

161. Zusammensetzung des Wal-myoglobins¹⁾

von Karl Schmid²⁾.

(8. IV. 49.)

Die in den letzten Jahren gewonnenen, äusserst bedeutsamen Fortschritte der Eiweissforschung förderten die Kenntnisse sowohl der Darstellung und Eigenschaften als auch der Analyse der Eiweisskörper in weitem Masse. Der Ausbau der Analyse ist aber noch in steter Entwicklung begriffen, und es wird versucht, die Zusammensetzung eines Proteins mit möglichst wenig Substanz in kurzer Zeit zu finden. In dieser Hinsicht sei auf die interessanten Ergebnisse hingewiesen, die mit Hilfe der Verteilungschromatographie erreicht worden sind³⁾. Damit wurden die klassischen Methoden⁴⁾ zur Bestimmung der Aminosäuren überholt, nach denen die Basen nach dem *Kossel'schen Silber-Barytverfahren*, die neutralen Eiweissbausteine nach der Estermethode von *Fischer* und der Extraktionsmethode von *Dakin*, und die Säuren nach der Methode von *Chibnall*⁵⁾ zu ermitteln waren.

Heute stehen zur Bestimmung jeder Aminosäure mehrere Methoden mit verschiedenem Anwendungsbereich zur Verfügung⁶⁾. *Chibnall*, der die in chemischer Hinsicht gängbarsten Bestimmungsmethoden⁷⁾ entwickelte, konnte so als erster über die Aminosäurezusammensetzung mehrerer Proteine berichten⁷⁾. Wenn von den mikrobiologischen⁹⁾ und enzymatischen¹⁰⁾ Verfahren sowie von der

¹⁾ Vorläufige Mitteilung: *K. Schmid*, Nature, im Druck.

²⁾ Gegenwärtige Adresse: Department of Physical Chemistry, Harvard Medical School, Boston 15.

³⁾ *R. Condon*, Nature **162**, 359 (1948); *L. Naftalin*, Nature **161**, 763 (1948); *A. S. Keston*, *S. Underfriend* und *R. K. Cannan*, J. Am. Soc. **68**, 1390 (1946); *R. B. Fisher* und *D. S. Parson*, Nature **161**, 764 (1948); *C. L. Christ*, *C. J. Burton* und *Y. C. Betty*, Science **168**, 91 (1948); *R. J. Williams* und *H. Kirby*, Science **107**, 481 (1948).

⁴⁾ *R. J. Block*, Chem. Rev. **38**, 501 (1946); *A. Kossel*, Protamine und Histone; *S. Edlbacher*, Die Strukturchemie der Aminosäuren und Eiweisskörper, 1927.

⁵⁾ *A. C. Chibnall*, *M. W. Rees* und *E. F. Williams*, Biochem. J. **37**, 372 (1943); *K. Bailey*, *A. C. Chibnall*, *M. W. Rees* und *E. F. Williams*, Biochem. J. **37**, 362 (1943).

⁶⁾ *R. J. Block* und *D. Bolling*, The Amino-Acid composition of Proteins and Foods, Springfield, 1945; *E. Brand* und *J. T. Edsall*, Annual Rev. Biochem. **16**, 223 (1947); *A. J. P. Martin* und *R. L. M. Sygne*, Adv. Protein Chem. **2**, 1 (1945).

⁷⁾ *A. C. Chibnall*, J. Intern. Soc. Leather Soc. Trades' Chem. **30**, 1 (1946).

⁸⁾ *W. J. H. Lugg*, Biochem. J. **32**, 2123 (1938); *H. T. Macpherson*, Biochem. J. **40**, 470 (1946); *M. W. Rees*, Biochem. J. **40**, 632 (1946); *F. Sanger*, Biochem. J. **39**, 507 (1945); *G. R. Tristram*, Biochem. J. **40**, 725 (1946).

⁹⁾ *E. E. Snell*, Adv. Protein Chem. **2**, 85 (1945).

¹⁰⁾ *E. F. Gale*, Nature **157**, 265 (1945); Biochem. J. **39**, 46 (1945).

