

Zur Kenntnis der Eiweißkörper der Fäulnisbakterien.

Von

E. Salkowski.

Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 13. Dezember 1919.)

Bei Untersuchungen über die Eiweißkörper der Bakterien hat man, wenn die Bakterien aus einem eiweißhaltigen Medium stammen, immer mit der Komplikation zu rechnen, daß den Bakterien Reste des eiweißhaltigen Mediums anhängen; nur ein Bakterienmaterial, das aus einer eiweißfreien Kulturflüssigkeit stammt, ist nach dieser Richtung hin einwandfrei. Dasselbe scheint mir auch für die Bakterien der Leimfäulnis zu gelten. Eiweißkörper, die man in ihnen findet, müssen — soweit sie nicht etwa in ihrem Verhalten mit dem Leim übereinstimmen — als Körpersubstanz angesehen werden. Es ist anzunehmen, daß die bei der Fällung der eingedampften Leimfäulnisflüssigkeiten mit Alkohol erhaltenen Niederschläge außer beigemischter anorganischer Substanz nur aus Fäulnisbakterien bestehen, vielleicht etwas Leim beigemischt enthalten.

Da mir solche Niederschläge von den in der vorhergehenden Arbeit mitgeteilten Versuchen zur Verfügung standen, wollte ich die mir sich bietende Gelegenheit nicht ungenützt vorübergehen lassen.

Der inzwischen trocken gewordene Niederschlag aus einem Versuch mit 400 g Gelatine wurde mit stark verdünnter Salzsäure behandelt und filtriert. Es ergab sich so eine salzsaure Lösung A und ein unlöslicher Rückstand B.

Die Lösung A wurde mit Natronlauge alkalisiert und von dem fast ausschließlich aus Eisenoxydhydrat bestehenden, von dem Destilliergefäß stammenden Rückstand, der nicht weiter berücksichtigt ist, abfiltriert. Die alkalische Lösung gab auf

Zusatz von Salzsäure einen Niederschlag, der sich bei weiterem Zusatz wieder löste. Die Lösung sei C genannt.

Der von der verdünnten Salzsäure nicht gelöste Rückstand B wurde ausgewaschen und mit Wasser ausgekocht, in dem er sich zum Teil löste. Die filtrierte Lösung D wurde mit C vereinigt. Der von heißem Wasser nicht gelöste Anteil E (von dem sich Proben leicht in Natronlauge lösten) wurde ausgewaschen und in bekannter Weise mit Alkohol und Äther entwässert und entfettet. Beim Trockenreiben des ätherfeuchten Materials wurde das äußerst feine rehfarbene Pulver so elektrisch, daß ein Verlust durch Herausschleudern nicht zu vermeiden war. Das Gewicht dieser eiweißartigen Substanz betrug 0,45 g. Da diese Quantität zur Feststellung der Eigenschaften sehr gering erschien, wurde eine weitere Quantität der vereinigten Rückstände aus den Leimfäulnisversuchen, die sich noch vorfanden, in derselben Weise verarbeitet. Diese Darstellung ergab 1,3 g. Zu den Reaktionen, soweit sie nicht mit der Substanz selbst angestellt sind, wurde durch Verreiben mit Wasser unter Zusatz von etwas Natronlauge eine $2\frac{1}{2}\%$ ige Lösung dargestellt.

Die vereinigten salzsauren Lösungen von C und D wurden mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag ausgewaschen, mit Baryt zersetzt, vom Baryumwolframat abfiltriert und der Überschuß von Baryumhydroxyd durch Ammoniak + Ammoniumcarbonat entfernt, eingedampft, von sich noch ausscheidenden Baryumcarbonat abfiltriert und die Lösung auf 50 ccm gebracht. 10 ccm gaben beim Eindampfen und Trocknen bei 110° 0,344 g. Die Quantität der Substanz C + D betrug demnach 1,72 g¹⁾. Die auf Gehalt von $2\frac{1}{2}\%$ gebrachte Lösung zeigte in ihrem Verhalten zu Fällungsmitteln Albumose-Charakter. Das Verhalten zu Reagentien findet sich ebenso wie das von E in der folgenden Tabelle zusammengestellt, gleichzeitig das Verhalten von Leimalbumose und Eiweißalbumose.

