(Aus dem physiolog.-chem. Laboratorium des Herrn Prof. Hoppe-Seyler.)

Ueber die Fermentation der Leber und Bildung von Indol.

Von

Dr. **W. Koukol-Yasnopolsky** aus Petersburg.

Es ist von mehreren Physiologen die Beobachtung gemacht und besonders von Liebig wieder hervorgehoben, dass die Leber, zerkleinert mit Wasser in abgeschlossenen Räumen stehen gelassen, sehr bald eine bedeutende Gasentwicklung gibt, über deren Veranlassung und Verlauf Näheres nicht bekannt ist, nur wird von Liebig und auch von Anderen angegeben, dass die entwickelten Gase aus CO_2 und H_2 bestehen. Dass man den Process nicht näher untersucht hat, wird seinen Grund wahrscheinlich darin finden, dass man denselben als einen Fäulnisprocess ansah und diese Umsetzungen haben die Physiologen ziemlich constant vernachlässigt, offenbar dabei von der nicht genügend begründeten Ansicht geleitet, dass die Lebensprocesse höherer Organismen mit den Vorgängen der Fäulnis in keinem Zusammenhange standen.

Béchamp¹⁾ hatte bereits nachgewiesen, das zerkleinerte Leber mit phenolhaltigem Wasser gewaschen noch im Stande sei, Fermentation auszuführen, dass also derselben Fermente eigen seien, welche nicht von Mikrokokken und Bacterien herrührten, die aus Luft, Wasser und den Gefäßwandungen in diese Masse gekommen seien.

Aufgefordert von Herrn Prof. Hoppe-Seyler habe ich in Bezug auf die in der zerkleinerten Leber verlaufenden spontanen Zersetzungsprocesse einige Versuche ausgeführt, die allerdings den Beweis liefern, dass man es hier 1) mit einem Processe zu thun habe, der von den Fäulnisvorgängen nicht getrennt werden kann, aber doch manches Auffallende und bisher Unbekannte bietet, und 2) dass das Ferment für diese Zersetzung, wie es Béchamp mit anderen Methoden bereits richtig gefunden hat, nicht aus zufällig hinzugegangenen niederen Organismen herkommen kann.

Um in dieser letzteren Beziehung eine sichere Entscheidung zu erhalten, wurden Kaninchen, die eben getödtet waren, die Leber entnommen und dieselbe sofort in einem Becherglas in geschmolzenes

1) Béchamp, Comptes rendus, T. LXXV, p. 1830.

Wachs von 105° Temperatur eingetaucht; hierdurch wurde die an die Oberfläche des Organs bei dem Entnehmen aus dem Thier gelangten niederen Organismen getödtet, aber das Innere der Leber wurde dabei nicht coagulirt; beim Erkalten contrahirte sich das Wachs in dem Grade, dass leicht Risse und Spalten entstanden, und um jetzt das Eindringen von Bacterien zu vermeiden, wurde venetianischer Terpentin darüber gegossen, am besten bis 40° erwärmt, damit er sich hinreichend flüssig in alle Risse hineinlegte¹⁾.

Die Leber und Muskeln, welche in der beschriebenen Weise in Wachs eingeschlossen waren, wurden nun zwei Wochen bis 20 Tage stehen gelassen; schon am dritten, vierten Tage konnte man einige Bläschen von Gas bemerken, welche durch den dicken venetianischen Terpentin durchgingen. Nach der Eröffnung zeigte sich dann die Oberfläche der Leber bedeckt mit Tyrosinkrystallen, sie war ganz erweicht, ragirte sauer; unter dem Mikroskop fanden sich eine grosse Menge sich bewegender Bacterien und Mikrokokken. Das wässerige Extract zeigte schwachsaure Reaction, blassgelbe Farbe mit etwas grünlicher Fluorescenz; mit Natronlauge und schwefelsaurem Kupferoxyd trat schwache violette Färbung ein; Alkohol in Ueberschuss bewirkte eine Trübung; mit 10 Volumina Wasser verdünnt und einigen Tropfen verdünnter Essigsäure versetzt gab es flockigen Niederschlag. Mit salpetersaurem Quecksilber gekocht zeigte die Flüssigkeit intensive Rothfärbung, dann Niederschlag, sie enthielt also viel Tyrosin. Bei der Destillation wurde aus der Lösung ein schwach alkalisches, nicht Indolhaltiges Destillat gewonnen.

