

Über die Einwirkung von Alkalien auf Proteinstoffe.

I. Mitteilung.

Von

A. Kossel und F. Weiss.

Wenn man Clupein längere Zeit mit Natronlauge oder Barytwasser bei Zimmertemperatur stehen läßt, so nimmt das optische Drehungsvermögen der Lösung allmählich ab. Zum Beispiel betrug der Drehungswinkel einer Lösung von 2 g lufttrocknem Clupeinsulfat in 40 ccm $n/2$ -Natronlauge im 10 cm-Rohr zunächst $-2,6^\circ$; nach 64 Stunden $-1,4^\circ$, nach 7 Tagen $-0,5^\circ$. Mehrere Tage nach Beginn des Versuchs war Ammoniakbildung bemerkbar. Diese Umwandlung verläuft schneller bei 38° . Zum Beispiel war die Drehung einer zweiten wie vorhin bereiteten Lösung im Brütschrank schon nach 50 Stunden von $-2,75^\circ$ auf $-0,51^\circ$ (im 10 cm-Rohr) heruntergegangen. Von jetzt ab geht die weitere Änderung nur sehr langsam vor sich und wir haben bisher ein völliges Verschwinden der Linksdrehung nicht beobachtet. Die Biuretreaktion blieb bei unseren Versuchen stets erhalten.

Die gleiche Erscheinung beobachtet man auch, wenn man höhere Proteinstoffe der gleichen Einwirkung überläßt, z. B. war der Drehungswinkel einer mit $n/2$ -Natronlauge im Brüt-Ofen digerierten Leimlösung im Laufe von 14 Tagen von $-5,84$ auf $-0,57$ (Beobachtung im 10 cm-Rohr) zurückgegangen. Auch hier änderte sich das Drehungsvermögen von jetzt ab nur sehr langsam.

Verfolgt man das Drehungsvermögen der Protamine bei der Säurespaltung, so bemerkt man beim Übergang in die Protone eine Abnahme der Linksdrehung. Aus den schwächer linksdrehenden Protonen können, wie wir kürzlich gezeigt haben,¹⁾

¹⁾ cf. A. Kossel und F. Weiss., Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 281.

sogar Produkte hervorgehen, welche völlig inaktiv sind. Bei weitergehender Säurespaltung aber entsteht rechtsdrehendes Arginin. In diesem Falle ist es die Änderung der Konstitution, welche die Inaktivierung der Zwischenprodukte bewirkt.

Da bei der Einwirkung der Alkalien auf Clupein ebenfalls eine Hydrolyse stattfindet, so könnte man auch bei diesem Prozeß den Rückgang der Drehung durch eine Änderung der Konstitution erklären. Es ist aber noch eine zweite Erklärung möglich, nämlich eine Änderung der Konfiguration des Proteinmoleküls, indem ein Teil desselben racemisiert wird. Die folgenden Untersuchungen machen diesen letzteren Vorgang höchst wahrscheinlich, wobei selbstverständlich nicht ausgeschlossen ist, daß daneben auch die Konstitutionsänderung bei der Alkaliwirkung ebenso wie bei der Säurehydrolyse das Drehungsvermögen beeinflusst.

Daß unter dem Einfluß der Alkalien eine Racemisierung gewisser Teile des Proteinmoleküls stattfindet, wird bewiesen durch die Entstehung von inaktivem Arginin und inaktivem Ornithin. Unterwirft man nämlich die durch Alkaliwirkung gebildeten Reaktionsprodukte weiterhin der Säurehydrolyse, so findet man nunmehr dl-Arginin vor. Läßt man ferner Barythydrat in wässriger Lösung längere Zeit bei 40° auf Clupein einwirken, so bildet sich dl-Ornithin. Nun könnte man gegen diese Befunde und ihre Erklärung den Einwand erheben, daß das Arginin durch die Alkaliwirkung zunächst als d-Arginin abgespalten und erst nachträglich racemisiert sei, oder daß das dl-Ornithin einer weitergehenden Hydrolyse des racemischen Arginins seinen Ursprung verdanke. Aber dieser Einwand ließ sich leicht widerlegen. Wenn wir nämlich eine Alkalilösung in derjenigen Konzentration auf d-Arginin wirken ließen, welche wir bei unseren Versuchen zur Umwandlung des Clupeins benutzt hatten, so änderte sich das Drehungsvermögen der alkalischen Flüssigkeit kaum in bemerkbarer Weise, selbst nachdem die Einwirkung 10 mal so lange gedauert hatte. Trotzdem ist das Arginin gegen die Alkaliwirkung bei 40° nicht völlig widerstandsfähig, es wird sowohl durch Natronlauge, wie durch Barythydrat bei sehr langer Digestion allmählich in Ornithin