¹⁾ Bei der Verarbeitung der zweiten Quantität ist die salzsaure Lösung, die zu der Substanz C + D führte, nicht weiter berücksichtigt, da die aus der ersten Darstellung erhaltenen Albumosen zu den Reaktionen ausreichten.

	I Leim- albumose- pepton $2\frac{1}{2}\frac{0}{0}$	II Witte-Pepton $2\frac{1}{2}\frac{0}{0}$	III Albumose aus Leimfäulnis, etwas bräun- liche Lösung	IV Eiweißkörper E aus Leim- fäulnisbak- terien
Erhitzen mit $\frac{1}{2}$ Volumen Sal- petersäure von 1,2 D	Schwache gelbe Fär- bung, durch NaOH zitro- nengelb	Starke Gelb- färbung, durch Natron- lauge tief orange	Lösung wird zunächst heller, durch NaOH dunkel- gelb	Fällung, die auch beim Er- hitzen bleibt, leichte Gelb- färbung
Einige Tropfen ge- sättigter Mercuri- chloridlösung	0	Dicke Fällung	0	Dicke weiße Fällung
Jodjodkalium- lösung (1 Jod, 2 Jodkalium, 100 Wasser)	0	Dicke Fällung	0	0
Einige Tropfen konzentrierter Trichloressig- säurelösung	0	Fällung, bei Wasserzusatz bleibend	0	Starke Fäl- lung bei Was- serzusatz bleibend
stärkerer Zusatz von Trichloressig- säurelösung	Fällung, die sich bei Was- serzusatz löst	Fällung, bei Wasserzusatz bleibend	Fällung, bei Wasserzusatz bleibend	Wie bei II
Erhitzen mit alka- lischer Bleilösung	0	Starke schwarze Fär- bung	0	?
α -Naphtol + Schwefelsäure	0	Positiv	0	0
Millonsche Reak- tion	0	Positiv	0	0
p-Dimethyl- amidobenz- aldehyd + $\frac{1}{2}$ Vol. Salzsäure von 1,19 D	Zuerst 0, beim Stehen lassen schwache rötliche Fär- bung ¹⁾	Rotfärbung, allmählich in gesättigtes Violett über- gehend ²⁾	Die bräun- liche Färbung zeigt leichte Schattierung nach Rot	Wie bei III
Glyoxylsäure + Schwefelsäure	0	Intensive Reaktion	0	0
Formaldehyd- reaktion mit Sub- stanz	0	Intensive Reaktion	0	0
Biuret-Reaktion	Positiv	Positiv	0	Schwach und mehr bläulich

¹⁾ Mit Amylalkohol geschüttelt und stehen gelassen. Am nächsten Tage Rosafärbung, die z. T. in den Amylalkohol übergegangen ist.

²⁾ Mit Amylalkohol geschüttelt und stehen gelassen. Am nächsten Tage wäßrige Lösung tiefblau, Amylalkohol hellblau, Absorptionsstreifen zwischen C und D.

Der Tabelle füge ich noch hinzu, daß sowohl die Albumose als auch der Körper E bei Anstellung der Schwefelreaktion nach Siegfried eine schwach positive Reaktion geben.

Die Angabe in der Tabelle: Reaktion mit Formalinlösung und eisenhaltiger Salzsäure bedarf noch einer Erläuterung.

