalten Gerbung (30°) überhaupt keinen Formaldehyd binden, oder diesen schon beim Waschen mit kaltem Wasser sehr leicht wieder abspalten. Als Bindungsstelle für Methylenbrücken komme einzig die Peptidgruppe in Frage. Nur für die Gerbung bei 70° räumt der genannte Autor die Möglichkeit einer stabilen Bindung an den freien Aminogruppen ein.

¹⁾ Die beiden Autoren haben übrigens selbst durch potentiometrische Titration für rohes Casein festgestellt, dass die OH' -Bindung erst bei p_{H} 11,28 beendet ist.

²⁾ Vgl. I, *Nitschmann* und *Hadorn*, *Helv.* **24**, 237 (1941).

³⁾ Vgl. III, *Nitschmann* und *Hadorn*, *Helv.* **26**, 1075 (1943).

⁴⁾ *Svensk kem. Tid.* **52**, 261 (1940); *Koll. Z.* **103**, 43 (1943).

⁵⁾ Zellwolle, Kunstseide, Seide **46**, 444 (1941); Referat.

Angesichts dieser sich widersprechenden Ansichten sollte für das Casein die Frage abgeklärt werden, welche Gruppen im Protein mit dem Formaldehyd reagieren. Im folgenden bringen wir einen ersten Beitrag zu diesem Fragenkomplex. Insbesondere soll hier versucht werden, die Annahme der Methylenbrückenbildung, zu der wir beim Studium der Quellung gegerbter Caseine sozusagen gezwungen wurden, experimentell zu stützen.

I. Die Formaldehydbindung durch die freien Lysinaminogruppen.

Dieselbe lässt sich durch den quantitativen Vergleich der Formaldehydaufnahme von gewöhnlichem und von desaminiertem Casein ermitteln. Wir bereiteten uns Desaminocasein ungefähr nach *Dunn* und *Lewis*¹⁾ wie folgt:

50 g Casein²⁾ wurden in einem Stutzen in 1 Liter Wasser suspendiert. Unter kräftiger Rührung wurde langsam 70 cm³ Eisessig zugetropft. Das Casein löste sich dabei zu einer trüben, viskosen Lösung. Nun wurde 250 cm³ 8-proz. Natriumnitritlösung zuge-
tropft. Unter Gasentwicklung fiel das Casein langsam wieder aus. Das Produkt war intensiv zitronengelb gefärbt, was auf eine weitergehende Einwirkung der salpetrigen Säure deutet (Nitrosierung). Das Reaktionsgemisch wurde nun 3 Tage lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde durch ein Glasfilter filtriert und zunächst mit kaltem, dann mit heissem Wasser gewaschen. Dabei wurde Gasentwicklung beobachtet und das Präparat färbte sich bräunlich. Zum Schluss wurde mit Alkohol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das getrocknete Desaminocasein hatte eine gelbbraune Farbe.

Die Menge der bei der Desaminierung in OH-Gruppen übergeführten Aminogruppen wurde aus der Verminderung des Säurebindungsvermögens³⁾ und des nach *van Slyke* bestimmbaren Amino-
stickstoffes³⁾ berechnet. Die Werte sind in guter Übereinstimmung (Tab. 1). Sie entsprechen zudem ungefähr dem Wert, den *van Slyke*⁴⁾ für den Lysingehalt des Caseins gefunden hat (7,72 % entspr. 60 Mil-
limol/g). Natives und desaminiertes Casein wurden nun unter genau gleichen Bedingungen gegerbt, ausgewaschen und getrocknet und die Differenz des Formaldehydgehaltes dieser Präparate bestimmt⁵⁾.

Wir fanden, dass für jede zerstörte Lysinaminogruppe annähernd, aber nicht ganz eine Molekel Formaldehyd weniger gebunden wird, wenn man 24 Stunden bei Zimmertemperatur mit 10-proz. Formaldehydlösung gerbt⁶⁾. Da unter solchen Bedingungen — wie gleich noch gezeigt wird — im nativen Casein ein kleinerer Teil der Aminogruppen unumgesetzt bleibt, kommt man zum Schluss, dass Formaldehyd und Aminogruppen im Verhältnis 1:1 miteinander

¹⁾ J. Biol. Chem. **49**, 327 (1921).

²⁾ Betr. dessen Herstellung siehe III, loc. cit.

³⁾ Betr. Ausführung dieser Bestimmungen vgl. den Anhang, S. 310.

⁴⁾ J. Biol. Chem. **16**, 531 (1914).

⁵⁾ Analysenmethode siehe II, *Nitschmann* und *Hadorn*, Helv. **26**, 1069 (1943).

⁶⁾ Diese Behandlung genügt zur Erreichung des maximalen Gerbeffektes in Bezug auf die Quellung; vgl. IV, loc. cit.

reagieren. Dieses Ergebnis wird durch die Tatsache nicht widerlegt, dass bei sehr langdauernder Gerbung (30 Tage, 10-proz. Lösung) Casein und Desaminocasein fast gleich viel Formaldehyd binden. Die OH-Gruppen im letzteren binden mit der Zeit ebenfalls Formaldehyd, so dass die Differenz immer kleiner wird.