Die Muskelmassen, die in derselben Weise eingeschlossen gehalten waren, fanden sich bei der Entfernung der Wachs-Terpentinhülle sehr zerreisslich, übel riechend, schmutzig blass gefärbt, von saurer Reaction. Sie zeigten unter dem Mikroskope reichlichen Gehalt an Bacterien und Mikrokokken. Die Muskelmasse wurde mit heissem Wasser extrahirt und gab dabei eine sauer reagirende Flüssigkeit, welche mit Natronlauge und Kupfersulfat eine zwar schwache, aber doch intensivere Violett-färbung gab, als das Extract der in gleicher Weise behandelten Leber.

Durch Verdünnen mit Wasser und Zusatz einiger Tropfen Essigsäure wurde ein reichlicherer Niederschlag erhalten, als bei der

1) Dieses Verfahren ist im wesentlichen übereinstimmend mit dem von Th. Billroth befolgten, vergl. Billroth's Untersuchungen über die Vegetationsformen von *Coccobacteria septica*. Berlin 1874. S. 58.

gleichen Behandlung der Leber. Tyrosin fand sich nach der Reaction mit Quecksilberniträt nur wenig, dagegen gab das schwach alkalische Destillat intensive Indolreaction.

Andere Theile von Leber und Muskelextract mit verdünnter Schwefelsäure destillirt, gaben keine Reaction auf Ameisensäure und sehr schwache Reaction mit Eisenchlorid; sie enthielten wahrscheinlich Spuren von Essigsäure.

Die beschriebenen Verhältnisse beweisen, dass die hermetisch abgeschlossenen Organe eine Zersetzung erleiden, die in ihren Producten mit der Fäulniss völlig übereinstimmt. Es ist dabei nicht sicher zu entscheiden, welches die Ursache des Auftretens von Indol in den Muskeln und der Abwesenheit desselben in der Leber sein mag.

Das Auftreten von niederen Organismen unter den geschilderten Verhältnissen ist gewiss in hohem Grade interessant. Sie konnten von Aussen nicht hineingekommen sein und da durch zahlreiche Versuche nachgewiesen ist, dass sie bei 100° getödtet werden, ist anzunehmen, dass die Oberfläche der in das heisse Wachs getauchten Organe, so wie die Glasoberfläche von niederen Organismen befreit war. Durch das geschmolzene erkaltende Wachs konnten sie gleichfalls nicht eindringen so wenig als durch den Terpentin, da in dieser Flüssigkeit die Bewegung kleiner Theilchen ausserordentlich gehindert ist; Terpentin wirkt auch bekanntlich tödtlich auf sie. Es bleibt somit keine andere Annahme zur Erklärung übrig, als dass die Keime dieser Organismen in den lebenden Organen bereits vorhanden waren, die sich dann entwickelten, als hierfür günstige Bedingungen eintraten.

Bei einer zweiten Reihe von Versuchen wurde kein Werth darauf gelegt, niedere Organismen von aussen abzuhalten, sondern es wurden die Producte der Gährung untersucht, welche bei Abschluss der atmosphärischen Luft gebildet werden. Es wurden Portionen von 1 Kilo frischer Kalbsleber zerkleinert, mit destillirtem Wasser zerrieben, durch Leinwand filtrirt und die Flüssigkeit in Kolben von 1,5 bis 2,5 Liter Inhalt gebracht. Die Kolben wurden mit Kautschukkorken verschlossen und ein Gasleitungsrohr durch die Bohrung des Korkes bis auf den Boden des Kolben eingeschoben; die Röhre war dann aussen in der Weise umgebogen, dass bei umgekehrter Stellung des Kolbens die Oeffnung des Rohres sich unter Quecksilber befand und die entweichenden Gase leicht aufgesammelt werden konnten. Die in solcher Weise beschickten Kolben wurden

nun bei Sommertemperatur 3 bis 8 Wochen stehen gelassen und die entweichenden Gase von Zeit zu Zeit untersucht.

