

## Über den Abbau von Eiweiß.

Von

M. Dennstedt und F. Haßler.

---

(Mitteilung aus dem Chemischen Staatslaboratorium in Hamburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. Juli 1906.)

---

Unter dem gleichen Titel ist bereits im Jahre 1901 auf der Naturforscherversammlung in Hamburg berichtet worden<sup>1)</sup> und zwar über den Abbau von Weizenfibrin und Zein durch Kochen mit verdünnter Barytlösung und mit Wasser unter Druck.

Wir hatten damals als leitenden Gedanken festgelegt, daß eine Aufklärung über den Abbau des Eiweißes zu Albumosen und Peptonen oder allgemeiner zu Proteosen und damit Rückschluß auf die Konstitution des Eiweißes bei der offenbaren Kompliziertheit des Vorgangs nur dann zu erhoffen sei, wenn man nicht, wie meist üblich gewesen, von den käuflichen Peptonen, sondern von einem reinen Eiweißstoff ausgeht. Zu unserer Genugtuung ist später auch Pick<sup>2)</sup> zu derselben Überzeugung gelangt, wenn wir uns ihm darin auch nicht anzuschließen vermögen, daß man von krystallisierten Eiweißstoffen ausgehen müsse, da nach unserer Meinung die angebliche Krystallisation des Eiweißes durchaus keine Gewähr für seine Reinheit gibt. Ein beliebiges als rein d. h. als chemische Verbindung erkanntes Eiweiß sollte dann den verschiedenen Verfahren des schrittweisen Abbaus, nämlich Verdauung, Fäulnis mit Reinkulturen, Einwirkung von Säure, von Alkali und Wasser unter Druck, der Reihe nach unterworfen und die erhaltenen Proteosen rein dargestellt und endlich die reinen Produkte unter einander verglichen und schließlich einzeln bis zu den letzten Produkten aufgespalten werden. Wir hatten ferner die

---

<sup>1)</sup> M. Dennstedt, Chem. Ztg., 1901, S. 814 u. 832.

<sup>2)</sup> E. P. Pick, Beiträge zur chem. Physiologie, 1902, S. 481.

Überzeugung ausgesprochen, daß dieses Ziel entgegen den jetzt fast allgemein herrschenden Ansichten der physiologischen Chemiker nur mit Hilfe der Elementaranalyse zu erreichen sei, denn nur durch sie ist die Reinheit des Ausgangsmaterials und der erhaltenen Produkte zu konstatieren.

Wir waren damals, indem wir Weizenfibrin und Zein in diesem Sinne verschiedenen abbauenden Verfahren unterwarfen, kurz gefaßt zu folgendem Ergebnis gekommen: Alle Proteosen, gleichgültig durch welchen Vorgang sie entstehen, sind ausgesprochene Säuren. Die Bildung der Proteosen aus den Proteinen ist keine einfache hydrolytische Spaltung, sondern ein chemischer Vorgang, bei dem stets Stickstoff als Ammoniak, meist auch Schwefel als Schwefelwasserstoff abgespalten wird, gleichzeitig kann daneben auch Wasseraufnahme, unter Umständen auch Oxydation erfolgen.

Diese Sätze stehen zwar einigermaßen im Widerspruch mit den üblichen Anschauungen, sie sind deshalb aber nicht weniger richtig.

So werden im allgemeinen die Albumosen und Peptone für Zwitter angesehen, die sowohl mit Basen wie mit Säuren Salze bilden, deren basischer Charakter aber vorherrschend. Nur Siegfried<sup>1)</sup> hat aber erst nach uns 1903 und nur für die von ihm hergestellten reinen Peptone klar und deutlich ausgesprochen, daß sie sämtlich ausgesprochene Säuren seien.

Daß man den Säurecharakter so oft und so lange übersehen hat, beruht darauf, daß viele gegen Lackmus nicht sauer reagieren, sie sind jedoch, wie z. B. das käufliche Wittepepton so starke Säuren, daß sie aus Baryumcarbonat beim Erwärmen Kohlensäure abspalten.

Oft wird der Säurecharakter dadurch verdeckt, daß sich nicht die freien Proteosen, sondern deren Ammoniaksalze bilden, so z. B. bei der Einwirkung von Wasser unter Druck, auch bei der Verdauung.

Die Beobachtung, daß bei der Pepsinverdauung nach einiger Zeit die freie Salzsäure verschwindet, was von Paal<sup>2)</sup> und

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, 1903, S. 259.

<sup>2)</sup> Berichte, Bd. XXV, S. 1202.