Anwendung der Isotopen¹⁾ abgesehen wird und nur die chemischen, verbunden mit den physikalisch-chemischen Methoden betrachtet werden, so wird in den meisten Fällen auf Grund des unterschiedlichen Verhaltens der einzelnen Aminosäuren oder Aminosäuregruppen das Hydrolysat in mehrere Fraktionen aufgeteilt. Dabei gelangen im wesentlichen drei Prinzipien zur Anwendung: Ionenaustausch-Verfahren²⁾, Verteilungschromatographie^{2,3)} und Elektrodialyse⁴⁾. Dem ersten Prinzip folgend gelang es *Wieland*⁵⁾, sowohl die Basen als auch die Säuren mit Hilfe von Al_2O_3 resp. „Wofatit C“ abzutrennen und aufzuteilen. *Consden, Gordon* und *Martin*⁶⁾ sowie *Drake*⁷⁾ erreichten neulich dasselbe Ziel mit anderen Kunstarzen. Ausserdem berichtet *Tiselius*⁸⁾ über ein Verfahren, nach dem das Proteinhydrolysat in Säuren, Basen, aromatische und aliphatische Aminosäuren aufgeteilt werden kann. Auf dem zweiten Prinzip beruht das von *Gordon, Martin* und *Sygne*⁹⁾ entwickelte Bestimmungsverfahren, das von *Tristram* (l. c.) weiter ausgebaut und verfeinert wurde, und das erlaubt, die acetylierten Aminosäuren mit Hilfe von verschiedenen Lösungsmitteln durch Verteilungschromatographie an Silicagel zu trennen. Nach dem gleichen Prinzip ist sogar die Auf trennung von Mischungen mit bis zu 19 verschiedenen, freien Aminosäuren an einer Stärkekolonne gelungen¹⁰⁾. Die Elektrodialyse endlich bietet ebenfalls die Möglichkeit¹¹⁾, die Säuren und Basen eines Proteinhydrolysats abzutrennen. Glutaminsäure und Asparaginsäure können dann nach einem der oben erwähnten Ionenaustauschverfahren oder nach *van Slyke*¹²⁾, und Histidin, Aginin und Lysin kolorimetrisch oder enzymatisch bestimmt werden. In der so erhaltenen Restlösung ist es ohne Schwierigkeiten¹³⁾ möglich, die Oxy-aminoäuren nach *Rees* (l. c.), und in Abwesenheit von Cystin und Oxyprolin, die verbleibenden Aminosäuren nach *Tristram* (l. c.) zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit soll über die Aminosäure-Zusammensetzung des Wal-myoglobins berichtet werden, dessen Darstellung und Eigenschaften kürzlich beschrieben wurden¹⁴⁾. Es erwies sich bei

- ¹⁾ *D. Rittenberg* und *G. L. Forster*, J. Biol. Chem. **133**, 737 (1940).
- ²⁾ *A. J. P. Martin* und *R. L. M. Sygne*, Adv. Protein Chem. **2**, 1 (1945).
- ³⁾ *A. Tiselius*, Adv. Protein Chem. **3**, 67 (1947).
- ⁴⁾ *H. Svensson*, Adv. Protein Chem. **4**, 251 (1948).
- ⁵⁾ *Th. Wieland*, B. **76**, 823 (1943); B. **77**, 539 (1944); Z. physiol. Chem. **273**, 24 (1942).
- ⁶⁾ *R. Consden, A. H. Gordon* und *A. J. P. Martin*, Biochem. J. **42**, 442 (1948).
- ⁷⁾ *B. Drake*, Nature **160**, 602 (1947).
- ⁸⁾ *A. Tiselius, B. Drake* und *L. Hagdahl*, Exper. **3**, 21 (1947).
- ⁹⁾ *A. H. Gordon, A. J. P. Martin* und *R. L. M. Sygne*, Biochem. J. **37**, 79, 313 (1943), ibid. **38**, 65 (1944).
- ¹⁰⁾ *S. Moore* und *W. H. Stein*, J. Biol. Chem. **176**, 337 (1948).
- ¹¹⁾ *H. T. Macpherson*, Privat-Mitteilung.
- ¹²⁾ *O. D. van Slyke*, J. Biol. Chem. **141**, 671 (1941).
- ¹³⁾ *D. French* und *J. T. Edsall*, Adv. Protein Chem. **2**, 310 (1945).
- ¹⁴⁾ *K. Schmid*, Helv. **32**, 105 (1949).

dieser Analyse als sehr vorteilhaft, die schwefelhaltigen Aminosäuren zuerst zu bestimmen. Dazu wurde das Protein mit einer Mischung von Soda und Natriumperoxyd geschmolzen, um den gesamten Schwefel zu Sulfat zu oxydieren. Durch Behandlung mit rauchender HNO_3 hingegen wird nur der Cystein- und Cystinschwefel, nicht aber derjenige des Methionins in Sulfat umgewandelt¹⁾. Die Tatsache, dass das Wal-myoglobin nur Methionin²⁾ als Schwefelträger und weiterhin kein Oxyprolin enthält, erleichterte die Durchführung der Arbeit sehr, indem das sonst schwer zu bestimmende Glykokoll ohne zusätzliche Operationen nach *Tristram* (l. c.) und Tryptophan nach *Graham* und Mitarbeiter³⁾ bestimmt werden konnten. In Gegenwart von Cystein oder Cystin kann nämlich die von *Graham* (l. c.) entwickelte Methode nicht angewendet werden, da die Bildung des zu messenden Farbstoffes — wie in besonderen Untersuchungen gefunden wurde — durch diese Aminosäuren beeinflusst wird⁴⁾. Um die noch nicht erwähnten Aminosäuren zu bestimmen, muss das Protein mit Hilfe einer Säure hydrolysiert werden. Es sei hier kurz auf die Vor- und Nachteile der Salzsäure und Schwefelsäure als hydrolysierende Agentien hingewiesen. Der Überschuss der Salzsäure lässt sich bekanntlich im Vakuum sehr bequem entfernen. Während der Elektrodialyse eines mit HCl dargestellten Hydrolysates bildet sich jedoch an der Anode freies Chlor, das auf die Aminosäuren zerstörend einwirkt⁵⁾ und so nur die Bestimmung der Basen erlaubt. Das Entfernen der Schwefelsäure hingegen ist bedeutend mühsamer; ein solches Hydrolysat kann aber durch Elektrodialyse in drei Fraktionen zerlegt werden. Dieser von *Macpherson* (l. c.) entwickelte Weg schliesst, wie oben schon angedeutet wurde, den bemerkenswerten Vorteil in sich, durch diese Trennung die Bestimmung der Monoamino-mono-carbonsäuren wesentlich zu erleichtern.

