

## Über die Zersetzung des Eiweisses durch die Bacillen des malignen Oedems

von

Dr. Richard Kerry.

(Vorgelegt in der Sitzung am 7. November 1889.)

Über Anregung des Herrn Prof. Dr. v. Nencki und von ihm in der freundlichsten Weise unterstützt, habe ich die vorliegende Untersuchung über die Zersetzung des Eiweisses durch die Bacillen des malignen Oedems im Juli 1888 begonnen. Herr Prof. Dr. Nencki hat im Verlaufe meiner Untersuchung mit anderen anaëroben Spaltpilzen ähnliche Versuche unternommen, mit denselben Methoden, die er so freundlich war, mir anzurathen, und die Ergebnisse seiner Untersuchung bereits publicirt.<sup>1</sup> Insofern erscheint die vorliegende Untersuchung als Ergänzung zu der eben citirten und erklärt sich auch die Ähnlichkeit in der Anordnung der Versuche.

Während bisher bei den Untersuchungen über die Zersetzungsproducte des Eiweisses die eiweisshaltigen Substanzen meistens einfach der Fäulniss überlassen wurden, habe ich bei meiner Untersuchung den Einfluss einer bestimmten Bacterienart auf die Eiweisszersetzung geprüft.

Durch die Güte meines hochverehrten Lehrers, Herrn Prof. Dr. Max Gruber gelangte ich in den Besitz von Reinculturen der Bacillen des malignen Oedems, von denen vermöge der Verflüssigung der Gelatine durch dieselben, vermöge ihrer starken Gasentwicklung und pathogenen Wirkung eine intensive Einwirkung auf Eiweiss zu erwarten war.

---

<sup>1</sup> Siehe Monatshefte für Chemie, X. Bd., 7. Heft, Juli 1889. Gesammelte Abhandlungen aus den Sitzungsberichten der kais. Akademie der Wissenschaften.

Als Eiweisssubstanz benützte ich — wie v. Nencki — getrocknetes Ochsenblutserum, sogenanntes Bluteiweiss. 150 *g* dieses Bluteiweisses wurden in grossen Kolben mit 3 *l* gewöhnlichen Wassers übergossen, die Kolben mit Watte verstopft und einer sehr exacten fractionirten Sterilisirung unterzogen. Ich habe die Kolben mindestens sieben Tage lang je zwei Stunden im strömenden, überhitzten Wasserdampfe sterilisirt und besitze heute noch einen vollkommen keimfreien Controlkolben, welcher im December vorigen Jahres hergestellt wurde. Die auf diese Weise hergestellte Flüssigkeit war von hellgraugelber Farbe und enthielt einen geringen Theil des Eiweisses und Salze in Lösung, während der grösste Theil des Eiweisses ungelöst war. Es wurde hierauf in einen doppeldurchbohrten Kautschukstöpsel, welcher in Sublimat sterilisirt war, einerseits ein bis auf den Boden gehendes Gaszuleitungsrohr, andererseits ein Kugelapparat, in welchem Quecksilber vorgelegt wurde, gesteckt, die Röhren durch die Flamme gezogen, die Kolben mit einer ganzen verflüssigten Gelatinecultur beschickt und rasch mit dem in oben beschriebener Weise adjustirten Pfropfen geschlossen.

Zur Vertreibung der Luft aus den Kolben wurde circa eine Stunde lang Kohlensäure durchgeleitet. In dieser Zeit erschien bei der Prüfung mit Kalilauge die Luft verdrängt.

