

Über die Beziehung der freien Aminogruppen zum Lysingehalt der Proteine.

Von

K. Felix.

(Aus dem Institut für Eiweißforschung [Stiftung Behringer], Universität Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 18. Juni 1920.)

Die Ursache des basischen Charakters der Eiweißstoffe ist von großem Interesse für die Erforschung der Bindungsart der Aminosäuren im Proteinmolekül. Die ersten Untersuchungen in dieser Richtung wurden von Skraup¹⁾ angestellt. Er ließ salpetrige Säure auf Casein und Glutin einwirken und fand dann in der Hydrolyse der Derivate kein Lysin mehr. Es war durch die salpetrige Säure zerstört worden. Aus dieser Tatsache schloß er, daß das Lysin im Casein und Glutin in der Weise gebunden sein müsse, daß sich mindestens eine seiner beiden Aminogruppen in reaktionsfähigem Zustand befinde. Kossel und Cameron²⁾ zeigten dann, daß das Arginin derart in das Proteinmolekül eingefügt ist, daß die Guanidingruppe desselben frei ist, daß sie also den basischen Charakter des ganzen Moleküls mitbestimmt.

Diese Basizität der Proteine scheint demnach — wenigstens bis zu einem bestimmten Grade — bedingt zu sein durch die endständige Guanidingruppe des Arginins einerseits und mindestens eine Aminogruppe des Lysins andererseits. Die Frage, ob außerdem noch andere Aminogruppen reaktionsfähig sind, konnte erst angeschnitten werden, nachdem Sö-

¹⁾ Monatshefte der Chemie Bd, 27, S. 631, 653 (1906).

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 75, S. 457 (1912).

rensen¹⁾ seine Formoltitration zu einer exakten Methode der Bestimmung der freien Aminogruppen im unzersetzten Eiweiß ausgearbeitet hatte. Hierbei ist folgendes zu beachten: Das Prolin gibt nach Sörensen¹⁾ ebenfalls einen Ausschlag mit der Formoltitration, obwohl es keine Aminogruppe, sondern nur eine Iminogruppe enthält. Die Reaktion ist aber keine quantitative. Kossel und Gawrilow²⁾ wiesen an den Protaminen der Salmingruppe nach, daß das im Eiweißmolekül gebundene Protein mit Formol nicht reagiert, also keinen Ausschlag bei der Formoltitration des unzersetzten Proteins geben kann. Vom freien Arginin reagiert nur die α -Aminogruppe mit Formol, die Guanidingruppe nicht. Vom Histidin zeigt die Formoltitration nicht, wie zu erwarten wäre, nur ein Drittel des gesamten Stickstoffs an, sondern etwas mehr, etwa 38—40%³⁾. Es muß also das Formol auch am Imidazolring angreifen. Wir haben ebenfalls die Formoltitration des Lysins wiederholt und fanden, daß nicht nur eine, sondern beide Aminogruppen reagieren. Der Formolstickstoff betrug 108% des Gesamtstickstoffs im Lysin. Der geringe Mehrbetrag an Formolstickstoff über den berechneten Wert hinaus ist dadurch zu erklären, daß, wie Sörensen⁴⁾ festgestellt hat, das Lysin bei der Veraschung nach Kjeldahl seinen Stickstoff nicht vollständig abgibt.

Von van Slyke⁵⁾ wurde eine weitere Methode zur Bestimmung der freien Aminogruppen ausgearbeitet. Sie beruht auf der Fähigkeit der salpetrigen Säure, mit primären Aminen — also auch mit freien Aminogruppen — zu reagieren. Diese geben dabei den Stickstoff als Gas ab, der in einer Gasbürette aufgefangen und gemessen wird. Die Resultate an freien Aminosäuren stimmen mit denen der Formoltitration überein. Der Stickstoff der Monoaminosäuren reagiert quantitativ, vom

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 59 (1907).

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 81, S. 274 (1912).

³⁾ Diese Zeitschr.

