

## Zur Chemie der Bakterien.

### I. Mitteilung.

Von

**Sakae Tamura** (Tokio).

(Aus dem hygienischen und dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 8. Juli 1913.)

Die Feststellung der chemischen Zusammensetzung der Bakterien ist zunächst vom speziell medizinischen Standpunkt wichtig, insofern sie uns eine Aufklärung bieten kann über die Beziehungen, in welche diese Organismen zum Leben der höheren organischen Wesen treten, insbesondere über die Lebensbedingungen und das Wachstum der Bakterien selbst, über die Natur der Gifte und der Immunstoffe, die sie erzeugen.

Andererseits ist die chemische Kenntnis der Bakterien aber auch ein wichtiges Kapitel der allgemeinen Physiologie. Eine Organismengruppe, welche in ihren physiologischen Funktionen von den übrigen lebenden Wesen so weit abweicht, verdient bei den Forschungen über das Wesen der Lebenserscheinungen ganz besondere Aufmerksamkeit. Sie verspricht neue Gesichtspunkte für die Auffassung der fundamentalen Lebensprozesse.

Auch die chemischen Untersuchungsmethoden müssen eigene Wege einschlagen, um die Natur der Bakterien zu ergründen. Die Methoden, welche zur Untersuchung anderer organischer Gewebe dienen, reichen in diesen Fällen nicht aus.

Besonders schwierig ist die Charakterisierung der Proteinstoffe, da diese sich den indifferenten Lösungsmitteln gegenüber als widerstandsfähig erweisen. Trotzdem ist es möglich, auf Grund der folgenden Betrachtungen einige wichtige Kenntnisse über die stickstoffhaltigen Bestandteile der Bakterien zu gewinnen. Die Proteinstoffe müssen als Aggregate derjenigen

Atomgruppen bezeichnet werden, welche im Stoffwechsel der lebenden Zelle die eigentlich tätigen Einheiten sind: der «Protoplasma-Bausteine». Die Biochemie der Zelle hat in erster Linie die Natur und wenn möglich auch die Mengenverhältnisse der Protoplasma-Bausteine aufzuklären; erst in zweiter Linie erhebt sich dann die Frage nach der Art der größeren Komplexe, welche aus diesen Bausteinen zusammengefügt sind, d. h. der Proteinstoffe, der Phosphatide usw. Während die letztere Frage im Bereich der Bakterienchemie für unsere heutigen Hilfsmittel noch wenig zugänglich ist, kann die erste ohne besondere Schwierigkeiten in Angriff genommen werden. Es gilt nur, die Bakterienmasse durch Hydrolyse zu zerlegen und aus dem Reaktionsprodukte die Bausteine zu isolieren.

Die folgenden Untersuchungen erweisen, daß auf diese Weise charakteristische Eigentümlichkeiten des Bakterienprotoplasmas aufgedeckt werden können, welche auch für die Systematik der Bakterien Beachtung verdienen.

Eine Voraussetzung für derartige Untersuchungen ist die Beschaffung des erforderlichen Materials, die eine besondere Technik erfordert. Auch wird man vielleicht die Möglichkeit zu berücksichtigen haben, daß in einzelnen Fällen die chemische Zusammensetzung der Bakterien von der Beschaffenheit der Nährflüssigkeit abhängig ist.

### Material.

Für die Untersuchungen dienten die beiden folgenden Bakterienarten:

1. *Bacillus tuberculosis* (Typus humanus).<sup>1)</sup>
2. *Mykobakterium lacticola perrugosum*.

Die Hauptschwierigkeit, die sich der chemischen Untersuchung des Bakterienkörpers in den Weg stellt, ist die Gewinnung ausreichender Mengen. Für die Tuberkelbacillen ermöglichte es die für die Herstellung des Tuberkulins von

<sup>1)</sup> Die Literatur über die chemische Zusammensetzung der Tuberkelbazillen siehe bei H. Kossel im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, herausgegeben von W. Kolle und A. von Wassermann, II. Auflage.



R. Koch angegebene Kultivierung auf Glycerinbouillon, die Bakterienmassen ganz rein ohne Beimengung von Nährboden und zwar in großen Mengen zu erhalten.

Die für die Kulturen verwandte Nährbouillon hatte folgende Zusammensetzung: Zu jedem Liter natursaurer Rindfleischbrühe (aus 500 g Fleisch) wurde nach dem Kochen und Filtrieren 5,0 Kochsalz, 10,0 Pepton Witte, 25,0 Glycerin zugesetzt.

Diese Rindfleischbouillon wurde in nicht zu hoher Schicht in Erlenmeyersche Kolben gefüllt (etwa 100 ccm in 300 ccm fassenden Kolben) und mit Tuberkelbacillen des Typus humanus geimpft. Die Kultivierung dauerte stets fünf Wochen. Die Temperatur der Thermostaten wurde auf 37,5—38° C. erhalten. Die Tuberkelbacillen bilden unter diesen Bedingungen eine an Dicke mehr und mehr zunehmende Oberflächenhaut von brüchiger Beschaffenheit, die sich über die ganze Oberfläche der Bouillon ausdehnt und an der Glaswand hinaufklettert. Mit zunehmender Ausdehnung faltet sich die Haut und ihre Oberfläche nimmt ein runzeliges Aussehen an. Zur Gewinnung des Materials von der Bouillon habe ich die lebenden Bakterien durch Filterpapier abfiltriert und mit Wasser gründlich ausgewaschen. Hiermit glaube ich verhindert zu haben, daß die wasserlöslichen Bestandteile der Tuberkelbacillen in Lösung gehen. Die ausgewaschenen Bakterien wurden im Trockenschrank unter allmählicher Steigerung der Temperatur bis auf 100° C. eine Stunde lang erhitzt und darauf bei 37° C. völlig getrocknet. Es ergab sich dabei eine gelblich braune spröde Masse, welche sich leicht pulverisieren ließ. Die getrockneten Bakterien haben noch den typischen aromatischen Geruch der frischen Tuberkelbacillenkultur und lassen sich in geschlossenen Gefäßen beliebig lange aufbewahren, ohne ranzigen Geruch anzunehmen.

Für *Mykobakt. lacticola* habe ich die gleiche Nährbouillon angewandt, die aber Glycerin nur zu 1,5% enthielt. Die Kultivierung dauerte fünf Tage bei der Temperatur von 36° C. Das Wachstum war sehr üppig und ähnlich dem der Tuberkelbacillen nach fünf Wochen langer Kultivierung bei 38° C. Sie bilden runzlige Häutchen von weniger brüchiger

Beschaffenheit, die an der Glaswand hinaufklettern. Nach der Filtration und Waschung habe ich die Bakterien direkt bei 37° C. trocknen gelassen, ohne Erhitzung auf 100° C.

Mit den oben angegebenen Methoden habe ich ca. 200 g Tuberkelbacillen und einige hundert Gramm Mykobakt. lact. in getrocknetem Zustand erhalten.

### Lipoide Stoffe.

Schon ältere Autoren haben den auffallend hohen Gehalt der Tuberkelbacillen an lipoiden Stoffen erkannt. Hammerschlag<sup>(1)</sup> gab, offenbar gestützt auf den Phosphorgehalt des Ätherextrakts, die Gegenwart von Lecithin an. Dieser Phosphorgehalt wurde dann später von Anderen, z. B. von Schweinitz und Dorset,<sup>(2)</sup> bestätigt. Einige Forscher schlossen aus ihren Untersuchungen auf die Gegenwart eines Esters, der aus einer höheren Fettsäure und einem Alkohol zusammengesetzt ist und als eine «wachsartige» Substanz bezeichnet worden ist (Aronson,<sup>(3)</sup> Bulloch und Macleod).<sup>(4)</sup> Es ist aber aus den bisherigen Angaben nicht ersichtlich, ob nicht neben den Estern auch höhere Alkohole in freiem, nicht verestertem Zustande vorkommen. Aus meinen Untersuchungen ergibt sich außerdem mit Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein eines oder vielleicht auch mehrerer Kohlenwasserstoffe, deren Untersuchung noch nicht beendet ist.

Der höhere Alkohol, welcher in freiem Zustand oder in esterartiger Bindung vorhanden ist, ist bisher nicht näher charakterisiert worden; auch die naheliegende Frage nach dem Vorkommen des Cholesterins ist nicht von allen Autoren in gleichem Sinne beantwortet worden. Einige Forscher, wie Hammerschlag, haben die Gegenwart dieses Körpers ganz geleugnet.

Die Untersuchung der lipoiden Stoffe wurde zunächst am Mykobakterium lacticola in folgender Weise vorgenommen:

100 g der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Bakterien wurden zuerst mit Äther («I») und sodann mit Alkohol («II») in der Wärme extrahiert.



Das ätherische Extrakt «I» wurde bei niederer Temperatur auf ein kleines Volumen eingedampft, filtriert und das Filtrat unter Umschütteln mit Aceton gefällt. Der Niederschlag «Ia» bildete eine gelblichweiße, zusammengeballte Masse, welche phosphorfrei war. Zur weiteren Reinigung wurde der Niederschlag in Äther gelöst und mit Alkohol gefällt. Es entstand ein weißer, pulveriger Niederschlag, welcher sich bei Färbungsversuchen (siehe unten) als säurefest erwies und einen Schmelzpunkt von 66—68° zeigte. Die weitere Untersuchung dieses Niederschlags siehe S. 98.

