

## Perjodat-Oxydation von Ovalbumin

Von Kazuyuki MAEKAWA und Masahisa KUSHIBE

(Eingegangen Am 7. Januar, 1954)

Früher wurden häufig die Oxydationsagenzien wie Permanganate, Wasserstoffsuperoxyd, Chromsäure angewandt, um die Struktur der Eiweißstoffe mit Hilfe von Oxydation zu erklären. Bei diesen Versuchen sind sie jedoch so kräftig, dass verschiedene Stelle an dem Molekül angegriffen und damit die Reaktion kompliziert wird. Ausser bei den verhältnismässig einfachen Eiweißstoffen brachten die solchen Versuche kein ergiebiges Ergebnis<sup>1,2)</sup>. Hinsichtlich der Beziehungen zwischen der Struktur der Eiweißstoffe und ihrer physiologischen Wirkung brachte die direkte Oxydation von Eiweißstoffen fast nichts zu Tage.

Dagegen wurden neulich einige Versuche veröffentlicht, native Eiweißstoffe unter verhältnismässig milden Bedingungen zu oxydieren. Goevel et al. fanden z.B., dass Virus, „Western equine encephalomyitis“, infolge der Perjodat-Oxydation seine Pathogenität verliert, dabei aber seine antigenische Spezifität zurückbleibt<sup>3)</sup>. Ferner folgerten Goebel und Perlmann<sup>4)</sup> aus den Veränderungen an Absorptionsspektrum und elektrophoretischer Mobilität, dass sich einige Amino-Säuren zerstören liessen, indem sie mittels  $\text{LiIO}_4$  Rinde Serumalbumin oxydierten.

Desnuelle et al. berichteten<sup>5)</sup>, dass Ovalbumin durch Perjodat allmählich niedergeschlagen wurde, und dass sämtlich Cystein, Cystin, ein Teil von Tyrosin und ein Drittel von Tryptophan in dem koagulierten Ovalbumin zersetzt wurden. Vor kurzer Zeit behandelten Jansen et al.<sup>6)</sup> mit Perjodat  $\alpha$ -Chymotrypsin und gewannen Oxy- $\alpha$ -Chymotrypsin, welche opt.  $\rho\text{H}$  mehr oder weniger verschob.

Betreffs Chemismus von Eiweiß-Oxydation befindet sich aber die eingehende Forschung noch nicht.

Schon berichtete einer von uns gemeinsam mit M. Hamada<sup>7)</sup>, dass verschiedenartige

Eiweißstoffe gewissermassen das Oxydant verbrauchten und dabei gewisses Ammoniak und Aldehyd entstanden. Jedoch muss noch erklärt werden, dass dieser scheinbare Perjodat-Verbrauch von Protein verrichtet wurde, um welche Stelle von dem Proteinmoleküle wirklich zu oxydieren, und was Protein folgendessen für eine Veränderung physikalisch erlitt, und auch welche Aminosäuren welcherweise sich zersetzen. Um weiteres darüber zu erklären und zur Kenntnisse der physiologischen Wirkung und Strukture zu kommen, nahmen die Verfasser die folgenden Untersuchungen vor.

### Beschreibung der Versuche

**I. Direkte Oxydation von kristallisierten Ovalbumin durch Perjodat.** Ovalbumin, welches nach gewöhnlichen Verfahren dargestellt, mehrfach umkristallisiert und dialyziert wurde, wurde in Michaelis'schen Phosphat-Puffer von pH 7.7 aufgelöst, um 5~20 mg/ccm von Eiweisslösung darzustellen.  $\text{NaIO}_4$  wurde aus Wasser umkristallisiert und in demselben Puffer von pH 7.0, als 0.1~0.01 N Lösung gelöst. Unter Benutzung von beiden Lösungen wurden die Bestimmung von Oxydant-Verbrauch und die Darstellung von oxydierten Proben folgendermassen jede für sich verrichtet.

