

**ZUR BIOCHEMIE
DES
EIWEISSES**

DEUTSCHER VERLAG DER WISSENSCHAFTEN

**ZUR
BIOCHEMIE
DES
EIWEISSES**

1956

VEB DEUTSCHER VERLAG DER WISSENSCHAFTEN

BERLIN

Die sowjetischen Zeitschriften, aus denen die einzelnen Arbeiten entnommen wurden,
sind jeweils am Anfang einer neuen Arbeit in einer Fußnote angeführt

Übersetzung: O. Lebtag

Alle Rechte vorbehalten

Copyright 1956 by VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin

Printed in Germany

Lizenz-Nr. 206 · 435/49/56

Gesamtherstellung: (III/18/203)  VEB Leipziger Druckhaus, Leipzig

VORBEMERKUNG

Der Gedanke, sowjetische biochemische Arbeiten in deutscher Übersetzung zu veröffentlichen, findet seine Erklärung sowohl in dem Umstand, daß bisher nur ein beschränkter Kreis von sprachkundigen Lesern die sowjetische Literatur zu verfolgen vermag, als auch in dem hohen Niveau der sowjetischen Biochemie, deren Ergebnisse es verdienen, einem breiteren Kreis deutscher Wissenschaftler zugänglich gemacht zu werden. Daß die Biochemie in der Sowjetunion in den letzten Jahrzehnten eine stürmische Entwicklung erfahren hat und jetzt eine erstrangige internationale Stellung einnimmt, ist unbestreitbar. Sie besitzt aber auch eine große Tradition. Es mögen nur die Namen von BACH und PALLADIN, die Schöpfer der ersten modernen biologischen Oxydations- und Dehydrations-theorien, genannt sein.

Bei der Auswahl aus der Vielfalt der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeiten schien es vorteilhaft, einen Schwerpunkt zu wählen und eine zeitliche Begrenzung auf die jüngste Vergangenheit vorzunehmen. War diese Vorstellung gerechtfertigt, so erschien es natürlich, als zentrales Thema die Biochemie der Eiweißkörper zu wählen, jener Stoffklasse, deren Stoffwechsel den Lebensprozeß selbst kennzeichnet; insbesondere, das sie aus denselben Gründen einen Schwerpunkt in der sowjetischen biochemischen Forschung darstellt. Die im vorliegenden Band vereinten Arbeiten spannen den Bereich von rein physikalisch-chemischen Untersuchungen an isolierten Eiweißkörpern bis zur Erforschung des Zwischenstoffwechsels der Aminosäuren.

Schon eine oberflächliche Durchsicht der Arbeiten läßt eine gewisse Gemeinsamkeit erkennen. Die Anwendung moderner Methodik, engster Kontakt mit den letzten Ergebnissen der internationalen Wissenschaft, ein stolzes Bewußtsein der eigenen Tradition, großer Gedankenreichtum sind offenbar. Man erkennt auch deutlich, daß die sowjetische Biochemie den Standpunkt einer biologischen Wissenschaft bezieht, nicht — wie es so häufig gerade in Deutschland ist — sich nur als die Chemie der Naturstoffe betrachtet.

Die erste Arbeit von FRENKEL befaßt sich mit der Anwendung einer der modernsten Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Eiweißkörpern. Von besonderem Interesse ist die Anwendung auf das wichtige, noch ungelöste Problem der Denaturierung der Eiweißkörper. Ein Artikel der Arbeitsgruppe um BRÄSLER befaßt sich mit der Re-synthese bzw. Renaturierung von Eiweißkörpern durch hohe Drucke. Es handelt sich hier um Teilergebnisse einer selbständigen Entwicklung der Sowjetwissenschaft, die größte theoretische Bedeutung für die Probleme der Struktur und der biologischen Synthese der Eiweißkörper besitzt. Der Artikel von TONGUR über die Umkehrbarkeit der Eiweißdenaturierung stellt eine Zusammenfassung der internationalen Literatur wie auch zahlreicher sowjetischer Arbeiten dar. Er zeichnet sich durch eine scharfsinnige Behandlung dieses Problems aus. Die Abhandlungen der Arbeitsgruppe um SISSAKJAN befassen sich mit Eigenschaften der Plastiden-Eiweiße. Das Gebiet der Pflanzenbiochemie ist schon lange Zeit im Brennpunkt des Interesses der Biochemiker der Sowjetunion, während es erst in den letzten Jahren eine erhöhte Aufmerksamkeit in anderen Ländern zu erwecken beginnt. Der Artikel von WOROBJOW und SCHAPOT stellt eine Pionierarbeit der synthetischen Biochemie dar, gestützt auf die dialektische Auffassung der Beziehung

zwischen Struktur, Chemismus und Funktion, wie sie ursprünglich von ENGELS entwickelt und mit solcher Kühnheit von OPARIN auf die Probleme der Entstehung des Lebens angewendet wurde; sie ist ein Schritt zur Lösung der krönenden Aufgabe der Biochemie, der Synthese des Lebens, die die materialistische Wissenschaft als ein durchaus erreichbares Ziel ansieht. Zwei Artikel stammen von BRAUNSTEIN und seinen Mitarbeitern. Sie befassen sich mit dem Zwischenstoffwechsel der Aminosäuren, einem Gebiet, dessen gegenwärtige Entwicklung durch BRAUNSTEINS klassische Entdeckung der Transaminierung eingeleitet wurde. BRAUNSTEIN gibt einen Überblick über die Bedeutung des Vitamins B₆ im Aminosäurestoffwechsel und entwickelt auf der Grundlage der modernen Vorstellungen der theoretischen organischen Chemie eine umfassende Theorie der vielfältigen Prozesse, die durch die Pyridoxalenzyme katalysiert werden.

