

Einige Bemerkungen über das Erbsenlegumin.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaktion zugegangen am 14. April 1918.)

In dem nächst folgenden Aufsätze über Chymosin- und Pepsinwirkung, V., werde ich einige Versuche über die Wirkung dieser Enzyme auf Erbsenlegumine mitteilen. Bei der Darstellung dieses Legumins machte ich einige Beobachtungen, welche mich dazu nötigten, die von Ritthausen¹⁾ auf der einen Seite und von Osborne und Mitarbeitern²⁾ auf der anderen angewendeten Darstellungsmethoden ein wenig zu vergleichen. Hierbei erhielt ich, je nachdem ich nach dem einen oder anderen Verfahren arbeitete, zwei etwas verschiedene Produkte, die ich als a- und b-Legumin bezeichnet habe. Es war jedoch nicht meine Absicht, was ich hier ausdrücklich bemerke, eine eingehende Prüfung der Leguminfrage zu unternehmen, was mich gar zu weit von meiner Hauptaufgabe — dem Studium der Pepsin-Chymosinfrage — hätte führen müssen. Meine Beobachtungen über das Legumin sind nur als Nebenprodukte der Hauptarbeit anzusehen, und wenn ich sie trotzdem hier veröffentliche, geschieht dies aus folgenden Gründen. Der eine Grund ist der, daß ich in dem folgenden Aufsätze über Versuche mit sowohl a- wie b-Legumin berichten werde und daß es folglich notwendig ist zu sagen, was ich unter

¹⁾ Journal f. prakt. Chemie, Bd. 103 (1868) und N. F., Bd. 24 (1881) und Bd. 26 (1882). H. Ritthausen, Die Eiweißkörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Ölsamen, Bonn 1872 und Pflügers Archiv, Bd. 15 (1877), Bd. 16 (1878) und Bd. 18 (1878).

²⁾ Journ. of the Amer. Chem. Soc., Bd. 18 (1896), Bd. 20 (1898), Bd. 24 (1902) und Bd. 25 (1903). Vgl. auch Biochem. Handlexikon (herausgegeben von E. Abderhalden), Bd. 4 (1911), S. 3—5, wo man auch weiteres über die Arbeiten von Osborne findet.

diesen Namen verstehe. Der andere Grund liegt darin, daß meine Beobachtungen, trotzdem sie nicht hinreichend eingehend sind, jedoch ein wenig Licht auf die zwischen Ritthausen und Osborne bestehenden Meinungsdivergenzen bezüglich des Legumins werfen und hierdurch vielleicht anderen Forschern, welche mit dieser Frage sich beschäftigen wollen, zu einigem Nutzen werden könnten.

Sieht man von älteren Untersuchungen ab, so gibt es nur zwei Arbeiten über das Erbsenlegumin, welche von größerer Bedeutung sind, nämlich die Untersuchungen von Ritthausen und insbesondere diejenigen von Osborne und seinem Mitarbeiter Campbell. Leider stimmen die Resultate der Arbeiten von Ritthausen und Osborne nicht mit einander überein, was unzweifelhaft seinen Grund in den verschiedenen Darstellungsmethoden der beiden Forscher hat.

Ritthausen verwendete als Extraktionsmittel entweder nur Wasser oder schwach alkalihaltiges Wasser, fällte das Legumin aus dem Filtrate mit Essigsäure, entfernte aus dem Niederschlag das Wasser mit Alkohol und extrahierte darauf mit Äther. Zur weiteren Reinigung wurde in schwach alkalihaltigem Wasser gelöst, mit Essigsäure gefällt und wie oben mit Alkohol und Äther behandelt. Das so dargestellte Präparat war ein Gemenge von 2 Stoffen, von denen der eine in verdünnter NaCl-Lösung unlöslich, der andere aber löslich war. Nur den in Kochsalzlösung unlöslichen Stoff bezeichnete er als Legumin und er war der Ansicht, daß in den Erbsen zwei Proteine vorhanden sind, die beide ursprünglich in Kochsalzlösung sich lösen, von denen aber das eine, das wahre Legumin, durch die Lösung in Alkali und Fällung mit Essigsäure unlöslich geworden war.

Osborne dagegen extrahierte das Erbsenmehl mit Salzlösung, fällte durch Entfernung des Salzes mittels Dialyse gegen Wasser und reinigte durch wiederholtes Auflösen in NaCl-Lösung und Fällung mittels Dialyse oder Verdünnung mit Wasser. Das zuletzt erhaltene, behufs der Analyse weiter gereinigte Produkt war leicht löslich in passend verdünnter Salzlösung und wurde von Osborne Legumin genannt. Nach

Osborne ist das Legumin ein in Kochsalzlösung von passender Konzentration leicht lösliches, phosphorfrees Globulin; und mit diesem Globulin ist nach ihm der in Na-Lösung lösliche Teil der Ritthausenschen Fällung identisch — wenn auch weniger rein. Das Legumin Ritthausens, also der in NaCl-Lösung unlösliche Teil, ist nach Osborne wahrscheinlich nichts anderes als ein Teil des in NaCl ursprünglich löslichen Globulins, welches infolge der Darstellungsmethode Ritthausens unlöslich in Kochsalzlösung geworden ist.

Ritthausen fand in seinem unlöslichen Legumin mehr Phosphorsäure als diejenige Menge, welche der Asche des Legumins entsprach. Er betrachtete deshalb das Legumin als eine phosphorsäurehaltige Proteinverbindung, denn er fand es weniger wahrscheinlich, daß die Phosphorsäure während der Ausscheidung des Legumins aus der Lösung mitgefällt worden war. Für die Annahme, daß das Legumin eine phosphorhaltige Proteinsubstanz sei, lagen nach ihm keine genügenden Gründe vor. Das Legumin von Osborne war dagegen phosphorfrei.

Die zwischen beiden Forschern bestehenden Meinungs-differenzen sind also folgende. Nach Osborne handelt es sich nur um einen Eiweißstoff, ein in Kochsalzlösung leicht lösliches, phosphorfrees Globulin (das Legumin Osbornes), von dem ein Teil, wahrscheinlich infolge der Darstellungsmethode Ritthausens, in Salzlösung unlöslich geworden ist. Nach Ritthausen handelt es sich dagegen um zwei verschiedene Eiweißkörper, die beide ursprünglich in Salzlösung löslich sind, von denen aber der eine durch die Alkaliwirkung — jedoch ohne Denaturierung — in eine in Salzlösung unlösliche Modifikation umgewandelt wird. Dieser in Salzlösung unlösliche Stoff (das Legumin Ritthausens) ist eine Phosphorsäure-Proteinverbindung.