(A). 10 ccm dieser Ovalbuminlösung wurde in 50 ccm Glasstöpselflaschen pipettiert, hierzu wurde 20 ccm 0.02 N Natriummetho-Perjodat Lösung zugesetzt, diese wurde bei Zimmertemperatur unter gelegentlicher Pipettierung gelassen. 1 ccm von der ausgezogenen Lösung wurde mit 10 ccm gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und 1 ccm 10%-iger KJ Lösung versetzt, danach mit 1 ccm 0.5% Stärkelösung, zuletzt mit Wasser bis zu 50 ccm

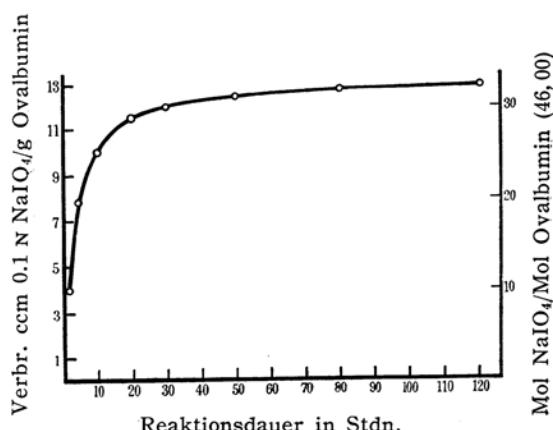


Fig. 1 Perjodat-Verbrauch von Ovalbumin.

1) S. Goldschmidt, und K. Straus, *Ann.*, **480**, 263 (1930).

2) R. M. Herriott, "Adv. in Protein Chem.", **3**, 175 (1947).

3) W. F. Goebel, P. K. Olitsky und A. C. Saenz, *J. Exp. Med.*, **87**, 445 (1948). zitiert aus *C.A.*, **42**, 5552 (1948).

4) W. F. Goebel und G. E. Perlmann, *J. Exp. Med.*, **88**, 479 (1949).

5) P. Desnuelle, S. Antonin und A. Casal, *Bull. soc. chim. biol.*, **29**, 694 (1947).

6) E. F. Jansen, A. L. Curi und A. K. Balls *J. Biol. Chem.*, **189**, 671 (1951).

7) M. Hamada und K. Maekawa, *Sci. Bull. Fac. Agric., Kyusyu Univ.*, **13**, 180 (1951).

gefüllt. Der dabei entstandene Farbenton wurde unter Anwendung von Filter 570 m $\mu$  bestimmt. Differenz der Daten für Blindprobe bezeigt Perjodat-Verbrauch. Die dabei gefundenen Ergebnisse sind wie folgende:

Wie man aus der Figur erkennt, ging die Oxydation anfangs bis zur 20 M/M Ovalbumin verhältnismässig schnell vor sich, es bedurfte aber eines Tages, um 30M von Perjodat zu verbrauchen. Diese Ziffer zeigt also, dass die von Perjodat oxydierte Stelle durchschnittlich bei Ovalbumin im Verhältnis von 1 Stelle pro 12~13 Aminosäurereste steht, wenn die Summe der Aminosäurereste in Ovalbumin als 402 angenommen wird<sup>8)</sup>.

(B). Zur Darstellung von Oxy.-Ovalbumin wurde folgendes Verfahren angewandt. Zu 200 ccm von Ovalbuminlösung (5.5 mg/ccm) wurden je 4.5 ccm (a), 9 ccm (b) und 13.5 ccm (c) von 0.1 N NaIO<sub>4</sub> Lösung zugesetzt, und diese Gemische wurden 15 Stunden lang in der Zimmertemperatur (12°) gelassen. Nachdem so gestanden, zeigten die Reaktionsgemische pH 6.6~6.8 und enthielten kein Perjodat ausser (c). Hierzu wurden gesättigte Ammoniumsulfatlösungen in folgenden Raten

versetzt, um oxydiertes Ovalbumin niederzuschlagen.

- (a) 1 ccm Lösung: 2.3 ccm (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>—Lösung
- (b) " : 2.0 "
- (c) " : 1.6 "

Jeder Niederschlag wurde in Wasser gelöst und mit Ammoniumsulfat wieder behandelt. Die Umlösung wurde so oft wiederholt, bis Jodverbindung nicht mehr erkennbar war. Die wässerigen Probelösungen wurden zuletzt zu pH 5.3~5.5 zubereitet, mit Ammoniumsulfat versetzt, bis sich eine kaum bemerkbare Trübung zeigte, und so gelassen, um die oxydierten Proben zu fällen.

