

Über die Hydrolyse des Eiereiweißes mit Natronlauge

von

Zd. H. Skraup und F. Hummelberger.

Aus dem II. chemischen Laboratorium der k. k. Universität in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 22. Oktober 1908.)

C. Paal¹ hat durch Einwirkung von Natronlauge auf Ei-albumin Stoffe dargestellt, welche er Protalbinsäure und Lysalbinsäure nannte. Paal hat diese zwei von ihm dargestellten Stoffe mannigfach zur Kolloidierung von Metallen benutzt, sie aber sonst nicht näher studiert. Wir haben sie näher untersucht, vor allem in der Absicht, um ihre Zusammensetzung aus den verschiedenen Aminverbindungen festzustellen.

Es hat sich vorerst herausgestellt, daß die Lysalbinsäure auch in dem rohen Sinne, in welchem man bei Eiweißstoffen von bestimmten Substanzen meist nur reden kann, nicht einheitlich, sondern ein Gemenge ist eines durch Ammonsulfat fällbaren und eines nicht fällbaren Stoffes, die man also als Albumose und Pepton auffassen kann. Um in die Literatur nicht neue Namen einzuschleppen, wird aber nicht nur der Name Protalbinsäure, sondern für die erwähnte Alkali-Albumose auch der Name Lysalbinsäure beibehalten und das Pepton als Lysalbin-Pepton benannt.

Da Stoffe von ähnlichem Charakter auch aus anderen Proteinen entstehen, wollen wir sie in der Folge als Ei-Protalbinsäure, Kasein-Lysalbinsäure etc. auseinanderhalten.²

¹ Berl. Ber., 35, 2, 2195 (1902).

² Nach verschiedenen Patentbeschreibungen der Firma Kalle & Komp. entstehen Protalbin- und Lysalbinsäuren auch aus andern Proteinen. Im hiesigen Institut werden verschiedene dieser Stoffe gegenwärtig untersucht.

Was die Entstehung der drei Stoffe aus dem Eialbumin anbelangt, haben wir festgestellt, daß die Lysalbinsäure und das Lysalbinpepton oder richtiger gesagt die Hauptmengen von ihnen neben der Protalbinsäure aus dem Eiweiß entstehen. Bei Einwirkung von Natronlauge auf Protalbinsäure entstehen zwar auch Stoffe vom Charakter der Albumosen und Peptone, aber doch in viel geringerer Menge. So haben wir unter sonst gleichen Bedingungen erhalten aus:

	Protalbinsäure	Lysalbinsäure	Lysalbinpepton
Eiweiß	20%	31%	37%
Protalbinsäure ..	62	20	12

Die Lysalbinsäure gibt unter denselben Verhältnissen mit Natronlauge behandelt, unter welchen sie entsteht, wieder Ammoniak und Schwefelwasserstoff, beim Ansäuern aber nur sehr geringe Mengen eines schwer löslichen Stoffes, von dem es zweifelhaft ist, ob er Protalbinsäure ist.

Infolgedessen ist die Annahme gerechtfertigt, daß bei der Behandlung des Eiweißes mit Natronlauge ein Teil des Moleküls in die Protalbinsäure, ein anderer in Lysalbinsäure und Pepton übergeht.

Da die Protalbinsäure zum Unterschied von den zwei anderen Produkten in Wasser und verdünnten Säuren sehr schwer löslich ist, kann man annehmen, daß sie durch die von uns eingeschlagenen Trennungsmethoden von jenen frei erhalten wurde. Da das Pepton auch in konzentriertem Ammonsulfat löslich ist, die Lysalbinsäure dagegen schon bei ungefähr Halbsättigung ausfällt, kann man weiter annehmen, daß das Pepton von der Lysalbinsäure befreit wurde und, da es schwer dialysiert, auch von den einfachen Aminoprodukten, die bei der Hydrolyse nebenher entstehen.

Die Lysalbinsäure, die in ihren Eigenschaften zwischen Protalbinsäure und Pepton steht, bietet am wenigsten Garantie, es ist nicht ausgeschlossen, daß sie von beiden anderen Stoffen erhebliche Anteile enthält.

Die Beziehungen zwischen den drei beschriebenen Stoffen untereinander und zum Eiweiß wurden durch quantitative

Ermittlung der Produkte der Hydrolyse festgestellt und zeigen sich auch in Unterschieden der üblichen Farbenreaktionen.

Folgende Tabelle enthält die abgerundeten Zahlen der Analysen, wir haben vergleichsweise die Zahlen für das Eiereiweiß, die wir selber nochmals ermittelt haben, mit aufgenommen.

In 100 Teilen:

	Eiweiß	Protalbins.	Lysalbins.	Pepton
Histidin	1·5	2·3	0·3	0·6
Arginin	2·9	0·4	0·2	0·3
Lysin	3·9	3·3	5·3	4·0
Tyrosin	2·4	3·4	2·6	1·1
Phenylalanin	5·8	12·0	5·2	2·4
Prolin	1·5	2·0	1·0	0·3
Aminosäuren	7·9	14·7	7·0	3·2
Glutaminsäure	3·2	1·8	1·0	1·6

Was die Hexonbasen anbelangt, bestehen keine sehr wesentlichen Unterschiede. Die Differenzen beim Lysin (Maximum bei der Lysalbinsäure) könnten immerhin von Versuchsfehlern herrühren. Auch der auffälligen Veränderung des Arginins in allen drei Spaltungsprodukten kann ein besonderes Gewicht nicht geschenkt werden, da ja die Angaben über den Arginingehalt des Eiweißes selber sehr abweichend sind. Dagegen ist wohl anzunehmen, daß der relativ hohe Histidinhalt der Protalbinsäure ihr wirklich zukommt.

