

Hydrolyse des Hordeins.¹⁾

Von

Dr. A. Kleinschmitt.

Mitteilung aus dem gärungs-chem. Laborat. der Kgl. techn. Hochschule in München.

(Der Redaktion zugegangen am 23. November 1907.)

Aus der großen Anzahl der bekannten Eiweißkörper lassen sich 3 Proteine pflanzlichen Ursprungs, nämlich das Gliadin aus Weizen, das Hordein aus Gerste und das Zein aus Mais durch ihr ungewöhnliches physikalisches Verhalten in eine Gruppe zusammenfassen. Alle drei sind nämlich in Wasser wenig oder gar nicht, in verdünntem Alkohol dagegen leicht löslich.

Während das Zein gleich als einheitlicher Körper erkannt wurde, glaubte Ritthausen, daß die alkohollöslichen Proteine des Weizens und der Gerste aus je 3 verschiedenen Körpern zusammengesetzt seien, die man nach seinen Angaben durch fraktionierte Fällung erhalten kann (Ritthausen, Die Eiweißkörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Ölsamen, Bonn 1872). Er nennt die des Weizens Gliadin, Glutenfibrin und Mucedin, die der Gerste Glutencasein, Glutenfibrin und Mucedin.

Osborne und seine Mitarbeiter haben diese Angaben berichtigt und in sehr exakter, einwandfreier Weise den Nachweis geführt, daß es sich jeweils nur um einen Körper handelt, den sie dann Gliadin bezüglich Hordein nannten (Griesmayer, Die Proteide der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Ölsamen, Heidelberg 1897).

Gliadin und Hordein lassen sich durch ihre physikalischen Eigenschaften nicht oder fast nicht unterscheiden, weshalb manche Forscher sie für identisch hielten.

Nur mittels Elementaranalyse sorgfältigst gereinigter Präparate konnte Osborne (l. c.) einen geringen Unterschied in der Zusammensetzung feststellen, weshalb er die Ansicht ausspricht, daß es sich nicht um den gleichen Körper handelt.

¹⁾ Vgl. Hydrolyse des Hordeins, Inaug.-Diss., Heidelberg 1907.

Für Gliadin aus Weizen liegen bereits Hydrolysen nach Fischer, ebenso wie nach Kossel und Kutscher, von Abderhalden und Samuely und von Osborne und Clapp vor, für Zein von Langstein und von Kossel und Kutscher.

Nach vorliegender Hydrolyse dürfte es nicht mehr zweifelhaft sein, daß Gliadin und Hordein nicht als identisch betrachtet werden können, da sich Zahlen für α -Prolin, Phenylalanin und Tyrosin ergaben, die doppelt so groß sind wie die, welche Abderhalden für Gliadin fand.

	Gliadin ¹⁾	Hordein	Zein ²⁾	Zein ³⁾
Glykokoll	0,68 ⁴⁾	0	0	—
Alanin	2,66	1,34	0,5	—
Aminovaleriansäure	0,33	1,40	vorhanden	—
Leucin	6,00	7,00	11,25	—
α -Prolin	2,4	5,88	1,49	—
Phenylalanin	2,6	5,48	6,96	—
Glutaminsäure	31,5	41,32	11,78	16,87 ⁵⁾
Asparaginsäure	1,24	1,32	1,04	—
Serin	0,12	0,10	—	—
Histidin	1,7	0,51	—	0,81
Arginin	3,4	3,14	—	1,82
Lysin	0	0	—	0
Tyrosin	2,37	4,00	—	10,06
Ammoniak	—	4,34	—	2,56

¹⁾ Abderhalden und Samuely, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 276, 1905.

²⁾ Langstein, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 508, 1903.

³⁾ Kossel und Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165, 1901, und Bd. XXXVIII, S. 39, 1903.

⁴⁾ Rührt von einer kleinen Verunreinigung her (vgl. Osborne und Clapp, Americ. Journ. of Physiology, Bd. XVIII, S. 231, 1906), deren Hydrolyse jedoch mit obigen Zahlen nicht direkt verglichen werden kann, da unter etwas anderen Versuchsbedingungen gearbeitet wurde.