Zur Darstellung des Legumins benutzte ich in meinen ersten Versuchen nur die von Osborne angewendete Methode: Extraktion mit NaCl-Lösung und Dialyse. Als Ausgangsmaterial benutzte ich käufliches Erbsenmehl von gelben Felderbsen, welches vorher wiederholt mit warmem Alkohol zur Entfernung von Phosphatiden und anderen alkohollöslichen Stoffen extrahiert wurde. Das trockene Mehl, welches immer sauer auf

mit Wasser befeuchtetes, blaues Lackmuspapier reagierte, wurde mit der 5—10fachen Menge NaCl-Lösung von 8% extrahiert. Die Filtration ging verhältnismäßig leicht von statten, aber das Filtrat war nie ganz hell, sondern immer etwas opalisierend und trübe. Die Reaktion des NaCl-Extraktes war immer sauer (auf Lackmuspapier). Bei der Dialyse schied sich stets eine Fällung aus, die indessen auch Farbstoff mit niedergerissen hatte und die nie in NaCl-Lösung von 8% sich klar löste. Die Lösung war im Gegenteil immer trübe und gab bei der Filtration nie ein klares Filtrat. Ich filtrierte deshalb, nach dem Vorgange von Osborne und Campbell, durch einen (mit Kochsalzlösung durchgedrängten) Brei von Filtrierpapiermasse und erhielt nun klare Filtrate. Die Filtration ging jedoch sehr langsam von statten und hörte allmählich fast vollständig auf, so daß ein neues Filtrum von Papiermasse angeordnet werden mußte. Hierdurch entstanden aber recht große Verluste; das Filtrat war fortwährend gelb gefärbt, und nach Ausfällung mit Wasser und wiederholtem Lösen in Kochsalzlösung und Fällen durch Verdünnung mit Wasser blieb zuletzt die Ausbeute recht klein.

Neutralisation des Kochsalzextraktes mit Alkali vor der Dialyse änderte nicht wesentlich das Resultat. Die Dialysefällung löste sich auch in diesem Falle nicht klar; die Filtration durch Papiermasse war unvermeidlich und die Ausbeute war noch kleiner als bei Dialyse des sauer reagierenden Extraktes. Daß man nach diesem Verfahren ein reines Legumin darstellen kann, ist allerdings unzweifelhaft, aber das langdauernde und ziemlich umständliche Verfahren lieferte regelmäßig eine verhältnismäßig geringe Ausbeute. Statt der mehrere Tage andauernden Dialyse, die übrigens infolge des Kalkgehaltes des Leitungswassers nicht gegen fließendes Wasser geschehen konnte, sondern große Mengen destillierten Wassers erforderte, versuchte ich deshalb einfach die Fällung des NaCl-Extraktes durch Verdünnung mit destilliertem Wasser. Auch die hierbei auftretende Fällung, welche dem Anscheine nach fast weiß war, löste sich nicht vollständig und klar in Kochsalzlösung, und die gefärbte Lösung mußte durch Papiermasse (mit großen

Verlusten) filtriert werden. Dieses Verfahren führte nun allerdings rascher zum Ziele als die Dialysemethode, aber auch hier war die Ausbeute verhältnismäßig klein.

Da man also nach dieser Methode stets mit großen Mengen Rohmaterial arbeiten mußte, um nicht zu kleine Mengen Endprodukt zu erhalten, versuchte ich auch die ältere Methode: Extraktion mit alkalihaltigem Wasser und Fällung des Filtrats mit einer Säure, also die von Ritthausen — namentlich bei Verarbeitung von sauer reagierendem Rohmaterial — benutzte Methode. Ich extrahierte das Erbsenmehl mit schwach ammoniakhaltigem Wasser — 0,013 bis 0,016 % NH_3 — in dem Verhältnisse 1 Teil Erbsenmehl und 20 Teile Wasser. Die Filtration verlief rasch und leicht, aber das Filtrat war nicht ganz wasserhell, sondern auch hier schwach opalisierend oder unklar. Bei Zusatz von Chlorwasserstoffsäure bis zu 0,028—0,056 % entstand ein reichlicher flockiger Niederschlag, der sich ziemlich rasch zum Boden setzte und abzentrifugiert wurde. Der Bodensatz war anscheinend rein weiß, während die obenstehende, ganz klare Flüssigkeit gelb gefärbt war. Dieser Bodensatz wurde durch wiederholte gleichförmige, feine Verteilung in Wasser und Zentrifugieren gereinigt.

Wenn nun dieser, noch wasserhaltige Niederschlag mit NaCl-Lösung von 8 % behandelt wurde, löste sich ein Teil in der Salzlösung; ein bedeutender Teil blieb aber ungelöst, selbst nach wiederholtem Auslaugen mit Kochsalzlösung. Ich kam also zu ganz demselben Resultate wie Ritthausen, nämlich daß der Niederschlag ein Gemenge von zwei Stoffen, der eine in NaCl von 8 % löslich und der andere darin unlöslich ist.

Wenn man mit Osborne annehmen will, daß der von Ritthausen als Legumin bezeichnete, unlösliche Teil der Fällung ein durch die chemischen Eingriffe umgewandeltes und in Kochsalzlösung unlöslich gewordenes Globulin (Osbornes Legumin) ist, so folgt aus dem nun Angeführten jedenfalls, daß diese Umwandlung nicht die Folge der von Ritthausen angewandten Alkohol-Ätherbehandlung sein kann. Eine solche Behandlung fand nämlich in meinen Versuchen nie statt.

Will man den in NaCl unlöslichen Teil der Fällung (Legumin Ritthausens) als einen in Salzlösung unlöslich gewordenen Teil des Legumins Osbornes betrachten, so bleibt also nur die Annahme übrig, daß dieser unlösliche Teil durch die Einwirkung des Alkalis, der Säure oder des Stehens unter Wasser aus dem löslichen Legumin entstanden sei.

