

Über die Verbesserung der Eiweisshydrolyse durch Proteinvorbehandlung mit Perameisensäure

Nach SCHRAM *et al.* besteht die Möglichkeit, Zystin und Zystein als Zysteinsäure nach Perameisensäurevorbehandlung und anschliessender HCl-Hydrolyse der Proteinträger quantitativ zu bestimmen¹. Zysteinsäure wurde als relativ hydrolysestabil befunden. TOENNIES und HOMILLER² nehmen an, dass Perameisensäure in gewissem Umfang mit einer Reihe von Aminosäuren schon im Eiweissverband reagiert.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an Fischmehl vorgenommen, um quantitativ die Ausmasse eventuell zu erwartender Umwandlungsprozesse nach erfolgter Behandlung mit Perameisensäure und anschliessender HCl-Hydrolyse zu ermitteln. In einer vorausgegangenen Untersuchung³ waren am gleichen Fischmehl Aminosäurenanalysen nach MOORE und STEIN vorgenommen worden, um einen Überblick über den chemischen Ablauf der HCl-Hydrolyse nach DUSTIN⁴ in gestaffelten Zeitabständen zu gewinnen. Die Daten dieser Versuche sollen in vorliegender Arbeit zum Vergleich herangezogen werden.

Nach den Angaben von HIRS⁵ war mit der Umwandlung von Zystin bzw. Zystein, Methionin und Tyrosin zu rechnen. SANGER⁶ erhielt bei ähnlichen Versuchen neben Tyrosin ein Derivat, das er als Tyrosin X bezeichnete. HIRS⁵ identifizierte dieses Artefakt als Chlorotyrosin, das stets dann nach Perameisensäurevorbehandlung auftrat, wenn das zu oxydierende Substrat mit Cl⁻ verunreinigt war. Im Rahmen von Futtermitteluntersuchungen wird es nur sehr schwer sein, die vorhandenen Proteine verlustlos chlorfrei zu gewinnen. Es wurde versucht, das Tyrosin quantitativ in Chlorotyrosin zu überführen.

Als geeignetes Oxydationsreagens erwies sich ein Gemisch von 0,5 ml 30%igem H₂O₂ (MERCK, Darmstadt) und 4,5 ml 98%iger Ameisensäure (MERK, Darmstadt) bei 50°C. 3 min nach der Mischung der beiden Komponenten erfolgte die Zugabe von je 0,8 ml der Perameisensäure zu je 20 mg Protein, dem 20 mg NaCl beigemengt worden waren. Die Reaktion wurde bei 50°C im Wasserbad durchgeführt und nach 15 min durch Verdünnen mit 200 ml H₂O je 20 mg Protein unterbrochen. Unmittelbar anschliessend konnte die Flüssigkeit im Vakuum bei etwa 40°C bis zur Sirupkonsistenz des Rückstandes abdestilliert werden. Der so gewonnene Rest wurde dann der HCl-Hydrolyse nach Dustin⁴ 24 h lang unterworfen.

Aus dem Vergleich der Aminosäurewerte der normalen 24-, 48- und 72-h-Hydrolyse der Tabelle mit den Daten des 24-h-Hydrolysates des mit Perameisensäure vorbehandelten Fischmehles geht hervor, dass bei sämtlichen Aminosäuren des oxydierten Fischmehles Maximalwerte vorliegen. Es scheint durch den Einfluss der Ameisensäure einerseits eine gewisse Schutzwirkung auf hydrolyselabile Aminosäuren⁷, zum anderen eine Katalyse bei

