

76. Alb. Fitz: Ueber Schizomyceten-Gährungen II¹⁾ [Glycerin, Mannit, Stärke, Dextrin.]

(Mittheilung aus dem chemischen Institut der Universität Strassburg.)

(Eingegangen am 17. Februar.)

Glycerin.

1) Schizomycet. Sät man den Schizomyceten in eine hochprocentige, z. B. 10 pCt. Glycerin enthaltende Gährflüssigkeit, so entsteht nach 1 bis 2 Tagen starke Gährung, die nach circa 14 Tagen aufhört, obwohl noch ein grosser Theil des Glycerins unzersetzt ist. Untersucht man jetzt die Gährflüssigkeit und den Bodensatz mikroskopisch, so ist der Schizomycet, d. h. die Vegetationsform desselben, vollständig verschwunden; an seiner Stelle finden sich Dauersporen. In der Form von Dauersporen befindet sich der Schizomycet in einem Ruhezustand, er erregt keine Gährung, er ist vollständig inactiv. Giesst man nun die Gährflüssigkeit von dem Bodensatz ab, destillirt bis aller Butylalkohol übergegangen ist und giesst die rückständige Flüssigkeit nach dem Erkalten in die Gährflasche zurück, so keimen die im Bodensatz befindlichen Dauersporen aus und vermehren sich mit Schnelligkeit in der gewöhnlichen Weise. Es entsteht von Neuem energische Gährung. Die Sache macht den Eindruck, als ob sich der Schizomycet durch die Anhäufung des Butylalkohols geniert fühle. Um sich gegen den ungünstigen Einfluss desselben zu schützen, verkriecht er sich in die widerstandsfähige Form von Dauersporen und wartet unthätig ab, bis bessere Zeiten kommen. Dies ist der Fall, wenn man den Butylalkohol wegnimmt; alsdann keimen die Dauersporen wieder aus, vermehren sich durch Spaltung und erregen Gährung.

Die Dauersporen, trocken aufbewahrt, behalten sehr lange ihre Keimfähigkeit. Noch nach 6 Monaten zeigten sie sich keimfähig.

Aus Obigem ergibt sich, dass es zweckmässig ist, sehr verdünnte Glycerin-Gährflüssigkeiten anzuwenden, etwa 3 Glycerin auf 100 Wasser. Nach Beendigung der Gährung giesst man die Flüssigkeit vom Bodensatz ab, destillirt den Butylalkohol ab und bringt die rückständige Flüssigkeit nach dem Erkalten in die Gährflasche zurück, fügt Wasser bis zum ursprünglichen Volumen, zu und wieder Glycerin im Verhältniss von 3 zu 100 Wasser. Die Anhäufung des buttersauren und capronsäuren Kalkes schadet dem Schizomyceten nicht; man kann alsdann nach Beendigung mehrerer Gährungen die Kalksalze auf einmal verarbeiten.

Zwei Reihen fortlaufender Versuche mit verschiedenem Aussaatmaterial machen es wahrscheinlich, dass es zwei nahe verwandte

¹⁾ Vgl. erste Mittheilung d. Ber. IX, S. 1348,

Schizomyceten giebt, die Glycerin mit grösster Energie angreifen und wovon der eine Normal-Butylalkohol, der andere Aethylalkohol liefert; den ersteren Schizomyceten hatte ich nahezu rein unter den Händen, den zweiten stark gemengt mit dem ersten. Doch ist noch eine grössere Zahl von Versuchen nöthig, um die Sache völlig sicher zu stellen.

2) Stickstoffhaltiger Nährstoff. Anstatt Pepsin lässt sich mit gleich gutem Erfolg schwefelsaures oder phosphorsaures Ammoniak als stickstoffhaltiger Nährstoff anwenden. In eine Gährflüssigkeit, zusammengesetzt aus

