

Die Chemie der Proteinkörper des Weizenkornes.¹⁾

Teil II.²⁾

Darstellung der Proteine in genügender Menge für die Hydrolyse.

Von

Thomas B. Osborne und **Isaak F. Harris.**

Um die Zersetzungsprodukte der Proteine beim Sieden mit starken Säuren zu studieren, musste von ganz reinen Rohmaterialien ausgegangen werden. Nun kann aber eine positive Sicherheit über die chemische Individualität der Proteinsubstanzen mit unsern gegenwärtigen Mitteln nicht erbracht werden, wenn auch kein Zweifel darüber besteht, dass man aus Samen und tierischen Geweben Proteinsubstanzen isolieren kann, die entschieden ganz verschiedene Körper sind.

So können aus dem Weizenkorne fünf unzweifelhaft verschiedene Proteinformen isoliert werden, die sich nach ihrer Zusammensetzung, ihrer Löslichkeit und ihrem physikalischen Verhalten von einander unterscheiden. Ob jede derselben ein chemisches Individuum oder eine Mischung von zwei oder mehreren ähnlichen Substanzen ist, kann zur Zeit nicht festgestellt werden. Alles, was man darüber sagen kann, besteht darin, dass es bis jetzt nicht möglich war, dieselben in Fraktionen zu trennen, deren Eigenschaften eine Mischung anzeigen.

In Anbetracht der ausserordentlichen Empfindlichkeit der Proteine gegen Säuren, Alkalien und Salze können geringe Unterschiede in der Löslichkeit nicht genügen, um hieraus Schlüsse auf eine verschiedene Individualität von Proteinen zu ziehen. So wird das Protein Edestin, welches in reinem Wasser ganz unlöslich ist, in Gegenwart eines winzigen Säuregehaltes entschieden löslich darin. Zusatz einer geringen Menge

¹⁾ Nach dem American Journal of Physiology 17, No. III bearbeitet und übersetzt von V. Griessmayer.

²⁾ Teil I ist veröffentlicht in dieser Zeitschrift 44. 516 ff.

eines Neutralsalzes fällt das Protein aus dieser sauren Lösung, während eine grössere Menge von Salz es sofort wieder auflöst.

Solche Unterschiede in der Löslichkeit haben mit dem eigentlichen Proteinmolekül nichts zu schaffen, sondern sie kommen von der Bildung von Proteinsalzen her, deren Löslichkeit von der des freien Proteins verschieden ist. Da die Bildung solcher Proteinsalze von Bedingungen abhängt, über die man sich in den meisten Fällen keine Rechenschaft geben kann, so können solche Verschiedenheiten in der Löslichkeit nicht als Grundlage genommen werden, um verschiedene individuelle Proteine zu charakterisieren.

Wir dürfen uns also bei dergleichen Untersuchungen nur auf schärfere Unterschiede in der Löslichkeit, wie zum Beispiel in Alkohol oder in starken Salzlösungen, oder in Alkalien, oder auf die Konstanz in der schliesslichen Zusammensetzung von sukzessiven fraktionierten Fällungen stützen.

Wenn also Proteine in Fraktionen getrennt wurden, welche dieselbe Zusammensetzung, allgemeine Löslichkeit und dieselben physikalischen Eigenschaften haben, so sind wir nicht zu dem Schlusse berechtigt, dass wir es in jedem Falle mit einem eigenen Proteinindividuum zu tun haben. Wir können nur behaupten, dass wir mit den jetzigen Mitteln die Trennungsgrenze erreicht haben und dass wir zur Zeit solche Produkte als die einfachsten Einheiten ansehen müssen, mit denen wir uns jetzt zu befassen haben, und die zunächst als Grundlage für unsere weiteren Studien zu dienen haben. Zeigen andererseits nach obiger Manier charakterisierte Proteinpräparate bestimmte und konstante Verschiedenheiten von einander, so sind wir berechtigt, sie für verschiedene Substanzen anzusehen. Dass das Weizenkorn zum mindesten fünf solcher verschiedener Proteinsubstanzen enthält, ist durch umfassende Untersuchungen in Osborne's Laboratorium festgestellt worden.

