

Ueber die Spaltungsprodukte der aus Coniferensamen darstellbaren Proteinstoffe.

Von
E. Schulze.

(Aus dem agriculturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 22. October 1897.)

Wie von mir nachgewiesen worden ist,¹⁾ findet sich in den Keimpflanzen von *Abies pectinata* und *Picea excelsa* Arginin in grösserer Quantität, als irgend ein anderes abscheidbares Produkt des Eiweissumsatzes: bei *Abies* fiel von der in einem eiweissfreien Extract enthaltenen Stickstoffmenge ein weit grösserer Theil auf die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Basen (Arginin etc.), als auf alle übrigen Verbindungen zusammen. Diese Beobachtungen veranlassten uns, auch die Spaltungsprodukte zu untersuchen, welche ein aus den *Abies*-Samen nach dem Ritthausen'schen Verfahren dargestelltes Proteinstoff-Präparat beim Erhitzen mit Salzsäure lieferte. Es zeigte sich, dass diese Spaltungsprodukte eine ganz ungewöhnlich grosse Quantität von Basen einschlossen: in dem durch Phosphorwolframsäure in der Zersetzungsflüssigkeit hervorgerufenen Niederschlage fand sich mehr als ein Drittel des Gesamtstickstoffs dieser Flüssigkeit vor. Bei Mittheilung dieses Resultates²⁾ erwähnte ich, dass dasselbe durch später auszuführende Versuche kontrolirt werden solle. Die Ergebnisse dieser, grösstentheils von N. Rongger in meinem Laboratorium ausgeführten Versuche theile ich im Folgenden in aller Kürze mit.³⁾

1) Diese Zeitschrift. Bd. 22, S. 435.

2) Ebendasselbst, S. 445.

3) Ausführlicher wird Herr N. Rongger an anderem Orte über die bezügliche Untersuchung berichten.

Zur Verwendung kamen zwei Proteinsubstanz-Präparate, von denen das eine nach dem Ritthausen'schen Verfahren¹⁾ aus den Samen von *Picea excelsa*, das zweite in der gleichen Weise aus den Samen von *Abies pectinata* dargestellt war. Das erstere Präparat war das reinere: es enthielt in der Trockensubstanz 17,1% Stickstoff. Das aus den *Abies*-Samen gewonnene Präparat war braun gefärbt und enthielt nur 12,3% Stickstoff. In kochender 20%iger Salzsäure löste sich dieses Präparat auch bei längerem Erhitzen nicht vollständig auf: das Ungelöste bildete nach dem Abfiltrieren, Auswaschen und Trocknen eine dunkelbraun gefärbte Masse mit einem Stickstoffgehalt von 2%. Es ist wohl das Wahrscheinlichste, dass dieser Stickstoffgehalt von unvollständiger Auflösung des Proteins herührte und dass dem Präparat eine stickstofffreie Substanz beigemischt war.²⁾ Diese Substanz löste sich bei Behandlung des Präparates mit verdünnter Natronlauge mit dem Protein auf und schied sich nach Zusatz von Essigsäure mit letzterem wieder aus.

A. Proteinsubstanz aus den Samen von *Picea excelsa*.

Wir erhitzen 130 gr. der lufttrocknen Proteinsubstanz, 106,3 gr. wasserfrei, mit der vierfachen Menge 20%iger Salzsäure und etwas Zinnchlorür zuerst im Wasserbade, dann

1. Die Proteinsubstanzen wurden aus den zerkleinerten und entfetteten Samen mit möglichst schwacher Alkalilauge ausgezogen, aus den Extracten mit Essigsäure ausgefällt, dann nacheinander mit Wasser, verdünntem und starkem Weingeist ausgewaschen. Wir wählten diese Darstellungsmethode, weil es uns darauf ankam, die in den Samen enthaltenen Proteinstoffe möglichst vollständig zu gewinnen. Die so gewonnen Substanzen bezeichne ich hier mit dem allgemeinen Namen »Proteinstoffe«, weil ihre Eigenschaften bis jetzt von uns nicht näher untersucht wurden; wir vermögen daher zur Zeit auch nicht anzugeben, welcher Untergruppe der »Proteinstoffe« sie angehören.

