

Mitteilung aus dem Analyt. Laboratorium der Universität Riga (Lettland)  
Vorstand: Prof. Dr. M. Straumanis

## Viscositätsmessungen an Lösungen verschiedener Desaminoproteine

Von **B. Jirgensons**

(Eingegangen am 4. Februar 1943)

In einigen unlängst veröffentlichten Arbeiten wurde gezeigt, daß die Lösungen des Desaminocaseins, Desaminoovalbumins, Desaminohämoglobins und Desaminoedestins viel höhere Viscosität als die entsprechenden Lösungen der unveränderten Proteine haben<sup>1)</sup>. Es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß bei der Desaminierung die verwendeten Sphäroproteine in Linearproteine umgewandelt werden. Die freien Aminogruppen sind also von entscheidender Bedeutung an der Biegung und Zusammenlagerung der Peptidketten.

In der vorliegenden Mitteilung wird über weitere Versuche, die mit anderen Desaminoproteinen ausgeführt worden sind, berichtet. Serumalbumin, Serumglobulin, Gliadin und Gelatine wurde desaminiert und die Viscosität der Lösungen der Desaminoproteine wurde gemessen. Einige wichtige Schlußfolgerungen über den Einfluß von Teilchengestalt und Ladung auf die Viscosität wurden gezogen.

### Versuchsteil. Ergebnisse

A. Desaminoserumalbumin. Zuerst wurde das Serumalbumin aus defibriniertem Pferdeblut hergestellt. Die Blutkörperchen wurden vom Serum abgetrennt und das Serum mit gleichem Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung vermischt. Nach einem Tag wurde das ausgefallene Serumglobulin abfiltriert und das Serumalbumin nach

<sup>1)</sup> B. Jirgensons u. M. Strautmanis, Kolloidn. Schurnal (russ.) **7**, 129 (1941); B. Jirgensons, J. prakt. Chem. [2] **160**, 120 (1942); **161**, 181 (1943); **161**, 293 (1943); **162**, (1943).

der Methode von Krüger<sup>2)</sup> ausgefällt. Der Albuminniederschlag wurde im Wasser gelöst und durch eine Kollodiummembran dialysiert. Die Lösung des reinen Serumalbumins wurde dann mit so viel 3 n-Essigsäure versetzt, daß die Konzentration der Säure im Gemisch 1 n war. Dann wurde die saure Albuminlösung bei Zimmertemperatur langsam mit einer Lösung von 10 g Natriumnitrit in 50 ccm Wasser versetzt und oft geschüttelt. Nach einigen Stunden ist die Desaminierung beendet. Nach 22stündigem Stehen bei Zimmertemperatur (12—16° C) wurde der Niederschlag abgenutscht, zuerst mit kaltem, dann mit warmem Wasser, nachher mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Das getrocknete, fein verriebene Desaminoserumalbumin ist eine schwach grau gefärbte Substanz, die sich in Lauge mit rotbrauner Farbe auflöste.

B. Desaminoserumglobulin. Das bei der Herstellung des Serumalbumins als Nebenprodukt gewonnene Serumglobulin wurde in Wasser gelöst (340 ccm) und mit 80 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Der aus Fibrinogen, Fibrinoglobulin und auch etwas Serumglobulin bestehende Niederschlag wurde verworfen. Das Serumglobulin wurde dann aus der Lösung durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Der Niederschlag wurde nochmals in Wasser gelöst und durch dritte Fällung in vollständig reiner Form erhalten. Das so gewonnene Serumglobulin wurde dann im Wasser gelöst und dialysiert. Nach der Dialyse wurden die Globulinflocken in Essigsäure gelöst (etwa 1 n im Gemisch) und mit 5 g Natriumnitrit in der üblichen Weise desaminiert. Nach 20 Stunden ist ein reichlicher Niederschlag des Desaminoproteins gebildet, wobei sich kein Stickstoff mehr entwickelt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit kaltem und warmem Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Die Substanz ist schwach gelb gefärbt und löste sich in 0,02 n-NaOH mit gelbbrauner Farbe.

C. Desaminogliadin. Gliadin wurde aus Weizenmehl nach der Methode von T. B. Osborne<sup>3)</sup> hergestellt. Das gut ausgewaschene Protein wurde in 3 n-Essigsäure gelöst. Die trübe Lösung wurde dann in der üblichen Weise mit NaNO<sub>2</sub> behandelt. Bald erfolgte Gasentwicklung und Abscheidung des Desaminoproteins. Schon nach etwa 1 Stunde war die Desaminierung beendet. Nach weiteren 5 Stunden wurde der klebrige, gelbe Niederschlag dekantiert, gründlich ausgewaschen und getrocknet.

