

# Untersuchungen über die Zersetzung des Eiweisses durch anaërobe Spaltpilze

von

**M. Nencki.**

(Mit 2 Textfiguren.)

(Vorgelegt in der Sitzung am 9. Mai 1889.)

## I. Die aromatischen Spaltungsproducte.

Seit meinen, im Jahre 1876<sup>1</sup> publicirten Untersuchungen über die Zersetzung des Eiweisses und der Gelatine bei der Fäulniss mit Pankreas sind unsere Kenntnisse auf diesem Gebiete durch die Arbeiten von Gautier in Frankreich, Baumann, Salkowski und Brieger in Deutschland sehr umfangreich geworden. Briegers verdienstvolle Arbeiten haben gezeigt, wie zahlreich und mannigfaltig die basischen Fäulnissproducte sind, und namentlich dass durch besondere Spaltpilzspecies, wie z. B. die Tetanus- und Typhusbacillen ihnen eigenthümliche, giftige Toxine gebildet werden.

Ich habe mit grossem Interesse jede auf diesem Gebiete neu aufgefundene Thatsache verfolgt, obgleich durch die Arbeiten über die physiologische Oxydation, die Anaërobiose und namentlich über den Blutfarbstoff in Anspruch genommen, ich mich in den letzten Jahren an diesen Untersuchungen weniger, als ich gewünscht hätte, theiligen konnte. Erst nach Feststellung der Zusammensetzung des Hämatoporphyrins haben wir im vergangenen Jahre diese Untersuchungen wieder aufgenommen und es sollen die erhaltenen Resultate der Gegenstand der folgenden Mittheilungen sein.

---

<sup>1</sup> Bern 1876 im Verlag von Dalp.

Ein wesentlicher Fortschritt in der Gährungschemie datirt seit durch die Ausbildung der bakteriologischen Methoden es keine grosse Schwierigkeit hat eine bestimmte Pilzspecies in Reincultur zu erhalten. Den besten Beweis dafür werden die Resultate der vorliegenden Untersuchung abgeben.

Gemeinschaftlich mit Dr. V. Bovet habe ich die Zersetzung des Serumeiweisses durch drei anaërobiotische Bacillenarten, nämlich den *Bacillus liquefaciens magnus*, den *Bacillus spinosus* und die Rauschbrandbacillen studirt. Die Reinculturen der zwei ersten, nicht pathogenen Arten hat uns der Entdecker derselben, Herr Dr. Carl Lüderitz<sup>1</sup> in Berlin, bereitwilligst zur Verfügung gestellt. Die Reinculturen des Rauschbrandes haben wir uns selber hergestellt. Rauschbrand (*Charbon emphysemateux du boeuf*, *charbon symptomatique*, *emphysema infectiosum*) gehört in der Schweiz und speciell im Berner Oberland zu den häufigsten und gefährlichsten Infectiouskrankheiten des Rindes. So sind im Canton Bern vor der Einführung der Schutzimpfung im Jahre 1884, 815 Stück an Rauschbrand und nur 73 Stück an Milzbrand umgestanden.<sup>2</sup> Wir verdanken unsern Impfstoff Herrn Dr. Hess, Professor an der Veterinärsehule hierselbst. Es ist dies die bei 35° eingetrocknete und pulverisirte seröse Flüssigkeit des Tumors eines an Rauschbrand verendeten Rindes. Dieses Pulver behält länger als ein Jahr seine Virulenz, wenn es nur mit etwas Säure und Zucker einem Thierte injicirt wird.<sup>3</sup> Wir benutzten zu unseren Versuchen Meerschweinchen, die besonders dafür empfänglich sind. Etwa 0.1 g des Pulvers wurden in 3 cm<sup>3</sup> 50% Traubenzuckerlösung eingeweicht und mit einem Tropfen Milchsäure versetzt. Meistentheils injicirten wir eine Pravaz'sche Spritze von dieser Flüssigkeit in die Hinterbacke, worauf die Thierte ausnahmslos in 18—24 Stunden am typischen Rauschbrand zu Grunde gingen. Kurz vor dem Tode wurden den erkrankten Meerschweinchen die Haare auf der Geschwulst abrasirt, die Stelle mit Sublimat abgewaschen, unter antiseptischen

<sup>1</sup> Zeitschrift für Hygiene von Koch und Flügge, 5. Bd., S. 141, 1888.

<sup>2</sup> E. Hess. Thiermedizinische Vorträge. Herausgegeben von Dr. S. Schneidemühle in Halle a. d. S., Bd. 1, Heft 4.

<sup>3</sup> Vergl. hierüber Arloing et Cornevin C. r. T.103., p. 1078.

Cautelen incidirt und etwas von der serösen Flüssigkeit aus dem Tumor in capillare Gläschen eingesogen. Mit dieser Flüssigkeit wurde sofort Nährgelatine und Agar geimpft, die geimpfte Nährlösung nach Esmarch ausgerollt und nach dem Erstarren mit einer Schicht Nährgelatine oder flüssigem Parafin bedeckt. Der Wattepfropf wurde noch mit einer Kautschukkappe geschlossen. Enthält das Agar etwa 3% Glycerin, so wachsen bei Bruttemperatur am zweiten und dritten Tage die einzelnen Colonien heraus, aus welchem dann leicht durch Übertragung, Reincultur der Stäbchen erhalten werden kann. Auch bei der Nährgelatine ist Glycerinzusatz für das Wachstum sehr förderlich. Da die Röhrechen jedoch nicht bei Bruttemperatur gehalten werden können, so sind die ersten Colonien erst am vierten und achten Tage sichtbar. Es ist dies — die sogenannte hohe Cultur — die bequemste Art Anaëroben zu züchten. Der Sauerstoffausschluss ist kein vollständiger, aber die im Nährboden gelösten Spuren hindern das Wachstum nicht. Anfangs haben wir die nach Esmarch ausgerollten Röhrechen mit Wasserstoff gefüllt, oder auch durch ein angeschmolzenes T-Rohr, das alkalisches Pyrogallol enthielt, die Culturröhrechen völlig sauerstofffrei gehalten. Die Herstellung derselben ist aber immer zeitraubend und umständlich. Die nach der vierten oder fünften Übertragung erhaltenen reinen Rauschbrandbacillen üben keine pathogene Wirkung mehr auf Meerschweinchen aus, verflüssigen aber rasch Gelatine und zersetzen Eiweiss unter Bildung weiter unten zu beschreibender Producte.

