

Notizen über die chemische Zusammensetzung der Tuberkelbazillen.

Von
Theodor Panzer.

(Der Redaktion zugegangen am 12. April 1912.)

Im Anschlusse an meine Untersuchungen über die *Goussia gadi* (*Eimeria gadi*),¹⁾ ein zu den Coccidien gehöriges Protozoon, wollte ich zum Vergleiche die chemische Zusammensetzung einiger Bakterien heranziehen. Ich wählte zunächst den Tuberkelbacillus, weil mir dieser eben in entsprechender Menge zur Verfügung stand. Die Literatur weist zwar verhältnismäßig viele Untersuchungen über die Zusammensetzung des Tuberkelbacillus (Ruppel, Bendix, de Schweinitz und Dorset, Kresling, Auclair und Paris, Tontes, Aronson, Deycke u. a.) auf, doch entsprachen diese insofern nicht meinem Zwecke, als sie keinen Überblick über die Hauptbestandteile des Tuberkelbacillus gestatten. Von diesem letzteren Gesichtspunkte aus stellte ich daher folgende Untersuchung an.

Tuberkelbazillen, welche auf Glycerinbouillon gezüchtet waren,²⁾ wurden durch Kochen getötet, auf Filtern gesammelt, unter wiederholtem Verteilen in Wasser gründlich mit Wasser ausgewaschen und im Vakuum über Chlorcalcium getrocknet.

Das Gewicht der trockenen Bazillen betrug 2,7 g. Sie wurden fein zerrieben und nacheinander extrahiert:

1. mit Äther,
2. mit Alkohol,
3. mit Wasser,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 109.

²⁾ Ich verdanke das Material der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. J. Schnürer, Professor an der tierärztlichen Hochschule in Wien.

4. mit $\frac{1}{20}$ -n-Salzsäure,
5. mit $\frac{1}{20}$ -n-Sodalösung,
6. mit $\frac{1}{20}$ -n-Natronlauge,
7. mit heißem Wasser,
8. mit 2%iger Kalilauge.

Das Wasser (3), die Salzsäure (4), die Sodalösung (5), die Natronlauge (6) und die Kalilauge (8) hatten nur geringe Substanzmengen aufgenommen; das meiste ging in den Äther (1), den Alkohol (2) und das heiße Wasser (7), und außerdem blieb noch ein beträchtlicher Anteil der Bacillen bei der Behandlung mit den genannten Lösungsmitteln ungelöst.

Das Fett der Tuberkelbacillen ist insbesondere von K. J. Kresling¹⁾ und A. Fontes²⁾ eingehend untersucht worden; unter anderem haben sie nachgewiesen, daß das Fett der Tuberkelbazillen frei von Cholesterin ist, daß es aber einen anderen höheren Alkohol enthält.

Bei der mir zur Verfügung stehenden Fettmenge durfte ich nicht hoffen, meine Untersuchung auch nur halbwegs so eingehend gestalten zu können wie die genannten beiden Forscher; ich wollte jedoch das Material nicht ungenützt verwerfen und habe daher die Windaussche³⁾ Digitoninmethode darauf angewendet.

Da meine Digitoninvorräte aufgebraucht waren und Digitonin zurzeit im Handel nicht zu haben war, so habe ich mir Digitonin selbst aus Digitalisblättern dargestellt.

Gepulverte Digitalisblätter wurden mit 50%igem Alkohol ausgezogen. Diese Digitalistinktur wurde in Portionen von 1—2 l in heißem Zustande mit einer heißen Lösung von Cholesterin in 95%igem Alkohol vermischt. Beim Erkalten schied sich das ganze Cholesterin, zum Teile gebunden an Digitonin wieder aus. Die Fällung des Digitonins war allerdings nicht vollständig, indem in der von dem Niederschlage abgesaugten Mutterlauge sich noch Digitonin nachweisen ließ. Der Niederschlag wurde mit 95%igem Alkohol ausgekocht, wodurch die

¹⁾ Arch. des Sc. biolog. St. Pétersbourg, 9., 359.

²⁾ Zentralblatt f. Bakter. u. Parasitenkunde, I. Abt., B. 49, S. 317.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 65, S. 110.

