Milchsäuregärung der Glucose durch Peptone

Von der

Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

zur Erlangung der

Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften

genehmigte

Promotionsarbeit

vorgelegt von

Gottfried Schlatter
dipl. Ingenieur-Chemiker
aus Zürich

No. 295

Referent: *Herr Prof. Dr. E. Baur.*
Korreferent: *Herr Prof. Dr. v. Gonzenbach.*

SPRINGER-VERLAG
BERLIN HEIDELBERG GMBH
1922

ISBN 978-3-662-26934-3 ISBN 978-3-662-28406-3 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-28406-3

Meinen lieben Eltern in Verehrung gewidmet.

Milchsäuregärung der Glucose durch Peptone.

Von

Gottfried Schlatter.

(Aus dem Physikalisch-chemischen Institut der Eidgenössischen technischen Hochschule, Zürich.)

(Eingegangen am 21. April 1922.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Die nachfolgende Untersuchung ist eine Fortsetzung der vor Jahresfrist von *Emil Baur* und *E. Herzfeld*[1]) mitgeteilten Versuche, die als „Gärung ohne Hefe" bezeichnet worden waren. Es wurde von den Autoren gezeigt, daß in Zucker-Peptonlösungen unter gewissen Bedingungen eine Gärung des Zuckers einsetzt. Dieselbe lieferte zum größten Teil eine Säure, wahrscheinlich Milchsäure, und zum kleineren Teil, nämlich zu etwa 5% der gesamten Zersetzung, eine jodoformgebende Substanz, wahrscheinlich Alkohol, so daß man das Vorliegen einer gemischten, teils milchsäurebildenden, teils alkoholischen Gärung behaupten durfte. Die Autoren haben nach einem derartigen Effekt gesucht, indem sie sich von der Vorstellung leiten ließen, daß fermentierende Systeme durch eine geeignete Mischung sonst wohlbekannter Stoffe aufgebaut werden könnten. Denn nachdem *E. Herzfeld*[2]) nachweisen konnte, daß man Fermente mit peptischen und tryptischen Eigenschaften durch Mischung von Aminosäuren und Polypeptiden bereiten kann, war es naheliegend, auch für andere Gärungen, als für Proteolysen, die Annahme zu machen, daß die entsprechenden Fermente nicht sowohl Stoffe von unbekannter Zusammensetzung enthielten, an denen ihre Wirkung haftete, sondern daß ein Ferment aus analytisch längst bekannten Bestandteilen besteht, seine Wirkung aber nur in einem ganz bestimmten Mischungs- und Zerteilungszustand auszuüben vermag. Dann sollte es möglich sein, derartige wirksame Mischungen künstlich zu bereiten. Indem *Emil Baur* und *E. Herzfeld* diesen Weg einschlugen,

[1]) Diese Zeitschr. **117**, 96. 1921.
[2]) Diese Zeitschr. **68**, 402. 1915.

erhielten sie die genannten sucroclastischen Effekte, wenn sie in bicarbonatalkalischer Lösung Peptone und gallensaure Salze auf Traubenzucker einwirken ließen.

Die Versuche der Autoren waren mehr vorläufiger Art. Nach verschiedener Richtung forderten sie dazu auf, ins Einzelne verfolgt zu werden. Auf Anregung der Autoren habe ich es unternommen, die Versuche wenigstens nach einer bestimmten Richtung hin auszubauen. Es gelang mir, eine quantitative Vergärung des Traubenzuckers zu Milchsäure zu verwirklichen. Der Bereich meiner Untersuchung erstreckt sich auf die Durcharbeitung dieser Reaktion.

Vorbereitende Versuche.

Baur und *Herzfeld* haben mit zwei verschiedenen Peptonen gearbeitet, mit Pepton *Witte* und mit Pepton *Siegfried* (von A. G. vormals *B. Siegfried*, Zofingen, Schweiz). Die beiden Peptone verhielten sich verschieden, insofern als das letztere die Gärung rascher einleitete. Zusatz von gallensauren Alkalien hielten sie unter allen Umständen für unerläßlich. Hierzu ist aber zu bemerken, daß sich die Autoren auf Entbindung von Kohlendioxyd für sich allein nicht verließen, da auch im Blindversuch (d. h. wenn kein Zucker zugegen ist) eine solche eintreten kann, wenn genügende Mengen von Pepton und Bicarbonat genommen werden. Vielmehr hielten sie eine Gärung erst dann für gegeben, wenn die Jodoformprobe positiv ausfiel.

Den Umfang der Jodoformbildung hatte ich zunächst nachzuprüfen. Hierbei mußte ich die Erfahrung machen, daß die Bereitung gleich wirksamer Gallensalzfraktionen, wie sie *Baur* und *Herzfeld* zur Verfügung standen, auf Schwierigkeiten stieß. Nach der von den Autoren gegebenen Vorschrift[1]) verfahrend, bekam ich aus 500 g Rindergalle in der ätherunlöslichen Fraktion 37 g und in der ätherlöslichen Fraktion einige Gramme gallensaure Alkalien als hellgelbes Pulver. Die letztere Fraktion sollte die wirksame sein.

Indessen verhielten sich meine beiden Präparate gleich, nämlich so, daß die Jodoformreaktion stets nur schwach blieb, wenn auch, nach der Entbindung von Kohlendioxyd beurteilt, ein unzweifelhafter Gäreffekt vorlag. Zum Gelingen des Versuches hielten es *Baur* und *Herzfeld* für nötig, daß Zucker, Pepton und Bicarbonat unter dem Pistill zusammengerieben und in der frischbereiteten wässerigen Lösung von Gallensalzen unter Umrühren mit dem Pistill rasch aufgelöst werden. Diese Vorschrift genau einhaltend, bekam ich bei Variation der Pepton- und Bicarbonatmenge die Vergärungswerte der folgenden Tabelle I.

Der Versuch besteht darin, daß mit den in der Tabelle angegebenen Mengen von Pepton *Witte* und Bicarbonat je 2 g Traubenzucker (pu-

[1]) l. c. S. 101.

rissimum, wasserfrei, *Merck*) verrieben und in 10 ccm der 1 proz. Gallensalzlösung gelöst werden. Die Lösungen kommen in graduierte Saccharimeter und werden bei 37° in den Brutschrank eingestellt. Die freie Oberfläche in der Ampulle ist zweckmäßig mit Toluol zu überschichten. Zu jeder Probe gehört eine gleiche ohne Zucker. Die in dieser entwickelte Kohlensäure wird von der in der Hauptprobe entwickelten abgezogen. Die Unterschiede, gemessen in Kubikzentimeter, sind die in der Tabelle verzeichneten Werte.

Tabelle I.

Bicarbonat g	Pepton *Witte* in g				Beginn nach Tagen	Dauer in Stunden
	1,0 g ccm	0,5 g ccm	0,2 g ccm	0,1 g ccm		
1,0	2,5	1,1	0,6	0,1	sofort	4
0,5	1,4	0,2	0,1	0,1	„	4
0,2	5,6	6,0	5,6	5,5	2—4	2 Tage
0,1	6,2	5,1	5,0	6,0	3—6	2 „

Für die dritte und vierte Zeile ist die abzuziehende Menge 0, für die erste und zweite geht sie bis 1,3 ccm im Höchstfalle. Man erkennt einen schädlichen Einfluß einer zu hohen Salzkonzentration, dergestalt, daß deutliche Gäreffekte vielleicht mit Ausnahme der ersten Spalte, nur bei den Proben der dritten und vierten Zeile zu verzeichnen sind.

Die vergorenen Lösungen wurden nun angesäuert, mit wasserfreiem Natriumsulfat übersättigt, ein Teil abdestilliert und im Destillat die Jodoformprobe angestellt. Diese fiel nun wohl insoweit positiv aus, als Jodoform durch den Geruch deutlich wahrnehmbar wurde, während dies bei den blinden Proben nicht der Fall war; aber es war klar, daß im Vergleich mit der entwickelten Menge Kohlendioxyd die auf Alkohol zu beziehende Jodoformbildung nur den Charakter einer quantitativ ganz unbedeutenden Nebenreaktion besitzt.