2. Da eine nach Stutzer's Verfahren ausgeführte Bestimmung zeigte, dass in den Samen von *Abies* nur 0,05% Stickstoff auf nicht proteinartige Verbindungen fielen, so ist nicht wahrscheinlich, dass der aus diesen Samen dargestellten Proteinsubstanz eine Stickstoffverbindung anderer Art beigemischt war.

96 Stunden lang über freier Flamme am Rückflusskühler. Nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit verdünnt und zur Entfernung des Zinns mit Schwefelwasserstoff behandelt, hierauf zur Syrupconsistenz eingedunstet. Den Syrup verdünnten wir mit Wasser und setzten dann eine Auflösung von krystallisirter Phosphorwolframsäure zu. Es entstand ein so starker Niederschlag, dass die Flüssigkeit sich fast in einen Brei verwandelte. Der Niederschlag wurde abfiltrirt und mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, bis das Filtrat nur noch Spuren von Salzsäure enthielt. Dann zerlegten wir diesen Niederschlag mit reiner Kalkmilch unter Zusatz von etwas Barytwasser. Die so erhaltene Basenlösung wurde nach dem Einleiten von Kohlensäure und darauf folgender Filtration mit Schwefelsäure neutralisirt. Aus dieser Flüssigkeit wurde das Arginin nach der vortrefflichen Methode S. G. Hedin's¹⁾ als basisches Argininsilbernitrat = $C^6H^{14}N^4O^2, AgNO^3 + \frac{1}{2}H^2O$ abgeschieden. Wir erhielten eine reichliche Menge dieses in kaltem Wasser sehr schwer löslichen Salzes. Der Silbergehalt desselben entsprach der obigen Formel (berechnet 30,59% gefunden 30,60 und 30,62% Ag). Das bei Zerlegung dieser Silberverbindung erhaltene Nitrat der Base stimmte im Aussehen und in den Reactionen²⁾ mit dem aus Keimpflanzen dargestellten Argininnitrat überein. Aus der in der Wärme mit Kupferoxydhydrat gesättigten Lösung dieses Nitrats krystallisirte beim Erkalten in dunkelblauen, zu Gruppen vereinigten Prismen eine Kupferverbindung, welche das Aussehen des Kupferargininnitrats = $(C^6H^{14}N^4O^2)^2 Cu(NO^3)^2 \cdot 3H^2O$ besass und in Bezug auf den Kupfer- und Krystallwassergehalt der vor-

1) Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 166—168.

2) Eine kleine Verschiedenheit bestand jedoch darin, dass die wässrige Lösung dieses Nitrats mit Mercurinitrat keinen Niederschlag gab, während das aus Keimpflanzen gewonnene Argininnitrat mit diesem Reagens eine Fällung gibt. Allerdings ist die Fällung nur eine schwache, wenn man dieses Nitrat durch Ueberführung in die schwer lösliche Kupferverbindung und durch Umkrystallisiren gereinigt hat. Dass man aus Pflanzenextracten das Arginin durch Ausfällung mit Mercurinitrat gewinnen kann, ist von mir in einer grossen Anzahl von Fällen gezeigt worden.

stehenden Formel entsprach (berechnet 9,16% H_2O und 10,73% Cu, gefunden 9,13% H_2O und 10,82% Cu). Diese Angaben beweisen, dass die von uns zur Abscheidung gebrachte Base Arginin war.

Wir erhielten in dem beschriebenen Versuche, bei Anwendung von 106,3 gr. Proteinsubstanz (wasserfrei), nicht weniger als 22 gr. des basischen Argininsilbernitrats = 11 gr. Arginin: 100 Th. der Proteinsubstanz hatten also etwas mehr als 10 Th. Arginin geliefert, während S. G. Hedin¹⁾ aus den von ihm untersuchten Proteinstoffen nur 0,25—2,75% Arginin erhielt.