Experimenteller Teil.

A. Beitrag zur Bestimmung des Tryptophans nach *Graham* und Mitarbeiter (l. c.).

Ausführung der Bestimmung: In Reagensgläser (12 cm lang, 3 cm Durchmesser) werden je 0,5 cm³ einer Gelatinelösung (8,4 g Gelatine in 92 cm³ 1-n. NaOH gelöst und zentrifugiert), steigende Mengen einer Tryptophan-Standard-Lösung (0,05 Gew.-% in 1-n. NaOH, Tryptophan nach *Albertson*⁶⁾ umkristallisiert) resp. Protein und soviel

¹⁾ *K. Bailey*, Adv. Protein Chem. **1**, 304 (1944).

²⁾ Es wird angenommen, dass nur Cyst(e)in und Methionin als schwefelhaltige Aminosäuren vorhanden sind. Adv. Protein Chem. **2**, 63 (1945).

³⁾ *C. E. Graham*, *E. P. Smith*, *S. W. Hier* und *D. Klein*, J. Biol. Chem. **168**, 711 (1947).

⁴⁾ In diesem Fall muss die von *Lugg* (Biochem. J. **31**, 1422 (1932); ibid. **32**, 775 (1938)) gefundene Methode herangezogen werden, bei der das Tryptophan vorgängig als Quecksilbersalz abgetrennt wird.

⁵⁾ *K. Langheld*, B. **42**, 2361 (1909); *E. Aubel* und *J. Asselineau*, Biochimica et Biophysica Acta **2**, 198 (1948); *Pl. A. Plattner* und *U. Nager*, Helv. **81**, 669 (1948).

⁶⁾ *N. F. Albertson* und *B. F. Tullar*, Am. Soc. **67**, 502 (1945).

1-n. NaOH gegeben, bis das Endvolumen von 2 cm³ erreicht ist. Alle Ansätze werden nun während 2 Stunden in einem Ölbad von 120° C belassen, abgekühlt und mit je 0,5 cm³ 2,5-proz. p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung in 10-proz. H₂SO₄, 0,2 cm³ 2-proz. NaNO₃-Lösung und 28 cm³ konz. HCl versetzt. Zur Entwicklung der blauen Farbe werden sie 30 Minuten bei Zimmertemperatur belassen und danach mit 50-Vol.-proz. Äthylalkohol auf 100 cm³ ergänzt. Der Zusatz des Alkohols hält einerseits die Bildung des Farbstoffes an und bewirkt andererseits eine Stabilisierung desselben. Die Intensität des Farbstoffes wird anschliessend mit Hilfe eines Photometers (Ilford 204-Filter) gemessen. Die erhaltene Eichkurve stellt eine Gerade dar und kann durch die folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$\text{mg Tryptophan} = \text{Ablesung} \times 0,0138 - 0,0034$$

Innerhalb eines Messbereiches von 0,2—0,5 mg Tryptophan beträgt der Fehler $\pm 2\%$.

Tabelle 1.
Einfluss des Cystins.
T = Tryptophan; C = Cystin.

Ansatz	Färbung nach			% T gefunden
	8'	16'	24'	
0,3 mg T 0,0 mg C	blau	blau	blau	100
0,3 mg T 0,6 mg C	blau	blau	blau	96
0,3 mg T 1,0 mg C	<i>bläulich</i>	blau	blau	96
0,3 mg T 1,4 mg C	farblos	<i>bläulich</i>	blau	54
0,3 mg T 1,8 mg C	farblos	farblos	<i>bläulich</i>	17

Tabelle 2.
Einfluss des Cysteins.
T = Tryptophan; Ce = Cystein.

Ansatz	Färbung nach			% T gefunden
	8'	24'	30'	
0,3 mg T 0,0 mg Ce	blau	blau	blau	100
0,3 mg T 1,0 mg Ce	farblos	blau	blau	88
0,3 mg T 1,5 mg Ce	farblos	<i>bläulich</i>	blau	34
0,3 mg T 2,0 mg Ce	farblos	<i>bläulich</i>	blau	19
0,3 mg T 2,5 mg Ce	farblos	farblos	<i>schwach bläulich</i>	0

In den Versuchsergebnissen der Tabellen 1—4 soll über den Einfluss der schwefelhaltigen Aminosäuren auf die Bildung des Farbstoffes berichtet werden, der unter den Bedingungen der oben erwähnten Bestimmungsmethode aus Tryptophan und p-Dimethylaminobenzaldehyd entsteht. Cystein, Cystin und Methionin sowie Insulin werden vor der Hydrolyse den betreffenden Ansätzen zugegeben. Die Zeit zur Entwicklung des Farbstoffes beträgt in den in Tab. 4 wiedergegebenen Versuchen nicht 30 Minuten, sondern musste entsprechend dem Einfluss des Insulins stark verlängert werden. Weiterhin wird die Intensität der Blaufärbung während der Bildung des Farbstoffes in verschiedenen Zeitabständen angegeben.

