

Hydrolyse des im Eigelb des Hühnereies enthaltenen Proteins («Vitellin»).

Von

Emil Abderhalden

und **Andrew Hunter**, Carnegie Research Fellow, Edinburgh.

(Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Juli 1906.)

Das im Eigelb der Vogeleier enthaltene Protein, Vitellin genannt, enthält Phosphor. Es ist zur Zeit unmöglich, zu entscheiden, ob dieser in engeren Beziehungen zum Eiweiß steht, oder ob es sich um eine Beimengung handelt. Wir haben nicht versucht, unser Präparat phosphorfrei darzustellen, weil wir vorläufig noch keinen Weg kennen, das sogenannte Vitellin auf seine Einheitlichkeit zu prüfen, und wir irgendwelche intensivere Eingriffe, die das Eiweiß als solches verändern konnten, vermeiden wollten. Unsere Untersuchung hatte nur den Zweck, die Zusammensetzung des «Vitellins» an Monoaminosäuren kennen zu lernen. Am naheliegendsten war ein Vergleich mit dem Casein, mit dem es aus mehr äußeren Gründen, speziell wegen seines Phosphorgehaltes, meist zu einer Gruppe vereinigt wird. Die folgenden Zahlen geben die auf 100 g aschefreies, bei 100° getrocknetes «Vitellin» berechneten Mengen an Monoaminosäuren wieder. Zur Vergleichung sind die entsprechenden Zahlen für das Casein aufgeführt:

	«Vitellin»	Casein aus Kuhmilch
Glykokoll	1,1	0
Alanin	vorhanden	0,9
Aminovaleriansäure	2,4	1,0
Leucin *	11,0	10,5
Asparaginsäure	0,5	1,2
Glutaminsäure	12,2	11,0
Phenylalanin	2,8	3,2
Prolin	3,3	3,1
Serin	—	0,23
Tyrosin	1,6	4,5

Wir führen diese Vergleichswerte mit aller Vorsicht an und betonen wiederholt ausdrücklich, daß es uns fern liegt, auf Grund einer ähnlichen quantitativen Zusammensetzung an Aminosäuren Schlüsse auf die Verwandtschaft oder gar Identität so komplizierter Verbindungen, wie die Proteine es sind, zu ziehen. Vorläufig hat diese Gegenüberstellung nur biologisches Interesse. Das Vitellin spielt im Haushalte des werdenden Vogelorganismus neben den Eiweißkörpern des Eierweiß gewiß eine ähnlich hervorragende Rolle, wie das Casein bei der ersten Ernährung des Säugetieres. Es ist wohl denkbar, daß ein ganz ähnliches Material den Ausgangspunkt für all die verschiedenen Ansprüche, denen diese «ersten» Nahrungseiweiße zu genügen haben, bildet. Es wird von Interesse sein, auch das Eieralbumin mit dem Milchalbumin zu vergleichen. Untersuchungen nach dieser Richtung sind im Gange.

Experimenteller Teil.

Das verwendete Vitellin — 400 g — verlor bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet 12,75% Wasser. Es enthielt 3,95% Asche. Zur totalen Hydrolyse wurde es mit der 5fachen Menge 25%iger Schwefelsäure 12 Stunden erhitzt. Beim Filtrieren der abgekühlten Flüssigkeit hinterblieben auf dem Filter 24,5 g einer dunkelbraun gefärbten Masse. Im Filtrat wurde in der üblichen Weise die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt entfernt, und der scharf abgenutschte und abgepreßte Baryumsulfatniederschlag so lange mit Wasser ausgekocht, bis eine Probe des Waschwassers keine Färbung mit Millons Reagens mehr gab. Die vereinigten Filtrate engten wir so lange ein, bis schon in der Wärme Abscheidung von Krystallen begann. Die so erhaltene Krystallisation wurde abgenutscht und das Filtrat so lange weiter eingengt, bis die Mutterlauge kein Tyrosin mehr enthielt. Das so gewonnene Rohtyrosin wurde aus heißem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert. Erhalten wurden 4,95 g reines Tyrosin:

0,1833 g Substanz gaben 0,4035 g CO₂ und 0,1031 g H₂O

Berechnet für C₉H₁₁NO₃:

Gefunden:

59,66% C und 6,07% H.

60,01% C und 6,29% H.