Cohnheim<sup>1)</sup> dadurch erklärt wird, daß sich die gebildeten Peptone mit der Säure verbunden haben, wird ungezwungen so erklärt, daß das abgespaltene Ammoniak die Salzsäure neutralisiert.

Immerhin soll nicht bestritten werden, daß Eiweißstoffe und somit auch Albumosen und Peptone Säuren festhalten können, wohl aber fehlt noch der Beweis, daß es sich hier um wohl definierte chemische salzartige Verbindungen von konstanter Zusammensetzung handelt.

Da es zunächst genügte, das aufgestellte Programm mit einem einzigen Protein durchzuführen, so beschränkten wir jetzt unsere Versuche auf das Maisfibrin oder Zein, das in Alkohol löslich ist und daher bei seinem Abbau ebenfalls in Alkohol lösliche Proteosen liefert, was deren Trennung und Reindarstellung erleichtern muß.

Das Zein ist bekanntlich zuerst von Ritthausen, wie er glaubte, in reinem Zustande dargestellt worden. Er gibt folgende Zusammensetzung für aschefreie, bei 130—140° getrocknete Substanz an:

$$H = 7,45, C = 54,66, N = 15,50, S = 0,69\%.$$

Der Mais ist jedoch sehr fettreich, dieses Fett wird vom Zein mit außerordentlicher Hartnäckigkeit festgehalten und läßt sich durch einfaches Ausäthern nicht vollständig entfernen, man muß vielmehr so oft in Alkohol auflösen und durch Wasser fällen, trocknen und ausäthern, bis das so erhaltene, getrocknete und fein gepulverte Produkt auch nach Stunden keine Spur von Fett mehr an Äther abgibt. Wir haben schon früher nachgewiesen, daß beim Trocknen von Eiweißstoffen bei 100° oder gar darüber immer die Gefahr vorliegt, daß auch chemisch gebundenes Wasser abgegeben wird. Die für die Elementaranalyse bestimmten Produkte dürfen unter allen Umständen nur bei gewöhnlicher Temperatur über Phosphorsäureanhydrid bis zu konstantem Gewicht getrocknet werden.

Ritthausens reines Zein war noch immer fetthaltig und hat offenbar bei 130—140° schon Wasser abgegeben.

---

<sup>1)</sup> Zeitschrift für Biologie, Bd. XXXIII, S. 489.

Reines Zein hat vielmehr, wie wir an zahlreichen verschiedenen Präparaten festgestellt haben, folgende Zusammensetzung:

$$H = 7,27, C = 54,28, N = 16,00, S = 0,77\%.$$

Noch viel weniger wie Ritthausen haben Chittenden und Osborne<sup>1)</sup> und W. Szumowski<sup>2)</sup> reines Zein in Händen gehabt. Szumowski hat sein Präparat durch Lösen des Rohzeins in verdünntem Alkali und Fällen mit Kohlensäure oder anderen Säuren gereinigt. Hätte er seine Präparate durch die Elementaranalyse geprüft, so würde er sich überzeugt haben, daß das Zein hierbei schon eine Veränderung erleidet und daß die von ihm beschriebene wasserlösliche «Modifikation», die er durch Einwirkung 0,5% iger Alkalilösung hergestellt hat, überhaupt kein Zein mehr ist, sondern aus Proteosen besteht.

Handelt es sich um die Darstellung nur kleiner Mengen reinen Zeins, z. B. für die Analyse, so verfährt man am besten wie folgt:

Ausgesuchter reiner, reifer Mais wird geschrotet, im Soxhlet mit Äther extrahiert und mindestens dreimal mit viel kaltem Wasser unter Zusatz von etwas Toluol einige Zeit durchgeschüttelt, wodurch eine geringe Menge Albumin, dessen Reindarstellung nicht gelang, viel Zucker- und dextrinartige Stoffe und viel Mineralsalze in Lösung gehen. Das mit Wasser erschöpfte Maisschrot wird mit viel 80% igem Alkohol wiederholt in der Kälte ausgezogen, die klar filtrierte Extrakte werden im Vakuum auf ein nicht zu kleines Volumen eingedampft und vorsichtig tropfenweise in viel kaltes Wasser gegossen. Durch Zusatz von Kochsalz zu der milchigen Flüssigkeit erhält man einen feinflockigen, weißen Niederschlag, der mit viel Wasser durch Dekantieren ausgewaschen und dann auf Fließpapier an der Luft getrocknet wird. Das so erhaltene Zein enthält noch immer Fett, das nur, wie schon angegeben, durch wiederholtes Auflösen in Alkohol, Fällen mit Wasser usw. und Extraktion des feinen Pulvers mit Äther entfernt werden kann. Die absolute

<sup>1)</sup> s. Gießmayer, Die Proteide, S. 38.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 201.

