Aus dem Physiologischen Institut der
Kgl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.

Die Monoaminosäuren der Cocons der italienischen Seidenraupe.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES

DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE

DER

KÖNIGLICHEN TIERÄRZTLICHEN
HOCHSCHULE ZU BERLIN

vorgelegt von

Georg Roose,
approb. Tierarzt und Unterveterinär.

VERITAS IUSTITIA LIBERTAS
VETERINÄR-MEDIZINISCHE BIBLIOTHEK
FREIE UNIVERSITÄT BERLIN

Berlin 1911.

Hermann Blanke's Spezial-Druckerei für Dissertationen
Kl. Rosenthalerstr. 9. BERLIN C. 54, Kl. Rosenthalerstr. 9.

1955,71

Gedruckt mit Genehmigung der Königlichen Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.

Referent: Prof. Dr. Abderhalden.

Meinen Eltern in Dankbarkeit
gewidmet.

Für den Physiologen ist es von grösster Bedeutung, dass er bei Fragen des Stoffwechsels den chemischen Aufbau aller in Betracht kommenden Körper kennt. Nur dann darf er hoffen, die verwickelten Vorgänge der Verdauung und des Zellenlebens zu enträtseln. Das Hauptsächlichste aus der Chemie der Kohlehydrate und Fette ist nun schon lange bekannt, dagegen über die wichtigsten Bausteine des tierischen Organismus, die Proteine, wusste man bis vor kurzem nur sehr wenig. Noch vor wenig Jahren hatte man durchaus keinen Einblick in ihren Aufbau; man musste sich damit begnügen, die elementare Zusammensetzung der einzelnen Proteine zu vergleichen. Man nahm an, dass, wenn zwei Proteine ähnliche Analysenwerte für C, H, O, N und S gaben, diese beiden Körper dann auch, wenn nicht völlig gleich, so doch ähnlich zusammengesetzt seien. Die Kenntnis über den Aufbau der einzelnen Proteine war eben sehr dürftig. Freilich hatte man im Laufe der Zeiten einige zusammenhanglose Beobachtungen gesammelt. Mehrere der bis jetzt aufgefundenen Aminosäuren sind schon vor Jahren entdeckt worden, aber immer nur in bestimmten Eiweissarten und sehr oft nicht in reinem Zustande. Das reichliche Vorkommen dieser oder jener Aminosäure führte zu ihrer Entdeckung, so des Alanins in der Seide. Dann wurden immer wieder die gleichen Verbindungen gefunden, weil sie wie das schwer lösliche Tyrosin sich leicht abscheiden oder

ein schwer lösliches Salz liefern, wie die Glutaminsäure mit Salzsäure. Schliesslich hatte man auch die sogenannten Hexonbasen kennen gelernt. Die übrigen Bestandteile dagegen entgingen dem Nachweis, weil es an geeigneten Methoden zu ihrer Isolierung und Reinigung fehlte.

Und dabei hatte man oft nicht die Gewissheit, dass die untersuchten Körper wirklich chemische Individuen vorstellten, ob sie nicht vielmehr ein Gemisch mehrerer verschiedener Verbindungen waren. Es muss daher als ein grosser Schritt, ja als die erste bedeutende Leistung in der Entwicklung der Eiweisschemie bezeichnet werden, als es gelang, Methoden zu finden zur Gewinnung möglichst gut charakterisierter Proteine. Dies war den Arbeiten Mieschers, Hofmeisters und Osbornes zu verdanken. Hatten die oben erwähnten Untersuchungen, die namentlich von E. Schulze, A. Kossel und E. Fischer herrühren, gezeigt, dass man als die einfachsten Bausteine der Proteine die Aminosäuren anzusehen hat, so ist als weiterer Fortschritt die Feststellung zu bezeichnen, dass alle Proteine, die bisher bekannt geworden sind, mit nur wenig Ausnahmen die gleichen Bausteine besitzen. Für manche von diesen besitzen wir exakte Methoden, für andere können wir wenigstens vergleichbare Werte erhalten. Als grundlegend für alle diese Untersuchungen sind die Forschungen E. Fischers zu betrachten, dem es nach langem Bemühen gelungen ist, eine Methode auszuarbeiten, um die zahlreichen Schwierigkeiten zu umgehen, welche bisher einer Isolierung der einzelnen Spaltprodukte so sehr im Wege gestanden hatten. Im experimentellen Teil wird auf diese so genannte Estermethode näher einzugehen sein. Zwar gestattet sie nicht den Gehalt an einzelnen Aminosäuren quantitativ festzustellen, man kann aber mit verhältnismässig geringer Mühe die einzelnen Amino-

säuren in reinem Zustand darstellen und sie auch in kleinsten Mengen nachweisen. Da sie ferner trotz der nur annähernden Werte bei mehrfachen Untersuchungen des gleichen Proteins immer dieselben Ausbeuten an Aminosäuren liefert, so ist sie zu vergleichenden Untersuchungen der einzelnen Eiweisskörper sehr geeignet.

