

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

Von

Emil Abderhalden.

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

(Der Redaktion zugegangen am 16. August 1909.)

Durch einen glücklichen Zufall ist es gelungen, bei der partiellen Hydrolyse von Seidenabfällen Glycyl-l-tyrosin direkt zu fassen. Seidenabfälle waren der partiellen Hydrolyse mit 70%iger Schwefelsäure zur Gewinnung von Peptonen unterworfen worden. Zu diesem Zwecke wurden 500 g Seidenabfälle mit der 5fachen Menge 70%iger Schwefelsäure übergossen. Es trat bald Lösung ein. Sie wurde 4 Tage bei Zimmertemperatur (ca. 18°) aufbewahrt. Die Lösung wurde dann mit Wasser auf 10 Liter verdünnt, und nunmehr die Schwefelsäure mit der annähernd berechneten Menge fein gepulverten Baryts quantitativ gefällt. Es ist vorteilhaft, die Entfernung der Schwefelsäure in möglichst verdünnter Lösung vorzunehmen, weil sonst die großen Baryumsulfatmassen zusammenbacken und viel Mutterlauge einschließen. Das Auskochen des Baryumsulfatniederschlags haben wir absichtlich unterlassen, weil dieser oft noch festes Baryt einschließt und oft auch die umhüllte Mutterlauge noch Säure enthält. Beim Kochen liegt dann die Gefahr eines weiteren Abbaues vor. Wir haben aus diesen Gründen den Baryumsulfatniederschlag nur mit kaltem Wasser wiederholt angerieben und ihn immer wieder abgenutscht und scharf abgepreßt. Die gesamten Filtrate wurden dann unter vermindertem Druck eingedampft und schließlich noch einmal kontrolliert, ob die Lösung frei von Baryum und von Schwefelsäure war. Nun wurde zur Trockene verdampft, der Rückstand mit Methylalkohol ausgekocht und die Lösung mit Äther gefällt. Man erhält auf diesem Wege schneeweiße

Produkte, die sich in Wasser leicht lösen und farblose Lösungen geben. Die Darstellung dieser Peptone erfolgte in größerem Maßstabe, weil wir sie zur Untersuchung auf peptolytische Fermente verwenden. Wir reinigten die Peptone auch so, daß wir den Destillationsrückstand in möglichst wenig Wasser lösten und dann Alkohol zugaben. Die «Peptone» fallen dann als schwach gelbgefärbte Pulver. Hat man zur Lösung der Peptone zuviel Wasser genommen, dann sind sehr große Mengen an Alkohol nötig, um eine Fällung zu erzielen. Wir hatten nun in einem Falle versehentlich zuviel Wasser zur Lösung angewandt. Trotz reichlichen Alkoholzusatzes wollte es nicht gelingen, eine Abscheidung der Peptone zu erhalten. Es fielen zwar flockige Massen, die Hauptmenge des Peptons blieb jedoch in Lösung. Vom Ausgeschiedenen wurde abfiltriert und die Lösung beiseite gestellt. Nach etwa einer Woche zeigten sich an den Wänden des Gefäßes prachtvoll ausgebildete Krystalle, daneben hatten sich auch amorphe Massen abgeschieden. Die Krystalle wurden zunächst für Aminosäuren gehalten. Sie wurden nach einiger Zeit mechanisch von den amorphen Beimengungen getrennt. Die Lösung wurde abgegossen und die harten Krystalle von den Wänden des Gefäßes losgelöst. Der Umstand, daß die Lösung der Krystalle sich mit Millons Reagens tief rot färbte, ergab, daß eine Aminosäure nicht vorliegen konnte. Versuche, aus allen zur Verfügung stehenden Peptonen aus Seide dieselben Krystalle wiederzugewinnen, hatten nur bei dem gleichen Präparat Erfolg, das schon die ersten Krystalle geliefert hatte. Das Pepton wurde in Wasser gelöst (1 Teil Pepton und 5 Teile Wasser) und dann so lange Alkohol zugegeben, bis eine bleibende Trübung auftrat. Diese wurde durch vorsichtigen Zusatz von Wasser wieder aufgelöst. Es dauerte stets mehrere Tage, bis die nicht verschlossene Lösung Krystalle ansetzte. Ihre Menge war nicht sehr groß. Es wurden schließlich 2,2 g Krystalle gewonnen. Sie wurden in heißem Wasser gelöst, die Lösung, die schwache Biuretreaktion gab, mit Tierkohle gekocht und zu der heißen Lösung soviel Äthylalkohol zugefügt, bis eine ganz schwache Trübung bestehen blieb. Es schossen bald lanzettförmige, zu Gruppen vereinigte Krystalle