Reinheit des Produkts kann nur durch die Elementaranalyse festgestellt werden.

Handelt es sich um die Darstellung großer Mengen Zeïns, so gelangt man weniger umständlich wie folgt zum Ziel:

Der geschrotene Mais wird direkt bei  $60^{\circ}$  mit 80%igem Alkohol ausgezogen, die alkoholischen Lösungen im Vakuum eingeeengt und mit Wasser und Kochsalz gefällt. Der lufttrockne Niederschlag wird im Soxhlet mit Äther entfettet, wieder in Alkohol gelöst, mit Wasser und Kochsalz gefällt, gut ausgewaschen und nochmal mit Äther extrahiert. Dieses Produkt enthält noch einen stickstoffärmeren Körper, der sich dadurch entfernen läßt, daß man die blankfiltrierte alkoholische Lösung in ganz verdünntes Ammoniak gießt und mit Kochsalz fällt. Der gut ausgewaschene Niederschlag stellt für den Abbau genügend reines Zeïn dar.

Nachdem wir uns überzeugt hatten, daß bei der Aufspaltung des Zeïns durch Wasser unter Druck und durch Kochen mit verdünnter Barytlösung Proteosen gleicher Art gewonnen werden, daß also die Atmoid- und die Alkaliproteosen sehr ähnlich, wenn nicht gar identisch sind, haben wir uns nur noch des zweiten Verfahrens bedient, weil man dabei durch Unlöslichwerden (Koagulieren) eines Teils Zeïns weniger Verluste erleidet und weil man beim Kochen mit verdünnter Barytlösung die Zersetzung mehr in der Hand hat. Das koagulierte Zeïn hatte nur dann mit dem ursprünglichen annähernd übereinstimmende Zusammensetzung, wenn das Erhitzen unter Druck nur kurze Zeit fortgesetzt und nicht zu hoch getrieben wurde, es wird dabei immer stickstoff- und schwefelärmer, ohne daß man zu einer Verbindung konstanter Zusammensetzung käme. Beim Kochen mit verdünnter Barytlösung ist diese Koagulation geringer.

Ebenso wie die Aufspaltung mit Wasser um so weiter fortschreitet, je höher und je länger man erhitzt, ebenso geschieht das beim Kochen mit Baryt, je länger man erhitzt und je stärker die Barytlauge genommen wird. Will man daher, worauf es uns ankam, möglichst die nächsten, also die dem Zeïn noch ähnlichsten Abbauprodukte erhalten, so wendet man

verdünntes Barytwasser und kurze Kochdauer an. Die Menge des abgespaltenen Stickstoffs und Schwefels wächst mit der Kochdauer und der Konzentration der Barytlösung, überschreitet aber eine bestimmte Grenze nicht.

Wir verfahren wie folgt: Je 10 g Zein wurden mit 1400 g Wasser und 4 g Baryt 1 Stunde gekocht, die Menge des als Ammoniak abgespaltenen Stickstoffs beträgt dann etwa 0,18%. In Lösung gehen dabei etwa 60% des Zeins, sodaß sich der abgespaltene Stickstoff auf etwa 0,30% berechnet. Bei der Bestimmung des Ammoniaks wurde, um es aus der Flüssigkeit vollständig auszutreiben, zum Schluß im Vakuum destilliert.

Die klarfiltrierte Lösung, die die Barytsalze der Proteosen enthält, haben wir anfangs durch Quecksilberchlorid und Bleiacetat gefällt und die Quecksilber- und Bleisalze mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Da wir aber auf diese Weise unverhältnismäßig schwefelreiche Körper erhielten, sodaß wir annehmen mußten, daß ein Teil des Schwefels aus dem Schwefelwasserstoff stammte, so haben wir dieses Verfahren verlassen, die Barytsalze vielmehr einfach mit der berechneten Menge Schwefelsäure zerlegt, nachdem der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt war.

Diese Methode empfiehlt sich überhaupt zur Reingewinnung der Proteosen, die man ja nach jedem Verfahren, z. B. auch bei der Verdauung und der Fäulnis, entweder in saurer Flüssigkeit oder als Ammonsalze erhält. Namentlich der letzte Umstand ist oft übersehen und die Ammonsalze für reine Proteosen (Albumosen und Peptone) gehalten worden, wie sich aus den vielfach in der Literatur verzeichneten, unmöglich hohen Stickstoffzahlen ergibt.

