

Zur Chemie der Tuberkelbacillen.

I. Mittheilung.

Von

Dr. W. G. Ruppel.

Aus dem Privat-Institut des Prof. Dr. Behring für experimentelle Therapie zu Marburg.

(Der Redaction zugegangen am 30. September 1898.)

Die eingehenden Untersuchungen Kühne's¹⁾ über die Bestandtheile des Koch'schen Tuberkulins führten zu dem Resultat, dass die Culturflüssigkeiten durch das Wachstum der Tuberkelbacillen nur sehr unwesentliche Veränderungen erleiden. Eine geringe Zunahme an echtem, durch Ammonsulfat nicht aussalzbarem Pepton, sowie das Auftreten eines dem Tryptophan analogen Farbstoffes waren die einzigen Veränderungen, welche Kühne an den aus Pepton Witte, Fleischextract und Glycerin hergestellten Nährflüssigkeiten constatiren konnte. Die Akroalbumose, ein durch Essigsäure fällbares Propepton, wurde bei dieser Gelegenheit entdeckt, erwies sich jedoch nicht als ein von den Tuberkelbacillen abgesondertes, specifisches Stoffwechselprodukt, sondern ist gleichfalls in dem angewandten Pepton bereits vorhanden.

Die einzige stark hervortretende Veränderung der Culturflüssigkeiten nach etwa 4—5 wöchentlichem Wachstum der Tuberkelbacillen ist, neben der bereits erwähnten Bildung eines intensiven rothen Farbstoffes, das Auftreten eines charakteristischen Riechstoffes, über dessen Natur wir noch völlig im Unklaren sind.

¹⁾ W. Kühne, Zeitschr. f. Biol. N. F. Bd. 11. 1892. S. 24 u. Bd. 12. 1893. S. 221.

Bei Kühne's Versuchen, die specifisch wirksame Substanz des Koch'schen Tuberkulins in möglichst concentrirter Form zu gewinnen, erwies sich die bereits von Koch angewandte fractionirte Alkoholfällung als die verhältnissmässig geeignetste Methode. Hierbei wurde aus dem Tuberkulin ein Albumosengemisch erhalten, welches fast die gesammte wirksame Substanz enthielt und dessen Hauptbestandtheil «Deuteroalbumose» war. Die fractionirte Alkoholfällung des Koch'schen Tuberkulins ist übrigens ein Verfahren, dessen Ausführung, wie schon Kühne hervorhob, mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden ist. Die klebrige und harzige Beschaffenheit der Niederschläge, wozu der hohe Glyceringehalt der Lösungen noch sehr störend hinzukommt, erschwert die Verarbeitung der Fällungen sehr erheblich und führt häufig nicht geringe Verluste herbei.

Zur Bereitung des Koch'schen Tuberkulins wurde bekanntlich derart verfahren, dass die Culturflüssigkeiten in Gemeinschaft mit den Bacillen in Dampfapparaten unter gewöhnlichem Druck auf $\frac{1}{10}$ des Volumens eingeengt wurden. Erst nach dem Eindampfen wurde eine Trennung der Bacillenleiber von der Flüssigkeit durch Filtration vorgenommen. Der Zweck dieses Verfahrens war der, neben der Concentration der Flüssigkeiten eine gewisse Auslaugung der Bacillen herbeizuführen.

Da sich bei häufiger Wiederholung dieses Koch'schen Darstellungsverfahrens im hiesigen Institut herausgestellt hatte, dass die Tuberkelbacillen bei dieser Behandlungsweise eine bedeutende Herabsetzung ihrer Wirksamkeit erleiden, ein Verlust, welcher mit der verhältnissmässig geringen Zunahme des Tuberkulins an wirksamer Substanz in keinem befriedigenden Verhältniss steht, so nahmen wir von diesem Auslaugungsverfahren sehr bald Abstand und verarbeiteten Culturflüssigkeiten und Bacillen von nun an stets getrennt.

Die Filtration unserer Massenculturen (es kamen meistens 50 l. Nährbouillon nach 4wöchentlichem Wachstum der Bacillen auf einmal zur Verarbeitung) geschah durch Absaugen auf grossen Porcellannutschen, wobei es leicht gelingt, völlig klare Filtrate zu erhalten. Diese Filtrate wurden in Vacuum-Destillir-

apparaten bei Temperaturen von 30—40° C. bis auf $\frac{1}{20}$ ihres Volumens eingeengt.

