

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Göttingen  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur. O. SCHMIDT)

## **Untersuchungen über die Anteile der Eigen- und Fremdfermente am postmortalen Eiweißzerfall\***

Von

**O. SCHMIDT, B. FORSTER und G. SCHULZ**

Mit 9 Textabbildungen

*(Eingegangen am 1. Dezember 1960)*

In vieler Hinsicht gleicht der postmortale Abbau den Vorgängen des Lebens; das gilt insbesondere für die ersten Phasen des Zerfalls. Viele dieser Abläufe sind ungeordnete, nicht mehr auf die Erhaltung des Lebens eingestellte Teilvorgänge des vitalen Stoffwechsels. Schwer in die vitalen Vorgänge einzuordnen sind die mannigfachen körperfremden Zerfallsprodukte des späteren Abbaues. Die Anteile der Eigen- und Fremdfermente sind hierbei nicht genauer abzuschätzen.

Inwieweit dem postmortalen Abbau Eigen- oder Fremdfermente zugrunde liegen, ist gerichtsärztlich eine überaus bedeutsame Frage: Konservierung und Leichenfäulnis, abnorme Zersetzung und Fäulnisprodukte sind von der Aktivität der Eigenfermente und der Keimbeseidlung abhängig.

Den Einfluß der Eigen- und Fremdfermente untersuchten wir am Beispiel des Eiweißzerfalls. Die hierbei auftretenden Spaltprodukte sind durch ihren Stickstoffgehalt leicht vom Zerfall der übrigen Grundstoffe abzutrennen. Das ermöglicht die Einordnung in zusammenhängende Abläufe.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich auf den autolytischen Zerfall und den Abbau der Aminosäuren. Wir verwendeten Gewebsbrei einer frischen Rinderleber, der über längere Zeitläufe unter aeroben oder anaeroben Bedingungen, bei möglicher Ausschaltung von Fremdkeimen oder unter dem Einfluß verschiedenster Keimbeseidlung der Fäulnis überlassen wurde. Die Untersuchungen erstreckten sich auf die gasförmige und flüssige Phase des Zerfalls. Die Analyse des gasförmigen Teils beschränkte sich auf den Nachweis von Ammoniak und Kohlensäure. Der flüssige Teil wurde in stickstoffhaltige Fraktionen aufgediedert, die den verschiedenen Abbaustufen zuzuordnen sind. Die

---

\* Herrn Prof. Dr. Dr. TIMM zum 65. Geburtstag gewidmet. Nach einem Vortrag, gehalten auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin, Oktober 1960 in Graz.

Aufteilung erfolgte nach Löslichkeit und Fällbarkeit mit Eiweißfällungsmitteln, nach freien Amino- und Carboxylgruppen und Ammoniak. Die löslichen und fällbaren Anteile, die Amino- und Carboxylgruppen gehören dem proteolytischen Zerfall, die Ammoniumsalze, das flüchtige Ammoniak, die Carbonate und freie Kohlensäure dem Abbau der Aminosäuren an. Die Abtrennungen addieren sich jeweils zu dem an der Einwaage zuvor bestimmten Gesamt-N.

Gelöstes wurde durch scharfes Zentrifugieren von ungelöst gebliebenem getrennt. Die Bestimmung der in Lösung gegangenen stickstoffhaltigen Anteile wurde im Kjeldahl vorgenommen. Der mittlere Fehler unserer Einzelbestimmung beträgt  $\pm 0,7\%$ . Der proteolytische Zerfall führt in zunehmendem Maße zu wasserlöslichen Teilproduktion.

Zur Eiweißfällung benutzten wir 20%ige Trichloressigsäure. Abtrennbar sind die Peptone und hochmolekularen Peptide. Der quantitative Nachweis erfolgte (nach KJELDAHL) im Zentrifugat. Die niedermolekularen Peptide, Aminosäuren, Amine und Ammoniumsalze sind mit Trichloressigsäure nicht fällbar; sie bilden den „Rest-N“.

Amino-N wurde volumetrisch nach dem Verfahren von VAN SLYKE mit salpetriger Säure bestimmt. Ammoniak und flüchtige Amine wurden zuvor aus der Lösung entfernt. Das Verfahren erfaßt die nicht flüchtigen, primären, aliphatischen Amine und die Aminogruppen der natürlichen Aminosäuren in  $\alpha$ -Stellung. In anderer Stellung verhalten sie sich träge. Proteine und Peptide reagieren entsprechend ihrem minimalen Gehalt an freien Aminogruppen nur mit einem geringen Teil ihres Stickstoffs. Die proteolytischen Spaltprodukte liefern in dem Maße, in dem freie Aminogruppen gebildet werden, mehr Aminostickstoff. Bei Vorlage eines mit HCl erhaltenen Leber-Hydrolysats ergaben unsere Einzelwerte eine Abweichung von  $\pm 0,6\%$ .

Der Nachweis der Carboxylgruppen erfolgte titrimetrisch als Kohlensäure nach Zusatz von Ninhydrin nach den Angaben von VAN SLYKE und MCFADYEN-HAMILTON. Carbonate, die unter Umständen reichlich zu erwarten sind, und Ketosäuren wurden zuvor nach Zugabe des Zitratpuffers  $p_H$  2,5 in siedendem Wasser als Kohlensäure ausgetrieben und in dem gleichen Gerät mit Bariumhydroxyd titrimetrisch bestimmt. Die Werte sind ohne sonderliche Fehler auf Kohlensäure zu beziehen. Die Ninhydrin-Reaktionen ergeben alle  $\alpha$ -Aminosäuren. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aminosäuren reagieren nur in geringem Umfang. Keine  $CO_2$ -Abspaltung zeigen die Carbonsäuren, die Oxysäuren, Peptide oder Aminosäuren mit substituierten oder veresterten Amino- oder Carboxylgruppen. In unseren Händen ergab die Bestimmung von Alanin eine mittlere Streuung von  $\pm 0,3\%$ .

Bei Aminosäure- und Peptid-Gemischen sind die Anteile von Amino-N und Carboxyl-C annähernd gleich. Ein Überschuß an Amino-N ist den Aminen zuzuschreiben. Bei ihnen handelt es sich um forensisch sehr bedeutsame Körper, deren Konstitution und nahe Beziehung zu den Alkaloiden in älteren Arbeiten eingehender untersucht worden sind. Die Abhängigkeit ihrer Bildung von bestimmten Bakterienarten ist in neuerer Zeit erkannt worden. Mit dieser Frage beschäftigt sich auch die vorliegende Arbeit.

Die Abtrennung der Ammoniumsalze erfolgte nach Zusatz von gesättigtem Kaliumcarbonat oder  $n/10$  NaOH. Die N-Bestimmungen im Kjeldahl lagen in guter Übereinstimmung. Flüchtige Amine wurden in der Vorlage potentiometrisch erfaßt. Das flüchtige Ammoniak der Durchströmungsgase wurde in Salzsäure eingefangen und in üblicher Weise titriert.

Die flüchtige Kohlensäure wurde in Natronlauge absorbiert. Die Titration erfolgte als Bariumcarbonat gegen Phenolphthalein.

Für die pH-Bestimmungen verwendeten wir die Glaselektrode. Nach Angabe der Hersteller-Firma hat das Meßgerät eine Genauigkeit von 0,02 pH.