Als sicher sind aber die Differenzen bei den anderen Spaltungsprodukten anzunehmen, und zwar nicht bloß wegen der Abweichungen im einzelnen, sondern auch, weil diese stets in denselben Abstufungen von der Protalbinsäure über die Lysalbinsäure zum Pepton verlaufen.

Tyrosin, Phenylalanin, also die aromatischen Spaltungsprodukte, sind in der Protalbinsäure in größerer Menge vorhanden als im Eiweiß, die Mengen sinken bei der Lysalbinsäure (die überhaupt ungefähr dieselbe Zusammensetzung hat wie das Eiweiß) und sind im Pepton viel kleiner als im Eiweiß.

Ganz dasselbe gilt aber auch vom Prolin (Rohgewicht) und von den Aminosäuren (Leucin, Vallin und Alanin). Bei der Glutaminsäure findet sich dagegen beim Übergang von Eiweiß

in Protalbinsäure eine starke Verminderung, ganz so wie wir es beim Übergang von Gelatine in die leichtest aussalzbare, also relativ schwer lösliche Gelatose gefunden haben. Und wenn man einen Vergleich zwischen Glykokoll für sich, das wir bei den Gelatosen allein bestimmt haben, und der Gesamtsumme der Aminosäuren, die wir in dieser Arbeit bei den Ovalbuminabkömmlingen ermittelt haben, ziehen darf, so findet sich die Übereinstimmung, daß beide in um so größerer Menge vorhanden sind, je schwerer löslich die Proteinabkömmlinge sind.

Beim Übergang von Eiweiß in die Protalbinsäure nimmt der Prozentgehalt an Tyrosin, Phenylalanin, Aminosäuren und Prolin zu; vielleicht auch der Tryptophangehalt, wie im experimentellen Teile noch erwähnt wird.

Diese Zunahme erfordert den Austritt anderer Bestandteile. Andererseits erfordert die Abnahme der eben erwähnten Aminoverbindungen in der Albumose und im Pepton eine Zunahme anderer Bestandteile.

Diese konnten in Substanz allerdings nicht gefaßt werden, über sie geben aber die typischen Farbenreaktionen einigen Aufschluß.

Sowohl die Naphthol- als auch die Thymolreaktion, die für den sogenannten Kohlenhydratrest charakteristisch ist, tritt bei der Protalbinsäure nicht ein, beziehlich statt der intensiven violetten oder purpurroten Färbung sieht man nur sehr schwache bräunliche oder gelbe Färbungen.

Lysalbinsäure und das Pepton gaben sie aber in deutlich verstärkterem Grade als das Eiweiß selbst und das Pepton am intensivsten.

Daraus ist mit großer Wahrscheinlichkeit der Schluß zu ziehen, daß in der Protalbinsäure der Kohlenhydratrest gar nicht mehr, dafür in der Lysalbinsäure und noch mehr im Pepton in größerer Menge vorhanden ist als im Eiweiß.

Hieraus kann man wieder folgern. Der gegen Natronlauge resistenter Teil des Eiweißmoleküls, der in die Protalbinsäure übergeht, enthält relativ viel mehr aromatische Anteile, er enthält dagegen den sogenannten Kohlenhydratrest nicht. Dieser geht in die neben der Protalbinsäure entstehende

Albumose und das Pepton über und ist in diesen angereichert; es läßt sich daher weiter annehmen, daß der Kohlenhydratrest im wesentlichen wenigstens, nicht zu jenen einfachen Spaltungsprodukten gehört, die schon beim ersten Angriff auf das Eiweißmolekül als solche oder in Form relativ einfacher Peptide abgespalten werden. Es sei bemerkt, daß im hiesigen Institut Versuche im Gange sind, diese Verhältnisse genauer als bisher festzustellen.

Über die Protalbin- und Lysalbinsäure sowie das Lysalbinpepton sei noch folgendes hervorgehoben. Wenn die drei Stoffe unter denselben Verhältnissen mit Permanganat oxydiert werden, unter welchen Maly¹ aus Eiweiß die Oxyprotsäure erhalten hat, entsteht ein dieser ähnlicher Stoff nur aus der Protalbinsäure. Die Ansicht Maly's, daß die Oxyprotsäure lediglich durch Sauerstoffzufuhr ohne weitere Spaltung des Eiweißes entsteht, ist bekanntlich später widerlegt und die Oxyprotsäure auch als Gemenge erkannt worden.

Die eben erwähnten Tatsachen machen es nun sehr wahrscheinlich, daß die Oxyprotsäure aus jenem resistenteren Teil des Eiweißes entsteht, der die Protalbinsäure liefert, ja es lassen sich noch viel nähere Beziehungen zwischen Protalbinsäure und Oxyprotsäure vermuten und auch darüber werden im hiesigen Institut Versuche angestellt.

Was den Schwefelgehalt in Protalbinsäure- etc. betrifft, sei die Bemerkung zugefügt, daß die landläufige Reaktion auf leicht abspaltbaren Schwefel bei Proteinen weniger sicher ist als wohl allgemein angenommen wird. Sowohl Protalbinsäure als Lysalbin und Pepton werden mit alkalischer Bleilösung nicht verändert. Trotzdem müssen sie Sulfid-schwefel enthalten, da beispielsweise das Lysalbin, längere Zeit mit Natronlauge erwärmt, nach dem Ansäuern sehr deutlich Schwefelwasserstoff entwickelt.

Schließlich muß noch ein bemerkenswerter Widerspruch hervorgehoben werden, welcher zwischen den von uns beobachteten Tatsachen und Beobachtungen besteht, die E. Abderhalden und seine Schüler gemacht haben.

¹ Monatshefte für Chemie, 6, 107 (1885).

