

331. Richard Kuhn und Pierre Desnuelle: Über die Aminosäuren des gelben Ferments.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut f. Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 3. August 1937.)

Die Aufklärung der chemischen Natur des spezifischen Eiweißkörpers, der im gelben Ferment mit der Lactoflavin-5'-phosphorsäure vereinigt ist, soll durch die folgenden Versuche angebahnt werden. Das Adsorptionsverfahren von F. Weygand¹⁾ hat es ermöglicht, größere Mengen von reinem gelben Ferment zu gewinnen und die daraus durch saure Hydrolyse gebildeten Aminosäuren zu untersuchen. Hrn. F. Weygand, der die von uns analysierten Präparate gemeinsam mit Hrn. H. Stocker und Hrn. K. Breitwieser dargestellt hat, sind wir zu sehr großem Dank verpflichtet.

Fraktionierung mit Ammoniumsulfat.

Die Abwesenheit fremder Proteine ist für die vorliegende Aufgabe naturgemäß wesentlich. Als Reinheitskriterium benützten wir das von E. J. Cohn²⁾ angegebene:

Fällt man ein homogenes Protein mit Ammonsulfatlösungen von steigender Konzentration und trägt die in Lösung verbliebenen Mengen gegen den Logarithmus der Ammonsulfat-Konzentration auf, so erhält man eine gerade Linie. Diese Prüfung ist im Falle des gelben Ferments dadurch begünstigt, daß man nicht nur die Menge des Proteins, sondern auch die des Farbstoffs, der in Lösung bleibt, leicht bestimmen kann. Einheitlichkeit vorausgesetzt, müssen beide parallel gehen. Die bei der Aussalzung in Lösung gebliebenen Proteinmengen bestimmten wir nach dem Verfahren von A. Roche und F. Marquet³⁾ durch Fällung mit Tannin und Analyse des Stickstoffgehalts der Niederschläge. Die colorimetrische Bestimmung des nicht gefallenen gelben Ferments erfolgte mit dem Stufenphotometer.

Auf diesem Wege fanden wir, daß Präparate von gelbem Ferment, deren Farbstoffgehalt bereits dem von H. Theorell⁴⁾ berechneten Molekulargewicht von 70000 entspricht, nach dem log-S-Diagramm noch nicht ganz einheitlich sind (Fig. 1). Ein Teil des Proteins, 10—15%, fällt schon mit Ammonsulfatlösungen von weniger als 58% Gehalt aus. Auffallend groß ist der Unterschied gegenüber den von H. Theorell⁴⁾ für die Aussalzung durch Ammonsulfat angegebenen Werten, die in Fig. 1 mit eingetragen sind.

Durch Vorfällung mit 58-proz. Ammonsulfatlösung, die präparativ von Hrn. F. Weygand ausgeführt wurde, gelang es, Fermentpräparate darzustellen, deren log S-Kurven scharf abknicken und bis zur vollständigen Ausfällung bei 66.6% Sättigung geradlinig verlaufen (Fig. 2).

Diese Reinigung hat das „Mol.-Gew.“ des gelben Ferments nicht merklich verändert. Für das zwischen 58% und 66.6% scharf ausfallende Chromoprotein ergab sich:

10 ccm Lösung mit 1 ccm n_{10} -Salzsäure versetzt und bei $\lambda = 445 \text{ m}\mu$ lichtelektrisch gemessen. Schichtdicke der Küvette $d = 0.508 \text{ cm}$, gef. $\log I_0/I$

¹⁾ F. Weygand u. H. Stocker, Ztschr. physiol. Chem. **247**, 167 [1937].

²⁾ Physiol. Rev. **5**, 349 [1925].

³⁾ Bull. Soc. Chim. biol. **17**, 1630 [1935]; **19**, 613 [1937].

⁴⁾ Biochem. Ztschr. **272**, 155 [1935]; **278**, 263 [1935]; s. a. Kekwick u. Pedersen, Biochem. Journ. **30**, 2201 [1936].

= 0.528 (für die 10-proz. Verdünnung korr.). Für Lactoflavin (Lactoflavin-phosphorsäure) ist im Mittel aus vielen Messungen $\kappa = 29 \times 10^3$ bei $\lambda = 445 \mu$, daher die Konzentration der prosthetischen Gruppe

$$c = \frac{2.30}{29 \times 10^3} \times \frac{0.528}{0.508} = 8.25 \times 10^{-5} \text{ (Mol/l).}$$

Der Trockengehalt der Lösung betrug 5.80 g in 1000 ccm. Für das verwendete gelbe Ferment folgt daraus

$$\text{Mol.-Gew.} = \frac{5.80}{8.25 \times 10^{-5}} = 70000.$$

Daß die Vorfällung mit Ammonsulfat den Farbstoffgehalt kaum verschoben hat, dürfte darauf beruhen, daß unterhalb von 58% Sättigung verhältnismäßig geringe Mengen anderer Proteine ausfallen, die gelbes Ferment adsorbieren.

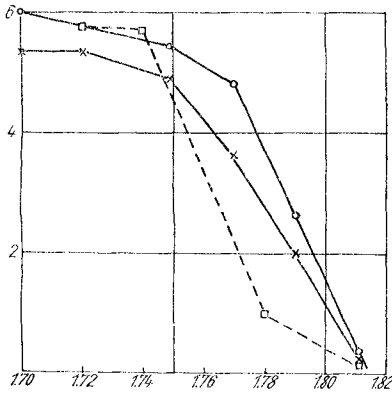


Fig. 1.

Gelbes Ferment und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
Abszissen: $\log S$ [$S = \% \text{ Ammonium-sulfat}$].

Ordinaten: mg gelbes Ferment in Lösung.
—○—○— ber. aus dem Farbstoffgehalt,
—×—×— ber. aus dem Stickstoffgehalt
($N = 16.3\%$).

Je 2 ccm Fermentlösung + ges.
Ammonsulfatlösung + Wasser zu
7.00 ccm; $p_{\text{H}} = 5.2$ durch $n/_{10}$ -
Acetatpuffer.

—□—□— von H. Theorell für $p_{\text{H}} =$
5.2 gefunden.

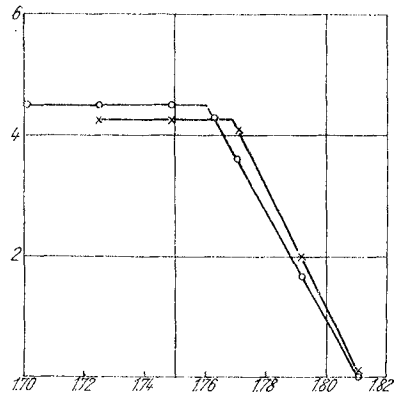


Fig. 2.

Reines gelbes Ferment und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
Abszissen: $\log S$ [$S = \% \text{ Ammonium-sulfat}$].

Ordinaten: mg gelbes Ferment in Lösung.
—○—○— ber. aus dem Farbstoffgehalt,
—×—×— ber. aus dem Stickstoffgehalt
($N = 16.3\%$).

Je 2 ccm Fermentlösung + ges.
Ammonsulfatlösung + Wasser zu
7.00 ccm; $p_{\text{H}} = 5.2$ durch $n/_{10}$ -
Acetatpuffer.

Das Drehungsvermögen des gelben Ferments war in den untersuchten Grenzen vom p_{H} praktisch unabhängig ($d = 1 \text{ dm}$, $c = 0.70$):

p_{H}	3.8	5.3	7.4	8.6	10.4
α_{D}	-0.27°	-0.26°	-0.27°	-0.26°	-0.28°

Es änderte sich mit der Wellenlänge wie folgt:

$$\alpha_{630} = -0.18^\circ, \quad \alpha_{580} = -0.20^\circ, \quad \alpha_{537} = -0.23^\circ.$$

Die Elementaranalyse ergab:

4.165, 3.940 mg Sbst.: 7.84, 7.44 mg CO₂, 2.62, 2.52 mg H₂O. — 31.150 mg Sbst.:
1.083 mg BaSO₄. — 3.081 mg Sbst.: 0.436 ccm N₂ (20°, 750 mm).

Gef. C 51.34, 51.49, H 7.04, 7.21, S 0.48, N 16.27.

Der Schwefelgehalt war nur halb so groß wie bei H. Theorell⁵⁾,
der 1.0% S fand.

Stufenphotometrische Bestimmung der Aminosäuren.

In den folgenden Tabellen bedeutet

γ die Gesamtmenge der Aminosäure in dem nach Vorschrift jeweils erhaltenen
Gesamtvolumen der Farbstofflösung in 0.001 mg,

d die Schichtdicke der Küvette in cm,

D die Lichtdurchlässigkeit der Farbstofflösung in %, für das jeweils angegebene
Farbfilter,

k die aus D folgenden k -Werte, die man der dem Stufenphotometer beigelegten
Tabelle zu entnehmen hat.

Von den Lichtfiltern S47, S50, S53, S57, S61 und S72 wurde in jedem Falle das-
jenige verwendet, für das sich die stärkste Absorption ergab. D ist der Mittelwert von
je 8 Ablesungen. Die Küvette mit der Farbstofflösung befand sich dabei 4-mal in der
rechten und 4-mal in der linken Hälfte des Pulfrich-Photometers (C. Zeiss). Für
jeden Punkt der Eichkurven wurde die betreffende Farbstofflösung 2—3-mal von Anfang
an hergestellt.