Das Alkoholextrakt «II» der mit Äther erschöpften Bakterien diente zur Darstellung der Phosphatide.

### Die Phosphatide der Bakterien.

Das Alkoholextrakt «II» aus den Kulturen von *Mykobakterium lacticola* wurde bei niederer Temperatur im Vakuum eingedunstet und die konzentrierte Lösung mit Äther versetzt. Es entstand ein Niederschlag, welcher abfiltriert wurde. Die ätherische Lösung wurde stark konzentriert und mit Aceton, solange Fällung eintrat, versetzt. Die Acetonfällung wurde wieder in Äther gelöst, der Äther aufs neue mit Aceton niedergeschlagen und diese Operation 2—3 mal wiederholt, bis sich der Acetonrückstand klar und vollständig in Äther löste. Die klare Ätherlösung wurde stark konzentriert und mit Alkohol versetzt. Die in Äther und Alkohol lösliche Fraktion wurde nach vorheriger Konzentration wieder mit Aceton gefällt. Schließlich blieb eine gelbbraune, klebrige Masse zurück, die in Alkohol und Äther vollständig löslich und durch Aceton fällbar war. Die in dieser Weise von Fett befreite Substanz enthielt die Hauptmenge der Phosphatide. Sie wog getrocknet 0,515 g und reduzierte Kupferlösung bei alkalischer Reaktion nicht.

Es ist beachtenswert, daß diese Phosphatide ätherlöslich sind und trotzdem nicht in das erste Ätherextrakt übergehen. Sie müssen also in den Zellen der Bakterien mit anderen Körpern verbunden vorkommen. Diese Verbindung wird nicht durch Äther, wohl aber durch Alkoholbehandlung gelöst. Ein solches Verhalten wurde von Hoppe-Seyler<sup>(5)</sup> zuerst beim

Lecithin des Eidotters bemerkt und von E. Schulze<sup>(6)</sup> zur Darstellung des Lecithins aus Pflanzensamen benutzt. Später machte Erlandsen<sup>(7)</sup> dieselbe Beobachtung bei dem Diaminophosphatid aus Muskelsubstanz.

Die Analyse des Bakterienphosphatides führte zu folgenden Ergebnissen.

1. 0,1240 g Substanz, nach Neumann auf Phosphor untersucht, verbrauchen 6,3 ccm  $n/2$ -Natronlauge, d. i. 2,80% P.
2. 0,2422 g Substanz, nach Kjeldahl auf Stickstoff untersucht, verbrauchen 4,5 ccm  $n/10$ -Schwefelsäure, d. i. 2,62% N.
3. 0,2263 g aus anderem Material dargestellte Substanz erforderten nach Neumann 11,5 ccm  $n/2$ -Natronlauge, d. i. 2,81% P.

In gleicher Weise wurden auch die Kulturen der Tuberkelbacillen verarbeitet. Das primäre Ätherextrakt I, welches einen eigentümlichen aromatischen Geruch besaß und tiefrot gefärbt war, wurde nach dem Eindampfen mit Aceton gefällt. Nach wiederholtem Lösen in Äther und Fällung mit Aceton wurde ebenso wie bei Mykobakterium lacticola die Abwesenheit von Phosphatiden in dieser Fraktion festgestellt. Wohl aber erhielt ich ein weißes Pulver, welches sich bei den Färbungsversuchen als «säurefest» erwies, dessen Schmelzpunkt aber, abweichend von dem oben beschriebenen, 46° C. war.

Das Alkoholextrakt II aus den Tuberkelbacillen, welches nach völliger Extraktion mit Äther erhalten war, wurde durch Vakuumdestillation eingengt, in Äther gelöst und mit Aceton gefällt. Nach mehrfacher Wiederholung dieser Operation erhielt ich eine gelbbraune, knetbare Masse, die in Äther und Alkohol völlig löslich war und aus einem Phosphatid bestand.

Die Analysen ergaben folgendes Resultat:

1. 0,1227 g Substanz, nach Neumann auf Phosphor untersucht, verbrauchen 6,6 ccm  $n/2$ -Natronlauge, d. i. 2,98% P.
2. 0,2080 g Substanz, nach Kjeldahl verascht, verbrauchen 4,0 ccm  $n/10$ -Schwefelsäure, d. i. 2,69% N.

Aus Mykobakterium lacticola		Aus Tuberkelbacillen
Darstellung A	Darstellung B	
P = 2,80	2,81	2,98
N = 2,62	—	2,69

Das Verhältnis P : N beträgt:

in Mykobakterium lacticola	1 : 2,06
in den Tuberkelbacillen	1 : 1,99.



Hiernach kann es keinem Zweifel unterliegen, daß das Phosphatid der beiden untersuchten Bakterienarten nicht, wie man bisher für die Tuberkelbacillen annahm, Lecithin ist, sondern daß hier ein Diaminomonophosphatid vorliegt.

Die Existenz von Körpern, die diesem Typus angehören, wurde zuerst von Thudichum<sup>(8)</sup> im Gehirn festgestellt. Später sind die Diaminomonophosphatide auch in anderen tierischen Organen gefunden worden, und einige von ihnen, z. B. ein Körper aus den Muskeln (Erlandsen,<sup>(9)</sup>) ein anderer aus Eigelb (Thierfelder und Stern<sup>(10)</sup>) sind auch genauer untersucht worden. Meine Untersuchungen beweisen, daß das Vorkommen der Diaminophosphatide nicht auf die höheren Organismen beschränkt ist.

Verschiedene Autoren haben die Anwesenheit von Lecithin in Bakterienarten behauptet, z. B. Stoklasa<sup>(11)</sup> in *Azotobact. chroc.*, Kresling<sup>(12)</sup> in Tuberkelbacillen, Nishimura<sup>(13)</sup> in der Trockensubstanz des Wasserbacillus.

Offenbar haben diese Autoren den Nachweis des Lecithins auf die Gegenwart ätherlöslicher Phosphorverbindungen gegründet. Meine Untersuchungen weisen von neuem darauf hin, daß diese Methode nicht ausreicht, um die Gegenwart des Lecithins festzustellen.

## I. Höhere Alkohole als Bestandteile der Bakterien.

### A. Allgemeines.

Die in dem Vorhergehenden beschriebenen Extraktionsmittel genügen, wie bereits frühere Autoren bemerkten, nicht, um alle lipoiden Stoffe aus den Bakterien zu entfernen. Ein Teil davon haftet sehr fest an den übrigen Zellbestandteilen und wird vielleicht durch physikalische Strukturverhältnisse, vielleicht auch durch chemische Bindungen vor der Lösung durch Alkohol und Äther geschützt.

R. Koch erleichterte bekanntlich die Einwirkung der Lösungsmittel auf die Tuberkelbazillen dadurch, daß er die Bakterienmasse aufs feinste zerrieb.

Ich habe ein anderes Verfahren angewandt, indem ich die Zerstörung der Struktur nicht auf mechanischem, sondern

auf chemischem Wege bewirkte. Es zeigte sich, daß durch diese Behandlung ein gewisser Anteil der Lipoide für die Alkohol- und Ätherextraktion zugänglich gemacht wird.

Diejenige Lipoids substanz, welche erst nach der vollständigen Hydrolyse der Bakterien substanz durch Alkohol und Äther extrahierbar ist, diente zur Gewinnung eines höheren Alkohols, welcher die Eigenschaft der «Säurefestigkeit», wie unten gezeigt werden soll, in ausgesprochenem Maße besitzt.

Das Verfahren gestaltete sich folgendermaßen: Etwa 100 g der getrockneten Bakterienmasse von *Mykobakterium lacticola* wurden mit Alkohol und Äther erschöpft und der unlösliche Rückstand mit einer Mischung von 2 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 1 Teil Wasser bei Zimmertemperatur im Mörser gut zerrieben. Die Struktur der Bakterien wird auf diese Weise zerstört, und es entsteht eine dick sirupöse, braune Masse. Diese Flüssigkeit wird in die vielfache Menge Wasser hineingegossen, dabei bildet sich ein weißer, flockiger Niederschlag, welcher die Proteinstoffe der Bakterien vollständig enthält. Dieser Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen bis zum Verschwinden der sauren Reaktion des Waschwassers und sodann im Vakuum getrocknet. Die getrocknete Masse gibt an Alkohol und Äther eine ziemlich große Menge lipoider Stoffe ab. Die Menge des auch jetzt in Alkohol und Äther unlöslichen Rückstandes betrug 41 g. Dieser Rückstand zeigte noch die als Säurefestigkeit bekannte Eigentümlichkeit. Wenn man nun diese Masse durch 14 stündiges Erhitzen mit 25%iger Schwefelsäure bis zum Verschwinden der Biuretreaktion kocht, so scheidet sich an der Oberfläche der Flüssigkeit eine ölige Masse ab, welche in der Kälte erstarrt. Durch Filtration wurde diese schwarz gefärbte Abscheidung von der Flüssigkeit getrennt und mit Äther extrahiert. Nach dem Verdunsten des Äthers blieb 7,5 g Substanz übrig, und diese enthält außer dem erwähnten höheren Alkohol Fettsäure und einen Kohlenwasserstoff.

