

Ueber Eiweisspaltung durch Bacterien.

Von

Alonzo Englebert Taylor.

(Aus dem Hearst Laboratory of Pathology, University of California.)

Der Redaction zugegangen am 8. September 1902.)

In wie weit die Spaltung von Eiweisskörpern durch Bacterien den Spaltungen durch bekannte chemische Agentien, wie durch Mineralsäuren, und durch die Verdauungssäfte analog sind, ist nicht bekannt. Wir haben die Lösung dieser Frage unternommen und beabsichtigen, in einer Reihe von Versuchen die Wirkung von verschiedenen Bacterien auf verschiedene Eiweisskörper zu studiren. Ich berichte jetzt über zwei Versuche mit Casein.

Um eine genügende Ausbeute an den Endprodukten der Zersetzung zu erhalten, müssen die Versuche in grossem Maassstabe angestellt werden. Zu jedem Versuch wurden 500 g Casein benutzt (beste käufliche Sorte von Merck). Es wurde zweimal nach Hammarsten gereinigt und im Chloroformdampf getrocknet. Das Casein, das sich nach dieser Vorbereitung in jedem Falle als steril erwies, wurde in 10 l steriles Wasser eingetragen, 25 g Chlornatrium zugegeben und darauf 10 g Natriumcarbonat hinzugefügt. Ein Theil des Caseins ging in Lösung. Die Flüssigkeit wurde dann mit grossen Mengen Bacterien von Reinculturen auf nicht flüssigem Nährboden geimpft, wobei Sorge getragen wurde, dass die Bacterien in geeigneter Weise von ihrem Nährboden abgehoben wurden. Zu dem einen Versuche wurde *B. coli communis*, zu dem zweiten *Proteus vulgaris* benutzt. Für freien sterilen Luftzutritt wurde gesorgt. Die Temperatur wurde bei dem Versuch mit dem *Colonbacillus* auf 33°, bei dem *P. vulgaris* auf 27° gehalten.

Die Untersuchung nach Hexonbasen geschah nach den Methoden von Kossel und Kutscher; die Verarbeitung auf

Monamidosäuren wurde nach der Methode von E. Fischer durchgeführt.

Versuch mit dem *B. coli communis*.

Die Flüssigkeit trübte sich allmählich und wurde gelblich gefärbt. Im Laufe der Zeit wurde die Farbe immer dunkler, und am Ende war sie braun. Nach den ersten Wochen war ein Geruch nach altem Käse wahrnehmbar, Fäulnissgestank trat jedoch überhaupt nicht ein. Der Bodensatz von ungelöstem Casein wurde allmählich kleiner, und nach vier Monaten war er vollkommen in Lösung gegangen. Die Flüssigkeit war aber nicht klar, sondern durch eine feine Suspension getrübt. Nach fünf Monaten wurde der Versuch unterbrochen. Nachdem die Existenz einer Reincultur des Colonbacillus festgestellt war, wurde die Temperatur zwei Tage auf 65° gehalten und darnach die Flüssigkeit bei Zimmertemperatur eine Woche stehen gelassen.

Die klare Flüssigkeit wurde von dem Sediment, das grösstentheils aus Bakterien bestand, abgezogen. Das Sediment wurde viermal mit heissem Wasser ausgezogen, und die Auszüge der Hauptflüssigkeit hinzugefügt. Die Gesamtmenge der Flüssigkeit betrug 12 l. 5 l wurden auf Hoxonbasen untersucht, 5 l und das Endfiltrat nach der Basenuntersuchung (im Ganzen also 10 l entsprechend) auf Monamidosäuren verarbeitet.

Die Flüssigkeit war stark eiweisshaltig. Sie gab in der Kälte eine schwache, in der Hitze eine intensive Biuretreaction. Nur ein Theil des Eiweisses war coagulirbar. Durch Säuren wurde ein kleiner Theil des Eiweisses abgeschieden, offenbar Casein. Ein geringer Gehalt an primären Albumosen wurde mittelst der Kühne-Neumeister'schen Methoden nachgewiesen. In der völlig enteweissten Flüssigkeit (nach Fällung mit Phosphorwolframsäure) war weder die Biuretprobe noch die Millon'sche Reaction zu erzielen. Die anorganisch gebundene Phosphorsäure betrug (gewichtsanalytisch bestimmt) 7,28 g. auf das ganze Material bezogen. Da in dem ursprünglichen Casein etwa 9,6 g P_2O_5 vorhanden gewesen sein könnten,

darf man annehmen, dass circa 76% des P_2O_5 abgespalten worden ist, oder dass 76% des Caseins gespalten wurde. In der zur Verfügung stehenden Flüssigkeit wurde auf folgende Substanzen untersucht: Harnstoff (Moerner-Sjöquist), Harnsäure und Purinbasen (Silber- und Kupferfällung), durchaus mit negativem Erfolg. Ein Theil der Flüssigkeit wurde mit 10 Volumen Alkoholäther gefällt, am nächsten Tage filtrirt, das Filtrat spurenhafte angesäuert, Alkohol und Aether im Vacuum bei 40° abdestillirt und der Rückstand auf seine Reduktionskraft geprüft; weder Silberoxyd noch Fehling'sche Lösung wurden reducirt. Diese Resultate stehen im Einklang mit der herrschenden Anschauung, wonach Casein kein echtes Nuclein enthalten soll.