Sie haben beim Edestin und Kasein gefunden,¹ daß diese bei der Einwirkung von aktiviertem Pankreassaft sehr rasch das Tyrosin vollständig abspalten, während die Glutaminsäure langsamer und nur zu etwa zwei Dritteln frei austritt. Nach unseren Versuchen ist das Verhältnis umgekehrt. Natronlauge spaltet aus Eiereiweiß rascher Glutaminsäure als Tyrosin ab.

Was das Phenylalanin und Prolin betrifft, kamen wir zu ähnlichen Beobachtungen wie Abderhalden, beim Tryptophan wieder zu entgegengesetzten.

Obzwar bisher so ganz prinzipielle Unterschiede zwischen der hydrolytischen Zerlegung der Eiweißstoffe durch rein chemische Katalysatoren und durch enzymatische nicht beobachtet wurden, könnte die Differenz immerhin daher rühren, daß wir Natronlauge angewendet haben, Abderhalden aber Pankreassaft. Es wäre aber auch nicht ausgeschlossen, daß die Differenzen daher kommen, daß wir Eialbumin untersucht haben, Abderhalden dagegen andere Proteine. Wäre das die Ursache, dann wäre der Unterschied sehr bemerkenswert.

Von Elementaranalysen der Protalbinsäure etc. sind wir vorläufig abgestanden. Sie werden nachträglich mit Präparaten aus kristallisiertem Ovalbumin ausgeführt werden.

Experimenteller Teil.

C. Paal² hat die Hydrolyse des Eiereiweißes durch Erhitzen von 100 Teilen desselben mit 500 Teilen Wasser und 15 Teilen Ätznatron durch ungefähr eine Stunde vorgenommen. Die von ihm erwähnten Begleiterscheinungen haben wir durchwegs bestätigt gesehen, aber gefunden, daß bei längerem Erhitzen und bei größerer Konzentration der Lauge die Menge an Protalbinsäure abnimmt.

Bei einer Konzentration von 3% NaOH wog die Fällung durch Schwefelsäure (am Wasserbad getrocknet) nach ein- bis fünfständigem Erhitzen 4, 4, 3·5, 3 und 3 g.

¹ Zeitschrift für phys. Chemie, 44, 284 (1905); 46, 159 (1905), und 53, 315 (1907).

² Berl. Ber., 35 (2), 2197 (1902).

Bei einer Konzentration von 6⁰/₀ war das Gewicht der Fällungen 4, 2·5, 2, 1·5 und 1·5 g.

Da es nicht unmöglich ist, daß bei kürzerer Einwirkung der ausfallenden Protalbinsäure noch unverändertes Eiweiß beigemischt ist, haben wir 3 Stunden und auch mit konzentrierterer (6⁰/₀) Lauge erwärmt. Die Ausfällung der Protalbinsäure haben wir, wie schon erwähnt, nicht wie Paal mit Essigsäure, sondern mit Schwefelsäure vorgenommen.

Die Darstellung geschah wie folgt.

Käufliches Eialbumin (Präparat von Zimmer in Frankfurt, Pharmak. Germ. IV) wird mit der fünffachen Menge Wasser übergossen und festes Ätznatron in der berechneten Menge eingetragen. Zunächst tritt teilweise Lösung, dann Gallertbildung ein; beim Erhitzen am Wasserbad erfolgt aber, wenn öfter geschüttelt wird, schon nach etwa einer halben Stunde vollständige Lösung. Starker Ammoniakgeruch ist schon wahrzunehmen, wenn die Flüssigkeit warm geworden ist, er hält bis zum Schlusse der Hydrolyse an, welche 3 Stunden andauerte.

Da 6⁰/₀ Lauge schwer zu filtrieren ist, wurden die suspendierten Flocken (nach Vankel größtenteils anorganischer Natur) nicht entfernt und ohneweiters in geräumigen Schalen und noch in der Wärme die zur Neutralisation berechnete Menge 33⁰/₀ Schwefelsäure zugefügt. Dabei tritt starker Schwefelwasserstoffgeruch auf, die Flüssigkeit scheidet aber noch nichts ab; erst wenn über die saure Reaktion hinaus verdünnte Schwefelsäure (25prozentig) zugesetzt wird, erfolgt Fällung. Es wurde Säure zugefügt, so lange die Abscheidung sich vermehrte, die, falls die Flüssigkeit heiß genug ist, sich in zähen Klumpen zusammenballt, die durch Rühren leicht vereinigt werden können. Nach dem Erkalten ist die Fällung hart und zerreiblich. Die überstehende Lösung kann unschwer durch Abgießen entfernt werden.

Die auf Leinwand scharf abgesaugte Fällung wiegt feucht regelmäßig etwas über 50⁰/₀ des Ausgangsmaterials.

Die Fällung wurde in ungefähr das halbe Gewicht kochendes Wasser eingetragen und das wieder weich gewordene Harz gut durchgeknetet. Nach dem Erkalten kam die wässrige Schicht zu der erst abgegossenen Lösung. Diese

wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, auf ein Volum eingedampft, welches ungefähr dem dreifachen Gewicht des Ausgangsmaterials entspricht, und eben so viel festes Ammonsulfat unter gutem Umrühren heiß eingetragen als das Ausgangsmaterial wiegt.

Dabei fällt ein harziger Niederschlag aus, der sich beim Rühren sehr leicht vereinigt, so daß schon in der Hitze abgegossen werden kann: Wenn kein Ammonsulfat ungelöst geblieben, wiegt die feuchte Fällung nicht viel mehr als das Ausgangsmaterial. Sie wird im $1\frac{1}{2}$ -fachen Gewicht Wasser heiß gelöst und das ihr gleiche Gewicht Ammonsulfat eingetragen. Nach dem Erkalten wird abgegossen und unter denselben Verhältnissen wieder gelöst und gefällt. Bei der zweiten Fällung vermindert sich das Gewicht auf etwa zwei Drittel des früheren, bei der dritten Fällung tritt eine Gewichtsverminderung von kaum 1% ein.