Im Gegensatz zu den Bacillen (Tb.) pflegen wir die Filtrate resp. die eingeengten Flüssigkeiten mit der Bezeichnung Tub. F., Tuberkulose-Filtrat, zu benennen.

Um die wirksamen Bestandtheile des Tub. F. in feste Form überzuführen, kann man mit fast gleichem Erfolg für den Wirkungswerth der resultirenden Präparate zwei verschiedene Wege einschlagen. Erstens nämlich die fractionirte Alkoholfällung und zweitens die Alkoholfällung nach vorausgegangener mehrtägiger Dialyse.

Zur fractionirten Alkoholfällung versetzt man am zweckmässigsten die zu fällende Flüssigkeit sehr allmählich mit dem doppelten Volumen absoluten Alkohols. Der abgeschiedene Niederschlag setzt sich sehr rasch ab, wird durch Decantiren von der überstehenden Flüssigkeit getrennt, noch 3—4mal mit 66° oigem Alkohol, dem man zu je 1 l. 25 cem. gesättigte Kochsalzlösung hinzufügt, darauf mit absolutem Alkohol gewaschen, auf einer Nutsche vermittelt der Saugpumpe gesammelt und schliesslich im Vacuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet.

Die Ausbeute beträgt in diesem Falle 5 gr. aus einem Liter der ursprünglichen Bouillon.

Die so erhaltenen Präparate (Tub. F. Alkoh. 66° o) stellen körnige, nur wenig hygroskopische Pulver dar, welche in der fünffachen Menge Wasser leicht löslich sind.

Essigsäure erzeugt in der Lösung einen sehr geringen Niederschlag (Akroalbumose).

Kochsalz bringt in neutraler Lösung eine ziemlich beträchtliche Fällung von primären Albumosen hervor, im Filtrat dieser Fällung erzeugt Essigsäure nunmehr einen bedeutenderen Niederschlag, bestehend aus einem Gemisch von primären und Deuteroalbumosen. Die Hauptmenge der Substanz bleibt aber auch nach Kochsalz- und Essigsäurefällung in der Lösung zurück und kann nach Dialyse und Eindampfen durch Eintragen in Alkohol niedergeschlagen werden. Auf diesem letzteren Wege konnten aus 25 gr. der ursprünglichen durch

fractionirte Alkoholfällung erhaltenen Substanz nicht weniger als 18 gr. eines Körpers erhalten werden, dessen wässerige, neutrale Lösung beim Sättigen mit Kochsalz keinerlei Trübung erfuhr, welcher jedoch durch Ammonsulfat vollkommen aussalzbar war und somit als Deuteroalbumose angesprochen werden musste. Dies Präparat bestand demnach mindestens aus 64% Deuteroalbumose.

Zu anderen Präparaten gelangte ich, indem ich die im Vacuum eingeengten Nährflüssigkeiten einer viertägigen Dialyse gegen strömendes Wasser unterwarf. Nach dieser Zeit beobachtet man, dass sich die Schläuche mit einer ziemlich dicken Schicht einer schleimigen, in Wasser unlöslichen Substanz, der Heteroalbumose, überzogen haben. Ein Theil dieser Albumose befindet sich noch in der Flüssigkeit suspendirt und kann durch Centrifugiren leicht beseitigt werden. Nach dem Centrifugiren wird die Flüssigkeit im Vacuum bis auf $\frac{1}{20}$ ihres Volumens eingeengt und mit absolutem Alkohol, unter Zusatz geringer Mengen Kochsalz und nach vorausgegangenem schwachen Ansäuern mit Salzsäure, gefällt.

Auf diese Weise erhält man einen völlig farblosen, flockigen Niederschlag, dessen weitere Verarbeitung keinerlei Schwierigkeiten verursacht, da sowohl Heteroalbumose und Pepton, welche beide den Alkoholfällungen einen harzigen Charakter zu verleihen pflegen, wie auch das Glycerin durch die Dialyse entfernt sind.

Fast in allen Fällen betrug die Ausbeute nach der Dialyse etwa 4 gr. aus einem Liter der ursprünglichen Culturflüssigkeit. Seiner Zusammensetzung nach besteht dies Präparat, welches die Bezeichnung Tub. F. dialyst. erhielt, aus mindestens 60% Deuteroalbumose.