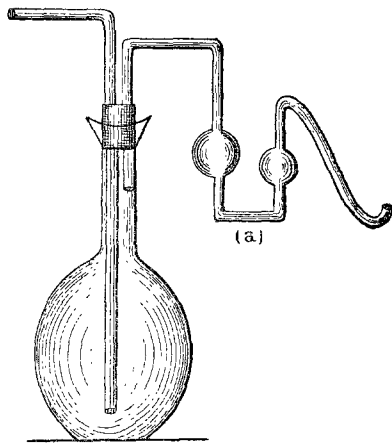
Dass die Rauschbrandbacillen und die des malignen Oedems (B. de la septicémie gangréneuse) Eiweiss zersetzen, hat schon S. Arloing<sup>1</sup> gesehen, jedoch die entstandenen Spaltungsproducte nicht untersucht und nur die dabei auftretenden Gase analysirt. Herr Dr. Bovet wird auf die Gasanalysen Arloings später noch einmal zurückkommen.

Um die Spaltungsproducte der Eiweisstoffe durch anaëroben Mikroben zu untersuchen, habe ich folgenden Weg eingeschlagen: In Kolben von 4—10 l Inhalt wurde käufliches Serumeiweiss mit Wasser übergossen, sodann mit einem festen Wattepfropf

<sup>1</sup> Compt. rend. T. 103, p. 1268, 1886.

verschlossen und in einem Dampfapparat viermal jeden zweiten Tag  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunden lang auf  $100^\circ$  erhitzt. Es ist dies eine discontinuirliche Sterilisation bei  $100^\circ$ , wodurch auch Spaltpilze, die höhere Temperaturen vertragen, wie z. B. der *Bacillus thermophilus* von Miquel abgetödtet werden mussten. Die so behandelten Kolben bleiben in der That auch Monate lang steril. Die Kolben wurden jetzt mit passenden, doppelt durchbohrten und mit Gaszuleitungs- und Ableitungsrohr versehenen Kautschukstopfen verschlossen. Das Ableitungsrohr hatte die nebenstehend abgebildete Form. (Siehe Fig. Ia). In die Biegung (a) wurde etwas Quecksilber als Sperrflüssigkeit eingebracht und darauf etwas 2% Sublimatlösung gegossen. Sowohl die Glasröhren, wie der Kautschukstopfen wurden vorher durch heisse Sublimatlösung desinficirt. Jetzt wurde der Kolbeninhalt mit der im Reagenzröhrchen befindlichen

Fig. I.



Reincultur geimpft und die Luft aus dem Kolben durch Stickstoff, Wasserstoff oder Kohlensäure vollständig verdrängt. Für das Wachstum der Anaëroben scheinen die beiden ersten Gase günstiger zu sein. Kohlensäure hat den Übelstand der Löslichkeit in Wasser und namentlich in dem alkalischen Serumeiweiss; weshalb wir bei unseren Versuchen das Alkali durch vorherigen Zusatz von Essigsäure abstumpften. Auch hat Kohlensäure auf das Wachstum der Pilze eine verzögernde Wirkung, doch trat bei der Bruttemperatur bei allen von uns untersuchten anaërobiotischen Arten Gährung ein, vorausgesetzt, dass der Nährboden für die betreffende Pilzart geeignet war.

Da Kohlensäure am leichtesten erhältlich ist — wir entwickelten sie aus gepulvertem geschlemmtem Kalkcarbonat — so wurden die meisten unserer Versuche in Kohlensäureatmosphäre angestellt. Für die Darstellung von völlig reinem Stickstoff habe ich folgendes Verfahren eingeschlagen, das sich als praktisch

im Laboratorium seither bewährte: Atmosphärische Luft wurde zunächst durch einen grösseren Ballon geleitet, in welchem sich alkalisches Pyrogallol befand und zwar im Verhältniss von 2·5 g Pyrogallol auf 1 l 6 % Kalilauge. Es ist dies nach Weil und Zeitler<sup>1</sup> für die Absorption des Sauerstoffes die günstigste Concentration. Hierauf passirt die Luft ein in einem Verbrennungsofen befindliches an beiden Enden offenes Rohr, das ganz mit metallischem, grobkörnigem Kupfer gefüllt ist. Es ist nöthig das Rohr in starkem Glühen zu erhalten. Nach etwa einhalbstündigem Durchleiten ist das austretende Gas völlig sauerstofffrei. Man lässt das austretende Gas durch eine im Liebig'schen Kugelapparat befindliche Pyrogallollösung passiren. Ist auch hieraus alle Luft verdrängt, so wird in den Kugelapparat ausgekochte Kalilauge eingesogen. Tritt keine Bräunung ein, so wird das Gas durch die Nährlösung durchgeleitet. Nach etwa einstündigem Durchleiten ist aller Sauerstoff verdrängt und das austretende Gas bräunt alkalisches Pyrogallol nicht mehr. Das Kupfer im Rohr reicht hin, um aus 3—4 Kolben den Sauerstoff zu verdrängen. Um das entstandene Kupferoxyd wieder zu reduciren wurde es in einem Tiegel wie bei Elementaranalysen zum Glühen erhitzt und noch glühend in, in einer Porzellanschale befindlichen Alkohol hineingeschüttet. Es ist hierbei bei einiger Vorsicht keine Gefahr vorhanden. Das erhaltene metallische Kupferpulver wird auf Fliesspapier an der Luft getrocknet und kann von Neuem benutzt werden.

