

## 94. Untersuchung der Bindung von Natrium- und Chlorid-Ionen durch Casein mittels RÖNTGEN-Strahlen- und Elektronen-Beugung<sup>1)</sup>

von S. Gál, A. Ludi, H. R. Oswald und R. Signer

(12. II. 62)

In einer frühern Arbeit<sup>2)</sup> konnte mit Hilfe von Wasserdampfsorptionsmessungen gezeigt werden, dass Casein grössere Mengen (bis etwa 6%) von Natriumchlorid chemisch bindet, wenn das Salz dem Protein in wässriger Lösung zugefügt und dem System das Wasser bei 25° langsam entzogen wird. In der vorliegenden Arbeit wird über eine Bestätigung dieses Befundes durch Beugungsversuche von RÖNTGEN- und Elektronenstrahlen berichtet.

Der Untersuchung liegt folgende Überlegung zugrunde. Wird dem Protein weniger Salz zugefügt als beim Entzug des Wassers an das Eiweiss gebunden werden kann, so findet sich im Trockenpräparat kein kristallines Natriumchlorid. Übersteigt der Salzzusatz dagegen die Ionenbindfähigkeit des Proteins, so wird nach dem Wasserentzug ein Gemisch von festem Casein und kristallinem Natriumchlorid erwartet. Letzteres würde im RÖNTGEN- oder Elektronenstrahl je nach der Kristallgrösse mehr oder weniger scharfe Reflexe verursachen, die bei der gleichmässigen Streuung des total amorphen Caseins leicht erkennbar sein sollten. Mit der RÖNTGEN-Strahlbeugung sind unter derartigen Bedingungen vermutlich Kriställchen nachweisbar, die Dimensionen von mindestens 50 Identitätsabständen besitzen. Die Elektronenbeugung ist zum Nachweis noch viel kleinerer Kristalle mit etwa 5 Identitätsabständen geeignet<sup>3)</sup>.

Zur röntgenographischen Prüfung der Casein-Proben auf kristallines Natriumchlorid wurden immer  $10 \pm 1$  mg Casein-Salz-Gemisch in einer schnelltrocknenden Kunstharzlösung in Benzol (Bedacryl ICI) eingebettet. Die RÖNTGEN-Diagramme wurden mit einer GUINIER-Kamera nach DE WOLFF hergestellt. Bestrahlt wurde mit dem  $\text{CuK}_\alpha$ -Dublett. Die Präparate befanden sich während der Bestrahlung unter einer evakuierten Haube und wurden dauernd hin und her bewegt. Die Belichtungszeit betrug durchwegs zwei Std. Die Herstellung der Präparate sowie das Belichten, Entwickeln und Fixieren der Filme erfolgte stets unter gleichen Bedingungen.

Zur Prüfung der eben noch nachweisbaren Menge kristallinen Natriumchlorides im Casein wurden verschiedene Gemische aus den trockenen Komponenten hergestellt. Das Salz wurde vorher im Mörser fein zerkleinert und dann noch einige Minuten mit dem Casein im Achatmörser zerrieben. Die Präparate enthielten 3,50%, 2,34%, 1,17%, 0,58%, 0,44%, 0,29%, 0,12% und 0,06% Natriumchlorid (zwischen 60 und 1 Mol Natriumchlorid auf  $10^5$  g Protein).

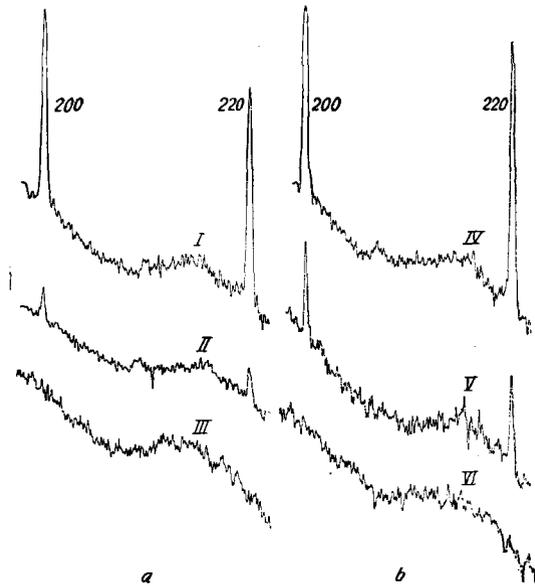
Auf den RÖNTGEN-Filmen ist bei 1 Mol NaCl auf  $10^5$  g Casein der Natriumchloridreflex 200 von Auge als schwache Linie eben erkennbar. 2 Mole NaCl geben eine deutliche, scharfe Linie, 5 Mole eine sehr ausgeprägte. Mit den Photometerdiagrammen der RÖNTGEN-Filme ist der Nachweis etwas weniger empfindlich, wie die Fig. 1a zeigt.