Diese Proteine waren: 1. Gliadin, unlöslich in neutralen wässrigen Lösungen, aber von allen anderen dadurch unterschieden, dass es sich in neutralem 70-prozentigem Alkohol rasch löst; 2. Glutenin, ein Protein, das eine dem Gliadin sehr ähnliche procentuale Elementarzusammensetzung hat, löslich in sehr verdünnten sauren und alkalischen Lösungen, aber unlöslich in verdünntem Alkohol oder in neutralen wässrigen Lösungen ist; 3. Leukosin, ein albuminähnliches Protein, in reinem Wasser entschieden löslich, wird aus dieser Lösung durch Erhitzen derselben auf 50—60° koaguliert; 4. ein Globulin, das in

Zusammensetzung und Eigenschaften manchen Globulinen ähnlich ist, die in anderen Samen gefunden wurden; 5. eine oder mehrere Proteosen, die in sehr geringer Menge zugegen sind. In einer früheren Abhandlung¹⁾ waren die Proteine aus dem Weizenkeim beschrieben worden, und es war dort gezeigt worden, dass das Globulin, Albumin und die Proteose die ganze Proteinsubstanz dieses Teils des Samens ausmachten. Es schien demnach, dass diese drei Proteine hauptsächlich im Embryo enthalten wären, und dass das Gliadin und Glutamin nahezu die Gesamtheit der Proteine des Endosperms oder über 90 % des Totalgehaltes an Proteinen des Samens ausmachten.

Darstellung des Albumins Leukosin.

Der Weizenembryo enthält ungefähr 10 % Leukosin, während das ganze Korn zirka 0,3 bis 0,4 % liefert. Das Weizenkeimmehl des Handels, welches fast ganz aus dem Embryo zusammen mit einem geringen Gehalte an Endosperm und Kleie besteht, wurde daher dazu benutzt, um das Leukosin in grösseren Mengen darzustellen.

Das frisch gemahlene Mehl wurde mit Wasser ausgezogen, und da die klebrige Lösung innerhalb einer geeigneten Zeit nicht filtriert werden konnte, wurde ein gleiches Volumen einer gesättigten Lösung von Ammonsulfat hinzugesetzt. Der hierdurch entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser gelöst, die Lösung vollkommen klar filtriert und das Leukosin durch Erhitzen der verdünnten Lösung auf 65° in einem Wasserbad von 70° koaguliert. Da die einzige andere Protein-substanz, die in dieser Lösung vorhanden war, eine relativ unbedeutende Menge von Proteose war, so war das erhaltene Produkt praktisch frei von jedem anderen Protein. Dieses Koagulum wurde mit heissem Wasser gründlich gewaschen, um die beigemischte Proteose zu entfernen, und mit absolutem Alkohol entwässert. Das Präparat bildete ein licht weisses Pulver. In seinen physikalischen Eigenschaften und seiner Elementarzusammensetzung ähnelt das Leukosin den Proteinen der tierischen Gewebe viel mehr wie den Reserveproteinen des Endosperms. Es ist viel weniger stabil wie die letzteren und wird rascher in eine unlösliche Substanz verwandelt.

1) The Journal of the American Chemical Society 1900, S. 22.

Elementarzusammensetzung des Leukosins.

