

Über die Aminosäurezusammensetzung von trypsinresistenten Phosphopeptonen aus α -Casein

Von

M. Pantlitschko und E. Gründig

Aus dem Institut für medizinische Chemie an der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 26. Februar 1958)

Es wird die Darstellung des Bariumsalzes eines „Phosphopeptons“ aus reinem α -Casein durch tryptische Verdauung beschrieben. Durch die Analyse des Hydrolysates dieses Peptons konnte die quantitative Zusammensetzung ermittelt werden. Die Verbindung besitzt ein Molekulargewicht von 3376, besteht aus insgesamt 20 Aminosäuren, an die vier Phosphorsäuren esterartig gebunden sind. Es besteht kein Anhaltspunkt dafür, daß die Phosphorsäure in verschiedenen Bindungsarten vorliegt. Es ist anzunehmen, daß zwei Moleküle Acetylglucosamin im Pepton gebunden sind.

Casein war schon frühzeitig der Gegenstand eingehender Untersuchungen. So konnte *Hammarsten*¹ 1883 bereits nachweisen, daß Casein eine beträchtliche Menge Phosphor in organisch gebundener Form enthält. *Posternak*² unterwarf Casein der tryptischen Verdauung und zeigte, daß relativ hochmolekulare Bruchstücke entstehen, die den Hauptteil des im Casein gebundenen Phosphors enthalten und von Trypsin nicht weiter abgebaut werden können. In der folgenden Zeit sind eine ganze Reihe von Arbeiten erschienen, die sich mit dem Problem dieser trypsinresistenten Bruchstücke des Caseins, die nach einem Vorschlag von *Rimington* und *Kay*³ als Phosphopeptone bezeichnet werden, befassen. Da verschiedene Abbaumethoden und auch verschiedene Caseine zur Darstellung dieser Phosphopeptone verwendet wurden, war keine Übereinstimmung der Analyseergebnisse zu erwarten, und dementsprechend sind auch die N:P-Werte der verschiedenen Autoren sehr variabel (Tab. 1). Auf Grund der

¹ O. Hammarsten, Z. physiol. Chem. **7**, 227 (1893).

² S. Posternak, Schwz. P. Nr. 104 336 (1923); S. Posternak, Biochem. J. **21**, 289 (1927).

³ C. Rimington und H. D. Kay, Biochem. J. **20**, 777 (1926).

Untersuchungen von *Posternak* und *Pollaczek*⁴ u. a. wird heute allgemein angenommen, daß die Gründe der Resistenz der Phosphopeptone gegen Trypsin und gegen die Aminopeptidase der Darmschleimhaut in dem hohen Gehalt dieser Verbindungen an Phosphorsäure zu suchen sind. *Damodaran* und *Ramachandran*⁵ konnten 1941 zeigen, daß nach Abspaltung der Phosphorsäure durch alkalische Hydrolyse das resultierende Pepton von Trypsin wie ein normales Pepton gespalten wird. Über die Aminosäurezusammensetzung des Peptons sind fast nur Untersuchungen älterer Autoren vorhanden (Tab. 1). Es konnten vor allem Serin, Glutaminsäure, Leucin und Asparaginsäure im Hydrolysat in wechselnden Mengen aufgefunden werden. Die Angabe von *Rimington*⁶ aus dem Jahre 1927, daß im Hydrolysat Oxyglutaminsäure vorhanden sei, wurde 1941 von ihm wieder zurückgezogen. Durch die Arbeiten von *Lipmann*⁷ und von *Levene* und *Hill*⁸ ist man über die Bindung der Phosphorsäure im Phosphopepton unterrichtet. Es gelang diesen Autoren, Serinphosphorsäure sowohl aus dem Casein als auch aus dem Phosphopepton zu isolieren. Erst *Mellander*⁹, der, ausgehend von der physiologischen Bedeutung dieser Phosphopeptone für die Ernährung des kindlichen Organismus, sich für diese Substanzen interessierte, versuchte mit Hilfe der Papierchromatographie die einzelnen Aminosäuren qualitativ nachzuweisen. Er fand bei der Analyse von Phosphopeptonen der Caseine verschiedener Spezies eine Reihe von Aminosäuren, die den älteren Autoren entgangen waren. All diesen Untersuchungen gemeinsam ist jedoch, daß sie der heterogenen Zusammensetzung des Ausgangsproduktes nicht Rechnung getragen haben. Untersuchungen über die Phosphopeptone der einzelnen Caseinkomponenten sind u. W. noch nicht durchgeführt worden, obwohl es naheliegend ist anzunehmen, daß sich Unterschiede in der Zusammensetzung der Phosphopeptone nachweisen lassen. Wir haben deshalb versucht, aus reinen Caseinfractionen möglichst einheitliche phosphorhaltige Peptone zu isolieren und ihre Zusammensetzung mit Hilfe der Säulenchromatographie quantitativ zu ermitteln.