<sup>1)</sup> Eine ausführliche Beschreibung der Versuche findet sich in der Dissertation von S. GÁL, Bern 1961. Mikrofilme der ungekürzten Dissertation sind bei der Stadt- und Hochschulbibliothek Bern erhältlich.

<sup>2)</sup> R. SIGNER & S. GÁL, Makromol. Chem. 44-46, 259 (1961).

<sup>3)</sup> Z. G. PINSKER, Electron Diffraction, p. 201 *et seq.*, Butterworths, London 1953.

Fünf Mole ergeben eine deutliche Zacke (Kurve a, II), zwei Mole eine geringere (Kurve a, III), die in der allgemeinen Schwankung der Untergrundschwärzung verschwindet.



Photometerdiagramme von Casein-Natriumchlorid-Gemischen

Fig. a) *Komponenten trocken gemischt.*

Kurve I: 60 Mole, Kurve II: 5 Mole, Kurve III: 2 Mole NaCl auf  $10^5$  g Casein.

Fig. b) *Gemisch befeuchtet und wieder getrocknet.*

Kurve IV: 165 Mole, Kurve V: 105 Mole, Kurve VI: 93 Mole auf  $10^5$  g Casein.

Die wiedergegebenen Diagramme wurden mit einem KIPP & ZONEN Photometer aufgenommen.

In analoger Weise wurde mit RÖNTGEN-Strahlen eine Reihe von Casein-Natriumchlorid-Gemischen untersucht, bei denen das Salz in wässriger Lösung zugefügt und das Wasser, wie früher beschrieben<sup>2)</sup>, bei  $25^\circ$  langsam entzogen wurde. Bei Kochsalzmengen von 80 Molen auf  $10^5$  g Casein und darunter traten keine Natriumchlorid-Reflexe auf. Mit 93 Molen Salz war der 200-Reflex von Auge eben sichtbar, und zwar so stark, wie wenn 1 Mol Natriumchlorid ohne Wasser dem Casein zugefügt wird. Mit 105 und 167 Molen NaCl traten die Natriumchlorid-Reflexe stark auf (s. Fig. b).

Die RÖNTGEN-Untersuchung führt also zu dem Schluss, dass Casein aus wässriger Kochsalzlösung beim Eintrocknen etwa 90–95 Mole Salz auf  $10^5$  g so bindet, dass keine Reflexe des Kochsalzgitters auftreten.

Um festzustellen, ob das röntgenographisch nicht nachweisbare Natriumchlorid eventuell in sehr kleinen Kristalliten vorkomme, wurden mit einem Präparat von 69,1 Molen NaCl auf  $10^5$  g Casein Elektronenbeugungs-Aufnahmen gemacht.

Die Elektronenbeugungs-Untersuchung wurde sowohl auf einem Elektronendiffraktographen der Fa. TRÜB-TÄUBER als auch im SIEMENS-Elmiskop I durchgeführt. Die trockenen Präparate wurden in dünner Schicht auf Trägernetzchen aus Kupfer aufgebracht, die mit einer ungefähr 50 Å dicken Formvar-Folie überzogen waren. Im Elektronendiffraktographen wurde mit einer