Beispiele für die Fehlergrenzen (Bestimmung von Pyrrol mit *p*-Dimethylamino-
benzaldehyd):

27.5 γ	Lösung I: $D = 62.2$	55 γ	Lösung I: $D = 45.9$
	Lösung II: $D = 59.9$		Lösung II: $D = 47.2$
	Lösung III: $D = 61.1$		Lösung III: $D = 46.6$

Phenylalanin.

Die von R. Kapeller-Adler⁶⁾ angegebene colorimetrische Bestimmung
beruht offenbar auf der Bildung eines Nitrophenylhydroxylamins (Gemisch
von *o*- und *p*-Verbindungen) und nicht, wie nach den älteren Versuchen
von J. Meisenheimer⁷⁾ angenommen wurde, auf der Bildung von *o*-Nitro-
nitroso-Verbindungen. Nach erfolgter Nitrierung führen wir die Reduktion
mit Ascorbinsäure⁸⁾ in der Kälte aus. Die rotstichig violette Farbe,
die man erhält, entspricht derjenigen, die ein Gemisch von viel *p*- und wenig
o-Nitrophenyl-hydroxylamin⁸⁾ in Form der Mono-alkalisalze zeigt.

Ein bestimmtes Volumen der Lösung, das 1—4 mg Phenylalanin ent-
halten soll, wird zur Trockne verdampft und nach R. Kapeller-Adler
mit 2 ccm Nitriersäure (10 g Kaliumnitrat in 100 ccm konz. Schwefelsäure)
20 Min. im siedenden Wasserbade nitriert. Man spült mit wenig Wasser in
ein 25-ccm-Meßkölbchen und macht mit konz. Ammoniak alkalisch. Nach
dem Abkühlen gibt man 0.5 ccm einer frisch bereiteten 1-proz. Lösung von
Ascorbinsäure (bzw. 5 mg) zu und füllt mit konz. Ammoniak zur Marke auf.
Bis zur Ablesung hat man 30 Min. zu warten. Filter S 53.

Min. nach Zusatz der

Ascorbinsäure	10	15	20	25	30	40	90
D in %	34	32.4	31.2	29.5	29.4	29.4	29.5

⁵⁾ Biochem. Ztschr. **290**, Maiheft [1937]. ⁶⁾ Biochem. Ztschr. **252**, 185 [1932].

⁷⁾ B. **36**, 4174 [1903]; **39**, 2533 [1906]; **52**, 1161 [1919].

⁸⁾ R. Kuhn u. F. Weygand, B. **69**, 1969 [1936].

Nach 30 Min. gefundene Werte

Filter S53 ($\lambda = 530 \text{ m}\mu$)	γ	d	D	k
	886.8	1	53.5	0.272
	1773.7	1	29.4	0.532
	2661.0	1	15.95	0.798
	3547.4	0.5	30.4	0.517

Arginin⁹⁾.

a ccm Argininlösung und (5-a) ccm Wasser werden in schmelzendem Eis gekühlt. Man versetzt mit 1 ccm 2-n. Natronlauge + 1 ccm 0.02-proz. α -Naphthol in 20-proz. Alkohol und läßt 3 Min. bei 0° stehen. Dann gibt man 0.15 ccm Natriumhypobromitlösung (2 g Brom in 100 ccm 5-proz. Natronlauge) zu und schüttelt 7 Sek. kräftig. Sofort darauf versetzt man mit 1 ccm gesättigter Lösung von Harnstoff in Wasser, mischt gründlich, läßt noch 5 Min. in Eis stehen und liest dann am Stufenphotometer möglichst rasch ab. Die Lösungen wurden durch Einwägen von Arginin-nitrat bereitet. Die Tabelle gibt die Werte für freies Arginin an.

Filter S50 ($\lambda = 500 \text{ m}\mu$)	γ	d	D	k
	92.5	0.25	50.0	0.301
	165.0	0.25	36.2	0.442
	232.0	0.25	28.2	0.550
	290.0	0.25	22.9	0.640
	395.0	0.25	18.0	0.745

Histidin.

Zu der von R. Kapeller-Adler¹⁰⁾ angegebenen stufenphotometrischen Bestimmung haben wir nicht das Filter S 50, sondern S 53 verwendet, da die Lichtabsorption der violetten Lösung bei $\lambda = 530 \text{ m}\mu$ erheblich stärker ist. a ccm der aus dem Dichlorhydrat dargestellten Lösung von reinem Histidin wurden mit (2-a) ccm Wasser in einem 10-ccm-Meßkölbchen verdünnt, nach Vorschrift bromiert, mit Ammoncarbonat-Ammoniak versetzt und nach dem Erkalten zur Marke aufgefüllt. Eine Vorbehandlung mit Kaliumpermanganat wurde in keinem Falle vorgenommen.

Filter S53 ($\lambda = 530 \text{ m}\mu$)	γ	d	D	k
	780	0.5	49.4	0.306
	1060	0.5	31.9	0.497
	1310	0.5	20.4	0.690
	1560	0.5	12.2	0.914
	1820	0.5	26.0	0.584

Bei der Analyse der Eiweißhydrolysate hat sich die von R. Kapeller-Adler verlangte Vorreinigung des Histidins durch Fällung mit Hopkins-Reagens als entbehrlich erwiesen, da die von uns bestimmten Histidinlösungen schon durch Elektrodialyse vorgereinigt waren.

⁹⁾ S. Sakaguchi, Journ. Biochemistry 5, 25 [1925]; C. J. Weber, Journ. biol. Chem. 86, 217 [1930]; G. Klein u. K. Tauböck, Biochem. Ztschr. 251, 10 [1932].

¹⁰⁾ Biochem. Ztschr. 264, 131 [1933]; 271, 206 [1934].

Tyrosin.

Die orangerote Färbung, die man mit Mercurisulfat, Schwefelsäure und Nitrit erhält, wurde unter genauer Einhaltung der von O. Folin und A. D. Marenzi¹¹⁾ gegebenen Vorschrift erzeugt. Für die stufenphotometrische Bestimmung kommt man jedoch mit 10-mal geringeren Tyrosinmengen aus. Man dividiere alle in der Originalvorschrift angegebenen Mengen der Reagenzien durch 10 und fülle zuletzt nicht auf 100 ccm, sondern auf 10 ccm auf.

Filter S47	γ	d	D	k
($\lambda = 470 \text{ m}\mu$)	186.1	2	53.4	0.273
	372.2	1	60.4	0.220
	558.3	1	46.1	0.337
	744.4	1	31.1	0.507
	813.0	1	26.8	0.572

Tryptophan.

Die Farbreaktion mit Formaldehyd, Salzsäure und Nitrit nach E. Voisenet¹²⁾ wurde unter den von O. v. Fürth und Z. Dische¹³⁾ angegebenen Bedingungen ausgeführt. Als Standard-Substanz diente Casein nach Hammarsten, das 24 Stdn. bei 80° getrocknet worden war. Von diesem wurden 5.00 g in 100 ccm 30-proz. Kalilauge gelöst. Die Lösung enthielt somit 0.085% Tryptophan. Das Endvolumen der blauviolettten Lösung betrug stets 20 ccm.

Filter S53	γ	d	D	k
($\lambda = 530 \text{ m}\mu$)	425	1	52.5	0.280
	637	0.5	55.5	0.255
	850	0.5	44.4	0.353
	1060	0.5	37.2	0.430
	1275	0.5	29.9	0.525

Glykokoll¹⁴⁾.

a ccm Glykokoll-Lösung und (1-a) ccm Wasser werden mit 1.5 ccm Zimmermann-Reagens (*o*-Phthaldialdehyd)¹⁵⁾ in einem kleinen Scheidetrichter gemischt. Nach 2 Min. gibt man 2 ccm einer Mischung von 5 Vol. konz. Schwefelsäure und 30 Vol. 95-proz. Alkohol zu. Nach weiteren 2 Min. schüttelt man den grünen Farbstoff mit 5 ccm Chloroform aus. Von der Chloroformschicht werden 3 ccm herauspipettiert, mit 0.5 ccm Alkohol verdünnt und am Stufenphotometer abgelesen.

Filter S72	γ	d	D	k
($\lambda = 720 \text{ m}\mu$)	307	1	71.0	0.149
	512	1	47.8	0.320
	769	1	29.2	0.535
	1025	1	19.0	0.721

¹¹⁾ Journ. biol. Chem. **83**, 89 [1929].

¹²⁾ Bull. Soc. chim. France **33**, 1198 [1905].

¹³⁾ Biochem. Ztschr. **146**, 275 [1924].

¹⁴⁾ G. Klein u. H. Linser, Ztschr. physiol. Chem. **205**, 251 [1932].

¹⁵⁾ Vorschrift für die Darstellung aus Tetrabrom-*o*-xylol: W. Zimmermann, Ztschr. physiol. Chem. **189**, 4 [1930].

Oxyprolin.