⁵⁾ Osborne und Gilbert, Americ. Journ. of Physiology, Bd. XV, S. 333, 1900.

Dagegen fügen sich die drei Proteine ganz ungezwungen auch ihrer Zusammensetzung nach in eine Sonderklasse ein, die sich physikalisch durch die Löslichkeit in Alkohol auszeichnet und auch chemisch durch das Fehlen von Glykokoll und Lysin unter den Spaltungsprodukten charakterisiert ist.

Experimenteller Teil.

Zur Gewinnung des Ausgangsmaterials wurde Gerstenmehl mit der doppelten Gewichtsmenge 70^o/igen Alkohols zu einem gleichmäßigen Brei verrührt und 12 Stunden unter häufigem Umrühren stehen gelassen, hierauf die Flüssigkeit mittels einer Filterpresse klar abgepreßt und zur Abscheidung des Hordeins $\frac{2}{3}$ des Lösungsmittels unter vermindertem Drucke abdestilliert. Beim Erkalten schied sich das Protein als gelatinöse Masse am Boden ab. Dasselbe wurde mit destilliertem Wasser mehrmals durchgeknetet und gewaschen und schließlich auf dem Wasserbad und dann im Trockenschrank bei 100—110^o getrocknet. Die Masse hatte eine hornartige Konsistenz von gelblichbraun durchschimmernder Farbe. Die Präparate enthielten im Durchschnitt noch 9—10^o/o Wasser.

Zu einer Hydrolyse, die mit größter Genauigkeit und Sorgfalt durchgeführt wurde, wurden 656 g eines Präparates angewendet, das 76,24^o/o oder 500 g reines, trockenes Hordein enthielt. Dieser Berechnung wurden die Zahlen Osbornes (s. oben) zugrunde gelegt, der 17,21^o/o Stickstoff für reinstes Hordein angibt, da es nach der Art der Gewinnung ausgeschlossen erscheint, daß noch ein anderer stickstoffhaltiger Körper anwesend ist. Die Verunreinigungen erwiesen sich auch, wie nachträglich festgestellt wurde, hauptsächlich als Fette, neben mineralischen Stoffen.

Diese, wie alle folgenden Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl ausgeführt.

$$\begin{aligned} 0,5005 \text{ g Substanz gaben } \text{NH}_3 &= 16,6 \text{ ccm H}_2\text{SO}_4 \\ 1 \text{ ccm H}_2\text{SO}_4 &= 0,00364 \text{ g N} \\ &= 12,08\% \text{ N} = 76,24\% \text{ Hordein.} \end{aligned}$$

Es wurde in der üblichen Weise durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 am Rück-

flußkühler hydrolysiert, nach dem Erkalten die abgeschiedenen Huminsubstanzen über Asbest abgenutscht und sorgfältig mit Wasser nachgewaschen. Sie wogen bei 110° getrocknet 46 g und enthielten im Mittel 3,19% N.

$$\begin{aligned} 0,5012 \text{ g Substanz gaben } \text{NH}_3 &= 4,4 \text{ ccm H}_2\text{SO}_4 \\ 1 \text{ ccm H}_2\text{SO}_4 &= 0,00366 \text{ g N} \\ &= 3,22\% \text{ N.} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 0,5238 \text{ g Substanz gaben } \text{NH}_3 &= 4,5 \text{ ccm H}_2\text{SO}_4 \\ 1 \text{ ccm H}_2\text{SO}_4 &= 0,00366 \text{ g N} \\ &= 3,15\% \text{ N.} \end{aligned}$$

Das Filtrat wurde bei sehr stark vermindertem Druck und 48° auf zirka die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingedampft und dann zur Abscheidung der Glutaminsäure als Chlorhydrat bei 0° mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Hierbei wurde eine ungewöhnlich starke Entwicklung von Schwefelwasserstoff beobachtet.