In gleicher Weise wurden 70 g getrocknete Tuberkelbacillen verarbeitet.

Bei der chemischen Untersuchung der Tuberkelbacillen



hat man schon früher das Vorhandensein höherer Fettsäuren, höherer Alkohole und esterartiger Verbindungen beider festgestellt. Als Fettsäuren wurden Palmitinsäure, Arachinsäure und Laurinsäure von Schweinitz und Dorset<sup>(2)</sup> angeführt. Aronson<sup>(3)</sup> wies darauf hin, daß ein «mit Cholesterin nicht identischer höherer Alkohol» in einer esterartigen Verbindung enthalten sein soll. Über die Natur dieses Alkohols lagen aber bisher keine Angaben vor.

## B. Das «Mykol» ein höherer Alkohol aus Mykobacterium.

### 1. Mykol aus Mykobacterium lacticola.

Das nach der Hydrolyse der Bakterienmasse gewonnene Ätherextrakt wurde verdunstet, es hinterließ, wie schon oben angegeben (s. S. 92) 7,5 g Rückstand. Derselbe wurde in siedendem Alkohol gelöst, die Lösung auf Zimmertemperatur abgekühlt, wobei eine reichliche weiße Fällung eintrat. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus heißem Alkohol wurde ein ganz schneeweißes, bei 62° C. schmelzendes Pulver erhalten, dem noch eine geringe Menge freier Fettsäure und Kohlenwasserstoffe beigemischt waren. Um diese letzteren zu entfernen, wurde das Pulver mit einer eben hinreichenden Menge von Benzol in der Wärme gelöst. Beim Erkalten schied sich die Substanz als gallertartige Masse aus, welche abfiltriert und mit wenig Benzol gewaschen wurde. Nachdem alles anhaftende Benzol im Vakuum entfernt war, wiederholte ich das Umkrystallisieren aus heißem Alkohol, es schieden sich jetzt schneeweiße, ganz kleine Krystallwärtchen aus, deren Schmelzpunkt 66° C. war.

Diese Substanz hat sich als ein gut charakterisiertes chemisches Individuum erwiesen, ich schlage für sie den Namen «Mykol» vor.

*Freies Mykol.* Das Mykol zeigt die charakteristischen Eigenschaften der Säurefestigkeit in allerhöchstem Maße, es ist leicht löslich in Chloroform, Xylol, Toluol, Petroläther und Äther, etwas schwerer löslich in kaltem Alkohol, Methylalkohol

und Antiformin.<sup>1)</sup> Stickstoff, Phosphor und Schwefel waren nicht darin nachzuweisen und beim Erhitzen auf dem Platinblech verkohlte und verbrannte der Körper ohne Rückstand.

Die Analysen gaben folgende Zahlen.

0,1058 g Substanz gaben 0,3198 g CO<sub>2</sub> und 0,1252 g H<sub>2</sub>O

d. i. C = 82,43% und H = 13,23%.

0,1692 g Substanz gaben 0,5122 g CO<sub>2</sub> und 0,2047 g H<sub>2</sub>O

d. i. C = 82,56% und H = 13,53%.

Die aus dem Bromid berechnete Formel (siehe unten) C<sub>29</sub>H<sub>56</sub>O verlangt: C 82,75% und H 13,3%.

*Einwirkung des Broms.* Zur weiteren Feststellung der Formel untersuchte ich die Wirkung von Halogen. Läßt man zu einer Ätherlösung des getrockneten Mykols eine Lösung von Brom in Eisessig tropfen, so wird jeder einfallende Tropfen rasch entfärbt und gegen Ende der Reaktion wird ein farbloses fein krystallinisches Bromderivat ausgeschieden, welches nach wiederholter Umkrystallisation aus Alkohol den Schmelzpunkt 56° C. zeigt.

Bei der Analyse ergaben sich folgende Werte:

0,1394 g Substanz gaben 0,0526 g AgBr = 16,06% Br

0,1408 „ „ „ 0,0527 „ „ = 15,92% „

0,1230 „ „ „ 0,3138 „ CO<sub>2</sub> und 0,1240 g H<sub>2</sub>O.

Die Analysen stimmen mit der Formel C<sub>29</sub>H<sub>55</sub>OBr überein.

Gefunden:	Nach der Formel C <sub>29</sub> H <sub>55</sub> OBr berechnet:	Nach der Formel C <sub>29</sub> H <sub>57</sub> OBr berechnet:
C = 69,58%	69,74%	69,40%
H = 11,29%	11,02%	11,47%
Br = 15,99%	16,01%	15,94%

*Einwirkung von Jod.* In gleicher Weise wie das Brom wird auch das Jod vom Mykol aufgenommen. Die Jodzahl wurde nach der Methode von Hübl festgestellt und ergab 29,11, während aus der Formel C<sub>29</sub>H<sub>55</sub>OJ 30,20 zu berechnen ist. Das Chloroform, welches bei der Jodzählbestimmung angewandt war, wurde abgedampft, und zurückgebliebenes Jodmykol wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt war 58° C.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

<sup>1)</sup> Antiformin ist eine Mischung von 10%igem Eau de Javelle und 5–10%iger Kalilauge zu gleichen Teilen.



0,1766 g Substanz gaben 0,1630 g H<sub>2</sub>O und 0,4124 g CO<sub>2</sub>.

d. i. C = 63,68% und H = 10,32%.

Berechnet für C<sub>29</sub>H<sub>55</sub>OJ: C = 63,73% und H = 10,07%.

Das Mykol gibt keine der Farbenreaktionen des Cholesterins; auffallend ist das Verhalten gegenüber dem Brom. Das Cholesterin nimmt bekanntlich entsprechend der doppelten Bindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen zwei Bromatome auf, das Mykol hingegen liefert bei der Einwirkung des Broms ein Substitutionsprodukt mit nur einem Bromatom. Dies letzte Verhalten steht aber nicht ohne Analogie da, z. B. hat Liebermann<sup>(15)</sup> festgestellt, daß ein aus der Chinarinde erhaltener höherer Alkohol, das Cholestol, bei der gleichen Behandlung ein Substitutionsprodukt mit nur einem Bromatom bildet. Ebenso verhält sich das Lupeol, ein von E. Schulze und Likiernik<sup>(16)</sup> aus Lupinensamen isolierter Alkohol von der Formel C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O, welches unter der Wirkung des Broms in Chloroformlösung ein Produkt von der Zusammensetzung C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>OBr ergibt.

*Verhalten gegen alkoholische Kalilauge.* Zur weiteren Feststellung des Alkoholcharakters dieser Substanz untersuchte ich zuerst das Verhalten gegen alkoholische Kalilauge. Es ergab sich hieraus, daß es sich nicht etwa um einen Ester handeln kann, denn eine Verseifung trat nicht ein. Die Petrolätherlösung des Mykols wurde mit Verseifungslauge erwärmt und mit normaler Säure zurücktitriert. Aber wie lange man sie auch erwärmte, so ergab sich doch gar keine Verseifungszahl. Nach der Extraktion der mit Kalihydrat gekochten Substanz mit Petroläther, Fraktionierung mit Benzol und Krystallisation aus Alkohol erhielt ich das Mykol mit den gleichen Eigenschaften und dem gleichen Schmelzpunkt, wenn ich nicht zu lange Zeit mit Alkali erhitzt hatte, dabei scheint sich die Substanz langsam zu verändern, aber ohne verseift zu werden.

*Einwirkung von Essigsäureanhydrid.* Auch das Verhalten gegenüber dem Essigsäureanhydrid stimmte mit der Annahme, daß das Mykol die Eigenschaften eines Alkohols besitzt, überein. Zur Darstellung des Acetates wurde 0,2 g der entwässerten Substanz etwa eine Stunde mit Essigsäureanhydrid in einem Kolben mit Rückflußrohr in ganz schwachem

Sieden erhalten. Die Substanz mischt sich zunächst nicht mit Essigsäureanhydrid, aber löst sich beim Kochen allmählich auf und die Lösung erstarrt beim Erkalten. Nachdem alle Essigsäure gut entfernt worden war, wurde die acetylierte Substanz gewogen. Ihre Gewichtszunahme betrug 0,0228 (berechnet 0,0285). Bei der Verseifung des Acetates mit alkoholischer Kalilauge erhielt ich die Acetylverseifungszahl 75,67. Dieselbe ist niedriger, als der Formel  $C_{29}H_{56}O \cdot C_2H_3O$  entspricht (berechnet 121). Die Acetylierung war also vielleicht eine unvollständige.

*Mykolbenzoat.* Auch konnte ich Mykol in den Benzoesäureester überführen, indem ich dasselbe mit der vierfachen Menge Benzoesäureanhydrid im zugeschmolzenen Rohr längere Zeit auf  $200^{\circ} C$ . erhitze. Nach dem Erhitzen wurde der braungefärbte Inhalt nach den Angaben von E. Schulze zur Entfernung der überschüssigen Benzoesäure bei der analogen Darstellung des Cholesterylbenzoats behandelt und aus Alkohol umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt wurde zu  $57^{\circ} C$ . bestimmt.