Methodisches

Wir verwendeten als Ausgangsmaterial zur Darstellung der einzelnen Caseinfractionen das handelsübliche „Casein nach Hammarsten“. α -Casein wurde durch fraktionierte Alkoholfällung nach der Vorschrift von *Hipp* und Mitarb.¹⁰ dargestellt. Die Reinheit der Fraktion wurde laufend elektro-

⁴ *Th. Posternak* und *H. Pollaczek*, *Helv. Chim. Acta* **24**, 921 (1941).

⁵ *M. Damodaran* und *B. V. Ramachandran*, *Biochem. J.* **35**, 122 (1941).

⁶ *C. Rimington*, *Biochem. J.* **21**, 1179 (1927).

⁷ *F. Lipmann*, *Biochem. Z.* **262**, 3 (1933).

⁸ *P. A. Levene* und *D. W. Hill*, *J. biol. Chem.* **101**, 711 (1933).

⁹ *O. Mellander* und *C. H. Verdier*, *Acta Soc. Med. Upsal.* **57**, 218 (1952).

¹⁰ *N. J. Hipp*, *M. L. Groves*, *J. H. Custer* und *T. L. MacMeekin*, *J. Dairy Sci.* **35**, 272 (1952).

Tabelle 1

Autor	Dargestellt als	C %	H %	N %	P %	Ba %	Amino N %	Zahl d. A. S.	N : P	S
<i>S. Posternak</i> ²	freie Säure	—	—	11,36	6,29	—	—	15	3,75— 4,50	—
<i>C. Rimmington</i> ⁶	freie Säure	37,44	5,75	10,13	7,05	—	11	9	3,0	—
<i>S. Posternak</i> ²	freie Säure	—	—	—	—	—	—	14	3,5	—
<i>Levene und Hill</i> ⁸	Na-Salz	—	—	—	—	—	13,3	—	3,83— 4,30	—
<i>Schmidt</i> ¹¹	Ba-Salz	—	—	—	—	—	—	—	2,0	—
<i>Rimmington</i> ¹²	freie Säure	35,29	6,16	9,86	7,27	—	—	9	3,01	—
<i>Rimmington</i> ¹²	freie Säure	37,58	6,16	10,40	6,88	—	—	10	3,33	—
<i>Posternak und Pollaczek</i>	Ba-Salz	—	—	6,68	4,16	37,0	9,3	10—11	3,56	—
<i>Posternak und Pollaczek</i> ⁴	Ba-Salz	—	—	6,04	5,66	35,5	14,37	7	2,37	—
<i>Louwes et al.</i> ¹³	Na-Salz	—	—	10,56	5,77	—	12,6	8	4,0	—
<i>Damadaran et al.</i> ⁵	Ba-Salz	—	—	6,48	4,53	33,45	9,94	10	3,20	—
<i>Damadaran et al.</i> ⁵	Ba-Salz	—	—	6,44	4,26	33,12	9,84	10	3,25	—
<i>Mellander</i> ¹⁴	Ba-Salz	23,71	3,06	7,42	5,34	35,20	—	—	3,08	0
<i>Mellander</i> ¹⁴	Ba-Salz	23,43	3,38	8,21	5,37	31,08	—	—	3,39	0

¹¹ G. Schmidt, Z. physiol. Chem. **223**, 86 (1934).¹² C. Rimmington, Biochem. J. **35**, 321 (1941).¹³ J. Louwes, T. J. R. Macara und R. H. A. Plimmer, Biochem. J. **35**, 315 (1941).¹⁴ O. Mellander, Uppsala Läkarefören. Förhandl. **52**, 107 (1947).