Von den Lösungen, die bei der Fällung mit Ammonsulfat abgegossen worden waren, wurden bloß die von der ersten und zweiten Fällung verarbeitet, da bei der dritten eine Gewichtsänderung kaum eingetreten war. Sie wurden zunächst durch successives Eindampfen von der Hauptmenge des Sulfats befreit. Hierbei scheidet sich meist schon vor dem Auskrystallisieren des Sulfats und besonders bei der Flüssigkeit von der zweiten Fällung ein weiches, braunes Harz ab, welches durch Abschöpfen, eventuell Abgießen entfernt wird. Es wiegt dann 1% des Ausgangsmaterials und ist vermutlich identisch mit der Albumose der Sulfatfällung. Die von dieser Abscheidung und vom abgeschiedenen Sulfat befreite dicke Lauge wird sodann mit etwas mehr als dem gleichen Volum Alkohol versetzt, dem etwa 5% des Volums Ammoniak zugefügt ist. Der letztere Zusatz ist notwendig, da sonst viel organische Substanz mit dem Sulfat ausfällt.

Das alkoholische Filtrat wurde abermals eingedampft und wie beschrieben behandelt, so lange nennenswerte Mengen von Sulfat abzuscheiden waren.

Durch Verdampfen eines gemessenen Anteiles stellte sich heraus, daß in der ersten Sulfatlösung 179, in der zweiten 65 g Trockensubstanz enthalten war.

Aus 635 g Eialbumin (käuflich) entstanden an Trockensubstanz

Säurefällung . . .	300 g,
Albumose	364 g,
Pepton	244 g,

welch letztere zwei natürlich noch mit Sulfat stark verunreinigt sind.

Säurefällung, Protalbinsäure.

Beim Durchkneten der Rohfällung mit heißem Wasser geht viel Schwefelsäure in Lösung. Diese haftet hartnäckig an; bei mehrmaligem Umschmelzen unter Wasser nahm die Reaktion zwar ab, blieb aber noch immer ziemlich stark. Da die rohe, feuchte Fällung in wenig Alkohol sich löst und nach Zusatz von Wasser wieder ausfällt, haben wir dieses Verhalten zur Reinigung benutzt, wegen der großen Verluste, die dabei auftreten, es aber aufgeben müssen. Ähnliches trat bei Versuchen auf, die in Ammoniak gelöste Protalbinsäure mit Essig- oder Salzsäure auszufällen. Es wurde deshalb zur Reinigung die Dialyse herangezogen, die schon Paal benutzt hat. Anstatt wie er es aber tat, die pulverige, freie Säure in den Dialysator zu bringen, haben wir die aus Alkohol mit Wasser ausgefällte Substanz mit der eben nötigen Menge Ammoniak in etwa fünfprozentige Lösung gebracht. Ein kleiner Teil der rohen Verbindung löst sich nicht. Da Filtrieren in halbwegs größeren Mengen undurchführbar blieb, wurde die (mit Toluol versetzte) Flüssigkeit durch 16 Tage langes Stehen geklärt und sodann abgehebert.

Die Dialyse dauerte 8 Tage. Die anfänglich sehr deutliche Barytfällung wurde immer geringer, am letzten Tage war Schwefelsäure mit Sicherheit nicht mehr vorfindbar.

Von den Dialysaten wurden aliquote Mengen eingedunstet. Auf die Gesamtmenge berechnet, dialysierten in den aufeinanderfolgenden Tagen: 6·5, 5·1, 3·2, 2·5, 2·0, 1·8, 1·6 g.

Der Inhalt der Dialysierschläuche wurde bei gewöhnlichem Drucke nun eingedampft. Die Konzentration im Vakuum war wegen des außerordentlich heftigen Schäumens unmöglich.

Dabei schieden sich Häute ab, die auf Zusatz von wenig Ammoniak in Lösung gingen. Die zur Trockne gebrachte Masse enthielt 84 g Trockensubstanz. Sie war in Wasser teilweise löslich; die löslichen Anteile, immer wieder eingedampft, wurden endlich vollständig unlöslich, offenbar durch Dissoziation des Ammonsalzes. Alle unlöslich gewordenen Fraktionen lösten sich in sehr verdünnten Alkalien mit Leichtigkeit wieder auf. Nach längerem Liegen des trockenen Präparats werden aber kleine Anteile wieder unlöslich.

Die Protalbinsäure ist in absolutem Alkohol sehr schwer löslich; mit wenig 50% Alkohol erwärmt, bildet sie eine gleichmäßige Gallerte. Sie löst sich leicht in heißem Eisessig und auch in 50% Essigsäure, sehr schwer in verdünnter Mineralsäure auch in der Hitze, und löst sich in warmer Sodalösung. Die Farbenreaktionen werden mit denen der Lysalbinsäure und des Peptons am Schlusse des experimentellen Teiles angegeben. Daß sie keine Kohlenhydratreaktion gibt, ist schon erwähnt worden.

Ei-Lysalbinsäure.

Die durch dreimaliges Aussalzen mit Ammonsulfat von der Hauptmenge der Beimischungen befreite Fällung (364 g) wurde zur Abscheidung des anhaftenden Ammonsulfats gleichfalls, und zwar in 10% Lösung dialysiert. Die Außenflüssigkeit betrug in einem Apparat das gleiche, in einem zweiten, kleineren, das doppelte Volum der Innenflüssigkeit. Das Volum der letzteren stieg bis zum Schlusse der Dialyse, die 14 Tage dauerte, auf das Vierfache. Das Wasser wurde täglich gewechselt und dabei mit der Innenlösung stets auf gleiches Niveau gebracht.

