

Zur Kenntnis des Ricins*.

Von

A. Holasek, H. Lieb und W. Merz.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und Pregl-Laboratorium
der Universität Graz.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 17. Oktober 1955.)

Ricin, das toxische Protein des Ricinussamens, wurde so weit isoliert, daß es dem elektrophoretischen Verhalten nach über 90% eines von uns als Fraktion D bezeichneten Präparates ausmacht. Kontrollbestimmungen während der Präparation zeigten, daß mit zunehmender Reinheit die spezifische Drehung und der Schwefelgehalt des Produktes abnehmen. Es wurden die am Aufbau beteiligten Aminosäuren papierchromatographisch identifiziert und als endständige Aminosäuren mit freier Aminogruppe Isoleucin und Methionin gefunden. Die Lösung des Ricinpräparates verliert beim Lagern im Kühlschrank an Toxizität. Gleichzeitig treten elektrophoretisch nachweisbare neue Komponenten auf, es steigt die spezifische Drehung und es verändert sich die Lichtabsorption im ultravioletten Bereich.

Der Samen der Ricinuspflanze, der bekanntlich zur Ölgewinnung verwendet wird, enthält auch reichlich Eiweißkörper, so daß sich der bei der Ölgewinnung anfallende Preßkuchen als Futtermittel eignen würde, wenn darin nicht das toxische Protein *Ricin* enthalten wäre. Dieser Eiweißkörper ist nämlich nicht nur bei parenteraler Zufuhr giftig, sondern entfaltet auch bei der Verfütterung eine ziemlich starke Giftwirkung. Noch 0,14 m μ Ricin töten bei intraperitonealer Injektion eine 20 g schwere Maus. Die Zufuhr kleiner Mengen, wie dies durch Einatmen des Staubes beim Umgang mit dieser Substanz fast unvermeidlich ist, führt zu einer Überempfindlichkeit, die den Experimentator sogar

* Herrn Prof. Dr. A. Hafferl zum 70. Geburtstag gewidmet.

behindern kann, die Arbeit mit Ricin fortzusetzen. Die Erforschung des Giftstoffes ist schon in der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts in Angriff genommen worden.

Der Name Ricin stammt von *Stillmark*¹, dem es im Jahre 1889 gelang, die giftige Substanz in einer Eiweißfraktion des Ricinussamens anzureichern. *M. Jacoby*² glaubte auf Grund seiner Untersuchungen annehmen zu können, daß es sich bei dem Gift zwar um eine hochkomplexe Verbindung, jedoch nicht um ein Protein im gewöhnlichen Sinne handle. In der Folge versuchte man nun verschiedentlich, die toxische Komponente vom Eiweiß zu trennen. *A. Cushny*³ konnte jedoch feststellen, daß mit der Zerstörung des Proteins auch die Toxizität schwindet. Dasselbe fanden auch *T. B. Osborne*, *L. B. Mendel* und *I. F. Harris*⁴, die die Proteine des Ricinussamens in verschiedene Fraktionen trennten. Ihre Präparationsmethode bildete die Grundlage fast aller späteren Darstellungen von Ricin. *P. Karrer*⁵ konnte in Verdauungsversuchen zeigen, daß die Giftigkeit seines Ricinpräparats mit zunehmender Spaltung abnimmt. Daher nimmt er an, daß die Giftigkeit auf eine bestimmte Atomgruppierung im Eiweißmolekül zurückzuführen sei. Er untersuchte auch nach den früher üblichen Methoden die Aminosäuren des Ricins.

In neuerer Zeit gelang es *M. Kunitz* und *M. R. MacDonald*⁶, das toxische Protein Ricin in kristallinischer Form darzustellen. Ihr Präparat schien in der Ultrazentrifuge und elektrophoretisch einheitlich zu sein, die Löslichkeitsversuche zeigten jedoch, daß auch in ihrem Präparat mindestens zwei Komponenten enthalten sind.