Die vereinigten Laugen vom Tyrosin — Mutterlauge des Rohtyrosins und Mutterlauge des reinen Tyrosins — wurden nun unter vermindertem Druck bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und der Rückstand in der üblichen Weise mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Die Veresterung wurde dreimal wiederholt. Ein Versuch, Glykokoll als Glykokollesterchlorhydrat zur Abscheidung zu bringen, hatte keinen Erfolg.

Die Ester wurden mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Die Destillation der Ester ergab folgendes Resultat:

- | | | | | |
|-------------|--------|-----------------|---------------|--------|
| 1. Fraktion | 0— 60° | des Wasserbades | (12 mm Druck) | = 27 g |
| 2. „ | —100° | „ „ | (12 „ „) | = 46 „ |
| 3. „ | —105° | „ Ölbad | (0,2 „ „) | = 24 „ |
| 4. „ | —200° | „ „ | (0,2 „ „) | = 61 „ |

Im Destillationskolben verblieb ein tief braun gefärbter Rückstand.

Er wog 50,0 g.

Die drei ersten Fraktionen wurden sofort durch Kochen mit der 7fachen Menge Wasser verseift. In der 4. Fraktion wurde in der bekannten Weise zunächst der Phenylalaninester durch Ausäthern entfernt, und dann die Ester dieser Fraktion durch 2ständiges Kochen mit Barytwasser verseift.

In der Bearbeitung der einzelnen Fraktionen hielten wir uns an die im hiesigen Institute ausgearbeiteten Methoden. Sie sind wiederholt beschrieben worden. Wir können uns deshalb an die wesentlichsten Punkte halten.

Aus Fraktion II und III schieden sich beim Erkalten der verseiften Flüssigkeiten Krystalle ab. Sie erwiesen sich als reines Leucin. Die ersten drei Fraktionen wurden zunächst, nachdem sie filtriert worden waren, unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Es empfiehlt sich, die alkoholische Lösung erst dann zu filtrieren, wenn sie völlig abgekühlt ist, weil stets kleine Mengen von Alanin und anderen Aminosäuren im heißen Alkohol mitgelöst sind. Es tritt aus diesem Grunde beim Abkühlen des heiß filtrierten Alkohols nach kurzer Zeit Abscheidung von Krystallen ein. Zu bemerken ist, daß das racemische Prolin schwerer löslich in Alkohol ist als das aktive. Wir verwendeten

die fünf- bis zehnfache Menge der angewandten Substanz an absolutem Alkohol. Zur Gewinnung des Prolins verdampften wir die vereinigten alkoholischen Auszüge unter vermindertem Druck zur Trockene. Es empfiehlt sich, den Trockenrückstand nochmals in absolutem Alkohol aufzunehmen, zu filtrieren und den Prozeß zu wiederholen. Auf diese Weise gelingt es, den letzten Rest der mit dem Prolin mitgelösten Aminosäuren zu entfernen. Das gesamte Prolin wog 10,1 g. Es wurde in Wasser gelöst, und durch Kochen mit überschüssigem Kupferoxyd gewannen wir das Kupfersalz des Prolins, das durch Auskochen des Verdampfungsrückstandes seiner Lösung mit Alkohol in den aktiven und racemischen Anteil getrennt wurde. Das racemische Kupfersalz wog 7,0 g.

0,2342 g racemisches, lufttrockenes Prolinkupfer verloren bei 120° 0,0256 g H₂O.

0,2410 g bei 120° getrocknetes Prolinkupfer gaben 0,0658 g CuO = 0,0526 g Cu.

Berechnet für (C ₅ H ₈ NO ₂) ₂ Cu + 2 H ₂ O:	Gefunden:
10,99% H ₂ O	10,93% H ₂ O
und für (C ₅ H ₈ NO ₂) ₂ Cu:	
21,80% Cu.	21,82% Cu.

Die in Alkohol unlöslichen Teile der einzelnen Fraktionen (I—III) ergaben folgende Aminosäuren:

Fraktion I wurde zunächst auf Glykokoll geprüft. 1 g wurde verestert, mit einem Kryställchen von Glykokollesterchlorhydrat geimpft und dann auf Eis aufbewahrt. Es erfolgte keine Krystallisation von Glykokollesterchlorhydrat. Der übrige Teil dieser Fraktion (1,4 g) wurde durch Krystallisation in zwei Teile geteilt. Die zuerst ausgeschiedenen Krystalle (0,7 g) bestanden aus Leucin, wie die Darstellung des Kupfersalzes ergab.

0,1398 g Substanz gaben 0,0342 g CuO = 0,0273 g Cu = 19,55% Cu.