Zur Schwefelsäurereaktion wurde jedesmal $\frac{1}{50}$ der Außenflüssigkeit verwendet. Sie nahm anfänglich ziemlich rasch und regelmäßig, zum Schlusse sehr langsam ab und war auch nach 14 Tagen nicht ganz verschwunden. Im Dialysierschlauch war aber in diesem Stadium Schwefelsäure nicht mehr wahrnehmbar. Zur Kontrolle wurden die einzelnen Dialysate zur Trockne gedampft.

Die ersten fünf enthielten noch so viel Ammonsulfat, daß beim Konzentrieren dieses reichlich auskrystallisierte. In der konzentrierten Flüssigkeit schieden sich wieder weiche Harze ab. Diese wurden mechanisch von dem mit auskrystallisierten Salz getrennt und dann getrocknet. Vom sechsten Dialysat ab war diese Trennung nicht mehr notwendig, es wurde ohne weiteres zur Trockne gebracht und gewogen. Das Gewicht der fünf Aussalzen und der folgenden Eindampfungen war: 14, 15, 13, 11, 10, 9, 7, 5, 4·5, 4·0, 3·5, 3·0, 2·5, 2·5 g.

Der Inhalt der Dialysierschläuche wurde zunächst in großen Schalen auf dem Wasserbad, dann im Vakuum zur Trockne gebracht. Nach einer Probetrocknung war die wasserfreie Substanz 73 g.

Die Substanz löst sich in Wasser mit Leichtigkeit, verdünnte Schwefelsäure schied nichts ab. Die Farbenreaktionen werden später angegeben.

In Ammonsulfat lösliches Pepton.

Die 246 g wiegende Rohfraktion Trockensubstanz wurde mit 70 g einer noch feuchten Fraktion einer anderen Darstellung in etwa 17% wässriger Lösung der Dialyse unterworfen. Diese wurde in ganz ähnlicher Weise wie bei der Lysalbinfraktion vorgenommen und dauerte 7 Tage, nach welcher Zeit das Dialysat eine zu vernachlässigende Schwefelsäurereaktion gab.

Die sieben Dialysate hinterließen eingedampft 120, 60, 32, 19, 13, 7·7, 4·9 g, zusammen 256 g. Der Schlauchinhalt enthielt nach einer Probetrocknung 40·2 g Trockensubstanz. Die Substanz löst sich in Wasser mit großer Leichtigkeit und gibt weder bei neutraler Reaktion noch bei Zusatz von Schwefelsäure mit stark überschüssiger Ammonsulfatlösung eine Trübung.

Methode der Hydrolyse.

Die Hydrolyse erfolgte in allen Fällen nach Kossel-Kutscher mit Schwefelsäure. Die Bestimmung der einfachsten Spaltungsprodukte geschah im wesentlichen nach bekannten Methoden. Da aber zum Teil doch von diesen abgewichen

wurde und andererseits bei den Unvollkommenheiten der bekannten Trennungen für künftige Vergleiche die eingehaltenen Bedingungen wichtig sein könnten, sei der eingeschlagene Gang in Kürze mitgeteilt. Es sei noch erwähnt, daß wir, um Vergleiche mit dem Eialbumin mit erreichbarer Sicherheit ziehen zu können, auch das verwendete Eialbumin »analysiert« haben. Letzteres enthielt 15·5% Wasser.

Nach erfolgter Hydrolyse wurden die Hexonbasen nach Kossel-Kutscher getrennt und bestimmt. Manchmal wurden aber die Hexonbasen gemeinschaftlich mit Phosphor-Wolframsäure ausgefällt, der Niederschlag in bekannter Weise mit Baryt zersetzt und dann erst ihre Trennung vorgenommen.¹ In jedem Falle wurde der Überschuß der Phosphor-Wolframsäure mit Baryt, der Überschuß desselben mit Kohlendioxyd entfernt und sodann bis zur starken Krystallisation eingedampft. Das auskrystallisierte Gemisch von Tyrosin und Leucin wurde durch systematisches Umkrystallisieren und Eindampfen auf Tyrosin verarbeitet. Wenn das zuerst auskrystallisierte Gemisch unter dem Mikroskop viel Leucin zeigte, wurde in der 40fachen Menge Wasser heiß gelöst, wenn Tyrosin vorwaltete, mit der 20fachen Wassermenge gekocht. Das Eindampfen und Wiedermkrystallisieren wurde so lange fortgesetzt, bis Millon'sches Reagens nur mehr sehr schwache Tyrosinreaktion gab.

Sämtliche von Tyrosin befreite Lösungen wurden vereinigt mit Salzsäure auf das 1½-fache Gewicht des zur Hydrolyse verwendeten Proteins gedampft, mit Salzsäuregas gesättigt und nach Einimpfen von salzsaurer Glutaminsäure im Eischrank bis zu 8 Tagen, immer aber so lange aufbewahrt, bis die Krystallisation sich nicht vermehrte.

Filtrat und Waschalkohol der salzsauren Glutaminsäure wurden nach Fischer zweimal verestert und in bekannter Weise die Ester im Vakuum destilliert. Mit Rücksicht auf die relativ geringen Substanzmengen wurden bloß die Fraktionen bis 80°, 80° bis 100° und 100° bis 165° aufgefangen. Der von den Estern abdestillierte Äther wurde auf einen Gehalt an Glykokoll-

¹ Wo das der Fall war, wird es in der Folge besonders hervorgehoben werden.

ester geprüft, die zwei niedriger siedenden Esterfraktionen wurden mit Wasser verseift, aus der höchstsiedenden durch Verdünnen mit Wasser und Schütteln mit Petroläther zunächst das Phenylalanin gewonnen, die wässrige Lösung dann mit Barytwasser gekocht.