Auf der Suche nach der Ursache der starken Giftigkeit von Ricin fanden *E. Le Breton* und *Y. Moulé*⁷, daß es eine beträchtliche proteolytische Wirksamkeit besitzt. Sie vermuten, daß darauf die Toxizität beruhe. Wenn man von den ersten Untersuchungen *P. Karrers*⁵ absieht, war es lediglich *Y. Moulé*⁸, die einige grundlegende Resultate über die chemische Zusammensetzung des Ricins veröffentlichte. Im nachfolgenden werden einige Ergebnisse unserer bisherigen Versuche mitgeteilt.

¹ *Stillmark*, Arch. pharmakol. Inst. Dorpat **3**, 59 (1889).

² *M. Jacoby*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **1901**, 28.

³ *A. Cushny*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **41**, 439 (1898).

⁴ *T. B. Osborne*, *L. B. Mendel* und *I. F. Harris*, Amer. J. Physiol. **14**, 258 (1905).

⁵ *P. Karrer*, *A. P. Smirnoff*, *H. Ehrenspurger*, *J. v. Srooten* und *M. Keller*, Z. physiol. Chem. **135**, 129 (1924).

⁶ *M. Kunitz* und *M. R. MacDonald*, J. Gen. Physiol. **32**, 25 (1948).

⁷ *E. Le Breton* und *Y. Moulé*, Bull. soc. chim. biol. **31**, 94 (1949); C. r. acad. sci., Paris **229**, 305 (1949).

⁸ *Y. Moulé*, Bull. soc. chim. biol. **33**, 1461, 1467 (1951); Arch. sci. physiol. **5**, 227 (1951).

Isolierung von Ricin.

Die zur Isolierung von Ricin verwendete Methode basiert auf den Angaben von *T. B. Osborne*, *L. B. Mendel* und *I. F. Harris*⁴ sowie *Y. Moulé*⁸ und setzt sich aus folgenden Arbeitsgängen zusammen: 1. Mahlen und Entfetten der Bohnen*, 2. Extraktion der Eiweißkörper aus dem Mehl mit 10%iger Kochsalzlösung, 3. Gewinnung aller Eiweißkörper durch Fällung mit Ammoniumsulfat, 4. Isolierung des Ricins durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat.

Beim Aussalzen verhält sich das Ricin wie ein Globulin; denn es fällt schon, wenn die Lösung mit Ammoniumsulfat halb gesättigt ist. Dadurch, daß man die Lösung zu einem Drittel mit Ammoniumsulfat sättigt, lassen sich verschiedene nicht toxische Globuline entfernen. Nach dem Zentrifugieren setzt man zur klaren, überstehenden Lösung festes Ammoniumsulfat zu, bis sie halbgesättigt ist, und erhält auf diese Art im Niederschlag eine Fraktion, in der fast die gesamte Menge Ricin enthalten ist. Diese Fraktion wird aufgelöst und dialysiert, wobei sich ein Niederschlag bildet, der aber nicht aus Ricin besteht. Ricin ist nämlich auch in salzfreiem Wasser gut löslich. Durch wiederholte Fällung, Auflösen des Niederschlages in immer kleineren Mengen Wasser und anschließende Dialyse wurde schließlich ein sehr toxisches Ricinpräparat gewonnen, das als Fraktion D bezeichnet wird. Weitere Umfällung führte zu keinem toxischeren Produkt.

Die Prüfung der Giftigkeit an Mäusen und Ratten zeigte, daß unser Präparat D mit dem kristallisierten Ricin durchaus vergleichbar ist. Eine 20 g schwere Maus wird bei peritonealer Injektion durch 1,5 μ schon innerhalb von 24 Std. getötet.

Elektrophorese.

Die papierelektrophoretische Untersuchung des Ricins wurde auf Papier 2043 b der Fa. Schleicher & Schüll im Elphor H durchgeführt. Als Lösung diente ein *Michaelis*-Puffer von pH 8,6 und einer Ionenstärke von 0,05. Die Auswertung erfolgte nach Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B photometrisch am Papier.

Die Untersuchung einer frisch bereiteten Lösung der Fraktion D zeigte, daß diese neben einer Hauptkomponente, die über 90% ausmacht, noch zwei rascher wandernde Komponenten enthält, daß also das Präparat noch nicht ganz rein war.

