

Die Papierelektrophorese von Eierproteinen. 2. Mitteilung, Ergebnisse der papierelektrophoretischen Untersuchungen an Vogeleiern

Autor(en): **Hellhammer, D. / Högl, O.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **49 (1958)**

Heft 3

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982533>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Literatur

- 1) E. Waser und S. Janett, diese Mitt. **28**, 103 (1937)
- 2) Th. von Fellenberg und O. Högl, diese Mitt. **36**, 24 (1945)
- 3) J. Deshusses und P. Desbaumes, diese Mitt. **41**, 381 (1950)
- 4) H. Suter und H. Hadorn, Ztschr. f. analyt. Chemie **160**, 335 (1958)
- 5) G. Iwantscheff, Angew. Chem. **62**, 361 (1950); Referat Ztschr. analyt. Chemie **133**, 477 (1951)
- 6) Kohn-Abrest, Annales des fals. et fraudes **28**, 457 (1935)
- 7) H. Fischer, G. Leopoldi und H. Uslav, Ztschr. analyt. Chem. **101**, 1 (1935)

Vergleiche auch G. Iwantscheff: «Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse», Verlag G.m.b.H., Weinheim (1958).

Die Papierelektrophorese von Eierproteinen

Ergebnisse der papierelektrophoretischen Untersuchungen an Vogeleiern

2. Mitteilung

Von D. Hellhammer und O. Högl

(Eidg. Gesundheitsamt, Bern)

IV. Teil

Chemische Identifizierung der einzelnen Proteinbanden

In einer ersten Mitteilung (Hellhammer und Högl 1958) haben wir die Methoden der Papierelektrophorese von Eiereiweiss beschrieben.

Der Arbeit lag folgende Zielsetzung zugrunde:

1. Es sollte versucht werden, die mit der klassischen Elektrophorese schon anderen Autoren gelungene Fraktionierung des Eiweisses auch mit der wesentlich einfacheren Methodik auf Papier zu erreichen. Wie in der ersten Mitteilung dargelegt, gelang diese Auftrennung relativ gut.
2. Da eine gewisse Verschiedenheit der Pherogramme von Vogelart zu Vogelart anzunehmen war, sollte auch diese Frage untersucht werden.
3. Schliesslich beabsichtigten wir, die Veränderungen von Eiweiss bei der Alterung, beim Eintrocknen und allgemein bei der Auswirkung verschiedener chemischer und physikalischer Agentien zu verfolgen. In dieser Weise hofften wir auch einige Bedingungen kennen zu lernen, unter denen vielleicht andere Eiweisstoffe aus Lebensmitteln, die sich in weniger reiner Form darboten und bei welchen sich daher gewisse Schwierigkeiten bei der Isolierung ergeben konnten, in gleicher Art charakterisieren zu können.

Abb. 1 zeigt eine typische Extinktionskurve, wie sie mit der in der 1. Mitteilung beschriebenen Methodik bei Hühner-Eiklar (Leghorn-Rasse) erhalten wird.

