

Die Monoaminosäuren von aus Kürbissamen dargestelltem, krystallinischem Eiweiß.

Von

Emil Abderhalden und Oscar Berghausen. Cincinnati.

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

(Der Redaktion zugegangen am 5. August 1906.)

Aus der Klasse der pflanzlichen Reserveeiweißstoffe sind bekanntlich mehrere in krystallinischem Zustande erhalten worden. Sie sind früher mit verschiedenen Namen belegt worden, sie führen jetzt jedoch wohl allgemein, soweit es sich um diejenigen Proteine handelt, die aus entfetteten Samen mit einer 5—10%igen Kochsalzlösung ausgezogen werden, den Namen Edestin. Diese Bezeichnung ist dem früher üblichen Namen Vitellin vorzuziehen, weil unter diesem zum Teil Proteine zusammengefaßt werden, welche Phosphor in organischer Bindung enthalten sollen. Das zu der vorliegenden Untersuchung verwendete Material war von G. Grübler¹⁾ dargestellt worden. Von ihm stammt auch die erste ausführliche Beschreibung und Untersuchung des aus Kürbissamen darstellbaren krystallinischen Eiweißes. Grübler gibt als vorteilhafteste Darstellung dieses Proteins folgende an. Die Kürbissamen werden durch Schälen von ihrer äußeren, harten Hülle befreit, dann zermahlen und aus dem Mehl durch Schlemmen mit Öl und Petroläther die Proteinkörner isoliert. Diese setzen sich bald zu Boden und können durch wiederholtes Ausziehen mit Petroläther vom Öl befreit werden. Den letzten Rest fettiger Substanzen entfernt man durch Ausäthern im Drechselschen Extraktionsapparat. Das erhaltene weiße Pulver wird in Wasser suspendiert und

¹⁾ Georg Grübler, Über ein krystallinisches Eiweiß der Kürbissamen. Journal f. prakt. Chemie, Bd. XXIII, S. 97, 1881.

unter Erwärmen auf etwa 40° allmählich soviel Kochsalz zugesetzt, bis alles Eiweiß gelöst ist. Nun filtriert man durch einen Warmwassertrichter und läßt das Filtrat sich langsam abkühlen. Allmählich scheiden sich dann mikroskopisch kleine reguläre Oktaeder ab. Die Krystalle lassen sich wiederum auflösen und wieder zur Abscheidung bringen. Es fragt sich, ob wir berechtigt sind, aus dem Umstand, daß dieses Protein krystallisiert, den Schluß zu ziehen, daß es einheitlich ist. Wir besitzen nach dieser Richtung keine Beweise. Mit unseren jetzigen Kenntnissen können wir diese Frage nicht beantworten. Jedenfalls ist das Krystallisationsvermögen eine sehr wertvolle Eigenschaft, ein bestimmtes Protein oder vielleicht ein bestimmtes Gemenge von Proteinsubstanzen von anderen Eiweißkörpern abzutrennen. Die ganze Art der Krystallisation und die Art und Weise, wie das Umkrystallisieren ausgeführt wird, bietet uns keine Garantie für ein wirklich einheitliches Präparat. Wir betonen diesen Umstand deshalb, um die ganze Frage nach der Einheitlichkeit der bis jetzt dargestellten Proteine nach allen Richtungen offen zu behalten.

Bei der Hydrolyse dieses Proteins aus Kürbissamen mit verdünnter Schwefelsäure erhielten wir folgende auf 100 g aschefreie, bei 100° getrocknete Substanz berechnete Ausbeuten an Aminosäuren.

Glykokoll	0,08 g
Alanin	vorhanden
Aminovaleriansäure	0,7 g
Leucin	4,7
Prolin	1,7
Glutaminsäure	13,4
Asparaginsäure	4,5
Phenylalanin	2,6
Tyrosin	1,4

Zu der vorliegenden Untersuchung verwendeten wir 285 g Eiweiß. Es enthält 14,24% Wasser und 1,09% Asche. Die Hydrolyse wurde durch 12stündiges Kochen mit 2 l 25%iger Schwefelsäure herbeigeführt. Nach dem Abkühlen der braun gefärbten Flüssigkeit wurde sie filtriert. Auf dem Filter verblieben 6 g einer schwarz gefärbten Masse. Im Filtrat fällten

wir die Schwefelsäure quantitativ mit einer Barytlösung und kochten, wie schon wiederholt beschrieben, den Baryumsulfatniederschlag so lange aus, bis eine Probe des Waschwassers keine Rotfärbung mit Millons Reagens mehr gab. Die vereinigten Waschwässer wurden dann mit dem ursprünglichen Filtrate der Baryumsulfatfällung eingeeengt, bis sich bereits in der Wärme eine Krystallhaut bildete. Beim Abkühlen vermehrte sich die Ausscheidung. Die Flüssigkeit wurde nun filtriert und das Filtrat so lange weiter eingeeengt, bis das Filtrat der entstandenen Krystallisation keine Reaktion mit Millons Reagens mehr gab. Das so gewonnene Rohtyrosin krystallisierten wir aus heißem Wasser um. Seine Menge betrug im analysenreinen Zustand 3,20 g.

