

Vergleichende Hydrolyse von Seide durch kochende rauchende Salzsäure, 25 %ige Schwefelsäure, 25 %ige Natronlauge und heiß gesättigte Barytlösung.

Von

Emil Abderhalden, F. Medigreceanu und L. Pincussohn.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Juli 1909.)

Es ist wiederholt die Vermutung ausgesprochen worden, daß die bei der totalen Hydrolyse von Proteinen mit starken Säuren entstehenden Abbauprodukte — die Aminosäuren — zum Teil wenigstens im Eiweiß nicht vorgebildet seien. Es sollten in den Proteinen Komplexe enthalten sein, welche beim Abbau sekundär bestimmte Aminosäuren liefern. Diese Annahme hat wenig für sich. Vor allem spricht die Tatsache, daß beim Abbau der Proteine durch Fermente dieselben Aminosäuren erhalten werden, wie bei der totalen Hydrolyse mit Säuren, dafür, daß die einzelnen Aminosäuren als solche im Eiweiß enthalten sind. Einzig für das Prolin und Oxyprolin ist die Möglichkeit einer sekundären Entstehung nicht ausgeschlossen. Es ist bis jetzt nicht geglückt, diese beiden Aminosäuren aus dem Verdauungsgemisch von Proteinen direkt in reinem Zustande zu isolieren. Umfassende Versuche nach dieser Richtung sind im Gange. Nun finden sich in der Literatur Angaben, wonach die Ausbeuten an verschiedenen Aminosäuren sehr verschiedene sind, je nach dem Mittel, mit dem man den totalen Abbau von Proteinen herbeiführt. So sollte z. B. nach Kutscher und Seemann¹⁾ bei der Spaltung mit siedender

¹⁾ Fr. Kutscher und J. Seemann, Beitrag zur Kenntnis der Verdauung im Dünndarm. Vorläufige Mitteilung. Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 298, 1906.

konzentrierter Salzsäure mehr Glutaminsäure aus einem bestimmten Protein entstehen, als bei Anwendung von 33%iger Schwefelsäure. Der eine von uns hat bereits in Gemeinschaft mit Funk¹⁾ darauf hingewiesen, daß diese Beobachtungen nicht richtig sind. Neuerdings sind Skraup und Türk²⁾ zu dem gleichen Resultat gelangt. Wir hatten auch wiederholt Gelegenheit, die bei der totalen Hydrolyse von bestimmten Proteinen — Edestin, Gliadin, Casein — durch rauchende Salzsäure und 25%ige Schwefelsäure erhaltenen Mengen an Glutaminsäure mit der Ausbeute an dieser Aminosäure zu vergleichen, die bei der successiven Verdauung mit Pankreas- und Darmsaft erhalten worden war. Auch hier fanden sich keine wesentlichen Unterschiede. Es weisen somit alle Beobachtungen darauf hin, daß beim totalen Abbau der Proteine mit verschiedenen Mitteln im allgemeinen dieselben Aminosäuren und in annähernd den gleichen Ausbeuten erhalten werden.

Es erschien uns nicht überflüssig, durch eine systematische Untersuchung eine weitere Klärung der eben erwähnten Frage herbeizuführen. Wir wählten als Ausgangsmaterial einen seiner Zusammensetzung nach möglichst gut bekannten Eiweißkörper, nämlich die Seide. Sie besteht nach den Untersuchungen Emil Fischers fast ausschließlich aus Monoaminosäuren und zwar herrschen Glykokoll, Alanin, Serin und Tyrosin vor. Wir gingen von gewöhnlicher Abfallseide aus. Sie wurde nicht degommiert. Je 100 g dieser Seide wurden 1. mit rauchender Salzsäure, 2. mit 25%iger Schwefelsäure, 3. mit 25%iger Natronlauge und 4. mit heiß gesättigter Barytlösung hydrolysiert. Es wurden bestimmt Tyrosin, Glykokoll und Alanin. Es ergab sich, daß die Ausbeuten an diesen Aminosäuren annähernd die gleichen waren. Die Unterschiede lassen sich ohne weiteres auf die angewandte Methodik zurückführen. Hervorgehoben sei, daß

¹⁾ Emil Abderhalden und Casimir Funk, Beitrag zur Kenntnis der beim Kochen von Casein mit 25%iger Schwefelsäure und mit starker Salzsäure entstehenden Spaltungsprodukte. Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 19, 1907.

²⁾ Zd. H. Skraup und W. Türk, Notiz über die Hydrolyse von Casein mit Salzsäure und Schwefelsäure. Monatshefte für Chemie, Bd. XXX, S. 287, 1909.

bei der Hydrolyse mit Natronlauge und mit Baryt die Ausbeuten an Tyrosin etwas höher waren, als bei der Hydrolyse mit Säuren; ferner ist von Interesse, daß, wie vorauszusehen war, beim Abbau mit Alkalien ausgedehnte Racemisierung eintritt, und zwar erfolgt sie offenbar schon vor erfolgtem Abbau, wie Beobachtungen bei der partiellen Hydrolyse von Seide mit Natronlauge und mit Baryt ergaben. Über diese Versuche soll später berichtet werden.¹⁾

1. Hydrolyse mit rauchender Salzsäure (spez. Gew. 1,19).

Die Hydrolyse wurde in üblicher Weise durch 6 stündiges Kochen mit der 3fachen Menge Säure herbeigeführt. Das dunkel gefärbte Hydrolysat wurde filtriert. Der Rückstand wog nach wiederholtem Auswaschen mit Salzsäure, Wasser und Alkohol 3,5 g. Die Waschwässer wurden mit dem Filtrat vereinigt und die Salzsäure mit der berechneten Menge Natronlauge genau neutralisiert. Vom ausfallenden Tyrosin wurde abfiltriert. Es fiel zunächst in Form dunkelbraun gefärbter Flocken aus. Die Ausbeute an Tyrosin betrug nach erfolgtem Umkrystallisieren aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle 6,2 g.

