

# Fäulnisversuche mit d-Glutaminsäure und Studien über die $\gamma$ -Aminobuttersäure.

Von

**Emil Abderhalden und Karl Kautzsch.**

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. September 1912.)

Ackermann<sup>1)</sup> hat beobachtet, daß  $\gamma$ -Aminobuttersäure entsteht, wenn er ein Gemisch von 50 g Glutaminsäure, 10 g Kochsalz, 20g Traubenzucker, 10g Pepton Witte, geringe Mengen von Magnesium- und Natriumsulfat in 4 Liter Wasser bei sodaalkalischer Reaktion nach Zusatz einer faulen Pankreasflocke 40 Tage bei 36° stehen ließ. Die Ausbeute an Goldsalz der  $\gamma$ -Aminobuttersäure betrug 2,1 g. Diese geringe Ausbeute kann verschiedene Ursachen haben. Einmal könnte sie in der angewandten Methodik begründet sein. Ferner ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß nur ein Teil der angewandten Glutaminsäure über  $\gamma$ -Aminobuttersäure abgebaut wurde, und endlich könnte fortwährend gebildete  $\gamma$ -Aminobuttersäure weiter zerlegt werden. Die Arbeit Ackermanns weist insofern Lücken auf, als nicht mitgeteilt wird, ein wie großer Teil der zugesetzten Glutaminsäure verändert worden ist, und ferner fehlt ein Kontrollversuch mit Witte-Pepton allein. Es wäre a priori denkbar, daß dieses die Quelle für die isolierte  $\gamma$ -Aminobuttersäure abgegeben hat. Gegen diesen Einwand läßt sich allerdings anführen, daß dann auch bei anderen Fäulnisversuchen mit anderen Aminosäuren  $\gamma$ -Aminobuttersäure hätte auftreten müssen. Immerhin sind Kontrollversuche gerade

<sup>1)</sup> D. Ackermann, Über ein neues, auf bakteriellem Wege gewinnbares Aporrhagma. Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 273, 1910. — Vgl. auch R. Engeland und Fr. Kutscher, Über ein methyliertes Aporrhagma des Tierkörpers. Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 282, 1910.

bei solchen Untersuchungen sehr wichtig, weil die Art des Abbaus offenbar ganz außerordentlich von den gewählten Bedingungen abhängt.

Wir haben die Fäulnisversuche mit verschiedenen Aminosäuren aufgenommen, weil wir hofften, die Methodik der Isolierung der sich bildenden Abbauprodukte wesentlich vereinfachen zu können. Bei der Anstellung der Versuche hielten wir uns, mit Ausnahme der Temperatur und der Zeitdauer, genau an die Angaben von Ackermann. Zur Isolierung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure wählten wir die Estermethode. Das Fäulnisgemisch wurde nach verschieden langer Dauer der Fäulnis unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft (die genaueren Angaben finden sich weiter unten), der Rückstand in gewohnter Weise mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert und die Ester schließlich nach erfolgter Infreisetzung unter vermindertem Druck destilliert. Daß diese Methodik gute Resultate liefert, ließ sich einwandfrei zeigen, indem wir einem Fäulnisgemisch  $\gamma$ -Aminobuttersäure zusetzten und sie dann auf die beschriebene Art wieder gewannen.

Wir haben ferner die nicht umgewandelte Glutaminsäure teils als solche, teils als Pyrrolidoncarbonsäure wieder gewonnen. Es war ein auffallend großer Teil der angewandten Aminosäure unverändert. Das erhaltene Resultat sei gleich vorweggenommen. Es ist uns in keinem einzigen Falle geglückt, auch nur eine Spur von  $\gamma$ -Aminobuttersäure zu isolieren. Außer den hier ausführlich mitgeteilten Versuchen haben wir, zum Teil unterstützt von Herrn Mehrwein, noch solche mit 1, 2, 3 und 4 Wochen Dauer durchgeführt. Auch hier war keine  $\gamma$ -Aminobuttersäure entstanden.

Unsere Versuche unterscheiden sich von denen Ackermanns in zwei Punkten. Einmal dauerte sein Versuch 40 Tage und dann ließ er bei 36° faulen. Aus äußeren Umständen war es uns unmöglich, die Versuche bei dieser Temperatur durchzuführen. Die Angaben von Ackermann über den Nachweis von  $\gamma$ -Aminobuttersäure bei den von ihm gewählten Bedingungen sind so gut gestützt, daß sein positiver Befund selbstverständlich durch unsere Beobachtungen nicht in Zweifel

gezogen werden kann. Immerhin zeigen unsere Versuche, daß noch manche Fragestellung zu lösen bleibt. Vor allem interessiert uns die Frage, ein wie großer Teil der Glutaminsäure über  $\gamma$ -Aminobuttersäure abgebaut wird. Liegt eine Art des Abbaus vor, die zur Regel gehört, oder stellt die Bildung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure etwas Außergewöhnliches dar? Man wird, um zu verhüten, daß einzelne Beobachtungen allzu sehr verallgemeinert werden, nicht nur qualitative Studien, sondern auch quantitative Beobachtungen anstellen müssen. Würde Ackermann den Rest der nicht abgebauten Glutaminsäure bestimmt haben, dann würde sich vielleicht sofort ergeben, weshalb unsere Resultate so verschiedene sind. Vielleicht war bei seinen Versuchen der Abbau ein viel vollständigerer. Wir werden unsere Beobachtungen unter anderen Bedingungen fortsetzen und die angewandte Methodik auch auf andere Fälle ausdehnen.

Um für die Versuche die nötigen Grundlagen zur Isolierung der zu erwartenden  $\gamma$ -Aminobuttersäure zu haben, haben wir diese synthetisch dargestellt und sie eingehend studiert. Vor allem prüften wir ihr Verhalten bei der Veresterung, die Eigenschaften des freien Esters und sein Verhalten bei der Destillation. Im folgenden seien zunächst die Studien über die  $\gamma$ -Aminobuttersäure mitgeteilt und darauf folgend die Fäulnisversuche mit Glutaminsäure. Bemerkte sei noch, daß für die  $\gamma$ -Aminobuttersäure ein wichtiges Erkennungsmittel ihre optische Inaktivität ist. Sie enthält kein asymmetrisches Kohlenstoffatom im Gegensatz zu allen aus Eiweiß gewonnenen Aminosäuren mit Ausnahme des Glykokolls.

