

Die stickstoffhaltigen Bestandteile der Hefe.

Von

Jakob Meisenheimer.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 7. Februar 1919.)

Über die Eiweißstoffe der Hefe liegen eine Reihe von Untersuchungen vor¹⁾, von denen sich der kleinere Teil mit den direkt in der Hefe sich findenden Eiweißarten²⁾, der größere Teil mit ihren Spaltprodukten befaßt. Für die Beurteilung des Wertes der Hefe als Eiweißnährstoff ist eine genaue Kenntnis der Eiweißspaltprodukte von besonderer Bedeutung und von diesem Gesichtspunkte aus ist die nachfolgende Untersuchung begonnen worden. Die Anregung dafür ging von Herrn Geheimerat Prof. Dr. Max Delbrück vom Institut für Gärungsgewerbe in Berlin aus. Das Institut hat auch die nicht unbeträchtlichen Mittel für die Durchführung der Arbeiten zur Verfügung gestellt. Ich möchte nicht unterlassen, dafür dem Institut und besonders Herrn Geheimerat Delbrück meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich ausschließlich mit den einfachsten Bausteinen der Stickstoffkörper der Hefe, und zwar strebten wir eine möglichst quantitative Aufklärung des gesamten Stickstoffgehalts der Hefe an. Deshalb

¹⁾ Ausführliche Literaturzusammenstellung siehe P. Schulze, Wochenschr. f. Brauerei 29, 535 (1912).

²⁾ Vgl. besonders die neueren Arbeiten von P. Thomas. C. r. 156, 2024 (1913); 157, 243 (1913); ferner G. Dreyer, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, 36, 201 (1913).

wurde von vornherein auf eine Isolierung der Hefeeiweißstoffe verzichtet, da eine solche nur mit sehr großen Verlusten¹⁾ durchgeführt werden kann. Es wurde vielmehr stets die Hefe direkt dem Abbau, meist durch Autolyse, in einigen Fällen auch durch Säuren, unterworfen. Die heutige Mitteilung befaßt sich ausschließlich mit den bei der Spaltung auftretenden Monamino-säuren. Es ist bereits bekannt, daß Hefeneiweiß sich zum weitaus größten Teil aus Monamino-säuren aufbaut; von diesen sind bisher folgende in der (autolytierten) Hefe gefunden worden: Leucin und Tyrosin, schon von Béchamps²⁾ und Schützenberger³⁾ aus Hefe isoliert; ihr Vorkommen wurde später von vielen anderen⁴⁾ bestätigt. A. Wroblewski⁵⁾ fand die Glutaminsäure, Fr. Kutscher⁶⁾ auch Asparaginsäure, M. Schenk⁷⁾ das Tryptophan, F. Ehrlich und A. Wendel⁸⁾ wiesen neben Leucin auch Isoleucin und Valin nach. Nach Schröder⁹⁾ ist außerdem das Auftreten von Phenylalanin und Cystin wahrscheinlich. Von diesen Resultaten sind nur die von Ehrlich mit Hilfe der Fischerschen Estermethode gewonnen; nach dem gleichen Verfahren stellte A. Pringsheim¹⁰⁾ fest, daß die Hefe weder Glykoll noch Alanin enthält, dagegen geringe Mengen von Prolin, Phenylalanin und Glutaminsäure, vielleicht auch Serin und sehr viel Leucin und Valin.

Die unten beschriebenen Versuche waren im Sommer 1914 abgeschlossen und zum Teil auch schon niedergeschrieben; ihre Veröffentlichung wurde durch den Krieg bis jetzt verzögert. Im Jahre 1915 erschien eine Mitteilung von C. Neu-

¹⁾ Vgl. besonders G. Dreyer, Dissert. der Technischen Hochschule München, S. 26 (1912).

²⁾ A. Béchamps, C. r. 74, 184 (1872); 78, 645 (1874).

³⁾ P. Schützenberger, C. r. 78, 493 u. 698 (1874).

⁴⁾ Vgl. P. Schulze a. a. O.

⁵⁾ Ber. d. d. Chem. Ges. 31, 3223 (1898); J. pr. Chem. 64, 52 (1901).

⁶⁾ Diese Zeitschr. Bd. 32, 71 (1901).

⁷⁾ Wochenschr. f. Brauerei 22, 227 (1905).

⁸⁾ Bioch. Zeitschr. 8, 431 (1908).

⁹⁾ Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys. u. Pathol. 2, 389 (1902).

¹⁰⁾ Wochenschr. f. Brauerei 30, 399 (1913).

berg¹⁾, welche im Gegensatz zu den Angaben Pringsheims auch Alanin unter den Spaltprodukten des Hefeeiweißes feststellte.

Wir haben sowohl Ober- als Unterhefe der Untersuchung unterworfen. Als Oberhefe benutzten wir obergärrige Reinzuchtbrennereihefe Rasse 12, als Unterhefe eine untergärrige Betriebsreinhefe Rasse K des Instituts für Gärungsgewerbe. Zur Aufspaltung der Eiweißstoffe blieb die Hefe bei Gegenwart von Toluol der Autolyse überlassen; die Bestimmung der Monaminosäuren erfolgte soweit möglich nach dem E. Fischerschen Esterverfahren.

Als Hauptresultat²⁾ ist hervorzuheben, daß es gelang, fast alle bereits als Eiweißspaltprodukte überhaupt aufgefundenen Monaminosäuren in der Hefe nachzuweisen: Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Prolin, Phenylalanin, Asparagin- und Glutaminsäure, Tyrosin, Tryptophan; nicht ganz sicher gelang der Nachweis von Serin und Cystin. Ferner sprechen manche Anzeichen für das Vorhandensein einer Aminobuttersäure. Das Suchen nach dieser im Eiweiß bisher nicht mit aller Sicherheit nachgewiesenen Substanz erschien hier besonders aussichtsreich, nach den Arbeiten von F. Ehrlich³⁾. Ehrlich hat bekanntlich gezeigt, daß die Fuselöle bei der alkoholischen Gärung durch Spaltung der Aminosäuren entstehen, und zwar liefert jede Aminosäure den um ein Kohlenstoffatom ärmeren Alkohol. Da nun das Fuselöl, wenn auch in geringer Menge, n-Propylalkohol enthält, so sollte α -Amino-n-Buttersäure⁴⁾ entweder in der Hefe, oder in der zu vergärenden Maische, Schlempe usw. aufzufinden sein. Unsere in dieser Richtung angestellten Versuche führten indessen zu keinem sicheren Erfolg. — Das so oft in Hefe vergeblich gesuchte Glukosamin wurde in reinem Zustande aus den Zellrückstän-

¹⁾ Wochenschr. f. Brauerei 32, 319 (1915).

²⁾ Eine kurze vorläufige Mitteilung darüber findet sich in der Wochenschr. f. Brauerei 32, 325 (1915).

³⁾ Zeitschr. d. Ver. d. deutschen Zuckerindustrie 55, 539 (1905).

⁴⁾ Über eine andere Möglichkeit der Erklärung vgl. F. Ehrlich, a. a. O. S. 566.

den nach der Selbstverdauung isoliert. Den Hauptwert legten wir auf eine möglichst quantitative Isolierung der einzelnen Spaltprodukte; eine Erörterung der dabei gewonnenen Ergebnisse soll indessen einer späteren Mitteilung vorbehalten bleiben.

I. Oberhefe.

Autolyse der Hefe.

Eine abgewogene Menge (mehrere Kilogramm) Hefe von bekanntem Stickstoff- und Wassergehalt wurde im locker verschlossenen Stöpselglas mit 5% Toluol versetzt und gut durchgemischt. Da im Anfang stets heftige Selbstgärung unter Kohlendioxydentwicklung eintrat, blieb die sich schnell verflüssigende Masse, um ein Überschäumen zu vermeiden, zunächst 1—2 Tage bei Zimmertemperatur stehen, und wurde erst, wenn die erste heftige Gasentwicklung vorbei war, in den Brutschrank gesetzt. Die Selbstverdauung schritt stets sehr schnell voran, meist fiel bereits nach zehn Tagen die Biuretreaktion negativ aus; die letzten Reste noch unangegriffener Eiweißstoffe gingen dagegen nur sehr langsam in Lösung (vgl. unten). Stets begann nach einigen Tagen das Tyrosin langsam in farblosen kugeligen Aggregaten aus der Lösung auszukristallisieren. Es ist unmöglich, das Ungelöste von der Flüssigkeit durch Filtrieren zu trennen; daher wurde bei Unterbrechung des Versuchs die ganze Masse in einer großen Zentrifuge mit 3000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Vorhandenes Tyrosin scheidet sich dabei als schweres Pulver am Boden ab, es kann von den darüber sitzenden und teilweise in der Flüssigkeit schwebenden Zellhäuten leicht und vollständig mechanisch getrennt werden. Um auch die Zellrückstände zu entfernen, wurde das Ganze mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und aufgeköcht. Bei erneutem Zentrifugieren setzen sich nunmehr die Zellrückstände fest am Boden ab. Sie werden noch zwei- bis dreimal mit sehr viel Wasser (je etwa dem doppelten Gewicht der angewandten Hefe) ausgeköcht und stets durch Abzentrifugieren wieder von der Flüssigkeit getrennt. Die alsdann noch sehr wasserhaltige Masse wird durch zweimaliges Eintragen in sehr viel Alkohol (Gewicht der angewandten

Hefe) und erneutes Abzentrifugieren von der Hauptmenge Wasser befreit und an der Luft getrocknet. Der unlösliche Rückstand war um so geringer, je länger die Autolyse dauerte, auch nahm der Stickstoffgehalt ständig ab, niemals aber wurde der Rückstand stickstofffrei.

Versuch I: 600 g Hefe 2 Tage bei 22° C., 8 Tage bei 37° C. gaben etwa 35 g Rückstand (ungefähr 25% vom Trockengewicht der Anfangshefe) mit 1,95% Stickstoff; es dürften schätzungsweise 6% des Gesamtstickstoffs der Hefe ungelöst geblieben sein.

Versuch II: 900 g Hefe mit 230 g Trockensubstanz und 19 g Stickstoff 14 Tage bei 37° C. gaben 50 g Rückstand mit 47 g Trockensubstanz (= 20% der angewandten Trockenhefe) und 1,8% (0,9 g) Stickstoff (= 4,7% vom Gesamtstickstoff).

Versuch III: 4200 g Hefe mit 1120 g Trockensubstanz und 94,5 g Stickstoff 16 Tage bei 37° C.: 210 g Rückstand mit 196 g Trockensubstanz (17,5% der Trockenhefe) und 2,2% (4,7 g) Stickstoff (= 5% des Gesamtstickstoffs).

Versuch IV: 3960 g Hefe mit 1020 g Trockensubstanz und 87,5 g Stickstoff 1 Tag bei 20° C., 20 Tage bei 37° C., dann noch 2 Tage bei 20° C.; 173 g Rückstand mit 163 g Trockensubstanz (16%) und 1,3% (2,25 g) Stickstoff (= 2,6% vom Gesamtstickstoff).

Versuch V: 3850 g Hefe mit 1030 g Trockensubstanz und 87,7 g Stickstoff 2 Tage bei 20° C., 26 Tage bei 37° C., dann noch 13 Tage bei 20° C.; 95 g Rückstand mit 88 g Trockensubstanz (8%) und 1,4% (1,3 g) Stickstoff (= 1,5% vom Gesamtstickstoff).

Bei der Autolyse tritt ein Stickstoffverlust (etwa in Form von Ammoniak oder auch von elementarem Stickstoff) nicht ein: die Hefe vom Versuch V enthielt z. B. frisch 2,28% Stickstoff und nach vierwöchentlicher Autolyse bei Gegenwart von Toluol 2,31% Stickstoff (Durchschnitt mehrerer fast genau übereinstimmender Analysen).

Der in den Zellrückständen verbleibende Stickstoff war weder durch häufig wiederholtes Auskochen mit sehr viel Wasser, noch durch Ausziehen mit Alkohol oder heißer 2%iger alkoholischer oder kalter 4%iger wässriger Salzsäure in irgend erheblichem Maße in Lösung zu bringen. Dagegen entzog der Alkohol, der zum Auswaschen diente, dem Rückstande erhebliche Mengen stickstofffreier Substanzen, welche beim Verdampfen des Alkohols teilweise auskristallisierten. Durch Abpressen auf Ton und wiederholtes Umkristallisieren aus Alkohol wurden schließlich farblose Schuppen vom Schmelzpunkt 156—157° C. erhalten: Phytosterin,

welches die von E. Gérard¹⁾ angegebene Farbreaktion zeigte. O. Hinsberg und E. Roos²⁾ geben als den Schmelzpunkt des Phytosterins aus Bier oder Preßhefe 159° C. an, während A. Neville³⁾ die Schmelztemperatur niedriger (und auch Hinsberg und Roos in einem Falle), nämlich bereits bei 145–147° C. fanden. Auch wir beobachteten gelegentlich niedriger schmelzende Produkte.

Die stickstoffhaltige Substanz der Zellrückstände ist in sehr verdünnter Natronlauge zum größten Teil löslich: von 5 g Rückständen mit 2,1% Stickstoff blieben nach stundenlangem Schütteln mit 100 ccm $\frac{1}{10}$ -normaler Natronlauge⁴⁾ 3,9 g mit nur noch 1,12% Stickstoff ungelöst. Am vollständigsten kann man die Auflösung der Zellrückstände erreichen durch Behandlung mit starken Säuren (konzentrierter Salzsäure, 50% iger Schwefelsäure). Kocht man eine solche Lösung längere Zeit, so entsteht

Glukosamin.

Der Nachweis von Glukosamin ist bisher in der Hefe nicht gelungen, eine Tatsache, die deshalb besonders merkwürdig erschien, weil die Zellmembran der meisten anderen Pilze Chitin⁵⁾ enthält und daher bei der Hydrolyse mit starken Säuren Glukosamin liefert. C. van Wisselingh⁶⁾ hat vergeblich versucht, auf mikrochemischem Wege mit Hilfe der von ihm ausgearbeiteten Jodreaktion Chitin in der Hefezellwand nachzuweisen, und ebensowenig gelang C. Tanret⁷⁾ der direkte chemische Nachweis durch Umwandlung in Glukosamin. Wir erhielten die besten Ausbeuten an Glukosamin-Chlorhydrat auf folgendem Wege:

¹⁾ Chem. Zentralblatt 1896, I, 45.

²⁾ Diese Zeitschrift Bd. 38, S. 12 (1903).

³⁾ Chem. Zentralblatt 1914, I, 565.

⁴⁾ Vgl. G. Dreyer a. a. O. S. 13

⁵⁾ Umfangreiche Lit. vgl. E. v. Lippmann, Chemie der Zuckerarten, Braunschweig 1904, S. 780.

⁶⁾ Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 31, 658 (1898).

⁷⁾ Bull. Soc. Chim. III, 17, 924 (1897).

100 g Zellerückstände (Versuch V) mit 1,4% Stickstoff und 7,1% Wasser werden mit 300 ccm konzentrierter Salzsäure angerührt und auf dem Wasserbade erwärmt. Es tritt rasch Lösung ein, alsbald färbt sich die Flüssigkeit dunkel und schließlich schwarz. Nun setzt man nochmals 200 ccm konzentrierte Salzsäure zu und kocht am Rückflußkühler, zuerst wegen des starken Schäumens vorsichtig, dann stärker, im ganzen 8—10 Stunden lang. Die sich dabei massenhaft abscheidende kohlige Huminsubstanz (132 g feucht mit 0,28 g Stickstoff) wird abfiltriert und das goldgelbe klare Filtrat auf dem Wasserbade bis zur Entfernung der Hauptmenge Chlorwasserstoff eingedampft. Der hinterbleibende braune Sirup scheidet beim wochenlangen Stehen allmählich schöne farblose Kristalle ab (1,6 g). Diese Kristalle zeigen die typischen Reaktionen des Glukosamin-Chlorhydrats. Sie sind leicht löslich in Wasser, schwerer in Alkohol, sind aschefrei, reduzieren Fehlingsche Lösung in der Kälte langsam, momentan bei gelindem Erwärmen. Aus Wasser kristallisieren sie in der charakteristischen Form und besitzen dann auch die richtige Zusammensetzung und Drehung:

0,010180 g Substanz verbrauchten 4,70 ccm n_{100} -Silbernitratlösung

0,1508 " " " 6,95 " n_{10} "

$C_6H_{14}O_5NCl$ (215,6). Ber.: Cl 16,47. Gef.: 16,38; 16,34.