Emil Abderhalden hat nun den Versuch unternommen, auf Grund der bisher ermittelten Gewichtsprozente an einzelnen Bausteinen die Proteine einzuteilen. Bei einer Gruppe fehlen bestimmte Aminosäuren, so dem Eier-, Serum- und Milchalbumin das Glykokoll, den in Alkohol löslichen Pflanzeneiweissen das Lysin, dem Leim Tyrosin und Tryptophan. Vergleichen wir die Mengenverhältnisse, in denen die einzelnen Aminosäuren am Aufbau des Eiweissmoleküls beteiligt sind, so ergeben sich auch gewaltige Unterschiede. Sehr auffällig ist der verschiedene Anteil der Mono- und Diaminosäuren. Während die letzteren bei den Protaminen vorherrschen, stehen sie bei den Albuminoiden sehr im Hintergrunde; hier treten die Monoaminosäuren mehr hervor. Weniger ausgeprägt sind diese Unterschiede bei den gewöhnlichen Eiweissen und den Histonen. Auffallend ist sodann das starke Auftreten einzelner Monoaminosäuren. Das Gliadin besteht z. B. zum dritten Teil aus Glutaminsäure.

Von diesen Gesichtspunkten aus lassen sich, wie Abderhalden betont, Gruppen von Eiweisskörpern aufstellen, in welchen die einzelnen Vertreter neben den gleichen Bausteinen annähernd gleiche Prozentzahlen für die Aminosäuren besitzen. Abderhalden hat nun die weitere Frage aufgeworfen, ob zwei Proteine, welche bei der totalen Hydrolyse gleiche Werte liefern an Prozentzahlen, auch einander gleich sind. Oder mit anderen Worten: Genügt der völlige Abbau zur

Identifizierung eines Proteins? Es genügt dies nicht. Weit entfernt davon können vielmehr diese beiden Eiweisskörper im chemischen Aufbau wie in ihren biologischen Eigenschaften grundverschieden sein. Die chemische Seite der Frage soll ein einfaches Beispiel näher beleuchten. Nehmen wir an, es wäre aus einem Eiweisskörper ein Polypeptid, also ein Körper, der aus mehreren aneinander gekuppelten Aminosäuren besteht, isoliert und nach Möglichkeit gereinigt. Er zeige bei seiner totalen Hydrolyse 1 Glykokoll, 2 d Alarin und 1 l Leucin als Bestandteile, wäre also ein Tetrapeptid. Nehmen wir zur Vereinfachung der Frage ausserdem an, es gelänge bei der partiellen Hydrolyse dieses Körpers nachzuweisen, dass d Alanin einmal an Glykokoll, das andere Mal an l Leucin gebunden sei, so sind immer noch acht Möglichkeiten für den Aufbau unseres Tetrapeptids denkbar:

1. Glycyl - d-Alanyl - d-Alanyl - l-Leucin
2. d-Alanyl-Glycyl - d-Alanyl - l-Leucin
3. Glycyl - d-Alanyl - l-Leucyl - d-Alanin
4. d-Alanyl-Glycyl - l-Leucyl - d-Alanin
5. d-Alanyl - l-Leucyl-Glycyl - d-Alanin
6. l-Leucyl - d-Alanyl-Glycyl - d-Alanin
7. d-Alanyl - l-Leucyl - d-Alanyl-Glycin
8. l-Leucyl - d-Alanyl - d-Alanyl-Glycin.

Hätten wir nicht die Einschränkung gemacht, dass d Alanin einmal an Glykokoll, dann an l Leucin gekuppelt sein soll bei der partiellen Hydrolyse, so wären noch weit mehr Bindungsmöglichkeiten vorhanden, z. B. Glycyl - l-Leucyl - d-Alanyl - d-Alanin. Ein blosses Verschieben in der Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren genügt, um einen chemisch durchaus verschiedenen Körper herzustellen. Mithin ist schon an diesem doch noch relativ einfach aufgebauten Körper aus der totalen Hydrolyse durchaus kein Bild seiner Struktur zu gewinnen. Ist hier aber die Zahl der

Isomerien schon so gross, welche Schwierigkeiten bieten sich erst bei der Untersuchung eines Proteins, das doch so viel mehr Bausteine enthält, wo die Zahl der möglichen Strukturisomerien ins Unendliche wächst. Noch komplizierter gestaltet sich die Frage, wenn entschieden werden soll, ob zwei Eiweisskörper gleich sind. Denken wir wieder an unser Tetrapeptid. Wir nahmen an, es enthielte 1 Glykokoll, 2 d Alanin und 1 l Leucin. Seine partielle Hydrolyse ergäbe die oben erwähnte Bindung des Alanins einmal an Glykokoll, das andere Mal an 1 Leucin. Ein zweites Tetrapeptid bestehe aus denselben Aminosäuren. Wie liesse sich jetzt entscheiden, ob beide strukturisomer sind? Man würde den zweiten Körper der partiellen Hydrolyse unterwerfen. Würde sich dann d-Alanyl - d-Alanin neben l-Leucyl-Glycin ergeben, so wäre damit festgestellt, dass es sich um zwei nicht identische Körper handelte. Anders dagegen, wenn bei der partiellen Hydrolyse die gleichen Dipeptide auftreten wie beim ersten Körper. Es bliebe nun noch die Möglichkeit, dass es gelänge, eine Aminosäure abzuspalten und die Eigenschaften der übrig bleibenden Tripeptide zu vergleichen oder sie sogar zu identifizieren mit bekannten Tripeptiden.