an. Das reine Produkt gibt keine Biuretreaktion, dagegen sehr starke Rotfärbung mit Millons Reagens. Auffallend war, wie außerordentlich leicht das gereinigte Produkt krystallisierte. Es fiel nie amorph aus, sondern bildete stets makroskopische, zu Gruppen vereinigte Blättchen.

An reinen Krystallen wurden 1,25 g gewonnen. Das bei 100° getrocknete Präparat schmolz zwischen 176 und 180° (korr.) und zeigte $[\alpha]_{20}^D = 50,08^\circ$.

0,25 g des Präparates wurden in 5 ccm Wasser gelöst und zur Lösung 1 ccm Hefepreßsaft zugesetzt. Nach kurzer Zeit erfolgte Abscheidung von Tyrosin.

0,5 g des reinen Präparates wurden 12 Stunden mit 10 ccm 25%iger Schwefelsäure gekocht. Die Schwefelsäure wurde dann quantitativ mit Baryt entfernt und der Baryumsulfatniederschlag wiederholt mit Wasser ausgekocht. Durch Einengen der vereinigten Filtrate wurde das Tyrosin abgeschieden. Isoliert wurden 0,30 g Tyrosin und 0,12 g Glykokoll in Form seines salzsauren Esters. Eine andere Aminosäure war nicht vorhanden.

Die Analyse des bei 120° getrockneten Präparates ergab:

0,1621 g Substanz gaben 0,3290 g CO₂ und 0,0878 g H₂O.

0,1610 „ „ „ 16,6 ccm N [23°, 764 mm].

Berechnet für C₁₁H₁₄N₂O₄:

Gefunden:

55,46% C, 5,88% H und 11,76% N. 55,35% C, 6,02% H und 11,96% N.

0,2029 g Substanz gelöst in 5 ccm Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 5,1014 g. $d_{20} = 1,0043$. $\alpha = + 2,00^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = + 50,08^\circ$.

Nach allen Ergebnissen unterliegt es keinem Zweifel, daß das isolierte Produkt dem Dipeptid Glycyl-l-tyrosin entspricht. Damit steht auch der frühere Befund von Glycyl-l-tyrosinanhidrid im Einklang.¹⁾ Mancherlei Beobachtungen lassen es uns als sehr wahrscheinlich erscheinen, daß neben dem schließlich isolierten Glycyl-l-tyrosin noch ein anderes schwieriger krystallisierbares Produkt vorhanden war. Wir werden diese Beobachtungen weiter verfolgen.

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXIX, S. 2315, 1906.

Nach wiederholten, vergeblichen Bemühungen ist es ferner geglückt, aus Elastin ein Dipeptid in kristallisiertem Zustand zu gewinnen, nämlich das Leucyl-glycin und die Anwesenheit von Glycyl-leucin wahrscheinlich zu machen. Hier führte die systematische Durchführung der Hydrolyse von Elastin mit Barytlösung zum Ziel. Zunächst wurden 100 g Elastin 16 Stunden mit einer heißgesättigten Barytlösung auf 95° erwärmt. Wir verwendeten die 10fache Menge des angewandten Elastins an Barytlösung. Nach quantitativer Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure wurde die mit Wasser auf 10 Liter verdünnte Lösung mit einer 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag war sehr beträchtlich. Wir verarbeiteten das Filtrat der Fällung, nachdem die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Baryt und dessen Überschuß dann mit Schwefelsäure entfernt worden war. Beim Einengen der Lösung erfolgten bald kristallinische Abscheidungen. Sie erwiesen sich als Leucin und Valin. Die eingehende Untersuchung der einzelnen Krystallfraktionen ergab, daß fast ausschließlich Aminosäuren vorhanden waren. Es scheint, daß unter den gewählten Bedingungen bei der Hydrolyse mit Baryt neben komplizierteren, mit Phosphorwolframsäure fällbaren Produkten hauptsächlich Aminosäuren entstehen und fast gar keine einfacher gebauten, noch zwei und mehr Aminosäuren enthaltende Produkte.

