

## **Weiterer Beitrag zur Kenntnis der bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen auftretenden Spaltprodukte.**

Von

**Emil Abderhalden und Akikazu Suwa.**

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. März 1910.)

Es sind im hiesigen Institute eine ganze Reihe von Seidenarten der totalen Hydrolyse unterworfen worden, um festzustellen, ob sie alle dieselben Aminosäuren und in annähernd den gleichen Mengenverhältnissen liefern. Es ließ sich zeigen, daß zwar stets dieselben Aminosäuren gefunden werden, es lassen sich jedoch nach den Mengen, in denen die einzelnen Bausteine vorhanden sind, bestimmte Gruppen abgrenzen. Es gibt Seidenarten, die, wie z. B. die italienische Grège, sehr viel Glykokoll, Alanin und Tyrosin liefern, während bei Seidenarten des Typus der wilden Seiden, der Tussah-Seiden, das Glykokoll an Menge wesentlich zurücktritt. All diese Untersuchungen sollen als Grundlage zur Entscheidung der Frage dienen, ob Proteine, welche nicht nur die gleichen Bausteine, sondern diese auch in den gleichen Mengenverhältnissen besitzen, bei der partiellen Hydrolyse ebenfalls gleichartige Abbauprodukte liefern oder aber, ob sich hier Unterschiede zeigen.

Wir haben damit begonnen, Dipeptide aus einigen Seidenarten zu isolieren und zwar zunächst in Form ihrer Anhydride. Aus «Canton-Seide» wurden Glycyl-d-alaninanhydrid und Glycyl-l-tyrosinanhydrid gewonnen und aus der «New-Chwang»-Seide und der indischen Tussah d-Alanin-

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden, Vergleichende Untersuchungen über die Zusammensetzung und den Aufbau verschiedener Seidenarten. Diese Zeitschrift. Bd. LVIII, S. 352, 1909.

anhydrid und Glycyl-d-alaninanhydrid. Auffallend war, daß die Seiden des Typus der «Tussah-Seiden» stets größere Mengen von d-Alaninanhydrid lieferten. Wir dachten zunächst an eine sekundäre Bildung dieses Anhydrids aus d-Alanin-ester. Wir haben deshalb die Versuche wiederholt und alle Sorgfalt auf die Entfernung der Monoamino-säureester verwendet. Wir erhielten trotzdem d-Alaninanhydrid und zwar scheidet sich dieses sofort aus. Bei der partiellen Hydrolyse von italienischer Grège und der «Canton-Seide» haben wir nie Alaninanhydrid beobachtet. Leider geben uns die gemischten Anhydride keine Auskunft über die Struktur der Dipeptide, aus denen sie sich bilden. Hier muß die direkte Isolierung der Dipeptide einsetzen und eine Entscheidung der erwähnten Fragestellung bringen.

### Experimenteller Teil.

200 g «Canton-Seide» (degommiert) wurden mit der fünffachen Menge rauchender Salzsäure (1,19 spez. Gew.) übergossen und vier Tage bei 20° aufbewahrt. Das Seidenfibroin ging nach etwa 3 Stunden völlig in Lösung. Die Verarbeitung auf Dipeptide resp. deren Anhydride erfolgte in gewohnter Weise. Zunächst wurde die Hydrolysenflüssigkeit mit der zehnfachen Menge Wasser verdünnt und dann die Hauptmenge der Salzsäure mit Kupferoxydul entfernt. Nach Entfernung des gelösten Kupfers aus der filtrierten Lösung mit Schwefelwasserstoff engten wir das Filtrat vom Kupfersulfid unter vermindertem Druck bei 35—40° des Wasserbades ein. Der Rückstand wurde wiederholt mit absolutem Alkohol zur Trockene verdampft und schließlich in der üblichen Weise verestert. Die Veresterung wurde zweimal wiederholt. Die Ester setzten wir mit der berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit. Der Chlorgehalt der Lösung wurde gravimetrisch festgestellt. Wir destillierten dann die Ester bis 100° bei 10 mm Druck ab und extrahierten den Rückstand wiederholt mit viel Äther (ca. 2 l). Das in Äther Unlösliche wurde in Alkohol aufgenommen, die Lösung filtriert und dann bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Es er-

folgten bald teils krystallinische, teils amorphe Abscheidungen. Sie wurden in einzelnen Fraktionen gesammelt. Blieb das Filtrat der letzten Abscheidung längere Zeit klar (2—3 Tage), dann wurde es eingengt. So fraktionierten wir, bis nur noch eine geringe Menge Mutterlauge übrig blieb.