Nach 8 tägigem Stehen auf Eis hatte sich eine sehr reichliche Krystallisation gebildet. Da die Masse zu dickflüssig war, wurde sie mit dem gleichen Volumen eiskalten Alkohols versetzt und über Asbest abgenutscht. Die mit salzsäurehaltigem Alkohol gewaschene Krystallmasse wog lufttrocken 335 g.

Zur genauen quantitativen Bestimmung des Gehaltes an Glutaminsäure wurden genau 30 g des Rohpräparates mit überschüssigem Baryumhydrat gekocht, mit Tierkohle entfärbt und stark eingedampft. Hierauf bei 0° mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und einige Zeit bei 0° stehen gelassen.

Es wurden 23,1 g trockenes Glutaminsäurechlorhydrat erhalten, für die ganze Menge 258 g oder 206,6 g freie Glutaminsäure.

Das Glutaminsäurechlorhydrat hatte folgende Zusammensetzung:

$$\begin{aligned} 0,3174 \text{ g gaben } \text{NH}_3 &= 8,4 \text{ ccm H}_2\text{SO}_4 \\ 1 \text{ ccm H}_2\text{SO}_4 &= 0,00284 \text{ g N} \\ \text{Berechnet für } \text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4\text{HCl} &: 7,65\% \text{ N} \\ \text{Gefunden:} & \quad 7,52\% \end{aligned}$$

Aus dem Chlorhydrat wurde die Glutaminsäure durch Versetzen mit titrierter Natronlauge in Freiheit gesetzt; sie gab folgende Zahlen:

0,2034 g Substanz gaben 0,3041 g CO_2 und 0,1123 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$: 40,81% C und 6,12% H

Gefunden: 40,78% C 6,17% H

Die Mutterlauge vom Glutaminsäurechlorhydrat wurde bei 20 mm Druck und einer 45° des Wasserbades nicht übersteigenden Temperatur zum dickflüssigen Sirup verdampft und in der üblichen Weise verestert, die Ester in Freiheit gesetzt, getrocknet und der fraktionierten Destillation unterworfen.

Zur Erzeugung des notwendigen Vakuums von Bruchteilen eines Millimeters wurde mit ausgezeichnetem Erfolg das von Wohl und Losanitsch (B. d. D. chem. G., Bd. XXXVIII, S. 4149, 1905) angegebene Verfahren benützt. (Einzelheiten siehe A. Kleinschmitt, Hydrolyse des Hordeins, Inauguraldissertation, Heidelberg 1907.)

Es wurden folgende Fraktionen erhalten:

I. Fraktion bis	50°	des Dampfes bei	9 mm Druck	=	8,8 g
II. »	85°	»	»	=	56,87 »
III. »	100°	Bades	» 0,03 »	=	51,57 »
IV. »	180°	»	» 0,01 »	=	58,70 »

Im Destillierkolben verblieb ein schwarzer, in der Kälte erstarrender, glänzender Rückstand, der nicht gewogen wurde.

I. Fraktion (bis 50°).

Diese Fraktion bestand fast ganz aus Alkohol. Sie wurde mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbad verdampft. Es blieben nur wenige Dezigramm eines schmierigen Rückstandes. Es wurde absoluter Alkohol zugegeben und durch Einleiten von gasförmiger, trockener Salzsäure zu verestern versucht. Nach Einimpfen eines Kryställchens Glykokollesterchlorhydrat wurde mehrere Tage bei 0° stehen gelassen. Es konnte keine Krystallisation erhalten werden.

Derselbe Versuch wurde mit einer Fraktion aus einer andern Hydrolyse, die bei einer Temperatur bis 75° der Dämpfe und 10 mm Druck übergegangen war, wiederholt, doch konnte auch hier keine Spur Glykokoll gefunden werden.

II. Fraktion (bis 85°).

Die Ester wurden durch Kochen mit Wasser am Rückflußkühler verseift und dann auf dem Wasserbade zur Trockene

verdampft. Zur Gewinnung des α -Prolins wurde mehrmals mit absolutem Alkohol ausgekocht. Es gingen 15,0 in Lösung.

