

Untersuchungen über die Zersetzung des Elastin durch anaerobe Mikroorganismen.

Von

Dr. Luigi Zoja,

Assistent an der medicinischen Klinik zu Parma.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 14. April 1897.)

Ueber die bakterielle Zersetzung des Elastin liegt nur eine Untersuchung aus älterer Zeit vor. Wälchli¹⁾ brachte Elastin mit Wasser und etwas Pankreas zusammen und liess es 15 Tage bei Brüttemperatur stehen; es hatten sich Ammoniak, Valeriansäure neben wenig Buttersäure, Glykokoll, Leucin und Biuret-Reaction gebende Körper, aber kein Phenol, Skatol und Indol gebildet. Nachdem inzwischen durch die Arbeiten von Nencki²⁾, Nencki und Sieber³⁾, Kerry⁴⁾, Selitrenny⁵⁾ festgestellt ist, in welcher Weise Eiweiss und Leim unter dem Einfluss reineultivirter anaerober Mikroorganismen zerfallen, schien es von Interesse, die Untersuchung mit dem Elastin wieder aufzunehmen und in exacterer Weise, als es früher möglich war, durchzuführen. Im Folgenden soll kurz über die erhaltenen Resultate berichtet werden.

Die Darstellung des Elastin geschah mit geringen Modificationen nach den von Horbaczewski⁶⁾ und Chittenden

1) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 17, S. 71.

2) Monatsh. f. Chem. Bd. 10, S. 506.

3) Ebenda S. 526.

4) Ebenda S. 864.

5) Ebenda S. 908.

6) Diese Zeitschrift Bd. 6, S. 330.

u. Hart¹⁾ benutzten Verfahren. Das Lig. nuchae vom Rind wurde möglichst rein präparirt, fein zerhackt und längere Zeit mit destillirtem Wasser gekocht. Das Gewebe lässt sich jetzt leicht zu feinen Fasern zerdrücken. Das Kochen wurde unter mehrfachem Erneuern des Wassers fortgesetzt, bis im Filtrat die Eiweisreactionen ausblieben. Nun behandelte ich die Masse mit 10% Essigsäure, filtrirte nach 48 Std. ab, wusch aus, bis die auf Lakmuspapier zerdrückte Substanz nur noch ganz schwache Rothfärbung gab und brachte sie in 5% Salzsäure. Nach ungefähr 48 St. wurde das Elastin abfiltrirt, gewaschen, in Wasser zertheilt und mit 1% Natronlauge tropfenweise bis zur neutralen Reaction zersetzt, wiederum filtrirt und bis zum Verschwinden der Chlorreaction im Filtrat gewaschen. Filtriren und Waschen geschieht am besten auf einem grossen Porzellanfilter mit Hülfe einer Saugpumpe. Das Elastin wurde schliesslich im Soxhlet'schen Apparat mit Alkohol und Aether extrahirt und bei 100° getrocknet. Die zur Analyse fein zerstoßene Masse erwies sich unter dem Mikroskop als noch aus feinsten elastischen Fasern bestehend. Bestimmungen des Stickstoffs nach Kjeldahl und des Schwefels nach Hammarsten²⁾ und Zinoffsky³⁾ sowie Aschenbestimmungen ergaben folgende Resultate:

0,4326 gr. Elastin lieferten 52,40 ccm. $\frac{1}{10}$ N. NH_3 , enthielten also 0,07336 gr. N, d. h. 16,96%. 7,5410 gr. Elastin lieferten 0,1516 gr. $\text{BaSO}_4 = 0,276\%$ S. 12,0466 gr. Elastin lieferten 0,0045 gr. Asche = 0,0373%. 10,9520 gr. Elastin lieferten 0,0045 gr. Asche = 0,0410%, im Mittel 0,0392% Asche.

Aehnliche Zahlen für Stickstoff und Schwefel fanden die früheren Untersucher: Chittenden und Hart für das Elastin aus dem Lig. nuchae des Ochsen 16,85% N und 0,30% S, Schwarz⁴⁾ für das Elastin aus der Aorta des Rindes 16,67% N und 0,38% S, dagegen war der Aschegehalt in

1) Zeitschr. f. Biologie Bd. 25, S. 368.

2) Diese Zeitschr. Bd. 7, S. 257, u. Bd. 9, S. 289.

3) Ebenda Bd. 10, S. 29.