Dasselbe Bild bekam ich auch, wenn das *Witte*-Pepton durch das Pepton *Siegfried* ersetzt wurde: undeutliche Gärwirkung in ungefähr gesättigter Bicarbonatlösung, deutliche in verdünnter, immer aber nur Spuren von der jodoformbildenden Substanz. Das Pepton *Siegfried* hat den Vorzug vor dem Pepton *Witte*, daß die Gärung rascher eintritt. Bei dem letzten muß es bedenklich erscheinen, daß die Gärung in den eigentlich allein in Betracht kommenden, an Bicarbonat verdünnten Lösungen erst nach 2 oder mehreren Tagen einsetzt. Um den Einwand möglicher Bakterientätigkeit zu begegnen, mußte man, vorläufig wenigstens, auf möglichst prompte Wirkung bedacht sein. Solche erreicht man mit dem Pepton *Siegfried*, z. B. gibt 1 g Pepton *Siegfried*, 2 g Glucose, 0,1 g Natriumbicarbonat in 10 ccm 1 proz. Gallensalzlösung aufgelöst, in 6—8 Stunden 5—6 ccm CO_2, während im Blindversuch durch die Säurenatur des Peptons etwa 1 ccm CO_2 entbunden werden.

Die sofort einsetzende Säurebildung fällt in die Augen. Es wird später nachgewiesen, daß diese Säure Milchsäure ist. Sie setzt eine ihr äquivalente Menge Kohlensäure aus dem Bicarbonat in Freiheit. Hierdurch wird der Verlauf bequem quantitativ verfolgbar. Aber die Jodoformreaktion bleibt viel schwächer als in den von *Baur* und *Herzfeld* mitgeteilten Versuchen.

Das nächstliegende war, zu versuchen, durch Variation der Gallensalzmenge diesem Mangel abzuhelfen. Dieses gelang nun zwar nicht, dafür stellte sich heraus, daß für die Milchsäuregärung, die in den hier behandelten Versuchen sehr nahezu rein auftritt, das *Gallensalz ganz entbehrlich* ist.

Gleichzeitig fällt eine andere Beschränkung fort; nämlich die Notwendigkeit, Pepton, Bicarbonat und Zucker erst zu verreiben und dann gemeinsam zu lösen. Vielmehr bekommt man die Milchsäuregärung auch dann, wenn die Stoffe, die zum Zustandekommen des gärkräftigen Systems notwendig sind, einzeln in Wasser aufgelöst und in beliebiger Reihenfolge vereinigt werden.

Daß zum Zustandekommen des beobachteten Effektes keiner der drei Bestandteile fehlen darf, wurde vielfach geprüft. Die folgende kleine Tabelle II gibt ein Beispiel:

Tabelle II.

In 10 ccm sind gelöst			
Pepton *Siegfried* g	Traubenzucker g	Natrium-bicarbonat g	CO_2 ccm
1	2	0	0*)
1	0	0,1	0
0	2	0,1	0
1	2	0,1	4

*) Gibt nach 24 Std. mit Bicarbonat versetzt, nicht sofort Gasentwicklung.

Nach diesen Feststellungen ließ ich die Frage nach den für ein stärkeres Hervortreten der alkoholischen Gärung nötigen Bedingungen fallen und beschränkte mich auf die Untersuchung der ohne Gallensalze so gut wie rein einsetzenden Milchsäuregärung der Glucose. Dieses Vorgehen empfiehlt sich wegen der Einfachheit des zu behandelnden Systems sowohl in bezug auf Zusammensetzung, wie in bezug auf den stofflichen Umsatz.

Konzentrationsabhängigkeit und ungefährer zeitlicher Verlauf.

Nachdem das Pepton *Siegfried* sich dem Pepton Witte weit überlegen gezeigt hat, wird die Konzentrationsabhängigkeit mit dem ersteren allein untersucht. Abgewogene Mengen der drei Bestandteile werden

in je 10 ccm destilliertem Wasser gelöst, in Saccharimeter gefüllt und die Gasentwicklung im Brutschrank bei 37° gemessen. Anfang und Ende, sowie der zeitliche Anstieg im groben Umriß werden vermerkt. Das Ende der Gärung fällt zusammen mit einer Ausflockung des Peptons; während der Gasentwicklung trübt sich die zunächst fast klare Gärlösung. Bei konstant gehaltenem Zuckergehalt (2 g Glucose auf 10 ccm Wasser) ergibt sich das Bild der Tabelle III und zugehörigen Kurventafel, Abb. 1a und 1b.

Tabelle III.

10 ccm enthalten 2 g Traubenzucker und				
Bicarbonat g	Pepton *Siegfried* 1,0 g ccm	0,5 g ccm	0,2 g ccm	0,1 g ccm
1,0	0	0,5	0,5	0,7
0,5	0,3	0,9	1,9	1,9
0,2	2,0	3,6	5,0	5,0
0,1	4,0	4,8	5,0	5,0
Beginn nach Stunden:	sofort	ca. 2	ca. 14	ca. 16

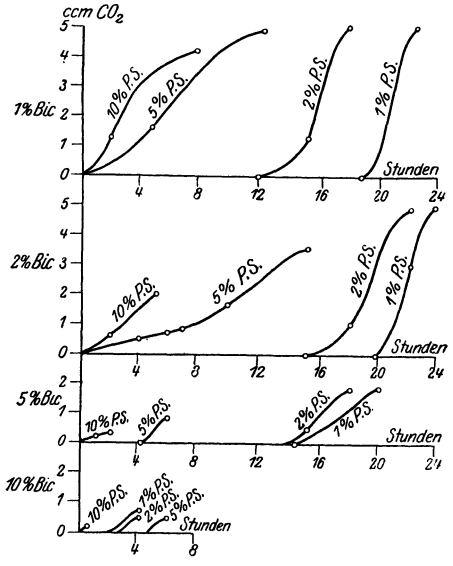


Abb. 1a.

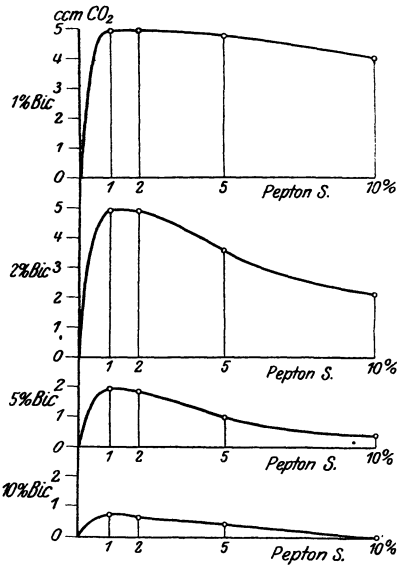


Abb. 1b.

Die Zahlenwerte der Tabelle bedeuten Kubikzentimeter CO_2, abzüglich derjenigen Mengen, die gleichzeitig im Blindversuch ohne Zucker erhalten werden. In den Versuchen der dritten und vierten Zeile der Tabelle war nichts abzuziehen, in denjenigen der beiden ersten Zeilen

wechselnde Mengen bis 2,5 ccm, steigend mit der Pepton- und Bicarbonatmenge. Diese Gasentbindung kommt nur von der Neutralisation des Peptons. Die Mehrzahl der Versuche ist doppelt oder dreifach ausgeführt worden. Die Abweichung der Einzelwerte ist nicht größer als das nur annähernd genaue Meßverfahren festzustellen gestattet.

Man erkennt folgendes:

a) Wachsende Konzentration des Bicarbonats verringert das Ausmaß des Umsatzes. 1% Bicarbonat ist ungefähr das Optimum. Unterhalb $^1/_2$% erlischt die Wirkung rasch.

b) Auch die Peptonmenge hat bei ungefähr 1% ihr Optimum. Es ist aber viel flacher, namentlich bei der optimalen Bicarbonatkonzentration (1%).

c) Der Beginn der Gasentwicklung tritt um so später ein, je weniger Pepton vorhanden ist. Der Verlauf der Gärung hat einen deutlich autokatalytischen Verlauf, d. h. die Gasentwicklung setzt langsam ein, wird dann rascher, um bei eintretender Flockung ziemlich plötzlich zum Stillstand zu kommen. Da die Gasentwicklung erst dann einsetzen kann, nachdem die Lösung an Kohlendioxyd etwas übersättigt ist, so bedeutet die Inkubationszeit bei den geringeren Pepton *S.*-Gehalten nicht etwa, daß die Zuckerzersetzung erst nach so viel Stunden anfängt, sondern nur, daß sie solange sehr geringfügig geblieben ist.

Sowohl die Umsatzgröße, als der zeitliche Verlauf der Gärung, ist von der Konzentration des Peptons und Bicarbonats in ganz gesetzmäßiger Weise abhängig und vollkommen reproduzierbar. Dies beweist, daß Pepton und Bicarbonat in ihrer Kombination die wirklichen Ursachen der Milchsäuregärung des Traubenzuckers sind.

