

Beitrag zur Kenntnis der bei der totalen Hydrolyse von Proteinen auftretenden Aminosäuren.

Von
Emil Abderhalden.

(Aus dem physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)
Der Redaktion zugegangen am 25. August 1910.)

In den letzten Jahren sind mit Hilfe der von Emil Fischer eingeführten Estermethode eine sehr große Zahl von Proteinen auf ihren Gehalt an Aminosäuren untersucht worden. Es lagen diesen Arbeiten mehrere Ziele zugrunde. Einmal galt es, die Zusammensetzung einer möglichst großen Zahl von Proteinen kennen zu lernen. Zahlreiche Fragestellungen trafen hier zusammen. Unsere Kenntnisse über die am Aufbau der verschiedenartigsten Proteine beteiligten Bausteine waren, ehe Emil Fischer seine klassischen Arbeiten begann, noch sehr lückenhafte. Das Resultat der zahlreichen Untersuchungen war, daß am Aufbau der verschiedenartigen Eiweißkörper im allgemeinen stets die gleichen Aminosäuren beteiligt sind. Der eine oder andere Baustein fehlt einigen Proteinen. Große Unterschiede ergaben sich bei der Vergleichung der Quantitäten, in denen die einzelnen Aminosäuren in den verschiedenen Eiweißstoffen sich finden.

Weitere Untersuchungen galten vergleichenden Studien über den Gehalt an Aminosäuren von Proteinen ein und derselben Klasse. Hier sollte eine Grundlage für Studien über partielle Hydrolyse von Eiweißstoffen geschaffen werden. Nach dieser Richtung war es auch von größter Wichtigkeit, Proteine aufzufinden, an deren Aufbau einige wenige Aminosäuren in ganz besonders großer Menge beteiligt sind.

Endlich hatten die zahlreichen Hydrolysen auch zum Ziel, Ausgangsmaterial zur Gewinnung einzelner Aminosäuren zu schaffen.

In neuerer Zeit sind mehrfach Verbesserungen der

Fischerschen Estermethode vorgeschlagen worden. Ferner ist an den erhaltenen Resultaten Kritik geübt worden. Wir haben schon vor längerer Zeit ausgedehnte Untersuchungen in Angriff genommen, um einesteils die vorgeschlagenen Verbesserungen zu prüfen und andernteils die Brauchbarkeit der Estermethode in quantitativer Hinsicht zu ergründen. Wir werden über diese Untersuchung im Zusammenhang berichten. Hier sei zunächst nur über Versuche berichtet, die den Zweck hatten, festzustellen, bei welchen Operationen der Estermethode Verluste erfolgen und ferner, ein wie großer Teil des Gesamtstickstoffs der Untersuchung entgeht. Wir gingen so vor, daß wir vor und nach jeder Operation den Stickstoffgehalt genau bestimmten. Zunächst stellten wir den Stickstoffgehalt des Ausgangsmaterials fest, dann wurde mit Baryt resp. Schwefelsäure vollständig hydrolysiert. Im Hydrolysat wurde wieder der Stickstoffgehalt bestimmt. Dann wurden die abgeschiedenen Aminosäuren (Tyrosin, Glykokoll) und die entsprechenden Mutterlaugen auf Stickstoff analysiert. So verfolgten wir eine Phase nach der anderen. Die unten mitgeteilte Übersicht gibt die erhaltenen Resultate wieder. Zu den einzelnen Versuchen verwendeten wir italienisches Seidenfibroin. Der Stickstoffgehalt bezieht sich auf die bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknete, aschefreie Substanz. Bei Versuch 1 und 2 ist die Hydrolyse durch 9stündiges Kochen mit einer heiß gesättigten Barytlösung herbeigeführt worden. Vor dem Kochen war die Seide auf dem Wasserbad mit der Barytlösung so lange digeriert worden, bis der größte Teil der Seide gelöst war. Bei Versuch 3 und 4 verwendeten wir 25%ige Schwefelsäure. Wir kochten 16 Stunden. In beiden Versuchsreihen bestimmten wir den Stickstoffgehalt des Hydrolysats und des ungelöst gebliebenen Rückstandes. Sein Anteil ist bei der Seide sehr gering. Während der Hydrolyse sind keine nennenswerten Verluste eingetreten. Selbstverständlich wurde das Kochen mit Baryt resp. Schwefelsäure unter Anwendung eines guten Rückflußkühlers vorgenommen. Wir wollen jetzt schon bemerken, daß bei anderen Proteinen beim Kochen mit Säuren namentlich schwefelhaltige Produkte sich im Kühler kondensieren. Beim