Zur Trennung und Reinigung führt man seine Proteosen, wenn sie als freie Säuren vorliegen, wie z. B. im Wittepepton durch Erwärmen mit feingepulvertem gefällten Baryumcarbonat auf dem Wasserbade, wenn sie als Ammonsalze vorliegen, durch Zusatz von verdünnter Barytlösung bis zu schwachem Überschuß in die Barytsalze über. In letzterem Falle wird das Ammoniak im Vakuum, indem man darauf achtet, daß nicht über 40° erwärmt wird, abdestilliert und die geringe Menge

überschüssigen Baryts durch Kohlensäure in der Wärme ausgefällt.

In einem aliquoten Teile der so oder so erhaltenen klar filtrierten Barytsalzlösung wird der Baryt einfach dadurch bestimmt, daß man etwa 10 ccm mit Schwefelsäure ansäuert, zuerst auf dem Wasserbade, dann über freier Flamme zur Trockene eindampft und schließlich glüht und den so erhaltenen schwefelsauren Baryt wägt. Mit etwas weniger als der auf die Gesamtmenge berechneten Menge Schwefelsäure wird nun der Baryt ausgefällt und das Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft. War die Barytsalzlösung sehr konzentriert, so fällt mit dem Baryumsalz auch ein kleiner Teil der Proteosen aus, die man dem Niederschlage aber leicht mit etwas Alkohol entziehen kann. Diese alkoholische Lösung wird mit dem ersten Trockenrückstande vereinigt und mit diesem zusammen bis zur Staubtrockene eingedampft.

Die erhaltenen Proteosen sind nicht nur in Äthylalkohol, sondern auch in Methyl-, Propyl- und Amylalkohol löslich, die Löslichkeit sinkt mit steigendem Molekulargewicht des Alkohols, sodaß man diese Eigenschaft zur Trennung und Reinigung mit benutzen kann.

Wir verfahren dabei folgendermaßen:

Der sorgfältig über Schwefelsäure getrocknete, fein gepulverte Rückstand wurde auf dem Wasserbade in möglichst wenig siedendem trockenen Methylalkohol gelöst, von dem geringen, noch aus Barytsalz bestehenden Rückstand im Heißwassertrichter abfiltriert. Beim Erkalten scheidet sich ein großer Teil der Proteosen mit fast krystallinischem Aussehen und rein weiß ab. Eine zweite Fällung kann man erhalten, wenn man den Methylalkohol zum Teil abdestilliert. Da sich die Flüssigkeit dabei jedoch merklich dunkler färbt, so haben wir es vorgezogen, dadurch eine zweite Fällung zu erzielen, daß wir das Filtrat einige Zeit in die Kältemischung stellten. Die erhaltenen Niederschläge konnten zwar aus heißem Methylalkohol «umkrystallisiert» und so von rein weißer Farbe und sehr schönem Aussehen — mit bloßem Auge betrachtet machte der Körper einen durchaus krystallinischen Eindruck — erhalten werden,

durch die Elementaranalyse konnten wir uns aber überzeugen, daß wir unmöglich einen reinen Körper, d. h. eine einheitliche chemische Verbindung unter Händen hatten.

Wenn aus dem Filtrat selbst durch langandauerndes Abkühlen ein Niederschlag nicht mehr zu erzielen war, wurde der Methylalkohol abdestilliert, der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet, pulverisiert und nun in gleicher Weise mit trockenem Äthylalkohol, dann ebenso mit Propylalkohol und Amylalkohol behandelt, die entsprechenden Niederschläge immer wieder aus dem entsprechenden Alkohol «umkrystallisiert», nachdem man sich überzeugt hatte, daß aus Alkohol niederen Molekulargewichts ein Niederschlag nicht mehr erzielt werden konnte.

Auf diese Weise wurden, indem man das Verfahren, wir können wohl behaupten, mit unerschöpflicher Geduld solange wiederholte, bis die einzelnen Fraktionen nur noch aus wenigen Grammen bestanden, wiewohl wir von einigen hundert Gramm Proteosen ausgegangen waren, eine große Zahl von Fraktionen erhalten, von denen wir annehmen zu dürfen glaubten, daß sie mindestens 6 reinen Körpern, nämlich je 2 Fraktionen aus Methyl-, Äthyl- und Amylalkohol, die Fraktion aus Propylalkohol war auf so geringe Mengen zusammengesmolzen, daß wir an einen einheitlichen Körper dieser Fraktion nicht mehr zu glauben vermochten.