Die Farbreaktion mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd nach K. Lang¹⁶⁾, die auf der Bildung von Pyrrol bei der Oxydation mit Natriumhypochlorit beruht, wurde unter den von E. Waldschmidt-Leitz und S. Akabori¹⁷⁾ angegebenen Bedingungen ausgeführt: Man mischte a ccm der durch Destillation gewonnenen Pyrrol-Lösung, (1-a) ccm Wasser, 1 ccm konz. Salzsäure ($d = 1.19$) und 1 ccm 2.5-proz. Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in Alkohol, ließ 20 Min. bei 37° stehen, kühlte ab und füllte auf 20 ccm im Meßkölbchen auf. Die Ablesung erfolgte nach 5 Min. Für die folgenden Messungen wurde von reinem Pyrrol ausgegangen.

Filter S53 ($\lambda = 530 \text{ m}\mu$)	Pyrrol γ	Oxyprolin Υ	d	D	k
	27.5	67.2	1	61.1	0.214
	55.0	134.4	1	46.6	0.332
	82.5	201.6	1	36.4	0.440
	110.0	268.8	1	29.6	0.529

Da 1 Mol. Oxyprolin (Mol.-Gew. 131) unter diesen Bedingungen nur 0.80 Mol. Pyrrol (Mol.-Gew. 67) liefert, berechnet sich der Oxyprolingehalt aus der gefundenen Pyrrolmenge durch Multiplikation mit dem Waldschmidt-Leitz-Koeffizienten 2.44.

Cystin.

Führt man die Farbreaktion von Sullivan unter den von J. W. H. Lugg¹⁸⁾ angegebenen Bedingungen aus, so findet man mit dem Stufenphotometer die folgenden Werte:

Filter S47 ($\lambda = 470 \text{ m}\mu$)	γ	d	D	k
	996	0.5	46.4	0.335
	1328	0.5	36.7	0.435
	1660	0.5	30.8	0.511
	1992	0.5	26.1	0.583

Für die Farbreaktion nach O. Folin und A. D. Marenzi¹⁹⁾ kommt man mit $\frac{1}{5}$ der in der Originalvorschrift angegebenen Mengen aus. a ccm Cystinlösung bzw. Eiweißhydrolysat und (1-a) ccm Wasser werden mit 0.4 ccm 20-proz. Natriumsulfidlösung vermischt und 1 Min. stehen gelassen. Dann versetzt man mit 3.6 ccm + $a \times 0.5$ ccm 20-proz. Sodalösung, mit 0.4 ccm 20-proz. Li_2SO_4 -Lösung und 1.6 ccm Harnsäure-Reagens. Der Farbwert der blauen Lösung wird nach 3 bis 5 Min. abgelesen.

Filter S72 ($\lambda = 720 \text{ m}\mu$)	γ	d	D	k
	272.0	1	59.0	0.228
	381.5	1	37.6	0.425
	463.2	1	26.5	0.576
	545.0	1	18.7	0.728

¹⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. **219**, 148 [1933]; Biochem. Ztschr. **291**, 174 [1937].

¹⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **224**, 187 [1934].

¹⁸⁾ Biochem. Journ. **27**, 669 [1933].

¹⁹⁾ Journ. biol. Chem. **83**, 103 [1929].

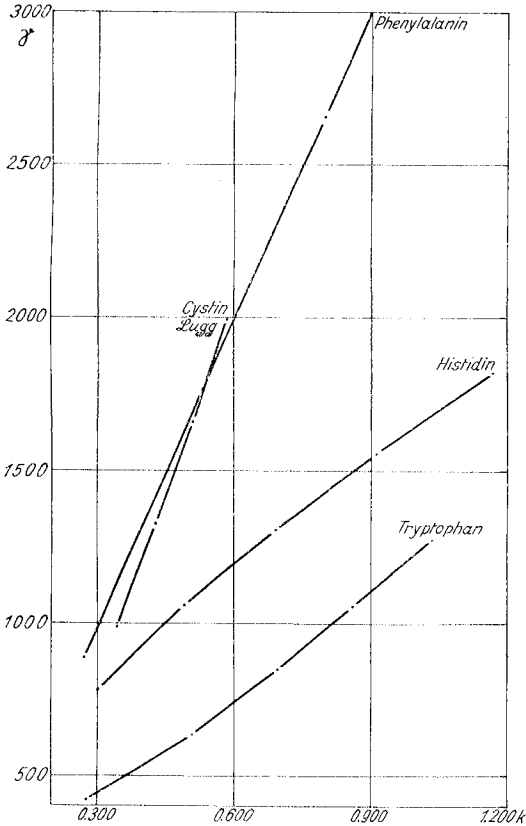


Fig. 3.

Eichkurven für die Bestimmung von Phenylalanin, Cystin, Histidin und Tryptophan.

Abszissen: k aus der Tabelle.
 Ordinaten: Aminosäure in γ .

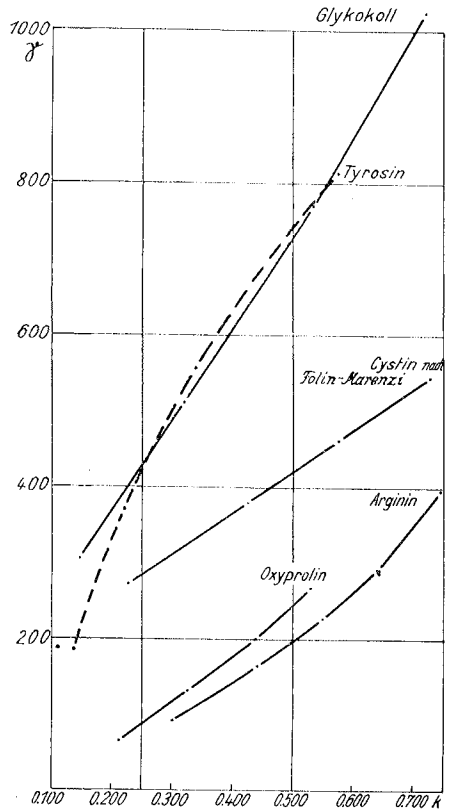


Fig. 4.

Eichkurven für die Bestimmung von Glykokoll, Tyrosin, Cystin nach Folin-Marenzi, Arginin und Oxyprolin mit dem Stufenphotometer.

Abszissen: k aus der Tabelle.
 Ordinaten: Aminosäure in γ .

Abtrennung der Hexonbasen durch Elektrodialyse.

Das Verfahren gründet sich auf die Untersuchungen von G. L. Foster und C. L. A. Schmidt²⁰⁾ sowie von G. J. Cox, H. King und C. P. Berg²¹⁾. Wir benützen zur Elektrodialyse den von W. Pauli²²⁾ angegebenen waagrecht angeordneten Apparat, dessen Mittelgefäß etwa 100 ccm faßt. Die 2 Elektroden bestehen aus feinen Netzen von reinem Platin. Spannung 220 Volt, Stromstärke 0.1 bis 0.2 Ampère. Membranen: doppelte Lagen von mittelstarkem Cuprophane²³⁾, von dem 1 Bogen (50 × 50 cm) 5.6 g wiegt. Der Elektrodialyse-Apparat befindet sich in einem Thermostaten mit schmelzendem Eis. Die Stromzuführungen sind durch Überziehen mit Gummischläuchen und sorgfältiges Abdichten mit Lack isoliert.

²⁰⁾ Journ. biol. Chem. **56**, 545 [1923].

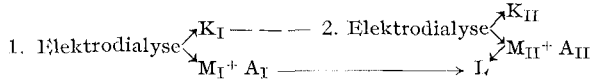
²¹⁾ Journ. biol. Chem. **81**, 755 [1929].

²²⁾ Biochem. Ztschr. **152**, 355 [1924].

²³⁾ J. P. Bemberg A.-G.

Man taucht den Apparat in schmelzendes Eis, füllt die 2 Außenzellen mit dest. Wasser und beschickt die Mittelzelle mit der Aminosäurelösung. Das Flüssigkeitsniveau soll in allen 3 Zellen dasselbe sein. Die Spannung wird sofort eingeschaltet und die Lösung in der Mittelzelle durch einen Rührer, der sich durch die obere Öffnung eben einführen läßt, schwach gerührt. Die Kathoden-Flüssigkeit wird nach $\frac{1}{2}$, nach 1 und nach $1\frac{1}{2}$ Stdn. abgehebert und jedesmal durch frisches dest. Wasser ersetzt. Die drei abgeheberten Lösungen werden vereinigt (K_I). Nach 2 Stdn. ist die vierte Kathodenflüssigkeit bereits frei von Arginin (Sakaguchi-Reaktion) und Histidin (Diazreaktion).

Die Lösung K_I wird im Vak. auf etwa 80 ccm eingeeengt und zur zweiten Elektrodialyse mit etwas Wasser wieder in die Mittelzelle gespült. Die Kathodenflüssigkeiten werden wiederum nach $\frac{1}{2}$, 1 und $1\frac{1}{2}$ Stdn. abgehebert und vereinigt (K_{II}). Die in der Mittelzelle bei der 1. und 2. Elektrodialyse verbliebenen Lösungen (M_I und M_{II}) werden miteinander und mit dem Inhalt der Anodenzellen (A_I und A_{II}) vereinigt zu L , worin man weitere Aminosäuren bestimmt. Das Arbeits-Schema ist also folgendes:



Zuletzt hat man nur 2 Lösungen: K_{II} , in der sich die Hexonbasen finden, und $L = M_I + A_I + M_{II} + A_{II}$, worin die Aminocarbonsäuren und Monoamino-dicarbonensäuren enthalten sind.