3000	C. C. Wasser,
150	Gr. Glycerin,
1,5	- phosphorsaurem Kali,
0,7	- schwefelsaurer Magnesia,
6	- schwefelsaurem Ammoniak,
30	- kohlensaurem Kalk,

wurde am 22. November eine minimale Aussaat gemacht. Am 23. November Morgens hatte sich eine Haut auf der Oberfläche der Flüssigkeit gebildet, Nachmittags nahm die Trübung von oben nach unten zu. Am 24. November Morgens war die Flüssigkeit in stürmischer Gährung. Der ganze obere leere Raum der Gährflasche, dessen Volumen circa $\frac{1}{2}$ Liter betrug, war mit Schaum angefüllt, ein Theil des Schaumes war aus der Oeffnung herausgeflossen. Die stürmische Gährung mit langsamem Ausfliessen des Schaumes dauerte den ganzen Tag an. Am 25. November sank der Schaum zusammen, die Gährung wurde ruhiger, an den folgenden Tagen mehr und mehr träge; am 8. December stiegen auch beim Umschütteln keine Gasblasen mehr aus dem Bodensatz auf. Am 9. December wurde abdestillirt. Der Alkohol bestand wesentlich aus Normalbutylalkohol.

Die Menge des schwefelsauren Ammoniaks ist in dem beschriebenen Versuch viel zu hoch gegriffen; kleinere Mengen sind ausreichend; die Gährung verläuft alsdann ruhiger. Auch die Mengen von phosphorsaurem Kali und schwefelsaurer Magnesia sind zu hoch.

Bei neueren Gährversuchen reiche ich dem stets in unwägbarer Menge ausgesäeten Schizomyceten für je 100 Gr. zu vergärende Substanz 0,1 Gr. phosphorsaures Kali, 0,02 Gr. schwefelsaure Magnesia, 1 Gr. schwefelsaures Ammoniak oder 1,6 Gr. phosphorsaures Ammoniak $\text{PO}_4 \text{H}_2 (\text{NH}_4)$. Der Schizomycet befindet sich dabei sehr wohl, er vermehrt sich rapid und äussert eine energische Fermentthätigkeit.¹⁾

¹⁾ Die Chemiker nehmen bei Milchsäure- und Buttersäure-Gährungen noch immer „saure Milch“ und „alten Käse“ als „Ferment.“ Es möchte sich empfehlen, die „saure Milch“ und den „alten Käse“ fallen zu lassen und nach dem Vorgange Pasteur's (vergl. u. A. dessen Etudes sur la bière S. 275 u. 283) Gährflüssigkeiten

3) Alkohol. Für die theoretische Ausbeute halte ich 20 pCt. Bei dem in der ersten Mittheilung¹⁾ beschriebenen Versuch erhielt ich aus 100 Glycerin 8,1 entwässerten Roh-Alkohol. Bei dem günstigsten neueren Gährversuch erhielt ich aus 190 Gr. Glycerin 30,5 Gr. entwässerten Roh-Alkohol, also aus 100 Glycerin 16 Roh-Alkohol. Im Ganzen erhielt ich aus 1075 Gr. Glycerin 143,6 Gr. entwässerten Roh-Alkohol, also aus 100 Glycerin 13,3 Roh-Alkohol. Der Roh-Alkohol gab bei der fractionirten Destillation eine kleine Fraction, siedend von 78—85°; dieselbe betrug auf 143,6 Gr. Roh-Alkohol nur 1,6 Gr. Die Fractionen zwischen 85 bis 116° waren minimal; Alles Uebrige siedete constant von 116—117°. (Lieben und Rossi geben den Siedepunkt des Normalbutylalkohols zu 116° an, Linnemann zu 116,9°.)