Dieses kleine Beispiel enthält in Kürze die Wege, welche die Eiweisschemie einzuschlagen hat. Wie schon Abderhalden in seinem Lehrbuch der physiologischen Chemie ausführlich beweist, muss sie einmal versuchen, aus gut gereinigten Proteinen durch die partielle Hydrolyse direkt Polypeptide mit möglichst wenig Komponenten zu fassen, andererseits muss man bestrebt sein, Mittel und Wege zu finden, um die erhaltenen Polypeptide zu identifizieren. Diese letzte Forderung schien längere Zeit nicht erfüllbar zu sein, hier drohte die Forschung auf den toten Punkt zu kommen, da war es wieder E. Fischer, der auch hier

einen gangbaren Weg fand. Die Analyse versagte, daher brachte er die Synthese ins Treffen. Nach den Angaben, die die totale Hydrolyse eines gefundenen Polypeptids ihm lieferten, bauten er und seine Mitarbeiter aus den betreffenden Aminosäuren alle in Frage kommenden Polypeptide auf, untersuchten ihre Eigenschaften und verglichen sie mit denen des aus dem Eiweiss gewonnenen Körpers. Die Mühe, der Zeitaufwand ist gewaltig, bis es gelingen kann, auch nur von einem gefundenen Tripeptid alle möglichen Kombinationen aufzubauen und mit ihren Eigenschaften festzulegen. Dafür verspricht dieses Verfahren nicht nur in Zukunft reiche Früchte, sondern schon jetzt liegen mehrere Dipeptide und höher aufgebaute Körper vor, die von E. Fischer und E. Abderhalden aus verschiedenen Eiweissarten abgespalten sind und mit den künstlich aufgebauten übereinstimmen.

Es ist von Interesse, diese komplizierten Bausteine, die bisher gefunden sind, zusammenzustellen.

Schon vor einiger Zeit war es gelungen, bei der partiellen Hydrolyse der Seide das Glycyl - d-alaninanhydrid und das Glycyl - l-tyrosinanhydrid aufzufinden. E. Abderhalden hat jetzt die entsprechenden Dipeptide direkt aus der Seide isoliert. Er fand zuerst Glycyl - l-tyrosin, dann in dessen Mutterlauge das d-Alanyl-glycin. Letzteres schied er dann in grösseren Mengen wiederholt bei der Bereitung von Seidenpepton ab.

Aus dem Elastin, gewonnen aus dem Ligamentum nuchae des Ochsen, wurde von E. Fischer und E. Abderhalden isoliert:

1. Glycyl - l-leucinanhydrid.
2. l-Leucyl - d-alaninanhydrid.

Auch das Dipeptid selbst wurde gefunden:

d-Alanyl - l-leucin; und neuerdings von E. Abderhalden das isomere l Leucyl-d-alanin.

Vet.-Med. Bibl. d. F. B 846

Ein weiteres Anhydrid aus Elastin ist das Glycyl - d-valinanhydrid, ferner ein anderes, das bei der totalen Hydrolyse d Alanin und l Prolin lieferte. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass bisher ein eingehender Vergleich mit den entsprechenden synthetischen Körpern namentlich für den letzteren fehlt.

Aus Gelatine hergestellt und einstweilen nur durch die totale Hydrolyse identifiziert ist das von P. Levene und W. A. Beatty beschriebene

Glycyl-prolinanhydrid.

Aus Seide ist von E. Fischer und E. Abderhalden mit Hilfe von βNaphtalinsulfochlorid erhalten

βNaphtalinsulfo-glycyl-d-Alanin.

Ferner kuppelten E. Abderhalden und Casimir Funk Seidenpepton mit βNaphtalinsulfochlorid und bauten das Reaktionsprodukt total ab. Sie erhielten Mononaphtalinsulfotyrosin (die βNaphtalinsulfogruppe befindet sich an der Phenolgruppe) βNaphtalinsulfoalanin, Glykokoll und Alanin. Dagegen keine Spur von Diβnaphtalinsulfotyrosin. Daher befindet sich Alanin wenigstens zum Teil am Anfang der Polypeptidkette. Gleichzeitig wird über das βNaphtalinsulfoderivat des Glycyl-l-tyrosins und seine Spaltprodukte und über das Mono-β-Naphtalinsulfotyrosinnatrium (bei freiem Hydroxyl ist die Aminogruppe besetzt) berichtet. Als weiteres direkt isoliertes Depeptid ist anzuführen die von E. Fischer und E. Abderhalden aus Gliadin gewonnene l-Leucyl - d-glutaminsäure. Osborne und Clapp isolierten ferner aus Gliadin einen Körper, der bei der totalen Hydrolyse Phenylalanin und Prolin lieferte.

Ferner wird von E. Fischer und E. Abderhalden ein Tetrapeptid beschrieben, das 2 Glykokoll, 1 d Alanin und 1 l Tyrosin enthält. Ueber seine Struktur ist man im Unklaren.

Bei der totalen Hydrolyse des Caseins und anderer Proteine entstehen Anhydride, über welche E. Abderhalden und Casimir Funk berichtet haben. Aus Casein wurde bisher rein hergestellt

1 Leucinanhydrid und
1 Phenylalanyl-d-alaninanhydrid.

Schliesslich beschreibt E. Abderhalden mehrere Produkte, die er aus dem Edestin der Baumwollensamen isoliert hat:

I. enthaltend Glutaminsäure und Tryptophan,
II. mit Tryptophan, Glutaminsäure und Leucin,
III. Tyrosin, Glykokoll und Leucin (dagegen keine Spur Tryptophan).