Tabelle 1.

Messung	Casein (I)	Desamino- casein (II)	Differenz (I—II)
Säurebindungsvermögen in Millimol/g	0,763	0,263	0,500
van Slyke-Stickstoff —NH ₂ in Millimol/g	0,597	0,102	0,495
CH ₂ O gebunden in %	2,18	0,96	1,22
CH ₂ O gebunden in Millimol/g . .	0,726	0,32	0,406
(Gerbung 48 Std. mit 10-proz. CH ₂ O, 24 Std. gewaschen)			
CH ₂ O gebunden in %	3,42	3,10	0,32
CH ₂ O gebunden in Millimol/g . .	1,14	1,033	0,166
(Gerbung 30 Tage mit 10-proz. CH ₂ O, 24 Std. gewaschen) ¹⁾			

Beim Kollagen kommen auf Grund analoger Versuche *Bowes* und *Pleass*²⁾ sowie *Highberger* und *O'Flaherty*³⁾ zum selben Schluss wie wir, nämlich dass das Bindungsverhältnis von Lysinaminogruppen zu Formaldehyd 1 : 1 beträgt.

Der Nachweis der Formaldehydbindung durch die Lysinaminogruppen ist zunächst indirekt erbracht worden. Es sollte nun noch versucht werden, im gegerbten Casein die Zahl der umgesetzten Aminogruppen auch direkt zu bestimmen.

Aus der Veränderung des H⁺-Bindungsvermögens bei der Gerbung lässt sich dieser Wert ebensowenig ermitteln wie aus der Veränderung des OH⁻-Bindungsvermögens⁴⁾. Durch die Bindung von Formaldehyd in dieser oder jener Weise verlieren die Aminogruppen ihren Basencharakter nicht vollständig. Deshalb ist es ganz erwartungsgemäss, wenn die gegerbten Caseine bei einem Säurezusatz, der bei gewöhnlichem Casein die maximale H⁺-Bindung bewirkt, etwas weniger Wasserstoffionen binden als das letztere, wobei die Differenz aber lange nicht der Anzahl umgesetzter Aminogruppen äquivalent ist.

¹⁾ Bei erschöpfendem Auswaschen (vgl. III, loc. cit.) bleibt die Differenz fast gleich.

²⁾ J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 453 (1939).

³⁾ J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 549 (1939).

⁴⁾ Vgl. Einleitung.

Aufschlussreicher ist die Bestimmung des *van Slyke*-Stickstoffes in den gegerbten Caseinen. Mit salpetriger Säure reagiert bekanntlich nur die primäre ε -Aminogruppe der Lysinreste unter Stickstoffentwicklung. Im gegerbten Protein ist diese Gruppe zum Teil durch Formaldehyd blockiert und nach der Methode von *van Slyke* nicht mehr erfassbar. Aus der Differenz der Werte von unbehandeltem Casein und gegerbtem Casein lässt sich die Menge der mit Formaldehyd umgesetzten Aminogruppen bestimmen.

In Tabelle 2 sind diese Werte für einige verschieden gegerbte Caseine zusammengestellt.

Tabelle 2.

Präparat-Nr.	Gerbung	Gesamt-CH ₂ O in %	<i>Van Slyke</i> -N in Millimol/g	Blockierte NH ₂ -Gruppen in Millimol/g
Casein	keine	0	0,597	0
38 I	1 Tag 38-proz. CH ₂ O-Lösung, kalt, „normal“ gewaschen ¹⁾	1,91	0,186	0,411
10 III	28 Tage 10-proz. CH ₂ O-Lösung, kalt, „normal“ gewaschen	2,33	0,209	0,388
10 I 70°	1 Tag 10-proz. CH ₂ O-Lösung, bei 70°, „normal“ gewaschen	5,21	0,083	0,514
G 50 AW	50 Tage Gasgerbung, „erschöpfend“ gewaschen	1,81	0,194	0,403
10/21943	2 Tage 10-proz. CH ₂ O-Lösung, kalt, 24 St. ausgewaschen	2,18	0,230	0,367

Man sieht, dass durch die Formaldehydgerbung tatsächlich der grösste Teil der nach *van Slyke* erfassbaren Aminogruppen blockiert wird. Die Umsetzung ist allerdings nicht quantitativ; ein beachtlicher Teil der NH₂-Gruppen, dessen Grösse etwas von den Gerbbedingungen abhängt, wird vom Formaldehyd nicht erfasst. Die Einbusse an freien Lysinaminogruppen beträgt bei der Gerbung in der Kälte ca. 0,4 Millimol/g, d. h. reichlich $\frac{2}{3}$ der total vorhandenen Menge. Das in Tab. 2 zuletzt aufgeführte Präparat ist dasselbe wie dasjenige in Tab. 1 (3. Horizontalreihe von oben, I). Wenn auch der erwartete Wert von 0,4 hier nicht ganz erreicht wird, so ist die Übereinstimmung doch immerhin so gut, dass man sie als Bestätigung für unsern Schluss ansehen darf, dass im grossen gesehen auf jede umgesetzte Aminogruppe eine Molekel Formaldehyd kommt.

¹⁾ Über das Auswaschen vgl. III, loc. cit.