⁴⁾ Compt. rend. des travaux du Laboratoire de Carlsberg (6. Vol. 1. R. Livraison 1903).

⁵⁾ Ber. Bd. 44, S. 1684 (1911).

Arginin nur die α -Aminogruppe; vom Histidin, wie wir feststellen konnten, ebenfalls mehr als ein Drittel des Gesamtstickstoffs, nämlich 40%.

Durch diese beiden Methoden ist es uns möglich, die Menge der freien Aminogruppen im unzersetzten Eiweiß zu bestimmen, indem man die gefundenen Stickstoffwerte in Prozenten des Gesamtstickstoffs ausdrückt.

Die bereits erwähnte Beobachtung Skraups, daß im Proteinmolekül eine Aminogruppe des Lysins in freiem Zustand vorzukommen scheint, wurde von verschiedenen Forschern aufgegriffen und der Gehalt der Proteine an freien Aminogruppen in eine gewisse Beziehung zu ihrem Lysin-gehalt zu setzen versucht. So haben als erste Kossel und Gawrilow¹⁾ folgende Feststellung gemacht: „Im allgemeinen scheinen die lysinreicheren Protamine auch reicher an formol-titrierbarem Stickstoff zu sein, doch sind die bisher vorliegenden Analysen noch nicht zahlreich genug, um hierüber zu entscheiden. Ein durchgehend proportionales Verhältnis zwischen beiden Größen ist kaum zu erwarten. Ganz abgesehen davon, daß bei Ausdehnung dieser Untersuchungen auf andere Proteine neben der Amidogruppe des Lysins noch andere formol-titrierbare Gruppen gefunden werden können, muß man auch mit der Möglichkeit verschiedenartiger Bedingungen des Lysins rechnen. Auch könnten äußere, nicht mit Zersetzung verbundene Einwirkungen das Proteinmolekül so verändern, daß eine ursprünglich reaktionsfähige Amidogruppe ihre Reaktionsfähigkeit gegen Formol verliert.“ Angeregt durch diese Untersuchungen haben van Slyke und Birchard²⁾ mit Hilfe der vom ersteren ausgearbeiteten Methode andere Eiweißkörper untersucht. Sie kamen dabei zu dem Schluß, daß der Stickstoff der freien Aminogruppen gleich ist der Hälfte des Lysinstickstoffs. Endlich hat Edlbacher³⁾ dieses Problem mit einer ganz andern Methodik angegriffen und

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 81, S. 241 (1912).

²⁾ Journ. of biol. Chem. Bd. 15, S. 539 (1914).

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 52 (1919).

konnte die ursprüngliche Kosselsche Beobachtung bestätigen. Weiter scheint aus seinen Untersuchungen hervorzugehen, daß außer den in Frage kommenden Aminogruppen des Lysins noch andere reaktionsfähige Aminogruppen vorhanden sein müssen, was ja auch Kossel und Gawrilow bereits in den Bereich der Möglichkeit gezogen haben.

Bevor auf eine Kritik der Resultate van Slykes und Birchards eingegangen werden soll, seien die bis jetzt von verschiedenen Autoren ermittelten Befunde in einer Tabelle (S. 221) übersichtlich zusammengestellt. Die Werte für die freien Amidogruppen sind in Beziehung gesetzt zum Lysingehalt der untersuchten Proteine.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die beiden Methoden zur Bestimmung der freien Aminogruppen im unzersetzten Eiweiß Werte ergeben, die annähernd derselben Größenordnung angehören, mit Ausnahme des Edestins. Ferner zeigt sich auch, daß, worauf Kossel zuerst hingewiesen hat, ein Parallelismus besteht zwischen der Menge der freien Aminogruppen und dem Gehalt an Lysin, in der Art, daß die lysin-freien Proteine keine freien Amidogruppen enthalten und daß unter den andern im allgemeinen die reicher an freien Aminogruppen sind, die auch mehr Lysin enthalten. Damit steht auch im Einklang, was Edlbacher durch die Bestimmung der „N-Methylzahl“ bei den verschiedenartigsten Proteinen gefunden hat.