In allen Fällen war der Gehalt an sogenannter Akroalbumose Kühne's nur sehr gering und entsprach völlig der Substanzmenge, welche aus äquivalenten Quantitäten der Handelspräparate, Pepton Witte und Pepton Aschmann, durch Essigsäure niedergeschlagen wird. Auffallen muss es daher, dass das Koch'sche Tuberkulin diesen Körper in weit beträchtlicherer Menge enthält. Die Hauptmenge dieser Substanz

muss daher ihren Ursprung den Tuberkelbacillen selbst verdanken und muss beim Auskochen der Bacillen mit der glycerinhaltigen Bouillon extrahirt worden sein. Dass sich dies thatsächlich so verhält, geht mit Sicherheit aus dem Umstand hervor, dass die aus Koch'schem Tuberkulin durch Essigsäure abgeschiedenen Körper phosphorhaltig sind. Es sind dies offenbar Verbindungen, welche mit später zu beschreibenden Körpern, die beim Auskochen der Bacillen mit alkalischen Flüssigkeiten in Lösung gehen, identisch sind.

Es ist demnach noch nicht gelungen, ein typisches und spezifisches Stoffwechselprodukt der Tuberkelbacillen aus ihren Culturflüssigkeiten zu isoliren. Das Einzige, was aus den bisherigen Versuchen hervorgeht, ist die Thatsache, dass den Tuberkelbacillen ein tryptisches Verdauungsvermögen eigenthümlich ist, vermöge dessen sie Eiweisskörper bis zur Bildung von Pepton unter gleichzeitigem Auftreten des Tryptophans in alkalischer Lösung zu spalten im Stande sind.

Die Tuberkelbacillen selbst stellen nach dem Abfiltriren schneeweisse, caseinähnliche Massen dar, welche sich nach dem Auswaschen mit sterilisirtem Wasser im Vacuumexsiccator über Schwefelsäure zu einer schwach grau gefärbten, äusserst spröden Masse trocknen lassen.

Um die chemische Zusammensetzung der Tuberkelbacillen zu ergründen, habe ich eine grosse Zahl von Extractionsmitteln zur Anwendung gebracht.

Das Vorhandensein bedeutender Mengen von Substanzen, welche den Tuberkelbacillen durch Aether entzogen werden können, wurde bereits von R. Koch, Klebs¹⁾ und in letzter Zeit von Aronson²⁾ beobachtet.

Nach meinen Beobachtungen sind es drei Kategorien fettähnlicher Substanzen, zu welchen man durch successive Extraction mit kaltem Alkohol, heissem Alkohol und schliesslich mit Aether gelangt.

Kalter Alkohol extrahirt etwa 8⁰/₁₀₀ vom Gesamtgewichte der Bacillensubstanz und nimmt während der Extraction eine

¹⁾ Klebs, Centralblatt f. Bacteriol., B. 20, 1896, S. 499.

²⁾ Hans Aronson, Berl. klin. Wochenschr., B. 35, 1898, S. 484.

intensive Rothfärbung an. Diese Rothfärbung rührt offenbar von einem Farbstoffe her, welcher in den Bacillen nicht als solcher praexistirt, sondern hier in Form eines Chromogens enthalten ist, aus welchem erst der Alkohol, wahrscheinlich unter dem Einflusse des Sauerstoffs der Luft, den rothen Farbstoff bildet. Die Bildung dieses Farbstoffs kann man auch beobachten, wenn man mit Alkohol gewaschene Bacillen zum Trocknen der Luft exponirt. Die Oberfläche solcher, anfänglich völlig farbloser Bacillen überzieht sich dann schnell mit gelben bis rothen Farbentönen.

Das Alkoholextract zeigt nach dem Verdunsten des Alkohols eine schmierige Consistenz und enthält eine nicht unerhebliche Menge freier Fettsäuren.¹⁾ Hat man durch die übliche Methode, d. h. durch Behandeln der schmierigen Masse mit Sodalösung und Aether, die freien Fettsäuren entfernt, so erhält man nach dem Verdunsten des Aethers eine Fettmasse, deren Schmelzpunkt zwischen 55 und 60° liegt. Diese Fettmasse lässt sich leicht verseifen und liefert hierbei neben freien Fettsäuren einen in Aether löslichen Körper, welchen Aronson mit Recht als einen höheren Alkohol bezeichnet hat.