phoretisch überprüft, und zwar mit Hilfe des Mikroelektrophorese-Apparates nach *Antweiler*, wobei wir bei Verwendung von Lösungen verschiedener Konzentration — meist 2% Casein in Phosphatpuffer von pH = 7,2, $\mu = 0,2$ (bei 45 V, 20 mA und 25 Min. Laufzeit) auch geringe Mengen von Verunreinigungen erfassen konnten. Die Umfällungen wurden so lange fortgesetzt, bis bei den oben genannten Bedingungen elektrophoretische Einheitlichkeit erreicht war. Wir möchten aber darauf hinweisen, daß dieselbe Fraktion, die bei der Wanderung im elektrischen Feld einheitlich erschien, bei der Überprüfung in der Ultrazentrifuge unter gleichen Bedingungen nicht einheitlich war (siehe auch die Untersuchungen von *Sullivan* und Mitarb.¹⁵).

Die Analysenwerte des α -Caseins, P = 1,02%, N = 15,5%, Glucosamin = 0,33% sind in guter Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur^{16, 17}. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit bestimmten wir in einem *Perkin-Elmer-Tiselius*-Apparat. Wir fanden bei einer Temp. von 4° C, $\mu = 0,2$, pH = 7,5 (Phosphatpuffer), $u = -8,27 \text{ cm}^2 \text{ Volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, während *Warner*¹⁶ bei $\mu = 0,1$ und pH = 6,96 (Phosphatpuffer) die Beweglichkeit zu $-7,52 \text{ cm}^2 \text{ Volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ fand.

Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten (wir sind Herrn Doz. Dr. *Auerswald* vom Physiol. Inst. der Universität Wien für die Durchführung der Messung zu Dank verpflichtet), die unter denselben Bedingungen wie die der elektrophoretischen Beweglichkeit durchgeführt wurde, ergab die Anwesenheit einer Hauptkomponente von 85% mit einer Sedimentationskonstante von $6,82 \cdot 10^{-13}$, während der geringere Anteil eine wesentlich kleinere Sedimentationskonstante von $1,71 \cdot 10^{-13}$ zeigte.

Darstellung des Phosphopeptons aus α -Casein

Wir hielten uns im wesentlichen an die Vorschrift von *Damodaran* und Mitarb.⁵. Eine 8%ige Lösung von Casein in Natronlauge wurde auf pH 8,2 eingestellt und mit handelsüblichem Trypsin (Heilmittelwerke Wien) 5 Tage bei 37° unter Toluolschutz digeriert. Nach dieser Zeit wurde mit Essigsäure auf ein pH von 4,6 gebracht, auf 0° abgekühlt und bei dieser Temperatur scharf zentrifugiert. Die klare Lösung wurde mit gesättigter Bleiacetat-lösung versetzt, das entstandene Bleisalz abzentrifugiert, mit 1%iger Bleiacetatlösung gewaschen und in Wasser suspendiert. Das Bleisalz wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt und das Bleisulfid abgetrennt. Zur Entfernung des überschüssigen Schwefelwasserstoffes wurde Luft durch die Lösung geblasen. Die stark saure Lösung wurde mit Natronlauge neutralisiert, mit Phosphatpuffer auf pH 8,2 eingestellt und neuerlich mit Trypsin (Endkonzentration 1%) durch 24 Stdn. bei 37° behandelt. Nun wurde abermals das Bleisalz, wie oben beschrieben, dargestellt und die freie Säure nach Entfernung des Bleis als Sulfid mit Barytwasser neutralisiert. Von unlöslichen Anteilen wurde abfiltriert, mit 1 m Bariumacetat-Essigsäure-Puffer (pH = 4,5) versetzt, mit Kaolin geschüttelt und zentrifugiert. Das Bariumsalz wurde durch Versetzen der Lösung mit dem doppelten Volumen Alkohol ausgefällt. Durch mehrmaliges Lösen im Bariumacetatpuffer und Fällung mit Alkohol erhält man leicht analysenreine Produkte, die hygroskopisch und in Wasser leicht löslich sind.

¹⁵ *R. A. Sullivan, M. M. Fitzpatrick, E. K. Stanton, R. Annino, G. Kissel* und *F. Palermi*, Arch. Bioch. Biophys. **55**, 455 (1955).

¹⁶ *R. C. Warner*, J. Amer. Chem. Soc. **66**, 1725 (1944).

