

# Über partielle Hydrolyse von Casein

von

**Zd. H. Skraup und E. Krause.**

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

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

In der vorhergehenden Mitteilung haben wir gezeigt, daß beim Lösen verschiedener Proteine in 60prozentiger Schwefelsäure eine teilweise Hydrolyse eintritt, bei der in großer Menge Stoffe von albumoseartigem Charakter auftreten. Diese sind natürlich komplizierte Gemische. Wir haben nun beim Casein versucht, diese annähernd zu trennen und das Verhältnis festzustellen, nach welchem in ihnen die einfachsten Aminosäuren enthalten sind.

Die Trennung ist auch nach dieser Art der Hydrolyse recht mühsam und verlustreich und bietet sie vor der, die nach alkalischer Hydrolyse notwendig ist, kaum Vorteile. Sicherlich ist es aber von Interesse festzustellen, ob der Verlauf der Hydrolyse ein anderer ist, je nachdem sie durch Alkalien oder Säuren begünstigt wird.

Es gelang verschiedene Stoffe annähernd zu trennen, von welchen der eine in Wasser sehr schwer löslich ist und dem Casein noch sehr nahe stehen dürfte. Die anderen sind in Wasser löslich. Einer von ihnen wird durch Ammonsulfat auch bei größter Konzentration nicht ausgefällt und hat den Charakter der Peptone. Die anderen sind durch Ammonsulfat aussalzbar und unterscheiden sich durch die verschiedene Aussalzbarkeit. Aber nur derjenige, der bei Einviertelsättigung sich abscheidet, konnte in zur Untersuchung genügenden Mengen erhalten

werden. Er soll Albumose II genannt werden, der wasserunlösliche Albumose I und der peptonartige schlechtweg Pepton.

Die Produkte der Hydrolyse wurden nur teilweise quantitativ bestimmt; wir haben uns darauf beschränkt, die Glutaminsäure und das Tyrosin zu bestimmen.

Dabei hat sich ergeben, daß das Pepton etwas reicher an Glutaminsäure ist als das ursprüngliche Casein, die Albumose II etwas ärmer, bei der Albumose I ist der Prozentgehalt wieder etwas größer, doch ist der Unterschied ziemlich gering. Wesentliche Unterschiede treten im Tyrosingehalt auf. Die beiden Albumosen liefern etwas mehr Tyrosin wie das Casein, das Pepton enthält das Tyrosin überhaupt nicht.

Die Differenz im Gehalt an Glutaminsäure ist demnach sehr ähnlich jener, die bei der Gelatine beobachtet worden ist, bei welcher die schwerer aussalzbaren Albumosen und das Pepton gleichfalls mehr Glutaminsäure enthalten wie die leichter aussalzbaren.<sup>1</sup> Dieselbe Differenz wurde beim Edestin<sup>2</sup> bei alkalischer Hydrolyse gefunden, während beim Serumglobulin<sup>3</sup> ebenfalls bei alkalischer Hydrolyse aber gerade das umgekehrte zu beobachten ist, dessen Pepton überhaupt keine Glutaminsäure geliefert hat.

Analoge Ähnlichkeiten und Unterschiede gelten für den Gehalt an Tyrosin. Beim Casein ist der Übergang in das Pepton von einer Abspaltung des Tyrosins begleitet; ähnlich ist es beim Ovalbumin, das (bei alkalischer Hydrolyse) ein auffallend tyrosinarmes Pepton liefert. Und ganz dasselbe gilt beim Serumglobulin (alkalische Hydrolyse), dessen Pepton weniger Tyrosin liefert als die den Albumosen ähnliche Lysalbinsäure und die Protalbinsäure.

Beim Edestin wurde aber bei alkalischer Hydrolyse wieder das entgegengesetzte gefunden, der den Peptonen näher stehende Stoff aus Edestin enthält mehr Tyrosin wie das dem ursprünglichen Edestin näher stehende Produkt der Hydrolyse.

Da solche Ähnlichkeiten und Unterschiede auch dort auftreten, wo verschiedene Proteine in derselben Weise, also durch

<sup>1</sup> Skraup und Hummelberger, Monatshefte für Chemie, 1908, 451.