Es finden sich in der Literatur vielfach Angaben über die Erkennung von Formaldehyd — ursprünglich in der Milch mit eisenhaltiger Salzsäure oder Schwefelsäure bei Gegenwart von Eiweißkörpern, teils in Form von Schichtproben, teils in Form von Mischproben. Nach einer brieflichen Mitteilung an E. Waser muß die Reaktion wohl als die von Hehner bezeichnet werden. Ich habe seinerzeit, nur die Reaktion zur Auffindung von Formaldehyd in der Milch kennend, eine Ausführungsform derselben beschrieben und wiederholt auf diese hingewiesen¹⁾. Die Reaktion beruht auf der Anwesenheit der Tryptophangruppe im Eiweißmolekül, wie Himrod und Levene²⁾ angegeben haben. Diese Angabe kann ich bestätigen, es liegt indessen natürlich kein Grund vor, Tryptophan anzuwenden, da Witte-Pepton ja unvergleichlich leichter zugänglich ist als Tryptophan.

Man kann nun aber auch umgekehrt Formaldehydlösung zur Erkennung der Tryptophangruppe benutzen. Zweckmäßig wendet man dazu eine Formaldehydlösung in der ungefähren Konzentration von 1 : 50 000³⁾ an; sie kann auch stärker sein, aber nicht über 1 : 5000. Die schwächeren Lösungen geben bessere Reaktionen. Die Ausführung ist nun folgende: Man setzt zu der Formalinlösung im Reagenzglas⁴⁾ das gleiche Volumen Salzsäure von 1,19 D und 3 Tropfen 3%iger Eisenchloridlösung, alsdann eine nicht zu kleine Spatelspitze (die

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 68, S. 337 (1915) und diese Zeitschr. Bd. 93, S. 432 (1915).

²⁾ Die Quellen kann ich leider nicht zitieren, ich verdanke auch diese Angaben Herrn Waser.

³⁾ Zweckmäßig geht man von einer Formalinlösung von 1 : 10 aus und verdünnt 3,5—3,7 ccm dieser Lösung auf 1000 ccm (= 1 : 10 000), diese dann weiter.

⁴⁾ Ich benutze geräumige Reagenzgläser von 23 cm Länge und 18 mm innerem Durchmesser.

von mir gebrauchte ist etwa 13 mm breit, das Gewicht des gefaßten Witte-Pepton beträgt ca. 0,08 g) des zu prüfenden Eiweißkörpers und erhitzt zum Sieden. Beim Vorhandensein der Tryptophangruppe tritt schnell Violettfärbung ein, die in ein tiefes und haltbares Blau übergeht. Bleibt die Reaktion aus, so beweist dies das Fehlen der Tryptophangruppe. Zweckmäßig setzt man alsdann noch Witte-Pepton (oder Tryptophanlösung) hinzu. Tritt jetzt die Reaktion ein — es geschieht überraschend schnell —, so zeigt dies, daß die Bedingungen zum Eintritt der Reaktion richtig getroffen sind, die Tryptophangruppe also in dem Untersuchungsmaterial in der Tat fehlt. Natürlich ist die Reaktion auch mit Lösungen anzustellen. Man nimmt dann zweckmäßig eine etwas konzentriertere Formaldehydlösung, etwa 1:25000, und hierzu das gleiche Volumen der zu prüfenden Lösung. Man kann natürlich auch die Mischung von Formaldehyd, Salzsäure und Eisenchlorid zuerst zum Sieden erhitzen und dann den zu prüfenden Körper eintragen.

Ausdrücklich möchte ich noch folgendes bemerken: Während die Reaktion auf Formaldehyd mit Eiweißpepton (Witte-Pepton) äußerst fein ist, ist das für diese Reaktion mit Formaldehyd keineswegs der Fall, sie kann nur zur schnellen Entscheidung darüber dienen, ob Eiweißpepton oder Leimpepton vorliegt. Vor anderen feineren Reaktionen z. B. mit p-Dimethylamidobenzaldehyd hat diese Reaktion den Vorzug, daß die erforderlichen Reagentien im Laboratorium stets zur Hand sind und daß die Reaktion, da sie nicht so fein, für die Frage, ob Eiweiß resp. Eiweißpepton oder Leim vorliegt, entscheidend ist.