¹⁷ *H. Masamune* und *Y. Nagazumi*, Tokio Journ. Biochem. **26**, 223 (1937).

Die gereinigten Bariumsalze wurden analysiert:

1. Nach dem Glühen bei 1000° bis zur Gewichtskonstanz konnte aus dem Rückstand, der, wie die Analyse zeigte, aus Bariumpyrophosphat bestand, der Barium- und Phosphorgehalt berechnet werden.

2. Anorganisches Phosphat, das nach *Lowry* und *Lopez*¹⁸ bestimmt werden kann, konnte in keinem der dargestellten Bariumphosphopeptone nachgewiesen werden. Die Menge des bei der alkalischen Hydrolyse freigesetzten Phosphates wurde nach Einstellung des pH-Wertes auf 4,5 nach derselben Methode ermittelt. Die Bestimmung des Gesamtphosphors wurde nach Veraschung mit Schwefel- und Salpetersäure nach *Lohmann* und *Jendrassik*¹⁹ vorgenommen.

3. Der Gesamtstickstoff wurde nach *Kjeldahl* und *Dumas* ermittelt.

4. Die Acetylbestimmung wurde nach *Kuhn* und *Roth*²⁰ durchgeführt.

5. Hydrolyse des Bariumsalses des Phosphopeptons:

Die über P₂O₅ getrocknete Substanz wurde in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen 16 Stdn. bei 110° mit 6 n Salzsäure erhitzt, nachdem die Luft durch Stickstoff verdrängt worden war, das Hydrolysat am Wasserbad zur Trockne eingedampft, die Salzsäure durch wiederholtes Eindampfen mit Wasser entfernt, der Rückstand in 10 ccm Puffer nach *Moore* und *Stein* aufgenommen. Diese Lösung diente zur Bestimmung des „Amid-N“, Amino-N sowie zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren.

6. Zur Bestimmung des „säureamidartig“ gebundenen Stickstoffes bedienen wir uns der Methode von *Conway*²¹, die bei nicht zu kleiner Einwaage stets gut reproduzierbare Werte lieferte.

7. Der Aminostickstoffgehalt wurde nach der gasometrischen Carboxyl-C-Methode nach *van Slyke* und Mitarb.²² ermittelt.

8. Analytischer Nachweis der Aminosäuren mit Hilfe der Papierchromatographie: Wir verwendeten für unsere absteigenden, eindimensionalen Chromatogramme Filterpapier Whatmann Nr. 1 und bedienten uns der von *Fischer* und *Dörfel*²³ gemachten Vorschläge bezüglich der Wahl des Steigmittels und der Entwicklung des Streifens. Die gepufferten Verteilungsmedien wurden nach den Angaben von *McFarren*²⁴ hergestellt. Das Phenol wurde durch Destillation über Zinkstaub von den farbigen Verunreinigungen befreit und durch Zugabe von Natriumcyanid von erneuter Verfärbung geschützt. Zur Sättigung des Phenols mit den wäßrigen Pufferlösungen schüttelten wir gleiche Anteile Phenol und Pufferlösung bei der Temperatur, die beim Verteilungsversuch herrschte. Wir verwendeten zur Auftrennung des Hydrolysates Phenol von pH 1 und pH 12 sowie zum Nachweis des Methionins neben Leucin und Isoleucin nach *Boissonas*²⁵ ein Lösungsmittelgemisch aus Butanol-Methyläthylketon-Wasser im Verhältnis 2 : 2 : 1, und ließen zur Kontrolle reine Aminosäuren mitlaufen.

¹⁸ O. H. Lowry und J. A. Lopez, J. biol. Chem. **162**, 412 (1946).

¹⁹ K. Lohmann und L. Jendrassik, Biochem. Z. **178**, 419 (1926).

²⁰ R. Kuhn und H. Roth, Ber. dtsch. chem. Ges. **66**, 1274 (1933).

²¹ E. J. Conway und E. O'Malley, Biochem. J. **36**, 655 (1942).

²² D. D. van Slyke, R. T. Dillon, D. A. MacFadyen und P. Hamilton, J. biol. Chem. **141**, 726 (1941).

²³ F. G. Fischer und H. Dörfel, Biochem. Z. **324**, 544 (1953).

²⁴ E. F. McFarren und J. A. Mills, Anal. Chem. **24**, 650 (1952).