Tabelle 3.
Einfluss des Methionins.
T = Tryptophan; M = Methionin.

Ansatz	Färbung nach 8'	% T gefunden
0,3 mg T		
0,0 mg M		
0,3 mg T		
1,0 mg M		
0,3 mg T	Alle Ansätze blau gefärbt	100% zurück erhalten
1,5 mg M		
0,3 mg T		
2,0 mg M		
0,3 mg T		
3,0 mg M		

Tabelle 4.
Einfluss des Insulins.
T = Tryptophan; I = Insulin.

Ansatz	Farbe nach				17 Std.	% T gefunden nach 17 Std.
	30'	60'	120'			
0,0 mg T 40,4 mg I	farblos	farblos	farblos	farblos	Alle Ansätze schwach getrübt	0
0,4 mg T 29,5 mg I	farblos	schwach bläulich	bläulich	blau		39
0,4 mg T 30,9 mg I	farblos	schwach bläulich	bläulich	blau		44

Die Versuche zeigen, dass Cystin, resp. Cystein in freier Form oder im Peptidverband die Bestimmung des Tryptophans nach *Graham* beeinflusst, indem zum mindesten die Bildung des zu messenden, blauen Farbstoffes verzögert wird. Methionin hingegen beeinträchtigt diese Bestimmung nicht.

Da das Wal-myoglobin nur Methionin als Schwefelträger enthält, ist es möglich, den Tryptophangehalt des Globins dieses Proteids mit Hilfe der oben beschriebenen Methode zu ermitteln.

B. Aminosäurezusammensetzung des Wal-myoglobins.

1. Material.

Die Darstellung des verwendeten Globins, über die kürzlich berichtet wurde¹⁾, erfolgte auf die nachstehende Weise: Das Wal-myoglobin wurde zuerst mit Ammoniumsulfat, dann mit Phosphatsalzen fraktioniert gefällt und aus Phosphatpuffer dreimal umkristallisiert. Mit Aceton und Salzsäure wurde das so erhaltene Proteid anschliessend gespalten und das resultierende Globin in der Hitze koaguliert.

2. Feuchtigkeitsgehalt²⁾.

In 2 Wägegläschen, die zuvor 1 Stunde bei 105° gehalten, eine halbe Stunde im Exsikkator abgekühlt und anschliessend gewogen worden waren, wurden je 200—300 mg Protein eingewogen und bis zur Gewichtskonstanz (12—24 Stunden) bei 105° belassen. Nach halbstündigem Abkühlen im Exsikkator wurden die Gläschen mit Inhalt wieder gewogen. Feuchtigkeitsgehalt: 9,23%.

3. Asche³⁾.

Zur Veraschung wurden 501,1 mg lufttrockenes Protein in einem Porzellantiegel, dessen Gewicht nach dem oben beschriebenen Prinzip ermittelt worden war, über einer *Bunsen*-Flamme vorsichtig bis zur Rotglut erhitzt. Der Tiegel wurde während weiteren 20 Minuten bei dieser Temperatur belassen und danach eine halbe Stunde im Exsikkator abgekühlt und gewogen. 0,6 mg Asche = 0,12%.

Zur Abschätzung des in der Asche enthaltenen Eisens wurde der erhaltene Rückstand in möglichst wenig 5-n. HCl gelöst, mit einer NaCNS-Lösung versetzt, und die Reaktionslösung auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Die Intensität der Rotfärbung wurde mit den Intensitäten der Eisen-Standard-Lösungen verglichen, welche dieselbe Menge Säure und NaCNS enthielten (ca. 0,012 mg Fe). Wird für das Wal-myoglobin derselbe Eisengehalt (0,34%) wie für das Myoglobin des Pferdes³⁾ angenommen, so ergibt sich, dass ca. 1% des ursprünglich enthaltenen Eisens durch die Behandlung mit Aceton und Salzsäure nicht entfernt worden war.

4. Amid-Stickstoff⁴⁾.

Wie *Rees* (l. c.) in seinen Untersuchungen zeigen konnte, werden bei der Hydrolyse eines Proteins mit 20-proz. HCl vor allem Serin und Threonin teilweise zerstört und bilden so zusätzliches Ammoniak⁵⁾. Deshalb muss zur Bestimmung des Amid-Stickstoffs das Protein unter milder Bedingungen hydrolysiert werden, wobei nur der säureamidartig gebundene Stickstoff des Asparagins und Glutamins als Ammoniak in Freiheit gesetzt werden soll.