verwandelt, doch ist das Ornithin in diesem Falle nicht inaktiv, sondern rechtsdrehend. Es kann also weder das bei unsern Versuchen entstandene dl-Arginin, noch das dl-Ornithin durch nachträgliche Racemisierung von d-Arginin oder d-Ornithin entstanden sein, vielmehr muß man annehmen, daß die Arginin-gruppe der Racemisierung leichter zugänglich ist, solange sie im Proteinmolekül gebunden ist ¹⁾.

Dieselben Schlußfolgerungen ergaben sich auch für einen von uns untersuchten höheren Proteinstoff, nämlich den Leim. Wir erhielten bei der Einwirkung wässriger Natronlauge auf Leim ein anscheinend inaktives Peptongemisch, welches bei der Spaltung durch siedende verdünnte Säuren inaktives Arginin lieferte.

Durch diese Versuche scheint die Möglichkeit gegeben zu sein, gewisse Teile des Proteinmoleküls zu racemisieren, solange sie sich im Zusammenhang mit anderen befinden. Es ergeben sich hieraus Anregungen für physiologische Untersuchungen, welche im hiesigen Institut verfolgt werden sollen.

Experimenteller Teil.

I. Einwirkung von verdünnter Natronlauge auf Clupein.

Wir digerierten 10 g Clupeinsulfat, welche in 200 ccm ⁿ 2-Natronlauge gelöst waren, während 6 Tagen im Brütöfen bei 40°. Die Drehung ging von $-2,3$ auf $-0,20^{\circ}$ zurück (im 10 cm-Rohr bei alkalischer Reaktion gemessen). Die Reaktionslösung wurde mit Salpetersäure neutralisiert, mit Baryumcarbonat versetzt und durch Durchleiten von Wasserdampf vom präformierten Ammoniak befreit. ²⁾ Sodann wurde die Lösung angesäuert und nach dem mehrfach beschriebenen Verfahren

¹⁾ Gegen diese Erklärung könnte man vielleicht noch ein weiteres Bedenken geltend machen, nämlich daß das Arginin im Momente der Abspaltung aus dem Protein — etwa bei der Loslösung des mit dem asymmetrischen Kohlenstoffatom verbundenen Stickstoffs aus der Peptidbindung — durch Alkalien racemisiert worden sei. Wir gedenken diese Möglichkeit experimentell zu prüfen.

²⁾ Während des Durchleitens bildet sich von neuem Ammoniak.

mit Silbernitrat und Baryt gefällt. Auf diese Weise wird die Hauptmenge des Clupeons und etwa vorhandenes Arginin niedergeschlagen, während das etwa gebildete Ornithin sowie freie Monoamidosäuren in Lösung bleiben würden. Da die vom Silberniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit nach Entfernung des Silbers in saurer Lösung keine erhebliche Fällung mit Phosphorwolframsäure ergab, so hatte bei diesem Versuch keine Bildung von Ornithin stattgefunden.

Der Silberniederschlag wurde in verdünnter Schwefelsäure suspendiert, durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit und die filtrierte Lösung nach Vertreiben des Schwefelwasserstoffs mit überschüssigem Baryt versetzt. Sobald die Reaktion alkalisch wurde, bemerkten wir einen intensiven, an Tetramethyldiamin erinnernden Geruch. Die mit Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreite Lösung wurde eingedampft und sodann durch sechsstündiges Kochen am Rückflußkühler mit wässriger Schwefelsäure völlig hydrolysiert. Aus dem Reaktionsprodukt wurde nach bekannten Methoden das Arginin gewonnen.