²⁵ R. A. Boissonas, Helv. Chim. Acta **33**, 1966 (1950).

9. Quantitative Bestimmung der Aminosäuren:

Wir bedienten uns der von *Moore* und *Stein*²⁶ entwickelten Methode zur Trennung von Aminosäuregemischen mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50- x 4. Wir hielten uns in bezug auf Reinigung des technischen Ionenaustauschers und Abmessungen der Säule an die Angaben der erwähnten Autoren. Als Puffer verwendeten wir einen 0,2 m Citratpuffer von pH 3,40 mit einem Zusatz von 1% Benzylalkohol sowie 0,1% Tween 80, die Temperatur betrug 37°. Nach dem Durchlaufen des Alanins wurde dieser Puffer durch einen 0,2 m Citratpuffer von pH 4,25 mit denselben Zusätzen ersetzt, und die Temperatur auf 50° gesteigert. Zur Trennung des Eluates in 1 cm-Anteile diente uns ein Fraktomat der Firma *Hako* (Tübingen).

Zur Analyse der aufgefangenen 1 cm-Portionen verwendeten wir nicht die von *Moore* und *Stein* vorgeschlagene Methode, da sie für uns technisch nicht durchführbar war. Wir entwickelten daher eine Bestimmungsmethode, die es erlaubt, eine große Anzahl von Einzelbestimmungen von Aminosäuren, wie sie bei der Fraktionierung von Eiweißhydrolysaten anfallen, schnell und genau durchzuführen. Nach *Fischer* und *Dörfel*²³ besteht die Möglichkeit, Papierchromatogramme von Aminosäuren quantitativ mit Hilfe der Ninhydrinreaktion und Überführung des blauen Farbstoffes in die roten Kupferkomplexe auszuwerten. Es gelang, diese Methode mit bestem Erfolg auf unser Problem anzuwenden. Wir gingen folgendermaßen vor:

Filterpapier Whatmann Nr. 1 wird mit Bleistift in 3 × 3 cm große Felder eingeteilt, das Papier in handliche Streifen zerschnitten (meist 12 × 36 cm) und waagrecht aufgespannt. Nun wird ein etwa 40° warmer Luftstrom darauf gerichtet, in jedes Feld mit einer geeichten Pipette 50 cmm Lösung aus jeder der 1 cm-Portion aufgetragen und getrocknet. Man kann auf einem Streifen bis zu 50 Proben auftragen. Die Streifen werden, nachdem man sie flexibel gemacht hat, durch eine Ninhydrinlösung (50 mg Ninhydrin in 8,6 ccm wassergesättigtem n-Butanol und 1,4 ccm Eisessig), die sich in einem Trog befindet, gezogen, 20 Min. im Luftstrom bei Zimmertemperatur getrocknet und für 20 Min. in einen Trockenschrank von 70° gebracht. Die Überführung des blauen Ninhydrinfarbstoffes in den Kupferkomplex kann man auf zwei Arten erreichen. Man kann erstens in einem warmen Luftstrom von etwa 40—50° die Papierstreifen auf beiden Seiten mit alkohol. Kupfernitratlösung (2 ccm gesättigte wäßrige Kupfernitratlösung, 0,2 ccm 10%ige Salpetersäure, 97,8 ccm Äthylalkohol) besprühen und wieder trocknen lassen. Das Aufbringen dieser Lösung muß sehr vorsichtig erfolgen, damit kein Verwaschen der Flecken eintritt. Die Papierquadrate werden unmittelbar nach Entstehung der roten Farbe ausgeschnitten, der Farbstoff mit 4 ccm Methylalkohol eluiert und in einem Spektrophotometer bei 504 m μ gemessen.

Die zweite Methode besteht darin, daß man die Papierquadrate mit dem blauen Ninhydrinfarbstoff direkt in 4 ccm Methylalkohol, der 1%ig in bezug auf alkoholische Kupfernitratlösung ist, eluiert und die Messung sofort nach der Elution durchführt. Die Reaktion der verschiedenen Aminosäuren mit Ninhydrin auf dem Papier ist von vielen Faktoren abhängig (Trocknungszeit, Feuchtigkeitsgehalt der Luft, Trocknungstemperatur, Reaktionstemperatur), die nur schwer konstant zu halten sind. Um einwandfreie quantitative Bestimmungen durchführen zu können, ist es daher notwendig, auf demselben Streifen auf einige Felder eine Standardlösung der in Frage kommenden Aminosäuren aufzutragen und die Extinktion dieser bekannten Aminosäuremengen als Bezugswert zu verwenden. Wir konnten feststellen, daß das

²⁶ *S. Moore* und *W. H. Stein*, *J. biol. Chem.* **192**, 663 (1951).

