

# Über die freien Amidogruppen der Eiweißkörper.

## II. Mitteilung.

Von

S. Edbacher.

---

(Aus dem physiologischen Institut Heidelberg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 6. November 1919.)

---

In Verfolgung der in der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> dargelegten Methode teile ich hier die Ergebnisse der weiteren Versuche mit.

### Pepsinversuche.

Es war naheliegend, zunächst zu ermitteln, wie sich im Gegensatze zur Säurehydrolyse und zur tryptischen Verdauung das Pepsin verhalten würde.

Es wurden daher Versuche in dieser Richtung mit Gelatine und Casein ausgeführt. Auch hier schien es mir wieder von Vorteil, in möglichst geringen Konzentrationen zu arbeiten, um klare Resultate zu erhalten.

Bevor ich auf die Ergebnisse der Versuche eingehe, seien diese selbst beschrieben.

Es wurden z. B. 1 g Pepsin (Grübler) in 1 Liter 0,21% iger Salzsäure gelöst und nun je 1 g Gelatine in je 100 ccm dieser Lösung angesetzt. Unter Zusatz von etwas Toluol wurden die Proben bei 37° im Brutschrank die angegebene Zeit digeriert, dann genau neutralisiert.

Es gelangten von dieser neutralen Lösung je 20 cm<sup>3</sup> zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl und 20 cm<sup>3</sup> zur Formoltitration; 10 cm<sup>3</sup> wurden mit 0,5 g Dimethylsulfat und 5 cm<sup>3</sup> 10% iger Natroulauge 15—20 Minuten geschüttelt, dann mit

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 52 (1919).

10%iger Salzsäure neutralisiert bzw. schwach angesäuert. Nun wurde genau auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnt und von dieser verdünnten Lösung 1 cm<sup>3</sup> zur N-Methylbestimmung im Quarzkölbchen unter Zusatz von Goldchlorid eingedampft. Die Behandlung und Ermittlung der Werte ist also bis auf die Bereitung der Verdauungslösung ganz gleich wie bei den früher beschriebenen Versuchen<sup>1)</sup>.

Pepsinverdauung der Gelatine.

Zeit in Stunden	% Formol Stickstoff vom Gesamtstickstoff	CH <sub>3</sub> -Gruppen auf je 100 Atome Gesamtstickstoff	$\frac{\text{N-Methylzahl}}{\text{Formolzahl}}$
0	4	15	3,7
16	5,45	14,5	2,7
120	9,78	20,6	2,1
290	10,66	19,4	1,81

Pepsinverdauung des Caseins.

Zeit in Stunden	% Formol Stickstoff vom Gesamtstickstoff	CH <sub>3</sub> -Gruppen auf je 100 Atome Gesamtstickstoff	$\frac{\text{N-Methylzahl}}{\text{Formolzahl}}$
0	5	17	3,4
8	15,6	20,8	1,3
24	19,0	24,9	1,3

Wie zu erwarten war, trat eine Aufspaltung des Proteinkölbchens bei beiden untersuchten Substanzen erst in wesentlich längeren Zeiträumen ein und blieb auch auf einem relativ frühen Zeitpunkte der Hydrolyse stehen. In Analogie mit den Ergebnissen der Säurehydrolyse und der Trypsinspaltung verschiebt sich das ursprüngliche Verhältnis von N-Methylzahl zu Formolzahl zu Gunsten der letzteren. Bemerkenswert ist aber, daß das Sinken des Quotienten bei der Gelatinereihe bei weitem nicht in so typisch kurzer Zeit ( $\frac{1}{2}$  Stunde bei

<sup>1)</sup> l. c.

HCl und Trypsin) erfolgt. Es findet vielmehr hier ein ganz allmählicher Übergang zum konstanten Werte statt.

Bei allen diesen Versuchen über den hydrolytischen Abbau der Proteine sind die Ergebnisse dadurch sehr undurchsichtig, daß es nie gelingt, eine Scheidung zwischen tatsächlich zersetztem und unverändertem Anteile zu machen. Immer ist das Resultat ein Gemenge von abgebauten, peptonisierten und noch tiefer gespaltenem Material, aus dessen Verhalten sehr wenig gefolgert werden kann.