Eine Denaturierung infolge der Alkalieinwirkung ist wenig wahrscheinlich. In den Versuchen von Ritthausen, in welchen zur Lösung Wasser mit 0,1—0,2% Kaliumhydroxyd verwendet wurde, ist eine schädigende Einwirkung des Alkalis allerdings nicht ausgeschlossen; verwendet man aber Wasser, welches nicht mehr als 0,016% Ammoniak enthält, so ist eine denaturierende Wirkung mindestens sehr unwahrscheinlich.

Die fortgesetzte Untersuchung zeigte auch, daß eine Denaturierung durch Alkalieinwirkung nicht anzunehmen ist, und als Beleg hierfür kann folgende Beobachtung dienen. Das sauer reagierende Erbsenmehl wurde in dem Verhältnisse 1:20 mit Wasser, welches nur 0,009% Ammoniak enthielt, ein paar Stunden bei Zimmertemperatur behandelt und dann rasch filtriert. Das Filtrat reagierte nicht alkalisch, sondern sauer. Ein Teil des Filtrates wurde mit 0,03% HCl gefällt und unmittelbar zentrifugiert. Nach 5 Minuten wurde die Flüssigkeit von dem festen Bodensatz vollständig abgegossen und die Oberfläche des letzteren mit Wasser abgespült. Darauf wurde der Bodensatz mit Wasser zu einer homogenen Milch zerrieben, mit viel Wasser gemischt, neue 5 Minuten zentrifugiert und die Flüssigkeit entfernt. Der Bodensatz, mit NaCl-Lösung von 8% behandelt, löste sich zum Teil in der Salzlösung, z. T. war er darin unlöslich, und dieser Teil bildete eine grobflockige Fällung.

Von einer Denaturierung durch Alkalieinwirkung kann wohl keine Rede sein, wenn man mit so schwach ammoniakhaltigem Wasser extrahiert, daß das Extrakt schwach sauer reagiert. Der einfachste und sicherste Beweis dafür, daß das Legumin Ritthausens kein durch Alkalieinwirkung entstandenes Umwandlungsprodukt ist, liegt aber darin, daß man dasselbe Produkt erhält, wenn man jede Alkalieinwirkung vermeidet, das sauer reagierende Erbsenmehl einfach mit Wasser ex-

trahiert und mit Säure fällt. So erhielt ich z. B. durch Extraktion von Erbsenmehl mit Wasser (1 : 20) bei Zimmertemperatur (unter Zusatz von Toluol) ein opalisierendes, sauer reagierendes Filtrat, welches durch Zusatz von 0,04% HCl gefällt wurde. Die unmittelbar abzentrifugierte Fällung wurde wie in den anderen Versuchen durch Aufschlemmen in Wasser und unmittelbares Zentrifugieren gereinigt. Bei der Behandlung mit NaCl-Lösung von 8% blieb ein bedeutender Teil ungelöst, welcher in derselben Weise wie die unter ähnlichen Verhältnissen aus dem ammoniakalischen Extrakte erhaltene Kochsalzunlösliche Fällung sich verhielt.

Da man also durch Extraktion mit Wasser, ohne irgend einen Alkalizusatz, das in Kochsalzlösung unlösliche Legumin Ritthausens erhält, kann die Ansicht, daß dieses Legumin eine ursprünglich salzlösliche Substanz ist, «welche durch alkalische, freies Alkalihydrat enthaltende Lösungen in die salzunlösliche Modifikation übergeführt wird», nicht richtig sein.

Dagegen kann man nicht daran zweifeln, daß das Legumin Ritthausens aus einer ursprünglich salzlöslichen Proteinsubstanz hervorgeht. Wenn man nämlich das Erbsenmehl mit NaCl-Lösung von 8% erschöpft und dann den Rest mit ammoniakhaltigem Wasser extrahiert, so erhält man nur eine äußerst geringe Menge mit Säure fällbarer Substanz in dem Filtrate. Die Muttersubstanz des salzunlöslichen Legumins ist also durch die Salzlösung extrahiert worden.

Man könnte nun vielleicht das Unlöslichwerden dieser Muttersubstanz durch Einwirkung des Wassers erklären wollen, da bekanntlich gewisse Globuline, wenn man sie nach der Ausfällung unter Wasser stehen läßt, in eine unlösliche Modifikation übergehen. Nun kann ich allerdings nicht die Möglichkeit in Abrede stellen, daß die hier in Rede stehende Substanz, wenn sie etwas längere Zeit — über eine Nacht oder einige Tage — unter Wasser steht, etwas schwerlöslicher als in frisch gefälltem Zustande wird, und gewisse Beobachtungen machen dies sogar wahrscheinlich. Der wesentlichste Grund ihrer Unlöslichkeit kann aber (wie übrigens unten gezeigt werden soll) nicht in einer Einwirkung des Wassers gesucht

werden. In zahlreichen Fällen habe ich die mit HCl erhaltene Fällung unmittelbar nach dem Säurezusatz zentrifugiert, möglichst rasch in Wasser verteilt, von neuem zentrifugiert, mit NaCl-Lösung geprüft und immer die Unlöslichkeit eines Teiles der Fällung in NaCl-Lösung konstatiert. Es ist kaum wahrscheinlich, daß eine Wassereinwirkung von insgesamt 15 bis 20 Minuten die Unlöslichkeit in Kochsalz bewirkt hat. Wenn dem aber so wäre, so beweist dies jedenfalls, daß die Muttersubstanz des in Salzlösung unlöslichen Legumins nicht das salzlösliche Legumin Osbornes sein kann. Das letztere kann nämlich mehrere Tage unter Wasser ausgefällt stehen oder wiederholt mit Wasser ausgewaschen werden, ohne seine Löslichkeit in Kochsalz zu verlieren. So war z. B. in einem Falle ein solches Legumin, welches 10 Tage unter Wasser (mit Toluol) gestanden hatte, noch löslich in verdünnter Kochsalzlösung.

Nach Osborne soll das mit Salzlösung ohne Neutralisation der natürlichen Säure des Erbsenmehles extrahierte Legumin bei der Dialyse zum Teil in ein salzunlösliches Produkt übergehen, welches er «Albuminat» genannt hat. Dieses Albuminat verhält sich aber ebenfalls anders als das Legumin von Ritthausen. Das Albuminat quillt nämlich in verdünnter NaCl-Lösung zu einer gelatinösen, nicht filtrierbaren Flüssigkeit auf, schrumpft aber und wird körnig in Wasser, während das von mir erhaltene, salzunlösliche Produkt fast umgekehrt sich verhält, wie unten näher gezeigt werden soll.