Läßt man eine sterile Lösung der Fraktion D einige Monate im Kühl schrank bei 1 bis 3° C stehen, so bildet sich ein Niederschlag von denaturiertem Protein. Zentrifugiert man diesen ab und untersucht die über

* Wir danken auch an dieser Stelle der Deutschen Rizinus Ölfabrik, Boley & Co., Krefeld-Uerdingen, die unsere Arbeit durch Überlassung von Ricinussamen unterstützt hat.

stehende klare Lösung elektrophoretisch, so findet man neben der Hauptkomponente, die jetzt nur mehr etwa 70% ausmacht, noch vier Nebenkomponenten, die rascher wandern. Man kann annehmen, daß diese Nebenkomponenten aus denaturierten Ricinmolekülen, vielleicht unter dem Einfluß des proteolytisch wirksamen Ricins, entstanden sind (Abb. 1 a und b).

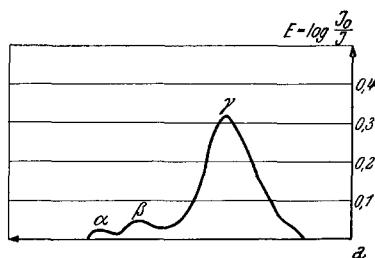


Abb. 1 a.

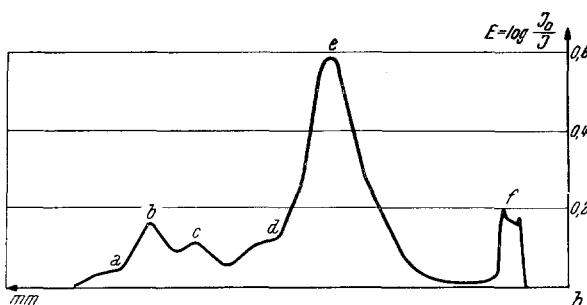


Abb. 1 b.

Photometrische Auswertung der Papier-Elektrophorese von Fraktion D.
Elphor H, Schleicher & Schüll 2043 b.

a) Frische Lösung, b) 4 Monate gelagerte Lösung.

Spezifische Drehung.

Unter Zugrundelegung des Faktors 6,25 (entsprechend dem angenommenen Gehalt von 16% Stickstoff) für die Umrechnung vom Stickstoff auf Eiweiß fanden wir bei unserer Fraktion D eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20^\circ} = -27,5^\circ$. Interessant war die Beobachtung, daß mit zunehmender Reinheit des Präparats die Drehung abnimmt. So hat das Rohprodukt nach der erstmaligen Fällung mit halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20^\circ} = -46,5^\circ$ und nach zweimaliger Fällung $[\alpha]_D^{20^\circ} = -34,3^\circ$. Von den bisher untersuchten Ricinpräparaten hat nur das kristallisierte Ricin eine kleinere

spezifische Drehung, die von *E. A. Kabat, M. Heidelberger* und *A. E. Bezer*⁹ mit $[\alpha]_D^{20^\circ} = -26,5^\circ$ angegeben wurde. So scheint die optische Aktivität ein gutes Kriterium für die Reinheit zu sein.

Die bereits elektrophoretisch untersuchte, durch Monate im Kühlschrank aufbewahrte Lösung der Fraktion D zeigte eine allmählich zunehmende Drehung. Die spezifische Drehung erreichte im Extremfall $[\alpha]_D^{20^\circ} = -49^\circ$. Hierfür ist neben der Denaturierung wahrscheinlich auch das Entstehen von Spaltprodukten verantwortlich zu machen.

Lichtabsorption.

Auch die Lichtabsorption im ultravioletten Bereich wurde sowohl bei einer frisch bereiteten als auch bei einer im Kühlschrank aufbewahrten Lösung untersucht. Der pH-Wert betrug in beiden Fällen 5,5 und die Proteinkonzentration 0,925 g pro Liter (aus dem Stickstoffgehalt mit dem Faktor 6,25 berechnet). Die Aufnahme erfolgte mit einem *Beckman-Spektralphotometer* bei einer Schichtdicke von 1 cm.