| | Versuch I ¹⁾ Stickstoff in g in % | Versuch II ¹⁾ Stickstoff in g in % | Versuch III ¹⁾ Stickstoff in g in % | Versuch IV ¹⁾ Stickstoff in g in % |
|--|--|---|--|---|
| Gesamtstickstoff | 21,20 | 6,17 | 17,15 | 34,30 |
| Hydrolsat | 21,10 | 6,06 | 17,00 | 34,24 |
| Ungelöster Rückstand (Melanine) | 0,025 | 0,08 | 0,03 | 0,08 |
| Baryumsulfatniederschlag (Entfernung des Baryts mit Schwefel- säure, resp. der Schwefelsäure mit Baryt) | 0,28 | 0,04 | 0,12 | 0,28 |
| Filtrat der Fällung | — | — | 16,75 | 33,60 |
| Durch Krystallisation gewonnenes Tyrosin | 0,90 | 0,27 | 0,80 | 1,64 |
| Mutterlauge des Tyrosins | 19,80 | 5,68 | 15,80 | 31,92 |
| Esterchlorhydrate der übrigen Aminosäuren in alkoholischer Lösung Abgeschiedenes Glykokoll (als salzsaure Ester gewonnen) | — | 5,72 | 15,75 | 31,90 |
| Mutterlauge des Glykokollchlorhydrats | 6,66 | 1,19 | 6,10 | 12,84 |
| Ätherische Lösung der freien Aminosäureester (nach Infrarot- setzung der Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat) | 12,90 | 3,69 | 9,55 | 18,80 |
| Destillation der Aminosäureester: I. Fraktion: bei 100° des Wasserbades bei 12 mm Druck | 8,45 | 2,87 | 8,00 | 16,10 |
| II. „ „ 100° „ „ 0,1 „ „ | 4,10 | — | 3,05 | 7,90 |
| III. „ „ 180° „ Ölbad „ 0,1 „ „ | 1,70 | — | 1,50 | 2,84 |
| Destillationsrückstand | 0,71 | — | 0,70 | 1,44 |
| Summe | 1,29 | — | 1,75 | 2,70 |
| Rückstand nach der Ausätherung der Ester (Salzgemisch und nicht ausgeätherte Aminosäureester) | 7,80 | — | 7,00 | 14,88 |
| Wiederholung der Veresterung. Es verblieben in den Salzen nach erfolgter Veresterung | 4,38 | 0,78 | 1,50 | 2,62 |
| Summe der in Äther übergegangenen Ester | 0,42 | 0,10 | 0,10 | 0,15 |
| Summe der nicht in Äther übergegangenen stickstoffhaltigen Substanzen | 1,53 | 0,33 | 0,62 | 1,20 |
| Summe | 1,84 | 0,27 | 0,69 | 1,20 |

¹⁾ Versuch I und II sind von Herrn Dr. Erwin Mayer, dem Assistenten des Instituts, im W.-S. 1909/10 durchgeführt worden.

Hämoglobin beobachteten wir wiederholt Schwefelabscheidung und bei der Hydrolyse von Spongin Jodoformgeruch. Wahrscheinlich werden sich bei den verschiedenartigen Proteinen größere Verluste als gerade bei der Seide ergeben.