Alle Fraktionen wurden für sich aus wässerigem Alkohol unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert und dann auf Anwesenheit von Tyrosin (Millon) geprüft. Ferner stellten wir fest, ob die Substanz ganz aus Anhydriden bestand; indem wir ihre wässerige Lösung mit Kupferoxyd kochten. Endlich machten wir mit jeder Fraktion die Biuretprobe. Die zuerst gewonnenen Fraktionen gaben keine Rotfärbung mit Millons Reagens. Sie ließen sich auch relativ leicht in Krystallform bringen. Sie drehten alle wenig. Eine Reihe von weiteren Fraktionen drehten gleichfalls wenig, sie ließen sich jedoch nur in gallertartiger Form abscheiden. Die zuletzt gewonnenen Substanzen gaben alle Rotfärbung mit Millons Reagens, zum Teil färbten sich ihre wässerigen Lösungen blau beim Kochen mit Kupferoxyd. Offenbar lag hier ein Gemenge von verschiedenen Substanzen vor.

Von den isolierten Anhydriden konnten wir nur das Glycyl-d-alaninanhydrid und das Glycyl-l-tyrosinanhydrid identifizieren. Das erstere krystallisierten wir aus heißem Alkohol um. Wir haben auch hier wieder die auffallende Beobachtung gemacht, daß in manchen Fällen bei anscheinend ganz gleichartigen Versuchsbedingungen ohne weiteres Krystallisation erfolgt. Aus der heißen alkoholischen Lösung schieden sich feine Nadelchen ab. In anderen Fällen dagegen erhält man eine Gallerte, die oft hartnäckig jeder Krystallisation widersteht. Wir haben solche Gallerten wiederholt getrocknet und dann analysiert. Wir erhielten auf Glycyl-alaninanhydrid stimmende Werte. Auch ließen sich bei der totalen Hydrolyse neben Alanin und Glykokoll keine anderen Aminosäuren nachweisen. Auffallend war, daß diese Gallertform ein bedeutend stärkeres Drehungsvermögen aufwies, als das krystallisierte Anhydrid. Da jedoch dieses aus der gallertigen Abscheidung nur unter großen Verlusten zu gewinnen war, bleibt es vorläufig unentschieden, ob nicht doch

dem gallertigen Produkte in geringer Menge ein anders zusammengesetztes Anhydrid beigemischt war. Die Ausbeute an krystallisiertem Anhydrid betrug 2—5% des angewandten Fibröins.

0,1982 g Substanz gaben 0,3412 g  $\text{CO}_2$  und 0,1156 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$ :

Gefunden:

46,88% C und 6,25% H.

46,95% C und 6,49% H.

2,0 g des analysenreinen Produktes hydrolysierten wir durch 6stündiges Kochen mit der fünffachen Menge rauchender Salzsäure. Nach dem Verdampfen des Hydrolysats unter vermindertem Druck veresterten wir den Rückstand zur Abscheidung des Glykokolls als Esterchlorhydrat. Die Ausbeute an Glykokoll betrug 0,90 g. Die Mutterlauge des Glykokollesterchlorhydrats verdampften wir zur Trockene und setzten die Ester in gewohnter Weise mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit. Die Ester wurden in Äther aufgenommen, der Äther verdampft und der Rückstand direkt durch Kochen mit der 10fachen Menge Wasser verseift. Nach dem Eindampfen der Lösung verblieb ein Rückstand, der in der auf Alanin berechneten Menge Salzsäure gelöst  $[\alpha]_{20}^D = -1-8,1^\circ$  zeigte.

Aus einer weiteren Portion des gleichen Anhydrids haben wir aus dem Ester das Alanin nach dem Verseifen isoliert. Wir erhielten aus 1 g Anhydrid neben 0,48 g Glykokoll 0,60 g Alanin vom Schmelzpunkt  $296^\circ$  (korr.).

0,1024 g Substanz gaben 0,1520 g  $\text{CO}_2$  und 0,0719 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ :

Gefunden:

40,45% C und 7,86% H.

40,48% C und 7,85% H.

Das Glycyl-l-tyrosinanhydrid reinigten wir durch wiederholtes Umkrystallisieren aus heißem Wasser. F.  $282^\circ$ . Millons Reaktion stark positiv.