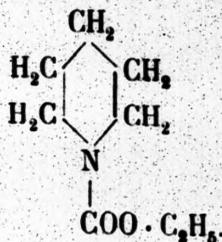
Anhangsweise sei noch der Bemühungen gedacht, auf biologischem Wege Pyrrolidincarbonsäure in Pyrrolidincarbonensäure mittels Wasserstoff entwickelnder Bakterien überzuführen. Ein sicherer Erfolg ist bis jetzt nicht erreicht worden. Die Überführung wurde namentlich mit dem *Bacillus butyricus* versucht. Würde die geplante Umwandlung gelingen, dann hätte man Beweise dafür, daß die Glutaminsäure durch Zellen über Pyrrolidon-

carbonsäure in Pyrrolidincarbonsäure übergeführt werden kann. Diese drei Aminosäuren wären dann auch biologisch eng verknüpft.

### I. Darstellung der $\gamma$ -Aminobuttersäure.

Wir gingen von Piperylurethan aus. Nach C. Schotten<sup>1)</sup> und nach S. Gabriel<sup>2)</sup> wird Piperylurethan durch konzentrierte Salpetersäure oxydiert und aufgespalten und dann das dabei entstehende Produkt, das noch den äthylsauren Ameisensäurerest enthält, im Rohr über 100° erhitzt, wobei unter Chloräthylabspaltung das Chlorhydrat der  $\gamma$ -Aminobuttersäure entsteht. Das Piperylurethan gewannen wir unter Zugrundelegung der Schottenschen Angaben<sup>3)</sup> aus Piperidin und Chlorkohlensäureäthyl. Wir haben die Darstellung in mancher Hinsicht modifiziert.

#### Darstellung des Piperylurethans,



aus Piperidin und Chlorkohlensäureäthyl:



Läßt man nach C. Schotten Chlorkohlensäureäthylester zu Piperidin tropfen, so tritt eine außerordentlich heftige Reaktion ein, die von starker Dampfentwicklung begleitet ist und eventuell zum Verspritzen führen kann. Vorteilhafter ist es, das Piperidin in reichlicher Menge eines indifferenten Lösungsmittels zu lösen und den Chlorkohlensäureester unter Kühlung zutropfen zu lassen. In diesem Falle findet nur eine mäßige Reaktion statt. Die Anwendung des indifferenten

<sup>1)</sup> C. Schotten, Über die Oxydation des Piperidins. Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 16, S. 643 (1883).

<sup>2)</sup> S. Gabriel, Synthese der Homopiperidinsäure und der Piperidinsäure. Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 23, S. 1770 (1890).

<sup>3)</sup> C. Schotten, Beitrag zur Kenntnis des Piperidins. Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 15, S. 425 (1882).

Lösungsmittels bietet auch den Vorzug, daß das sich bildende und ausfallende Piperidinchlorhydrat nach Beendigung der Reaktion ohne weiteres abfiltriert und anderweitig verwendet und das Filtrat direkt der Destillation unterworfen werden kann.

Man verfährt am besten, wie folgt:

42 g Piperidin (2 Mol.) werden etwa in der achtfachen Menge getrockneten absol. Äthers gelöst. Unter Eissalzkühlung läßt man während 25 Minuten etwas mehr als die für 1 Molekül berechnete Menge Chlorkohlensäureäthylester zutropfen. Es findet nur mäßige Nebelbildung statt. Nach Beendigung der Reaktion versetzt man die Reaktionsmasse mit ca. 150 g Wasser und schüttelt durch. Es geht dabei das Piperidinchlorhydrat in Lösung. Man trennt die ätherische Lösung im Scheidetrichter, schüttelt die wässrige Lösung nochmals mit Äther aus, trocknet dann den ätherischen Anteil mit Magnesiumsulfat und destilliert. Das Piperylurethan geht als farbloses Öl bei 211—212° über. Die Ausbeute beträgt 93% der Theorie, berechnet auf das angewandte Piperidin.

Anstatt das Piperidinchlorhydrat aus der Reaktionsmasse durch Ausschütteln mit Wasser zu entfernen, kann man auch die ätherische Lösung durch Abfiltrieren trennen und das Filtrat dann direkt der Destillation unterwerfen.

Wünscht man das bei der gebildeten Operation in Form des Chlorhydrates festgelegte zweite Molekül Piperidin zu weiterer Verarbeitung auf Piperylurethan zu verwenden, so versetzt man die wässrige Lösung, die bei der erwähnten Ausschüttelung erhalten wird, mit einer genügenden Menge Lauge oder Sodalösung und nimmt dann das freigemachte Piperidin in Äther auf.

Will man sich das während der Reaktion entstehende salzsaure Piperidin direkt zur Gewinnung von Piperylurethan nutzbar machen, so versetzt man die Reaktionsmasse, die nach Einwirkung des Chlorkohlensäureäthyls auf die ätherische Piperidinlösung sich bildet, mit etwas Sodalösung, schüttelt durch, trennt im Scheidetrichter, schüttelt die Ätherlösung, die jetzt auch das in Freiheit gesetzte Piperidin enthält, zum Trocknen kurze Zeit mit Magnesiumsulfat und läßt dann unter den oben

angegebenen Bedingungen die für die Hälfte des ursprünglich angewandten Piperidins berechnete Menge ( $\frac{1}{2}$  Mol.) Chlorkohlensäureäthylester einwirken.

In analoger Weise kann man auch das durch Abfiltrieren gewonnene Piperidinchlorhydrat verwerten.

### Überführung des Piperylurethans in $\gamma$ -Aminobuttersäure.

Zur Aufspaltung des Piperylringes und zur Oxydation wird das Piperylurethan nach S. Gabriel<sup>1)</sup> in zirka die doppelte Menge konzentrierte Salpetersäure eingetropt. Zur Mäßigung der Reaktion kühlten wir mit Eis. Es muß beständig umgeschüttelt werden. Läßt man die Einwirkung im umgekehrten Sinne nach C. Schotten<sup>2)</sup> vor sich gehen, so findet häufig eine solch energische Reaktion statt, daß bei plötzlich einsetzender, stürmischer Stickoxydgasentwicklung ein Teil der Reaktionsflüssigkeit durch Verspritzen verloren geht.