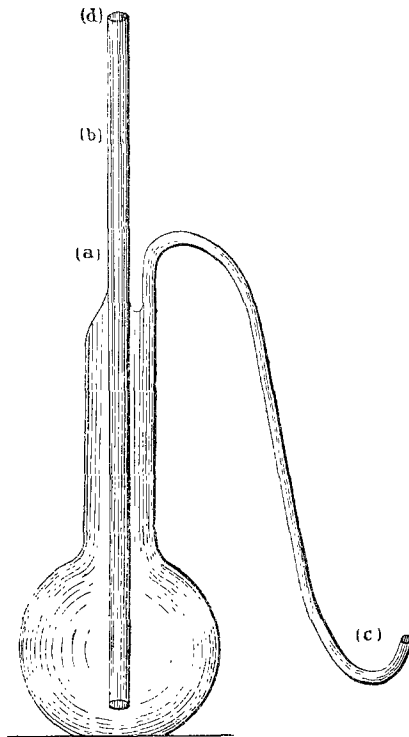
In Fällen, wo ich die Gase analysiren wollte, habe ich mit Vortheil den nebenbei abgebildeten Kolben benutzt. (Siehe Fig. II.) Durch das etwa 8 mm weite Rohr (*a*) von leicht schmelzbarem Glase können nicht allein Flüssigkeiten, sondern auch gröbere Partikel, wie z. B. die des käuflichen Serumeiweisses leicht eingebracht werden. Der Kolben sammt Inhalt wird bei 100° discontinuirlich sterilisirt, durch das Rohr (*a*) die Impfflüssigkeit eingegossen, dann das Rohr bei (*b*) rechtwinklig umgebogen, etwas verjüngt ausgezogen und hierauf, während das Ende (*c*) in eine mit Quecksilber gefüllte Schale taucht, die Luft durch Kohlensäure, Wasserstoff oder Stickstoff verdrängt. Hat man sich

---

<sup>1</sup> Ann. Chem. Pharm., Bd. 205, S. 263, 1880.

überzeugt, dass die Luft völlig ausgetrieben ist, so wird das Rohr an der verjüngten Stelle noch während des Durchleitens des Gases zugeschmolzen. Auf die Weise ist jeder Kautschukverschluss und die dadurch bedingten Diffusionsfehler vermieden. Gewöhnlich liess ich die geimpften Kolben 2—3 Wochen bei der Bruttemperatur stehen. Nach Verlauf dieser Zeit ist das Eiweiss bis auf einen kleinen Rest in Lösung gegangen. Am zweiten bis

Fig. II.



dritten Tage wird durch die ersten Gasblasen die beginnende Zersetzung angezeigt. Die stärkste Gasentwicklung findet am fünften bis achten Tage statt, von da ab lässt sie allmählich nach, ohne jedoch auch nach vier Wochen gänzlich aufzuhören. Das von Kali nicht absorbierte Gas besteht nur aus Wasserstoff. Weder durch den Rauschbrandbacillus, noch durch *B. liquefaciens magnus* oder *spinosus* wird aus Serumeiweiss Grubengas entwickelt.

Die Verarbeitung der vergährten Flüssigkeit<sup>1</sup> geschah in folgender und zwar in allen Versuchen gleicher Weise, nachdem ich gesehen habe, dass wenigstens, was die mit Wasserdämpfen flüchtigen und die aromatischen Producte betrifft, durch alle die drei untersuchten Pilzarten die gleichen Substanzen entstehen.

Nach Öffnen des Kolbens wurde zuerst die Flüssigkeit bezüglich der Reinheit der ausgesäten Mikroben mikroskopisch untersucht und Übertragungen auf Nähragar und Nährgelatine gemacht. Ausser beweglichen Bacillen waren in den vergährten Flüssigkeiten stets sporenhaltige und auch freie Sporen in Menge vorhanden. Der Kolbeninhalt wurde dann in einer tubulirten Retorte mit krystallisirter Oxalsäure — auf je 50 g trockenen Eiweisses 20 g der Säure — versetzt und destillirt. In das Destillat gehen über ausser den später zu beschreibenden gasförmigen Producten noch die flüchtigen Fettsäuren bis zur Capronsäure inclusive. Dagegen finden sich darin weder Phenol noch Indol oder Skatol. Auch enthalten die Destillate keine Alkohole der Fettreihe. Als ich ein Destillat, herrührend von 150 g zersetzten Eiweisses, mit Soda neutralisirt und mit Äther ausgeschüttelt habe, hinterliess der bei gelinder Wärme abdestillirte Äther einen geringen flüssigen Rückstand, der keines von den aromatischen

---

<sup>1</sup> Meinen früheren Auseinandersetzungen entsprechend (siehe Archiv für experiment. Pathol. von Naunyn und Schmiedeberg, Bd. 21, S. 299 und ff., „die Anaërobie und die Gährungen“ von M. Nencki), bezeichne ich jede Zersetzung organischer, also auch stickstoffhaltiger Substanzen durch Anaëroben mit dem Worte Gährung. Gährung ist Leben ohne atmosphärischen Sauerstoff, gleichgiltig ob vorwiegend in stickstoffreien oder stickstoffhaltigen Nährmedien. Viele Spaltpilze haben die Fähigkeit sowohl Kohlehydrate und sonstige stickstofffreie, als auch Eiweiss- und andere stickstoffhaltige Substanzen bei Luftausschluss zu zersetzen. Der Name Fäulniss, worunter im gewöhnlichen Leben Zersetzung organischer Substanzen unter Bildung übelriechender Producte verstanden wird, sollte aus der Terminologie der Gährungsschemie ganz verschwinden. Ob etwas angenehm oder schlecht riecht, ist für das Wesen der Gährungen nebensächlich. Die sogenannten Gährungen durch Oxydation, wie z. B. die Bildung der Essigsäure aus Alkohol durch Spaltpilze sind daher sensu strictiori keine Gährungen mehr. Die Zersetzungen organischer Substanzen durch Pilze mittelst atmosphärischen Sauerstoffes würde man passend mit dem Worte „Verwesung“ bezeichnen.

flüchtigen Producten enthielt, aus welchem aber nach Zusatz von Pottasche einige Cubikcentimeter einer leicht beweglichen, oben aufschwimmenden Flüssigkeit sich abschieden, die sowohl durch den Siedepunkt, als auch die Dampfdichte als Äthylalkohol sich auswiesen. Ich hielt mit Rücksicht auf die kürzlich publicirten Versuche von Vitali<sup>1</sup> den erhaltenen Alkohol für ein Spaltungsproduct aus dem Eiweiss, überzeugte mich aber bald, dass dies ein Irrthum war, indem der zur Extraction verwendete Äther Alkohol enthielt und als ich bei Wiederholung des Versuches ein Destillat von vergährtem Eiweiss durch Rauschbrandbacillen statt mit Äther mit vollständig alkoholfreiem Schwefelkohlenstoff extrahirte, fehlte der Alkohol gänzlich.

