

## Untersuchungen über den Einfluß von Temperatur, Druck und Erhitzungsdauer auf die saure Hydrolyse von eiweißhaltigen Produkten.

### II. Mitteilung.

#### Das Verhalten einzelner Aminosäuren in saurer Lösung in Abhängigkeit von Druck und Temperatur.

Von

K. HEINTZE.

*Mitteilung aus der Bundesanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe.*

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. August 1954.)

Nachdem im ersten Teil dieser Untersuchung der Verlauf der Hydrolyse eiweißhaltiger Produkte bei zunehmendem Druck bzw. Temperatur an der Freisetzung von  $\alpha$ -Aminostickstoff gemessen worden war, ergab sich die Frage, in welcher Beziehung einzelne Aminosäuren zu den beobachteten Maxima und Minima in der Abspaltung des Amino-N bei der sauren Hydrolyse unter Druck stehen und in welchem Umfang sie unter den gegebenen Bedingungen zerstört werden.

#### *Verhalten von Cystin, Cystein und Methionin.*

In der Literatur sind sowohl in früherer Zeit als auch in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Untersuchungen über die Freisetzung und Zerstörung von Aminosäuren in saurer Lösung veröffentlicht worden. So berichten beispielsweise JONES und GERSDORFF<sup>1</sup> über die Abspaltung von Cystin aus Casein bei der sauren Hydrolyse unter Rückfluß, wobei nach etwa 2 Std. ein Maximum an freiem Cystin erreicht wird, während bei längerer Erhitzung die Cystinwerte sehr schnell wieder abnehmen. CALVERY u. Mitarb.<sup>2</sup> konnten dies auf Grund ihrer Untersuchungen nicht bestätigen, sondern beobachteten, wie unter den gleichen Bedingungen die Cystinwerte allmählich anstiegen, nach etwa 5 Std. ein Maximum erreichten und dann langsam wieder absanken. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen werden auf Schwierigkeiten bei den verschiedenen Bestimmungsmethoden für Cystin zurückgeführt. Bei Hydrolysen im Autoklaven (120° C) mit 10% iger Schwefelsäure werden Cystin und Arginin aus Casein und anderen Proteinen zufolge BHAGVAT u. Mitarb.<sup>3</sup> nach 45 min freigesetzt. Eine längere Erhitzung führt zur Abnahme der Werte.

Über die Zerstörung von Cystin und Cystein bei der sauren Hydrolyse unter Rückfluß bzw. im geschlossenen Gefäß bei 100° C berichtet LUGG<sup>4</sup>. Danach werden diese beiden Aminosäuren unter den genannten Bedingungen nur wenig zerstört. Bei Gegenwart von Kohlenhydraten erhöhen sich die Verluste jedoch beträchtlich und erreichen bei Cystin 6—7%, bei Cystein bis zu 85%. Nach OLCOTT und FRAENKEL-CONRAT<sup>5</sup> spielt auch das Tryptophan eine gewisse Rolle bei der Zerstörung des Cysteins bzw. umgekehrt. Bei höheren Temperaturen erhöhen sich die dadurch entstehenden Verluste noch.

Im Vergleich zu Cystin und Cystein scheint das Methionin nach Berichten von SMITH und GREENE<sup>6</sup> wesentlich stabiler zu sein und wurde bei Hydrolyse von Samenglobulin mit 3n-Salzsäure bei 120° C nicht angegriffen. Nach BUTZ<sup>7</sup> entstehen bei der Erhitzung von Methionin in starken Säuren nichtflüchtige Disulfide (wahrscheinlich Homocystin), die unter Umständen einen erhöhten Cystingehalt vortäuschen können.

<sup>1</sup> JONES, D. D., u. C. E. GERSDORFF: J. of Biol. Chem. **101**, 657 (1933).

<sup>2</sup> CALVERY, H. O., W. D. BLOCK u. E. D. SCHOCK: J. of Biol. Chem. **113**, 21 (1936).

<sup>3</sup> BHAGVAT, K., u. V. V. SREERAMAMURTHY: Indian J. Med. Res. **32**, 145 (1944); ref. in Chem. Abstr. **40**, 4093 (1946).

<sup>4</sup> LUGG, J. W. H.: Biochem. J. **27**, 1022 (1933).

<sup>5</sup> OLCOTT, H. S., u. H. FRAENKEL-CONRAT: J. of Biol. Chem. **171**, 583 (1947).

<sup>6</sup> SMITH, E. L., u. R. D. GREENE: J. of Biol. Chem. **167**, 833 (1947).

<sup>7</sup> BUTZ, L. W.: J. of Biol. Chem. **97**, 31 (1932).