D. Desaminogelatine. 5 g Gelatine („Golddruck“) wurde 2 Tage dialysiert, bei +80° in 150 ccm Wasser gelöst und mit so viel Essigsäure versetzt, daß die Säurekonzentration im Gemisch 2 n war. Das Gemisch wurde dann bis zu 30° abgekühlt und mit einer Lösung von

<sup>2)</sup> Vgl. E. Abderhalden, Handbuch biolog. Arbeitsmethoden I, S, 456 (1922).

<sup>3)</sup> Vgl. E. Abderhalden, a. a. O. S. 438.

5 g  $\text{NaNO}_3$  in 30 ccm Wasser langsam versetzt. Bald erfolgte Gasentwicklung, aber keine Niederschlagsbildung. Nach einigen Stunden erstarrte das Gemisch zu einer Gallerte. Diese wurde durch Erwärmung auf etwa  $80^\circ$  verflüssigt und mit einem doppelten Volumen Wasser verdünnt. Die Lösung wurde so lange geschüttelt, bis keine Stickstoffblasen mehr sichtbar waren, woraus man schließen kann, daß die Desaminierung beendet ist. Dabei erfolgte aber keine Abscheidung des Desaminoproteins. Das Gemisch wurde noch 2 Stunden (bei  $+40^\circ$ ) beobachtet und das Desaminoprotein dann mit Aceton ausgefällt. Der Niederschlag wurde in der üblichen Weise dekantiert, filtriert, gewaschen und getrocknet. Die Substanz ist hellbraun gefärbt und löste sich leicht im warmen Wasser. Die Lösung ist schwach gelbbraun gefärbt und reagiert neutral auf Lackmus.

Desaminoserumalbumin, Desaminoserumglobulin und Desaminogliadin sind unlöslich im Wasser, in Säuren oder in Salzlösungen. Diese Desaminoproteine wurden in Natriumhydroxyd aufgelöst. In der Regel wurde 0,25 g Substanz in 25 ccm 0,05 n oder 0,02 n NaOH gelöst. Desaminogelatine wurde im Wasser gelöst. Die Viscosität der Lösungen wurde mit Wi. Ostwaldschen Viscosimetern (Wasserszahlen bei  $25^\circ\text{C}$  80,0 Sek. und 102,2 Sek.) im Thermostaten bei  $20,0$  und  $25,0^\circ$  gemessen. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Überall wurde die spezifische Viscosität  $\eta_{\text{sp}} = \eta_{\text{rel}} - 1$  berechnet und angegeben.

Tabelle 1

Desaminoserumalbumin.  $T = 25,0^\circ$ . 1 Tag alte Lösungen

| 0,02 n-NaOH |                    |                      | 0,05 n-NaOH |                    |                      |
|-------------|--------------------|----------------------|-------------|--------------------|----------------------|
| c g/Liter   | $\eta_{\text{sp}}$ | $\eta_{\text{sp}}/c$ | c g/Liter   | $\eta_{\text{sp}}$ | $\eta_{\text{sp}}/c$ |
| 9,6         | 2,050              | 0,214                | 10,0        | 0,321              | 0,0321               |
| 4,8         | 1,130              | 0,236                | 5,0         | 0,194              | 0,0388               |
| 2,4         | 0,663              | 0,276                | 2,50        | 0,115              | 0,0460               |
| 1,2         | 0,400              | 0,333                | 1,25        | 0,068              | 0,0544               |
| 0,6         | 0,315              | 0,520                | 0,62        | 0,038              | 0,0608               |
| 0,3         | 0,131              | 0,437                | 0,31        | 0,024              | 0,0720               |

Tabelle 2

Desaminoserumglobulin.  $T = 25,0^\circ$ . 1 Tag alte Lösungen

|      |       |        |      |       |        |
|------|-------|--------|------|-------|--------|
| 10,0 | 0,675 | 0,0675 | 10,0 | 0,261 | 0,0261 |
| 5,0  | 0,375 | 0,0751 | 5,0  | 0,150 | 0,0300 |
| 2,5  | 0,231 | 0,0924 | 2,5  | 0,090 | 0,0360 |
| 1,25 | 0,132 | 0,1055 | 1,25 | 0,050 | 0,0400 |
| 0,62 | 0,088 | 0,1409 | 0,62 | 0,032 | 0,0512 |
| 0,31 | 0,052 | 0,1669 | 0,31 | 0,019 | 0,0609 |

Die verdünnteren Lösungen wurden aus den konzentrierteren durch Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Konzentration der Lauge erniedrigt sich also mit der Verdünnung. Das Verhältnis  $\frac{[\text{Desaminoprotein}]}{[\text{NaOH}]}$  bleibt also konstant. Das gleiche gilt für die Tab. 3 und 6.