Bei einer zweiten Versuchsreihe wurde ein anderes Aussaatmaterial genommen. Auch hier wurde das Glycerin mit grösster Energie angegriffen; eine Gährflüssigkeit z. B. von 6 Liter Abends mit einer unwägbaren Aussaat versehen, war am folgenden Morgen, also nach 15 Stunden, schon in voller Gährung. Es trat ein Gemenge zweier Schizomyceten auf. Schon äusserlich verlief die Gährung etwas anders. Bei der ersten Versuchsreihe bildete sich mehr Schaum, die Gährung war vom 2. bis 4. Tag nach der Aussaat äusserst stark, sank alsdann rasch an Energie herunter; bei der zweiten Versuchsreihe bildete sich wenig Schaum; es zeigte sich kein so auffälliges Intensitätsmaximum; die Gährung verlief gleichmässig stark in den ersten 8 Tagen der Gährzeit. Beim Abdestilliren des Alkohols zeigte sich sofort eine grosse Verschiedenheit von der ersten Versuchsreihe. Bei der ersten Versuchsreihe konnte fast sämmtlicher Alkohol bei oft wiederholter Destillation durch einfaches Abheben mit der Pipette ohne Anwendung von Potasche gewonnen worden; nur die letzten 2 Reagensröhrchen brauchten mit Potasche behandelt zu werden. Bei der zweiten Versuchsreihe konnte nur sehr wenig direct mit der Pipette abgehoben werden. Fast aller Alkohol wurde mit Potasche abgeschieden. Es wurde erhalten aus 900 Gr. Glycerin 120,4 Gr. entwässerten Roh-Alkohol, aus 100 Glycerin also 13,3 Roh-Alkohol. Bei der fractionirten Destillation wurden 2 Hauptfractionen erhalten; die eine siedete von 78—80°, die andere von 116—117°. Diese 2 Fractionen waren gleich gross; die zwischen liegenden Fractionen waren minimal.

Verschiedene Rückstände wurden auf Jodbutyl verarbeitet; dasselbe

mit Nährstoffsalzen herzustellen und minimale Mengen der rein cultivirten Ferment-Organismen anzusäen. Die Gährung verläuft rasch ohne Nebengährungen und die Gährungsprodukte sind leichter rein zu gewinnen.

Mit der Zeit werden wohl die rein cultivirten Ferment-Organismen auf den Preis-Couranten der Präparaten-Fabriken erscheinen.

¹⁾ Diese Berichte IX, S. 1848.

siedete constant bei 128—129° (Quecksilberfaden ganz im Dampf). Lieben und Rossi gaben den Siedepunkt zu 129.6° an, Linneemann zu 129.8°.

Pasteur erhielt bei Buttersäuregärungen manchmal Butylalkohol, den er nicht weiter untersuchte. Bei 4 Gährversuchen mit je 150 Grm. milchsaurem Kalk und verschiedenem Aussaatmaterial wurde im ersten und zweiten Versuch ein wenig Alkohol gewonnen; die Menge desselben betrug nach Abscheiden mit Potasche nur wenige Tropfen. Beim dritten und vierten Versuch wurde keine Spur Alkohol erhalten.

4) Flüchtige Säure. Die in meiner ersten Mittheilung¹⁾ angegebenen Silberbestimmungen stammen von dem ersten mit 50 Grm. Glycerin angestellten Gährversuch. Bei dem zweiten Gährversuch mit 260 Grm. Glycerin wurde die flüchtige Säure nach Zusatz von Salzsäure durch siebenmalige Destillation nach stets erneutem Wasserzusatze gewonnen, die 7 Destillate getrennt in Kalksalze übergeführt und untersucht.

Destillat I enthielt 20 pCt. der Gesamtsäure. Das Kalksalz wurde abgedampft, mit der berechneten Menge Salzsäure versetzt und destillirt. Auf dem Destillat schwammen grosse Oeltropfen. Durch fraktionirtes Sättigen mit kohlensaurem Silber wurden Silbersalze dargestellt; dieselben gaben folgende Zahlen:

1) 48.6 pCt. Silber	Capronsäure verlangt 48.4
2) 48.6 - -	Buttersäure - 55.4
3) 48.5 - -	
4) 49.1 - -	
5) 54.9 - -	
6) 55.2 - -	

Destillat II enthielt 50 pCt. der Gesamtsäure. Die Silberbestimmungen ergaben:

1) 48.9	7) 53.7
2) 48.4	8) 54.0
3) —	9) 55.0
4) 48.3	10) 55.2
5) 48.6	11) —
6) 49.4	12) —

Destillat II enthielt also ebenfalls beträchtliche Mengen Capronsäure.

Destillat III enthielt 20 pCt. der Gesamtsäure. Nur das letzte Silbersalz wurde analysirt (die ersten Silbersalze gingen durch ein Versehen verloren). Es gab 55.5 Silber.