Um festzustellen, wie viel vom Stickstoff der Proteinsubstanz nach der Zersetzung im Ganzen in Form von Basen sich vorfand, erhitzen wir in einem zweiten Versuche 90 gr. Proteinsubstanz (wasserfrei) in der oben beschriebenen Weise mit 20% iger Salzsäure und füllten die Zersetzungsflüssigkeit, nachdem sie durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Zinn befreit und zur Entfernung eines Theils der Salzsäure zur Syrupconsistenz eingedunstet worden war, mit Wasser auf 1 Liter auf: abgemessene Antheile dieser Flüssigkeit (je 10 ccm.) wurden sodann mit Phosphorwolframsäure in schwachem Ueberschuss versetzt, die so erhaltenen Niederschläge abfiltrirt, mit 5% iger Schwefelsäure vollständig ausgewaschen und zur Stickstoffbestimmung nach der Kjeldahlschen Methode verwendet. Ausserdem bestimmten wir in der gleichen Flüssigkeit den Ammoniakgehalt durch Destillation mit Magnesia.²⁾ Die Bestimmungen ergaben folgende Mittelzahlen:

	10 ccm der Flüssigkeit gaben
Stickstoff im Phosphorwolframsäure-Niederschlag . . .	0,06530 gr.
„ in Ammoniakform	0,01185 „
<hr/>	
Differenz (Stickstoff in organischen Basen)	0,04445 gr.

Da die für den Versuch verwendeten 90 gr. Proteinsubstanz 15,3 gr. Stickstoff enthalten hatten, so ergibt sich, dass nach der Zersetzung 29% des Protein-Stickstoffs in Form

1) Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 165.

2) Vor dem Zusatz der Magnesia wurde die Flüssigkeit mit Natronlauge annähernd neutralisirt.

von organischen Basen sich vorfanden. Mehr als zwei Drittel dieses Betrags fallen zweifellos auf das Arginin;¹⁾ die Untersuchung der neben letzterem sich noch vorfindenden Basen ist von uns noch nicht vollendet worden.²⁾

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäure-Niederschlag lieferte, nachdem es von der überschüssigen Phosphorwolframsäure, von der Schwefelsäure und von der Salzsäure befreit worden war, nach dem Eindunsten eine krystallinische Ausscheidung, aus welcher leicht Tyrosin und Leucin isolirt werden konnten.

B. Proteinsubstanz aus den Samen von *Abies pectinata*.

Wie oben schon erwähnt ist, war die aus den Abies-Samen dargestellte Proteinsubstanz verunreinigt durch einen anderen, wahrscheinlich stickstofffreien Körper. Wir verwendeten von dieser Proteinsubstanz 75 gr. = 63,6 gr. wasserfrei. Nach längerem Erhitzen mit der 4fachen Menge 20%iger Salzsäure wurde das ungelöst Gebliebene mit Hilfe von Glaswolle abfiltrirt: das Gewicht desselben betrug nach dem Auswaschen und Trocknen 20 gr: es waren demnach 43,6 gr. in Lösung gegangen. Das Filtrat wurde nun am Rückflusskühler weiter erhitzt: die Kochdauer betrug 96 Stunden, nachdem zuvor schon 24 Stunden lang im Wasserbade erhitzt worden war. Die Zersetzungsflüssigkeit wurde ebenso behandelt, wie es oben bei Beschreibung des mit der anderen Proteinsubstanz angestellten Versuchs angegeben worden ist, und dann mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Von dieser Flüssigkeit wurden 120 ccm für die w. u. mitgetheilten quantitativen Bestimmungen verwendet: 880 ccm. dienten zur Abscheidung des Arginins. Wir erhielten 7,9 gr. basisches Argininsilbernitrat = 3,95 gr. Arginin. Die ganze Flüssigkeit würde also 4,5 gr. Arginin

1) Das Arginin enthält 32,2% Stickstoff; da nun 100 Th. Proteinsubstanz à 17,1% Stickstoff 11 Th. Arginin à 32,2% Stickstoff geliefert haben, so ergibt sich, dass 20,7% vom Stickstoff der Proteinsubstanz in der Zersetzungsflüssigkeit in Form von Arginin sich vorfanden.