Kohlenstoff	53,02 %
Wasserstoff	6,84 <
Stickstoff	16,80 <
Schwefel	1,28 <
Sauerstoff	22,06 <

Proteine von ähnlicher Zusammensetzung und ähnlichen Eigenschaften wie das Leukosin finden sich in geringer Menge in mehreren Getreidearten und Leguminosen, und es ist möglich, dass diese, wie die meisten der tierischen Proteine, einen Teil des physiologisch tätigen Gewebes des Embryos bilden und bei dem Stoffwechsel des Samens einem anderen Zwecke dienen wie die Reserveproteine des Endosperms. Es ist daher interessant, die Resultate der quantitativen Bestimmungen seiner Zersetzungsprodukte teils mit jenen der Reserveproteine und teils mit jenen von Proteinen aus physiologisch tätigen tierischen Geweben zu vergleichen.

Darstellung des Globulins.

Behandelt man das ganze Weizenmehl mit 10-prozentiger Kochsalzlösung, so gibt es an letztere ungefähr 0,6 % Proteine ab, welche bei der Dialyse in Form winziger Sphäroide niedergeschlagen werden, die ihrerseits zum grössten Teile durch Kochsalzlauge rasch wieder aufgelöst werden. Dieses Protein hat die charakteristischen Eigenschaften einer grossen Anzahl von Globulinen, die man aus anderen Samen erhalten hat, und ähnelt denselben auch in der Zusammensetzung. Ob sich diese Ähnlichkeit auch noch weiter erstreckt, können wir zur Zeit nicht sagen. Die Autoren hofften daher, eine genügende Menge dieses Proteins zu erhalten, um quantitative Bestimmungen der verschiedenen Zersetzungsprodukte vornehmen zu können, aber in dieser Beziehung trat ein Misserfolg ein. Angesichts der geringen Menge, in welcher dieses Globulin aus dem Mehle des ganzen Samens erhalten wird, ist es nicht praktisch, grössere Mengen hieraus darzustellen. Die Verfasser benutzten daher frisch bereitetes Keimmehl, aus welchem das Globulin in erheblicher Menge dargestellt werden kann. Unglücklicherweise tritt es bei diesem Auszuge in Verbindung mit Tritikonkoleinsäure auf, während die Präparate aus dem ganzen Samen von dieser Säure nichts enthielten. Die Versuche, das Globulin von der Säure zu trennen, hatten so grosse

Verluste zur Folge, dass die Verfasser darauf verzichten mussten, genügende Mengen davon für die gegenwärtige Untersuchung darzustellen.

Die Proteosen.

Wässrige Auszüge von Weizenmehl enthalten immer eine kleine Menge von Proteinsubstanz, welche in ihren Eigenschaften mit den Substanzen sehr nahe verwandt ist, die man bei der Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf die nativen Proteine erhält. Es ist wahrscheinlich, dass diese Substanz bis zu einem gewissen Grade, wenn auch nicht ganz, von der Einwirkung der Enzyme des Samens auf die Reserveproteine des Endosperms, sowie auf die Gewebeproteine des Keimes her stammt. Da wir keine Mittel besitzen, den Ursprung dieser Proteosen zu bestimmen oder deren Mischung in Produkte von wahrscheinlicher chemischer Individualität zu spalten, so wurde kein Versuch gemacht, um sie behufs weiterer Untersuchung darzustellen.

Gliadin.

Dieses wichtige Protein bildete das Objekt der ersten Abhandlung dieser Serie aus dem Jahre 1905 ¹⁾, in welcher die Anschauung zurückgewiesen wurde, dass im Weizensamen mehr wie ein alkohollösliches Protein enthalten sei. Es wurde dort auch gezeigt, dass fraktionierte Fällungen des Gliadins aus alkoholischen Lösungen von verschiedenen Konzentrationen ähnliche Mengen von Glutaminsäure liefern. Weizenmehl liefert, ungleich dem Mehle aller anderen Samen, wenn man es mit einer genügenden Menge Wasser vermischt, eine teigige Masse, welche beim Kneten in einem Strom von Wasser an letzteres nahezu alle Stärke und alle in Wasser löslichen Substanzen abgibt und schliesslich eine zusammenhängende und elastische Beschaffenheit erhält. Dies letztere Produkt ist der »Weizenkleber« und besteht aus einer Mischung von zwei Proteinen, dem Gliadin und dem Glutenin, zusammen mit mehr oder weniger anderen Samenbestandteilen.

