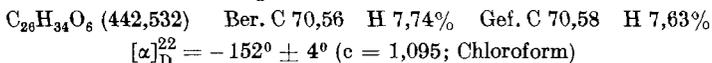


das Präparat 12 Std. bei 70° und 0,1 mm. Die Verbrennungsprobe wurde noch 2 Std. bei 100° und 0,01 mm im Schiffchen getrocknet.



Im Papierchromatogramm zeigt sich die Substanz als einheitl. Produkt. UV.-Spektren siehe theor. Teil, Fig. 3.

*Hydrierung des Anhydroacetates:* 50 mg des Anhydroproduktes wurden in 25 cm<sup>3</sup> Eisessig mit 20 mg Platin hydriert. Nach 50 Min. war die für 3 Doppelbindungen theoretisch notwendige Menge aufgenommen. Man filtrierte vom Platin ab und engte i. V. ein. Den Rückstand liess man mit wenig Methanol stehen. Auch nach längerer Zeit war keine Kristallisation eingetreten, so dass man das Produkt durch Chromatographieren zu reinigen versuchte, was nur zu amorphen Produkten führte.

Die Analysen, Drehungen und UV.-Spektren wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. Gysel durchgeführt.

### Zusammenfassung.

Aus der Rinde von *Mansonia altissima* A. Chev. konnten durch Chromatographieren der wasserlöslichen Glykosidfraktion die kristallisierten, schwach wirksamen Mansonine A, B, C, D und E neben hochwirksamen amorphen Fraktionen gewonnen werden. Durch hydrolytische Spaltung nach der Methode von *Mannich-Siewert* wurden 4 Anhydrogenine in Form ihrer Acetate erhalten. Aus den wässrigen Mutterlaugen isolierte man überdies das Mansonin G, das sehr wahrscheinlich ein teilweise abgebautes Glykosid ist.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung.

## 72. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. V<sup>1</sup>). Analytische Untersuchungen an kristallisiertem Lab

von H. Schwander, P. Zahler und Hs. Nitschmann.

(25. I. 52.)

### Einleitung.

Trotzdem die Kristallisation des Labfermentes schon vor mehreren Jahren von zwei verschiedenen Autoren (*C. L. Hankinson*<sup>2</sup>); *N. J. Berridge*<sup>3</sup>), beschrieben worden ist, liegen über kristallisiertes Lab noch heute sehr wenig analytische Daten vor. *Hankinson* gibt die Elementaranalyse seines Präparates und den isoelektrischen Punkt an, während *Berridge* sein Präparat nur dem Löslichkeitstest

<sup>1</sup>) Nr. IV dieser Reihe: Helv. **34**, 1421 (1951).

<sup>2</sup>) *C. L. Hankinson*, J. of Dairy Science **26**, 53 (1943).

<sup>3</sup>) *N. J. Berridge*, Biochem. J. **39**, 179 (1945).

unterzogen hat, bei dem es sich als ein im Sinne der Phasenregel einheitliches Protein erwiesen hat. Vom Molekulargewicht wusste man nur, dass es nicht sehr gross sein kann, da das Lab langsam durch Membranen zu diffundieren vermag<sup>1)</sup>. Die Aminosäurezusammensetzung ist erst ganz kürzlich durch *K. W. McKerns*<sup>2)</sup> mit Hilfe der zweidimensionalen Papierchromatographie qualitativ untersucht worden, wobei jedoch nicht kristallisiertes, aber immerhin hoch gereinigtes Lab verwendet wurde<sup>3)</sup>.

Wir berichten im folgenden über Untersuchungen zur Bestimmung der Teilchengrösse von gelöstem Lab mit der Ultrazentrifuge und mit der Diffusion, über das elektrophoretische Verhalten des Labes und über das Ergebnis quantitativer Aminosäureanalysen.