### *Verhalten von Arginin, Histidin und Lysin.*

Die basischen Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin verhalten sich nach den Berichten in der Literatur verschieden gegenüber einer Erhitzung in saurer Lösung. So berichtet TRISTRAM<sup>1</sup>, daß bei einer Hydrolyse in Gegenwart von furfurolabspaltenden Kohlenhydraten Verluste an Arginin entstanden, während die Histidinwerte schwankten. Lysin blieb unverändert. Auch SCHEIN und BERG<sup>2</sup> beobachteten bei ihren Versuchen mit einer mehrstündigen Hydrolyse von Casein in 25% iger Schwefelsäure unter Rückfluß sowie bei 1, 2 und 6 atü, daß Arginin dabei am stärksten, Histidin wenig und Lysin kaum zerstört wurde. BAILEY<sup>3</sup> gibt für Arginin Verluste von 5—27%, für Histidin von 1,5—41% und für Lysin von 4—10% bei saurer Hydrolyse an. Es soll dabei jedoch kein Ammoniakstickstoff gebildet werden. Die Form der Zerstörung ist unbekannt. HENRIQUES und GJALDBAEK<sup>4</sup> berichten unter anderem auch über Versuche anderer Autoren, wozu nach Histidin und Arginin bei 150° C in 2n-Salzsäure nur wenig Ammoniak abspalten, während Glykokoll unter diesen Bedingungen nicht und Tyrosin nur wenig angegriffen wurde.

### *Verhalten von Tyrosin und Tryptophan.*

Nach anderen Angaben ist Tyrosin dagegen in saurer Lösung (auch im geschlossenen Gefäß bei 100° C) sehr empfindlich, besonders in Gegenwart von Kohlenhydraten<sup>5</sup>. Das gleiche gilt für Tryptophan, das nach LUGG<sup>6</sup> am stärksten betroffen wird. YORITAKA<sup>7</sup> berichtet, daß Tryptophan allein durch eine Säurehydrolyse nicht zerstört wird, sondern daß erst in Gegenwart von Kohlenhydraten durch Huminbildung Verluste entstehen. Ähnliche Beobachtungen machten auch OLCOTT u. Mitarb.<sup>8</sup>, die noch besonders auf die gegenseitige Beeinflussung von Tryptophan und Cystin/Cystein hinweisen.

### *Verhalten von Threonin und Serin.*

Nach WINNICK<sup>9</sup> ist eine längere Säurehydrolyse bei 100° C ohne Einfluß auf zu hydrolysierenden Gliadin zugesetztes Threonin, während BORCHERS u. Mitarb.<sup>9</sup> bei der Hydrolyse von Zein mit 10—25% iger Schwefelsäure bei 100°, 140°, 165°, und 180° C und einer Dauer von 8 bzw. 15 Std. eine zunehmende Zerstörung von Threonin feststellten. Über Serin wird bereits von ABDERHALDEN und BROICH<sup>10</sup> berichtet, daß es gegen Kochen in 25% iger Schwefelsäure ziemlich empfindlich ist. In neuerer Zeit machten GORDON u. Mitarb.<sup>11</sup> sowie BOYD und LOGAN<sup>12</sup> die gleiche Beobachtung, wobei erstere mit 10n-Salzsäure bei 37° C, letztere mit 6,8n-Salzsäure unter Rückfluß arbeiteten.

### *Verhalten reiner Aminosäuren.*

Während sich die bisher angeführten Untersuchungen in erster Linie auf unmittelbar aus dem Proteinverband abgespaltene Aminosäuren bezogen, prüften GAWRILOW u. Mitarb.<sup>13</sup> das Verhalten einzelner reiner Aminosäuren in saurer Lösung bei 180° C. Sie konnten unter diesen Bedingungen eine verschiedene starke Desaminierung, gemessen an der Ammoniakabspaltung, feststellen. Danach wurden Cystin, Histidin und Asparaginsäure stark geschädigt, Leucin, Alanin und Arginin wenig, Valin, Lysin, Tyrosin, Glykokoll und Glutaminsäure kaum verändert. Versuche mit Oxyaminosäuren erfolgten nicht. Die Konzentration der verwendeten Säuren lag um 1%.

Ein weiterer Punkt, der bei der Zerstörung von Aminosäuren während der Erhitzung in saurer Lösung berücksichtigt werden muß, ist die von verschiedenen Autoren beobachtete größere Empfindlichkeit einzelner dieser Säuren in Peptidbindung, verglichen mit der freien Form. NICOLET und SHINN<sup>14</sup> berichten über diese Erscheinung beispielsweise über Serin und Threonin, BAILEY<sup>3</sup> bei Cystein und Cystin. Auch GAWRILOW u. Mitarb.<sup>13</sup> konnten bei ihren Versuchen mit reinen

<sup>1</sup> TRISTRAM, G. R.: *Biochemic. J.* **33**, 1271 (1939).

<sup>2</sup> SCHEIN, A. H., u. C. P. BERG: *Federat. Proc.* **2**, 69 (1943); *Arch. of Biochem.* **11**, 209 u. 215 (1946).

<sup>3</sup> BAILEY, K.: *Biochemic. J.* **31**, 1396 (1937).

<sup>4</sup> HENRIQUES, V., u. J. K. GJALDBAEK: *Hoppe-Seylers Z.* **67**, 8 (1910).

<sup>5</sup> LUGG, J. W. H.: *Biochemic. J.* **32**, 775 (1938).

<sup>6</sup> YORITAKA, T.: *Hoppe-Seylers Z.* **270**, 43 (1941).

<sup>7</sup> OLCOTT, H. S., u. H. FRAENKEL-CONRAT: *J. of Biol. Chem.* **171**, 583 (1947).

<sup>8</sup> WINNICK, T.: *J. of Biol. Chem.* **142**, 461 (1942).

<sup>9</sup> BORCHERS, R., J. R. TOTTER u. C. P. BERG: *J. of Biol. Chem.* **142**, 697 (1942).