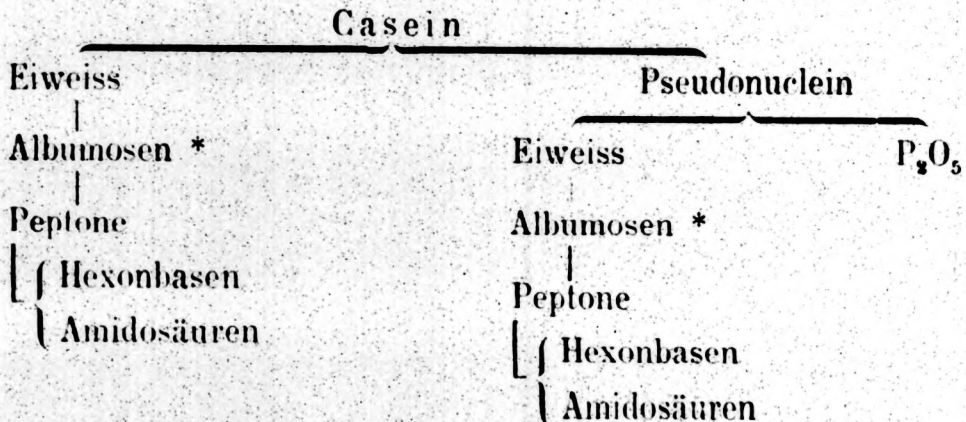
Bei der Untersuchung auf Hexonbasen wurde die Flüssigkeit aufgeköcht, mit Schwefelsäure schwach angesäuert und filtrirt. Nach Abkühlung auf 75° wurde dem Filtrat so lange Silbersulfat zugegeben, als in der sauren Flüssigkeit noch eine Fällung entstand. Dann wurde filtrirt und zu dem auf 40° abgekühlten Filtrat noch Silbersulfat zugegeben, bis die Barytprobe positiv ausfiel, worauf die Flüssigkeit mit Baryumhydrat gesättigt wurde; es entstand ein sehr kleiner Niederschlag. Niederschlag und Filtrat wurden dann vorschriftsmässig behandelt.

Aus der Histidinfraction erhielt ich am Ende eine nicht wägbare Menge. Aus den Arginin- und Lysinfraktionen wurde überhaupt gar nichts erhalten. Es entstand sofort die Frage, ob die Basen nicht trotz der Löslichkeit ihrer Silberverbindungen in Säure in den ersten Silberniederschlag, der offenbar im Wesentlichen aus Eiweissverbindungen bestand, hineingegangen sein könnten. Der Niederschlag wurde daher in Wasser gebracht, angesäuert, mit Schwefelwasserstoff entsilbert und das Filtrat zum Syrup eingedampft. Der Syrup wurde in 10 Theile Alkohol abs. gegossen und am nächsten Tage zur Trockene eingedampft, der Rückstand mehrmals mit saurem Wasser heiss ausgezogen, es ging aber nur ein Theil in Lösung. Die sauren wässerigen Auszüge wurden mit Silbersulfat versetzt; es entstand ein kleiner Niederschlag, der

abfiltrirt wurde. Im Filtrat wurde weiter nach Hexonbasen gefahndet, dieselben waren aber nicht nachzuweisen.

Bei der Verarbeitung der Flüssigkeit auf Monamidosäuren bin ich zu ähnlichen negativen Resultaten gelangt. Ich habe keine Spur von Estern erhalten. In dem Rest der Culturflüssigkeit suchte ich nach Tyrosin, aber wiederum vergeblich.

Nach den gegenwärtigen Anschauungen erfolgt die Spaltung von Casein etwa nach folgendem Schema:



Aus diesem Versuch kann man folgern, dass der *B. coli communis* eine Spaltung von Casein nur bis zu dem Stadium * zu Stande bringen kann, und auch das nur unvollkommen.

Versuch mit dem *Proteus vulgaris*.