Größere Unstimmigkeiten weist dagegen die Tabelle in den Werten für den Lysingehalt auf; namentlich in jenen Werten, die nach den beiden Methoden — Kossels Pikratmethode und van Slykes Gruppenbestimmung — für ein und dieselben Proteine gefunden wurden. Die letzteren sind wesentlich höher als die nach der Pikratmethode gefundenen. Und zwar ist in diesen Fällen der Gehalt an Lysinstickstoff meistens doppelt so groß als der an freiem Aminostickstoff. Aus diesen seinen Befunden schloß van Slyke, daß nur eine Aminogruppe des Lysins frei ist, die dann den ganzen Betrag an freiem Aminostickstoff im unzersetzten Eiweiß bestreiten müßte. Ferner glaubt er annehmen zu können, daß die Werte,

Tabelle 1.

Autor	Protein	Stickstoff der freien Aminogruppen im unzersetzten Eiweiß in Prozenten vom Gesamtstickstoff		Stickstoff, der im Lysin nach der Hydrolyse des Eiweiß gefunden wird, in Prozenten vom Gesamtstickstoff	
		nach der Formol-titration	durch HNO ₃ in Freiheit gesetzt	nach Kossels Methode	nach van Slykes Methode
Kossel u. Gawrilow ¹⁾	Clupeinsulfat	0		0	
	Salmisulfat	0		0	
	Hordein	0		0	
Kossel u. Gawrilow ¹⁾ van Slyke u. Birchard ²⁾	Zein	0	0	0	0
van Slyke u. Birchard ²⁾ Edlbacher ³⁾	Gliadin	0	1,10	0	0,38
Kossel u. Gawrilow ¹⁾ Kossel u. Gawrilow ¹⁾ Kossel u. Kutscher ⁴⁾ Kossel u. Weiß ⁵⁾ Kossel u. Cameron ⁶⁾	Sturinsulfat	6,4 8,61		8,4 5,5	
Kossel u. Dakin ⁷⁾ Kossel u. Cameron ⁶⁾	Cyprinin I		23,6	30,3	
Kossel u. Kutscher ⁴⁾ Edlbacher ³⁾	Thymus- histon	19,5		8,0	
Kossel u. Kutscher ⁴⁾ Edlbacher ³⁾	Gadushiston	16,1		8,5	
Ed. Hart ⁸⁾ Edlbacher ³⁾ van Slyke ⁹⁾ van Slyke u. Birchard ²⁾	Casein	5,0		6,9 8,7; 9,36	10,30
Ed. Hart ⁸⁾ Edlbacher ³⁾ van Slyke u. Birchard ²⁾	Gelatine	4,0		2,76; 3,05	
Kossel u. Patten ¹⁰⁾ Edlbacher ³⁾ van Slyke u. Birchard ²⁾	Edestin	3,3		1,76; 1,72	
			1,80		3,80

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 81, S. 274 (1912). ²⁾ Journ. of biol. Chem. Bd. 16, S. 539 (1914).

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 52 (1919). ⁴⁾ Ebenda Bd. 31, S. 165 (1901). ⁵⁾ Ebenda Bd. 78, S. 404 (1912). ⁶⁾ Ebenda Bd. 76, S. 457 (1912). ⁷⁾ Ebenda Bd. 40, S. 570 (1904). ⁸⁾ Ebenda Bd. 33, S. 347 (1901). ⁹⁾ Journ. of biol. Chem. Bd. 16, S. 531 (1914). ¹⁰⁾ Diese Zeitschr. Bd. 38, S. 39 (1903).

die er mit seiner Methode findet, richtiger sind, als die mit der Pikratmethode gefundenen.

