

Vergleichende Untersuchung über den Gehalt von befruchteten Hühnereiern in verschiedenen Entwicklungsperioden an Tyrosin, Glykokoll und an Glutaminsäure.

Von

Emil Abderhalden und Martin Kempe.

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 26. August 1907.)

Die Frage des Eiweißstoffwechsels im tierischen Organismus ist bisher im allgemeinen unter der Voraussetzung in Angriff genommen und beurteilt worden, daß eine Neubildung von Aminosäuren resp. eine Umwandlung der einen Aminosäure in eine andere nicht stattfindet. Eine Ausnahme macht vielleicht das Glykokoll. Es spricht manches dafür, daß diese Aminosäure im tierischen Organismus teilweise synthetisch entsteht. Auch für die übrigen Aminosäuren darf a priori die Möglichkeit nicht verneint werden, daß sie einesteils durch Abbau oder Umbau aus anderen Aminosäuren sich bilden können und anderenteils direkt aufgebaut werden. Ein strikter Beweis für eine solche Annahme liegt allerdings nicht vor. Es wird auch bei der Raschheit, mit welcher der Eiweißstoffwechsel abläuft, schwer sein, einen einwandfreien Beweis nach dieser Richtung durch Stoffwechselversuche zu erbringen. Wir haben deshalb einen anderen Weg eingeschlagen. Wir untersuchten befruchtete Hühnereier vor ihrer Bebrütung auf ihren Gesamtgehalt an Tyrosin, Glykokoll und an Glutaminsäure. Dieselben Aminosäuren bestimmten wir am 10. Tage der Bebrütung und endlich am Tage des Ausschlüpfens der Hühnchen. Tyrosin- und Glutaminsäure lassen sich innerhalb enger Grenzen quantitativ bestimmen, und für das Glykokoll kann man mit Hilfe der Estermethode wenigstens gut vergleichbare Werte erhalten. Hatten während der Entwicklung der Hühnerembryonen in den Mengen der einzelnen Aminosäuren beträchtliche Verschiebungen stattgefunden, so mußten sie sich unzweifelhaft nachweisen lassen. Wir folgten bei diesem Versuchsplane ganz analogen Untersuchungen

von A. Kossel¹⁾ über das Mengenverhältnis der Purinbasen im Dotter unbebrüteter und bebrüteter Eier. Wir möchten die erhaltenen Resultate nicht als ganz definitive bezeichnen. Der ganze Versuch muß wiederholt werden, um jedem Zufalle vorzubeugen. Wir teilen die Ergebnisse dieser Untersuchung jetzt schon mit, weil einesteils die Wiederholung des Versuches naturgemäß nicht so bald erfolgen kann, und anderenteils der eine von uns (Kempe) das chemische Institut verläßt. Wir hatten natürlich auch daran gedacht, die gestellte Frage an Säugetieren zu entscheiden. Die Verhältnisse liegen jedoch hier so verwickelt, daß einstweilen ein eindeutiges Resultat kaum zu erwarten ist. Da der Säugling mit den Eiweißkörpern der Milch wenig Glykokoll erhält, so könnte man daran denken, das Problem der synthetischen Bildung dieser Aminosäure im tierischen Organismus durch vergleichende Untersuchungen an Säugetieren in verschiedenen Entwicklungsstadien zur Entscheidung zu bringen. Alle übrigen Aminosäuren erhält der Säugling nach unseren jetzigen Kenntnissen in ausreichender Menge. Nun scheint jedoch das neugeborene Tier einen ganz beträchtlichen Vorrat speziell an Glykokoll bei der Geburt zu erhalten. Seine Gewebe sind besonders reich an leimgebenden Substanzen und diese weisen bekanntlich einen sehr hohen Glykokollgehalt auf. Mit dem Fortschreiten der Verknöcherung ist die Möglichkeit gegeben, daß Glykokoll für den allgemeinen Stoffwechsel frei wird und auf diesem Wege dem geringen Glykokollgehalt der Milchproteine entgegengewirkt wird. Also auch hier ergeben sich für eine klare Beantwortung der gestellten Frage Schwierigkeiten. Es wird sich immerhin lohnen, den Glykokollgehalt des neugeborenen Tieres mit demjenigen eines Tieres desselben Wurfs während der Säugungsperiode zu vergleichen.