0,4341 g Substanz zeigten, in Wasser zu 20 ccm gelöst und eine halbe Stunde nach der Lösung untersucht, im 2 cm-Rohr eine Drehung von $+3,52^\circ$. Die Drehung ging nach einer weiteren halben Stunde auf $3,16^\circ$ zurück und war nach 24 Stunden bei $3,09^\circ$ konstant. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = 71,2^\circ$, was mit den in der Literatur¹⁾ sich findenden Angaben gut übereinstimmt.

Kürzeres Kochen mit konzentrierter Salzsäure lieferte überhaupt kein Glukosamin, wahrscheinlich, weil dann die Kohlenhydrate der Zellmembran noch nicht genügend durch Bildung von Huminsubstanzen zerstört und aus der Lösung entfernt waren und die Kristallisation verhinderten. Durch

¹⁾ Vgl. E. v. Lippmann a. a. O. S. 519.

mehrständiges Erwärmen mit verdünnter (8%iger) Salzsäure war nur sehr unvollkommene Lösung zu erzielen. Auch das Verfahren von E. Winterstein¹⁾ mit Verwendung der Dialyse ergab ein völlig negatives Resultat, wohl ebenfalls aus dem oben angegebenen Grunde.

Die aufgefundenene Menge Glukosamin-Chlorhydrat ist sehr gering (im obigen Versuch 0,15% von der Trockensubstanz der ursprünglich verwendeten Hefe). Nun wird man ja allerdings annehmen müssen, daß bei dem erforderlichen langen Kochen mit Salzsäure der größte Teil des vorhandenen Glukosamins zerstört wird. Bei der Autolyse scheint Glukosamin nicht in Lösung zu gehen, denn die am längsten verdauten stickstoffärmsten Zellrückstände des Versuchs V lieferten die besten Ausbeuten an Glukosamin. Diese Widerstandsfähigkeit gegen Verdauungsenzyme spricht dafür, daß die Muttersubstanz des Glukosamins in der Hefe, wie in so vielen anderen Pilzen, auch das Chitin ist, und der negative Ausfall der Versuche von van Wisselingh erklärt sich durch die außerordentlich geringe Menge. Als zweites Spaltprodukt des Chitins tritt bekanntlich Essigsäure²⁾ auf; auch diese konnte hier nachgewiesen werden (vgl. unten). Da indessen die in den Organismen ebenfalls sehr häufig aufgefundenen Mucine in allen oben angeführten Eigenschaften dem Chitin gleichen (vgl. C. Oppenheimer, Handb. der Bioch. des Menschen und der Tiere, I, 320), so könnte sehr wohl auch ein solches Mucin die Muttersubstanz des Glukosamins in der Hefe darstellen. Das Verhalten gegen Säuren und Alkalien steht mit dieser Annahme in besserem Einklang.

Um ein ungefähres Bild von der Natur der insgesamt in den Zellrückständen verbleibenden stickstoffhaltigen Substanzen zu bekommen, wurde eine größere Portion der Hydrolyse unterworfen:

178 g Zellrückstände mit 3,97 g Stickstoff (Versuch III) wurden mit konzentrierter Salzsäure wie oben aufgeschlossen.

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 21 S. 137 (1895).

²⁾ F. Hoppe-Seyler, Ber. d. d. chem. Ges. 27, 3329 (1894); T. Araki, Diese Zeitschrift Bd. 20 S. 498 (1895).

Es schieden sich 84,9 g Huminsubstanz (bei 100° C. getrocknet) ab mit 0,67 g Stickstoff (17% vom Gesamtstickstoff). Nach dem Einengen des Filtrats im Vakuum kristallisierten allmählich 1,13 g Glukosamin-Chlorhydrat (mit 0,07 g Stickstoff) aus, die in einzelnen Fraktionen abgesaugt wurden.

Das Vakuumdestillat der Hydrolysenflüssigkeit wurde durch Schütteln mit Bleioxyd von der Hauptmenge Salzsäure und durch Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei befreit. Der Rest der Salzsäure sollte mit Silberoxyd hinweggenommen werden. Bei Zusatz des Silberoxyds trat aber starke Abscheidung von metallischem Silber auf, welche nur durch Ameisensäure¹⁾ veranlaßt sein konnte. Es wurde daher zunächst zur Zerstörung der Ameisensäure mit Schwefelchromsäuregemisch auf dem Wasserbade erwärmt, bis die gelbrote Farbe der Chromsäure stehen blieb und die flüchtige Säure alsdann von neuem übergetrieben. Etwas Salzsäure wurde noch mit Silberoxyd entfernt; aus dem Filtrat davon kristallisierte das essigsaure Silber in den charakteristischen farblosen Nadeln.

0,1565 g Substanz verbrauchten 9,30 ccm n_{10} -Salzsäure
 $C_2H_3O_2Ag$. Ber.: Ag 64,65%; gef.: 64,14%.

Als auch bei sehr langem Stehen kein Glukosaminchlorhydrat mehr sich abschied, wurde mit Wasser verdünnt und zuerst mit Bariumkarbonat, nachher, als dabei fast kein Ammoniak überging, mit Magnesia destilliert. Das Destillat enthielt 0,31 g Stickstoff in Form von Ammoniak. — Beim Abtreiben des Ammoniaks war versehentlich viel zu viel Bariumkarbonat und Magnesia verwendet (Gesamtmenge nach dem Auswaschen und Trocknen 105 g!); das Gemisch erhielt daher sehr viel Stickstoff adsorbiert zurück, nämlich 0,28 g.

Das Filtrat vom Bariumkarbonat-Magnesiumoxyd (1150 ccm) wurde mit 150 ccm 30%iger Schwefelsäure stark angesäuert und zur Ausfällung der Alloxurbasen heiß mit Silbersulfat versetzt, solange noch ein Niederschlag erfolgte; selbstverständlich fiel auch sehr viel Chlorsilber mit. Der Niederschlag enthielt nach sehr sorgfältigem Auswaschen mit heißer verdünnter Schwefelsäure 0,18 g Stickstoff (Alloxurbasestickstoff).

¹⁾ Entstanden beim Kochen der Kohlenhydrate der Zellrückstände mit Salzsäure.

In dem Silbersulfat noch in reichlicher Menge enthaltenden Filtrat wurde in bekannter Weise ¹⁾ die Arginin-Histidin-Fraktion durch Zusatz von festem gepulvertem Baryt abgeschieden. Gefunden: 0,52 g Arginin-Histidin-Stickstoff.

Nach Entfernung des überschüssigen Baryts mit Schwefelsäure (das ausfallende Bariumsulfat [300 g] riß wieder 0,16 g Stickstoff mit nieder) wurde aus der stark eingeeengten Flüssigkeit das Lysin und Cholin mit Phosphorwolframsäure gefällt; es fielen 5,4 g Phosphorwolframat mit 0,08 g Stickstoff.

Das Filtrat davon enthielt noch 1,20 g Stickstoff (Monaminosäurestickstoff).

Addiert man die im Verlauf des eben beschriebenen Versuchs gefundenen Stickstoffmengen, so ergibt sich als Summe 3,47 g Stickstoff, mithin ein Verlust von 0,50 g, der als Arbeitsverlust zu betrachten ist. Ohne erheblichen Fehler kann man annehmen, daß dieser Verlust wesentlich bei dem Absaugen der Glukosaminfraktion, also zu Beginn der Operation eingetreten ist, und sich daher gleichmäßig auf den gesamten vorhandenen Stickstoff verteilt. Das gleiche gilt von dem Stickstoff der Huminsubstanz, der hier wegen der großen Menge der vorhandenen Kohlenhydrate sehr hoch ist. Läßt man diese Stickstoffanteile außer Betracht, so ergibt sich schätzungsweise nachstehende Verteilung des Stickstoffs in den Zellrückständen (abgesehen vom Glukosamin); dabei ist der in dem Bariumkarbonat-Magnesiumoxyd-Gemisch und im Bariumsulfat zurückgehaltene Stickstoff in sinngemäßer Umrechnung bei den einzelnen Stickstofffraktionen in Rechnung gesetzt: Auf Ammoniak entfallen 11% des Gesamtstickstoffs, auf Alloxurbasen 7%, auf die Arginin-Histidinfraktion 22%, auf die Lysin-Cholinfraktion 4% und auf Monaminosäuren 56%. Diese Zahlen entsprechen im großen und ganzen den bei der allgemeinen Hydrolyse des Hefeeweißes gefundenen Werten, nur in der Lysin-Cholinfraktion ist sonst stets mehr Stickstoff gefunden. Die in den „Zellrückständen“ hinterbleibende stickstoffhaltige Substanz hat demnach (abgesehen vom

¹⁾ F. Weiß, Diese Zeitschrift Bd. 52 S. 107 (1907).

Glukosamin) die gleiche Zusammensetzung wie das übrige Hefeeiweiß.

Die weitere Darstellung der Untersuchungsergebnisse erfolgt am besten an Hand eines vollständig durchgeführten Versuchs; die bei anderen Versuchen gemachten Erfahrungen sind an passender Stelle eingefügt.

3850 g Hefe (Versuch V der Zusammenstellung über den Autolysenverlauf S. 233) mit 87,7 g Stickstoff wurden unter den bereits angegebenen Bedingungen der Autolyse überlassen. Beim Abbrechen des Versuchs hatte sich das

Tyrosin

in dichten kugeligen Anhäufungen am Boden des Gefäßes abgeschieden, während die leichteren Zellrückstände in der dunkelgefärbten Flüssigkeit suspendiert waren. Ohne mit Wasser zu verdünnen, wurde die dickflüssige Masse zentrifugiert; auf diese Weise ließ sich das Tyrosin von den Zellrückständen gut trennen, da sich das Tyrosin am Boden der Zentrifugiergefäße, die Zellrückstände dagegen an der Oberfläche der Flüssigkeit absetzten. Nach nochmaligem Waschen mit Wasser und Trocknen hinterblieben 15 g (enthaltend 1,16 g Stickstoff) fast farbloser Kristalle von Tyrosin. Sie schmolzen roh bei 303° C. (Zersetzung), nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser bei 311—312° C. und waren frei von Asche und Schwefel. Beim Auskochen der feingepulverten Substanz mit einem Gemisch von Eisessig und Alkohol (1 : 1)¹⁾ gingen nur Spuren in Lösung; also war auch kein Leucin beigemischt. Es lag vielmehr fast reines Tyrosin vor. Die hier gefundene Menge Tyrosin ist zweifellos zu niedrig, da in der abzentrifugierten Mutterlauge und in den Waschwässern eine nicht unerhebliche Menge gelöst blieb. Wir haben bei der Unterhefe diese Menge bestimmt (siehe dort); danach kann man schätzen, daß hier die gesamte Tyrosinmenge etwa 20—25 g betragen hat.

¹⁾ J. Habermann und R. Ehrenfeld, Diese Zeitschrift Bd. 37 S. 18 (1902/03).

Verarbeitung der Zellrückstände.

Die von dem Tyrosin abgetrennte Autolysenflüssigkeit (nebst Waschwässern), in der noch die Zellrückstände suspendiert waren, wurde mit Wasser auf das Doppelte des ursprünglichen Volumens gebracht, aufgeköcht und nach dem Erkalten die nunmehr untersinkenden Zellrückstände abzentrifugiert. Nachdem diese noch dreimal in je ca. 8 l Wasser und dann zweimal in je 4 l Alkohol aufgeschlemmt und wieder abzentrifugiert bzw. zuletzt abgesaugt und mit Äther gewaschen waren, stellten sie ein graues trockenes Pulver (95 g) dar, das noch 6,8 % Wasser und 1,32 g (= 1,4 %) Stickstoff enthielt. Über die Natur der in diesen Rückständen vorhandenen stickstoffhaltigen Substanz ist oben ausführlich berichtet. Der Alkohol, mit dem die Zellrückstände behandelt worden waren, hinterließ beim Eindampfen ein in Wasser nicht klar lösliches rotbraunes Öl. Es wurde mit Äther behandelt, wobei es teilweise in Lösung ging. Diese ätherische Lösung, vereinigt mit dem Waschäther der Zellrückstände, erwies sich jedoch als fast stickstofffrei; sie enthielt nur 0,03 g Stickstoff und wurde nicht weiter untersucht. Der in Äther unlösliche Teil des aus dem alkoholischen Extrakt erhaltenen Rückstandes wurde wieder in Alkohol gelöst und auf seinen Stickstoffgehalt analysiert. Er enthielt 0,51 g Stickstoff. In dem gesamten alkoholischen Extrakt waren also 0,54 g Stickstoff vorhanden, die, soweit sie nicht für die Analysen verbraucht waren, mit der Autolysenflüssigkeit vereinigt weiter verarbeitet wurden (0,3 g Stickstoff).

Veresterung nach Emil Fischer.

Die vom Tyrosin und den Zellrückständen befreite wässrige Autolysenflüssigkeit wurde mit allen Waschwässern der Zellrückstände und des Tyrosins vereinigt im Vakuum eingedampft, nachdem vorher eine Probe zur Stickstoffanalyse abgenommen worden war. Die wässrige Lösung enthielt 83,6 g Stickstoff. Da ursprünglich 87,7 g Stickstoff in Arbeit genommen waren und bisher 1,16 g mit dem Tyrosin, 1,32 g

mit den Zellrückständen abgetrennt und ferner 0,24 g zu Analysen verbraucht sind, so sollten eigentlich noch 85,0 g Stickstoff vorhanden sein; es sind mithin bei den zahlreichen Operationen 1,4 g Stickstoff verloren gegangen. Der beim Eindampfen hinterbleibende braune Sirup wurde mit 2 l absolutem Alkohol übergossen und nach der Methode von E. Fischer, durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure, verestert, der Alkohol abgedampft, in 3 l frischem Alkohol aufgenommen und von neuem mit Chlorwasserstoff gesättigt. Es hinterblieb ein beträchtlicher unlöslicher Rückstand, der nach längerem Stehen im Eisschrank abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und bei 40° C. getrocknet wurde (95 g). Die alkoholische Waschflüssigkeit wurde mit der alkoholisch-salzsäuren Esterlösung vereinigt, im Vakuum eingedampft und die Veresterung nach dem Aufnehmen in 3 l absolutem Alkohol nochmals in derselben Weise durchgeführt. Wieder blieb ein Teil, wenn auch nur noch wenig, ungelöst und wurde in derselben Weise wie bei der ersten Veresterung behandelt. Im ganzen betrug der unlösliche Veresterungsrückstand 99 g und enthielt 9,8 g Stickstoff, wovon 2,5 g als Ammoniakstickstoff vorhanden waren¹⁾. Soweit der Stickstoff nicht als Ammoniak vorlag, konnte er als Alloxurbasenstickstoff vollständig aufgeklärt werden.

Die alkoholisch-salzsäure Esterlösung wurde auf 4000 ccm gebracht und analysiert. Sie enthielt 71,0 g Gesamtstickstoff, während 73,8 g (83,6 g—9,8 g im Veresterungsrückstand) zu erwarten gewesen wären, also auch hier wieder ein Arbeitsverlust von 2,8 g Stickstoff. Verschiedene Proben wurden ferner nach Abstumpfung der Salzsäure mit Natronlauge zur Bestimmung des Ammoniaks mit Magnesia, Natriumkarbonat und Bariumkarbonat destilliert. Mit Soda und Magnesia wurden (auf die 4000 ccm berechnet) übereinstimmend 6,8 g Stickstoff als Ammoniak übergetrieben, mit Bariumkarbonat etwas weniger. Addiert man dazu den Ammoniakstickstoff des Ver-

¹⁾ Von diesem Veresterungsrückstand wird in einer späteren Mitteilung ausführlich die Rede sein.

esterungsrückstandes und berücksichtigt auch die Arbeitsverluste, so ergibt sich, daß im ganzen nach der Veresterung 9,8 g des Hefestickstoffs (11 %) in Form von Ammoniak vorhanden sind. Es besteht kein Zweifel, daß die Bildung des Ammoniaks zum weitaus größten Teil erst bei der Veresterung und nicht bei der Autolyse vor sich geht. Denn in einem analogen Versuch (IV) wurde bei Verwendung von 3960 g Hefe mit 87,5 g Stickstoff direkt nach beendeter Autolyse der Ammoniakstickstoffgehalt ermittelt und selbst beim Destillieren mit Bariumhydroxyd nur 4,1 g Ammoniakstickstoff gefunden, wobei sicherlich bereits Zersetzung komplizierter stickstoffhaltiger Substanzen eingetreten war. Mit Magnesiumhydroxyd wurden nämlich nur 2,8 g, mit Bariumkarbonat gar nur 0,6 g Stickstoff übergetrieben. Indessen ist Bariumkarbonat zur Bestimmung von Ammoniak in Autolysesäften, wie wir uns überzeugten, ungeeignet, denn auch der Ammoniakgehalt im Phosphorsalz oder im Zinkammoniumsulfat wird, wenn man diese Substanzen dem Autolysensaft zusetzt, nur sehr langsam und unvollständig übergetrieben, während dieselben Salze beim Kochen mit Bariumkarbonat für sich ohne Schwierigkeit richtige Ammoniakzahlen lieferten. — Merkwürdigerweise ergab indessen auch die nachträgliche Hydrolyse des Hefeautolysensaftes nach 7stündigem Kochen mit 25%iger wässriger Schwefelsäure nicht soviel Ammoniak, als die ja allerdings sehr viel längere Behandlung mit alkoholischer Salzsäure bei der Veresterung. Unter diesen Bedingungen gingen nur 7,5% vom Stickstoff des Autolysensaftes derselben Hefe in Ammoniak über.