Die Absorptionskurve der frischen Lösung stimmt im wesentlichen mit denen anderer Eiweißkörper überein. Man sieht eine scharf ausgeprägte Bande, die bei $3580 \text{ } \nu'$ ein Maximum und bei $3980 \text{ } \nu'$ ein Minimum aufweist. Das Maximum entspricht der Überlagerung der Tyrosin- und Tryptophanabsorption (Abb. 2a).

Die Absorptionskurve der im Kühlschrank gelagerten Lösung zeigt das Minimum etwas gegen Violett verschoben ($4020 \text{ } \nu'$). Das Maximum zeigt eine eindeutige Verbreiterung gegen lange Wellen und reicht von 3580 bis $3650 \text{ } \nu'$ (Abb. 2b). Es soll hier auf die Deutung dieser Erscheinung nicht näher eingegangen werden.

Elementaranalyse.

Die Elementaranalyse des mit Aceton aus wässriger Lösung gefällten Präparats D ergab nach Trocknung bei 105°C folgende Werte:

C	51,0 %
H	7,75%
O	24,55%
N	15,63%
S	1,20%

Der Sauerstoff wurde nach *J. Unterzaucher*¹⁰ bestimmt und nicht aus der Differenz berechnet.

⁹ *E. A. Kabat, M. Heidelberger* und *A. E. Bezer*, *J. Biol. Chem.* **168**, 629 (1947).

¹⁰ *J. Unterzaucher*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **73**, 391 (1940); *Mikrochem.* **36/37**, 706 (1951).

Es ist üblich, die Eiweißmenge einer Lösung aus dem Stickstoffgehalt zu berechnen. Danach müßte man bei unserem Ricinpräparat mit dem Faktor 6,4 rechnen. Trotzdem verwenden wir immer 6,25, um bessere Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Autoren zu haben.

Die Schwefelbestimmung verschiedener von uns dargestellter Ricinpräparate zeigte, daß mit zunehmender Reinheit der Schwefelgehalt

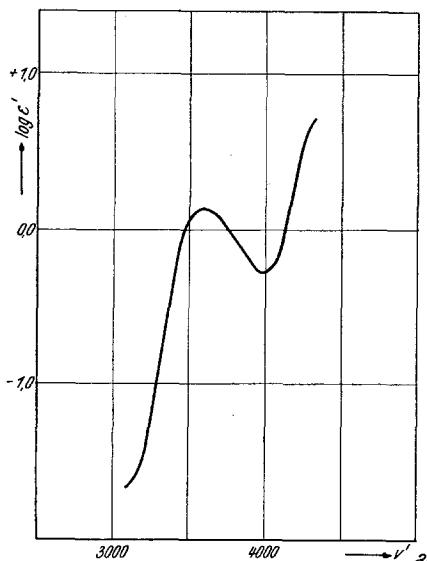


Abb. 2 a.

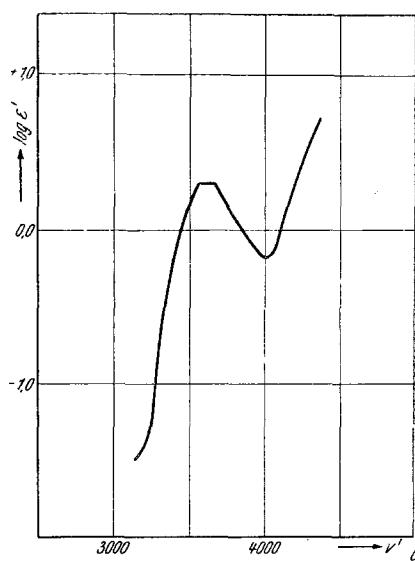


Abb. 2 b.

UV-Absorptionskurve der Fraktion D.
a) Frische Lösung, b) 4 Monate gelagerte Lösung.

abnimmt. Während das nach der ersten Fällung mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewonnene Rohprodukt 1,9% S aufwies, fanden wir nach zweimaliger Fällung 1,5% und bei der Fraktion D 1,2% Schwefel. Auch mehrmalige Umfällung der Fraktion D führte zu keinem Produkt mit geringerem Schwefelgehalt.