Lambert-Beersche Gesetz für alle Aminosäuren mit Ausnahme des Glykokolls in dem Bereich von 0,25 γ –15 γ Aminosäure pro Papierquadrat gültig ist.

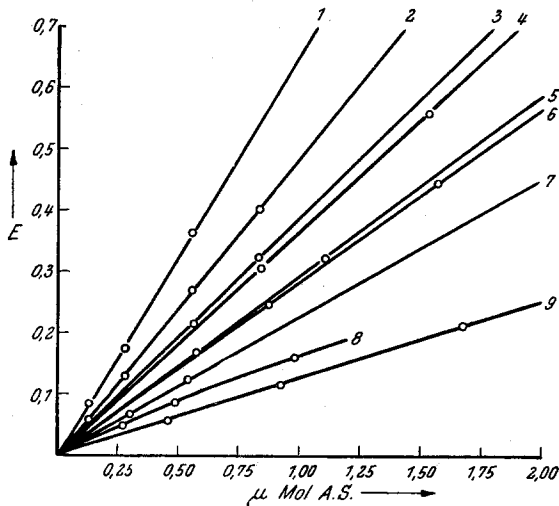


Abb. 1. Extinktion pro Mikromole Aminosäuren

1 = Leucin, 2 = Valin, 3 = Alanin, 4 = Glutaminsäure,
5 = Threonin, 6 = Serin, 7 = Phenylalanin, 8 = Glykokoll,
9 = Asparaginsäure

So fanden wir z. B. in einem Hydrolysat des Phosphopeptons nach der Carboxyl-C-Methode von *van Slyke et al.*²² 492 γ Aminosäurestickstoff. Nach der Trennung des Gemisches in der Kolonne ergab die Bestimmung aller aufgefundenen Aminosäuren, nach obigem Verfahren, 480,4 und 484,0 γ Amino-N. Die Differenz betrug also nur 2,2%.

10. Der Nachweis des Glucosamins wurde papierchromatographisch nach der Vorschrift von *Stoffyn und Jeanloz*²⁷ durchgeführt.

Ergebnisse

Die Analysenergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Präparation	Glührückst.	Phosphor			Barium		Stickstoff			Schwefel n. Carius	Acetyl nach ²⁶
		aus Glührückst.	anorg. nach ¹⁴	gesamt nach ¹⁰	aus Glührückst.	aus BaSO ₄	gesamt Kjeldahl Dumas	Amid nach ¹⁵	Amino nach ¹⁶		
1	26,82	3,72	0	3,62	16,45	16,52	9,12	1,00	8,20	0,95	—
2	26,71	3,70	0	3,58	16,38	16,28	9,21	0,97	8,10	—	—
3	—	—	0	3,70	—	—	9,30	1,02	8,25	0,97	2,52
Mittel	26,75	3,71	0	3,65	16,42	16,40	9,21	0,99	8,18	0,96	2,52

²⁷ P. J. Stoffyn und R. W. Jeanloz, Arch. Biochem. Biophys. 52, 373 (1954).

Die Bestimmung des anorganischen Phosphates nach *Lopez* und *Mitarb.*¹⁸ sowie der Vergleich zwischen Gesamtphosphat und dem Phosphat aus dem Rückstand berechnet, zeigt uns, daß unsere Phosphopeptone frei von anorganischen Verunreinigungen sind. Nach den Arbeiten von *Lipmann*⁷ sowie *Levene* und *Hill*⁸, die aus Casein bzw. Phosphopeptone Phosphoserin isolierten, besteht kein Zweifel, daß die Phosphorsäure im Casein an Serin, eventuell an Threonin gebunden ist. Andererseits ist durch Untersuchungen von *Perlmann*²⁸ und *Nguyen-Vanthoai*²⁹ bekannt, daß die saure Phosphomonoesterase aus Kartoffeln alle Phosphopeptone, die durch Abbau mit Trypsin aus natürlich vorkommenden Phosphoproteinen gewonnen werden, dephosphoryliert, aber nicht jene, die durch Abbau mit Pepsin dargestellt werden. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die Phosphorsäure in den Phosphorproteinen bzw. Peptonen in zwei verschiedenartigen Bindungen vorliegt. Unser Phosphopepton ist gegen 1 n Säure sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 100° durchaus beständig. Pyrophosphatartig gebundene Phosphorsäure sowie Monosephosphate und labile Phosphatbindungen können also ausgeschlossen werden. In alkalischer Lösung werden die Phosphopeptone jedoch sehr leicht angegriffen.

