

## Ueber das Fibroin und den Leim der Seide.

Von

Emil Fischer und Aladar Skita.

(Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 18. März 1902.)

In der ersten Mittheilung<sup>1)</sup> haben wir gezeigt, dass das Seidenfibroin vorzugsweise aus Monoaminosäuren zusammengesetzt ist, unter denen Glycocoll und Alanin an Menge bei Weitem überwiegen und einen grösseren Procentgehalt ausmachen, als in irgend einem anderen Proteinstoff bisher gefunden wurde.

Es schien uns deshalb die Möglichkeit nicht ausgeschlossen zu sein, dass hier ein besonders reines Material vorliege, in dem die Diaminosäuren gar nicht vorhanden seien.

Zwar hat Wetzell angegeben, dass unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten Histidin sich befinde; aber es war zweifelhaft, wie wir schon früher hervorhoben, ob das von ihm untersuchte Material rein gewesen sei.

Wir haben deshalb ein besonders sorgfältig gereinigtes Fibroin der Hydrolyse unterworfen und auf Diaminosäuren geprüft. Ihre Menge war allerdings sehr gering, aber es konnte doch Arginin mit voller Sicherheit nachgewiesen werden. Bei dieser Gelegenheit wurde eine Lücke der früheren Arbeit ausgefüllt, indem es gelang, die schon damals vermuthete Anwesenheit von Serin in den Spaltungsprodukten des Fibroins zu beweisen. Wir glauben diese Beobachtung besonders hervorheben zu dürfen, da das Serin, welches zur Zeit noch die

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 177 (1901).

einzig natürliche Oxyaminosäure der aliphatischen Reihe ist, bisher nur im Seidenleim aufgefunden wurde, und wir machen von Neuem darauf aufmerksam, dass diese Oxyaminosäuren eine bis jetzt gar nicht gewürdigte grosse Bedeutung für das Studium der Proteine haben.

Wesentlich verschieden vom Fibroin ist in den äusseren Eigenschaften der Seidenleim und wir haben deshalb auch die Zusammensetzung dieses Materials mit den neuen Methoden geprüft. Wie schon in der ersten Mittheilung erwähnt wurde, liefert derselbe bei der Hydrolyse eine reichliche Menge von Diaminosäuren, unter denen wir jetzt das Arginin sicher nachgewiesen haben. Aber der Unterschied in der Zusammensetzung von Seidenleim und Fibroin scheint doch wesentlich nur ein quantitativer zu sein: denn die Monoaminosäuren, welche dort gefunden wurden, scheinen auch hier vorhanden zu sein. Neben dem von Cramer nachgewiesenen Tyrosin und Serin haben wir gefunden Alanin und Spuren von Glycocoll. Für den Nachweis von Leucin und Phenylalanin fehlte uns das Material.

#### **Spaltungsprodukte des Fibroins.**

**Serin.** Werden die Ester der Monoaminosäuren auf die früher beschriebene Weise bei 8—10 mm. Druck destillirt, so befindet sich der Serinester in der Fraction 90—140°. Aber es ist schwierig, aus diesem Material die reine Oxyaminosäure zu isoliren, weil bei der Destillation Zersetzungen eintreten, welche die Menge der Aminosäure verringern und schwer zu entfernende Nebenprodukte entstehen lassen. Diese Schwierigkeit wird beseitigt, wenn die Destillation bei viel niedrigerem Druck stattfindet. Wir haben deshalb das Gemisch der Ester zunächst auf dem Wasserbade bei 8—10 mm. Druck abdestillirt und die weitere Fractionirung bei 0,5 mm. ausgeführt. Bei einer Temperatur des Bades von 100—120° wurde eine Fraction der Ester gewonnen, welche bei Anwendung von 250 g Fibroin 8 g betrug und den Ester des Serins enthielt. Diese Fraction wurde zunächst mit etwa der fünffachen Menge Petroläther durchgeschüttelt und der unge-



löste Theil, dessen Menge 6 g betrug, mit einer Lösung von 12 g Barythydrat in 60 cem. Wasser durch dreistündiges Erwärmen auf dem Wasserbade verseift. Nach der genauen Ausfällung des Barythydrates durch Schwefelsäure gab die Lösung beim Verdampfen etwas mehr wie 4 g krystallisirtes Serin.