Nach der Oeffnung der Kolben im Keller wurden daselbst die Flüssigkeiten abfiltrirt, die Filtrate in 4 Portionen getheilt und diese in folgender Weise untersucht:

Eine Portion diente für die Reactionen auf verschiedene Eiweissstoffe. Die zweite wurde für sich der Destillation unterworfen und das Destillat auf Indol geprüft. Die dritte Portion, zu welcher der grösste Theil der Flüssigkeit verwendet wurde, unterwarf ich zur Aufsuchung flüchtiger Säuren der Destillation mit verdünnter Schwefelsäure, sättigte das Destillat mit Barytwasser, leitete CO_2 ein und verfuhr zur Trennung und zum Nachweis der Säuren im Wesentlichen nach dem in dem Handbuch von Prof. Hoppe-Seyler angegebenen Verfahren. Die vierte Portion wurde im Keller stehen gelassen.

Der Rückstand, der bei dieser Destillation in der Retorte geblieben war, wurde durch Barytwasser, Einleiten von CO_2 und Erhitzen von Schwefelsäure befreit, dann nach Abdampfen auf ein kleines Volumen erst mit neutralem, dann mit basischem Bleiacetat, endlich mit salpetersaurem Quecksilberoxyd gefällt, die so erhaltenen Niederschläge gesondert untersucht nach ihrer Zerlegung mit Schwefelwasserstoff. Im neutralen Bleiacetatniederschlage wurde besonders auf Asparagin- und Glutaminsäure, im basischen Bleiniederschlage auf Xanthin und Sarkin, im Quecksilberniederschlage auf Allantoin und in der von allen diesen Niederschlägen abfiltrirten Flüssigkeit auf Leucin und Tyrosin die Untersuchung gerichtet.

Der ungelöste Rückstand endlich, welcher bei der Filtration des Inhaltes der Kolben auf dem Filter blieb, wurde gleichfalls in mehrere Theile getheilt, ein Theil mit verdünnter Natronlauge, ein anderer mit Salzsäure extrahirt, die filtrirten Extracte neutralisirt zur Prüfung auf Eiweissstoffe. Der grösste Theil des Rückstandes wurde zur Untersuchung auf Fette, Seifen, Cholesterin verwendet, nachdem er mit heissem Wasser vorher extrahirt war zur Lösung von Xanthin, Sarkin u. s. w. Dies Wassereextract war der Portion der abfiltrirten Flüssigkeit, die auf diese Stoffe untersucht werden sollte, hinzugefügt.

Es würde zu weit führen alle Proceduren durchzugehen, welche zur Trennung und Nachweis der genannten Stoffe angewendet wurden, besonders da die Methoden nichts Neues bieten würden.

Portion Nr. 1.

Die erste Portion des Leberauszugs war am 10. Mai in der beschriebenen Weise eingeschlossen und aufgestellt. Gasentwicklung wurde am Ende des dritten Tages bemerkbar, blieb bei 16° — 20° C. bis zum 27. Mai sehr gering, wurde dann bei 22° bis 25° bis 14. Juni viel geschwinder, nahm dann bei 20° wieder sehr ab, blieb sehr gering bis 22. Juni. Es stieg dann die Temperatur wieder um 2° bis 3° . Vom 1. Juli an zeigte sich keine Gasentwicklung mehr. Das entwickelte Gas bestand bis auf Spuren allein aus CO_2 . Am 4. Juli wurde der Kolben geöffnert.

Die abfiltrirte Flüssigkeit war gelb durchsichtig, ohne üblen Geruch, sauer reagirend; mit schwefelsaurem Kupferoxyd und Natronlauge tritt sehr schwach violette Färbung ein; Alkohol in Ueberschuss giebt fast keinen Niederschlag; beim Erhitzen keine Coagulation; eine nur kleine Menge von Bacterien und Mikrokokken wurde gefunden. Beim Stehen der Flüssigkeit bildete sich kein Niederschlag.

