

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

Von

Emil Abderhalden.

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

(Der Redaktion zugegangen am 11. November 1909.)

Wie jüngst¹⁾ mitgeteilt worden ist, ist es geglückt, unter den bei der partiellen Hydrolyse von Seidenfibroin mit 70%iger Schwefelsäure entstehenden Abbauprodukten Glycyl-l-tyrosin zu isolieren. Aus der Mutterlauge dieses Dipeptids ist nun ferner d-Alanyl-glycin in größerer Menge gewonnen worden.

Das ursprüngliche, in der vorhergehenden Mitteilung¹⁾ erwähnte Hydrolysat schied beim weiteren Stehen immer wieder Krystalle ab. Diese waren mit amorphen, die Biuretreaktion gebenden Produkten vermischt. Das beste Resultat wurde erhalten, wenn der nach der Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt (vgl. die vorhergehende Mitteilung¹⁾) und Verdampfen des Filtrates verbleibende Rückstand in der fünffachen Menge Wasser gelöst wurde. Zu der heißen, mit Tierkohle behandelten Lösung wurde dann solange unter fortwährendem Kochen tropfenweise absoluter Äthylalkohol zugefügt, bis die jeweiligen beim Zusatz des Alkohols entstehende Trübung beim Umschütteln bestehen blieb oder gerade noch verschwand. Im günstigsten Falle trat sofort Krystallisation ein. Meist erfolgte erst nach 24 Stunden Krystallabscheidung. Die zuerst erscheinenden Krystalle waren tyrosinhaltig und erwiesen sich als Glycyl-l-tyrosin. Die Gesamtausbeute an diesem Dipeptid beläuft sich auf 4—5 g auf 100 g Seidenfibroin berechnet. Ein Teil des Tyrosins des Seidenfibroins war als solches im Hydrolysat vorhanden. Beim Ein-

¹⁾ Emil Abderhalden, Weiterer Beitrag zur Kenntnis der bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen auftretenden Spaltprodukte, Diese Zeitschrift, Bd. LXII, S. 315, 1909.

engen der Mutterlaugen des Glycyl-l-tyrosins ergab die Wiederholung des Alkoholzusatzes in der Hitze wieder Krystallabscheidung. Auch diese Krystallfraktionen, deren Menge roh 12 g betrug — verarbeitet wurde nach der angeführten Methode ca. $\frac{1}{5}$ des gesamten Hydrolysates, entsprechend ca. 100 g Seidenfibroin — gaben Millons Reaktion. Sie war jedoch erheblich schwächer als bei Anwendung von reinem Glycyl-l-tyrosin. Diese Krystallfraktion ließ sich durch Auslaugen mit kaltem Wasser leicht in eine tyrosinhaltige, ungelöst bleibende und eine tyrosinfreie, in Lösung gehende Fraktion trennen. Wurde die letztere Lösung konzentriert und dann mit Alkohol bis zur eben bleibenden Trübung versetzt und nun umgeschüttelt, dann trat spontan Krystallisation ein. Bald wurden feine Nadelchen, bald rhombische, schmale Blättchen, bald zu Aggregaten verwachsene derbe Krystalle erhalten. Die Gesamtausbeute an reinen Krystallen betrug 3,8 g. Es unterliegt keinem Zweifel, daß aus der Mutterlauge noch weitere Mengen von diesen Krystallen zu erhalten sind.

Die isolierten Krystalle schmecken ganz schwach bitter. Sie zersetzen sich unter Bräunung und Gasentwicklung nicht scharf gegen 234—235° (korr.). Die totale Hydrolyse von 2 g des isolierten Produktes ergab nur die Aminosäuren d-Alanin und Glykokoll. Letzteres wurde in Form seines salzsauren Esters isoliert und ersteres durch seine spezifische Drehung und durch die Kupferbestimmung seines Kupfersalzes identifiziert. Die Ausbeute betrug 1,08 g d-Alanin ($[\alpha]_{20}^D = +9,80^\circ$ (salzsaures Salz)) und 0,95 g Glykokoll.

0,4702 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der Lösung 4,8001 g. $d = 1,033$. $\alpha = 4,92^\circ$ nach rechts bei 20° im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht. $[\alpha]_{20}^D = +48,55^\circ$.