Die Mutterlauge vom Tyrosin wurde unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft und der Rückstand dann in gewohnter Weise verestert. Der ganze Prozeß wurde nach jedesmaliger Abscheidung des Glykokollesterchlorhydrates so lange wiederholt, bis keine Krystallisation mehr erfolgte. Die Ausbeute an Glykokoll betrug 26 g.

Die Mutterlauge vom Glykokollesterchlorhydrat wurde nunmehr unter vermindertem Druck verdampft und die Ester mit Kaliumcarbonat und Alkali in üblicher Weise in Freiheit gesetzt. Die Ester wurden in zwei Fraktionen aufgefangen, nämlich bei 0,3 mm Druck bis 100° des Wasserbades und von 100—200° des Ölbadess bei gleichem Druck.

¹⁾ Vgl. hierzu: A. Kossel und F. Weiss, Über die Einwirkung von Alkalien auf Proteinstoffe. I. Mitteilung. Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 492, 1909, und II. Mitteilung. Ebenda, Bd. LX, S. 311, 1909.

Fraktion I hinterließ nach erfolgter Verseifung mit Wasser und Eindampfen einen Rückstand von 25 g.

Fraktion II wog nach Verseifung mit Baryt und Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure und Eindampfung des Filtrates vom Baryumsulfat 10 g.

An Alanin wurden isoliert 13,5 g. $[\alpha]_{20}^D = + 9,2^\circ$ (in der berechneten Menge Salzsäure gelöst).

2. Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure.

100 g Seide wurden mit 500 ccm 25%iger Schwefelsäure 16 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Es hinterblieb ein Rückstand von 4,2 g. Das filtrierte Hydrolysat wurde mit Baryt quantitativ von Schwefelsäure befreit. Der abfiltrierte Baryumsulfatniederschlag wurde so lange mit Wasser ausgekocht, bis das Filtrat keine Millonsche Reaktion mehr gab. Sämtliche Filtrate wurden dann eingengt und das in verschiedenen Fraktionen ausgeschiedene Tyrosin aus heißem Wasser umkrystallisiert. Ausbeute 7,0 g Tyrosin.

Die weitere Verarbeitung erfolgte in genau der gleichen Weise, wie es oben bei der Salzsäurehydrolyse beschrieben wurde. Die entsprechenden Werte sind:

Ausbeute an Glykokoll 26,5 g, an Alanin 12,9 g.
 $([\alpha]_{20}^D = + 8,9^\circ)$.

Fraktion I wog 23,0 g.

Fraktion II wog 8,0 g.

3. Hydrolyse mit 25%iger Natronlauge.

100 g Seide wurden mit 500 ccm 25%iger Natronlauge 20 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das filtrierte Hydrolysat hinterließ beim Filtrieren einen Rückstand von 4,0 g. Die Natronlauge wurde mit Salzsäure genau neutralisiert und die Lösung zur Abscheidung des Tyrosins eingengt. Ausbeute an Tyrosin = 8,0 g. $([\alpha]_{20}^D \text{ in } 4\% \text{ iger Salzsäure} = 0)$.

Die Mutterlauge vom Tyrosin wurde eingedampft und nach Zugabe von Alkohol gasförmige Salzsäure eingeleitet. Vom Kochsalz wurde sofort heiß abfiltriert und der Rückstand so

lange mit heißer alkoholischer Salzsäure gewaschen, bis er schneeweiß war. Die Veresterung wurde auch hier so lange wiederholt, bis alles Glykokoll als Esterchlorhydrat ausgefallen war. Ausbeute an Glykokoll 27,0 g.

Die Verarbeitung auf die übrigen Aminosäuren erfolgte wie oben beschrieben. Fraktion I wog 20,0 g und Fraktion II 7,0 g. Ausbeute an Alanin 13,5 g. ($[\alpha]_{20}^D = 0^\circ$).

4. Hydrolyse mit gesättigter Barytlösung.

500 ccm Wasser wurden heiß mit Baryt gesättigt und auf 100 g Seide gegossen. Die Hydrolyse war nach 60stündigem Kochen vollständig. Das Hydrolysat wurde heiß abfiltriert. Es hinterblieb ein Rückstand von 9,0 g. Das Filtrat wurde durch Zugabe von Schwefelsäure quantitativ von Baryt befreit und dann in der üblichen Weise Tyrosin abgeschieden. Selbstverständlich wurde auch hier der Baryumsulfatniederschlag gründlich ausgekocht. Ausbeute an Tyrosin 7,5 g, an Glykokoll 20,0 g und an Alanin 11,0 g. Tyrosin und Alanin waren vollständig racemisch. Fraktion I wog 18,5 g und Fraktion II 8,5 g.

Überblickt man die erhaltenen Resultate und berücksichtigt man die mannigfaltigen Manipulationen und die dadurch bedingten Fehlerquellen, dann kommt man zum Schlusse, daß in engen Grenzen gleiche Mengen an Aminosäuren erhalten werden, gleichgültig, ob man Säuren oder Alkalien zur Hydrolyse von Seide verwendet. Wir haben diese Versuche dreimal durchgeführt und stets das gleiche Resultat erhalten. Erwähnt sei noch, daß beim Stehen von Seide mit 33%iger Natronlauge schon bei Zimmertemperatur auffallend bald Tyrosin frei wird.
