

# Notizen über Hydrolyse von Proteinstoffen.

Von

**Emil Fischer und Emil Abderhalden.**

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

(Der Redaktion zugegangen am 9. August 1904.)

## 1. Hydrolyse des Caseins.

Tyrosin, das aus Proteinstoffen durch Kochen mit Schwefelsäure, genaues Ausfällen derselben mit Baryt und Kristallisation der eingeengten Lösung gewonnen wird, ist bekanntlich nicht rein und muß mehrmals aus Wasser umgelöst werden, bevor es die richtige Zusammensetzung zeigt. Bei einer neueren Untersuchung über die Spaltprodukte des Caseins, die wir im Anschluß an die älteren Versuche des einen von uns<sup>1)</sup> und vor dem Erscheinen der ersten Anzeige von Skraup<sup>2)</sup> begonnen hatten, sind wir dieser Beobachtung nachgegangen und haben gefunden, daß das unreine Tyrosin mehrere Fremdkörper enthält, die sich durch Wasser abtrennen lassen, und die außerdem durch Phosphorwolframsäure aus ganz verdünnter Lösung gefällt werden. Zwei davon haben wir isoliert. Der eine ist Lysin, das trotz seiner großen Löslichkeit in Wasser dem rohen Tyrosin wahrscheinlich in Form einer schwer löslichen Kombination sich beimengt. Der andere ist eine in Wasser relativ schwer lösliche Aminosäure, von der Formel  $C_{12}H_{26}N_2O_5$ . Sie muß betrachtet werden als eine gesättigte aliphatische Oxyaminsäure, und wir bezeichnen sie vorläufig als Diaminotrioxydodecansäure, wobei es allerdings unbestimmt bleibt, ob die Kohlenstoffkette normal oder verzweigt ist. In dem Verhältnis von Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff gleicht sie der kürzlich

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151 (1901).

<sup>2)</sup> Berichte der Deutschen Chem. Gesellschaft, Jg. 37, S. 1596 (1904).

von Skraup<sup>1)</sup> beschriebenen Caseinsäure, dagegen ist der Wasserstoffgehalt erheblich größer: auch im optischen Verhalten sind so große Unterschiede, daß wir eine Verschiedenheit beider Säuren für wahrscheinlich halten.

Da die Ausbeute an der Säure von der Art der Isolierung abhängig ist, so halten wir eine genaue Beschreibung der Versuchsbedingungen für notwendig: 2 kg Casein (nach Hammarsten) werden mit 12 l 25%iger Schwefelsäure im Glaskolben 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht, auf etwa 30 l verdünnt, dann die Schwefelsäure mit reinem Ätzbaryt quantitativ ausgefällt, der Niederschlag abgenutscht, nochmals mit Wasser ausgekocht und wieder abfiltriert. Die vereinigten Filtrate werden in Porzellanschalen auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation des Tyrosins eingedampft. Der ersten Kristallisation vom Tyrosin, die abfiltriert wird, ist schon eine beträchtliche Menge der Diaminotrioxysäure beige-mengt, aber eine noch größere Quantität findet sich in der Mutterlauge. Um sie zu gewinnen, dampft man weiter ein und sammelt die verschiedenen hierbei resultierenden Kristallisationen. Selbstverständlich enthalten diese auch Leucin, Glutaminsäure und andere Produkte. Sie werden von den leicht löslichen Teilen durch Waschen mit eiskaltem Wasser befreit. Die erste Kristallisation, die die Hauptmenge des Tyrosins enthält, wird in heißem Wasser gelöst, mit Tierkohle gekocht und aus dem Filtrat das Tyrosin durch Abkühlen ausgeschieden. Die Mutterlauge dient dann zur Gewinnung der Diaminotrioxydodecansäure. Die übrigen Fraktionen, die nur wenig Tyrosin mehr enthalten, werden direkt verarbeitet. Zur Isolierung der Diaminotrioxydodecansäure dient zuerst die Fällung mit Phosphorwolframsäure. Zu dem Zwecke wird die Mutterlauge vom Tyrosin auf etwa 8 l verdünnt, mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß sie 5% davon enthält, und dann eine Lösung von Phosphorwolframsäure zugefügt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Die drei weiteren Kristallisationen werden jede ebenfalls in 8 l Wasser gelöst und dann in derselben Weise behandelt. Die verschiedenen Niederschläge von Phosphorwolframat wurden

<sup>1)</sup> l. c. und Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 292 (1904).

getrennt von einander filtriert, scharf abgepreßt, mit Wasser nochmals sorgfältig gewaschen, und dann mit überschüssigem Barytwasser in der üblichen Weise zerlegt. Als das Filtrat nach genauer Ausfällung des Baryts mit Schwefelsäure auf dem Wasserbade stark eingeengt war, fiel beim Erkalten die Diaminotrioxydodecansäure kristallinisch aus, während in der Mutterlauge leicht lösliche Produkte zurückblieben. Aus der Fraktion, die den Hauptteil des Tyrosins enthielt, haben wir an dieser Stelle das Lysin mit Hilfe des Pikrates nachgewiesen.

0.1827 g Substanz gaben 29.9 ccm N [22°, 761 mm]

0.1713 „ „ „ 0.2436 g CO<sub>2</sub> und 0.0750 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH:

18.66% N, 38.40% C und 4.53% H

Gefunden:

18.57% N, 38.78% C und 4.86% H.