Die Versuche von *M. Kunitz* und *M. R. MacDonald*⁶ zeigten, daß auch beim Ricin durch die Kristallisation, Elektrophorese und Ultrazentrifuge noch keine ausreichenden Beweise für die Einheitlichkeit des Eiweißkörpers erbracht werden können. War doch ihr kristallisiertes Präparat, obwohl es elektrophoretisch und in der Ultrazentrifuge einheitlich erschien, im Löslichkeitsversuch inhomogen. Bei den Versuchen, ein möglichst reines Ricinpräparat darzustellen, fanden wir nun Kriterien, die bei der laufenden Präparation Aufschluß über den Fortgang der Reinigung geben können. Die Bestimmung der spezifischen Drehung sowie des Schwefelgehaltes scheinen die raschste und sicherste Methode

zur Kontrolle der Präparation zu sein. Der Toxizitätsversuch ist zeitraubend und sehr ungenau, da 10% Verunreinigung kaum feststellbar sind.

Aminosäuren.

Die Fraktion D wurde mit Aceton gefällt, bei 105° C getrocknet und der Hydrolyse mit 5,5 n HCl unterworfen. Als Gefäß diente eine mit einer Schliffkappe und Hahn versehene Eprouvette. Nachdem man das zu hydrolysierende Präparat und die Salzsäure in das Gefäß gebracht hat, evakuierter man es mit einer Wasserstrahlpumpe, schließt den Hahn und gibt es auf 12 Stdn. in ein Bad von 110° C. Im Hydrolysat konnte nach dem Abzentrifugieren der Huminsubstanzen deren Stickstoffgehalt zu 0,24% der Einwaage ermittelt werden. Als Ammoniakstickstoff fanden wir nach der Methode von *E. J. Conway*¹¹ 1,36% der Einwaage.

Das Hydrolysat wurde im Vak. eingedampft, mit Wasser aufgenommen und wieder im Vak. eingedampft. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Vorganges wurde das Aminosäuregemisch in 10%igem Isopropanol gelöst und dann die papierchromatographische Trennung vorgenommen. Es wurden Durchlaufchromatogramme hergestellt unter Verwendung des Papiers von Schleicher & Schüll 2043 b. Als Lösungsmittel diente das von *S. M. Partridge*¹² angegebene Gemisch in etwas modifizierter Form: 400 ml n-Butanol, 25 ml Eisessig und 575 ml Wasser wurden kräftig geschüttelt, 24 Stdn. stehen gelassen und die obere Schicht verwendet. Das Gemisch eignete sich sehr gut und zeigte selbst nach einer Laufzeit von 150 Stdn. keine Entmischung. Die Aminosäuren wurden mit Ninhydrin angefärbt. Die Abb. 3a zeigt ein Chromatogramm nach 50stündig. Laufzeit, Abb. 3b die fünf am langsamsten wandernden Aminosäuren nach 144stündig. Laufzeit.

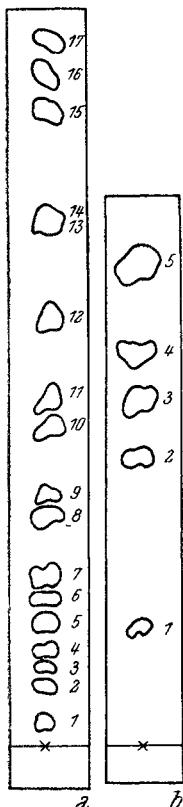


Abb. 3. Papierchromatische Trennung der Aminosäuren.
Schleicher & Schüll 2043 b, Butanol-Eisessig-Wasser (16:1:23).
a) Nach 50stündiger Laufzeit, b) nach 144stündiger Laufzeit.

Bei dem mit den Zahlen 13 und 14 bezeichneten Fleck mußte geklärt werden, ob es sich um Valin oder Methionin oder um beide Aminosäuren handelt. Zur Klärung dieser Frage versuchten wir, die von *C. E. Dalglish*¹³ angegebene Methode zur Sichtbarmachung des Methionins heranzuziehen. Durch Besprühen des Papierchromatogramms mit einer Lösung, die 1%ig an Kaliumpermanganat und 2%ig an Natriumkarbonat ist, soll das Methionin als gelber Fleck auf violettem Hintergrund sichtbar sein.