2) Vermuthen darf man, dass neben dem Arginin noch Lysin und Histidin sich vorfanden.

geliefert haben. Da nun nur 43,6 gr. Proteinsubstanz zur Zersetzung gelangt waren, so war auch in diesem Versuch die Ausbeute an Arginin eine sehr hohe: sie betrug ungefähr 10%₀ der verwendeten Proteinsubstanz.

Die quantitativen Bestimmungen wurden ebenso ausgeführt, wie es oben bei Beschreibung des ersten Versuchs angegeben worden ist: doch haben wir in diesem Falle auch den Gesamtstickstoff der Zersetzungsflüssigkeit bestimmt.¹⁾ Es ergaben sich folgende Mittelzahlen:

	10 cem. der Flüssigkeit gaben
Gesamtstickstoff	0,06892 gr.
Stickstoff im Phosphorwolframsäure-Niederschlag	0,02683 ..
.. in Ammoniakform	0,00807 ..

Auf organische Basen fielen also 0,01876 gr. Stickstoff pro 10 cem., oder 27,3%₀ des Gesamtstickstoffs — eine Zahl, welche der im ersten Versuch gefundenen (= 29%₀) sehr nahe liegt.²⁾ Auch hier fallen ungefähr zwei Drittel dieses Betrags auf Arginin.

Aus den im Vorigen gemachten Mittheilungen ist zu ersehen, dass die aus den Coniferensamen dargestellten Proteinsubstanzen bei der Zersetzung durch Salzsäure eine viel grössere Quantität von Arginin lieferten, als die von S. G. Hedin untersuchten Glieder der gleichen Stoffgruppe; unsere Ausbeute

1) Da die für diesen Versuch verwendete Proteinsubstanz nicht rein war und beim Auflösen in Salzsäure einen starken Rückstand liess, so hielten wir es für das Richtigeste, bei der obigen Berechnung von der Stickstoffmenge auszugehen, welche in der Zersetzungsflüssigkeit auf diesem Wege gefunden wurde.

2) Die Zahl ist niedriger, als die früher (diese Zeitschrift. Bd. 22. S. 445) von mir angegebene. Doch habe ich die letztere damals nur mit Vorbehalt mitgetheilt, weil nicht nur bei Zersetzung der bezüglichen Proteinsubstanz, welche übrigens aus einem anderen Muster von Abies-Samen dargestellt war, die Dauer des Erhitzens mit Salzsäure der dafür gegebenen Vorschrift nicht ganz entsprach, sondern auch die Anordnung des Versuchs noch in einigen anderen Punkten eine mangelhafte war.

an Arginin betrug ungefähr 10⁰/₀ der verwendeten Proteinsubstanz, während Hedin in Maximo 2,75⁰/₀ Arginin erhielt. Die Proteinsubstanzen der Coniferensamen bilden also ein sehr gutes Material für die Darstellung von Arginin. Die Thatsache aber, dass die verschiedenen Proteinstoffe eine so ungleiche Argininmenge liefern, ist auch deshalb von Interesse, weil sie im Verein mit anderen Beobachtungen erkennen lässt, dass diese Stoffe eine ungleiche Constitution besitzen.

Bekanntlich hat A. Kossel¹⁾ gefunden, dass die Protamine, welche nach seinen Untersuchungen bei der Zersetzung durch Säuren nur Basen, nämlich Arginin, Histidin und Lysin, liefern, sich mit Eiweissstoffen zu neuen Eiweisskörpern zu verbinden vermögen. Mit dieser Beobachtung verknüpft Kossel sehr bemerkenswerthe Anschauungen über die Constitution der Eiweissstoffe. Es ist wahrscheinlich, dass die Protamine gewissermassen als Kern im Eiweissmolekül enthalten sind; an diesen Kern können Amidosäuren der aliphatischen und der aromatischen Reihe, schwefelhaltige Atom-complexe u. s. w. sich anlagern. Die Verschiedenheit der zahlreichen Glieder der genannten Stoffgruppe beruht darauf, dass entweder hier und da einzelne Componenten fehlen oder dass diese Componenten in ungleichen quantitativen Verhältnissen sich vorfinden. Es kann z. B. vorkommen, dass eine Gruppe, z. B. die basenbildende Gruppe, in einem grösseren Molekül mehrmals enthalten ist.