Ganz anders aber würde das Bild sich gestalten, wenn es gelänge, unverändertes Eiweiß aus dem Reaktionsgemenge zu entfernen.

Die einfachste Methode schien mir darin zu bestehen, Proteine auszuwählen, die relativ langsam aufgespalten und außerdem durch Koagulation ausgefällt werden.

Hydrolysiert man z. B. mit kochender Säure, so koaguliert der Eiweißkörper zum größten Teil und kann durch Filtration von dem in Lösung gegangenen Teil getrennt werden. Die erhaltene Lösung muß nun die entstandenen Bruchstücke enthalten, die nun auf diese Art auf ihr Verhalten gegen Formol und Dimethylsulfat geprüft werden können. Die Methode gestaltete sich also folgendermaßen: 1 g des betreffenden Eiweißkörpers wurde mit 100 cm<sup>3</sup> normal Salzsäure durch die angegebene Zeit am Rückflußkühler gekocht. Da die Flüssigkeit stark stößt und schäumt, wurden einige Platinschnitzel und eine geringe Spur Amylalkohol zugesetzt. Dann wurde rasch abgekühlt, durch ein Faltenfilter filtriert und mit 15%iger Natronlauge sorgfältigst neutralisiert (Azolithmin!). Beim Neutralisieren entstand meistens noch eine Spur einer flockigen Trübung, von der ebenfalls abfiltriert wurde.

Es entstanden so nur ganz schwach gelb gefärbte Lösungen, die sich vorzüglich formoltitrieren ließen. Die Kontrolle wurde durch etwas Bismarckbraun auf den gleichen Farbton gebracht. Von diesen Lösungen wurden je 20 cm<sup>3</sup> für die Kjeldahl-, 20 cm<sup>3</sup> für die Formoltitration und 10 cm<sup>3</sup> für die Methylierung abgemessen, wie schon früher beschrieben worden ist.

Ich verzichte darauf, das gesamte analytische Zahlen-



material hier wiederzugeben, und will nur erwähnen, daß die meisten ermittelten Werte durch Kontrollbestimmungen sichergestellt wurden:

#### Säurehydrolyse des Gliadins.

Zeit in Stund.	Gesamt-N in 20 cm <sup>3</sup> in mg	Formol-N in 20 cm <sup>3</sup> in mg	Ag J aus 1 cm <sup>3</sup> der verd.Lösg. in mg	% Formol-N vom Gesamt-N	N-Methyl- zahl	N-Methylzahl Formolzahl
1/2	14,42	7,0	1,67	48,50	69,16	1,4
2	21,70	10,36	2,50	47,74	68,81	1,4
3	24,08	12,60	2,92	52,32	72,42	1,38
6	24,08	14,84	3,33	61,62	82,56	1,34

#### Säurehydrolyse des Zeins<sup>1)</sup>.

1/2	6,02	3,64	—	60,47	—	—
1	10,60	5,60	—	53,30	—	—
2	14,70	6,16	—	41,90	—	—
3	18,90	9,26	—	49,00	—	—
6	21,00	12,32	—	58,62	—	—

Außer Gliadin und Zein wurde noch Casein untersucht, doch geht dasselbe zu schnell vollkommen in Lösung, um den Versuch auf die genügend lange Zeit ausdehnen zu können.

Betrachtet man die in der Tabelle enthaltenen Zahlen, so ergibt sich zunächst aus dem Ansteigen des Gesamtstickstoffs, daß mit fortschreitender Hydrolyse immer konzentriertere Lösungen entstehen. Auch das Verhältnis von N-Methylzahl und Formolzahl bleibt, wie schon in der ersten Abhandlung erwähnt, merkwürdig konstant<sup>2)</sup>.

Als zweite Tatsache ergibt sich, daß in den ersten zwei Stunden Formolzahl und N-Methylzahl beim Gliadin fast auf gleicher Höhe bleiben, während beim Zein im Verlauf der ersten halben Stunde die Formolzahl von 0 auf 60 heraufschnellt und von da ab allmählich bis auf 42 zu sinken beginnt, um dann erst im Laufe der dritten Stunde wieder

<sup>1)</sup> Die N-Methylzahlen wurden nicht bestimmt.