Das Destillat der Flüssigkeit enthält kein Indol, reagirt sauer, Ameisensäure und wahrscheinlich Essigsäure wurden in geringer Menge gefunden, ebenso bei Destillation nach Zusatz von Schwefelsäure, andere fette flüchtige Säuren wurden vergeblich gesucht.

Der Rückstand nach der Destillation enthielt weder Asparagin- noch Glutaminsäure, dagegen wurden Xanthin und Sarkin gefunden, kein Allantoin. Tyrosin und Leucin waren reichlich vorhanden. Der ungelöste Rückstand auf dem Filter mit schwefelsäurehaltigem Alkohol warm ausgezogen gab ein Filtrat, welches bei der Spectraluntersuchung die Absorptionerscheinungen des Hämatin zeigte.

Oel-, Palmitin-, Stearinsäure und Cholesterin wurden gefunden, aber kein Glycerin, keine unverseiften Fette.

Der ganze ungelöste Rückstand, der von der Lebermasse übrig geblieben war, betrug trocken nur 2 Grm.; Salzsäure zog aus demselben Eiweissstoffe aus, Natronlauge dagegen nicht nachweisbar Quantität davon.

Portion Nr. 2.

Dauer des Gährungsversuchs vom 25. Mai bis 19. Juli.

Als Unterschied zwischen Nr. 1 und Nr. 2 ist zu bemerken, dass letztere mehr verdünnt mit Wasser (beinahe zwei mal so stark) und der Luftraum im Kolben grösser gelassen war.

Anfang der Gasentwicklung am Ende des sechsten Tages. T. 18° bis 20° C.; vom 31. Mai bis 8. Juni Gasentwicklung rasch. T. 22° — 25° C. vom 8. Juni bis 12. Juni dagegen sehr gering. Vom 12. bis 18. Juni stärkste Gasentwicklung. Nach 22. Juni wurde dieselbe wieder rascher und blieb so bis zum 10. Juli. Das entwickelte Gas bestand nur aus CO_2 .

Die abfiltrirte Flüssigkeit zeigt einen unangenehmen Geruch, ist gelb, opalisirend, reagirt sauer; mit Natronlauge und schwefelsaurem Kupferoxyd schwache violette Färbung; Alkohol im Ueberschuss bringt einen geringen

Niederschlag hervor. Beim Erhitzen entsteht geringe Coagulation. Eine Portion der Flüssigkeit mit ihrem 10fachen Volumen Wasser verdünnt giebt bei Zusatz einiger Tropfen Essigsäure nur eine Trübung.

Eine kleine Menge sich bewegender Bacterien und Mikrokokken fand sich in der Flüssigkeit. Beim Stehen der Flüssigkeit bildete sich kein weiterer Niederschlag. Für sich destillirt gab sie keine Indolreaction im Destillate, mit Schwefelsäure destillirt nur Spuren von Essigsäure, keine Ameisensäure; Asparagin- und Glutaminsäure, Allantoin und diesmal auch Xanthin und Sarkin, wurden vergeblich aufgesucht. Nur Tyrosin und Leucin wurden gefunden; keine unverseiften Fette; kein Glycerin wohl aber Stearin-, Palmitinsäure. Hämatin war unzersetzt geblieben und wurde aus dem unlöslichen abfiltrirten Rückstande mit schwefelsäurehaltigem Alkohol extrahirt, auch liessen sich in diesem Rückstande durch Behandlung mit Salzsäure und Neutralisation der sauren Lösung noch unzersetzte Eiweissstoffe nachweisen.

Bei der Destillation der aus dem Kolben entnommenen und filtrirten Flüssigkeit mit Schwefelsäure wurde ein Destillat erhalten, aus dem 1,830 Grm. Barytsalz mit 39,01 % Barium-Gehalt gewonnen wurden, wahrscheinlich hauptsächlich aus buttersaurem und capronsaurem Baryt bestehend.

Der ganze ungelöst gebliebene Theil der Lebermasse wog trocken 1,750 Grm.

Portion Nr. 3.