Heisser Alkohol extrahirt aus den mit Alkohol in der Kälte erschöpften Bacillen weitere Wachsmassen, welche sich beim Erkalten des Lösungsmittels als völlig farblose Körper ab scheiden. Der Schmelzpunkt derselben lässt sich nicht bestimmen, da er in zu weiten Grenzen liegt. Die Masse beginnt sich bei etwa 65° zu verflüssigen, ohne selbst beim Erhitzen auf 200°, ein völlig klares Aussehen zu erlangen. Diese durch heissen Alkohol extrahirten Verbindungen sind nur sehr schwierig zu verseifen, scheinen aber auch aus Fettsäureestern höherer Alkohole zu bestehen.

Das Aetherextract schliesslich liefert wiederum Substanzen, deren Schmelzpunkt bei 65—70° C. liegt und welche beim Erhitzen schon durch den Geruch ihren dem Bienenwachs ähnlichen Charakter zu erkennen geben.

Die Gesamtmenge der durch Alkohol und Aether ex-

¹⁾ Hans Aronson, l. c.

trahirten Substanzen ist je nach dem Alter der Culturen sehr bedeutenden Schwankungen unterworfen. Nach einer sehr grossen Anzahl von Versuchen betrug dieselbe im Minimum 8—10^o o, im Maximum 25—26^o o des Gesamtgewichtes der Bacillen.

Durch die Behandlung mit Alkohol und Aether erleiden die Tuberkelbacillen eine gewisse Veränderung, indem Substanzen, welche den intacten Bacillen leicht durch Extraction mit Wasser entzogen werden können, in schwer lösliche Modificationen übergehen.

Behandelt man intacte Tuberkelbacillen mit Wasser, oder auch mit verdünnten Alkalien, wie z. B. mit Sodalösung (1^o o), so erhält man fadenziehende, schlecht filtrirende Lösungen, welche am zweckmässigsten durch Centrifugiren von den Bacillen getrennt werden.

Weyl¹⁾ glaubte das Vorkommen mucinähnlicher Verbindungen in den Tuberkelbacillen constatirt zu haben. In Alkaliauszügen der Tuberkelbacillen erhielt er Fällungen mit verdünnter Essigsäure und schloss hieraus auf die Gegenwart eines Mucins, welchem er wegen der giftigen Wirkungen dieser Substanz die Bezeichnung «Toxomucin» beilegte. Gegen die Mucinnatur dieser Verbindung spricht der bereits von Weyl beobachtete Phosphorgehalt derselben, wodurch diese Substanz eher als ein Nucleoalbumin charakterisirt wird. Zweifellos handelt es sich in diesen Essigsäurefällungen um Gemenge verschiedener Substanzen, deren Isolirung, wie weiter unten gezeigt werden wird, erst in letzter Zeit gelungen ist.

Die durch Wasser oder verdünnte Alkalilösungen aus intacten Bacillen erhaltenen Extracte zeigen häufig die Eigenthümlichkeit, alkalische Kupferoxydlösungen zu reduciren, ein Reductionsvermögen, welches nach dem Erhitzen mit Säuren eine beträchtliche Zunahme erfährt. Die Essigsäurefällungen besitzen nach dem Spalten mit Salzsäure nur sehr geringe reducirende Eigenschaften. Die eigentliche mucinähnliche Substanz, welche den Lösungen ihre fadenziehende Eigenschaft

¹⁾ Weyl, D. medic. Wochenschr., 1891. S. 256.

und ihr Reductionsvermögen nach der Spaltung durch Säuren verleiht, ist nicht fällbar durch Essigsäure, wohl aber fällbar durch Essigsäure und Alkohol. Diese Substanz besitzt also Eigenschaften, welche mehr an das Pseudomucin der Ovarialcystome erinnern. Gegen eine Identität mit diesem Körper spricht freilich der Umstand, dass die aus den Tuberkelbacillen extrahirte Substanz keinerlei Eiweissreactionen liefert und durch die Fällung mit Alkohol in eine schwer lösliche Modification übergeführt wird.