Es liegen also schon mehrere Untersuchungen vor, welche beweisen, dass in der Tat im Eiweissmolekül die einzelnen Aminosäuren sich in säureamidartiger Bindung befinden.

Nunmehr ist E. Abderhalden an die Entscheidung der Frage herangetreten, ob Eiweisskörper, welche nicht nur die gleichen Bausteine besitzen, sondern diese auch in gleichen Mengenverhältnissen aufweisen, bei der partiellen Hydrolyse ebenfalls gleichartige Abbauprodukte liefern oder aber, ob da Unterschiede vorliegen. Als besonders geeignet für diese Feststellungen erwiesen sich die Seidenarten. Eine ganze Reihe der verschiedensten Seiden wurden direkt aus der Heimat beschafft und nacheinander im physiologischen Institute der Tierärztlichen Hochschule Berlin der totalen Hydrolyse unterworfen. Hierbei liess sich zeigen, dass zwar stets die gleichen Aminosäuren gefunden wurden, es lassen sich jedoch nach den Mengen, in welchen die einzelnen Bausteine vorhanden sind, bestimmte Gruppen abgrenzen. Es gibt Seiden, die wie die italienische Grège sehr viel Glykokoll, Alanin und Tyrosin aufweisen, während die

Tussahseiden, welche zum Typus der wilden Seiden gehören, nur wenig Glykokoll enthalten.

An Dipeptiden und zwar zunächst in Form ihrer Anhydride wurden bisher isoliert von E. Abderhalden und Akikazu Suwa aus der Canton-Seide

Glycyl - d-alaninanhydrid und

Glycyl - l-tyrosinanhydrid und aus der New-Chwang-Seide und der indischen Tussah

d Alaninanhydrid und

Glycyl-d-alaninanhydrid.

Experimenteller Teil.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden von mir die Cocons der italienischen Seide der totalen Hydrolyse unterworfen, um ihren Gehalt an Monoaminosäuren festzustellen. Das Material für meine Arbeit wurde mir von Herrn Prof. Abderhalden zur Verfügung gestellt, und ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nicht vorübergehen lassen, hierfür, wie für das rege Interesse, welches Herr Prof. Abderhalden meinen Untersuchungen entgegengebracht hat, meinen aufrichtigen Dank abzustatten.

Die Cocons der Seidenraupe sind nicht einheitlich zusammengesetzt. Es lässt sich verhältnismässig leicht ein zu innerst liegendes Häutchen vom übrigen Cocon abtrennen. Dieses erscheint anders gewoben als die übrigen Partien des Cocons. Ich besass nicht genügend Material, um zu entscheiden, ob den ver-verschiedenen Schichten auch eine besondere Zusammensetzung zukommt. Vorläufig wurde der Cocon als Ganzes untersucht, nachdem er zuvor entleimt worden war. Der Leim wurde getrennt durch wiederholtes Auskochen der Cocons im Porzellanbecher unter Druck. Der Leimgehalt betrug 28% des Cocons. Die entleimten Cocons bildeten ein Gewirr von

hellgelben Seidenfäden verschiedener Dicke. Bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, verloren die lufttrockenen Cocons 11—12% und ergaben bei der Veraschung im Porzellantiegel und dem Wiegen des Rückstandes 1,9% Asche.

Gewinnung des Tyrosins.

Zur Isolierung des Tyrosins wurden 100 g degommierte Cocons mit 600 g 25% Schwefelsäure in einem Rundkolben übergossen, im Wasserbad und am Kugel-Rückflusskühler erwärmt und mehrmals gut geschüttelt, bis eine völlige Auflösung der Seidenfäden eingetreten war. Darauf wurde der Rundkolben auf ein Baboblech gesetzt und unter Zugabe von Siedesteinchen die Flüssigkeit am Rückflusskühler etwa 10 Stunden gekocht. Dann wurde eine Probe des dunkelbraunen Hydrolysats mit der Biuretreaktion auf Peptone untersucht. Da die Reaktion positiv ausfiel, musste angenommen werden, dass die Aufspaltung noch nicht beendet sei. Daher wurde das Kochen fortgesetzt, bis nach weiteren 7 Stunden der negative Ausfall der Reaktion in einer zweiten Probe darauf deutete, dass keine komplizierter gebauten Körper mehr vorhanden waren. Die Hydrolysenflüssigkeit wurde darauf isoliert und der sich ergebende Rückstand so lange mit destilliertem Wasser ausgewaschen, bis er frei von Schwefelsäure war. Die so erhaltenen Waschwässer wurden zum Filtrat hinzugefügt. Darauf wurde die zur ungefähren Neutralisation der Schwefelsäure nötige Menge an Baryumhydroxyd berechnet und fein gemahlen allmählig unter stetem Rühren der Flüssigkeit zugesetzt, bis die von dem ausfallenden Baryumsulfat milchig gefärbte Flüssigkeit auf Lakmus sich neutral zeigte. Jetzt wurde der Schwerspat von