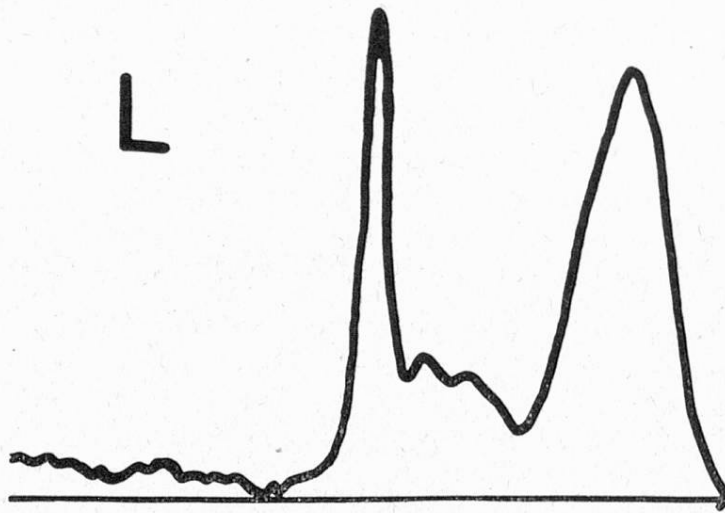
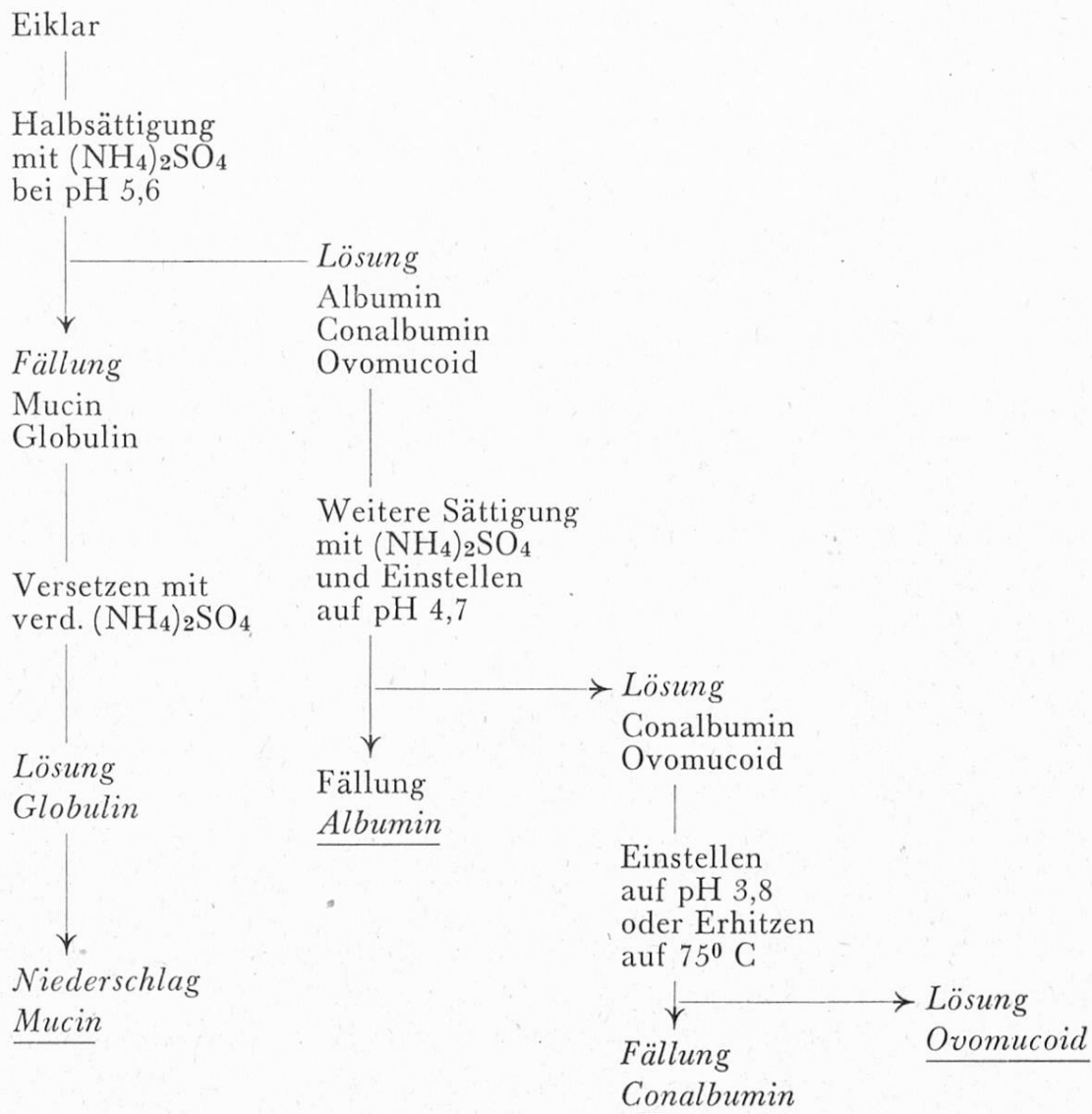