<sup>10</sup> ABDERHALDEN, E., u. F. BROICH: *Biochem. Z.* **262**, 321 (1933).

<sup>11</sup> GORDON, A. H., A. J. P. MARTIN u. R. L. M. SYNGE: *Biochemic. J.* **35**, 1369 (1941).

<sup>12</sup> BOYD, M. J., u. M. A. LOGAN: *J. of Biol. Chem.* **146**, 279 (1942).

<sup>13</sup> GAWRILOW, N. J., N. W. u. A. BLAGINA: *Bull. Soc. chim. France* **5**, 442 (1938).

<sup>14</sup> NICOLET B. H., u. L. A. SHINN: *J. of Biol. Chem.* **140**, 685 (1941).

Aminosäuren diese Feststellung machen. Sie beobachteten, daß Alanyl-glycin bei Erhitzung in verdünnter Säure auf 180° C mehr Ammoniak-N abspaltet als die beiden freien Aminosäuren allein. Sicher kann hier in manchen Fällen auch die gegenseitige Beeinflussung einzelner Aminosäuren untereinander die schon weiter oben bei der Zerstörung von Tryptophan bzw. Cystin/Cystein erwähnt wurde<sup>1</sup>, eine Rolle spielen.

#### *Einfluß von Säurekonzentration, Temperatur und Erhitzungsdauer.*

Nach SCHEIN und BERG<sup>2</sup> ist der Einfluß einer Temperaturerhöhung größer, als wenn die Erhitzungsdauer verlängert, die Säurekonzentration erhöht werden<sup>3</sup>. Die Dauer der Erhitzung ist insofern von Bedeutung, als eine Verlängerung über die zur Hydrolyse des Proteins notwendigen Zeit hinaus die Aminosäuren sowohl verstärkt racemisiert als auch zerstört, besonders bei höheren Temperaturen.

#### *Rolle der Kohlenhydrate.*

Im allgemeinen sind wohl die begleitenden Kohlenhydrate, insbesondere ihre reaktionsfähigen Spaltprodukte, für einen großen Teil der Zerstörung von Aminosäuren bei der Eiweißhydrolyse verantwortlich, sei<sup>4</sup> es durch Adsorption, durch Aldehyd-Amino- bzw. Aldehyd-Phenol-Kondensationen oder sei es durch andere Reaktionen, die in erster Linie zur Bildung der huminähnlichen schwarzen Rückstände mit wechselndem N-Gehalt führen. So berichtet LUGG<sup>5</sup> über den großen Einfluß von Kohlenhydraten auf die Zerstörung von Cystin und besonders Cystein in saurer Lösung. Dagegen hält er für Tyrosin und Tryptophan die Gegenwart von Kohlenhydraten für praktisch bedeutungslos<sup>6</sup>, eine Ansicht, die von vielen anderen Autoren nicht geteilt wird. Nach GORTNER<sup>7</sup> spielt gerade das Tryptophan eine Hauptrolle bei der Bildung von Huminverbindungen, und zwar durch Kondensation eines H-Atoms des Indolringes mit einer Aldehydgruppe der Kohlenhydrate. Auch KASCHIRSKUH<sup>8</sup> machte ähnliche Beobachtungen bei der Erhitzung von Casein mit Kohlenhydraten. Nach KIESEL und KIRJANOWA<sup>9</sup> war besonders das Tyrosin an der Huminbildung bei saurer Hydrolyse beteiligt. Durch Zusatz von Tannin oder Rohrzucker zu reinen Aminosäuren konnten sie die gleiche Erscheinung hervorrufen. (Weitere Literatur vgl.<sup>10</sup>.)

Neben der Feststellung der Zerstörung von Aminosäuren bei der sauren Hydrolyse von Proteinen sind auch eine ganze Reihe von Versuchen zur Vermeidung dieser Verluste gemacht worden. Hier sei nur der Zusatz reduzierender Substanzen erwähnt. So verwendet in neuer Zeit KOFRANYI<sup>11</sup> Zinn(II)-chlorid, Quecksilber(II)-chlorid oder Titan(III)-chlorid, um wenig gefärbte Hydrolysate zu erlangen. Bei einem großen Überschuß an Kohlenhydraten, wie beispielsweise in Nahrungsmitteln, waren die Ergebnisse allerdings nicht besonders günstig. KARAMBELKA u. Mitarb.<sup>12</sup> verwendeten TiCl<sub>3</sub> und SnCl<sub>2</sub> bei der sauren Hydrolyse von Casein und konnten dabei sowohl eine Schutzwirkung der Salze auf Tryptophan und Cystin als auch eine Katalysierung der Hydrolyse beobachten. Letzteres wird ebenfalls von LIEBEN<sup>13</sup> für TiCl<sub>3</sub>, SnCl<sub>2</sub> und SnCl<sub>4</sub> berichtet. Nach MOSS<sup>14</sup> wird bei der Verwendung von Schwefliger Säure als Hydrolysieragens bei 100—180° C eine Huminbildung verhindert und die Hydrolyse von beispielsweise Casein oder Soja ohne Verluste an Tryptophan durchgeführt. Um Zerstörungen bei der sauren Hydrolyse zu vermeiden, arbeiteten MONIER und JUTISZ<sup>15</sup> mit einer, durch fünfmaliges Destillieren von allen metallischen Verunreinigungen befreiten 6n-Salzsäure unter Luftabschluß bei 85—90° C, und vermieden dabei Verluste an Tryptophan, Cystin/Cystein und Serin.