In der Vergangenheit waren die Beziehungen zwischen der deutschen und der russischen Wissenschaft sehr eng. Viele deutsche Wissenschaftler waren oft lange Jahre an russischen Forschungstätten, viele russische Wissenschaftler weilten in deutschen Laboratorien. Die vorliegende Sammlung soll als ein bescheidener Beitrag zur Vertiefung der gegenseitigen Beziehungen zwischen der deutschen und der sowjetischen Wissenschaft dienen.

INHALTSVERZEICHNIS

S. J. FRENKEL

Bestimmung des Molekulargewichts von Eiweißstoffen nach der Methode der Lichtstreuung in Lösungen 1

S. J. BRESLER · M. W. GLIKINA · N. A. SELESNEWA · P. A. FINOGENOW

Untersuchung der Resynthese von Eiweißen unter Druck 22

W. S. TONGUR

Einige Fragen der Umkehrbarkeit der Eiweißdenaturierung 38

N. M. SISSAKJAN · E. N. BESINGER · J. B. KUWAJEW

Aminosäurezusammensetzung der Plastideneiweiße 68

N. M. SISSAKJAN · S. S. MELIK-SARKISSJAN · E. N. BESINGER

Über die chemischen und elektrochemischen Eigenschaften der Plastideneiweiße .. 81

W. I. WOROBJOW · W. S. SCHATOT

Über Eiweißverbindungen von Hochpolymeren als Grundlage der Protoplasmastrukturen 100

A. J. BRAUNSTEIN

Die Funktionen von Vitamin B₆ bei den Prozessen des Aminosäurestoffwechsels ... 121

A. J. BRAUNSTEIN · M. M. SCHEMJAKIN

Theorie der durch Pyridoxalenzyme katalysierbaren Prozesse des Aminosäurestoffwechsels 162

S. J. Frenkel

Bestimmung des Molekulargewichts von Eiweißstoffen nach der Methode der Lichtstreuung in Lösungen¹

In den letzten Jahren hat die Untersuchung der Makromoleküle mit der Methode der Lichtstreuung in Lösungen eine starke Verbreitung gefunden. Die Vorteile dieses Verfahrens bestehen darin, daß das untersuchte System praktisch keiner äußeren Einwirkung unterworfen ist und daß die Messungen rasch erfolgen können. Wenn im System irgendwelche Veränderungen (Aggregation, Polymerisation, Dissoziation) vor sich gehen, können diese leicht bestimmt werden. Dieses Verfahren ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichtes auf Grund der Trübung der Lösungen sowie die Bestimmung der Form und Größe der Makromoleküle auf Grund der Winkelverteilung der Intensität des gestreuten Lichtes. Die nach diesem Verfahren gewonnenen Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit den nach anderen Methoden erzielten Werten.

In der vorliegenden Arbeit werden einige Fälle der Anwendung dieser Methode auf die Eiweißstoffe behandelt und die gewonnenen Ergebnisse mitgeteilt.

1. Theorie

Die Rayleighsche Formel für die Streuung des Lichtes besitzt bekanntlich nachstehende Form:

$$\frac{i}{I} = \frac{8\pi^4 \nu \alpha^2}{\lambda'^4 r^2} (1 + \cos^2 \theta). \quad (1)$$

Hier bedeuten i die Intensität des gestreuten Lichtes, bezogen auf die Volumeinheit des streuenden Systems, I die Intensität des einfallenden Lichtstrahles, r den Abstand zwischen Beobachter und streuendem System, θ den Winkel zwischen Beobachter und Ausgangsstrahl, ν die Zahl der Teilchen in der Volumeinheit des streuenden Systems, λ' die Wellenlänge des einfallenden Lichtes im vorliegenden Medium, α die Polarisierbarkeit der streuenden Teilchen. Das gestreute Licht ist planpolarisiert und besitzt je eine

¹ С. Я. Френкель, Измерение молекулярного веса белков методом рассеяния света в растворах. *Аус: Биохимия (Die Biochemie)*, 1952, Bd. 17, Nr. 5, S. 535—550.

vertikale und horizontale polarisierte Komponente, unabhängig davon, ob das einfallende Licht polarisiert war oder nicht. Die Intensität der horizontal-polarisierten Komponente ist gegeben durch $\cos^2 \theta$. Unter einem geraden Winkel zum Ausgangsstrahl wird deshalb nur die vertikal polarisierte Komponente beobachtet.

Gleichung (1) wurde unter nachstehenden Annahmen abgeleitet:

1. Die Teilchen sind isotrop.

2. Die Teilchen sind kinetisch unabhängig. Dies entspricht, allgemein gesprochen, idealen Gasen oder Lösungen. In verdünnten Lösungen können die Teilchen ebenfalls als unabhängig voneinander angesehen werden.

3. Die Teilchen sind im Vergleich zur Wellenlänge λ' klein. In diesem Falle zeigen die von den einzelnen Bereichen eines Teilchens gestreuten Elementarwellen praktisch eine Phasenübereinstimmung; die Gesamtstreuung setzt sich aus den Elementarstreuungen jedes Einzelteilchens zusammen. Sind jedoch die linearen Dimensionen der Teilchen von der Größenordnung $\lambda'/10$ oder höher, so ist eine Korrektur für die Interferenz des von den einzelnen Bereichen dieser Teilchen gestreuten Lichtes anzubringen; diese Differenz führt zur Abnahme der Gesamtstreuung.