Abb. 1

Da sich schon bei den ersten vergleichenden Untersuchungen gezeigt hatte, dass die Grösse der einzelnen Fraktionen von Vogelart zu Vogelart recht verschieden ausfiel und diese Verteilung demnach als Merkmal zur Charakterisierung des betreffenden Eiweisses eventuell herangezogen werden konnte, musste zunächst bekannt sein, um welche Eiweissfraktionen (s. Teil II, S. 13) es sich bei den einzelnen Banden handelte.

Das Eiklar wurde daher zunächst durch Aussalzmethode in die bekannten Fraktionen Ovalbumin, Conalbumin, Globulin, Ovomuroid und Mucin zerlegt und die betreffenden Eiweisstoffe papierelektrophoretisch untersucht.

Grundsätzlich wurde nach folgendem Fraktionierschema verfahren:



Im Einzelnen gestalteten sich die Verhältnisse bei der chemischen Fraktionierung der Eiklarproteine folgendermassen:

Fraktioniermethode

Das Eiklar von 5 Leghorn-Eiern wurde zwecks Zerstörung der hochviskosen Mucinstruktur vorsichtig geschlagen und durch ein feinporiges Drahtsieb gegossen.

100 ml des homogenisierten Eiklars wurden in einem 300-ml Erlenmeyerkolben mit dem Magnetrührer durchmischt und nach der Methode von Sørensen und Hoyrup (1917) tropfenweise 100 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung (Merck, pro analysi) zugegeben, wobei das Globulin + Mucin als weisser Niederschlag ausgeschieden wurde.

Das Gemisch wurde während 20 Minuten in der «Ecco»-Zentrifuge bei 3500 rpm zentrifugiert und anschliessend die überstehende Lösung sorgfältig dekantiert, durch ein Faltenfilter filtriert, zwecks Weiterverwendung mit eini-

gen Kristallen Thymol versetzt und im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Der Globulin-Niederschlag am Boden der Zentrifugengläser wurde mit H_2O versetzt, wobei durch mitgerissene Mengen Ammoniumsulfat eine Salzlösung geringer Konzentration entstand, die eine langsame Auflösung des Globulins zur Folge hatte.

Die Lösung wurde erneut zentrifugiert und die das Globulin enthaltende Lösung vom Mucin-Niederschlag abgegossen. Ueber Nacht wurde die Globulinlösung bei Zimmertemperatur gegen fliessendes Wasser dialysiert. Der dabei entstandene Globulin-Niederschlag wurde mit Wasser in ein Becherglas gespült und durch Zugabe von einigen ml 10 %iger NaCl -Lösung wieder gelöst. Im Anschluss daran wurde die Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung sowie die beschriebenen Reinigungsoperationen erneut wiederholt.

Ovalbumin, Conalbumin und Ovomuroid waren in der überstehenden, klaren Lösung der Globulin-Fällung enthalten, aus der sie durch spezielle Fraktioniermethoden abgetrennt werden konnten. Als erste Substanz wurde das Ovalbumin auf folgende Weise ausgefällt:

Unter Rühren der klaren Lösung wurde tropfenweise soviel gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung zugegeben, dass eine bleibende Trübung entstand. Anschliessend wurde mit Hilfe der Glaselektrode «Polymetron» der pH-Wert der Lösung durch vorsichtige Zugabe von $2\text{n H}_2\text{SO}_4$ auf 4,7 eingestellt, wobei das Albumin ab pH 5,0 als voluminöser, weisser Niederschlag ausfiel. Nach Erreichen des gewünschten pH-Wertes, der dem isoelektrischen Punkt des Ovalbumins entsprach, wurde noch 10 Minuten weitergerührt und anschliessend die mit einigen Kristallen Thymol versetzte Lösung für 3 bis 4 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, wonach sich sämtliches Albumin abgesetzt hatte.