<sup>1</sup> OLCOTT, H. S., u. H. FRAENKEL-CONRAT: Zit. S. 464, Anm. 7

<sup>2</sup> SCHEIN, A. H., u. C. P. BERG: Zit. S. 464, Anm. 2.

<sup>3</sup> BORCHES, R., u. C. P. BERG: J. of Biol. Chem. **142**, 693 (1942).

<sup>4</sup> HEINTZE, K.: Diese Z. **100**, 253 (1955).

<sup>5</sup> LUGG, J. W. H.: Zit. S. 463, Anm. 4.

<sup>6</sup> LUGG, J. W. H.: Zit. S. 464, Anm. 5.

<sup>7</sup> GORTNER, R. A.: Hoppe-Seylers Z. **139**, 95 (1924).

<sup>8</sup> KASCHIRSKUH, W. A.: J. chim. Gen. **10**, 1495 (1940).

<sup>9</sup> KIESEL, A., u. E. KIRJANOWA: Biochimija [russ.] **6**, 280 (1941); ref. in Ber. ges. Physiol. **126**, 240 (1941).

<sup>10</sup> MARTIN, A. J. P., u. R. L. M. SYNGE: Advances Protein Chem, **2**, 1 (1945).

<sup>11</sup> KOFRANYI, E.: Hoppe-Seylers Z. **283**, 14 (1948); Naturwiss. **37**, 91 (1950).

<sup>12</sup> KARAMBELKA, P. V., u. A.: Ann. Biochem. Exp. Med. (India) **10**, 1 (1950); ref. in Chem. Abstr. **46**, 1073 (1952).

<sup>13</sup> LIEBEN, F.: J. of Biol. Chem. **145**, 223 (1942).

<sup>14</sup> MOSS, A. M.: U. S. P. 2, 442, 055. ausgeg. 25. V. 1948.

<sup>15</sup> MONIER, R., u. M. JUTISZ: Bull. Soc. chim. Biol. (Paris) **32**, 228 (1950); ref. in Ber. ges. Physiol. **144**, 216 (1951).

Aus den hier angeführten, nur einen Bruchteil der Gesamtliteratur ausmachenden Arbeiten ist zu ersehen, daß das Problem der Zerstörung von Aminosäuren bei der Hydrolyse von Proteinen oder proteinhaltigen Substanzen schon seit langem im Mittelpunkt des Interesses steht. Wie jedoch schon in der Einleitung zum ersten Teil dieser Untersuchung, so muß auch hier wieder festgestellt werden, daß die in der Literatur berichteten Ergebnisse unter zu verschiedenartigen Bedingungen gewonnen wurden, um sowohl einen Vergleich der einzelnen Aminosäuren untereinander, als auch mit den gewählten Bedingungen zu ermöglichen. Das unterschiedliche Verhalten mehrerer Arten von Aminosäuren unter gleichen Bedingungen wurde nur von GAWRILOW u. Mitarb.<sup>1</sup> untersucht, die jedoch, entsprechend ihrer Arbeitsrichtung, mit sehr verdünnten Säuren erhitzten und auch nur einen einzelnen Druckbereich, nämlich 10 atü (179° C), herausgriffen.

Die Aufgabe der folgenden Untersuchungen sollte es daher sein festzustellen, wie sich einzelne reine Aminosäuren in Ab- oder Anwesenheit von Kohlenhydraten und unter den im ersten Teil der Untersuchung zur Hydrolyse eiweißhaltiger Produkte gewählten Bedingungen verhalten, um zunächst einen Überblick und schließlich gewisse Anhaltspunkte für eine spätere direkte Analyse der einzelnen Hydrolysate zu erhalten. Letztere stößt z. Z. noch auf beträchtliche Schwierigkeiten, insbesondere wenn es sich, wie in diesem Fall, zum Teil um partielle Hydrolysate handelt. Als nächstes wird dann die Empfindlichkeit der Aminosäuren in Peptidbindung zu untersuchen sein.

### Versuchsteil.

Die Zerstörung der Aminosäuren bei Erhitzung in saurer Lösung wurde vorerst nur durch Bestimmung der Ammoniakabspaltung, also der Desaminierung, verfolgt. Im Zusammenhang mit den im ersten Teil der Arbeit entstandenen Fragen interessierte diese Seite des Problems zunächst am meisten. Auch ist diese Form der Inaktivierung bzw. Zerstörung mit die wichtigste und häufigste unter diesen Bedingungen (vgl. z. B. 2, 3). Es muß dabei beachtet werden, daß weitere Möglichkeiten der Zerstörung, besonders bei Oxy- und Thioaminosäuren, bestehen, die auf andere Weise zu erfassen sind. Auch Veränderungen der optischen Aktivität unter den gegebenen Bedingungen konnten nicht berücksichtigt werden, da der größte Teil der untersuchten Aminosäuren nur in der dl-Form erhältlich war.

Die Erhitzungstemperaturen wurden, wie im ersten Teil, zwischen 112° und 179° C gewählt, wobei 112° C unter Rückfluß, die übrigen Temperaturen im Autoklaven erreicht wurden. Auch die Erhitzungsdauer blieb zunächst unverändert 30 min, da es in erster Linie auf einen Vergleich zwischen den verschiedenen Aminosäuren ankam. Selbstverständlich müssen im Anschluß daran auch Untersuchungen über den Einfluß der Erhitzungsdauer erfolgen, um ein richtiges Bild von den Vorgängen bei der Erhitzung in saurer Lösung zu geben.