II. Zur Frage der Methylenbrücken. Nachweis einer Kondensation bei der Formaldehydbindung.

Für die Bindung des Formaldehyds durch die Lysinaminogruppen kommt entweder Anlagerung oder Kondensation in Frage. Im ersteren Falle würde eine Methylolverbindung $R-NH-CH_2OH$ gebildet. Bei Kondensation bleibt die Möglichkeit, dass ein Azomethin $R-N=CH$ entsteht, oder dass eine Methylenbrücke zwischen einer Aminogruppe und einer anderen reaktiven Gruppe gebildet wird (z. B. $-NH-CH_2-N<$). Die so ausserordentlich einleuchtende Brückentheorie würde eine sehr starke experimentelle Stütze erhalten, wenn es gelänge, den Nachweis für die Kondensation zu erbringen, denn die Bildung der Azomethin-Gruppe ermöglicht keine Erklärung des Gerbeffektes¹⁾.

Der Nachweis, dass bei der Formaldehydgerbung des Caseins tatsächlich eine Kondensation von Wasser stattfindet, konnte recht einfach folgendermassen erbracht werden: An genau gewogenen Caseinproben wurde die durch die Gerbung bewirkte Gewichtszunahme ermittelt. Bei der Gerbung mit Formaldehydgas²⁾ ist das besonders leicht möglich. Im gegerbten Casein wurde ausserdem der gebundene Formaldehyd analytisch ermittelt. Wäre der gesamte Formaldehyd in Methylolform gebunden (Addition ohne Kondensation), so müssten die beiden Werte übereinstimmen. Bei einer Kondensation wird der Wert für die Gewichtszunahme um die kondensierte Wassermenge zu niedrig gefunden. Aus dieser Differenz lässt sich der als Methylen gebundene Formaldehydanteil berechnen.

Die Caseinproben (0,3 g) wurden zunächst in kleinen Wägegläsern über konz. Schwefelsäure vorgetrocknet und anschliessend im Hochvakuum (0,06 mm) neben Phosphor-pentoxyd bis zur Gewichtskonstanz weiter getrocknet. Die Gerbung erfolgte bei Zimmertemperatur in einem kleinen Exsikkator über 38-proz. Formaldehydlösung. Die Gerbezeit betrug 28 Tage. Die Wägegläser wurden offen in den Exsikkator gestellt. Durch gelegentliches vorsichtiges Drehen wurde das Casein durchgemischt, damit die Gerbung möglichst gleichmässig erfolge. Nach beendeter Gerbung wurden die Gläser 14 Tage offen an der Luft stehen gelassen, bis kein Formaldehydgeruch mehr wahrnehmbar war. Das Trocknen der Probe erfolgte in genau gleicher Weise wie vor der Gerbung, nachdem die bei der Gerbung erfolgte Gewichtszunahme festgestellt war, wurde die gesamte Probe quantitativ in einen Destillierkolben gespült und der gebundene Formaldehyd genau bestimmt. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Dieser Versuch beweist, dass tatsächlich ein beträchtlicher Teil des Formaldehyds (ca. 0,46 Millimol/g) unter Kondensation gebunden wurde. Die gefundenen Werte stimmen recht gut mit der durch die Lysinaminogruppen gebundenen Formaldehydmenge überein. Dieselbe beträgt nach den Versuchen der Tabelle 1 und 2 ca. 0,4 Milli-

¹⁾ Vgl. IV, loc. cit. Die Existenz von Azomethinen des Formaldehyds ist überhaupt fraglich. Jedenfalls sind die Formaldehydverbindungen der Aminosäuren sehr wahrscheinlich Methylolverbindungen. *Franzen und Fellmer* (J. pr. [2], **95**, 299 (1917)), die sie hergestellt und untersucht haben, bezeichnen sie zwar als Methylenverbindungen, geben aber an, dass alle mit Wasser krystallisieren und sehr hygroskopisch sind.

²⁾ Vgl. III, loc. cit.

mol/g. Erinnern wir uns noch daran, dass das Maximum des Gerb-effektes (Verminderung der Quellfähigkeit¹⁾) ebenfalls bereits mit 1,5 % CH_2O resp. 50 Millimol/g erreicht ist, so können wir feststellen, dass alles dafür spricht, dass es gerade die Lysinaminogruppen und nur diese sind, welche Formaldehyd unter Bildung von Methylenbrücken binden und somit die eigentliche Gerbung bewirken. Bei der Gerbung von Desaminocasein, das auch beträchtlich Formaldehyd zu binden vermag, müsste demnach keine Kondensation stattfinden. Diese Erwartung wurde bestätigt. Die Kondensation machte bei wie zuvor beschriebener Gasgerbung nur 0,07 Millimol/g (entsprechend 0,22 % CH_2O) aus. Dieser kleine Betrag dürfte auf die nicht vollständige Desaminierung unserer Präparate zurückzuführen sein; er liegt im übrigen fast innerhalb der Fehlergrenze.

Tabelle 3.