Die Methode der Stickstoffbestimmung in Gruppen, wie van Slyke¹⁾ seine Methode nennt, besteht darin, daß in der Hydrolysenflüssigkeit alle drei Hexonbasen durch Phosphorwolframsäure gefällt werden. Der Niederschlag wird mit Natronlauge zerlegt und die Phosphorwolframsäure als Bariumsalz entfernt. Die die Basen enthaltende Lösung wird auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Ein aliquoter Teil mit konzentrierter Natronlauge gekocht. Dabei wird das Arginin zerstört und verliert die Hälfte seines Stickstoffs in Form von Ammoniak. Dieses wird in n/10-Säure aufgefangen. Der aus der verbrauchten Säure berechnete Stickstoff beträgt die Hälfte des gesamten Argininstickstoffs. Weiter wird durch die salpetrige Säure im van Slykeschen Apparat der freie Aminostickstoff der Basen bestimmt. Die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff der Basen und dem Aminostickstoff derselben ergibt den Nichtaminostickstoff. Dieser verteilt sich auf Arginin und Histidin nach folgender Gleichung: Histidin-N = $\frac{3}{2}$ (Nichtamino-N - $\frac{3}{4}$ Arginin-N). Da der Argininstickstoff bekannt ist, läßt sich leicht der Histidinstickstoff berechnen. Der Lysinstickstoff wird ebenfalls ausgerechnet nach der Gleichung: Lysin-N = Gesamt-N - (Arg-N + Cystin-N + Hist-N). Das Cystin, welches ebenfalls mit Phosphorwolframsäure gefällt wird, wird durch seinen Schwefel bestimmt.

Zur Aufklärung der Unstimmigkeiten in der Tabelle 1 habe ich auf Anregung von Herrn Prof. Kossel den Lysin-gehalt und die Zahl der freien Aminogruppen bei verschiedenen Proteinen auf das sorgfältigste von neuem bestimmt.

Experimenteller Teil.

Das Eiweiß wurde in der von Kossel angegebenen Weise mit Schwefelsäure hydrolysiert. Nachdem die Hauptmenge

¹⁾ Journ. of biol. Chem. Bd. 10, S. 15 (1911).

der Schwefelsäure durch Baryt weggeschafft war, wurde das Ammoniak entfernt, indem die Hydrolysenflüssigkeit zunächst mit Baryt annähernd neutralisiert und dann durch Zusatz einiger Gramm fein gepulverten Bariumkarbonats alkalisch gemacht wurde. Diese alkalische Reaktion war dann durch die Hexonbasen selbst hervorgerufen. Das Ganze wurde 20 Minuten gekocht. Darnach wurden Arginin und Histidin nach dem bekannten Verfahren durch Silber und Baryt gefällt und der Niederschlag in Säure wieder gelöst, das Silber durch Schwefelwasserstoff entfernt, das Filtrat vom Schwefelsilber auf ein bestimmtes Volumen gebracht und in einem aliquoten Teil der Stickstoff der „durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen“ bestimmt. Das Filtrat von der Silberfällung, in dem das Lysin enthalten sein mußte, wurde ebenfalls angesäuert, das Silber entfernt, auf ein bestimmtes Volumen gebracht und wieder in einem aliquoten Teil der Stickstoff der „durch Silber und Baryt nicht gefällten Substanzen“ bestimmt. Dann wurde es mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Im Filtrat der Phosphorwolframate wurde auf entsprechende Weise der Stickstoff „der durch Phosphorwolframsäure nicht gefällten Substanzen“ (Monoaminosäuren) ermittelt. Das Phosphorwolframat wurde in der von Kossel und seinen Mitarbeitern angegebenen Weise mit Baryt zerlegt und wieder der Stickstoff „der durch Phosphorwolframsäure gefällten Substanzen“ (Maximalzahl des Lysinstickstoffs) gefunden. Das Lysin selbst wurde als Pikrat isoliert und gewogen. Die Mutterlauge vom Lysinpikrat wurde nach Entfernung der Pikrinsäure wieder mit Phosphorwolframsäure und weiter wie bei der ersten Ausfällung behandelt. Dieser Prozeß wurde dreimal wiederholt, um möglichst alles Lysin als Pikrat zu gewinnen. Aus dem Pikrat wurde nach der bekannten Formel der Lysinstickstoff berechnet (Minimalzahl).