<sup>2</sup> Skraup und Woeber, Ebenda, 1909, 289.

<sup>3</sup> Skraup und Lampi, Ebenda, 1909, 363.

Alkalien oder durch Säuren hydrolysiert worden sind, ist man wohl berechtigt, sie auf Konstitutionsverhältnisse im weitesten Sinne des Wortes zurückzuführen.

Es sei auch noch hervorgehoben, daß die hier vermerkten Tatsachen erweisen, daß die von Abderhalden<sup>1</sup> und seinen Schülern konstatierte Leichtabspaltbarkeit des Tyrosins und seiner Proteine nicht so gedeutet werden kann, daß das gesamte Tyrosin in einer gleichen relativ labilen Art gebunden sei, sondern daß dieses in verschiedener Art im Proteïn-molekül verteilt ist.

Bei den Produkten der Hydrolyse des Caseins haben wir noch beobachtet, daß das Pepton die Farbenreaktion auf den Kohlenhydratrest viel stärker liefert, als die Albumosen und das Casein selber. Dasselbe ist bei anderen Proteinen auch konstatiert worden und kann auch hier nicht anders gedeutet werden, als daß der sogenannte Kohlenhydratrest in dem Pepton stärker angehäuft ist als in den nebenher auftretenden albumoseartigen Körpern.

## Experimenteller Teil.

1 kg Casein wurde mit 6 kg etwa 60%  $H_2SO_4$  (58·5%) zirka 17 Stunden auf der Maschine geschüttelt, wobei fast alles in Lösung ging. Der geringe Rest war nach weiterem zweitägigem Stehen im geschlossenen Gefäß verschwunden und hatte sich eine dunkelgrün gefärbte Lösung gebildet. Diese nahm merkwürdigerweise erst beim Stehen an freier Luft die blauviolette Farbe an, die man beim Lösen von Casein in Salzsäure in der Hitze oder in der Kälte beobachtet und die, wie wir beobachtet haben, wenn auch schwächer, bei gewöhnlicher Temperatur nach dem Lösen von Casein in mäßig verdünnter Schwefelsäure beim Stehen an freier Luft auftritt. Die Lösung wurde auf 4 kg Eis gegossen und mit  $NH_3$  versetzt, bis die Flüssigkeit eben noch sauer reagierte. Notwendig waren etwa

---

<sup>1</sup> Zeitschr. für phys. Chemie, 53, 315 (1907); 46, 195 (1905); 44, 284 (1905).

6 kg  $\text{NH}_3$ . Es erfolgte Abscheidung harziger Klumpen, die durch Röhren leicht vereinigt und von denen leicht abgegossen werden konnte. Die abgeschiedene Harzmenge wog in feuchtem Zustand 1380 g (Fällung I).

Neben dieser harzigen Abscheidung schied sich ein weißes Pulver ab, das von dem Harz leicht abzuschlämmen war und scharf abgesaugt wurde. Es wog feucht 217 g. Dieses Pulver erwies sich beim Glühen als organisch, war in heißem  $\text{H}_2\text{O}$  nahezu löslich, vollständig löslich nach Zusatz von wenigen Tropfen  $\text{NH}_3$ .

Bei Vorversuchen zeigte sich, daß die harzige Fällung mit etwa der vierfachen Menge Wasser erwärmt, völlig, wenn auch trüb in Lösung geht. Diese Lösung wird in der Hitze sowohl durch einen Zusatz von Ammoniak wie von Schwefelsäure teilweise gefällt und scheidet, ohne einen Zusatz abgekühlt, wieder ein Harz ab. Die über diesem stehende Flüssigkeit wird nur noch durch Schwefelsäure, nicht aber durch Ammoniak getrübt, wohl aber wenn sie vorher erwärmt wird; beim Abkühlen erfolgt wieder Lösung. Die von dem erwähnten Harz abgegossene Lösung scheidet, partiell mit Ammonsulfat gesättigt, Niederschläge ab, welche nach der Einviertelsättigung am reichlichsten sind und bei weiterer Sättigung immer mehr abnehmen. Diese Fällungen in Wasser wieder gelöst und abermals mit Ammonsulfat partiell gefällt, lassen sich durch öftere Wiederholung des Verfahrens allmählich wieder in wasserunlösliche Fällungen und in Fraktionen verschiedener Aus Salzbarkeit zerlegen.