Bei der Verbrennung gab der Ester folgende Zahlen:

0,1201 g Substanz gaben 0,3624 g  $CO_2$  und 0,1232 g  $H_2O$

d. i. C = 82,30% und H = 11,48%.

Berechnet für  $C_{29}H_{55}OC_7H_5O$ : C = 82,36% und H = 11,53%.

Man erhält diese Verbindung auch in glatter Weise, wenn man das getrocknete Mykol mit einem Überschuß von Benzoylchlorid im Reagenzglas auf ungefähr  $160^{\circ}$  im Ölbad erhitzt. Nach der Reaktion, die in wenigen Minuten vollendet ist, wäscht man das überschüssige Benzoylchlorid mit verdünntem Alkohol weg und krystallisiert aus dem heißen Alkohol um. Aus diesem Lösungsmittel scheidet sich das Mykolbenzoat als schneeweiße Substanz aus.

Die Analyse gab folgende Zahlen.

0,1316 g Substanz gaben 0,3995 g  $CO_2$  und 0,1374 g  $H_2O$

d. h. C = 82,75% und H = 11,68%.

*Molekulargewichtsbestimmung.* Aus dem oben angeführten Analysenresultat kann man schließen, daß das Mykol ein hochmolekularer Alkohol ist, der die Formel  $C_{29}H_{56}O$  hat.



Diese Formel steht auch in einer annähernden Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Siedepunktbestimmung.

0.4382 g Substanz in 25 cem Benzol ergaben  $0,15^{\circ} \Delta T.$ , deshalb  $M = 381,1$ .  
(Berechnet für  $C_{29}H_{56}O = 420,4$ .)

## 2. Mykol aus Tuberkelbacillen.

70 g Tuberkelbacillen wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren behandelt, sie wurden mit Alkohol und Äther erschöpft, dann mit der Schwefelsäuremischung zerrieben und mit Wasser versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, getrocknet, wieder mit Alkohol und Äther behandelt und 28 g davon hydrolysiert. Die unlöslichen Lipoide (6,0 g) wurden mit Äther extrahiert und dann aus Alkohol umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt des schneeweißen Niederschlags war am Anfang  $46^{\circ} C.$ , aber er stieg nach mehrmaligem Fraktionieren mit Benzol und Umkrystallisation aus heißem Alkohol bis auf  $66^{\circ} C.$  und blieb dann bei weiterer Umkrystallisation konstant.

Die Analyse ergab folgendes:

0,1515 g Substanz gaben 0,4581 g  $CO_2$  und 0,1840 g  $H_2O$   
d. i. C = 82,46% und H = 13,58%.

Ein Teil des Körpers wurde bromiert, der Bromgehalt des erhaltenen Produkts ergibt sich aus der folgenden Bestimmung:

0,1259 g Substanz gaben 0,0479 g  $BrAg = 16,19\% Br.$

Somit ergibt sich, daß auch die Tuberkelbacillen Mykol enthalten.

### Zusammenstellung der analytischen Ergebnisse.

	Mykol aus Tuberkelbacillen	Mykol aus Mykobakt. lacticola	Berechnet für $C_{29}H_{56}O$
C =	82,46	82,43 82,56	82,75
H =	13,58	13,23 13,53	13,3
	Brommykol aus Tuberkelbacillen	Brommykol aus Mykobakt. lacticola	Berechnet für $C_{29}H_{53}BrO$
Br =	16,19	16,06 15,92	16,01
C =	—	69,58	69,74
H =	—	11,29	11,02

		Jodmykol aus	Berechnet für
		Mykobakt. lacticola	$C_{29}H_{55}OJ$
Jodzahl	—	29,11	30,20
C =	—	63,68	63,73
H =	—	10,32	10,07
		Mykolbenzoat aus	Berechnet für
		Mykobakt. lacticola	$C_{29}H_{55}OC_7H_5O$
C =	—	82,30	82,36
H =	—	11,48	11,53

### 3. Ester des Mykols.

Ich habe bereits oben gesagt, daß aus dem primären Ätherextrakt (Extrakt «I», S. 88 und 89) eine gewisse Menge von säurefesten Substanzen durch Aceton ausgefällt wurde. Eine durch Aceton gefällte Substanz zeigte den Schmelzpunkt  $46^{\circ} C.$  bei Tuberkelbacillen und  $66^{\circ} C.$  bei Mykobakterium lacticola. Diese säurefesten Substanzen aus beiden Bakterien sind verseifbar und die Verseifungszahl der Substanz aus Mykobakterium lacticola ist 41,61.

Auch die Löslichkeit dieser Substanz ist eine andere, als die des Mykols, sie ist leichter löslich in kaltem Benzol, relativ schwerer löslich in Äther.

Unterwirft man nun aber diesen Körper der Verseifung durch alkoholische Kalilauge und schüttelt die Reaktionsflüssigkeit mit Petroläther aus, so erhält man aus dem Petroläther Mykol, welches nach der Reinigung mit Hilfe des oben beschriebenen Verfahrens mit Benzol und Umkrystallisieren aus Alkohol den Schmelzpunkt  $66^{\circ} C.$  zeigt. Das Mykol ist also mindestens teilweise in einer esterartigen Verbindung vorhanden. Außerdem sind aber noch andere Ester vorhanden, die ich bisher nicht genauer untersucht habe.

## II. Proteinstoffe.

Die Eiweißbestandteile der Tuberkelbacillen haben in den letzten Jahren dadurch ein erhöhtes Interesse gewonnen, daß viele Autoren (Hammerschlag,<sup>(1)</sup> Weyl,<sup>(17)</sup> Auclair und Paris,<sup>(18)</sup> Ruppel<sup>(19)</sup> usw.) gerade in ihnen spezifische



antigene Eigenschaften zu entdecken glaubten. Trotzdem ist die Natur des Eiweißes der Bakterien noch nicht aufgeklärt. Aus den vielen Arbeiten geht hervor, daß seine Reindarstellung nicht gut gelingt wegen des Widerstandes, den die fett- und wachsähnlichen Stoffe dem Eindringen eiweißlösender Flüssigkeiten entgegensetzen.

Wie ich mich durch eigenen Versuch überzeugte, gelang es weder durch Digerieren in der Kälte mit 1%iger  $H_2SO_4$ , noch durch verdünnte Kochsalzlösung und Wasser aus getrockneten Tuberkelbacillen irgend einen Eiweißkörper in Lösung zu bringen. Nur mit Alkali kann man etwas davon extrahieren, aber der größte Teil des Proteins blieb in den Bakterienleibern zurück.

Die Untersuchung des Tuberkelbacillus auf eiweißartige Stoffe wird wie schon eben erwähnt, sehr erleichtert durch die von R. Koch angewandte Methode der mechanischen Zerkleinerung. Nach Ruppel soll man aus den so zertrümmerten Bazillen durch Extraktion mit 1%iger Schwefelsäure eine chemisch charakterisierbare Substanz erhalten, die von ihm als «Tuberculosamin» bezeichnet wurde, sie soll nach Ruppel phosphorfrei und durch Natriumpikrat in neutraler Lösung fällbar sein und sie soll von allen Farbenreaktionen der Proteine nur die Biuretreaktion liefern und Eiweißkörper in alkalischer Lösung fällen. In bezug auf diese Reaktionen würde das Tuberkulosamin den Protaminen ähnlich sein.

### 1. Die Protein- und Nuclein-Bausteine der Tuberkelbacillen.

Ich habe 70 g gut getrocknete Tuberkelbacillen für folgende Untersuchungen verwandt. Die Bakterienmasse wurde zunächst im Extraktionsapparat während 24 Stunden mit Äther extrahiert und sodann durch Pressen möglichst von Äther befreit. Das entfettete trockene, feine Pulver wurde hierauf mit Alkohol unter Rückflußkühlung auf dem Wasserbad ausgekocht. Der überstehende tief braunrot gefärbte Alkohol wurde heiß durch ein Faltenfilter abgossen, der Rückstand neuerdings mit Alkohol ausgekocht und abfiltriert. Diese Operationen wurden

mehrmals wiederholt, bis der Alkohol nicht mehr gelblich war. Die entfettete Bacillusmasse wog 51 g. Sie enthielt aber, wie aus obiger Darstellung hervorgeht, noch große Mengen von Lipoiden. Durch schwache Säure waren keine Eiweißkörper daraus extrahierbar, sondern nur geringe Mengen reduzierender Substanzen und anorganischer Salze.

Die so vorbereitete Masse wurde nun mit der Mischung von 2 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und einem Teil Wasser zerrieben und mit Wasser verdünnt, bis der  $H_2SO_4$ -Gehalt 5% betrug. Der bei der Verdünnung mit Wasser entstandene flockige Niederschlag war amorph. Die Zerstörung des Bacillenleibes wurde dadurch in kurzer Zeit so vollständig bewirkt, daß man unter dem Mikroskop keine unveränderten Bakterien mehr sehen konnte. Die Flüssigkeit («A») wurde von diesem Niederschlag («B») abfiltriert. Die weitere Verarbeitung des Niederschlages B siehe S. 102.