Diesen Anschauungen Kossel's entsprechen die Ergebnisse, die wir bei Untersuchung der Spaltungsprodukte der aus den Coniferensamen dargestellten Proteinsubstanzen erhalten haben. Man darf annehmen, dass diese Proteinsubstanzen die basenbildende Gruppe in grosser Menge enthielten und dass sie deshalb sowohl bei der Spaltung durch Salzsäure, als auch

1) A. Kossel, über die einfachsten Eiweisskörper, Sitzungsberichte der Gesellschaft zur Beförderung der gesammten Naturwissenschaften in Marburg, 1897, Nr. 5; man vergleiche auch Kossel's Mittheilungen in dieser Zeitschrift, Bd. 22, S. 176.

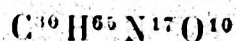
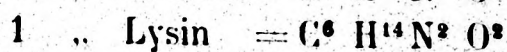
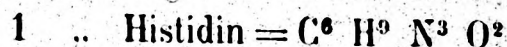
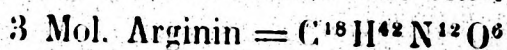
beim Zerfall während des Keimungsvorgangs¹⁾ eine ungewöhnlich grosse Quantität von Basen, insbesondere von Arginin, lieferten.

Kossel hält es für wahrscheinlich, dass bei der Hydrolyse des Protamins auf 3 Moleküle Arginin 1 Molekül Histidin und 1 Molekül Lysin entstehen.²⁾ Legt man dieses Mengenverhältniss zu Grunde, so würde aus der Elementarzusammensetzung der genannten Basen sich ergeben, dass in dem aus dem Protamin entstehenden Basengemenge etwas mehr als zwei Drittel des Gesamtstickstoffs auf Arginin fallen. Auch von der Stickstoffmenge, die sich in den bei Spaltung unserer Proteinsubstanzen mit Salzsäure erhaltenen Flüssigkeiten in Form von organischen Basen vorfand, fielen aber nach den von uns ausgeführten Bestimmungen zwei Drittel auf Arginin, eine Uebereinstimmung, welche noch als Stütze für die von Kossel ausgesprochenen Ansichten dienen kann.

Es ist schliesslich noch darauf aufmerksam zu machen, dass die zur Darstellung der Proteinsubstanzen aus den Coniferensamen von uns benutzte Methode keine Gewähr dafür leistet, dass unsere Präparate nicht Gemenge mehrerer Protein-

1) Dass in den Keimpflanzen die Basen noch stärker prävalirten, als in den bei der Spaltung der Proteinsubstanzen durch Salzsäure erhaltenen Lösungen, ist nicht schwer zu erklären; ich verweise auf die Darlegungen, die ich darüber in dieser Zeitschrift, Bd. 24, S. 59, Anmerkung 1 gemacht habe.

2) Der Abhandlung Kossel's entnehme ich folgendes:



Nimmt man an, dass diese 5 Moleküle Basen sich unter Verlust von 4 Molekülen Wasser vereinigt haben, so resultirt für die so entstandene Verbindung die Formel $\text{C}^{30} \text{H}^{57} \text{N}^{17} \text{O}^6$; dies ist aber die Formel, welche Kossel für ein Protamin, nämlich für das Clupein, festgestellt hat. Es ist daher wahrscheinlich, dass in diesem Körper die Basen in dem angegebenen Mengenverhältniss vorhanden waren.

stoffe waren. Gesetzt, dass ein Gemenge vorlag, so würden dadurch doch die aus unseren Versuchen von uns abgeleiteten Schlussfolgerungen kaum beeinträchtigt werden.¹⁾ Bei einer von uns in Aussicht genommenen näheren Untersuchung der Proteinstoffe der Coniferensamen werden wir aber auch die obige Frage zu entscheiden suchen.

1) Doch liegt auf der Hand, dass dann ein Gemenge von Proteinstoffen vorgelegen haben kann, von denen der eine weniger, ein anderer mehr Arginin und andere Basen lieferte, als den oben gemachten Angaben entspricht.