4) Ebenda Bd. 18, S. 487.

meinem Präparat offenbar in Folge einer gründlicheren Reinigung erheblich geringer, als in den früher dargestellten, denn Chittenden und Hart fanden 0,31 % Asche und Schwarz sogar 0,72 %.

Die Gährung ging in der von Hoppe-Seyler¹⁾ construirten Flasche unter Luftabschluss vor sich. Die Flasche entsprach völlig seinen Angaben, nur enthielt der verschliessende Gummistopfen noch eine zweite Durchbohrung, durch die ein bis auf den Boden der Flasche reichendes Glasrohr eintrat. In dieses Gährungsgefäss kamen 250 gr. Elastin und so viel Wasser (2200 ccm.), dass nur ein kleiner Luftraum übrig blieb. Nach gründlicher Sterilisation wurde mit einer Reinkultur von Rauschbrandbacillen geimpft, darauf zur vollständigen Verdrängung der atmosphärischen Luft durch das bis auf den Boden reichende Glasrohr reiner, nach der Vorschrift von Nencki²⁾ dargestellter Stickstoff eingeleitet, das Rohr zugeschmolzen und die Flasche in den Brütöfen gestellt. Die Gasentwicklung begann am 4. Tage und dauerte bis zum 44. Sobald ein mit Quecksilber gefülltes Absorptionsgefäss annähernd mit Gas erfüllt war, wurde es durch ein neues ersetzt, so dass von dem Gase nichts verloren ging. Die Gasentwicklung zeigte folgenden Gang:

vom 4. bis zum 10. Tage wurden geliefert 64,5 ccm.						} (auf 0° und 760 mm. Druck reducirt.)	
»	10.	»	»	»	»		60,76
»	15.	»	»	»	»		133,42
»	17.	»	»	»	»		325,85
»	20.	»	»	»	»		303,32
»	25.	»	»	»	»		298,62
»	32.	»	»	»	»		239,71
»	39.	»	»	»	»		249,48

Das Gas enthielt reichlich Kohlensäure, keinen Schwefelwasserstoff, roch deutlich nach faulem Kohl (Mercaptan), aber doch so schwach, dass die durch Aetzkali bedingte Volumverminderung ganz auf Kohlensäure bezogen werden konnte.

1) Diese Zeitschr. Bd. 11, S. 561.

2) L. c. S. 510.

Der Kohlensäuregehalt des Gases nahm mit fortschreitender Gährung zu, wie aus folgender Tabelle hervorgeht:

Fraction 1)	°o Gehalt an C.O ₂	Gehalt der entsprechenden Gesamtgasmenge an C.O ₂ in gr.
III	67,76	0,262
IV	90,46	0,640
VII	95,68	0,546
VIII	98,91	0,667
IX	99,15	0,578

Daneben enthält das Gas noch H und CH₄, wie die Analyse der Fraction IV zeigt:

CO ₂	90,46
H	4,74
CH ₄	2,37
N	2,43
	100,00

Zwei Tage nach dem Aufhören der Gasentwicklung wurde der Versuch unterbrochen. Ein grosser Theil des Elastin war ungelöst geblieben. Die Gährflüssigkeit enthielt die Rauschbrandbacillen in Reinkultur und reagirte alkalisch. Sie wurde mit Wasser verdünnt, mit 25 gr. Oxalsäure versetzt und der Destillation unterworfen. Es entwickelte sich ein starker Geruch nach faulem Kohl, beim Durchleiten des übergehenden Gases durch eine Cyanquecksilberlösung verschwand der Geruch und es entstand ein grüngrauer Niederschlag, auch gab das Destillat die Isatinschwefelsäurereaction²⁾, es handelte sich also um Mercaptan. Allmählich aber trat in der Cyanquecksilberlösung eine schwarze Abscheidung auf. Da zu befürchten war, dass unter dem Einfluss der Oxalsäure in der Wärme von Elastin Schwefelwasserstoff abgespalten wurde, unterbrach ich die Destillation, filtrirte von dem ungelösten Elastin ab und destillirte das Filtrat, bis die übergehende Flüssigkeit nicht mehr sauer reagirte. In der That zeigte sich, dass reines Elastin, mit Oxalsäure längere Zeit gekocht, Schwefel

1) Diese Fractionen entsprechen nicht genau den oben aufgeführten.