Nun ist noch der Einfluß der Konzentration des Zuckers festzustellen. Die folgende Tabelle IV enthält die diesbezüglichen Versuche; zugleich sind in ihr noch Versuche mit weniger als 1% Pepton und Bicarbonat aufgenommen.

Tabelle IV.

Traubenzucker g	10 ccm enthalten: 0,1 g Pepton *Siegfried*		0,05 g Pepton *Siegfried*	
	0,1 g Bic. ccm	0,05 g Bic. ccm	0,1 g Bic. ccm	0,05 g Bic. ccm
1,0	6,2	3,4	4,8	2,5
0,5	4,7	5,0	6,8	2,2
0,25	5,1	3,7	6,2	3,3
0,1	6,5	2,6	4,2	3,3
0,05	3,0	3,5	1,9	2,2

Man sieht, daß herab bis zu 1% Zucker kein deutlicher Gang der Gärungswerte auftritt. Erst bei $^1/_2$% bemerkt man ein Nachlassen. Es

ist also das Ausmaß der Gärung in weiten Grenzen unabhängig vom Zuckergehalt.

Weiter unten wird gezeigt werden, daß bis zu einem Gehalt von 1—2% der Zucker erschöpfend vergoren werden kann.

Der genaue zeitliche Verlauf der Gärung.

Nach dem vorhergehenden Abschnitt eignen sich für genauere Untersuchung Mischungen mit etwa 2% Bicarbonat, 1—10% Pepton und einigen Prozenten Zucker. Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit geschieht im Nitrometer nach *Lunge*, deren Meßröhre von einem weiteren Glasmantel umgeben wird.

Der Zwischenraum wird mit Wasser gefüllt, das auf 37° erhitzt wird. Die Heizung besorgt ein in das Wasser getauchter Kohlenstab, der von Wechselstrom durchflossen ist. Der Temperaturausgleich wird durch Luftrührung bewirkt. Über Quecksilber als Sperrflüssigkeit wird das Nitrometer mit 50 ccm der Gärlösung beschickt. Das entwickelte Kohlendioxyd wird an der Teilung des Nitrometers abgelesen, wobei das Niveaugefäß dauernd nachgerückt wird. Wenn erforderlich, wird das Kohlendioxyd durch Öffnen des Hahnes abgelassen.

Die Angaben der folgenden Tabelle V beziehen sich sämtlich auf Lösungen, die 2% Bicarbonat enthalten, außerdem die in der Tabelle angeführten Mengen Pepton *S.* und Traubenzucker. Bei der Herstellung der Lösungen wurde von der inzwischen gemachten Erfahrung Gebrauch gemacht, daß es unbeschadet der Gärkraft zulässig ist, die Peptonzuckerlösung vorgängig der Zugabe des Bicarbonats auf dem siedenden Wasserbad zu erhitzen, wodurch die Bakterienkeime zum größten Teile (aber mit Ausnahme der Sporen) getötet werden. Mäßig langes Erhitzen beeinträchtigt die Gärfähigkeit nicht nur nicht, sondern übt sogar einen befördernden Einfluß aus.

Die Lösungen werden demgemäß folgendermaßen hergestellt: Zucker und Pepton werden in der Reibschale zusammengerieben, hierauf wird ein Drittel der Wassermenge langsam unter Rühren zugegeben. Nach völliger Lösung wird 20 Minuten auf dem siedenden Wasserbad sterilisiert, dann rasch filtriert und die restlichen $^2/_3$ Volumen Wasser, worin vorgängig das Bicarbonat gelöst wurde, zugefügt, umgeschüttelt, und die Lösung in das Nitrometer eingefüllt.

Die Reproduzierbarkeit der Lösungen mit 1% Pepton ist sehr gut, diejenige der mit 5 und 10% Pepton nicht so vollkommen, indem sowohl die Inkubationszeit, als der Endpunkt der Gärungen individuellen Schwankungen unterworfen sind, für die wahrscheinlich kleine Unterschiede der Handhabung bei der Bereitung der Lösungen verantwortlich sind. Die Art der Breibereitung scheint auf die Dispersität des Peptons auch noch nach dem Erhitzen auf dem Wasserbad von Einfluß zu sein. Je nachdem tritt raschere oder langsamere Flockung ein und damit ein früherer oder späterer Stillstand der Gärung. Wenn die Flockung

Tabelle V.
Die Zahlenwerte bedeuten ccm CO_2.

Zeit	10 proz. Pepton *Siegfr.*		5 proz. Pepton *Siegfried*			Zeit	1 proz. Pepton *Siegfr.*	
Std.	3 proz. Z.	1 proz. Z.	3 proz. Z.	1 proz. Z.	1 proz. Z.	Std.	3 proz. Z.	1 proz. Z.
1/2	0	0	—	—	—	15 1/2	0	0
1	12,5	4	—	—	—	16	2	1
1 1/2	25	10	—	—	—	16 1/2	10	5
2	37	19	—	—	—	17	17	11
2 1/2	55	28	—	0	—	17 1/2	27,5	21
3	68	37,5	—	1,5	—	18	35	25
3 1/2	75	45	0	6	—	18 1/2	—	—
4	83	51	1,5	10	—	19	—	—
4 1/2	—	57	6,0	12	—	19 1/2	54,5	52
5	100	71	9,5	15,5	—	20	—	—
5 1/2	—	—	—	—	—	20 1/2	—	—
6	—	—	—	—	0	21	—	—
6 1/2	—	—	25	35	2	21 1/2	81,5	75
7	134,5	99	35	44	5	22	—	—
7 1/2	—	—	44	50	—	22 1/2	94	88
8	—	110	—	—	12,5	23	—	—
8 1/2	—	115,5	—	—	14,5	23 1/2	107	101
9	165	115,5	65	75,5	21	24	—	—
9 1/2	175	—	—	—	26	24 1/2	—	—
10	185	—	—	—	31	25	124	115
10 1/2	194	—	87,5	98	40,5	25 1/2	—	—
11	204	—	—	—	48,5	26	128	115
11 1/2	—	—	101	110	56	26 1/2	—	—
12	215	—	—	112,5	64,5	27	—	—
12 1/2	223	—	110	—	76	27 1/2	—	—
13	227	—	—	112,5	88	28	—	—
13 1/2	—	—	118	—	—	28 1/2	—	—
14	235	—	—	—	104	29	—	—
14 1/2	—	—	125	—	108	29 1/2	—	—
15	240	—	125	—	—	30	128	—
15 1/2	244	—	—	—	112			
16	244	—	—	—	112			
18	244	—	125	—	112			
Nummerierung d. Kurven	I	II	III	IV	V		VI	VII

sofort oder schon nach 10 Minuten eintritt, so wird kein Zucker vergoren.

Die Zahlenwerte der Tabelle V sind auf der Kurventafel, Abb. 2 graphisch veranschaulicht. Namentlich die Kurven mit 5% Pepton zeigen deutlich den autokatalytischen Charakter. Der Abbruch der Gärung bei ca. 115 ccm CO_2 in den Lösungen mit 1% Zucker erfolgt fast plötzlich und zwar, wie die Rechnung lehrt, wegen völligen Verbrauchs des Zuckers. Mit den Daten: Litergewicht des Kohlendioxyds bei 37° und 720 mm: 1,65 g, Löslichkeit bei 37° und 720 mm: 0,1 g in 100 g Wasser, liefert die Rechnung 115 ccm CO_2 = 0,44 g Milchsäure. Zucker vorhanden: 0,50 g. — Zu den Versuchen mit 3% Zucker haben

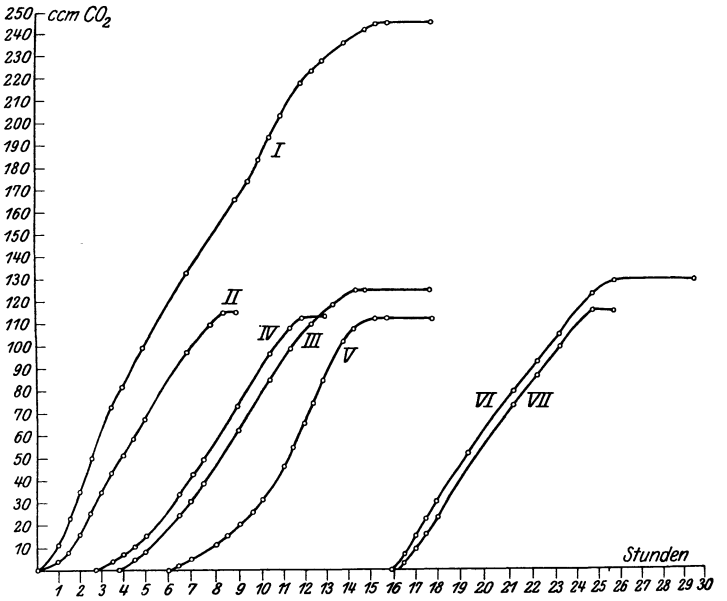


Abb. 2.

wir Stillstand der Gärung nach Vergärung von ungefähr $^1/_3$, bzw. $^2/_3$ der vorhandenen Menge.