Berechnet für (C₆H₁₂NO₂)₂Cu: 19,60% Cu.

Die zweite Krystallfraktion schmolz bei 260°. Nach wiederholtem Umkrystallisieren erhielten wir Analysenzahlen, die auf ein Gemisch von Alanin und Leucin resp. Aminovaleriansäure hindeuteten. Es gelang dann auch, durch Umkrystallisieren eine einheitlich aussehende Krystallmasse zu erhalten, deren Schmelz-

punkt (296°) auf Alanin hinwies. Zur Analyse wurde das Kupfersalz hergestellt.

0,1566 g Substanz gaben 0,0512 g CuO = 0,0409 g Cu = 26,13% Cu.

Berechnet für $(C_5H_6NO_2)_2Cu$ = 26,50% Cu.

Aus anderen Anzeichen und speziell aus dem Umstand, daß das Kupfersalz fraktioniert worden war, dürfen wir den Schluß ziehen, daß Alanin vorhanden war. Seine Menge bleibt unbestimmt.

Aus der zweiten Fraktion waren beim Abkühlen der verseiften Lösung, wie oben erwähnt, 5,3 g Leucin ausgefallen. Der Rest dieser Fraktion wog nach dem Auskochen mit Alkohol 27,3 g. Durch fraktionierte Krystallisation erhielten wir 15,11 g Leucin, 7,6 g Aminoisovaleriansäure = Valin¹⁾ und 3,53 g Glykokoll. Alanin war gewiß auch vorhanden, konnte jedoch seiner kleinen Menge wegen nicht von beigemengtem Leucin resp. Valin getrennt werden. Das Glykokoll wurde in einer Probe als Glykokoll-esterchlorhydrat abgeschieden und seine Menge so bestimmt.

0,1477 g Substanz gaben 0,1855 g CO₂ und 0,0979 g H₂O

Berechnet für C₄H₁₀NO₂Cl: Gefunden:

34,43% C und 7,18% H. 34,25% C und 7,41% H.

Das isolierte Valin gab folgende Zahlen:

0,1727 g Substanz gaben 0,3230 g CO₂ und 0,1490 g H₂O.

Berechnet für C₅H₁₁NO₂: Gefunden:

51,28% C und 9,40% H. 51,00% C und 9,65% H.

Aus der Fraktion III waren aus der verseiften Lösung 3 g Leucin ausgefallen.

0,1526 g Substanz gaben 0,3078 g CO₂ und 0,1386 g H₂O.

Berechnet für C₆H₁₃NO₂: Gefunden:

54,96% C und 9,92% H. 55,00% C und 10,16% H.

Das aus derselben Krystallisation dargestellte Kupfersalz gab folgende Analysenwerte:

0,1479 g Substanz gaben 0,0364 g CuO = 0,0291 g Cu = 19,66% Cu.

Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$: 19,60% Cu.

Aus der III. Fraktion wurden außerdem noch 7,5 g Leucin gewonnen.

¹⁾ Vergl. Emil Fischer, Spaltung der α -Aminoisovaleriansäure in die optisch-aktiven Komponenten, Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XXXIX, S. 2321, 1906.

Die IV. Fraktion enthielt 8,62 g Phenylalanin, das in der üblichen Weise isoliert wurde:

0,1637 g Substanz gaben 0,3915 g CO_2 und 0,1006 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$:

Gefunden:

65,45% C und 6,66% H. 65,23% C und 6,88% H.

Ferner wurden aus dieser Fraktion 1,6 g Asparaginsäure und 22,4 g Glutaminsäurechlorhydrat gewonnen. Sie enthielt ferner ein Produkt, das bei 277° schmolz und folgende Analysenwerte gab:

0,1505 g Substanz gaben 0,2805 g CO_2 und 0,1015 g H_2O

= 50,83% C und 7,55% H.

0,1179 g Substanz gaben 10,0 ccm N [23° , 762 mm] = 9,86% N.

Die Substanz sah ganz einheitlich aus, schmeckte süß, gab aber bei der Darstellung des Kupfersalzes ein Gemisch verschieden löslicher Krystalle. Wahrscheinlich lag ein Gemisch von Phenylalanin mit anderen Aminosäuren vor. Jedenfalls zeigte auch diese Beobachtung, wie vorsichtig man in der Beurteilung von Krystallfraktionen einheitlich erscheinender Substanzen sein muß. Selbst wiederholtes Umkrystallisieren bietet keine Garantie für einheitliche Substanzen.