Das kristallisierte Lab verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn *N. J. Berridge*. Es handelt sich dabei um das Originalpräparat, dessen Herstellung Herr *Berridge* 1945 (loc. cit.) beschrieben hat. Das Präparat hatte sich in der Zwischenzeit unter der Mutterlauge, mit etwas Thymol versehen, im Eisschrank befunden. Trotzdem das Lab seine Gerinnungsaktivität in dieser Zeit praktisch unverändert bewahrt hatte, wurde es von Herrn *Berridge* für unsere Untersuchungen nach der auf Seite 184 seiner bereits zitierten Arbeit angegebenen Methode umkristallisiert. Auch diesmal wurden die Kristalle nicht getrocknet, sondern mit Thymol unter der Mutterlauge kalt aufbewahrt.

## I. Ultrazentrifugen- und Diffusionsmessungen (bearbeitet von *H. Schwander*).

Die Sedimentationsmessungen konnten an der Abteilung für Virusforschung des Max-Planck-Institutes in Tübingen (Deutschland) ausgeführt werden, wo eine Phywe-Ultrazentrifuge mit Luftantrieb zur Verfügung stand.

Zur Herstellung der Lab-Lösungen wurde wie folgt vorgegangen: Ein Teil der ausgeschüttelten Kristallsuspension in Mutterlauge wurde abpipettiert und gegen 0,1-proz. NaCl-Lösung dialysiert, wobei die Kristalle langsam in Lösung gingen. Der Gehalt dieser Lösungen (meist ca. 2%) wurde durch Bestimmung des Trockenrückstandes unter Abzug des NaCl-Gehaltes bestimmt. Die Brechungsindices dieser Lösungen wurden im *Zeiss*-Interferometer gemessen und eine Eichkurve ermittelt, die ebenfalls zur Konzentrationsbestimmung herbeigezogen wurde. Es ergab sich dabei für das Brechungsindex-Inkrement  $dn/dx$  des Labes in 0,1-proz. NaCl-Lösung der Wert von 0,00196.

Diese Lösungen dienten als Stammlösungen und wurden durch Zusatz von 1/15-m. Phosphatpuffer nach *Clark-Sørensen* vom pH 7 auf den gewünschten Gehalt gebracht. Die Konzentrationen der untersuchten Lösungen betragen in Gramm Lab pro 100 cm<sup>3</sup> Lösung: 1,12; 0,33; 0,17; 0,08.

In allen vier Lösungen erwies sich das Lab als uneinheitlich. Neben einer Hauptkomponente, die keine ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationsgeschwindigkeit erkennen liess, und einem geringen Anteil, der schon beim Anlaufen der Zentrifuge sedimentierte, waren auch noch langsamer sedimentierende Bestandteile zu beobachten. Die Messungen an der Hauptkomponente wurden bei 50000 Touren/Min. ausgeführt und ergaben für die Sedimentationskonstante den Wert

$$s_{20} = 4 \cdot 10^{-13} \text{ sek.}$$

<sup>1)</sup> *H. Tauber & J. S. Kleiner*, *J. Biol. Chem.* **96**, 745 (1932).

<sup>2)</sup> *K. W. McKerns*, *Canad. J. Med. Sciences* **29**, 59 (1951).

<sup>3)</sup> Diese Arbeit ist uns erst nach Abschluss unserer eigenen Aminosäureanalysen bekanntgeworden.

Zur Bestimmung der Diffusionskonstante des Labes wurden Messungen nach der Skalenmethode von *O. Lamm*<sup>1)</sup> ausgeführt, die durch zwei Messungen mit der interferometrischen Methode von *G. Scheibling*<sup>2)</sup> ergänzt wurden.

Die Lösungen wurden in der oben angegebenen Weise zubereitet, jedoch vor der Messung noch gegen den zur Übersichtung verwendeten Puffer dialysiert. Es wurde wieder 1/15-m. Phosphatpuffer vom pH 7 verwendet. Zwei Messungen in 1/30- und in 2/15-m. Puffer ergaben gute Übereinstimmung und zeigen, dass die beträchtliche Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionskonstante nicht durch einen elektroviskosen Effekt erklärt werden kann. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt.