	Versuch I	Versuch II
Caseingewicht vor der Gerbung	0,3262 g	0,3307 g
Caseingewicht nach der Gerbung	0,3352 g	0,3395 g
Gewichtszunahme	0,0090 g	0,0088 g
Gew.-Zunahme in % (Gew. n. Gerbg. = 100) .	2,69 %	2,59 %
Die Analyse ergab: CH_2O in g	0,01186 g	0,01152 g
in Prozenten	3,54 %	3,39 %
CH_2O als Methylol gebunden	2,11 %	2,06 %
CH_2O als Methylen gebunden	1,43 %	1,33 %
CH_2O als Methylen geb. in Millimol/g	0,476	0,443

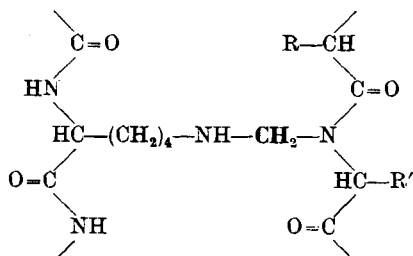
Die Gasgerbung ist für den Nachweis der Kondensation besonders geeignet, weil man das Casein nicht auszuwaschen braucht, Substanzverluste also ganz ausgeschlossen sind. Bei der Nassgerbung (10-proz. Formaldehydlösung, 24 Stunden, Zimmertemperatur) liess sich Kondensation ebenfalls nachweisen, jedoch streuten die Werte stärker und lagen zudem etwas tiefer (0,8—1,3 % CH_2O resp. 0,266 bis 0,433 Millimol/g als Methylen). Das ist nicht verwunderlich. Beim Auswaschen der gegerbten Präparate sind, auch wenn es nur kurz dauert, kleinere Caseinverluste unvermeidlich²⁾. Deshalb müssen die für den kondensierten Formaldehyd gefundenen Werte eher zu klein herauskommen. Immerhin stimmt wenigstens der höchste der gefundenen Werte mit der unter gleichen Gerbbedingungen durch die Lysinaminogruppen gebundenen Formaldehydmenge recht gut überein.

Für die an den Lysinaminogruppen ansetzenden Methylenbrücken stellt sich nun die Frage, zu welchen anderen Gruppen im Protein sie reichen. Da pro Lysinaminogruppe 1 Mol Formaldehyd

¹⁾ Vgl. IV, loc. cit.

²⁾ Das Waschwasser schäumt!

gebunden wird, kommt eine gegenseitige Verknüpfung der Aminogruppen durch $-\text{CH}_2-$ nicht in Frage, denn diese Reaktion würde nur ein halbes Mol Formaldehyd verbrauchen. Sie kann sich deshalb höchstens in untergeordnetem Masse abspielen. Da im Casein nur ca. jede 13. Aminosäure Lysin ist, wäre es zudem sehr unwahrscheinlich, dass sich alle diese weit verstreuten Aminogruppen zur gemeinsamen Brückenbildung finden könnten. Es bleibt kaum eine andere Möglichkeit, als dass im gegerbten Casein die Methylenbrücken je eine Lysinaminogruppe und eine Peptidgruppe entsprechend folgender Formel miteinander verknüpfen:



Diese Art der Brückenbildung ist schon deshalb die wahrscheinlichste, weil jede Lysinaminogruppe im Proteingel von zahlreichen Peptidgruppen umgeben ist. Zudem ist die Peptidgruppe für sich allein befähigt, Formaldehyd zu binden, wie wir noch zeigen werden.

III. Zur Frage der Bindung von Polyoxymethylenhydrat.

Bei kräftiger, langdauernder Gerbung vermag Casein wie auch Kollagen bedeutend mehr Formaldehyd zu binden, als den freien Aminogruppen entspricht¹⁾. Auch desaminiertes Casein bindet unter diesen Bedingungen beträchtliche Mengen Formaldehyd. Wir bestätigen mit dieser Feststellung nur, was andere Forscher schon vor uns gefunden haben²⁾. Man hat also damit zu rechnen, dass noch weitere Gruppen im Protein Formaldehyd binden. Von anderer Seite³⁾ ist ausserdem versucht worden, die höheren Formaldehydgehalte gegerbter Proteine damit zu erklären, dass ausser monomerem Formaldehyd auch Formaldehydpolymerisate gebunden worden sind. Wenn diese Annahme auch nicht bewiesen wurde, so kann sie doch nicht ohne weiteres von der Hand gewiesen werden. Neutrale und schwach saure Formaldehydlösungen höherer Konzentration enthalten reich-

¹⁾ Vgl. III, loc. cit.

²⁾ Bowes und Pleass, J. int. Soc. Leather Trades Chemists, **23**, 451 (1939); Highberger und O'Flaherty, J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 549 (1939); Highberger und Retzsch, J. Amer. Leather Chem. Assoc. **34**, 131 (1939); Csürös und Turai-Lichtig, Magyar Chem. Folyoirat **45**, 54 (1939).