Danach wurde in der «Ecco»-Zentrifuge 20 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert und die überstehende Conalbumin- und Ovomuroidlösung dekantiert, durch ein Faltenfilter filtriert und mit einigen Kristallen Thymol versetzt, im Kühlschrank aufbewahrt.

Der Albumin-Niederschlag wurde durch Zugabe von Wasser gelöst und aus der Lösung das Albumin erneut nach der vorhin beschriebenen Methode gefällt und gereinigt. Nach der 2. Fällung wurde die Albuminlösung über Nacht gegen fliessendes Wasser bei Zimmertemperatur dialysiert, wodurch das überschüssige Ammoniumsulfat entfernt wurde. Aus dem klaren Dialysat wurde das Albumin erneut gefällt, solange, bis ein Pherogramm erhalten wurde, das neben der Albuminfraktion keine weiteren verunreinigenden Banden aufwies, was nach dreimaliger Fällung und Reinigung der Fall war.

Conalbumin und Ovomuroid wurden durch Ansäuern der filtrierten überstehenden Lösung der Albuminfällung voneinander getrennt (Longsworth 1940).

Die Lösung wurde unter Rühren tropfenweise mit $2\text{n H}_2\text{SO}_4$ versetzt, wobei sich bei pH 3,8 (Glaselektrode «Polymetron») ein feiner weisser Niederschlag bildete, dessen Menge nach 2 bis 3 Tagen noch zunahm. Er wurde zentrifugiert

und die klare, überstehende Lösung abgegossen und nochmals filtriert; sie enthielt jetzt nur noch das Ovomuroid.

Der Conalbumin-Niederschlag wurde mit etwas Wasser versetzt und die Suspension unter Rühren vorsichtig mit 0,5n NaOH versetzt, wobei ab pH 6,0 Lösung des Niederschlages eintrat, was im Einklang mit den Beobachtungen von *Longworth* (1940) steht. Durch Wiederholung der Fällung und Dialyse des gelösten Niederschlages wurde auch das Conalbumin dreimal gereinigt. Auf indirektem Wege konnte die Lage des Conalbumins auf dem Pherogramm folgendermassen nachgewiesen werden:

1 bis 2 ml der Conalbumin und Ovomuroid enthaltenden Lösung der Albuminfällung wurden im Wasserbad langsam auf 75° C erhitzt. Dabei bildete sich ein klumpiger weisser Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Das überstehende Zentrifugat wurde papierelektrophoretisch untersucht, wobei nur noch die schwächere der beiden ursprünglichen Banden erhalten wurde.

Da das Ovomuroid erst bei 82° C koaguliert, das Conalbumin dagegen schon unterhalb dieser Temperatur, entsprach die Lage der schwach gefärbten Proteinbande auf dem Pherogramm dem Ovomuroid.

Die Lösungen der so isolierten und gereinigten Fraktionen wurden papierelektrophoretisch untersucht und mit Pherogrammen von Eiklar verglichen.

In Abb. 2 sind 6 Pherogramme abgebildet, die unter den nach Teil III erwähnten experimentellen Bedingungen erhalten wurden, und die folgendermassen zueinander in Beziehung stehen:

1. Pherogramm des Ausgangseiklars
2. Pherogramm von isoliertem und gereinigtem Globulin
3. Pherogramm der überstehenden Lösung der Albuminfällung, Conalbumin und Ovomuroid enthaltend
4. Pherogramm von isoliertem und gereinigtem Conalbumin
5. Pherogramm der überstehenden Lösung der Albuminfällung nach Ausfällung des darin enthaltenen Conalbumins. Ovomuroid bleibt in der Lösung zurück
6. Pherogramm von isoliertem und gereinigtem Ovalbumin.