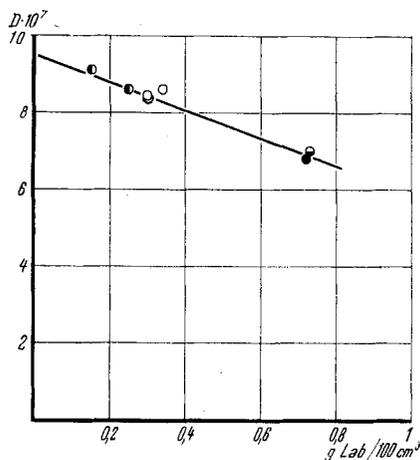


Fig. 1.

Die Diffusionskonstante des kristallisierten Labes in Abhängigkeit von der Konzentration bei pH 7. ● Methode nach *Scheibling*. ○ 1/30-m. Phosphatpuffer, ● 2/15-m. Phosphatpuffer.

Das Ergebnis der Ultrazentrifugierung, wonach sich das Lab als nicht ganz monodispers erwiesen hat, wurde durch die Messungen nach *G. Scheibling* bestätigt. Demnach ist die Hauptkomponente verhältnismässig einheitlich, wird aber von einer geringen Menge Material mit kleinerer Diffusionskonstante begleitet.

Um die Zuverlässigkeit unserer Messungen zu kontrollieren, wurde noch die Diffusionskonstante von KCl in 0,1-m. Lösung mit der Skalenmethode bestimmt. *Lamm*<sup>3)</sup> gibt hierfür den Wert  $D_{20} = 1,61 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ , während wir  $1,58 \cdot 10^{-5}$  fanden, was als eine sehr gute Übereinstimmung betrachtet werden darf. Die Diffusionskonstanten wurden bei der Skalenmethode aus der Höhe und der Fläche der Kurven berechnet. Der Projektionsfaktor war in der bei Ultrazentrifugemessungen üblichen Weise bestimmt worden<sup>4)</sup>.

Bei Extrapolation auf die Konzentration Null findet man nach Fig. 1 für die Diffusionskonstante:

$$D_{20} = 9,5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}.$$

1) *O. Lamm*, Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsaliensis [4] **10**, No. 6 (1937).

2) *G. Scheibling*, J. Chim. Physique **47**, 688 (1950).

3) *O. Lamm*, Särtryck u Svensk Kemisk Tidskrift 56: e årg., **1944**, 52.

4) *The Svedberg & K. O. Pedersen*, Die Ultrazentrifuge, S. 261, Leipzig 1940.

Zur Berechnung des Molekulargewichts wird noch der Wert des spezifischen Volumens  $V_{20}$  des Labes benötigt, der wegen Mangel an Material nicht bestimmt werden konnte. Wie *Svedberg & Pedersen*<sup>1)</sup> gezeigt haben, weichen die Werte von  $V_{20}$  für die verschiedenen Proteine aber meist sehr wenig voneinander ab. Wir legten unsern Rechnungen deshalb den Mittelwert  $V_{20} = 0,749$  zugrunde.

Mit den oben angegebenen Werten für  $s_{20}$  und  $D_{20}$  erhält man nach der bekannten Beziehung

$$M = \frac{RTs}{D(1 - V_0)} \quad (q = \text{Dichte des Lösungsmittels})$$

für das Molekulargewicht des Labes in Phosphatpuffer beim pH 7:

$$M \sim 40000.$$

Als Reibungsverhältnis ergab sich  $f/f_0 = 0,98$ , d. h. der Wert 1 innerhalb der Fehlergrenzen. Er deutet darauf hin, dass sehr wahrscheinlich praktisch kugelförmige Molekeln vorliegen und dass die Solvatation vernachlässigt werden darf.

Wir möchten betonen, dass die gefundenen Werte als vorläufige zu betrachten sind und in Anbetracht der Uneinheitlichkeit des Präparates keinen Anspruch auf grosse Genauigkeit erheben können. Wegen Mangel an Material konnten auch nicht so viele Messungen gemacht werden, wie es wünschbar gewesen wäre.