Aus den Tabellen ist zu ersehen, daß die Viscositätszahlen  $\eta_{sp}/c$  zwischen 0,02 und 0,5 liegen, also 10—50-mal höher sind als diejenigen des Serumalbumins<sup>4)</sup>.

Tabelle 3

Verschiedene Desaminoproteine<sup>5)</sup>. $T = 20,0^\circ$ . Grundlösung: 0,25 g Substanz in 25 ccm 0,05 n-NaOH.3 Tage alte Lösungen. Verdünnung wie in Tab. 1 und 2 (mit H<sub>2</sub>O)

| Desaminoserumalbumin |               | Desaminoovalbumin „VI“ |               | Desaminocasein „207“ |               | Desaminohämoglobin „II“ |               | Desaminoedestin |               | Desaminogliadin |               |
|----------------------|---------------|------------------------|---------------|----------------------|---------------|-------------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| $c$ g/L              | $\eta_{sp}/c$ | $c$ g/L                | $\eta_{sp}/c$ | $c$ g/L              | $\eta_{sp}/c$ | $c$ g/L                 | $\eta_{sp}/c$ | $c$ g/L         | $\eta_{sp}/c$ | $c$ g/L         | $\eta_{sp}/c$ |
| 5,0                  | 0,0306        | 4,8                    | 0,0540        | 5,0                  | 0,0698        | 5,0                     | 0,0300        | 3,6             | 0,0350        | 5,0             | 0,0304        |
| 2,5                  | 0,0404        | 2,4                    | 0,0708        | 2,5                  | 0,0920        | 2,5                     | 0,0392        | 1,8             | 0,0472        | 2,5             | 0,0344        |
| 1,25                 | 0,0472        | 1,2                    | 0,0950        | 1,25                 | 0,1104        | 1,25                    | 0,0496        | 0,9             | 0,0567        | 1,25            | 0,0416        |
| 0,62                 | 0,0624        | 0,6                    | 0,1282        | 0,62                 | 0,1264        | 0,62                    | 0,0624        | 0,45            | 0,0690        | 0,62            | 0,0480        |
| 0,31                 | 0,0737        | 0,3                    | 0,1468        | 0,31                 | 0,1570        | 0,31                    | 0,0641        | 0,225           | 0,0890        | 0,31            | 0,0512        |

In der Tab. 3 sind die Messungsergebnisse von verschiedenen Desaminoproteinen zusammengestellt. (Desaminoovalbumin und Desaminoedestin waren nicht vollständig aufgelöst. Die Lösungen wurden filtriert und die Konzentration  $c$  im Filtrat durch Eindampfung, Trocknung und Wägung bestimmt.) Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß im Falle überschüssiger Lauge (alle verwendeten Laugen reagierten basisch), die Viscositätszahlen mit steigender Konzentration des Desaminoproteins ( $c$ ) in allen Fällen sich erniedrigen. Außerdem kann man feststellen, daß die Viscositätszahlen verschiedener Desaminoproteine sich voneinander nur wenig unterscheiden. Es wurde schon

<sup>4)</sup> Vgl. z. B. Wo. Pauli u. E. Valkó, Kolloidchemie der Eiweißkörper, 2. Aufl. 1933.

<sup>5)</sup> Die Herstellung des Desaminoovalbumins, Desaminocaseins, Desaminohämoglobins und Desaminoedestins ist in den früheren Arbeiten [a. a. O. <sup>1)</sup>] beschrieben.

früher die Möglichkeit erörtert, daß bei der Desaminierung die Proteinmoleküle in etwa gleich große Teilchen abgebaut werden, z. B. in langgestreckte Abbauprodukte von  $M=17600$ . Nun ist es aber bekannt, daß die Viscosität auch von der elektrischen Ladung der in der Lösung befindlichen Teilchen bedingt ist. Die Desaminoproteine haben einsinnig negative Ladung, die von der Zahl der vorhandenen Carboxylgruppen abhängig sein muß. Die Zahl der freien Carboxyle ist aber vom Gehalt der Aminodicarbonsäuren in dem betreffenden Protein abhängig. Wäre die Viscosität hauptsächlich von den elektrischen Eigenschaften bestimmt, dann sollten die Lösungen der carboxylreichen Desaminoproteine höhere Viscosität haben als die Lösungen der carboxylarmen Proteine. Nun enthält Gliadin etwa 46% Aminodicarbonsäure, Edestin 30% und Ovalbumin nur 21% dieser Aminosäuren<sup>6)</sup> (Glutaminsäure,  $\beta$ -Oxyglutaminsäure und Asparaginsäure). Die höchsten Viscositätszahlen hat aber gerade Desaminoovalbumin und Desaminocasein (36% Aminodicarbonsäure), Desaminogliadin dagegen die geringsten. Die Viscosität wird also nicht von dem Carboxylgehalt bzw. von der Ladung bestimmt, oder die Ladung spielt hier nur eine untergeordnete Rolle. Anscheinend sind die Teilchen des Desaminogliadins weniger langgestreckt als die Teilchen des Desaminocaseins oder Desaminoovalbumins.