Spannung von 50 kV durchstrahlt, was einer Wellenlänge des Elektronenstrahls von 0,0534 Å entspricht. Die zur Beugung beitragende Präparatfläche betrug dabei ungefähr 1 mm<sup>2</sup>. Im Elektronenmikroskop wurde mit 80 kV (entspr. 0,0417 Å) gearbeitet, und die ausgeblendete Fläche betrug ca.  $\frac{1}{100}$  mm<sup>2</sup>. Es wurden Vergleichsaufnahmen der blossen Trägerfolie und von feinteiligem, im Vakuum aufgedampftem NaCl hergestellt. Die Trägerfolie verursachte zwei schwache, sehr diffuse Beugungsreflexe, während das NaCl völlig scharfe, intensive Ringe ergab. Die Lage der Folien-Reflexe ist so, dass auch sehr schwache NaCl-Reflexe nicht verdeckt werden könnten. Das Casein selbst ist amorph, es verursacht lediglich eine Erhöhung der diffusen Untergrundschwärzung. Auf keiner der mit dem genannten Präparat hergestellten Beugungsaufnahmen waren Hinweise auf einen Gehalt an kristallinem NaCl zu finden.

Im Elmiskop I ist es möglich, nach der von RIECKE & RUSKA<sup>4)</sup> beschriebenen Technik der Feinbereichsbeugung bei ca. 20000facher Vergrösserung einen Objekt-Bereich von ungefähr 2  $\mu^2$  auszublenden und zur Elektronenbeugung zu verwenden. Trotzdem nach dieser Methode eine sehr grosse Anzahl NaCl-haltiger Casein-Partikel untersucht wurden, gelang es in keinem Fall, Reflexe von kristallinem NaCl zu finden.

Die beschriebenen Versuche zeigen, dass in den untersuchten Casein-NaCl-Präparaten keine NaCl-Kriställchen nachweisbar sind, deren Grösse 4–5 Identitätsabstände (entsprechend einer Kantenlänge von 20–25 Å) übersteigt.

Um die Verwendbarkeit der RÖNTGEN-Strahlen- und Elektronen-Beugungsmethoden für diesen speziellen Zweck auf breiterer Basis zu vergleichen, wurden weitere natriumchloridhaltige Caseinmuster mit dem Elmiskop untersucht. Man konnte in den Mustern mit 93 und 105 Molen Natriumchlorid weder mit der allgemeinen noch mit der Feinbereichs-Beugung Kristalle nachweisen, während das Muster mit 165 Molen die erwarteten Reflexe zeigte. Man kann daraus die Schlussfolgerung ziehen, dass das freie Natriumchlorid in diesen Mustern in Form von wenigen, grossen Kristallen vorliegt. Wenn nämlich das Salz, welches in diesen Mustern die deutlichen, scharfen RÖNTGEN-Reflexe verursachte, sich in feinverteiltem Zustand befände, würden die Reflexe auch im Elmiskop trotz der kleinen ausgeblendeten Fläche häufig auftreten. In solchen Fällen ist also die RÖNTGEN-Methode, bei welcher infolge der Bewegung des Präparatenhalters eine beträchtlich grössere Fläche während 2 Stunden beleuchtet wird, empfindlicher als die Elektronen-Beugung.

Die RÖNTGEN-Strahlen- und Elektronen-Beugungsergebnisse bestätigen also den Schluss, der schon aus den Sorptionsmessungen gezogen wurde, dass isoelektrisches Casein die Ionen des Natriumchlorids chemisch bindet. Die Beugungsversuche ergeben eine grösste gebundene Menge von 90–95 Molen der Natrium- und Chlorid-Ionen auf 10<sup>5</sup> g Casein. Die Wasserdampfsorptionsmessungen führten auf 111  $\pm$  15 Mole<sup>1)</sup>.

Die Zahl der positiv geladenen Gruppen im isoelektrischen Casein beträgt nach Aminosäureanalysen 110 Äquivalente auf 10<sup>5</sup> g<sup>5)</sup>. Die Ähnlichkeit dieser Zahl mit den obigen lässt vermuten, dass Casein nahezu an jeder positiv geladenen Gruppe ein Chlorid-Ion und natürlich an seinen anionischen Gruppen eine äquivalente Zahl von Natrium-Ionen bindet, wenn es aus seiner Suspension in Natriumchloridlösung langsam entwässert wird.