Bei den bakteriologischen Untersuchungen fanden wir in dankenswerterweise die Mitarbeit von dem Leiter des Hygienischen Instituts der Universität, Herrn Prof. Dr. BRANDIS, und seinem Mitarbeiter, Herrn Privatdozenten Dr. THOFERN.

### I. Der aerobe Eiweißzerfall bei Anwesenheit ubiquitärer Keime

In aerobem Milieu ist, wie zu Lebzeiten, mit einem vollständigen Abbau der Eiweißkörper zu rechnen. Inwieweit der Zerfall bei An-

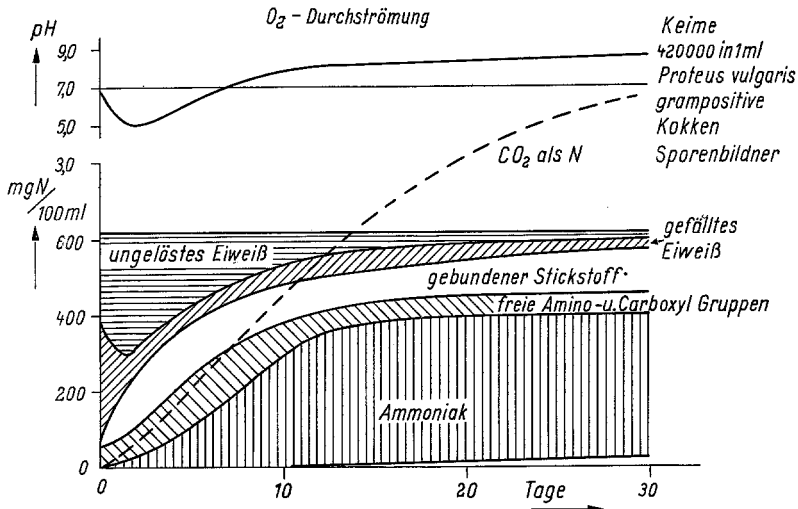


Abb. 1

wesenheit von Bakterien auf Eigen- oder Fremdfermente zurückzuführen ist, bleibe zunächst dahingestellt. Von Interesse ist der Verlauf des Zerfalls.

Der Brei einer frischen Rinderleber wurde 1:4 mit Wasser versetzt, im Brutschrank bei 25° mit Sauerstoff durchströmt und über mehrere Wochen der Fäulnis überlassen. 100 ml Substrat enthielten 620 mg Gesamt-N. Bei Abschluß des Versuchs fanden sich in 1 ml 420000 Keime, vorwiegend *Proteus vulgaris*, daneben grampositive Kokken und Sporenbildner.

Der Abbau zeigt den in Abb. 1 angegebenen Verlauf. Die hydrolytische Spaltung bringt die Eiweißkörper zunehmend in Lösung. Die löslichen Anteile sind als mg-N, berechnet auf 100 ml Fäulnissubstrat, gegen Zeit in Tagen aufgetragen. Die anfänglich stark ins Saure abfallende Phase ergibt vorübergehend eine vermehrte Ausfällung. Ungelöst bleibt ein geringer Rest. Hierbei dürfte es sich in erster Linie

wohl um Gerüsteiweißstoffe, die fermentativ schwer angreifbar sind, und um bakterielle Neubildungen handeln.

Die Fällung mit Trichloressigsäure trennt die höheren Peptide vom Rest-N. Die Kurve zeigt eine rapide Abnahme der fällbaren Substanzen. Schon nach wenigen Tagen sind die gelösten Eiweißstoffe fast vollständig zu niederen, nicht fällbaren Peptiden und Aminosäuren abgebaut. Fällbar bleibt auch hier ein geringer Rest. Über die Natur dieser Stoffe lassen sich keine näheren Angaben machen. Es sind wasserlösliche hochmolekulare Substanzen von Eiweißcharakter, deren fehlender Abbau wohl auf den Mangel an spezifischen Fermenten zurückzuführen ist.

Die freien Amine und Carboxylgruppen sind in Abb. 1 als N berechnet; sie sind der Ammoniakkurve aufgetragen. Amino-N und Carboxyl-C sind annähernd gleich. Amine finden sich im oxydativen Milieu nicht. Die Amino- und Carboxylgruppen sind vorzüglich den Aminosäuren zuzuschreiben, es kann sich bei ihnen aber auch um endständige Peptid-Gruppen handeln. Auffallend ist der schnelle Zerfall der Aminosäuren. Auch hier finden sich einige Reste, die sich dem weiteren Zerfall entziehen.

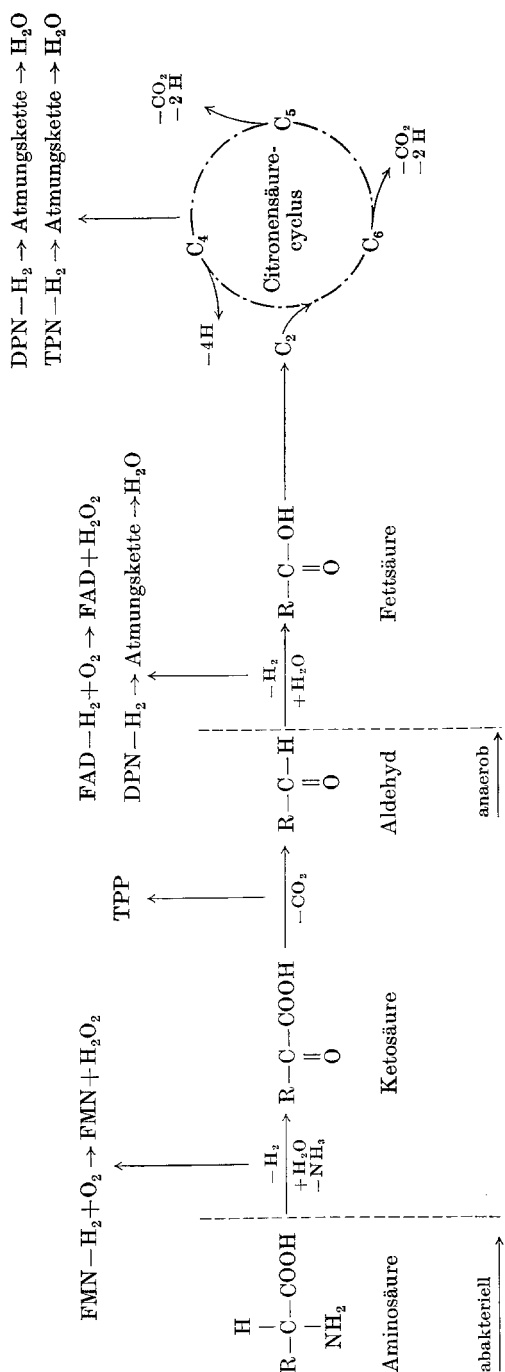
Der eigentliche Abbau wird durch die Ammoniak-Entwicklung angezeigt. Die Desaminierung beginnt bereits in den ersten Tagen. Sie ist im wesentlichen nach 14 Tagen beendet. Zwei Drittel des gesamten Stickstoffs sind der Desaminierung anheimgefallen. Die Aminogruppen liegen nunmehr als Ammoniumsalze vor. Der Ammoniakgehalt bestimmt das alkalische  $p_H$  der Lösung. Gasförmig entweicht das Ammoniak bei ansteigendem  $p_H$  erst gegen Ende des Versuchs. Die weitere Durchströmung überführt nach und nach die gesamten Ammoniumsalze in flüchtiges Ammoniak.