Im Baryumsulfatniederschlag blieb ebenfalls kein großer Anteil des Gesamtstickstoffs zurück. Auch dieser Befund darf nicht verallgemeinert werden. Bei der Hydrolyse anderer Proteine haben wir nach immer und immer wieder ausgeführter Auskochung des Baryumsulfatniederschlages noch größere Mengen organischer Substanz im genannten Niederschlag beobachtet. Es scheint, daß sehr schwer lösliche Baryumverbindungen vorliegen. Die Verluste beim Filtrieren des Baryumsulfatniederschlages waren gering. Nun wurde das Tyrosin abgeschieden. Auch bei dieser Operation sind kleine Verluste vorhanden. Die Mutterlauge des Tyrosins wurde verestert, das Glykokoll als Esterchlorhydrat abgeschieden. Bei Versuch 3 und 4 wurde ganz besondere Sorgfalt auf möglichst quantitative Bestimmung des Glykokolls gelegt. Die Veresterung wurde drei-, ja beim letzten Versuch sogar fünfmal wiederholt. Bei den beiden ersten Versuchen war offenbar nicht alles Glykokoll abgetrennt worden. Aus der Mutterlauge des Glykokollesterchlorhydrats wurden die Ester in Freiheit gesetzt.

Wir hielten uns in allen Fällen an die Vorschrift Emil Fischers. Wir wichen nur insofern von dieser ab, als wir nach erfolgter Lösung der salzsauren Aminosäuren in wenig Wasser nach Zusatz von Natronlauge direkt festes Kaliumcarbonat zugaben und nicht zuerst eine konzentrierte wässrige Lösung von Kaliumcarbonat. Die Hauptsache ist, daß man durch tüchtiges Schütteln und vorsichtigen Zusatz des Kaliumcarbonats jede Klumpenbildung vermeidet. Es muß schließlich eine ganz lockere, feinkörnige Masse resultieren, die ein ganz homogenes Aussehen hat. Der Äther muß jedes Körnchen für sich umspülen und überall sofort die in Freiheit gesetzten Ester aufnehmen können. Wir haben nach Levenes¹⁾ Vorschlag auch wasserfreies Baryumhydroxyd verwendet, jedoch

¹⁾ P. A. Levene, The cleavage products of proteoses. The Journal of biological chemistry, Vol. I, p. 45, 1905/6.

trotz aller Bemühungen nie so gute Resultate erzielt, als nach der ursprünglichen Vorschrift. Die Verwendung von Kaliumcarbonat und Natronlauge erleichtert sehr die Wiederholung der Veresterung. Wir haben früher¹⁾ den nach der Ausätherung der Ester verbleibenden Rückstand zunächst in Wasser gelöst und dann gasförmige Salzsäure eingeleitet. Dann dampften wir bis zur Abscheidung von Salzkrusten ein. Nun wurde filtriert und das Filtrat weiter eingeengt. Die vereinigten Salzmassen wurden dann solange mit Alkohol, der mit gasförmiger Salzsäure gesättigt war, gewaschen, bis keine organische Substanz mehr den anorganischen Salzen beigemischt war. Dieser ganze Prozeß läßt sich sehr vereinfachen. Man übergießt den obengenannten Rückstand direkt mit Alkohol und leitet gasförmige Salzsäure ein. Von den ungelösten Salzen wird abfiltriert. Bei größeren Salz mengen wird der ganze Prozeß wiederholt. Die alkoholischen Filtrate werden unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft und nunmehr die Veresterung wiederholt. In anderen Fällen haben wir nicht direkt verestert, sondern den Rückstand, der nach der Ausätherung verbleibt, zunächst ein- bis zweimal mit Salzsäure zur Trockene verdampft und dann den Rückstand mit Alkohol übergossen und gasförmige Salzsäure eingeleitet. Wir kamen so rascher zum Ziel, als wenn wir bei Anwendung von Baryt diesen mit Schwefelsäure entfernen mußten. Ohne Zweifel wird bei der Art der Anwendung der einen oder anderen Methode auch die Übung eine große Rolle spielen.

Ein Blick auf die tabellarische Übersicht zeigt, daß bei der Infreiheitsetzung der Ester wechselnde Resultate erhalten werden. Bei den beiden letzten Versuchen waren die Resultate gleichmäßiger. Ohne Zweifel liegt hier eine der wesentlichsten Fehlerquellen. Die Infreiheitsetzung der Ester erfordert Erfahrung und Übung. Bemerkte sei, daß die meisten der von mir und meinen Mitarbeitern veröffentlichten Arbeiten über vollständige Hydrolyse von Proteinen Resultate enthalten, die nach mehrfacher Wiederholung der ganzen Arbeit gewonnen worden

¹⁾ Vgl. Emil Abderhalden. Hydrolyse des krystallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut. Diese Zeitschrift. Bd. XXXVII. S. 484. 1903.

sind. Oft ergaben sich ganz beträchtliche Unterschiede. Selbstverständlich sind immer die besten Ausbeuten angegeben.