Nach diesen Vorversuchen wurden zweimal je 500 g des feingepulverten Niederschlages I in je 5 l heißes Wasser eingetragen, gut durchgerührt, erhitzt und erkalten gelassen. Die weitere Verarbeitung geht aus beiliegender Tabelle hervor.

Es sei bemerkt, daß die einzelnen Fällungen immer wieder mit der relativ gleichen Menge  $\text{H}_2\text{O}$  behandelt, bezüglich in ihr gelöst wurden.

500 g in 5 l heißem H<sub>2</sub>O suspendiert. Nach dem Abkühlen betrug der unlösliche Rückstand **255 g** (51%). Von diesem wurde abgessen und das Filtrat viertelgesättigt: **313 g** (63%) — Filtrat halbesättigt: **110 g** Filtrat dreiviertelgesättigt 36 g

beim abermaligen Lösen und Einviertelersättigung **288 g** (90.4%) — Filtrat halbesättigt **21 g**

beim abermaligen Lösen: Filtrat halbesättigt: **6 g**

unlöslich in H<sub>2</sub>O: **98 g** (32.9%)

bei Einviertelersättigung **150 g** (53%)

beim Lösen in H<sub>2</sub>O

ungelöst: **6 g** (4%) bei Einviertelersättigung **131 g** (87%)

beim Lösen in H<sub>2</sub>O

ungelöst: **8 g** (6.1%) bei Einviertelersättigung **108 g** (79%)

Die verschiedenen Halbesättigungen beider Operationen wogen nach längerem Stehen insgesamt **251 g**. Sie wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und die Lösung mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> einviertelersättigt, wobei eine Abscheidung von **105 g** erfolgte.

500 g in 5 l H<sub>2</sub>O suspendiert, erhitzt und abkühlen gelassen.

Unlöslicher Rückstand **195 g** (39%). Von diesem wurde abgessen und das Filtrat viertelgesättigt: **390 g** (78%) — Filtrat halbesättigt: **100 g** Filtrat dreiviertelgesättigt: **21 g**

beim Lösen in H<sub>2</sub>O:

unlöslich: **140 g** (36%) bei Einviertelersättigung: — Filtrat halbesättigt: **25 g**

beim Lösen in H<sub>2</sub>O

ungelöst: **25 g** (10.5%) bei Einviertelersättigung: — Filtrat halbesättigt: **9 g**

beim Lösen in H<sub>2</sub>O

ungelöst: **11 g** (6%) bei Einviertelersättigung: — Filtrat halbesättigt: **3 g**

beim Lösen in H<sub>2</sub>O:

unlöslich: **8 g** (6.6%) bei Einviertelersättigung: **123 g** (85%)

Das Filtrat gab bei Halbsättigung einen Niederschlag von **100 g** ↓

in H<sub>2</sub>O gelöst und Einviertelgesättigt: **50 g** — Filtrat halbgesättigt: **67 g** ↓  
 gelöst und Einviertelgesättigt: **35 g** (62%)

↓  
 gelöst in H<sub>2</sub>O bei Einviertelsättigung: **6 g** (9·1%),  
 bei Halbsättigung **56 g** (83·6%).

Die drei durch Einviertelsättigung erhaltenen Abscheidungen von **103 g**, **123 g**, **105 g** = **331 g** im ganzen wurden in heißem H<sub>2</sub>O suspendiert, dabei ↓

unlöslich **41 g** (12%) ↓  
 bei Einviertelsättigung: **210 g** (63%)

↓  
 beim Lösen in H<sub>2</sub>O  
 in der Hitze unlöslich: **20 g** (9·5%) ↓  
 bei Einviertelsättigung: **150 g** (71%)

↓  
 beim Lösen in H<sub>2</sub>O:  
 unlöslich: **1 g** (0·6%) ↓  
 bei Einviertelsättigung: **141 g** (94%)

Aus den Zahlen der Tabelle geht hervor, daß aus dem Harz sich allmählich Fraktionen gewinnen lassen, die sich durch Schwerlöslichkeit in Wasser, beziehlich verschiedene Fällbarkeit durch Ammonsulfat unterscheiden und daß diese Fraktionen durch Wiederholung des Verfahrens sich auch ziemlich annähernd trennen lassen.