Jede Probe der erhaltenen Oxy.-Ovalbumine ist anscheinend mit Ovalbumin ganz ähnlich.

**II. Veränderung in Zusammensetzung infolge der Oxydation.** An den oben erwähnten oxyproben wurden Aminosäuren bestimmt, welche erwarten liessen, vermutlich oxydative Zersetzung zu erleiden. So wie es ist, unmittelbar oder nach Hydrolyse mittels Säuren oder Baryta wurde Aminosäure-bestimmung nach verschiedenem Verfahren und mutatis mutandis verrichtet. Die Resultate sind in der Tafel I zusammengestellt.

TABELLE I  
VERÄNDERUNG IN ZUSAMMENSETZUNG INFOLGE DER OXYDATION

Probe	a	b	c	Oxy-gelatin	Oxy-Haare
	Oxy-dationsgrad	10 Mol. NaIO <sub>4</sub>	20 Mol. NaIO <sub>4</sub>		
Ausbeute	90 %	83 %	64 %		
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup> , (pH 7.7)	-55.5°	-55.5°	-83.3°	-118.3°	
Tryptophan	0.2 %	0	0		
Histidin	2.35%	2.33%	2.33%		
HS—	0	0	0		
Arginin	5.50%	5.34%	4.81%	(88%)*	
Tyrosin	3.60%	3.32%	3.00%		
Oxyprolin				(93%)*	
Cystin	1.15%	1.11%	1.11%		Spur (0.05%)

Das Zeichen\* zeigt v.H. von zurückbleibenden.

Zur Eiweissbestimmung wandten wir nicht Ninhydrin, sondern Biuret-Reaktion an, weil Oxyprobe mit jenem sich nicht färbe.

Tryptophan wurde nach photokolorimetrischem Verfahren (Filter 530 m $\mu$ ) bestimmt, unter Anwendung von Farbreaktion, welche aus Tryptophan und Vanillin im Gegenwart von Schwefelsäure entsteht.<sup>9)</sup>

Wie sich aus der obigen Tafel erhellt, lässt sich Tryptophan schon in früher Stufe der Reaktion beinahe zersetzen.

Sulfhydryl-Gruppe wurde nach Ferricyanid-Methode bestimmt<sup>10)</sup>. Es wurde erkannt, dass die Gruppe-SH auch anfangs angegriffen wurde. Dagegen ist Cystin fast unverändert zurückgeblieben. Ausserdem lässt sich vermuten, dass ein Teil von Cystein durch Perjodat zum Cystin oxydiert wurde. Haare, die zum Nachschlage mit sehr überschüssigem NaIO<sub>4</sub> monatelang durchdringend oxydiert wurden, hatten aber nach Hydrolyse nur Spur von Cystin.

Arginin erlitt wenig Veränderung. Dies wurde unmittelbar bestimmt, mit Hilfe der

8) G. R. Tristram, "Advances in Protein Chemistry," Vol. V, s. 137, Academic Press Inc., Publishers, New York, N.Y., (1949).

9) I. Iwamura, H. Hamakawa und Y. Nakahiro, *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, **23**, 543 (1947).

10) E. S. G. Barron, "Advances in Enzymol.", Vol. 11, S. 223, Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y. (1951).

Sakaguchi'schen Reaktion<sup>11)</sup>.

Tyrosin litt durch solch eine Oxydation keine erkennbare Veränderung.

Oxyprolin, welches bei Gelatine in Frage steht<sup>12)</sup>, zeigte keine merkbare Zersetzung.

### Zusammenfassung

Ovalbumin wurde durch Perjodat in ver-

schiedenem Grade oxydiert, ohne zu koagulieren.

Oxydiertes Ovalbumin enthielt nicht mehr Cystein und Tryptophan, aber Tyrosin, Histidin und Cystin blieben noch meistenteil zurück.

*Aus dem Institut für biologische Chemie  
der landwirtschaftlichen Hochschule  
Matsuyama*

11) H. T. MacPherson, *Biochem. J.*, **40**, 470 (1946).

12) R. E. Neuman und M. A. Logan, *J. Biol. Chem.*, **184**, 299 (1950).