Der Stickstoff der freien Aminogruppen wurde in einer 2%igen Lösung des betreffenden Eiweiß in Prozenten vom Gesamtstickstoff bestimmt, und zwar sowohl mit der Formoltitration als auch mit der salpetrigen Säuremethode. Bei letzterer wurde jeweils $\frac{1}{2}$ Stunde lang geschüttelt, weil

nach den Angaben van Slykes¹⁾ zu erwarten war, daß dann alle freien Aminogruppen reagieren, auch die endständige des Lysins.

Arachin aus *Arachis hypogaea*.

Es wurden 40 g Arachincarbonat hydrolysiert.

Fraktion	gefundener Stickstoff	
	absoluter Wert in g	Prozente vom Gesamt-N
Gesamtstickstoff	6,335	100,00
N der im BaSO ₄ -Niederschlag zurück- gehaltenen Substanzen + Amid-N .	0,858	13,60
N der durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen	1,807	28,53
N der dabei nicht gefällten Substanzen	3,703	58,41
N der durch Phosphorwolframsäure nicht gefällten Substanzen	3,269	51,55
N der durch Phosphorwolframsäure ge- fällten Substanzen (Maximalwert für Lysin)	0,433	6,86
N aus Lysinpikrat (Minimalwert für Lysin)	0,140	2,21

Der freie Aminostickstoff des Arachins beträgt 3,56%, also etwas mehr als der Lysinstickstoff²⁾.

¹⁾ Journ. of biol. Chem. Bd. 10, S. 15 (1911).

²⁾ Carl O. Jones und D. Breese Jones haben Arachin nach dem van Slykeschen Verfahren untersucht und fanden für den Lysinstickstoff 5,22%. Journ. of Biol. Chem. Bd. 30, S. 33—38, zit. nach Chem. Zentralbl. 1918 I, S. 273.

Glycinin (von *Soja hispida*)

30 g von aus Sajamehl hergestelltem Glycinin werden hydrolysiert.

Fraktion	Stickstoff	
	absoluter Wert in g	Prozente vom Gesamt-N
Gesamtstickstoff	5,152	100,00
N der im BaSO ₄ -Niederschlag zurück- gehaltenen Substanzen + Amid-N .	1,165	22,61
N der durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen	0,9513	18,46
N der dabei nicht gefällten Substanzen	2,961	57,48
N der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen	2,601	50,48
N der durch Phosphorwolframsäure ge- fällten Substanzen (Maximalwert des Lysins)	0,2975	5,774
N des Lysinpikrates (Minimalwert) . .	0,1681	3,338

Der freie Aminostickstoff des Glycinins beträgt nach der Formoltitration 6,15, nach der van Slykeschen Methode 7,9% vom Gesamtstickstoff, also ungefähr das Doppelte des Lysinstickstoffs¹⁾.

Gelatine (1. Versuch).

50 g reinste Handelsgelatine werden hydrolysiert.

Fraktion	Stickstoff	
	absoluter Wert in g	Prozente vom Gesamt-N
Gesamtstickstoff	7,41	100,00
N der im BaSO ₄ -Niederschlag zurück- gehaltenen Substanzen + Amid-N .	0,45	7,33

¹⁾ Nach Osborne beträgt der Lysinstickstoff des Glycinins 2,98% (berechnet nach den Angaben Osbornes über die Glycininanalyse in den Ergebn. d. Physiol., Bd. 10, S. 131 [1910]).

Fraktion	Stickstoff	
	absoluter Wert in g	Prozente vom Gesamt-N
N der durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen	1,390	18,75
N der dabei nicht gefällten Substanzen	5,510	74,30
N der durch Phosphorwolframsäure nicht gefällten Substanzen	4,88	66,9
N der durch Phosphorwolframsäure ge- fällten Substanzen (Maximalwert des Lysins)	0,852	11,52
N des Lysinikrates (Minimalwert) . .	0,2665	3,22

Gelatine (2. Versuch).

10 g derselben Gelatine werden hydrolisiert.