Dem Zerfall schwer zugänglich ist der anderweitig intramolekular gebundene Stickstoff. Er ist der Differenzbetrag der dargestellten Stickstoff-Fractionen zum Gesamt-N.

Erheblich ist die Entwicklung der Kohlensäure. Die Summenwerte, auf 100 ml Substrat als N berechnet, übersteigen die Ammoniakentwicklung bei weitem. Innerhalb der 30tätigen Versuchsdauer sind annähernd 3 g Kohlensäure in Freiheit gesetzt. Das ist weit mehr als die Hälfte des in 100 ml enthaltenen Trockengewichts der Leber.

Das oxydative Sauerstoff-Milieu überführt sonach im Laufe der Fäulnis das gesamte organische Material nahezu vollständig in seine gasförmigen anorganischen Bestandteile. Am Abbau unbeteiligt geblieben sind geringe Reste ungelöster und fällbarer Stoffe, ein kleiner Teil amino- und carboxylhaltiger Substanzen und Gruppen mit intramolekular gebundenem Stickstoff.

In vieler Hinsicht entspricht der hier dargestellte aerobe Zerfall den Vorgängen des Lebens. Mit dem vitalen Abbau übereinstimmend



ist der proteolytische Zerfall. Er ergibt sich aus der zunehmenden Löslichkeit, der Abnahme der Fällbarkeit und der Zahl der Amino- und Carboxylgruppen. Für den Abbau stehen der Zelle im Kathepsin und in den weitverbreiteten Zellpeptidasen die notwendigen Wirkstoffe zur Verfügung. Bemerkt sei, daß auch Bakterien reich an proteolytischen Fermenten sind.

Beim Zerfall der Aminosäuren sind die gleichen Abbaustufen anzunehmen, die auch beim vitalen Stoffwechsel auftreten. Die oxydative Desaminierung führt zu Ketosäuren, ihre anschließende Decarboxylierung zu Aldehyden, die weitere Oxydation zu Fettsäuren. Der abschließende decarboxylierende und oxydative Zerfall liegt im Citronensäurecyclyus. Im Sauerstoff-Milieu unbehindert sind alle jene Fermentabläufe, die den Wasserstoff auf Sauerstoff übertragen und als Atmungskette die terminale Verbrennung bewirken.

Das erste Glied in der Fermentkette sind L-Aminosäureoxydasen.

Es sind Flavin-Mononucleotide (FMN), die den Wasserstoff direkt auf Sauerstoff übertragen. Die Decarboxylierung der Ketosäuren wird durch Fermente vorgenommen, die als Coenzym meist das Thiaminpyrophosphat (TPP) benötigen. Bei der Oxydation der Aldehyde zu den entsprechenden Fettsäuren sind vorzüglich Pyridinnucleotide beteiligt, die auch den Wasserstoff- bzw. Elektronen-Transport im terminalen Abbau des Citronensäurecyclus bewirken. Die Stufen des Abbaues zeigt in grober Vereinfachung das Schema S. 32.

Abweichend vom vitalen Abbau ist die überaus reichliche Bildung von Ammoniak. Sie beherrscht den postmortalen Zerfall. Bemerkt sei, daß den L-Aminosäureoxydasen im vitalen Stoffwechsel nur eine geringe Bedeutung zukommt. Die Ausscheidung des Stickstoffs erfolgt vital nach vielfachen Transaminierungen als Harnstoff. Aminosäureoxydasen sind zudem nur wenig aktiv. Sie sind in der Leber nur in geringen Mengen vorhanden. Die Beteiligung körpereigener L-Aminosäureoxydasen am postmortalen Zerfall muß aus diesen Gründen recht zweifelhaft erscheinen: Der Anteil der bakteriellen Fremdfermente ist sicherlich erheblich.

## *II. Der anaerobe Eiweißzerfall bei Anwesenheit ubiquitärer Keime*

Das anaerobe Milieu bedeutet den Fortfall all jener Fermente, die Wasserstoff oder Elektronen auf Sauerstoff übertragen. Aerobe Transhydrogenasen und Oxydasen sind im Sauerstoff-Milieu an verschiedenen Stellen des Abbaues wirksam.

Die L-Aminosäureoxydasen übertragen den Wasserstoff vom Substrat direkt auf den Sauerstoff. Ein anaerobes Milieu unterbricht ihre Tätigkeit. Falls nicht andere Systeme — anaerobe Transhydrogenasen oder Transelektronasen — an ihre Stelle treten, entfällt der Aminosäureabbau überhaupt. Hiernach könnte es zweifelhaft erscheinen, ob unter anaeroben Bedingungen ein Zerfall der Eiweiße überhaupt erfolgt. Im streng anaerob lagernden Stalldünger bildet sich kein Ammoniak.

Mit dem Fortfall des Sauerstoffs entfallen aber auch alle jene Abläufe, die über die Atmungskette die endgültige Verbrennung bewirken. Oxydativer Abbau ist im sauerstofffreien Milieu nur in dem Maße möglich, in dem Wasserstoffakzeptoren zur Verfügung stehen.

In der Leiche wird der Sauerstoff des Hämoglobins nach dem Tode sehr schnell verbraucht. Die Totenflecke zeigen vom ersten Beginn ihres Auftretens die Farbe des reduzierten Hämoglobins. Es darf sonach als sicher gelten, daß die Fäulnisvorgänge mit Beginn des Eiweißzerfalls im Inneren der Leiche bereits streng anaerob verlaufen.

Die anaerobe Fäulnis untersuchten wir unter sonst gleichen Bedingungen an dem Gewebsbrei einer frischen Rinderleber im Stickstoffstrom (Abb. 2). Im Fäulnissubstrat fanden sich aerob wachsender

*Proteus vulgaris*, grampositive, nicht hämolysierende Kolonien und Stäbchen, daneben anaerob wachsender *Proteus* und vergrünende, nicht hämolysierende Kolonien. Bei der Verschiedenartigkeit der Keime kann der hier gezeigte Versuch als die experimentelle Wiedergabe eines gewöhnlichen Fäulnisablaufs luftgeschützter innerer Partien angesehen werden.

Die Untersuchung zeigt einen ungestörten Eiweißzerfall: Die fortschreitende Proteolyse ergibt sich aus der zunehmenden Löslichkeit

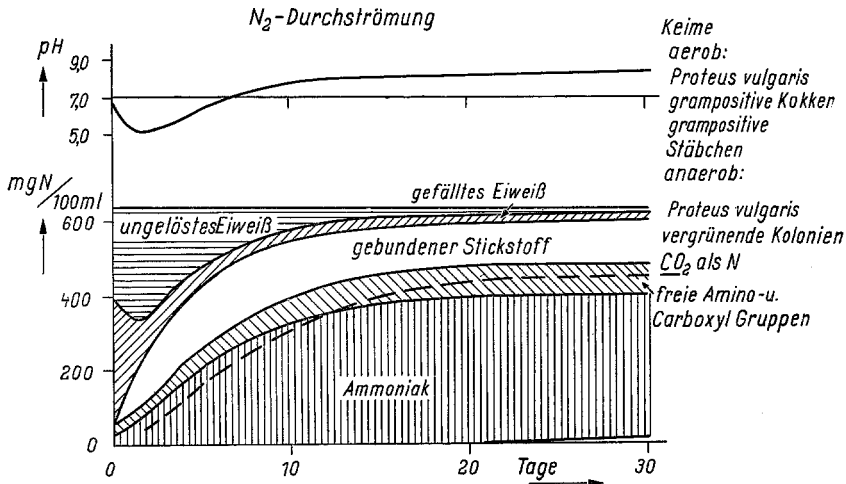


Abb. 2

der Eiweißkörper, der Kurve des Rest-N und der Zahl der freien Amino- und Carboxylgruppen; ungestört ist aber auch alles das, was die Versuchsanordnung über den Zerfall der Aminosäuren aussagt: Der Verlauf der Ammoniakentwicklung, Amino- und Carboxylgruppen, pH und das Auftreten von Kohlensäure werden durch den fehlenden Sauerstoff nicht berührt. Die Ammoniakentwicklung beträgt auch hier ein wenig mehr als zwei Drittel des Gesamtstickstoffs. Von der Sauerstoffdurchströmung abweichend ist lediglich die Menge der in Freiheit gesetzten Kohlensäure. Sie reicht nicht sonderlich über die Ammoniakentwicklung hinaus.