Dasselbe erwies sich als Nitrat auch bei Zusatz der 4 bis 5fach molekularen Menge Salpetersäure als völlig inaktiv. Das Nitrat wurde in krystallisiertem Zustand dargestellt und schmolz bei 218° unkor. (Riesser 217°),¹⁾ während das d-Argininnitrat nach Riesser bei 126° schmilzt. Auch das Pikrolonat wurde nach wiederholtem Umkrystallisieren in Krystallen mit dem scharfen Schmelzpunkt 238° unkor. gewonnen. Das d-Argininpikrolonat schmilzt nach den mit Steudels Angaben²⁾ übereinstimmenden Beobachtungen von F. Weiß³⁾ bei 225° (das dl-Argininpikrolonat soll nach Riesser bei 248° schmelzen).

Während es nach diesen Ergebnissen nicht zweifelhaft sein kann, daß aus dem bei 40° mit Alkali digerierten Clupein dl-Arginin abgespalten war, zeigte sich bei einem andern Versuch, daß die Digestion des Clupeins mit der gleichen Alkali-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 238 (1906).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 219 (1902—03) und Bd. XLIV, S. 157 (1905).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 114 (1907).

lösung bei Zimmertemperatur und annähernd gleicher Zeitdauer nicht hinreicht, um diese Umwandlung zu vollziehen. Das unter letzteren Verhältnissen gewonnene Arginin zeigte noch Rechtsdrehung.

II. Einwirkung von verdünnter Natronlauge auf Leim.

100 g Leim wurden mit 2 Liter $n/2$ -Natronlauge während 19 Tagen im Brütöfen digeriert, wobei die Drehung von $-5,84$ auf $-0,54$ (im 10 cm-Rohr bei alkalischer Reaktion) herabging. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure neutralisiert, zur Entfernung des Ammoniaks mit Baryumcarbonat gekocht, mit Salpetersäure angesäuert und mit Silbernitrat-Baryt in bekannter Weise ausgefällt. Die so gefällte Substanz wurde in geeigneter Weise (s. Versuch I) vom Silber befreit und mit der gleichen Fraktion eines zweiten, ebenso angesetzten Versuches vereinigt. Durch sechsständiges Kochen mit Schwefelsäure wurde dies Produkt völlig hydrolysiert und nach bekannten Methoden auf Arginin untersucht. Wir erhielten ein gut krystallisierendes Nitrat des inaktiven Arginins, welches den Schmelzpunkt 218° (unkorr.) zeigte.

III. Einwirkung von Natronlauge und Barytlösung auf Arginin.

Zur Prüfung der Racémisierung des freien Arginins wurde ca. 1 g Arginincarbonat mit 12 ccm $n/2$ -Natronlauge bei Brütöfentemperatur digeriert. Die Untersuchung im 10 cm-Rohr in alkalischer Lösung ergab im Anfang einen Drehungswinkel von $+0,77$. Nach 25 Tagen wurde ein Drehungswinkel von $+0,72$ gefunden, nach weiteren 34 Tagen ein solcher von $+0,6$. Die Racemisierungsgeschwindigkeit könnte also, wenn überhaupt eine Racemisierung stattfände, nur eine sehr geringe sein, und die Entstehung des inaktiven Arginin in obigem Versuch kann demnach, wie schon bemerkt, nicht auf nachträgliche Racemisierung von d-Arginin bezogen werden.

Derselbe Versuch wurde nun noch mehrere Monate fortgesetzt, das Drehungsvermögen blieb anscheinend das gleiche. Als zum Schluß die Lösung untersucht wurde, fand sich aber

nur ein Teil des d-Arginins unverändert vor, der größere Teil war unter Bildung von Ornithin zersetzt worden. Zur Isolierung des d-Ornithins benutzten wir das bisher noch nicht beschriebene Acetat, welches den Schmelzpunkt $161-162^{\circ}$ besitzt und sich nach unseren Erfahrungen zum Nachweis gut eignet. Bei dem Salz, welches wir in diesem Falle gewannen, stellten wir den Schmelzpunkt $160-161^{\circ}$ fest, im Polarisationsapparat erwies es sich als rechtsdrehend.

Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der Einwirkung des Barythydrats bei 40° auf Arginin. Dieselbe Spaltung, welche E. Schulze und E. Winterstein¹⁾ in der Siedehitze vornahmen, läßt sich also auch im Brütöfen bewirken.

1 g Arginincarbonat wurde während 20 Tagen mit einer Lösung von 2,2 g krystallisiertem Barythydrat in 20 ccm Wasser digeriert. Die Rechtsdrehung nahm in diesem Falle stärker ab wie bei dem vorhin beschriebenen Versuch, auch war das Arginin anscheinend völlig verschwunden. In der Flüssigkeit war d-Ornithin nachzuweisen.

IV. Einwirkung von Barylösung auf Clupein.

Während bei dem oben unter I beschriebenen Versuch kein Ornithin nachzuweisen war, bildete sich dieses, als wir 100 g Clupeinsulfat mit einer Lösung von 224 g krystallisiertem Barythydrat in 2 Liter Wasser 20 Tage bei Brütöfentemperatur digerierten. Die Reaktionsflüssigkeit wurde nach Ablauf dieser Zeit mit Schwefelsäure neutralisiert, filtriert und eingedampft. Aus dem Rückstand schieden sich Krystalle aus, deren Menge in reinem Zustand 28 g betrug und welche nach dem Umkrystallisieren aus 60 volumprozentigem Alkohol sich als wohl ausgebildete farblose Krystalle darstellten, die leicht in Wasser, fast nicht in Alkohol und Äther löslich waren; 100 Teile 60 volumprozentigen Alkohols lösten bei längerem Kochen am Rückflußkühler etwa $2\frac{1}{2}$ Teile des Sulfats, welche sich beim Erkalten fast völlig wieder ausschieden. Die Krystalle enthielten weder Krystallwasser noch Krystallalkohol. Sie erwiesen sich als optisch völlig inaktiv. Der Schmelzpunkt lag bei 213° .

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 1.

Bei der Analyse ergaben sich folgende Zahlen, welche mit denen eines Ornithinsulfats übereinstimmen.

I. 0.1346 g Substanz ergaben bei 19° und 760 mm B 17.6 ccm feuchten Stickstoffs, entsprechend 15.03% N.

II. 0.3870 g Substanz gaben 0.2450 g Baryumsulfat entsprechend 8.68% S

Berechnet für $(C_5H_{12}N_2O_2)_2H_2SO_4$:	Gefunden:
N = 15.47 %	15.03 %
S = 8.84 %	8.68 %

Ein weiterer Beweis dafür, daß die Krystalle aus dem bisher nicht beschriebenen dl-Ornithinsulfat bestanden, konnte durch die Überführung in dl-Ornithursäure erbracht werden.

3 g des Sulfats wurden in 30 ccm Wasser gelöst und mit 100 ccm 10 %iger Natronlauge und etwa 15 g Benzoylchlorid (in kleinen Portionen zugefügt) bis zum Verschwinden des Benzoylchloridgeruchs geschüttelt. Der mit Salzsäure ausgefällte Niederschlag wurde durch Äther von überschüssiger Benzoesäure befreit und der Rückstand aus wenig heißem Alkohol umkrystallisiert.

Die so dargestellte Ornithursäure zeigte den Schmelzpunkt von 184°, während E. Fischer für die aus synthetischem Ornithin erhaltene dl-Ornithursäure 184—185° angibt.¹⁾

Die Mutterlauge des Ornithinsulfats gab nach Entfernung der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffe eine reichliche Krystallabscheidung. Die abgesaugten Krystalle zeigten nach dem Umkrystallisieren die bekannten Reaktionen des Harnstoffs und einen Schmelzpunkt von 130° (unkorr.). Die Kjeldahlbestimmung ergab folgende Werte:

Gefunden:	Berechnet für Harnstoff:
N 46.53 %	46.67 %

Neben dem dl-Ornithin war somit unter der Einwirkung des Baryhydrats Harnstoff aus dem Clupein abgespalten worden.

Heidelberg, 31. März 1909.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 454 (1901)