140—160 mg Protein wurden in einem 50 cm³ Rundkolben mit 10 cm³ 2-n. HCl und 5 Tropfen Caprylalkohol versetzt und während 3 Stunden am Rückfluss gekocht (Glasperle). Das erhaltene Hydrolysat, dessen schwach gelbliche Färbung auf nur wenig Huminstoff resp. Tryptophan hinwies, wurde nach dem Abkühlen in einen *Kjeldahl*-Apparat übergeführt und mit 5-n. NaOH auf p_H = 4,5 (Bromkresolgrün als Indikator) neutralisiert. Dabei fiel der Huminstoff aus und es mussten weitere 4 cm³ Caprylalkohol zugesetzt werden, um das gebildete Ammoniak nach Zugabe von 10 cm³ Natriumboratpuffer (p_H = 10) vollständig in vorgelegte n/70 HCl destillieren zu können. Die überschüssige Säure wurde nach Verdampfen des Caprylalkohols mit n/70 NaOH zurücktitriert. (*Tashiro*-Indikator wurde der Säure beim Bereiten zugesetzt.) Der Gehalt an Amid-Stickstoff beträgt 3,35% des gesamten Stickstoffs.

¹⁾ *Karl Schmid*, Helv. **32**, 105 (1949).

²⁾ *A. C. Chibnall, M. W. Rees und E. F. Williams*, Biochem. J. **37**, 354 (1943).

³⁾ *H. Theorell*, Bioch. Z. **252**, 1 (1932).

⁴⁾ *A. C. Chibnall*, Proc. Royal Soc. **131B**, 136 (1942); *J. W. H. Lugg*, Biochem. J. **32**, 2123 (1938).

⁵⁾ *E. Brand und J. T. Edsall*, Annual Rev. Biochem. **16**, 226 (1947).

5. Bestimmung der schwefelhaltigen Aminosäuren.

a) Test auf Cystein: Es wurde die sehr empfindliche (1 : 50000) Natriumnitroprussid-reaktion ausgeführt. Sie fiel negativ aus.

b) Bestimmung des Cystins¹⁾: Als Veraschungsapparat diente ein langhalsiger Kolben, in den ein sog. „Kühlzapfen“ eingeschliffen war. Zum Druckausgleich war der Kolbenhals vor dem Schliff durchlocht. In diesem Kolben wurden 500—600 mg Protein mit 12 cm³ rauchender Salpetersäure (Dichte = 1,5; 94 Gew.-%) versetzt und mit Hilfe einer Mikroflamme während 36 Stunden siedend gehalten (Zugabe einer Glasperle). Der abgekühlte Kolbeninhalt wurde danach mit 50 mg KNO₃ versetzt und im Vakuum zum Trocknen eingeengt. Der erhaltene Rückstand wurde nun in 2 cm³ 5-n. HCl aufgenommen und wieder zur Trockene verdampft. Nachdem diese Operation nochmals wiederholt worden war, wurde der Rückstand in Wasser gelöst, das 0,3 cm³ konz. HCl enthielt. Die filtrierte Lösung wurde anschliessend zum Sieden erhitzt, mit 2 cm³ 10-proz. BaCl₂-Lösung versetzt und innerhalb einer Stunde auf 30 cm³ eingeengt. Nachdem die Lösung wenigstens 2 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatte, wurde das gebildete BaSO₄ auf einem aschenfreien Filter abfiltriert und mit Wasser chlorfrei gewaschen. Danach wurde das Filter getrocknet (2 Stunden bei 103°) und verascht. Es wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

Ansatz	mg Substanz	mg BaSO ₄	mg BaSO ₄ -Leerwert
Leerwert	0	1,3	0
Methionin	8,5	2,3	1,0
Globin, lufttrocken	636,8	4,7	3,4*)

*) Enthält noch präformiertes Sulfat.

Der Oxydationsversuch mit Methionin zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen 7,5% des in der erwähnten Aminosäure enthaltenen Schwefels in Sulfat umgewandelt wurde. Da das untersuchte Globin 1,03% Methionin-N enthält, liefert das im angewandten Globin enthaltene Methionin bei gleichem Zerfallsfaktor 1,3 mg BaSO₄. Die verbleibenden 2,1 mg BaSO₄ müssten demnach von Cystin gebildet worden sein. Nimmt man an, dass das Molekulargewicht dieses Globins 17000 beträgt und wenigstens 1 Mol. Schwefel als Cystin in einem Mol. Globin enthalten ist, so liefern 636,8 mg Globin entsprechend diesem angenommenen Cystingehalt 7,9 mg BaSO₄. Tatsächlich wurden aber nur 2,1 mg gefunden, d. h. 3,8 mal weniger als die minimal zu erwartende Menge. Da die Zerfallsbedingungen der freien Aminosäuren und der Aminosäuren im Peptidverband verschieden sind, ist die vermehrte BaSO₄-Bildung wohl einer vermehrten Oxydation des im Globin enthaltenen Methionins zuzuschreiben. Aus diesen Versuchen wurde deshalb der Schluss gezogen, dass das Globin des Wal-myoglobins kein Cystin enthält.

c) Bestimmung des Gesamtschwefels nach Lugg (l. c.): 674,2 mg lufttrockenes Globin wurden in einem 40 cm³ fassenden Nickeltiegel mit 10 cm³ 1,5-n. NaOH über Nacht bei 105° stehen gelassen. Nach dieser Zeit war die Hauptmenge des Wassers verdampft. Dem abgekühlten Rückstand wurde eine Mischung von 2 g wasserfreiem Na₂CO₃ und 2 g Na₂O₂ zugesetzt und der Tiegel auf der Flamme vorsichtig auf Rotglut erhitzt, nochmals 0,2 g Na₂O₂ zugesetzt und einige Minuten bei dieser Temperatur belassen. Der abgekühlte Tiegel wurde danach aussen sorgfältig mit glasdest. Wasser abgespült und in ein Becherglas gegeben, in das zum Lösen der Schmelze einige cm³ glasdest. Wasser vorgelegt worden waren. Um die Schmelze vollständig zu lösen, wurde sogleich konz. HCl zugesetzt. Die überschüssige HCl wurde mit gesättigter NaOH-Lösung neutralisiert.