Die in Wasser schwer löslichen Fraktionen treten beim Wiederauflösen der Ammonsulfatniederschläge anfangs merklich, später stark vermindert auf. Von den Ammonsulfatfällungen verminderte sich die durch Halbsättigung erhaltene schließlic so sehr, daß ihre Menge für eine weitere Untersuchung nicht hinreichte. Es wurde deshalb nur die Fällung durch Einviertelsättigung weiter untersucht und auch noch die durch Ammonsulfat nicht aussalzbaren peptonartigen Fraktionen. Diese letzteren wurden aus den Filtraten der

Halbsättigung dadurch erhalten, daß diese konzentriert wurden, so lange sich noch harzige Massen abschieden und nach Entfernung des Ammonsulfates (vermittels Alkohol) von niederen Spaltungsprodukten durch Dialyse gewonnen.

Um nicht unnötigerweise neue Namen einzuführen, wollen wir die in Wasser unlösliche Fraktion Albumose 1, den Hauptbestandteil der Einviertelsättigung Albumose 2 nennen, die durch Ammonsulfat nicht fällbare Fraktion schlechtweg Pepton.

Von der Albumose 1 wurde zunächst der beim Lösen des ursprünglichen Harzes sofort als unlöslich abgeschiedene Teil verarbeitet: 265 g wurden wiederholt unter Wasser am Wasserbad umgeschmolzen. Nach dem Erkalten konnte das Waschwasser leicht abgegossen werden. Nach zwölfmaligem Auswaschen waren in die Waschwässer 54 g Trockensubstanz übergegangen. Ungelöst waren 159 g, feucht gewogen. Daraus geht hervor, daß die ursprünglichen 265 g sehr viel Wasser enthielten, von welchem beim Umschmelzen recht viel abgegeben wurde. Selbst nach zirka 14maligem Auswaschen war die Reaktion auf  $H_2SO_4$  noch sehr stark.

Da sich zeigte, daß die Substanz in etwa 50prozentigem Alkohol in der Hitze größtenteils löslich ist und durch Wasser wieder gefällt wird, wurde versucht, auf Grund dieses Verhaltens die anhängenden Sulfate zu entfernen. In der Tat gelang dieses nach öfterem Umfällen, doch waren schließlich noch immer Spuren von Schwefelsäure nachzuweisen.

Die mehrfach ausgefällte, im Vakuum getrocknete Substanz wog schließlich nur 44 g.

Die Fällungen durch Ammonsulfat, die in dem Filtrat der Albumose I entstehen, lösen sich in Wasser nicht völlig auf und ist dieses insbesondere bei den anfänglichen Fällungen besonders zu bemerken. Diese Abscheidungen wurden als Albumose I betrachtet und wie diese weiter behandelt.

Sie verlor beim Umschmelzen mit Wasser und Ausfällen aus der verdünnt alkoholischen Lösung aber viel mehr an Gewicht als die ursprünglich unlöslich gebliebene. Es wurden schließlich 27 g im Vakuum getrocknete Substanz erhalten.

Die durch Einviertelsättigung erhaltene harzige Abscheidung Albumose II, deren Menge nach zahlreichen Umfällungen schließlich 141 g, feucht gewogen, betrug, wurde in zirka 2 l heißem  $H_2O$  gelöst, mit wenig überschüssigem  $Ba(OH)_2$  die Schwefelsäure ausgefällt, der überschüssige Baryt durch  $CO_2$  entfernt, das Filtrat eingedampft. Der Rückstand betrug 33·5 g und enthielt nach einer Trockenbestimmung (Vakuum) 26·71 g Trockensubstanz.