Bei den durch Kochen mit Wasser in freiem Zustand erhaltenen Aminosäuren wurde eine vollständige Trennung unterlassen und nur der in Alkohol unlösliche Anteil (Aminosäuren) von den auch in absolutem Weingeist löslichen (Prolinfraktion) getrennt.

Hierzu wurde zunächst bis zur starken Krystallisation gedampft. Die Mutterlauge wurde zweimal zum Sirup gedampft, jedesmal mit absolutem Alkohol aufgenommen und die ungelöst bleibenden Krystalle als Aminosäuren gewogen. Beim zweiten Extrahieren mit Alkohol blieb in der Regel so gut wie nichts ungelöst. Der Rückstand, der schließlich beim Verdampfen des absoluten Alkohols zurückblieb, wurde als Prolin berechnet.

Die Petrolätherlösung des Phenylalaninesters wurde mit Salzsäure ausgeschüttelt, die salzsaure Lösung zur Krystallisation gedampft, die Krystallisation mit Natriumacetat zerlegt und das Phenylalanin durch systematisches Umkrystallisieren und Eindampfen gewonnen und gereinigt.

Die mit Baryt verseifte wässrige Lösung, die vorher vom Phenylalaninester befreit worden war, schied beim Erkalten geringe Mengen eines Pulvers ab, welches in bekannter Weise auf Asparaginsäure verarbeitet wurde. Es sei vorweg bemerkt, daß jenes stets nur sehr geringe Mengen organischer Substanz enthielt, deren Identität mit Asparaginsäure sehr zweifelhaft blieb.

Das von dem unlöslichen Barytsalz getrennte Filtrat wurde in bekannter Weise auf Glutaminsäure-Chlorhydrat verarbeitet. Dasselbe gilt von dem bei der Vakuumdestillation der Ester im Kolben verbleibenden nicht flüssigen Rückstand.

Es sei bemerkt, daß die Abscheidungen von salzsaurem Glutaminsäure durchwegs mit Chlorbarium verunreinigt waren, mitunter war die organische Substanz ganz untergeordnet und mußte in allen Fällen der Baryt durch Schwefelsäure ausgefällt werden.

Wir haben eben den Überschuß an Baryt stets nur mit Kohlensäure entfernt. Die beobachtete Tatsache zeigt, daß es sicherer und, im ganzen genommen, auch viel bequemer ist, den Barytgehalt vorweg stets durch Schwefelsäure und nicht mit Kohlensäure zu entfernen.

Die Krystallisationen von salzsaurer Glutaminsäure, die zur Berechnung des Glutaminsäuregehaltes kamen, wurden zwar nicht analysiert, doch haben wir uns überzeugt, daß sie salzsaures Phenylalanin nicht enthielten.

Resultate der Hydrolysen.

Eiereiweiß.

Wie schon erwähnt, haben wir das Eiereiweiß hydrolysiert und einige der einfachen Spaltungsteile bestimmt, um zu sehen, ob die Resultate mit den vorliegenden Angaben übereinstimmen, in welchem Falle die nach derselben Methode bei der Protalbinsäure etc. gefundenen Zahlen einen Vergleich wirklich zulassen.

Das Eiweiß wurde dreimal hydrolysiert, und zwar jedesmal 50 g eines Präparats von 15·5% H_2O -Gehalt. Bei der zweiten Hydrolyse wurden die Hexonbasen gemeinschaftlich mit Phosphorwolframsäure ausgefällt.

Es sei bemerkt, daß wir nur beim Arginin, dessen Gehalt viel höher, und bei der Glutaminsäure, deren Menge viel niedriger gefunden wurde, erhebliche Differenzen mit den Literaturangaben gefunden haben.

	I	II	III
Salzsaures Histidin	0·949 g	—	—
Arginin—Mononitrat	1·713	} äquivalent 10 cm^3 $\frac{1}{5}NO_3H$	34·3 cm^3 $\frac{1}{5}NO_3H$
Lysin—Pikrat	4·299		—
Rohester	26	27 g	—
» 14 mm bis 100°	4·6	5·3	—
» 14 mm bis 165°	13·4	12·0	—
» Rückstand	5·0	7·5	—
Aminosäuren	2·94	3·32	—
Prolin	0·535	0·61	—
Tyrosin	—	0·99	—

	I	II	III
Phenylalanin	2·44	5·8 (Chlorhydrat)	—
Glutaminsäure aus nichtflüchtigen Estern.....	1·07	1·71	—
Asparaginsäure.....	0·02	0·03	—

Folgende Tabelle enthält die auf Trockensubstanz berechneten Prozentzahlen und die in der Literatur vorhandenen Angaben.

	Skraup und Hummelberger			Krystall. Eiweiß	Eieralbumin käuflich
Histidin	1·52	—	—	1·5	+ ¹
Arginin.....	3·22	1·02	3·13	0 ⁶	0·8 ²
Lysin	3·95	—	—	3·5 ⁶	—
Tyrosin	—	2·34	—	1·1 ³	0·58 ⁴
Prolin	1·26	1·45	—	2·25 ³	0·56 ⁵
Alanin	6·9	7·8	—	2·1 ³	—
Leucin.....				6·1 ³	—
Phenylalanin ...	5·8	—	—	4·4	1? ⁵
Glykokoll	+	—	—	0	—
Glutaminsäure ..	2·0	3·2	—	8·0 ³	—

Protalbinsäure.