Es liegt nahe, die an der Albumose aus Leimfäulnisbakterien beobachteten Eigenschaften durch die Annahme eines Gemisches von Leimalbumose und Eiweißalbumose zu erklären. Dagegen spricht aber folgendes: Es wurde eine Mischung von 9 Vol. der Leimalbumoselösung und 1 Vol. der Witte-Pepton hergestellt. Dieselbe ergab: 1. beim Kochen mit derselben alkalischen Bleilösung Bräunung und allmählich schwärzlichen Niederschlag; 2. deutliche Reaktion mit Glyoxylsäure; 3. all-

mählich starke Trübung und Niederschlag mit Jodjodkaliumlösung; 4. mit einigen Tropfen einer schwefelsauren Lösung von p-Dimethylamidobenzaldehyd versetzt bei Zusatz rauchender Salzsäure intensive Violettfärbung, mit konzentrierter Schwefelsäure geschichtet nach Rohde einen blauen Ring, beim Durchschütteln gesättigt blaue Flüssigkeit. Danach ist die aus den Leimfäulnisbakterien erhaltene Albumose eine besondere, durch den Mangel der Tryptophangruppe und Fehlen des Schwefels oder äußerst geringen Gehalt an Schwefel gekennzeichnete.

Was die Substanz E betrifft, so steht sie dem Eiweiß nahe, dies geht aus der Fällung durch Salpetersäure, die beim Kochen bestehen bleibt, dem Verhalten zu Mercurichlorid und zu Trichloressigsäure hervor, aber auch ihr fehlt die Tryptophangruppe und die Xanthoproteinreaktion ist äußerst schwach.

Es sind also in den Fäulnisbakterien zwei Eiweißkörper gefunden, von denen der eine die äußeren Charaktere der Albumose, der andere die eines globulinartigen Eiweißes zeigt, denen beiden aber die Tryptophangruppe fehlt, während der der Xanthoproteinreaktion zugrunde liegende Atomkomplex bei der Albumose fast ganz fehlt, bei dem Eiweiß auch nur in äußerst geringer Quantität vorhanden ist. In beiden Körpern habe ich durch die Reaktion von Siegfried (Erhitzen in einem engen Reagenzglas, in das ein mit Bleiessig getränkter Filtrierpapierstreifen eingeschoben ist) Schwefelgehalt nachweisen können, dagegen fehlt der sogenannte bleischwärende Schwefel bei dem Eiweißkörper ganz, seine Anwesenheit bei der Albumose bleibt zweifelhaft.

Etwas abweichende Ergebnisse wurden naturgemäß bei einer anderen Art der Verarbeitung des Materials erhalten. Allerdings stammte dieses nicht wie bisher aus einem Einzelversuch, sondern war ein Teil der vereinigten Rückstände der früheren Versuche; das Material wurde mit Wasser ausgekocht. Dabei gingen Albumosen in Lösung, die sich nach Fällung mit Phosphorwolframsäure usw. ebenso verhielten, wie die früher aus der salzsauren Lösung erhaltenen. Der Rückstand gab nunmehr fast nichts an verdünnte Salzsäure ab (bei Fällung der salzsauren Lösung mit überschüssiger Natronlauge schied sich Eisenoxydhydrat aus. Die von diesem abfiltrierte, mit Salzsäure angesäuerte Lösung enthielt nur sehr wenig durch Phosphorwolframsäure fällbare Substanz); stärkere Salzsäure extrahierte

einen beim Neutralisieren ausfallenden Eiweißkörper, der sich wie der Eiweißkörper E verhielt.