Die nach den Halbsättigungen erhaltenen Flüssigkeiten wurden konzentriert bis Ammonsulfat auskristallisierte, neben welchem sich Harze abschieden. Sobald bei weiterer Konzentration diese Harzabscheidung ausblieb, wurde das  $(NH_4)_2SO_4$  mit Alkohol, dem etwas  $NH_3$  zur leichteren Lösung der organischen Substanz zugesetzt war, abgeschieden. Das alkoholische Filtrat hinterließ eingedampft 201 g.

Versuche, die Hauptmenge der dem Pepton zweifellos beigemischten Aminosäuren in Form ihrer Kupfersalze durch fraktionierte Fällung mit Alkohol abzutrennen, gaben kein Resultat.

Infolgedessen wurde die zehnprozentige Lösung des Peptons in  $H_2O$  der Dialyse unterworfen, wodurch gleichzeitig völlige Entfernung des anhaftenden Ammonsulfats erzielt wurde. Das Dialysierwasser wurde das erstemal nach 2 Tagen, späterhin immer nach 24 Stunden abgelassen. Sein Volumen und die durch Dialyse weggeführten Mengen gehen aus folgender Tabelle hervor.

Das Dialysierwasser wurde abgelassen nach:	Volumen in Kubikzentimetern	Gewicht des Rückstandes
1 Stunde	3300	70 g
2 Stunden	4400	33
3 »	4970	16
4 »	5300	9
5 »	5760	5
6 »	6170	2
7 »	6200	ca. 1
Summe:		136 g

Nach der achten Dialyse zeigte das abgelassene Wasser keine Reaktion auf  $H_2SO_4$  mehr; infolgedessen wurde die Dialyse unterbrochen und der Inhalt der Dialysierschläuche auf dem Wasserbad eingedunstet.

Die Menge lufttrockenes Pepton betrug  $19\text{ g} = 13 \cdot 18\text{ g}$  Trockensubstanz. Beim Lösen in wenig  $H_2O$  und Versetzen mit gesättigter Ammonsulfatlösung entstand nur eine leichte Trübung.

Die nun folgenden Operationen, wie Hydrolyse, Abscheidung des Glutaminsäurechlorhydrats, Bestimmung des Tyrosins wurden bei Albumose I und II, bei dem Pepton und vergleichsweise bei dem Casein selbst in gleicher Weise durchgeführt und möglichst gleichmäßiges Arbeiten angestrebt. Wir geben deshalb bloß die Verhältnisse für die Albumose II an.

30 g der obigen Trockensubstanz (im Vakuum von Wasser befreit) wurden fein gepulvert und mit der sechsfachen Menge konzentrierter HCl 8 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Das hydrolysierte Produkt wurde sehr stark eingedampft, mit  $H_2O$  aufgenommen, etwas  $PbCO_3$  zugefügt und dann so viel Zinnchlorür zugesetzt, bis beim Einleiten von  $H_2S$  und folgender Filtration eine möglichst starke Entfärbung erzielt wurde. Dieses Filtrat wurde dann bis auf zirka  $70\text{ cm}^3$  eingedampft, in der Kälte HCl bis zur Sättigung eingeleitet, mit wenig Glutaminsäurechlorhydrat geimpft und dann in der Kälte sich selbst überlassen. Nach achttägigem Stehen wurden die entstandenen Krystalle von Glutaminsäurechlorhydrat auf Asbest abgenutscht und mit kaltem absolutem Alkohol gewaschen.

Ihre Menge betrug  $5 \cdot 06\text{ g} = 18 \cdot 9\%$  rohes Glutaminsäurechlorhydrat. Diese Rohkrystalle wurden in  $H_2O$  gelöst und unter Zusatz von wenig konzentrierter HCl bis zur starken Krystallisation eingedampft. Die Ausbeute betrug dann  $2 \cdot 86\text{ g} = 10 \cdot 70\%$ .