2) Arch. f. Hygiene, Bd. 19, S. 126.

als Schwefelwasserstoff, nicht als Mercaptan abgibt und der Schwefelgehalt nachweisbar heruntergeht (4,0540 gr. mit Oxalsäure gekochten Elastins lieferten 0,0622 gr. BaSO_4 , enthielten also nur 0,210% Schwefel). Hieraus und aus der Thatsache, dass die Gährungsgase keinen Schwefelwasserstoff enthielten, geht wohl mit Bestimmtheit hervor, dass bei der Gährung der Schwefel lediglich als Mercaptan und nicht als Schwefelwasserstoff abgespalten wird.

Die abfiltrirte Menge Elastin betrug 171 gr., es sind also 79 gr. in Lösung gegangen. Der ungelöste Theil stellte unverändertes Elastin dar (3,9779 gr. dieses Elastins lieferten 0,0780 gr. BaSO_4 , enthielten also 0,269% S).

Destillat.

Das saure Destillat, welches mehrere Liter betrug, war in zwei Fractionen aufgefangen, deren Untersuchung ich getrennt vornahm. Beide Fractionen wurden mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und zunächst destillirt, dann in Schalen bis auf 1600 ccm. bezw. 718 ccm. eingedampft. In den Destillaten liess sich weder Indol noch Skatol nachweisen. Erste Fraction. Ein Theil dieser Flüssigkeit wurde mit Schwefelsäure angesäuert, mit kohlensaurem Natron alkalisch gemacht und destillirt. Es war keine Spur von Phenol und Kresol nachzuweisen. Ein anderer Theil wurde zur Prüfung auf flüchtige Säuren benutzt. Weder durch den Geruch (nach dem Ansäuern) noch durch Reactionen liessen sich Ameisensäure, Essigsäure und Propionsäure nachweisen, auch nicht in den bei der Destillation zuletzt übergehenden Antheilen, wohl aber roch die angesäuerte Flüssigkeit deutlich nach Valeriansäure und noch stärker nach Buttersäure. In einer dritten Portion (110 ccm.) wurden nach Duclaux¹⁾ die flüchtigen Säuren quantitativ bestimmt. Es ist hier nicht der Ort, auf das Princip dieser Methode, ihre Ausführung und Berechnung einzugehen, es muss in dieser Beziehung auf die Arbeit von Duclaux ver-

¹⁾ Annales de l'institut Pasteur t. 9, p. 265.

wiesen werden. Hier sollen nur die analytischen Zahlen und die durch Berechnung gefundenen Werthe Platz finden.

Fraction	Zur Neutralisation nöthige Menge $\frac{1}{20}$ N. Natronlauge.	Anzahl der cem.	Zur Neutralisation nöthige Menge $\frac{1}{20}$ N. Natronlauge.	Verhältnisszahlen.	Für Butters.	Für Valerians.	Verhältniss von Butters. zu Valerians.
1	16,90ccm.	10	16,90ccm.	23,67	— 6,07	+ 6,83	0,89
2	13,60	20	30,50	42,70	— 9,10	+ 10,30	0,88
3	11,00	30	41,50	58,12	— 10,62	+ 11,38	0,93
4	8,65	40	50,25	70,38	— 10,38	+ 10,62	0,98
5	6,80	50	57,05	79,96	— 9,36	+ 8,54	1,096
6	5,25	60	62,30	87,25	— 7,75	— 6,25	1,24
7	3,60	70	65,90	92,29	— 5,79	— 4,21	(1,37)
8	2,60	80	68,50	95,93	— 3,43	(+ 2,37)	(1,44)
9	1,75	90	70,25	98,38	(— 1,38)	(— 1,12)	(1,23)
10	1,15	100	71,40	100,00	—	—	—

Mittelwerth 1,002

Auf 10,02 Buttersäure kommen also 10 Valeriansäure, in 110 cem. sind enthalten 0,1572 gr. Buttersäure und 0,1852 gr. Valeriansäure und in der ersten Fraction insgesamt 2,2866 gr. Buttersäure und 2,6938 gr. Valeriansäure.