Zunächst wurden die Aminosäuren in reiner Lösung in 15% iger Salzsäure erhitzt. Anschließend folgten Versuchsreihen mit einem Zusatz von Saccharose, um das Verhalten der Aminosäuren in Gegenwart von Kohlenhydraten zu untersuchen. Saccharose wurde gewählt, da mit ihr nach KIESEL und KIRJANOWA<sup>4</sup> bei der sauren Hydrolyse Erscheinungen hervorgerufen werden können, die der Huminbildung entsprechen und man daher so in gewissen Grenzen ein Modell für die Hydrolyse von kohlenhydrathaltigen Proteinen erhält.

#### Arbeitsweise.

#### Hydrolyse.

Von den Aminosäuren, die als reine Verbindungen vorwiegend in der dl-Form vorlagen (Merck-Hoffmann-La Roche-Präparate); Histidin, Cystein und Lysin als Hydrochloride wurden jeweils, 200—250 mg in Reagenzgläser mit eingeschlifffenen Stopfen eingewogen und mit 10 ml 15% iger Salzsäure (pro anal.) versetzt. Zu einem Teil der Proben wurden außerdem 500 mg reine Saccharose hinzugefügt. Die verwendeten Röhrchen besaßen eine Marke bei 10 und 20 ml, so daß nach Beendigung der Erhitzung aufgefüllt werden konnte.

<sup>1</sup> GAWRILOW, N. J., N. W. u. A. BLAGINA: Zit. 464, Anm. 13.

<sup>2</sup> MARTIN, A. J. P., u. R. L. M. SYNGE: Zit. S. 465, Anm. 10.

<sup>3</sup> LIEBEN, F.: Zit. S. 465, Anm. 13.

<sup>4</sup> KIESEL, A., u. E. KIRJANOWA: Zit. S. 465, Anm. 9.

Die Erhitzung der Aminosäurelösungen erfolgte in der gleichen Weise wie bei den Hydrolysen der ersten Versuchsreihen. Der verwendete Autoklav hatte einen Rauminhalt von etwa 2 l und einen Druckbereich von 0—10 atü. Die in 15% iger Salzsäure gelösten bzw. suspendierten Proben in den oben beschriebenen Röhren wurden, in einem Becherglas stehend, in den zu einem Drittel mit Wasser gefüllten Autoklaven eingebracht. Die Wärmeübertragung erfolgte auf diese Weise genügend gleichmäßig. Als Erhitzungsdauer wurde der Zeitraum von der Erreichung der gewünschten Temperatur bis zum Abstellen des Brenners gerechnet, also wiederum Anheiz- und Abkühldauer unberücksichtigt gelassen. Durch möglichst gleichmäßiges Anheizen gelingt es, diese Zeiten weitgehend konstant zu halten. Die Abkühlung ging stets auf die gleiche Art vor sich und das Öffnen des Autoklaven erfolgte nicht vor Erreichung des Normaldruckes.

Beim Abkühlen kam es gelegentlich vor, daß in den geschlossenen Röhren der Überdruck nicht so schnell nachließ wie im Autoklaven selbst und die Stopfen der Röhren absprangen. Um ein Eindringen von Flüssigkeit in diesem Moment zu verhindern, wurden die Stopfen durch einen dünnen Draht gesichert, so daß sie sich nur etwas heben konnten.

Nach dem völligen Erkalten wurde dann der Autoklav geöffnet und das Becherglas mit den Röhren herausgenommen. Während die Proben ohne Kohlenhydratzusatz vollkommen klar waren und keine Färbung zeigten (eine Ausnahme bildete Cystin, das sich schwach gelb färbte), wiesen die Proben mit Kohlenhydratzusatz eine dunkle Färbung und einen schwarzen Rückstand auf. Diese Erscheinung war jedoch auch zu beobachten, wenn Saccharose allein in 15% iger Salzsäure unter den gegebenen Bedingungen erhitzt wurde, und ließ keinen unbedingten Rückschluß auf eine eingetretene Zerstörung zu.

Neben der Erhitzung im Autoklaven wurde auch entsprechend bei normalem Druck, also unter Rückfluß gearbeitet. Dazu kamen die Aminosäurelösungen in den oben beschriebenen Röhren nach Zusatz eines Siedesteinchens in ein Paraffinölbad und wurden dort, nach Aufsetzen von Rückflußkühlern, auf 110—115° C (Durchschnitt 112° C) erhitzt, so daß sie schwach siedeten. Die Dauer der Erhitzung berechnete sich ebenfalls von der Erreichung der Siedetemperatur bis zum Abstellen des Brenners.