Das Zuleitungsrohr wurde nun im Gasstrome abgeschmolzen und die Kolben hierauf einer Temperatur von 37—40° ausgesetzt. Bei günstiger Temperatur — unter 35° trat die Zersetzung nie ein — bemerkte man nach 24 Stunden eine deutliche Trübung der ursprünglich klaren Flüssigkeit, nach weiteren 24 Stunden zeigte sich über dem Eiweiss eine mehrere Millimeter hohe weisse Schichte und es begann die Entwicklung stinkender Gase, durch deren Entweichen das vorgelegte Quecksilber geschwärzt wurde.<sup>1</sup> Unter dieser anfangs heftigen, später immer langsamer verlaufenden Gasentwicklung schritt die Eiweiss-

---

<sup>1</sup> Die rasche Entwicklung der gasförmigen Producte, welche die eingeleitete Kohlensäure verdrängt und den Bacillen ihre Atmosphäre verschafft, dürfte die Ursache sein, dass in diesem Falle die Bacillen wachsen, während sonst — nach den Untersuchungen von Fraenkel — die Kohlensäure einen entwicklungshemmenden Einfluss hat.

zersetzung immer weiter fort, bis circa zum zehnten Tage, vom Tage der Impfung gerechnet.

Um diese Zeit hörte die Gasentwicklung auf, die früher trübe Flüssigkeit klärte sich; am Boden des Gefässes verblieb ein kleiner Rest unzersetzten Eiweisses. Der Versuch wurde immer am zehnten Tage unterbrochen und die heftig stinkende Flüssigkeit zur Prüfung der Reinheit in Gelatine überimpft.<sup>1</sup>

Der mikroskopische Befund zeigte immer ein einheitliches Bild, entsprechend der Reincultur der Bacillen des malignen Oedems. Die Reaction der Flüssigkeit war stets alkalisch.

Auf die beschriebene Weise wurden etwa 20 Kolben à 3 l in Arbeit genommen.

Die Flüssigkeit wurde hierauf mit Oxalsäure angesäuert, wobei Schwefelwasserstoff und Kohlensäure entwichen, und dann auf freiem Feuer destillirt.

Das Destillat war meist milchig getrübt von einem fein vertheilten öligen Körper, welcher auch in grösseren Tropfen auf der Flüssigkeit schwamm. Es enthielt weder Skatol, noch Indol dagegen die bei der Eiweissfäulniss vorkommenden Fettsäuren und den oberwähnten öligen Körper. Zur Bindung der Fettsäuren wurde das Destillat mit Natriumcarbonat alkalisch gemacht und hierauf mit Äther ausgeschüttelt. Das Öl ging in den Äther, welcher nun von der klaren Lösung der Natronsalze abgegossen werden konnte. Der Äther wurde abdestillirt, das mit H<sub>2</sub>O gemischte Öl mit Chlorcalcium getrocknet.

Auf diese Weise erhielt ich etwa 30 cm<sup>3</sup> eines gelblichen Öles von nicht zu definirendem widrigem Geruche. Dieses Öl wurde im Linnemann'schen Apparate fractionirt destillirt. Ich erhielt sehr geringe Antheile, welche bis 109° übergingen. Die Hauptfraction erhielt ich zwischen 109—210°, einen weiteren Antheil über 360°.<sup>2</sup> Die Fraction 109—210° wurde abermals,

<sup>1</sup> Ich benützte zur Überschichtung der in Gelatine geimpften Anaëroben nicht Gelatine, sondern sterilisirtes Paraffinum liquidum (Pharm. Germ.) mit gutem Erfolge. Man erspart dadurch die umständliche Procedur, wie sie bei der Überschichtung mit Gelatine nöthig ist und ersetzt die Gelatine durch ein für Mikroorganismen recht ungünstiges Medium.

<sup>2</sup> Wie erwähnt, benützte ich zur Cultur flüssiges Paraffin, welches bei der Impfung zum Theil in die Kolben gelangte, bei der Destillation mit Wasser übergeht und — da in Äther löslich — die Fraction über 360° darstellt.

jetzt exact fractionirt und ergab einen Hauptantheil zwischen  $165-171^{\circ}$ , einen weiteren von  $173-178^{\circ}$  C. Diese beiden Antheile erwiesen sich jedoch als identisch, und daher kann ich wohl den Siedepunkt derselben zwischen  $165-171^{\circ}$  annehmen.