Nachdem zur Entfernung der flüchtigen Producte der Retorteninhalt auf etwa  $\frac{1}{3}$  des ursprünglichen Volumens abdestillirt war, wurde er noch heiss filtrirt und auf flachen Schalen auf dem Wasserbade bis zum starken Syrup und beginnender Krystallisation der Oxalsäure eingedampft. Ausser der Oxalsäure scheiden sich hier beim Erkalten noch die oxalsauren Alkalien und etwas Leucin ab. Die syrupige Masse wird dann in Flaschen gebracht und mit Äther drei bis viermal ausgeschüttelt. Der in Äther unlösliche Rückstand enthält ausser den genannten Stoffen noch Peptone und basische Producte an Oxalsäure gebunden. Aus dem ätherischen Auszug scheidet sich nach Abdestilliren des Äthers und Zusatz von Wasser eine schwere, darin untersinkende gelbliche Flüssigkeit, welche ausser geringen Mengen flüchtiger Fettsäuren die drei folgenden aromatischen Säuren enthält: 1. die Phenylpropionsäure, 2. die Paraoxyphenylpropionsäure (Hydroparacumarsäure) und 3. die Skatolessigsäure. Es sind diese drei Säuren allein, welche aus dem vergährtem Eiweiss in den Äther übergehen. Bei vielfacher Wiederholung dieser Versuche, wobei mehr als 100 l der Eiweisslösung verarbeitet wurden, habe ich stets nur diese drei Säuren erhalten. Ihre Menge ist je nach der Dauer, sowie der angewendeten Pilzart verschieden. Die grösste Menge der Skatolessigsäure wird nach drei bis vier wöchentlicher Gährung des Eiweisses mit Rauschbrandbacillen erhalten. Bei Anwendung des

---

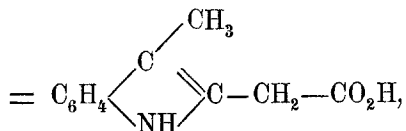
<sup>1</sup> Maly's Jahresbericht für 1887, S. 4.



*B. liquefaciens magnus* oder *spinosus* war ihre Menge stets geringer. Nach achttägiger Digestion von Eiweiss mit *B. liquefaciens magnus* in Stickstoffatmosphäre erhielt ich z. B. aus 150 g Eiweiss, 0.6 g analytisch reine Phenylpropionsäure, 0.34 g ebensolche Paraoxyphenylpropionsäure und keine Skatolessigsäure. Sie entsteht hier erst nach zwei bis drei Wochen. Die Trennung und Reindarstellung dieser drei Säuren ist ziemlich schwierig und mit Verlusten verbunden. Am zweckmässigsten erwies sich folgendes Verfahren:

Die Ätherauszüge von  $\frac{1}{2}$ —1 kg zersetzten Eiweisses werden mit überhitztem Dampf destillirt, so lange bis das Destillat noch sauer reagirt. Es verflüchtigen sich hier die Fettsäuren und die Phenylpropionsäure, während die Hydroparacumarsäure und die Skatolessigsäure als öliger Rückstand hinterbleiben. Dieser Rückstand wird in heissem Wasser gelöst und filtrirt. Das warme Filtrat wird beim Erkalten trüb, indem sich zunächst ein Harz ausscheidet, wovon abfiltrirt wird und nöthigenfalls diese Operation mehrmals wiederholt, bis das Filtrat beim Erkalten klar bleibt. Man kühlt jetzt in Eiswasser ab, worauf sich nach einigen Stunden die Skatolessigsäure in Prismen oder unregelmässig gezackten sechseitigen Tafeln, die dem salpetersauren Harnstoff ähnlich sind, ausscheidet. Beim Einengen der Mutterlauge scheidet sich noch mehr davon ab, während die letzte Krystallisation aus der im Wasser leicht löslichen Hydroparacumarsäure besteht.

#### Die Skatolessigsäure



die bisher weder synthetisch, noch als Spaltungsproduct des Eiweisses dargestellt worden ist, ist in kaltem Wasser wenig löslich, viel leichter in heissem, wie überhaupt ihre Löslichkeit in Wasser eine grössere ist, als wie die der Skatolcarbonsäure von welcher letzteren mir Herr Professor Salkowski ein Muster zum Vergleich freundlichst übersandte. In Alkohol und Äther ist sie

sehr leicht löslich, ebenso in verdünnter Essigsäure. Im Capillarröhrchen schmilzt sie bei  $134^{\circ}$  (uncorrigirt). Als eine grössere Partie im Reagenzröhrchen auf  $200^{\circ}$  erhitzt wurde blieb die Substanz unverändert. Sie erstarrte beim Erkalten krystallinisch und konnte durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser rein erhalten werden; allerdings enthielt die Lösung offenbar auch Spuren von Skatol, da nach Zusatz von Salzsäure und Pikrinsäure sich einige rothe Kryställchen der Skatol-Pikrinsäureverbindung absetzten. Erst als die Säure zum Sieden erhitzt wurde bräunte sie sich und es trat deutlich der Geruch nach Skatol auf, das durch Ausziehen der Masse mit heissem Wasser und Fällen mit Pikrinsäure leicht nachweisbar war.

Das aus heissem Wasser noch einmal umkrystallisirte und über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  getrocknete Präparat ergab bei der Verbrennung folgende Zahlen:

0·2133 g gaben 0·5475 g  $\text{CO}_2$  und 0·117 g  $\text{H}_2\text{O}$  oder 70·00% C und 6·09% H.