¹¹ *E. J. Conway* und *E. O'Malley*, Biochemic. J. **36**, 655 (1942).

¹² *S. M. Partridge*, Biochemic. J. **42**, 238 (1948).

¹³ *C. E. Dalglish*, Nature **166**, 1076 (1950).

Unsere Versuche ergaben, daß einerseits die 1%ige Permanganatlösung zu konzentriert, eine nur 0,05%ige jedoch brauchbar ist. Andererseits färbten sich Papierstreifen, bei denen Butanol-Eisessig als Lösungsmittel verwendet wurde, nach dem Besprühen mit Permanganat vollständig braun, so daß der Methioninfleck nicht sichtbar war. Aus diesem Grunde verwendeten wir als Lösungsmittel n-Butanol-konz. Ammoniak im Volumsverhältnis 98:2. Die Trennung der Aminosäuren mit diesem Gemisch war schlechter als mit dem nach *Partridge*; Methionin und Valin waren jedoch von den anderen getrennt und lagen wieder beisammen, wie durch Modellversuche festgestellt wurde. Nach dem Besprühen mit 0,05%iger Kaliumpermanganatlösung war Methionin als gelber Fleck sichtbar. Nach etwa 5 Min. verblaßt der Fleck. Nun lassen sich alle Aminosäuren mit Ausnahme des Methionins trotz der Behandlung mit Permanganat durch Ninhydrin anfärbten. Auf diese Art konnte festgestellt werden, daß der Fleck auf die Anwesenheit von Valin und Methionin zurückzuführen ist.

Die einzelnen Aminosäuren wurden dabei nicht nur auf Grund ihres R_f -Wertes, sondern auch durch Zusatz der fraglichen Aminosäure zum Hydrolysat und Beachtung der Verstärkung des Fleckes identifiziert. Schließlich wurde ein

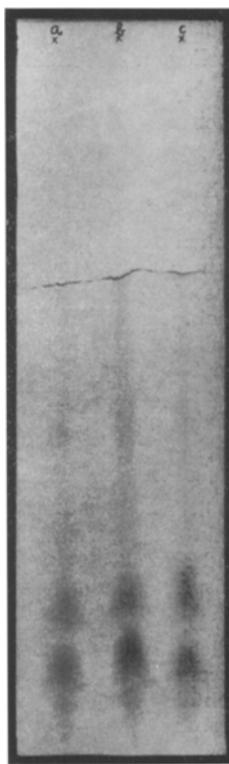


Abb. 4. Chromatogramm des DNP-Hydrolysates.
Schleicher & Schüll 2043 b. 50% sec. Butanol, 30% Methylacetat,
16% 0,5 n HCl, 4% Isopropylchlorid.
a) Reines Hydrolysat, b) Hydrolysat + DNP-Isoleucin,
c) Hydrolysat + DNP-Methionin.

aus den gefundenen Aminosäuren hergestelltes Gemisch der Papierchromatographie unterworfen und das Chromatogramm mit dem des Hydrolysats verglichen.

Am Aufbau des Ricins sind also folgende Aminosäuren beteiligt, wobei die Reihenfolge den R_f -Werten entspricht: Cystin (oder Cystein), Lysin, Histidin, Arginin, Asparaginsäure, Glykokoll, Serin, Glutaminsäure, Threonin, Alanin, Prolin, Tyrosin, Methionin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin und Leucin. Dazu kommt noch Tryptophan, das direkt im Eiweiß nachgewiesen und quantitativ bestimmt wurde. Über die quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Ricin, an der gearbeitet wird, soll gegebenenfalls berichtet werden.

Bestimmung der Amino-Endgruppen.

Zur Bestimmung der endständigen Aminosäure, deren Aminogruppe frei ist, wurde die Methode von *F. Sanger*¹⁴ verwendet. Das Protein wird mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol (DNFB) unter milden Bedingungen umgesetzt und anschließend hydrolysiert. Dabei bleibt der Dinitrophenylrest an den freien Aminogruppen haften, so daß nach der Hydrolyse neben den freien Aminosäuren auch Dinitrophenyl-(DNP)-Aminosäuren vorliegen. Wenn Lysin als Eiweißbaustein vorhanden ist, so findet man im Hydrolysat neben der DNP-Aminosäure, die endständig war, immer auch ϵ -DNP-Lysin.