Der Versuch bestätigt die Erfahrung an der Leiche. Die autolytische Erweichung der Organe und die Bildung von Fäulnisgasen sind vom Luftzutritt unabhängig; sie finden sich auch im Inneren der Leiche.

Überraschend ist der ungestörte Zerfall der Aminosäuren. An Stelle der körpereigenen, nur aerob wirksamen L-Aminosäureoxydasen sind offenbar bakterielle Fremdfermente getreten, ohne deren Eingriff jeder weitere Abbau und damit auch jeder Bakterienwuchs entfallen würden.

Über den Mechanismus des Abbaues geben die Untersuchungen keine Auskunft. Desaminierende Prozesse durch spezifische Transhydrogenasen, die den bei der Desaminierung freiwerdenden Wasserstoff auf andere Systeme übertragen, sind anzunehmen. Verbreiteter noch sind die von STICKLAND beschriebenen Reaktionsabläufe, bei denen gleichzeitig ein desaminierender Zerfall mehrerer Aminosäuren durch gekoppelte oxydierende und reduzierende Vorgänge erfolgt.

Von besonderer Bedeutung ist das Verhältnis der Kohlensäure zur Ammoniakentwicklung. Diese Beziehungen sind nicht zufälliger Art; sie zeigen sich in anaerobem Milieu regelmäßig. Mit dem Fortfall des Sauerstoffs werden die terminalen Verbrennungsvorgänge weitgehend unterbunden. Die decarboxylierende Verbrennung der Kohlenhydrate und Fette entfällt. Der Abspaltung von Kohlensäure unterliegen nunmehr nur noch die ersten Zerfallsglieder des Aminosäureabbaus. Aus diesem Grunde übersteigt die Entwicklung von Kohlensäure nicht sonderlich die Bildung von Ammoniak: in anaerobem Milieu endet der Abbau der Aminosäuren mit dem Zerfall der Ketosäuren. Die entsprechenden Zerfallsprodukte sind unvollständig oxydierte Stoffe. Ein Gemisch der verschiedensten Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren und dergleichen beschließt den Abbau.

### *III. Der Anteil der Eigenfermente am Eiweißzerfall bei anaerober Fäulnis*

Das Beispiel einer sterilen und anaeroben Fäulnis, die auf Eigenfermente zurückzuführen ist, bietet die intrauterin abgestorbene Frucht: Die Weichteile sind durch autolytische Vorgänge allenthalben hochgradig erweicht; Fäulnisgeruch und Fäulnisgase finden sich bei dieser sterilen Fäulnis — im Gegensatz zur gewöhnlichen Leichenzersetzung — nicht. Daß die Bildung von Fäulnisgasen eng mit der Anwesenheit von Fäulniskeimen zusammenhängt, ergibt sich auch aus anderen Befunden: Die nicht beatmeten sterilen Lungen Neugeborener erweichen, bleiben aber über längere Zeit frei von Fäulnisgasen. Eigenfermente sind offenbar in der Lage, die autolytische Zerstörung durchzuführen, der mit Gasbildung einhergehende Zerfall der Aminosäuren ist dagegen den Fremdkeimen zuzuschreiben.

Die experimentelle Wiedergabe einer sterilen Fäulnis, wie sie uns bei unbeatmeten Lungen oder faultoten Neugeborenen entgegentritt, gestattet unsere Versuchsanordnung nicht. Bei der Zubereitung der Organe, der Dauer der Versuche und den häufigen Probeentnahmen wird jedes Bemühen um keimfreie Ansätze zerschlagen. Aus diesem Grunde haben wir uns, um bakterielle Einflüsse möglichst auszuschalten, mit bakteriostatisch wirkenden Zusätzen zufriedengeben müssen. Stärker wirksame bactericide Substanzen zu verwenden, verbietet die Einwirkung auf die Fermentsysteme. Für unsere Zwecke brauchbar erwies



sich das Chloroform. Es bleibt am Stoffwechsel unbeteiligt und wirkt auf die am Umsatz beteiligten Fermente nicht ein. Es wurde den Faulgefäßen mit den Durchströmungsgasen über mehrere wäßrige Vorlagen gasförmig zugeleitet. In anderen Versuchen verwendeten wir Achromycin.

Abb. 3 zeigt den Zerfall des Leberbreies im Stickstoffstrom nach Zusatz von Chloroform. Im Fäulnissubstrat schwaches Wachstum aerober grampositiver Kokken und Stäbchen und anaerober hämolys.

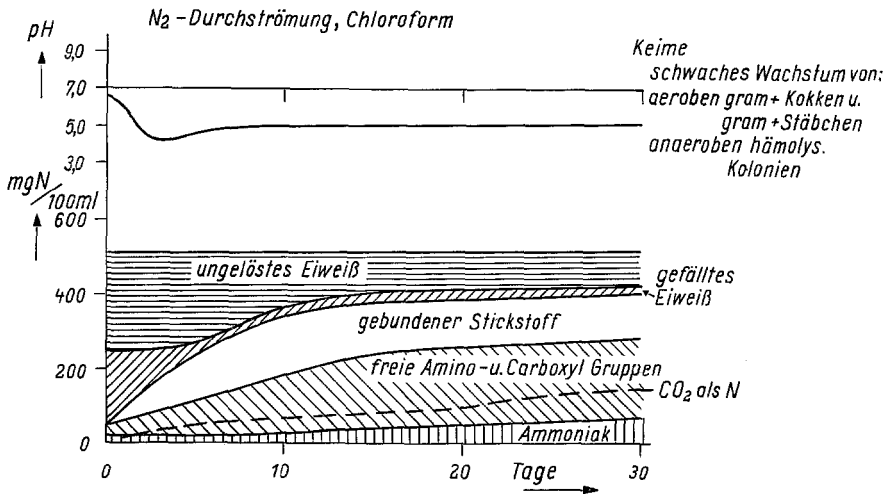


Abb. 3

sierender Kolonien. Der proteolytische Zerfall verläuft im wesentlichen unbehindert, wenngleich auch die Menge ungelöst gebliebener Anteile gegenüber dem in Abb. 2 gezeigten chloroformfreien Versuch deutlich überwiegt. Die Beteiligung proteolytischer Fremdfermente bei gewöhnlicher bakterieller Fäulnis ist sicherlich beachtlich. Deutlich vermehrt ist der Bestand an Amino- und Carboxylgruppen. Der Zerfall der Aminosäuren unterbleibt. Die Bildung von Ammoniak geht über die ersten Anfänge nicht sonderlich hinaus. Während der gesamten Versuchsdauer ist kaum ein Zehntel des Gesamtstickstoffs — gegenüber zwei Drittel bei ungehindertem Bakterienwuchs — der Desaminierung anheimgefallen. Das  $p_H$  bleibt bei der geringen Ammoniakentwicklung sauer. Die Entwicklung von Kohlensäure ist gering, sie übersteigt nicht wesentlich das Ammoniak.