In allen Fällen ergaben jedoch die Elementaranalysen — die Anzahl wollen wir nicht nennen, um uns nicht dem Vorwurfe der Übertreibung auszusetzen, die Arbeit war auch nur mit Hilfe der vereinfachten Methode<sup>1)</sup> zu bewältigen —, daß wir noch nicht einheitliche Körper unter Händen hatten, daß also eine glatte Trennung so nicht möglich war. Das konnten wir jedoch mit einiger Sicherheit konstatieren, daß die Proteosen aus den niedrigeren Alkoholen im allgemeinen stickstoffreicher und kohlenstoffärmer und daher als dem Zein noch näher stehend und als weniger weit abgebaut angesehen werden konnten. Sämtliche Körper waren schwefelhaltig und enthielten meist noch 0,1—0,2%.

<sup>1)</sup> s. M. Dennstedt, Anleitung zur vereinfachten Elementaranalyse, 2. Auflage, 1906, Hamburg, Otto Meißners Verlag.

Wir mußten uns daher nach anderen Trennungsmethoden umsehen. Da die schwerlöslichen Metallverbindungen (Quecksilber, Blei usw.) uns aus den schon erörterten Gründen nicht brauchbar erschienen, so blieb trotz der schon früher von uns geäußerten Bedenken nichts übrig, als die Ammonsulfatfällungen der Hofmeisterschen Schule zu versuchen. Diese Bedenken wurzelten hauptsächlich darin, daß uns bisher noch nicht genügend sicher durch die Elementaranalyse bewiesen erschien, daß die fraktionierten Fällungen unter allen Umständen tatsächlich aus chemisch reinen einheitlichen Körpern bestehen, die man unter denselben Bedingungen stets rein und von gleicher Zusammensetzung wiedererhalten muß, außerdem glaubten wir und wir glauben es noch, daß das mit den Fällungen niedergerissene Ammonsulfat wenigstens mit den bisher angewendeten Methoden nicht vollständig entfernt werden kann; endlich lag die Gefahr vor, und das ist ein Punkt, der überhaupt bisher noch nicht berücksichtigt wurde, daß man bei dem stark sauren Charakter der Proteosen nicht diese selbst, sondern ihre Ammonsalze erhält.

Die durch Behandlung mit den verschiedenen Alkoholen erhaltenen Proteosen wurden nunmehr im Sinne Hofmeisters in möglichst neutraler Lösung — wir lösten die einzelnen Fraktionen in etwa der zehnfachen Menge Wasser unter tropfenweisem Zusatz ganz verdünnten Ammoniaks — fraktioniert gefällt, indem wir zunächst soviel gesättigter Ammonsulfatlösung zugaben, daß die entstehende Lösung zu  $\frac{1}{6}$  aus gesättigter Ammonsulfatlösung bestand. Von dem entstandenen Niederschlage wurde nach einem Tage abfiltriert und weiter gesättigte Ammonsulfatlösung zugegeben bis zur  $\frac{1}{3}$  Konzentration. Wieder nach 24 Stunden vom Niederschlage abfiltriert und das Filtrat auf  $\frac{1}{2}$  und das Filtrat von diesem Niederschlage auf  $\frac{3}{4}$  gesättigt. Die Filtrate von dieser letzten Fällung wurden auf dem Wasserbade bis zum Ausscheiden des Ammonsulfats eingengt, mit diesem schieden sich aber nur noch wenig Proteosen ab und in dem Filtrat davon waren nur noch Spuren, aber doch immer noch in nachweisbarer Menge organischer Substanz vorhanden.

Die einzelnen Fraktionen wurden dann von neuem gelöst und demselben Gange noch weiter mehrere Male unterworfen; dabei zeigte sich dann sehr bald, daß tatsächlich bestimmte Fällungsgrenzen wenigstens in dem Sinne existieren, daß die Fällung haarscharf bei einem bestimmten Punkte beginnt, in keiner Weise aber war zu erreichen, daß die Fällung ebenso scharf bei einem bestimmten Punkte endigte. Das war nicht nur im Anfange so, sondern blieb auch, wenn man die Sache sechsmal und mehr mit einer Fällung wiederholte, immer wurde noch etwas organische Substanz bis zur Ganzsättigung mitgeschleppt, trotzdem konnte man schließlich, wie die Elementaranalyse bewies, auf diese Weise zu reinen Körpern gelangen. Hofmeister hat daher und zwar noch mehr, als er wohl selbst geahnt hat, mit seinem Vergleiche recht, nämlich daß diese Fällungsgrenzen ebenso charakteristisch für den Eiweißstoff sind, wie etwa der Löslichkeitsgrad für einen krystallisierten Körper. Hier wie dort wird bei bestimmter Konzentration und unter sonst gleichen Bedingungen haarscharf bei demselben Punkte die Abscheidung beginnen, während aus der nicht gesättigten Lösung, da es absolut unlösliche Körper nicht gibt, völlige Abscheidung an einem bestimmten Grenzpunkte unmöglich eintreten kann.