Wir haben die Versuche mit je 100 g Elastin wiederholt und schließlich nur 10 Stunden auf 90° erwärmt. Die Durchführung des Versuchs war dieselbe wie im erwähnten Falle. Es wurde auch mit Phosphorwolframsäure gefällt und das Filtrat verarbeitet. Zunächst schieden sich auch hier Aminosäuren aus beim Einengen der Lösung. Nach längerem Stehen der eingeengten Flüssigkeit waren auffallend große, zu Drusen vereinigte, durchsichtige Krystalle zu beobachten. Sie konnten mechanisch von den übrigen in Blättchen kristallisierenden Produkten getrennt werden. Die Krystalle wurden gesammelt und aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert. Es wurden mehrere Krystallfraktionen erhalten. Die Menge der am schwersten löslichen Krystalle betrug 2,2 g. Sie erwiesen sich als optisch inaktiv.

0,5 g des Präparates wurden 12 Stunden mit der 20fachen Menge 25%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht. Nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt wurde eingeeengt. Es schieden sich bald Krystalle aus, die ganz das Aussehen von Leucin hatten. Ihre Menge betrug 0,31 g. Die Mutterlauge wurde zur Trockene verdampft. Der Rückstand schmeckte süß und zersetzte sich gegen 220°. Da wir Glykokoll vermuteten, übergossen wir die Substanz mit 3 ccm Alkohol und leiteten gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung ein. Es erfolgte bald Krystallisation von Glykokollesterchlorhydrat. Seine Menge betrug 0,40 g. F. 144° (korr.). Es lag somit aller Wahrscheinlichkeit ein aus Glykokoll und Leucin aufgebautes Dipeptid vor. Die weitere Identifizierung des isolierten Produktes bereitete zunächst durch den Umstand Schwierigkeiten, daß das gewonnene Präparat optisch inaktiv war. Die Beobachtung, daß von den in Betracht kommenden Dipeptiden Leucyl-glycin und Glycyl-leucin das letztere nach den Beobachtungen von E. Fischer und O. Warburg¹⁾ mit Kupfersulfat in wässriger Lösung einen blaßblauen Niederschlag liefert, während das erstere diese Erscheinung nicht zeigt, gab uns einen Hinweis, daß unser Präparat sicher nicht Glycyl-leucin war. Es konnte somit nur Leucyl-glycin vorliegen, falls das isolierte Präparat überhaupt ein Dipeptid war. Für letztere Annahme spricht auch das Ergebnis der Analyse.

0,1682 g Substanz gaben 0,3155 g CO₂ und 0,1312 g H₂O.
 0,3152 „ „ brauchten 34,1 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für C ₈ H ₁₀ O ₃ N ₂ :	Gefunden:
C = 51,0%	51,15% C.
H = 8,57%	8,66% H.
N = 14,92%	15,14% N.

Volle Klarheit über die Art des isolierten Produktes brachte schließlich die asymmetrische Spaltung des isolierten Produktes mit Hefepreßsaft.

¹⁾ Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden. XI. mit Otto Warburg, Glycyl-leucin, Alanyl-leucin, Leucyl-alanin, Glycyl-alanyl-leucin und aktives Alanyl-glycin. Liebigs Annalen, Bd. CCCXL, 1905.

0,1890 g dl-Leucyl-glycin
 1,90 ccm Hefepreßsaft
 5,5 > Wasser.