4. Die Teilchen sind in ihrer Größe gleich.

Geht man von den idealen Bedingungen, für welche Formel (1) abgeleitet wurde, zu den realen Bedingungen über, so ist eine Reihe von Korrekturen erforderlich. Da wir die Methode der Lichtstreuung in Lösungen nur in ihrer Anwendung auf die Eiweißstoffe behandeln, beschränken wir uns in den nachstehenden Ausführungen auf jene Korrekturen, die in diesem Falle erforderlich sind.

Bei der Beobachtung unter einem Winkel von 90° ist

$$\frac{i}{I} = \frac{8\pi^4 \nu \alpha^2}{\lambda'^4 r^2}. \quad (1')$$

Hierbei beobachtet man nur das vertikal polarisierte Licht. Durch die Streuung wird das einfallende Licht im streuenden Medium abgeschwächt. Bezeichnet man die Ausgangsintensität mit I_0 , so ist

$$I = I_0 e^{-\tau l}, \quad (2)$$

wenn I den zurückgelegten Weg im Medium und τ die Trübung bedeuten. Zwischen der Intensität des unter einem geraden Winkel gestreuten Lichtes und der Trübung bestehen folgende Beziehungen:

$$\tau = \frac{16}{3} \pi r^2 \frac{i}{I}. \quad (3)$$

In Kombination mit (1') erhalten wir:

$$\tau = \frac{128}{3} \frac{\pi^5 \nu \alpha^2}{\lambda'^4}. \quad (4)$$

Um eine Arbeitsformel zu erhalten, verwenden wir die Gleichung, welche eine Beziehung zwischen der Polarisierbarkeit und dem Brechungsindex herstellt:

$$\frac{n^2 - n_0^2}{n_0^2} = 4\pi \nu \alpha. \quad (5)$$

Hier bedeuten n_0 den Brechungsindex des Lösungsmittels, durch welches der einfallende Lichtstrahl hindurchgeht (z. B. Wasser bei Verwendung einer wäßrigen Lösung), n den

Brechungsindex des Gesamtsystems (der Lösung selbst). Setzen wir Formel (5) in (4) ein, so erhalten wir:

$$\tau = \frac{8}{3} \pi^3 \frac{(n^2 - n_0^2)^2}{\lambda^4 \nu}, \quad (6)$$

wo $\lambda = n_0 \lambda'$ (1,33 λ' für die wäßrige Lösung) ist. Es ist mit anderen Worten λ die Wellenlänge des Lichtes im Vakuum (in der Luft).

Ersetzen wir die Zahl der Teilchen ν in der Volumeinheit durch den Wert $(N/M) \cdot c$ (N Avogadro'sche Zahl; M Molekulargewicht, wenn es sich um Moleküle handelt, oder Gewicht eines Grammmoleküls, wenn es sich um Molekülaggregate handelt; c Konzentration in g/cm³), so erhalten wir:

$$\tau = \frac{8\pi^3 M c}{3\lambda^4 N} \left(\frac{n^2 - n_0^2}{c} \right)^2. \quad (7)$$

Bei genügend geringer Konzentration (in genügend verdünnter Lösung) gilt:

$$\frac{n^2 - n_0^2}{c} = \frac{\Delta n^2}{\Delta c} \approx \frac{\partial n^2}{\partial c} \approx 2n_0 \left(\frac{n - n_0}{c} \right). \quad (8)$$

Es wird hierbei angenommen, daß die Werte von n und n_0 nahe beieinanderliegen.

In der Annahme, daß $\frac{32\pi^3 n_0^2}{3N\lambda^4} \left(\frac{n - n_0}{c} \right)^2 = H$, erhalten wir beim Einsetzen der Formel (8) in Gleichung (7):

$$M = \frac{\tau}{H c}. \quad (9)$$

Wenden wir uns der Frage zu, wieweit diese Formel auf die Bestimmung des Molekulargewichts der Eiweißstoffe anwendbar ist. Hierzu seien die Eigenschaften der Eiweißlösungen jenen Bedingungen gegenübergestellt, welchen die Rayleighsche Formel genügt [1].

1. Isotropie der Teilchen (gemeint ist die optische Isotropie). Die Moleküle der globulären Eiweiße kann man als Kugeln oder Rotationsellipsoide betrachten. Die Korrektur für die Depolarisation durch Anisotropie ist deshalb nicht höher als 1% und kann vernachlässigt werden. Auch unter weniger günstigen Bedingungen ist die Depolarisation in der Regel sehr gering.

2. Unabhängigkeit der Teilchen. Diese Bedingung ist bei Verwendung genügend verdünnter Lösungen ohne weiteres gegeben.

3. Teilchengröße. Nach den Angaben SVEDBERGS [1] ist der Durchmesser der Teilchen in keinem Falle größer als 500 Å (in der Regel liegt er unterhalb 100 Å). Die Trübung wird auf die grüne Quecksilberlinie bezogen, deren Wellenlänge ungefähr 550 m μ beträgt. Auch diese Bedingung ($d < \lambda'/10$) ist erfüllt.

Bei den Viruseiweißstoffen muß eine Korrektur angebracht werden wegen der Asymmetrie der Streuung, die als Folge der Interferenz des von verschiedenen Bereichen eines Moleküls gestreuten Lichtes auftritt. Von großer Bedeutung ist hierbei auch die Form der Moleküle. Dies gilt auch für die fibrillären Eiweißstoffe.