Von den 4000 ccm der alkoholischen Esterlösung wurden 150 ccm mit 2,7 g Stickstoff für Analysen verbraucht, so daß 3850 ccm mit 68,3 g Stickstoff für die weitere Verarbeitung zur Verfügung standen. Diese hinterließen beim Eindampfen im Vakuum einen braunen Sirup, aus dem die Ester nach bekanntem Verfahren mit Kalilauge und Kaliumkarbonat in Freiheit gesetzt und mit Äther aufgenommen wurden. Nach dem Trocknen und Abdestillieren eines großen Teils des Äthers betrug der Stickstoffgehalt der auf 1 l konzentrierten Ester-

lösung 20,0 g, wovon nach Abzug von Analysensubstanz für die Esterdestillation selbst noch 19,7 g übrig blieben.

Der Äther wurde nunmehr anfangs bei gewöhnlichem Druck, schließlich im Vakuum (60 mm, bis 30° Badtemperatur) weiter abdestilliert; dabei gingen geringe Mengen von Estern in das Destillat mit über (siehe später). Die Esterdestillation erfolgte dann in üblicher Weise, für die ersten drei Fraktionen bei 12—14 mm Druck, für die übrigen im hohen Vakuum. Die einzelnen Fraktionen wurden dann getrennt nochmals destilliert; das endgültige Ergebnis ist aus folgender Tabelle ersichtlich:

Fraktion	Siedetemperatur	Druck	Ausbeute
I	bis 55° C.	14 mm	36 g (mit viel Alkohol und Äther)
II	55 „ 85° C.	14 „	39 g
III	85 „ 95° C.	14 „	51 „
IV	90 „ 135° C. (Hauptmenge 100 bis 101° C.)	0 „	56 „

Die höher siedenden Anteile und der Destillationsrückstand (etwa 100 g) gingen infolge Zerspringens des Kolbens verloren.

Die Verseifung der Ester und die Aufarbeitung der Aminosäurefraktionen soll später besprochen werden.

Die beim Infreisetzen der Ester erhaltene breiige Masse wurde zwecks vollständiger Gewinnung der Ester noch ein zweites Mal der Veresterung unterworfen. Sie wurde deshalb mit einem Überschuß von konzentrierter Salzsäure versetzt; wegen des sehr starken Schäumens muß der Salzsäurezusatz sehr langsam in kleinen Portionen¹⁾ erfolgen. Durch mehr-

¹⁾ Leider ging an dieser Stelle knapp ein Viertel der Flüssigkeit durch Zerschlagen eines Kolbens verloren; da der Stickstoffgehalt vor dem Verlust genau bekannt war und sofort nachher von neuem bestimmt wurde, ließ sich die Größe dieses Verlustes mit Genauigkeit bestimmen. Im folgenden sind der Einfachheit und Übersichtlichkeit halber die gefundenen Mengen so umgerechnet, als ob ein Verlust nicht eingetreten wäre.

fachen Alkoholzusatz und Einengen im Vakuum wurde die Hauptmenge des Kaliumchlorids entfernt, bis schließlich beim Eindampfen ein brauner Sirup übrig blieb. Dieser braune Sirup wurde mit Alkohol übergossen und durch gasförmige Salzsäure zweimal verestert. Hierbei schied sich nochmals eine geringe Menge Kaliumchlorid ab, welche durch beige-mischte Huminsubstanzen braun gefärbt war. Die ganze Menge des ausgeschiedenen, mit Alkohol sorgfältig ausgewaschenen Kaliumchlorids, ca. 2450 g, enthielt 3,2 g wohl größtenteils als Huminsubstanzen vorhandenen Stickstoff; nähere Untersuchung erschien aussichtslos. Die Analyse der veresterten alkoholischen Lösung — sie war auf 2000 ccm gebracht worden, wovon 30 ccm zu Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl und Prüfung auf Ammoniak verbraucht wurden — ergab einen Gesamtstickstoffgehalt von 38,5 g Stickstoff, wovon nur noch wenig (0,7 g) in Form von Ammoniak vorlag. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie oben nach der Methode von E. Fischer. Die ätherische Lösung der freien Ester engten wir auf 400 ccm ein und entnahmen davon zweimal 5 ccm für Stickstoffbestimmungen; sie enthielt noch 8,4 g Stickstoff¹⁾. Dann erfolgte wie früher die Destillation. Die Verteilung der Fraktionen nach zweimaliger Destillation der ersten drei war folgende:

Fraktion	Siedepunkt	Druck	Ausbeute
I	bis 55° C.	12 mm	21 g
II	55 „ 80° C.	12 „	11 „
III	80 „ 105° C.	14 „	13 „
IV	100 „ 145° C.	0 „	28 „
	(Hauptmenge 103 bis 105° C.)		
V	145 bis 165° C.	0 „	10 „

Der Destillationsrückstand betrug 27 g und enthielt 1,76 g Stickstoff; er wurde nicht untersucht. Die weitere Verarbeitung des ätherunlöslichen wässerig-alkalischen Veresterungsrückstandes ist unten (S. 256) ausführlich beschrieben.

¹⁾ Beim Abdestillieren des Äthers gingen auch hier geringe Mengen von Estern mit über. Näheres hierüber siehe später unter Fraktion I.

Nach beendeter Destillation wurden die einzelnen Fraktionen der ersten wie der zweiten Veresterung sofort weiterverarbeitet. Die Fraktionen I—III beider Veresterungen waren im Wasser klar löslich und wurden durch 6—8stündiges Kochen mit etwa der 5—10fachen Menge Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion verseift. Die Ester der höher siedenden Fraktionen wurden dagegen, nachdem vorher die in Wasser unlösliche Phenylalanin-Fraktion in später genauer beschriebener Weise abgetrennt war, durch etwa 2stündiges Kochen mit ungefähr der doppelten Gewichtsmenge Baryt verseift. Die Aufarbeitung der einander entsprechenden Fraktionen aus beiden Veresterungen erfolgte dann gemeinsam, wie es im folgenden beschrieben wird.

Verarbeitung der einzelnen Fraktionen.

Wie schon erwähnt, gingen beim Eindampfen der ätherischen Esterlösungen geringe Mengen von Estern in das Destillat über. Durch Ausschütteln des Äthers beider Esterdestillationen mit verdünnter Salzsäure und Eindampfen der salzsauren Lösung wurden im ganzen 3,1 g Chlorhydrate erhalten. Beim Aufnehmen mit absolutem Alkohol blieben 0,3 g Ammoniumchlorid unlöslich zurück. Die alkoholische Lösung wurde nun durch Einleiten gasförmiger Salzsäure von neuem verestert und gab eine Kristallisation von 0,1 g Glykokollesterchlorhydrat (F. 139—140° C.). Die Mutterlauge von Glykokollesterchlorhydrat hinterließ nach dem Verseifen und nach Entfernung der Salzsäure mit Bleioxyd noch 1,1 g Aminosäure, welche im wesentlichen als Alanin angesprochen werden muß.

Fraktion I. Siedepunkt 25—55° C. bei 14 mm Druck; 57 g. Nach dem Verseifen und Eindampfen im Vakuum hinterblieb ein farbloser Rückstand, von dem beim Auskochen mit Alkohol fast nichts in Lösung ging; Prolin war in dieser Fraktion also so gut wie nicht enthalten. Der Auszug wurde mit dem der Fraktion II vereinigt. Es hinterblieben nicht mehr als 11,6 g Substanz, woraus zu schließen ist, daß die ursprüngliche Fraktion noch sehr erhebliche Mengen Alkohol

enthielt. Die farblose pulvrige Masse hatte einen Stickstoffgehalt von 15,23% (also 1,77 g Gesamtstickstoff), bestand mithin aus fast reinem Alanin (mit 15,7% Stickstoff), doch war auch etwas Glykokoll beigemischt, wie der folgende Versuch zeigt: 4 g obiger Substanz wurden in 20 ccm absolutem Alkohol suspendiert und durch trockenes Salzsäuregas verestert. Nachdem ein Impfkristall von Glykokollesterchlorhydrat hinzugefügt worden war, blieb die Lösung über Nacht in Eis stehen. Es wurden so 0,6 g Glykokollesterchlorhydrat in fast farblosen Kristallen erhalten, die bei 137—139° C. schmolzen und nach einmaligem Umkristallisieren aus Alkohol (0,45 g) den richtigen Schmelzpunkt 144° C. zeigten. Aus der Mutterlauge vom Glykokollesterchlorhydrat wurden nach dem Verseifen, Entfernen der Salzsäure mit Bleioxyd und Ausfällen des Bleis mit Schwefelwasserstoff 3,3 g Alanin zurück-erhalten.

Fraktion II. Siedepunkt 55—80° C. bei 14 mm Druck; 50 g. Von dem nach dem Verseifen und Eindampfen verbleibenden Aminosäuregemisch gingen beim Auskochen mit Alkohol nicht eben beträchtliche Mengen in Lösung. Es hinterblieben schließlich 34,1 g farbloser Substanz. Ein Versuch, in einem Teil dieser Fraktion durch fraktionierte Kristallisation eine Trennung der Aminosäuren zu erreichen, brachte keinen wesentlichen Erfolg; wenigstens wichen die Schmelzpunkte der einzelnen Fraktionen von dem der ursprünglichen Substanz (272° C.) nicht bedeutend ab. Daher wurde alles wieder mit dieser vereinigt in der Absicht, durch nochmalige Veresterung und fraktionierte Destillation eine Trennung der Aminosäuren dieser Fraktion zu versuchen. Diese Versuche sind indessen noch nicht zum Abschluß gekommen; es soll später darüber berichtet werden.

Die 34,1 g enthielten 13,06%, also 4,45 g Stickstoff. Die Stickstoffanalyse entspricht etwa der Zusammensetzung der Aminobuttersäure, die 13,6% Stickstoff enthält. Wie unten beschriebene Versuche mit Unterhefe zeigen, ist Aminobuttersäure, die bisher in Eiweißstoffen nicht mit Sicherheit gefunden ist, auch in der Hefe höchstens in geringer Menge

enthalten. Die hier erhaltene Fraktion Aminosäure dürfte demnach der Hauptsache nach (zu etwa 60%) aus Alanin bestehen, dem wenig Aminobuttersäure und viel (rund 40%) Valin beigemischt ist. Die einzelnen Bestandteile dieser Fraktion sind genauer in Versuch III (siehe S. 260) untersucht.

Fraktion III. Siedepunkt 80—100° C. bei 14 mm Druck; 64 g. Hier schieden sich nach beendeter Verseifung bereits beim Erkalten reichliche Kristallmassen aus, die abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen wurden (IIIa). Mutterlaugen und Waschwässer wurden vereinigt zur Trockne verdampft (IIIb). Die Ausbeute betrug nach dem Auskochen mit Alkohol für

IIIa: 11,9 g mit 10,70%, also 1,3 g Stickstoff,

IIIb: 23,8 „ „ 11,32% „ 2,7 „ „

während einschließlich der geringen Mengen aus Fraktion I und II 12,5 g Aminosäuren sich in dem Alkohol auflösten (siehe unter Prolin).

Die Aufarbeitung der beiden alkoholunlöslichen Fraktionen erfolgte getrennt nach dem von P. A. Levene und D. D. van Slyke¹⁾ angegebenen Verfahren über die Bleisalze.

IIIa.

Die Elementaranalyse dieser bei 285° C. noch nicht schmelzenden Fraktion ergab folgende Werte:

	C	H
Gefunden:	54,12	10,15
Berechnet für Leucin:	54,9	10,0
„ „ Valin:	51,3	9,5.

Unter der Annahme, daß die Substanz aus einem Gemisch von Leucin und Valin bestand, ließ sich aus dem gefundenen Werte für Kohlenstoff auf einen Gehalt von 78% Leucin schließen. Aus dieser Überlegung heraus ergab sich folgende Arbeitsweise:

10 g gut gepulverter Substanz wurden mit 70 ccm Wasser angerührt und auf dem Wasserbade erwärmt; nach Zugabe

¹⁾ Journ. of Biolog. Chem. 6, 391 (1909).

von 15 ccm 25%igem Ammoniak trat nach kurzer Zeit vollständige Lösung ein. Nun wurden 27 ccm Bleiacetatlösung vom spez. Gewicht 1,255 unter Umschütteln tropfenweise hinzugefügt; sie erzeugten eine feinpulverige Fällung, die nach 1stündigem Stehen in Eiswasser abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und dann getrocknet wurde. Fällung I: Ausbeute 13,5 g Bleisalz. (Unter der Voraussetzung, daß das angewandte Gemisch 78% Leucin enthielt, berechnen sich 13,9 g Leucinblei.) Die Mutterlauge ergab bei Zugabe von weiteren 9 ccm derselben Bleiacetatlösung abermals eine, wenn auch bedeutend schwächere Fällung, die ebenso wie die Fällung I behandelt wurde. Ein weiterer Zusatz von Bleiacetatlösung erzeugte keine Fällung mehr. Fällung II: Ausbeute 1,0 g. Die Analyse beider Fällungen ergab folgende Werte:

Fällung I: Gef.:	44,21%	Pb;	für Leucinblei berechnet	44,32%	Pb.
„ II: „	46,76%	„ „	Valinblei	47,12%	„

Fällung I war also reines Leucinblei, Fällung II fast reines Valinblei.

Zur weiteren Bekräftigung des oben gewonnenen Resultates wurden 13 g Bleisalz der Fällung I in viel Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt; das Filtrat vom Schwefelblei ergab dann beim Einengen 6,5 g einer schön kristallisierten farblosen Substanz, die alle Eigenschaften des Leucins zeigte. Auch die Stickstoffbestimmung gab auf Leucin gutstimmende Werte:

Gesamtstickstoff nach Kjeldahl	10,63%
Aminostickstoff nach van Slyke ¹⁾	10,98%
für Leucin berechneter Stickstoff	10,68%

Die Fällung I bestand also nach dieser Analyse aus reinem Leucin-Isoleucinblei. Die aus 10 g der Fraktion IIIa erhaltenen 13,5 g Bleisalz entsprachen mithin 7,5 g Leucin. Auf Isoleucin wurde nicht geprüft, da dieses schon von F. Ehrlich und A. Wendel²⁾ in der Hefe nachgewiesen ist. Das

¹⁾ D. D. van Slyke, Ber. d. d. chem. Ges. 43, 3170 (1910): 44. 1684 (1911).

²⁾ Bioch. Zeitschr. 8, 431 (1908).

Drehungsvermögen einer Lösung von 1,5858 g Substanz in 100 ccm Wasser betrug im 2 dm-Rohr — 0,14° C. Man kann daraus mit Vorbehalt schließen, daß das Präparat etwa zu $\frac{3}{4}$ aus l-Leucin, zu $\frac{1}{4}$ aus d-Isoleucin bestand.

Die Bleisalz-fällung II wurde (von der bereits angegebenen Analyse abgesehen) nicht weiter untersucht, sondern, soweit sie nicht für analytische Zwecke verbraucht war, wieder mit der Mutterlauge vereinigt und mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit. Das Filtrat vom Schwefelblei ergab dann beim Einengen 1,85 g Aminosäure, also (bei Hinzurechnung der als Analysensubstanz verbrauchten 0,5 g Bleisalz) nahezu die sich berechnende Menge, welche wohl ganz als Valin¹⁾ zu betrachten ist. Die Fraktion IIIa bestand demnach zu 75% aus Leucin, der Rest aus Valin. Daraus ergibt sich, daß in diesen 11,9 g 8,9 g Leucin und 3 g Valin enthalten waren.

IIIb.

Die Trennung von Leucin und Valin erfolgte in dieser Fraktion, welche 23,8 g vom Schmelzpunkt 275° C. betrug und 11,3% Stickstoff enthielt, ganz analog wie bei Fraktion IIIa. Eine Elementaranalyse ergab:

	C	H
Gefunden:	52,06	9,60
Berechnet für Leucin:	54,9	10,0
" " Valin:	51,3	9,5.