³⁾ Highberger und Retzsch, J. Amer. Leather Chem. Assoc. **34**, 131 (1939).

lich Polymerisationsprodukte des Formaldehyds. Ferner sind Aminosäure-Formaldehyd-Verbindungen bekannt, in denen mehrere (meist drei) Molekel Formaldehyd an die Aminogruppe gebunden sind¹⁾. In einer früheren Arbeit²⁾ haben wir beschrieben, dass gegerbte Caseine beim Auswaschen mit kaltem Wasser während langer Zeit beträchtliche Mengen Formaldehyd abgeben. Es wurde zunächst vermutet, dass es sich dabei um gebundene Polyoxymethylene handle, die allmählich hydrolytisch abgespalten würden³⁾. Die Frage wurde daher näher untersucht.

Eine Probe (0,1 g) von festem Polyoxymethylen, das sich aus einer 38-proz. Formaldehydlösung bei längerem Stehen abgeschieden hatte, löste sich in Wasser (50 cm³) in 5 Tagen fast vollständig auf. Die hydrolytische Abspaltung von Formaldehyd aus gegerbtem Casein erfolgt viel langsamer (bis zu 3 Wochen beobachtet). Dies deutet bereits darauf hin, dass es sich nicht um den gleichen Vorgang handeln kann. Sehr deutlich wird das unterschiedliche Verhalten von Polyoxymethylen und gegerbtem Casein bei der Wärmebehandlung.

Um einen Anhaltspunkt über die Geschwindigkeit der Depolymerisation zu erhalten, erwärmten wir eine Probe von 0,1 g Polyoxymethylen in der Trockenpistole unter Evakuieren (14 mm Hg) auf 78°. Als Absorptionsmittel für den abgespaltenen Formaldehyd diente Chromschwefelsäure. Der Gewichtsverlust betrug:

nach 1	Stunde	= 37%
„ 2 ½	Stunden	= 59%
„ 11	Stunden	= 91%.

In 38-proz. Formaldehyd gegerbte Caseine spalten unter gleichen Bedingungen nur sehr wenig ihres gebundenen Formaldehyds ab (vgl. Tab. 4). Dabei ist zwischen nur ganz kurz und „erschöpfend“ ausgewaschenem Casein kein Unterschied feststellbar. Bei den auswaschbaren Formaldehydanteilen kann es sich also nicht um Polyoxymethylene handeln.

Wenn durch diese Versuche auch nicht sicher bewiesen ist, dass vom Protein keine Polyoxymethylenmolekeln gebunden werden können, so scheint dies doch zum mindesten recht unwahrscheinlich.

Tabelle 4.

Casein-Nr.	Dauer der Erwärmung	% CH ₂ O der Probe		Verlust an CH ₂ O in % des urspr. Gehaltes	Bemerkungen
		vor Erwärm.	nach Erwärm.		
38 I a	4 h	2,59	2,60	0	Casein nach der Gerbung nur kurz gewaschen
	18 h	2,59	2,54	1,9	
AW.	18 h	1,78	1,74	2,3	„erschöpfend“ (3 Wochen) ausgewaschen

¹⁾ Bergman und Jacobsohn, Z. physiol. Ch. **131**, 18 (1923); Ensslin, Diss., Zürich.

²⁾ Vgl. III, loc. cit.

³⁾ Bei kräftiger Gerbung (28 Tage in 38-proz. Formaldehyd) wird allerdings nach erschöpfendem Auswaschen noch 3,03% Formaldehyd gefunden. Diese Menge ist immer noch bedeutend mehr, als was die Aminogruppen binden.

IV. Weitere formaldehydbindende Gruppen im Casein.

Von den übrigen Gruppen im Protein, die für eine Formaldehydbindung in Frage kommen können, wissen wir eigentlich nur vom Argininrest Sicheres. Für das Casein haben *Highberger* und *O'Flaherty*¹⁾, für das Kollagen hat *Gustavson*²⁾ nachgewiesen, dass die Aminogruppe im Guanidinrest des Arginins Formaldehyd bindet, jedoch nur im alkalischen Gebiet. Dies ergibt sich aus dem Vergleich des Formaldehydbindungsvermögens von gewöhnlichem und desarginiertem³⁾ Protein bei verschiedenen p_H . Bei unsern Gerbbedingungen (p_H 5—6) kommt somit eine Formaldehydbindung durch die Argininreste nicht in Frage.

Ob die sekundären Aminogruppen von Tryptophan, Histidin, Prolin und Oxyprolin unter den milden Bedingungen der Formaldehydgerbung Formaldehyd binden, ist ungewiss. Entsprechende Verbindungen der genannten Aminosäuren scheinen nie dargestellt worden zu sein. Nur vom Indol, dessen Ringsystem im Tryptophan enthalten ist, berichtet *Annie Homer*⁴⁾, dass es bei 150° in Gegenwart von Zinkchlorid mit Trioxymethylen unter Bildung einer Verbindung $C_{21}H_{20}O_3N_2$ reagiert. Diese Bedingungen sind mit unsern nicht vergleichbar; zudem ist nur sehr wenig Tryptophan im Casein⁵⁾ enthalten.