Man sieht also, daß der Stillstand der Gärung bei Überschuß des Zuckers von der Flockung des Peptons, bei Unterschuß des Zuckers aber von dessen Verbrauch beherrscht wird.

Die Kurven bestätigen den früheren Befund, daß Zunahme der Peptonkonzentration die Inkubationszeit abkürzt und die Dauer der Gärung verlängert.

Analytische Untersuchung und Umsatz-Bilanz.

Um für die analytische Bestimmung der Produkte der Gärung genügende Stoffmengen zu bekommen, wurde die Gärung mit je 750 ccm Lösung vorgenommen, die in einer Kochflasche im Thermostaten bei 37° sich befanden, während das entwickelte Kohlendioxyd in einer Kugelburette über gesättigter Kochsalzlösung als Sperrflüssigkeit aufgefangen wurde.

Nach vollzogener Gärung ist in der Lösung der übrige Zucker, die Milchsäure und die jodoformgebende Substanz (Alkohol) zu bestimmen. Vorgängig ist die Milchsäure zu identifizieren. Zu diesen Bestimmungen dienten die folgenden Methoden:

a) Identifizierung der Milchsäure.

Die vergorene Lösung wird angesäuert, der Peptonniederschlag zentrifugiert, alsdann die Lösung ausgeäthert und die ätherische Lösung verdampft. Es ver-

bleibt ein Sirup, der in der Porzellanschale auf dem Wasserbad vollständig von flüchtigen Bestandteilen befreit wird. Darübergehaltenes Lackmuspapier färbt sich nicht rot; es sind also keine flüchtigen Fettsäuren vorhanden. Der Rückstand muß eine Oxysäure sein. Derselbe gibt folgende Reaktionen:

1. Blaue Eisenphenolatlösung färbt sich mit einigen Tropfen des Rückstandes gelb, also eine Oxysäure ist vorhanden.

2. 0,2 ccm des Rückstandes werden mit 2 ccm konz. H_2SO_4 2 Minuten im Wasserbad erhitzt, erkalten gelassen, mit 1—2 Tropfen einer 5 proz. weingeistigen Kodeinlösung versetzt; eine stark braune Färbung zeigt Milchsäure an.

3. Einige Tropfen werden mit 5 ccm konz. H_2SO_4 und einem Tropfen konz. $CuSO_4$-Lösung erhitzt (im Wasserbad); nach dem Abkühlen werden 2—3 Tropfen ca. $^1/_2$ proz. weingeistiger Thiophenlösung zugegeben und erwärmt. Es tritt eine tief kirschrote Färbung auf. Milchsäure ist anwesend.

4. 1 ccm des Rückstandes wird mit kaltgesättigter alkoholischer Zinkacetatlösung versetzt. Nach einigen Stunden haben sich kleine feine Nadeln von Zinklactat gebildet. Die Milchsäure ist damit qualitativ sicher nachgewiesen.

5. Die Lösung des Ätherabdampfrückstandes in Wasser hat kein optisches Drehungsvermögen. Die entstandene Milchsäure ist also die gewöhnliche, optisch inaktive Gärungsmilchsäure.

6. Mikroskopische Prüfung des Zinklactates. Mehrere Gramme der im Gärversuch aus Zucker dargestellten Milchsäure werden wie unter 4. in das Zinksalz verwandelt; dasselbe wird abgesaugt und aus Wasser umkrystallisiert. Hierbei erhält man feine Nadeln, die unter dem Mikroskop meßbar sind. Ein Vergleichspräparat wird hergestellt aus käuflichem Natriumlactat durch Ansäuern seiner wässerigen Lösung, Ausäthern usf. wie oben, schließlich Umkrystallisieren des Zinnlactates aus Wasser. Beide Krystallisationen erweisen sich unter dem Mikroskop als identisch. Die Krystalle sind Prismen mit gerader Auslöschung. Der Winkel zwischen Prisma und Doma beträgt 118°, derjenige der beiden Domenflächen 124°.

7. Analyse des Zinklactates. Das Zinksalz der Gärungsmilchsäure ist von *Buff*[1]) analysiert worden. Es hat die Formel $(CH_3CHOHCOO)_2Zn \cdot 3\,H_2O$. Danach enthält es 18,1% H_2O und 21,9% Zn. Mein aus dem Gärversuch gewonnenes Zinklactat ergab bei der Analyse: 0,0608 g Zinklactat aus dem Exsiccator wiegen nach 24 Stunden Luftbad bei 100°: 0,0501 g, entspricht 17,7% H_2O.

1,2801 g Zinklactat werden als Zinksulfid gefällt und als Zinkoxyd gewogen. Erhalten 0,4220 g ZnO = 21,5% Zn.

b) Jodoformprobe.

Von der angesäuerten und durch Zentrifugieren geklärten Gärlösung wird die Hälfte (etwa 300 ccm) abdestilliert. Das Destillat wird mit viel Pottasche versetzt und auf 60° erhitzt unter Eintragen von Jod, bis es nicht mehr entfärbt wird. Geruch nach Jodoform und Abscheidung der bekannten gelben Krystallflitter beweisen die Anwesenheit eines jodoformgebenden Stoffes. In sämtlichen Versuchen betrug die Abscheidung nur wenige Milligramm. Die Konzentration des mutmaßlich vorhandenen Alkohols ist sonach zu gering, um ihn durch seine Reaktion mit p-Nitrobenzoylchlorid identifizieren zu können.

c) Bestimmung des Zuckers.

Nach der Gärung wird qualitativ mit *Nylanders* Reagens (2 g Wismutnitrat und 10,4 g Seignettesalz in 100 ccm 8 proz. Natronlauge) auf Zucker geprüft. In denjenigen der unten tabellierten Versuche, in denen in der Spalte für Glucose

[1]) Liebigs Ann. d. Chem. **140**, 159. 1866.

eine Null steht, verlief die Prüfung (schwarzer Niederschlag nach dem Aufkochen) negativ.

Zur quantitativen Bestimmung des unvergorenen Zuckers kann die Polarisierung nicht verwendet werden wegen der Anwesenheit linksdrehender Aminosäuren. Daher wurde der Zucker in der zentrifugierten Gärlösung nach *Fehling* in der üblichen Weise titriert. Bekanntlich wird die *Fehling*sche Lösung so eingestellt, daß zur Entfärbung von 10 ccm der Kupfersulfatlösung 0,1 g Zucker gebraucht wird. Werden also z. B. von der vergorenen Lösung 11,75 ccm gebraucht, so sind in 750 ccm enthalten:

$$\frac{750 \cdot 0{,}1}{11{,}75} = 6{,}29 \text{ g Glucose.}$$

Nach diesem Verfahren sind die in der unten folgenden Tabelle VI eingetragenen Zuckerwerte bestimmt.

d) Bestimmung der Milchsäure.