In K_{II} bestimmt man das Arginin und Histidin colorimetrisch. Überdies macht man eine Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl. Durch Abzug des dem Arginin und Histidin entsprechenden Stickstoffs erhält man die Menge des vorhandenen Lysins. Den so errechneten Gehalt an Lysin kontrolliert man durch eine Bestimmung des Aminostickstoffs nach D. D. van Slyke, wobei vom Arginin $\frac{1}{4}$, vom Histidin $\frac{1}{3}$ und vom Lysin $\frac{1}{1}$ des Stickstoffs erfaßt wird. Die auf beiden Wegen erhaltenen Lysinwerte stimmen bei den Hydrolysaten des gelben Ferments ebenso befriedigend überein wie bei künstlichen Gemischen von Arginin, Histidin und Lysin.

Es ist zu bemerken, daß in Übereinstimmung mit den Feststellungen von Foster und Schmidt bei der ersten Elektrodialyse auch eine gewisse Menge nichtbasischer Aminosäuren kathodisch wandert. Die Lösung K_I enthält stets mehr Gesamtstickstoff als theoretisch zu erwarten ist. Die Farbreaktion auf Histidin nach R. Kapeller-Adler wird in K_I durch eine Braunfärbung gestört, die auf Anwesenheit von Tyrosin zurückzuführen ist. Wie aus den folgenden Beispielen hervorgeht, sind all diese Nachteile in der Lösung K_{II} vollkommen verschwunden. Die Gesamtstickstoffwerte sind richtig und man erhält bei der Prüfung auf Histidin, auch wenn es sich um Proteinhydrolysat handelt, eine rein violette Färbung, die mit der von reinem Histidin gegebenen identisch ist. Die vorangehende Isolierung dieser Aminosäure durch Fällung mit Hopkins-Reagens ist daher nach der zweiten Elektrodialyse unnötig.

Beispiel I.

Einmalige Elektrodialyse von 90 ccm einer Lösung, die in 100 ccm Wasser folgende Aminosäuren enthält:

30 mg Histidin, 30 mg Arginin

50 mg Phenylalanin, 50 mg Cystin,
50 mg Glykokoll

Zeit (Uhr)	pH (Mitte)	Stromstärke (Ampère)	Arginin- reaktion			Histidin- reaktion			Be- merkungen
			K	M	A	K	M	A	
10.15	6.7	0.2	—	+	—	—	+	—	
25	5.8	0.17	+	+	—	—	+	—	
35	5.2	0.17	+	+	—	+	+	—	
45	5.0	0.15	+	+	—	+	+	—	
55	5.0	0.08	+	~0	—	+	+	—	
11.15	5.0	0.07	+	—	—	+	~0	—	← Wasser
45	5.0	0.05	—	—	—	~0	—	—	

Die Abkürzungen K, M, A bedeuten Kathoden-, Mittel- und Anoden-Zelle. Das Zeichen ← Wasser bedeutet, daß die kathodische Flüssigkeit durch destilliertes Wasser ersetzt wurde.

Arginin und Histidin wurden in den vereinigten kathodischen Lösungen (K_I) colorimetrisch bestimmt. Gesamtvolumen von $K_I = 50$ ccm.

Arginin: $a = 0.35$ ccm, $d = 0.25$, $D = 34.2$, $k = 0.466$ entspr. 180 γ Arginin. In 50 ccm: $50 \times 0.180 / 0.35 = 25.7$ mg; $25.7 \times 100 / 90 = 28.6$ mg Arginin.

Histidin: 20 ccm der Lösung K_{II} wurden auf 10 ccm eingeengt. $a = 1.5$ ccm, $d = 0.5$, $D = 14.1$, $k = 0.851$ entspr. 1480 γ Histidin. In 50 ccm: $1.480 \times 50 / 1.5 \times 2 = 24.7$ mg; $24.7 \times 100 / 90 = 27.5$ mg Histidin.

Bilanz I.

Aminosäure	angewandt	gefunden	Verlust
Arginin	30 mg	28.6 mg	4.6 %
Histidin	30 mg	27.5 mg	8.2 %

Beispiel II.

Zweimalige Elektrodialyse von 100 ccm einer Lösung enthaltend:

20 mg Histidin, 20 mg Arginin 20 mg Tyrosin, 50 mg Phenylalanin
50 mg Cystin, 50 mg Glykokoll

Arginin und Histidin sind in der kathodischen Lösung K_{II} bestimmt worden.

Gesamtvolumen von $K_{II} = 50$ ccm.

Arginin: $a = 0.4$ ccm, $d = 0.25$, $D = 39.9$, $k = 0.399$ entspr. 143.7 γ Arginin. In 50 ccm: $0.143 \times 50 / 0.4 = 18.0$ mg Arginin.

Histidin: 20 ccm der Lösung K_{II} sind auf 10 ccm eingedampft worden. $a = 2$ ccm, $d = 0.5$, $D = 15.6$, $k = 0.807$ entspr. 1438 γ Histidin. In 50 ccm: $1438 \times 50 / 4 = 18.0$ mg Histidin.

Bilanz II.

Aminosäure	angewandt	gefunden	Verlust
Arginin	20 mg	18.0 mg	10 %
Histidin	20 mg	18.0 mg	10 %

Beispiel III.

20 mg Histidin, 16 mg Lysin
16.6 mg Arginin

50 mg Glykokoll, 50 mg Alanin
50 mg Cystin, 20 mg Tyrosin

in 100 ccm Wasser wurden zweimal elektrodialysiert.

p _H (in der Mittelzelle)	Anfang	Ende
Erste Elektrodialyse	6.5	4.9
Zweite Elektrodialyse	7.2	5.2

Die kathodische Lösung K_{II} wurde auf 25 ccm eingedampft.

Gesamtstickstoff. 0.8 ccm der Lösung: 2.74, 2.80 ccm $n_{/100}$ -HCl, Mittel = 2.77 ccm, $2.77 \times 0.14 \times 25 / 0.8 = 12.1$ mg Gesamt-N.

Aminostickstoff. 1.5 ccm der Lösung (6 Min. geschüttelt): 0.644, 0.658 ccm N₂ (24°, 744 mm). Blindversuche: 0.045 ccm. $0.606 \times 0.5445 \times 25 / 1.5 = 5.5$ mg Amino-N.

Colorimetrische Bestimmungen.

Arginin: $a = 0.25$ ccm, $d = 0.25$, $D = 40.0$, $k = 0.398$ entspr. 144 γ Arginin.
 $0.144 \times 25 / 0.25 = 14.4$ mg Arginin.

Histidin: $a = 2$ ccm, $d = 0.5$, $D = 14.0$, $k = 0.854$ entspr. 1490 γ Histidin.
 $1.490 \times 25 / 2.0 = 18.6$ mg Histidin.

Berechnung (Stickstoffverteilung nach van Slyke). A, H, und L sind die auf Arginin, Histidin, Lysin entfallenden Stickstoffmengen in mg.

$$\begin{array}{rcl} A + H + L = 12.1 & A + L = 7.1 & 3A + 3L = 21.3 \\ A + \frac{H}{4} + L = 5.5 & 3A + 12L = 46 & 3A + 12L = 46 \\ H = 5.0 & & \underline{9L = 24.7} \end{array}$$

Daraus folgt: $L = 2.75$ $A = 4.35$.

Bilanz III.

	N-Arginin	N-Histidin	N-Lysin	N Summe
Angewandt	5.1 mg	5.4 mg	3.2 mg	13.7 mg
Gefunden	4.35 mg	5.0 mg	2.8 mg	12.15 mg
	4.64 mg			

Beispiel IV.

74.0 mg Histidin, 70.7 mg Arginin
66.5 mg Lysin

100 mg Glykokoll, 100 mg Cystin
100 mg Phenylalanin, 50 mg Prolin

in 100 ccm Wasser wurden, wie beschrieben, zweimal elektrodialysiert.

Erste Elektrodialyse: p_H 6.4 \rightarrow 4.7. Zweite Elektrodialyse: p_H 7.2 \rightarrow 5.2.

Bilanz IV.

	N-Arginin	N-Histidin	N-Lysin	basischer Amino-N	Summe
Angewandt	22.66 mg	20.05 mg	12.76 mg	25.1 mg	55.47 mg
Gefunden	21.6 mg	17.7 mg	12.3 mg	22.1 mg	51.6 mg
	20.3 mg				

Vorversuche mit Casein.

Beispiel I.