Die rohe Diaminotrioxydodecansäure wird zuerst einmal aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umgelöst. Zur völligen Reinigung dient dann die Kristallisation des Hydrochlorates. Zu dem Zwecke wird die Säure in heißer, starker Salzsäure gelöst, stark abgekühlt, das ausgeschiedene Hydrochlorat abgesaugt, mit starker Salzsäure gewaschen, dann in warmem Wasser gelöst, und die Aminosäure durch Neutralisation mit Ammoniak ausgefällt. Die Ausbeute an reiner Säure beträgt ungefähr  $\frac{3}{4}$ % des Caseins. Für die Analyse war das Präparat nochmals aus heißem Wasser umgelöst. Die im Vacuum-exsikkator getrocknete Substanz verlor bei 120° nicht an Gewicht.

0.1589 g Substanz gaben 14.2 ccm N [25°, 763 mm]

0.1562 „ „ „ 0.1300 g H<sub>2</sub>O und 0.2965 g CO<sub>2</sub>

Berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 10.07% N, 51.79% C, 9.35% H

Gefunden: 10.01% N, 51.76% C, 9.24% H

0.1551 g Substanz gaben 13.7 ccm N [27°, 760 mm]

0.1561 „ „ „ 0.2976 g CO<sub>2</sub> und 0.1297 g H<sub>2</sub>O

Gefunden: 9.81% N, 51.99% C und 9.23% H.

0.1506 g Substanz gaben 0.2854 g CO<sub>2</sub> und 0.1286 g H<sub>2</sub>O

Gefunden: 51.68% C und 9.49% H.

Die Diaminotrioxydodecansäure hat keinen konstanten Schmelzpunkt, weil sie sich zersetzt. Im Kapillarrohr schmilzt sie gegen 255° unter Braunfärbung und Gasentwicklung. Die

Kristallform ist nicht charakteristisch. Es sind meist leichte Blättchen, die in der Regel zu Rosetten oder kugligen Aggregaten verwachsen sind. Die Verbindung reagiert auf Lakmuspapier ganz schwach sauer und schmeckt gar nicht süß, sondern sehr schwach bitter. In verdünnten Säuren ist sie leicht löslich, dagegen ist das Hydrochlorat, wie oben erwähnt, in starker Salzsäure recht schwer löslich. Es kristallisiert aus heißer Salzsäure in äußerst feinen Nadelchen und kann mit 20%iger Salzsäure mehrere Stunden auf 125° erhitzt werden, ohne Zersetzung zu erleiden. Die wässrige Lösung der Aminosäure dreht das polarisierte Licht nach links. Bei einer 5%igen wässrigen Lösung wurde die Drehung im 1-Dezimeterrohr — 0,4 bis — 0,46° gefunden. Die spezifische Drehung wäre demnach ungefähr — 9°. Die Bestimmung darf aber nur als approximativ angesehen werden.

Das Kupfersalz, das durch Erwärmen der wässrigen Lösung mit überschüssigem Kupferoxyd oder Kupferkarbonat bereitet wurde, bildet eine tiefblaue Lösung und scheidet sich aus der Lösung in blaßblauen Blättchen aus. Es ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich. Im Vacuumexsikkator getrocknet, verändert es beim Erwärmen auf 120° weder sein Gewicht, noch seine blaue Farbe.

0,1246 g Substanz gaben 0,0287 g CuO

0,1558 » » » 0,0359 » »

Berechnet für  $C_{12}H_{24}N_2O_5Cu$ : 18,72% Cu

Gefunden: 18,38% und 18,42% Cu.

Das Salz unterscheidet sich in der Zusammensetzung scharf von den Kupferverbindungen der gewöhnlichen Aminosäuren, es gleicht aber darin völlig dem Salz des Isoserins.<sup>1)</sup>

## 2. Hydrolyse von Gelatine (Bildung von Serin).

Das in einer ganzen Reihe von Proteinstoffen bereits nachgewiesene Serin entsteht auch bei der Spaltung der Gelatine durch Säuren. Für seine Gewinnung diente die Fraktion der Ester der Aminosäuren aus 1 kg Gelatine, die bei 0,6 mm

<sup>1)</sup> E. Fischer und H. Leuchs, Berichte der Deutschen Chem. Gesellschaft, Bd. 35, S. 3795 (1902).

Druck von 100—160° (Temperatur des Bades) destillierte. Sie wurde mit viel Petroläther versetzt, wobei der Serinester mit dem Ester der Asparaginsäure und anderen Produkten ölig ausfällt. Diese Fällung wurde mit 20 ccm Wasser versetzt, wiederholt mit Petroläther ausgeschüttelt, dann nach Abtrennung des Petroläthers mit überschüssigem Baryt auf dem Wasserbade 2 Stunden erhitzt, um die Ester zu verseifen. Nachdem der Baryt mit Schwefelsäure genau entfernt war, wurde die wässrige Lösung zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit Alkohol ausgekocht. Der unlösliche Teil enthielt das Serin, das beim Auslaugen mit wenig eiskaltem Wasser in Lösung ging und nach dem Entfärben der Flüssigkeit mit Tierkohle sich beim Eindunsten kristallinisch abschied. Die Analyse der Kristalle, die das Aussehen und das Verhalten des Serins zeigten, gab folgende Zahlen:

0,1702 g Substanz gaben 0,2147 g CO<sub>2</sub> und 0,1016 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>: 34,28% C und 6,66% H

Gefunden: 34,40% C      6,63% H

Ihre Menge betrug 0,4% der Gelatine. Da die Isolierung aber mit großen Verlusten verbunden ist, so muß der wirkliche Gehalt an Serin erheblich größer sein.