Aus den Destillaten IV bis VII konnte keine hinreichende Menge krystallisirtes Silbersalz gewonnen werden.

¹⁾ Diese Berichte IX, S. 1351.

Die flüchtige Säure der Glycerin-gährung besteht also aus Capronsäure und Buttersäure und zwar ist erstere in beträchtlicher Menge vorhanden. Die relativen Mengen werden noch genauer festgestellt werden. Essigsäure tritt, soweit meine Versuche bis jetzt reichen, bei der Glycerin-gährung nicht auf.

Ich möchte nicht unterlassen, zu bemerken, dass bei meinen Glycerin-gährungen die flüchtige Säure nicht etwa durch ein auf der Oberfläche wachsendes und den Alkohol oxydierendes Mycoderma entsteht. Die Oberfläche der Gährflüssigkeiten ist während der ganzen Dauer der Gährung von einer Atmosphäre von CO_2 und H_2 bedeckt. Alkohol und flüchtige Säure werden gleichzeitig durch ein und denselben Schizomyceten gebildet.

5) Nicht flüchtige Säure. Nach dem Abdestilliren der von 260 Grm. Glycerin herkommenden Säure wurde die rückständige Flüssigkeit stark abgedampft, filtrirt und wiederholt mit Aether ausgeschüttelt.

Nach dem Abdestilliren des Aethers hinterblieb eine syrpförmige Säure; dieselbe wurde mit kohlen-saurem Zink in das Zinksalz übergeführt und umkrystallisirt. Die Menge betrug 0.4 Grm. Das bei 110° getrocknete Salz enthielt 27.0 Zn; wasserfreies milchsäures Zink verlangt 26.7. Die nicht flüchtige Säure besteht also wahrscheinlich aus Milchsäure. Sie wird mit grösserer Menge Material noch genauer untersucht werden.

6) Stickstoffhaltige flüchtige Base. Bei Anwendung von Pepsin als stickstoffhaltigen Nährstoff entsteht aus demselben bei der Glycerin-gährung eine flüchtige Base der Picolin-Reihe. Das alkoholische Destillat reagirt alkalisch; man hält die Base mittelst Schwefelsäure fest, dampft nach dem Abdestilliren des Alkohols ab und erhält so das schwefelsaure Salz gut krystallisirt. Durch Zusatz von ein wenig Kalkmilch zu der vergohrenen Flüssigkeit vor dem Abdestilliren des Alkohols könnte man wohl noch mehr von der Base gewinnen. Sie wird später untersucht werden.

Mannit.

Mannit wird nicht von den Alkoholgährungspilzen¹⁾, dagegen von Schizomyceten in Gährung versetzt.

Es wurden 6 Gährflaschen mit je 150 Grm. Mannit aufgestellt. Auf 100 Wasser wurden 5 Mannit genommen, besser ist es wohl, nur 3 Mannit zu nehmen. Die 2 ersten Flaschen wurden noch mit

¹⁾ Ueber das Verhalten von schizomycetenfreien Alkoholgährungs-Pilzen zu Mannit habe ich mir nach einigen vorläufigen Versuchen folgende Ansicht gebildet: Bei Anwesenheit von O wächst die Aussaat, der Mannit wird theils assimilirte theils verbrannt; bei Abwesenheit von O bleibt der Pilz in Ruhestand, der Mannit intakt. Zu gelegener Zeit werde ich die Richtigkeit dieser Ansicht durch weitere Versuche prüfen.

Pepsin beschickt, die 4 anderen mit schwefelsaurem Ammoniak als stickstoffhaltigem Nährstoff. Die Gärung verlief bei den 4 letzten ebenso gut wie bei den 2 ersten. Die Gährflaschen wurden mit verschiedenem Aussaamaterial versehen. Beim Abdestilliren des Alkohols konnte bei einigen Gährflaschen der Alkohol ohne Anwendung von Potasche abgehoben werden, bei den anderen erst nach Anwendung von Potasche. Der Alkohol wurde zusammen verarbeitet.

