

Über den Sitz der Fermente im Hühnerei.¹⁾

Von

J. Wohlgemuth.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. April 1905.)

In einer früheren Arbeit²⁾ habe ich berichtet, daß im Hühnerei Fermente vorhanden sind, welche in Tätigkeit treten, sobald man die Eier unter bestimmte Bedingungen gesetzt hat. Diese Bedingungen bestehen darin, daß man ganz frische Hühnereier von der Schale befreit, Eiweiß und Eigelb mit einer gewissen Menge Wasser und etwas Toluol versetzt, gründlich durcheinander schüttelt, bis ein homogener Brei entstanden ist, und diesen Brei in einer Stöpselflasche einer Temperatur von 38° aussetzt. Nach 30—45tägigem Stehen sind beträchtliche Veränderungen in ihm vor sich gegangen, die darauf hindeuten, daß das Eiweiß, das Lecithin resp. Fett und der Farbstoff eine Zerlegung bzw. Zersetzung erfahren haben. Ich schloß hieraus, daß im Hühnerei wahrscheinlich 3 Fermente vorhanden sind, ein proteolytisches, ein lipolytisches und ein chromolytisches.

Im Hinblick auf embryologische Gesichtspunkte war es nun interessant, zu entscheiden, in welchem Teil des Eies die Fermente ihren Sitz haben, ob im Weißei oder Gelbei oder in beiden zugleich. Zu dem Zwecke wurden gesondert sowohl mit Weißei wie mit Gelbei autolytische Versuche angestellt.

Über die ersteren mag von vornherein mitgeteilt sein, daß sie samt und sonders — es handelt sich im ganzen um 4 Versuche — negativ ausfielen. Das Weißei konnte also für den Sitz der Fermente nicht in Frage kommen.

Es war somit der Schluß berechtigt, daß die fraglichen Fermente im Gelbei zu suchen waren. Und in der Tat wurde

¹⁾ Teilweise vorgetragen auf der 76. Versammlung Deutscher Naturforscher und Ärzte zu Breslau 1904.

²⁾ J. Wohlgemuth, Salkowskis Festschrift, Verlag von Hirschwald, Berlin 1904.

durch mehrere Versuche die Richtigkeit dieser Annahme festgestellt. Es würde zu mannigfachen Wiederholungen führen, wollte man auf die Details eines jeden Versuches genauer eingehen. Da alle Versuche annähernd in gleicher Weise angeordnet waren, dürfte es genügen, wenn einer von ihnen ausführlich mitgeteilt wird. — Im ganzen wurden 8 Versuche mit Eigelb allein angestellt; davon waren 5 positiv, 3 negativ ausgefallen. Daß nicht alle Versuche ein positives Resultat lieferten, glaube ich einerseits darauf zurückführen zu können, daß vielleicht nicht alle Eier sich zu diesen Untersuchungen eignen, andererseits darauf, daß der Zusatz eines Konservierungsmittels die Wirksamkeit der Fermente entschieden beeinträchtigt. Die allerersten Versuche nämlich hatten gezeigt, daß bei Zusatz von Chloroform nur eine ganz schwache autolytische Wirkung auftritt. Erst als mit Toluol allein konserviert wurde, gelangte man zu deutlich positiven Resultaten. Aber auch das Toluol darf nur in mäßigen Mengen zur Anwendung kommen, wenn es den Prozeß nicht ungünstig beeinflussen soll. Es hat sich im Laufe der Zeit herausgestellt, daß man am wenigsten schadet, wenn man auf 200 ccm Flüssigkeit 1—2 ccm Toluol zusetzt. Diese Menge genügt vollkommen, um eine Fäulnis zu verhüten. — Außer diesen antiseptischen Versuchen wurde auch ein aseptischer mit ganzen Eiern (Weißei und Gelbei) angestellt, der über 14 Tage ausgedehnt werden konnte. Dieser Versuch soll weiter unten einer besonderen Beschreibung unterzogen werden. — Die Versuchsanordnung gestaltete sich nun im wesentlichen folgendermaßen:

In 5—10 ganz frischen Hühnereiern (Brüteeier) wurde das Gelbei mechanisch vom Weißei, so gut es möglich war, getrennt, in einer Stöpselflasche mit 250—500 ccm Wasser versetzt, gut durchgeschüttelt und zu dem Brei 2—4 ccm Toluol zugefügt. Dann wurde die Flasche in einen Brutschrank (38°) gesetzt und daselbst unter häufigem Durchschütteln 4—10 Wochen belassen; dabei wurde häufig geprüft, ob die Lösung keinen Fäulnisgeruch zeigte. Nach Ablauf der Frist wurde der Brei auf die Spaltprodukte von Eiweiß und Lecithin resp. Fett verarbeitet. Ich kann mich bei der Darstellung dieser

Untersuchungen ganz kurz fassen, da sie im wesentlichen mit den früher mitgeteilten ziemlich genau übereinstimmten. Der Brei wurde in zwei ungleich große Portionen A und B geteilt und dieselben gesondert untersucht.