4. Monodispersität. Auch diese Bedingung ist in den Lösungen der globulären Eiweiße erfüllt. In einer Reihe von Fällen (verschiedene Aggregationsprozesse) muß jedoch auch die zeitliche Änderung des Dispersitätsgrades der gelösten Substanz berücksichtigt werden. Hierher gehören Aggregation und Desaggregation, Polykondensation, Proteolyse usw. Die unmittelbare Anwendung der Formel (9) auf einen dieser Prozesse ergibt in den Zwischenstadien Mittelwerte für das Molekulargewicht.

Da die Polarisierbarkeit α der Teilchen ihrem Volumen V proportional ist, kann Gleichung (4) auch in nachstehender Form geschrieben werden:

$$\tau = A v V^2. \quad (10)$$

Hieraus wird ersichtlich, daß τ bei der Aggregation proportional dem Aggregationsgrad zunimmt und umgekehrt. Die Abnahme der Gesamtteilchenzahl um das n -fache ist von der gleichen Zunahme des Volumens der Teilchen begleitet. Es ist demnach

$$\tau_1 = A \frac{v}{n} \cdot (n V)^2 = n \tau.$$

Für ein polydisperses Medium gilt:

$$\tau = A \sum_i v_i v_i^2. \quad (10')$$

Diese Formel kann auf die Zwischenstadien der obenerwähnten Prozesse angewandt werden. Ist der Charakter des Prozesses und damit das Verhältnis der Anfangswerte v_0 und V_0 zu v_i und V_i bekannt, so kann die Konstante der entsprechenden Reaktion ermittelt werden. Die Formeln für eine Reihe konkreter Fälle wurden von OSTER abgeleitet [2].

Dieses Verfahren ermöglicht also die Untersuchung der verschiedenen morphologischen Reaktionen der Eiweißstoffe.

Dies alles gilt für die globulären Eiweiße. Bei den fibrillären Eiweißstoffen ist, wie wir gesehen haben, eine Reihe von Bedingungen nicht erfüllt, die bei der Ableitung der Formel (9) vorausgesetzt wurden.

Die Theorie von RAYLEIGH ist nur ein Grenzfall der allgemeinen Theorie der Lichtstreuung in Lösungen von SMOLUCHOWSKI-EINSTEIN-DEBYE [3]. Nach dieser Theorie wird die Streuung durch die Fluktuation der Konzentration in der Lösung verursacht. Diese Fluktuationen sind um so geringer, je größer die für die Änderung der Konzentration erforderliche osmotische Arbeit ist. Als Folge der Fluktuation tritt eine lokale Änderung des Brechungsindex ein. Dies ist die unmittelbare Ursache für die Streuung. Die Trübung ist hierbei gegeben durch die Gleichung:

$$\tau = \frac{32\pi^3}{3} \cdot \frac{n_0^2}{N\lambda^4} \cdot \frac{\left(c \frac{\partial n}{\partial c}\right)^2}{c \frac{\partial}{\partial c} \left(\frac{\pi}{RT}\right)}, \quad (11)$$

wo R die Gaskonstante; T die absolute Temperatur; π den osmotischen Druck bedeuten; die übrigen Bezeichnungen sind die gleichen wie oben. Führen wir die Konstante H ein, die den gleichen Wert wie früher besitzt, so erhalten wir

$$\left(\frac{\partial n}{\partial c} = \frac{\Delta n}{c} = \frac{n - n_0}{c} \right);$$

$$H \frac{c}{\tau} = \frac{\partial}{\partial c} \left(\frac{\pi}{RT} \right). \quad (11')$$

Bei einer realen polymeren Lösung (als solche sind die Lösungen der fibrillären Eiweißstoffe zu betrachten) beträgt der osmotische Druck:

$$\frac{\pi}{RT} = \frac{c}{M} + Bc^2, \quad (12)$$

wobei B eine Konstante, welche die Abweichung der Lösung vom idealen Zustand bestimmt, darstellt. In den Lösungen der linearen Polymere ist B einerseits vom Lösungsmittel abhängig, andererseits charakteristisch für die Elastizität der Molekülkette des Polymers. Durch Einsetzen von (12) in (11') erhalten wir:

$$H \frac{c}{\tau} = \frac{1}{M} + 2Bc. \quad (13)$$

Es ist leicht einzusehen, daß bei $B = 0$ Formel (9) erhalten wird. Wird die Funktion $Hc/\tau = f(c)$ graphisch dargestellt, so ist die Kurve bei genügend kleinem c eine Gerade (Abb. 1). Je größer ihr Neigungswinkel, desto größer ist die Abweichung der Lösung

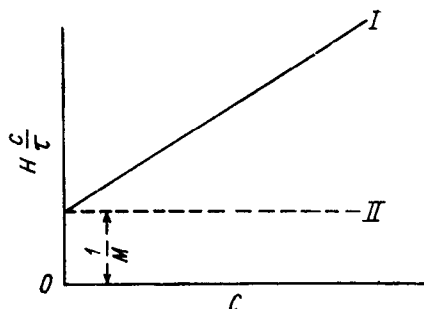


Abb. 1

vom Idealzustand. Bei einer idealen Lösung ist diese Funktion eine der Abszissenachse parallele Gerade, ein Ausdruck für die Tatsache, daß die Trübung der Konzentration proportional ist und dem Rayleighschen Gesetz unterliegt.