Vom 6. Juli bis 29. Juli.

Zu dieser Portion waren 100 Grm. kohlensaurer Kalk hinzugefügt, und ein grosser Luftraum gelassen.

Nach zwei Stunden schon heftige Gasentwicklung, die dann ein schnelles Tempo behielt bis zur letzten Woche vor Abbruch des Versuchs, zu welcher Zeit sie etwas langsamer geworden war.

Das entwickelte Gas bestand nur aus CO_2 .

Die abfiltrirte Flüssigkeit war schmutzig grünroth gefärbt, von unangenehmem Geruch; im Spectrum zeigte sie den bekannten Streifen vom Hämatin; mit Natronlauge und schwefelsaurem Kupferoxyd violette Färbung; mit Ueberschuss von Alkohol einen Niederschlag; beim Erhitzen bedeutende Coagulation; mit 10 Volumina Wasser und einigen Tropfen verdünnter Essigsäure versetzt bedeutenden flockigen Niederschlag.

Eine kleine Menge sich bewegender Bacterien und Mikrokokken wurde gefunden.

Das Destillat gab mit concentrirter Salpetersäure Reaction auf Indol und enthielt zugleich Ammoniak.

Bei der Destillation mit verdünnter Schwefelsäure wurde keine Ameisensäure erhalten und so geringe Menge anderer flüchtiger Säuren, dass ihre Trennung nicht möglich war. Tyrosin und Leucin waren reichlich vorhanden; Asparagin- und Glutaminsäure wurden, sowie Allantoin, Xanthin, Sarkin

vergeblich gesucht. Cholesterin war unverändert geblieben, keine unverseiften Fette; keine Stearin- und Palmitinsäure; kein Glycerin.

Vergleicht man die Resultate dieser drei Versuche, so ergibt sich, dass bei der Gährung von Lebersubstanz mit Wasser bei Ausschluss der atmosphärischen Luft sich, unabhängig zunächst von Zusatz von Calciumcarbonat, reichlich Kohlensäure bildet und dieselben Zersetzungsproducte entstehen, welche auch bei Zutritt der Atmosphäre aus Eiweissstoffen erhalten werden, wie Tyrosin, Leucin, Pepton, dass abweichend von den beiden andern Versuchen in Versuch Nr. 3, wo CaCO_3 zugesetzt war, eine reichliche Quantität löslicher Eiweissstoffe und zwar Globulinsubstanz sich vorfand — die Gährung war aber auch noch nicht sehr weit vorgeschritten. Dass die in den ersten Versuchen gefundene Ameisensäure im dritten Versuche fehlte ist leicht erklärlich, da von Popoff gefunden wurde, dass ameisen-saurer Kalk mit Kloakenschlamm unter Bildung von H_2 und CO_2 zerlegt wird. Die Fette waren in allen drei Versuchen zersetzt und zwar vollständig, Palmitin- und Stearinsäure wurde gefunden auch Oelsäure wird nicht gefehlt haben. Im dritten Versuche war der Kalkniederschlag nicht auf Seifen untersucht, sondern nur auf Fette; von Glycerin war in allen drei Versuchen nichts zu finden. Ueber die Bildung von Essigsäure, Propion-, Butter-, Baldrian-, Capronsäure ergaben die beiden ersten Versuche nur, dass bei saurer Reaction der gährenden Flüssigkeit nur sehr wenig von ihnen gebildet wird, die Quantitäten von Barytsalzen, die aus den Destillaten erhalten wurden, reichten zu einer weiteren Untersuchung nicht aus. Asparagin- und Glutaminsäure werden entweder nicht gebildet oder, was wahrscheinlicher ist unter Austritt von NH_3 zu Bernsteinsäure und Brenzweinsäure reducirt. Dass bei dem Fäulnisprocessen Reductionen eintreten, ist eine bekannte Erfahrung; sie müssen schon deswegen nothwendig angenommen werden, weil sich im Verlaufe des Processes fortdauernd CO_2 entwickelt, deren Sauerstoff entweder den organischen Verbindungen oder dem Wasser entzogen wird; da nun keine erhebliche Menge von Wasserstoff entweicht, so müssen die organischen Stoffe selbst reicher daran geworden oder NH_3 etc. abgespalten sein.