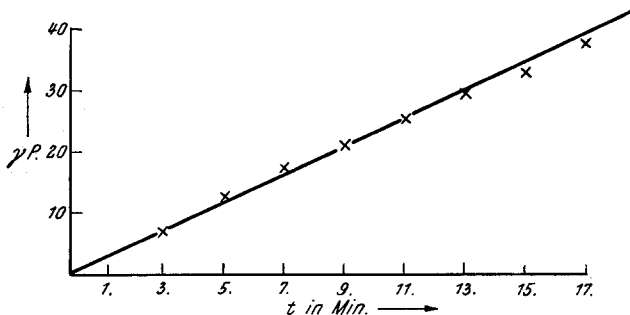


Abb. 2. γ P in 0,02 n NaOH bei 37° in Freiheit gesetzt

Aus Abb. 2 ist zu entnehmen, daß die Abspaltung der Phosphorsäure in 0,02 n Lauge bei 37° als Reaktion erster Ordnung anzusehen ist. Es ergibt sich kein Anhaltspunkt für die Anwesenheit von verschiedenartigen Bindungen der Phosphorsäure. Die Hydrolysenkonstante ($k = 1/t \ln a/a - x$) berechnet sich bei den oben angeführten Bedingungen zu $38,7 \cdot 10^3$.

Die qualitative und quantitative Aminosäureanalyse des Phosphopeptons ergab die Anwesenheit von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin,

²⁸ G. E. *Perlmann*, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 3191 (1952).

²⁹ *Nguyen-Vanthoai*, J. Roche und P. Pin, Bull. Soc. Chim. Biol. **36**, 483 (1954).

Threonin, Alanin, Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin und Methionin. Die Abb. 3 zeigt ein Austauschchromatogramm eines bei 110° in 6n Salzsäure hydrolysierten Phosphopeptons.

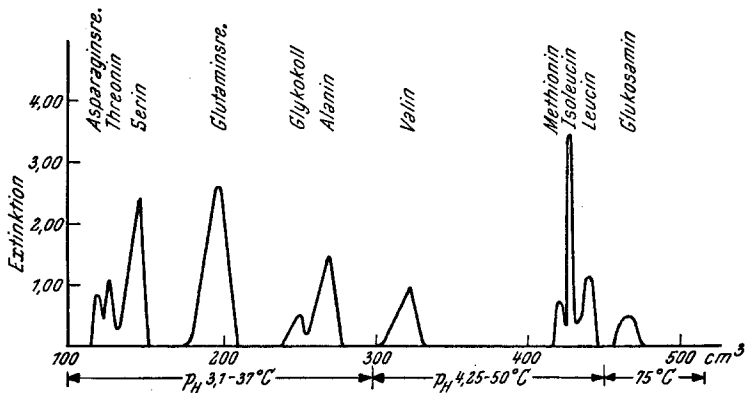


Abb. 3. Extinktion pro cem Eluat

Die quantitative Auswertung des in Abb. 3 dargestellten Austauschchromatogramms ergab die in Tabelle 3 zusammengefaßten Ergebnisse.