Es war nun noch die Aufgabe zu lösen, die Fällungen von dem anhaftenden Ammonsulfat und dem gebundenen Ammoniak vollständig zu befreien. Das gelang in folgender Weise: Der Niederschlag wird in Wasser gelöst und vorsichtig mit ganz verdünnter Barytlösung bis zur alkalischen Reaktion gegen Lackmus versetzt. Man destilliert nun im Vakuum aus dem Wasserbade bei höchstens  $40^{\circ}$  das Ammoniak ab, bis die Lösung nicht mehr auf Neßler reagiert. Für diese Vakuumdestillationen, namentlich sobald es sich nicht mehr um zu geringe Mengen handelte, hat sich der bekannte Soxhletsche Destillationsapparat außerordentlich bewährt. Sobald alles Ammoniak übergegangen ist, wird in einem aliquoten Teil der filtrierten Lösung in der schon beschriebenen Weise das Baryum bestimmt und aus der ganzen Menge mit der berechneten Menge bis auf eine kleine Spur Baryt, um sicher keine freie Schwefelsäure zurückzubehalten,

ausgefällt. Das Filtrat wird dann von neuem bis zur Trockene eingedampft, getrocknet und in der beschriebenen Weise mit den verschiedenen Alkoholen behandelt.

Nachdem wir uns endlich durch die Elementaranalyse überzeugt hatten, daß man so zu reinen, wohl definierten Körpern gelangen kann, der eingeschlagene Weg also wirklich gangbar ist, haben wir das Verfahren dadurch vereinfacht, daß wir die ursprüngliche, mit Kohlensäure gefällte und filtrierte Barytlösung sofort mit Ammonsulfat und zwar in noch engeren Grenzen 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75 und 1-Sättigung fällten. Die erste 0,1-Fällung enthielt den ganzen Baryt als Sulfat. Die einzelnen Fällungen gleicher Konzentration wurden anfangs mit einander vereinigt von der fünften Wiederholung an, im ganzen wurde 6—7 mal gefällt, wurde jeder Niederschlag besonders gelassen, die Fällung begann dann immer scharf bei der ihnen eigentümlichen Konzentration.

Die Niederschläge sind stets etwas weniger ammoniakalisch, als die Lösungen; es muß daher immer wieder beim Auflösen eine Spur Ammoniak hinzugegeben werden.

Waren die Niederschläge nach der siebenten Wiederholung soweit getrennt, wie das auf diese Weise überhaupt möglich ist, so wurden sie in Wasser gelöst und nach Zusatz von verdünnter Barytlösung bis zur schwach alkalischen Reaktion im Vakuum bei höchstens 40° solange destilliert, bis sich im Rückstande mit Neßlers Reagens kein Ammoniak mehr nachweisen ließ. Nachdem in der Wärme Kohlensäure eingeleitet war, wurde in einem aliquoten Teil des klaren Filtrats die Menge des Baryts wie schon beschrieben bestimmt, aus der Hauptlösung durch die berechnete Menge Schwefelsäure bis auf eine Spur ausgefällt und das Filtrat auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand pulverisiert und über Schwefelsäure getrocknet.

Jetzt begann die schon beschriebene Trennung mit Methyl-, Äthyl-, Propyl- und Amylalkohol, die so oft wiederholt wurde, bis die betreffende Fraktion aus dem entsprechenden Alkohol fast vollständig ausfiel. Für die Analyse wurde nicht bei 100°, sondern über Phosphorsäureanhydrid bis zu konstantem Ge-

wichte getrocknet, vor dem Trocknen auch noch jedesmal solange mit Äther im Soxhlet extrahiert, bis auch keine Spur Fett mehr hineinging, d. h. bis aus dem ganzen Äther beim Verdampfen auf dem Uhrglase auch nicht mehr ein Hauch von Fett zurückblieb. Die einzelnen Körper wurden erst dann als rein angesehen, wenn die Analysen mit der nochmal in Ammoniak gelösten, mit Ammonsulfat in entsprechender Konzentration gefällten, wieder in Freiheit gesetzten und aus dem entsprechenden Alkohol «umkrystallisierten» Substanz übereinstimmten.