Die Cultur des *Proteus vulgaris* zeigte von Anfang an ein anderes Verhalten. Bald nach der Impfung stellte sich Blasenbildung ein, die Flüssigkeit wurde dunkel und innerhalb weniger Wochen machte sich ein Fäulnissgestank bemerkbar. Im Anfang hatte der üble Geruch einen sauren Charakter, nach kurzer Zeit aber waren die Gerüche von Indol und Skatol sehr deutlich. In weniger als zwei Monaten war alles Casein in Lösung gegangen, nach drei Monaten wurde der Versuch unterbrochen, nachdem festgestellt worden war, dass aus der Flüssigkeit nur *P. vulgaris* zu züchten war. Die Flüssigkeit wurde aufgeköcht und heiss filtrirt. Beim Erkalten fiel kein Niederschlag aus. Die Reaction war alkalisch, die Farbe tief braun, die Flüssigkeit roch sehr stark nach Indol und Skatol, sowie nach Schwefelverbindungen. Die Biuretprobe fiel in der Kälte stark positiv aus, die Millon'sche Reaction war gleichfalls positiv. Von coagulirbarem Eiweiss (selbstverständlich

vor dem Aufkochen geprüft) war keine Spur vorhanden. Es konnte mit den Methoden von Kühne und Neumeister ein Gehalt an Albumosen nachgewiesen werden, und zwar Deuteroalbumosen. Es war ferner eine Substanz nachweisbar, welche der Fällung durch Sättigung mit Ammoniumsulfat bei neutraler, saurer und alkalischer Reaction entging, welche aber durch Alkohol und Gerbsäure gefällt werden konnte. Dieselbe gab, nachdem sie nach einer solchen Isolirung und Reinigung wieder in Lösung gebracht worden war, die Biuretreaction. Die Substanz ist also wahrscheinlich als echtes Pepton anzusehen.

Die eine Hälfte der Flüssigkeit wurde auf Hoxonbasen verarbeitet. Das Endfiltrat der Phosphorwolframsäure wurde von diesem Reagens befreit und mit der zweiten Hälfte (nach Entnahme von 1 l) vereinigt; die gesammte Menge sodann auf Monamidosauren untersucht.

Bei der Histidinfällung wurde eine kleine Menge Substanz erhalten, die, aus HCl-haltiger Lösung umkrystallisirt, 0,1236 g wog.

Da diese Menge so klein war, konnte von einer vollständigen Elementaranalyse kaum die Rede sein. Ich habe eine Chlorbestimmung nach Carius und eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ausgeführt.

0,0424 g gaben 0,0534 AgCl = 0,0132 Cl,
 0,0660 „ „ 0,0146 NH₃ = 0,0120 N.

Berechnet für	Gefunden:
C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ · 2HCl:	
Cl = 31,07 %	Cl = 31,13 %
N = 18,46 %	N = 18,18 %

Die Zahlen passen ziemlich gut auf Histidindichlorid. Es muss aber offen zugestanden werden, dass für eine strenge Beweisführung eine Elementaranalyse als unentbehrlich zu betrachten ist.

In der Fraction der Argininfällung wurde gar nichts erhalten.

Bei der Lysinfallung wurde ein kleiner Niederschlag mit Pikrinsäure erhalten. Das Salz wurde aus Wasser umkrystallisirt, in Wasser wieder gelöst und nach dem Ansäuern die

Pikrinsäure mit Aether extrahirt. Die wässrige Lösung wurde dann mit starker Salzsäure versetzt, eingedampft und in den Kühlschrank gestellt. Eine kleine Menge Krystalle schieden sich aus und wurden mit Hülfe von Alkohol und Aether umkrystallisirt. Die Menge wog nur 0,141 g. Ich habe wieder nur eine Chlor- und eine Stickstoffbestimmung ausgeführt.

0,0512 g gaben 0,0676 AgCl = 0,0167 Cl,

0,0704 „ „ 0,0109 NH₃ = 0,0089 N.

Berechnet für

C₆H₁₄H₂O₂ · 2 HCl:

Cl = 32,35 %

N = 12,81 %

Gefunden:

Cl = 32,61 %

N = 12,64 %

Die Substanz ist wohl Lysindichlorid. Leider musste die ausführliche Elementaranalyse auch hier ausbleiben.

Bei der Verarbeitung des Materials auf Monamidosäuren bekam ich etwas mehr als 6 g Rohester. Bei der fractionirten Destillation dieser Ester ging die ganze Menge sammt Apparat durch ein Versehen seitens des Dieners verloren. Der Versuch wird wiederholt.

Harnstoff, Harnsäure und Purinbasen waren nicht aufzufinden. Tyrosin konnte in unzweideutiger Weise nachgewiesen werden. Die Lösung zeigte, nach Fällung durch Alkoholäther, eine deutliche Reductionskraft.

Zusammenfassung der Resultate: Casein wird von dem *B. coli communis* nicht in tiefgreifender Weise gespalten, wohl aber wird es von dem *Proteus vulgaris* energisch gespalten und zersetzt; unter den Zersetzungsproducten finden sich mit grösster Wahrscheinlichkeit Histidin und Lysin. Weitere Versuche sind im Gange.