Im Destillationsrückstand verblieb noch eine ansehnliche Stickstoffmenge. Aus ihm läßt sich Serinanhydrid gewinnen. Bei der Fraktionierung der Ester und speziell beim Abdampfen des Äthers sind die Verluste relativ groß. Diese Fehlerquelle ist bereits bekannt. Man kann sie beträchtlich einschränken, indem man den von den Estern abdestillierten Äther mit wässriger Salzsäure ausschüttelt und dann vom Äther abtrennt. Dampft man den salzsäurehaltigen Auszug ein, dann erhält man noch ganz beträchtliche Mengen von Aminosäuren (Glykokoll und Alanin). Unzweifelhaft entstehen auch Verluste bei der Destillation der Ester selbst. Sie lassen sich vermeiden durch eine sehr sorgfältige Kühlung der Vorlage. Am besten werden zwei Vorlagen vorgelegt. In manchen Fällen beschickten wir die zweite Vorlage (am besten wird hierzu eine Saugflasche genommen) mit verdünnter Salzsäure. Zwischen der ersten und zweiten Vorlage wurde dann ein Hahn eingeschaltet, um zu vermeiden, daß bei Unterbrechung des Vakuums Salzsäuredämpfe in die erste Vorlage zurücksteigen.

Weitere Verluste entstehen bei der Trennung der einzelnen Fraktionen in ihre Bestandteile. Hier sprechen Erfahrung und Übung eine sehr große Rolle. Verluste sind jedoch nicht vermeidbar. Viel hängt natürlich von der Art der Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen ab. Wiegen bestimmte Aminosäuren vor, dann wird die Trennung rascher gelingen, als wenn ein Gemisch von mehreren, in ungefähr gleicher Menge vorhandenen Aminosäuren vorliegt. Besondere Schwierigkeiten bereitete bisher immer die Trennung von Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin. Die erstere Aminosäure läßt sich noch am besten abtrennen. Valin, Leucin und Isoleucin bilden leicht Mischkrystalle. Durch alle früheren Arbeiten klingt die Klage, daß die Leucinfraction meist nicht ganz rein zu erhalten sei. Nie ist ein Zweifel darüber belassen worden, daß unter Leucin einmal die Aminoisobutyllessigsäure und das Isoleucin zu verstehen sind und ferner Valin beigemischt ist. Das Isoleucin ist nie bestimmt worden. Sein Entdecker Ehrlich hatte seinerzeit den Wunsch geäußert, die Leucinfraction nach dieser Richtung selbst

aufzuarbeiten. Wir begnügten uns deshalb meistens mit der qualitativen Feststellung. Durch den Versuch, Valin abzutrennen, hatten wir meistens große Verluste. Wollte man überhaupt vergleichbare Werte erhalten, dann konnte man nur so vorgehen, daß man aliquote Anteile der einzelnen, schon möglichst gereinigten Fraktionen auf bestimmte Aminosäuren verarbeitete. Einer Bemerkung von Halliburton¹⁾ gegenüber sei auch hier nochmals ausdrücklich hervorgehoben, daß weder Emil Fischer noch ich jemals behauptet haben, daß die mit Hilfe der Estermethode erhaltenen Werte Anspruch auf Exaktheit machen. Niemals war die Rede von einer quantitativen Bestimmungsmethode. Daß die Estermethode in ganz verschiedenen Händen recht gut übereinstimmende Werte ergeben kann, haben die Wiederholungen von Hydrolysen ergeben, die wir bereits ausgeführt hatten.²⁾ Schon der Umstand, daß eine Wiederholung der Veresterung nach erstmaliger Ausätherung der Ester die Ausbeuten ganz wesentlich steigert, zeigt, daß von einer quantitativen Methode nicht die Rede sein kann. Bei der Seide sind die Ausbeuten bei weitem am besten, weil hier nur einige wenige gut trennbare Aminosäuren vorliegen. Daß wir niemals daran gedacht haben, die von uns gegebenen Werte, die übrigens stets als Minimalwerte bezeichnet sind, als quantitative auszugeben, geht schon daraus hervor, daß wir immer, wenn es sich um quantitative Bestimmungen handelte, nur Tyrosin, Glutaminsäure und die Diaminosäuren in Betracht zogen. Höchstens das Glykokoll wurde in solchen Fällen noch mitbestimmt. Osborne, der über eine reiche Erfahrung auf diesem Gebiete verfügt, hat unter Berücksichtigung der erwähnten Punkte bei der Vergleichung unserer Resultate mit den seinen sich mit einer annähernden Übereinstimmung zufrieden gegeben.