Verwendet 37·4 g. Beim Auflösen in 33% Schwefelsäure deutlicher Geruch nach Schwefelwasserstoff, der beim Kochen noch stärker auftrat.

Histidin	1·24 g	Dichlorhydrat.
Arginin.....	0·216	Mononitrat.
Lysin	3·19	Pikrat (Schmelzpunkt 247°).
Tyrosin	1·27	
Aminosäuren ...	5·46	
Prolin.....	1·27	
Phenylalanin ...	2·41	Chlorhydrat und freie Verbindung.
	2·40	
Glutaminsäure ..	0·82	Chlorhydrat.

¹ Hedin, Zeitschr. für phys. Chemie, 22, 193.

² Hedin, Journ. für prakt. Chemie, 21, 163.

³ Abderhalden und Preyl, Zeitschr. für phys. Chemie, 46, 24.

⁴ Cohnheim's Lehrbuch.

⁵ E. Fischer, Zeitschr. für phys. Chemie, 33, 412.

⁶ Skraup und Kaas, Liebig's Annalen 351, 379 (Lieben-Festschrift).

Die in Prozente umgerechneten Werte sind schon in der Einleitung mitgeteilt.

Es sei noch zugefügt, daß das Tyrosin analysiert wurde. 0·1303 g gaben 0·2853 g CO₂ und 0·0724 g H₂O.

In 100 Teilen:

	Berechnet	Gefunden
C	59·63	59·71
H	6·13	6·17

Als nach Abscheidung des Tyrosins die vereinigten Filtrate auf Glutaminsäure verarbeitet wurden, entstand nach dem Einimpfen eine Krystallisation von 10 g, die in verschiedene Fraktionen zerlegt wurde, von denen die ersten viel Chlorbarium enthielten. Die dritte war nahezu aschenfrei und gab bei der Analyse Zahlen, die nahezu auf Phenylalanin-Chlorhydrat stimmen.

In 100 Teilen:

	Gefunden		Berechnet
	I	II	
C	51·63	51·00	53·88
H	5·95	5·66	6·00

Salzsaure Glutaminsäure erfordert:

C	32·68
H	5·50

Aus den ersten zwei Fraktionen entstand nach Beseitigung des Bariums durch Schwefelsäure eine Krystallisation, deren Analyse ziemlich scharf auf salzsaures Phenylalanin stimmte.

0·1265 g gaben 0·2487 g CO₂ und 0·0655 g H₂O.

0·1146 g gaben 0·0816 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Berechnet	Gefunden
C	53·58	54·42
H	6·00	5·76
Cl	17·58	17·60

Das mit Natriumacetat abgeschiedene Phenylalanin gab den charakteristischen Aldehydgeruch beim Erwärmen mit

Chromsäure und hatte auch sonst die angegebenen Eigenschaften.

Daß an jener Stelle, an der sonst salzsaure Glutaminsäure abzuscheiden ist, trotz Einimpfens nicht diese, sondern Phenylalanin auskrystallisiert, ist eine qualitative Bestätigung des Vorwiegens von letzterem und Zurücktreten der früher genannten Aminoverbindung.

Bei der Esterdestillation erhielten wir:

Fraktion bis 80°	0·6 g
» » 100	7·5
» » 170	8·8
Nicht flüchtig	4 $\frac{1}{2}$
Summe...	20·0 g

Aus der ersten Fraktion erhielten wir 0·37, aus der zweiten zunächst 1·69 und nach dem Eindampfen und Wiederlösen in Alkohol 3·31 g krystallisierte Aminosäuren. Ein drittes Eindampfen lieferte nur mehr 0·09 g. Zusammen »Aminosäuren« 5·64 g.

Die absolut alkoholische Mutterlauge gab 0·3245 g racemisches Prolinkupfer, die Mutterlauge, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, 0·474 g Rückstand, welcher als aktives Prolin berechnet wurde. Glykokoll und Asparaginsäure waren mit Sicherheit nicht nachzuweisen.

Die Petrolätherausschüttelung der höchstsiedenden Esterfraktion gab 5·7 g salzsaures Phenylalanin, aus welchem in Summe 2·401 g freies Phenylalanin isoliert wurde.

Aus dem nichtflüchtigen Teile der Ester war nach einer Woche 0·82 g Glutaminsäurechlorhydrat auskrystallisiert.

Lysaibinsäure.

Verwendet 37·4 g Trockensubstanz. Erhalten:

Histidin	0·17 g	Dichlorhydrat.
Arginin	0·13	Mononitrat.
Lysin	5·05	Pikrat (Schmelzpunkt 243 bis 247°).
Tyrosin	0·98	
Aminosäuren	2·603	
Prolin	0·37	
Glutaminsäure	0·48	Chlorhydrat.
Phenylalanin	1·949	

Es sei noch zugefügt, daß, als das Filtrat vom Tyrosin auf Glutaminsäure verarbeitet wurde, die Krystallisation (3·8 g) fast nur Chlorbarium war. Es wogen:

die Rohester.....	19 g,
> Fraktion bis 100°.....	4
> > > 170	7·4
der Rückstand.....	4

Die Petrolätherausschüttelung gab 4·8 g salzsaures Phenylalanin, aus welchem die freie Aminoverbindung abgeschieden und durch systematisches Krystallisieren rein erhalten wurde. Die prozentische Zusammensetzung ist in der Einleitung angegeben.

Lysalbinpepton.

Verwendet 25·6 g. Erhalten:

Histidindichlorhydrat	0·213 g
Argininmononitrat	0·067
Lysinpicrat	2·66
Tyrosin	0·29
Aminosäuren	0·82
Prolin.....	0·08
Phenylalanin	0·61
HCl-Glutaminsäure.....	0·50

Die Isolierung erfolgte im übrigen ganz so wie bei der Lysalbinsäure. Im Äther, der von den Estern abdestilliert worden war, konnten kleine Mengen Glykokoll als Esterchlorhydrat nachgewiesen werden.