Aus dem gefundenen Werte für Kohlenstoff war auf einen Gehalt von etwa 22% Leucin in dem Gemisch zu schließen. Dementsprechend wurde wie folgt verfahren:

10 g der Fraktion wurden, wie oben beschrieben, mit Ammoniak in Lösung gebracht und tropfenweise 10 ccm Bleiacetatlösung (spezifisches Gewicht 1,255) zugegeben. Nachdem der Niederschlag (I) entfernt war, wurden durch Zusatz von noch zweimal je 4 ccm derselben Bleiacetatlösung zwei weitere Fällungen (II und III) erhalten, welche sämtlich auf ihren

¹⁾ Valinblei ist in Wasser ziemlich löslich und die Mutterlauge der Fällung II enthielt mit größter Wahrscheinlichkeit im wesentlichen auch nur Valinblei.

Bleigehalt geprüft wurden. Die Analysen lassen erkennen, daß die erste Fällung aus Leucinblei, die beiden folgenden aus Valinblei bestanden.

I.	4,5 g	Bleisalz	mit	44,45%	Blei,
II.	1,65	"	"	46,70%	"
III.	1,7	"	"	46,60%	"

Berechnet für Leucinblei 44,32%, für Valinblei 47,12%.

Bei weiterem Zusatz von Bleiacetat entstanden immer geringere Fällungen. Die drei Fällungen, soweit sie nicht für analytische Zwecke verbraucht waren, und auch die Mutterlauge wurden getrennt mittels Schwefelwasserstoff vom Blei befreit und weiter untersucht: Fällung I ergab 2 g schönkristallisierender Substanz mit allen Eigenschaften des Leucins. Auch die Stickstoffbestimmung gab einen auf Leucin stimmenden Wert: Gefunden 10,84% Stickstoff, berechnet für Leucin 10,68%.

Die Fällungen II und III wurden vereinigt und ergaben nach Entfernung des Bleies beim Einengen eine gut kristallisierte Substanz vom Schmelzpunkt 287° C. Eine Stickstoffbestimmung gab einen auf Valin stimmenden Wert: Gefunden 11,77%, berechnet für Valin 11,96% Stickstoff.

Aus der Mutterlauge der Bleifällungen, welche mit Bleiacetat keine weitere Fällung mehr ergeben hatte, wurden in der üblichen Weise 3,8 g Aminosäure zurückerhalten.

Aus 10 g des Gemisches wurden also 4,5 g Leucinblei, entsprechend 2,5 g Leucin, gewonnen. Das übrige, 7,5 g, ist nach der Elementaranalyse des ursprünglichen Gemisches und nach Blei- und Stickstoffbestimmung der Fraktionen als allerdings wohl nicht ganz reines, nämlich durch Alanin (und Aminobuttersäure?) verunreinigtes Valin in Rechnung zu setzen.

Daraus ergibt sich für die ursprünglich vorhandenen 23,8 g der Fraktion IIIb ein Gehalt von 6,0 g Leucin und 17,8 g Valin.

Prolinfraktion.

Wie schon erwähnt, waren die drei ersten Esterfraktionen nach dem Verseifen sämtlich mit Alkohol ausgekocht

worden. Die vereinigten alkoholischen Ertrakte wurden in bekannter Weise durch mehrmaliges Eindampfen und Aufnehmen des Rückstandes mit Alkohol von Spuren anderer alkoholunlöslicher Aminosäuren befreit. Es hinterblieben schließlich 12,5 g eines gelben Sirups. Er enthielt 1,15 g Gesamtstickstoff, davon nach van Slyke 0,42 g als Aminostickstoff; für Prolinstickstoff bleibt also 0,73 g, woraus sich ein Gehalt von 6,0 g Prolin ergibt.

Der Sirup, welcher nach Abzug von Analysensubstanz noch 0,89 g Stickstoff enthielt, wurde mit Wasser aufgenommen und durch Kochen mit frischgefälltem Kupferoxyd in das Kupfersalz verwandelt. Der aus der tiefblau gefärbten wässrigen Lösung erhaltene Eindampfrückstand hinterließ beim Auskochen mit Alkohol 3,5 g unlösliches Kupfersalz. Diese 3,5 g enthielten außer racemischem Prolin auch noch andere Aminosäuren, denn nach dem Zerlegen von 3,2 g hiervon und Eindampfen zur Trockne ging mit Alkohol nur ein Teil in Lösung. 0,8 g blieben unlöslich; sie wurden nicht näher untersucht. In der alkoholischen Lösung entstand auf Zusatz von Äther eine Fällung, zunächst ziemlich schmierig (0,35 g); nachdem diese abgetrennt war, fiel mit mehr Äther ein kristallisierter Niederschlag (0,8 g) vom Zersetzungspunkt 170° C. (von 150° C. ab Sintern¹⁾). Beim Erhitzen trat der charakteristische Pyrrolidingeruch auf; dies war wohl ziemlich reines racemisches Prolin (nähere Charakterisierung siehe unten). Die Mutterlauge davon lieferte wieder ein unreines Produkt.

Das Kupfersalz des l-Prolins war in dem oben erwähnten alkoholischen Extrakt enthalten und blieb beim Eindampfen desselben als tiefblaue amorphe Masse zurück. Es wurde mit Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit und das Filtrat vom Kupfersulfid in Vakuum eingedampft; es hinterblieben 5,7 g fester Substanz, die in Alkohol so gut wie völlig löslich war, aber nur zum geringen Teil Neigung zum Kristallisieren zeigte.

¹⁾ Wasserfreies rac.-Prolin schmilzt wesentlich höher, zwischen 205 und 210° C. (vgl. darüber bei C. Neuberg, *Der Harn*, Berlin 1911, 729); zu den Schmelzpunktbestimmungen wurden hier lufttrockene, also kristallwasserhaltige Präparate verwendet.

Daher wurde die Gesamtmenge zwecks Identifizierung nach E. Fischer¹⁾ durch 16stündiges Erhitzen mit 12 g Barythydrat und 120 ccm Wasser auf 160° C. in die inaktive Form übergeführt. Nachdem das Barium mit Schwefelsäure quantitativ entfernt und die Substanz wieder in das Kupfersalz verwandelt worden war, ging beim Extrahieren mit Alkohol zwar noch ein Teil in Lösung, aber dieser lösliche Teil hinterließ nach Entfernung des Kupfers nur Schmierer, die nicht weiter untersucht wurden.

In Alkohol unlöslich waren 2,9 g Kupfersalz, aus dem nach Entfernung des Kupfers, Eindampfen und erneutem Aufnehmen mit Alkohol neben 0,6 g in Alkohol unlöslicher Produkte 1,1 g Prolin vom Schmelzpunkt 173° C.²⁾ erhalten wurden. Die Mutterlauge davon enthielt geringe Mengen weniger reinen Materials.

Die 1,1 g wurden, mit den früher erhaltenen 0,8 g Prolin vereinigt, dazu benutzt, um den Nachweis des Prolins einwandfrei zu führen, indem daraus noch das Phenylisocyanat bzw. dessen Anhydrid nach der Vorschrift von E. Fischer³⁾ hergestellt wurde: Aus 0,5 g Substanz erhielten wir 0,8 g Isocyanat vom Schmelzpunkt 166° C. (Zersetzung; rac. Prolinphenylisocyanat soll sich nicht ganz konstant gegen 170° C. zersetzen). Zur Verwandlung in das Hydantoin wurden nun die Kristalle sofort mit 25 ccm 25%iger Salzsäure auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und der Trockenrückstand aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute 0,55 g. Die Substanz schmolz bei 115–116° C. (unkorrigiert), nachdem sie bei 113° C. zusammengesintert war. E. Fischer gibt als Schmelzpunkt 118° C. (korrigiert) an.

Da die Reindarstellung des Prolins stets mit sehr großen Verlusten verbunden ist, wird man zweckmäßig das Resultat der van Slykeschen Methode als für die Ausbeutebestimmung maßgebend betrachten. Demnach sind im ganzen 6 g Prolin gefunden mit 0,73 g Stickstoff. Der Rest der Prolinfraktion

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 33 S. 167 (1901).

²⁾ Vgl. die Anmerkung oben.

³⁾ Ber. d. d. chem. Ges. 34, 460 (1901).

wird neben stickstofffreien Substanzen hauptsächlich aus Valin und Leucin gebildet sein, da bei weitem die Hauptmasse der Prolinfraktion der dritten Esterfraktion entstammte.

Fraktion IV und V: Siedepunkt 95—165° C. bei 0 mm. Die Ester der Fraktionen IV und V waren in Wasser nicht klar löslich, sondern hinterließen beim Schütteln mit Wasser beträchtliche Mengen von unlöslichem Öl (wesentlich Phenylalaninester). Diese in Wasser unlöslichen Anteile wurden nach E. Fischer und E. Abderhalden¹⁾ im Scheidetrichter mit Äther aufgenommen, die ätherischen Lösungen noch dreimal mit Wasser durchgeschüttelt und der Äther abdestilliert.

Von der ersten Veresterung gingen von der Fraktion IV 26 g (also fast die Hälfte), von der zweiten nur 8,7 g (weniger als ein Drittel) mit Äther in Lösung. Aus der Esterfraktion V der zweiten Veresterung wurden 1,7 g (noch nicht ein Viertel der Gesamtfraktion) in Äther lösliche Ester erhalten, im ganzen also 36,4 g. Die entsprechende hochsiedende Esterfraktion der ersten Veresterung ging, wie schon erwähnt, verloren; daher sind die im folgenden als Ausbeute angegebenen Zahlen sowohl für Phenylalanin als auch für Asparaginsäure und Glutaminsäure als zu niedrig anzusehen. Für Phenylalanin ist dieser Verlust allerdings wohl zu vernachlässigen, da anzunehmen ist, daß fast alles in der bei 100—105° C. siedenden Hauptmenge enthalten ist. Die erhaltenen 36,4 g rohen Phenylalaninesters entsprechen einer Ausbeute von 31,1 g Phenylalanin mit 2,65 g Stickstoff.

Identifizierung des Phenylalanins.

Aus dem Phenylalaninesteranteil der ersten Veresterung — er betrug 26 g Ester — wurden nach dem Verseifen mit Salzsäure (ein nicht sehr beträchtlicher Teil war auch in Salzsäure unlöslich und wurde durch Ausäthern entfernt) zuerst 8 g Phenylalaninchlorhydrat (entsprechend 6,6 g Phenylalanin) abgeschieden. Die Mutterlauge wurde eingedampft, kristallisierte aber auch nach wochenlangem Stehen im Exsikkator

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 36 S. 273 (1902).

nur zum Teil. Es hinterblieben 11 g, die vorsichtig mit Ammoniak versetzt wurden. Dabei schieden sich noch 2,2 g freies Phenylalanin (zusammen also 8,8 g) ab. Die entsprechenden Anteile der zweiten Veresterung (10,4 g) lieferten im ganzen nur 1,6 g freies Phenylalanin, wovon fast alles (1,3 g) der niedriger siedenden Fraktion entstammt. Die Gesamtausbeute an ziemlich reinem Phenylalanin betrug demnach 10,4 g. Nach dem Umkristallisieren aus Wasser mit Tierkohle schmolz die Substanz, welche in schönen, farblosen perlmutterglänzenden Blättchen kristallisierte, bei 270° C. Dieser Schmelzpunkt stimmt auf d, l-Phenylalanin¹⁾ und eine Bestimmung des Drehungsvermögens zeigte, daß in der Tat so gut wie reine Racemform vorlag. Beim Erhitzen der Substanz mit Chromsäure²⁾ trat starker Geruch nach Phenylacetaldehyd auf.

Die Mutterlauge obiger 10,4 g enthielt viel in Wasser äußerst lösliche Produkte, die nicht zum Kristallisieren zu bringen waren; der Hauptsache nach dürften sie aus dem, wie auch sonst beobachtet, nur schwierig kristallisierenden unreinen aktiven Phenylalanin bestanden haben.

Asparaginsäurefraktion.

Der Teil der Ester, welche sich im Wasser klar gelöst hatte, wurde mit Baryt auf dem Wasserbade verseift. Nach kurzer Zeit begann die Abscheidung eines kristallinen Barytsalzes, dessen Menge sich bei mehrtägigem Stehen bedeutend vermehrte. Es bestand, außer geringen Mengen Bariumkarbonat, aus dem Bariumsalz der racemischen Asparaginsäure. Nach der quantitativen Entfernung des Bariums mit Schwefelsäure etc. wurden daraus 7,7 g Asparaginsäure erhalten. Die Mutterlauge hinterließ beim völligen Eindampfen noch etwas mehr als 2 g nur sehr langsam kristallisierender, also ziemlich unreiner Substanz. Die Ausbeute an racemischer Asparaginsäure kann also zu 10 g angenommen werden.

¹⁾ S. P. L. Sörensen, C. 1903, II, 33 gibt für d, l-Phenylalanin 271—273° C. (korr.) an.

²⁾ E. Fischer, diese Zeitschrift Bd. 33 S. 174 (1901).

Glutaminsäure.

Aus dem Filtrat vom asparaginsäuren Baryt wurden nach Entfernung des Bariums mit Schwefelsäure durch langsames Eindampfen und schließlich Zusatz von Alkohol beträchtliche Mengen von Glutaminsäure erhalten (15,5 g). Eine Stickstoffbestimmung gab einen auf Glutaminsäure gut stimmenden Wert:

Gefunden: 9,37%, berechnet: 9,52% Stickstoff.

Eine Probe wurde durch Erwärmen in konzentrierter Salzsäure gelöst und darauf in den charakteristischen schönen Kristallen des Glutaminsäurechlorhydrats erhalten. Schmelzpunkt 190° C. (statt 193° C.).

Die Mutterlauge der Glutaminsäure, welche keine Kristallabscheidung mehr gab, enthielt noch 1,35 g Stickstoff; durch Sättigung mit gasförmiger Salzsäure konnte daraus noch eine nicht unbedeutende Kristallisation von Glutaminsäure-Chlorhydrat erhalten werden, nämlich 3,1 g, entsprechend 2,5 g freier Aminosäure.

Die Gesamtausbeute an Glutaminsäure betrug demnach 18 g. Es muß hervorgehoben werden, daß die Fraktion V der zweiten Veresterung so gut wie vollständig aus Glutaminsäure bestand (es wurden fast 5 g Kristalle daraus isoliert, die oben mitgerechnet sind). Da diese Fraktion bei der ersten Veresterung infolge Unfalls verloren ging, so ist die hier angegebene Zahl ohne Zweifel viel zu niedrig; der Verlust muß auf mindestens 10–15 g geschätzt werden.

Prüfung auf Serin.

Beim weiteren Einengen der Glutaminsäure-Mutterlauge und nochmaligem Sättigen mit Salzsäuregas erfolgte keine Kristallabscheidung mehr. Daher wurde nun mit Wasser verdünnt und die Lösung im Vakuum stark eingeeengt, um die Hauptmenge der Salzsäure zu entfernen; der Rest wurde durch Schütteln mit Bleioxyd gebunden. Vom Bleichlorid und überschüssigem Bleioxyd wurde abfiltriert und das Filtrat mittels Schwefelwasserstoff vom Blei befreit. Beim Eindampfen hinterblieben 5 g einer in Wasser leicht löslichen Substanz,

mit eigentümlich an Fleischextrakt erinnerndem Geruch. Ein Versuch, das Serin aus dieser Masse als β -Naphthalin-Sulfo-derivat nach Angaben von E. Fischer und P. Bergell¹⁾ abzuscheiden, ergab nur schmierige Produkte, die auch nach längerem Stehen nicht kristallisierten.

Der Rest der Substanz (3,3 g) wurde durch Kochen mit Kupferoxyd in das Kupfersalz verwandelt, und das sich beim Erkalten abscheidende schwer lösliche Kupfersalz der aktiven Asparaginsäure abfiltriert; daraus wurde etwa 0,5 g kristallisierte Asparaginsäure gewonnen. Die vom Kupfer mit Schwefelwasserstoff befreite Mutterlauge von asparaginsaurem Kupfer gab beim Eindampfen eine Kristallabscheidung von 1,4 g mit dem Schmelzpunkt 155° C. Nach mehrmaligem Umkristallisieren mit Tierkohle stieg der Schmelzpunkt auf 200 – 201° C. (Aufschäumen); es lag darum ohne Zweifel weiter nichts als bloß Glutaminsäure vor, die Mutterlauge davon gab mit Naphthalinsulfochlorid nur Schmierer. Bei einem anderen ähnlichen Versuch wurde zwar an dieser Stelle ein höher schmelzendes Produkt erhalten, dessen Schmelzpunkt (235° C.) sogar dem des Serins (245° C.) recht nahe lag, aber das daraus dargestellte Naphthalinsulfoderivat zeigte einen bedeutend niedrigeren Schmelzpunkt (175° C. statt 210° C.). Ebensowenig Erfolg hatte der Versuch, das Serin mit Hilfe der Unlöslichkeit seines Esters in Petroläther²⁾ abzutrennen. Es ist also nicht gelungen, Serin mit Sicherheit in der Hefe nachzuweisen.