Die bisher angeführten Beobachtungen machen es schon wahrscheinlich, daß das Legumin Ritthausens kein Umwandlungsprodukt von dem Legumin Osbornes ist, und in der Folge werden wir weitere Verhältnisse kennen lernen, welche dafür sprechen, daß es hier um zwei vielleicht nahe verwandte, aber trotzdem verschiedenartige Proteinsubstanzen sich handelt. Unter solchen Umständen dürfte es wohl angemessen sein, in dem Folgenden, aus Bequemlichkeitsrücksichten, statt der umständlichen Bezeichnungen salzlösliches Legumin oder Osbornes Legumin und salzunlösliches Legumin oder Ritthausens Legumin die kürzeren Bezeichnungen a- oder b-Legumin zu gebrauchen. In der Folge bedeutet also a-Legumin

das in NaCl lösliche Legumin von Osborne und b-Legumin das in NaCl-Lösung unlösliche Legumin von Ritthausen.

Daß das b-Legumin nicht durch Alkali- und allem Anscheine nach ebenfalls nicht durch Wassereinwirkung aus dem a-Legumin entsteht, geht aus dem oben Mitgeteilten hervor. Wenn es überhaupt ein Umwandlungsprodukt eines anderen Stoffes ist, bleibt also kaum etwas anderes übrig als die Annahme, daß seine Entstehung in irgend einer Beziehung zu der Ausfällung mit Säure steht. Dies scheint nun in der Tat auch der Fall zu sein.

Die in dem ammoniakalischen Wasserextrakte des Erbsenmehles durch Säurezusatz erzeugte Fällung enthält, wie aus dem Vorigen hervorgeht, ein Gemenge von a- und b-Legumin. Aus dieser Fällung erhält man durch Extraktion mit NaCl-Lösung von 8% eine Lösung von a-Legumin, die weiter verarbeitet werden kann. Den von der Na-Cl-Lösung nicht gelösten Rest, das b-Legumin, kann man durch mehrmals wiederholte Extraktion mit Salzlösung so vollständig von in NaCl-Lösung löslicher Proteinsubstanz befreien, daß das Kochsalzextrakt bei Verdünnung mit Wasser höchstens schwach opalisierend wird und nach Zusatz von ein wenig Chlorwasserstoffsäure nach einiger Zeit höchstens eine Trübung gibt. Ein von Eiweiß ganz freies NaCl-Extrakt habe ich nie erhalten, sei es, daß das b-Legumin in NaCl-Lösung nicht ganz unlöslich ist, oder daß die vollständige Entfernung des a-Legumins nicht ganz gelungen war.

Versucht man nun die mit NaCl-Lösung erschöpfte Fällung von b-Legumin durch feine Verteilung in Wasser und Zentrifugieren auszuwaschen, so beobachtet man folgendes. Das erste Waschwasser ist klar und der Bodensatz setzt sich scharf ab. Bei wiederholtem Aufschlemmen in Wasser und Zentrifugieren quillt aber das b-Legumin stark auf und bei Anwendung von einer nicht besonders großen Wassermenge liefert es eine schleimig gequollene Masse, die man nicht durch Zentrifugieren von der oberen, schleimig trüben Flüssigkeit trennen kann. Bei Anwendung von viel Wasser löst sich fast alles scheinbar zu einer trüben Flüssigkeit. Bei Anwendung von nicht zu

dichtem Papier und Wechseln der Faltenfilter kann man die Flüssigkeit filtrieren. Sie geht aber trübe durch das Filtrum, filtriert immer langsamer, wenn man die Filter nicht wechselt, und bei Anwendung von einem dichteren Filtrum erhält man ein wasserhelles Filtrat, während die Substanz zurückgehalten wird. Das b-Legumin verhält sich also umgekehrt wie das von Osborne beschriebene Albuminat, indem es in Wasser nicht schrumpft, sondern umgekehrt stark aufquillt und scheinbar sich löst. Bei Zusatz von NaCl-Lösung schrumpft es dagegen und wird aus der scheinbaren Lösung gefällt, während das Albuminat in Kochsalzlösung quillt.

Das gequollene b-Legumin bzw. die Lösung desselben in Wasser reagiert sauer und bei vorsichtigem Zusatz von Alkali geht die Quellung zurück, resp. es entsteht in der trüben Flüssigkeit eine Fällung. Ebenso entsteht eine Fällung, wenn man ein wenig NaCl-Lösung zusetzt. Das durch Säurezusatz zu dem ammoniakalischen Wasserextrakte des Erbsenmehles ausgefällte b-Legumin ist also eine Säure-Eiweißverbindung, die in Wasser stark aufquillt, in Kochsalzlösung dagegen schrumpft oder davon gefällt wird.

In der nun beschriebenen Weise verhielt sich das feuchte b-Legumin in den meisten Fällen. In anderen quoll es dagegen weniger stark auf, gab nicht die obengenannte trübe Flüssigkeit, es ließ sich mit Wasser auswaschen und ähnelte mehr dem Albuminate Osbornes, ohne jedoch in Wasser zu schrumpfen. Da ich nun in den verschiedenen Darstellungen mit etwas wechselnden Säuremengen gefällt hatte, lag es nahe zur Hand zu prüfen, ob nicht eine Fällung des Erbsenmehl-extraktes mit einer etwas wechselnden Säuremenge die Eigenschaften der Fällung verändern könnte. Der Versuch bestätigte diese Vermutung.