Das auf diese Weise erhaltene Product ist ein farbloses dickes Öl, leichter als Wasser, von unangenehmem Geruche. Es ist leicht löslich in Äther, Alkohol, Schwefelkohlenstoff, Benzol, unlöslich in Wasser, Alkalien und Säuren. Nach der Methode von Carius im geschlossenen Rohre mit Salpetersäure erhitzt und weiter geprüft, erwies es sich als schwefelfrei, ebenso bei der Probe mit Nitroprussidnatrium. Auch die Proben auf Stickstoff fielen negativ aus.

Die Analysen des Körpers ergaben folgende Zahlen:

- I.  $0.2962\text{ g}$  verbrannte Substanz gaben  $0.5987\text{ g CO}_2$  und  $0.2572\text{ g H}_2\text{O}$ . Das entspricht  $55.12\%$  C,  $9.65\%$  H.
- II.  $0.2437\text{ g}$  verbrannte Substanz gaben  $0.4868\text{ g CO}_2$  und  $0.2098\text{ g H}_2\text{O}$ , entsprechend  $54.48\%$  C,  $9.58\%$  H.
- III.  $0.2647\text{ g}$  verbrannte Substanz gaben  $0.5292\text{ g CO}_2$  und  $0.2247\text{ g H}_2\text{O}$ , d. i.  $54.52\%$  C,  $9.43\%$  H.

Für  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$  wurde berechnet:

$$\begin{array}{l} \text{C} \dots 54.54\% \\ \text{H} \dots 9.09. \end{array}$$

Gefunden:

$$\begin{array}{l} \text{C} = 55.12\% \\ \quad 54.48 \\ \quad 54.52 \\ \text{H} = 9.65 \\ \quad 9.58 \\ \quad 9.43. \end{array}$$

Nach den Resultaten der Analyse kommt also dem Körper die Formel  $n(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$  zu.

Die Bestimmung der Dampfschichte wurde nach der Methode von V. Mayer im Naphthalinbade und nach der Hoffmann'schen Methode im strömenden Anilindampfe vorgenommen und dabei folgende Zahlen gefunden:

R. Kerry,

Mayer.

I	II
Verwendete Substanz	
0·1157 g	0·1102 g
$t = 21·4$	19
$V = 25$	24·4
$b = 748·5$	744·5
Daraus $d = 4·02$	4·24

Hoffmann.

I	II
Verwendete Substanz	
0·0213 g	0·0615 g
$t = 23·4$	23·7
$t_1 = 182$	182
$t_2 = 28$	24,5
$b = 750$	750
$V = 59·16$	82·74
$h_1 = 228$	208
$h_2 = 419$	350
Daraus $d = 4·69$	4·30

Für  $(C_2H_4O)_4$  wird verlangt:  $d = 4·56$ .

Ich glaube demnach berechtigt zu sein, dem fraglichen Öle die Formel  $C_8H_{16}O_4$  zu geben.

Ein Theil der Substanz wurde auf ihr optisches Verhalten geprüft. Die Prüfung wurde im 100 mm-Rohre mit dem Soleil-Ventzke'schen Apparate vorgenommen und ergab eine Rechtsdrehung um 2·86 Theilstrieche. Dies entspricht einem Winkel  $\alpha = 5·63$ . Es erscheint daher wahrscheinlich, dass das Öl ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält.

Der Körper ergab folgende Reactionen:

1. Mit Fuchsin-Schwefliger Säure eine violette Färbung.

2. Mit ammoniakalischer Silberlösung nach Tollens eine Reduction ohne Spiegelbildung.

3. Mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat entsteht anfangs deutliche Erwärmung, später eine krystallinische Verbindung.

4. Mit Diazobenzolsulfosäure, Natronlauge und Natriumamalgam eine rothviolette Färbung.

Hingegen entsteht keine Reaction mit Natriumbisulfit, keine Reduction der Fehling'schen Lösung.