¹⁾ J. W. H. Lugg, Biochem. J. 32, 2114, 2121 (1938); K. Bailey, Biochem. J. 31, 1396 (1937).

die Lösung zum Sieden erhitzt und das gebildete Nickelhydroxyd durch tropfenweisen Zusatz von konz. HCl gerade gelöst. Um den Säuregehalt von 0,1-n. (Endvolumen = 50 cm³) zu erreichen, wurden der Lösung weitere 0,5 cm³ konz. HCl zugesetzt. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung wie bei der Bestimmung des Cystins weiter behandelt (18,0 mg BaSO₄).

Das präformierte Sulfat (nach Lugg, l. c.) wurde in einem mit HCl dargestellten Hydrolysat ermittelt. 480 mg lufttrockenes Protein ergaben 1,0 mg BaSO₄.

674,2 mg lufttrockenes oder 597,3 mg (Feuchtigkeitsgehalt dieses Präparates = 11,40%) trockenes Globin enthalten entsprechend 17,5 mg BaSO₄ 1,05 mg Methionin-Stickstoff oder 1,03% Methionin-N. Der Gesamtschwefel beträgt 0,40 Gew.-%.

6. Bestimmung des Oxyprolins nach McFarlane und Guest¹⁾.

Aliquote Teile eines neutralisierten Hydrolysates und Oxyprolin-Standardlösungen wurden gleichzeitig nach dieser Methode behandelt. Das Hydrolysat zeigte dieselbe Gelbfärbung wie der Leerwert, hingegen ergab Oxyprolin durch die Oxydation zu Pyrrol und Kondensation mit Isatin stets eine Rotfärbung (Empfindlichkeit 0,2—1,6 mg). Dieselben Überlegungen, die schon zur Auswertung der Ergebnisse der Cystinbestimmung dienten, führten zum Schluss, dass das untersuchte Globin kein Oxyprolin enthält.

7. Bestimmung des Tryptophans nach Graham und Mitarbeiter (l. c.).

Die Ausführung dieser Bestimmung wurde im 1. Teil beschrieben.

mg Globin lufttrocken	mg Tryptophan-N	% Tryptophan-N
19,6	6,41	2,11
27,3	8,94	2,11
34,6	11,21	2,09

Mittel: 2,10% Tryptophan-Stickstoff.

Wird die Reaktion mit Myoglobin ausgeführt, so stört die Häminkomponente und es werden zu niedrige Werte erhalten.

8. Hydrolyse des Globins mit Salzsäure.

1,0—1,5 g Globin wurden in einem Rundkolben (250 cm³) eingewogen, mit 20 cm³ konz. HCl per Gramm Protein versetzt und auf dem Wasserbad bei 40° gelöst. Alsdann wurde die berechnete Menge warmen Wassers zugegeben, um 20 Gew.-proz. HCl zu erhalten und die Lösung während 24 Stunden am Rückfluss gekocht. Das schwach braune Hydrolysat wurde anschliessend im Vakuum zum Sirup eingeengt, wobei das zu Beginn auftretende Schäumen durch Zusatz einiger Tropfen Caprylalkohol verhindert wurde. Diese Operation wurde noch 3 mal wiederholt, indem der erhaltene Sirup jeweils in 30 cm³ Wasser gelöst wurde. Danach wurde das Hydrolysat auf 100 cm³ ergänzt und aliquote Teile davon zur Bestimmung der verschiedenen Stickstoffgruppen verwendet.

9. Bestimmung des Gesamtstickstoffs²⁾.

4 cm³ des erhaltenen Hydrolysates wurden zu 50 cm³ aufgefüllt und je 5 cm³ davon für jede Bestimmung verwendet. Da der Stickstoff des Histidins und vor allem derjenige des Lysins schwierig in Ammoniak überzuführen ist, wurde die Veraschungslösung während mindestens 12 Stunden siedend gehalten. Als Katalysator wurden jedem Ansatz

¹⁾ W. D. McFarlane und G. H. Guest, Canad. J. Research **17B**, 139 (1939).

²⁾ A. C. Chibnall, M. W. Rees und E. F. Williams, Biochem. J. **37**, 354 (1943).

0,2 g der folgenden Salzmischung zugesetzt: 20 g CuSO₄, 5 H₂O; 80 g K₂SO₄ und 0,34 g Na₂SeO₄. Das gebildete Ammoniak wurde im *Kjeldahl*-Apparat bestimmt unter Verwendung derselben Masslösungen, die bei der Bestimmung des Amidstickstoffs schon beschrieben wurden. Der Gesamtstickstoff beträgt 17,00%.