¹⁾ Vgl. den Annual Report of the Chemical Society 1909. Biological Chemistry. Berichterstatter: W. D. Halliburton.

²⁾ Vgl. hierzu die Resultate, die Osborne und seine Schüler bei der Hydrolyse von Proteinen der Pflanzenwelt erhalten haben. Eine Zusammenstellung der Resultate findet sich in Bd. IV des Biochemischen Handlexikons.

Nun haben vor kurzem Levene und Slyke¹⁾ eine Methode angegeben, die eine quantitative Trennung der Leucinfraction in Leucin, Isoleucin und Valin gestatten soll. Bestätigt sich die Exaktheit der Methode durch weitere Erfahrungen, dann ist ohne Zweifel ein bedeutsamer Erfolg in der Trennung dieser Aminosäuren zu verzeichnen. Selbstverständlich können jedoch die erhaltenen Werte auch nicht als quantitative betrachtet werden. Die Methode von Levene und Slyke erstrebt ja nur eine Trennung der Leucinfraction in die einzelnen Komponenten. Da jedoch die Leucinfraction als solche bereits durch eine nicht quantitative Methode gewonnen worden ist, so bleibt der Fehler, der der Estermethode an und für sich anhaftet, bestehen. Levene und Slyke heben ganz richtig hervor, daß die früheren Untersucher nie einen Zweifel darüber gelassen haben, daß die Leucinfraction nicht einheitlich sei. Es mußte jede Methode, die eine quantitative Trennung der drei genannten Aminosäuren gestattet, zu einer Revision der bisher angegebenen Werte führen. Genau ebenso würde eine bessere Methode zur Trennung von Asparaginsäure, Serin und Phenylalanin sofort zu besseren Ausbeuten führen.

Levene und Slyke²⁾ haben nun bei der Prüfung der Leucinfraction des Edestins und des Caseins für die Fraction als solche andere Werte erhalten, als sie von Emil Fischer und von mir angegeben worden sind. Das Casein ist von Emil Fischer und später von mir wiederholt analysiert worden. Die einzelnen Bestimmungen gaben recht gut übereinstimmende Werte. Wir erhielten eine Leucinfraction + Valin von ca. 11 g. Levene und Slyke fanden 16 g. Beim Edestin, das von uns wiederholt untersucht worden ist, erhielten die genannten Autoren einen viel niedrigeren Wert, nämlich statt ca. 21 g nur 14 g. Wir haben beim Casein trotz größter Sorgfalt nie mehr als 13 g Leucinfraction pro 100 g reines

¹⁾ P. A. Levene und Donald D. Van Slyke, The leucin fraction of proteins. The Journal of Biological Chemistry, Vol. VI, p. 391, 1909.

²⁾ P. A. Levene und Donald D. van Slyke, The leucin fraction in casein and edestin. The Journal of biological Chemistry, Vol. VI, p. 419, 1909.

Casein (Hammarsten) erhalten können. Unsere Ausbeuten für Edestin schwanken zwischen 17,5 und 21%. Daß Levene und Slyke für Edestin andere Werte gefunden haben, erklärt sich vielleicht ohne weiteres daraus, daß sie bei der Isolierung der Leucinfraction anders verfahren sind als wir. Die Gründe für die höhere Ausbeute der Leucinfraction beim Casein können wir nicht angeben. Weitere Untersuchungen, die bereits im Gange sind, müssen hier Aufklärung bringen. Wir sind schon hier kurz auf die Arbeit von Levene und von Slyke eingegangen, weil Unkenntnis der ganzen Methodik leicht zum Schlusse führen könnte, als wären die zutage getretenen Differenzen unbedingt auf mangelhaftes Arbeiten zurückzuführen. Nur solche Resultate sind bei Anwendung der Estermethode vergleichend — und dann noch unter der Reserve, daß keine quantitative Methode vorliegt — zu verwerten, die in allen Einzelheiten genau auf die gleiche Weise erhalten worden sind.