## II. Elektrophoretisches Verhalten

(bearbeitet von *P. Zahler*).

Wegen der Knappheit des Materials wurde mit der Papierelektrophorese gearbeitet, und zwar nach der von *Grassmann, Hannig & Knedel*<sup>2)</sup> angegebenen Methode. Es wurden verschiedene Elektrophoresen bei pH 5 bis 8 und bei 2 unter Verwendung von Citrat-Phosphat-Boratpuffer nach *Theorell & Stenhagen*<sup>3)</sup> ausgeführt. Es wurden jeweils 0,01 bis 0,03 cm<sup>3</sup> einer ca. 6-proz. Lablösung aufgetragen. Bei allen diesen pH erwies sich das Lab als elektrophoretisch einheitlich. Der isoelektrische Punkt konnte nicht genau bestimmt werden, weil die Wanderungsgeschwindigkeiten auf Papier bis jetzt nicht sehr zuverlässig ermittelt werden können und weil zudem das Lab am und nahe beim isoelektrischen Punkt sehr schwer löslich ist. Der Punkt scheint aber nicht weit von 4,5 zu liegen, was mit dem Befund von *Hankinson*<sup>4)</sup> übereinstimmt.

Es ist kein seltener Fall, dass ein Proteinpräparat elektrophoretisch einheitlich, aber nicht monodispers ist. Da es sich in unserm Falle um ein kristallisiertes Präparat handelt, das sich zudem früher

<sup>1)</sup> Loc. cit., S. 368.

<sup>2)</sup> *Grassmann, Hannig & Knedel*, Deutsche Med. Wochenschr. **76**, 333 (1951).

<sup>3)</sup> *Theorell & Stenhagen*, Biochem. Z. **299**, 417 (1939).

<sup>4)</sup> *C. L. Hankinson*, loc. cit.

im Löslichkeitstest bei pH 5,4 als einheitlich erwiesen hatte, darf vermutet werden, dass es sich bei denjenigen Anteilen, deren Teilchengröße von der der Hauptfraktion abweicht, um Artefakte handelt, die durch Spaltung, Denaturierung oder Aggregation in der Lösung entstanden sind. Das Lab ist ein besonders gegen alkalisches Medium sehr empfindliches Ferment, wird es doch bereits bei pH über 8 allmählich inaktiviert. Das für die Molgewichtsbestimmung verwendete pH 7 liegt schon recht nahe bei diesem kritischen Wert. Wiederholung der Molgewichtsbestimmung bei tieferen pH wäre deshalb sehr erwünscht.

### III. Aminosäurezusammensetzung

(bearbeitet von P. Zahler).

Die Analyse wurde chromatographisch mit Stärkesäulen nach der Methode von *Stein & Moore*<sup>1)</sup> durchgeführt.

Um die Magnesium (aber kein  $\text{NH}_4^+$ ) enthaltende Mutterlauge zu entfernen, wurde das kristallisierte Lab mit konzentrierter NaCl-Lösung erschöpfend ausgewaschen. Das gewaschene Lab wurde im Vakuum getrocknet und durch Veraschen der NaCl-Gehalt bestimmt. Von diesem Trockenpräparat wurden 7 mg (enthaltend 2–3 mg Protein) mit 2 cm<sup>3</sup> 6-n. HCl 16 Std. bei 120° hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde im Vakuum getrocknet, in 0,5 cm<sup>3</sup> Lösungsmittel aufgenommen und auf die Säule gegeben.