Die Reaktionsmasse wird mit etwa der dreifachen Menge Wasser versetzt und dann mit Benzol zur Aufnahme des Reaktionsproduktes wiederholt ausgeschüttelt. Die filtrierte Benzolösung wird auf dem Wasserbade eingedunstet und der gelbe, ölige Rückstand mit etwa dem zwei- bis dreifachen Volumen konzentrierter Salzsäure im Einschlußrohr ca. 2 Stunden auf 125—130° erhitzt, um den Chlorkohlensäureäthylrest (in Form von Kohlendioxyd und Chloräthyl) abzuspalten. Den starkgefärbten Röhreninhalt schüttelten wir zunächst nach Verdünnen mit Wasser mit Tierkohle. Das Filtrat wird dann auf dem Wasserbade eingedampft. Um die Salzsäure möglichst vollständig zu vertreiben, wiederholten wir nach Zusatz von Wasser das Eindampfen. Der Rückstand wird nun in wenig Wasser gelöst, mit Silbercarbonat aufgeköcht, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff vom gelösten Silber befreit, mit Tierkohle gekocht

<sup>1)</sup> S. Gabriel, l. c., Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 23, S. 1770 (1890).

<sup>2)</sup> C. Schotten, l. c., Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 16, S. 643 (1883).

und schließlich auf dem Wasserbade eingeengt. Nach S. Gabriel wird die konzentrierte Flüssigkeit mit Methylalkohol versetzt und der filtrierten Lösung Äther bis zur Trübung zugefügt, worauf nach einigem Stehenlassen die  $\gamma$ -Aminobuttersäure zur Abscheidung kommt.

Wir beobachteten, daß aus der mit Tierkohle gereinigten, wässrigen Lösung nach dem Konzentrieren bereits beim Versetzen mit etwas Methylalkohol farblose Krystallabscheidung erhalten werden konnte. Die abgesaugten, mit etwas Methylalkohol und Äther ausgewaschenen Krystalle stellten bereits ganz reine  $\gamma$ -Aminobuttersäure dar. Sie schmolz bei  $203^{\circ}$  mit Gasentwicklung. (Nach S. Gabriel schmilzt das nach Zusatz von Äther auskrystallisierte Produkt bei  $184^{\circ}$ .)<sup>1)</sup>

Krystallisiert die  $\gamma$ -Aminobuttersäure nicht sogleich nach Versetzen mit Methylalkohol aus, so nimmt man die fast völlig eingedunstete Lösung in zirka der zehnfachen Menge Methylalkohol auf, behandelt eventuell nochmals mit Tierkohle und fügt dann zu der (möglichst) entfärbten Lösung Äther bis zur Trübung. Nach mehrstündigem Belassen im Eisschrank scheidet sich dann die  $\gamma$ -Aminobuttersäure meist in schönen, rosettenartig angeordneten Krystallaggregaten, die aus Nadeln zusammengesetzt sind, ab. Auf Zusatz von viel Äther scheidet sich die Säure zunächst als Öl ab. Erhält man zunächst eine, mit etwas Öl noch durchtränkte Krystallmasse oder ein nur halbfestes Produkt, so reinigt man nach Abgießen der Flüssigkeit durch Verreiben der verbleibenden Masse mit einigen Kubikzentimetern Methylalkohol. Man gewinnt dabei eine reine, farblose Krystallmasse. Aus den Mutterlaugen erhält man noch weitere Mengen der  $\gamma$ -Aminobuttersäure in krystallinischer Form nach Zusatz von etwas Äther oder von Äthylalkohol.

Die Ausbeute an  $\gamma$ -Aminobuttersäure beläuft sich bei An-

<sup>1)</sup> Nach C. Schotten liegt der Schmelzpunkt der  $\gamma$ -Aminobuttersäure bei  $183$ – $184^{\circ}$  (l. c., Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jahrg. 16, S. 643 [1883]). J. Tafel und Max Stern geben als Schmelzpunkt der durch Umlösung mittels wässrigen Äthylalkohols gereinigten Säure  $202^{\circ}$  an, für das Rohprodukt den Schmelzpunkt  $186^{\circ}$ . Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 33, S. 2224 (1900).

wendung von 25 g Piperylurethan auf ca. 5,5 g.<sup>1)</sup> Zum Umkrystallisieren eignet sich auch wässriger Äthylalkohol. Löst man das Produkt in der sechsfachen Menge heißen, 75%igen Äthylalkohols, und versetzt man die warme Lösung mit etwa einem Drittel ihres Volumens mit absolutem Alkohol, so scheidet sich die Säure besonders nach mehrstündigem Belassen im Eisschrank und nach Impfen in reichlicher Ausbeute, zu mehr als 75% der Ausgangsmenge, in Form farbloser, makroskopischer, prismenartiger Krystalle ab. Das so umkrystallisierte Produkt schmilzt ebenso wie die oben aus Methylalkohol abgeschiedene Säure bei 203° unter Aufschäumen (Verwandlung in ihr Anhydrid, Pyrrolidon).

Für die Analyse wurde die Substanz bei ca. 100° getrocknet: 0,1562 g Substanz gaben 0,2673 g CO<sub>2</sub> und 0,1216 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> N:	Gefunden:
C = 46,60%	46,67%
H = 8,73%	8,65%

Auf Aminostickstoff nach van Slyke untersucht, gab die  $\gamma$ -Aminobuttersäure die auf 1 Atom Stickstoff stimmende Menge Stickstoffgas:

0,3014 g Substanz wurden in 20 ccm H<sub>2</sub>O gelöst; 9,15 ccm, also 0,1379 g Substanz enthaltend, lieferten im van Slykeschen Apparat 32,0 ccm Gas. Daraus berechnete sich: 12,9% N als Aminostickstoff; berechnet 13,59% N.

Die Angaben, daß die reine  $\gamma$ -Aminobuttersäure in Wasser spielend, in indifferenten Lösungsmitteln, wie in absolutem Alkohol, Äther und Chloroform unlöslich ist, konnten wir im allgemeinen bestätigen. In heißem Methylalkohol ist das Produkt dagegen etwas löslich. Es fällt aus der methylalkoholischen Lösung auf Zugabe von Äther in schönen farblosen, feinen, mikroskopischen Nadelchen aus. Der reine Körper ist an der Luft nicht zerfließlich. Ebenso fanden wir, daß die Säure beim Kochen in

<sup>1)</sup> C. Schotten und ferner S. Gabriel machen keine näheren Angaben über ihre erhaltenen Ausbeuten an  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Schotten weist nur darauf hin, daß die Ausbeute auf Grund der heftigen Einwirkung der Salpetersäure auf das Piperylurethan nicht gut ist.

wässriger Lösung mit wässriger Kupferoxydsuspension kein Kupfersalz bildet. Die konzentrierte wässrige Lösung gibt mit einer konzentrierten alkoholischen Pikrinsäurelösung keine Fällung; auch auf Zusatz einer alkoholischen Pikrolonsäurelösung findet keine Fällung statt. Wird die konzentrierte wässrige Lösung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure mit einer 10%igen Phosphorwolframsäurelösung versetzt, so entsteht zunächst ein dicker weißer Niederschlag, der beim Schütteln wieder verschwindet. Auf Zusatz von mehr Phosphorwolframsäure tritt dann eine bleibende, schwere, weiße Fällung ein. Beim Erhitzen oder auf Zusatz von viel kaltem Wasser geht sie wieder in Lösung. Sie löst sich auch in einer reichlichen Menge verdünnter Salpetersäure, dagegen nicht in Ammoniak (Unterschied vom Pyrrolidon).