Was nun die ausgeführten Versuche anbetrifft, so ist zu erwähnen, daß wir eine größere Anzahl von befruchteten Eiern bei demselben Händler auf einmal einkauften. Sie stammten alle von derselben Hühnerrasse. 12 Eier (1 Tag alt) wurden sofort verarbeitet und zwar in der Weise, daß Eiereiweiß und

¹⁾ A. Kossel, Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkerns, Diese Zeitschrift, Bd. X, S. 248, 1886.

Dotter zusammen in einer Schale vermischt wurden. Die Eierschalen wurden sorgfältig von allen Eiweißsubstanzen gereinigt, nur das Eihäutchen wurde nicht mitverarbeitet, sondern an den Schalen haften gelassen. Nun wurde der ganze Brei zunächst mit absolutem Alkohol am Rückflußkühler längere Zeit gekocht, dann abgenutscht und der Rückstand im Soxhlet solange mit Äther extrahiert, als etwas in Lösung ging. Das Gesamtgewicht der Eier betrug 686 g. Ihr Inhalt wog 611 g. Nach dem Kochen mit Alkohol und Äther verblieben 85,8 g lufttrockene Substanz. Sie enthielt 13,45 % Stickstoff.

80 g der getrockneten Substanz wurden nun mit der fünf-fachen Menge 25%iger Schwefelsäure 16 Stunden am Rückflußkühler gekocht, die Schwefelsäure aus der mit Wasser verdünnten Lösung quantitativ mit Baryt entfernt und der abgenutschte, scharf abgepreßte Baryumsulfatniederschlag solange mit Wasser ausgekocht, bis das Filtrat mit Millons Reagens keine Spur einer Rotfärbung mehr gab. Nun vereinigten wir alle Filtrate und engten sie ein, bis Krystallisation eintrat. Die Krystalle wurden abgenutscht und die Mutterlauge weiter eingengt, bis wiederum Krystallisation erfolgte. Dieser Prozeß wurde solange wiederholt, bis die Mutterlauge keine Tyrosinreaktion mehr gab. Das so erhaltene Rohthyrosin wurde aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert. Die Mutterlauge des reinen Tyrosins wurde dann, sobald sie mit Millons Reagens keine Reaktion mehr zeigte, mit derjenigen des Rohthyrosins vereinigt und aus der eingengten, mit gasförmiger Salzsäure gesättigten Lösung die Glutaminsäure als Chlorhydrat, abgeschieden. Die quantitative Gewinnung des Glutaminsäurechlorhydrats war mit Schwierigkeiten verknüpft. Es krystallisierte zunächst schwer und unvollständig. Wir verdünnten den dicken Sirup mit Wasser, schüttelten die Lösung mit etwas überschüssigem Kupferoxydul, filtrierten ab und fällten das gelöste Kupfer mit Schwefelwasserstoff. Es gelingt so leicht, die die Krystallisation störenden und die Flüssigkeit dunkelbraun färbenden Stoffe niederzuschlagen, ohne daß Verluste eintreten. Das Filtrat vom Schwefelkupfer war nun nur noch hellgelb gefärbt. Es wurde unter vermindertem Druck stark eingengt und dann

wiederum gasförmige Salzsäure eingeleitet. Beim Stehen auf Eis erfolgte nun bald reichliche Krystallisation. Die Krystalle wurden abgesaugt und die Mutterlauge weiter eingeengt. Das erhaltene rohe Glutaminsäurechlorhydrat krystallisierten wir aus verdünnter Salzsäure unter Anwendung von Tierkohle um. Die Mutterlauge des rohen Glutaminsäurechlorhydrates und des reinen vereinigten wir dann, verdampften die Flüssigkeit unter vermindertem Drucke bei 40° Außentemperatur zum Sirup und veresterten den Rückstand in der gewohnten Weise mit Alkohol und gasförmiger, trockener Salzsäure. Die Veresterung wurde zweimal wiederholt. Aus den Esterchlorhydraten setzten wir die Ester mit Natriumalkoholat in Freiheit und destillierten dann die freien Ester bei 12 mm Druck bei 100° des Wasserbades. Das Destillat wurde mit wässriger Salzsäure geschüttelt, zur Trockene verdampft und der Rückstand mit der fünffachen Menge absoluten Alkohols übergossen und gasförmige, trockene Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Wir impften dann mit einem Kryställchen von Glykokollesterchlorhydrat und stellten die Lösung auf Eis. Nach wenig Stunden erfolgte reichliche Abscheidung von gegen 144° (korr.) schmelzenden Krystallen.