Nach dem Umkrystallisiren aus heissem Wasser hatte das Präparat den Schmelzpunkt  $245^{\circ}$  (corr.) und die Zusammensetzung des Serins.

0.1823 g Substanz gaben 0.2279 g  $\text{CO}_2$  und 0.1100 g  $\text{H}_2\text{O}$ .  
0.2147 g Substanz lieferten 24.6 cem. N bei  $16.5^{\circ}$  und 756 mm. Druck.

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3\text{N}$	Gefunden:
C 34.30	C 34.09
H 6.67	H 6.70
N 13.30	N 13.29

Die Menge des isolirten Serins betrug 1,6% des Fibroins. In Wirklichkeit ist dieselbe aber jedenfalls erheblich grösser, da bereits bei der Darstellung und Isolirung des Esters starke Verluste unvermeidlich sind.

Diaminosäuren. Für die Aufsuchung derselben dienten die letzten Mutterlaugen, welche blieben, als nach der Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure<sup>1)</sup> und genauer Entfernung der Säure durch Barythydrat, aus der eingedampften Lösung die Monoaminosäuren herauskrystallisirt waren. Sie wurden zunächst auf 150 cem. verdünnt und dann nach dem Verfahren von Kossel<sup>2)</sup> untersucht. Das Arginin wurde in Form des bekannten Argininsilbernitrats  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3 + \text{AgNO}_3$  isolirt. Die Verbindung zeigte den Schmelzpunkt  $183-184^{\circ}$ .

0.0910 g Substanz gaben beim Glühen 0.0243 g oder 26.70% Ag.

Berechnet: 26.53% Ag

Sie drehte schwach nach rechts.

Die Menge des Arginins aus der Silberverbindung berechnet betrug 1% des Fibroins. Für das Histidin und Lysin wurden bei dem Kossel'schen Verfahren die entsprechenden Niederschläge erhalten, aber doch so wenig, dass der weitere Nachweis nicht mit Sicherheit geführt werden konnte.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 177 (1901).

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 176 und Bd. XXVI, S. 588 (1898).

**Seidenleim.**

Zur Darstellung des Seidenleims haben wir gelbe, lombardische Rohseide zweimal mit je 25 Theilen Wasser jedesmal 3 Stunden im Autoclaven im grossen Porzellanbecher auf 118° erhitzt und dann die wässrige Lösung verdampft. Die Ausbeute betrug ungefähr 25% der Rohseide und das erhaltene Produkt war eine dunkle, glasige, leimähnliche Masse, die wir absichtlich ohne weitere Reinigung zur Hydrolyse benutzt haben. Letztere wurde für die Untersuchung auf Diaminosäuren in folgender Weise mit verdünnter Schwefelsäure ausgeführt. 1 Theil Seidenleim wurde mit einem Gemisch von 2 Theilen concentrirter Schwefelsäure und 8 Theilen Wasser am Rückflusskühler 24 Stunden gekocht, die Schwefelsäure mit Barythydrat genau ausgefällt und die Flüssigkeit mit Thierkohle entfärbt. Beim Eindampfen, das am besten bei vermindertem Druck vorgenommen wird, krystallisirt zuerst das Tyrosin, von dem durch die optische Untersuchung der Lösung in 21%iger Salzsäure festgestellt wurde, dass gewöhnliches l-Tyrosin vorlag. Später folgt, aber ziemlich langsam, das Serin. Die dann verbleibenden Mutterlaugen dienen für den Nachweis der Diaminosäuren.

Diese Untersuchung geschah wieder nach dem Verfahren von Kossel. Das Argininsilbernitrat hatte den Schmelzpunkt 183-184° und die spec. Drehung  $[\alpha]_D^{20} = +5,0$  (während Gulewitsch  $\alpha = +5,6$  fand.<sup>1)</sup>

0,1720 g Substanz gaben beim Glühen 0,046 g Ag, berechnet 26,53% Ag, gefunden 26,74% Ag.

Aus der Silberverbindung berechnet, betrug die Menge des Arginins 4% des Seidenleims, war also 4 mal so gross als bei dem Fibroin.

Das Lysin wurde als Pikrat isolirt. Leider ist die Analyse des gereinigten Präparats, dessen Menge sehr klein war, missglückt.

