bei der Oxydation eingetretene Gewichtsverlust wurde ermittelt.

Gewichtsverlust: Fibroin: 0,1231 g = 5,8 Prozent.
Kollagen: 0,2572 g = 13,2 Prozent.

Hydrolyse des oxydierten Fibroins bzw. Sehnenkollagens

Zur Hydrolyse wurden die nach der Oxydation ausgewogenen Proben (Fibroin 1,9837 g und Kollagen 1,6984 g) mit der zehnfachen Menge 6-n. HCl 24 Std. bei 105°C im Bombenrohr erhitzt. Das Hydrolysat wurde vorsichtig im Vakuum abgedampft und der Rückstand in einem 10-cm³-Meßkölbchen in 10 cm³ Wasser aufgenommen.

Hochspannungs-Elektrophorese der Hydrolysate

(Vgl. die frühere Mitteilung)

Entwicklung der Cysteinsäure mit Ninhydrin und Bestimmung der Cysteinsäure-Konzentration durch Spektrophotometrie

(Vgl. die frühere Mitteilung)

Berechnung des Cystingehaltes aus der Cysteinsäuremenge

Wir verwendeten denselben Faktor 0,9 für die Ausbeute an Cysteinsäure aus dem eingebauten Cystin wie SCHRAM et al.⁶. Unter Einsatz der Äquivalentgewichte Cystin/Cysteinsäure erhält man bei gleichzeitiger Berücksichtigung des Faktors 0,9 den Umrechnungsfaktor 0,79, mit dem man den gefundenen Cysteinsäuregehalt

multiplizieren muß, um den Cystingehalt des Proteins in Prozent zu erhalten.

Cystingehalt von Fibroin und Kollagen

Es wurde gefunden, daß hochgereinigtes Fibroin 0,12% [Var. $\pm 17\%$] und hochgereinigtes Sehnenkollagen 0,08% [Var. $\pm 20\%$] Cystin enthalten. Der Wert für Fibroin stimmt nicht vollständig mit den Angaben von SCHROEDER (0,18%) überein, jedoch ist die Abweichung gering. Bei einem Cystingehalt von 0,12% entfällt auf ein Molekül Fibroin (Mol.-Gew. 100 000) etwas mehr als $\frac{1}{2}$ Molekül Cystin, während der Wert von SCHROEDER (0,18%) 1 Molekül Cystin liefert. Im Gegensatz zu früheren Annahmen scheint durch das Vorhandensein von Cystinresten in Fibroin ein Einketten-Molekül nicht mehr wahrscheinlich. SITCH und SMITH¹⁵ fanden in oxydiertem Fibroin neue saure Gruppen. Sicherlich handelt es sich nicht nur um Carbonsäure- sondern auch um Sulfonsäure-Gruppen aus dem eingebauten Cystin. Es ist reizvoll, die chemischen und physikalischen Eigenschaften von schonend oxydiertem Fibroin zu untersuchen. Entsprechende Untersuchungen sind im Gange.

Was Kollagen anbelangt, so erklärt der Cystingehalt von 0,08% möglicherweise einige der besonderen Eigenschaften des Kollagens. Bei der Einwirkung von Perjodat auf Sehnenkollagen wird das eingebaute Cystin restlos oxydiert¹⁶. Auch hier sind systematische Untersuchungen an schonend oxydiertem Kollagen von Interesse.

¹⁵ D. A. SITCH u. S. G. SMITH, Shirley Inst. Memoirs **30**, 47 [1957].

¹⁶ H. ZAHN u. L. ZÜRN, Z. Naturforschg., im Druck.

Über aminosäurehaltige ätherlösliche Verbindungen aus Granasediment von *Spinacia oleracea*

Von THOMAS KAUFFMANN und REINHARD KÖDDING

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Z. Naturforschg. **12 b**, 735—736 [1957]; eingeg. am 1. August 1957)

Das Chlorophylloprotein Chloroplastin¹ ist im Blatt in den Grana lokalisiert, die aus geldrollenartig übereinanderliegenden Scheibchen, den Granalamellen, bestehen². Sedimente der Granalamellen (Granasedimente) lassen sich aus grünen Blättern relativ leicht darstellen. Sie enthalten nach STOLL und WIEDEMANN¹ neben Protein und den Blattpigmenten Chlorophyll a und b, Carotin und Xanthophyll ein kompliziertes Gemisch bisher kaum untersuchter farbloser Lipide.