Wegen des ungünstigen Teilungsverhältnisses der Milchsäure [etwa 1 : 12 nach *Pinnow*[1])] ist ein erschöpfendes Ausäthern aussichtslos. Die Milchsäure wurde daher bei allen Gärungsanalysen, bei denen keine oder nur sehr kleine Mengen Zucker unvergoren blieben, nach dem Verfahren von *Möslinger*, verbessert von *Baragiola* und *Schuppli*[2]), folgendermaßen durchgeführt:

25 ccm der vergorenen und zentrifugierten (vorher mit verdünnter Salzsäure angesäuerten) Lösung, die höchstens $3^0/_{00}$ Milchsäure enthalten darf (aus der Kohlendioxydentwicklung kann dies berechnet werden), wird mit 25 ccm Wasser und 5 ccm einer 10 proz. Bariumchloridlösung versetzt und mit heißgesättigter Bariumhydroxydlösung neutralisiert; nach dem Eindampfen auf ca. 15 ccm, wobei die Lösung genau neutral gehalten werden muß, bringt man sie in einen Mischzylinder und läßt erkalten. Man spült mit 96 proz. Alkohol nach und füllt damit unter stetem Umrühren auf 100 ccm auf. Man filtriert durch ein mit Uhrglas bedecktes Faltenfilter (Dauer 3 Stunden). Vom Filtrat werden 75 ccm in einem Kölbchen mit 25 ccm 5 proz. Natriumsulfatlösung versetzt, umgeschüttelt, etwa $^1/_4$ Stunde absetzen gelassen und das Bariumsulfat durch ein Faltenfilter abfiltriert Vom Filtrat werden 75 ccm in einer Platinschale eingedampft, verkohlt und die Asche weißgebrannt (Dauer ca. 2 Stunden). Nach dem Abkühlen wird mit genau eingestellter $^n/_5$-Salzsäure aufgenommen, wobei das aus Bariumlactat entstandene Bariumcarbonat gelöst wird; hierauf wird filtriert und mit $^n/_5$-Kalilauge zurücktitriert mit Methylorange als Indicator. Daraus läßt sich die Milchsäure leicht berechnen. Aus 7,5 g Zucker wurden 7,2 g Milchsäure gefunden (bei Versuch Nr. 2). Damit ist die quantitative Milchsäuregärung bestätigt. Die Milchsäurebestimmungen nach *Möslinger* können, wenn nicht genau nach Vorschrift verfahren wird, zu große oder zu kleine Werte liefern. Von einer Gärlösung müssen mehrere Milchsäurebestimmungen gemacht werden. Wenn diese miteinander und mit dem aus der Kohlendioxydentwicklung berechneten Wert übereinstimmen, so kann die Bestimmung als richtig angesehen werden.

In den Versuchen 7 und 8 der Tabelle VI ist die Milchsäurebestimmung unterblieben wegen der großen Menge Pepton (10%). Man kann aber indirekt aus der gemessenen Kohlendioxydmenge auf die gebildete Milchsäure zurückschließen, indem für das Litergewicht des Kohlendioxyds bei 15° und 720 mm: 1,75 g, und für die Löslichkeit bei 37° und 720 mm: 0,1 g in 100 g Wasser angesetzt wird. Der so berechnete Wert für die Milchsäure ist etwas zu klein, teils wegen Über-

[1]) *J. Pinnow*, Zeitschr. f. analyt. Chemie **54**, 321. 1915.

[2]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **27**, 842. 1914.

sättigung der Gärlösung an Kohlendioxyd, teils wegen Verlust durch Absorption über der Sperrflüssigkeit.

Die Tabelle VI enthält 10 nach den obigen Methoden vollständig durchgeführte Versuche.

Tabelle VI.

Versuchs-nummer	750 ccm Lösung enthalten: vor der Gärung: Bic. g	Glucose g	Pepton S. g	nach der Gärung: Glucose g	Milch-säure g	Jodo-form mg	Menge CO_2 in Litern bei 15° gemessen	Beginn der CO_2-Entwicklung nach Stunden	Dauer der Gärung in Stunden
1	7,5	7,5	7,5	0	6,9	2—3	1,4	16	6
2	7,5	7,5	7,5	0	7,2	2—3	1,4	16	6
3	7,5	15,0	7,5	6,4	8,1	2—3	1,6	15	6
4	7,5	15,0	7,5	6,3	8,1	2—3	1,6	15	6
5	7,5	7,5	37,5	0	6,9	2—3	1,5	8	8
6	15,0	15,0	37,5	6,2	8,2	2—3	1,6	8	8
7	15,0	15,0	75,0	0	11,2	12	2,7	sofort	12
8	15,0	22,5	75,0	7,0	11,2	12	2,7	sofort	14
9	7,5	0	7,5	0	0	0	0	—	—
10	15,0	0	75,0	0	0	0	0,2	sofort	3

Die Versuche 9 und 10 sind zuckerfreie Kontrollen. Im 7. und 8. Versuch steht unter „Milchsäure" ein „berechneter" Wert, der nach der Kohlendioxyderzeugung geschätzt ist. Statt 11,2 g sollte der Wert etwa 15 g sein. Der Grund für das Zurückbleiben dieser Zahl ist schon angegeben. Legt man aber das gemessene Kohlendioxydvolumen vom 1. und 2. Versuch zugrunde und rechnet damit die dort gefundene Milchsäuremenge proportional um, so würde man ungefähr zu der richtigen Zahl kommen.

In den Versuchen 1 bis 6 ist die Summe der nach der Gärung bestimmten Mengen von Glucose plus Milchsäure nahe gleich der vor der Gärung vorhandenen Glucose. Hiermit ist bewiesen, daß die Gärung dargestellt wird durch die Gleichung: $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_3H_6O_3$.

In den Versuchen von *Baur* und *Herzfeld* betrug die Milchsäuregärung (nach der Kohlendioxyderzeugung beurteilt) etwa 95% des gesamten Umsatzes; der Rest war wahrscheinlich alkoholische Gärung. In den vorliegenden Versuchen kommt auf diese Nebenreaktion nur etwa $^1/_{0000}$ des Umsatzes.

Das Verhalten des Peptons.

Die analytische Untersuchung, die im vorigen Abschnitt behandelt wurde, wäre unvollständig, wenn die Veränderungen, die am Pepton vor sich gehen, außer acht gelassen würden. Wie schon beschrieben, tritt während der Gärung eine äußerlich erkennbare Veränderung ein. Die zuerst fast klar durchsichtige Gärlösung wird milchig trübe und gleichzeitig setzen sich langsam gröbere Flocken ab. Gegen den Schluß der Gärung ist starke Flockung vorhanden; die überstehende Lösung wird wieder klar und die Gasentwicklung hört auf. Flockungsvorgänge dieser

Art unterliegen einem autokatalytischen Verlauf[1]). Es scheint, daß die Milchsäuregärung gerade dieser Flockung parallel geht und daher ein entsprechendes Zeitgesetz befolgt. Nur während der Dispersitätsänderung bekommen wir den Zuckerzerfall als *induzierte* Reaktion. Dieser Umstand ist schon von *Baur* und *Herzfeld* betont worden. Die Autoren deuten auch an, daß die Dispersität nicht die einzige Änderung ist, die am Pepton vor sich geht, sondern daß gleichzeitig ein hydrolytischer Vorgang stattfindet.

Die *Hydrolyse oder Autolyse des Peptons* habe ich quantitativ untersucht und gefunden, daß der Gehalt an freien Aminosäuren während der Gärung und *nur* während derselben eine *starke Zunahme* erfährt.

Für die Dosierung freier Aminosäuregruppen steht uns in der Reaktion mit Ninhydrin (Triketohydrindenhydrat) ein ausgezeichnetes Hilfsmittel zu Gebote. Es ist von *E. Herzfeld*[2]) gezeigt worden, daß jede freie Aminosäuregruppe, einerlei zu welcher einfachen oder verketteten Aminosäure sie gehört, gleichviel zu der Erzeugung des blauen Farbstoffes beiträgt, der mit Ninhydrin entsteht und dessen Menge colorimetrisch leicht gemessen werden kann. Hierbei dient eine Vergleichslösung, die mit einer bekannten Menge, z. B. von Glykokoll, bereitet wurde, als Standard. Die so durch colorimetrischen Vergleich erhaltenen Werte kann man entweder in Grammen Glykokoll oder in Grammen Stickstoff ausdrücken. In der unten folgenden Tabelle VII ist der letztere Ausdruck gewählt. Die Bestimmung wird nach *E. Herzfeld* folgendermaßen ausgeführt:

1 ccm der zu untersuchenden Lösung wird mit ca. 10 ccm Alkohol versetzt, das alkoholische Filtrat in einer Porzellanschale unter Zugabe von 0,5 ccm einer 1 proz. Lösung von Triketohydrindenhydrat eingedampft, nachdem die Lösung durch Zutropfen von verdünnter Natronlauge genau gegen Lackmus neutralisiert worden ist. Dann sofort aufgenommen mit 90 proz. Alkohol in mehreren Portionen, wobei sich eine tiefblaue oder violette Lösung bildet. Die Lösung wird colorimetriert mit einer Vergleichslösung, die aus 1 ccm einer 1 promill. Glykokollösung hergestellt wird. Es werden jeweilen 3 Parallelbestimmungen nebeneinander aus-

Tabelle VII.