Wenn der hier gezeigte Versuch auch nicht in idealer Weise den Gang eines sterilen Fäulnisablaufes wiedergibt, so darf er in seinem eindeutigen Ergebnis doch zur Erklärung der uns bekannten Bilder einer sterilen Leichenzersetzung herangezogen werden. Er zeigt die im

wesentlichen ungestörte Aktivität der körpereigenen Peptidasen und das völlige Versagen der am Abbau der Aminosäuren beteiligten Fermente. Bei Ausschaltung von Fremdkeimen endet der Zerfall mit der hydrolytischen Spaltung der Peptidketten. Erweichung ohne Gasfäulnis ist das anatomische Ergebnis. Der Versuch zeigt den überragenden Einfluß der Bakterien auf den Zerfall. Für die Beseitigung seiner Eigensubstanz trifft der lebende Körper keine Vorkehrungen; seine Aufgaben erschöpfen sich in der Erhaltung des Lebens. Nach dem Tode bleibt die Beseitigung der Substanz Fremdindividuen überlassen.

#### *IV. Der Anteil der Eigenfermente am aeroben Eiweißzerfall*

a) *Nach Zusatz von Chloroform.* Bei ungestörter Aktivität der Eigenfermente ist im Sauerstoffmilieu die endgültige Verbrennung sämtlicher Grundstoffe zu erwarten. Der desaminierende Abbau der Aminosäuren wird durch die Ammoniakentwicklung angezeigt. Die endgültige Verbrennung des stickstofffreien Restes und der terminale Abbau der Fette und Kohlenhydrate führen zur Bildung von Kohlensäure. Am Abbau sind die verschiedensten Fermentsysteme beteiligt. Aminosäureoxydasen bewirken die Abspaltung von Ammoniak, Pyridinnucleotidasen vorzüglich an dem weiteren decarboxylierenden Zerfall der Eiweiß- und der übrigen Grundstoffe beteiligt. Bei Ausschaltung der Fremdkeime sind die Bildung von Kohlensäure und das Auftreten von Ammoniak ein Ausdruck für die Leistungsfähigkeit der am Abbau beteiligten körpereigenen Fermente.

Nach Zusatz von Chloroform sahen wir, wie Abb. 4 es zeigt, bei Durchlüftung mit Sauerstoff einen überaus trägen und unvollständigen Abbau. Die Eiweißkörper bleiben zum großen Teil ungelöst. Die gelösten Anteile zerfallen langsam. Die höheren, mit Trichloressigsäure fällbaren Peptide halten sich lange. Die Zunahme freier Amino- und Carboxylgruppen ist verzögert. Die Kulturen ergaben nach 40stündiger Bebrütung nur wenig Keime. In 1 ml fanden sich 1700 Keime — grampositive Keime — gegenüber 420 000 im chloroformfreien Milieu.

Die Behinderung des proteolytischen Zerfalls ist überraschend und schwer verständlich. Wir haben ihn auf den Mangel an Sulfhydrylgruppen zurückgeführt, die für die Fermente des Kathepsins, die an der autolytischen Selbstverdauung nach dem Tode bevorzugt beteiligt sind, unentbehrliche Aktivatoren darstellen. Sulfhydrylgruppen werden, wie wir aus früheren Untersuchungen wissen — soweit sie nicht den lebenden Zellen zugehören —, im postmortalen Gewebe bei Anwesenheit von Sauerstoff zu inaktiven Schwefelverbindungen oxydiert. Die Zugabe von Sulfhydrylgruppen durch Spuren von Schwefelwasserstoff ergibt, wie Abb. 5 es zeigt, bei zunehmender Löslichkeit und reichlich Amino- und Carboxylgruppen einen deutlich vermehrten proteolytischen Zerfall.

Bei Ausschaltung der Fremdkeime ist die Ammoniakentwicklung gering. Sie reicht nicht sonderlich über die ersten Anfänge hinaus. Das pH bleibt sauer, freie Amino- und Carboxylgruppen bleiben bestehen.

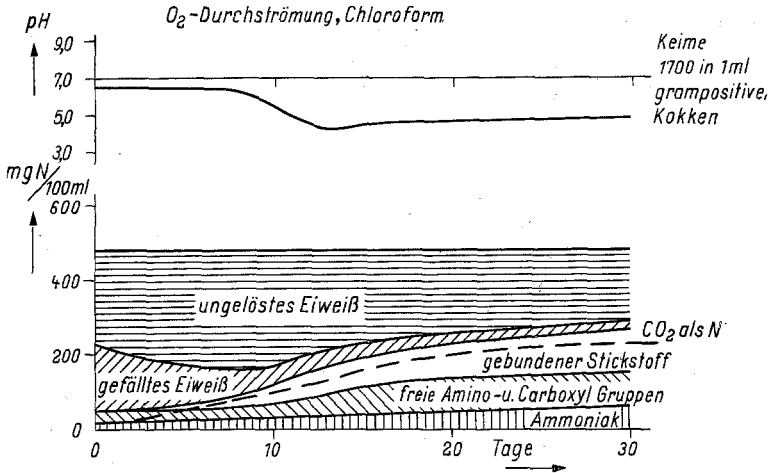


Abb. 4

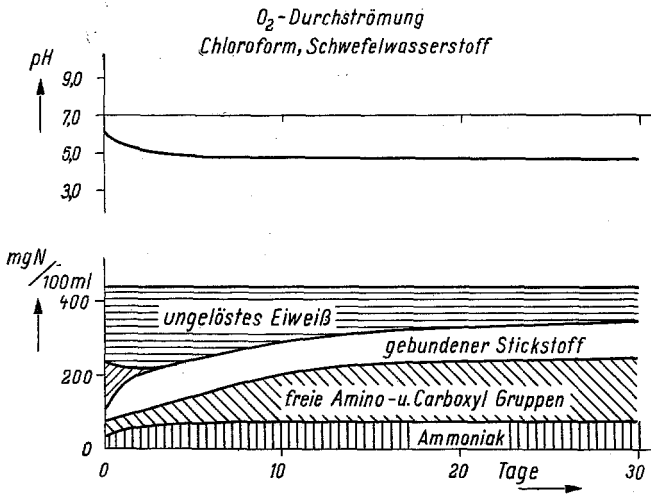


Abb. 5

Das Gesamtbild zeigt das völlige Versagen der Eigenfermente. Ihre Tätigkeit erschöpft sich in einer unvollständigen und träge ablaufenden proteolytischen Spaltung. Die Unfähigkeit der Eigenfermente, Aminosäuren oxydativ anzugreifen, unterbindet jeden weiteren Abbau der Eiweißkörper.