Zeit	Abgelesener Winkel (korrigiert unter Berücksichtigung der Eigendrehung des Preßsaftes).
0 Minuten	0°
15 >	— 0,45°
30 >	— 0,75°
40 >	— 1,10°
60 >	— 1,15°
120 >	— 1,15°

Wir haben gleichzeitig synthetisch dargestelltes dl-Leucyl-glycin unter den gleichen Bedingungen mit der gleichen Menge desselben Preßsaftes gespalten:

Zeit	Abgelesener Winkel (korrigiert)
0 Minuten	0°
15 >	— 0,46°
30 >	— 0,73°
40 >	— 1,08°
60 >	— 1,12°
120 >	— 1,15°

Dieser Versuch zeigt, daß die racemische Substanz so gespalten wird, daß ein nach links drehendes Produkt übrig bleibt. Nun dreht d-Leucyl-glycin, das bei der asymmetrischen Spaltung von dl-Leucyl-glycin sich bildet, nach links und zwar zeigte es $[\alpha]_D^{20} = -85,99^\circ$, während Glycyl-d-leucin nach rechts dreht $[\alpha]_D^{20} = +35,09^\circ$. Der ausgeführte Versuch steht in Analogie mit früher durchgeführten Untersuchungen.¹⁾ Vgl. die Seite 373 angeführte Spaltung von dl-Leucyl-glycin. Der erwähnte Parallelversuch mit synthetischem dl-Leucyl-glycin ergab denselben Verlauf des Abbaus durch Hefepreßsaft.

Alle Beobachtungen — das Ergebnis der Analyse, der totalen Hydrolyse und die Feststellung des fermentativen Abbaus des gewonnenen Produkts, wie alle Eigenschaften (F. 243° [korr.], löslich in zirka der 15fachen Menge heißen Wassers, schwachbitterer Geschmack, Kupfersalz) — sprechen dafür,

¹⁾ Vgl. Emil Abderhalden und A. H. Koelker, Zur Kenntnis des Verlaufs der fermentativen Polypeptidspaltung, Diese Zeitschrift, Bd. LIV. S. 363 (373), 1908.

daß das isolierte Dipeptid Leucyl-glycin ist. Unsere Beweisführung weist insofern noch eine Lücke auf, als wir das bei der Fermentspaltung entstehende optisch-aktive Produkt und die sich bildenden Aminosäuren — Leucin und Glykokoll — nicht in genügender Weise isoliert haben. Wir haben 0,25 g des isolierten Produktes mit Hefepreßsaft gespalten und, nachdem die Drehung ein bestimmtes Maximum erreicht hatte (Linksdrehung), das Gemisch aufgeköcht, filtriert und zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde verestert und es gelang, Glykokoll als Esterchlorhydrat abzuscheiden. Leider war die Menge des angewandten Produktes zu gering, um mit genügender Aussicht auf Erfolg die Ester aus ihren Chlorhydraten in Freiheit zu setzen und zu destillieren. Wir verzichteten deshalb auf den Nachweis des Leucins und verdampften die nach dem Abfiltrieren des salzsauren Glykokollesters verbleibende Flüssigkeit zur Trockene. Den Rückstand übergossen wir mit alkoholischem Ammoniak. Nach einigem Stehen bei 37° erfolgte krystallinische Abscheidung. Nach allen Eigenschaften lag ein Anhydrid vor. Es war optisch-aktiv. Zu einer genaueren Bestimmung reichte die Substanzmenge nicht aus. Jedenfalls ergibt der Versuch soviel, daß Glykokoll und ein optisch-aktives Dipeptid bei der Fermenthydrolyse entstanden waren.

Uns scheint der eingeschlagene Weg, um bei der partiellen Hydrolyse mit Mitteln, wie Baryt, die eine Racemisierung der Spaltprodukte herbeiführen, entstandene Abbauprodukte zu identifizieren, sehr aussichtsreich. Die Benutzung der Fermente als Reagens auf die Art vorhandener Spaltprodukte wird unzweifelhaft noch in vielen Fällen eine Entscheidung herbeiführen.

Die Mutterlauge des Leucyl-glycins enthielt sehr wahrscheinlich noch Glycyl-leucin, denn sie gab mit Kupfersulfat eine blaßblaue Fällung. Die Menge des isolierten Produkts reicht vorläufig zu einer genaueren Untersuchung nicht aus. Erwähnt sei noch, daß sich die erwähnten Befunde mit der früheren Auffindung von l-Leucyl-glycin-anhydrid decken.¹⁾

¹⁾ Emil Abderhalden und Emil Fischer, Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse von Proteinen, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXIX, S. 2315, 1906.