Versuchs-nummer	Zusammensetzung der Gärlösung 750 ccm enthalten:			Ninhydrintiter von 750 ccm Lösung in g Stickstoff	
	Bic. g	Zucker g	Pepton S. g	vor der Gärung	nach der Gärung
1	7,5	7,5	7,5	0,135	0,34
2	7,5	7,5	7,5	0,135	0,37
3	7,5	15,0	7,5	0,140	0,41
4	7,5	15,0	7,5	0,135	0,41
5	7,5	7,5	37,5	0,67	1,12
6	15,0	15,0	37,5	0,67	1,12
7	15,0	15,0	75,0	1,36	2,24
8	15,0	22,5	75,0	1,36	2,40
9	7,5	0	7,5	0,135	0,12
10	15,0	0	75,0	1,36	1,00

[1]) *Freundlich* und *N. Ishizaka*; Kolloid-Zeitschr. **12**, 230. 1913.
[2]) *E. Herzfeld*, diese Zeitschr. **59**, 249. 1914.

geführt. Bei Anwesenheit von sehr viel Aminosäuren soll die zu untersuchende Lösung zuerst auf das 10fache Volumen verdünnt und davon 1 ccm zur Bestimmung verwendet werden.

In den Versuchen 1—10 der Tabelle VI sind die Ninhydrinwerte ermittelt worden. Dieselben stehen in der Tabelle VII verzeichnet.

Der Aminotiter (ausgedrückt in Grammen Stickstoff auf 750 ccm) wird vor der Gärung, d. h. unmittelbar nach der Bereitung der Lösungen, und nach der Gärung, d. h. im allgemeinen nach 24 Stunden, bestimmt. Wir erhalten das belangreiche Ergebnis, daß der Aminotiter während der Gärung sich verdoppelt oder verdreifacht. Im Blindversuch dagegen bemerkt man keine solche Zunahme, sondern sogar eine kleine Abnahme, was auf einen Reversionsvorgang hinweist. Es wird weiter unten gezeigt, daß der während der Gärung einsetzende autolytische Prozeß nicht so sehr darin besteht, daß niedere Aminosäuren abgespalten werden, sondern darin, daß sich höhere Polypeptide in niedere Peptide aufspalten. Dieser Vorgang scheint mit der Gärung in einer notwendigen Weise verflochten oder gekoppelt zu sein. Diese Feststellung gewährt einen tieferen Einblick in das Wesen der vorliegenden Gärung. Wie schon *Baur* und *Herzfeld* darlegten, muß sich daraus eine neue Auffassung fermentativer Prozesse entwickeln, nämlich deren Einreihung unter die induzierten Reaktionen.

Die Rolle des Bicarbonats.

Zusatz von Natriumbicarbonat ist eine unerläßliche Bedingung, um die Milchsäuregärung in Gang zu bringen. Es läßt sich feststellen, daß das Salz als Puffer wirkt zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration. Denn es kann durch geeignete andere, die Neutralität regelnde Salze ersetzt werden. Die gewöhnlich hierzu verwendeten Phosphatgemische sind zwar untauglich, da sie zu rasche Flockung des Peptons hervorrufen. Wohl aber gelingt es, die Milchsäurebildung bei Zusatz von Natriumacetat einzuleiten, einen Puffer von sehr schwacher Alkalität, der seiner einwertigen Ionen wegen nicht stärker flockend wirkt als Bicarbonat.

Folgende Lösungen wurden im Nitrometer bei 37° beobachtet:

I. 0,75 g Natriumacetat + 0,75 g Traubenzucker + 0,75 g Pepton Siegfried + 75 ccm Wasser.

II. 1,5 g Natriumacetat + 0,75 g Traubenzucker + 0,75 g Pepton Siegfried + 75 ccm Wasser.

In beiden Lösungen tritt keine Gasentwicklung ein. I. bleibt während einigen Tagen klar und reagiert dann noch schwach alkalisch. II. trübt sich nach einigen Stunden zunehmend. Tags darauf wird gesättigte Natriumbicarbonatlösung zugegeben. Sofort entwickeln sich etwa 40 ccm Kohlendioxyd, zum Zeichen, daß eine entsprechende Säurebildung stattgefunden hat.

Es ist also möglich, das Bicarbonat durch Acetat zu ersetzen, wenn man die richtigen Mengenverhältnisse einhält. Die Rolle des Bicarbonates als Puffer scheint hiermit befriedigend aufgeklärt zu sein.

Die Eigenart der Peptone.

Es ist in einem früheren Abschnitt die Wirksamkeit des Pepton Witte mit der des Pepton Siegfried verglichen und festgestellt worden, daß das zweite dem ersten weit überlegen ist. In der Tat bekommt man mit

Lösungen, die 1% Bicarbonat, 1% Zucker und 1% Pepton Witte enthalten, erst nach mehreren Tagen eine Gasentwicklung, die mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist, weil inzwischen faulige Zersetzungen eingetreten sein können.

Man mußte fragen, womit dieser Unterschied im Verhalten der beiden Peptone zusammenhängt. Hier war zunächst daran zu denken, daß der Grad des Eiweißabbaus von Einfluß sein könnte. Das Pepton Siegfried ist stärker aufgespalten. Es enthält keine Albumosen, d. h. es bleibt die Reaktion mit Sulfosalicylsäure aus, wogegen das Pepton Witte damit einen Niederschlag erzeugt. Ich habe nun versucht, das Pepton Witte in das andere Pepton zu verwandeln, indem die wässerige Lösung des Wittepeptons 2—3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt wurde. Es treten dabei Hydrolysen ein, wie daraus klar erkannt werden kann, daß die Peptonlösung nach der Erhitzung einen um etwa 30% höheren Ninhydrinwert besitzt. Eine so behandelte Pepton Witte-Lösung hat nun in der Tat eine verbesserte Gärwirkung. Die Inkubationszeit in dem obigen 1 proz. Gärgemisch findet sich herabgesetzt von etwa 6 Tagen auf 35 Stunden. Immerhin ist sie noch doppelt so lange wie beim Pepton Siegfried, auch ist die Gasentwicklung bedeutend langsamer.

Es muß also noch einen anderen Unterschied zwischen den beiden Peptonen geben. Ich habe nun zunächst eine Anzahl anderer Peptone auf ihre Gärkraft untersucht, wobei sich herausstellte, daß es zwei Kategorien gibt, eine „unwirksame" und eine „wirksame".

Unwirksam sind:

Pepton Witte, Pepton Roche, Pepton Merck sine sale.

Wirksam sind:

Pepton Siegfried, Pepton Merck e carne, Pepton Merck ex albumine.

Die erste Kategorie verhält sich übereinstimmend so, wie für Pepton Witte schon angegeben (also keine Gärung in 24 Stunden in der 1 proz. Mischung; sofortige, aber nur ca. 4 Stunden andauernde Gärung mit 10% Pepton). Die zweite Kategorie verhält sich wie Pepton Siegfried, aber mit quantitativer Abstufung, indem dieses noch in $^1/_2$ proz. Lösung wirksam ist, während für die beiden anderen 1 proz. Lösungen zum gleichen Effekt benötigt werden.

Die Aufklärung brachte die quantitative Analyse der Peptone. Es werden folgende Bestimmungen vorgenommen:

a) *Bestimmung des Aschengehaltes durch Veraschung.*

b) *Bestimmung der Phosphorsäure* (P_2O_5) *in der Asche.*

Der Phosphorsäuregehalt des Peptons wird nach *C. Neuberg*[1]) ermittelt.

5 g Pepton Witte werden in einer Platinschale verascht, angesäuert, filtriert und genau neutralisiert. 5 ccm einer Lösung, die 30 g Eisessig und 100 g Natriumacetat in einem Liter enthält, werden zugegeben. Nach dem Erwärmen wird

[1]) *C. Neuberg*, Der Harn usw. Bd. 1, S. 144. 1911.

vorsichtig aus einer Pipette Uranylnitratlösung zulaufen gelassen. Man tüpfelt auf mit Ferrocyankalium befeuchtetem Filtrierpapier, bis eine bleibende Braunfärbung auftritt. Dies zeigt das Ende der Titration an; die Lösung ist dabei grün geworden. Wenn die Uranlösung 35,461 g Uranylnitrat in einem Liter enthält, so zeigt 1 ccm dieser Lösung 5 mg P_2O_5 an.

c) *Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl.*

d) *Bestimmung des Stickstoffs im Phosphorwolframsäurenniederschlag.*

In demselben befinden sich die Polypeptide und ein Teil der Aminosäuren, während die aliphatischen Monoaminosäuren gelöst bleiben. Die Phosphorwolframatlösung wird bereitet, indem man 60 g Natriumwolframat und 100 g Natriumphosphat in 500 ccm Wasser löst. 10 ccm einer 10 proz. Peptonlösung werden mit 20 ccm verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit folgender Lösung bei 30° gefällt: 9 ccm Wasser werden mit 3 ccm konz. Schwefelsäure und 38 ccm Phosphorwolframatlösung vermischt und damit die Peptonlösung gefällt, wobei sofort ein weißer Niederschlag entsteht, der 2 Tage stehengelassen werden muß[1]). Nach dem Abnutschen und Trocknen wird der Niederschlag kjeldahlisiert.

e) *Bestimmung des Aminosäurestickstoffes* im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag mit Ninhydrin.

f) Bestimmung der offenen nicht verketteten Aminosäuregruppen mit Ninhydrin (*Ninhydrintiter*) in der ursprünglichen Peptonlösung und in der Peptonlösung nach der Gärung.

g) *Bestimmung des Stickstoffgehaltes in der Flockung nach der Gärung.*

Tabelle VIII enthält die vollständigen Angaben für fünf Peptone.