1.8 g Casein „nach Hammarsten“ (24 Stdn. bei 80° getrocknet) wurden 40 Stdn. mit 10 ccm 6-n.-Schwefelsäure unter Rückfluß gekocht. Das Hydrolysat wurde auf 200 ccm verdünnt und filtriert. Der unlösliche Rückstand wog nach dem Waschen und Trocknen 36 mg. Er enthielt 3.7% N (1 mg Stickstoff). Das Filtrat (300 ccm) erhitzen wir zum Sieden. Unter Umrühren gaben wir eine heiß gesättigte Lösung von 9 g Bariumhydroxyd zu. Die Bariumhydroxydmenge wurde aus der verwendeten Schwefelsäuremenge berechnet, minus 5%. Die abzentrifugierte Bariumsulfatfällung wurde 6-mal mit 50 ccm siedendem Wasser ausgewaschen. Das letzte Waschwasser gab keine Ninhydrin-Reaktion mehr. Nach dem Trocknen wog die Fällung 6.6 g. Sie enthielt noch 19 mg Stickstoff. Man hat versucht, die adsorbierten Aminosäuren durch 50-proz. Essigsäure zu eluieren. Aus diesen Versuchen geht aber hervor, daß erstens das Bariumsulfat sich nachher nur sehr schwer zentrifugieren läßt, und zweitens, daß die am Bariumsulfat adsorbierten braunen Substanzen, die das Hydrolysat dunkel färbten, auch eluiert werden. Da die colorimetrischen Bestimmungen ganz farblose Flüssigkeiten verlangen, haben wir die Essigsäure-Elution aufgegeben. Der verlorene Stickstoff ist in der schließlichen Bilanz abgezogen.

Lösung und Waschwasser (600 ccm) wurden vereinigt und in einen 1000-ccm-Destillationskolben gebracht. An diesen Kolben wurde die klassische Ammoniak-Destillationsanlage²⁴⁾ angeschlossen. In die erste Vorlage brachte man 40 ccm, in die zweite 20 ccm n_{10} -H₂SO₄. Die drei Kolben wurden verbunden. Zu der Aminosäurelösung gab man nun 1 g Bariumhydroxyd (berechnet um die restliche Schwefelsäure genau zu fällen: 0.5 g; weitere 0.5 g zur Erzielung alkalischer Reaktion). Man destillierte unter 30 mm Vak. (Wasserbad-Temperatur: 35°) 1½ Stdn. Der Überschuß an Schwefelsäure wurde durch n_{10} -Natronlauge zurücktitriert (Methylorange). Es waren hierfür 42.5 ccm notwendig, entspr. $(60-42.5) \times 1.4 = 24.5$ mg Ammoniakstickstoff.

In dem Destillationsrückstand wurde das Barium quantitativ durch Schwefelsäure entfernt (kein Schwefelsäureüberschuß!). Diese zweite Bariumsulfatfällung wurde, wie die erste, mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Sie wog 0.75 g und enthielt 2.1 mg Stickstoff.

Lösung und Waschwasser haben wir nun auf 250 ccm eingedampft.

Gesamt-N. 0.4 ccm der Lösung verbr. 2.75 ccm n_{10} -HCl. $2.75 \times 0.14 \times 250/0.4 = 240.5$ mg Gesamt-Stickstoff.

Amino-N. 0.8 ccm der Lösung gaben 1.134 ccm N₂ (27°, 760 mm). $1.134 \times 0.5490 \times 250/0.8 = 194.5$ mg Amino-Stickstoff.

100 ccm dieser Lösung (Gesamt-N: 96.2 mg; Amino-N: 77.8 mg) haben wir zur Abtrennung der Hexonbasen elektrodialysiert.

²⁴⁾ A. Bertho-W. Grassmann, Biochem. Praktikum, Berlin und Leipzig 1936, S. 62.

Erste Elektrodialyse.

Zeit (Uhr)	pH (Mitte)	Stromstärke (Ampère)	Kathodische Zelle		Bemerkungen
			Arginin	Histidin	
3.15	6.8	0.2	—	—	
20	6.2	0.2	+	—	
25	5.4	0.2	+	—	
35	4.8	0.2	+	+	
45	4.6	0.2	+	+	
55	4.6	0.17	+	—	← Wasser
4.15	4.6	0.12	+	+	← Wasser
4.45	4.6	0.05	—	+	← Wasser
5.15	4.5	0.05	—	—	

Zweite Elektrodialyse.

Zeit (Uhr)	pH (Mitte)	Stromstärke (Ampère)	Kathodische Zelle		Bemerkungen
			Arginin	Histidin	
9.35	7.4	0.2	—	—	
40	6.8	0.2	+	—	
45	5.8	0.2	+	+	
55	5.5	0.17	+	+	
10.05	5.5	0.17	+	+	← Wasser
20	5.4	0.14	+	—	
35	5.4	0.11	+	+	← Wasser
11.05	5.3	0.05	+	—	← Wasser
11.45	5.3	0.05	—	—	

Die Lösungen K_{II} und L wurden mit Schwefelsäure angesäuert (Kongo) und eingedampft, K_{II} auf 25 ccm, L auf 100 ccm.

 K_{II} (Kathode):

Gesamtstickstoff. 0.5 ccm Lösung verbr. 2.93 ccm n_{100} -HCl. $2.93 \times 0.14 \times 25/0.5 = 20.5$ mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 1.0 ccm Lösung gab 0.981 ccm N_2 (26°, 758 mm).

$0.981 \times 0.5505 \times 25 = 13.5$ mg Aminostickstoff.

Histidin. 10 ccm wurden auf 5 ccm eingedampft. $a = 2$ ccm, $d = 0.5$, $D = 22.3$, $k = 0.653$ entspr. 1262 γ Histidin. $1.262 \times 25/4 = 7.8$ mg Histidin (2.15 mg N).

Arginin. $a = 0.25$ ccm, $d = 0.25$, $D = 27.5$, $k = 0.561$ entspr. 241 γ Arginin, $0.241 \times 25/0.25 = 24.1$ mg Arginin (7.75 mg N).

Stickstoffverteilung nach van Slyke.

$$\begin{array}{rcl}
 A + H + L = 20.5 \text{ mg} & A + L = 18.35 \text{ mg} & 3A + 12L = 153.4 \text{ mg} \\
 \frac{A}{4} + \frac{H}{3} + L = 13.5 \text{ mg} & 3A + 12L = 153.4 \text{ mg} & \frac{3A + 3L}{9L} = 55.05 \text{ mg} \\
 H = 2.15 \text{ mg} & & 9L = 98.4 \text{ mg}
 \end{array}$$

$$L = 10.9 \text{ mg}$$

$$A = 7.5 \text{ mg}$$

$$\text{Lysin } 56.8 \text{ mg}$$

$$\text{Arginin } 23.3 \text{ mg}$$

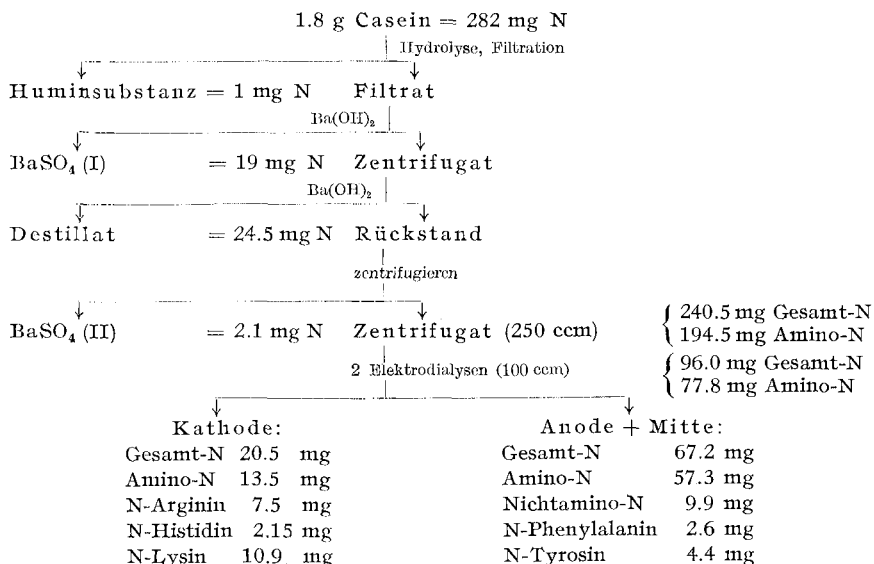
I₁ (Anode und Mitte):

Gesamtstickstoff. 0.6 ccm Lösung verbr. 2.88 ccm n_{100} -HCl. $2.88 \times 0.14 \times 100 / 0.6 = 67.2$ mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 1.2 ccm Lösung gaben 1.247 ccm N₂ (26°, 758 mm). $1.247 \times 0.5505 \times 100 / 1.2 = 57.2$ mg Aminostickstoff.

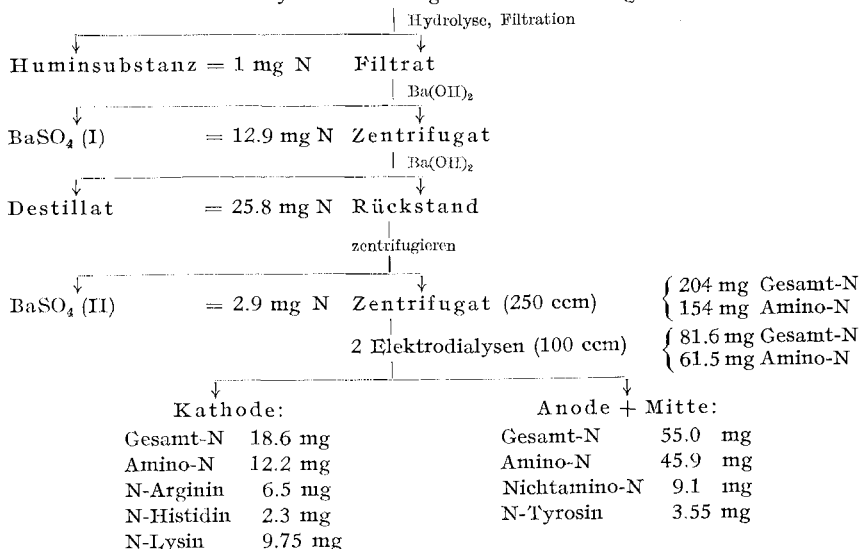
Phenylalanin. a = 9.6 ccm, d = 0.5, D = 34.0, k = 0.469 entspr. 1475 γ Phenylalanin. $1.475 \times 2 \times 100 / 9.6 = 30.7$ mg Phenylalanin (2.6 mg N).