<sup>2)</sup> l. c. S. 71.

anzusteigen. Erst nach 6 Stunden hat sie dann erst annähernd den Stand von 60 wieder erreicht.

Dieses Verhalten läßt verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zu: Man könnte zunächst an die Erscheinung der Plasteinbildung denken, bei der Henriques und Gjaldbäck<sup>1)</sup> mit der Formolmethode ebenfalls eine Abnahme der freien Amidogruppen fanden, doch scheint mir diese Annahme sehr wenig wahrscheinlich. Andererseits wäre es auch denkbar, daß zunächst Gruppen abgespalten werden, die reich an Hexonbasen sind, die bekanntlich nur einen Teil ihres Stickstoffes in formoltitrierbarer Form enthalten. Dagegen spricht der geringe Gehalt an Diaminosäuren der beiden Proteine. So enthält Gliadin: ca. 3% Arginin, 0,6% Histidin und kein Lysin; Zein: 1,5% Arginin, unter 1% Histidin und ebenfalls kein Lysin (nach Osborne).

Eine dritte Erklärungsmöglichkeit wäre die folgende: Das Gleichbleiben der Formol- und N-Methylzahl in den ersten zwei Stunden beruht wahrscheinlich darauf, daß hier zunächst mehr pepton- oder peptidartige Körper in Lösung gehen, deren absolute Menge natürlich zunimmt. Diese Komplexe würden natürlich eine relativ geringe Anzahl freier Amidogruppen besitzen.

Erst nach einer gewissen Zeit beginnt dann die Aufspaltung dieser Sprengstücke in kürzere Ketten, vielleicht Amidosäuren, was aus dem beginnenden Steigen der Werte gefolgert werden muß. Beim Zein gehen dagegen vielleicht anfangs mehr Amidosäuren, später mehr Peptone in Lösung, welche dann erst langsam in Amidosäure zerfallen.

Diese Erklärung der beobachteten Tatsachen wird aber auch noch dadurch schwierig, daß sicherlich auch die Abspaltung von Ammoniak namentlich in den ersten Stadien der Hydrolyse eine größere Rolle spielt.

Inwieweit dies zutrifft, müssen erst neue Versuche ergeben.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 81, S. 439 (1912).

### Versuche mit anderen Proteinen.

Das merkwürdige Phänomen, daß sich durch den Vergleich von Formolstickstoff und N-Methylzahl bei den verschiedenen Eiweißkörpern ergibt <sup>1)</sup>, veranlaßte mich, einige weitere Protein-substanzen in den Kreis dieser Untersuchung zu ziehen.

Es wurde daher das Verhalten von Gliadin, Zein, Cyprinin-sulfat, Thymushistonsulfat und Gadushistonsulfat gegen Formol und Dimethylsulfat untersucht. Es wurden je 100 cm<sup>3</sup> der 1%igen Lösung der genannten 5 Substanzen genau neutralisiert und in je 20 cm<sup>3</sup> Gesamtstickstoff und Formolstickstoff <sup>2)</sup> ermittelt, je 10 cm<sup>3</sup> wurden mit 0,5 g Dimethylsulfat methyliert und von der auf 50 cm<sup>3</sup> verdünnten Lösung 1 cm<sup>3</sup> zur Bestimmung der N-Methylzahl verwendet.

	Gesamt-N in 20 cm <sup>3</sup> in mg	Formol-N in 20 cm <sup>3</sup> in mg	Ag J aus 1 cm <sup>3</sup> in mg	% Formol Stickstoff vom Gesamt- stickstoff	CH <sub>3</sub> Grup- pen auf je 100 Atome Gesamt- stickstoff
Gliadin . . . . .	19,23	0	0	0	0
Zein . . . . .	17,41	0	0	0	0
Cyprinin . . . . .	29,96	5,60	3,16	18,69	62,9
Thymushiston . . . . .	22,96	4,48	0,87	19,52	22,62
Gaduhiston . . . . .	25,96	4,20	1,76	16,18	40,49

Der besseren Übersicht halber seien die in der ersten Abhandlung <sup>3)</sup> mitgeteilten Werte im Verein mit den oben ermittelten hier zusammengestellt. (Siehe Tabelle S. 293.)