Tabelle VIII.

Die Zahlenwerte bedeuten Gewichtsprozente.

	Pepton Witte	Pepton sine sale Merck	Pepton Siegfried		Pepton e carne Merck	Pepton ex albumine Merck
			vor der Gärung	nach der Gärung		
Asche	2,50	1,3	5,79	5,79	5,19	6,51
P_2O_5	0,07	Spuren	1,75	1,75	0,63	0,46
Gesamtstickstoff . . .	11,8	12,8	10,9	10,9	10,2	9,6
Stickstoff i. d. Flockung	—	—	—	0,48	—	—
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag	10,7	11,2	9,7	9,4	8,5	8,3
Aminostickstoff i. Filtrat	0,36	0,30	0,39	0,40	0,20	0,20
Gesamt-Aminostickstoff-(Ninhydrintiter)	1,4	2,6	1,5	4,4	2,3	1,7

Man sieht sofort, daß die einzelnen Peptone sich nicht allzusehr unterscheiden in bezug auf den Gesamtstickstoff und dessen Verteilung auf die verschiedenen Fraktionen, daß dagegen starke Unterschiede bestehen im Aschengehalt, namentlich aber in bezug auf Phosphorsäure. Die beiden „unwirksamen" Peptone (Witte und Merck sine sale) sind praktisch frei von Phosphorsäure, in den „wirksamen" Peptonen (Sieg-

[1]) *E. Baur* und *H. Barschall*, Arbeit. d. Kais. Gesundsheitsamtes Berlin **24**, 552. 1906.

fried, Merck e carne und Merck ex albumine) stuft sich die Wirksamkeit deutlich mit dem Phosphorsäuregehalt ab.

Dieser Befund ist sehr bedeutungsvoll; kennt man doch den maßgebenden Einfluß, den die Phosphate bei der Zymasegärung[1]) und im Stoffwechsel des Muskels[2]) entfalten.

Es war natürlich sofort zu prüfen, ob Zusatz von Dinatriumphosphat zum Pepton Witte dessen Gärkraft auf die Stufe der phosphorsäurehaltigen Peptone bringe. Angesetzt wurde die 1 proz. Gärmischung (1% Pepton Witte, 1% Zucker, 1% Bicarbonat) unter Zusatz von 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 und 1,0 g Dinatriumphosphat auf 50 ccm. In allen Fällen tritt aber zu rasche Flockung durch das Phosphorsäureion ein, wodurch Gärung verhindert wird. Es scheint, daß die Phosphorsäure im Pepton irgendwie organisch gebunden ist. Wie sich dies verhält, muß noch weiter untersucht werden.

Wirkung der Antiseptica und bakterielle Untersuchung.

Alles Vorangehende über die Milchsäuregärung der Glucose gilt unter der Voraussetzung, daß die untersuchte Reaktion keine Bakterienwirkung ist. Ob eine solche Einwirkung ausgeschlossen ist, mußte besonders untersucht werden. Hierbei genoß ich die schätzenswerte Hilfe des Assistenten am Hygienisch-bakteriologischen Institut der Eidg. Techn. Hochschule, Herrn *Acklin*, und die tätige Anteilnahme des Vorstandes des Institutes, Herrn Prof. Dr. W. v. *Gonzenbach*. Beiden Herren bin ich für ihre Unterstützung zu großem Danke verpflichtet.

Die Peptone sind von Haus aus *nicht steril*. Plattenversuche haben gezeigt, daß der Bakteriengehalt von Pepton Siegfried und Pepton Witte ungefähr gleich ist.

1 ccm einer 1 proz. Lösung enthält etwa 250 Bakterien. Nun kann man allerdings den größten Teil davon abtöten durch Erhitzen der Pepton-Zuckerlösung auf dem Wasserbad. Allein die Sporen widerstehen der Zerstörung. Auch dürfte es schwer sein, den Gärversuch vollkommen steril durchzuführen. Mindestens das Bicarbonat kann nicht mitsterilisiert werden. Unter diesen Umständen scheint es angezeigt, den Gärversuch mit Antisepticis durchzuführen. Die bei Fermentstudien meist gebrauchten Antiseptica sind Chloroform und Toluol. Es genügt zur Hintanhaltung jeder Bakterienentwicklung aber nicht, die Gärlösungen mit diesen Flüssigkeiten zu über- oder unterschichten. Vielmehr muß mit den Antisepticis kräftig durchgeschüttelt werden, um dieselben in feinen Tröpfchen in der Gärlösung zu verteilen. Eine solche Behandlung verträgt aber die Peptonlösung nicht. Mit Toluol geschüttelt, trübt sie sich sogleich stark und die Gärung unterbleibt. Noch schlimmer wirkt Chloroform und auch Quecksilberchlorid: Es entstehen sofort Flockungen, die erfahrungsgemäß die Gärfähigkeit aufheben, wo immer sie sich zeigen. Es muß einer späteren systematischen Durchforschung vorbehalten bleiben, zu entscheiden, ob sich Antiseptica finden lassen, die zwar alles Bakterienwachstum hintanhalten, sonst aber die Peptonlösung in ihrer Kolloidität so unbeeinflußt lassen, daß ihre Gärkraft unverändert bleibt.

[1]) *O. Meyerhof*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 185. 1918.
[2]) *Embden-Laquer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 94. 1914.

Es gibt noch eine andere Art der Sterilisation, die sog. „fraktionierte Sterilisation". Sie erfolgte durch Erhitzen im Dampftopf während einer halben Stunde, unter Wiederholungen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, entsprechend der Behandlungsweise von leichtzersetzlichen, meist zuckerhaltigen Nährsubstraten in der bakteriologischen Technik. Die wiederholte Erhitzung auf 100° hat den Zweck, die inzwischen ausgekeimten Sporen zu vernichten. Die Sterilität wird so auch erreicht; gleichzeitig tritt aber auch eine sichtliche Veränderung der Peptonlösung auf, indem sich braune Flocken absetzen. Das Pepton hat alsdann seine zuckerspaltenden Eigenschaften eingebüßt.

Somit waren wir darauf angewiesen, den Beweis, daß Bakterien an dem Zustandekommen der Zuckerspaltung keinen irgendwie fühlbaren Anteil haben können, indirekt zu führen. Zunächst ließ sich durch Kulturen, die mit der vergorenen Peptonzuckerlösung angesetzt wurden, nachweisen, daß kein notorischer Milchsäurebildner anwesend war. Vorhanden ist nur der Bacillus subtilis. Daß dieser keine Säuerung in dem beobachteten Ausmaße hervorbringen kann, soll der folgende Versuch dartun:

Von der vergorenen Lösung wird ein wenig übergeimpft in eine Mischung von der Zusammensetzung: 0,1 g Bicarbonat, 0,1 g Pepton Witte, 0,5 g Zucker, in 10 ccm Wasser. Die Lösung trübt sich stark nach 24 Stunden, ein Zeichen, daß sich die Bakterien gut entwickeln. Indessen erscheint fast keine Gasentwicklung (0,3 ccm). Dagegen beginnt die Kohlensäureentwicklung nach 6 Tagen wie im ungeimpften Versuch.