Chlorhydrat der  $\gamma$ -Aminobuttersäure,  $C_4H_9NO_2 \cdot HCl$ :

Die salzsaure  $\gamma$ -Aminobuttersäure wurde bereits von C. Schotten<sup>1)</sup> und von J. Tafel<sup>2)</sup> erwähnt, jedoch ohne Angabe des Schmelzpunktes.

Wir stellten uns das Chlorhydrat aus der reinen  $\gamma$ -Aminobuttersäure dar durch Lösen derselben in wenig konzentrierter Salzsäure, Versetzen mit einigen Kubikzentimetern Alkohol und dann mit etwa dem fünffachen Volumen Äther. Man erhält dabei das Chlorhydrat in farbloser, seidenartiger, in Federn verwachsener Krystallmasse in reichlicher Ausbeute. Es schmilzt bei 135—136°.

0,2200 g Substanz bei 100° getrocknet, erforderten, nach Volhard bestimmt, 15,9 ccm  $n_{10}$ -AgNO<sub>3</sub>.

Berechnet für  $C_4H_9NO_2 \cdot HCl$ : Gefunden:

Cl = 25,45% 25,65%.

Das Chlorhydrat löst sich etwas in absolutem Alkohol, spielend in Wasser. Es ist etwas hygroskopisch.

Die  $\gamma$ -Aminobuttersäure kann man bei ihrer Darstellung

<sup>1)</sup> C. Schotten, l. c., Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 16, S. 644 (1883).

<sup>2)</sup> Julius Tafel und Max Stern, Reduktion von Succinimiden zu Pyrrolidonen. Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 33, S. 2224 (1900).

aus Piperylurethan auch in folgender Weise in Form ihres schön krystallisierenden Chlorhydrates abscheiden. Die nach Erhitzen im Einschlußrohr mit Tierkohle behandelte Lösung wird bis auf ein kleines Volumen eingeeengt, dann versetzt man mit etwa der fünffachen Volumenmenge an absolutem Alkohol und fügt schließlich zu dieser Lösung das Zehnfache an Äther hinzu. Scheidet sich dabei das Chlorhydrat zunächst etwas ölig ab, so gießt man die überstehende Lösung ab und behandelt den Rückstand mit etwas absolutem Alkohol. Man erhält dabei die salzsaure  $\gamma$ -Aminobuttersäure in Form schöner, farbloser, derber Krystalle. (Aus dem Filtrate konnten wir dann nach Eindunsten und Aufnehmen in Wasser in der oben beschriebenen Weise durch Behandeln mit Silbercarbonat usw. noch reine  $\gamma$ -Aminobuttersäure gewinnen.)

Platinsalz der  $\gamma$ -Aminobuttersäure  $(C_4H_9NO_2)_2H_2PtCl_6$ .

Das Platinat stellten wir uns am besten durch Lösen der reinen Säure in einigen Kubikzentimetern Salzsäure und Versetzen mit einer 10%igen alkoholischen Platinchloridlösung dar. Man erhält dabei das Salz in Form leichter oder kompakter orangegeber, prismenartiger Krystalle.

0,1380 g Substanz, bei 100° getrocknet, lieferten 0,0434 g Pt.

Berechnet für $(C_4H_9NO_2)_2H_2PtCl_6$ :	Gefunden:
Pt = 31,65%	31,44%

Das Platinsalz der  $\gamma$ -Aminobuttersäure schmilzt gegen 220° unter völliger Schwarzfärbung und unter starkem Aufschäumen. Es löst sich spielend in Wasser, mittelmäßig in Methylalkohol, kaum in absolutem Alkohol und gar nicht in Äther.

Goldsalz der  $\gamma$ -Aminobuttersäure.

Das Aurat gewannen wir am besten, indem wir z. B. 0,2 g reiner  $\gamma$ -Aminobuttersäure in 2 ccm verdünnter Salzsäure lösten, mit 1 ccm einer sehr konzentrierten Goldchloridlösung (aus 3 Teilen  $H_2O$  und 2 Teilen Goldchlorid bestehend) versetzten und dann im Vakuum-Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure einengten. Das Salz schied sich dabei in orange-gelben, prachtvollen, monoklinen Krystallen ab. Es schmilzt bei

138/139° nach kurz vorher erfolgter Erweichung;<sup>1)</sup> bei ca. 225° findet starkes Aufschäumen statt. Es löst sich sehr leicht in Wasser, in Methylalkohol und in Äthylalkohol, schwer in Äther und gar nicht in Benzol.

#### Veresterung der $\gamma$ -Aminobuttersäure.

3 g  $\gamma$ -Aminobuttersäure werden mit der 20fachen Menge absoluten Alkohols versetzt und mit trockenem Salzsäuregas behandelt.<sup>2)</sup> Es tritt dabei bald Lösung ein. Wir dunsteten unter stark vermindertem Druck fast zur Trockne ein. Der dabei erhaltene sirupöse Rückstand scheidet plötzlich, besonders nach Zusatz von einigen Kubikzentimetern kalten absoluten Alkohols, in reichlicher Menge den salzsauren Äthylester in farblosen, sternartig angeordneten Krystallaggregaten ab. Auf Zusatz von Äther nimmt die Abscheidung noch bedeutend zu.

Zur Gewinnung des freien Esters versetzt man den Eindampfrückstand mit etwa 5 ccm absoluten Alkohols und mit 50 ccm absoluten trocknen Äthers; dann sättigt man die Masse unter Eiswasserkühlung mit trockenem Ammoniakgas. Es wird hierauf schnell filtriert und im Vakuum destilliert.

