

Über den Gehalt ägyptischer Mumien an Eiweiß und Eiweiß-Abbauprodukten.

Von

Emil Abderhalden und Arthur Weil.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 24. März 1911.)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ ist der Nachweis geführt worden, daß die Muskelsubstanz ägyptischer Mumien, nach erfolgter Hydrolyse mit Säuren, Aminosäuren liefert. Bei dieser ersten Untersuchung ist die Frage nach der Art des Vorkommens der Aminosäuren nicht berührt worden. Wir haben nunmehr diese Lücke ausgefüllt und uns die Frage vorgelegt, ob in der Muskelsubstanz von Mumien Aminosäuren bereits vorgebildet vorhanden sind. Ferner interessierte es uns, ob andere Abbaustufen des Eiweißes, z. B. Peptone, sich nachweisen lassen und endlich, ob Eiweiß als solches vorhanden ist. Die gestellten Probleme mußten uns einen Einblick geben in das Verhalten der Muskel-Eiweißkörper nach erfolgter Konservierung der Mumien. Wir wollen gleich vorausnehmen, daß uns der Nachweis von Aminosäuren im wässrigen Extrakt der Mumiensubstanz geglückt ist. Ferner konnten wir auch biuretgebende Körper im Dialysat von Muskelsubstanz und im wässrigen Extrakt nachweisen. Damit ist wohl bewiesen, daß die Konservierung der Leichen die Autolyse nicht vollständig aufgehoben hat; es müßte denn die Einbalsamierung erst längere Zeit nach erfolgtem Tode vorgenommen sein, was aber nicht wahrscheinlich ist.

¹⁾ Emil Abderhalden und Carl Brahm, Über den Gehalt der Muskelsubstanz ägyptischer Mumien an Monoaminosäuren. Diese Zeitschrift, Bd. LXI. S. 419, 1909.

Von Interesse ist es, daß einige Aminosäuren, die beim Abbau der Peptone durch Fermente sehr frühzeitig abgespalten werden, wie z. B. Tyrosin und Tryptophan im Dialysat und im wässerigen Extrakt höchstens in Spuren sich nachweisen ließen, während andere Aminosäuren, wie Glykokoll, Alanin, Leucin usw. in relativ reichlichen Mengen vorhanden waren. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß ein Teil der Aminosäuren weiter abgebaut worden ist. Schwieriger zu entscheiden ist die Frage nach dem Vorkommen von unverändertem Eiweiß in der Muskelsubstanz der Mumie.¹⁾ Daß Produkte, welche mehrere Aminosäuren gebunden enthalten, in relativ reichen Mengen in der Mumiensubstanz vorhanden sind, zeigt der Umstand, daß nach vollständiger Extraktion mit Wasser, der Rückstand nach erfolgter Aufspaltung durch Kochen mit 25%iger Schwefelsäure, resp. mit rauchender Salzsäure Aminosäuren lieferte. Diese Beobachtung läßt wohl kaum eine andere Deutung zu, als daß in der Mumiensubstanz noch Eiweißkörper vorhanden waren. Die Peptone waren in das wässerige Extrakt übergegangen. Ihre Menge war ziemlich groß. Wir erhielten bei der Veresterung des Rückstandes des wässerigen Extraktes eine auffallend geringe Ausbeute an Aminosäuren. Nach erfolgter Infreihetsetzung der Aminosäureester zeigte der verbleibende Rückstand einen hohen Stickstoffwert, und es gelang durch Kochen des Rückstandes mit rauchender Salzsäure und Wiederholung der Veresterung noch reichliche Mengen von Aminosäuren zu gewinnen.

Die zu unseren Versuchen verwandten beiden Mumien verdanken wir der großen Freundlichkeit des Herrn Borchardt, Direktor des Kaiserlichen Deutschen Instituts für Ägyptische Altertumskunde in Kairo. Die Mumien hatten ein Alter von ca. 3000 Jahren. Das Herz und die Eingeweide fehlten vollständig. Zu unseren Versuchen benutzten wir hauptsächlich die

¹⁾ Vgl. hierzu: W. A. Schmidt, Chemische und biologische Untersuchungen von ägyptischem Mumienmaterial nebst Betrachtungen über das Einbalsamierungsverfahren der alten Ägypter, Zeitschr. f. allg. Physiologie, Bd. VII, S. 369, 1908. — P. Uhlenhut, Über die Bestimmung der Herkunft von Mumienmaterial mit Hilfe spezifischer Sera, Deutsche med. Wochenschr., 1905, H. 6, S. 212.