*Das Filtrat A* war klar, gelblich und reduzierte Kupferlösung bei alkalischer Reaktion. Es zeigte weder Biuretreaktion noch Millonsche Reaktion. Es wurde mit Baryt neutralisiert und von dem ausgeschiedenen Baryumsulfatniederschlag abgesaugt und stark abgedampft. Diese konzentrierte Lösung zeigte folgende Reaktion: Natriumpikratlösung erzeugte bei neutraler Reaktion einen flockigen Niederschlag, mit ammoniakalischer Silberlösung entstand eine weiße Fällung in ammoniakalischer Lösung, mit Silbersulfat eine Fällung in schwach saurer Lösung und mit Phosphorwolframsäure ein reichlicher flockiger Niederschlag in 5%iger  $H_2SO_4$ -Lösung. Aber Eiweißfarbenreaktionen waren nicht nachweisbar.

Ließ schon diese oberflächliche Untersuchung vermuten, daß Nucleinbasen darin enthalten waren, deren Zersetzungsprodukte die Hauptbestandteile dieser Extrakte ausmachten. so wurde diese Voraussetzung durch die eingehendere Untersuchung vollauf bestätigt.

Um die reduzierende Substanz abzutrennen, habe ich die konzentrierte Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt, nachdem der Schwefelsäuregehalt auf 5% gebracht war. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit 5%iger  $H_2SO_4$  ausgewaschen,



dann mit überschüssigem Baryt zersetzt und filtriert. Das Filtrat wurde nach Entfernung des überschüssigen Baryts durch  $\text{CO}_2$  abgedampft und mit Schwefelsäure nochmals schwach angesäuert. Zu dieser sauren Flüssigkeit wurde Silbersulfatlösung vorsichtig hinzugefügt, bis eine Probe mit Barytwasser eine braune Fällung von Silberoxyd gab. Dieser Niederschlag der Silberverbindung wurde abfiltriert, ausgewaschen, mit verdünnter Schwefelsäure aufgeschlämmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat von Silbersulfid nebst Waschwasser wurde durch Aufkochen von  $\text{H}_2\text{S}$  befreit und mit Baryt bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Das Filtrat von Baryumsulfat wurde durch Einleiten der Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit, filtriert und eingeengt.

Diese neutrale, klare, farblose Flüssigkeit zeigt weder Guanin- noch Xanthinreaktionen, auch konnte durch Ammoniak keine Ausscheidung von Guanin erhalten werden. Auf Zusatz von Natriumpikrat lieferte die Lösung eine reichliche Ausscheidung von feinen nadelförmigen Krystallen, welche mit Hilfe einer Saugvorrichtung abfiltriert wurden. Der Schmelzpunkt dieses Pikrats liegt bei  $281^\circ \text{C}$ .

Das Pikrat wurde in schwacher Salpetersäure suspendiert, durch Ausschütteln mit Äther von der Pikrinsäure befreit und die Basen mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Der gut ausgewaschene Niederschlag diente zur Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl.

0,1509 g Substanz entsprach 31,2 ccm  $n_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4 = 28,97\%$  N.

Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_4\text{AgN}_5 = 28,45\%$  N.

Die Base ist somit Adenin.

Die vom Adeninpikrat abfiltrierte Flüssigkeit scheidet nach einigem Stehen einen flockigen Niederschlag aus, der seiner Krystallform nach dem Hypoxanthinpikrat entspricht. Die Menge war aber für eine sichere Feststellung nicht ausreichend.

Das Vorkommen des Nucleins ist für die verschiedenen Bakterien von vielen Autoren (Galeotti,<sup>(20)</sup> Levene,<sup>(21)</sup> Nishimura,<sup>(13)</sup> Velde,<sup>(34)</sup> Aronson,<sup>(3)</sup> usw.) festgestellt worden, und aus dem Tuberkelbacillus hat Ruppel eine Nuclein-

säure dargestellt, die einen hohen Phosphorgehalt besaß und imstande war, genuines Eiweiß zu fällen. Diese wurde von ihm «Tuberkulinsäure» genannt. Auch hat Bendix<sup>(22)</sup> durch kurzes Ausziehen mit verdünnter Natronlauge und Fällung mit Essigsäure aus Tuberkelbacillen ein Nucleinproteid dargestellt, welches stark phosphorhaltig war und starke Pentosereaktion gab.

Es ist anzunehmen, daß das von mir erhaltene Adenin und Hypoxanthin aus einer Nucleinsubstanz dieser Art hervorgegangen ist.

Jedoch habe ich mich vergebens bemüht, das von Ruppel angegebene «Tuberculosamin» aus den zertrümmerten Tuberkelbacillen durch verdünnte Schwefelsäure zu extrahieren. Wenn ich die Säuremischung (2 Teile  $H_2SO_4$  und 1 Teil  $H_2O$ ) auf die entfetteten Bacillenleiber über eine Stunde wirken ließ, sodaß die gebildete breiige Lösung stark dunkelbraun gefärbt wurde, so erhielt ich nach dem Abfiltrieren des mit Wasser gefällten flockigen Niederschlages ein Filtrat, welches die Biuretreaktion zeigte. Man darf wohl annehmen, daß in diesem Falle durch die lange Wirkung der Säuremischung eine Umwandlung bezw. eine partielle Hydrolyse des Bakterieneiweißes zu löslichem Eiweiß erfolgt. Niemals aber bin ich auf einen proteinartigen Körper gestoßen, der mit den aus Fischsperma gewonnenen Protaminen einige Ähnlichkeit gezeigt hätte.

Der durch Wasser gefällte Niederschlag «B» (S. 100) wurde nochmals einer gründlichen Extraktion mit Alkohol und Äther unterworfen, und im Exsikkator getrocknet. Die aus 70g Tuberkelbacillen erhaltene Menge betrug 29,2 g. Diese Masse bestand im wesentlichen aus Eiweiß, sie enthielt keine Kupfer reduzierenden Bestandteile und zeigte fast alle bekannten Eiweißreaktionen (Biuretreaktion, Xanthoproteinreaktion, Millonsche Reaktion, Tryptophanreaktion), nur die Schwefelbleireaktion war negativ. Sie enthielt 9,2% Stickstoff und 0,70% Phosphor und war unlöslich in schwacher Säure, verd. Kochsalzlösung und Wasser, löslich in Alkalien und konzentrierter Schwefelsäure.

Um einen Überblick über die Bausteine des Eiweißes zu gewinnen, führte ich die Hydrolyse dieser Tuberkelbacillenproteine aus. Ich erhitzte 28 g Substanz mit 25%iger Schwefel-



säure am Rückflußkühler 14 Stunden lang. Die Biuretreaktion war jetzt verschwunden. Nach dem Erkalten wurde das gebildete Melanin und die ungelösten Lipoide, die zusammen 6,0 g betragen, abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen.

Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und nach dem Verfahren von A. Kossel und F. Kutscher<sup>(23)</sup> unter Anwendung der im hiesigen physiologischen Institut gebräuchlichen Modifikationen (cf. Weiß<sup>(24)</sup>) verarbeitet. Die Schwefelsäure wurde gleichzeitig mit dem bei der Zersetzung gebildeten Huminstoff durch Baryt entfernt. Auch wurde eine Ammoniakbestimmung ausgeführt. Alle Zahlen sind aus den Tabellen I und II zu ersehen.

Die hellgelbe von Huminstoff und Ammoniak befreite Flüssigkeit wurde bei Gegenwart von Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure gefällt. Nach 24 Stunden wurde der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert und gut mit 5%iger  $H_2SO_4$  gewaschen. Das farblose Filtrat und Waschwasser ist als «Monoaminosäurefraktion» bezeichnet, der gelbliche Niederschlag als «Diaminosäurefraktion».

*Diaminosäurefraktion:* Der mittels Phosphorwolframsäure abgeschiedene Niederschlag wurde durch Baryt zersetzt. Die von dem Baryumniederschlag befreite Lösung wurde schwach mit Schwefelsäure angesäuert und mit etwas wässriger Silbersulfatlösung geprüft. Es bildete sich kein Niederschlag, also waren in dieser Fraktion Nucleinbasen nicht in erheblicher Menge vorhanden. Die schwachsaure Lösung wurde nun mit kochend heißer Silbersulfatlösung in geringem Überschuß versetzt. Zu der abgekühlten Flüssigkeit wurde gepulverter Ätzbaryt bis zur Sättigung zugefügt, wobei sich die Silbersalze des Histidins und Arginins ausschieden.

Zur Trennung von Arginin und Histidin wurde der Silberniederschlag in schwefelsäurehaltigem Wasser suspendiert und mit  $H_2S$  zersetzt, und der jetzt entstandene Niederschlag von  $Ag_2S$  und  $BaSO_4$  abgesaugt. Im Filtrat wurde durch Behandlung mit Baryumnitrat, Baryumcarbonat und Silbernitrat in der bekannten Weise Histidin abgeschieden und als Pikrolonat identifiziert. Das Histidinpikrolonat wog 0,3850 g.

Das Arginin wurde im Filtrat nach der Behandlung mit Baryt, Schwefelsäure und Schwefelwasserstoff in ähnlicher Weise in das Pikrolonat übergeführt. Die Menge des Arginin-pikrolonats betrug 1,3915 g.