#### *Bestimmung von $NH_3$ —N.*

Zur Bestimmung des abgespaltenen, als Ammonchlorid vorliegenden Ammoniakstickstoffs wurde der Inhalt des Röhrens zunächst mit 10% iger Natronlauge (pro anal.) auf ungefähr  $p_H$  6—6,5 gebracht und nach Abkühlen auf 20 ml aufgefüllt. Die Kohlenhydrat enthaltenden Proben mußten anschließend filtriert werden, die anderen Proben kamen direkt zur Verwendung. Ein aliquoter Teil von 10 ml wurde in einen 500 ml-Langhals-Rundkolben gebracht, mit Wasser auf etwa 200 ml verdünnt und mit ungefähr 4 g Magnesiumoxyd (reinst) versetzt. Die Destillation des Ammoniaks erfolgte in einer Schließapparat mit Spezialvorstoß bei einem Vakuum von etwa 13 mm (Wasserstrahlpumpe) und einer Wasserbadtemperatur von 40° C. Der übergehende Ammoniak wurde in vorgelegter Säure aufgefangen und diese zurücktitriert. Die Normalität der vorgelegten Säure ist verschieden und war dem Grad der Ammoniakabspaltung anzupassen. Als Dauer für die Destillation erwiesen sich 30 min als ausreichend.

Vorher waren mit den verwendeten Chemikalien ohne Zusatz einer Aminosäure sowie mit der entsprechenden Aminosäure aber ohne vorheriges Erhitzen Blindbestimmungen vorgenommen worden. In letzterem Fall betrug die Blindwerte ausnahmslos 0, es fand also bei den angewendeten Destillationsbedingungen noch keine Abspaltung von Ammoniak statt.

#### *Bestimmung von Aminogruppen.*

Zur Kontrolle einer möglichen weiteren Zerstörung oder Blockierung von Aminogruppen neben der Abspaltung als Ammoniak-Stickstoff wurde weiterhin in einem aliquoten Teil von 5 ml die Formoltitration nach SÖRENSEN<sup>1</sup> durchgeführt. Dazu erfolgte nach Neutralisation der Lösung gegen Neutralrot ein Zusatz von 5 ml neutralisierter (Phenolphthalein) 30% iger Formaldehydlösung und die anschließende Titration mit 0,25 n-Natronlauge bis zum Umschlag von Phenolphthalein. Da bei dieser Bestimmung neben den  $\alpha$ -Aminogruppen auch der Ammoniakstickstoff quantitativ erfaßt wird, mußte auch nach der Erhitzung der Aminosäuren im Autoklaven der ursprüngliche Wert gefunden werden, falls nicht Aminogruppen beispielsweise durch Reaktion mit Kohlenhydraten blockiert oder von dem schwarzen Rückstand adsorbiert und damit sowohl analytisch wie physiologisch unzugänglich geworden waren. Bei allen untersuchten Aminosäuren, mit Ausnahme des Cysteins, war dieser Wert der Formoltitration auch bei den hohen Temperaturen und in Gegenwart von Kohlenhydraten unverändert.

<sup>1</sup> Handbuch der Lebensmittelchemie. Bd. II/2, S. 617.

## Ergebnisse.

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse in Tab. 1 fällt als erstes auf, daß ein großer Teil der untersuchten zwölf Aminosäuren in freier Form, auch bei Gegenwart von Kohlenhydraten, gegenüber einer kürzeren Erhitzung in 15%iger Salzsäure, selbst bei hohen Temperaturen ziemlich unempfindlich ist. Jedenfalls trifft das für die hier allein untersuchte Desaminierung zu. Inwieweit andere Schädigungen des Moleküls der Aminosäuren unter diesen Bedingungen eintreten, ist noch festzustellen. Jedoch scheinen nach den Ergebnissen der zur Kontrolle durchgeführten Formoltitration zumindest die  $\alpha$ -Aminogruppen nicht verändert zu werden, so daß also weder eine Bildung von löslichen Aminosäure-Kohlenhydratkomplexen, noch eine merkbare Adsorption an unlösliches Kohlenhydrat bzw. Huminbildung stattgefunden hatte, was durch den äußerst geringen Stickstoffgehalt der schwarzen Rückstände (0,08 bis 0,5% vom Gesamtstickstoff) bestätigt wurde. Eine Ausnahme bildet hier das

Tabelle 1. Der Einfluß erhöhten Drucks auf wäßrige Aminosäure-Lösungen ohne bzw. bei Gegenwart von Saccharose.