Von besonderem Interesse war uns bei diesen Versuchen das Auftreten des Indol im 3. Versuche. Erst vor Kurzem ist von

Nencki¹⁾ die Bildung von Indol bei der Fäulniss von Eiweissstoffen mit Pankreassaft beschrieben. Das Pankreas ist, wie meine Versuche beweisen, durchaus unnöthig. Um über seine Entstehung weiteren Aufschluss zu erhalten, hatte ich eine Reihe von Versuchen angestellt, welche wegen der Publication von Nencki abgekürzt wurden. Aus derselben möchte ich folgende Ergebnisse anführen: wässriger Auszug aus zerkleinertem Ochsenpankreas bildet für sich bei 38° bis 40° in 4 bis 5 Tagen Indol, wird die Flüssigkeit aber mit Natrium- oder Ammoniumcarbonat oder durch Harnstoffzusatz alkalisch gemacht, so tritt die Indolbildung schon nach 12—18 Stunden deutlich auf. Wässrige Auszüge aus zerkleinerten Nieren, Leber, Muskeln zeigten auch nach mehrtägiger Behandlung in der Blutwärme noch keinen Indolgehalt, wenn sie ohne Alkalizusatz geblieben waren, dagegen trat in den mit Ammonium- oder Natriumcarbonat versetzten Auszügen die Indolbildung bald ein, bei den Nieren am dritten bis vierten, bei der Leber am fünften bis sechsten, den Muskeln am vierten bis fünften Tage. Es kann nicht bezweifelt werden, dass das Indol als ein regelmässig auftretendes Fäulnissproduct der Albuminstoffe in alkalischen Lösungen derselben angesehen werden muss. Durch Versuche von Prof. Lubavin und Hoppe-Seyler ist nun bekannt, dass Eiweissstoffe bei Behandlung mit Wasser bei 180° bis 200° Peptone, Tyrosin und Leucin geben, es war fraglich, ob bei dieser Zersetzung auch Indol entstehe. Einige Versuche, die ich in der Richtung anstellte, bestätigten diese Vermuthung. Gut mit Wasser, dann mit Alkohol und Aether gewaschenes Blutfibrin mit Wasser in Glasröhren eingeschmolzen und 6 bis 8 Stunden bei 180° erhalten, gab eine braune Flüssigkeit und flockigen Niederschlag. Die Flüssigkeit, welche reichlich Tyrosin enthielt, liess bei der Destillation Indol übergehn. Ebenso bildet sich stets Indol bei Behandlung von Eiweissstoffen oder Hornspänen mit schmelzendem Aetzkali. Bei andauernder Fäulniss scheint das Indol wieder zu verschwinden.

Ich habe endlich Indol auch im frischen Pferdeharn von einem gesunden Thiere nachweisen können, es geht bei der Destillation des Harns in das Destillat über und rührt nicht von einer Zersetzung von indigobildender Substanz her. Um mich in letzterer Beziehung

1) M. Nencki, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin. 1875. Nr. 5. S. 336.

zu überzeugen, habe ich den Harn zunächst mit basischem Bleiacetat, dann mit Ammoniak gefällt, den Niederschlag in Wasser zertheilt mit einem Strom Kohlensäure zerlegt, im Filtrate das Blei durch SH_2 entfernt und von der bleifreien Lösung einen Theil für sich destillirt, einen andern Theil vorher mit Natronlauge, einen dritten mit Salzsäure versetzt und dann destillirt, aber in den Destillaten war kein Indol, obwohl die von Blei befreite Lösung eine sehr schöne intensive Indigobildung mit chlorhaltiger Salzsäure zeigte. Es wäre gewiss auffallend, wenn sich Indol als ein regelmässiges Zersetzungsproduct der Eiweissstoffe im Organismus und regelmässiger Harnbestandtheil erweisen würde, obwohl Tyrosin und Leucin, welche sonst stets damit zusammen entstehen, durchaus nicht aufgefunden werden.