0·2021 g gaben im Zulkowski'schen Apparate 13·8  $\text{cm}^3$  N gas bei  $15\cdot8^{\circ}$  T und 700 mm Bst. = 7·34% N.

0·2019 g von einer andern Darstellung herrührend, gaben 0·5200 g  $\text{CO}_2$  und 0·1068 g  $\text{H}_2\text{O}$  oder 69·74% C und 5·87% H.

0·1627 gaben 10·8  $\text{cm}^3$  N gas bei  $17^{\circ}$  T und 717 mm Bst. = 7·27 % N.

Versuch	Die Formel $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ verlangt
C ... 70·00 und 69·74%	C ... 69·84%
H ... 6·09 „ 5·87 „	H ... 5·87 „
N ... 7·34 „ 7·27 „	N ... 7·40 „

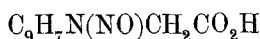
Als die empfindlichste Reaction auf Skatolcarbonsäure beschreibt Salkowski die folgende:<sup>1</sup> Man versetzt eine Lösung von 1 : 10,000 mit einigen Tropfen Salzsäure, dann mit 2—3 Tropfen einer ganz dünnen Eisenchloridlösung und erhitzt. Es färbt sich dann die Mischung noch vor dem Sieden intensiv violett. Lösungen von 1 : 100000 zeigten die Reaction noch sehr ausgeprägt und unverkennbar, nur muss der Eisenchloridzusatz noch geringer gewählt werden. Macht man die Reaction mit

<sup>1</sup> Zeitschrift für physiol. Chem. Bd. 9, S. 25.

stärkeren Lösungen (1 : 1000) so tritt eine intensive Kirschfarbe auf; der Salzsäurezusatz muss hierbei etwas grösser gewählt werden, ebenso der Zusatz von Eisenchlorid.

Eine wässrige Lösung der Skatolessigsäure gibt mit Eisenchlorid eine weissliche Trübung. Beim Erwärmen wird die Trübung ziegelroth, und beim Erkalten bildet sich ein ziegelrother Niederschlag. Werden concentrirtere Lösungen angewendet so färbt sich die Lösung feuerroth bis kirschroth.

Ein viel besseres Reagens auf die Skatolessigsäure, das mir zu ihrer Auffindung sehr nützlich war und auch zur quantitativen Bestimmung derselben benutzt werden kann, ist das salpetrigsaure Kali. Versetzt man eine Lösung, die Skatolessigsäure enthält mit einer concentrirten Lösung von salpetrigsaurem Kali und säuert mit etwas Essigsäure an, so bildet sich in wenigen Augenblicken ein Magma von feinen gelben Krystallnadeln der Nitrosoverbindung. Ich habe diese Reaction zuerst gelegentlich einer Untersuchung, die Herr Dr. Kerry aus Wien in meinem Laboratorium über die Zersetzung des Eiweisses durch die Bacillen des malignen Oedems angefangen hat, und die er in Wien weiter fortsetzen wollte, aufgefunden. Die Nitrososkatolessigsäure ist in Wasser unlöslich. Aus reiner Skatolessigsäure wird sie am zweckmässigsten so dargestellt, dass die letztere in essigsäurehaltigem Wasser gelöst und unter Kühlung in Eiswasser mit einer Lösung von salpetrigsaurem Kali im Ueberschusse unter Umrühren versetzt wird. Der sofort entstandene Krystallbrei wird auf dem Filter sorgfältig ausgewaschen und zunächst auf Fliesspapier, sodann über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  getrocknet. Die Verbrennungen, namentlich die Stickstoffbestimmung, da der Körper beim Erhitzen verpufft, müssen vorsichtig ausgeführt werden. Gegen Ende, um den letzten Rest des Stickstoffes auszutreiben, ist es nothwendig stark zu glühen. Die erhaltenen Zahlen stimmen mit der Formel



überein.

0·2087 g gaben 24·2  $\text{cm}^3$  N gas bei 16° T und 706 mm Bst.  
oder 12·51 % N.

0·2156 g gaben 0·4804 g  $\text{CO}_2$  und 0·0972 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 60·75% C  
und 5·00% H.

0·2343 g gaben 0·5208 g CO<sub>2</sub> und 0·1012 g H<sub>2</sub>O = 60·61% C  
und 4·79% H.

Versuch	Die Formel C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> N(NO)CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H verlangt
C ... 60·75 und 60·61%	C ... 60·55%
H ... 5·00 „ 4·79 „	H ... 4·59 „
N ... 12·51%	N ... 12·84 „

Die Nitrososkatolessigsäure ist leicht zersetzbar, wesshalb sie auch aus Alkohol, worin sie leicht löslich ist, nicht umkrystallisirt werden konnte. In Äther ist sie ebenfalls leicht löslich, weniger in Ligroin. Von Alkalien wird sie leicht gelöst und daraus durch Salzsäure gefällt. Allem Anscheine nach findet auch hierbei eine partielle Zersetzung statt. Im Capillarröhrchen schmilzt sie bei 135° unter Gasentwicklung. In Phenol gelöst gibt sie nach Zusatz von Schwefelsäure und gelindem Erwärmen einen braunrothen Farbstoff, der sich in Alkalien mit schön blauer Farbe löst, ein Beweis dass der Körper wirklich eine Nitroso- und nicht Isonitrosoverbindung ist. Auch die Skatolcarbonsäure gibt mit Essigsäure und salpetrigsaurem Kalium eine in haarfeinen gelben Nadeln krystallisirende Nitrosoverbindung, die sich nur etwas langsamer, als die Nitrososkatolessigsäure ausscheidet. Ich habe den Körper nicht analysirt und constatirte nur, dass er ebenfalls die Liebermann'sche Reaction gibt.