Portion A.

Dieser Teil diente zum Nachweis der Eiweißspaltprodukte, und da deren eine verhältnismäßig geringe Menge zu erwarten waren, wurden etwa $\frac{2}{3}$ des Breies zu ihrer Isolierung verwandt. Dieselbe geschah nun auf folgende Weise:

Der Brei wurde im Wasserbad bis auf ca. 50° erwärmt und mit ein paar Tropfen H_2SO_4 angesäuert. Dabei trat eine Gerinnung des Eiweißes ein und gleichzeitig setzte sich mit dem Eiweiß das Lecithin fast vollkommen ab, so daß die darüberstehende Flüssigkeit fast klar erschien. Dieselbe wurde abfiltriert, auf dem Wasserbad bis auf ein Volumen von 100 ccm eingeeengt, mit Äther solange im Scheidetrichter extrahiert, als noch fettige Produkte übergingen, und dann zur Abscheidung des letzten Restes von Albumosen und Peptonen mit Phosphorwolframsäure behandelt. Das Filtrat dieser Fällung wurde von der überschüssigen Phosphorwolframsäure mittels Baryt befreit, der Baryt durch Kohlensäure entfernt und die hieraus resultierende Lösung bis zum Sirup eingeeengt. Nach kurzem Stehen im Exsikkator war der Sirup — falls der Versuch positiv ausfiel — fast völlig erstarrt und seine mikroskopische Untersuchung zeigte, daß er zum größten Teil aus Tyrosin und Leucin bestand. Die Trennung dieser beiden Körper von einander geschah so, daß die Kristallmasse scharf abgesogen und dann mit wenig Wasser wieder angerührt wurde. Dabei ging das Leucin in Lösung. Das Tyrosin wurde abfiltriert und einmal aus heißem Ammoniak und etwas Knochenkohle umkristallisiert. Das schneeweiße Produkt zeigte unter dem Mikroskop die typischen zu Büscheln vereinigten Tyrosinadeln und gab die Millonsche Reaktion. — Das Leucin wurde aus dem Filtrat stets als Kupfersalz in der üblichen Weise isoliert und zu einer Identifizierung des Kupfergehalts bestimmt. Ich führe hier und weiter unten nur die Analysen von Versuch IV und VI an.

Versuch IV: 0,3112 g Substanz, gaben 0,0772 g CuO	
VI: 0,2510 „ „ „ „ 0,0622 „ „	
Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:	Gefunden:
Cu = 19,62%	Cu = 19,81%
	Cu = 19,79%

Weitere Eiweißspaltprodukte konnten in keinem Versuch nachgewiesen werden: speziell Cystin, auf das ich, veranlaßt durch den Befund in den ersten autolytischen Versuchen, ganz besonders mein Augenmerk richtete, war niemals zu konstatieren.

B.

Mit dieser Portion sollte nachgewiesen werden, daß bei der Autolyse neben dem Eiweiß auch das Lecithin eine fermentative Spaltung erfahren hatte. In den früheren Versuchen hatte ich mich damit begnügt, nur die Anwesenheit freier Phosphorsäure und freien Glycerins festzustellen, und daraus eine Zersetzung des Lecithins hergeleitet. Gegen eine solche Schlußfolgerung ist aber der Einwand möglich, daß die beiden Produkte gar nicht aus dem Lecithin zu stammen brauchen, daß die Phosphorsäure ebenso gut von dem Vitellin und das Glycerin aus dem Fett herrühren kann. Aus diesem Grunde wurde versucht, ein typisches Spaltprodukt des Lecithins, das Cholin, zu isolieren, dann aber auch wie bisher freie Phosphorsäure und freies Glycerin nachzuweisen. Die Verarbeitung gestaltete sich dementsprechend folgendermaßen: Der Brei wurde solange mit Äther extrahiert, bis kein Fett und kein Lecithin mehr in ihn überging. Dann wurde er auf dem Wasserbad fast vollkommen eingeeengt und der Rückstand mit Alkohol mehrmals extrahiert. Der alkoholische Auszug wurde abgedampft, mit Wasser aufgenommen und in der wässerigen Lösung zunächst freie Phosphorsäure in der üblichen Weise und dann freies Glycerin nachgewiesen. Der Nachweis des Glycerins geschah nach der von Wohl und Neuberg¹⁾ angegebenen Methode, die darin besteht, daß man die zu untersuchende Lösung mit Borsäure erhitzt. Dabei bildet sich aus dem Glycerin Acrolein: dieses ist leicht erkennbar durch einen stechenden

¹⁾ Wohl und Neuberg, Berichte der Deutschen chem. Gesellsch., 1898, Jahrgang XXXI, S. 2114.