Die Mutterlauge krystallisierte abermals; die abgenutschten und mit absolutem Alkohol gewaschenen Krystalle wogen  $0 \cdot 18\text{ g} = 0 \cdot 67\%$ .

Das Glutaminsäurechlorhydrat der ersten Krystallisation ( $2 \cdot 86\text{ g}$ ) wurde zur Analyse nochmals umkrystallisiert.

0·2411 g Substanz gaben 0·1893 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet
Cl.....	19·41	19·30

Zur Bestimmung des Tyrosins wurde das von dem rohen Glutaminsäurechlorhydrat befreite Filtrat durch Eindampfen möglichst von HCl befreit, dann mit H<sub>2</sub>O auf zirka  $\frac{1}{2}$  l aufgefüllt und mit Silberoxyd, das auf  $\frac{1}{1000000}$  ausgewaschen war, möglichst genau in der Hitze entchlort. Vom AgCl wurde filtriert, der Niederschlag mit heißem H<sub>2</sub>O wiederholt ausgewaschen. Eventuell vorhandene Silbersalze wurden im Filtrat durch H<sub>2</sub>S zersetzt, filtriert, der Niederschlag gut ausgewaschen und das Filtrat konzentriert. Der dabei sich ausscheidende S wurde durch Filtration entfernt. Bei stärkerem Konzentrieren fand Abscheidung von Krystallen statt, die sich unter dem Mikroskop als Tyrosin erwiesen. Die weitere Isolierung des Tyrosins erfolgte durch fraktionierte Krystallisation der Mutterlauge; die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde durch die Reaktion mit Millon's Reagens und durch das Mikroskop festgestellt. Diejenigen Fraktionen, bei denen durch fraktioniertes Krystallisieren eine Trennung des Tyrosins vom Leucin nicht mehr möglich war, wurden mit Eisessig behandelt. Die betreffende Krystallisation wurde dabei als reines Leucin in Rechnung gezogen und mit der 150fachen Menge Eisessig erhitzt, wobei das Leucin in Lösung geht. Nach dem Erkalten wurde von den ungelöst gebliebenen Krystallen abgenütscht. Sie erwiesen sich als nahezu reines Tyrosin. Sie wurden nochmals in H<sub>2</sub>O gelöst und stark konzentriert. Auf diese Weise wurde für die Einviertelsättigung ein Tyrosingehalt von 4·53% gefunden. In folgender Tabelle sind die eingehaltenen Bedingungen ersichtlich.

## Bestimmung des Tyrosins in dem Niederschlag der Albumose II.

Beim Konzentrieren der Lösung Abscheidung von Krystallen:

I. 2·45 g, starke Reaktion auf Millon's Reagens. —————→ gelöst in viel heißem H<sub>2</sub>O, beim Konzentrieren:

↓

Mutterlauge konzentriert:

II. 3 g, sehr schwache Reaktion, unter dem Mikroskop kein

Tyrosin.

↓

III. 1·89 g, äußerst schwache Reaktion.

α I.: 1 g, Reaktion sehr stark, reines Tyrosin.

↓

α II.: 0·33 g, Reaktion sehr stark, durchsetzt mit Leucin.

α III.: 0·15 » » stark, » » »

α IV.: 0·33 » » schwach, kein Tyrosin mehr.

α V.: 0·10 » » » » »

α VI.: 0·11 » » » » »

α VII.: 0·23 « » » » »

Fraktion α II. und α III. wurden in 72 g Eisessig suspendiert und erhitzt. Nach dem Erkalten wurde abgenutscht, ungelöst waren 0·26 g. Diese wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und eingedampft bis zur starken Krystallisation. Die Menge der Krystalle: 0·21, unter dem Mikroskop reines Tyrosin. Also Gesamtmenge 1·21 = 4·53% Tyrosin.

## Albumose I.

Von den 44 g der von Anfang an unlöslichen Albumose I und den 27 g der bei den weiteren Umfällungen unlöslich gebliebenen Albumose I wurden 33 g = 30·94 g Trockensubstanz zur Hydrolyse verwendet, und zwar waren diese 33 g gemischt im Verhältnis beider Anteile 44 : 27.