Zur vorliegenden Untersuchung wurde das Gliadin gänzlich aus Kleber dargestellt, weil hierbei die wasserlöslichen Samenbestandteile vollständiger entfernt werden wie nach jeder anderen Darstellungsmethode. Das Weizenmehl wurde in einem Haushaltungsbrodmischer zu einem Teig geknetet und dann unter Wasser in einer speziell konstruierten Knet-

¹⁾ Vergl. diese Zeitschrift **44**, 517.

maschine behandelt. Nach vielfachem Dekantieren und Erneuern des Wassers erhielt man einen vollständig zusammenhängenden Kleber. Dieser wurde in einem Wasserstrom praktisch stärkefrei gewaschen und noch im feuchten Zustande zerteilt, indem man ihn durch eine Apothekerpresse trieb. Der zerteilte Kleber wurde dann mit Alkohol von solcher Stärke ausgezogen, dass mit dem an den Kleber gebundenen Wasser ein Lösungsmittel von 60—70 Volumprozenten entstand. Die Auszüge wurden durch dicke Filzfilter von Papierpulpe vollständig klar filtriert und die wasserklare Flüssigkeit, frei von jeder Opaleszens oder Trübung, auf dem Wasserbade zu einem geringen Volumen eingedampft. Der so erhaltene dicke Sirup wurde abgekühlt und dann unter anhaltendem und raschem Umrühren in ein grosses Volumen von destilliertem Eiswasser, das etwas Kochsalz enthielt, geschüttet. Das Gliadin wurde so in Strähnen gefällt, die sich beim Umrühren zu einer plastischen Masse vereinigten. Dies Gliadin wurde zunächst mit starkem Alkohol so lange umgerührt, bis alles in Lösung gegangen war, indem das an das gefällte Gliadin gebundene Wasser genügte, um den Alkohol auf den geeigneten Grad zu verdünnen. Die entstandene Lösung wurde zu einem dicken Sirup eingedampft, wobei von Zeit zu Zeit absoluter Alkohol hinzugesetzt wurde, um das Gliadin in Lösung zu halten, da dieses während der Eindampfung immer wässriger wurde. Der dicke Sirup wurde dann in sehr feinem Strahle in ein grosses Volumen absoluten Alkohols unter raschem und anhaltendem Umrühren gegossen. Auf solche Art wurde eine poröse Proteinmasse erhalten, die sofort zu kleinen Stückchen reduziert und mit frischem absolutem Alkohol digeriert wurde. Nach scharfer Entwässerung wurde das Gliadin mit Äther digeriert, teilweise über Schwefelsäure getrocknet, zu einem groben Pulver zermahlen und nun gänzlich über Schwefelsäure ausgetrocknet.

So dargestellt bildet das Gliadin eine schneeweisse, zerreibliche Masse, die leicht in ein Pulver verwandelt werden kann. Trocknet man es durch langsame Verdampfung seiner Lösung in verdünntem Alkohol, so bildet es vollständig klare, durchsichtige Blätter, die reiner tierischer Gelatine sehr ähnlich sehen. Infolge dieser Eigenschaft war das Gliadin lange als Pflanzengelatine bekannt.

In kaltem Wasser ist das Gliadin in geringem Masse löslich, zumal wenn sehr wenig Säure zugegen ist. Es ist höchst wahrscheinlich, dass diese Löslichkeit von der Bildung löslicher Gliadinsalze herrührt und

dass die offenbar geringe Löslichkeit der in obiger Manier dargestellten Präparate durch die Existenz solcher Salze im Samen oder von deren Bildung während des Auszuges bedingt ist.