Geruch und durch die Fähigkeit seiner Gase, mit Silbernitrat getränktes Filtrierpapier zu schwärzen. — Der Rest der Lösung wurde, um etwa vorhandenes freies Cholin zu isolieren, mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, dann wieder auf dem Wasserbad eingeeengt und mit Alkohol aufgenommen. Zur alkoholischen Lösung wurde soviel Platinchlorid zugesetzt, als noch ein Niederschlag auftrat, die Fällung abgesaugt, mehrmals mit Alkohol, dann mit Äther gewaschen und danach in Wasser gelöst. Beim langsamen Verdunsten an der Luft blieben orangefarbene Plättchen und Tafeln, mitunter auch 1—2 cm lange Nadeln zurück, wie sie nach der Angabe von Gulewitsch¹⁾ für Cholinplatinchlorid charakteristisch sind.

Versuch IV: 0,2113 g Substanz lieferten 0,0669 g Pt

» VI: 0,1811 » » » 0,0574 » »

Gefunden: Berechnet für $C_{10}H_{28}N_2O_2Cl_2 \cdot PtCl_4$:

Pt = 31,69% Pt = 31,63%

Pt = 31,72%

Neben den Versuchen mit isoliertem Eigelb wurde auch, wie schon oben mitgeteilt, ein aseptischer Versuch mit ganzen Eiern angestellt. Um völlige Asepsis zu erzielen, wurden 6 ganz frische Hühnereier in ihrer Schale gelassen, gründlich mit Wasser und Seife gereinigt, mit Alkohol gewaschen und schließlich zur Abtötung der noch anhaftenden Keime mit Sublimat behandelt. Um jede Spur von Sublimat zu entfernen, wurden sie mehrmals mit sterilisiertem Wasser gewaschen, dann in ein vorher sterilisiertes Glasgefäß gebracht, nun erst durch kräftiges Schütteln die Schalen zerbrochen und der Inhalt solange durcheinander geschüttelt, bis ein homogener Brei entstanden war. Dem wurden 600 ccm sterilisiertes Wasser zugegeben und die ganze Mischung abermals gründlich geschüttelt. Sofort angelegte Kulturen (Bouillon und Agar) blieben keimfrei, ebenso fiel am Ende des Versuchs dieselbe Probe negativ aus. Während das Gefäß im Brutschrank (38°) gehalten wurde, konnte man deutlich dieselbe Farbenveränderung wahrnehmen, wie ich sie in meinen früheren Untersuchungen beschrieben habe: der anfänglich hellgelbe Brei nahm eine hellrote Farbe an. Es schien nicht rat-

¹⁾ Gulewitsch, Diese Zeitschrift. Bd. XXVI, S. 175, 1898/99.

sam, den Versuch länger als 14 Tage auszudehnen, sonst hätte man wohl auch weiter beobachten können, wie die hellrosa Farbe mehr und mehr verblaßt und die Lösung schließlich eine milchigweiße Farbe annimmt. Nach 2 Wochen also wurde der Versuch unterbrochen und der Brei auf die einzelnen Spaltprodukte in der oben geschilderten Weise untersucht. Es sei hierüber nur so viel gesagt, daß es gelang, Tyrosin und Leucin zu isolieren, ferner auch Cholin und ebenso freie Phosphorsäure nachzuweisen; dagegen war freies Glycerin nicht vorhanden.

Wenn wir noch einmal die Ergebnisse obiger Untersuchungen kurz zusammenfassen, so haben die autolytischen Versuche mit Hühnereiweiß gezeigt, daß in ihm Fermente nicht enthalten sind. Dagegen finden sie sich im Eigelb, und zwar besitzen dieselben in erster Linie die Fähigkeit, Eiweiß, Lecithin und Fett zu zerlegen. Ihre Einwirkung auf das Vitellolutein ist eine durchaus schwankende. Während sie bei der Autolyse ganzer Eier deutlich zutage trat (aseptischer Versuch), konnte sie bei den positiv ausgefallenen Versuchen mit Eigelb allein nur zweimal beobachtet werden und war auch in diesen beiden Fällen nur ganz schwach.

Diese Befunde stehen im Einklang mit den Untersuchungen Liebermann¹⁾ an bebrüteten Eiern, aus denen hervorgeht, daß während des Brütens in der ersten Epoche der Entwicklung eine bedeutende Abnahme namentlich der fettartigen Bestandteile der Eier und gleichzeitig auch ihrer stickstoffhaltigen Substanzen statthat. Die Elementaranalyse der Trockensubstanz bebrüteter Eier ergab nämlich, daß der Kohlenstoff um $\frac{1}{2}$, der Wasserstoff um $\frac{1}{3}$, der Stickstoff um $\frac{1}{4}$ und ebenso der Sauerstoff um $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Gewichts dieser Bestandteile abnimmt. Da nun nach den bisherigen Erfahrungen nur verseifte Fette im intermediären Stoffwechsel eine Rolle spielen, so wird das eine unsrer nachgewiesenen Fermente wahrscheinlich die notwendige Lipolyse besorgen, während gleichzeitig das andre seine Tätigkeit bei der Zertrümmerung der Eiweißkörper entfaltet.

¹⁾ Liebermann, Pflügers Archiv. Bd. XLIII. S. 105 (1888.)