Durch verdünnte Alkalien werden durchschnittlich 15% vom Gesamtgewichte exsiccatorrockener Bacillen extrahirt.

Um den physiologischen Wirkungswerth dieser Extracte bestimmen zu können, wurden die Lösungen zunächst mit Essigsäure neutralisirt, im Vacuum auf $\frac{1}{10}$ des Volumens eingengt, angesäuert und mit Alkohol gefällt, ohne dass die durch Essigsäure allein fällbare Substanz abgesondert wurde.

Die so erhaltenen festen Präparate bezeichneten wir mit «T. S.» (Tuberkelbacillen-Sodaextract).

Zu Produkten, welche mit den soeben beschriebenen fast identisch sind, gelangt man durch Extraction der Tuberkelbacillen mit Wasser oder besser mit Glycerinlösungen (2—5%) in der Siedehitze. Die hierbei erhaltenen Lösungen besitzen gleichfalls eine schleimige, fadenziehende Beschaffenheit und enthalten ebenfalls geringe Mengen durch verdünnte Essigsäure fällbarer Substanzen. Die festen Präparate, welche wir aus diesen Auszügen durch Alkoholfällung erhielten und welche wir mit «T. Gl.» (Tuberkelbacillen Glycerinextract) bezeichneten, waren ziemlich schwer löslich in Wasser und enthielten beträchtliche Mengen anorganischer Substanzen.

Die Extraction von Tuberkelbacillen mit Kochsalzlösungen der verschiedensten Concentration liefert ebenso wie die Einwirkung verdünnter Säuren in der Kälte nur sehr unbefriedigende Resultate, da in beiden Fällen nur äusserst geringe Substanzmengen in die Lösungsmittel übergehen.

Auffallend ist es, dass alle Lösungen, welche man durch die verschiedensten Extractionsmittel aus den Tuberkelbacillen erhält, nur sehr unbedeutende Eiweissreactionen liefern.

Lässt man Verdauungsflüssigkeiten, wie Pepsinchlorwasserstoffsäure oder auch Trypsin, in alkalischer Lösung auf die Bacillen einwirken, gleichgültig ob man vorher eine Extraction der Fette vorgenommen hat oder nicht, so gehen hierbei selbst bei sehr lange fortgesetzter Einwirkung der Fermente nur sehr unwesentliche Mengen der Eiweisssubstanzen der Bacillen in lösliche Modificationen über.

Günstiger gestaltet sich die Ausbeute an löslichen Eiweisskörpern, wenn man gespannte Wasserdämpfe auf gut entfettete Bacillen einwirken lässt.

Zu diesem Zwecke wurden die Bacillen zunächst mit 1^o oiger Sodalösung extrahirt oder auch mit Glycerinlösungen ausgekocht, mit Alkohol getrocknet, sehr gründlich entfettet, getrocknet und fein zerrieben. Die staubfeine Masse wurde dann mit der zehnfachen Menge einer 5^o oigen Glycerinlösung 1 $\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden im Autoclaven auf 150^o C. erhitzt. Darauf wurde die noch heisse Masse filtrirt. Das anfänglich klare Filtrat trübt sich beim Abkühlen und setzt bei längerem Stehen unlösliche Bodensätze ab, welche mittelst der Centrifuge leicht entfernt werden können.

Die Hauptmenge der bei diesem Verfahren in lösliche Form umgewandelten Substanz beträgt etwa 18—20% der Gesamtmenge der angewandten Bacillen und besteht ausschliesslich aus albumosenähnlichen Produkten, ganz analog den Atmidalbumosen Neumeister's.¹⁾ Die sich in unlöslicher Form abscheidenden Substanzen bilden nur äusserst geringe Mengen. Bemerkenswerth ist es, dass diese eigenartigen Körper, welche auf keinerlei Art wieder zur Lösung gebracht werden konnten, in mehreren Fällen die Hauptmenge der aus den Bacillen in Freiheit gesetzten wirksamen Substanz enthielten.

Das Gemisch der Atmidalbumosen bildet dunkel gefärbte Lösungen, welche durch Ammonsulfat, durch Kochsalz, namentlich bei Gegenwart von Salzsäure, durch Ferrocyanwasserstoffsäure und viele andere Fällungsmittel, am besten jedoch durch absoluten Alkohol nach Zusatz geringer Mengen Kochsalz und Salzsäure niedergeschlagen werden.