Bekanntlich haben schon Z. Skraup <sup>4)</sup> und hauptsächlich A. Kossel <sup>5)</sup> und später v. Slyke und Birchard <sup>6)</sup> auf den Zusammenhang zwischen freien Amidogruppen und Lysin-gehalt hingewiesen. Demgemäß hat auch der lysinreichste

<sup>1)</sup> l. c. S. 69.

<sup>2)</sup> Indikator Phenolphthalein, Stadium: „deutlich rot“.

<sup>3)</sup> l. c. S. 69.

<sup>4)</sup> Monatshefte d. Chemie Bd. 27, S. 631, 653 (1906).

<sup>5)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 81, S. 274 (1912).

<sup>6)</sup> Journ. of Biol. Chem. Bd. 14, S. 539 (1914).



	% Formol-N vom Gesamt-N	N-Methylzahl	Lysingehalt
Gelatine . . . . .	3,4	15	+
Casein . . . . .	5,5	16	+
Edestin . . . . .	3,3	15	+
Gliadin . . . . .	0	0	0
Zein . . . . .	0	0	0
Thymushiston . . . . .	19,5	22,6	+
Gadushiston . . . . .	16,1	40,5	+
Cyprinin . . . . .	18,7	62,9	+
Sturin . . . . .	8,6	24,0	+
Clupein . . . . .	0	24,0	0
Salmin . . . . .	0	9,0	0
Esocin . . . . .	0	0	0
Scombrin . . . . .	0	0	0

Proteinstoff, das Cyprinin, die höchste N-Methylzahl und es ist bemerkenswert, daß Gliadin, Zein, Esocin und Scombrin als lysinfreie Proteine weder Formol, noch methylierbaren Stickstoff enthalten, während alle übrigen mit Ausnahme des Salmis und Clupeins sich sowohl formoltitrieren wie methylieren lassen:

1. Es besteht also bei den vier genannten: Esocin, Scombrin, Gliadin und Zein tatsächlich ein gewisser Parallelismus zwischen Lysingehalt und freien Amidogruppen.

Bei Clupein und Salmin findet eine Abweichung von dieser Regel statt: Diese beiden lysinfreien Proteine enthalten eine größere Zahl von Stickstoffatomen, die durch die Formoltitrierung nicht als freie Amidogruppen, wohl aber als methylierbar gekennzeichnet sind.

Es kann sich hier vermutlich um gewisse bevorzugte Imidbindungen handeln. Auffallend ist nur ihre große Anzahl in den genannten Proteinen.

2. Die Methylierungsmethode zeigt also Unterschiede zwischen Proteinen an, die sich den bisherigen Methoden entzogen haben.

Bei Gelatine, Casein, Edestin, Sturin und Cyprinin entfallen auf je eine formoltitrierbare Amidogruppe 3 bis 5 an N gebundene  $\text{CH}_3$ -Gruppen, was sich ungefähr durch die Vorstellung erklären läßt, daß jede freie  $\text{NH}_2$ -Gruppe in eine  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe übergeht, wobei es aber auch, wie schon Novak<sup>1)</sup> beobachtet hat, zur Bildung von höher methylierten Substanzen kommen kann. Besonders gut stimmt dieses Verhältnis beim lysinreichen Cyprinin. Immerhin wäre es aber möglich, daß auch hier kompliziertere Verhältnisse vorliegen.

Im Gegensatz zu Punkt 2 geben die beiden untersuchten Histone einen relativ viel höheren Gehalt an formoltitrierbarem Stickstoff an als an methylierbarem. Es besteht hier das umgekehrte Verhältnis wie bei Clupein und Salmin.

3. Es scheinen somit im Proteinmoleküle freie Amidogruppen, die sich wohl formoltitrieren, nicht aber völlig mit Dimethylsulfat methylieren lassen, zu bestehen. Es wird dadurch ein neues charakteristisches Verhalten der Histone gekennzeichnet.

In der oben zitierten Arbeit glauben v. Slyke und Birchard gefunden zu haben, daß der freie Amidstickstoff im Proteinmolekül der Hälfte des Lysinstickstoffs gleich sei. Diese Frage soll bei anderer Gelegenheit noch erörtert werden.

<sup>1)</sup> Novak, Ber. d. chem. Ges. Bd. 45, S. 834 (1912).