Man sieht, ein langer und mühsamer, aber kaum abzukürzender Weg, bei dem die Substanzen immer mehr zusammenschmolzen, sodaß schließlich von den wirklich als rein anzusehenden Körpern immer nur noch wenige Gramm zur Verfügung standen, obwohl wir den Mais zentnerweise und das reine Zein kilowise verarbeitet. Allerdings ging der größte Teil bei der Ausarbeitung des Verfahrens verloren.

In die beigegebene Tabelle haben wir nur die Körper aufgenommen, deren Zusammensetzung uns als einigermaßen sicher festgestellt angesehen werden kann. In größter Menge entstehen und wegen ihrer Schwerlöslichkeit am leichtesten zu reinigen sind die Körper aus Methylalkohol, von denen die 0,1<sup>a</sup> und 0,15<sup>a</sup>, die 0,2<sup>a</sup> und 0,3<sup>a</sup>, und endlich die 0,4<sup>a</sup> und 0,5<sup>a</sup> Fällungen als identisch anzusehen sind. Ebenfalls identisch sind wahrscheinlich 0,1<sup>b</sup> und 0,15<sup>b</sup>, 0,3<sup>b</sup> und 0,4<sup>b</sup>, vielleicht auch 0,5<sup>b</sup>, ferner 0,15<sup>e</sup> und 0,2<sup>e</sup>.

Sämtliche Körper enthalten noch Schwefel, meist 0,1—0,2%, der für sie als durchaus charakteristisch anzusehen ist, sodaß sich dadurch sehr wohl eine Grenze zwischen ihnen und Fischers Polypeptiden, mit denen diese Proteosen sonst Ähnlichkeit haben, ziehen läßt.

Als Kontrolle für die Einheitlichkeit der dargestellten Körper kann außer der schon früher beschriebenen Barytzahl und des daraus berechneten Äquivalentgewichts auch die Basicität der Säuren, wie sie mit Alkali und verschiedenen Indikatoren erhalten wird, dienen.

Aus dem Umstande, daß bei der Titration unter An-

wendung verschiedener Indikatoren sehr verschiedene, aber in annähernd äquivalenten Verhältnissen stehende Säuremengen gebraucht wurden, hatten wir schon früher den Schluß gezogen, daß man es in den beschriebenen Proteosen mit mehrbasischen Säuren zu tun habe. Diese Annahme wird durch ihre elektrische Leitfähigkeit, die wir mit einigen reinen Substanzen bestimmten, bestätigt. Wir geben nur ein Beispiel:

Es wurde in  $\frac{1}{32}$  n-KOH soviel der Proteose (0,1<sup>b</sup> der Tabelle) gelöst, als sich lösen wollte, und die Leitfähigkeit bestimmt. Darauf wurde auf  $\frac{1}{1024}$  n. verdünnt und wieder die Leitfähigkeit bestimmt. Das verwendete Wasser hatte Leitfähigkeit von  $2,26 \times 10^{-6}$  reziproken Ohm.

Gefunden wurde: in  $\frac{1}{32}$  n-Lösung 55,06 äquival. Leitfähigkeit  
 >  $\frac{1}{1024}$  > > 79,87 > >  
 Differenz = 24,81.

Da jeder Wertigkeit eine Differenz von etwa 10 entspricht, so ist die untersuchte Proteose als dreiwertig anzusehen. Bei dem ziemlich schwachen Säurecharakter kann jedoch starke hydrolytische Spaltung eingetreten sein und dadurch die Differenz herabgedrückt werden; es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die Proteose noch mehr als dreibasisch ist.

Die Aufspaltung des Zeïns durch Verdauung und durch Behandlung mit verdünnten Säuren und durch Fäulnis haben wir weniger weit durchführen können, doch ist es ganz sicher, daß dabei Proteosen anderen Charakters entstehen, daß also das ursprüngliche Eiweißmolekül an anderen Stellen auseinanderbricht; aber ebenso wie die Atmoid- und Alkalizeïnosin einander sehr ähnlich, wenn nicht identisch sind, trifft das gleiche zu bei den Pepto- und Acidzeïnosin und auch bei den Trypto- und Fäulniszeïnosin.

Wie verschiedenartig die Spaltung desselben Eiweißkörpers, z. B. bei der Alkali- und Säurespaltung verläuft, geht u. a. daraus hervor, daß man bei der Behandlung mit Baryt als Grenzzahl etwa 3,7% N als Ammoniak abgespalten erhält; bei der Säurespaltung nur 2,7%. Werden die erhaltenen Acidzeïnosin nun mit Baryt weiter behandelt, so wird nicht, wie man vermuten sollte, noch 1% N abgespalten, sondern nur 0,2%.