1) Neumeister, Zeitschr. f. Biol., N. F., Bd. VIII, S. 57.

Die Alkoholniederschläge bilden nach dem Trocknen schneeweisse, lockere Pulver, deren Menge 18—20^o/_o vom Gewicht der angewandten entfetteten Bacillen betrug. Wir legten diesen Präparaten die Bezeichnung T. D. bei, während wir die einmal unter erhöhtem Druck aus gelangten Bacillen mit Tb. R. (Restbacillen) bezeichneten.

Diese Tb. R. zeigten die Eigenthümlichkeit, dass sie, wengleich vor der Extraction unter Druck vollkommen mit Alkohol und Aether erschöpft, nunmehr wiederum erhebliche Mengen fettähnlicher Substanzen aufweisen. Thatsächlich kann man diesen Restbacillen durch Behandeln mit Alkohol und Aether noch 10—15^o/_o ihres Gewichtes entziehen.

Nach der Extraction der Tb. R. durch Alkohol und Aether konnte eine weitere Portion der Eiweisssubstanz der Bacillen durch nochmaliges Erhitzen im Autoclaven in lösliche Form übergeführt werden. Diese zweiten Auszüge verhielten sich den ersten ganz analog, nur dass die Menge der sich beim Abkühlen der Lösungen abscheidenden Substanz eine noch weit geringere war, als bei der ersten Extraction.

Durch diese zweite Operation konnten noch 6—8^o/_o der Restbacillen in lösliche Form übergeführt werden.

Nachstehend gebe ich eine tabellarische Uebersicht aller aus 50 l. Culturflüssigkeit gewonnenen Produkte:

50 l. Culturflüssigkeit ¹⁾	
50 l. Filtrat	255 gr. Tb. (Exsiccator trocken)
125 gr. Tub. F. Alkohol 66 ^o / _o aus 25 l. Culturflüssigkeit.	30 gr. T. S. aus 255 gr. Tb. (Exs. tr.)
85 gr. Tub. F. dialysat aus 25 l.	207 gr. Alkohol Tb. aus 225 gr. Tb.
	176 gr. Aetherentfettete Tb.
	35 gr. T. D. aus 176 gr. entfetteten Tb.
	130 gr. entfettete Tb. R.
	16 gr. T. D. I. aus 130 gr. Tb. R.
	110 gr. Tb. R. I. (mit Alkohol und Aether getrocknet).

1) Die Culturflüssigkeit enthielt im Liter: 10 gr. Fleischextract, 10 gr. Pepton, 20 gr. Glycerin, 5 gr. Kochsalz und 10 cem. Normal-Natronlauge.

Den Bacillen waren demnach im Ganzen 81 gr. Substanzen in löslicher Form entzogen worden, oder 31,7% ihres Trockengewichts. Durch Alkohol und Aether wurden 60 gr. fettähnliche Substanzen extrahirt, oder 23,5%. Durch alle Extractionen zusammen hatten demnach die Bacillen einen Gewichtsverlust von 55,2% erlitten.

Die völlig ausgelaugten Rückstände bilden graue Substanzmassen, welche durch den positiven Ausfall der Millon'schen Farbenreaction immer noch ihre Zugehörigkeit zu den Eiweissstoffen erkennen lassen. In concentrirter Salzsäure löst sich nach längerem Stehen ein grosser Theil dieser Massen auf. Kocht man diese Restbacillen mit concentrirter Salzsäure, so erhält man Lösungen, welche Kupferoxyd in alkalischer Lösung reduciren. Es scheint demnach ein grosser Theil der Eiweisskörper der Tuberkelbacillen aus Substanzen zu bestehen, welche der Klasse des Keratins oder Chitins nahe stehen. wenigstens würde hierin eine Erklärung für die grosse Widerstandsfähigkeit dieser Körper allen Lösungsmitteln gegenüber liegen.

Das chemische Studium der Tuberkelbacillen erlangte durch die letzten Veröffentlichungen R. Koch's¹⁾ eine wesentliche Förderung. Koch war es gelungen, die Tuberkelbacillen auf mechanischem Wege derartig zu zerkleinern, dass man in den zertrümmerten Massen mikroskopisch keine intacten Bacillen mehr zu unterscheiden vermag.

