

Partielle Hydrolyse von Proteinen durch Schwefelsäure

von

Zd. H. Skraup und E. Krause.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 17. Februar 1910.)

Will man Proteine durch Säuren partiell hydrolysieren und die ersten Umwandlungsprodukte in möglicher Ausbeute fällen, so ist es wünschenswert, sie ohne Erwärmung gleich zu Beginn in Lösung zu bringen. Dieses ist, wie der Eine von uns vor einiger Zeit gefunden hat, bei Anwendung von Salzsäure durch einen Zusatz von Essigsäure zu erreichen, dabei tritt aber die Unannehmlichkeit auf, daß nach der Neutralisation massenhaft Salze in Lösung gehen, die infolge ihrer Löslichkeitsverhältnisse in einfacher Weise nicht zu entfernen sind.

Es wurde nun gefunden, daß mäßig verdünnte Schwefelsäure beim Schütteln schon bei gewöhnlicher Temperatur alle leichter beschaffbaren Proteine in Lösung bringt, aber mit bemerkenswert verschiedener Geschwindigkeit. Die Unterschiede sind in manchen Fällen so groß, daß eine recht verschiedene Löslichkeit der Proteine (vielleicht besser gesagt Lösbarkeit) ganz evident ist, in anderen Fällen ist das weniger sicher, weil auch bei gleichmäßigem Arbeiten die Proteine anfänglich in gelatinöse Klumpen sich umwandeln, die in der Folge nur schwer in Lösung gehen.

Einige Zeit nach Beginn unserer Untersuchungen hat E. Abderhalden¹ mitgeteilt, daß Edestin in 70prozentiger

¹ Zeitschr. phys. Chem., 58, 375 (1908/09).

Schwefelsäure bei 20° nach kurzer Zeit sich auflöst; ob er ähnliches bei anderen Proteinen, die er erwähnt, wie Elastin, Keralin und Hämoglobin konstatiert hat, geht aus der knappen Mitteilung nicht hervor.

Abderhalden hat im wesentlichen die Isolierung von Peptiden angestrebt, die ihm auch mehrfach gelungen ist, und andere Verhältnisse nicht besonders berücksichtigt. Nach unseren Erfahrungen können wir ergänzend hinzufügen, daß unter den von ihm eingehaltenen Bedingungen, welche von unseren wenig verschieden sind, nur ein relativ geringerer Teil der Proteine weitergehend hydrolysiert wird, welcher Umstand auf die Auffindung von Peptiden natürlich günstig wirkt.

Die ersten Versuche wurden mit dem Casein ausgeführt. Je 10 g wurden mit 100 cm^3 Schwefelsäure von 70 (I), 60 (II) und 50 Prozent auf der Maschine geschüttelt. Bei den zwei höheren Konzentrationen war schon in einer halben Stunde alles gelöst, bei den 50prozentigen war noch nach 10stündigem Schütteln viel ungelöst.

Nach je 24 Stunden wurden je 10 cm^3 der ersten zwei Lösungen, 1 g Casein enthaltend, in 20 cm^3 Wasser gebracht und unter Kühlung Ammoniak zugefügt, bis die Reaktion noch schwach sauer blieb. Die Fällung wurde scharf abgesaugt, auf Ton abgepreßt und gewogen. Es zeigte sich, daß die Fällungen allmählich abnehmen. Nach einmal, beziehlich dreimal und viermal 24 Stunden war bei I das Gewicht auf 71%, dann auf 58% und 50% des verwendeten Caseins gesunken, bei II auf 86%, dann auf 45% und 46%. Während die ersten Fällungen in Wasser nur teilweise löslich waren, lösten sie sich später ganz oder doch größtenteils. Ebenso nahm die Löslichkeit in Ammoniak zu. In den sauren Filtraten gab Zusatz von Ammonsulfat stets nur geringe Abscheidung.

Nicht nur geringe Veränderungen der Konzentration der Schwefelsäure, sondern auch ihre Menge haben bemerkenswerten Einfluß. So zeigte sich, daß, wenn 10 g Casein einmal in 80 cm^3 , das andere Mal in 60 cm^3 Schwefelsäure von 60% gelöst werden, nach 44 Stunden im ersten Fall 57%, im zweiten 73% nach dem Neutralisieren unlöslich ausfallen.

Durch dieses Verhalten wird sehr wahrscheinlich gemacht, daß unter den erwähnten Umständen die Hydrolyse des Caseins eine recht unvollständige ist und das Verhalten anderer Proteine zeigt, daß bei der Mehrzahl derselben dasselbe gilt.