Die Arbeit wurde durch Mittel des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS unterstützt, die dem einen der Autoren (R. S.) zur Erforschung zwischenmolekularer Kräfte zu Verfügung standen.

<sup>4)</sup> W. D. RIECKE & E. RUSKA, Z. wiss. Mikroskop. 63, 288 (1957).

<sup>5)</sup> W. G. GORDON, W. F. SEMMETT, R. S. CABLE & M. MORRIS, J. Amer. chem. Soc. 71, 3293 (1949).

## SUMMARY

Investigations by X-ray and electron diffraction show that sodium chloride will be bound by casein, if the salt is added in aqueous solution to the protein and if the water is then removed under isothermal and nearly reversible conditions. This confirms earlier results obtained by water sorption measurements. The diffraction method is a simple and safe way for determining the maximum salt binding capacity of the protein. 90 to 95 moles of NaCl are bound by 10<sup>6</sup> g of casein, which is more than 80% of the amount calculated from the amino-acid composition of the protein.

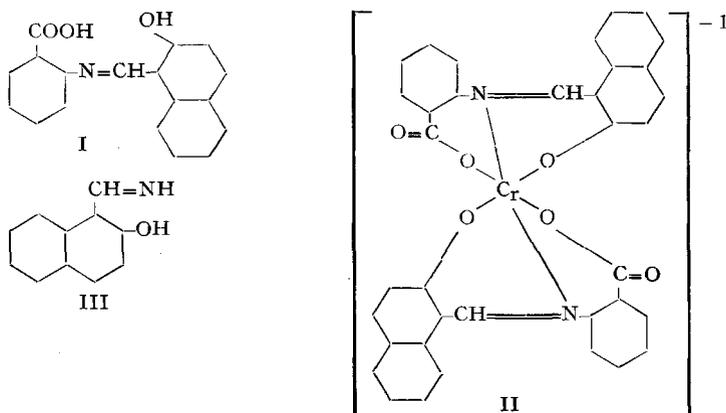
Institute für anorganische und organische Chemie  
der Universität Bern

### 95. Über isomere 1:2-Chromkomplexe aus der *o*-Carboxy-*o*'-hydroxy-azomethinreihe

von G. Schetty

(22. II. 62)

Nachdem wir Isomeriefälle bei 1:2-Chrom- und Kobalt-Komplexen aus *o*-Hydroxy-*o*'-carboxy-azofarbstoffen nachweisen konnten<sup>1)</sup>, interessierte uns die Frage nach den Verhältnissen bei den entsprechenden Chromkomplexen der Azomethinreihe. Diese Untersuchung schien uns schon deshalb sinnvoll, weil in diesen Komplexsystemen nur *ein* koordinierendes Stickstoffatom vorhanden ist. Damit wird eine Isomeriemöglichkeit, wie sie bei den Azoverbindungen durch Koordinieren des einen oder des anderen Stickstoffatoms denkbar ist<sup>2)</sup>, ausgeschlossen.



<sup>1)</sup> G. SCHETTY & W. KUSTER, Helv. 44, 2193 (1961). Der Name des diesem Komplex zugrunde liegenden Azokörpers, auf S. 2196, Zeile 4, als 1-(2'-Carboxy)-1'-(2''-hydroxynaphthyl)-azobenzol angegeben, wird jetzt durch Vereinbarung mit der Redaktion der H.C.A. in (2-Carboxyphenyl)-azo-(2-hydroxy-1-naphthalin) umgewandelt.

<sup>2)</sup> Diese Möglichkeit haben wir bis jetzt nicht diskutiert, da sie uns deshalb wenig wahrscheinlich schien, weil sie die Bildung je eines 7- und 5-Ringes voraussetzen würde. Die Ausbildung von 7-Ringen mit Chrom als Heteroatom ist durch Untersuchungen von H. PFITZNER (IG-FARBENINDUSTRIE, 11. wissenschaftl. Aka vom 20.5.1937; nach dem Krieg veröffentlichter interner Bericht der IG-FARBENINDUSTRIE) infrage gestellt worden.