Die so zerkleinerten Bacillen verhalten sich hinsichtlich ihrer Löslichkeitsverhältnisse völlig verschieden von den intacten Bacillen.

Während es, wie wir gesehen haben, nur mit grossen Schwierigkeiten gelingt, wesentliche Mengen von der Leibes- substanz intacter Bacillen in lösliche Form überzuführen, geht von den zerkleinerten Bacillen fast die Hälfte ihres Gewichtes schon beim einfachen Zusammenreiben mit Wasser in Lösung.

Rührt man zerkleinerte Bacillen mit Wasser an, so liefern

1) R. Koch, Deutsche Medicin. Wochenschr. Bd. XXII, 1897.

sie leicht vollkommen gleichmässige, milchige Emulsionen. Centrifugirt man diese Emulsionen längere Zeit, so fallen die ausgelaugten Bacillen zu Boden, während sich oberhalb derselben eine völlig durchsichtige, schwach opalisirende, gelbliche Flüssigkeit absetzt.

Trocknet man die von der Flüssigkeit getrennten Bacillen nunmehr wiederum im Exsiccator, so zeigt es sich, dass sie annähernd die Hälfte ihres Gewichtes eingebüsst haben.

Von grossem Interesse musste es nunmehr sein, die so erhaltenen Lösungen auf ihre Bestandtheile hin zu untersuchen.

Die Reaction der Flüssigkeit ist meist sehr schwach alkalisch, öfter auch vollkommen neutral.

Die Lösung enthält keine coagulirbaren Eiweisskörper und liefert von allen Farbenreactionen der Proteine nur eine ziemlich deutliche Biuretreaction.

Die auffallendste Eigenschaft der Flüssigkeit ist die, gemine Eiweisskörper aus ihren Lösungen niederzuschlagen.

Liess schon diese oberflächliche Untersuchung vermuthen, dass es die dem Zellkern angehörigen Verbindungen sind, welche die Hauptbestandtheile dieser Extracte ausmachen, so wurde diese Voraussetzung durch die eingehendere Untersuchung vollauf bestätigt.

Essigsäure erzeugt in der Flüssigkeit eine beträchtliche Fällung, welche sich in einem Ueberschuss der Säure nicht wieder auflöst, wohl aber in verdünnten Alkalien löslich ist und aus diesen Lösungen durch Säuren von Neuem gefällt werden kann.

Diese durch Essigsäurefällung erhaltene Substanz enthält Phosphor und zwar nach einer annähernden Bestimmung über 4⁰/₀.

Die neue Verbindung liefert weder die Millon'sche noch die Xanthoproteinreaction. Eine Lösung der Substanz in Eisessig färbt sich beim Erwärmen mit Schwefelsäure nicht roth, dagegen ist die Biuretreaction positiv.

Um die chemische Natur dieses Körpers zu ergründen, schüttelte ich ca. 25 gr. der Substanz mit Schwefelsäure (1⁰/₀) sehr gründlich aus und erhielt Lösungen, welche auf Zusatz

von absolutem Alkohol einen völlig farblosen, flockigen Niederschlag abschieden. Nach dem Abfiltriren und Trocknen stellt der Niederschlag ein schneeweisses, lockeres Pulver dar, dessen Menge etwa 0,7 gr. betrug. Der Körper ist in warmem Wasser löslich und scheidet sich beim Abkühlen theilweise, auf Zusatz geringer Mengen Alkohols vollständig wieder ab.

In der warmen Lösung erzeugte Barytwasser einen weissen Niederschlag von Baryumsulfat. Wurde dieses durch Filtration entfernt und das Filtrat von Neuem mit Alkohol gefällt, so entstand ein Niederschlag, dessen wässerige Lösung alkalisch reagierte. Es lag also hier die freie Base des zunächst als Sulfat erhaltenen Körpers vor.

In der warmen, neutralen Lösung des Sulfats erzeugt Natriumpikrat einen Niederschlag, aus welchem sich das ursprüngliche Sulfat durch Zerlegen mit Schwefelsäure nach Entfernung der Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Aether zurückgewinnen lässt. Es ist dies letztere das Verfahren, welches A. Kossel¹⁾ zur Reindarstellung der Protamine angewandt hat.