Wir haben auch hier die bei der Gewinnung des Tyrosins eingehaltenen Bedingungen in einer Tabelle zusammengestellt.

## Tyrosingehalt der unlöslichen Albumose I.

Beim Konzentrieren der Lösung Abscheidung von Krystallen:

I.: 1·79 g, starke Reaktion. —————→ Krystalle in H<sub>2</sub>O gelöst und die Lösung konzentriert:

α I.: 1·21 g reines Tyrosin.

↓

α II.: 0·19 g, Reaktion stark.

α III.: 0·08 » » »

α IV.: 0·03 » » »

II.: 3·10 g, ziemlich starke Reaktion. —————→ Krystalle gelöst in H<sub>2</sub>O und die Lösung konzentriert:

β I.: 0·47 g, Reaktion stark, unter dem Mikroskop vorwiegend Leucin.

β II.: 0·32 » » ziemlich stark, unter dem Mikroskop nur noch sehr

wenig Tyrosin.

β III.: 0·45 » » äußerst schwach, kein Tyrosin bemerkbar.

III. 1·95 g, Reaktion äußerst schwach.

α II., α III., α IV., β I, β II. wurden vereinigt und in 162 g Eisessig suspendiert, erhitzt und erkalten lassen. Unlöslich blieben 0·22 g. Diese wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und die Lösung stark konzentriert. Die Menge der abgeschiedenen Krystalle war 0·19 g. Sie waren nahezu reines Tyrosin; im ganzen also in der unlöslichen Albumose enthalten: 1·40 g = 4·52% Tyrosin.

Zur Hydrolyse des Peptons wurden 14 g = 13·18% vakuumtrockener Substanz verwendet. Merkwürdigerweise war bei dem Pepton Tyrosin nicht wahrnehmbar. Die Reaktion mit Millon's Reagens gab äußerst schwache Rotfärbung, unter dem Mikroskop war kein Tyrosin zu finden.

Die beim Konzentrieren des Filtrates zunächst ab-  
geschiedenen Krystalle lösten sich beim Waschen auf der  
Nutsche leicht in wenig Wasser, konnten also kein Tyrosin sein.

Da möglicherweise beim Entchlören das Tyrosin als  
Silbersalz ausgefallen sein konnte, wurden die AgCl-Nieder-  
schläge in H<sub>2</sub>O suspendiert, erhitzt und H<sub>2</sub>S eingeleitet. Das  
gelbgefärbte Filtrat wurde konzentriert. Nach dem Trocknen  
im Vakuum betrug der Rückstand 1·43 g.

Der Niederschlag von Ag<sub>2</sub>S wurde abermals in heißem  
H<sub>2</sub>O suspendiert und nochmals mit H<sub>2</sub>S zerlegt, doch enthielt  
das Filtrat keine organische Substanz mehr.

Der verhältnismäßig große Rückstand von 1·43 g wurde in  
zirka 300 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O gelöst und in der Hitze mit Silberoxyd ent-  
chlort, so daß die Flüssigkeit eben noch Reaktion auf HCl gab.  
Dann wurde wiederholt filtriert und konzentriert. Auch hier  
waren die abgeschiedenen Krystalle weder unter dem Mikroskop  
als Tyrosin zu erkennen, noch gaben sie mit Millon's  
Reagens ein Rotfärbung, so daß also in dem Pepton Tyrosin  
nur in äußerst geringen Spuren vorhanden sein kann.

Vergleichsweise wurde zum Schluß das Ausgangsmaterial,  
Casein, in gleicher Weise wie die Albumosen und das Pepton  
verarbeitet. Es wurden hierzu 33 g Casein = 29·47 g Trocken-  
substanz verwendet.

#### Tyrosingehalt beim Casein.

Beim Konzentrieren des Filtrates:

I.: Krystallisiert 1·65 g, —————→ in H <sub>2</sub> O gelöst und konzentriert:	
↓ wenig mit Leucin durchsetzt.	α I.: 1·13 g, reines Tyrosin.
II.: 0·26 g, Reaktion schwach,	α II.: 0·09 g, nahezu reines
↓ unter dem Mikroskop kein	↓ Tyrosin.
↓ Tyrosin wahrnehmbar.	↓
III.: 0·6 g, kein Tyrosin.	α III.: 0·06 g, kein Tyrosin mehr.