Gegen eine wesentliche Beteiligung der $—NH—$ Gruppen in den Heterocyclen spricht noch folgende Überlegung. Leichter als mit Formaldehyd reagieren diese Gruppen sicher mit salpetriger Säure. Mindestens vom Pyrrolidin (enthalten im Prolin) und vom Indol ist die Umsetzung mit salpetriger Säure bekannt⁶⁾. Im Desaminocasein sind demnach diese Iminogruppen durch Nitrosierung blockiert. Trotzdem vermag Desaminocasein noch beträchtliche Mengen Formaldehyd zu binden. So fanden wir in einem Desaminocasein, das 24 Stunden bei 70° mit 10-proz. Formaldehydlösung gegerbt worden war, 3,49% nicht auswaschbaren Formaldehyd.

Dass die Sulfhydrylgruppe des Cysteins leicht über ein weites p_H -Gebiet mit Formaldehyd reagiert, haben *Ratner* und *Clark*⁷⁾ gezeigt. Im Eiweiss findet sich allerdings meist nicht das Cystein, sondern sein Dehydroprodukt, das Cystin. Nach *Bowes* und *Pleass*⁸⁾ soll die $—S—S—$ Brücke des Cystins durch den Formaldehyd reduktiv gespalten werden. Die dabei entstehende $—SH$ -Gruppe reagiert

¹⁾ J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 549 (1939).

²⁾ Svensk kem. Tid. **52**, 261 (1940).

³⁾ Eine mindestens teilweise Zerstörung des Guanidinrestes gelingt mit Hypochlorit.

⁴⁾ Biochem. J. **7**, 101 (1912).

⁵⁾ Siehe: *Sutermeister* und *Browne*, Casein and its Industrial Applications. New York 1939.

⁶⁾ Siehe: *Beilstein*, Organische Chemie.

⁷⁾ Am. Soc. **59**, 200 (1937).

⁸⁾ J. int. Soc. Leather Trades Chemists **23**, 451 (1939).

dann natürlich mit Formaldehyd. Der höchste in der Literatur angegebene Wert für den Cystingehalt des Caseins ist 0,34 %¹⁾. Nun enthält das Casein aber ca. 0,8 % Schwefel. Davon fällt ca. 0,3 % auf Methionin¹⁾. Die Bindungsart des Restes ist unbekannt. Wenn wir annehmen, dass 0,5 % Schwefel als Cystein oder Cystin vorliegen, so würde dies die Bindung von ebenfalls 0,5 % Formaldehyd ermöglichen. Sogar dieser äusserste Wert ist viel kleiner als das, was über die Bindungsfähigkeit der Aminogruppen hinausgeht. Es müssen also schon noch andere reaktionsfähige Gruppen gesucht werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Reaktion mit Formaldehyd bietet der Phenolkern des Thyrosins. Die Angaben für dessen Gehalt im Casein liegen zwischen 4,5 und 7,5 %. Vom p-Kresol ist bekannt, dass es mit Formaldehyd in den beiden ortho-Stellungen reagieren kann²⁾. Hierzu ist jedoch Natronlauge oder konz. Salzsäure als Kondensationsmittel erforderlich. Ohne solche reagiert es, wie auch das Phenol selber, erst bei höherer Temperatur mit merklicher Geschwindigkeit. Mindestens bei den bei fast neutraler Reaktion und Zimmertemperatur ausgeführten Gerbungen ist es deshalb nicht wahrscheinlich, dass der Phenolrest des Tyrosins Formaldehyd bindet. Dagegen wird er bei der Behandlung des Caseins mit salpetriger Säure nitrosiert³⁾. Nun kann aber, wie schon ausgeführt, Desaminocasein noch beträchtliche Mengen Formaldehyd binden. Hiefür kann demnach auf keinen Fall das Tyrosin verantwortlich gemacht werden.

Es bleibt somit als formaldehydbindende Gruppe noch die Peptid-Iminogruppe.

Die Annahme, dass auch die Peptidgruppen Formaldehyd binden, ist schon von verschiedenen Autoren gemacht worden⁴⁾. Wir schliessen uns ihnen an, denn folgende Tatsachen sprechen für diese Annahme:

1. *Cherbuliez* und *Feer*⁵⁾ haben gezeigt, dass das Diketopiperazin, welches als eine geeignete Modellsubstanz für die in Frage stehende Reaktion angesehen werden kann, leicht 2 Mol Formaldehyd an den —NH—Gruppen anlagert zu 1,4-Di-oxymethyl-2,5-diketopiperazin. Die Autoren geben auch eine Zusammenstellung anderer Säureamide, die mit Formaldehyd reagieren.

2. Aus dem Studium des zeitlichen Verlaufes der Formaldehydbindung durch das Casein⁶⁾ geht hervor, dass sich eine rascher und eine langsamer verlaufende Reaktion überlagern. Die Reaktionsge-

¹⁾ *Sutermeister* und *Browne*: Casein.

²⁾ Vgl. z. B. *Köhner*, *Angew. Chem.* **46**, 251 (1933).

³⁾ Hierauf beruht die *Millon'sche* Reaktion. Desaminocasein selber ist gelb und wird mit Alkalien rot. Siehe auch *Wicke*, *A.* **101**, 317 (1857).

⁴⁾ Siehe *Gustavson*, *Koll. Z.* **103**, 43 (1943).

⁵⁾ *Helv.* **5**, 678 (1922).