Wir haben die Ausbeuten an Tyrosin, an Glutaminsäure und an Glykokoll auf 100 g Eiweiß berechnet. Den Eiweißgehalt wiederum stellten wir durch Multiplikation des gefundenen Stickstoffgehaltes mit 6,25 fest. Diese Berechnung ist nur eine approximative, da wir jedoch in allen Fällen von gleicher Basis ausgingen, dürften die Fehler sich entsprechen.

Erhalten wurden auf 100 g Eiweiß berechnet bei den befruchteten, unbebrüteten Eiern: 1,82 g Tyrosin, 12,8 g Glutaminsäure und 1,2 g Glykokoll.

Von denselben Eiern hatten wir eine größere Anzahl im Brutofen angesetzt. 12 Eier von 695 g Gewicht wogen nach 10tägigem Aufenthalt bei 40° noch 653 g. Ihr Inhalt wog 585 g. Er wurde ganz genau so verarbeitet, wie oben angegeben. Wir haben nur solche Eier verarbeitet, deren Embryonen in ihrer Entwicklung dem 10. Tage der Bebrütung entsprachen. Sie wurden mit der Schere vor der Extraktion mit Alkohol und Äther zerhackt. Das Gewicht der Substanz betrug nach

dem Extrahieren mit Alkohol und Äther 80,7 g. Die Stickstoffbestimmung ergab 13,57% N.

Erhalten wurden 2,11 g Tyrosin, 13,5 g Glutaminsäure und 1,15 g Glykokoll (auf 100 g Eiweiß berechnet).

10 Eier vom ursprünglichen Gewicht 597 g beließen wir bis zum Ende der Entwicklung des Embryos im Brutschrank, d. h. 20 Tage. Das Gewicht der Eier betrug nunmehr 520,3 g. Ihr Inhalt wog 460,1 g. Die entwickelten, aus den Eiern herausgenommenen Hühnchen wurden nebst Dottersack fein zerhackt und mit Alkohol und Äther behandelt. Es verblieben 71,2 g an trockenen, festen Stoffen. Die Stickstoffbestimmung ergab 13,16% N.

Auf 100 g Eiweiß berechnet, ergaben sich 2,25 g Tyrosin, 12,52 g Glutaminsäure und 1,35 g Glykokoll.

Vergleicht man die gefundenen Zahlen, so ergibt sich, daß für die Glutaminsäure und das Glykokoll Änderungen in den Mengen während der Entwicklung des Hühnerembryos nicht zu erkennen sind. Der Tyrosingehalt ist beim ausgebrüteten Hühnchen etwas höher als beim unbebrüteten Ei. Wir wagen nicht, aus den geringen Unterschieden Schlüsse zu ziehen. Es ist immerhin möglich, daß sie der Methode zur Last fallen. Es scheint, als ob eine Neubildung resp. eine Umwandlung von Aminosäuren während der Entwicklung des Hühnerembryos nicht stattfindet. Selbstverständlich darf, falls diese Schlußfolgerung sich später als ganz allgemein geltend erweisen sollte, nicht der Schluß gezogen werden, daß die Proteine des Eies als solche direkt beim Aufbau der Gewebe teilnehmen. Es spricht alles dafür, daß diesem ein weitgehender Umbau der «Nahrungsproteine» vorausgeht, und daß sich hier in gewissem Sinne ähnliche Prozesse vollziehen, wie im keimenden Samen. Es ist verlockend, in das Geheimnis dieser offenbar tiefgreifenden Umwandlungen durch direkte Versuche einzudringen. Eine klarere Entscheidung der gestellten Frage wird übrigens erst dann möglich sein, wenn Methoden bekannt sind, die es ermöglichen, alle einfachen Bausteine der Proteine quantitativ zu bestimmen.