Die Untersuchung anderer Proteine erfolgte ausschließlich mit der 60prozentigen (genau 58·5prozentigen) Säure. Es wurden verwendet: 1. Eieralbumin, 2. Casein, 3. Gelatine, 4. Seidenleim, 5. Edestin aus Hanfsamen, 6. Edestin aus Baumwollsamensamen, 7. Seidenfibrin, 8. Serumglobulin.

Mit Ausnahme des Seidenfibrins, welches zufälligerweise vakuumtrocken zur Verfügung stand und von welchem 20 g angewendet wurden, kamen von den anderen Proteinen 22 g, entsprechend ihrem mittleren Feuchtigkeitsgehalt in Anwendung.

Der Wassergehalt war bei

1	2	3	4	5	6	7	8
10·6	10·7	13·7	9·9	10·7	10·9	0·0	10·1

Bei den in der Folge mitgeteilten Zahlen ist auf die Trockensubstanz umgerechnet. Jedes Protein wurde mit 200 cm^3 der 60prozentigen Schwefelsäure auf der Maschine geschüttelt. Gelatine, Seidenleim und Seidenfibrin gingen fast sofort in Lösung, Casein nach kurzem Schütteln, die übrigen viel schwieriger, am langsamsten die beiden Edestine und das Eieralbumin, von welchem nach mehr als 36 Stunden noch einige kleine Klumpen ungelöst waren.

Um die fortschreitende Hydrolyse zu kontrollieren, wurden von Zeit zu Zeit je 20 cm^3 in 20 cm^3 Wasser gegossen. Schon hierbei traten Unterschiede auf. Bei Eieralbumin und den Edestinen traten reichliche Abscheidungen auf, bei den anderen nur schwache Trübungen, bei Seidenleim und Seidenfibrin blieb das Gemisch sogar fast ganz klar. Diese Unterschiede zeigten sich kaum verändert auch nach längerem Stehen der Lösungen in Schwefelsäure.

Die mit Wasser verdünnten Lösungen wurden unbekümmert um die Ausscheidung unter Kühlung von außen mit starkem Ammoniak vermischt, bis die Reaktion eben schwach alkalisch war, dann wurde mit Schwefelsäure eben sauer gemacht. Hierbei traten Fällungen auf, die nach einigem Stehen meist

hart und filtrierbar wurden. Sie wurden dann abgesaugt und ohne nachzuwaschen auf porösen Platten gut abgepreßt, bei 100° getrocknet und gewogen. Bei der Gelatine fiel ein unfiltrierbares weiches Harz aus. Seine Menge war nicht anders als durch Wägung des Becherglases nach möglichst vollständigem Abfließen der Ammonsulfatlösung möglich.

Bei Umrechnung der Fällungen auf Prozente des Ausgangsmaterials ergaben sich folgende Zahlen:

	Eieralbumin	Casein	Gelatine	Seidenleim	Edestin		Fibroin	Serumalbumin
					Hanf	Baumwolle		
Nach 39 Stunden	96·3	89·2	58·7	12·6	92·3	94·8	—	82·9
Nach 78 Stunden	74·2	66·3	21·5	5·5	67·3	70·4	14·0	71·7
Nach 126 Stunden	62·7	49·5	23·6	8·5	55·1	58·1	13·5	57·6
Nach 198 Stunden	56·5	40·8	16·3	6·5	52·0	58·0	11·5	51·0

Es sei bemerkt, daß das Ammonsulfat, welches beim Neutralisieren entsteht, so viel Wasser vorfindet, daß eine ungefähr halbgesättigte Lösung entsteht, daß also die Fällungen ungefähr als rohe Albumosen desselben Aussalzungsgrades aufzufassen sind.

Aus den mitgeteilten Zahlen geht hervor, daß solche Albumosen aus den einzelnen Proteinen in recht verschiedener Menge entstehen, und da weiter, wie Seidenleim und Fibroin zeigen, in manchen Fällen diese kleineren Mengen mit fortschreitender Zeit eine viel unerheblichere Verminderung erfahren als in anderen Fällen die größeren, läßt sich der Schluß ziehen, daß dieses seinen Grund in wirklichen Verschiedenheiten der Proteine haben wird.

Bemerkenswert ist auch die Abnahme, die bei gleicher Zeit bei den verschiedenen Proteinen in den Mengen dieser albumoseartigen Masse eintritt.