Fraktion	Stickstoff	
	absoluter Wert in g	Prozente vom Gesamt-N
Gesamtstickstoff	1,694	100,00
N der im BaSO ₄ -Niederschlag zurück- gehaltenen Substanzen + Amid-N .	0,254	14,99
N der durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen	0,307	17,71
N der dabei nicht gefällten Substanzen	1,14	67,3
N der durch Phosphorwolframsäure nicht gefällten Substanzen	1,059	62,5
N der durch Phosphorwolframsäure ge- fällten Substanzen (Maximalwert des Lysins)	0,1176	6,95
N des Lysinikrates (Minimalwert) . .	0,04459	2,693

Der freie Aminostickstoff der Gelatine beträgt nach der Formoltitration 2,67%, nach der van Slykeschen Methode

5,2% vom Gesamtstickstoff, im ersten Fall also ungefähr ebensoviel als Lysinstickstoff, im zweiten Fall ungefähr das Doppelte.

Aus vorläufigen Versuchen über den formoltitrierbaren Stickstoff der gesamten durch Phosphorwolframsäure gefällten Substanzen, die beim Arachin und bei der Gelatine angestellt wurden, scheint hervorzugehen, daß der formoltitrierbare Stickstoff nicht gleich dem Gesamtstickstoff dieser Fraktion ist, daß also der Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure gefällten Substanzen nicht nur vom Lysin herrührt, und neben ihm noch andere Substanzen in der Fraktion vorhanden sein müssen. Es sei daran erinnert, daß Kossel¹⁾ schon hervorgehoben hat, es sei nicht anzunehmen, daß die durch Phosphorwolframsäure gefällten Substanzen aus Lysin allein bestehen. Damit könnten auch die hohen Werte, die man mit der van Slykeschen Methode erhält, erklärt werden. Sind tatsächlich im Eiweiß außer den Hexonbasen und dem Cystin noch Substanzen vorhanden, die durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, so müssen sie bei der Gruppenbestimmung die Werte für Lysin erhöhen. Es wäre hierbei an Phenylalanin und Prolin zu denken, die beide mit Phosphorwolframsäure aus einer schwefelsauren Lösung gefällt werden, letzteres sogar aus ganz verdünnten Lösungen. Natürlich sind die Werte, die man mit der Kosselschen Methode erhält, auch nicht absolut richtig; sie sind, wie Kossel selbst hervorhob, Minimalwerte, geben dafür aber reines Lysin an.

Es läßt sich somit die Annahme van Slykes, daß die freien Aminogruppen im unzersetzten Eiweiß genau halb so viel Stickstoff enthalten als das im Eiweiß vorhandene Lysin, in dieser allgemeinen Form nicht aufrecht halten. Sondern es muß auf die ursprüngliche Ansicht Kossels zurückgegriffen werden: daß lysinfreie Proteine keine freien Aminogruppen haben, und daß bei den lysinhaltigen diejenigen mehr freie Aminogruppen haben, welche auch mehr Lysin enthalten. Eine gesetzmäßige quantitative Beziehung läßt sich zwischen beiden zurzeit nicht aufstellen.

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 81, S. 274 (1912).

Es ist auch nicht vor auszusetzen, daß die Bindungsverhältnisse der Bausteine in allen Proteinen die gleichen sind. Für einige Proteine mag die Annahme van Slykes, daß nur eine Aminogruppe des Lysins frei ist, zutreffen (Casein?), bei andern ist es jedenfalls nicht so (Histone, Sturin, Gelatine, Glycinin). Bei den Histonen übertrifft der freie Aminostickstoff den Lysinstickstoff so sehr, daß bei ihnen außer den beiden Aminogruppen des Lysins noch andere freie Aminogruppen vorhanden zu sein scheinen.

Zum Schluß erfülle ich gern die angenehme Pflicht, Herrn Prof. A. Kossel für die Anregung zu dieser Arbeit und für die mannigfaltige Unterstützung während ihrer Ausführung zu danken.