der Hydrolysenflüssigkeit getrennt und so lange mit destilliertem Wasser ausgekocht, bis eine Probe des Filtrats keine Rotfärbung mit Millons Reagens mehr gab. Die Waschwässer wurden dann mit dem Filtrat vereinigt und die gesamte Flüssigkeit bei 45° des Wasserbades im Vakuum bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt. Also wurde das Einengen fortgesetzt, bis sich an den Wandungen des Kolbens feine Kristalle absetzten, die sich beim Abkühlen der Flüssigkeit in grossen Mengen abschieden. Diese Tyrosinmassen wurden abgenutscht, das Einengen fortgesetzt und das fortwährend ausfallende Tyrosin weiter von der Mutterlauge getrennt, bis schliesslich letztere in einer mittelgrossen Porzellanschale Platz hatte und auf dem Wasserbade weiter eingeengt werden konnte. Endlich liess sich mit Millons Reagens kein Tyrosin mehr in der Flüssigkeit nachweisen. Das Gesamtgewicht des so gewonnenen Rohtyrosins betrug 10,2 g. Während aber die zuerst ausgefallenen Tyrosinmassen ziemlich farblos waren, zeigten die zuletzt gewonnenen sich sehr unrein und stark gefärbt. Daher wurde das gesamte so abgeschiedene Tyrosin aus heissem Wasser unter Anwendung von Tierkohle mehrmals umkristallisiert und dabei besondere Sorgfalt darauf verwandt, dass kein Tyrosin in der Tierkohle zurückblieb. Die Menge des reinen Tyrosins betrug 9 g.

Isolierung der übrigen Aminosäuren.

Zur Trennung der übrigen Aminosäuren wurden 300 g gereinigte und entleimte Cocons der totalen Hydrolyse mit rauchender Salzsäure unterworfen. Zu diesem Zwecke wurden die Cocons in einem Rundkolben mit der dreifachen Gewichtsmenge an rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 über-

gossen und auf dem Wasserbade am Rückflusskühler unter fortwährendem Schütteln zur Lösung gebracht. Nun wurde auf dem Baboblech am Rückflusskühler das Gemisch gekocht. Nach 8 Stunden fiel die Biuretreaktion negativ aus. Die dunkelbraune Flüssigkeit wurde durch ein Coliertuch abgenutscht und der Rückstand durch häufiges Auswaschen mit Wasser von der freien Salzsäure befreit. Die zurückbleibenden schwärzlichen Massen, die sogenannten Melanine, wurden über Kalk und Schwefelsäure und schliesslich bei 100° getrocknet, bis sie nicht mehr an Gewicht einbüssten. So getrocknet wogen sie 9,6 g d. i. 3,2%. Das Waschwasser wurde mit dem Filtrat vereinigt und bei etwa 40° des Wasserbades und einem stark verminderten Druck, der durch eine Wasserstrahlluftpumpe erzeugt wurde, zur Sirupkonsistenz eingedampft, dann wurden 1½ l absoluter Alkohol zugegeben und gasförmige trockene Salzsäure eingeleitet. Unter Erwärmen trat Lösung des Sirups ein. Es hatten sich die in Alkohol löslichen salzsauren Ester der Aminosäuren gebildet. Das Einleiten von Salzsäure wurde erst unterbrochen, als Salzsäuredämpfe reichlich entwichen. Nun wurde der Kolben gut verschlossen und abgekühlt. Nachdem darauf aufs neue Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet war, wurde die wieder gekühlte Lösung mit einem Kriställchen von Glykokollesterchlorhydrat geimpft und für 24 Stunden in den Eisschrank gestellt. Als nach dieser Zeit reichlich Glykokollesterchlorhydrat ausgefallen war, wurden die Kristallmassen abgenutscht und mit kaltem absolutem Alkohol gewaschen. Der Waschalkohol und das Filtrat zusammen wurden stark eingeengt, um das bei der Bildung der Ester der Aminosäure entstehende Wasser zu entfernen. Darauf wurde aufs neue Alkohol zugegeben und Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet, die gut gekühlte Lösung

wieder geimpft und 36 Stunden lang auf Eis gestellt. Nach Absaugen der inzwischen ausgefallenen Kristalle wurde das Filtrat mit dem zum Reinigen der Kristalle verwandten Waschalkohol zur Sirupkonsistenz eingeengt. Nach Zusatz von etwas absolutem Alkohol wurde der ganze Prozess der Veresterung zum dritten Male durchgeführt. Jedoch liess sich jetzt kein Glykokollesterchlorhydrat mehr abscheiden.

Daher ging ich dazu über, die Ester der übrigen Aminosäuren, welche sich als Esterchlorhydrate in der Mutterlauge des Glykokollesterchlorhydrats befinden, in Freiheit zu setzen. Dazu wurde die erwähnte Mutterlauge sehr stark eingedickt und in möglichst wenig Wasser gelöst. Dann wurde die Lösung in einer Kältemischung von Kochsalz und Eis gut gekühlt und mit Aether überschichtet. Gleichzeitig wurde 33%ige Natronlauge, welche zur Neutralisation der Salzsäure dienen sollte, in einer Kältemischung bereit gehalten. Diese wurde dann langsam und unter stetigem kräftigen Durchschütteln in der Kältemischung dem Kolbeninhalte zugefügt. Als die freie Salzsäure neutralisiert war, wurden die Ester durch vorsichtige Zugabe von kohlensaurem Kalium ausgesalzen. Der anfangs braun gefärbte Aether wurde erneuert, immer wieder Alkali und Kaliumkarbonat hinzugefügt, der Aether nach kräftigem Schütteln wieder abgegossen und dieses Verfahren so lange fortgesetzt, bis der Aether schliesslich gänzlich farblos wurde. Die aetherische Lösung der freien Ester wurde zunächst über festem Kaliumkarbonat gesammelt, nach einer halben Stunde filtriert und 12 Stunden mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Aus der so behandelten Lösung, welche etwa 13 l betrug, wurde dann der Aether verdampft anfangs bei gewöhnlichem Druck und etwa 30° des Wasserbades, gegen Ende des Verfahrens aber unter vermindertem Druck bei Zimmertemperatur,