Zur näheren Untersuchung dieser Lipide haben wir im wesentlichen nach WARBURG und LÜTTGENS³ durch

intensives Vermahlen von Spinatblättern im Starmix, Filtrieren des Blattbreis durch Faltenfilter und fraktioniertes Zentrifugieren des dunkelgrünen Filtrats Granasedimente hergestellt und nach STOLL und WIEDEMANN¹ mit Aceton und Äther in Eiweiß und die Lipidfraktion gespalten.

Die Lipidfraktion (15,2 g) aus Granasediment von 14 kg frischen Blättern wurde im Dunkeln unter Stickstoff mit dem völlig wasserfreien System Petroläther/Aceton+Acetonitril durch eine 175-stufige Craig-Verteilung fraktioniert. Aus den Lösungen der Röhrchen 165—175 der Craig-Verteilung, welche die Substanzen enthielten, die in der mobilen Petrolätherphase am schnellsten wanderten, wurde durch Eindampfen im Vak., Lösen des schmierigen Rückstands in wenig Äther, Versetzen mit Aceton und Abnutschen des festen amorphen Niederschlags 340 mg einer Fraktion erhalten, die sich durch ihre Schwerlöslichkeit in Aceton und das Molverhältnis von Stickstoff zu Phosphor (annähernd 1 : 1) als Glycerinphosphatid-Fraktion zu erkennen gab.

¹ Vgl. A. STOLL u. E. WIEDEMANN, Fortschritte der Chem. Forschung, Bd. 2, S. 539—549 (Springerverlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1951/53).

² Vgl. K. MÜHLETHALER, Naturwissenschaften **44**, 207 [1957].

³ O. WARBURG, Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten, S. 175 (Verlag Dr. W. Saenger, Berlin 1948).

Nach 8-stdg. Hydrolyse mit 20-proz. HCl konnten darin neben Glycerin, Fettsäuren, Phosphorsäure, Cholin und Colamin papierchromatographisch eindeutig kleine Mengen von Glycin, Alanin, Serin, Glutaminsäure und Asparaginsäure nachgewiesen werden. Die Phosphatidfraktion enthält also neben Lecithinen und Kephallinen ätherlösliche, aminosäurehaltige Verbindungen.

So lange die aminosäurehaltigen Verbindungen der Phosphatidfraktion nicht in reiner Form dargestellt und analysiert sind, lassen sich über ihre Konstitution keine sicheren Aussagen machen. Auf Grund der Tatsache, daß sie bei der Craig-Verteilung und Acetonfällung die Lecithine und Kephaline begleiten, ist jedoch zu vermuten, daß die erwähnten Aminosäuren wie Cholin und Colamin an Phosphatidsäuren gebunden sind. Wir ziehen aus folgenden Gründen zwischen Aminosäuren und Phosphatidsäuren eine energiereiche Acylphosphatbindung in Betracht:

1. Bei der Umsetzung der Phosphatidfraktion mit dem von SANGER⁴ zur Aminoendgruppen-Bestimmung eingeführten Reagenz Dinitrofluorbenzol in absolutem Äther, unter Zusatz eines tertiären Amins zur Bindung der bei der Umsetzung abgespaltenen Fluorwasserstoffsäure, wurden die Aminogruppen der Aminosäuren durch den Dinitrophenylrest substituiert. Die Totalhydrolyse der umgesetzten Phosphatidfraktion lieferte

nämlich die Dinitrophenyl-Derivate der erwähnten Aminosäuren. Die Aminogruppen sind daher an einer Bindung offenbar nicht beteiligt.

2. Beim 25 Min. langen Erwärmen der Phosphatidfraktion mit Wasser auf 42–44° wurden bei neutraler Reaktion von den Aminosäuren Glycin, Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure 60–63% und von Serin 56% der durch Totalhydrolyse erhältlichen Menge hydrolytisch abgespalten. Colamin wurde dagegen nur zu 6% abhydrolysiert, ist also wesentlich fester gebunden. Die bei den aminosäurehaltigen, ätherlöslichen Verbindungen beobachtete Hydrolysegeschwindigkeit entspricht der Geschwindigkeit, mit der Acylphosphatbindungen durch Wasser gespalten werden⁵.