Muskelsubstanz, die wir zunächst rein mechanisch von Fremdkörpern — Wachs, Tuchstücken usw. — befreien. Wiederholt beobachteten wir innerhalb der Muskelsubstanz Krystalldrusen von Fettsäuren — nach ausgeführten Untersuchungen Palmitin- und Stearinsäure; — ferner beobachteten wir wiederholt Cholesterinkrystalle. Diese Befunde zeigen, in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Schmidt,¹⁾ daß auch Fettstoffe in der Mumie selbst gespalten worden sind. Die groben Gewebstücke wurden nunmehr gepulvert, dann gesiebt und die zurückbleibenden groben Stücke solange weiter zerrieben, bis die ganze Substanz in feinste Pulverform verwandelt war. Wir gewannen im ganzen ca. 9 kg solcher Substanz. Die gesamte Masse wurde zunächst durch Kochen mit Wasser erschöpft. Das tief braun gefärbte, wässrige Extrakt dampften wir unter vermindertem Druck bei ca. 40° des Wasserbades zur Trockene ein. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol übergossen und trockene Salzsäure eingeleitet. Die Veresterung wiederholten wir noch zweimal. Die Aminosäureester wurden dann mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt. Der Stickstoffgehalt der ätherischen Lösung betrug ungefähr 12% der Stickstoffmenge des wässrigen Extraktes. 88% des gesamten Stickstoffs verblieben im Rückstand. Diesen gossen wir direkt nach Infreisetzung der Ester in Wasser, neutralisierten das Kaliumcarbonat mit Salzsäure und dampften dann die Flüssigkeit stark ein. Die sich abscheidenden Salze filtrierten wir ab. Der schließlich verbleibende Rückstand wurde mit ungefähr der vierfachen Menge rauchender Salzsäure 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das tief braun gefärbte Hydrolysat verdampften wir unter vermindertem Druck zur Trockene. Der Rückstand wurde verestert, und die Ester in der üblichen Weise in Freiheit gesetzt.

Zur Feststellung der in Wasser löslichen Produkte haben wir auch Dialyseversuche angestellt. Es wurde gepulverte Mumiensubstanz in Dialysierschläuche eingefüllt und dann gegen

¹⁾ W. A. Schmidt, Über Mumienfettsäuren, Chemiker-Zeitung, Bd. XXXII, S. 769, 1908.

destilliertes Wasser dialysiert. Das hellbraun gefärbte Dialysat enthielt Stickstoff und nach erfolgter Entfärbung mit Tierkohle konnten wir deutlich Biuretreaktion wahrnehmen. Die Millonsche Reaktion und die Tryptophanreaktion fielen negativ aus. Der Verdampfungsrückstand zeigte deutlich Krystalle von Aminosäuren.

Der in Wasser unlösliche Rückstand der Mumiensubstanz wurde mit Alkohol extrahiert, um die Harze möglichst zu entfernen. Doch unterwarfen wir dieser Extraktion nur einen kleinen Teil der gesamten Substanz, weil wir bei anderen Untersuchungen die Erfahrung gemacht haben, daß Alkohol zusammen mit anderen Substanzen oft auch eiweißartige Produkte aufnimmt und so Verluste entstehen. Einen Teil der in Wasser unlöslichen Mumiensubstanz hydrolysierten wir durch 20 stündiges Kochen mit 25%iger Schwefelsäure. Die Schwefelsäure wurde in der üblichen Weise mit Baryt quantitativ entfernt und das Filtrat auf Tyrosin verarbeitet. Es gelang mit Leichtigkeit, solches in reinem Zustande zu gewinnen. Ferner bestimmten wir in der Mutterlauge des Tyrosins die Glutaminsäure, indem wir in das Filtrat gasförmige Salzsäure einleiteten. Nach längerem Stehen schieden sich Krystalle von Glutaminsäurechlorhydrat ab.

Den größten Teil der in Wasser unlöslichen Mumiensubstanz verwandten wir zur Hydrolyse mit rauchender Salzsäure. Im Hydrolysat bestimmten wir die einzelnen Aminosäuren mit Hilfe der Estermethode. Bei der Isolierung der einzelnen Aminosäuren bedienten wir uns der bekannten Methoden. Wir wichen nur insofern von der gegebenen Vorschrift ab, als wir diejenige Esterfraktion, welche den Phenylalanin-, Asparaginsäure-, Glutaminsäure- und Serinester enthält, nicht durch Kochen mit Baryt verseiften, sondern durch 24 stündiges Kochen mit Wasser. Den Phenylalaninester trennten wir vorher in der üblichen Weise mit Äther ab und verdampften den isolierten Ester mit Salzsäure zur Trockene. Daß Asparagin- und Glutaminsäureester durch Wasser sich ohne wesentliche Verluste verseifen lassen, ergaben Versuche mit den entsprechenden Aminosäureestern. Die Verseifung braucht lange Zeit, weil die Halbesten der genannten Aminosäuren, worauf schon Emil