Das Destillat reagirt sauer von ein wenig flüchtiger Säure. Man neutralisirt das erste Destillat durch Zusatz von etwas Kalilauge und destillirt. Aus 900 Grm. Mannit wurden gewonnen 148 Grm. entwässerter Roh-Alkohol, 100 Mannit gaben also 16.4 Roh-Alkohol. Bei fraktionirter Destillation wurden 2 Hauptfractionen erhalten, eine bei 78—80°, die zweite bei 116—121°; die zwischenliegenden Fractionen waren minimal. Die Fraction 78—80° waren fast doppelt so gross als die Fraction 116—121°. Letztere wurde weiter fraktionirt; die Hauptmenge ging bei 116—118° über, der Rest, etwa $\frac{1}{4}$ C. C. bei 118—121°.

5 Grm. des bei 116—118° siedenden Alkohols wurden mit chromsaurem Kali und Schwefelsäure oxydirt, die flüchtige Säure abdestillirt und in das Kalksalz übergeführt; dasselbe, bei 100° getrocknet, wog 4 Grm. Die in der Kälte gesättigte und filtrirte Lösung des Kalksalzes erstarrte bei gelindem Erwärmen vollständig, so dass man das Reagenrohr umdrehen konnte, ohne dass etwas auslief.

Durch fraktionirte Fällung mit salpetersaurem Silber wurden 2 Silbersalze gewonnen (bei der zweiten Fällung wurde sämmtliche flüchtige Säure ausgefällt). Die Silberbestimmungen ergaben: 1) 55.4; 2) 55.5 Silber.

Die Säure war also Normalbuttersäure, der bei 116—118° siedende Alkohol Normalbutylalkohol.

Die Fraction 118—121° enthielt wohl einen höheren Alkohol; die Menge war jedoch zu gering, um seine Natur festzustellen.

Nach dem Abdestilliren des Alkohols wurde die rückständige Flüssigkeit mit ein wenig Kalkmilch neutralisirt und auf ein kleines Volumen abgedampft; sodann mit einer angemessenen Menge ClH versetzt und die flüchtige Säure mit gespanntem Wasserdampf übergetrieben. Das Kalksalz der flüchtigen Säure, bei 100° getrocknet, wog 250 Grm.

Die rückständige Flüssigkeit wurde filtrirt und öfter mit Aether ausgeschüttelt. Nach dem Abdestilliren des Aethers krystallisirt der Rückstand. Bei dem mit 80 Grm. Mannit gemachten ersten vorläufigen Gährversuch wurden 4 Grm. dieser Substanz gewonnen. Durch mehrmaliges Umkrystallisiren gereinigt, schmolz der Körper bei 181° C. Das Ammoniaksalz wurde gekocht, bis die Flüssigkeit deutlich sauer reagirte und mit Eisenchlorid versetzt; es entstand ein braunrother

Niederschlag. Das Silbersalz gab 64.7 Silber. Bernsteinsaures Silber verlangt 65.1. Der Körper ist also Bernsteinsäure.

Bei den Versuchen mit 900 Grm. Mannit wurde durch Ausziehen mit Aether eine syrupförmige Säure erhalten, die nach längerem Stehen theilweise erstarrte. Das Flüssige wurde abgesaugt. Die Menge der umkrystallisirten, farblosen Bernsteinsäure betrug diesmal nur 0.71 Grm. Die beträchtlich grössere Menge syrupförmiger Säure wird noch untersucht. Bei dem ersten Versuch mit 80 Grm. Mannit war keine syrupförmige Säure entstanden; alles erstarrte.

Stärke.

Säet man in eine Gährflüssigkeit, die nach den folgenden Verhältnissen zusammengesetzt ist

3000	Wasser
100	Stärke
0.1	phosphorsaures Kali
0.02	schwefelsaure Magnesia
1.6	phosphorsaures Ammoniak
40	Kreide

eine Spur des Schizomyceten, so ist die Flüssigkeit nach 24 Stunden in voller Gährung. Nach 18 Tagen war die Gährung völlig beendet; auch beim Umschütteln erhoben sich keine Gasblasen mehr aus dem Bodensatz. Untersucht man jetzt die Flüssigkeit mikroskopisch, so findet man von den Stärkekörnern nur noch die mit Jod sich gelb färbenden Cellulose-Skelette; die Granulose ist verschwunden, vergohren.