Hauptmenge des freien Cholesterins wieder gelöst wurde. Diese Lösung konnte zur Fällung weiterer Portionen von Digitalistinktur verwendet werden.

Die gesammelten Niederschläge wurden andauernd mit siedendem Xylol extrahiert und das vom Xylol nicht gelöste Rohdigitonin weiter gereinigt.

Gewiß ist diese Methode der Gewinnung von Digitonin nicht gerade billig; doch kommt fast nur der Preis der Digitalisblätter und der großen Mengen Weingeistes in Betracht; denn das verwendete Xylol und das gesamte Cholesterin wird wieder zurückgewonnen, und zwar letzteres in leicht zu reinigendem Zustande. Ich veröffentliche dieses Verfahren, einerseits weil es eine neue Anwendungsform der Digitonin-Cholesterinfällung darstellt, andererseits weil es erlaubt, in einem physiologisch-chemischen Laboratorium, in welchem ja gewöhnlich einige Vorräte an Cholesterin zu finden sind, ohne diese zu schädigen, verhältnismäßig bequem ausreichende Mengen von Digitonin zu gewinnen, wenn solches anderwärts nicht zu bekommen ist. Kann man noch dazu etwa digitoninreiche Fabrikationsabfälle bekommen, dann würde natürlich ein solches Digitonin auch ganz erheblich billiger kommen.

Ich habe auch versucht, statt Cholesterin den wohlfeileren Amylalkohol zu verwenden, doch gab dieser offenbar wegen der großen Verdünnung in meinen Digitalisauszügen keinen Niederschlag.

Der im Soxhletschen Apparate aus den 2,7 g trockenen Tuberkelbacillen gewonnene Ätherauszug (1) wog in getrocknetem Zustande 0,2904 g, entsprechend 10,75%.

Dieses Fett wurde in Alkohol gelöst und die Lösung in üblicher Weise mit Digitonin gefällt,¹⁾ der getrocknete Niederschlag wog 0,0113 g. Das im Filtrate enthaltene Fett wurde in Benzol gelöst und mit Natrium und Alkohol verseift. Die Fettsäuren in Chloroform gelöst addieren Brom.

Der «unverseifbare Rückstand», das sind die höheren Alkohole, wurde in Alkohol gelöst und die Lösung wieder mit

¹⁾ Hier und im übrigen den Windausschen Vorschriften (l. c.) folgend.

Digitonin gefällt. Das Gewicht dieses Niederschlages betrug 0,0035 g.

Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade verdampft, der Abdampfrückstand mit Wasser und Petroläther aufgenommen; der durch wiederholtes Ausschütteln mit Wasser gereinigte Petroläther hinterließ beim Verdunsten einen farblosen, durchwegs aus oktaederähnlichen Krystallen bestehenden Rückstand. Diese Krystalle waren in Wasser unlöslich. Sie lösten sich in Alkohol auf; diese Lösung wurde nach Zusatz von Phenolphthalein und einer winzigen Menge von Lauge sofort rot, reagierte demnach nicht sauer. Die Krystalle gaben nicht die Liebermannsche Cholestolreaktion und gaben mit konzentrierter Schwefelsäure keine Rotfärbung.

Die beiden mit Digitonin erzeugten und gewogenen Niederschläge wurden anhaltend mit siedendem Xylol behandelt. Die beiden Xylollösungen hinterließen beim Verdunsten Rückstände, welche aus Alkohol umkrystallisiert wurden. Sie repräsentierten darnach nur zum Teile farblose Krystalle, zum anderen Teile eine gelbliche Schmiere. Diese Rückstände gaben die Cholestolreaktion nicht.

So wurde auch durch die Digitoninmethode zweifellos nachgewiesen, daß das Fett der Tuberkelbacillen kein Cholesterin enthält, wohl aber einen anderen höheren Alkohol, welcher mit Digitonin sich verbindet, und daß mindestens ein Teil dieses Alkohols in freiem Zustande, nicht als Ester, in dem Fett enthalten ist.