Fischer hingewiesen hat,¹⁾ sehr widerstandsfähig sind. Wir haben die Verseifung mit Wasser deshalb versucht, weil es bei geringen Mengen der erwähnten Aminosäureester oft Schwierigkeiten bereitet, die einzelnen Aminosäuren nach erfolgter Verseifung mit Baryt zu isolieren. Besonders störend macht sich in solchen Fällen oft die Abscheidung des schwerlöslichen asparaginsäuren Baryts geltend. Die Erfahrung hat gezeigt, daß die weitere Verarbeitung der verseiften Aminosäuren am besten direkt mit der Abscheidung der Glutaminsäure als salzsaures Salz beginnt. Sie ist nämlich zum allergrößten Teil und oft quantitativ in Form von Pyrrolidincarbonsäure vorhanden. Erst durch die Salzsäure erfolgt die Umwandlung in Glutaminsäure.

I. Untersuchung des wässrigen Extraktes.

Aminosäuren, welche sich ohne vorherige Hydrolyse nachweisen ließen.

Wir haben in reinem Zustand abgeschieden: Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Prolin. Hervorgehoben sei die auffallend große Menge von Phenylalanin.

Glykokoll als Esterchlorhydrat und als Pikrat identifiziert.

Alanin:

0.1261 g Substanz verbrauchten 14,35 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_3H_7NO_2$: Gefunden:

15,74% N. 15,91% N.

Valin:

0.1349 g Substanz verbrauchten 11,75 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$: Gefunden:

11,98% N. 12,20% N.

Leucin:

0.1469 g Substanz verbrauchten 11,35 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$: Gefunden:

10,68% N. 10,82% N.

¹⁾ Emil Fischer. Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899—1906). Julius Springer, Berlin 1906. S. 60. Vgl. auch S. 193 und 194.

Asparaginsäure:

0,2578 g Substanz verbrauchten 19,4 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_4H_7NO_4$:

10,53% N.

Gefunden:

10,54% N.

Glutaminsäure wurde als salzsaures Salz identifiziert.

Phenylalanin:

0,2578 g Substanz verbrauchten 14,8 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_2$:

8,49% N.

Gefunden:

8,63% N.

Prolin:

0,1926 g lufttrockenes, racemisches Kupfersalz gaben 0,0417 g CuO.

Berechnet für $(C_5H_8NO_2)_2 Cu$:

19,40% Cu.

Gefunden:

19,24% Cu.

II. Untersuchung des in Wasser unlöslichen Anteils der Mumiensubstanz.

A. Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure.

Angewandt wurden 630 g Substanz, die mit Alkohol extrahiert waren und 1000 g Ausgangsmaterial entsprechen.

Hydrolysat enthielt 7,78 g N.

Rückstand » 4,65 » N.

Isoliert wurden 1,2 g Tyrosin,

5,8 » Glutaminsäure.

B. Hydrolyse mit rauchender Salzsäure.

Die Menge des verwandten Materials betrug 4690 g entsprechend 7500 g Ausgangsmaterial.

Das Hydrolysat enthielt 57,00 g N,

Der Hydrolysenrückstand enthielt 74,27 » N.

Isoliert wurden folgende Aminosäuren: Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Prolin, Serin.

Glykokoll wurde als Pikrat abgeschieden und identifiziert.

Alanin:

0,1338 g Substanz verbrauchten 15,2 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:

15,74% N.

Gefunden:

15,92% N.

Leucin:

0,2075 g Substanz verbrauchten 16,05 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$:	Gefunden:
10,69% N.	10,83% N.

Asparaginsäure:

0,1347 g Substanz verbrauchten 10,1 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_4H_7NO_4$:	Gefunden:
10,53% N.	10,50% N.

Glutaminsäure wurde als salzsaures Salz identifiziert.

Serin:

0,0826 g Substanz verbrauchten 7,7 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_3H_7NO_3$:	Gefunden:
13,34% N.	13,06% N.

Phenylalanin:

0,1295 g Substanz verbrauchten 7,6 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_9H_9NO_2$:	Gefunden:
8,49% N.	8,22% N.

Prolin:

0,2161 g Kupfersalz des aktiven Prolins gaben 0,0579 g CuO.

Berechnet für $(C_5H_8NO)_2Cu$:	Gefunden:
21,80% Cu.	21,41% Cu.