Auf die in der Literatur vorhandenen Angaben über die Zusammensetzung verschiedener Bakterien möchte ich nicht eingehen, vielmehr nur darauf hinweisen, daß Nencki¹⁾ das von ihm dargestellte Anthraxprotein schwefelfrei gefunden hat. Da die Reaktion von Siegfried zu Nenckis Zeit noch nicht bekannt war, so ist es möglich, daß auch das Anthraxprotein nicht ganz schwefelfrei war. Daß aber Schwefel in irgend einer Form für die Bakterien nicht absolut unentbehrlich ist, zeigt die Möglichkeit des Wachstums und der Vermehrung in schwefelfreien oder nur ein Minimum von Schwefel enthaltenden Kulturflüssigkeiten, wie die Pasteurschen Lösungen und ähnlich zusammengesetzte.

Es ist wohl anzunehmen, daß auch das Eiweiß der Bakterien im Pansen der Wiederkäuer, auf dessen Bedeutung für die Ernährung in neuerer Zeit wiederholt hingewiesen worden ist²⁾, nicht eigentliches Eiweiß ist, sondern nur aus dem Eiweiß nahestehenden Körpern besteht, die bei sonst genügender Beschaffenheit des Futters ebenso eiweißsparend wirken können wie der Leim. Ob überhaupt Bakterien bzw. einzellige Organismen imstande sind, Eiweiß zu erzeugen, dem nichts an zyklischen und heterozyklischen Gruppen fehlt, bedarf noch weiterer Untersuchungen; möglicherweise ist diese Fähigkeit auf die eigentlichen Pflanzen beschränkt, zu denen man die Bakterien und einzellige Hefe nicht rechnen kann. Vom chemischen Standpunkt aus ist die Einteilung der lebenden Natur in „Pflanzenreich“ und „Tierreich“ eben unzureichend: es schiebt sich dazwischen noch ein drittes Reich von Lebewesen ein, die wohl die Fähigkeit haben, anorganischen Stickstoff zum Aufbau von Leibessubstanz zu verwenden, nicht aber — augenscheinlich wegen des Fehlens von Chlorophyll — anorganischen Kohlenstoff in organischen umzuwandeln und sich dadurch sowohl von Pflanzen wie von Tieren scharf unterscheiden.

¹⁾ Malys Jahresbericht Bd. 14 S. 499.

²⁾ Vgl. z. B. Völtz, Zentralblatt für Bioch. u. Biophysik Bd. 21, S. 437.

Nachschrift¹⁾. Leider ist erst nachträglich ein Vortrag von Voeltz in der Berliner physiologischen Gesellschaft (Referat in der Berliner klin. Wochenschr. 1919 Nr. 29) zu meiner Kenntnis gelangt, der für die aufgeworfene Frage von größter Bedeutung ist. Voeltz hat 17 bis 25 Tage umfassende Versuche an wachsenden Schafen angestellt, die ausschließlich mit Natronlauge aufgeschlossenes Stroh (das keinen verdaulichen Stickstoff mehr enthält), Zucker, Stärke und Harnstoff erhielten. Dabei trat Wachstum und erheblicher Ansatz von Eiweiß ein, täglich 10 bis 20 g. In diesen Versuchen liegt eine ganze Reihe von biochemischen Problemen. Wo ist der Schwefel zum Aufbau des Eiweißes hergekommen? (vielleicht aus trotz des Aufschließens mit Natronlauge noch vorhandenem Calciumsulfat?), wo die Tryptophangruppe, die doch nach Abderhalden²⁾ und anderen zur Ernährung notwendig ist? Haben die Bakterien doch ein tryptophanhaltiges Eiweiß gebildet? oder ist vielleicht die Zusammensetzung des Eiweißes so ernährter Tiere eine andere?

¹⁾ Der Redaktion zugegangen am 29. Dezember 1919.

²⁾ Abderhalden, Diese Zeitschr. Bd. 96 S. 16 u. 18 (1915/16).