Auffällig und überraschend ist die geringe Entwicklung von Kohlensäure. Sie reicht nicht sonderlich über die Bildung von Ammoniak hinaus; man wird sie, wie auch die übrigen Versuche dies zeigen, dem desaminierenden Zerfall der Aminosäuren zuzuschreiben haben. Trotz der Anwesenheit von Sauerstoff unterbleibt die terminale Verbrennung der Eiweiße und der übrigen Grundstoffe. Fette und Zucker, die in der Leber reichlich vorhanden sind, hätten bei ungestörtem Abbau zu einer erheblichen Kohlensäureentwicklung geführt. Das Versagen der

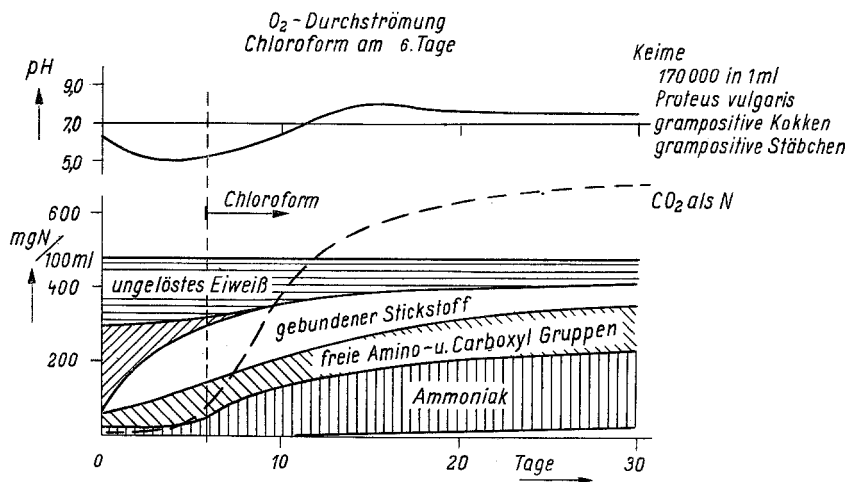


Abb. 6

Eigenfermente beschränkt sich sonach nicht allein auf die am Eiweißzerfall beteiligten Vorgänge.

Erfolgt der Chloroform-Zusatz erst nach genügender Keimentwicklung, am 6. Tage, dann nimmt der Abbau, wie Abb. 6 es zeigt — der Keimbesiedelung entsprechend —, den im Sauerstoffmilieu zu erwartenden ungestörten Verlauf. Im Fäulnissubstrat fanden sich bei Abschluß der Untersuchung in 1 ml 170 000 Keime, neben *Proteus vulgaris* grampositive Kokken und Stäbchen. Bemerkenswert ist, daß das Chloroform auf die am Zerfall beteiligten Fermente, wie dieser Versuch zeigt, ohne Einfluß geblieben ist.

b) *Der aerobe Eiweißzerfall nach Zusatz von Achromycin.* Auf der letztjährigen Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin in Frankfurt a. M. demonstrierte H.-J. WAGNER eine interessante Studie über den Einfluß der Antibiotica und Sulfonamide auf die Fäulnis. Den besten Erhaltungszustand zeigten die mit Tetracyclin-Präparaten vorbehandelten Tiere. „Die Unterschiede waren teils so drastisch, daß sich vor allem bei der Lagerung bis zu 12 Tagen nach

dem Tode der Eindruck ergab, als handle es sich um Tiere, die erst vor wenigen Stunden verendet waren.“ Präparate der Tetracyclingruppe, deren Wirkungsspektrum sich auch auf ausgesprochene Fäulniskeime erstreckt, erwiesen sich zur Fleischkonservierung als besonders geeignet. Über einen auffallend guten Erhaltungszustand menschlicher Leichen nach Vorbehandlung mit Antibiotica ist in letzter Zeit verschiedentlich berichtet worden.

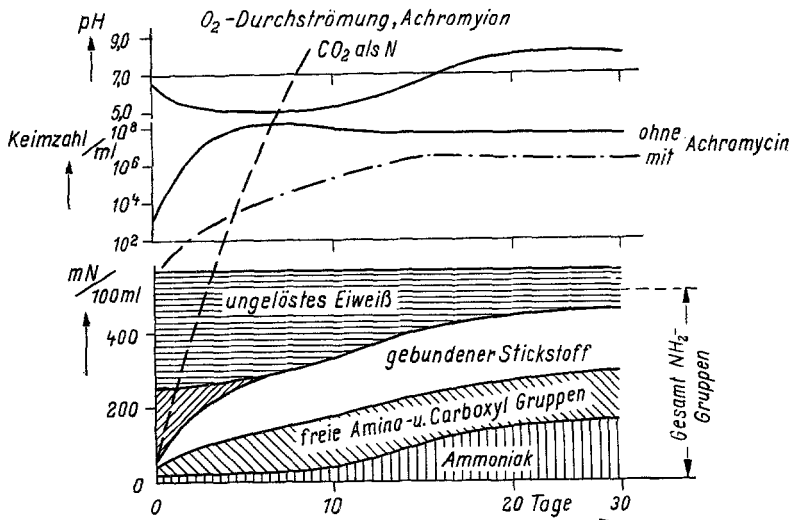


Abb. 7

Diese Mitteilungen veranlaßten uns, den bakteriostatischen Effekt des Achromycins auf den Verlauf der Fäulnis mit unseren Analysendaten erneut zu überprüfen. Bei der Dosierung war zu berücksichtigen, daß die Wirkung der Tetracycline in Homogenaten, besonders der Leber, stark herabgesetzt ist. Wir sahen einen nachhaltigen bakteriostatischen Effekt erst in 1%iger Lösung. Bei dieser Konzentration entwickeln sich die Keime, wie Abb. 7 es zeigt, gegenüber der achromycinfreien Kontrolle verlangsamt. Ihre Zahl bleibt zunächst um annähernd vier Zehnereinheiten zurück. Nach 14tägiger Versuchsdauer liegen die Werte bei stetig zunehmender Keimzahl um etwa zwei Zehnerpotenzen niedriger als die Kontrollen. Die Kulturen erfordern zu ihrer Auszählung gegenüber den achromycinfreien Substraten erheblich längere Bebrütungszeiten. In dem mit Achromycin versetzten Hydrolysat fanden sich überwiegend *Proteus vulgaris*, vergrünend wachsende Diplokokken, die zu den Enterokokken gehören dürften, und saprophytische Haufenkokken. Außerdem wurden noch vereinzelt gram-

positive Stäbchen in Primärbouillonkulturen nachgewiesen, die nicht auf anderen Nährböden weitergezüchtet werden konnten.

Auf den proteolytischen Zerfall ist das Achromycin ohne Einfluß: Die Autolyse wird, wie bereits früher gezeigt, vorzüglich durch Eigenfermente katalysiert.

Mit einer vollständigen Unterbrechung des weiteren Zerfalls ist bei der Zahl der hier wachsenden Keime nicht zu rechnen; dennoch ist der Abbau der Aminosäuren erheblich verzögert. Die Abspaltung von Ammoniak unterbleibt in den ersten Versuchstagen vollständig; sie beginnt eigentlich erst am 10. Tage. In der achromycinfreien Kontrolle waren während dieser Zeit die desaminierenden Prozesse im wesentlichen bereits abgeschlossen. Mit zunehmendem Wachstum der Keime steigt die Ammoniakentwicklung. Nach 26 Tagen ist ein Drittel der in der Leber enthaltenen Aminogruppen in Ammoniak überführt. In der gleichen Zeit sind in dem achromycinfreien Substrat 60% des Aminostickstoffs desaminiert worden.