Die Hauptmenge destillierte bei ca. 12 mm Druck bei 75—77° über, während ein geringerer Anteil bei ca. 130/132° als ebenfalls farbloses Öl ging. Die Menge der II. Fraktion betrug fast 1 g, etwa ein Drittel der I. Fraktion.

Die Substanz der ersten Fraktion, die einen intensiven Geruch nach Aminosäureestern besaß, erwies sich als  $\gamma$ -Aminobuttersäure-äthylester. Wir führten ihn in  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Platinat über und versetzten zu diesem Zwecke das farblose Destillat mit wässriger Salzsäure, wobei starke Reaktion (Nebelbildung) eintrat. Den Ester verseiften wir durch kurzes Erwärmen auf dem Wasserbade. Die nach starkem Eindunsten der Lösung auf dem Wasserbade erhaltene kompakte, hygroskopische Krystallmasse (Chlorhydrat der  $\gamma$ -Aminobuttersäure) wurde in einigen Tropfen Salzsäure gelöst und mit einer ca. 5%igen

<sup>1)</sup> Engeland und Kutscher geben als Schmelzpunkt des Goldsalzes 138° an. Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 283, 1910.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu auch J. Tafel, l. c., Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 33, S. 2232 (1900).

Platinchloridlösung in absolutem Alkohol versetzt. Wir erhielten dabei leichte, orangegelbe Krystalle, die sich nach ihrem Schmelzpunkt — gegen  $220^{\circ}$  unter starkem Aufschäumen und unter Schwarzfärbung — als Platinsalz der  $\gamma$ -Aminobuttersäure charakterisierten. Derselbe Schmelzpunkt wurde auch in reine Mischprobe mit dem oben beschriebenen Platinat der reinen  $\gamma$ -Aminobuttersäure erhalten. — Wird das Platinsalz in heißem Methylalkohol gelöst, so krystallisiert es beim Erkalten in den charakteristischen hellorangegelben, glänzenden Krystallen aus.

Daß das Hauptprodukt der Destillation  $\gamma$ -Aminobuttersäureester war, konnten wir auch noch durch Identifizierung des durch Verseifen eines Teiles der I. Fraktion mit Salzsäure erhaltenen Chlorhydrates nachweisen. Es schied sich aus der konzentrierten alkoholischen Lösung beim Erkalten in reichlicher Menge in Form weißer Krystalle ab, die, wie die salzsaure  $\gamma$ -Aminobuttersäure, bei  $135^{\circ}$  schmolzen und spielend löslich in Wasser, in Methylalkohol waren und sich leicht in heißem absoluten Alkohol lösten.

Die oben erwähnte II. Fraktion ist nach ihrem Siedepunkt als das Anhydrid der  $\gamma$ -Aminobuttersäure anzusprechen, das Emil Fischer<sup>1)</sup> bei der Destillation des durch Zerlegen mit Alkali aus dem Chlorhydrat gewonnenen Esters erhielt und bei 12 mm Druck bei  $133^{\circ}$  destillierte.

Das Produkt ergab mit wässriger Phosphorwolframsäurelösung eine weiße Fällung, die sich beim Erhitzen, sowie auf Zusatz von Ammoniak löste — ein Verhalten, das ebenfalls auf die Gegenwart von  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Anhydrid deutet.

## II. Fäulnisversuche mit d-Glutaminsäure.

Die einzelnen Versuche zur Prüfung der Einwirkung von Fäulnisbakterien auf d-Glutaminsäure wurden nach den Angaben von D. Ackermann<sup>2)</sup> angesetzt. Wir verwandten z. B.

<sup>1)</sup> Emil Fischer, Über die Ester der Aminosäuren. Sitzungsberichte d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wiss., S. 1062, 1900 und Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jahrg. 34, S. 433 (1901).

<sup>2)</sup> D. Ackermann, «Über ein neues, auf bakteriellem Wege gewinnbares Aporrhagma». Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 273 (1910).

25 g d-Glutaminsäure, 5 g Kochsalz, 10 g Traubenzucker, 5 g Witte-Pepton, einige Tropfen Magnesiumsulfat- und Natriumsulfatlösung und 2 l Wasser. Nachdem wir mit Soda (durch Zusatz von etwa der für 1 COOH-Gruppe der Glutaminsäure berechnete Menge) schwach alkalisch gemacht hatten, setzten wir einige kleine Stückchen faulenden Pankreasgewebes hinzu. Bereits nach kurzer Zeit, nach ca. 2 Tagen, war ein unangenehmer Fäulnisgeruch wahrnehmbar. In den ersten Tagen der Fäulnis nahm wiederholt die alkalische Reaktion ab. Es wurden dann wieder einige Tropfen Sodalösung hinzugefügt. Die Fäulnisgemische bewahrten wir verschieden lange Zeit bei mittlerer Temperatur (ca. 15—20°) auf.

#### Aufarbeitung der Fäulnisflüssigkeit.

Nach einer gewissen Zeit (vgl. hierzu die Angaben weiter unten bei den einzelnen Versuchen) wurde die widrig (etwas nach altem Käse riechende) trübe Flüssigkeit, die noch alkalisch reagierte, mit einigen Tropfen Essigsäure schwach sauer gemacht, zur Klärung mit etwas Tierkohle versetzt, dann ganz kurz aufgekocht und hierauf unter stark vermindertem Druck bei mäßiger Temperatur eingedampft. Der Rückstand wurde zur Veresterung in absolutem Alkohol suspendiert und zwar in der zehnfachen Menge der angewandten Glutaminsäure und gasförmige, trockene Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Dann wurde schnell abgesaugt, mit etwas absolutem Alkohol gut ausgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Wir nahmen wieder in der oben erwähnten Menge absoluten Alkohols auf, sättigten mit Salzsäuregas und dampften im Vakuum bei niedrigerer Temperatur ein. Der Rückstand wurde mit 20—30 ccm absoluten Alkohols und mit 200 ccm getrockneten, absoluten Äthers übergossen und das Gemisch zur Infreiheitsetzung der Ester aus den Chlorhydraten unter Eiswasserkühlung mit trockenem Ammoniakgas gesättigt. Dann filtrierten wir, destillierten Äther und Alkohol im Vakuum bei niedrigerer Temperatur ab und fraktionierten bei ca. 12 mm Druck, zuerst im Wasserbade und dann im Ölbad. Der Verlauf und die Ergebnisse der Destillationen sind bei Wiedergabe der einzelnen Versuche angeführt.