Die Asparaginsäure gab folgende Zahlen:

0,1547 g Substanz gaben 0,2059 g CO_2 und 0,0750 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$:

Gefunden:

36,09% C und 5,26% H. 36,30% C und 5,42% H.

Die Glutaminsäure wurde als Hydrochlorat abgeschieden:

0,1877 g Substanz gaben 0,2270 g CO_2 und 0,0933 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{HCl}$:

Gefunden:

32,70% C und 5,45% H. 32,97% C und 5,56% H.

Weitere Mengen an Glutaminsäure ließen sich aus dem bei der Destillation der Ester verbliebenen Rückstand gewinnen. Er wurde durch Kochen mit Barytwasser zunächst verseift und nach quantitativer Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure eingengt. Bald schieden sich Krystalle von Leucin ab. Die Menge des umkrystallisierten Produktes betrug 2,2 g. Die Mutterlauge von Leucin wurde zum Sirup eingengt und dieser in wenig starker Salzsäure aufgenommen. In die salzsaure Lösung wurde nun noch gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Beim Stehen auf Eis erfolgte bald reichliche Krystallisation von

Glutaminsäurechlorhydrat. Seine Menge betrug nach dem Umkrystallisieren 11,5 g.

Die Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrates wurde zur Entfernung der Salzsäure zunächst unter vermindertem Druck stark eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und nun mit Bleioxyd gekocht, bis eine Probe keine Chlorreaktion mehr gab. Das durch Schwefelwasserstoff von gelöstem Blei befreite Filtrat wurde eingeeengt. Im ganzen wurden 7,75 g einer schwach süß schmeckenden Substanz erhalten. Sie krystallisierte zum Teil in Blättchen, zum Teil in Nadelchen. Sie ließ sich in verschiedene Krystallfraktionen trennen. Es gelang jedoch vorläufig nicht, irgend ein Produkt zu fassen, das Garantie für Einheitlichkeit geboten hätte. Wir verzichteten, wie in allen diesen Fällen auf die Mitteilung von Analysen und Berechnungen von Formeln, weil eine reiche Erfahrung uns gezeigt hat, wie außerordentlich leicht Täuschungen möglich sind. Wir stehen nach wie vor auf dem Standpunkte, daß einfache Krystallisation und Analysenwerte nicht ausreichen, um neue Spaltungsprodukte aus Eiweiß zu identifizieren.

Erfahrungsgemäß liefert die Veresterungsmethode ganz allgemein geringere Ausbeuten an Aminosäuren, als sie in Wirklichkeit vorhanden sind. Es gilt dies ganz besonders von der Glutaminsäure. Durch die Verarbeitung des Destillationsrückstandes ist ihre Ausbeute ganz beträchtlich erhöht worden. Sie bleibt aber auch dann noch hinter der Wirklichkeit zurück, wie eine direkte Isolierung der Glutaminsäure zeigte. In diesem Versuche wurden 100 g desselben Proteins, wie es zu den vorhergehend geschilderten Versuchen diente, mit 300 ccm rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,196 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Es schieden sich 4,9 g Melanin ab. Die filtrierte Flüssigkeit wurde durch Kochen mit Tierkohle möglichst entfärbt, dann bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt und der Rückstand mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. In zwei Krystallisationen wurden 22,2 g rohes Glutaminsäurechlorhydrat gewonnen. Nach zweimaligem Umkrystallisieren verblieben 12,0 g reines Glutaminsäurechlorhydrat. Diese Menge entsprechen auf 100 g asche-, wasser- und melaninfreies Vitellin berechnet

12,2% Glutaminsäure. Im ersten Versuche waren nur 9,7% Glutaminsäure gewonnen worden.

Nach Abschluß dieser Arbeit ist eine Untersuchung über Vitellin von L. Hugouenq¹⁾ zu unserer Kenntnis gelangt. Hugouenq bediente sich zur Bestimmung der Monoaminosäuren auch der Estermethode. Die von ihm gefundenen Mengen an Aminosäuren bleiben fast durchwegs weit hinter unseren Ausbeuten zurück. Es ist bemerkenswert, daß Hugouenq unsere Untersuchungen im hiesigen Institut und der Gedankengang, der diesen zugrunde liegt, völlig entgangen zu sein scheinen.

¹⁾ L. Hugouenq, Recherches sur la vitelline. Annales de chimie et de physique, T. VIII, p. 115, 1906.