Verarbeitung des ätherunlöslichen Rückstandes.

Der nach der zweiten Veresterung und Abtrennung des Äthers hinterbleibende, mit festem Kaliumkarbonat durchsetzte wässrige Brei sollte neben Hexonbasen, Resten von Tyrosin und vielem anderen auch das Oxyprolin enthalten. Der Nachweis ist uns allerdings nicht gelungen, was verständlich erscheint, wenn man bedenkt, daß sich in diesem Teil der Autolyseflüssigkeit die ganzen übrigen Zersetzungsprodukte der

¹⁾ Ber. d. d. chem. Ges. 35, 3784 (1902).

²⁾ E. Fischer, Ber. d. d. chem. Ges. 39 S. 586 (1906).

Hefezelle, also vor allem auch die Kohlenhydratspaltprodukte, ansammeln und naturgemäß jede Reindarstellung aufs äußerste erschweren müssen. Wenn wir trotzdem unsere Versuchsergebnisse beschreiben, so geschieht es deshalb, weil wir in anderer Hinsicht über die Bindung des in diesem Rest noch vorhandenen Stickstoffs einige positive Ergebnisse gewinnen konnten.

Nach dem bereits früher erwähnten, nach der ersten Veresterung eingetretenen Verlust verblieben zur zweiten Veresterung noch 29,7 g Stickstoff, wovon 6,5 g nachher als Aminosäureester in die ätherische Lösung gingen. Der Rückstand wurde genau wie früher (S. 243) angegeben verarbeitet. Es hinterblieben 2,4 kg Kaliumchlorid, welche 0,6 g Stickstoff einschlossen, wohl als Huminsubstanz. Der alkoholische Auszug vom Chlorkalium hinterließ beim Eindampfen einen braunen Rückstand, der sich im Wasser nicht völlig löste; der in Wasser unlösliche Teil (40 g) enthielt neben viel Calcium und Phosphorsäure auch 1,1 g Stickstoff (wohl Huminstickstoff) und wurde nicht weiter untersucht. Die wässrige Lösung wurde zum Liter aufgefüllt; in ihr waren noch 19,3 g Stickstoff vorhanden (mithin Arbeitsverlust 2,2 g)¹⁾, davon nur wenig mehr als 0,3 g als Ammoniak.

Von der wässrigen Lösung wurden 265 ccm (= 5,1 g Stickstoff) zur Prüfung auf Oxyprolin verwendet. Zunächst wurden in bekannter Weise mit Phosphorwolframsäure die Hexonbasen ausgefällt: Erhalten 220 g Niederschlag mit 2,75 g Stickstoff. Aus dem Filtrat wurde die Phosphorwolframsäure mit Baryt abgeschieden, der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure und eine geringe Menge Salzsäure mit Silbersulfat, überschüssiges Silber mit Schwefelwasserstoff entfernt, und schließlich auch die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt gefällt. Die sämtlichen dabei erhaltenen sehr gut ausgewaschenen Niederschläge schlossen noch nicht ganz 0,1 g Stickstoff mit ein, und das zum Liter aufgefüllte Filtrat enthielt daher, einer Kjeldahlbestimmung zufolge, noch 2,35 g Stickstoff (berechnet

¹⁾ Ein Teil davon dürfte indessen als Ammoniak entwichen sein.

2,25 g). Von diesem Gesamtstickstoff waren Aminstickstoff im Sinne von van Slyke 1,28 g (55% vom Gesamtstickstoff). Der nach der Methode von van Slyke gefundene Stickstoffwert war allerdings nicht ganz konstant, sondern stieg langsam an, binnen einer Stunde auf 1,33 g, nach weiteren zwei Stunden auf 1,37 g. Diese Lösung hinterließ beim Eindampfen einen bräunlichen Sirup, der nicht kristallisierte, sich beim Anreiben mit Alkohol aber in ein amorphes festes Pulver (18 g) mit 8,2% Stickstoff verwandelte. Es gelang auf keine Weise, weder durch Behandlung mit Naphthalinsulfochlorid, noch durch Überführung in das Kupfer- oder Blei- oder Quecksilberchloriddoppelsalz, aus diesem Pulver etwas Kristallisierbares zu isolieren. Es tauchte nun die Vermutung auf, daß die geringe Neigung zum Kristallisieren darauf beruhte, daß nicht völlig abgebaute Eiweißstoffe noch darin enthalten seien. Achtstündiges Kochen mit starker Salzsäure zeigte jedoch, daß durch Hydrolyse das Verhältnis von Aminstickstoff (nach van Slyke) zum Gesamtstickstoff keine Veränderung erleidet.

Der oben beschriebene Versuch ist am genauesten und vollständigsten durchgeführt worden; im folgenden seien im Anschluß daran die Ergebnisse noch eines zweiten Veresterungsversuchs ganz kurz mitgeteilt, soweit sie daneben noch von Interesse sind:

Angewandt wurden 4,200 kg Hefe (Versuch III von S. 233) mit 94,5 g Stickstoff, zur Veresterung kamen 87 g Stickstoff; 140 g Salze usw. blieben bei der Veresterung ungelöst zurück mit 11,0 g Stickstoff, wovon 3,7 g Ammoniakstickstoff, der Rest Alloxurbasenstickstoff (vgl. S. 241). Es wurden folgende Esterfraktionen erhalten:

Fraktion	Siedepunkt	Druck	Ausbeute
I	25 bis 58° C.	11 mm	24 g
II	58 „ 84° C.	11 „	64 „
III	84 „ 110° C.	11 „	54,5 „
IV	100 „ 125° C.	0 „	63 „
	(Hauptmenge 103 bis 106° C.)		
V	125 bis 134° C.	0 „	17 „

Der Destillationsrückstand betrug ca. 75 g und enthielt 7,7 g Stickstoff; er bildete den Gegenstand einer besonderen Untersuchung. Der gesamte Destillationsrückstand wurde drei Stunden mit konzentrierter Salzsäure gekocht, die Lösung im Vakuum eingedampft, mit Alkohol und Salzsäure nochmals verestert, die Ester in bekannter Weise in Freiheit gesetzt und destilliert. Bei 12 mm Druck ging bis zu einer Badtemperatur von 100° C. fast nichts über. Bei Erhöhung der Badtemperatur und Erniedrigung des Drucks trat dann lebhaftere Destillation ein und es ergaben sich folgende Fraktionen:

I:	Siedepunkt	50— 87° C.	bei 0 mm:	10,5 g ¹⁾
II:	"	87—120° C.	" 0 "	: 3,0 "
III:	"	120—146° C.	" 0 "	: 7,0 "

Im Destillationskolben hinterblieb ein dunkelbrauner dickflüssiger Rückstand, der nunmehr nicht weiter untersucht wurde.

Die drei Fraktionen wurden in der üblichen Weise verseift. Die Fraktion I ergab so ein Aminosäurengemisch, das mehr als zur Hälfte in Alkohol löslich war; eine genaue Identifizierung im einzelnen wurde nicht durchgeführt. Dagegen konnten aus Fraktion II 0,9 g Glutaminsäure isoliert werden und aus Fraktion III, die beim Abkühlen zum Teil erstarrt war²⁾, 3,0 g Glutaminsäure und 0,5 g Phenylalanin. Die gewonnenen Resultate bedeuten insofern keinen wesentlichen Erfolg, als die damit erzielte Verbesserung der Ausbeute an Glutaminsäure und Phenylalanin wohl auch erreicht worden wäre, wenn man bei der ursprünglichen Destillation die Temperatur noch weiter erhöht hätte.

Die Verseifung der Esterfraktionen erfolgte in bekannter Weise, die Trennung wurde im allgemeinen durch fraktionierte Kristallisation versucht, was meist ganz brauchbare Ergebnisse zeitigte.

Fraktion I: 24 g Ester, Siedepunkt 25—58° C. bei 11 mm

¹⁾ Davon unter 80° C. nur etwa 2 g.

²⁾ Zu Pyrrolidincarbonsäureester vom Schmelzpunkt 54° C. vgl. E. Fischer und R. Boehner, Ber. d. d. chem. Ges. 44, 1334 (1911) und E. Abderhalden und A. Weil, Diese Zeitschrift Bd. 74 S. 452 (1911).

Druck. Die Gesamtausbeute an freiem Aminosäuregemisch betrug nach dem Auskochen mit Alkohol 11 g. Durch mehrfaches Umkristallisieren aus Wasser wurden daraus vier schwerer lösliche Fraktionen von im ganzen 8,7 g erhalten, deren Schmelzpunkte sämtlich zwischen 265 und 280° C. lagen und ohne Zweifel als ein Gemisch von d- und dl-Alanin zu betrachten sind (vgl. auch die Untersuchung des Alanins der Fraktion II). Die Mutterlaugen dieser Kristallisationen wurden mit der salzsauren Lösung, mit welcher der abdestillierte Äther ausgeschüttelt worden war, vereinigt, eingedampft und mit Alkohol und Salzsäuregas nochmals verestert. Nach einigem Stehen schieden sich 1,0 g Glykokollesterchlorhydrat ab, dessen Schmelzpunkt roh bei 135–137° C. und nach einmaligem Umkristallisieren richtig bei 143° C. lag.

Fraktion II: 64 g Ester vom Siedepunkt 58–84° C. bei 11 mm Druck. Die Gesamtausbeute an freier Aminosäure betrug 43 g, wovon nach dem Auskochen mit Alkohol 38,5 g unlöslich zurückblieben. Der in Alkohol unlösliche Teil der Aminosäuren wurde durch fraktionierte Kristallisation in eine große Zahl von Fraktionen zerlegt, von denen die Schmelzpunkte der am schwersten löslichen übereinstimmend zwischen 284 und 290° C. lagen; sie wurden vereinigt und betrugen zusammen 29 g (Leucin-Valin-Fraktion). Die Mischprobe zeigte mit Alanin deutliche, mit Valin keine Schmelzpunktdepression.

Ferner ergaben sich mehrere leichter lösliche Fraktionen, deren Schmelzpunkte zwischen 272° C. und 278° C. lagen, im ganzen 4,0 g. Die Elementaranalyse lieferte einen nahezu auf Alanin stimmenden Wert:

	Gefunden:	C 41,8;	H 8,3
	Berechnet für Alanin:	C 40,4;	H 7,9
	„	„ Valin:	C 51,3; H 9,5.

Die Identifizierung erfolgte als Benzoylderivat: 2 g des Gemisches ergaben nach der Methode von E. Fischer¹⁾ neben niedriger schmelzenden Fraktionen 2,3 g Benzoylderivat vom

¹⁾ Ber. d. d. chem. Ges. 32 S. 2454 (1899).

Schmelzpunkt 151°C ., der nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser auf 153°C . stieg.

0,1471 g Substanz gaben 0,3341 g CO_2 und 0,0773 g H_2O .

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (193,1).

Gefunden: C 61,95; H 5,84%.

Berechnet: C 62,14; H 5,74%.

Dem Drehungsvermögen zufolge liegt ein Gemisch von d- und dl-Alanin vor:

0,4883 g Substanz mit 2,55 ccm n/1-Kalilauge in Wasser zu 5 ccm gelöst, 2-dm-Rohr. $\alpha = +1,35^{\circ}\text{C}$.; $[\alpha]_{\text{D}} = +6,9^{\circ}\text{C}$. E. Fischer gibt für reines l-Benzoyl-Alanin $-37,4^{\circ}\text{C}$. an¹⁾.

Die Schmelzpunkte der leichtest löslichen Fraktionen lagen bedeutend tiefer. Durch noch mehrfach wiederholtes Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol wurden schließlich im ganzen 2,0 g vom Schmelzpunkte zwischen $242-245^{\circ}\text{C}$. erhalten. Die Untersuchung dieser Substanz ist noch nicht abgeschlossen; es wird vermutet, daß sie zum Teil aus Aminobuttersäure besteht. Die Mutterlaugen davon ergaben noch mehrere Fraktionen, 3,0 g, deren Schmelzpunkte zwischen 230 und 236°C . lagen; daraus ließen sich 1,1 g Glykokollesterchlorhydrat isolieren.

Fraktion III: 54,5 g Ester (vom Siedepunkt $80-110^{\circ}\text{C}$. bei 11 mm Druck) lieferten nach dem Verseifen mit Wasser beim Einengen und schließlich völligem Verdampfen der wässerigen Lösung in vielen Einzelfraktionen insgesamt 34 g Aminosäuren; davon gingen beim Auskochen mit Alkohol 6 g (Prolin) in Lösung. Die unlöslich zurückbleibenden 28 g wurden mit der bei der Verarbeitung der Esterfraktion II gewonnenen Leucin-Valin-Fraktion — sie betrug 29,0 g — vereinigt. Die gesamte Leucin-Valin-Fraktion betrug also 57 g. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach Levene und van Slyke²⁾.

Zwei Elementaranalysen des innig vermengten Gemisches ergaben folgende Werte:

¹⁾ a. a. O. 2456.

²⁾ a. a. O.

	Gefunden: C 52,30; 52,56	H 9,79; 9,82
Berechnet für Leucin:	C 54,9	H 10,0
" " Valin:	C 51,3	H 9,5.

In der Annahme, daß in der Substanz ein Gemisch von lediglich Leucin und Valin vorlag, ergab sich aus dem gefundenen Wert für Kohlenstoff ein Gehalt von etwa 35% Leucin. 10 g des Gemisches wurden also in 70 ccm Wasser und 15 ccm 25%igem Ammoniak in Lösung gebracht und mit der nach obigem berechneten Menge Bleiacetatlösung vom spezifischen Gewicht 1,254 (14 ccm) versetzt:

I. 6,4 g Bleisalz mit 44,17% Pb (für 3,5 g Leucin berechnet 6,2 g).

II. Weitere 8 ccm gaben 3,0 g Bleisalz mit 46,00% Pb.

III. " 10 ccm " 2,5 g " " 45,94% Pb.

Berechnet für Leucin: 44,32%, für Valin: 47,12% Pb.

Ein weiterer Zusatz von Bleiacetat erzeugte keine Fällung mehr.

Die Analysen der Bleisalze ließen also erkennen, daß die Fällung I aus reinem Leucinblei, Fällung II und III aus einem Gemisch von 45% Leucin- mit 55% Valinblei bestanden, und zwar entsprechen

6,4 g Bleisalz der Fällung I	3,6 g Leucin
5,5 g " " " II und III	1,4 g " und 1,7 g Valin
also aus 10 g in Summa . . .	5,0 g Leucin, 1,7 g Valin.

Der Gehalt des Gemisches an Leucin war mithin höher, als die Elementaranalyse erwarten ließ. Dieser Widerspruch klärte sich jedoch bei der Untersuchung der Mutterlauge der Fällung III, welche mit Bleiacetatlösung keinen Niederschlag mehr ergeben hatte, auf. Die daraus zurückgewonnene Aminosäure (Schmelzpunkt 282° C.) enthielt außer Valin auch noch Alanin (und Aminobuttersäure?). 2,5 g gaben beim Umkristallisieren aus Wasser neben 1,0 g Valin (bei 303—305° C. sublimierend) zwei Kristallfraktionen von 0,5 und 0,3 g, die bei 286 bzw. 270° C. schmolzen. Schon die bei 286° C. schmelzende Fraktion enthielt, wie eine Elementaranalyse zeigte, kohlenstoffärmere Aminosäuren:

	Gefunden: C 48,0;	H 9,2
Berechnet für Valin:	C 51,3;	H 9,5
" " Alanin:	C 40,4;	H 7,8.

Die Fraktion besteht demnach aus 50% Leucin und aus (schätzungsweise) 45% Valin und 5% Alanin, womit auch die ursprüngliche Elementaranalyse völlig in Einklang steht. Die Frage nach dem Vorhandensein von Aminobuttersäure ist dabei unberücksichtigt.

Die Prolinfraktion entsprach nach Menge (11 g) und Verhalten den beim vorigen Versuch gemachten Angaben.