Der Rest der Substanz — etwa 5 g — wurde mit chromsaurem Kali und Schwefelsäure oxydirt. Die nach Vollendung der Oxydation homogen gewordene Flüssigkeit, welche deutlich nach Fettsäuren roch, wurde im Dampfstrom destillirt, die frei gewordenen Fettsäuren aus dem Destillate ins Barytsalz überführt, dasselbe über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet. Dabei verwandelte sich die ursprünglich gelatinöse Masse (nach mehreren Wochen) in ein feines krystallinisches Pulver. Dasselbe wog trocken 1·7836 g, das daraus gefundene schwefelsaure Baryt 1·2625 g. Es ergibt sich daraus der Baryumgehalt der durch Oxydation gewonnenen Fettsäuren mit 41·64%, ein Gehalt, der zunächst steht dem des valeriansauren Baryums (40·41%). Durch die Oxydation wurde also der Körper der Hauptmasse nach in Valeriansäure überführt.

Über die Natur dieses Öles kann ich einstweilen nur Vermuthungen aussprechen. Seine Reactionen, sowie sein Verhalten bei der Oxydation verweisen ihn in die Reihe der Aldehyde oder Ketone.

Ein aldehydartiger Körper als Product des bacteriellen Stoffwechsels wurde kürzlich von Paltauf und Heider<sup>1</sup> beschrieben. Dieselben konnten keine Analysen anstellen; nach den von ihnen beschriebenen Reactionen ist ihr Aldehyd aber nicht identisch mit meinem Öle — so erhalten Paltauf und Heider Reduction von Fehling'scher Lösung, dagegen entfällt

<sup>1</sup> Siehe Paltauf und Heider, Über *Bacillus mairidis* (Cuboni). Medic. Jahrbücher der k. k. Gesellschaft der Ärzte. Neue Folge, 3. Jahrgang, 8. Heft, 1889, Wien.

bei ihnen die Reaction mit Fuchsin und schwefliger Säure. Ihr Aldehyd zerfiel bei der Oxydation in Buttersäure und ist optisch nicht activ. Es ist überdies zu bemerken, dass bei den Untersuchungen von Paltauf und Heider den Bacillen ein Minimum von Eiweiss, ein Überschuss von Kohlehydraten, speciell Zucker geboten wurden, so dass dort die Abstammung des Aldehydes aus dem Kohlehydrat für sehr wahrscheinlich erschien, woraus sich von vornherein eine Verschiedenheit vermuthen liesse.

Leider ist mir zur weiteren Erkenntniss dieses bei der Eiweisszersetzung meines Wissens bisher noch nicht bekannt gewordenen Productes das Material ausgegangen. Weitere Untersuchungen, mit denen ich derzeit beschäftigt bin, werden hoffentlich genauere Aufklärungen über seine Constitution geben.

Der Destillationsrückstand wurde — in der von Nencki angegebenen Weise — zum Syrup eingeengt, dieser mit Alkohol erschöpft, wobei oxalsaures Ammon zum grössten Theile ungelöst blieb, der Alkohol abdestillirt und der Rückstand mit Äther aufgenommen. Auf diese Weise erhielt ich eine ätherische Schichte, eine Schichte, die sich als Leucin erwies, und eine dritte syrupöse, in Äther unlösliche Schichte.

Die ätherische Lösung wurde abdestillirt, der dünnflüssige Rückstand mit Zinkoxyd und verdünntem Alkohol auf dem Wasserbade gekocht, die Lösung heiss filtrirt. Beim Erkalten erstarrte das Filtrat zu einer krystallinischen weissen Masse. Dieser Krystallbrei wurde getrocknet, mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Nach Verjagung des Äthers blieb eine gelbliche syrupöse Flüssigkeit zurück, welche in der Kälte zum grossen Theile zu langen Nadeln, auch Krystalldrusen erstarrte. Ein zurückbleibendes dunkles Öl konnte ich leider nie zur Krystallisation bringen. Dasselbe war in verdünntem Alkohol löslich und gab die von Nencki<sup>1</sup> angegebene Reaction mit Natriumnitrit. Dieses von mir immer nur in geringer Menge erhaltene Öl dürfte wohl identisch sein mit der von Nencki beschriebenen Skatolessigsäure.