Im übrigen läßt der von mir erhobene Befund mehrfache Deutung zu, wobei insbesondere zu erwägen wäre, ob nicht mindestens zwei solcher höherer Alkohole im Fette der Tuberkelbacillen enthalten sind. Die Menge des Alkohols, welche durch Digitonin gefällt worden ist, ist übrigens nicht sehr groß; denn würde man annehmen, daß die Digitoninniederschläge aus Digitonincholesterid bestehen, und würde man deren Gewicht auf Cholesterin umrechnen, so würde die Menge des derart supponierten Cholesterins nur etwa 1 % des trockenen Fettes betragen.

Der alkoholische Auszug aus den Tuberkelbacillen (2) wurde verdampft, der Abdampfrückstand mit Wasser behandelt, worin

er sich bis auf ein wenig harzige Substanz auflöste. Diese Lösung reduzierte Fehlingsche Lösung und hinterließ beim Verdampfen einen bräunlichen, nur zum Teile krystallinischen Rückstand

Durch die Behandlung der Tuberkelbacillen mit heißem Wasser (7) wurde diesen eine Substanz entzogen, welche in trockenem Zustande eine dem arabischen Gummi ähnlich aussehende Masse repräsentierte. Diese Substanz löste sich in heißem Wasser leicht auf. Konzentrierte Lösungen gelatinierten beim Erkalten.

Die Substanz war frei von Stickstoff, Schwefel und Phosphor, sie zeigte auch nicht spurenweise die Farbenreaktionen der Eiweißstoffe, dagegen gab sie die Molische Reaktion mit α -Naphthol. Ihre wässrige Lösung wurde durch Alkohol oder durch Bleizuckerlösung gefällt und reduzierte Fehlingsche Lösung nicht. Wurde dagegen mit verdünnter Salzsäure gekocht, dann trat beim Behandeln mit Fehlingscher Lösung reichliche Reduktion ein.

Der ganze noch verfügbare Rest der Substanz wurde mit Salpetersäure oxydiert. Aus dem Reaktionsgemisch konnte keine Schleimsäure isoliert werden, dagegen bei entsprechender Behandlung eine kleine Menge von Krystallen, welche wie saures zuckersaures Kalium aussahen. Das Hauptprodukt der Reaktion war Oxalsäure.

Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich die gelatinierende Substanz als ein Pektin bezeichne, welches jedoch kein Galaktan ist.

Der in allen eingangs aufgezählten Lösungsmitteln ungelöst gebliebene Anteil der Tuberkelbacillen war, wie schon erwähnt, relativ beträchtlich. Er enthielt Stickstoff und zeigte sowohl die Biuretreaktion, als auch die Molische Reaktion mit α -Naphthol.

Ein Teil der Substanz wurde mit verdünnter Salzsäure mehrere Stunden im Wasserbade erhitzt; die Substanz wurde nur zum Teile gelöst, die Lösung reduzierte darnach Fehlingsche Lösung kräftig.

Ein anderer Teil der Substanz wurde der Verdauung mit Pepsin unterworfen. Nach 8 Tagen war die Substanz an-

scheinend noch unangegriffen geblieben, die filtrierte Flüssigkeit zeigte keine Biuretreaktion, dagegen gab die ungelöst gebliebene Substanz noch starke Biuretreaktion.

Der durch die eingangs aufgezählten Lösungsmittel nicht gelöste Anteil der Tuberkelbacillen besteht demnach aus einem Gemenge von einem recht resistenten Eiweißstoff und einem kohlenhydratähnlichen Stoffe.

Nach weiteren Versuchen, welche ich angestellt habe, die aber noch zu keinem ganz einwandfreien Resultate, insbesondere noch nicht zur Darstellung von reinem salzsauren Glukosamin geführt haben, die ich aber zu wiederholen und weiter auszubauen gedenke, sowie mir wieder Material zur Verfügung steht, und daher hier nicht näher beschreibe, möchte ich schon hier die Meinung äußern, daß diese kohlenhydratähnliche Substanz mit großer Wahrscheinlichkeit Chitin ist, analog dem Befunde Emmerlings¹⁾ bei Essigsäurebakterien und konform mit der von Helbing²⁾ auf anderen Wegen beim Tuberkelbacillus gewonnenen Vermutung.

¹⁾ Ber. d. dtsh. chem. Ges., Bd. 32, S. 541.

²⁾ Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. 18, S. 97.