Bei dieser Gährung entsteht wenig Alkohol, dagegen viel Säure.

500 Grm. lufttrockene Stärke lieferten 10 Grm. Alkohol. Die fraktionirte Destillation ergab, dass er hauptsächlich aus Aethylalkohol und einer kleinen Menge eines über 114° siedenden Alkohols besteht. Von der Säure wurden ca. 140 Grm. kohlenaurer Kalk gelöst.

Dextrin.

Dextrin wurde mit denselben Zusätzen wie Stärke zur Vergährung gebracht.

530 Grm. Dextrin lieferten 22.2 Grm. entwässerten Alkohol, der ebenso wie der Stärke-Alkohol zusammengesetzt war.

Die alkoholliefernde Schizomycetengährung des Dextrins ist von Interesse für die Theorie der Gährung der Kartoffelmaische: man hatte bisher als selbstverständlich angenommen, dass der Alkohol der Kartoffelgährung nur von einer Bierbefe-Gährung herrühre. Ob das bei der Kartoffelgährung constatirte Verschwinden des Dextrins einer Schizomycetengährung zuzuschreiben ist, bleibt noch genauer zu untersuchen. Wie massenhaft Schizomyceten bei der Kartoffelgährung

auftreten, weiss Jeder, der einmal gährende Kartoffelmaische mikroskopisch untersuchte¹⁾.

Resultate.

Bei hohem Glyceringehalt der Gährflüssigkeit geht der Schizomycet in Folge der Anhäufung des Butylalkohols in die widerstandsfähige und inactive Form von Dauersporen über. Nimmt man den Butylalkohol weg, so keimen die Dauersporen wieder aus zu der Vegetationsform, vermehren sich durch Spaltung und erregen von neuem Gährung.

Die Dauersporen behalten sehr lange ihre Keimfähigkeit.

Sehr wahrscheinlich giebt es zwei sehr nahe verwandte Schizomyceten, die mit grosser Energie Glycerin vergähren; der eine liefert Normalbutylalkohol, der andere Aethylalkohol.

Als stickstoffhaltiger Nährstoff eignet sich vortreflich schwefelsaures oder phosphorsaures Ammoniak.

Bei Anwendung von Pepsin als stickstoffhaltigem Nährstoff entsteht aus demselben eine Base der Picolinreihe.

Bei der Mannitgährung entstehen: Aethylalkohol, Normalbutylalkohol, eine kleine Menge eines höheren Alkohols, flüchtige Säure, Bernsteinsäure und eine syrupförmige Säure.

Bei der Gährung der Stärke verschwindet aus den Stärkekörnern die Granulose, es bleibt nur das Celluloseskelett übrig. Ausser anderen Produkten entsteht eine kleine Menge Alkohol.

Dextrin giebt mehr Alkohol als Stärke.

77. Ferd. Tiemann und Herm. Herzfeld: Zur Synthese des Cumarins aus Salicylaldehyd.

(Aus dem Berl. Univ.-Laborat. CCCXIV.)

Vorgetragen von Hrn. Tiemann.

Wir haben vor einigen Wochen²⁾ gezeigt, dass Acetylparacumarsäure sich durch Erhitzen von Paroxybenzaldehyd mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat erhalten lässt, und darauf hingewiesen, dass in gleicher Weise aus dem Benzaldehyd Zimmtsäure³⁾ dargestellt werden kann.

¹⁾ Ich werde die Schizomyceten der Kartoffelmaische durch geeignete Culturen von der Bierhefe trennen, und der Frage näher zu treten versuchen, ob das Fuselöl des Kartoffelbranntweins von einer Schizomyceten-Gährung herrührt.

²⁾ Diese Berichte X, S. 68.

³⁾ W. H. Perkin veröffentlicht zur Zeit im Journal der englischen chemischen Gesellschaft eine Abhandlung, in welcher er eine grössere Anzahl mittelst der obigen Reaction dargestellter Säuren und Abkömmlinge derselben beschreibt. Ein Auszug aus dieser Abhandlung ist in der Chemical News 1877, Vol. XXXV, No. 898, S. 61 bereits erschienen.