Fraktion α II. und α III. wurden in 48 g Eisessig suspendiert, sie lösten sich  
leicht schon in der Kälte, konnten also kein Tyrosin mehr enthalten. Gesamt-  
gehalt an Tyrosin = 1·22 g = 4·14% Tyrosin. (Der Tyrosingehalt des  
Caseins ist im Cohnheim'schen Lehrbuch mit 4·5% angegeben.)

In folgender Tabelle haben wir tabellarisch die Menge der  
einzelnen Krystallisationen von salzsaurer Glutaminsäure aus  
Casein, Albumose I und II sowie dem Pepton zusammengestellt.

	Durch Einviertel- sättigung erhaltene Albumose II	In H <sub>2</sub> O unlösliche Albumose I	Pepton	Casein
<b>Prozentgehalt an Glutaminsäurechlorhydrat.</b>				
Rohes Glutamin- säurechlorhydrat.	18·9 0/0	28·11 0/0	25·49 0/0	25·11 0/0
Einmal aus H <sub>2</sub> O umkrystallisiert ..	10·70	16·87	18·9	15·10
Krystalle aus deren Mutterlauge .....	0·67	0·86	1·44	3·56
<b>Gehalt an Tyrosin.</b>				
	4·53	4·52	—	4·14

Die Cl-Bestimmungen wurden in dem zweimal aus H<sub>2</sub>O umkrystallisierten Glutaminsäurechlorhydrat vorgenommen:

Albumose II.: 0·2411 g Substanz gaben 0·1893 g AgCl = 19·41 0/0	}	Berechnet: 19·30 0/0.
Albumose I.: 0·1812 » » » 0·1423 » » = 19·42 »		
Pepton:..... 0·2200 » » » 0·1706 » » = 19·18 »		
Casein:..... Hier wurde der Cl-Gehalt bestimmt in der Krystallisation, die aus den einmal umkrystallisierten Mutterlaugekrystallen erhalten wurde:		
0·2230 g Substanz gaben 0·1765 g AgCl = 19·57 0/0.		

Zur Ausführung der Farbenreaktionen wurden im allgemeinen fünfprozentige Lösungen verwendet. Die Substanz wurde mit H<sub>2</sub>O und der eben notwendigen Menge KOH in Lösung gebracht.

Die braun gefärbte Lösung des Peptons wurde vorher mit Zinnchlorür und H<sub>2</sub>S in bekannter Weise nahezu entfärbt, filtriert, der H<sub>2</sub>S verjagt und dann die Farbenreaktionen vorgenommen.

Lösung:	Reaktion:	Casein:	Unlösliche Albumose:	Einviertel-sättigung:	Pepton:
5 $\frac{0}{10}$	Millon'sche	Starke Rotfärbung	Braun-färbung	Starke Rotfärbung	Rotfärbung (schwächer wie die übrigen)
		ungefähr gleich stark			
1 $\frac{0}{10}$	Millon'sche	Rotfärbung	Rotfärbung	Rotfärbung	Rotfärbung (schwächer)
		nahezu gleich stark			
5 $\frac{0}{10}$	Glyoxylsäure	violett	violett	violett	schwach rötlichgelb
		fast gleich starke Färbung		(stärker als die beiden ersten)	
5 $\frac{0}{10}$	Biuret	schwach violett (Farbton verschieden von den drei folgenden)	schwach rotviolett	schwach rotviolett (etwas stärker als die vorhergehende)	schwach rosa
5 $\frac{0}{10}$	$\alpha$ -Naphtol	rotbraun	rotbraun	sehr schwache Bräunung	stark violett
		nahezu gleich stark			
5 $\frac{0}{10}$	Thymol	rot	rotbraun	schwach braunrot	Rotfärbung (bedeutend stärker wie die vorhergehenden).
		etwas stärker als die folgende Einviertel-sättigung			

---