Tabelle 3

	10 ⁻⁶ Mole bez. auf Einwaage	γ Amino-N	Anzahl der A. S. pro Mol.
Asparaginsäure	1,08	15,2	1
Threonin	1,10	15,4	1
Serin	4,36	61,4	4
Glutaminsäure	6,35	89,0	6
Glykokoll	1,10	15,4	1
Alanin	2,10	29,4	2
Valin	1,95	27,3	2
Leucin	1,20	18,2	1
Isoleucin	1,04	13,2	1
Methionin	1,08	15,2	1
		299,7	20

Einwaage 8,71 mg gefunden 299,7 γ Amino N
 = 8,08 % aus Aminosäureanalyse
 gefunden 304,0 γ Amino N
 = 8,20 % aus Carboxyl C
 Methode nach²³

Ein Vergleich des Aminostickstoffwertes, der aus den gefundenen Aminosäuren berechnet werden kann, mit dem im Hydrolysat nach der

Carboxyl-C-Methode nach *van Slyke* bestimmten ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Da wir nach letzterer Methode 8,2% Aminostickstoff, nach *Conway* 0,99% Amidstickstoff und bei der Gesamtstickstoffbestimmung 9,2—9,3% N fanden, nahmen wir zuerst an, daß ein Teil der Asparaginsäure oder Glutaminsäure in Amidform vorliegt. Berechnungen des Molekulargewichtes aus den Barium-, Phosphor- und Stickstoffanalysenwerten ergaben im Vergleich zu dem aus den Aminosäureanalysen ermittelten zu hohe Werte. Es mußte also noch eine stickstoffhaltige Komponente mit höherem Molekulargewicht, als es die Aminosäuren aufweisen, vorhanden sein. Unser Verdacht richtete sich von allem Anfang an auf Hexosamin, da ja in der Literatur bekannt ist¹⁷, daß in Casein Glucosamin vorkommt. Versuche, das Hexosamin nach der Methode von *Boyer* und *Fürth*³⁰ bzw. nach *Nilsson*³¹ quantitativ zu bestimmen, schlugen fehl. Schon *Morgan*³² konnte zeigen, daß bei Anwesenheit von Aminosäuren die Farbreaktion des Glucosamins nach *Boyer* ausbleibt. Erst die Mikroacetylbestimmung nach *Kuhn-Roth*²⁰, die 2,52% Acetylgehalt ergab, zeigte uns, daß in dem Phosphopepton ein acetyliertes Hexosamin vorkommen könnte. Der Nachweis der Aminohexose und ihre Identifizierung gelang uns nach den Angaben von *Stoffyn* und *Jeanloz*²⁷. Wir mußten allerdings andere Hydrolysenbedingungen wählen und behandelten das Phosphopepton eine Stunde bei 100° in 1 n Salzsäure. Die durch die Ninhydrinreaktion entstandene Pentose, in unserem Falle Arabinose, trennten wir von den übrigen Reaktionsprodukten papierchromatographisch und wiesen den Zucker mit der Methode von *Trevelyan*³³ nach. Wir haben aus den Analysendaten für das Barium, den Phosphor und den Stickstoff das Molekulargewicht zu für das Ba-Salz des Phosphopeptions 3376 berechnet und geben in der Tabelle 4 einen Vergleich der berechneten und gefundenen Werte.

Tabelle 4

	Glührückstand	Phosphor	Barium	Gesamt-N	Amid-N	Amino-N	Schwefel	Acetyl
gefunden	26,75	3,68	16,41	9,21	0,99	8,18	0,96	2,52
berechnet	26,55	3,67	16,23	9,12	0,83	8,30	0,947	2,54

Wir glauben uns berechtigt, für das isolierte Bariumsalz des durch tryptische Verdauung aus Casein gewonnenen Phosphopeptons folgende Zusammensetzung annehmen zu dürfen:

³⁰ R. Boyer und O. Fürth, *Biochem. Z.* **282**, 242 (1935).

³¹ I. Nilsson, *Biochem. Z.* **285**, 386 (1936).

³² C. M. J. Rondle und W. T. J. Morgan, *Biochem. J.* **61**, 586 (1955).

³³ W. E. Trevelyan, D. P. Procter und J. S. Harrison, *Nature* [London] **166**, 444 (1950).

Das Pepton besteht aus 20 Aminosäuren, davon sind 5 Hydroxyaminosäuren. 4 Phosphorsäurereste sind esterartig, wahrscheinlich an das Serin, gebunden. Durch die Anwesenheit von 2 Molekülen Acetylglucosamin erklärt sich auch das Vorhandensein von „Amidstickstoff“, da wir nach *Tracey*³⁴ nachweisen konnten, daß unter den Arbeitsbedingungen nach *Conway* das Ammoniak aus dem Hexosamin quantitativ abgespalten wird.

³⁴ *M. V. Tracey*, *Biochem. J.* **52**, 265 (1952).