Die von mir zur Krystallisation gebrachte Säure wurde der Analyse unterzogen und ergab folgende Zahlen:

---

<sup>1</sup> Siehe die Eingangs citirte Arbeit von Nencki.

Verbrannte Substanz 0·2107 g. Diese gab 0·1148 g  $H_2O$  = 0·012755 g H und 0·4991 g  $CO_2$  = 0·136118 g C, d i.:

Gefunden	Berechnet für $C_9H_{10}O_3$
C . . . 64·60 <sup>0</sup> / <sub>100</sub>	65·06 <sup>0</sup> / <sub>100</sub>
H . . . 6·05	6·02
O . . . 29·35	28·92.
<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> 100·00	

Sie erwies sich daher als Hydroparacumarsäure.

Der eben angegebene Weg zur Isolirung dieser Säure durch Überführung des ursprünglichen Productes in das Zinksalz und sofortige Zersetzung desselben durch Schwefelsäure erwies sich als der einfachste, um die Hydroparacumarsäure rein zu erhalten. Zu diesem Zwecke genügt dann zweimaliges Umkrystallisiren der Krystalle aus heissem Wasser.

Die Zinksalze, selbst oft umkrystallisirt und mikroskopisch homogen erscheinend, erwiesen sich bei wiederholten Verbrennungen immer als Gemenge.

Bei der Verarbeitung des in Äther unlöslichen alkoholischen Rückstandes, in dem die basischen Producte zu vermuthen waren, bediente ich mich der von Brieger angegebenen Methoden. Hiebei gelangte ich immer zu wässrigen Extracten, welche die allgemeinen Alkaloidreactionen gaben, ohne Pepton zu enthalten. Leider hatte ich zu wenig Material, um zu einem erfolgreichen Resultate zu gelangen.

Bei der Untersuchung der gasförmigen Producte der Bacillen bediente ich mich kleiner, etwa 150  $cm^3$  fassender Kolben, wie sie Nencki in der oft citirten Arbeit S. 511 abbildet. Nachdem ich in einem Versuche, in welchem ich die Luft mit Stickstoff verdrängte, erkannt hatte, dass Kohlensäure entwickelt wird, babe ich weiterhin zur Vertreibung der Luft wieder Kohlensäure verwendet. Die Kohlensäure entwickelte ich diesmal, um sie ganz rein zu erhalten, aus saurem kohlensaurem Natron, welches in einem auf einer Seite zugeschmolzenen Verbrennungsrohre langsam erhitzt, einen continuirlichen, anhaltenden, langsamen Gasstrom lieferte. Die auf diesem Wege gewonnene Kohlensäure wurde zum Überflus in Sublimat gewaschen und so lange durch



den Kolben geleitet, bis eine Probe in dem für N-Bestimmungen nach Dumas von Prof. Ludwig angegebenen Apparat über Kalilauge keine Luft mehr erkennen liess. Hierauf wurde (gewöhnlich nach  $1\frac{1}{2}$  Stunden) das Gasableitungsrohr unter Quecksilber gestellt, das Gaszuleitungsrohr im Gasstrome abgeschmolzen und das Kölbchen der Bruttemperatur ausgesetzt. Auch hier begann am zweiten Tage eine heftige Gasentwicklung und ich fing das Gas in kurzen Absorptionsröhren Tag für Tag auf.

Beim ersten Kolben unterzog ich das zuerst gewonnene Gas einer besonderen Analyse, der Inhalt der übrigen Absorptionsröhren wurde zusammen analysirt.