Der Abschnitt auf der Ordinatenachse, der durch den Schnittpunkt der Geraden bestimmt wird, ist der reziproke Wert des Molekulargewichtes. Zur Bestimmung des Molekulargewichts in der realen Lösung ist die Funktion $Hc/\tau = f(c)$ graphisch darzustellen und hieraus der Wert bei $c = 0$ zu bestimmen.

2. Anwendung des Verfahrens auf die Eiweißstoffe

In der sehr umfangreichen Literatur über das behandelte Untersuchungsverfahren findet man nur sehr wenig Arbeiten über dessen Anwendung auf die Eiweißstoffe.

PIRZEUS und BROSTEAUX [4] zeigten, daß die Intensität der Lichtstreuung in Lösungen, wie aus den Formeln (9) und (3) folgt, den Molekulargewichten der Proteine proportional ist. Die genannten Autoren haben jedoch keine systematischen Untersuchungen durchgeführt und von der Formel (9) in Wirklichkeit keinen Gebrauch gemacht. Zum Teil erklärt

sich dies aus der Mangelhaftigkeit der Apparatur, hauptsächlich jedoch daraus, daß erst nach den Arbeiten DEBYES [3] die Aufmerksamkeit auf die Methode der Lichtstreuung gelenkt wurde. In den letztgenannten Arbeiten wurde das Verfahren ausführlich entwickelt.

OSTER [5] verwendete Formel (9) bei der Berechnung des Molekulargewichts verschiedener Viren. So erhielt er für das Virus der Tabakmosaikkrankheit mit einer Genauigkeit bis zu 5% ein Molekulargewicht von $40 \cdot 10^6$. Für solche Riesenmoleküle muß eine Korrektur für die Asymmetrie der Streuung angebracht werden, da sonst zu niedrige Werte für τ erhalten werden. Es muß auch die Depolarisation berücksichtigt werden, die sich bei großen Molekülen bemerkbar macht.

OSTER betrachtete die Moleküle des Tabakmosaikvirus als dünne Stäbchen und erhielt aus der Intensitätswinkelverteilung der Streuung für die Länge dieser Stäbchen den Wert $L = 270 \pm 15 \text{ m}\mu$. Nach den Ergebnissen der Ultrazentrifugierung, Diffusion, Elektronenmikroskopie und Viskosität ist $L = 260\text{—}280 \text{ m}\mu$. Eine gute Übereinstimmung mit anderen Verfahren besteht nicht nur hinsichtlich des Molekulargewichtes, sondern auch hinsichtlich der Form und Größe der Moleküle. Auf Einzelheiten der entsprechenden Berechnungen können wir hier nicht näher eingehen. In ähnlicher Weise untersuchten OSTER und JORDAN [6] die Wechselwirkung zwischen Aktomyosin und Adenosintriphosphorsäure.

Über das aus der Trübung ermittelte Molekulargewicht der Eiweißstoffe gibt es nur zwei Untersuchungen. HELLER und KLEVENS [7] veröffentlichten Zahlenwerte für das Eialbumin bei 4°C und beim p_H 4,65—4,68. Sofort nach der Herstellung ist $M = 47000 \pm 1500$; nach 24 Stunden ist $M = 64000 \pm 2000$, nach 72 Stunden $= 81000 \pm 3000$. Die Zunahme des Molekulargewichts zeigt deutlich das Vorliegen einer Aggregation. Diese Erscheinung wurde eingehend von BIER und NORD untersucht [8]. Sie erforschten die Kinetik der Aggregation von Eialbumin. Diese Aggregation hat nichts mit der Säure- oder Wärmedenaturierung zu tun. Sie ist eine Reaktion zweiter Ordnung. Für die Einzelmoleküle erhielten BIER und NORD M -Werte von 37000.

Damit sind die Literaturangaben über die Anwendung der Methode der Lichtstreuung auf Eiweißstoffe erschöpft.¹

3. Versuchsanordnung

Gerät zur Messung der Trübung (Nephelometer)

Die Messung der absoluten Trübung ist mit großen experimentellen Schwierigkeiten verbunden. Es wird deshalb der Vergleich der Trübung der Untersuchungslösung mit einem Standard vorgezogen, dessen absolute Trübung

¹ Als die vorliegende Arbeit bereits im Druck war, erschien eine weitere Arbeit, die erwähnt werden muß [21]. Untersucht wurden β -Laktoglobulin, Eialbumin, Lysozym, Serumalbumin und einige Spezialpräparate. Obwohl die Autoren im allgemeinen zu recht glaubwürdigen Zahlen kamen, muß ihrer Arbeit in einer Reihe von Einzelheiten widersprochen werden. So verwendeten sie nicht ganz einwandfreie Präparate, die zwei Monate, (mitunter ein Jahr alt waren, wodurch Aggregation und überhöhte Molekulargewichtswerte 46000 für Eialbumin, 78000 für Serumalbumin usw.) eintraten.

bekannt ist. Das Trübungsverhältnis zwischen Untersuchungslösung und Standard kann leicht photometrisch ermittelt werden. Das von uns verwendete Gerät ist ein vereinfachtes visuelles Turbidimeter nach STEIN und DOTY [9]. In Abb. 2 ist dieses Gerät schematisch dargestellt.

Das Licht einer kugelförmigen Quecksilberhochdrucklampe 1 tritt durch den Kondensor 2 und das Lichtfilter 12, trifft sodann auf den Metallmantel 11, in welchem das eigentliche Nephelometer untergebracht ist. Die Wände des Metallmantels sind mit schwarzem Wollstoff ausgeschlagen, um die Reflexion herabzusetzen.