Völlig ungestört verläuft die Entwicklung der Kohlensäure; sie ist sogar — verglichen mit allen anderen bisher gezeigten Versuchen, wie Abb. 7 dies zeichnerisch andeutet — überaus stark vermehrt. Bis zum 8. Tage sind bei unverändert geringerer Ammoniakentwicklung 3,7 g Kohlensäure in Freiheit gesetzt; nach 26 Tagen beträgt die Summe der abgespaltenen Kohlensäure mehr als 10 g. Derartige Kohlensäuremengen können unmöglich den Eiweißstoffen allein entstammen. Die Berechnung ergibt, daß während der gesamten Versuchsdauer bestenfalls die Hälfte der in dieser Zeit desaminierten Eiweißkörper einer vollständigen Verbrennung anheimgefallen ist.

Aus diesen Zahlen ist zu entnehmen, daß der Energiebedarf der Keime vorzüglich den stickstofffreien Grundstoffen entnommen wird. Daß unter der Einwirkung von Achromycin die Desaminierung einiger Aminosäuren gehemmt wird, ist bekannt. Der in der Literatur angegebene konservierende Einfluß des Achromycins ist dieser Aktivitätsminderung zuzuschreiben.

#### V. Der aerobe Eiweißzerfall durch *Proteus vulgaris*

Wie gezeigt werden konnte, endet der Anteil der Eigenfermente am postmortalen Eiweißzerfall mit der Spaltung der Peptidketten. Der eigentliche Abbau der Aminosäuren bleibt im aeroben wie anaeroben Milieu Fremdfermenten überlassen; Fäulnis und Verwesung sind demnach in ihren wesentlichen Abläufen mikrobiologische Vorgänge. Der Zerfall ist von der Individualität der Keime abhängig. Die Erforschung dieser Abläufe berührt die mannigfachen Fragen der bei der Zersetzung auftretenden Zerfallsprodukte und erklärt das Auftreten abnormer

Zersetzungserscheinungen. Das Studium mikrobiologischer Vorgänge wird hierdurch zu einem wichtigen, bisher wenig bearbeiteten Teilgebiet der gerichtlichen Medizin.

Von den an der Fäulnis beteiligten Keimen ist das Fermentsystem von *Proteus vulgaris* wohl am eingehendsten erforscht. Er produziert, wie alle Bakterien, Proteinasen, die die Peptidbindungen am Ende der Peptidketten hydrolysieren, und enthält, wie alle einzelligen Lebewesen, Endopeptidasen, die im Inneren der Peptidketten spalten und meist

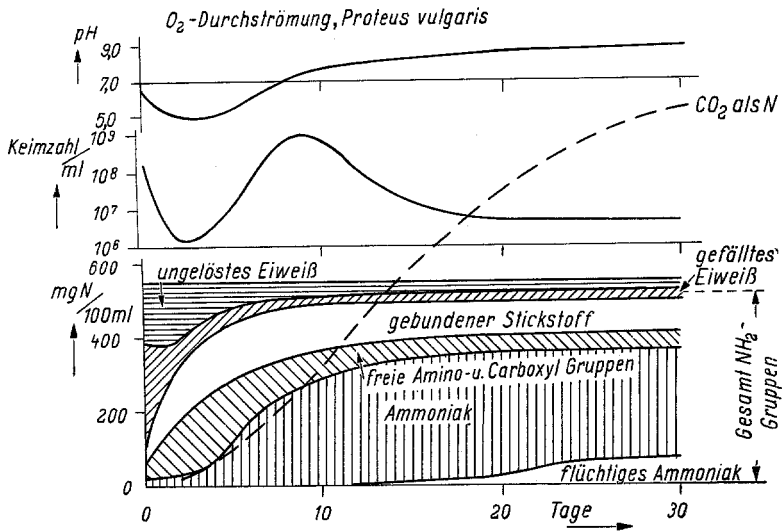


Abb. 8

erst nach dem Absterben der Zellen freigesetzt werden. Näher studiert sind die Aminosäureoxydasen. Sie spalten alle gewöhnlichen L-Formen. Bei Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt die endgültige Verbrennung in einem dem Tricarbonsäurecyclus ähnlichen Vorgang.

Abb. 8 zeigt den oxydativen Abbau des Leberbreies nach Beimpfung mit *Proteus vulgaris*. Die Keimzahl fällt in der Nährlösung zunächst ab. Mit der Vermehrung der Keime beginnt der proteolytische Zerfall. In dieser Phase vollzieht sich die Abspaltung der Aminogruppen. Nach Abschluß der proteolytischen und desaminierenden Vorgänge sinkt die Zahl der Keime. Aus der stetigen Entwicklung von Kohlensäure ist zu entnehmen, daß die eigentliche Energiequelle nunmehr die endgültige Verbrennung der stickstofffreien Gruppen darstellt. Der hier gezeigte Zerfall darf als der gewöhnliche und häufigste Typ eines bakteriell bedingten, oxydativ verlaufenden Abbaues gelten. Er zeigt eine Ferment-ausrüstung, die den Abbau in all seinen Phasen bis zur endgültigen Verbrennung ermöglicht.

# VI. Die Bildung von Aminen bei anaerobem Eiweißzerfall durch *Proteus vulgaris*

Fäulnisamine beanspruchen wegen ihrer nahen Beziehung zu den Alkaloiden ein besonderes forensisches Interesse. Den Arbeiten von GALE verdanken wir die Erkenntnis, daß bestimmte Bakterienarten für einzelne natürliche Aminosäuren streng spezifische Decarboxylasen besitzen. Die Abspaltung der Carboxylgruppen ist auf Aminosäuren beschränkt, die neben der L-Amino- und Carboxylgruppierung eine dritte

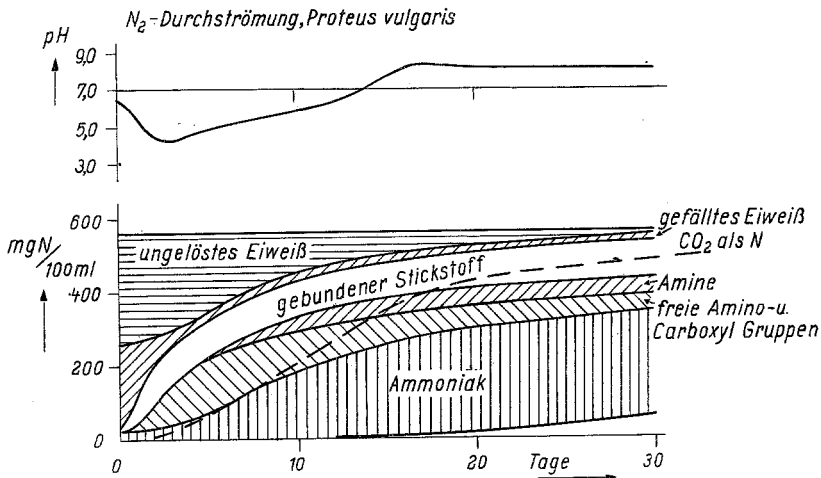


Abb. 9

endständige polare Gruppe besitzen, deren Substitution die Aminbildung verhindert. Amine können aus L-Arginin, L-Histidin, L-Lysin, L-Ornithin, L-Tyrosin und L-Glutaminsäure entstehen. Es bilden sich hierbei das Agmatin, Histamin, Cadaverin, Putrescin, Tyramin und die  $\gamma$ -Amino-Buttersäure. Die Decarboxylierung erfolgt anaerob. Sie ist auf den sauren  $p_H$ -Bereich und niedere Temperaturen — meist unterhalb von  $30^\circ$  — beschränkt. Amine haben offenbar den Zweck, das  $p_H$  auf den Wirkungsbereich anderer, am Abbau wesentlich beteiligter Fermente umzustellen.