Serin könnte z. T. auch mit seiner Hydroxylgruppe esterartig und daher fester an Phosphorsäure gebunden sein, wie man es für die von FOLCH und SCHNEIDER⁶ in Gehirnlipoiden entdeckten serinhaltigen Glycerinphosphatide annimmt, die bisher die einzigen bekannten aminosäurehaltigen Phosphatide darstellen.

Es ist bemerkenswert, daß es sich bei den Aminosäuren der Phosphatidfraktion aus dem Granasediment gerade um die fünf Aminosäuren handelt, die nach CALVIN und seinen Mitarbb.⁷ bei der Grünalge *Scenedesmus* nach kurzer Dauer der Photosynthese (90 Sek.) mit ¹⁴CO₂ als erste stickstoffhaltige Substanzen einen Gehalt an ¹⁴C aufweisen.

⁴ F. SANGER, *Biochem. J.* **39**, 507 [1945].

⁵ Zum Beispiel wird nach E. NEGELEIN u. H. BRÜMEL (*Biochem. J.* **39**, 507 [1945]) 1,3-Diphosphoglycerinsäure bei neutraler Reaktion und 38° C in wäßriger Lösung innerhalb von 10 min zu etwa 20% in Phosphoglycerinsäure und Phosphorsäure zerlegt.

⁶ J. FOLCH u. H. A. SCHNEIDER, *J. biol. Chemistry* **137**, 51 [1941].

⁷ A. A. BENSON, I. A. BASSHAM, M. CALVIN, T. C. GOODALE, V. A. HAAS u. W. STEPKA, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 1714 [1950].

Über lose gebundene Aminosäuren im Grana-Eiweiß von Dikotyledonen

VON THOMAS KAUFFMANN

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Z. Naturforschg. **12 b**, 736–737 [1957]; eingeg. am 1. August 1957)

Bei Versuchen zur Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung des Chlorophylloproteids Chloroplastin¹ wurde beobachtet, daß Grana-Eiweiß aus verschiedenen zweikeimblättrigen Pflanzen (Brennnessel, Spinat, Zuckerrübe, Sonnenblume) regelmäßig eine Reihe von lose gebundenen Aminosäuren enthält.

Die Darstellung des Grana-Eiweißes, das zum größten Teil aus der Eiweißkomponente des Chloroplastins, dem Plastin, besteht, erfolgte nach STOLL und WIEDEMANN¹ durch erschöpfende Extraktion von Granalamellen-Sedimenten mit Aceton und Äther. Die Granalamellen-Sedimente wurden im wesentlichen nach WARBURG und LÜTTGENS² durch intensives Vermahlen der Blätter im

Starmix, Filtrieren des Blattbreis durch Faltenfilter und fraktioniertes Zentrifugieren der dunkelgrünen Filtrate gewonnen.

Die lose gebundenen Aminosäuren wurden durch 5-tägiges Schütteln des in Wasser schwerlöslichen Grana-Eiweißes mit Glaskugeln und Äthanol-Wasser (2 Vol. : 1 Vol.) abgespalten und konnten nach dem Abfiltrieren des Grana-Eiweißes im Filtrat als freie Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Abspaltung war aber wahrscheinlich bei weitem nicht vollständig, da sich nach dem Schütteln mit einem Äthanol-Wasser-Gemisch im Grana-Eiweiß durch Aminoendgruppen-Bestimmung nach SANGER³ nochmals größere Mengen der gleichen Aminosäuren nachweisen ließen. Bei diesen Substanzen handelt es sich hauptsächlich um diejenigen Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin, Glutaminsäure und Asparaginsäure), die in der Glycerinphosphatid-Fraktion der Spinat-Granalipoide in Form ätherlöslicher Substanzen aufgefunden wurden⁴, außerdem um geringe Mengen von Threonin, Prolin, Valin, Leucin und Isoleucin. Da im Äthanol-Wasser-Gemisch nach

¹ Vgl.: A. STOLL u. E. WIEDEMANN, *Fortschritte der Chem. Forschung*, Bd. 2, S. 539–549 (Springerverlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1951/53).

² O. WARBURG, *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten*, S. 175 (Verlag Dr. W. Saenger, Berlin 1948).

³ F. SANGER, *Biochem. J.* **39**, 507 [1945].

⁴ TH. KAUFFMANN u. R. KÖDDING, *Z. Naturforschg.* **12 b**, 735 [1957].