Ein weiterer Versuch soll zeigen, daß, wenn auch die Wachstumsbedingungen für die Bakterien vollständig identisch sind, doch die Milchsäurebildung und Kohlensäureentwicklung ausbleiben können, wenn nur die Dispersitätsbedingungen der Peptonlösung abgeändert werden:

1,0 g Zucker und 1,0 g Pepton Siegfried werden in 20 ccm Wasser gelöst, 20 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt und erkalten gelassen. Die Lösung wird in 2 Teile geteilt. Die erste Hälfte wird mit 40 ccm einer Lösung, die 0,5 g Bicarbonat enthält, schnell vermischt und im Nitrometer stehengelassen. Ein zweites Nitrometer wird zuerst mit 40 ccm derselben Bicarbonatlösung beschickt, hierauf die andere Hälfte der Peptonzuckerlösung vorsichtig darübergeschichtet. Es findet dann eine ganz allmähliche Vermischung der beiden Lösungen statt. Nach 20 Stunden ist bei der ersten Lösung eine starke Trübung aufgetreten, der dann die normale Gasentwicklung folgt; die zweite Gärlösung ist vollständig klar geblieben. Man kennt ja aus den Erfahrungen über die Elektrolytflockungen, daß die Art und Weise der Vermischung einer Salzlösung mit einer kolloiden Lösung auf deren Beständigkeit sehr von Einfluß sein kann. Obschon in beiden Versuchen zweifellos genau dieselbe Nährlösung und genau dieselben Bakterien vorhanden sind, ist der Effekt nur im ersten Versuch aufgetreten. Dies zeigt wiederum, wie außerordentlich empfindlich eine Fermentation auf den physikalisch-chemischen Zustand anspricht, und daß eine bakterielle Wirkung in unserem Falle so gut wie ausgeschlossen ist.

Das wichtigste Beweismittel gegen den Verdacht einer Bakterienwirkung ist aber die Gesamtheit der in den vorangehenden Abschnitten geschilderten quantitativen Abhängigkeiten. Insbesondere haben wir es

in der Hand, durch Änderung der Peptonkonzentration den Beginn der Gärung gesetzmäßig zu verschieben, und man kann es dahin bringen, daß die Gärung so gut wie sofort einsetzt, bevor an ein irgend ausreichendes Bakterienwachstum gedacht werden kann. Im Hinblick darauf können wir uns über etwa anwesende Bakterien vollständig beruhigen, wenn auch zugegeben werden muß, daß im Interesse der Reinheit des Versuches weitere Anstrengungen, die Bakterien vollständig wegzubringen, angezeigt erscheinen.

Einige weitere Beobachtungen.

1. Der Temperatureinfluß.

Ohne demselben eine ausführliche Untersuchung zu widmen, ist festgestellt worden, daß bei 45° die Milchsäuregärung bereits zu versagen beginnt. Bei 30° zeigt sich die Gärung verzögert. In der 1 proz. Mischung (1% Pepton Siegfried, 1% Zucker, 1% Bicarbonat) nahm die Gärung bei 30° folgenden Verlauf:

Zeit . . . . . Stunden	$24^1/_2$	25	27	30	44
CO_2 aus 50 ccm Lösung . . . . . ccm	0	0,5	51	54	105

2. Aminosäuren.

Um zu prüfen, ob vielleicht reine Aminosäuren zur Einleitung einer Milchsäuregärung hinreichend sein möchten, sind Lösungen der folgenden Zusammensetzung angesetzt worden:

0,1 g Bicarbonat + 0,1 g Zucker + 0,1 g Aminosäuren + 10 ccm Wasser. Als Aminosäuren kamen der Reihe nach zur Anwendung: Glykokoll, Asparaginsäure, Leucin.

Diese Mischungen erwiesen sich indessen als unwirksam. Hieran änderte es auch nichts, wenn anstatt reinem Wasser eine Nährlösung verwendet wurde, hergestellt aus[1]): 1,5 g NaCl, 0,03 g $CaCl_2$, 0,1 g $MgSO_4$, 0,7 g Na_2HPO_4 in 250 ccm Wasser (der entstehende flockige Niederschlag ist abzufiltrieren). Die Unwirksamkeit solcher Zusammensetzungen ist übrigens ein weiterer Beweis dafür, daß in den Peptonversuchen der Effekt nicht auf Bakterienwachstum zurückzuführen ist.

Die Unwirksamkeit reiner löslicher Aminosäuren zeigt, daß die höheren Peptide mitwirken. Die Anwesenheit von Kolloidteilchen ist zweifellos eine Grundbedingung. Vielleicht könnte es gelingen, die Peptone durch passende Mischungen definierter Polypeptide zu ersetzen. Allerdings wäre wegen der Unzahl von Kombinationen ein Erfolg vielleicht nur durch einen glücklichen Griff zu erreichen.

3. Schutzkolloide.

Der Gedanke liegt nahe, durch Schutzkolloide den Effekt sicherer und besser zu gestalten. Versuche mit zentrifugierten Tragantlösungen von verschiedener Konzentration, mit Agar-Agar, Gummiarabicum, Kirschgummi, Dextrin usw. zeigten, daß der Gäreffekt in keinem Falle

[1]) *König*, Handb. d. Nahrungsmittelchemie, 4. Aufl., Bd. 3, I. Teil, S. 643. 1910.

verbessert wird. Die Gasentwicklung wird entweder ganz verhindert oder verzögert, nie aber vermehrt. Immerhin wäre es nicht ausgeschlossen, daß sich kolloide Stoffe finden lassen, die in geeigneter Konzentration den Effekt zu verstärken vermöchten.

4. Putride Gärung.

Die zuckerfreien Kontrollversuche, sowie solche mit Pepton Witte, die sehr lange beobachtet werden müssen, gehen manchmal in Fäulnis über, was sich durch Geruch nach Methylamin verrät. Es war daher geboten, durch eine schärfere Prüfung bei den richtig verlaufenen Milchsäuregärungen sich von der Abwesenheit solcher fremder, von Bakterien ausgehenden Veränderungen zu überzeugen. Pepton Siegfried, wie fast alle Peptone, enthalten Tryptophan, nachzuweisen durch die Rot- und Violettfärbung mit *Rohdes*[1]) Reagens, das aus 20 g Dimethylaminobenzaldehyd, 500 ccm konz. HCl und 500 ccm Wasser zusammengesetzt ist. Tryptophan verwandelt sich bei jeder Spur von Fäulnis in Indol, welches durch folgendes Reagens eine Rotfärbung zeigt: 20 g Dimethylaminobenzaldehyd in 500 ccm Wasser. Die richtig vergorene Lösung, damit versetzt, bleibt farblos, während mit *Rohdes* Reagens das unveränderte Tryptophan nachweisbar ist. Putride Gärungen bei den richtig verlaufenen Versuchen sind somit ausgeschlossen. Tritt einmal Geruch nach Methylamin auf, so ist auch Indol nachweisbar. Solche Versuche müssen verworfen werden.

Zusammenfassung.

Die von *Emil Baur* und *E. Herzfeld* als „Gärung ohne Hefe" beschriebene Zersetzung der Glucose unter Bildung einer Säure und eines jodoformgebenden Stoffes ist weiter untersucht worden. Es wird festgestellt, daß Glucose in Lösungen, die Bicarbonat als Puffer enthalten, durch Pepton bei 37° quantitativ in Milchsäure übergeführt wird. Die Gärung erreicht nach bestimmter Zeit ihr Ende durch einen Flockungsvorgang am Pepton. Das Pepton kann sein eigenes Gewicht an Zucker vergären. Der zeitliche Verlauf der Gärung in Abhängigkeit von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer wird festgestellt. Die Gärung kommt um so rascher in Gang, je mehr Pepton anwesend ist. Die Konzentration des Zuckers übt nur einen geringen Einfluß aus. Eine wichtige Rolle spielt die Gegenwart von Phosphat, indem phosphatfreie Peptone zur Erregung einer Glucose-Milchsäuregärung unvermögend sind. Unbeschadet der Gärkraft kann die Peptonzuckerlösung vor Zusatz des Puffers auf dem Wasserbad erhitzt werden. Während der Gärung und *nur* während dieser nimmt die Zahl der freien Aminosäuregruppen im Pepton zu. Milchsäurebildende Bakterien sind in der gärenden Lösung nicht nachweisbar.

[1]) *Rohde*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 161. 1905.

Curriculum vitae.

Geboren am 21. April 1899 als Bürger von Zürich, Sohn des Gottfried Schlatter-Briner, Kaufmann, habe ich das hiesige kantonale Gymnasium besucht und daselbst im Herbst 1917 die Maturitätsprüfung bestanden. Anschließend hieran studierte ich an der chemischen Abteilung der Eidg. Techn. Hochschule und erhielt im Frühjahr 1921 das Diplom als Ingenieur-Chemiker. In den folgenden zwei Semestern führte ich im Institut für physikal. Chemie an der Eidgen. Techn. Hochschule die Doktorarbeit aus, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. EMIL BAUR und Herrn Priv.-Doz. Dr. E. HERZFELD, denen ich für ihre stets bereitwillige Unterstützung zu ganz besonderem Dank verpflichtet bin.