Fraktion IV und V: Die 63 g Ester vom Siedepunkt 100–125° C. bei 0–1 mm Druck wurden zunächst mit 1 l Petroläther (30–50° C.) durchgeschüttelt. Dabei blieben 15 g ungelöst, aus welchen sich aber bei weiterer Verarbeitung kein Serin, sondern neben ganz wenig Phenylalanin und 0,3 g Asparaginsäure (Schmelzpunkt über 305° C.) wesentlich nur Glutaminsäure isolieren ließ; die letzten Mutterlaugen enthielten viel ziemlich niedrig schmelzende Produkte unbekannter Zusammensetzung. An Phenylalanin wurden (teils als Chlorhydrat, teils in freiem Zustande) 10,4 g in kristallisiertem Zustande isoliert, ferner 5 g d, l-Asparaginsäure und aus der Mutterlauge davon noch wenig Glutaminsäure. Fraktion V (17 g, 125–135° C. bei 0 mm Druck) lieferte 2 g Phenylalanin und 4 g Glutaminsäure.

Spezielle Methoden zum Nachweis von Monamino-säuren.

Cystin.

Zur Verwendung kam die Hefe, Versuch IV (S. 233). Es wurde zunächst nach K. A. H. Mörner¹⁾ der Gesamtschwefel in 25 ccm Autolyseflüssigkeit bestimmt (gef. 0,0218 g) und ebenso in 200 ccm der „bleischwärende“ Schwefel (gef. 0,0371 g), d. h. es sind 21% des Schwefels in Form von bleischwärendem Schwefel vorhanden. 100 ccm der Autolyseflüssigkeit enthielten 1,88 g Stickstoff und nach obigem 0,0872 g Gesamt- und 0,0186 g bleischwärenden Schwefel. Macht man die der Wahrheit wohl ziemlich nahe kommende Annahme, daß in der schwefelhaltigen Substanz des Hefeeiweißes auf 1 Atom Schwefel

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 34 S. 209 (1901/02).

1 Atom Stickstoff entfällt, so ergibt sich, daß rund 2% des Stickstoffs in Form schwefelhaltiger Substanz vorhanden ist. Die gefundene Menge des bleischwärenden Schwefels läßt weiterhin vermuten, daß etwa 0,5% des Stickstoffs als Cystinstickstoff in der Hefe vorhanden ist. Die Isolierung des Cystins in reinem Zustande ist uns bisher nicht gelungen.

Nachweis und Bestimmung des Tryptophans¹⁾.

2,8 kg Oberhefe wurden 8 Tage lang bei 37° C. der Selbstverdauung überlassen, mit Wasser verdünnt und aufgekocht. Nach dem Abzentrifugieren des Tyrosins und der Zellrückstände wurde die Autolyseflüssigkeit auf 3,31 konzentriert, mit 700 ccm 30%iger Schwefelsäure stark angesäuert und mit 130 g Quecksilbersulfat, gelöst in 1300 ccm 5%iger Schwefelsäure, gefällt. Es fiel ein schleimiger Niederschlag, der abgesaugt, ausgewaschen und dann durch tagelanges Einleiten von Schwefelwasserstoff in der Wärme unter wiederholter Abstumpfung der dabei freiwerdenden Schwefelsäure mit Barythydrat zerlegt wurde. Das Filtrat nebst Waschwässern (1200 ccm) gab starke Tryptophanreaktion; es wurde eingengt und zur Entfernung der Alloxurbasen mit Silbersulfat in 5%iger schwefelsaurer Lösung gefällt. Die von dem Silberniederschlag abgesaugte Flüssigkeit wurde erneut mit Quecksilbersulfat gefällt und die entstehende Fällung nunmehr mit größter Sorgfalt tagelang ausgewaschen, doch gelang es nicht, die Millonsche Reaktion zum Verschwinden zu bringen. Der Niederschlag wurde wiederum mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die erhaltene Flüssigkeit im Vakuum eingengt. Dabei kristallisierte zunächst ein Pulver aus, das starke Tyrosinreaktion gab; das Filtrat wurde bei 40° C. zur Trockne verdampft. Der Rückstand löste sich in 50%igem Alkohol zum größten Teil auf. Die braune Lösung wurde

¹⁾ F. G. Hopkins und S. W. Cole, Journ. of Physiol. 27, 418 (1901); 29, 451 (1903). — C. Neuberg und N. Popowsky, Bioch. Zeitschrift 2, 366 (1906). — E. Abderhalden und M. Kempe, Diese Zeitschrift Bd. 52 S. 208 (1907).

mit Tierkohle gekocht und dann in Eis gekühlt, worauf Kristallabscheidung (1,2 g) eintrat. Die Kristalle zeigten sowohl die typische Brom- wie die Glyoxylsäurereaktion sehr stark, erwiesen sich unter dem Mikroskop als sehr lange dünne Nadeln und schmolzen bei 220° C. unter Zersetzung; die Millonsche Probe zeigte, daß sie noch sehr viel Tyrosin enthielten. Ähnlich verhielten sich einige kleinere nachfolgende Kristallfraktionen. Die letzte Mutterlauge wurde mit Alkohol versetzt, bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr gab, und dann noch etwas Äther zugegeben. Bei wochenlangem Stehen schieden sich nun in geringer Menge farblose Kristallnadeln ab, die bei 260° C. unter Gelbfärbung sich zersetzten. Diese Kristalle gaben ein in konzentrierter Salzsäure schwer lösliches Chlorhydrat (vom Schmelzpunkt 255° C.), das sehr kräftige Tryptophanreaktion zeigte und nach A. Ellinger und C. Flaman¹⁾ behandelt, ein bei 180° C. (statt 185° C.) schmelzendes Benzolsulfoderivat lieferte.

Hierdurch ist der Nachweis für das Vorhandensein des Tryptophans in der Hefe einwandfrei erbracht; um auch seine Menge wenigstens annähernd zu bestimmen, bedienten wir uns des kolorimetrischen Verfahrens von H. Fasal²⁾.

In Übereinstimmung mit den Angaben Fasals erhielten wir bei Verwendung von reinem Tryptophan violette Färbungen, deren Stärke der Tryptophankonzentration entsprach. Die ersten Versuche mit Hefe zeigten, daß brauchbare Farbtöne nur bei Anwendung von sehr wenig Substanz (0,03 g feuchter Hefe oder 0,01 g Trockenhefe) zu erhalten waren. Da feuchte Hefe in so geringen Mengen sich auf der Mikrowage nur schwierig abwägen läßt, so verwandelten wir die zu untersuchende Hefe zuerst nach bekannten Methoden³⁾ in Trockenpräparate und verfahren dann folgendermaßen:

Etwa 10 mg Acetondauerhefe wurden auf der Mikrowage

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 55 S. 22 (1908).

²⁾ Bioch. Zeitschrift 44, 394 (1912).

³⁾ E. und H. Buchner, Die Zymasegärung, München und Berlin 1903, 265.

genau abgewogen, in ein Reagensgläschen mit flachem Boden gebracht und mit 1 ccm Wasser und 2 ccm Glyoxylsäurelösung¹⁾ sorgfältig angerührt. Zu der Emulsion wurde nun 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure zugefügt, mit Eiswasser abgekühlt und noch 1 ccm Schwefelsäure eingetroppt. Dabei ging die Hefe meist klar und farblos in Lösung. Es wurde nun wieder mit Eis gekühlt und dann weitere 4 ccm Schwefelsäure ohne Kühlung auf einmal unter gutem Rühren zugegeben. Nach einer Stunde wurde der entstandene Farbton mit aus reinem Tryptophan hergestellten, genau ebenso behandelten Lösungen verschiedener Konzentration (verwendet je 1 ccm Tryptophanlösung 1 : 20 000, 1 : 30 000, 1 : 40 000) verglichen. Manchmal entstanden bei der gleichen Arbeitsweise grüne oder graue Färbungen; derartige Versuche wurden verworfen und zur Bestimmung nur solche Lösungen benutzt, deren Farbton möglichst nahe an die reinen Tryptophanlösungen herankam. Wir fanden im Mittel 0,3% Tryptophan (berechnet auf Hefetrockensubstanz), und zwar sowohl in Ober- wie in Unterhefe. Es ergaben z. B. 0,00916 g Oberhefe (mit 6,6% Stickstoff und 92,4% Trockensubstanz) einen Farbton, der 1 ccm einer Tryptophanlösung 1 : 40 000 entsprach; daraus berechnet sich, auf Trockensubstanz bezogen, 0,30% Tryptophan. Derselben Tryptophanmenge waren 0,00868 g Unterhefe (mit 6,7% Stickstoff und 83,4% Trockensubstanz) gleichwertig; Tryptophangehalt hiernach 0,34%.

Nach M. Schenck²⁾ enthält Kahlhefe kein Tryptophan. Wir haben diese Angabe nach der Methode von Fasal nachgeprüft und können sie nicht bestätigen. Eine vom Institut für Gärungsgewerbe in Berlin zur Verfügung gestellte Reinkultur von Kahlhefe gab mit Glyoxylsäurelösung und Schwefelsäure deutliche Violettfärbung, doch war die Intensität der Färbung nur etwa ein Drittel so stark wie bei Ober- und Unterhefe.

¹⁾ F. Hoppe-Seyler und H. Thierfelder, Handbuch der phys. und path.-chem. Analyse, Berlin 1909, 786.

²⁾ Wochenschr. f. Brauerei 22, 227 (1905).

II. Unterhefe.

Autolyse der Hefe.

Unsere Versuche mit Unterhefe sind nicht so zahlreich wie mit Oberhefe; wir verfügen nur über zwei Versuche. In einem Falle trat die Selbstgärung auch bei Zimmertemperatur bei Gegenwart von Toluol so stürmisch ein, daß ein Übersäumen sich nicht vermeiden ließ, im zweiten Falle war der Verlauf ruhiger. Der Endotryptasegehalt der Unterhefe war deutlich geringer als bei der Oberhefe, denn im Versuch I war nach fünfwöchentlichem Stehen bei 37° C. die Biuretreaktion noch schwach vorhanden, die Menge des unverdauten Stickstoffs war in beiden Versuchen relativ groß.

Versuch I: 4700 g Hefe mit 1280 g Trockensubstanz und 112 g Stickstoff, 3 Tage bei Zimmertemperatur, 36 Tage bei 37° C., dann noch einige Tage bei Zimmertemperatur, hinterließen 270 g Rückstand (Tyrosin mit einberechnet, vgl. unten) mit 10,1 g Stickstoff.

Versuch II: 1000 g Hefe mit 262 g Trockensubstanz und 25,9 g Stickstoff; nach etwa siebenwöchentlichem Stehen bei 37° C. blieben 61 g ungelöst mit 2,71 g Stickstoff.

Es folgt zunächst die Beschreibung des allein ganz durchgeführten Versuchs I.

Tyrosin.

Bei der untergärigen Hefe war die Menge des Tyrosins stets geringer als bei Oberhefe. Es schied sich in sehr kleinen Kriställchen ab, die sich nur unvollkommen von den Zellrückständen durch Zentrifugieren trennen ließen. Das Rohtyrosin war deshalb sehr unrein, vermischt mit Zellrückständen, anorganischen Salzen und vor allem mit Hopfenharzen. Es wurden erhalten 39,5 g mit 5,38% (2,13 g) Stickstoff und 11,6% Asche (wesentlich Calcium- und Magnesiumphosphat). Beim Auskochen mit viel Wasser blieben davon 25 g ungelöst mit 3,7% (0,9 g) Stickstoff; die wässrige Lösung schied beim Einengen 8,2 g Kristalle in mehreren Fraktionen ab, die Mutterlauge davon hinterließ bei völligem Eindampfen eine

schellackartige harte Masse (etwa 5 g mit 7,5% Stickstoff). Obige 8,2 g wurden durch nochmaliges Kristallisieren aus Wasser und Tierkohle gereinigt; Schmelzpunkt 305—310° C., Stickstoffgehalt: gefunden 7,66%, berechnet auf Tyrosin 7,74%. Es lag also reines Tyrosin vor, was durch die üblichen Tyrosinreaktionen weiterhin bestätigt wurde. Die ursprünglichen 39,5 g waren in Alkohol-Eisessig so gut wie unlöslich, enthielten also kein Leucin, dagegen war etwas organisch gebundener Schwefel nachweisbar.

Bei der Autolyse von 4,7 kg Hefe sind demnach direkt auskristallisiert 8,2 g Tyrosin; ein Fünftel der Autolyseflüssigkeit wurde im Vakuum stark eingeengt und lieferte dann nach wochenlangem Stehen 2,4 g einer wie Tyrosin kristallisierenden Kristallfraktion, die sehr kräftige Tyrosinreaktion gab.

In der für den zweiten Versuch benutzten Hefe konnte in dem bei der Autolyse unlöslich bleibenden Rückstand überhaupt kein Tyrosin aufgefunden werden, obwohl die Isolierung wiederholt versucht wurde. Wohl aber fand sich Tyrosin in der Autolyseflüssigkeit: die Autolyseflüssigkeit aus 2 kg Hefe wurde nach Abfiltrieren der Zellrückstände mit Phosphorwolframsäure gefällt und nach quantitativer Entfernung der Phosphorwolframsäure das barium- und schwefelsäurefreie Filtrat eingeengt; es kristallisierten 3,5 g Tyrosin. — Man darf demnach wohl annehmen, daß in den 4,7 kg Hefe von Versuch I im ganzen etwa 16 g Tyrosin enthalten waren.

Zellrückstände.

Die Abtrennung der Hauptmenge der Zellrückstände von der Rohtyrosinfraktion gelang, wie bei der Oberhefe, durch Abzentrifugieren der unverdünnten Autolyseflüssigkeit, da die Zellrückstände sich dabei auch an der Oberfläche ansammeln, obwohl sie an sich große Neigung haben, zu Boden zu sinken. Nach der Abtrennung des Tyrosins wurde die Autolyseflüssigkeit mit Wasser verdünnt und genau wie oben weiter verfahren. Es hinterblieben schließlich 230 g durch die anwesenden Hopfenharze dunkelbraun gefärbtes Pulver mit 5,5%

Feuchtigkeit und 8,0 g Stickstoff; dazu kommen noch etwa 25 g (Nichttyrosin aus der Rohtyrosinfraktion) mit 0,9 g Stickstoff (vgl. oben). Die stark wasserhaltige alkoholische Waschlöslichkeit der Zellrückstände hatte beträchtliche Mengen Substanz mit 1,9 g Stickstoff mit in Lösung genommen; davon war ein Teil in Äther löslich und konnte aus dem Äther in glänzenden Blättchen (0,3 g vom Schmelzpunkt 157—158° C.) gewonnen werden: Phytosterin, welches der Mischprobe zufolge mit dem aus Oberhefe identisch war. — Es ist bisher nicht gelungen, durch Hydrolyse mit Salzsäure Glukosamin aus den Zellrückständen aus Unterhefe zu gewinnen. Ob das an der Unreinheit der Zellrückstände oder an ihrem geringen Glukosamingehalt liegt, läßt sich vorläufig nicht entscheiden.

Veresterung nach E. Fischer.

Die Autolyseflüssigkeit nebst Waschwässern wurde im Vakuum auf 5 l eingeengt und ihr Stickstoffgehalt nach Kjeldahl (gefunden 99,1 g Gesamtstickstoff) und nach van Slyke (gefunden 58,7 g Aminostickstoff) bestimmt. VierFünftel davon, also 4 l, mit 79,2 g Stickstoff wurden im Vakuum eingedampft und in bekannter Weise auf Monaminosäureester verarbeitet. In der absolut alkoholischen salzsauren Flüssigkeit blieben 104,5 g (neben Ammoniumchlorid und anderen anorganischen Salzen die Chlorhydrate der Alloxurbasen enthaltend) ungelöst mit im ganzen 7,9 g Stickstoff. Das Filtrat davon wurde auf 4800 ccm eingeengt, wovon 100 ccm zu Analysen verbraucht wurden. Es ergab sich Ammoniakstickstoff 7,4 g (sowohl mit Magnesiumoxyd wie mit Natriumkarbonat bestimmt), Gesamtstickstoff 71,8 g (statt der berechneten 71,3 g; die Nichtübereinstimmung erklärt sich leicht aus den Analysenfehlern). Der Rest wurde eingedampft; für die Esterdestillation wurden indessen nur wenig mehr als zwei Drittel des Ganzen, genau 50 g Stickstoff (mit 5,1 g Ammoniakstickstoff) verwendet. Davon fanden sich nachher 16,5 g Stickstoff in Form von Aminosäureestern in der ätherischen Lösung ($\frac{1}{50}$ für Analysen); die Fraktionierung der Ester ist unten beschrieben. — Die wässrige Flüssigkeit wurde mit konzen-

trierter Salzsäure angesäuert, das Kaliumchlorid, dem viel schwarze Huminsubstanz beigemischt war, mit konzentrierter Salzsäure und Alkohol gewaschen, weiter eingedampft, nochmals abgesaugt und auf 2 l gebracht. Es fanden sich noch 26,9 g Stickstoff in der Lösung ($\frac{1}{100}$ verbraucht), davon 1,15 g als Ammoniakstickstoff ($\frac{1}{20}$ verbraucht); das ergibt einen Verlust von 2,7 g organisch gebundenem Stickstoff, der wesentlich auf die Huminsubstanz im Chlorkalium entfallen dürfte. Beim Eindampfen zur Trockne und Aufnehmen mit absolutem Alkohol hinterblieben nochmals 660 g schwarzbraunes Kaliumchlorid mit 1,1 g Stickstoff. Bei erneuter Anwendung der Estermethode gingen wieder beträchtliche Mengen Aminosäureester (mit 4,8 g Stickstoff) in den Äther (siehe unten), während in der nicht weiter untersuchten wässrig-alkalischen Lösung 17,1 g Stickstoff verblieben.