Das Lysin wurde in Form seines Pikrates isoliert, das Lysinpikrat wog 0,52 g.

*Monoaminosäurefraktion*: Sie wurde durch Baryt von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure befreit und abgedampft. Der gesamte Stickstoff in der Lösung betrug 1,7087 g.

*Phenylalanin*. Sobald diese Lösung bis auf 50 ccm konzentriert war, schieden sich weiße seidglänzende nadelförmige Krystalle aus, die auf dem Filter gesammelt und getrocknet wurden. Die gesamte Menge der Krystalle betrug 2,2 g. Nach dem Umkrystallisieren war der Schmelzpunkt  $280^{\circ}$  C.

Die Stickstoffbestimmung ergab folgende Zahlen:

0,1544 g Substanz gaben 11,2 ccm N (765 mm,  $15^{\circ}$  C).  
Gefundener N = 8,55%. Berechnet für  $C_9H_{11}NO_2$  = 8,47%.

Diese Krystalle zeigten schwache Millonsche Reaktion, aber ihr Schmelzpunkt und ihr Stickstoffgehalt ergaben, daß sie aus Phenylalanin bestanden, dem Spuren von Tyrosin beigemischt waren. Letztere waren aber so gering, daß sie die Analyse und den Schmelzpunkt nicht merklich beeinflussten.

Die Menge des Phenylalanins ist auffallend hoch und es scheint hier der phenylalaninreichste von allen bisher bekannten Proteinstoffen vorzuliegen.

*Prolin*. Die von dem Phenylalanin abfiltrierte Lösung wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne abgedampft. Die zurückgebliebene freie Aminosäure wurde mit Äthylalkohol dreimal ausgekocht. Das Äthylalkoholextrakt wurde vorsichtig zu einer gelbweißen Masse abgedampft, diese wurde zur Reinigung wieder mit Äthylalkohol aufgenommen. Der von unlöslichen Substanzen getrennte Alkohol wurde nochmals abgedampft und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet. Sein Gewicht betrug 0,65 g.

Die Stickstoffbestimmung ergab folgende Zahl:

0,1523 g Substanz gaben 15,4 ccm N (767 mm,  $14^{\circ}$  C).  
Gefundener N = 12,0%. Berechnet als  $C_5H_9NO_2$  = 12,18%.



Die Formel stimmt also mit der des Prolins überein, auch die Löslichkeit weist auf diese Substanz hin. Der endgültige Beweis, daß hier Prolin vorliegt, wurde durch die Verwandlung in das Phenylhydantoin geliefert. Die Substanz wurde nach den Angaben von E. Fischer<sup>(25)</sup> mit Phenylisocyanat bei schwach alkalischer Reaktion geschüttelt und als Phenylisocyanatverbindung abgeschieden. Der Niederschlag wurde sodann unter Zusatz von 4%iger Salzsäurelösung längere Zeit erhitzt. Dabei schied sich das Hydantoin in schönen Nadeln ab, die nach dem Umkrystallisieren bei 143° C. schmolzen. E. Fischer gibt für l-Prolinphenylhydantoin 143° uncorr. an.

*Valin.* Der in Äthylalkohol unlösliche Teil wurde mit Methylalkohol extrahiert. Aus dieser Lösung schied sich beim Eindampfen eine Monoamidosäure ab, deren Gewicht 2,67 g betrug und die bei der Stickstoffbestimmung folgende Zahlen ergab:

0,1518 g Substanz gaben 14,6 ccm N (767 mm, 14° C.).  
Gefundener N = 11,42%. Berechnet als  $C_5H_{11}NO_2 = 11,96\%$ .

Diese Substanz ist wahrscheinlich Valin, der Versuch einer Überführung in Hydantoin mißlang.

## 2. Die Nuclein- und Proteinbausteine von *Mykobakterium lacticola.*

Die Kulturen von *Mykobakterium lacticola* habe ich dem gleichen Verfahren unterworfen.

Dazu habe ich 100 g getrocknete Bacillenmasse verwendet. Nach der Alkohol- und Ätherextraktion wog der Rückstand 85 g. Diese wurden in der Säuremischung zerrieben und mit Wasser gefällt. Der abfiltrierte Rückstand wog nach dem Erschöpfen mit Alkohol und Äther 41 g. In dem Filtrat, das ganz eiweißfrei war, wurde Adenin und Hypoxanthin nachgewiesen, aber kein Guanin und kein Xanthin. Die möglichst entfettete Eiweißmasse bildete eine braune Substanz und zeigte fast alle Eiweißreaktionen, jedoch war auch in diesem Falle die Schwefelbleireaktion negativ. Der Stickstoffgehalt betrug 8,2%.

Nach der Hydrolyse wurde das Arginin und Histidin in das Pikrolonat, das Lysin in das Pikrat übergeführt. Alle diese Substanzen wurden durch den Schmelzpunkt identifiziert.

Die Menge des Argininpikrolonats betrug 2,693 g.

Die des Histidinpikrolonats 0,295

Das Lysinpikrat wog 0,481

Aus der Monoaminosäurefraktion wurde Phenylalanin in einer Menge von 2,232 g krystallisiert gewonnen, auch dies Präparat gab nur schwache Millonsche Reaktion. Der Schmelzpunkt lag bei 281°. Die Stickstoffbestimmung ergab folgendes:

0,1278 g Substanz gaben 9,5 ccm N (760 mm, 18° C.).

N gefunden = 8,58%. Berechnet für  $C_9H_{11}NO_2 = 8,47\%$

Durch Alkoholextraktion wurde 2,02 g Prolin dargestellt, dasselbe ergab bei der Stickstoffbestimmung folgendes:

0,1638 g Substanz gaben 16,7 ccm N (766 mm, 14° C.).

N gefunden = 12,09%. Berechnet für  $C_5H_9NO_2 = 12,18\%$ .

Das Phenylhydantoin hatte aber in diesem Fall einen niedrigeren Schmelzpunkt als das oben beschriebene aus dem Tuberkelbacillus gewonnene Präparat, und zwar stimmt es mit dem des inaktiven Prolinphenylhydantoin überein: F. = 118°.

Valin wurde durch Methylalkohol extrahiert und wog nach der Reinigung 0,258 g. Die Stickstoffbestimmung ergab folgendes:

0,1530 g Substanz gaben 14,3 ccm N (765 mm, 14° C.).

Stickstoff gefunden = 11,08%. Berechnet für  $C_5H_{11}NO_2 = 11,04\%$ .

Die übrigen Monoaminosäuren waren an Menge sehr gering und wurden nicht untersucht.

Tabelle I.

	In 28 g Eiweiß des Tuberkel- bacillus	In 40 g Eiweiß des Myko- bakt. lact.	Prozent in Eiweiß	
			des Tuberkel- bacillus	des Myko- bakt. lact.
Arginin . . . . .	0,6049	1,1700	2,16	2,927
Histidin . . . . .	0,1426	0,1092	0,51	0,27
Lysin . . . . .	0,2057	0,1902	0,735	0,475
Ammoniak . . . . .	0,0272	0,0358	0,097	0,089
l-Phenylalanin . . . . .	2,2000	2,2320	7,85	5,58
l-Prolin . . . . .	0,6500	2,0200	2,32	5,05
Valin . . . . .	2,6700	0,2580	9,35	0,645

Arginin und Histidin wurde aus ihrem Pikrolonat berechnet; Lysin aus dem Pikrat.



Tabelle II.

	In 28 g Eiweiß des Tuberkel- bacillus	In 40 g Eiweiß des Myko- bakt. lact.	Berechnet in 100 g Eiweiß des		Berechnet in 100 g Stickstoff des	
	g	g	Tuberkel- bacillus g	Myko- bakt. lact. g	Tuberkel- bacillus g	Myko- bakt. lact. g
Gesamtstickstoff . . . . .	2,5640	3,2220	9,157	8,090	100,0	100,0
A. Basenstickstoff . . . . .	0,2963	0,4823	1,085	1,230	11,85	15,21
in Arginin . . . . .	0,1963	0,3780	0,70	0,946	7,64	11,69
in Histidin . . . . .	0,0392	0,0350	0,14	0,09	1,53	1,11
in Lysin . . . . .	0,0385	0,0398	0,137	0,10	1,49	1,23
in Ammoniak . . . . .	0,0224	0,0295	0,105	0,07	1,15	0,91
B. Monoaminosäure-N . . . . .	1,7087	2,1560	6,098	5,400	66,59	66,74
in l-Phenylalanin . . . . .	0,1881	0,1891	0,67	0,475	7,31	5,89
in l-Prolin . . . . .	0,0792	0,2466	0,28	0,62	3,09	7,66
in Valin . . . . .	0,2945	0,0284	1,05	0,07	11,50	0,91
andere Monoaminosäuren	1,1469	1,6925	4,09	4,25	44,98	52,34
C. N in unbekannter Form . . . . .	0,5590	0,5837	1,996	1,464	21,80	18,09
in Humin . . . . .	0,4050	0,4680	1,446	1,175	15,79	14,52
im Silberniederschlag . . . . .	0,0657	0,1040	0,23	0,260	2,56	3,21
in Filtrat des Lysinpirats	0,0873	0,01165	0,31	0,029	3,38	0,36