Zweite Fraction. Sie zeigte dasselbe Verhalten. Die Bestimmung nach Duclaux ergab folgende Werthe:

Fraction	Zur Neutralisation nöthige Menge $\frac{1}{20}$ N. Natronlauge.	Anzahl der cem.	Zur Neutralisation nöthige Menge $\frac{1}{20}$ N. Natronlauge.	Verhältnisszahlen.	Für Butters.	Für Valerians.	Verhältniss von Butters. zu Valerians.
1	13,82ccm.	10	13,82ccm.	24,60	— 7,0	+ 5,9	1,18
2	10,40	20	24,22	43,17	— 9,57	— 9,8	0,96
3	8,73	30	32,95	58,71	— 11,21	+ 10,8	1,04
4	7,15	40	40,10	71,48	— 11,48	+ 9,5	1,20
5	5,40	50	45,50	81,10	— 10,5	— 7,4	(1,41)
6	4,05	60	49,55	88,32	— 8,8	— 5,2	(1,70)
7	2,80	70	52,35	93,33	— 6,8	— 3,2	(2,47)
8	1,85	80	54,20	96,61	— 4,1	— 1,7	(2,43)
9	1,10	90	55,30	98,59	— 1,5	+ 0,9	(1,74)
10	0,80	100	56,10	100,00	—	—	—

Mittelwerth 1,005

Auf 10,95 Buttersäure kommen also 10 Valeriansäure, in 110 ccm. sind enthalten 0,13062 gr. Buttersäure und 0,13497 gr. Valeriansäure, und in der zweiten Fraction insgesamt 0,9389 gr. Buttersäure und 0,9692 gr. Valeriansäure. Im Ganzen waren also 3,2255 gr. Buttersäure und 3,6630 gr. Valeriansäure gebildet. Die Mengen beider Säuren verhalten sich wie 100 zu 113,8; sie sind also im Verhältniss ihrer Molekulargewichte (100 zu 112) gebildet.

Die ungefähr 8% Lösung der Säuren zeigte keine Ablenkung der Polarisationssebene, es handelte sich also um die inactive Valeriansäure.

Rückstand.

Der nach Abdestilliren der flüchtigen Säuren hinterbliebene Rückstand wurde bis zur beginnenden Krystallisation eingedampft und mit Aether wiederholt extrahirt.

Aetherauszug. Der Aether hinterliess beim Verdunsten einen öligen Rückstand, welchen ich im Wasserdampfstrom destillirte. Das Destillat wurde mit kohlensaurem Natron neutralisirt, concentrirt, mit Phosphorsäure angesäuert und wieder mit Aether ausgeschüttelt. Der ölige, in Wasser unlösliche, in Alkohol lösliche Aetherrückstand wurde mit Zinkkarbonat gekocht. Beim Erkalten der vom überschüssigen Zink abfiltrirten Flüssigkeit schied sich ein in feinen Nadeln krystallisirendes Zinksalz ab, offenbar phenylpropionsaures Zink.¹⁾

Der bei der Destillation im Wasserdampfstrom hinterbleibende Rückstand enthält keine Skatolessigsäure, sämtliche Reactionen versagten, dagegen gab er ziemlich deutliche Rothfärbung mit Millon's Reagenz und mit salpetrigsaurem Kali. Es waren also aromatische Oxysäuren vorhanden, aber jedenfalls nur in sehr geringer Menge, denn es gelang nicht, die Säuren oder ihre Zinksalze krystallinisch zur Abscheidung zu bringen.

¹⁾ Durch einen unglücklichen Zufall ging die Gesamtmenge des Salzes dieser Säure, welche die Hauptmenge des Aetherextractes ausmachte, verloren, doch lässt das Verhalten der Säure und die Krystallisation des Zinksalzes wohl keinen Zweifel darüber, dass Phenylpropionsäure vorlag.

Andere Säuren enthielt der Aetherauszug nicht.

Der vom Aether nicht gelöste Theil wurde mittelst kohlsaurem Kalk von Oxalsäure befreit und nun destillirt, das Destillat in Normalschwefelsäure geleitet. Es gingen 4,077 gr. Ammoniak über. Der Destillationsrückstand krystallisirte beim Eindampfen zu einer krystallinischen Masse, die aus Drusen, Kugeln und Nadeln bestand.

Diese Untersuchung bedarf in mehrfacher Beziehung der Vervollständigung, an der mich äussere Umstände leider verhinderten, welche aber in kurzer Zeit nachfolgen soll. Speciell ist noch der Beweis zu erbringen, dass es sich in der That um Phenylpropionsäure handelt, ausserdem muss noch festgestellt werden, welche Bestandtheile der zuletzt erwähnte Destillationsrückstand enthält. Es soll dann auch auseinandergesetzt werden, worin sich die Zersetzung des Elastins durch anaerobe Bakterien von der entsprechenden des Eiweisses und des Leims unterscheidet und worin sie miteinander übereinstimmen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. H. Thierfelder für das vorgeschlagene Thema und die stetige Unterstützung meinen verbindlichsten Dank hier auszusprechen.