Bei der Chromatographie hielten wir uns weitgehend an die detaillierten Vorschriften von *Stein & Moore*. Einige kleine Varianten, die aber nicht von prinzipieller Bedeutung sind, seien erwähnt:

Unsere Säulen hatten einen Durchmesser von 0,9 cm. Wir verwendeten chemisch reine, lösliche Stärke der Firma *Siegfried AG.* in Zofingen (Schweiz). Sie wurde ohne weitere Vorbehandlung in n-Butanol (pro Säule 19,3 g in 31 cm<sup>3</sup>) aufgeschlemmt. Diese Stärkemenge ergab eine Höhe von ca. 30 cm und verlangte für eine Durchflussgeschwindigkeit von 0,5 cm<sup>3</sup> (= eine Fraktion) in 24 Min. einen Druck von 10–16 mm Hg. Wir verwendeten als Fraktionen-Kollektor eine Drehscheibe, die alle 24 Min. automatisch weitergeschaltet wurde. Die Fraktionen wurden alle gewogen und eventuelle Abweichungen des Fraktionsvolumens sofort durch Druckänderung korrigiert. Die Verdampfung aus den kleinen, mit Siliconfilm wasserabstossend gemachten Reagensgläsern wurde verhindert, indem die Gläser nach der Wägung sofort unter eine Glasglocke in eine gesättigte Atmosphäre des Lösungsmittels gestellt wurden.

Von den möglichen Lösungsmitteln wählten wir zum Eluieren n-Propanol/HCl 0,5-n. (2:1), mit dem zwei Analysen ausgeführt wurden. In einem weiteren Versuch verwendeten wir n-Butanol/n-Propanol/HCl 0,1-n. (1:2:1), um auch noch die Stoffpaare Valin-Methionin und Arginin-NH<sub>3</sub> aufzuspalten.

Bei der Gehaltsbestimmung der Fraktionen mit Ninhydrin wurden, um von dem teuren Reagens zu sparen, nur aliquote Teile der Fraktionen (0,100 oder 0,174 cm<sup>3</sup>) für die Kolorimetrie verwendet, was ohne Einbusse an Genauigkeit möglich ist<sup>2)</sup>. Abpipettieren in nach gleicher Weite und Lichtabsorption ausgesuchte Reagensgläser, Neutralisieren mit 1, bzw. 2 Tropfen 0,8-n. NaOH, Versetzen mit 1 cm<sup>3</sup> Ninhydrinlösung (10 g Ninhydrin, 0,4 g SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O in 250 cm<sup>3</sup> Methylcellosolve + 250 cm<sup>3</sup> 0,2-n. Citratpuffer, pH 5,0). Die Mischung wurde dann genau 20 Min. in einem Glycerinbad von 100° erhitzt<sup>3)</sup> und hierauf mit 2,5 bzw. 5 cm<sup>3</sup> Propanol/H<sub>2</sub>O (2:1) verdünnt und gemischt. Die Messung erfolgte stets

1) *W. H. Stein & S. Moore*, *J. Biol. Chem.* **176**, 337 (1948); **178**, 79 (1949); *S. Moore & W. H. Stein*, *ibid.* **176**, 367 (1948); **178**, 53 (1949).

2) Durch eine qualitativ vergleichende Tüpfelanalyse mit Ninhydrin wurde ermittelt, wieviel genommen werden muss, um eine für die Messung geeignete Farbtiefe zu erhalten.

3) Der stets gleiche Verdampfungsverlust wurde ein für alle Mal bestimmt.

in der ersten Std. mit einem *Beckman*-Spektrophotometer DU bei Wellenlänge  $570 \mu$  ( $440 \mu$  für Prolin). Als „blank“ diente Propanol/ $H_2O$ .

Nullwerte: Nach 4tägigem Waschen der Säulen ergab das abfliessende Lösungsmittel bei der beschriebenen Behandlung mit Ninhydrin Extinktionswerte von 0,20—0,23, während das Lösungsmittel direkt gemessen 0,175 gab. Im Laufe eines Versuches fiel dann der Nullwert, d.h. der Wert zwischen gut separierten Spitzen ebenfalls auf 0,175. Zur Berechnung der Konzentration der einzelnen Aminosäuren wurde deshalb jeweils der zeitlich nächstliegende Nullwert verwendet.