Die Größe des Mantels wurde so gewählt, daß die Apertur des Lichtstrahls praktisch vernachlässigt werden konnte.

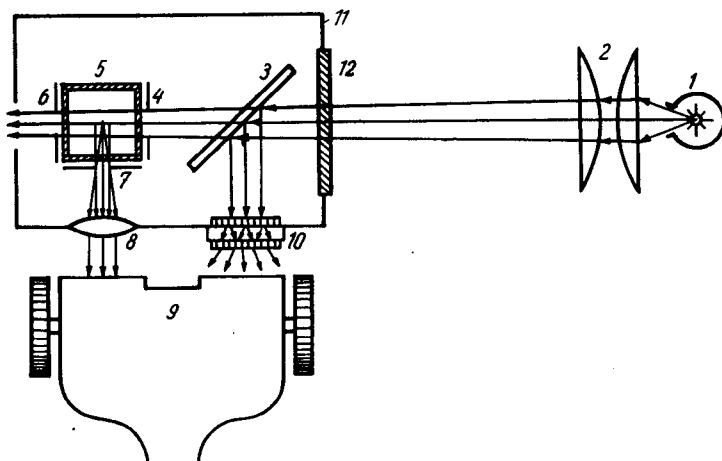


Abb. 2

Nach dem Durchtritt durch das Lichtfilter trifft der Lichtstrahl auf den Spiegel 3 auf, der unter einem Winkel von 45° zur Richtung des Lichtes aufgestellt ist. Ein Teil des Lichtes, der durch den Spiegel hindurchgeht, trifft durch eine kleine quadratische Blende 4 auf die quadratische Küvette 5, welche die Untersuchungsflüssigkeit enthält, und verläßt diese durch eine gleich große Blende 6. Visuell zeigt sich die Streuung als dünner Tyndallkegel in der Küvette. Ein Teil des Lichtes, der unter dem Winkel von 90° gestreut wird, tritt durch die Blende 7 und die Linse 8 mit einer achtfachen Vergrößerung. Die Linse ist an der Wand des Mantels befestigt; ihr Brennpunkt ist auf den Mittelpunkt der Küvette eingestellt. Der parallele Strahl des gestreuten Lichtes wird von dem linken Objektiv des Pulfrich-Photometers 9 aufgefangen. Ein Teil des von Spiegel 3 reflektierten Lichtes tritt durch Milchgläser hindurch, die als Vergleich dienen. Dieser Teil des Lichtes wird im rechten Objektiv des Photometers aufgefangen. Bei der Neubeschickung der Küvette wird der Mantel 11 abgenommen. Der Mantel wird so befestigt, daß er immer genau eingestellt ist. Das gesamte Gerät ist auf zwei zueinander senkrechten optischen Bänken montiert und wird in einer bestimmten Stellung festgehalten. Die Messungen erfolgen in der Regel mit grünem oder gelbem Lichtfilter.

Messungen

Eigentlich wird nicht die Trübung gemessen, sondern die Intensität des unter einem Winkel von 90° gestreuten Lichtes. Bei eingestellter Blende des linken Objektivs (Stellung der linken Trommel des Photometers bei 100, 50, 25 usw.) wird die rechte Trommel so eingestellt, daß die Intensitäten des in der Standardlösung gestreuten Lichtes und des die Vergleichsgläser passierenden Lichtes im Photometer einander gleich werden. Sodann wird die Küvette mit dem Standard durch die Küvette mit der Untersuchungslösung ersetzt. Bei unveränderter Lage des linken Limbus wird die Stellung des rechten Limbus erneut abgelesen. Das Verhältnis der ersten zur zweiten Ablesung liefert unmittelbar das Verhältnis der Intensitäten des gestreuten Lichtes im ersten und zweiten Falle und damit das Verhältnis der Trübungen (Formel 3).

Im Prinzip genügt es, ein für allemal die Streuung in der Standardlösung mit dem Licht zu vergleichen, das durch die Mattgläser hindurchtritt, und die Ablesungen des rechten Limbus bei einer Reihe fixierter Einstellungen (100, 75, 50 usw.) des rechten Limbus für die Standardlösung anzuwenden. Wir überzeugten uns jedoch davon, daß durch geringe Schwankungen in den Lichtverhältnissen das Verhältnis der Ablesungen am linken und rechten Limbus der Standardlösung innerhalb 5 % verändert wird. Es ist deshalb günstiger, die Ablesungen des Standards zu Beginn und nach Abschluß jedes Versuches nachzuprüfen.

Es ist ferner die Reflexion von den Wänden des Metallgehäuses, der Küvette, der Blende usw. auszuschalten, da hierdurch die Intensität des gestreuten Lichtes etwas verstärkt wird. Zur Gewinnung eines Nullpunktes ist die „Sreuung“ von einer praktisch nicht streuenden Flüssigkeit, z. B. Wasser, zu bestimmen. Der Nullpunkt darf nicht an der leeren Küvette ermittelt werden, da hier die Reflexion von den Wänden verstärkt wird. STEIN und DORY tauchten den gesamten optischen Teil in Wasser, wodurch die Reflexion ausgeschaltet, die Konstruktion jedoch sehr kompliziert wurde. Wie unsere Messungen zeigten, ist die Zunahme durch die Reflexion gering ($\sim 3\%$), darf jedoch nicht vernachlässigt werden.