Für die Aufsuchung der Monoaminosäuren mittelst der Estermethode wurde eine neue Menge Seidenleim, genau so

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 178. (1899.)



wie es beim Fibroin beschrieben ist,<sup>1)</sup> durch Salzsäure hydrolysiert und die Aminosäuren in die Ester übergeführt. Die Menge des Glycocolls ist so gering, dass aus der salzsauren alkoholischen Lösung das Hydrochlorat nicht auskrystallisierte. Bei der Destillation der Ester, welche aus 120 g Seidenleim gewonnen waren, ergaben sich folgende Fractionen.

a) Destillation bei 8—10 mm. Druck:		
1. Fraction 43—75°	. . . . .	10,5 g
2. [            75—80°	. . . . .	1,0
b) Destillation bei 0,5 mm. Druck:		
3. Fraction bis 100° (Temperatur des Bades)	. . . . .	1,0 g
4.            100—125°	. . . . .	18,0
5.            125—180°	. . . . .	3,0

Glycocoll. Aus der ersten Fraction (43—75°) wurden zunächst etwa 1½ cem. abdestilliert, mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt und Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach dem Einimpfen und langem Stehen bei niederer Temperatur war salzsaurer Glycocollester aus der Lösung gefallen. Nach dem Umkrystallisiren aus Alkohol hatte das Präparat den Schmelzpunkt 144°. Seine Menge betrug nur 0,2 g oder 0,1% des Seidenleims, während aus dem Fibroin 36% Glycocoll isolirt wurden.

Alanin. Der übrige Theil der ersten Fraction war zu meist Alaninester. Dieser wurde mit der 10fachen Menge Wasser verseift und das Alanin durch Krystallisation gereinigt.

0,1744 g Substanz gaben 0,2575 g CO<sub>2</sub> und 0,1242 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet:	Gefunden:
40,45% C	40,27% C
7,86% H	7,91% H

Das Präparat schmolz unter Zersetzung bei 297°. Seine Menge betrug 5% des Seidenleims. Die optische Untersuchung des salzsauren Salzes zeigte, dass es sich wieder um d-Alanin handelte.

Die zweite und dritte Fraction war zu gering, um eine Untersuchung der Aminosäuren zu gestatten.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 177. (1901.)

Die vierte Fraction, welche den Serinester enthielt, wurde zunächst mit der 7fachen Menge Wasser geschüttelt, das ungelöste Oel mit Aether aufgenommen und die ätherische Lösung noch 2 mal mit Wasser durchgeschüttelt. Schliesslich blieb in dem Aether der Ester einer Aminosäure zurück, die durch Verseifen mit Baryt gewonnen werden kann. Sie ist im Wasser ziemlich leicht löslich, unterscheidet sich von dem Phenylalanin durch die grosse Löslichkeit in concentrirter Salzsäure und scheint eine bisher unbekannte Verbindung zu sein, deren nähere Untersuchung später ausgeführt werden soll. Die wässrige Lösung enthält den Serinester. Sie wurde mit Baryt verseift und die Lösung in üblicher Weise verarbeitet gab 8 g reines Serin.

0.1825 g Substanz gaben 0.2304 g  $\text{CO}_2$  und 0.1121 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet:

34.30% C

6.67% H

Gefunden:

34.43% C

6.82% H

Der Schmelzpunkt wurde wieder bei  $240^\circ$  (corr.  $245^\circ$ ) gefunden.

Die optische Inaktivität des Serins wurde durch die Prüfung des Hydrochlorates kontrollirt. Seine 10%ige Lösung zeigte im 2 dm.-Rohre keine wahrnehmbare Drehung.

Phenylisocyanat-Serin. Diese Verbindung wurde in üblicher Weise durch Einwirkung von Phenylisocyanat auf die alkalische Lösung der Aminosäure dargestellt und zeigte sich völlig identisch mit dem Produkt, das aus dem synthetischen Serin<sup>1)</sup> auf gleiche Art gewonnen war.

0.1822 g Substanz lieferten 0.3598 g  $\text{CO}_2$  und 0.0891 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet:

53.57% C

5.35% H

Gefunden:

53.81% C

5.43% H

Der Schmelzpunkt wurde bei  $167^\circ$  (corr.  $170^\circ$ ) gefunden. Auch diese Verbindung war in alkalischer Lösung völlig inactiv.

<sup>1)</sup> E. Fischer und H. Leuchs, Sitzungsberichte der Berliner Akademie, 1902, 78.