Verhalten der Protalbinsäure gegen Natronlauge.

100 g Albumin (15·5% Wasser enthaltend) wurden, wie früher beschrieben, mit Natronlauge behandelt. Die Fällung, durch Schwefelsäure zweimal mit Wasser umgeschmolzen, enthielt nach einer Trockenbestimmung 17·5 g. Die vereinigten Lösungen wurden mit Ammonsulfat gesättigt und Lysalbinsäure und Pepton, wie früher beschrieben, getrennt. Um rascher arbeiten zu können, wurde bei beiden die Schwefelsäure mit

Baryt gefällt und der Barytüberschuß mit Kohlensäure sodann eingedampft. Wir erhielten 26·6 g Lysalbinsäure und nur 31·6 g Pepton.

Von der rohen Protalbinsäure wurden 16·5 g in derselben Weise behandelt und dabei erhalten: 10·2 g Säurefällung, 3·3 g Albumose und 2·0 g Pepton.

In der Einleitung ist die Verschiedenheit des Verhältnisses der drei Stoffe bei jedem der zwei Versuche schon zahlenmäßig angegeben.

Es sei noch bemerkt, daß auch das Verhältnis von Albumose zu Pepton in jedem der zwei Fälle verschieden ist. Albumin gibt sie im Verhältnis von 1:1·2, die Protalbinsäure im Verhältnis von 1:0·6.

Oxydation.

Je 2 g Protalbinsäure, Lysalbinsäure und Lysalbinpepton wurden mit 10 cm^3 Wasser übergossen. Die Protalbinsäure brauchte 10 Tropfen 10% KOH zur Lösung. Der Gleichmäßigkeit halber wurde dieselbe Menge auch der klaren Lösung der anderen zwei Substanzen zugefügt. In alle drei Lösungen kamen unter Kühlung 42 cm^3 einer vierprozentigen Permanganatlösung.

Es trat in allen drei Fällen Erwärmung und ziemlich rasch und gleichmäßig Braunfärbung ein. Nach einer Viertelstunde gab die Filtrierpapierprobe keine Permanganatfärbung. Nach einer halben Stunde waren alle drei Proben zu Gallerten erstarrt, nach etwa 5 Stunden schon war der Braunstein in Substanz abgeschieden und über ihm eine klare, farblose Flüssigkeit. Es wurde unter Druck filtriert und gleichmäßig gewaschen.

Das Filtrat der Protalbinsäure gab auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure eine anfänglich beim Umrühren verschwindende, dann bleibende Fällung von rein weißer Farbe, die erst bei deutlich saurer Reaktion beendet war und im Überschuß der Schwefelsäure sich sehr schwer löste. Die Filtrate von der Oxydation der Albumose und des Peptons schieden auf Zusatz von Schwefelsäure nichts ab.

Das Oxydationsprodukt der Protalbinsäure wog trocken 0·5 g. In seinem Filtrat gab Ammonsulfat sehr reichliche

Fällung. Das Oxydationsprodukt reagiert mit α -Naphthol und Thymol ganz ähnlich wie die Protalbinsäure.

Farbenreaktionen.

Je 1.5 g Eiweiß und die drei Produkte der Hydrolyse wurden mit der eben nötigen Menge Kalilauge auf 20 cm^3 gebracht. Zu jeder Reaktion wurden gleiche Volumina der Probelösungen und der Reagenzien abgemessen.

	Eiweiß	Protalbin- säure	Lysalbinsäure	Pepton
Biuretreaktion ¹ bei tropfenweisem Zusatz einer sehr verdünnten Kupfer- vitriollösung				
	Blauviolett	kaum violett	rotgelb	rotgelb
Millon'sches Reagens	stark	stark	stark	etwas schwächer
α -Naphthol. Einmal wurde je 1 cm^3 mit 3 Tropfen Naphthollösung und 1 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure vermischt, das andere Mal 2 Tropfen und zweimal hintereinander je 1 cm^3 Schwefelsäure mit ganz denselben Farbenerscheinungen				
Färbung {	dunkelblau- violett stark	schmutzig- braun schwach	dunkelrot- violett stark	noch mehr ins Rote noch stärker
Thymol. Je 1 cm^3 Lösung und zweimal hintereinander je 1 cm^3 H_2SO_4 , das eine Mal 4 Tropfen, das andere Mal 1 Tropfen Thymol, nach kurzem Stehen noch 3 Tropfen. Es trat dann überall Verstärkung der Farbe ein, nur bei der Protalbinsäure nicht				
Färbung {	Purpur	schwach röt- lichgelb	Purpur	Purpur am inten- sivsten
Tryptophanreaktion (Eisessig mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure) 1 cm^3 Lösung, 1 Tropfen Eisessig, 2 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure				
	lavendelblau	ebenso, mit Stich ins Braune	bräunlichgrün	bräunlichgrün

¹ Da mit Ausnahme des Eiweißes die Lösungen gefärbt sind, sind die Farbenänderungen nicht sehr auffällig.

	Eiweiß	Protalbin- säure	Lysalbinsäure	Pepton
Alkalische Bleilösung				
	braun	keine Färbung	ebenso	ebenso
Ungefähr gleiche Mengen fester Substanz mit rauchender Salzsäure im Wasserbad erhitzt				
	rotviolett	schmutzig- braun	hell braungelb	ebenso
Krystallisiertes Eiereiweiß gab ganz dieselbe Färbung wie unser käufliches Präparat.				

Die Untersuchung wird fortgesetzt.