Demnach entsprechen die Banden eines Pherogramms bzw. die Kurvenmaxima des entsprechenden Extinktionsdiagramms (Abb. 1) folgenden Proteinfraktionen:

von links nach rechts

- | | |
|-------------------------|-----------------|
| 1. Bande (Glockenkurve) | I = Conalbumin |
| 2. Bande (Gipfel) | II = Globulin |
| 3. Bande (Gipfel) | III = Ovomuroid |
| 4. Bande (Glockenkurve) | IV = Ovalbumin. |

In Abb. 2 sind die Fraktionen I bis IV rechts aussen markiert.

Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit den Resultaten, welche schon die oben erwähnten Forschergruppen *Longworth* (1940), *Bain* und *Deutsch* (1947) und *Forsythe* und *Foster* (1950) bei der Fraktionierung des Eiklars mittelst der freien Elektrophorese erzielt hatten.

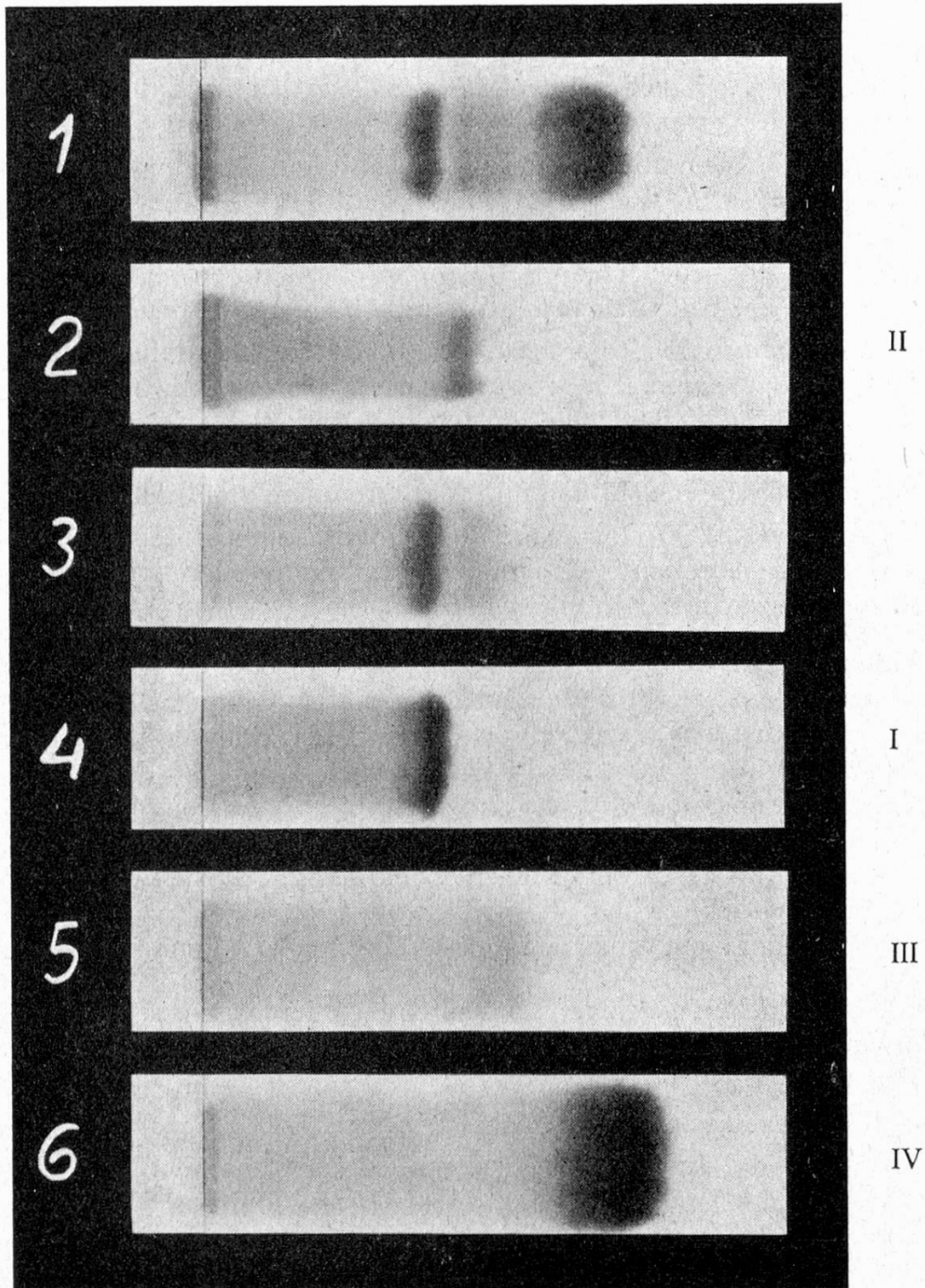


Abb. 2

Die von diesen Autoren im pH-Gebiet 7,8 bis 8,6 erhaltenen Schlierendiagramme zeigen gute Uebereinstimmung mit unseren Extinktionsdiagrammen, wobei unter Anwendung obiger Nomenklatur die einzelnen Kurvenzüge der Schlierendiagramme mit folgenden Proteinfractionen identifiziert wurden:

| Kurvenmaxima | <i>Langsworth</i> (1940) | <i>Bain und Deutsch</i> (1947) | <i>Forsythe</i> (1950) |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| I | Conalbumin | Conalbumin | Conalbumin |
| II | | | Globulin |
| + | Glob. + Ovomuc. | Glob. + Ovomuc. | |
| III | | | Ovomucoid |
| IV | Ovalbumin | Ovalbumin | Ovalbumin |

Verglichen mit der klassischen Elektrophorese liefert die Papierelektrophorese praktisch ebenso gute Resultate, wobei im Hühner-Eiklar die Auftrennung in die Globulin- und Ovomuroid-Fraktion zum Teil noch besser gelingt.