Bezeichnen wir die Ablesung am rechten Limbus im Nullpunkt mit I_0 , die dem Standard entsprechende Ablesung mit I_1 und die der Untersuchungslösung entsprechende Ablesung mit I (bei unbeweglichem linken Limbus), die absolute Trübung der Standardlösung mit τ_1 , so erhalten wir für die Trübung der Untersuchungslösung:

$$\tau = \frac{I - I_0}{I_1 - I_0} \tau_1. \quad (14)$$

Um eine größere Genauigkeit zu erzielen, sind für I Mittelwerte aus einer möglichst großen Zahl von Ablesungen (unter allen Umständen nicht weniger als 10) zu ermitteln.

Als Standard verwendeten wir Lösungen von Polystyrol in CCl_4 . Die absoluten Trübungen der beiden von uns verwendeten Standards betrugen $24,00 \cdot 10^{-4}$ und $17,15 \cdot 10^{-4}$. Der geneigte Spiegel 3 (Abb. 2) wurde so aufgestellt, daß bei völlig offener linker Blende am rechten Limbus die Werte 60–70 abgelesen wurden. Der Nullpunkt ist hierbei nicht höher als 2. Bei der Einstellung der linken Trommel auf 75, 50, 25 usw. nahmen die Ablesungen am rechten Limbus entsprechend um $\frac{4}{3}$, 2, 4 mal usw. ab, ein Beweis für die richtige Funktion des Gerätes.

Herstellung der Lösungen

Die Reinheit der Lösung ist bei den Messungen der Streuung von ungeheurer Wichtigkeit. Die Anwesenheit von Staub oder kolloiden Aggregaten, die das Licht stark streuen, kann eine Intensität der Streuung ergeben, welche die Molekülstreuung der Lösung übersteigt und zu falschen Ergebnissen führt. Aus diesem Grunde muß die Küvette vor dem Versuch sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen werden.

Die Reinheit der Küvette prüft man im Nephelometer. Durch die Anwesenheit des stark vergrößernden Glases 8 wirkt das Photometer als Ultramikroskop. Die einzelnen Staubteilchen treten auf dem dunklen Hintergrund des praktisch nicht lichtstreuenden Wassers als helle „Sterne“ auf. In ähnlicher Weise zeigt sich die Abwesenheit physikalischer Verunreinigungen in der Lösung. Durch die Anwesenheit von 3 bis 5 „Sternen“ im Gesichtsfeld werden die Meßergebnisse noch nicht verfälscht. Bei sehr starker Molekülstreuung werden die „Sterne“ praktisch von dem allgemeinen Hintergrund verdeckt. Bei schwacher Streuung dagegen wirken die „Sterne“ stark störend. Die Reinigung der Lösungen muß deshalb sehr sorgfältig durchgeführt werden.

Praktisch wird die Lösung so hergestellt, daß man das Eiweiß in wenig Wasser oder Puffer löst und gegen das Lösungsmittel dialysiert. Anschließend wird die Lösung zentrifugiert, durch ein Glasfilter Nr. 4 filtriert und auf den erforderlichen Grad verdünnt. In der Regel wird bei mehreren Konzentrationen gemessen. Unmittelbar vor der Messung wird das Eiweiß 4mal durch das Filter Nr. 4 bis zum Verschwinden der Sterne filtriert. Wenn nötig, wird nochmal zentrifugiert. Eine ideale Reinigung wird durch kombinierte Filtration und Zentrifugierung bei 6000–8000 Umdrehungen je Minute erzielt.

Die Werte für die absolute Trübung der Standardlösungen wurden durch Vergleich mit Schwefelkohlenstoff gewonnen, das als allgemein gebräuchlicher Trübungsstandard verwendet wird. Die Standardlösungen können mit Erfolg durch Würfel aus festem Polystyrol ersetzt werden, die mit Schwefelkohlenstoff geeicht wurden.

Gewinnung der Berechnungswerte

Die Trübung der Lösungen bestimmten wir nach Formel (14). Besitzt der Puffer eine Eigenstreuung, so kann man, ohne die Berechnungen nach Formel (14)

durchzuführen, die Abhängigkeit von I (Ablesung am rechten Limbus) von der Konzentration graphisch darstellen (Abb. 3). Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinatenachse liefert die Intensität der Streuung im reinen Puffer I_P . Diese ist in den Nenner der Formel (14) an Stelle von I_0 einzusetzen. Bei der Ermittlung der Trübung an mehreren Konzentrationen ist es angebracht, die Kurve $\tau = f(c)$ aufzunehmen, die für verdünnte Lösungen von globulären Eiweißstoffen immer eine gerade Linie ist, und aus dieser Kurve das mittlere Molekulargewicht zu berechnen.

Die Konzentration bestimmten wir nach 3 voneinander unabhängigen Verfahren: nach KJELDAHL, durch Trocknung und interferometrisch. Die Konstante H mußte experimentell bestimmt werden. Da die Trübung der Standardlösungen in Beziehung zur grünen Quecksilberlinie ($\lambda = 546 \text{ m}\mu$) berechnet

wurde und der Brechungsindex für verdünnte wässrige Lösungen $n_0 \approx 1,335$ ist, erhalten wir:

$$H = 1,102 \cdot 10^{-4} \left(\frac{n - n_0}{c} \right)^2.$$

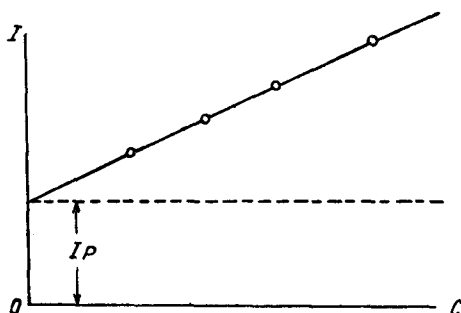


Abb. 3

Hier bedeutet n_0 den Brechungsindex nicht des reinen Wassers, sondern jenes Puffers, in welchem das Eiweiß gelöst wird. Der Ausdruck in der Klammer ist nichts anderes als das Inkrement des Brechungskoeffizienten des Eiweißes.