10. Bestimmung des Huminstickstoffs¹⁾.

86 cm³ des unter 8. erhaltenen Hydrolysates wurden mit 1-n. NaOH auf pH = 4,7 neutralisiert und der dadurch gefallte Huminstoff abfiltriert. Das Filter wurde nun sorgfältig mit Wasser, das etwas Na₂SO₄ enthält, gewaschen und anschliessend im *Kjeldahl*-Kolben verascht. Der Huminstickstoff beträgt 0,43% des Gesamtstickstoffs.

11. Bestimmung des präformierten Ammoniaks.

Das oben erwähnte Filtrat wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft, der resultierende Sirup mit 0,5 cm³ konz. HCl versetzt und mit Wasser zu 50 cm³ ergänzt. 5 cm³ dieser Lösung wurden mit 1-n. NaOH auf pH = 4,5 neutralisiert und das gebildete Ammoniak in gleicher Weise ermittelt wie dies bei der Bestimmung des Amidstickstoffs schon erwähnt worden ist. Es wurden 3,82% des Gesamtstickstoffs als präformiertes Ammoniak gefunden.

12. Bestimmung der Basen nach Macpherson (l. c.).

10 cm des unter 8. erhaltenen Hydrolysates wurden im Elektrodialyse-Apparat nach den Angaben von Macpherson behandelt. Von der resultierenden Lösung wurde der Gesamtbasen-Stickstoff, das Arginin nach einer auf der Sakaguchi-Reaktion beruhenden Bestimmungsmethode und das Histidin durch Messung des Farbstoffes ermittelt, der bei Kupplung dieser Aminosäure mit diazotierter Sulfanilsäure entsteht. Das Lysin wurde als Differenz gefunden. Dieser Wert stimmte gut mit demjenigen (18,40% des Gesamt-Stickstoffs) überein, der mit Hilfe der „Dinitrofluorbenzol“-Methode (Sanger l. c.) erhalten worden war. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 6 zusammengestellt.

13. Bestimmung des Serins und Threonins nach Rees (l. c.).

Zur Ermittlung des Serin- und Threoningehaltes diente die im Abschnitt 11 beschriebene Lösung. Die Oxydation dieser Aminosäuren mit H₂IO₄ — das Prinzip dieser Methode — liefert Glyoxalsäure, Ammoniak und Formaldehyd resp. Acetaldehyd. Der Acetaldehyd, der in wässriger Lösung nur sehr schwach hydratisiert ist, kann durch Durchlüftung der Reaktionslösung quantitativ in vorgelegte Natriumhydrogensulfatlösung gebracht werden und dient so zur Bestimmung des Threonins. Der Formaldehyd, der erst bei 100° mit Wasserdampf abgetrennt werden kann, reagiert teilweise mit dem in Myoglobin in hohem Prozentsatz enthaltenen Histidin, so dass das Serin, dessen Gehalt in Tab. 6 wiedergegeben wird, als Differenz aus dem gebildeten Ammoniak (Berücksichtigung des präformierten Ammoniaks) und des Acetaldehyds bestimmt wurde.

14. Bestimmung der Dicarbonsäuren.

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, ist es möglich, Glutaminsäure und Asparaginsäure mit Hilfe der Elektrodialyse aus einem mit H₂SO₄ dargestellten Hydrolysat abzutrennen. Das Verfahren, das demnächst veröffentlicht werden wird, wurde von Macpherson ausgearbeitet.

Aus einem auf diese Weise bereiteten Hydrolysat wurde zuerst H₂SO₄ entfernt und dann die Basen nach der oben erwähnten Methode abgetrennt und bestimmt. Die basenfreie Lösung wurde nun durch Elektrodialyse in Dicarbonsäure- und Restlösung aufgeteilt. Nachdem der Gesamtstickstoff der Dicarbonsäuren ermittelt worden war, wurde ein aliquoter Teil dieser Lösung mit Ninhydrin nach van Slyke (l. c.) decarboxyliert. Da

¹⁾ A. C. Chibnall, M. W. Rees und E. F. Williams. Biochem. J. 37, 375 (1943).

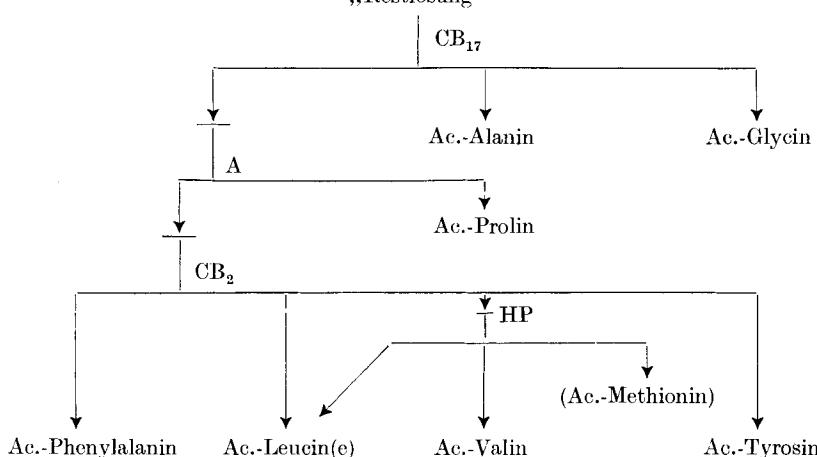
dabei bekanntlich Glutaminsäure¹⁾ 1 Mol., Asparaginsäure aber 2 Mol. CO₂ liefert, kann auf Grund des Verhältnisses der total gebildeten CO₂ zum Stickstoff, den die decarboxylierten Säuren enthielten, der prozentuale Anteil der Glutaminsäure resp. Asparaginsäure gefunden werden.