### I. Fäulnisversuch mit $\gamma$ -Aminobuttersäure.

Um uns zu überzeugen, daß einerseits die  $\gamma$ -Aminobuttersäure nach der angewandten Methode sicher aufgefunden werden kann, und daß andererseits die bei der Fäulnis eventuell entstehende  $\gamma$ -Aminobuttersäure während weitergehender Fäulnis nicht verändert wird oder überhaupt verschwindet, führten wir einen Versuch aus, bei dem wir unter den oben angegebenen Bedingungen aber ohne Zusatz von Glutaminsäure faulen ließen und besonders während der ersten Periode des Fäulnisversuches zu verschiedenen Zeiten bestimmte Mengen  $\gamma$ -Aminobuttersäure zugaben.

Einer Fäulnisflüssigkeit von 1 Liter, welche die oben angegebenen Produkte in den angeführten Mengenverhältnissen enthielt, setzten wir am zehnten Tage 1,2 g  $\gamma$ -Aminobuttersäure und sechs Tage darnach noch 0,3 g  $\gamma$ -Aminobuttersäure zu. Nach weiterem sechstägigen Stehenlassen, wonach die Flüssigkeit noch alkalisch reagierte, wurde der Versuch unterbrochen und den obigen Angaben entsprechend verarbeitet. Die unter ca. 12 mm Druck ausgeführte Destillation ergab folgendes Resultat:

I. Fraktion. Bis 30° gingen nur wenige Tropfen eines nach Aminosäureester riechenden Öles über. Die daraus gewonnene Menge Esterchlorhydrat betrug nur 0,05 g (Spuren von Estern der niederen Aminosäuren aus Witte-Pepton).

II. Fraktion. Destillat, hauptsächlich zwischen 72° und 76° übergegangen.

Wir führten zunächst die überdestillierte Substanz, etwa 1,5 ccm farblosen Öles, ins Chlorhydrat über und versuchten sie, auf Grund unserer Erfahrungen, die wir bei Gewinnung des reinen Chlorhydrats des Äthylesters aus der synthetisch dargestellten  $\gamma$ -Aminobuttersäure gesammelt hatten, in Form des Chlorhydrates zur Abscheidung und zur Identifizierung zu bringen. Zu diesem Zwecke wurde das Öl in 5 ccm absol. Alkohols aufgenommen und in die Lösung trocknes Salzsäuregas eingeleitet. Nach Versetzen mit trockenem absol. Äther schied sich, besonders nach Belassen im Eisschrank, ein dickes milchiges Öl ab (Esterchlorhydrat der  $\gamma$ -Aminobuttersäure).

Da dasselbe nicht in krystallinischer Form ausfiel, führten wir es nun in das Chlorhydrat der  $\gamma$ -Aminobuttersäure über, das wir dann in Form des Platinats identifizieren konnten. Die sich über erwähntem Öl befindende Flüssigkeit wurde abgossen und der Rückstand zur Verseifung mit dem mehrfachen Volumen wässeriger Salzsäure erhitzt. Schließlich wurde auf dem Wasserbade eingedunstet. Der Rückstand betrug 0,5 g. Wir nahmen ihn in einigen Kubikzentimetern absoluten Alkohols auf und versetzten dann mit einer 10%igen alkoholischen Platinchloridlösung. Es entstand sogleich ein dicker Niederschlag von hellorange gelben Krystallen. Es wurde abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und bei 100° getrocknet. Die Ausbeute betrug ungefähr 0,5 g. Das Produkt schmolz gegen 220° unter starkem Aufschäumen und unter völliger Schwarzfärbung. Der nämliche Schmelzpunkt des  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Platinats ergab sich auch bei einer Mischprobe unter Zuhilfenahme des Platinsalzes der synthetisch dargestellten  $\gamma$ -Aminobuttersäure.<sup>1)</sup>

Daß das erwähnte Chlorhydrat des  $\gamma$ -Aminobuttersäureesters, das in reinem Zustande leicht krystallinisch erhalten wird, nur in öligem Zustande auf Zusatz von Äther abgeschieden wurde, hat zweifellos seinen Grund darin, daß diese II. Fraktion noch neben dem Ester der  $\gamma$ -Aminobuttersäure geringe Mengen von Estern anderer Aminosäuren enthielt, die bei diesen Versuchen aus dem Witte-Pepton, wie uns ein blinder Fäulnisversuch ohne Zusatz von Glutaminsäure oder  $\gamma$ -Aminobuttersäure gezeigt hat,<sup>2)</sup> entstehen.<sup>3)</sup>

III. Fraktion. Die Destillation begann unter ca. 12 mm Druck bei etwa 80°; die Temperatur stieg bald an, der Hauptteil dieser Fraktion ging zwischen 125 und 133° über (bei der Temperatur, bei welcher unter dem angegebenen Druck das Anhydrid der  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Pyrrolidon, destilliert). Die Vorlage war mit Eis gekühlt worden.

<sup>1)</sup> Vgl. hierzu den I. Teil dieser Arbeit, S. 10.

<sup>2)</sup> Vgl. hierzu Versuch V, S. 20.

<sup>3)</sup> Bei den Temperaturen der II. Fraktion (von 30—76°) gehen lediglich die Ester von Glykokoll und Alanin über.

Das Destillat dieser III. Fraktion, das zweifellos neben Pyrrolidon noch etwas Ester der  $\gamma$ -Aminobuttersäure enthielt, stellte ca. 1 g eines farblosen Öles dar. Um das Pyrrolidon daraus zu isolieren, kochten wir das Destillat portionsweise mit 25 ccm Petroläther aus. (Petrolätherlösung a, ungelöst gebliebene Teil b).

a) Die Petrolätherlösung wurde zunächst teilweise eingedunstet. Es fand dabei keine Abscheidung statt. Nachdem wir fast völlig abgedunstet hatten, trat schließlich ölige Abscheidung ein. Eine Probe dieses Produktes zeigte, in Wasser aufgenommen, stark alkalische Reaktion, woraus auf die Gegenwart von Ester geschlossen werden kann. Mit Phosphorwolframsäurelösung entstand eine dicke weiße Fällung, die auf Zusatz von Ammoniak leicht in Lösung ging. — eine Erscheinung, die auf Anwesenheit von Pyrrolidon deutet. Wir erhitzen nun das Produkt zur Überführung in das Chlorhydrat der  $\gamma$ -Aminobuttersäure mit Salzsäure und dunsteten ein. Der Rückstand, der etwa 0,3 g betrug, wurde in einigen Kubikzentimetern absoluten Alkohols gelöst und dann mit einer 10%igen alkoholischen Platinchloridlösung versetzt. Es entstand in reichlicher Menge Abscheidung eines orangegelben Niederschlags, der aus den für das  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Platinat charakteristischen glänzenden, tafelförmigen Prismen bestand. Dem Schmelzpunkte nach erwies sich die Substanz ebenfalls als Platinsalz der  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Fp. ca. 220° unter starker Zersetzung).