Um die Phenylpropionsäure von den flüchtigen Fettsäuren zu trennen, werden die mit Wasserdämpfen übergegangenen Säuren mit Soda neutralisirt, zur Trockne verdunstet und mit verdünnter Schwefelsäure (im Verhältnis von 1 : 2) angesäuert und mit Äther extrahirt. Zur Reindarstellung der Phenylpropionsäure habe ich mich hier wie schon früher des schön krystallisirenden, in verdünntem Alkohol schwer löslichen Zinksalzes bedient. Der nach Abdestilliren des Äthers hinterbliebene Rückstand wurde mit etwa dem zehnfachen Volumen Wasser versetzt und in einer Schale auf dem Wasserbade so lange Alkohol zugesetzt, bis die anfänglich ölig abgeschiedene Säure wieder in Lösung geht. Man setzt jetzt Zinkoxydhydrat im Überschusse zu, erhitzt zum Kochen und filtrirt heiss. Das beim Erkalten aus-

krystallisirte Salz wird aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt. Das Salz enthält Krystallwasser, das es aber vollständig beim Trocknen im Exsiccator über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  verliert. Ein so aus einer Rauschbrandcultur erhaltenes Zinksalz ergab bei der Verbrennung folgende Zahlen:

0·2632 g des Salzes im offenen Rohre verbrannt gaben 0·574 g  $\text{CO}_2$ , 0·1206 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0·058 g  $\text{ZnO}$  oder in Procenten 59·4% C, 5·09% H und 17·68% Zn. Die Formel  $(\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2)_2\text{Zn}$  verlangt: C 59·5% H 4·96% und Zn 17·4%.

Die aus einer Cultur von *B. liquefaciens magnus* aus dem Zinksalze abgeschiedene freie Säure — Schmelzpunkt  $47\cdot5^\circ$  — ergab bei der Verbrennung folgende Zahlen:

0·204 g gaben 0·5399 g  $\text{CO}_2$  und 0·1267 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 72·17% C und 6·90% H.

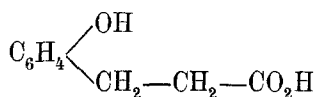
Die aus der Cultur von *B. spinosus* ebenso erhaltene Säure — Schmelzpunkt  $47^\circ$  — ergab folgende Zahlen:

0·2387 g gaben 0·6304 g  $\text{CO}_2$  und 0·1510 g  $\text{H}_2\text{O}$  oder 72·02% C und 7·02% H. Die Formel der Phenylpropionsäure =  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$  verlangt 72·0% C und 6·66% H.

Die Phenylpropionsäure bildet den Hauptbestandtheil der in Ätherextract übergehenden aromatischen Säuren. Ich muss jedoch genaue quantitative Angaben hierüber einer späteren Untersuchung vorbehalten. Anfangs suchte ich die aromatischen Säuren statt sie durch Destillation im Dampfströme zu trennen, durch fractionirte Krystallisation der Zinksalze zu isoliren. Es gelingt dies mit der Phenylpropionsäure und Hydroparacumarsäure. Das Zinksalz der Skatolessigsäure ist in verdünntem Alkohol leichter löslich, als das der Phenylpropionsäure. Eine vollständige Trennung der beiden Säuren ist aber auf diesem Wege nicht möglich. Es gelingt wohl als erste Krystallisation reines phenylpropionsaures Zink zu erhalten. Die späteren Krystallisationen aber bestehen stets aus einem Gemenge der beiden Salze im wechselnden Verhältniss. Vortheilhafter ist es aber auf diese Weise die Hydroparacumarsäure zu isoliren. Die durch Zersetzen der Zinksalze abgeschiedenen öligen Säuren werden abfiltrirt und das Filtrat auf dem Wasserbade concentrirt.

Aus der eingeengten Lauge krystallisirt die Hydroparacumarsäure leicht aus und es bedarf nur eines einmaligen Umkrystallisirens um sie rein zu erhalten. Beim Destilliren im Dampfströme hinterbleibt als nicht flüchtig neben der Skatolessigsäure auch die Hydroparacumarsäure. Sie ist aber durch das lange Erhitzen zum Theil verharzt und nur schwer oder gar nicht zum Krystallisiren zu bringen. Ein auf obige Weise aus Rauschbrandecultur erhaltenes Präparat ergab bei der Verbrennung folgende Zahlen:

0·2641 g der Substanz gaben 0·6293 g CO<sub>2</sub> und 0·145 g H<sub>2</sub>O oder 64·98% C und 6·1% H. Die Formel

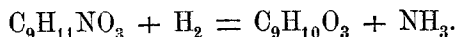


verlangt 65·06% C und 6·02% H.

Der Schmelzpunkt des analysirten Präparates lag bei 125°.

Auf gleiche Weise habe ich auch aus den Culturen des *B. liquefaciens magnus* und *B. spinosus* die Paraoxyphenylpropionsäure in reinem Zustande dargestellt, doch begnügte ich mich hier mit der Schmelzpunktbestimmung und der Reaction mit dem Millon'schen Reagens. Die Gegenwart der Oxyphenylpropionsäure war übrigens auch durch die Rothfärbung mit salpetrigsaurem Kali stets zu erkennen. Während die Phenylpropionsäure mit diesem Reagens keinen Niederschlag oder Färbung gibt, die Skatolsäuren in ihre krystallinische, rein gelbe, in Wasser unlösliche Nitroverbindung verwandelt werden, sind es nur die Oxy-säuren, welche sich damit roth färben. Hervorheben will ich, dass ausser den drei genannten Säuren, ich weder die Phenyllessigsäure, noch die Benzoësäure und die respectiven hydroxyilirten Säuren in dem Ätherextracte auffinden konnte, obgleich ich besonders darauf geachtet habe. Diese Thatsache ist sowohl für die Kenntniss der anaërobiotischen Gährung, als wie auch des Eiweissmolekül's von hohem Interesse. Alle Forscher, die sich in den letzten Jahren mit der Eiweisschemie beschäftigt haben, sind darüber einig, dass ausser der hydroxyilirten Phenylamidopropionsäure — dem Tyrosin — in dem Eiweissmolekül noch