Zur Berechnung der molaren Aminosäurekonzentrationen der Fraktionen aus der Extinktion wurde eine Eichkurve mit reinem Leucin aufgenommen, die Übereinstimmung mit der Tab. 1 von *Moore & Stein*<sup>1)</sup> zeigte.

Die Zuordnung der Maxima zu den einzelnen Aminosäuren machte keine Schwierigkeiten, da die Spitzen genau bei der von *Moore & Stein* für ein synthetisches Aminosäuregemisch angegebenen  $cm^3$ -Zahl Eluat erschienen<sup>2)</sup>. Einen Fixpunkt bildet auch das Prolin mit seiner andersartigen Ninhydrin-Färbung. Die Proportionalitätsfaktoren für die Farbausbeute bei den einzelnen Aminosäuren wurden der Tab. II auf S. 377 der gleichen Arbeit entnommen. Auch sonst wurde bei der Auswertung nach jenen beiden Autoren verfahren.

Einige Aminosäuren erfordern aber noch besondere Bemerkungen:

Cystin. *Stein & Moore* haben gezeigt, dass bei ihrem Verfahren auch Cystein als Cystin erfasst wird. Wir konnten im kristallisierten Lab weder direkt, noch nach Denaturierung mit Guanidinhydrochlorid mit Nitroprussidnatrium freie SH-Gruppen nachweisen. Es darf deshalb angenommen werden, dass das gefundene Cystin wirklich als solches im Lab vorhanden ist. Die Extinktionen waren aber so klein, dass nur die Grössenordnung des Cystingehaltes als richtig angesehen werden darf.

Methionin. Da dem Aufschluss kein Thiodiglykol zur Verhinderung der Oxydation des Methionins zugesetzt worden war, korrigierten wir den gefundenen Wert den Erfahrungen von *Stein & Moore*<sup>3)</sup> entsprechend mit dem Faktor 0,81/0,92. Dem Methioninwert kann ohnehin keine grosse Genauigkeit zukommen, da die Trennung für diese Aminosäure mangelhaft ist.

Threonin und Serin. Um den durch ihre teilweise Desaminierung entstehenden Fehler zu kompensieren, wurden ihre Werte entsprechend *Stein & Moore*<sup>3)</sup> mit den Faktoren 1/0,9 bzw. 1/0,95 multipliziert. Zugleich wurde am  $NH_3$ -Wert ein entsprechender Abzug gemacht.

Alanin und Glutaminsäure. Da diese beiden Aminosäuren gemeinsam bestimmt worden waren, lassen sich die Molprocente nicht ohne weiteres in Gewichtsprocente umrechnen. Wenn man die Summe der basischen Komponenten ( $NH_3$ , Arginin, Lysin) mit dem molaren Anteil der sauren Asparaginsäure vergleicht, so ergibt sich aber, dass der Glutaminsäureanteil ziemlich hoch sein muss, damit der tiefe isoelektrische Punkt des La-bes zustande kommt. Wir haben deshalb für die Umrechnung auf Gewichtsprocente die Annahme gemacht, dass bei der Summe der molaren Konzentrationen  $1/3$  auf Alanin und  $2/3$  auf Glutaminsäure kommt. Die Gewichtsprocente dieser beiden Säuren sind aber natürlich nur als angenäherte Werte zu betrachten.

Glutaminsäure und Asparaginsäure. Ihre Werte fallen wegen teilweiser Veresterung mit dem Propanol zu tief aus und müssen nach *Stein & Moore*<sup>4)</sup> mit den Faktoren 1,25 bzw. 1,11 korrigiert werden, was in Tab. 1 geschehen ist.

Tryptophan. Da diese Säure bei der Hydrolyse mit HCl zerstört wird, wurde sie gesondert kolorimetrisch im unhydrolysierten Lab mit p-Dimethylaminobenzaldehyd bestimmt. Wir hielten uns dabei an die Vorschriften von *Spies & Chambers*<sup>5)</sup> (Variante K der zweiten Arbeit). Die Eichkurve wurde mit reinem dl-Tryptophan (*Hoffmann-La Roche*) aufgenommen. Wir fanden in drei Bestimmungen 1,74; 1,63 und 1,50%. Mittelwert 1,62%, bezogen auf das Protein, oder 1,36% bezogen auf das Hydrolysat.