### III. Färberisches Verhalten des Mykol.

Die Gruppe der säurefesten Bakterien verdankt ihren Namen dem eigentümlichen Verhalten gegen Farbstoffe. Sie sind allgemein mit wässrigen Lösungen der Anilinfarben nicht oder nur schwer färbbar. R. Koch gelang bekanntlich die Entdeckung der Tuberkelbacillen dadurch, daß er Schnitte von tuberkulösen Gewebstücken mit einer Lösung von Methyleneblau in Wasser unter Zusatz von Kalilauge behandelte und sie darauf mit Bismarckbraun nachfärbte. Die Tuberkelbacillen erschienen nunmehr blau gefärbt, während die Kerne der Gewebszellen und die übrigen Bakterien die braune Farbe angenommen hatten. Ehrlich<sup>(27)</sup> fand dann, daß die mit Anilinfarben, die in Anilinwasser gelöst waren, gefärbten Tuberkelbacillen ihre Färbung behielten, wenn sie mit starker Salpetersäure behandelt wurden. Dieses Verhalten bezeichnet man als Säurefestigkeit. Später zeigte Koch,<sup>(26)</sup> daß die einmal gefärbten Tuberkelbacillen ihre

Farbe auch festhielten, wenn sie außer mit Säure auch noch mit Alkohol behandelt wurden. Den Tuberkelbacillen analog verhalten sich einige saprophytische Bakterien, unter ihnen das von mir untersuchte Mykobakterium lacticola perrugosum.

Ehrlich nahm zur Erklärung der Säurefestigkeit das Vorhandensein einer für Farbstoffe schwer zu durchdringenden Hülle an. Durch die Untersuchungen von Aronson ergab sich, daß in der Tuberkelbacillenzelle eine wachsartige Substanz enthalten ist, die sich bei der Färbung genau wie die Tuberkelbacillen verhält, d. h. durch Säurealkohol nicht entfärbt wird. Zu dem gleichen Resultat kamen nach ihm Bulloch und Macleod, die den Körper aus den Tuberkelbacillen in Form eines Alkohols isolierten.

Nachdem es mir gelungen war, das Mykol rein zu gewinnen, stellte ich Färberversuche an. Ich konnte zunächst feststellen, daß Mykol durch wässrige Methylenblaulösung nicht, wohl aber durch alkalische Methylenblaulösung gefärbt wurde. Ferner zeigte sich, daß mit Carbolfuchsin in der Wärme gefärbtes Mykol mit 3% Salzsäure enthaltendem Alkohol bis zu 24 Stunden behandelt werden konnte, ohne seine Farbe zu verlieren.

Die Prüfung der Säurefestigkeit habe ich in folgender Weise vorgenommen.

1. Ein Objektträger, der mit einer geringen Quantität Mykol in möglichst dünner Schicht bedeckt ist, wird mit Carbolfuchsin behandelt, hierauf über der Flamme erwärmt, bis gerade Wasserdampf bemerkbar wird. Bringt man nun den gefärbten Objektträger in 3%igen Salzsäurealkohol, so leistet er der Entfärbung großen Widerstand.

Um das Mykol so dünn und gleichmäßig wie möglich auf dem Deckglas zu verteilen, brachte ich ein kleines Stückchen der Substanz mit einem Tropfen Äther auf dem Deckglas in Lösung und verteilte es durch Bedecken mit einem zweiten Gläschen. Nach dem Abziehen dieses zweiten Gläschens ließ ich die gewonnenen Präparate lufttrocken werden.

2. Ein Stückchen Mykol wurde im Reagenzglas mit Carbolfuchsinlösung in der Wärme gefärbt und kalt filtriert, der ge-



färbte Rückstand wurde mit 3%igem Salzsäurealkohol, welcher mehrmals erneuert wurde, ausgekocht. Es zeigte sich starke Resistenz.

Wenn man gefärbtes Mykol in einem Reagenzglas wiederholt mit jedesmal erneuertem Säurealkohol erwärmt, so leistet es der Entfärbung einen starken Widerstand und wird erst nach 7—8maliger Erneuerung des Säurealkohols farblos.

Um festzustellen, ob das Fuchsin mit dem Mykol eine chemische Verbindung eingeht, habe ich die Gewichtszunahme der Substanz nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Farbstoffs bestimmt. 0,2922 g Mykol wurden mit 5%iger Fuchsinlösung gefärbt und 0,3055 g tiefrot gefärbte Substanz gewonnen: Gewichtszunahme = 0,0178 g : 6,09%. Ferner wurden 0,2341 g Substanz mit 8%iger Fuchsinlösung gefärbt und 0,2537 g gefärbte Substanz erhalten: Gewichtszunahme = 0,0196 : 8,37%.

Die Farbstoffaufnahme des Mykols ist also abhängig von der Konzentration der Farblösung und es läßt sich kein Molekularverhältnis zwischen beiden Substanzen ermitteln. Dadurch ist freilich die Frage noch nicht entschieden, ob es sich um eine chemische Verbindung, um eine physikalische Adsorption oder eine feste Lösung handelt.

Eine zweite Färbereaktion, die der Tuberkelbacillus mit vielen anderen Bakterien gemeinsam hat, ist die Färbbarkeit nach Gram.<sup>(28)</sup> Bekanntlich folgt bei der Gramschen Färbung auf die Behandlung mit Anilinwassergentianaviolett eine Behandlung mit Jodjodkalilösung und dann differenziert man in absolutem Alkohol oder Acetonalkohol. Färbt man Deckglaspräparate, die in der oben geschilderten Weise möglichst dünn mit Mykol oder Mykolester bedeckt sind, 24 Stunden mit Anilinwassergentianaviolett und bringt sie einige Minuten in frische Jodjodkalilösung, so wird das Präparat tief schwarzviolett und entfärbt sich sehr schwer in absolutem Alkohol oder Acetonalkohol. Nach 8stündigem Differenzieren in absolutem Alkohol bei 37° C. kann man noch deutlich einen blauen Farbton sehen. Das Kontrollpräparat, das ohne vorhergegangene Jodierung in die Entfärbungsflüssigkeit gebracht wurde, nimmt einen mehr

violetten Farbton an und entfärbt sich schon in 8 Stunden vollkommen. Im Acetonalkohol geht die Entfärbung noch schneller, sogar bei Zimmertemperatur vor sich; nach einer halben Stunde kann man schon einen deutlichen Unterschied zwischen dem jodierten und dem nicht jodierten Präparat finden. Dieses Verhalten des Mykols wirft ein interessantes Licht auf das Zustandekommen der Gramschen Färbung bei den Bakterien.

Bekanntlich unterscheidet man grampositive und gramnegative Bakterien, je nachdem sie bei der Gramschen Färbung den jodierten Farbstoff nach der Behandlung mit Alkohol oder Acetonalkohol festhalten oder nicht. In einer bemerkenswerten Arbeit hat Brudny<sup>(29)</sup> in jüngster Zeit als Grund für diese Erscheinung die verschiedene osmotische Permeabilität der Bakterien angeführt. Grampositive Bakterien sind fast ausnahmslos permeabel, gramnegative impermeabel. In die ersteren dringt das Jod widerstandslos ein, und ihre Verbindung mit Pararosanilin wird von ihnen festgehalten. Bei den gramnegativen dringt das Jod nicht oder nur spurenweise ein. Die Färbung bleibt eine oberflächliche und widersteht der Alkoholauswaschung nicht. Alle Faktoren, welche das Eindringen des Jods begünstigen, steigern nach Brudny die Gramfestigkeit. Den Grund für die differente Permeabilität verschiedener Bakterien sieht Brudny vor allem in den osmotischen Eigenschaften des Plasmas, wenn er auch Permeabilitätsdifferenzen einer Membran nicht ganz ausschließt. Eisenberg<sup>(30)</sup> glaubte dagegen, daß gerade die Beschaffenheit dieser Membran in den Vordergrund zu stellen ist. Für die Beurteilung dieser Anschauungen ist es nun wichtig, daß das Mykol, also eine von dem Plasma und der Membran der Tuberkelbazillen vollständig getrennte Substanz, bei der Gramschen Färbung ganz und gar das gleiche Verhältnis zeigte, wie die Bakterienkörper selbst.

Für die säurefesten Bakterienarten ist deswegen die Annahme einer Membran nicht nötig, um ihre Grampositivität zu erklären.

Für die Zwecke des Tuberkelbacillennachweises wurde die Gramsche Methode in neuerer Zeit von H. Much<sup>(31)</sup> folgendermaßen modifiziert. 1. Färben unter Aufkochen oder



24 Stunden bei 37° C. in folgender Flüssigkeit: 10 ccm konzentrierte alkoholische Lösung von Methylviolett B. N. in 100 ccm 2%iger wässriger Carbolsäurelösung (filtrieren). 2. Lugolsche Lösung 1—5 Minuten. 3. 5%ige Salpetersäure 1 Minute. 4. 3%ige Salzsäure (10 Sekunde). 5. Differenzieren in Aceton-Alkohol ana.