Erbsenmehl wurde wie gewöhnlich mit ammoniakhaltigem Wasser (0,014% NH_3) in dem Verhältnis 1 : 20 extrahiert. Von dem Filtrate wurden zwei gleich große Teile abgemessen, von denen der eine A mit 0,03 und der andere B mit 0,1% HCl gefällt wurde. Beide wurden darauf 5 Minuten zentrifugiert, die Fällungen in gleichen Mengen Wasser verteilt und wiederum

5 Minuten zentrifugiert. Es wurden nun die nach dem Augenmaße etwa gleich hohen Bodensätze mit gleich großen Mengen Kochsalzlösung von 8% behandelt, um die Fällungen zu lösen. Hierbei löste sich der größte Teil von A und das Ungelöste bestand aus einer grobflockigen, lockeren Fällung. In B dagegen war der ungelöste Rückstand größer, weiß und mehr kompakt. Nach neuem Abzentrifugieren wurde in viel Wasser aufgeschlemmt. Hierbei trat in A keine Quellung auf, eher das Gegenteil, während die Fällung in B vollständig in eine sauer reagierende, aber nicht klare Flüssigkeit verwandelt wurde. Diese saure Flüssigkeit wurde gefällt durch Zusatz von ein wenig Kochsalzlösung wie auch durch Neutralisation mit ein wenig Ammoniak. Die Fällung in A wurde noch einmal in viel Wasser fein verteilt. Sie quoll nicht auf, ließ sich leicht abzentrifugieren und mit Wasser auswaschen.

Je nach der zur Fällung des ammoniakhaltigen Wasserextraktes verwendeten Säuremenge kann man also ein b-Legumin von etwas verschiedenartiger Beschaffenheit erhalten. Bei Anwendung von einer etwas größeren Säuremenge erhält man ein b-Legumin, welches in Wasser stark aufquillt und eine sauer reagierende Flüssigkeit gibt. Bei Fällung mit weniger Säure quillt das Legumin nicht auf und läßt sich direkt mit Wasser auswaschen. Die Säuremenge ist jedoch nicht das einzige hier in Betracht kommende Moment, denn die Beschaffenheit des Erbsenmehles ist nicht ganz ohne Belang. So waren die Löslichkeitsverhältnisse und die Filtrierbarkeit des stark gequollenen sauren b-Legumins nicht ganz dieselben, wenn ich von einem alten oder von einem frisch gemahlten Erbsenmehle (welches noch Chlorophyll enthielt) ausging. Diese kleinen Unterschiede veränderten jedoch nicht die Hauptresultate.

Wie oben erwähnt, kann man die filtrierbare, trübe Lösung des mit viel Wasser behandelten b-Legumins durch Zusatz von ein wenig Ammoniak oder Alkalilauge fällen. Diese Fällung, mit Wasser ausgewaschen, löst sich nicht in Kochsalzlösung und kann mittels solcher von verunreinigendem a-Legumin befreit werden. Die darauf mit Wasser von Kochsalz vollständig befreite Fällung reagiert sauer auf Lackmuspapier und verhält

sich wie eine Säure. Es ist also wohl möglich, daß das b-Legumin selbst eine Säure ist, wenn auf der andern Seite auch die Möglichkeit besteht, daß die bei Alkalizusatz ausfallende Substanz eine in Wasser nicht lösliche Verbindung des Legumins mit einer kleineren Menge Säure ist. Es ist auch recht wohl denkbar, daß die mit den kleinsten Säuremengen erzeugten Leguminfällungen aus dem freien b-Legumin — wenn dies eine Säure ist — besteht oder Verbindungen von diesem mit der Phosphorsäure oder einer anderen der angeblich vorkommenden Säuren im Erbsenmehle enthält, während die Fällungen mit größeren Mengen Chlorwasserstoffsäure jedenfalls hauptsächlich aus Verbindungen des Legumins mit Chlorwasserstoffsäure bestehen. Eine solche Annahme konnte das in verschiedenen Fällen etwas wechselnde Verhalten des feuchten b-Legumins zu Wasser recht gut erklären. Die Entscheidung darüber, ob und inwieweit die eine oder andere dieser Möglichkeiten verwirklicht ist, mag aber anderen Untersuchern überlassen werden.

Das Wesentlichste ist nämlich, daß der durch Ausfällung mit einer Säure erhaltene, von Ritthausen als Legumin bezeichnete, in Kochsalzlösung nicht lösliche Eiweißstoff — das b-Legumin — hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich, aus Säure-Eiweißverbindungen besteht. Die nächste Hauptfrage gilt also der Art des in diesen Säureverbindungen enthaltenen Eiweißes, namentlich seine Beziehung zu dem a-Legumin.

Das a-Legumin verbindet sich ebenfalls, wie Osborne gezeigt hat, mit Säuren, und man kann auch Salzsäureverbindungen des a-Legumins mit Kochsalzlösung fällen. Der Umstand, daß bei Fällung mit einer größeren Säuremenge der salzunlösliche Teil der Fällung reichlicher ist als bei Fällung mit weniger Säure, wie auch der Umstand, daß im ersteren Falle das salzlösliche Eiweiß sich verhältnismäßig schwer mit Kochsalzlösung ganz entfernen läßt, könnten dafür sprechen, daß bei Ausfällung mit mehr Säure der in Salzlösung unlösliche Teil neben Säureverbindungen von b-Legumin auch in Salzlösung schwerlösliche Säureverbindungen von a-Legumin enthält und demnach ein Gemenge ist. Es könnte aber viel-

leicht auch so sein, daß dieses Gemenge neben Säureverbindungen von b-Legumin nur in Kochsalzlösung lösliche Verbindungen von a-Legumin enthält, die infolge der mehr kompakten Beschaffenheit der b-Leguminfällung fester eingeschlossen und infolge hiervon dem Lösungsmittel weniger leicht zugänglich sind. Wie es hiermit sich verhält, habe ich nicht näher geprüft, denn es werden immer schon bei der ersten Extraktion mit Kochsalzlösung so reichliche Mengen von a-Legumin gelöst, daß dieses Extrakt sehr gut zur Darstellung des a-Legumins sich eignet. Das zweite Extrakt lieferte regelmäßig eine wesentlich geringere Fällung. Diese Kochsalzextrakte reagieren immer stark sauer.