Beim zweiten Kolben analysirte ich den Inhalt sämtlicher Absorptionsröhren gemeinsam. In allen Fällen absorbirte ich jedoch die Kohlensäure und den Schwefelwasserstoff vorher mit Kalikugeln und trocknete ich das Gas, da eine quantitative Bestimmung der Kohlensäure doch irrelevant erschien.

Die Analyse ergab:

	Kolben I, Rohr 1	Kolben I, Rohr 2—6	Kolben II, Rohr 1—5
	Reducirtes Volumen		
Angewandtes Gas . . . . .	17·91	40·46	16·91
Nach Zusatz von Sauerstoff . . . . .	93·1	136·25	75·5
Nach der Explosion . . . . .	68·9	75·24	50·66
Nach der Absorption . . . . .	65·85	74·43	49·86
Resultat . . . . .	H = 67·33% CH <sub>4</sub> = 17·03	C = 98% CH <sub>4</sub> = 2	H = 91·42% CH <sub>4</sub> = 4·73
Unabsorbirter Rest . . . . .	N = 15·64		N = 3·67

Bei den in den später aufgestellten Absorptionsröhren (5, respective 6—10) aufgefangenen Gasproben wurde bei der Absorption mit der Kalikugel das ganze Gas absorbirt, so dass nur eine Gasblase zurückblieb, welche für die weitere Analyse nicht ausreichte.

Die Gase, welche also bei der Zersetzung des Eiweisses durch die Bacillen des malignen Oedems entwickelt werden, sind demnach ausser Kohlensäure, Schwefelwasserstoff und Ammoniak hauptsächlich Wasserstoff, und zwar erscheint dieser im Verlaufe der Gährung in wachsender Menge, in geringer, und zwar im Verlaufe der Gährung abnehmender Menge Grubengas. Was den Stickstoff anbelangt, so möchte ich nach diesen Versuchen allein nicht sicher behaupten, dass er entwickelt wird. Wenn auch die ähnlichen Untersuchungen von Arloing<sup>1</sup> eine Stickstoffentwicklung ergaben, so sind meine Versuche doch mit zu geringen Quantitäten angestellt, als dass das als Stickstoff berechnete Gasvolum nicht in die Reihe der Versuchsfehler fallen könnte. Auffällig ist es auch, dass Stickstoff sich nur im zuerst aufgefangenen Gase vorfindet (Colonne 1), später verschwindet (Colonne 2), ein Verhalten, das durch die Analyse beim zweiten Kolben (Colonne 3) bestätigt zu werden scheint.

Hierüber hoffe ich aus neuen Untersuchungen Aufklärung zu erhalten.

Aus der vorliegenden Untersuchung ergibt sich also, dass bei der Eiweisszersetzung durch die Bacillen des malignen Oedems ein Process vor sich geht, welcher von einem Fäulnisprocess nicht zu unterscheiden ist. Die Producte desselben sind die bekannten Producte der Eiweissfäulnis, wie: Fettsäuren, Leucin, Hydroparacumarsäure. Auffallend ist der Mangel von Indol und Skatol, bemerkenswerth das Auftreten des Eingangs beschriebenen aldehyd- oder ketonartigen Körpers, welcher wohl bisher bei der Eiweisszersetzung noch nicht aufgefunden wurde.

Es sei mir zum Schlusse gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Hofrath Prof. Dr. Ludwig für die freundliche Erlaubnis, diese Untersuchung in seinem Laboratorium beenden zu dürfen, sowie für seine liebenswürdige Unterstützung bei derselben meinen wärmsten Dank auszusprechen; auch kann ich nicht umhin, meinem verehrten Freunde Herrn Professor Dr. Julius Mauthner für seine bereitwillige Unterstützung in Rath und That herzlich zu danken.

---

<sup>1</sup> Siehe Comptes rendus, 1888.