Beim Abdestillieren des Äthers von dieser Esterlösung kam sie mit etwas verdünnter Salzsäure in Berührung; obwohl sie davon sofort wieder abgehoben wurde, hatte das doch zur Folge, daß sich beim Destillieren im Vakuum bei weitem der Hauptteil der Ester zersetzte und im Rückstand blieb: Von den 4,8 g Stickstoff, welche die Lösung ursprünglich enthielt, gingen nur etwa 1,5 g in das Destillat.

Destillation der Ester.

Nach der ersten Veresterung ergaben sich folgende Fraktionen:

Fraktion	Siedepunkt	Druck	Ausbeute
I	bis 62° C. (Hauptmenge 57 bis 59° C.)	13 mm	20 g
II	62 bis 80° C.	13 "	24 "
III	60 " 90° C.	1 "	38 "
IV	90 " 135° C.	1 "	41 "
V	über 135° C.	1 "	13 "

Der Stickstoffgehalt des Destillationsrückstandes betrug 3,2 g.

Ester der zweiten Veresterung.

Fraktion	Siedepunkt	Druck	Ausbeute
I	bis 50° C.	20 mm	21 g ¹⁾
II	50 „ 80° C. (Hauptmenge bei 72° C.)	20 „	6 „
III u. IV	80 bis 135° C. (fast alles bei 125° C.)	1 „	8 „
V	über 135° C.	1 „	4,5 „

Wie bereits erwähnt, erlitt bei dieser Destillation der weitaus größte Teil der Ester Veränderung und blieb im Rückstand.

Die Verseifung und Aufarbeitung der Ester erfolgte, soweit nicht ausdrücklich anders bemerkt, wie im Oberhefe-Hauptversuch.

Fraktion I²⁾: Verseifungsrückstand nach dem Auskochen mit Alkohol 10,6 g (9 g von der ersten und 1,6 g von der zweiten Veresterung). Dem Stickstoffgehalt zufolge (gefunden 1,66 g Stickstoff = 16,1%) bestanden die Kristalle wesentlich aus Alanin (berechnet 15,7% Stickstoff), dem etwas Glykokoll und, wie unten gezeigt wird, auch Spuren von Valin beigemischt waren; isolieren ließen sich in bekannter Weise 2,8 g Glykokollesterchlorhydrat (entsprechend 1,5 g Glykokoll). Von den nach Abtrennung des Glykokolls wiedergewonnenen Aminosäuren wurde ein Teil durch Kristallisieren aus Wasser in drei Fraktionen zerlegt und so erhalten: 3,3 g Schmelzpunkt 274° C., 0,8 g Schmelzpunkt 267° C. und 0,5 g Schmelzpunkt 285° C. Die Hauptfraktion wurde racemisiert und in das Benzoylderivat verwandelt: sie lieferte ohne weiteres in nahezu quantitativer Ausbeute d, l-Benzoylalanin (Schmelzpunkt nach einmaliger Kristallisation aus Wasser 162–163° C.). Die dritte Kristallisation wurde in das Kupfersalz umgewandelt; der wenigst lösliche Anteil davon enthielt 20,6% Cu (auf Valinkupfer berechnet 21,50%).

¹⁾ Zumeist aus Alkohol bestehend.

²⁾ Die mit dem Äther sich verflüchtigenden Esteranteile wurden durch Ausschütteln mit Salzsäure gewonnen; es waren etwa 2 g. Nach früherem bestehen sie aus viel Alanin neben wenig Glykokoll.

Fraktion II: 30 g Ester lieferten 18,5 (16,75 + 1,75) g alkoholunlösliche Aminosäuren mit 2,52 g = 13,6% Stickstoff. Die Bestimmung des Leucingehalts sollte nach Levene und van Slyke erfolgen. Da eine Elementaranalyse hier (wegen des Alaningehalts) keine Auskunft geben konnte, wurde zunächst in einem Vorversuch mit Hilfe der Bleisalz-fällung auf Geratewohl der Gehalt an Leucin ungefähr bestimmt:

5 g Substanz wurden aufs feinste gepulvert, mit 35 ccm Wasser erhitzt, mit 8 ccm 25%igen Ammoniaks in Lösung gebracht und dann mit 5 ccm Bleiacetatlösung (spezifisches Gewicht 1,255) versetzt. Bald erfolgte Trübung und beim Stehen Kristallabscheidung. Schon das langsame Eintreten der Fällung deutet auf geringen Leucingehalt hin. Nach einer Stunde wurde abgesaugt (1,2 g); die Mutterlauge gab mit 6 ccm Bleiacetatlösung über Nacht noch 1,5 g Fällung, weiterer Zusatz hatte keine Wirkung mehr. Die erste Fällung enthielt 45,08%, die zweite 47,30% Blei; berechnet auf Leucinblei 44,32%, auf Valinblei 47,12% Blei. Der erste Bleiniederschlag bestand demnach etwa zu $\frac{3}{4}$ aus Leucinblei. Daraus ergab sich folgende Arbeitsweise:

12,8 g wurden in entsprechender Weise mit 8 ccm der Bleilösung gefällt; nach einstündigem Stehen 2,2 g glitzernde Kristalle (I). Zur Mutterlauge 2 ccm Bleilösung: 0,4 g Abscheidung (II). Mit weiteren 20 ccm Bleilösung nach Stehen über Nacht: 4,4 g (III); die Mutterlauge davon wurde durch Bleiacetatlösung nicht mehr gefällt. — Die Niederschläge I und II waren reines Leucinblei (gefunden 44,42 und 44,35% Blei), III Valinblei (gefunden 47,06% Blei). — Aus diesen Zahlen berechnet sich, daß die 18,5 g Aminosäuren der Gesamtfraktion 2,1 g Leucin enthielten. Berücksichtigt man ferner die obige Stickstoffbestimmung, so ergibt sich weiter, daß der übrige Teil der Fraktion etwas mehr als zur Hälfte (55%) aus Alanin, der Rest aus Valin besteht, vorausgesetzt, daß nicht größere Mengen von Aminobuttersäure vorhanden sind.

Wenn in der Hefe überhaupt Aminobuttersäure zu finden ist, so mußte sich diese in der vorliegenden Fraktion befinden.

Es wurde deshalb das nach Abtrennung der schwer löslichen Bleisalze verbleibende Aminosäuregemisch mit großer Sorgfalt durch fraktionierte Kristallisation der Kupfersalze auf diese Säure geprüft; mit nicht ganz sicherem Erfolg:

Die aus dem Vor- und Hauptversuche gesammelten Bleisalzfiltrate wurden mit Schwefelwasserstoff entbleit und eingedampft, der Rückstand zur Entfernung von Essigsäure und Ammoniak mit Alkoholäther (3 : 1) wiederholt angerieben und so lange auf dem Wasserbade erwärmt, bis der Geruch nach Essigsäure ganz verschwunden war und der Rückstand keine Ammoniakreaktion mehr gab. Nun wurde mit Wasser aufgenommen, mit Tierkohle entfärbt und durch Kochen mit Kupferoxyd in das Kupfersalz verwandelt. Durch allmähliches Eindampfen der wässrigen Lösung wurden folgende Fraktionen erhalten:

a. 0,6 g blaßblaue Kristalle. Fast unlöslich in Methylalkohol; nach nochmaligem Kristallisieren aus Wasser enthielten sie (0,24 g) 20,14% Cu.

b. 1,2 g, etwas dunkler blau. Beim Auskochen mit Methylalkohol gingen 0,12 g in Lösung, Rest aus Wasser kristallisiert (0,45 g) und bei 120° C. getrocknet: 20,21% Cu.

c. 1,78 g; bei 120° C. getrocknet und direkt analysiert: 23,26% Cu; die Fraktionen a bis c enthielten kein Kristallwasser.

d. 4 g, tief dunkelblau; die lufttrockne Substanz verlor bei 120° C. 2,21% Kristallwasser und enthielt wasserfrei 23,88% Kupfer.

e. 2,5 g, tief dunkelblau; 5,34% Wasser, 23,52% Kupfer.

Die analysierten Anteile der Fraktionen a und b bestanden sonach aus einem Gemisch von Valinkupfer (darauf berechnet: 21,50% Cu) und Leucinkupfer (19,64% Cu); die Mutterlaugen davon wurden eingedampft und ebenso wie die Kristallisationen c—e im Extraktionsapparat 8—10 Tage lang mit Methylalkohol erschöpfend ausgezogen, bis keine Blaufärbung des Extraktes mehr eintrat. Es blieb nur bei c ein geringer Rückstand (0,15 g ohne Kristallwasser mit 26,04% Kupfer: Alaninkupfer; darauf berechnet 26,52% Cu). Die

gesamten methylalkoholischen Auszüge wurden vereinigt und allmählich eingedampft; die dabei erhaltenen Kristallisationen wurden nochmals aus Methylalkohol umkristallisiert. Es ergaben sich folgende Fraktionen:

a ₁ .	0,90 g,	kein Kristallwasser,	25,23 %	Kupfer
b ₁ .	1,80 g,	"	25,47 %	"
c ₁ .	1,40 g,	"	25,38 %	"
d ₁ .	1,35 g,	1,61 %	22,16 %	"
e ₁ . ¹⁾	1,50 g,	6,06 %	13,89 %	"

Die letzte Fraktion war sehr stark verunreinigt, gelbgrün und etwas klebrig, abgesehen von dem beigemischtem Harz in Wasser sehr leicht löslich. Genau weiter untersucht wurden nur die Fraktionen a—c, die der Analyse zufolge aus einem Gemisch der Kupfersalze des Alanins (26,52 % Cu) und der Aminobuttersäure (23,75 % Cu) bestanden. Zunächst wurde nun, d. h. nach Abtrennung des Valinkupfers durch seine Leichtlöslichkeit in Methylalkohol, versucht, die Trennung durch erneutes Umkristallisieren aus Wasser zu erreichen.

0,78 g der Fraktion a₁ lösten sich in 50 ccm Wasser zu einer klaren dunkelblauen Flüssigkeit; diese wurde bis zur beginnenden Kristallisation eingengt und erkalten gelassen (a₂ 0,11 g mit 22,82 % Kupfer), weiterkonzentriert (a₃ 0,11 g mit 23,48 % Kupfer) und zur Trockne verdampft (a₄ 0,52 g mit 26,07 % Kupfer). b₁ und c₁ wurden vereinigt (2,95 g) und wie a₁ behandelt; erhalten drei Fraktionen:

b ₂ .	0,18 g	mit 22,95 %	Kupfer
b ₃ .	0,90 g	" 24,88 %	"
b ₄ .	1,50 g	" 25,54 %	"

alle Salze waren wasserfrei.

Die Löslichkeit der Kupfersalze in Methylalkohol und die Tatsache, daß auch das Alaninkupfer wasserfrei kristallisiert, beweisen, daß lediglich die Kupfersalze der aktiven Aminosäuren vorlagen. Durch das erstmalige Umkristallisieren

¹⁾ Zur Trockne verdampft.

aus Wasser wurden noch beigemischtes Isoleucin und etwas Valin als schwerlösliche Kupfersalze (a und b) entfernt. Beim darauffolgenden Kristallisieren aus Methylalkohol blieb umgekehrt gerade das Valinkupfer in den Mutterlaugen (d_1). Das erneute Umkristallisieren aus Wasser zeigt, daß die wenigst löslichen Fraktionen immer noch etwas Valin enthalten (a_2 und b_2). Die Trennung von Aminobuttersäure und Alanin über die Kupfersalze scheint bei den aktiven Säuren nicht so gut zu gelingen wie bei den inaktiven¹⁾; die Fraktion a_3 gibt zwar einen gut auf aminobuttersaures Kupfer stimmenden Wert, b_3 und b_4 indessen deuten auf Mischung von Alanin und Aminobuttersäure. Wir entschlossen uns daher, den nun noch bleibenden Rest zunächst nach Umwandlung in die Aminosäure zu racemisieren und dann erneut die Kupfersalze zu fraktionieren. Wir verwendeten die Fraktion b_3 (0,79 g); wegen der uns zu Gebote stehenden geringen Substanzmenge gingen wir gleichzeitig zur Mikroanalyse über, mit der wir ausgezeichnet übereinstimmende Resultate erhielten.

Die Racemisierung erfolgte durch 24stündiges Erhitzen mit Baryt im Autoklaven auf 170—175° C. Die Lösung war nach quantitativer Entfernung des Baryts völlig inaktiv. Die heiße wässrige Lösung des daraus wieder dargestellten Kupfer-

¹⁾ Racemisches Alanin und Aminobuttersäure können über die Kupfersalze sehr gut voneinander getrennt werden. Aminobuttersaures Kupfer kristallisiert aus Wasser in hellblauen Nadeln wasserfrei (0,1933 g Substanz lufttrocken verloren bei 120° C. nicht an Gewicht und gaben 0,0571 g Kupferoxyd. $[C_4H_9O_2N]_2Cu$. Berechnet 23,75%, gefunden 23,60% Cu) und ist in Wasser schwer löslich, in heißem und kaltem Methylalkohol unlöslich. Alaninkupfer ist sehr viel leichter löslich (1 g etwa in 15 ccm kaltem Wasser) und bildet dunkelblaue Nadelchen, die ein Molekül Kristallwasser enthalten (A. Strecker, Liebigs Ann. 75, 36 [1850]): 0,5322 g Substanz lufttrocken verloren bei 120° C. 0,0364 g H_2O . — 0,2864 g Substanz lufttrocken gaben 0,0882 g CuO . $[C_3H_6O_2N]_2Cu + H_2O$. Berechnet H_2O 6,99, Cu 24,67%, Gefunden H_2O 6,84, Cu 24,60%). In kochendem Methylalkohol ist es etwas löslich, in kaltem so gut wie unlöslich. Als ein Gemisch von gleichen Teilen Alaninkupfer und aminobuttersaurem Kupfer (je 0,5 g), zusammen aus Wasser fraktioniert kristallisiert wurde, war bereits nach zweimaliger Kristallisation der schwerst lösliche Anteil reines aminobuttersaures Kupfer.

salzes gab beim allmählichen Einengen zwei Kristallfraktionen (I und II) und wurde schließlich zur Trockne gebracht (III). Die letzte Fraktion III (0,35 g) war reines racemisches Alaninkupfer. Gefunden: 6,83% Wasser und 24,29% Kupfer, berechnet auf $(C_3H_7O_2N)_2Cu + H_2O$: 6,99% H_2O und 24,67% Cu. — Fraktion II (0,14 g) enthielt 25,65% Cu; das deutet auf ein Gemisch von d, l-aminobuttersaurem und d, l-Alaninkupfer, aber das Salz war überraschenderweise wasserfrei! Die schwerst lösliche Fraktion I (0,3 g) wurde durch erneutes Kristallisieren aus Wasser in drei Fraktionen zerlegt (0,10 g, 0,05 g und 0,06 g), welche sämtlich wasserfrei waren und 23,01%, 23,65% und 27,55% Kupfer enthielten.

Da die beiden ersten Kristallisationen aus Fraktion I den gleichen Kupfergehalt aufweisen, wird man sie als reine Substanzen betrachten müssen; es liegt hier mit großer Wahrscheinlichkeit d, l-aminobuttersaures Kupfer vor. Zur genaueren Charakterisierung reichte unser Material nicht; wir gedenken aber unsere Versuche fortzusetzen und vor allem durch Isolierung der aktiven Form sicherzustellen.