Verdünnt man das NaCl-Extrakt, welches das a-Legumin enthält, mit so viel Wasser, daß der Gehalt an NaCl in dem Gemenge etwa 1% wird, so scheidet sich das a-Legumin als eine reichliche, flockige Fällung aus, die sich leicht in Kochsalzlösung wieder löst und bei Wasserzusatz wieder ausfällt. Versucht man die abzentrifugierte Fällung in derselben Weise wie das b-Legumin durch feine Verteilung in Wasser und Zentrifugieren zu reinigen, so erhält man, wenn das Salz gewaschen worden ist, eine milchähnliche Flüssigkeit und einen weißen Bodensatz, der bei erneutem Behandeln mit Wasser eine ebenfalls milchige Flüssigkeit gibt. Die weiße milchähnliche Flüssigkeit reagiert sauer. Sie wird bei sehr vorsichtiger Neutralisation mit sehr verdünntem Ammoniak flockig gefällt, löst sich aber äußerst leicht in einem kleinen Überschuß des Ammoniaks. Ebenso wird sie gefällt von etwas Kochsalzlösung, schon von weniger als 0,5%, wird aber von mehr NaCl, 3—4%, zu einer sauer reagierenden Flüssigkeit klar gelöst. Das milchige Aussehen der Flüssigkeit rührt also von einer Säureverbindung des a-Legumins her. Diese in dem Wasser fein verteilte Säureverbindung kann man im allgemeinen, wenigstens nach wiederholtem Zurückgießen des Filtrates auf das Filtrum, so vollständig abfiltrieren, daß man ein wasserhelles, eiweißfreies Filtrat erhält, und wenn man die a-Leguminfällung direkt auf ein Filtrum bringt und mit Wasser auswäscht, kann man deshalb die eben geschilderte Veränderung der Fällung durch

Wassereinwirkung übersehen. In einigen Fällen geht indessen die Flüssigkeit fast unverändert milchweiß durch das Filtrum, und dieses, etwas wechselnde Verhalten scheint von einem verschiedenen Gehalte der Verbindung an Säure abhängig zu sein. Durch Zusatz von sehr wenig Säure, so wenig, daß sie das Aussehen der feinen Emulsion nicht ändert, kann man nämlich leicht die letztere mit unverändertem Aussehen filtrierbar machen. Daß ich bei Anwendung von verschiedenem Erbsenmehl als Ausgangsmaterial eine etwas ungleiche Filtrierbarkeit der a-Leguminsäureverbindung beobachtet habe, dürfte wohl auch vielleicht mit der ursprünglich etwas ungleich stark sauren Reaktion des Mehles im Zusammenhange stehen.

Das a-Legumin kann also ebenso wie das b-Legumin Säureverbindungen geben, aber die Säureverbindungen der beiden Legumine zeigen ein wesentlich verschiedenes Verhalten. Die Säureverbindungen des b-Legumins geben mit Wasser eine stark gequollene schleimige Masse, bzw. dickflüssige, nicht filtrierbare Lösungen oder mit viel Wasser eine von gequollenen Partikelchen trübe, schwer filtrierbare Flüssigkeit. Die Säureverbindungen des a-Legumins quellen dagegen nie in Wasser, sondern geben damit eine immer dünnflüssige milchweiße Emulsion bzw. eine milchweiß filtrierende Lösung. Ein anderer Unterschied ist der folgende. Neutralisiert man die Säureverbindung des b-Legumins in Wasser mit Alkali, so erhält man eine grobflockige, ziemlich kompakte Fällung, die nach dem Auswaschen mit Wasser unlöslich oder fast unlöslich in NaCl-Lösung von 8% ist. Die aus der Säureverbindung des a-Legumins durch Neutralisation mit Alkali erhaltene flockige, mehr lockere Fällung löst sich dagegen nach dem Auswaschen mit Wasser außerordentlich leicht und ganz klar in verdünnter Kochsalzlösung. Diese Lösung reagiert stark sauer, und das durch Neutralisation ausgefällte a-Legumin ist also entweder selbst eine Säure oder eine in Wasser nicht lösliche säureärmere Verbindung.

Auch in anderen Beziehungen verhalten sich die beiden Legumine etwas verschieden. Aus dem feuchten a-Legumin kann man leicht mit verdünntem Alkali klare, leicht filtrierende, dünnflüssige, neutral oder sogar sehr schwach sauer reagierende

Lösungen darstellen. Das b-Legumin gibt dagegen — gleichgültig ob man die Säureverbindung direkt oder die obengenannte, durch Neutralisation ausgefällte Substanz mit Alkali in Wasser zu lösen versucht — nie klare, sondern trübe, gelbbraun gefärbte, schleimige oder dickflüssige Lösungen, die beim Erwärmen sich etwas klären und weniger schwerfiltrierbar werden, die aber noch etwas opalisierend sind. Diese Lösungen reagieren regelmäßig alkalisch, nie sauer, und nur durch Verdünnung einer solchen Lösung und sehr vorsichtigen Zusatz von $n/100$ -HCl habe ich neutral reagierende Lösungen erhalten können.

Ein entsprechender Unterschied zwischen den beiden Leguminen besteht auch in ihrem Verhalten zu kleinen Mengen Säure. Von dem a-Legumin kann man mit sehr wenig Chlorwasserstoffsäure milchweiße, filtrierbare und mit etwas mehr Säure klare Lösungen erhalten. Diese Lösungen sind immer dünnflüssig, nie schleimig, sie reagieren immer stark sauer auf Lackmuspapier. Die mit wenig Säure bereiteten reagieren nicht auf Kongopapier. Versucht man das b-Legumin in Wasser mit $n/10$ -HCl zu lösen, so erhält man je nach der Menge des Legumins kleisterähnliche oder schleimige Massen, bzw. dickflüssige nicht filtrierbare Lösungen, die jedoch beim Stehen dünnflüssiger werden. Beim Erwärmen klären sie sich auf, ohne jedoch ganz klar zu werden. Sie sind nun auch mehr dünnflüssig und lassen sich filtrieren, sind aber immer gelbgrau gefärbt und opalisierend. In dieser Weise kann man indessen Lösungen von b-Legumin darstellen, die zwar auf Lackmuspapier stark sauer, dagegen nicht auf Kongopapier reagieren.

Ein weiterer Unterschied betrifft vielleicht den Phosphorgehalt. Das a-Legumin ist nach Osborne phosphorfrei. In dem b-Legumin fand Ritthausen dagegen immer Phosphor und ich habe ebenfalls dasselbe phosphorhaltig gefunden. Ich habe indessen noch keine eingehenden Untersuchungen über den Phosphorgehalt des b-Legumins ausgeführt und kann deshalb nicht bestimmt behaupten, daß diese Substanz Phosphor enthält. Daß das mit Säure gefällte Legumin (richtiger Gemenge) phosphorhaltig ist, haben indessen schon ältere Forscher gezeigt, und nach den Untersuchungen von Ritthausen wie

von Wiman¹⁾ kann über die Richtigkeit dieser Angaben kein Zweifel bestehen. Es wäre deshalb gewiß von Interesse zu untersuchen, ob das b-Legumin immer Phosphor enthält, bzw. ob es um eine Leguminphosphorsäureverbindung oder um Phosphor in organischer Bindung sich handelt.