b) Der in Petroläther ungelöst gebliebene Anteil des Destillates der III. Fraktion (ca. 0,3 g) wurde in Wasser aufgenommen. Die Lösung reagierte stark alkalisch. Es wurde mit Salzsäure erhitzt und eingedunstet. Der Rückstand wurde mit Alkohol und alkoholischer Platinchloridlösung versetzt. Wir erhielten etwa 0,3 g Platinsalz, das als Platinsalz der  $\gamma$ -Aminobuttersäure identifiziert werden konnte. Es schied sich in orangegelben, prismenartigen Krystallen ab. Sein Schmelzpunkt, sowie der Schmelzpunkt einer Mischprobe mit dem Platinat der reinen  $\gamma$ -Aminobuttersäure war der oben bei der Beschreibung des  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Platinates ange-

gebene. Auch in seinen Löslichkeitsverhältnissen stimmte es mit diesem Produkt überein. Es war leicht löslich in Wasser, schwerer in heißem Methylalkohol, aus dem es beim Erkalten in Form feiner Prismen auskrystallisierte, und kaum löslich in Äthylalkohol.

Der eben beschriebene Versuch hat also ergeben:

1. Daß man mit Hilfe der angewandten Estermethode die  $\gamma$ -Aminobuttersäure aus der Fäulnisflüssigkeit in Form des Platinates abscheiden kann.

2. daß die in den Fäulnisflüssigkeiten — wie sie zu unseren Versuchen dienten — vorhandene (zugesetzte)  $\gamma$ -Aminobuttersäure in dem gewählten Zeitraum nicht verschwindet.

## II. 14tägiger Fäulnisversuch mit Glutaminsäure.

Der Versuch wurde mit 25 g d-Glutaminsäure ausgeführt. Die Verarbeitung der Fäulnisflüssigkeit geschah ähnlich den oben gemachten Angaben. Die Destillation der Ester unter ca. 12 mm Druck ergab folgendes:

I. Fraktion. Bei Temperaturen des Wasserbades bis  $55^{\circ}$  destillierte wieder, wie im Vorversuch, nur eine Spur Ester über. Als Chlorhydrat ergaben sich daraus nur 0,05 g (im unreinen Zustande).

II. Fraktion. Die Außentemperatur wurde von  $55^{\circ}$  auf  $100^{\circ}$  gesteigert. Gegen  $40$  und  $50^{\circ}$  destillierte eine geringe Menge Ester über, die nach Verseifen mit Salzsäure und Eindunsten 0,8 g Chlorhydrat ergab. Wir nahmen es in heißem absoluten Alkohol auf, entfärbten die Lösung mit Tierkohle und fällten mit dem mehrfachen Volumen Äther ein weißes flockiges Produkt, das bereits bei ca.  $90^{\circ}$  erweichte. Konnte das Destillat der II. Fraktion schon wegen seines niederen Siedepunktes nicht als Ester der  $\gamma$ -Aminobuttersäure angesprochen werden, so deutete das Verhalten des Chlorhydrates ebenfalls nicht darauf, daß salzsaure  $\gamma$ -Aminobuttersäure vorlag.

III. Fraktion. Die Temperatur des Ölbadetes wurde nach und nach bis auf  $180$ — $190^{\circ}$  gesteigert. Erst bei dieser Temperatur stieg der Quecksilberfaden des Innenthermometers

plötzlich auf über 160°. Es waren 0,2 g Ester überdestilliert. Die Destillation wurde unterbrochen.

Die Verarbeitung des Destillates (0,2 g) ergab nach Verseifen und Abdampfen mit Salzsäure einen Rückstand, aus dem durch Behandeln mit Alkohol und etwas Äther Glutaminsäurechlorhydrat in farblosen Krystallen abgeschieden werden konnte (identifiziert durch Schmelzpunkt und Geschmack). Es war also bei der angegebenen hohen Temperatur bereits eine geringe Menge Pyrrolidoncarbonsäureester, der sich aus Glutaminsäureester unter Ringschluß bei ca. 180° bildet,<sup>1)</sup> übergegangen, der durch Behandeln mit Salzsäure in das Glutaminsäurechlorhydrat übergeführt worden war.<sup>2)</sup>

IV. Fraktion. Zwischen 180 und 184° (hauptsächlich bei 182/183°) destillierte ein farbloses Öl über, das schön krystallinisch erstarrte und sich als Pyrrolidoncarbonsäure-äthylester erwies. Seine Menge betrug 14 g.

Der nach Abdestillation der IV. Fraktion hinterbliebene braune, ölige Rückstand wurde zur Verseifung und Aufspaltung der Pyrrolidoncarbonsäure mehrere Stunden mit Salzsäure am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wurde mit Tierkohle entfärbt und stark eingedampft. Es schied sich dabei salzsaure Glutaminsäure in derben Krystallen ab, die gegen 210° mit Zersetzung schmolzen. Ihre Menge betrug fast 3 g.

Dieser Versuch zeigt also, daß unter den angegebenen Verhältnissen bei 14 tägiger Fäulnis keine  $\gamma$ -Aminobuttersäure nachgewiesen werden konnte. Ferner wurde festgestellt, daß ein großer Teil der zur Fäulnis angesetzten Glutaminsäure unverändert blieb.

Die erhaltenen Mengen an Pyrrolidoncarbonsäure-äthylester und an Glutaminsäurechlorhydrat ergeben, auf Glutaminsäure umgerechnet, 15,5 g oder 62% der zugesetzten

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden und Arthur Weil, «Über die bei der Isolierung der Monoaminosäuren mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste», I. Mitteilung. Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 445 ff. (1911).

<sup>2)</sup> Emil Abderhalden und Karl Kautzsch, «Zur Kenntnis der Glutaminsäure und Pyrrolidoncarbonsäure», Ibid., Bd. 64, S. 447 (1910). — Dieselben, II. Mitteilung, Ibid., Bd. 68, S. 487 (1910).