⁶⁾ Vgl. III, *Helv.* **26**, 1075 (1943), Fig. 1.

schwindigkeitskurve dieser zweiten Reaktion, die auch nach 30 Tagen noch keineswegs beendet ist, scheint fast linear zu verlaufen¹⁾. Es muss sich also um eine Reaktion handeln, bei der die Menge der reagierenden Gruppen während der betrachteten Zeitspanne nicht merklich abnimmt. Dies trifft nur für die sehr zahlreichen Peptidgruppen zu, denn wenn dieselben 1,5% des Caseingewichts an Formaldehyd gebunden haben, so hat erst jede zwanzigste mit einer Molekel Formaldehyd reagiert.

Anhang.

1. Die Bestimmung des Säurebindungsvermögens.

Diese Bestimmung kann dank der Unlöslichkeit des Caseins in verdünnter Schwefelsäure sehr einfach und exakt wie folgt ausgeführt werden:

0,5 g lufttrockenes Casein werden in eine Glasstöpselflasche abgewogen. Nach Zugabe von genau 30 cm³ Schwefelsäure bekannter Konzentration wird verschlossen und 4 Stunden lang bei Zimmertemperatur gerollt. Nach dieser Zeit ist der Gleichgewichtszustand sicher erreicht; er bleibt auch nach 20 Stunden unverändert. Casein und überstehende Flüssigkeit werden dann durch scharfes Zentrifugieren voneinander getrennt und 20 cm³ der letzteren mit Natronlauge und Methylrot als Indikator titriert. Aus dem gefundenen Werte lässt sich berechnen, wieviel Schwefelsäure vom ungelösten Casein gebunden worden ist. Eine Spur Casein geht allerdings in Lösung, jedoch so wenig, dass das Resultat dadurch nicht wesentlich beeinflusst wird.

Die Säurebindung hängt von der Menge, resp. von der Konzentration der zugesetzten Säure ab. Tabelle 5 enthält die Werte, die wir für das von uns hergestellte Casein unter Verwendung von je 30 cm³ Schwefelsäure steigender Konzentration (bis zu 0,05-n.) erhielten.

Tabelle 5.

Milli-Aquivalente H ⁺ /g trock. Casein		Milli-Aquivalente H ⁺ /g trock. Casein	
zugesetzt	gebunden	zugesetzt	gebunden
0,448	0,392	1,794	0,732
0,897	0,622	2,242	0,763
1,345	0,697	3,363	0,763

Man sieht, dass ein beträchtlicher Überschuss an Säure nötig ist, damit die gesuchte maximale Säurebindung erreicht wird, dass aber noch mehr Säure dieselbe nicht mehr verändert. Wenn die benötigte Säuremenge einmal ermittelt ist, so kann man sich bei weiteren Messungen natürlich mit einem einzigen Ansatz begnügen.

2. Die Bestimmung des *Van Slyke*-Stickstoffes.

Die von *van Slyke* zur Bestimmung primärer aliphatischer Aminogruppen angegebene Methode²⁾ konnte von uns nicht unverändert übernommen werden. Sie setzt voraus, dass der zu analysierende Stoff gelöst werden kann, was für gegerbte Caseine unmöglich ist. Wir arbeiten deshalb wie folgt:

Als Reaktionsgefäß verwenden wir eine 50 cm³ fassende Weithalsflasche, die durch einen Gummistopfen verschlossen werden kann, der in vier Bohrungen zwei kleine Tropf-

¹⁾ Wir sind daran, den zeitlichen Verlauf der Formaldehydbindung weiter, d. h. über ein ganzes Jahr, zu verfolgen.

²⁾ Siehe *Houben-Weyl*, Methoden der organischen Chemie, 2. Aufl., Bd. 4, S. 463.

trichter und ein Zuleitungs- und ein Ableitungsrohr für Gas trägt. In diese Flasche werden 0,6 bis 1 g Casein eingewogen. Man setzt 15 cm³ Wasser, 3 cm³ i-n. Natriumsulfatlösung sowie einen Tropfen Amyl- oder Oktylalkohol zu, schwenkt um, bis alles benetzt ist, und lässt 30 Minuten quellen. Nun wird die vom Casein noch festgehaltene Luft durch vorsichtiges Evakuieren (vom Gaszuleitungsrohr her) entfernt. Das Schäumen der Mischung bekämpft man dadurch, dass man durch den kleineren Tropftrichter noch etwas Amylalkohol zugibt. Nun wird das Gefäss durch das Gaszuleitungsrohr mit luftfreiem Kohlendioxyd (aus einem *Kipp*) gefüllt. Jetzt lässt man durch den grösseren Tropftrichter 5 cm³ Eisessig einfließen, worauf man nochmals kurz evakuiert und wieder mit Kohlendioxyd auffüllt. Am kapillaren Gasableitungsrohr angeschlossen war bereits eine mit Zweiweghahn und Niveaugefäss versehene Gasbürette, die als Sperrflüssigkeit 1-proz. Schwefelsäure enthält. Der bisher geschlossene Zweiweghahn wird nun so gedreht, dass Reaktionsgefäss und Gasbürette miteinander verbunden sind. Jetzt lässt man durch den grösseren Trichter tropfenweise eine ausgekochte Lösung von 3 g Natriumnitrit in 10 cm³ Wasser zufließen. Die Gasentwicklung setzt sofort ein. Zu starkes Schäumen wird durch weitere Zugabe von Amylalkohol bekämpft. Die Zeit, zu der das Nitrit zugesetzt wird, ist zu notieren. Eine Stunde nach Zugabe des Nitrits wird der entwickelte Stickstoff zum erstenmal gemessen. Das Gasgemisch (N₂, NO und NO₂) wird durch den Zweiweghahn in eine Absorptionspipette nach *Hempel* getrieben. Diese enthält 10-proz. Natronlauge, die mit Kaliumpermanganat gesättigt ist. Das Reaktionsgefäss wird zweimal mit 50 cm³ Kohlendioxyd ausgespült und auch dieses Gasvolumen in die Pipette getrieben. Die Absorption und die Messung des verbleibenden Stickstoffes müssen rasch vor sich gehen, damit im Reaktionsgefäss inzwischen kein zu grosser Überdruck entsteht. Man nimmt nun eine Zeitkurve der *van Slyke*-Reaktion auf, indem man während ca. 4 Stunden alle 30 bis 40 Minuten den entwickelten Stickstoff misst. Dies ist nötig, weil die Reaktion nie zu einem Ende kommt. Die Zeitkurven der Stickstoffentwicklung haben alle dieselbe Form (I), wie sie in Fig. 1 wiedergegeben ist. Man erkennt deutlich,