Will man für einzelne Proteine den Gehalt an bestimmten Aminosäuren in exakterer Weise feststellen, als es bis jetzt der Fall war, dann muß man in erster Linie die Esterinfreiheitsetzung wiederholen.

Addiert man bei den Versuchen I, III und IV (vgl. die obige Tabelle) die Stickstoffwerte für Tyrosin, Glykokoll und für die einzelnen Esterfraktionen, dann kommt man zu den folgenden Ausbeuten: Bei Versuch I sind erhalten worden 14,07 g N, ausgegangen wurde von 21,20 g N. Der Bestimmung entgangen sind somit 7,13 g N. Die entsprechenden Werte für Versuch III sind: Erhalten von 17,15 g N 12,15 g. Differenz 5 g N. Versuch IV: Ausgegangen von 34,30 g N, isoliert 26,66 g N. Differenz 7,64 g N. Bei Versuch I sind 66,37% N in definierbarer Form erhalten worden, bei Versuch II 70,84% und 77,72% bei Versuch III.

Ein Blick auf diese Werte zeigt, daß selbst beim Seidenfibroin, das der Isolierung der Aminosäuren die wenigsten Schwierigkeiten entgegengesetzt, weil es nur wenige Bausteine besitzt, ziemlich erhebliche Differenzen in den Ausbeuten vorkommen. Versuch I und II sind von einem anderen, Untersucher ausgeführt worden, als Versuch III und IV. Bei Versuch IV wurde der Infreiheitsetzung der Ester die denkbar

größte Sorgfalt gewidmet. Ferner wurde die Veresterung 5 mal wiederholt. Bei Versuch III war nur 3 mal verestert worden. Die angegebenen Ausbeuten würden sich verringern, wenn an Stelle der Ester die freien Aminosäuren (nach erfolgter Verseifung und Trennung) berücksichtigt würden. Andererseits würde das im Destillationsrückstand vorhandene Serinanhydrid hinzukommen.

Wir haben den ganzen Esterprozeß wiederholt und in allen Fällen noch Aminosäureester gewonnen. Die Ausbeuten waren allerdings keine sehr bedeutenden mehr. Immer blieb noch ein beträchtlicher Teil des Stickstoffs beim Ausäthern der Ester zurück. Zum Teil ist dieser Anteil auf Diaminosäuren zurückzuführen.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß die Verfolgung des Stickstoffgehaltes der bei den mannigfaltigen Operationen, die zur Isolierung der Monoaminosäuren dienen, auftretenden Zwischenprodukte uns ein Mittel an die Hand gibt, die Quellen von Verlusten aufzudecken. Man wird in Zukunft verlangen müssen, daß bei jeder Hydrolyse die hier mitgeteilten Werte bestimmt werden. Nur dann wird es möglich sein, die von verschiedenen Seiten gewonnenen Werte zu vergleichen und zu beurteilen.

Unzweifelhaft wird man ein ganz anderes Bild erhalten, wenn man nicht Seide, sondern irgend ein anderes Protein, das mannigfaltigere Bausteine besitzt, in analoger Weise untersucht. Hier wird es auch nötig sein, vergleichende Untersuchungen mit künstlich hergestellten Gemischen bekannter Aminosäuren anzustellen. Derartige Versuche sind auch von anderer Seite in Angriff genommen worden,¹⁾ jedoch ohne Kontrolle mit Hilfe der Stickstoffwerte.

¹⁾ Vgl. Thomas B. Osborne and D. Breese Jones, Determining the quantity of monoamino-acids yielded by proteins when hydrolyzed with acids. *The American Journal of Physiology*, Vol. XXVI, p. 212, 1910, und A consideration of the sources of loss in analyzing the products of protein hydrolysis. *Ebenda*, p. 305.