Zu 115 mg Fraktion D, gelöst in 10 ml Wasser, wurden bei 37° C unter Schütteln 50 mg Natriumbicarbonat und 115 mg DNFB in 10 ml Äthanol zugesetzt. Nachdem man die trübe Lösung 72 Stdn. bei Zimmertemp. stehen ließ, wurde der Alkohol bei Zimmertemp. im Vak. entfernt, die Suspension mit Wasser quantitativ in einen Scheidetrichter gebracht und mit wassergesättigtem n-Butanol so oft ausgeschüttelt, bis das Butanol farblos blieb. Im Butanol findet man nun das gesamte überschüssige DNFB. Die trübe wäßrige Lösung wurde mit verd. Salzsäure neutralisiert und im Vak. zur Trockene eingeengt. Nachdem man den Rückstand mehrmals mit Eiswasser und dann mit Alkohol und Äther gewaschen hat, trocknet man ihn wieder im Vak. Ausbeute 123,5 mg DNP-Protein.

100 mg des DNP-Substitutionsproduktes werden in dem früher genannten Hydrolysiergefäß mit 10 ml 12 n HCl versetzt und nach Evakuierung durch 16 Stdn. bei 110° der Hydrolyse unterworfen. Der Inhalt wird dann im Vak. bei 50° eingedampft, der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen und dreimal in einem Scheidetrichter mit Äther ausgeschüttelt. Die wäßrige Lösung enthält das ϵ -DNP-Lysin.

Die vereinigten ätherischen Lösungen werden eingedampft und der Rückstand in 3 ml Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde der papier-chromatographischen Trennung unterworfen. Papier der Fa. Schleicher & Schüll 2043 b tränkt man mit Phthalatpuffer von pH 6 (50 ml 0,1 m Kaliumbiphenolat + 45,5 ml 1 n NaOH) und trocknet es an der Luft. Als Lösungsmittel dient das von *K. Felix* und *A. Krekels*¹⁵ angegebene Gemisch, bestehend aus 50% sek. Butanol, 30% Methylacetat, 16% 0,5 n HCl und 4% Isopropylchlorid. Es wurde absteigend chromatographiert.

Gleichzeitig mit dem Hydrolysat ließen wir verschiedene DNP-Aminosäuren, die nach *R. R. Porter* und *F. Sanger*¹⁶ dargestellt wurden, mitlaufen. Die Chromatogramme untersuchten wir im sichtbaren und ultravioletten Licht ohne Anfärbung und fanden gelbe Flecken, entsprechend R_f -Werten von 0,77, 0,86 und 0,90 (Abb. 4). Im ultravioletten Lichte zeigten diese Flecken eine starke Lösung. Die Lage entsprach DNP-Methionin, DNP-Isoleucin sowie 2,4-Dinitrophenol. Das letztgenannte konnte nicht nur mit Hilfe eines Leitchromatogramms, sondern auch dadurch identifiziert werden,

¹⁴ *F. Sanger*, Biochemic. J. **39**, 507 (1945).

¹⁵ *K. Felix* und *A. Krekels*, Z. physiol. Chem. **290**, 78 (1948).

¹⁶ *R. R. Porter* und *F. Sanger*, Biochemic. J. **42**, 287 (1948).

daß sein Fleck durch Besprühen mit 2 n HCl zum Verschwinden gebracht werden kann. Die DNP-Aminosäuren behalten auch im stark sauren Milieu ihre gelbe Farbe.

Demnach ergab die Untersuchung, daß Isoleucin und Methionin als endständige Aminosäuren mit freier Aminogruppe in Betracht kommen. Inwiefern eine von diesen den elektrophoretisch festgestellten, weniger als 10% ausmachenden Nebenkomponenten entstammt, konnte im Rahmen dieser Arbeit wegen der ungenügenden Reinheit des Präparats nicht geklärt werden. An der Darstellung eines reinen Präparats wird gearbeitet.