Es ist bekannt, daß dieses Inkrement für die meisten Eiweißstoffe den Wert $1,8$ bis $1,95 \text{ cm}^3/\text{g} \cdot 10^{-1}$ besitzt, daß die H -Werte für die Eiweißstoffe und Peptide von der Größenordnung $3,5$ bis $4,2 \cdot 10^{-6}$ sind.

Die genaue Bestimmung des Wertes von $\Delta n/c$ ist also von großer Wichtigkeit. Das Abbésche Refraktometer, mit dessen Hilfe der Brechungsindex mit einer Genauigkeit bis zur vierten Dezimale bestimmt wird, ist hier nicht verwendbar.

Wir bestimmten das Inkrement des Brechungskoeffizienten der Eiweißstoffe mit einem Interferometer, das mit KCl geeicht wurde. Dies ermöglichte es uns, die erforderliche Genauigkeit bis zur fünften Dezimale einzuhalten. Praktisch wurde im Interferometer direkt der Wert von Δn bestimmt, sodann die Konzentration. Anschließend wurde das spezifische Inkrement berechnet. Die erzielten Werte zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Tabellenwerten. Bei den weiteren Arbeiten wurden die Konzentrationen interferometrisch bestimmt. Die Kontrollbestimmungen der Konzentrationen nach KJELDAHL zeigten eine Übereinstimmung mit den interferometrischen Werten bis zu hundertstel Prozents. Hierbei ist es natürlich sehr wichtig, daß die Kon-

zentration der Salze im Puffer und in der Eiweißlösung genau dieselbe ist. Dies erreicht man durch Schnelldialyse innerhalb von 16 Stunden.

Berücksichtigt man die möglichen Fehler bei den experimentellen Bestimmungen der Streuung, der Konzentration des Brechungskoeffizienten der Lösung und des Inkrementes $\Delta n/c$, so erhält man einen Gesamtfehler der Molekulargewichtsbestimmung von 5 bis 10 %.

4. Meßergebnisse

Bestimmung der Molekulargewichte

Wir lösten frisches kristallines Eialbumin und dialysierten bei 4°C 24 Stunden gegen destilliertes Wasser. Das Inkrement des Brechungskoeffizienten von Eialbumin beträgt 0,183 cm³/g. Hieraus erhalten wir:
 $H = 3,72 \cdot 10^{-6}$.

In Abb. 4 sind die Meßergebnisse für die Streuung bei 4 verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Wir sehen, daß die Punkte genügend gut auf einer Geraden liegen. Der mittlere Trübungswert nach der Kurve ergibt in Umrechnung auf das Molekulargewicht $M = 33000$. Diese Zahl liegt in der Nähe jener Werte, die von einigen anderen Autoren nach demselben Verfahren erhalten wurden, unterscheidet sich jedoch stark von den Werten SVEDBERGS [1].

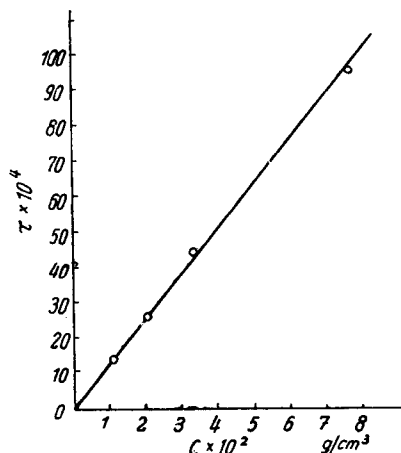


Abb. 4

Als endgültiges Molekulargewicht von Eialbumin betrachtet SVEDBERG den auf der Ultrazentrifuge ermittelten Wert von 40000.

Daneben bringt er die von anderer Seite erhaltenen Werte: 26000 (KUHN); 20000 (BÜRGERS); 42000 (POLSON).¹ Die letzte Zahl stimmt praktisch mit dem Wert von SVEDBERG überein. Später kamen die meisten Autoren auf den Wert 45000 ± 1000 [10].

Es besteht Grund zu der Annahme, daß das Eialbumin in Wirklichkeit ein geringeres Molekulargewicht besitzt und daß die überhöhten Werte eine Folge der Aggregation sind. Wie bereits erwähnt, erhielten BIEB und NORD [8] $M_0 = 37000$. Die Aggregation verlief hierbei ziemlich schnell. In allerjüngster Zeit untersuchten RILEY und HERBERT [11] eine Reihe Eiweißstoffe mit der Methode der Röntgenstreuung in sehr konzentrierten (bis zu 40 %) Eiweißlösungen. Hierbei gelang es, die Größe der nicht hydratisierten Moleküle zu bestimmen und das Molekulargewicht zu berechnen. Es ist charakteristisch, daß für die zwei wahrscheinlichsten Konfigurationen des Eialbumins Molekulargewichte von

¹ Die beiden ersten Zahlen wurden osmometrisch gewonnen, die dritte Zahl mit dem Ultrazentrifugenverfahren.