	Aminosäuregehalt in % nach normaler Hydrolyse			Perameisensäure- Vorbehandlung und 24-h-HCl- Hydrolyse
	24 h	48 h	72 h	
Asparaginsäure . . .	7,25	7,52	7,65	7,65
Threonin	3,72	3,56	3,48	3,82
Serin	3,56	3,38	2,87	4,33
Glutaminsäure . . .	11,35	10,17	9,27	11,38
Glycin	5,80	6,12	5,42	6,12
Alanin	6,89	5,61	5,56	6,90
Valin	6,59	4,75	4,36	6,63
Methionin	1,99	1,87	1,18	2,19
Isoleuzin	1,34	2,75	3,74	3,75
Leuzin	4,12	5,12	6,53	6,65
Tyrosin	2,31	2,21	2,14	2,31
Phenylalanin	1,93	2,20	2,27	2,46
Histidin	1,56	1,04	1,05	1,62
Lysin	4,79	4,33	4,04	4,81
Arginin	0,62	0,59	0,58	0,62
Zystein ½				0,79

der Spaltung der gegen kochende HCl relativ resistenten Peptide⁸ zu erfolgen.

Die säulenchromatographische Bestimmung der entstehenden Eiweißspaltprodukte nach HCl-Hydrolyse und vorangehender Perameisensäurevorbehandlung erfolgt am besten nach der von HIRS⁵ modifizierten Methode nach MOORE und STEIN⁸. Zystin und Zystein erscheinen auf dem Eluierungsbild als Zysteinsäure, Methionin als Methioninsulfon und Tyrosin als Chlorotyrosin. Die Bestimmung der Zysteinsäure ist nach dem genannten Verfahren dann möglich, wenn keine anderen sehr sauren Substanzen im Analysenmaterial vorliegen. Dies kann durch ein Probechromatogramm eines normalen HCl-Hydrolysates bzw. auf papierchromatographischem Wege ermittelt werden. Zysteinsäure kann bei gleichzeitiger Anwesenheit sehr saurer, ninhydrinpositiver Substanzen nach SCHRAM¹ an Dowex-2-Säulen chromatographisch bestimmt werden. Chlorotyrosin wird auf einer 15-cm-Amberlite-IR-120 (XE-69)-Kolonne vollständig vom Phenylalanin getrennt. Im Eluierungsbild eines Chromatogrammes an Dowex-50-X4-Säulen erscheint Chlorotyrosin unmittelbar neben Histidin, zum Teil wird Histidin überlappt. An der Position des Tyrosins im Chromatogramm der 100-cm-Dowex-50-X12-Kolonne konnte ebenfalls keine ninhydrin-positive Reaktion festgestellt werden. Demnach ist unter den beschriebenen Versuchsbedingungen sämtliches Tyrosin in Chlorotyrosin übergegangen.

Weitere Untersuchungen zur Frage der Schutzwirkung bzw. Katalyse bei der HCl-Hydrolyse durch Vorbehandlung der Substrate durch Perameisensäure sind im Gange.

G. KRAMPITZ

Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere,
Universität Bonn, den 18. Januar 1957.

Summary

By treatment of fish-meal with performic acid, it is possible to convert methionine, cystine and tyrosine residues in the intact protein into products stable to hydrolysis. After hydrolysing with hydrochloric acid, maximum values of amino acids were found, compared with amino acid values of non-treated 24, 48 and 72 h hydrolysates. It is assumed that unstable amino acids are protected and the cleaving of relative HCl-resistant peptides is accelerated by performic acid.

¹ E. SCHRAM, S. MOORE und E. BIGWOOD, Biochem. J. 57, 33 (1954).

² G. TOENNIES und R. P. HOMILLER, J. Amer. chem. Soc. 64, 3054 (1942).

³ G. KRAMPITZ, Naturwissenschaften (im Druck).

⁴ J. P. DUSTIN, C. CZAJKOWSKA und S. MOORE, Analyt. chim. Acta N. Y. 9, 256 (1953).

⁵ C. H. W. HIRS, J. biol. Chem. 219, 611 (1956).

⁶ F. SANGER und H. TUPPY, Biochem. J. 49, 463, 481 (1951).

⁷ S. U. GURNANI, U. S. KUMTA und M. B. SAHASRABUDHE, Biochem. biophys. Acta 16, 553 (1955).

⁸ S. MOORE und W. H. STEIN, J. biol. Chem. 211, 893 (1954).