Fraktion III: 38 g Ester wurden durch Kochen mit 250 ccm Wasser verseift. Beim Erkalten kristallisierten 6 g (IIIa) aus; beim völligen Verdampfen der Mutterlauge und nach Auskochen des Rückstandes mit Alkohol verblieben 13,8 g (IIIb) Aminosäuren, während 11 g (Prolin) in die alkoholische Lösung gingen. IIIa enthielt 10,6%, IIIb 11,0% Stickstoff. — IIIa wurde durch Umkristallisieren aus Wasser in drei annähernd gleich große Fraktionen zerlegt (Schmelzpunkt 296° C., 298° C. und 292° C.), doch erwies sich auch die erste bei der Elementaranalyse als noch nicht ganz reines Leucin; Gefunden: C 54,34%, H 10,14%; berechnet für Leucin: C 54,9%, H 10,0%. Auch eine Fällung des Bleisalzes nach Levene und van Slyke bestätigte den Valingehalt des Präparates. Die beiden anderen Fraktionen wurden daher mit IIIb vereinigt (zusammen 17,2 g) und analysiert. Gefunden: 51,1% und 50,93% C, 9,72% und 9,46% H. Daraus läßt sich ein Schluß aus dem Leucingehalt nicht ziehen. Es wurde daher zunächst wie oben in einem Vorversuch durch allmäh-

liches Fällen mit Bleiacetatlösung der ungefähre Leucingehalt festgestellt und dann wie folgt verfahren:

6,9 g wurden in 60 ccm Wasser unter Zusatz von konzentriertem Ammoniak gelöst und mit 11,4 ccm Bleiacetatlösung (spezifisches Gewicht 1,255) gefällt. Nach einstündigem Stehen in Eiswasser waren 4,8 g reines Leucinblei abgeschieden (44,45% Pb; berechnet: 44,32%), entsprechend 2,7 g Leucin. Die Mutterlaugen gaben mit Bleilösung nur noch geringe Niederschläge. Sie wurden in die Kupfersalze umgewandelt und die letzteren fraktioniert kristallisiert. Aus der Löslichkeit des Kupfersalzes (es war zum größten Teil leicht löslich in Methylalkohol) und aus den vielen Kupferbestimmungen, die hier nicht aufgeführt sein sollen, ergab sich, daß darin außer etwas Leucin (oder richtiger wohl Isoleucin) hauptsächlich Valin und geringe Mengen (etwa $\frac{1}{4}$ der Gesamtmenge) von Alanin vorhanden waren, womit auch die oben angeführten Elementaranalysen sich in Einklang bringen lassen. Man kann sonach die ursprüngliche Gesamtfraktion (fast 20 g) betrachten als bestehend aus: 10 g Leucin, 7,5 g Valin und 2,5 g Alanin¹⁾.

Prolinfraktion.

Die gesamten alkoholischen Auszüge der Fraktionen I bis III beider Veresterungen hinterließen 13,1 g leicht in Alkohol löslichen Rückstand. Darin waren enthalten: 0,953 g Gesamt- und 0,491 g Aminostickstoff (nach van Slyke). Mit hin berechnet sich 0,46 g Prolinstickstoff entsprechend 3,8 g Prolin. Behufs Identifizierung des Prolins wurde die noch vorhandene Menge (von 100 ccm wässriger Lösung waren 12 ccm für Analysen verbraucht) mit Baryt racemisiert²⁾, das Barium mit Kohlendioxyd entfernt und das Filtrat mit Kupferoxyd gekocht. Das beim Eindampfen der wässrigen Lösung sich ausscheidende Kupfersalz war in Alkohol so gut wie unlöslich (9,8 g nach dem Auskochen mit Alkohol; Prolinkupfer $[C_5H_8NO_2]_2Cu + 2H_2O$ berechnen sich nach obiger Bestimmung

¹⁾ Auf Aminobuttersäure ist nicht geprüft.

²⁾ E. Fischer, a. a. O.

nur 4,75 g). Beim Umkristallisieren aus Wasser ergaben sich zunächst etwa 2 g einer wenig löslichen Fraktion, die nach Entfernen des Kupfers mit Schwefelwasserstoff einen nicht-kristallisierten Rückstand hinterließen, der auch kein kristallisiertes Pikrat gab¹⁾. Dagegen gab die Mutterlauge davon nach der Entkupferung und Eindampfen zur Trockne ohne weiteres in Eisessiglösung mit Äther ein kristallisiertes Pikrat, dessen Schmelzpunkt allerdings um einige Grad zu tief, nämlich bei 128—130° C. statt 135—137° lag und auch durch Umkristallisieren mit Alkohol nicht in die Höhe zu bringen war. Es zeigte sich indessen, daß die aus dem Kupfersalz wiedergewonnene Aminosäure nicht mehr glatt in Alkohol löslich war. Die Behandlung mit Alkohol wurde daher mit dem noch vorhandenen Rest der Aminosäure (etwa 4 g) wiederholt; es blieben 0,75 g (siehe unten) ungelöst. Der ölige Rückstand des alkoholischen Auszugs gab nunmehr ein sehr schön kristallisierendes Pikrat (Schmelzpunkt 132° C.), das nach einmaligem Umkristallisieren aus Alkohol den richtigen Schmelzpunkt, 135° C., des reinen d, l-Prolinpikrats zeigte.

F. W. Foreman²⁾ gibt an, daß die schwerlöslichen Anteile der Prolinfraktion eine Aminobuttersäure enthielten. Dieser Angabe wegen haben wir die oben erwähnten 0,75 g durch Umwandlung in das Kupfersalz genauer geprüft. Das Kupfersalz war im Wasser ziemlich leicht löslich, es wurde in zwei Fraktionen zerlegt und analysiert. Beide Fraktionen waren wasserfrei und enthielten 21,2% und 21,5% Kupfer, während sich auf Aminobuttersäure 23,7% Kupfer berechnen. Die Analysenzahl deutet auf Valinkupfer hin, doch schmolz die aus den Salzen gewonnene Aminosäure bereits bei 235° C., war also bestimmt kein Valin.

Fraktion IV: Von 49 g Ester (41 g von der ersten und 8 g von der zweiten Veresterung) waren in Wasser unlöslich 15 + 2 g; der wasserunlösliche Esteranteil der Fraktion V (2 + 1 g) wurde damit vereinigt. Im ganzen waren also in

¹⁾ Nach D. Alexandroff, Diese Zeitschrift Bd. 46 S. 17 (1905).

²⁾ Bioch. Zeitschrift 56, 1 (1913).

beiden Fraktionen 20 g roher Phenylalaninester entsprechend 17 g Phenylalanin. Durch Verseifen mit Salzsäure¹⁾ wurden daraus 8,6 g Phenylalaninchlorhydrat gewonnen, aus der Mutterlauge mit Ammoniak noch 1 g freies Phenylalanin. Der nichtkristallisierende Rest durfte ebenfalls zur Hauptsache aus Phenylalanin (Gemisch der aktiven und racemischen Form) bestanden haben. Durch Umkristallisieren aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle konnten aus obigen Kristallfraktionen leicht große Mengen von reinem Phenylalanin isoliert werden. Der Schmelzpunkt lag bei 268° C., woraus zu schließen ist, daß wesentlich Racemform vorlag.

Die wasserlöslichen Ester wurden mit Baryt verseift, das unlösliche Bariumsalz abfiltriert. Nach dem Zerlegen mit Schwefelsäure kristallisierten beim Einengen 3,8 g dl-Asparaginsäure (Schmelzpunkt höher als 270° C.) aus; die letzte Mutterlauge enthielt ganz wenig braune in Alkohol lösliche Substanz.

Die Mutterlauge vom asparaginsäuren Barium wurde nach Entfernung des Bariums mit Schwefelsäure eingedampft. Der Rückstand (etwa 15 g) wurde mit Kupferoxyd gekocht, die heißfiltrierte Lösung schied beim Erkalten und Einengen 7,7 g in Wasser schwer lösliches asparaginsäures Kupfer ab; die aus dem Kupfersalz gewonnene freie Asparaginsäure schmolz im offenen Röhrchen bei 290° C. noch nicht, im zugeschmolzenen Röhrchen bei 265° C. statt 270—271° C. Die so gewonnene Asparaginsäure war frei von Glutaminsäure, denn ein schwerlösliches Chlorhydrat konnte daraus nicht abgeschieden werden.

Das Filtrat von asparaginsäurem Kupfer lieferte nach Entfernung des Kupfers 2,9 g Glutaminsäure-Chlorhydrat. Nach völliger Abscheidung der Glutaminsäure mit Salzsäure verblieb in der Lösung noch etwa 0,6 g Stickstoff und dementsprechend also noch eine recht erhebliche Menge Substanz. Es gelang auch hier nicht, so wenig wie bei der Oberhefe, Serin nachzuweisen. Zwar konnte nach quantitativer Entfernung der Salzsäure noch reichliche Kristallisation erzielt werden, und die Schmelzpunkte der einzelnen Fraktionen lagen

¹⁾ Wieder erwies sich ein Teil der Fraktion als unlöslich in Salzsäure

auch in der Nähe des Serinschmelzpunktes, nämlich zwischen 230°C . und 250°C ., es gelang aber nicht in einem einzigen von zahlreichen Versuchen, diese Kristalle in das charakteristische Naphthalinsulfoderivat vom richtigen Schmelzpunkt umzuwandeln.

Fraktion V schied, wie wir häufig beobachtet haben, beim Erkalten Kristalle ab, die durch den Schmelzpunkt ($54\text{--}55^{\circ}\text{C}$.) und auch durch eine Elementaranalyse als Pyrrolidonkarbonsäureester erwiesen wurden. Der wasserlösliche Anteil der Ester ($11\text{ g} + 3,5\text{ g}$) lieferte nach der Verseifung mit Barythydrat auch bei tagelangem Stehen keine Kristalle. beim Absaugen des in geringer Menge abgeschiedenen Bariumkarbonats aber erfolgte plötzlich in der Saugflasche lebhaftere Kristallabscheidung. Die aus dem Bariumsalz freigemachte Säure (6 g) aber erwies sich nicht als Asparaginsäure, sondern nach dem Schmelzpunkt als reine Glutaminsäure. Aus dem Filtrat des Bariumsalzes wurden neben $0,5\text{ g}$ alkohollöslichem Öl noch 4 g weniger reine Glutaminsäure gewonnen, die sich aber durch Umwandlung in das Chlorhydrat (Schmelzpunkt 193°C .) auch als solche erweisen ließ.

Glutaminsäure und Prolin (ohne Esterdestillation).

Es wurde von 2 kg Hefe (vom Versuch II) mit $51,8\text{ g}$ Stickstoff ausgegangen. Bei der Selbstverdauung blieben $5,4\text{ g}$ Stickstoff ungelöst¹⁾; die mit dem Waschwasser auf 4300 ccm eingedampfte Autolyseflüssigkeit enthielt $46,1\text{ g}$ Stickstoff. Davon wurden 4000 ccm mit $42,9\text{ g}$ Stickstoff in Arbeit genommen. Sie wurden in schwefelsaurer Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt und sehr sorgfältig mit 5% iger Schwefelsäure bis zum Verschwinden der Millonschen Reaktion ausgewaschen. Der Niederschlag wog nach dem Trocknen 1342 g und enthielt im ganzen $19,3\text{ g}$ Stickstoff. Das Filtrat (22 l) wurde mit überschüssigem Baryt von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure befreit und nach dem Abfiltrieren des Niederschlags auch das Barium quantitativ mit Schwefelsäure

¹⁾ Tyrosin war nicht abgeschieden (siehe oben).

ausgefällt. Trotz sehr sorgfältigen Auswaschens (bis nahezu zum Verschwinden der Triketohydrinden-Reaktion) hielten diese Niederschläge 2,5 g Stickstoff eingeschlossen. Das Filtrat wurde im Vakuum auf 4 l eingeengt, die 22,2 g Stickstoff enthielten (Verlust 2,1 g: in Anbetracht der großen Mengen Flüssigkeit und Niederschlag erklärlich). 3800 ccm davon lieferten bei weiterem Einengen zunächst eine Kristallisation von Tyrosin (siehe oben S. 268), alsdann sehr erhebliche Mengen von tyrosinfreien Abscheidungen; bei völligem Eindampfen hinterblieb ein Sirup. Sämtliche Kristallisationen (außer der Tyrosinfraktion) und der Sirup wurden erschöpfend mit Alkohol ausgekocht (Prolinfraktion), der in Alkohol unlösliche Teil auf

Glutaminsäure

verarbeitet. Die schwerer und die leichter in Wasser löslichen Anteile wurden getrennt mit Chlorwasserstoffsäure behandelt, die Mutterlaugen dann vereinigt und erneut zur Kristallisation gestellt. Als sich auch nach langem Stehen kein Chlorhydrat mehr abschied, wurde die Salzsäure mit Bleioxyd entfernt, das bleifreie Filtrat mit Tierkohle gekocht und dann erneut mit gasförmigem Chlorwasserstoff gesättigt, solange noch Kristallabscheidung zu erreichen war. So gelang es, im ganzen 25 g Glutaminsäurechlorhydrat (Schmelzpunkt roh 182° C., nach einmaliger Kristallisation 193° C.) zu isolieren, d. i. eine sehr viel größere Menge, als je bei der Esterdestillation gefunden war.

Prolin.

Der nach dem Verdampfen der alkoholischen Lösung hinterbleibende Sirup wurde noch wiederholt mit Alkohol aufgenommen und jedesmal die unlösliche Aminosäure abfiltriert. Schließlich wurde eine konzentrierte alkoholische Lösung erhalten, die nach wochenlangem Stehen 0,75 g Kristalle abschied. Diese wurden in das Kupfersalz umgewandelt und letzteres mit Alkohol extrahiert. Der alkoholunlösliche Teil war eine undeutlich kristallisierende blaue Masse; die trotz verschiedener Anläufe nicht zu identifizieren war. Das

alkohollösliche Kupfersalz (0,2 g) enthielt, im Exsikkator über Schwefelsäure ohne Vakuum zur Konstanz getrocknet, 23,47% Kupfer. Es war im Wasser sehr leicht, im Alkohol schwer löslich. Der noch vorhandene Rest (etwa 0,1 g) wurde in viel (etwa $\frac{1}{2}$ l) Alkohol gelöst und durch Eindampfen in zwei Fraktionen zerlegt; die erste (0,05 g) war dunkelblau, die zweite, durch Eindampfen bis fast zur Trockne gewonnene (0,01 g), etwas mehr grünlich. Beide Fraktionen gaben im Vakuum über Schwefelsäure vorgetrocknet, bei 105° C. nur noch eine Spur Feuchtigkeit ab und enthielten 23,34% bzw. 23,32% Kupfer. Für aminobuttersaures Kupfer berechnen sich 23,75%. Die Konstanz der Werte macht es recht wahrscheinlich, daß hier wirklich Aminobuttersäure vorlag.

Die alkoholische Lösung wurde auf 600 ccm aufgefüllt und der Gesamtstickstoff bestimmt; gefunden: 4,00 g Stickstoff. Die übrigbleibenden 550 ccm hinterließen, im Vakuum eingedampft und über konzentrierter Schwefelsäure zur Konstanz getrocknet, 39,0 g braunen Sirup (mit 9,4% Stickstoff). Dieser Rückstand wurde nun nach Foreman¹⁾ noch achtmal mit je etwa 75—100 ccm Chloroform ausgekocht, bis so gut wie nichts mehr in Lösung ging. Der Chloroformauszug enthielt etwa 5 g glasiger, klebriger Substanz; sie wurde in Wasser gelöst, von braunem Harz abfiltriert und auf 100 ccm gebracht. Gesamtstickstoff 0,53 g, Aminostickstoff nach van Slyke nur 0,01 g; fast der gesamte Stickstoff war also als Prolinstickstoff vorhanden. Trotzdem gelang es nicht, durch Racemisieren mit Barytwasser und Herstellung des Kupfersalzes, letzteres in reiner Form zu gewinnen; der größte Teil der Aminosäure war nach der Racemisation unlöslich in Alkohol.

Die in Chloroform unlösliche Hauptmenge wurde ebenfalls in Wasser gelöst, filtriert und auf 250 ccm aufgefüllt. Gesamtstickstoff 3,2 g, Aminostickstoff nach van Slyke 0,8 g, also 2,4 g Prolinstickstoff, was etwa 20 g Prolin entsprechen würde. Die Aminosäuren wurden nun racemisiert, durch

¹⁾ a. a. O.

Kristallisation aus Alkohol in eine alkoholunlösliche und mehrere alkohollösliche Fraktionen zerlegt, und jede von diesen für sich in das Kupfersalz umgewandelt, doch konnte aus keiner Prolinkupfer in sicher reinem Zustande isoliert werden. Auch ein Versuch, Oxyprolin in der üblichen Weise nachzuweisen, mißlang.

Bei der Ausführung der oben beschriebenen Versuche wurde ich von den Herren Dr. Paul Schulze und Dr. Kurt Bratring in trefflicher Weise unterstützt.