0,2412 g Substanz gaben 0,5303 g  $\text{CO}_2$  und 0,1215 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ :

Gefunden:

60,00% C und 5,49% H.

59,96% C und 5,63% H.

Zur totalen Hydrolyse verwendeten wir 2 g des Anhydrids. Sie wurde durch 16stündiges Kochen mit 25%iger Schwefelsäure herbeigeführt. Wir isolierten durch direkte Krystallisation 1,25 g Tyrosin und aus dessen Mutterlauge über das Esterchlorhydrat 0,52 g Glykokoll.

Die Ausbeute an diesem Anhydrid betrug nur 1—3% des angewandten Fibroins. Für  $[\alpha]_{20}^D$  erhielten wir, in wässerigem Ammoniak gelöst, +110,5°.

Die «New-Chwang-Seide» behandelten wir ebenfalls mit rauchender Salzsäure und zwar verwendeten wir einen Liter davon auf 290 g Seide. Nach viertägigem Stehen bei 20° war noch keine vollständige Lösung eingetreten. Wir erwärmten deshalb das Gemisch 6 Stunden auf 40° und bewahrten die immer noch zähflüssige Masse noch 2 Tage bei 20° auf. Es verblieb noch ein ganz erheblicher Rückstand, von dem abfiltriert wurde. Die Verarbeitung war im übrigen genau dieselbe, wie sie im vorhergehenden Falle geschildert worden ist. Wir erhielten fast ausschließlich d-Alaninanhydrid, das sofort auskrystallisierte. Die einzelnen Fraktionen waren verschieden rein.

0,1496 g Substanz brauchten 21,1 ccm  $H_{10}$ -Schwefelsäure.

Berechnet für  $C_6H_{10}N_2O_2$ :

19,72% N.

Gefunden:

19,77% N.

Bei der totalen Hydrolyse des Anhydrids erhielten wir ausschließlich d-Alanin.  $[\alpha]_{20}^D$  des salzsauren Salzes = +8,58°.

Aus der Mutterlauge des Alaninanhydrids gewannen wir ein Anhydrid, das offenbar mit Glycyl-d-alanin identisch war. Seine Menge reichte zur genauen Identifizierung nicht aus.

Aus zwei weiteren Präparaten der gleichen Seidenart, die wir nur 4 Tage mit rauchender Salzsäure stehen ließen, erhielten wir stets wieder größere Mengen von d-Alaninanhydrid — bis zu 6% der angewendeten Seide — und Glycyl-d-alaninanhydrid. Das erstere krystallisiert sehr leicht und scheidet sich frühzeitig ab.

d-Alaninanhydrid erhielten wir auch in größerer Menge aus indischer Tussah. Die Einwirkung der Salzsäure dauerte in den drei ausgeführten Versuchen 4 Tage. Die Ausbeute an d-Alaninanhydrid betrug 2—5%.

0,1486 g Substanz brauchten 20,8 ccm  $H_{10}$ -Schwefelsäure.

Berechnet für  $C_6H_{10}N_2O_2$ :

19,72% N.

Gefunden:

19,62% N.

Die einzelnen Fraktionen drehten in wässriger Lösung von  $-20^{\circ}$  —  $26,38^{\circ}$ . F.  $297^{\circ}$  (korr.). Bei der totalen Hydrolyse wurde nur d-Alanin erhalten.

Die Mutterlauge des d-Alaninanhydrids gab starke Rotfärbung mit Millons Reagens; es ist uns jedoch nicht gelungen, ein tyrosinhaltiges Anhydrid in genügender Menge in krystallinischem Zustand abzuscheiden. Glycyl-d-alaninanhydrid war unzweifelhaft vorhanden, doch gelang es nicht, es in völlig analysenreinem Zustand zu erhalten.

Um zu prüfen, ob ein Gemisch von Estern verschiedener Aminosäuren bei längerem Stehen zu gemischten Anhydriden führt, haben wir Glykokoll- und Alaninester aus Seide längere Zeit zusammen aufbewahrt. Wir filtrierten jeden Tag die ausgeschiedenen Krystalle ab. Alle Fraktionen wurden auf ihren Schmelzpunkt, ihr Drehungsvermögen und ihre sonstigen Eigenschaften untersucht. Zunächst beobachteten wir nur die Abscheidung von Glycinanhydrid. Viel später folgte Alaninanhydrid. Glycyl-d-alaninanhydrid konnten wir nie auffinden. Wir setzen die Versuche fort.