Menge und Art der Aminosäure	Zerstörung von Aminosäuren, berechnet aus dem abgespaltenen $\text{NH}_3\text{-N}$ , bei einem Überdruck von															
	0 atü und 112° C		2 atü und 130° C		4 atü und 148° C		5 atü und 154° C		6 atü und 161° C		7 atü und 166° C		8 atü und 170° C		10 atü und 179° C	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
	25 mg Saccharose in %															
250 mg Glutaminsäure	—	—	0,1	0,3	0,2	0,3	0,1	0,4	—	—	0	0,2	—	—	0,1	1,1
100 mg Glykokoll	1,3	1,6	0,7	1,1	0,6	1,5	1,0	2,0	0,8	1,4	0,5	1,2	—	—	0,9	1,2
100 mg Valin	0,7	2,2	0,6	1,7	0,6	1,7	0,8	2,0	0,6	1,7	0,7	1,6	—	—	1,0	2,1
110 mg Isoleucin <sup>5</sup>	0,5	0,6	0,4	0,5	0,7	0,8	0,4	0,5	—	—	0,4	0,7	—	—	0,4	0,7
100 mg Leucin <sup>1</sup>	0,8	1,7	0,8	1,6	0,6	1,0	0,8	2,2	0,6	1,3	0,9	2,7	—	1,6	0,9	1,7
100 mg Lysin x 2HCl <sup>5</sup>	0	0,2	0,1	0,6	0,5	1,1	0,5	0,8	—	—	0,4	0,5	—	—	0,2	0,4
100 mg Histidinhydrochlorid <sup>5</sup>	0,1	0,2	0,3	0,7	0,6	1,0	0,2	0,6	—	—	0,1	0,7	—	—	0	0
100 mg Arginin <sup>2</sup>	1,0	2,7	0,9	1,8	0,8	4,8	0,9	5,2	1,1	5,7	1,5	7,1	—	—	3,1	8,7
100 mg Methionin	—	—	0,9	1,2	0,6	0,6	1,4	1,6	0,7	1,5	0,9	1,4	—	—	0,8	1,8
100 mg Cystin	—	—	1,3	2,6	4,8	6,0	7,4	8,2	13,8	14,2	16,4	16,9	26,8	25,3	41,2	38,0
100 mg Cysteinhydrochlorid <sup>3</sup>	1,6	4,6	1,8	7,1	2,2	8,1	2,5	9,9	2,6	10,6	3,4	12,0	—	—	4,4	14,4
100 mg Serin	2,2	2,6	3,4	4,6	7,7	8,3	10,4	11,7	15,1	16,2	22,6	24,7	29,9	33,3	46,2	47,3
100 mg Glycyl-glycin <sup>4</sup>	—	—	0,7	1,5	0,7	1,5	1,2	1,8	0,9	1,5	0,7	1,2	—	—	0,8	1,1

<sup>1</sup> Zerstörung bei 1 atü: 0,9 bzw. 1,7%; bei 9 atü: 0,9 bzw. 1,3%.

<sup>2</sup> Zerstörung bei 3 atü: 0,8 bzw. 2,8%. Berechnung auf  $\alpha$ -Amino-N.

<sup>3</sup> Nur Desaminierung. Gesamt-Zerstörung 80—90%.

<sup>4</sup> Gerechnet auf 2  $\alpha$ -Aminogruppen je mol.

<sup>5</sup> Im Rahmen vorliegender Arbeit wurden die Werte für diese 3 Aminosäuren von Herrn W. TIMPE bestimmt (Diplomarbeit Techn. Univ. Berlin 1952).

Cystein, dessen Verhalten noch näher untersucht werden muß, da nach den bisher durchgeführten Bestimmungen nicht sicher zu entscheiden ist, ob es sich um eine Bildung von, evtl. auch teilweise löslichen, Verbindungen zwischen  $\alpha$ -Aminogruppen des Cysteins und reaktionsfähigen Gruppen des Kohlenhydrats handelt, oder ob in erster Linie eine Adsorption stattfindet. Für eine Huminformbildung würde der verhältnismäßig hohe Stickstoffgehalt des schwarzen Rückstandes von 6,0—7,5 mg N<sub>2</sub> sprechen, was etwa 70% des Cysteinhydrochlorids gleichkäme. Wie aus Tab. I zu entnehmen ist, liegt dieser Verlust also wesentlich höher als der durch Desaminierung verursachte. Da die übrigen untersuchten Aminosäuren unter den gewählten Bedingungen nicht oder nur ganz geringfügig und nur bei hohen Temperaturen adsorbiert wurden, müssen beim Cystein besonders aktive Gruppen vorhanden sein, die entsprechend in Aktion treten. Möglicherweise kann hier die von LUGG<sup>1</sup> beschriebene Reaktion zwischen den sehr reaktionsfähigen SH-Gruppen des Cysteins und Aldehyd- oder Ketogruppen des Kohlenhydrats unter Bildung von Mercaptalen oder Mercaptolen von Einfluß sein.

Im Gegensatz zu dem größeren Teil der untersuchten Aminosäuren ist eine geringe Anzahl wesentlich empfindlicher und zeigte Verluste bis zu fast 50%. Vergleicht man nun den Verlauf der Ammoniakabspaltung bei steigender Temperatur dieser beiden Gruppen von Aminosäuren miteinander, so fällt auf, daß die entsprechenden Werte bei den Aminosäuren mit den größeren Verlusten stetig ansteigen, während bei den geringfügig betroffenen Aminosäuren die Ammoniak-Abspaltung meist zwischen 4 und 6 atü (148—161° C) ein gewisses Maximum erreicht, um nachher bei den höheren Temperaturen wieder geringer zu werden, und zwar sowohl mit als auch ohne Kohlenhydratzusatz. Der formoltitrierbare Stickstoff verändert sich dabei nicht. Eine Erklärung dieser Erscheinung ist zunächst nicht möglich. Auch läßt sich noch nicht entscheiden, ob und wie weit sie mit den im ersten Teil berichteten Maxima und Minima bei der Abspaltung von  $\alpha$ -Amino-Stickstoff aus Protein bei zunehmender Temperatur in Zusammenhang steht. Weitere Versuche sind zur Klärung dieser Frage notwendig.

Ebenso sind noch weitere Untersuchungen über die verstärkte Empfindlichkeit von Aminosäuren in Peptidbindung erforderlich. Das hier zunächst herangezogene Glycyl-glycin ließ keine stärkere Zerstörung im Vergleich zu Glykokoll erkennen (vgl. Tab. 1). Möglicherweise sind nur gemischte Peptide empfindlich. GAWRILOW u. Mitarb.<sup>2</sup> stellten eine verstärkte Ammoniakabspaltung bei Alanyl-glycin fest.