um zu verhüten, dass die Ester teilweise mit dem Aether in die Vorlage überdestillieren. Das Gemisch der freien Ester der Aminosäuren wurde nunmehr in einem Claissenkolben der fraktionierten Destillation unterworfen.

Es wurden dabei drei Fraktionen aufgefangen:

I. bei bis 100° des Wasserbades und etwa 12 mm Druck,
II. bei bis 100° d. Wasserbades u. etwa 0,1—0,5 mm Druck,
III. bei bis 200° des Oelbades und etwa 0,1—0,5 mm Druck.

I. Fraktion.

Die Verarbeitung der 1. Fraktion begann mit der Verseifung der Ester. Die Flüssigkeit wurde mit etwa der 10fachen Menge Wasser übergossen und unter Zugabe von Siedestäbchen am Rückflusskühler auf dem Baboblech gekocht, bis das Verschwinden der alkalischen Reaktion die Beendigung des Verseifungsprozesses anzeigte. Dies war nach etwa 8 Stunden der Fall. Nunmehr wurde die wässerige Lösung der freien Aminosäuren unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft und der Rückstand wiederholt mit absolutem Alkohol ausgekocht, um das etwa vorhandene Prolin zu gewinnen. Die alkoholische Lösung wurde dann zusammen mit der aus der 2. Fraktion in gleicher Weise gewonnenen weiter behandelt. Die übrigen Aminosäuren der 1. Fraktion, welche in Alkohol nicht löslich waren, wurden nun in etwas Wasser gelöst und auf dem Wasserbade durch Kristallisation in 8 Fraktionen zerlegt. Nachdem diese im Trockenschrank bei 100° bis zur Gewichtskonstanz verblieben waren, wurde der Schmelzpunkt der einzelnen Fraktionen festgestellt und aus je einer bestimmten Menge das Kupfersalz hergestellt und untersucht. Dazu wurde je 1 g der betreffenden Fraktion

mit einem Ueberschuss von Kupferoxydaufschwemmung aufgekocht, die Lösung vom Rückstand abfiltriert, letzterer noch gut ausgekocht und dann das Filtrat im Verein mit den Waschwässern zur Trockne verdampft. Von den so erhaltenen Kupfersalzen der einzelnen Fraktionen wurden bestimmte Mengen, die bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet waren, im Porzellantiegel verascht. Aus der Differenz der Gewichtszahlen wurde sodann der jeweilige Kupfergehalt der Salze von den einzelnen Fraktionen berechnet.

II. Fraktion.

In gleicher Weise wurde die 2. Fraktion verarbeitet. Die Verseifung wurde ebenfalls durch 8stündiges Kochen mit der 10fachen Menge Wassers erzielt. Die wässerige Lösung der freien Aminosäuren wurde zur Trockne eingedampft, das Prolin durch wiederholtes Auskochen mit absolutem Alkohol abgetrennt und mit dem aus der 1. Fraktion stammenden alkoholischen Auszug vereinigt. Von den übrigen Aminosäuren wurden entsprechend ihrer geringeren Gewichtsmenge nur 4 Fraktionen hergestellt, welche dann wie bei der 1. Fraktion auf ihren Schmelzpunkt und den Kupfergehalt ihrer Kupfersalze untersucht wurden.

Prolin-Bestimmung.

Das Prolin, welches in den beiden ersten Fraktionen enthalten ist, war durch deren Auskochen mit absolutem Alkohol gewonnen worden. Der vereinigte Auszug wurde unter vermindertem Druck eingedampft

und der Rückstand wieder mit heissem absolutem Alkohol übergossen. Dabei zeigte sich, dass nur ein Teil wieder in Lösung ging. Diese Lösung wurde wieder zur Trockne verdampft und nochmals mit absolutem Alkohol gelöst. Auch jetzt blieb ein in Alkohol unlöslicher Rückstand. Diese beiden unlöslichen Rückstände wurden in Wasser gelöst, vereinigt, eingedampft und wie die beiden ersten Fraktionen auf Schmelzpunkt und Kupfergehalt ihrer Kupfersalze untersucht. Die alkoholische Lösung dagegen blieb nach nochmaligem Eindampfen völlig in absolutem Alkohol löslich. Da nun anzunehmen ist, dass der beim Eindampfen verbleibende Rückstand ziemlich reines Prolin darstellt, wurde dieses in sein Kupfersalz übergeführt, nachdem vorher sein Gewicht festgestellt war. Dazu wurde seine wässerige Lösung mit Kupferoxydaufschwemmung gekocht, das Filtrat hiervon mit den beim Auskochen des Rückstandes sich ergebenden Waschwässern vereinigt und zur Trockne eingedampft. Die Ueberführung des Prolins in sein Kupfersalz wurde vorgenommen, um 1 Prolin von dem gleichzeitig vorhandenen racemischen Prolin zu trennen. Während nämlich das Kupfersalz des ersteren in absolutem Alkohol sich löst, ist das Kupfersalz des d-l Prolins in Alkohol völlig unlöslich. Daher wurde das so gewonnene blaue Prolinkupfer mit absolutem Alkohol aufgekocht. Während ein Teil in Lösung ging und durch Filtrieren abgetrennt werden konnte, blieb ein Rückstand übrig, das razemische Prolinkupfer. Dieses wurde aus Wasser umkristallisiert und sein Kupfergehalt bestimmt, nachdem es bei 120° getrocknet worden war. Der in Alkohol lösliche Anteil, das 1 Prolinkupfer, ergab beim Eindampfen unter vermindertem Druck einen sirupartigen Rückstand.