In folgender Tabelle sind die Unterschiede der Gewichte nach den verschiedenen Zeiten angegeben.

Abnahme nach	Eieralbumin	Casein	Gelatine	Seidenleim	Edestin		Fibroin	Serumalbumin
					Hanf	Baumwolle		
39 Stunden	3·7	10·8	41·3	87·4	7·7	5·2	—	17·1
78 Stunden	22·1	22·9	19·8	7·1	25·0	24·4	—	11·2
126 Stunden	11·5	16·8	+2·1	+3	12·2	12·3	0·5	14·1
198 Stunden	6·2	8·7	7·3	2·0	3·1	0·1	2·0	6·0

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß, während bei einzelnen Proteinen die Umwandlung schon zu Beginn größtenteils eingetreten ist, bei anderen sie erst mit der Zeit erheblicher wird. Dieses läßt auf eine verschiedene Festigkeit schließen und darum auch wieder auf konstitutionelle Unterschiede.

Das geht auch aus anderen Versuchen hervor.

Seidenfibroin und Seidenleim wurden in den schon erwähnten Verhältnissen gelöst und weiter behandelt. Die Ausfällungen betragen nach

	S t u n d e n			
	$\frac{3}{4}$	25	73	79
Seidenfibroin	—	34 $\frac{0}{10}$	16 $\frac{0}{10}$	14 $\frac{0}{10}$
Seidenleim	29 $\frac{0}{10}$	10 $\frac{0}{10}$	—	—

Also auch bei diesen Proteinen entstehen anfänglich recht bedeutende Mengen der Albumosen, von diesen wird aber der größte Teil löslich und nur ein kleiner, widerstandsfähigerer Teil erhält sich bei weiterer Einwirkung.

Anders ist es wieder beim Glidin und beim Serumglobulin, welch letzteres wir der Freundlichkeit von Prof. S. Fraenkel verdanken. Bei diesen tritt eine wesentliche Veränderung mit der Zeit nicht ein.

	S t u n d e n				
	$2\frac{1}{2}$	5	25	49	72
Glidin	100 $\frac{0}{10}$	—	76 $\frac{0}{10}$	73 $\frac{0}{10}$	—
Serumglobulin	—	65 $\frac{0}{10}$	65 $\frac{0}{10}$	—	50 $\frac{0}{10}$

	S t u n d e n		
	4	48	96
Pepton Witte	92 $\frac{0}{10}$	64 $\frac{0}{10}$	60 $\frac{0}{10}$

Es war von Interesse festzustellen, wie die nach der partiellen Hydrolyse ausfällbaren Albumosen sich verhalten, wenn sie unter gleichen Umständen neuerdings mit Schwefelsäure behandelt werden, vor allem, ob ihre relative Widerstandsfähigkeit gegen Schwefelsäure dann wieder zu beobachten ist.

Es wurden hiezu die nach 198stündigem Stehen verbliebenen Reste der schwefelsauren Lösungen von Eiweiß, dem Casein und den beiden Edestinen verwendet. Die aus ihnen gefällten Albumosen wurden lufttrocken im früheren Verhältnis in 58·5 prozentiger Schwefelsäure gelöst. Nach 1½ stündigem Schütteln war alles in Lösung gegangen.

Nach 41, beziehungsweise 89 Stunden wurde, wie früher beschrieben, mit Wasser verdünnt und mit Ammoniak nahezu neutralisiert. Von den ursprünglich eingewogenen Albumosen waren wieder ausfällbar:

	Eiereiweiß	Casein	Edestin	
			Hanf	Baumwolle
41 Stunden	72 $\frac{0}{10}$	68 $\frac{0}{10}$	73 $\frac{0}{10}$	67 $\frac{0}{10}$
89 Stunden	62 $\frac{0}{10}$	65 $\frac{0}{10}$	65 $\frac{0}{10}$	60 $\frac{0}{10}$

In allen Fällen tritt anfänglich eine recht erhebliche Abnahme ein, die späterhin aber gering wird. Aus diesen Beobachtungen in Verbindung mit den vorher angegebenen könnte man schließen, daß die Hydrolyse mit so wenig verdünnter Schwefelsäure einem Gleichgewichtszustand zwischen den komplexeren und den einfacheren Abbauprodukten zustrebt.

Es sollen die derartig entstehenden albumoseartigen Reste näher untersucht werden. In der folgenden Abhandlung teilen wir die Resultate mit, die wir beim Casein ermittelt haben.