Die auf diesem Wege gereinigte Substanz ist phosphorfrei. Ihre ammoniakalische Lösung fällt Lösungen genuiner Eiweisskörper und primärer Albumosen.

Eine Lösung der Substanz liefert von allen Farbenreactionen der Eiweissstoffe nur die Biuretreaction.

Es erfüllt somit diese neue Verbindung fast alle Bedingungen, welche A. Kossel²⁾ für die Protamine fordert. Sie wird erhalten als das Sulfat eines basischen Produktes. sie ist phosphorfrei, fällbar durch Natriumpikrat in neutraler Lösung, liefert von allen Farbenreactionen der Proteine nur die Biuretreaction und fällt Eiweisskörper in ammoniakalischer Lösung.

Ich habe denselben Körper nach demselben Darstellungsverfahren mit völlig analogen Eigenschaften seither wiederholt

1) A. Kossel, Ueber die Constitution der einfachsten Eiweissstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXV, 1898, S. 165.

2) A. Kossel l. c. S. 166.

von Neuem erhalten können und hoffe bald in der Lage zu sein, genaue analytische Angaben über die neue Verbindung veröffentlichen zu können.

Für dies neue Protamin möchte ich den Namen «Tuberkulosamin» vorschlagen.

Nach meinen bisherigen Untersuchungen ist das Tuberkulosamin in den Tuberkelbacillen an eine Nucleinsäure gebunden, da es mir gelang, aus den Rückständen der Muttersubstanz des Protamins nach dem Ausschütteln mit Schwefelsäure eine stark phosphorhaltige Säure zu isoliren, welche genuine Eiweisskörper zu fällen im Stande ist.

Das Vorhandensein dieser Nucleinsäure-Protaminverbindung in den Extractionsflüssigkeiten zertrümmerter Tuberkelbacillen erklärt noch nicht die auffallende Eigenschaft dieser Lösungen, genuine Eiweisskörper zu fällen. Diese Thatsache findet jedoch eine einfache Erklärung darin, dass sich neben diesem durch Essigsäure fällbaren Produkt freie Nucleinsäure in nicht unerheblicher Menge in den Extracten vorfindet.

Fällt man die Filtrate des Essigsäureniederschlages mit salzsäurehaltigem Alkohol, so erhält man typische Fällungen, welche alle Eigenschaften der Nucleinsäure besitzen.

Nach dem Abfiltriren und Auswaschen mit Alkohol und Aether bilden diese Niederschläge trockene Pulver, welche sich in Wasser, namentlich bei Gegenwart geringer Alkalimengen, leicht lösen. Diese Lösungen liefern keine Eiweissreactionen, erzeugen dagegen in Flüssigkeiten, welche genuine Eiweisskörper enthalten, kräftige Fällungen.

Eine auf dem beschriebenen Wege erhaltene Substanz enthielt 9,42% Phosphor.

Dieser neuen Verbindung, mit deren eingehenderem Studium ich augenblicklich beschäftigt bin, legte ich die Bezeichnung «Tuberkulinsäure» bei.

Durch das Vorhandensein der freien Nucleinsäure in den Wasserextracten zerkleinerter Tuberkelbacillen könnte die auffällige Thatsache, dass diese Wasserextracte keinerlei genuine Eiweisskörper enthalten, eine befriedigende Erklärung finden. Nimmt man an, dass von vornherein ein Ueberschuss freier

Nucleinsäure in die Lösung übergeht, so würde ein Theil dieser Säure mit gleichzeitig gelösten Albuminstoffen Verbindungen eingehen, welche in der annähernd neutral reagirenden Flüssigkeit unlöslich sind und mit den ausgelaugten Bacillencellulosen beim Centrifugiren zu Boden gerissen werden.

Für diese Annahme spricht der Umstand, dass man aus den ausgelaugten Bacillen in der That durch sehr verdünnte Alkalien Substanzen extrahiren kann, welche durch verdünnte Säuren fällbar sind und sich wie Nucleine verhalten.

Bei der Bearbeitung dieses für das Studium der Chemie des Zellkerns so überaus geeigneten Materials drängen sich noch eine grosse Anzahl wichtiger Fragen auf, deren Beantwortung ich für die nächste Zeit in Aussicht stelle.