0,1922 g Substanz gaben 0,4200 g CO_2 und 0,1060 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$:

Gefunden:

59,66% C und 6,07% H.

59,59% C und 6,12% H.

Die tyrosinfreie Mutterlauge des umkrystallisierten Tyrosins wurde zur ersten Tyrosinmutterlauge hinzugefügt und nun die gesamte Flüssigkeit unter vermindertem Druck bis zum Sirup eingeeengt. Nun veresterten wir, wie gewohnt, dreimal mit Alkohol und gasförmiger, trockener Salzsäure. Beim Auflösen der Esterchlorhydrate in Alkohol hinterblieb nach der ersten Veresterung ein unlöslicher Rückstand. Er wurde abfiltriert und erwies sich als aus anorganischen Salzen (Kochsalz und etwas Chlorammon) bestehend. Ein Versuch, aus der stark eingeengten alkoholischen Lösung der Esterchlorhydrate nach dem Impfen eines Kryställchens von Glykokollesterchlorhydrat Glykokoll nachzuweisen, war ohne Erfolg. Schließlich setzten wir in der üblichen Weise mit Natronlauge und Kaliumcarbonat die Ester in Freiheit. Sie wurden in Äther aufgefangen.

Die fraktionierte Destillation der Ester ergab folgendes Resultat:

I. Fraktion:	bis 60°	des Wasserbades	und 12 mm Druck	= 26 g
II.	>	>	100° >	>
III.	>	>	100° >	>
IV.	>	>	220° >	>
		Ölbades	>	>

Im Destillationskolben verblieb ein dunkelbraun gefärbter Rückstand.

Er wog 33,5 g.

0.1813 g Substanz gaben 0.2250 g CO₂ und 0.1170 g H₂O.

Berechnet für C₄H₁₀NO₂ · Cl:

Gefunden:

34,41% C und 7,17% H.

33,96% C und 7,17% H.

Durch fraktionierte Krystallisation erhielten wir ferner: 2 g Leucin, 1 g Aminovaleriansäure und etwas Alanin. Letzteres gewannen wir auf folgende Weise aus der Mutterlauge des isolierten Glykokollesterchlorhydrates. Diese wurde mit der entsprechenden Mutterlauge aus Fraktion I vereinigt und dann aus den Esterchlorhydraten mit Natronlauge und Kaliumcarbonat die Ester in Freiheit gesetzt. Sie wurden in Äther aufgenommen, und dieser nach dem Trocknen mit Natriumsulfat abdestilliert. Der ziemlich geringe Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und durch Kochen verseift. Durch Eindampfen der Lösung gewannen wir nach wiederholtem Umkrystallisieren eine Substanz, deren Kupfersalz Analysenzahlen gab, die mit den für Alaninkupfer berechneten ziemlich gut übereinstimmten.

Die Aminovaleriansäure gab folgende Zahlen:

0.1831 g Substanz gaben 0.3447 g CO₂ und 0.1581 g H₂O.

Berechnet für C₅H₁₁NO₂:

Gefunden:

51,28% C und 9,40% H.

51,34% C und 9,59% H.

Fraktion III. Sie enthielt 8,2 g Leucin, das sich gegen 293—295° (korr.) zersetzte.

0.1651 g Substanz gaben 0.3309 g CO₂ und 0.1458 g H₂O.

Berechnet für C₆H₁₁NO₂:

Gefunden:

54,96% C und 9,92% H.

54,66% C und 9,81% H.

Die vierte Fraktion wurde in genau derselben Weise, wie üblich verarbeitet, d. h. es wurde der Phenylalaninester abgetrennt und dann verseift. Wir die übrigen Aminosäureester mit Barytwasser. Isoliert wurden 6 g Phenylalanin, 10,5 g Asparaginsäure und 18,9 g Glutaminsäure. Letztere wurde als salzsaures Salz abgeschieden.

Phenylalanin:

0.1517 g Substanz gaben 0.3648 g CO₂ und 0.0925 g H₂O.

Berechnet für C₉H₁₁NO₂:

Gefunden:

65,41% C und 6,71% H₂O.

65,59% C und 6,77% H.

Asparaginsäure:

0.1650 g Substanz gaben 0.2185 g CO₂ und 0.0810 g H₂O.

Berechnet für C₄H₇NO₄:

Gefunden:

36,09% C und 5,26% H.

36,11% C und 5,46% H.

Glutaminsäurechlorhydrat:

0,1568 g Substanz gaben 0,1867 g CO_2 und 0,0765 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{HCl}$: Gefunden:

32,70% C und 5,45% H. 32,47% C und 5,39% H.

Endlich haben wir auch hier den bei der Destillation der Ester verbleibenden Rückstand in der gewohnten Weise verarbeitet. Wir gewannen 1 g Leucin und 12,5 g Glutaminsäure. Serin konnten wir mit Sicherheit weder aus Fraktion IV noch aus dem Rückstand gewinnen.