Eine weitere Bestimmung mit einem anderen Präparat ergab 48,75° und eine dritte + 48,20°.

0,1538 g Substanz gaben 0,2283 g CO₂ und 0,0933 g H₂O.

0,1394 „ „ „ 23,2 ccm N [18°, 763 mm].

Berechnet für d-Alanyl-glycin C₅H₁₀O₃N₂ (Mol.-Gew. 146):

C 41,10%, H 6,85% und N 19,18%.

Gefunden: C 40,48%, H 6,74% und N 19,22%.

Das synthetisch dargestellte d-Alanyl-glycin zeigt die gleiche Krystallform, zersetzt sich gegen 235° (korr.) und besitzt $[\alpha]_{20}^D = + 50,2^{\circ}$.¹⁾ Die Mischung unseres Präparates mit dem synthetisch gewonnenen d-Alanyl-glycin hatte ebenfalls 235° als Zersetzungspunkt. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß das von uns aus Seidenfibroin gewonnene Produkt d-Alanyl-glycin ist, eine Annahme, welche noch durch die Überführung des Esters in das Anhydrid und endlich durch die Verfolgung des Abbaues des isolierten Produktes durch Hefepreßsaft gesichert wurde.

1 g des Dipeptids wurde mit 15 ccm absolutem Alkohol übergossen und gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Die heiß filtrierte Lösung wurde dann unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, der Rückstand mit alkoholischem Ammoniak übergossen und die Lösung drei Tage im Brutraum aufbewahrt. Sie wurde dann zur Trockene verdampft und der Rückstand aus heißem Alkohol nach erfolgtem Filtrieren und Behandeln mit Tierkohle umkrystallisiert. Das Produkt fiel in feinen Nadelchen aus, gab beim Kochen mit Kupferoxyd keine Blaufärbung und zersetzte sich gegen 242° (korr.).

2 ccm $\frac{1}{1000}$ -mol. Dipeptidlösung

2 „ Hefepreßsaft.

2,5 „ physiol. Kochsalzlösung.

Zeit in Minuten	Abgelesener Winkel in Graden
0	+ 0,62
15	+ 0,45
45	+ 0,30
90	+ 0,15
120	+ 0,05
180	- 0,05
210	- 0,15
280	- 0,15
320	- 0,14
600	- 0,14

Mit der Isolierung des d-Alanyl-glycins und des Glycyl-l-tyrosins sind zwei Dipeptide auf direktem Wege unter den

¹⁾ Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden. XIII. Chloride der Aminosäuren und Polypeptide und ihre Verwendung zur Synthese. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVIII, S. 2914, 1905.

Abbauprodukten des Seidenfibroins nachgewiesen worden, welche früher schon in Form ihrer Anhydride¹⁾ gewonnen worden waren. Es blieb damals unentschieden, welchen Dipeptiden diese beiden Anhydride entsprechen. Später konnte unter den Abbauprodukten des Seidenfibroins mit Hilfe von β -Naphthalinsulfochlorid β -Naphthalinsulfo-glycyl-d-alanin²⁾ in allerdings geringer Ausbeute isoliert werden. Mit dem Befunde von d-Alanyl-glycin ist somit ein drittes Dipeptid festgestellt, das nach unseren jetzigen Beobachtungen an Menge das Glycyl-d-alanin zu überwiegen scheint. Unentschieden ist zurzeit noch die Frage, ob die verschiedenen Seidenarten dieselben Dipeptide bei der partiellen Hydrolyse liefern. Es ist wohl möglich, daß hier Verschiedenheiten bestehen, auf die wir wiederholt hingewiesen haben, ein Problem, mit dessen Prüfung wir zurzeit beschäftigt sind. Die direkte Isolierung der genannten Dipeptide zeigt, daß es bei sorgfältiger Auswahl der Versuchsbedingungen möglich ist, Polypeptide unter den Abbauprodukten von Proteinen ohne Zuhilfenahme von Derivaten zu gewinnen. Diese Befunde ermuntern zu weiterem Suchen nach solchen Abbaustufen bei anderen Proteinen.

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroins, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXIX, S. 752, 1906, und Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine, Ebenda, Jg. XXXIX, S. 2315, 1906.

²⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XL, S. 3544, 1907.