15. Bestimmung von Glykokoll, Alanin, Prolin, Phenylalanin, Leucin²⁾, Valin und Tyrosin.

Ein aliquoter Teil (1,7—2,0 mg N enthaltend) der unter 14. erhaltenen säure- und basenfreien Lösung wurde acetyliert und die gebildeten Acetylaminosäuren nach dem von Tristram (l. c.) entwickelten Verfahren getrennt. Dieses soll durch das in Tab. 5 wieder-gegebene Schema dargestellt werden. Die einzelnen Fraktionen wurden mit n/70 NaOH und Bromthymolblau als Indikator titriert. Zur Kontrolle wurde danach auch ihr Stickstoffgehalt nach Kjeldahl ermittelt.

Tabelle 5.

Acetylierte
„Restlösung“



CB₁₇ = Chloroform, das 17 Vol.-% n-Butanol enthält.

CB₂ = Chloroform, das 2 Vol.-% n-Butanol enthält.

A = Äthylacetat.

HP = Cyclohexan, das 5 Vol.-% Propanol enthält.

Alle Lösungsmittel sind mit Wasser gesättigt. Die rechtsstehenden Fraktionen weisen in den Kolonnen die kleinsten Bewegungsgrößen auf. Methionin wird nur teilweise zurückgehalten.

Die Ergebnisse der Analyse des aus dem Wal-myoglobin dargestellten Globins sind in Tab. 6 zusammengestellt. Interessanterweise ist die Zusammensetzung des Wal-myoglobins derjenigen des Pferdemyglobins³⁾ sehr ähnlich.

¹⁾ Nach den bis jetzt gemachten Beobachtungen kommt β -Oxy-glutaminsäure nicht als Eiweissbaustein vor; *K. Bailey, A. C. Chibnall, M. W. Rees und E. F. Williams, Biochem. J.* **37**, 360 (1943).

²⁾ Die Leucinfaktion enthält Leucin und Iso-Leucin. Diese können nach *S. E. Darmon, B. B. M. Sutherland und G. R. Tristram, Biochem. J.* **42**, 508 (1948), getrennt bestimmt werden. Stehen grössere Mengen Protein zur Verfügung, so kann Iso-Leucin nach *Albanese und Irby, Archives Biochem.* **17**, 21 (1948), bestimmt werden.

³⁾ *G. R. Tristram, Adv. Protein Chem.* **5**, im Druck.

Tabelle 6.

Aminosäurezusammensetzung des aus Wal-myoglobin dargestellten Globins.

Gesamtstickstoff: 17,00% (feuchtigkeits- und aschenfrei)

Gesamtschwefel: 0,40%

Endgruppe: 1 Mol. Valin pro 17000 (freie α -NH₂-Gruppe).

Der Prozentgehalt der Aminosäuren ist in Prozent Stickstoff des Gesamtstickstoffs ausgedrückt.

Aminosäure	% N	Aminosäure	% N
Arginin	4,25	Glykokoll	4,44
Histidin	17,78	Alanin	7,82
Lysin	17,94	Prolin	1,70
Glutaminsäure . . .	9,74	Phenylalanin	1,98
Asparaginsäure . . .	3,98	Leucin(e)	11,30
Amid-N.	3,35	Valin	2,64
Methionin	1,03	Tyrosin	0,96
Tryptophan	2,10	Cyst(e)in	0,00
Serin	2,12	Oxyprolin	0,00
Threonin	2,95	Oxylysin	0,00
Total gefunden . . .			96,08

Zusammenfassung.

1. Es wurde der Einfluss der schwefelhaltigen Aminosäuren auf die Tryptophanbestimmung nach *Graham* und Mitarbeitern untersucht.

2. Der Gehalt jeder im Wal-myoglobin enthaltenen Aminosäure wurde ermittelt.

Die Ausführung dieser Arbeit wurde mir durch die Erteilung eines grosszügigen Stipendiums der *Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie* ermöglicht. Dem Stiftungsrat, sowie Herrn Prof. *A. C. Chibnall*, F.R.S., der die Anregung zu dieser Arbeit gab und in dessen Institut sie ausgeführt wurde, sei auch an dieser Stelle für ihre Unterstützung bestens gedankt. Den Herren Dr. *H. T. Macpherson*, *M. W. Rees* und Dr. *G. R. Trippon* möchte ich auch hier für ihre wertvolle Hilfe meinen Dank aussprechen.

School of Biochemistry,
University of Cambridge, England.