Unter den Bakterienarten finden sich Aminbildner in regelloser Verteilung. Die Stämme müssen in der Lage sein, Pyridoxalphosphat zu bilden. Einige benötigen das Co-Ferment oder Pyridoxin in der Nährlösung. Die Aminbildung erfordert eine Adaptation der Keime an das Substrat.

*Escherichia coli* enthalten in unterschiedlicher Verteilung die größte Zahl von Aminosäuredecarboxylasen. *Streptococcus faecalis* decarboxyliert L-Tyrosin. Einige Stämme von *Chlostridium welchii* sind in der



Lage, Histidin und Glutaminsäure zu decarboxylieren. *Chlostridium septicum* enthält in hoher Aktivität Ornithin-Decarboxylasen. *Proteus vulgaris* bildet aus L-Ornithin das Putrescin, aus  $\beta$ -Oxyglutaminsäure die  $\gamma$ -Amino- $\beta$ -Oxybuttersäure und aus L-Asparaginsäure  $\beta$ -Alanin. In älteren Literaturangaben wird die Decarboxylierung von Leucin und Serin beschrieben.

Abb. 9 zeigt im faulenden Leberbrei die Bildung von Aminen bei anaerober Fäulnis nach Beimpfung von *Proteus vulgaris* — Versuchstemperatur 25°. Autolytische Spaltung, die Entwicklung von Ammoniak und Kohlensäure verlaufen dem anaeroben Milieu entsprechend ungestört. Die Bildung von Aminen ergibt sich aus dem Mißverhältnis der freien Amino- und Carboxylgruppen; sie beginnt nach einigen Tagen und beschränkt sich auf den sauren Bereich. Die Amine sind von langem Bestand. Aminoxydasen, die den Flavinfermenten zugerechnet werden, haben sich nicht ausgewirkt.

### Zusammenfassung

Am Beispiel des Eiweißzerfalls untersuchten wir den Einfluß der Eigen- und Fremdfermente auf den postmortalen Zerfall an dem Gewebsbrei einer frischen Rinderleber. Die Untersuchungen erstreckten sich auf den proteolytischen Zerfall und den Abbau der Aminosäuren. Die Aufteilung des Fäulnishydrolysats erfolgte nach löslichen, mit Trichloressigsäure fällbaren und ungelösten stickstoffhaltigen Anteilen, nach freien Amino- und Carboxylgruppen, Ammoniumsalzen und Carbonaten. Die Untersuchung der gasförmigen Phase beschränkte sich auf den Nachweis von  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$ .

Bei ubiquitärer Keimbildung zeigt sich bei Anwesenheit von Sauerstoff ein ungestörter Abbau, der bei längeren Versuchszeiten das gesamte organische Material nach und nach in anorganische, vorzüglich gasförmige Produkte überführt. In anaerobem Milieu resultieren nach dem desaminierenden Zerfall der Aminosäuren unvollständig oxydierte Zerfallsstufen.

Bei weitgehender Ausschaltung bakterieller Keime durch Chloroform oder Achromycin verläuft der proteolytische Zerfall im wesentlichen ungestört; dagegen unterbleibt der Abbau der Aminosäuren: Die körpereigenen Fermente sind nicht in der Lage, den Abbau der Aminosäuren durchzuführen. Darüber hinaus entfällt im Sauerstoff-Milieu auch jeder weitere endgültige oxydative Zerfall der übrigen Grundstoffe. Die Beseitigung der Eigensubstanz bleibt nach dem Tode Fremdindividuen überlassen. Der Zerfall ist von der Fermentausrüstung der Keime abhängig. Das Studium mikrobiologischer Vorgänge wird hierdurch zu einem interessanten und wichtigen Teilgebiet der gerichtlichen Medizin.

Am Beispiel des *Proteus vulgaris* wird der Einfluß der Keimbesiedlung auf den postmortalen Zerfall in aerobem und anaerobem Milieu mit der hier vorliegenden Aminbildung dargestellt.

### Literatur

- BENDER, A. E., and H. A. KREBS: The oxydation of various synthetic  $\alpha$ -amino-acids by mammalian D-amino-acid-oxydase, L-amino-acid-oxydase of copra venom and the L- and D-amino-acid oxydases of *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* **46**, 210 (1950).
- BRIEGER, L.: Über Ptomaine. Berlin 1885.
- GALE, E. F.: The bacterial amino acid decarboxylases. *Advanc. Enzymol.* **6**, 1 (1946).
- GROSSMANN, W., F. SCHNEIDER u. J. TRUPKE: Aminosäuren und Peptide. In B. FLASCHENTRÄGER u. E. LEHNHARTZ, *Physiologische Chemie. Die Stoffe*, Bd. I. 1951.
- HINZBERG-LANG: *Medizinische Chemie*. 1951.
- HOFFMANN-OSTENHOF, O.: *Enzymologie*. Wien 1954.
- KREBS, H. A.: Oxydation of amino acids. *The Enzymes*, Vol. II, Part. I, p. 499. 1951.
- LEHNHARTZ, F.: Einführung in die chemische Physiologie, 11. Aufl. 1959.
- LEUTHARDT, F.: *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 14. Aufl. 1959.
- LIEB, H., u. W. SCHÖNIGER: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Bd. III, erster Bd.-Teil 1955.
- LORKE, D., u. O. SCHMIDT: Fäulnis und Verwesung im Experiment. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **41**, 236 (1952).
- Beitrag zum postmortalen Abbau des Schwefels in Abhängigkeit von der Redoxlage. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **42**, 164 (1952).
- SCHALES, O.: Amino-acid-decarboxylases. *The Enzymes*, Vol. II, Part. I, p. 216 1951.
- SCHMIDT, O., D. LORKE u. B. FORSTER: Studie über postmortale Abbauvorgänge. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **49**, 208 (1959).
- SLYKE, D. VAN: Bestimmung der Aminogruppen. In HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Bd. III, Teil 1, S. 312.
- P. A. MCFADYEN and P. HAMILTON: *J. biol. Chem.* **141**, 671 (1941).
- SPECHT, W.: Chemische Abbaureaktionen bei der Leichenzersetzung. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **33**, 138 (1937).
- STICKLAND, L. H.: *Biochem. J.* **28**, 1746 (1934); **29**, 288 (1935).
- STREET, H. E.: The degradation of amino-acids. In D. RUHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. VIII, S. 674. 1958.
- TURBA, F.: Aminosäuren und Peptide. In HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse*, Bd. III, Teil 2, 1707ff.
- VONDERBANK, H.: Aureomycin und Achromycin. Aulendorf i. Württ. 1956.
- WAGNER, H. J.: Einfluß der Antibiotica und Sulfonamide auf die Leichenfäulnis. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **49**, 714 (1959/60).
- WENNESLAND, B.: Keto-acid-decarboxylases. *The Enzymes*, Vol. II, Part. I, p. 183. 1951.

Prof. Dr. Dr. O. SCHMIDT,  
Institut für gerichtliche Medizin der Universität,  
Göttingen, Geiststr. 7