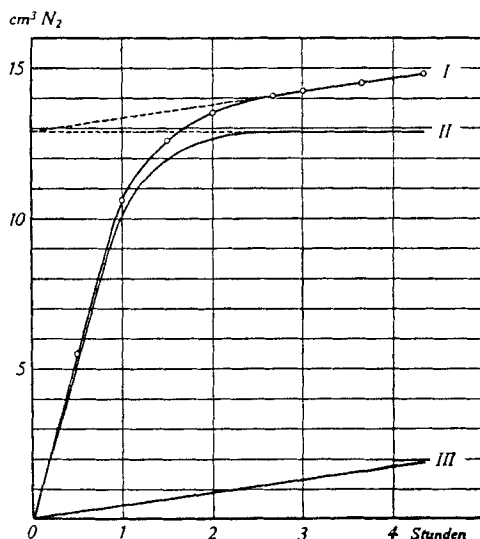


Fig. 1.

dass sich zwei Reaktionen überlagern, eine rasch beginnende und nach 2 bis 3 Stunden beendete Reaktion (II) und eine andere, langsame, deren Kurve (III) linear mit der Zeit verläuft. Bei der letzteren dürfte es sich um eine Umsetzung mit den Peptidgruppen

handeln¹⁾. Der Schnittpunkt des linearen Kurvenstückes mit der Ordinate ergibt den Endwert der rasch verlaufenden Reaktion der salpetrigen Säure mit den freien Lysinaminogruppen. Unter Verwendung dieser graphisch ermittelten Stickstoffvolumina lassen sich die *van Slyke*-Werte mit einer Genauigkeit von $\pm 1\%$ reproduzieren.

Zusammenfassung.

Es wurde festgestellt, dass bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Casein bei p_H 5—6 und Zimmertemperatur in erster Linie die freien ε -Aminogruppen des Lysins in Reaktion treten.

Aus dem Vergleich des Formaldehydbindungsvermögens von desaminiertem und gewöhnlichem Casein und aus der Verminderung des *van Slyke*-Stickstoffes bei der Formaldehydgerbung ist zu schliessen, dass sich die freien Lysinaminogruppen mit dem Formaldehyd im Verhältnis 1 : 1 verbinden. Es konnte erstmals einwandfrei nachgewiesen werden, dass bei der Reaktion zwischen Formaldehyd und Casein Wasser abgespalten wird. Die kondensierte Wassermenge wurde als äquivalent dem durch die Lysinaminogruppen gebundenen Formaldehyd gefunden. Schliesslich konnte erneut gezeigt werden, dass ausser den Lysinaminogruppen noch andere Gruppen im Casein vorhanden sind, die schon in schwach saurem Medium Formaldehyd binden. Eine Reihe von Gründen sprechen dafür, dass es sich dabei vor allem um die Peptidgruppen handeln muss. Die Reaktion zwischen den Peptidgruppen und dem Formaldehyd ist aber mindestens in der Kälte mit keiner Kondensation verbunden.

Die mitgeteilten Versuche führen zum Schluss, dass die eigentliche Gerbwirkung des Formaldehyds (Verlust der Löslichkeit, Verminderung der Quellfähigkeit) dadurch zustande kommt, dass zwischen den freien Lysinaminogruppen einerseits und den Peptidgruppen andererseits Methylenbrücken gebildet werden, was eine hauptvalenzmässige Verknüpfung der Proteinmolekeln untereinander bedeutet.

Bern, Chemisches Institut der Universität,
Organische Abteilung.

¹⁾ Es ist auch von gewissen einfachen Peptiden bekannt, dass sie mehr Stickstoff entwickeln als den freien NH_2 -Gruppen entspricht. Siehe *Houben-Weyl*, loc. cit.