Es wurde oft vorgeschlagen, die Viscosität von heteropolaren Molekülkolloiden in Gegenwart von großer Elektrolytkonzentration zu messen<sup>7)</sup>. Damit sollten die durch die Ladung hervorgerufenen Viscositätseffekte zurückgedrängt werden. Auch die Versuche mit den Desaminoproteinen zeigten [a. a. O. <sup>1)</sup>], daß in Gegenwart von großer Salzkonzentration die Viscosität sich erniedrigte. Die Salze wirken aber auch als Flockungsmittel, so daß die Erniedrigung der Viscosität auch als Folge der Koagulation erklärt werden kann. Eine ganz gegensätzliche Wirkung hat Natriumhydroxyd. Es wurde nun gefunden, daß auch in Gegenwart von großer NaOH-Konzentration die

<sup>6)</sup> Vgl. C. L. A. Schmidt, *The Chemistry of the Amino Acids and Proteins*, 1938.

<sup>7)</sup> H. Staudinger, *Die hochmolekularen organischen Verbindungen, Kautschuk und Cellulose*, 1932, S. 364; A. Polson, *Kolloid-Z.* 88, 51 (1939); H. Staudinger, *Chem. Z.* 66, 380 (1942).

die Viscosität sich erniedrigte. Aber auch von diesen Messungen kann man keinen sicheren Schluß über die Elektrolyteffekte ziehen, denn bekanntlich kann durch NaOH Abbau der Peptidketten stattfinden. Beim Desaminoserumalbumin und Desaminoserumglobulin, die in 2 n-NaOH gelöst wurden, waren die Viscositätszahlen ( $\eta_{sp}/c$ ) auch nicht konstant, sondern variierten mit der Konzentration ( $c$ ). Annähernd konstante Viscositätszahlen wurden im Fall von Desaminoserumalbumin, in Gegenwart von 0,5 n-NaCl, erhalten. In diesem Fall entstand von dem Elektrolyt auch keine sichtbare Trübung. Die Resultate sind in der Tab. 4 zusammengestellt.

Tabelle 4

Desaminoserumalbumin und Serumalbumin<sup>\*)</sup> mit 0,02 n-NaOH + 0,5 n-NaCl.  
 $T = 20,0^\circ$

| Desaminoserumalbumin |               | Serumalbumin |               |
|----------------------|---------------|--------------|---------------|
| $c$ g/Liter          | $\eta_{sp}/c$ | $c$ g/Liter  | $\eta_{sp}/c$ |
| 4,70                 | 0,0185        | 6,00         | 0,0088        |
| 2,35                 | 0,0204        | 3,00         | 0,0085        |
| 1,17                 | 0,0196        | 1,50         | 0,0060        |
| 0,58                 | 0,0182        | 0,75         | 0,0072        |

Betrachten wir die Viscositätszahlen hier als Maß der Disymmetrie, so wären die Moleküle des Desaminoproteins nur  $2^{1/2}$ -mal länger als die Moleküle des unveränderten Proteins. Es wurde aber schon früher darauf hingewiesen,<sup>\*)</sup> daß durch den Einfluß von Salz die Teilchengestalt sich beträchtlich verändern kann, so daß in elektrolytarmen Lösungen die Teilchen der Desaminoproteine langgestreckter sind als in Gegenwart von großer Salzkonzentration.