1) J. Biol. Chem. **176**, 376 (1948).

2) Fig. 1 und 4 der Arbeit in J. Biol. Chem. **178**, 53 (1949).

3) J. Biol. Chem. **178**, 79 (1949).

4) J. Biol. Chem. **178**, 53 (1949).

5) J. R. Spies & D. Chambers, Anal. Chem. **20**, 30 (1948); **21**, 1249 (1949).

Das Ergebnis der drei Versuche ist in Tabelle 1 und dasjenige des dritten (Elution zuerst mit Butanol/Propanol/HCl und nach der Asparaginsäure mit Propanol/HCl) ausserdem in Fig. 2 (S. 560) niedergelegt.

**Tabelle 1.**

Aminosäurezusammensetzung des kristallisierten Labes. (Die %-Zahlen beziehen sich auf die Summe aller Werte = 100<sup>1</sup>) und damit also auf Eiweisshydrolysat, nicht auf Eiweiss.)

Aminosäure	Mol-Prozente			Mittelwerte	
	1. Anal.	2. Anal.	3. Anal.	Mol-%	Gew.-%
Leucin + Isoleucin . . . . .	12,2	11,6	11,8	11,9	13,4
Phenylalanin . . . . .	4,9	4,7	4,7	4,8	6,8
Valin	11,7	10,8	9,9	10,1	9,9
Methionin } . . . . .			0,7	0,8	0,9
Tyrosin . . . . .	4,1	4,3	4,2	4,2	6,6
Prolin . . . . .	4,4	5,0	4,6	4,6	4,6
Alanin . . . . .	3,6	3,5	3,6	3,6	2,7
Glutaminsäure . . . . .	9,1	8,9	9,2	9,1	11,5
Threonin . . . . .	5,5	5,4	5,3	5,4	5,6
Asparaginsäure . . . . .	13,0	13,7	13,2	13,3	15,3
Serin . . . . .	8,6	8,6	8,6	8,6	7,8
Glycin . . . . .	6,8	7,0	7,1	7,0	4,5
Arginin } . . . . .	10,8	10,7	0,9	0,8	1,3
NH <sub>3</sub> . . . . .			10,5	10,3	1,4
Lysin . . . . .	2,2	2,4	2,4	2,3	2,9
Histidin . . . . .	2,1	2,2	2,1	2,1	2,8
Cystin . . . . .	0,3	0,4	0,4	0,4	0,8
Tryptophan (extra bestimmt)	0,8	(0,8)	0,8	0,8	1,4
Total . . . . .	100,1	100,0	100,0	100,1	100,2

Die Übereinstimmung zwischen den Werten der drei Analysen ist befriedigend. Es wäre natürlich wünschenswert, die Resultate mit Hilfe anderer Analysenmethoden zu kontrollieren. Das gilt insbesondere für die Aminosäuren mit kleinen Werten, da bei ihnen die Genauigkeit der chromatographischen Methode natürlich am geringsten ist. Ein Vergleich mit dem Papierchromatogramm von *K. W. McKerns* (loc. cit.) ist nicht gut möglich, da dieser Autor keine quantitative Auswertung versucht hat. Immerhin lässt sich leicht sehen, dass bei ihm die Flecken von Leucin und von Valin besonders gross sind. Diese beiden Aminosäuren verzeichnen auch bei uns besonders hohe Werte. Gegenüber der Zusammensetzung des kristallisierten Pepsins bestehen