Gliadin ist unlöslich in absolutem Alkohol und, so weit bekannt, in allen wasserfreien organischen Flüssigkeiten mit Ausnahme des Eisessigs. In wässrigem Alkohol ist es löslich, wobei der Grad der Löslichkeit mit dem Gehalte an Wasser zunimmt, bis dieser 30—40 % ausmacht, und dann abnimmt.

Die Elementaranalyse des Gliadins ist aus folgender Tabelle ersichtlich, welche die Durchschnitte der Ausbeuten von verschiedenen fraktionierten Präparaten enthält.

Prozentuale Zusammensetzung des Gliadins.

	Gliadin (Weizen). Mittel von 25 Analysen.	Gliadin (Roggen). Mittel von 13 Analysen.
Kohlenstoff . . .	52,72	52,75
Wasserstoff . . .	6,86	6,84
Stickstoff . . .	17,66	17,72
Schwefel . . .	1,14	1,21
Sauerstoff . . .	21,62	21,48

Glutenin.

Glutenin wurde aus dem Rückstande des Weizenklebers dargestellt, nachdem das Gliadin mit Alkohol ausgezogen war. Der Rückstand wurde bei Zimmertemperatur getrocknet und dann zu einem Pulver vermahlen, das zuerst mit absolutem Alkohol und dann mit Äther so lange ausgezogen wurde, als eines der beiden Lösungsmittel noch etwas davon herausbrachte. Der Alkohol wurde dann bei Zimmertemperatur weggedunstet und das zurückbleibende Pulver mit eben so viel 0,2-prozentiger Kalilauge behandelt, als gerade nötig war, um es in Lösung zu bringen. Die hierdurch entstehende trübe Lösung wurde vollständig klar filtriert und mit sehr verdünnter Salzsäure neutralisiert. Der entstandene Niederschlag wurde mit 70-prozentigem Alkohol so lange ausgezogen, als noch Gliadin hierdurch entfernt wurde, dann mit absolutem Alkohol gänzlich entwässert und über Schwefelsäure getrocknet.

Prozentuale Zusammensetzung des Glutenins.

Kohlenstoff	52,34
Wasserstoff	6,83
Stickstoff	17,49
Schwefel	1,08
Sauerstoff	22,26

Obwohl die Lösung, aus welcher das Glutenin gefällt wurde, vollständig klar filtriert war, enthält das Produkt doch viel weniger Stickstoff und mehr Kohlenstoff.

Die Übereinstimmung in der Zusammensetzung zwischen dem Glutenin und Gliadin ist sehr nahe und hat viele frühere Forscher verleitet, anzunehmen, dass beide den gleichen Ursprung hätten oder von einander abstammten. Dass dies nicht der Fall ist, bewiesen Kossel und Kutscher, welche unter den Zersetzungsprodukten des Glutenins Lysin fanden, unter denen des Gliadins aber keines. Diese Verschiedenheit wird durch die Ergebnisse der gegenwärtigen Untersuchung noch schärfer betont werden, welche erhebliche Unterschiede in der Menge der verschiedenen Zersetzungsprodukte aufweist.

Eine neue Modifikation der Bestimmung der zitratlöslichen Phosphorsäure in den Futterkalken nach Petermann.

Von

G. Fingerling (Referent) und **A. Grombach**.

(Mitteilung aus der Königl. Württ. landw. Versuchsstation Hohenheim.)

Bekanntlich resorbiert der tierische Organismus von den beiden Kalksalzen, Di- und Trikalzium-phosphat, am ausgiebigsten das erstere, während nach den Untersuchungen Köhler's das tertiäre Salz besonders in Form von Knochenmehl viel schlechter verwertet wird. Diesen Verhältnissen hat der Verband landwirtschaftlicher Versuchsstationen Rechnung getragen, indem er die Forderung aufstellte, dass als Futterkalk nur gefällter phosphorsaurer Kalk zu bezeichnen ist, in welchem — im