Die alkoholunlöslichen Aminosäuren wurden nach den Angaben Fischers (Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151, 1901) racemisiert und dann der fraktionierten Krystallisation unterworfen.

Es wurden im ganzen erhalten: 15,5 g Leucin vom Schmelzpunkt ca. 296° , 7,0 g Aminovaleriansäure und 5,1 g Alanin vom Schmelzpunkt 292° .

0,1874 g Substanz gaben 0,3769 g CO_2 und 0,1675 g H_2O

0,2803 > > > $\text{NH}_2 = 7,0$ ccm H_2SO_4

1 ccm $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0,0426$ g N

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$: 54,96% C, 9,92% H, 10,68% N

Gefunden: 54,85% > 10,00% > 10,64% >

Aminovaleriansäure gab folgende Zahlen:

0,1975 g Substanz gaben 0,3707 g CO_2 und 0,1677 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$: 51,28% C und 9,40% H

Gefunden: 51,19% > > 9,50% >

Alanin:

0,1981 g Substanz gaben 0,2934 g CO_2 und 0,1405 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$: 40,45% C und 7,87% H

Gefunden: 40,39% > > 7,93% >

III. Fraktion (bis 100°).

Die Ester wurden wie vorher verseift, eingedampft und mit absolutem Alkohol ausgekocht. Es lösten sich 14,4 g, die mit der alkoholischen Lösung aus der vorigen Fraktion vereinigt und verarbeitet wurden. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde mit Wasser aufgenommen und in der üblichen Weise mittels der Kupfersalze das racemische vom aktiven Prolin getrennt. Es wurden 12,9 g wasserfreies, racemisches Prolinkupfer erhalten. Es gab nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser folgende Zahlen:

0,2549 g Substanz verloren bei 120° 0,0273 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu} + 2 \text{H}_2\text{O}$: 10,99% H_2O

Gefunden: 10,71% >

0,2276 g Substanz gaben 0,0620 g CuO

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu}$: 21,79% Cu

Gefunden: 21,86% >

Das aktive Prolin wurde mit H_2S vom Kupfer befreit und gab nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol und Fällern mit Äther folgende Zahlen:

0,1872 g Substanz gaben 0,3572 g CO_2 und 0,1324 g H_2O

0,1607 „ „ „ $\text{NH}_3 = 4,55$ ccm H_2SO_4

1 ccm $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0,00426$ g N

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$: 52,18% C, 7,83% H, 12,17% N

Gefunden: 52,04% „ 7,91% „ 12,06% „

Schmelzpunkt ca. 207° .

Der in Alkohol unlösliche Rest dieser Fraktion wurde ebenfalls in der angegebenen Weise racemisiert und daraus durch fraktionierte Krystallisation 19,5 g Leucin und 1,6 g Alanin erhalten. Aminovaleriansäure konnte in dieser Fraktion keine gefunden werden. Das isolierte Leucin zeigte den Schmelzpunkt $295-297^\circ$, hatte die Zusammensetzung:

0,2118 g Substanz gaben 0,4247 g CO_2 und 0,1918 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$: 54,96% C und 9,92% H

Gefunden: 54,70% „ 10,13% „

Alanin: Schmelzpunkt 292° .

0,1793 g Substanz gaben 0,2651 g CO_2 und 0,1257 g H_2O

0,1942 „ „ „ $\text{NH}_3 = 10,7$ ccm H_2SO_4

1 ccm $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0,00284$ g N

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$: 40,45% C, 7,87% H, 15,73% N

Gefunden: 40,33% „ 7,84% „ 15,66% „

IV. Fraktion (bis 180°).

Sofort nach der Destillation wurde der Phenylalaninester durch Behandeln mit Wasser und Ausschütteln mit Äther abgetrennt, durch Eindampfen mit konzentrierter Salzsäure verseift und das Phenylalanin in bekannter Weise in Freiheit gesetzt. Es wurden 27,4 g erhalten von der Zusammensetzung:

0,2463 g Substanz gaben 0,5899 g CO_2 und 0,1497 g H_2O

0,3434 „ „ „ $\text{NH}_3 = 6,75$ ccm H_2SO_4

1 ccm $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0,00426$ g N

Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2$: 65,42% C, 6,66% H, 8,48% N

Gefunden: 65,32% „ 6,80% „ 8,37% „

Die in Wasser löslichen Ester wurden durch 2stündiges Erhitzen mit Barytwasser verseift, der Baryt durch Schwefelsäure entfernt und in die stark eingeeengte Flüssigkeit bei 0° gasförmige Salzsäure eingeleitet. Es wurden so noch 3 g Phenyl-

alaninchlorhydrat erhalten. Die im Vakuum stark eingeeengte Mutterlauge wurde durch Silbercarbonat von dem Rest der Salzsäure befreit und durch Kochen mit gefällttem Kupferoxyd in die Kupfersalze übergeführt und bis zur beginnenden Krystallisation eingedampft. Es wurden beim Abkühlen 9,9 g bei 130° getrocknetes, asparaginsaures Kupfer erhalten = 6,6 g freier Asparaginsäure.

Einmal aus heißem Wasser umkrystallisiert und an der Luft getrocknet wurden folgende Zahlen erhalten:

0,2425 g Substanz verloren bei 130° 0,0710 g H₂O
 Berechnet für C₄H₅NO₄Cu + 4½ H₂O: 29,45% H₂O
 Gefunden: 29,28% »

0,2897 g Substanz gaben 0,1870 g CO₂ und 0,1315 g H₂O
 Berechnet für C₄H₅NO₄Cu + 4½ H₂O:
 17,42% C 5,08% H
 17,65% » 5,08% »

0,1715 g Substanz gaben 0,0704 g CuO
 Berechnet für C₄H₅NO₄Cu: 32,67% Cu
 Gefunden: 32,80% »

Aus der Mutterlauge wurde das Kupfer durch H₂S entfernt und dieselbe im Vakuum zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol ausgekocht, das Ungelöste mit wenig Wasser aufgenommen und im Vakuum über Schwefelsäure der Krystallisation überlassen.

Es gelang schließlich, nach mehrmaligem Umkrystallisieren 0,52 g Serin zu erhalten, das den Schmelzpunkt 241° besaß und die richtige Zusammensetzung zeigte.

0,2070 g Substanz gaben 0,2595 g CO₂ und 0,1229 g H₂O
 Berechnet für C₃H₇NO₃: 34,30% C. 6,67% H
 Gefunden: 34,18% » 6,64% »

Glutaminsäure konnte hier keine gefunden werden.

Aus dem Destillationsrückstand wurde eine kleine Menge Krystalle isoliert, die sich nach dem Umkrystallisieren aus Essigäther als Leucinimid erwiesen = 2,9 g.

Zur Bestimmung der Hexonbasen und des Tyrosins wurde genau nach den Vorschriften von Kossel und Kutschier (Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165, 1900, und Bd. XXXVIII, S. 39, 1903) verfahren.

Es wurde aus 38,98 g reinem, trockenem Hordein erhalten: 0,1988 g Histidin, 1,236 g Arginin, 1,56 g Tyrosin und 1,693 g Ammoniak. Lysin konnte keines gefunden werden.

Das Tyrosin wurde zur Analyse einmal umkrystallisiert:

0,2344 g Substanz gaben 0,5110 g CO_2 und 0,1270 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$: 59,66% C, 6,07% H

Gefunden: 59,46% > 6,06% >

Die Krystalle gaben die Millonsche Reaktion.

Die Gesamtergebnisse, auf 100 g reines Hordein vom Stickstoffgehalt 17,21% berechnet, sind nun folgende:

Glykokoll	0
Alanin	1,34
Aminovaleriansäure	1,40
Leucin	7,00
α -Prolin	5,88
Phenylalanin	5,48
Glutaminsäure	41,32
Asparaginsäure	1,32
Serin	0,10
Tyrosin	4,00
Histidin	0,51
Arginin	3,14
Lysin	0
Ammoniak	4,34
Leucinimid	0,58
	76,41