III. Fraktion.

Aus der letzten Fraktion wurde zunächst der Phenylalaninester abgetrennt. Das Gemisch der verschiedenen Ester — hier kommen ausserdem die Ester des Serins, der Asparagin- und Glutaninsäure in Frage — wurde mit etwa der fünffachen Menge Wasser versetzt. Da der Ester des Phenylalanins nur sehr schwer in Wasser löslich ist, fiel er in Form feinster Tröpfchen aus und verlieh dadurch der Flüssigkeit eine milchige Trübung. Da aber die anderen Ester in Wasser leicht löslich sind, gelang es, den erstgenannten Ester dadurch abzutrennen, dass das Gemisch mit Aether geschüttelt wurde, wobei er von dem Aether aufgenommen wurde, während die drei übrigen Ester im Wasser gelöst blieben. Dann wurde mit dem Scheidetrichter die sich bald absetzende aetherische Schicht von der wässerigen Lösung getrennt und durch mehrfaches Auswaschen mit Wasser von den etwa noch mitgerissenen Teilen der übrigen Ester gereinigt. Nachdem nun der Aether bei vermindertem Druck entfernt worden war, wurde der Rückstand durch wiederholtes Verdampfen mit rauchender Salzsäure verseift. Das dabei gebildete salzsaure Phenylalanin wurde aus Salzsäure umkristallisiert.

Die Lösung der übrigen Ester in Wasser wurde mit den Waschwässern der aetherischen Lösung vereinigt. Dann wurden die Ester durch Kochen mit Baryumhydrat verseift, welches zu diesem Zweck frisch umkristallisiert worden war. Erst nach längerer Zeit, die Lösung stand über drei Wochen, waren neben dem Baryt in grösserer Menge feine Kristalldrüsen sichtbar, die aus asparaginsaurem Baryt bestehen. Sie wurden abfiltriert und durch Kochen mit Schwefelsäure zersetzt. Darauf wurde aus der stark verdünnten Lösung die freie Schwefelsäure durch Baryumhy-

droxyd entfernt und das Filtrat vom ausgefallenen Baryumsulfat eingedampft. Der Rückstand bestand aus reiner Asparaginsäure.

Nunmehr wurde zur Gewinnung der Glutaminsäure die Mutterlauge vom asparaginsauren Baryt weiter verarbeitet. Der Baryt wurde quantitativ mit Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat vom so entstandenen Baryumsulfat wurde unter vermindertem Druck stark eingeengt und in die Flüssigkeit gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Die Lösung blieb dann einige Tage im Eisschrank stehen und hatte nach dieser Zeit einen kristallinischen Niederschlag ausgeschieden. Dieser wurde abgenutscht. In das Filtrat, welches zuvor noch eingeengt war, wurde aufs neue Salzsäure eingeleitet. Nach einigen Tagen waren wieder Kristallmassen vorhanden. Der ganze Prozess wurde darauf noch einmal wiederholt, doch ohne Erfolg. Die vereinigten Niederschläge wurden nun mit kalter Salzsäure gewaschen, aus heisser Salzsäure umkristallisiert und über Kalk und Schwefelsäure getrocknet.

Schliesslich blieb noch die Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrats auf ihren Gehalt an Serin und Asparaginsäure zu untersuchen. Dazu wurde die Mutterlauge des unreinen Produktes mit der des umkristallisierten Salzes vereinigt und unter vermindertem Druck völlig zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde, um möglichst viel von der freien Salzsäure zu entfernen, wiederholt in Wasser aufgenommen und letzteres wieder verdampft. Schliesslich wurde er noch einmal in Wasser gelöst und so lange mit gelbem Bleioxyd gekocht, bis die Salzsäure völlig gebunden war. In das Filtrat wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, um das gelöste Blei zu entfernen, und wieder filtriert. Das Filtrat vom Bleisulfid enthält Asparaginsäure und Serin. Durch Einengen der Lösung liess

sich die Asparaginsäure ausfällen. Darauf wurde die saure Lösung mit Normal-Natronlauge genau neutralisiert und die Flüssigkeit weiter eingeengt. Jetzt schied sich das Serin aus.