Die nun mitgeteilten Erfahrungen und Beobachtungen, aus welchen hervorgeht, daß die beiden Legumine ganz verschiedene Löslichkeitsverhältnisse und physikalische Eigenschaften zeigen, haben mich zu der Überzeugung geführt, daß das von Ritthausen beschriebene Legumin, das b-Legumin, nicht ein durch Alkali-, Säure- oder Wassereinwirkung entstandenes Umwandlungsprodukt des Osborneschen Legumins, des a-Legumins sein kann. Es handelt sich hier vielmehr um zwei, vielleicht nahe verwandte, aber jedoch in mehreren Hinsichten verschiedene Proteinsubstanzen. Ich finde es wahrscheinlich, daß das b-Legumin diejenige Substanz ist, welche den Erbsenmehlextrakten ihre nie ganz klare Beschaffenheit verleiht und die Unklarheit wie auch die Schwerfiltrierbarkeit der Kochsalzlösungen des Rohlegumins bedingt. Ich finde es ferner nicht unwahrscheinlich, daß dieses Legumin in irgend einer Beziehung zu dem Albuminate von Osborne steht. Die Ansicht von Ritthausen, daß von Anfang an im Erbsenmehle zwei verschiedene in Salzlösung übergehende Proteinsubstanzen vorhanden sind, von denen die eine infolge der chemischen Eingriffe in eine salzunlösliche Modifikation übergeht, scheint mir richtig zu sein, wenn man statt «Modifikation» die Bezeichnung Säureverbindung verwendet. Seiner Ansicht, daß die Salzunlöslichkeit durch die Einwirkung des Alkalis bedingt ist, kann ich nämlich nicht beitreten, indem, wie ich im vorigen gezeigt habe, die kleine Alkalimenge ohne Einwirkung und das salzunlösliche Produkt eine Säureverbindung ist. Da aber auch die aus der gelösten Säureverbindung mit Alkali ausgefällte Substanz in NaCl-Lösung unlöslich ist, kann natürlich das durch Fällung mit Säure erhaltene Rohprodukt ein Gemenge von dieser Substanz und ihrer Säureverbindung sein. Daß man in dem NaCl-

¹⁾ Upsala Läkareförenings Förhandlingar (N. F.), Bd. 2, S. 553 (1897) und Malys Jahresbericht, Bd. 27, S. 21 (1898).

Extrakte des Erbsenmehles auch das in Salzlösung nicht lösliche b-Legumin erhält, rührt wohl daher, daß dieses Legumin im Mehle als eine lösliche, durch Säure fällbare Alkaliverbindung vorkommt.

Es würde natürlich von Interesse sein, die Natur und Eigenschaften des b-Legumins mehr eingehend zu studieren. Hierzu sind aber Untersuchungen nicht nur über die elementare Zusammensetzung, sondern auch über den Gehalt dieses Legumins an verschiedenen Aminosäuren erforderlich, und solche Untersuchungen lagen vollständig außerhalb des Planes meiner Arbeit. Meine Hauptaufgabe war nämlich nur, ein für meine Pepsin- und Chymosinuntersuchungen brauchbares Material darzustellen, und die mitgeteilten Beobachtungen habe ich — wie in der Einleitung hervorgehoben wurde — nur als Nebenprodukte der Hauptarbeit betrachtet. Ich hoffe trotzdem, daß diese Beobachtungen nicht ganz ohne Bedeutung für ein Verständnis der zwischen Ritthausen und Osborne vorhandenen Meinungsdivergenzen sein dürften.

Eine noch offene Frage ist die Ursache des verschiedenen Verhaltens der Säureleguminverbindungen zu Wasser vor und nach der Behandlung mit NaCl-Lösung. Das durch Extraktion des durch Säurezusatz ausgefällten Gemenges mit Kochsalzlösung und Fällung des Extraktes mit Wasser erhaltene a-Legumin gibt, wie oben erwähnt, beim Waschen mit Wasser (in oben angegebener Weise) eine milchige Flüssigkeit, die eine Säureverbindung des a-Legumins enthält, und der nach der Extraktion mit Kochsalzlösung zurückgebliebene Rest — das b-Legumin — gibt mit Wasser eine mehr oder weniger stark quellende Säureverbindung. Wenn nun also die mit Säure aus dem ammoniakalischen Wasserextrakte des Erbsenmehles erhaltene Rohfällung ein Gemenge von Säureverbindungen der Legumine ist, könnte man erwarten, daß auch dieses Gemenge vor der Kochsalzbehandlung mit Wasser eine milchig trübe Flüssigkeit, resp. eine quellende Masse mit viel Wasser geben würde; aber dies ist nicht der Fall. Man kann diese Rohfällung wiederholt mit Wasser und Zentrifugieren auswaschen, ohne irgend eine solche Veränderung zu sehen. Der Bodensatz setzt sich scharf ab, und die obenstehende Flüssigkeit ist wasserhell. Erst nach der

Extraktion mit Kochsalzlösung und Entfernung des a-Legumins beobachtet man die starke Quellung des b-Legumins in Wasser, und ebenso ist es erst das mit Wasser aus dem Kochsalzextrakte gefällte a-Legumin, welches beim Waschen mit Wasser die milchähnliche Flüssigkeit gibt. Die Frage, wie die Kochsalzlösung hierbei wirkt, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

Es liegt mir nun ob, die Gründe, warum ich die beiden Substanzen als a- und b-Legumin bezeichnet habe, anzugeben.

Das von Osborne mit großer Sorgfalt dargestellte und studierte Legumin scheint eine reine, einheitliche Substanz zu sein, während das Legumin Ritthausens allem Anscheine nach unrein war und auch Säureverbindungen des Legumins von Osborne enthielt. Unter solchen Umständen könnte es wohl berechtigt sein, der reineren, einheitlichen Substanz einen besonderen Namen, und zwar den Namen Legumin, zu geben. Auf der anderen Seite ist aber der Name Legumin als Bezeichnung für den Hauptbestandteil des salzunlöslichen Gemenges älter und also aus Prioritätsrücksichten ebenfalls berechtigt. Da es nun wenig angemessen sein dürfte, dem Legumin Ritthausens einen neuen, besonderen Namen zu geben, bevor die Natur dieser Substanz aufgeklärt worden ist, und da beide Substanzen vielleicht in naher Beziehung zu einander stehen, schien es mir am einfachsten zu sein, bis auf weiteres beide als Legumine, und zwar als a- und b-Legumine zu bezeichnen.