die Phenylamidopropionsäure enthalten sei. So äussert sich z. B. E. Schulze,<sup>1</sup> welcher zuerst die Phenylamidopropionsäure unter den Producten der Eiweisszersetzung aufgefunden hat, „es sei höchst unwahrscheinlich, dass diese Säure sich aus dem Tyrosin gebildet habe, man wird vielmehr anzunehmen haben, dass sie aus einer im Eiweissmolekül vorhandenen Atomgruppe hervorgegangen ist.“ Auch Salkowski l. c. S. 510, acceptirt die Anschauung, dass im Eiweiss präformirte Phenylamidosäure einen grösseren Antheil an den durch Spaltung entstehenden flüchtigen aromatischen Säuren habe, als das Tyrosin. Auf Grund der mitgetheilten Resultate bin ich in Übereinstimmung mit Salkowski (vergl. dessen „Lehre vom Harn“ S. 26.) der Ansicht, dass in dem Eiweissmolekül nicht zwei, sondern drei aromatische Gruppen, und zwar das Tyrosin, die Phenylamidopropionsäure und die Skatolamidoessigsäure präformirt sind. Bei der anaërobiotischen Gährung des Eiweisses, wo die Oxydation durch den atmosphärischen Sauerstoff ausgeschlossen ist, findet nur durch den nascirenden Wasserstoff die Umwandlung der drei im Eiweissmolekül enthaltenen Amidosäuren in Ammoniak und die respective stickstofffreie Säure statt. Baumann<sup>2</sup> fand, dass Tyrosin mit faulendem Pankreas in offenem Gefässe bei Bruttemperatur digerirt, in Ammoniak und Oxyphenylpropionsäure zerfällt. Die Zersetzung erfolgt hier nach der Gleichung:



Unter ähnlichen Verhältnissen wird die Phenylamidopropionsäure von Schulze<sup>3</sup> in Phenylessigsäure verwandelt.<sup>4</sup> Die Reaction verläuft hier in zwei Phasen, indem durch Wasserstoff zunächst Ammoniak und Phenylpropionsäure entstehen und bei

<sup>1</sup> Zeitschrift für physiol. Chem. Bd. 9, S. 88.

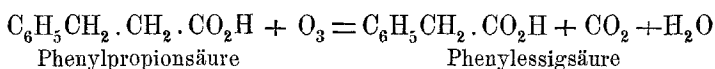
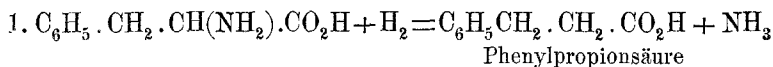
<sup>2</sup> Berl. chem. Ber. Jahrgang 1879, S. 1451.

<sup>3</sup> Nach den Untersuchungen von E. Schulze und E. Nägeli (Zeitschrift für physiol. Chem., Bd. 11, S. 201), ist die aus Lupinenkeimlingen und aus Eiweisstoffen erhaltene Amidosäure eine optisch active Modification der Phenylamidopropionsäure von Erlenmeyer und Lipp (Ann. Chem. Pharm. Bd. 219, S. 194) und kann ebenfalls in Tyrosin verwandelt werden.

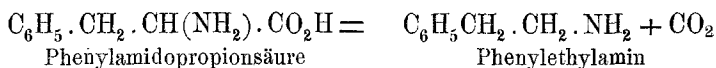
<sup>4</sup> Zeitschrift für physiol. Chem. Bd. 7, S. 282.

Luftzutritt die letzte zu Phenyllessigsäure oxydirt wird. Ist, wie in meinen Versuchen, der Zutritt des atmosphärischen Sauerstoffs ausgeschlossen, dann bleibt die Reaction nur bei der ersten Phase und so erklärt es sich, dass ich nur die drei genannten aromatischen Säuren und keines von ihren weiteren Oxydationsproducten erhalten habe. Sie entstehen erst bei Luftzutritt und wenn wir annehmen, dass die drei Amidosäuren im Eiweiss präformirt sind, so lässt sich durch Oxydation und Spaltung der daraus hervorgegangenen aromatischen Säuren die ganze Serie der bei der Eiweissgährung und Verwesung aufgefundenen Producte auf die einfachste Weise erklären.

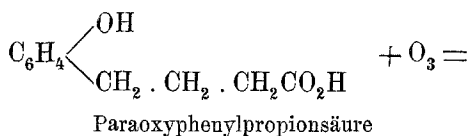
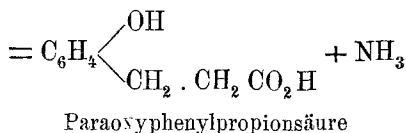
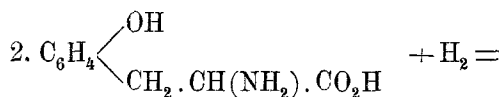
So entstehen aus der Phenylamidopropionsäure:



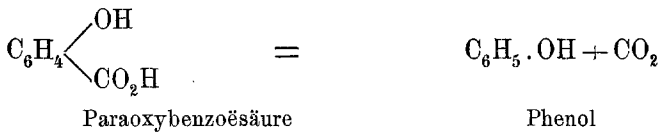
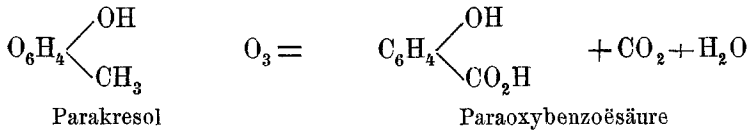
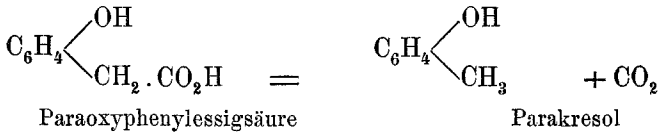
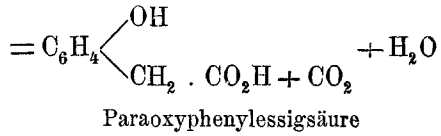
und ausserdem



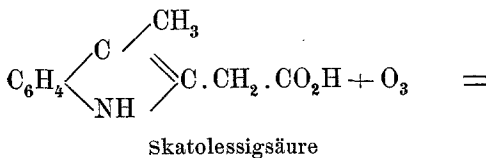
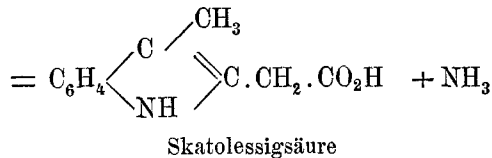
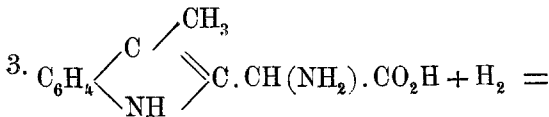
Aus dem Tyrosin:

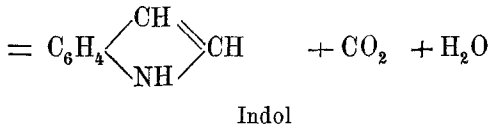
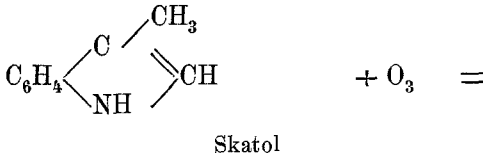
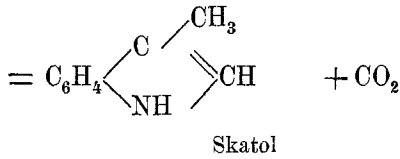
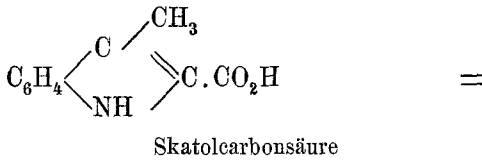
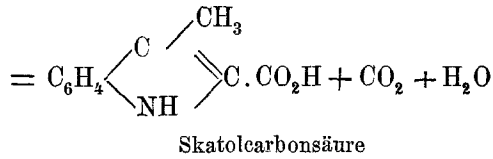






und aus der Skatolamidoessigsäure





Selbstverständlich will ich nicht behaupten, dass die Zersetzung der drei aromatischen Amidosäuren successive nach dem hier aufgestellten Schema verläuft. In vielen Fällen dürften aus den Amidosäuren die Endproducte, wie z. B. Phenol oder Indol sofort entstehen. Es hängt dies von der Temperatur, Luftzutritt und vor allem von den an der Zersetzung des Eiweisses beteiligten Spaltpilzen ab. Wie weiter unten gezeigt werden soll, sind in den Rauschbrandgeschwülsten nicht allein die Rauschbrandbacillen enthalten, sondern noch andere Mikroben und unter diesen ein sehr wirksames Ferment: der *Mikrococcus acidi paralaetici*. Entnimmt man nun die seröse Flüssigkeit direct aus der Geschwulst des Thieres und impft damit steriles Serum-eiweiss, so kann es vorkommen, wie wir dies wiederholt beob-

achtet haben, dass daraus in Kohlensäureatmosphäre und bei Bruttemperatur in reichlichen Mengen Skatol gebildet wird; was bei Impfung mit reinen Rauschbrandbacillen nie der Fall ist. Es ist also ein Spaltpilz vorhanden, der direct, sei es aus Eiweiss, sei es aus der Amidoskatolessigsäure Skatol abspaltet. Die Amidoskatolessigsäure ist bis jetzt als Spaltungsproduct des Eiweisses noch nicht nachgewiesen worden. Ich glaube jedoch dieselbe als Muttersubstanz der Skatolessigsäure im Eiweissmolekül annehmen zu müssen. Bei der relativen Beständigkeit der Skatolessigsäure, ihrer Löslichkeit in Äther und dem charakteristischen Verhalten gegen salpetrige Säure, wäre sie kaum der Aufmerksamkeit früherer Forscher entgangen, wenn sie als solche im Eiweiss präformirt enthalten wäre.

Vom Eiweiss unterscheidet sich Leim dadurch, dass er bei seiner Zersetzung weder Tyrosin, noch Skatol oder Indol, wohl aber Benzoësäure liefert. Ich bin daher der Ansicht, dass im Leim kein Tyrosin oder Skatolamidoessigsäure, dagegen die Phenylamidopropionsäure präformirt ist. Die Gegenwart dieser letzteren Säure im Molekül des Leims ist übrigens durch E. Schulze<sup>1</sup> wenn nicht sicher nachgewiesen, so doch höchst wahrscheinlich geworden. Die Versuche, welche den Nachweis dieser Säure im Leim bezwecken, sind übrigens in meinem Laboratorium im Gange. Ich theile daher die vor Kurzem ausgesprochene Ansicht meines verehrten Freundes Maly<sup>2</sup> hierüber nicht und finde gerade in der Vertheilung der aromatischen Gruppen einen wesentlichen Unterschied zwischen Eiweiss und Leim.

Ich habe oben als ein Spaltungsproduct der Phenylamidopropionsäure das Phenylethylamin aufgenommen. Nach den Beschreibungen dieser Base von Erlenmeyer und Lipp, sowie Schultze zweifle ich nicht daran, dass die von mir vor 13 Jahren bei der Fäulniss von Leim mit Pankreas erhaltene Base von der Formel  $C_8H_{11}N$  Phenylethylamin ist. Bei meiner Anwesenheit in Paris im vorigen Jahre hat mir Professor Gautier seine Collidin-

<sup>1</sup> Zeitschrift für physiol. Chem., Bd. 9. S. 121.

<sup>2</sup> Wiener Akademieberichte, Bd. 98, S. 19, Jänner 1889.

<sup>3</sup> Über die Zersetzung der Gelatine und des Eiweisses bei der Fäulniss mit Pankreas. Bern 1876.

basen gezeigt und ich konnte mich überzeugen, dass sie ganz verschieden von der meinigen waren.

Wie viel dem Gewichte nach Eiweiss in seinem Molekül aromatische Säuren enthält, lässt sich jetzt nicht genau angeben. Wenn man jedoch bedenkt mit wie viel Verlust ihre Isolirung verbunden ist, und dass bei der Gährung sie kaum vollständig aus dem Eiweissmolekül abgespalten werden, so dürfte die Annahme, dass etwa der zehnte Theil des Eiweisses aus aromatischen Amidosäuren besteht, nicht weit von der Wahrheit entfernt sein.

---