Tyrosin. a = 1.0 ccm, d = 1, D = 45.3, k = 0.345 entspr. 567 γ Tyrosin. $0.567 \times 100 / 1 = 56.7$ mg Tyrosin (4.4 mg N).



Beispiel II.

Analyse von 1.635 g Casein = 0.256 g N.



Aminosäuren im Casein.

	Literatur- werte ²⁵⁾	Hydro- lyse I	Hydro- lyse II	Mittel- werte
	%	%	%	%
Ammoniak	10.5	9.2	11.1	10.2
Kathodischer N	23.9	20.8	21.9	21.4
N-Arginin	7.5	7.6	7.65	7.62
N-Histidin	4.5	2.2	2.7	2.45
N-Lysin	10.3	11.05	11.5	11.3
(Anode + Mitte)-N	65.3	68.2	65.0	66.6
Nichtamino-N	8.9	10.0	10.7	10.35
N-Tyrosin	3.2	4.45	4.2	4.35
N-Phenylalanin	2.7	2.65	—	2.65

Isolierung der Glutaminsäure²⁶⁾.

1.69 g Casein wurden 40 Stdn. mit 35 ccm 20-proz. HCl gekocht. Nach dem Eindampfen wurde das Hydrolysat mit 100 ccm Wasser in ein 250-ccm-Zentrifugenglas gebracht. Man gab 18 ccm konz. HCl und 15 g Phosphorwolframsäure (in 70 ccm Wasser gelöst) zu. Nach 1-stdg. Erhitzen im Wasserbade wurde die Hexonbasenfällung 48 Stdn. in den Eisschrank gestellt. Die Fällung haben wir zentrifugiert, 5-mal mit 20 ccm einer kalten Lösung von 2.5 g Phosphorwolframsäure und 1 g HCl in 100 ccm ausgewaschen, die Mutterlauge und das Waschwasser vereinigt (300 ccm) und die Phosphorwolframsäure, wie üblich, mit einem Gemisch von Amylalkohol-Äther (1:1) entfernt.

Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand mit 40 ccm Wasser in ein 80-ccm-Zentrifugenglas gebracht und die Lösung mit Bariumhydroxyd schwach alkalisch gemacht. Die ausgefallene braune Masse wurde abzentrifugiert und 4-mal mit 10 ccm siedendem Wasser ausgewaschen. Lösung und Waschwasser haben wir vereinigt (80 ccm), mit festem Bariumhydroxyd gesättigt und unter Umrühren in 400 ccm 95-proz. Alkohol gegossen. Nach 2-tägigem Stehenlassen im Eisschrank wurde der ausgefallene weiße Niederschlag zentrifugiert, 5-mal mit 20 ccm 95-proz. Alkohol gewaschen und in 25 ccm Wasser gelöst. Eine kleine Menge unlöslicher Substanz wurde abzentrifugiert und mit 15 ccm heißem Wasser gut ausgewaschen. Nun gab man zur Lösung (40 ccm) vorsichtig und unter kräftigem Umrühren 45 ccm 95-proz. Alkohol. Unter diesen Bedingungen erhielt man eine schöne weiße, fein verteilte Fällung. Nach 12-stdg. Stehenlassen wurde sie zentrifugiert (F_I). Eine nach 24 Stdn. gebildete zweite, geringe Fällung wurde ebenfalls abzentrifugiert (F_{II}).

F_I wurde in 100 ccm Wasser gelöst. Die Bariumionen entfernte man durch Schwefelsäure quantitativ (kein Schwefelsäure-Überschuß). Die Lösung wurde dann mit HCl angesäuert, weitgehend eingedampft und mit sehr wenig Wasser in ein kleines Zentrifugenglas gebracht. Das Gesamtvolumen durfte nicht mehr als 4—5 ccm betragen. Man sättigte die Lösung in der

²⁵⁾ Cawett, Journ. biol. Chem. **95**, 335 [1932].

²⁶⁾ D. B. Jones u. O. Moeller, Journ. biol. Chem. **79**, 429 [1928].

Kälte mit HCl-Gas. Nach Animpfen fielen 234 mg Glutaminsäure-chlorhydrat aus. Die Mutterlauge gab nach Einengen auf 3 ccm und Sättigung mit HCl nur noch 2 mg Glutaminsäure-chlorhydrat.

F_{II} wurde genau so behandelt und lieferte aus 2 ccm gesättigter HCl-Lösung 54 mg Glutaminsäure-chlorhydrat. Im ganzen wurden 290 mg erhalten, als freie Glutaminsäure berechnet: 232 mg oder 13.7% des Caseingewichts.

Die verschiedenen Glutaminsäure-chlorhydrat-Mutterlaugen wurden vereinigt, eingedampft, der Rückstand mit 10 ccm 2-n.HCl mehrere Stdn. gekocht, um die etwa vorhandene Pyrrolidon-carbonsäure zu hydrolysieren, auf 3 ccm eingengt und nochmals mit HCl-Gas gesättigt. So ließen sich noch 5 mg Glutaminsäure-chlorhydrat gewinnen.

Gesamtausbeute: 295 mg Chlorhydrat = 236 mg Glutaminsäure oder 14%.

Die neueren Literaturwerte schwanken zwischen 16 und 21%.

Nach zwei Krystallisationen aus gesättigter HCl-Lösung wurde das Glutaminsäure-chlorhydrat 5 Stdn. im Vak. über Phosphorpentoxyd und Natriumhydroxyd bei 100° getrocknet.

3.484 mg Sbst.: 0.234 ccm N₂ (23°, 756 mm).

C₅H₁₀O₄NCl (183.5). Ber. N 7.63. Gef. N 7.70.

Analyse des Trägers des gelben Fermentes.

Das gelbe Ferment wird zunächst, entweder reversibel durch Dialyse gegen n/200-HCl bei 0° oder irreversibel durch Fällung mit Methanol gespalten. Das ausgefallene Protein soll nicht getrocknet werden, da es dabei hornartig hart wird und nachher sehr schwer zu hydrolysieren ist. Das Protein ist aus diesem Grunde für die folgenden Bestimmungen nicht eingewogen worden. Sämtliche Prozentzahlen sind aus dem Stickstoffgehalt der Hydrolysate berechnet und auf gelbes Ferment, das 16.3% N enthält, umgerechnet.

Zuerst wurden die allgemeinen Proteinreaktionen ausgeführt. Die dazu verwendete Trägerlösung war durch 4-tägige Dialyse von gelbem Ferment gegen n/200-HCl (unter Schütteln) gewonnen, die Salzsäure hierauf durch 3-tägige Dialyse gegen dest. Wasser entfernt worden.

I) Fällungsreaktionen

a) Koagulation durch Hitze (p _H 5.9) +	b) Schwermetallsalz-Fällungen
Hellersche Ringprobe (mit konz. HNO ₃) +	FeCl ₃ (sogar neutralisiert) —
10-proz. Lösung von Trichloressigsäure +	CuSO ₄ sehr wenig
Tanninlösung +	HgSO ₄ +
Phosphorwolframsäurelösung +	Bleiacetat (neutral und basisch) —
Ferrocyankalium + Essigsäure +	ZnSO ₄ sehr wenig
c) Aussalzen, Ammonsulfat (90 % Sättigung)	—

II) Farbreaktionen

Biuret +	Millon + (dunkelrot)
Ninhydrin +	Xanthoprotein + (hellgelb)

Die mit HNO₃ erhaltene Fällung war in verd. NaOH und in Ammoniak mit intensiv brauner Farbe löslich.

Nach der sauren Hydrolyse des Trägers wurde das Drehungsvermögen des Hydrolysats bestimmt. Es zeigte Rechtsdrehung im Gegensatz zur Linksdrehung des Ferments.

$$\alpha_D^{21}: +0.12^\circ, \quad l = 4 \text{ dm}, \quad c = 0.256. \quad [\alpha_D^{21}]: +11.7^\circ \text{ (1.2-proz. HCl).}$$

Das am Casein erprobte Verfahren wurde im Laufe der folgenden Analysen genau befolgt.

Eine Lösung von reinem gelben Ferment wurde mit Methanol gespalten und das Protein 40 Stdn. mit 7 ccm 6-n. H_2SO_4 gekocht.

Ammoniak: 7.0 ccm $n_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ entspr. 9.8 mg N. Gesamtvolumen: 100 ccm.