<sup>1</sup>) Diese Summenwerte sind absolut teils kleiner, teils grösser als die Einwaagen. Die Unstimmigkeit rührt daher, dass das trockene Lab-Kochsalz-Gemisch sehr schwer homogen abzuwägen ist. Das grob kristallisierte NaCl ist sehr leicht beweglich, während das feinpulvrige Lab leicht am Glas und am Spatel hängenbleibt. Eine N-Bestimmung der Lösungen war leider unterblieben. — Unser Rechnungsverfahren scheint einigermaßen berechtigt, weil *Stein & Moore* gezeigt haben, dass bei ihrem Verfahren die Summe aller Aminosäuremengen immer sehr nahe an den sich aus der Einwaage ergebenden Sollwert herankommt.

beträchtliche Unterschiede<sup>1)</sup>. Damit ist auch von dieser Seite bewiesen, dass Lab und Pepsin ganz verschiedene Fermente sind.

Millimolare  
Aminosäure-Konz.

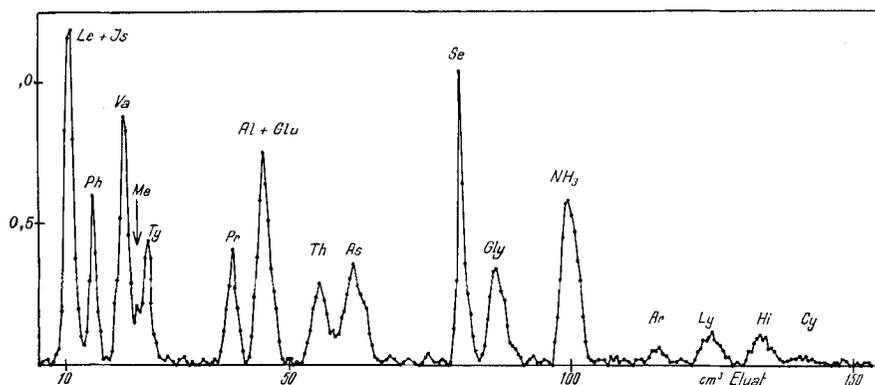


Fig. 2.

Chromatogramm des Hydrolysates von kristallisiertem Lab. Elution bis zum 67sten cm<sup>3</sup> mit Butanol/Propanol/HCl, von da an mit Propanol/HCl. Reihenfolge der Aminosäuren: Leucin + Isoleucin, Phenylalanin, Valin, Methionin, Tyrosin, Prolin, Alanin + Glutaminsäure, Threonin, Asparaginsäure, Serin, Glycin, NH<sub>3</sub>, Arginin, Lysin, Histidin, Cystin. Unkorrigierte Werte.

#### SUMMARY.

The crystallized rennin of *N. J. Berridge* was found to be not quite homogeneous at a pH of 7 in the ultracentrifuge and in diffusion measurements. An approximate molecular weight of 40,000 was calculated for the main fraction from the sedimentation and diffusion constants. The rennin behaved uniformly during paper-electrophoresis between pH 5 and 8 and at 2. The isoelectric point lies in the neighbourhood of 4.5. In conclusion, the quantitative amino acid composition was determined with the chromatographic method of *Stein & Moore*.

Wir danken Herrn Dr. *N. J. Berridge*, Reading, für die grosszügige Überlassung von kristallisiertem Lab, Herrn Prof. *Ch. Sadron*, Strasbourg, für wertvolle Anregungen, Herrn Dr. *G. Scheibling*, Strasbourg, für die Ausführung zweier Diffusionsmessungen, Herrn Dr. *G. Schramm*, Tübingen, für die Ermöglichung der Ultrazentrifugenmessungen an seinem Institut und Herrn *P. Giebler*, daselbst, für technische Hilfe. Ferner haben wir der *Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie* und der *Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern* für die Gewährung eines Stipendiums an den einen von uns (*Sch.*) zu danken.

Strasbourg, Centre d'Etudes de Physique Macromoléculaire,  
und Bern, Institut für organische Chemie der Universität  
und *Theodor-Kocher*-Institut.

<sup>1)</sup> Vgl. die Werte von *E. Brand*, zusammengestellt bei *J. H. Northrop, M. Kunitz & R. M. Herriot*, S. 26, *Crystalline Enzymes*, New York 1948.