Glutaminsäure. Da bekanntlich bei den angewandten Temperaturen (bis 190°) die Pyrrolidoncarbonsäureverbindungen leicht pyrochemische Nebenreaktionen (Kohlendioxidabspaltung etc.) erleiden, wodurch einerseits die Menge der vorhandenen Pyrrolidoncarbonsäure bzw. Glutaminsäure verringert wird, andererseits die Abscheidung der noch anwesenden Säure im reinen Zustande erschwert und vermindert wird, so ist somit die Menge der während der 14tägigen Fäulnis unangegriffen gebliebenen Quantität Glutaminsäure noch beträchtlich höher als 62% einzuschätzen.

### III. 22 tägiger Fäulnisversuch mit Glutaminsäure.

Der Versuch wurde mit 25 g Glutaminsäure analog den im Vorhergehenden beschriebenen Versuchen ausgeführt. Die Destillation der Ester unter etwa 12 mm Druck ergab folgendes:

I. Fraktion. Zwischen 48 und 50° destillierte ein farbloses, nach Aminosäureestern riechendes Öl über. Seine Menge betrug 0,61 g. Es wurde mit Salzsäure verseift. Die konzentrierte alkoholische Lösung des Chlorhydrates ergab mit einer konzentrierten alkoholischen Platinchloridlösung keine Fällung — es lag also, wie auch der Siedepunkt andeutete, keine  $\gamma$ -Aminobuttersäure vor.

II. Fraktion. Zwischen 50 und 100° destillierte eine geringe Menge Ester über; die Temperatur stieg dann schnell über 120°. Die Destillation wurde unterbrochen. Nach Verseifen des Destillates mit Salzsäure und Abdunsten erhielten wir knapp 0,5 g Chlorhydrat. Daß dieses Produkt kein  $\gamma$ -Aminobuttersäurechlorhydrat darstellte oder solches höchstens in Spuren enthielt, ging aus der verhältnismäßig starken optischen Aktivität des erwähnten Chlorhydrates hervor. In wässriger Lösung untersucht, zeigte es  $[\alpha]_D^{20} + 8,6^\circ$ .

III. Fraktion. Die Temperatur stieg schnell über 170°. Die Destillation ging hauptsächlich zwischen 180 und 184° vonstatten. Die Menge des Destillates betrug 13,5 g. Es erwies sich nach nochmaliger Destillation bis auf eine geringfügige Menge, etwa 0,5 g, anderer Ester — Reaktion dieses Anteils im Gegensatz zu dem Pyrrolidon stark alkalisch — als Pyrrolidon-

carbonsäure-äthylester (nachgewiesen teils durch den Schmelzpunkt des krystallinisch erstarrten Esters, teils durch Überführung mittels Erhitzens mit Salzsäure in das Glutaminsäurechlorhydrat).

Nach Abdestillieren der III. Fraktion waren 2 g einer braunen Masse als Rückstand verblieben. Durch Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure, Entfärben der Lösung mit viel Tierkohle und Eindunsten der Flüssigkeit konnten wir daraus Glutaminsäurechlorhydrat (Schmelzpunkt  $210^{\circ}$  unter Zersetzung) gewinnen.

Es konnte also auch bei diesem Versuche keine  $\gamma$ -Aminobuttersäure nachgewiesen werden. Lag solche vor, so konnte es sich nur um sehr geringfügige Mengen handeln. Die nachgewiesene unverändert gebliebene Glutaminsäure — berechnet aus 13 g + 2 g Pyrrolidoncarbonsäure-äthylester — belief sich auf reichlich 56% der zugesetzten.

#### IV. 11tägiger Fäulnisversuch mit 50 g Glutaminsäure.

Ferner führten wir noch einen 11tägigen Fäulnisversuch mit 50 g Glutaminsäure aus. Auch dieser Versuch ergab ein ganz analoges Resultat wie die vorhergehend angeführten Versuche mit 25 g Glutaminsäure.

#### V. Fäulnisversuch ohne Glutaminsäure.

Schließlich führten wir noch einen Fäulnisversuch unter sonst gleichen Bedingungen, aber ohne Zusatz von Glutaminsäure aus. Wir unterwarfen die Flüssigkeit einer 16tägigen Fäulnis. Die einzelnen, unter 12 mm Druck erhaltenen Fraktionen ergaben dabei, natürlich mit Ausnahme der Pyrrolidoncarbonsäureester-Fraktion, ein ganz analoges Resultat, wie die Fäulnisversuche mit Glutaminsäure. Es konnte gezeigt werden, daß bei diesen Versuchen geringe Mengen an Aminosäureestern aus Aminosäuren des Witte-Peptons — wie wir sie auch bei den Versuchen I—IV beobachtet hatten — erhalten werden.

#### III. Versuch, Pyrrolidoncarbonsäure mittels des *Bacillus butyricus* in Pyrrolidincarbonsäure überzuführen.

20 g inaktiver Pyrrolidoncarbonsäure wurden in 400 ccm Wasser gelöst, mit 4 g Kochsalz, einigen Tropfen Magnesium-

sulfat- und Natriumsulfatlösung versetzt. Die Lösung wurde mit Sodalösung schwach alkalisch gemacht. Sie wurde dann wiedererholt mit *Bacillus butyricus* geimpft. Das Gemisch wurde im Brutschrank aufbewahrt. Bereits am folgenden Tag war eine ziemlich starke alkalische Reaktion eingetreten. Wir setzten nun am zweiten Tage als Stickstoffquelle Alanin und zwar 31% der Menge der angewandten Pyrrolidoncarbonsäure hinzu. Nach 16 Tagen, also am 17. Tage von Beginn der angesetzten Fäulnis gerechnet, wurde der Versuch unterbrochen.

Wir versuchten nun, in der Fäulnisflüssigkeit Prolin nachzuweisen. Sie wurde durch Schütteln mit Tierkohle geklärt, mit Essigsäure angesäuert und dann eingedampft. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol ausgekocht, die alkoholische Lösung eingedunstet und der Rückstand in Wasser aufgenommen.

Wir versuchten, mit Hilfe von Phenylisocyanat das charakteristische Phenylhydantoin des Prolins zu gewinnen. Die wässrige Lösung wurde zu diesem Zwecke unter guter Kühlung in üblicher Weise mit Phenylisocyanat behandelt. Wir konnten nach Eindunsten mit Salzsäure keine Spur der außerordentlich schwer löslichen Hydantoinverbindung nachweisen.

Bei weiteren Versuchen wurde Asparagin als Stickstoffquelle gewählt und schließlich die Fraenkensche Nährlösung angewandt. In keinem Fall gelang es,  $\alpha$ -Pyrrolidoncarbonsäure zu identifizieren.

---