Die Methode zur Darstellung der beiden Legumine ist wohl schon im vorigen in den Hauptzügen angegeben, und ich habe nur wenig hinzuzufügen. Es wurden meistens 150 g Erbsenmehl mit 3000 ccm Wasser, welches nie mehr als 0,016, gewöhnlich 0,014%, NH_3 enthielt, extrahiert. Das Filtrat wurde mit Chlorwasserstoffsäure vom spez. Gewicht 1,127 (0,1—0,2 ccm auf je 100 ccm Filtrat) gefällt. Die zugesetzte Menge Chlorwasserstoffsäure schwankte also zwischen 0,028 und 0,056%, war aber meistens 0,056%. Die Menge der Säure — innerhalb dieser Grenzen — ist nicht gleichgültig für die fortgesetzte Arbeit. Bei Zusatz von wenig Säure erhält man leicht bei der folgenden Extraktion mit NaCl-Lösung opalisierende Extrakte, die bei Verdünnung mit Wasser einen

festen Bodensatz von Legumin absetzen, und dieser Bodensatz löst sich nicht klar in Kochsalzlösung. Die Darstellung eines reinen a-Legumins wird hierdurch etwas erschwert, während dagegen das b-Legumin viel leichter mit Salzlösung extrahiert wird und auch mit Wasser ohne die starke Aufquellung gewaschen werden kann. Bei Fällung mit der größeren Säuremenge — 0,056% — erhält man dagegen bei der Extraktion der gewaschenen Fällung mit NaCl-Lösung klare Extrakte, die mit Wasser eine weiße, lockere, flockige Fällung geben. Diese Fällung, welche leichter auszuwaschen ist, löst sich äußerst leicht und klar in verdünnter Kochsalzlösung auf. In diesem Falle ist aber die Rohfällung mehr weiß und kompakt und ist schwer mit Kochsalzlösung zu erschöpfen. Das rückständige b-Legumin quillt in diesem Falle stark in Wasser und kann sich in viel Wasser zu einer unklaren Flüssigkeit lösen. Man kann es also nicht mit Wasser waschen, sondern muß es durch Zusatz von ein wenig Alkali ausfällen. Für die Darstellung des a-Legumins ist also die größere Säuremenge besser; für die direkte Darstellung des b-Legumins umgekehrt die kleinere. Statt mit Chlorwasserstoffsäure kann man auch mit Essigsäure oder einer anderen Säure fällen. Ich habe nur die Essigsäure etwas versucht und erhielt mit 0,15% Säure eine Fällung, die in NaCl-Lösung zum Teil löslich und zum Teil unlöslich war. Inwieweit die eine oder die andere Säure vorzuziehen ist, habe ich nicht weiter geprüft.

Zur Darstellung des a-Legumins wurde die mit Wasser ausgewaschene Rohfällung mit NaCl-Lösung von 8% extrahiert, und das klare Extrakt mit so viel Wasser verdünnt, daß der Salzgehalt 1% betrug. Die Fällung wurde abzentrifugiert, in Kochsalzlösung wieder gelöst und wieder mit Wasser bis zu einem Gehalte von 1% NaCl (um das Vicilin zu entfernen) gefällt. Da es nur um die Darstellung eines zu den Enzymversuchen brauchbaren Materials sich handelte, schien es mir überflüssig, das Legumin mehr als zweimal mit Wasser zu fällen. Die abzentrifugierte Fällung wurde durch feine Verteilung in Wasser und Zentrifugieren gewaschen. Sobald hierbei eine milchige Flüssigkeit sich gebildet hatte, was als Beweis für die Entfernung des rückständigen Kochsalzes diente, wurde

sie von dem festen Bodensatze getrennt und durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak (von der Stärke 0,5%) gefällt. Diese Fällung von a-Legumin konnte leicht mit Wasser ausgewaschen werden und diente in feuchtem Zustande zur Darstellung von Alkali- bzw. Acidleguminatlösungen. Der von der milchigen Flüssigkeit getrennte Bodensatz wurde in einigen Fällen mit mehr Wasser behandelt, und die neue milchige Flüssigkeit, wie eben erwähnt, behandelt. In anderen Fällen wurde der Bodensatz in einer passenden Menge Wasser fein verteilt und direkt zu der Darstellung von Alkali-, bzw. Acidleguminat verwendet. Ob die eine oder andere Methode zur Darstellung solcher Lösungen benutzt wurde, war für die Versuchsergebnisse gleichgültig. Das a-Legumin wurde aber immer frischbereitet und feucht in Lösung gebracht, ohne Alkohol und Ätherbehandlung. Käufliches Legumin war so verändert und schwer löslich, daß ich es nicht brauchen konnte.

Das b-Legumin wurde in einigen Fällen (nach Fällung des Erbsenmehlextraktes mit wenig Säure) erst mit NaCl-Lösung möglichst erschöpft und dann mit Wasser gewaschen. In den meisten Fällen dagegen — wenn also zur Fällung des Erbsenmehlextraktes die größere Säuremenge verwendet worden war — wurde der mit Kochsalzlösung erschöpfte Rückstand der Rohfällung erst einmal mit Wasser und Zentrifugieren gewaschen, um die Hauptmenge des rückständigen Salzes zu entfernen. Dann wurde der Rückstand mit so viel Wasser versetzt, daß, nach dem Stehen in der Kälte über eine Nacht, eine filtrierbare (durch nicht zu dichtes Papier) oder jedenfalls eine durch Leinwand leicht kolierbare Lösung des b-Legumins erhalten wurde. Diese Lösung wurde durch Zusatz von Ammoniak gefällt, die Fällung erst mit Wasser gewaschen, dann mit NaCl-Lösung extrahiert (um etwa beigemengtes a-Legumin zu entfernen) und endlich mit Wasser gründlich ausgewaschen. Das b-Legumin wurde ebenfalls immer in feuchtem Zustande mit Alkali, resp. Säure gelöst.

Upsala, September 1917.