Der Einfluß der Zeit auf die Ammoniakabspaltung bei verschiedenen Temperaturen wirkt sich bei den einzelnen Aminosäuren unterschiedlich aus. So erfolgte bei Serin, einer empfindlichen Aminosäure, bei längerer Erhitzung nur eine mäßige Verstärkung der Ammoniakabspaltung, die einer Erhöhung der Temperatur bei 30 min Dauer entsprach (vgl. Tab. 1, Abb. 1 u. 2), während bei Glykokoll, einer wenig empfindlichen Aminosäure, sowohl unter Rückfluß als auch bei höheren Temperaturen unter Druck durch Verlängerung der Erhitzungsdauer die Höhe der sonst bei 30 min und höheren Temperaturen erhaltenen Ammoniakwerte weit überschritten wurde (vgl. Tab. 1, Abb. 1 u. 2). Es ist anzunehmen, daß hier eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber oxydativen Einflüssen eine Rolle spielt, worauf schon die bei 112° C (Rückfluß) höher als bei 130° C (Autoklav) liegenden Ammoniakwerte hindeuten.

Der Einfluß der Kohlenhydrate auf die Zerstörung bzw. Inaktivierung scheint bei den einzelnen untersuchten Aminosäuren ebenfalls sehr unterschiedlich zu sein, ist

<sup>1</sup> LUGG, J. W. H.: Zit. S. 463, Anm. 4.

<sup>2</sup> GAWRILOW, N. J., N. W. u. A. BLAGINA: Zit. S. 464, Anm. 13.

aber unter den gewählten Bedingungen nicht so groß, wie zunächst angenommen wurde. Eine wesentlich verstärkte Ammoniakspaltung zeigte sich eigentlich nur bei Cystein und Arginin, während eine Blockierung von  $\alpha$ -Aminogruppen bzw. eine Huminbildung und Adsorption nicht zu beobachten war. Die einzige Ausnahme bildete hier, wie schon weiter oben angeführt wurde, das Cystein. — Versuche mit den bei Anwesenheit von Kohlenhydraten in saurer Lösung als sehr empfindlich bekannten Aminosäuren Tyrosin und

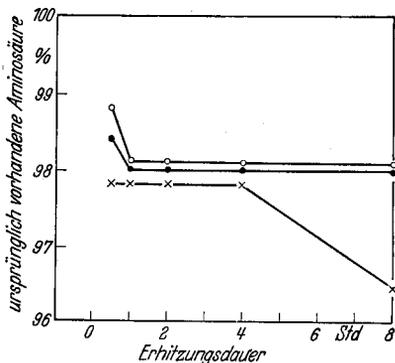


Abb. 1. Die Zerstörung von Serin und Glykokoll in saurer Lösung bei 112° C unter Rückfluß in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer. Serin ohne Saccharose: x; Glykokoll ohne Saccharose: o; Glykokoll mit Saccharose: •.

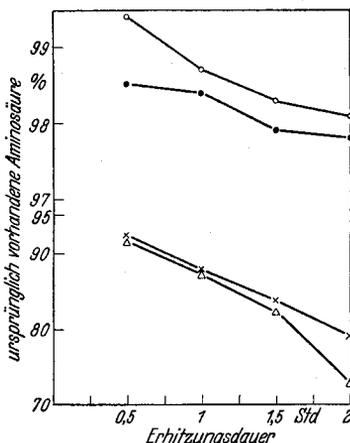


Abb. 2. Die Zerstörung von Serin und Glykokoll in saurer Lösung bei 148° C in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer. Serin ohne Saccharose: x; Serin mit Saccharose: x; Glykokoll ohne Saccharose: Δ; Glykokoll mit Saccharose: •.

Tryptophan stießen auf Schwierigkeiten, ebenso wie bei der dritten aromatischen Aminosäure Phenylalanin, da schon bei Abwesenheit von Saccharose keine übereinstimmenden Ammoniakwerte erhalten werden konnten. Eine nähere Untersuchung der Ursachen dieser Störungen soll erfolgen.

#### Zusammenfassung.

Im Anschluß an den ersten Teil der Versuche über den Einfluß von Temperatur, Druck und Dauer auf die saure Hydrolyse von eiweißhaltigen Produkten wurden 12 reine Aminosäuren auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Erhitzung in salzsaurer Lösung bei steigenden Temperaturen und unter Zusatz von Kohlenhydraten (Saccharose) untersucht. Die Temperaturen lagen zwischen 112 und 179° C (0—10 atü). Als Maß der Zerstörung diente die Ammoniakabspaltung.

Unter den gegebenen Bedingungen wurden die Aminosäuren Glykokoll, Glutaminsäure, Valin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Histidin und Methionin in reiner Form nur zu 0,5—1% desaminiert. Der Zusatz von Saccharose erhöhte die Verluste auf ungefähr 2%. Cystin, Cystein, Serin und in geringerem Maße auch Arginin waren dagegen wesentlich empfindlicher und erlitten Verluste bis zu 47%. Nur bei Arginin und Cystein hatte der Zusatz von Kohlenhydrat einen verstärkenden Einfluß auf die Desaminierung. Das Dipeptid Glycyl-glycin war unter den Versuchsbedingungen nicht empfindlicher als freies Glykokoll.