Die Untersuchung der Cocons der italienischen Seidenraupe, welche auf dem oben beschriebenen Wege ausgeführt wurde, ergab an Monoaminosäuren, berechnet auf 100 g Cocons, aschefrei und bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, die folgenden Werte. Es wurden gefunden:

Glykokoll	33,5 g	Glutaminsäure	0,25 g
Alanin	20,0 „	Phenylalanin	1,2 „
Leucin	0,75 „	Tyrosin	9,0 „
Serin	1,9 „	Prolin	0,8 „
Asparaginsäure	1,0 „		

Die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren erfolgte bis auf die Glutaminsäure durch die Analyse der betreffenden Verbindungen.

Glykokoll:

0,2230 g Subst. gaben 0,2604 g CO_2 und 0,1326 g H_2O.
Berechnet für $C_2H_5NO_2$: Gefunden:
32,00% C und 6,66% H. 31,85% C und 6,60% H.

Alanin:

0,1468 g Subst. gaben 0,2179 g CO_2 und 0,1045 g H_2O.
Berechnet für $C_3H_7NO_2$: Gefunden:
40,45% C und 7,87% H. 40,48% C und 7,90% H.

Leucin:

0,1056 g Subst. gaben 0,2130 g CO_2 und 0,0952 g H_2O.
Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$: Gefunden:
54,96% C und 9,92% H. 55,01% C und 10,01% H.

Serin:

0,1792 g Subst. gaben 0,2275 g CO_2 und 0,1098 g H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NO_3$:	Gefunden:
34,28% C und 6,66% H.	34,12% C und 6,80% H.

Asparaginsäure:

0,2010 g Subst. gaben 0,2664 g CO_2 und 0,0980 g H_2O.

Berechnet für $C_4H_7NO_4$:	Gefunden:
36,09% C und 5,26% H.	36,14% C und 5,42% H.

Glutaminsäure wurde als Chlorhydrat identifiziert.

Phenylalanin:

0,1482 g Subst. gaben 0,3560 g CO_2 und 0,0902 g H_2O.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_2$:	Gefunden:
65,45% C und 6,66% H.	65,50% C und 6,76% H.

Literatur.

1. Emil Abderhalden. Lehrbuch der physiologischen Chemie. 2. Aufl. 1909. Vorlesung IX S. 231 ff.
2. Emil Abderhalden. Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der speziellen Eiweisschemie 1909.
3. Emil Fischer und Emil Abderhalden. Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroins. Ber. d. dtsch. chem. Ges. Jg. 39 S. 752, 1906.
4. Emil Fischer und Emil Abderhalden. Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Ber. d. dtsch. chem. Ges. Jg. 39 S. 2315, 1906.
5. P. A. Levene und W. A. Beatty. Ueber das Vorkommen von Prolyl-glycinanhydrit bei der tryptischen Verdauung der Gelatine. Ber. d. dtsch. chem. Ges. Jg. 39 S. 2060, 1906.
6. P. A. Levene und G. B. Wallace. Ueber die Spaltung der Gelatine. IV. Mitt. Zeitschrft. f. phys. Chem. Bd. 47 S. 143, 1906.
7. Thomas B. Osborne und S. H. Clapp. A new decomposition product of Gliadin. American Journal of Physiology. Vol. XVIII p. 123 (1907.)
8. Emil Fischer und Emil Abderhalden. Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Ber. d. dtsch. chem. Ges. Jg. 40, S. 3544, 1907.
9. Emil Abderhalden und Casimir Funk. Beitrag zur Kenntnis der beim Kochen von Casein mit 25% Schwefelsäure und mit starker Salzsäure entstehendén Spaltungsprodukte. Ztschrft. f. phys. Chem. Bd. 53 S. 19, 1904.
10. Emil Abderhalden. Partielle Hydrolyse einiger Proteine. Ztschrft. f. phys. Chem. Bd. 58 S. 373, 1909.
11. Emil Abderhalden. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen auftretenden Spaltprodukte. Ebenda Bd. 62 S. 315, 1909.

12. Emil Abderhalden. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen auftretenden Spaltprodukte. Ebenda Bd. 63 S. 402, 1909.
13. Emil Abderhalden und Casimir Funk. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der partiellen Hydrolyse von Proteinen. Ebenda Bd. 64 S. 436, 1910.
14. Emil Abderhalden. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen auftretenden Spaltprodukte. Ebenda Bd. 65 S. 417, 1910.
15. Emil Abderhalden und Akikazu Suwa. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen auftetenden Spaltprodukte. Ebenda Bd. 66 S. 13, 1910.

Lebenslauf.

Ich Georg Karl Roose, evangelischer Konfession, wurde am 19. Juli 1886 zu Pyritz in Pomm. als Sohn des Uhrmachers Franz Roose und seiner Ehefrau Therese geb. Köller geboren. Nach vorbereitendem Unterricht auf der Knabenoberschule habe ich dort das Königl. Bismarck-Gymnasium besucht und am 1. April 1905 mit dem Reifezeugnis verlassen. Als Studierender der Königl. Militär-Veterinär-Akademie habe ich 7 Semester die Vorlesungen an der Tierärztlichen Hochschule zu Berlin gehört, dort am 30. April 1908 die naturwissenschaftliche Prüfung abgelegt und am 29. August 1910 nach bestandener Fachprüfung die Approbation als Tierarzt erlangt. Am 11. August wurde ich zum Unterveterinär befördert und gehörte am 12. Dezember zu den Doktoranden der ersten Promotionsprüfung an der Tierärztlichen Hochschule zu Berlin.

846000000568848

Freie Universität Berlin

846000000568848