Zusammenfassung

Zur Identifizierung der 4 Maxima im Extinktionsdiagramm von Leghorn-Eiklar wurde eine Fraktionierung mit den üblichen Fällungsmethoden der Proteinchemie durchgeführt. In Uebereinstimmung mit der klassischen Elektrophorese kommen die Maxima des Pherogramms von links nach rechts den Fraktionen Conalbumine – Globuline – Ovomuroid – Ovalbumin zu.

Résumé

Pour l'identification des quatre maxima dans le diagramme d'extinction du blanc d'œuf Leghorn on fait un fractionnement avec les méthodes de précipitations habituelles de la chimie des protéines. En accord avec l'électrophorèse classique les maxima du phérogramme correspondent de gauche à droite aux fractions conalbumines – globulines – ovomucoid – ovalbumine.

Summary

For identifying the 4 maxima in the extinction diagram of Leghorn egg white the protein was fractionated by means of the methods of precipitation used in protein chemistry. It was found that the maxima observed on the electropherogram are, from left to right – conalbumine – globulines – ovomucoid – ovalbumine.

Literatur

- Bain J. A. und Deutsch H. F.*, J. Biol. Chem. **171**, 531 (1947).
Forsythe R. H. und Foster J. F., J. Biol. Chem. **184**, 377, 385 (1950).
Hellhammer D. und Högl O., diese Mitt. **49**, 79 (1958)
Longsworth L. G., Cannan R. K. und MacInnes D. A., J. Amer. Chem. Soc. **62**, 2580 (1940).
Sørensen S. P. L. und Hoyrup H., Compt. rend trav. lab. Carlsberg **12**, 164 (1917).