Gesamtstickstoff: 0.4 ccm der Lösung: 3.97 ccm $n_{100}\text{-HCl}$, $3.97 \times 0.14 \times 100/0.4 = 138$ mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff: 0.8 ccm der Lösung gaben 1.586 ccm N_2 (22° , 756 mm); 0.7 ccm der Lösung gaben 1.483 ccm N_2 (22° , 756 mm).

$$\left. \begin{array}{l} 1.586 \times 0.5605 \times 100/0.8 = 111.1 \text{ mg} \\ 1.387 \times 0.5605 \times 100/0.7 = 111.9 \text{ mg} \end{array} \right\} 111.5 \text{ mg Aminostickstoff}$$

Nach zwei Elektrodialysen von 93 ccm fanden wir in

K_{II} (kathodische Lösungen auf 50 ccm eingengt)

Gesamtstickstoff. 0.5 ccm Lösung: 3.42 ccm $n_{100}\text{-HCl}$. $3.42 \times 0.14 \times 100 = 47.9$ mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 0.8 ccm Lösung gaben 0.833 ccm N_2 (22° , 752 mm). $0.833 \times 0.5575 \times 50/0.8 = 29.0$ mg Aminostickstoff.

Arginin. $a = 0.2$ ccm, $d = 0.25$, $D = 27.1$, $k = 0.568$ entspr. 246 γ Arginin. $0.246 \times 50/0.2 = 61.5$ mg Arginin (19.8 mg N).

Histidin. 10 ccm sind auf 5 ccm eingedampft worden. $a = 2.0$ ccm, $d = 0.5$, $D = 13.2$, $k = 0.880$ entspr. 1520 γ Histidin. $1.520 \times 50/4 = 19.0$ mg Histidin (5.16 mg N).

Stickstoffverteilung nach van Slyke.

$$\begin{array}{ll} \text{A} + \text{H} + \text{L} = 47.9 \text{ mg} & \text{A} + \text{L} = 42.7 \text{ mg} \\ \text{A} + \frac{\text{H}}{4} + \frac{\text{L}}{3} = 29.0 \text{ mg} & 3\text{A} + 12\text{L} = 327.2 \text{ mg} \\ \text{H} = 5.2 \text{ mg} & \\ 3\text{A} + 12\text{L} = 327.2 \text{ mg} & \text{L} = 22.1 \text{ mg} \\ 3\text{A} + 3\text{L} = 128.1 \text{ mg} & \text{A} = 20.6 \text{ mg} \\ \hline 9\text{L} = 199.1 \text{ mg} & \end{array}$$

L (Anode und Mitte auf 100 ccm eingengt):

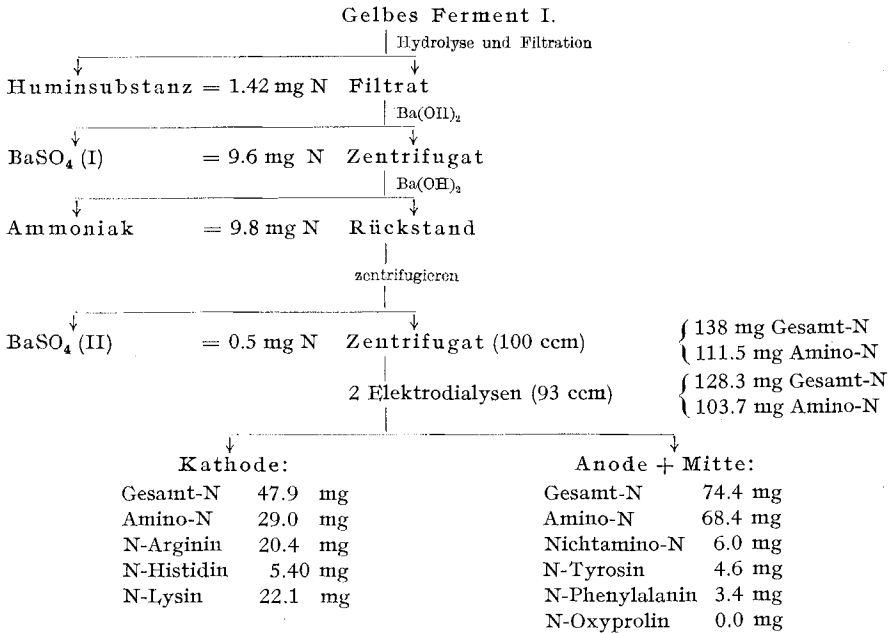
Gesamtstickstoff. 0.8 ccm der Lösung: 4.25 ccm $n_{100}\text{-HCl}$. $4.25 \times 0.14 \times 100/0.8 = 74.4$ mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 0.69 ccm: 0.845 ccm N_2 (22° , 752 mm). $0.845 \times 0.5575 \times 100/0.69 = 68.4$ mg Aminostickstoff.

Für die folgenden Bestimmungen wurden 93 ccm der Lösung auf 25 ccm eingengt.

Tyrosin. $a = 0.3$ ccm, $d = 1$, $D = 37.4$, $k = 0.427$ entspr. 670 γ Tyrosin. $0.670 \times 25 \times 100/0.3 \times 93 = 60.0$ mg Tyrosin (4.65 mg N).

Phenylalanin. $a = 1.5$ ccm, $d = 1$, $D = 21.0$, $k = 0.678$ entspr. 2217 γ Phenylalanin, $2.217 \times 25 \times 100/1.5 \times 93 = 39.8$ mg Phenylalanin (3.4 mg N).



Hydrolyse II.

Nach reversibler Spaltung des reinen gelben Ferments wurde der Träger mit 5 ccm 5.67-n. H₂SO₄ 40 Stdn. hydrolysiert.

Ammoniak. 2.75 ccm n/10-H₂SO₄ entspr. 3.85 mg N. Gesamtvolumen 100 ccm.

Gesamtstickstoff. 0.55 ccm der Lösung: 2.15 ccm n/100-HCl. 2.15 × 0.14 × 100/0.55 = 54.7 mg Gesamtstickstoff.

Aminostickstoff. 1.0 ccm gaben 0.766 ccm N₂ (24°, 756 mm). 0.766 × 0.5542 × 100/1 = 42.4 mg Aminostickstoff.

Nach zwei Elektrodialysen von 92 ccm:

K_{II} (kathodische Flüssigkeiten auf 50 ccm eingengt):

Gesamtstickstoff. 0.7 ccm der Lösung: 1.88 ccm n/100-HCl. 1.88 × 0.14 × 50/0.7 = 18.8 mg Gesamt-N.

Aminostickstoff. 1.2 ccm gaben 0.475 ccm N₂ (24°, 755 mm), 1.1 ccm gaben 0.420 ccm N₂ (24°, 755 mm).

0.475 × 0.5542 × 50/1.2 = 10.9 mg	}	10.75 mg Amino-N
0.420 × 0.5542 × 50/1.1 = 10.6 mg		

Arginin. a = 0.4 ccm, d = 0.25, D = 29.3, k = 0.533 entspr. 222 γ Arginin. 0.222 × 50/0.4 = 27.8 mg Arginin (8.93 mg N).

Histidin. 20 ccm K_{II} sind auf 5 ccm eingengt worden. a = 2 ccm, d = 0.5, D = 14.5, k = 0.839 entspr. 1474 γ Histidin. 1.474 × 50/8 = 9.25 mg Histidin (2.58 mg N).

Stickstoffverteilung nach van Slyke.

A + H + L = 18.8 mg	A + L = 16.22 mg
A + H	3A + 12L = 118.7 mg
4 + 3 + L = 10.75 mg	
H = 2.58 mg	
3A + 12L = 118.7 mg	L = 7.8 mg
3A + 3L = 48.7 mg	A = 8.4 mg

I, (Anode und Mitte), 50 ccm Gesamtvolumen.

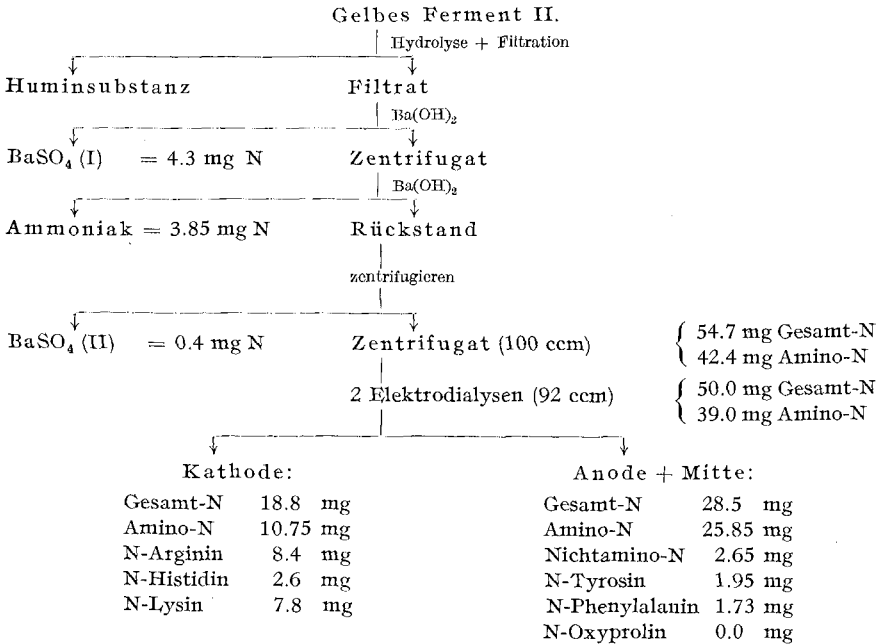
Gesamtstickstoff. 0.6 ccm der Lösung: $2.44 \text{ ccm } n_{100}\text{-HCl}$. $2.44 \times 0.14 \times 50/0.6 = 28.5 \text{ mg Gesamt-N}$.