Die folgende Zusammenstellung gibt einen Überblick über die Verteilung des Stickstoffs nach den einzelnen Prozeduren.

1. Das wässrige Extrakt aus 8,5 kg Mumiensubstanz enthielt 291,48 g N.

Die ätherische Lösung der Aminosäureester enthielt 34,04 g N.
Nicht in den Äther gegangen waren. 255,77 g N.

Summa 289,81 g N.

2. Der in Wasser unlösliche Anteil wog 5320 g.

A. Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure.

Verwendet 630 g mit Wasser erschöpfte Substanz (entsprechend 1 kg Mumiensubstanz) N = 12,43 g.

Bei der Hydrolyse gingen 7,78 g N in Lösung.

Ungelöst blieben 4,65 g N.

Hydrolyse mit rauchender Salzsäure.

Verwendet wurden 4690 g Substanz (= 7500 g Mumien-substanz).

Bei der Hydrolyse gingen in Lösung 57,00 g.

Ungelöst blieben 74,27 g.

Die ätherische Lösung der Aminosäureester enthielt 14,46 g N.

Nicht in Äther gingen 42,82 g N.

Die Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren in Zahlen auszudrücken, dürfte im vorliegenden Fall zwecklos sein, weil die vorhandenen Harze die Verarbeitung sehr störten. Erwähnt sei nur der sehr hohe Gehalt an Leucin. Alle übrigen Aminosäuren traten an Menge hinter dieser Aminosäure zurück.

Endlich haben wir mit Material einer anderen Mumie nach der Vorschrift von Kossel auf Diaminosäuren und auf Histidin geprüft. Lysin und Arginin wurden als Pikrat identifiziert und das Histidin als Dichlorhydrat nachgewiesen.

Anhangsweise sei erwähnt, daß wir den **Wassergehalt des asparaginsäuren Kupfers** genau festgestellt haben, weil das Kupfersalz der Asparaginsäure zur Abtrennung dieser Aminosäure oft wertvolle Dienste leistet und die Literaturangaben einen verschiedenen Wassergehalt aufweisen. Ritthausen¹⁾ berechnet aus der Analyse des lufttrockenen Kupfersalzes 4,5 Mol. Wasser. Dieselbe Zahl gibt Hofmeister²⁾ an. Curtius und Koch³⁾ fanden für die über Schwefelsäure getrocknete Substanz 3 Mol. Wasser. Wir gingen bei unseren Bestimmungen von der lufttrockenen Substanz aus und bestimmten in dieser den Gehalt an Kupfer. Aus dem gefundenen Cu-Gehalt berechneten wir den Wassergehalt, wie die folgende Übersicht zeigt.

¹⁾ H. Ritthausen, Asparaginsäure und Glutaminsäure, Zersetzungsprodukte des Legumins und Konglutins, Journal f. pr. Chemie. I. Folge. Bd. CVII. S. 269. 1869.

²⁾ Hofmeister. Über die Kupfersalze des Leucins, der Asparaginsäure, der Glutaminsäure und des Tyrosins. Liebigs Annalen d. Chemie. Bd. CLXXXIX, S. 6–44. 1877.

³⁾ Curtius und Koch. Reduktion der Diazobernsteinsäure. Journal f. pr. Chemie. Bd. XXXVIII; S. 486. 1888.

I.	0,2545 g	Substanz gaben	0,0720 g	CuO,
II.	0,1671	»	»	0,0469 »
III.	0,2892	»	»	0,0808 »
IV.	0,4020	»	»	0,1115 »

Berechnet für $C_4H_5NO_4Cu + 5 H_2O$: 22,32% Cu.

Gefunden: I. 22,60%, II. 22,42%, III. 22,32%, IV. 22,16%.

Wir haben den Wassergehalt auch direkt bestimmt, indem wir asparaginsaures Kupfer bei 140 und 150° bis zur Gewichtskonstanz trockneten. Der Gewichtsverlust entspricht einem Gehalt von 5 Mol. Wasser. Die Bestimmung erfolgte in der Weise, daß wir das lufttrockene Salz in einem evakuierten Glasrohr im Ölbad erhitzen. Bei 130° gelang es noch nicht, das Wasser völlig auszutreiben.

I.	0,7967 g	Substanz verloren bei	140°	0,2560 g,
II.	0,4663	»	»	140° 0,1402 »
III.	0,5990	»	»	150° 0,1910 »

Berechnet für $C_4H_5NO_4Cu + 5 H_2O$: 31,60% Wasser.

Gefunden wurden: I. 32,13%, II. 30,13%, III. 31,89% H_2O .