Die Schlußfolgerung, daß die chemischen Eigenschaften sowie die elektrische Ladung die Viscosität einer Proteinlösung bei Gegenwart von unorganischen Elektrolyten nur wenig beeinflussen, wird auch durch die folgenden, an Desaminogelatine

<sup>\*)</sup> Die verdünnteren Lösungen wurden hier aus den konzentrierteren durch Verdünnung mit 0,5 n-NaCl hergestellt. Die Konzentration des NaCl ist also in der ganzen Reihe konstant; das Verhältnis  $\frac{[\text{Protein}]}{[\text{NaCl}]}$  erniedrigt sich aber mit dem Verdünnungsgrad.

festgestellten Tatsachen bestätigt. Aus den Tab. 5 und 6 ist zu ersehen, daß Desaminogelatine im Vergleich zu Gelatine nicht höhere, sondern gerade umgekehrt — sogar noch etwas niedrigere Viscosität hat. Nun hat Gelatine langgestreckte Teilchen<sup>9)</sup>. Bei einem Linearprotein, wie z. B. der Gelatine, erfolgt also bei der Desaminierung keine Zunahme der Viscosität. Wäre aber die Viscosität von der einsinnig negativen Ladung der Desaminogelatine bedingt, so sollte auch im Fall der Desaminogelatine die Viscosität des Desaminoproteins höher sein als der unveränderten Gelatine.

Tabelle 5  
Desaminogelatine und Gelatine im Wasser.  $T = 25,0^\circ$

| Desaminogelatine |             |               | Gelatine    |             |               |
|------------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|
| $c$ g/Liter      | $\eta_{sp}$ | $\eta_{sp}/c$ | $c$ g/Liter | $\eta_{sp}$ | $\eta_{sp}/c$ |
| 9,0              | 0,533       | 0,0593        | 9,0         | 0,522       | 0,0580        |
| 4,5              | 0,268       | 0,0596        | 4,5         | 0,325       | 0,0722        |
| 2,25             | 0,139       | 0,0618        | 2,25        | 0,210       | 0,0933        |
| 1,12             | 0,084       | 0,0746        | 1,12        | 0,134       | 0,1099        |
| 0,56             | 0,051       | 0,0912        | 0,56        | 0,075       | 0,1230        |

Tabelle 6  
Desaminogelatine und Gelatine in 0,05 n-NaOH.  $T = 25,0^\circ$ .  
Verdünnung ebenso wie in Tab. 3 (mit Wasser)

| Desaminogelatine |             |               | Gelatine    |             |               |
|------------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|
| $c$ g/Liter      | $\eta_{sp}$ | $\eta_{sp}/c$ | $c$ g/Liter | $\eta_{sp}$ | $\eta_{sp}/c$ |
| 9,0              | 0,635       | 0,0705        | 9,0         | 0,675       | 0,0751        |
| 4,5              | 0,356       | 0,0792        | 4,50        | 0,395       | 0,0878        |
| 2,25             | 0,200       | 0,0889        | 2,25        | 0,230       | 0,1021        |
| 1,12             | 0,112       | 0,1000        | 1,12        | 0,146       | 0,1303        |
| 0,56             | 0,062       | 0,1108        | 0,56        | 0,088       | 0,1572        |
| 0,28             | 0,042       | 0,1500        | 0,28        | 0,051       | 0,1821        |

(Die Erniedrigung der Viscosität kann durch den bei der Desaminierung erfolgten Abbau der Peptidketten erklärt werden.)

<sup>9)</sup> Vgl. E. Krüger, Z. physik. Chem. **109**, 438 (1924); J. R. Katz u. O. Gerngross, Kolloid-Z. **39**, 180 (1926); M. Frankel, Z. physik. Chem. **167**, 26 (1927); G. Boehm u. R. Signer, Helv. chim. Acta **14**, 1389 (1931); B. Jirgensons, J. prakt. Chem. [2] **160**, 21 (1942).

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß Gelatine nur 9% Aminodicarbonsäuren enthält, also viel weniger als z. B. Albumin, Gliadin oder Casein. Die Viscositätszahlen der Desaminogelatine sind aber, wie es aus dem Vergleich der Tab. 3 und 6 ersichtlich ist, relativ hoch. Auch diese Tatsachen beweisen, daß die Viscosität der Desaminoproteine hauptsächlich vom Teilchengestalt abhängt.

#### Zusammenfassung

Serumalbumin, Serumglobulin, Gliadin und Gelatine wurden mit Natriumnitrit und Essigsäure behandelt und die Viscosität von Lösungen der gewonnenen Desaminoproteine wurde gemessen. Die Viscositätszahlen verschiedener Desaminoproteine wurden verglichen. Die Lösungen der desaminierten Sphäroproteine haben höhere Viscosität als die Lösungen der unveränderten Sphäroproteine, was von der Änderung der Teilchenform (Umwandlung in Linearproteine) bedingt ist. Die Viscosität der Lösungen eines desaminierten Linearproteins (Gelatine) ist dagegen etwas kleiner als die Viscosität des unveränderten Linearproteins. Die Viscosität von Lösungen der Desaminoproteine ist unabhängig von dem Carboxylgehalt des Proteins.