## Fällungen mit Ammonsulfat.

	0,1			0,15			0,2			0,3			0,4			0,5		
	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N	H	C	N
Methylalkohol a	7,17	54,79	15,46	7,27	54,83	15,45	7,24	54,32	14,73	7,01	54,62	14,53	6,94	54,37	15,60	6,80	54,26	15,39
Äthylalkohol																		
1. Fällung b	7,13	55,32	14,95	7,13	54,66	14,71	7,02	53,97	15,08	7,17	54,39	15,31	7,14	54,37	14,91	7,26	53,92	15,10
2. Fällung c	—	—	—	—	—	—	7,55	55,52	14,71	6,98	55,04	14,45	—	—	—	—	—	—
3. Fällung d	—	—	—	—	—	—	7,49	54,92	12,30	6,53	54,69	13,37	—	—	—	—	—	—
Amylalkohol																		
1. Fällung e	6,88	54,07	14,33	7,61	55,07	14,35	7,55	55,10	14,23	7,03	57,23	13,22	7,72	53,54	14,33	—	—	—
2. Fällung f	7,72	57,66	13,56	7,44	57,12	11,81	7,82	56,28	13,15	—	—	13,81	7,30	54,18	13,58	—	—	—

Wir glauben aus unseren Versuchen den sicheren Schluß ziehen zu können, daß bei der Zerlegung reiner Eiweißkörper nach den verschiedenen Methoden zwar verschiedene, aber sehr wohl definierte Proteosen bestimmter chemischer Zusammensetzung entstehen, die zu trennen und in chemisch reinem Zustande herzustellen sehr wohl möglich ist. Nicht in dem Sinne, daß es gelingen könnte, eine gegebene Menge Proteosen in ihre verschiedenen Bestandteile von chemischer Reinheit quantitativ zu trennen, wohl aber, daß es verhältnismäßig nicht zu schwer gelingt, aus einem solchen Gemisch einzelne und zwar besonders die in größter Menge vorkommenden zu isolieren; auch das wird schon genügen, um namentlich bei Berücksichtigung der verschiedenen Spaltungsmethoden und der dabei entstehenden Produkte und den daraus zu erhaltenden Produkten des weiteren Abbaus bis zu den Polypeptiden und Peptiden einen Rückschluß auf die Konstitution des ursprünglichen Proteins zu gestatten.

Allerdings gehört dazu, die Versuche in größerem Maßstabe auszuführen, als uns das möglich war. Schon die Darstellung des reinen Zeïns in Kilogrammen bedingt einen Aufwand von Arbeit, der bei weitem das übersteigt, was man sonst an Herstellung eines Ausgangsmaterials zu verwenden gewohnt ist. Dem Beispiele Szumowskis folgend, haben wir auch daran gedacht, von dem Rohzeïn der Farbwerke vormals Meister Lucius & Brüning auszugehen, aber die Schwierigkeit liegt nicht in der Darstellung dieses Rohzeïns, das seinem Namen alle Ehre machte, denn es enthielt außer anderen Verunreinigungen noch etwa 15% Fett, etwa 20% Wasser, sondern in der weiteren Reinigung. Außer der Arbeit werden auch noch bedeutende Mengen der verschiedenen Materialien, namentlich von Alkohol, der zum großen Teil bei der Vakuumdestillation verloren geht, verbraucht; auch der Verbrauch an Ammonsulfat, dessen Reinigung und Wiedergewinnung sehr umständlich und daher nicht lohnend ist, ist zu beachten. Für die Ausführung der einzelnen Operationen sind außerdem die verschiedenen Apparate in großer Zahl und von großen Dimensionen nötig und ein geräumiges Laboratorium muß zur Verfügung stehen.

Das sind jedoch alles Schwierigkeiten, die sich schließlich mit Geduld, mit Geldopfern usw. überwinden ließen, zumal man die ersten Operationen von weniger geschulten Hilfskräften durchführen lassen könnte. Die mühevollere Trennung und Reinigung der Proteosen und Endprodukte jedoch verlangt bei ihrer großen Zahl und der Schwierigkeit der Ausführung einen Aufwand an Zeit und Arbeit, den nur der mit einiger Aussicht auf Erfolg leisten kann, der durch keinerlei andere Tätigkeit gehemmt und behindert ist.

Wir gehören nicht zu diesen Glücklichen und müssen daher zu unserm großen Schmerze auf eine Fortsetzung der begonnenen Arbeit verzichten.

---