Mykol ist auch bei der Muchschen Methode färbbar, und verhält sich ganz wie die Tuberkelbacillenkörper selbst. Nach halbstündigem Differenzieren in Acetonalkohol hat das gefärbte Ausstrichpräparat noch einen deutlich blauschwarzen Farbton, während das nicht jodierte Kontrollpräparat entfärbt ist. (Siehe Tabelle III.)

Schon H. Kossel hat die Vermutung ausgesprochen, daß die Eiweißnatur der grampositiven Substanz der Tuberkelbazillen zweifelhaft ist und vielmehr manches dafür spricht, daß sie zu den fettähnlichen Bestandteilen des Bakterienleibes gehört.

Nachdem schon Ziehl beobachtet hatte, daß die mit Carbofuchsin gefärbten Tuberkelbacillen nicht nur gegen Säure, sondern auch gegen Alkali widerstandsfähig sind, hat Gasis in neuerer Zeit die Alkalifestigkeit zu ihrer Unterscheidung von nahestehenden Bakterien benutzt. Die Gasis-Färbung ist von Telemann<sup>(33)</sup> dahin abgeändert worden, daß mit Carbofuchsin gefärbt und mit einem Alkali-Alkoholgemisch (ein Teil 30% Kali, drei Teile 60% Alkohol) entfärbt wird. Mykol ist auch alkalifest nach der Telemannschen Methode.

Aus den Färbungsversuchen geht hervor, daß das Mykol, das aus säurefesten Bakterien isoliert wurde, der wesentliche Bestandteil für die spezifische Färbung der säurefesten Bakterien und für ihr Verhalten bei der Gramschen Färbung ist.

Auf Grund der bei der Färbung erhaltenen Resultate kann man folgendes sagen: Im allgemeinen wirkt 5%iger Alkali-Alkohol viel stärker entfärbend als 3%iger HCl-Alkohol. Die Behandlung der Präparate mit Jodjodkalilösung nach der Carbofuchsinfärbung beeinflusst die Entfärbbarkeit durch Acetonalkohol bei Mykol nicht, wohl aber wird der Mykolester durch Jodierung resistenter gegen Entfärbung. Bei Methylviolettfärbung

## Tabelle III.

## A. Säurefestigkeit.

(Deckglaspräparat 24 Stunden mit Carbofuchsin bei 37° C. gefärbt.)

Differenzierungs- flüssigkeit	Substanz	Nach									
		5 Stunden		24 Stunden		36 Stunden		48 Stunden			
3% HCl-Alkohol bei Zimmer- temperatur	Mykol	rot		rot	rot	rot	rot	rot wie Anfang			
	Mykolester	>		fast entfärbt	—	—	—				
						Nach					
		10	20	30	45	1	1½	2	15	24	
		Minuten			Stunde		Stunden				
3% HCl-Alkohol bei 37° C.	Mykol	rot	—	rot	rot	rot (wie Anfang)	rot	rot	rot	blaß- rot	blaß- rot
	Mykolester	rot	—	blasser	ent- färbt	—	—	—	—	—	—
5 Min. Jodierung, dann Acetonalkohol bei Zimmertemp.	Mykol	rot	rot	rot	rot	rot	rot	rot (etwas blaß)	rot	rot	rot
	Mykolester	rot	—	etwas blasser	deutlich blasser	—	—	fast entfärbt	ent- färbt	—	—
Ohne Jodierung direkt in Acetonalkohol bei Zimmertemp.	Mykol	rot	rot	rot	rot	rot	rot	etwas blaß	blaß- rot	blaß- rot	
	Mykolester	sehr blaß	—	vollkommen entfärbt	—	—	—	—	—	—	

## B. Alkalifestigkeit.

(Deckglaspräparat 24 Stunden mit Carbofuchsin bei 37° C. gefärbt.)

Differenzierungs- flüssigkeit	Substanz	Nach		
		4 Stunden	5 Stunden	24 Stunden
5% Alkali-Alkohol bei Zimmertemp.	Mykol	rot	rot	blaßrot
	Mykolester	blaßrot	entfärbt	—
		30 Minuten	45 Minuten	2 Stunden
5% Alkali-Alkohol bei 37° C.	Mykol	rot	rot	rot (etwas blaß)
	Mykolester	sehr blaß	entfärbt	—

## C. Gramfestigkeit (Muchsche Modifikation).

(Deckglaspräparat 24 Stunden mit Methylviolettlösung bei 37° C. gefärbt.)

		Nach				
		10 Minuten	30 Minut.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.
Jodiert	Mykol	schwarzblau	blau	blau	blau	blau
	Mykolester	>	>	>	etwasblasser	blaßblau
Nicht jodiert	Mykol	violett	blaßviolett	entfärbt	—	—
	Mykolester	>	entfärbt	—	—	—



verleiht die Behandlung mit Jodjodkali sowohl dem Mykol wie dem Mykolester stärkere Widerstandsfähigkeit gegen die Entfärbung durch Acetonalkohol. In beiden Fällen ist der Mykolester deutlich empfindlicher gegen das Entfärbungsmittel. (S. Tabelle.)

### Zusammenfassung.

Zum Schluß mögen einige der wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen noch einmal hervorgehoben werden:

Das direkt gewonnene Ätherextrakt aus Tuberkelbacillen und Mykobakt. lact. enthält keine Phosphatide. Der nachfolgende Alkohol extrahiert in der Wärme ein Diaminomonophosphatid aus beiden Bakterien.

Aus beiden Bakterien wurde ein hoch molekularer Alkohol isoliert, der die Formel  $C_{29}H_{56}O$  hat. In diesen kann durch Substitution ein Atom J oder Br eintreten. Unter der Einwirkung von Essigsäureanhydrid bildet er ein Acetat, mit Benzoessäure ein Benzoat.

Der Alkohol ist mindestens zum Teil als Ester einer höheren Fettsäure im Bakterienkörper enthalten.

Das Verhalten gegen Farbstoffe insbesondere, die Säurefestigkeit, Alkalifestigkeit und Grampositivität beruhen auf der Anwesenheit dieses höheren Alkohols oder dessen Ester.

Das Vorhandensein von Adenin und Hypoxanthin in beiden Bakterien wurde bestätigt.

Unter den Eiweißbausteinen wurden die folgenden Aminosäuren gefunden: Arginin, Histidin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Valin und durch Reaktion Tyrosin und Tryptophan. Dagegen tritt keine Schwefelbleireaktion ein.

Die quantitativen Verhältnisse dieser Aminosäuren in beiden Bakterien sind aus der Tabelle (I und II) zu ersehen. Die Bakterienproteine zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Phenylalanin aus.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Professor A. Kossel im physiologischen Institut und Herrn Professor H. Kossel im hygienischen Institut, auf deren

Anregung und unter deren Leitung diese Arbeit ausgeführt wurde, meinen wärmsten Dank auszusprechen für die vielfache Förderung bei den vorliegenden Untersuchungen.

#### Literatur.

1. Hammerschlag, Centralbl. f. innere Med., 1891.
2. Schweinitz und Dorset, Centralbl. f. Bakt., Bd. 19, 1898.
3. Aronson, Archiv f. Kinderheilk., Bd. 30.  
— — Berlin. klin. Wochenschr., 1910.
4. Bulloch und Macleod, Journ. of Hyg., Vol. 4, 1904.
5. Hoppe-Seyler, Med.-chem. Untersuchungen, 1867—1868.
6. Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. 55, 1908.
7. Erlandsen, Diese Zeitschrift, Bd. 51, 1907.
8. Thudichum, zitiert Biochem. Handlexikon von Abderhalden.
9. siehe 7.
10. Thierfelder und Stern, Diese Zeitschrift, Bd. 53, 1907.
11. Stoklasa, Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., Bd. 21, 1908.
12. Kresling, Centralbl. f. Bakt., Bd. 30, S. 24.
13. Nishimura, Archiv f. Hyg., Bd. 18.
14. Schulze, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 18.
15. Liebermann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 18, S. 1803.
16. E. Schulze und Likiernik, Diese Zeitschrift, Bd. 15.
17. Weyl, Deutsche med. Wochenschrift, 1891, S. 256.
18. Auclair und Paris. Arch. med. exper., 1908.
19. Ruppel, Diese Zeitschrift, Bd. 26.
20. Galeotti, Diese Zeitschrift, Bd. 25.  
— — Deutsche med. Wochenschrift, 1897.
21. Levene, Journ. medic. research., 1901.
22. Bendix, Deutsche med. Wochenschr., 1901.
23. A. Kossel und F. Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. 31.
24. Weiß, Diese Zeitschrift, Bd. 52.
25. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. 33.
26. Koch, Mitteil. aus d. Kaiserl. Ges.-Amt, 1884.
27. Ehrlich, Deutsche med. Wochenschr., 1882, Nr. 19.
28. Gram, Fortschritt der Medicin, 1884, S. 185.
29. Brudny, Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., Bd. 21.
30. Much, Beitr. z. Klinik d. Tuberk., 1907.
31. Eisenberg, Centralbl. f. Bakt., Bd. 49, 1909, und Bd. 58.
32. H. Kossel, Handbuch d. path. Mikroorg., Kolle-Wassermann, II. Aufl.,  
Bd. 5, S. 430ff.
33. Telemann, Deutsche med. Wochenschr., 1910.
34. Velde, Diese Zeitschrift, Bd. 8.