Aminostickstoff. 1.0 ccm gaben $0.932 \text{ ccm } N_2$ (24° , 755 mm). $0.932 \times 0.5542 \times 50 = 25.8 \text{ mg Amino-N}$.

Tyrosin. $a = 1.6$, $d = 1$, $D = 27.1$, $k = 0.566$ entspr. 807γ Tyrosin, $0.807 \times 50/1.6 = 25.2 \text{ mg Tyrosin}$ (1.95 mg N).

Phenylalanin. $a = 6 \text{ ccm}$, $d = 1$, $D = 18.1$, $k = 0.742$ entspr. 2455γ Phenylalanin. $2455 \times 50/6 = 20.5 \text{ mg Phenylalanin}$ (1.73 mg N).

Oxyprolin. Nach Destillation von 3 ccm von I, mit Hypochlorit war in der Vorlage kein Pyrrol nachzuweisen.



Bestimmung des Tryptophans.

0.32 g Träger (aus dem Stickstoffgehalt des Hydrolysats berechnet) wurden in 6 ccm 20-proz. Kalilauge gelöst (1 Stde. auf dem Wasserbade erhitzt). Die klare Flüssigkeit wurde auf 10 ccm gebracht und das Tryptophan durch die Voisenet-Reaktion bestimmt.

$a = 0.6 \text{ ccm}$, $d = 0.5$, $D = 41.9$, $k = 0.378$ entspr. 933γ Tryptophan.
 $0.933 \times 10/0.6 = 15.55 \text{ mg Tryptophan}$ (2.14 mg N).

Bestimmung des Cystins.

0.32 g Träger wurden mit 4 ccm 6-n. H₂SO₄ 18 Stdn. gekocht. Das Hydrolysat wurde auf 20 ccm gebracht und 5 Min. mit 0.2 g Kaolin geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren lag eine vollkommen klare und farblose Lösung vor. 16 ccm dieser Lösung wurden auf 3 ccm eingengt und das Cystin nach Folin und Marenzi bestimmt.

a = 1.0 ccm, d = 1, D = 31.2, a = 0.8 ccm, d = 1, D = 48.2,
 k = 0.506 entspr. 421 γ Cystin. k = 0.316 entspr. 320 γ Cystin.
 0.421 \times 3 \times 20/16 = 1.575 mg Cystin. 0.316 \times 3 \times 20/0.8 \times 16 = 1.500 mg Cystin.
 Mittelwert: 1.537 mg.

Isolierung der Glutaminsäure.

1.28 g Träger wurden mit 30 ccm 20-proz. HCl 40 Stdn. gekocht. Die Isolierung der Glutaminsäure erfolgte in genau derselben Weise wie beim Casein.

Nach der zweiten Alkoholfällung der Dicarbonsäure-bariumsalze wurden diese in einem bestimmten Volumen Wasser gelöst und der Stickstoffgehalt der Lösung nach Kjeldahl bestimmt. Wir fanden 34.2 mg N oder 16.4% des Gesamtstickstoffs. Dieser Wert ist als die maximale Stickstoffmenge, die zu Dicarbonsäuren gehören kann, zu betrachten.

Die Fällung F_I gibt 83 mg Glutaminsäure-chlorhydrat

Die Fällung F_{II} gibt 31 mg Glutaminsäure-chlorhydrat

Im ganzen 114 mg. Als freie Glutaminsäure berechnet 91 mg oder 7.1%.

Ergebnis.

Einen grundsätzlichen Unterschied gegenüber bekannten Proteinen lassen die im gelben Ferment bisher nachgewiesenen Aminosäuren weder nach Art noch nach Menge erkennen. Die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Zahlen gelten mit dem für alle colorimetrischen Bestimmungen erforderlichen Vorbehalte. Nur die Glutaminsäure ist als krystallisiertes Chlorhydrat in Substanz isoliert worden. Der Schwefelgehalt des Ferments (0.48%) wird nur zu 1/5 durch die nachgewiesene Cystinmenge gedeckt, so daß man mit der Anwesenheit weiterer S-haltiger Aminosäuren zu rechnen hat.

Aminosäuren im gelben Ferment.

	Hydrolyse I		Hydrolyse II		Mittelwert	
	% N	%Gew.	% N	% Gew.	% N	% Gew.
Humin	0.92	—	—	—	0.92	—
Ammoniak	6.55	—	6.6	—	6.6	—
Kathodischer N ...	36.6	—	37.0	—	36.8	—
Arginin	15.1	7.65	17.5	8.85	16.3	8.25
**	15.6	7.9	16.5	8.35	16.05	8.1
Histidin	4.15	2.5	5.1	3.05	4.7	2.75
Lysin	16.9	14.4	15.4	13.1	16.1	13.7
Amino-N.....	22.1	—	21.2	—	21.7	—
(Anode + Mitte)-N.	56.7	—	56.1	—	56.4	—
Nichtamino-N	4.6	—	5.2	—	4.9	—
(Prolin + Oxyprolin)						
Amino-N.....	52.1	—	51.0	—	51.5	—
Oxyprolin.....	~0.0	~0.0	~0.0	~0.0	~0.0	~0.0
Tyrosin	3.5	7.4	3.85	8.05	3.7	7.75
Phenylalanin	2.6	5.0	3.4	6.55	3.0	5.75
Tryptophan	4.08	4.86	—	—	4.08	4.86
Cystin	0.48	0.34	—	—	0.48	0.34
Dicarbonsäure-N.....	16.4	—	—	—	16.4	—
Glutaminsäure.....	4.1	7.1	—	—	4.1	7.1

* colorimetrisch bestimmt.

** aus der Stickstoff-Verteilung nach D. D. van Slyke berechnet.

Insgesamt sind 65% des gesamten Stickstoffs erfaßt worden. Von besonderem Interesse sind die Hexonbasen, da die Lactoflavin-5'-phosphorsäure nach R. Kuhn und P. Boulanger²⁷⁾ an mindestens 2 Stellen von basischen Gruppen der Eiweißkomponente gebunden wird: am Phosphorsäure-Rest und an der NH-Gruppe in 3-Stellung. Die Summe von Histidin, Arginin und Lysin (24.7%) ist derjenigen im bestbekanntesten Chromoprotein, dem Hämoglobin, sehr ähnlich (20.7%). Aber die Verteilung dieser 3 Aminosäuren ist eine stark verschiedene. Die Eiweißkomponente des gelben Ferments ist arm an Histidin (2.8%) und reich an Lysin (13.7%), während das Globin einen hohen Gehalt an Histidin (11.0%) und einen geringen an Lysin (4.3%) aufweist.

Der Rockefeller-Foundation sprechen wir für die Gewährung eines Stipendiums unseren besten Dank aus.

332. Alexander Spassow: Darstellung von Estern aus Alkoholen und Säurechloriden in Gegenwart von Magnesium. Über die Veresterung tertiärer Alkohole.

[Aus d. Organ.-chem. Laborat. d. Universität Sofia.]

(Eingegangen am 5. August 1937.)

Die älteren Verfahren zur Veresterung von Alkoholen mit Hilfe der Säurechloride oder Säureanhydride sind trotz vielfach variiertener Ausführung nicht immer allgemein anwendbar oder präparativ geeignet. Daher ist man manchmal gezwungen, nach neueren Methoden zu suchen, die eine präparativ bequemere Darstellung der Ester erlauben. Dies gilt insbesondere für empfindlichere oder tertiäre Alkohole, deren Ester meistens ziemlich schwer zu erhalten sind.

Bei einem Versuch¹⁾ zur direkten Darstellung von Acyl-Abkömmlingen des Acetessigesters der allgemeinen Form $\begin{matrix} \text{CH}_3 \cdot \text{CO} \\ \text{R} \cdot \text{CO} \end{matrix} > \text{CH} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_5$ konnte ich feststellen, daß sich Acetylchlorid mit Acetessigester leicht umsetzt, wenn metallisches Magnesium hinzugefügt wird. Wahrscheinlich reagiert hier der Acetessigester in der Enolform.

Davon ausgehend, übertrug ich die Reaktion auf andere hydroxylhaltige Verbindungen, wie Alkohole und Phenole. Die Versuche haben gezeigt, daß sich diese unter solchen Bedingungen sehr leicht umsetzen lassen. Die im folgenden beschriebene Methode zur Veresterung von Alkoholen mit Säurechloriden in Gegenwart von Magnesium erlaubt eine leichte und bequeme Darstellung von Estern einwertiger primärer und sekundärer Alkohole. Die erzielten Ausbeuten sind gewöhnlich sehr hohe, bisweilen nahezu quantitative. Auch recht schwer esterifizierbare Alkohole, wie die tertiären Alkohole, lassen sich auf diese Weise leicht verestern. Die Reaktion, die in ätherischer Lösung ausgeführt wird, ist gewöhnlich sehr lebhaft und verläuft unter Ent-

²⁷⁾ B. **69**, 1557 [1936]; R. Kuhn u. H. Rudy, B. **69**, 2557 [1936].

¹⁾ Die Ergebnisse werden demnächst veröffentlicht.