

127. Alb. Fitz: Ueber Spaltpilzgährungen.

V. Mittheilung.

[Aus dem chemischen Institut der Universität Strassburg.]

(Eingegangen am 14. März.)

Glycerinsaurer Kalk.

Es wurden 3 Versuche mit je 50 g glycerinsaurem Kalk gemacht.

1) Bei dem ersten Vorversuch wurden als Aussaat Kuhexcremente genommen.

Bei dem Hauptversuch fand sich in der Flüssigkeit ein länglicher Micrococcus; die Zellen desselben waren öfter rosenkranzförmig aneinander gereiht; die Rosenkranzketten boten bei etwas ungünstiger Beleuchtung das Aussehen von feinen, dünnen Stäbchen dar; ausserdem war ein runder Micrococcus vorhanden. Im Anfang der Gährung überwog die erstere Form, gegen Ende die letztere.

Gährungsprodukte. Eine Spur Alkohol, 24.5 g Kalksalz der flüchtigen Säure und eine Spur nichtflüchtiger, flüssiger Säure.

Die flüchtige Säure bestand aus Essigsäure und einer kleinen Menge (einige Decigramme) einer höheren Säure; letztere wurde aus den ersten Grammen Kalksalz abgeschieden, in das Barytsalz übergeführt und langsam auskrystallisiren gelassen; es wurden keine ausgebildeten Krystalle erhalten, sondern die undeutliche Form des buttersauren Baryts. Die höhere Säure bestand somit sehr wahrscheinlich aus Buttersäure. Das letzte Gramm Kalksalz enthielt eine kleine Menge Ameisensäure.

2) Nämliche Aussaat und bei dem Hauptversuch die nämlichen Spaltpilzformen.

Gährungsprodukte: 0.7 g Alkohol, siedend bei $78\frac{1}{2}$ — $79\frac{1}{2}$ ° C., also Aethylalkohol, 22.5 g Kalksalz der flüchtigen Säure. Das erste Gramm Kalksalz gab ein Silbersalz mit 63.6 pCt. Ag; das letzte Gramm Kalksalz enthielt ein wenig Ameisensäure. Die flüchtige Säure besteht somit aus Essigsäure mit Spuren einer höheren Säure und von Ameisensäure.

Nichtflüchtige Säure: Spur einer flüssigen Säure.

3) Zu dem ersten Vorversuch wurde nichtgekochtes Heuwasser genommen. Bei dem Hauptversuche fanden sich in der Flüssigkeit die nämlichen Spaltpilzformen wie bei den zwei vorhergehenden Versuchen. Vorherrschend war der längliche Micrococcus, in Rosenkranzform, schön entwickelt. Ausserdem fand sich selten eine Birnform, die durch Jod violett gefärbt wurde; diese Form war nur im Anfang vorhanden, später verschwand sie vollständig.

Gährungsprodukte: 1.3 g Alkohol vom Siedepunkt $78\frac{1}{2}$ — $80\frac{1}{2}$ ° C., also Aethylalkohol. 21.1 g Kalksalz der flüchtigen Säure, bestehend aus Essigsäure mit einer Spur einer höheren Säure.

Nichtflüchtige Säure: 0.11 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 182° C.; das sauer reagierende Ammoniaksalz gab mit Eisenchlorid die bekannte Reaction.

Die Bildung von Bernsteinsäure aus Glycerinsäure ist recht interessant und ist ein weiteres Beispiel der durch Spaltpilze bewirkten Synthesen.

Wenn die Gärung des glycerinsäuren Kalkes nach der Gleichung

$$C_3H_6O_4 = C_2H_4O_2 + CO_2 + H_2,$$

verläuft so müssten aus 50 g glycerinsäurem Kalk 27.6 g essigsaurer Kalk erhalten werden¹⁾).

Erythrit.

Zu dem ersten Vorversuch wurde nichtgekochtes Heuwaschwasser genommen.

Die Vorversuche verliefen vortrefflich; der Hauptversuch wurde jedoch durch den Schwefelwasserstoffspaltpilz gestört und verlief unvollständig; nichtsdestoweniger ergab die Untersuchung der Gärungsprodukte ein bemerkenswerthes Resultat.

Bei dem Hauptversuch waren in der Flüssigkeit vorhanden: feine, dünne Stäbchen, grössere, runde bis elliptische Zellen, die vielleicht als ein Micrococcus anzusprechen sind, ferner in geringerer Menge ein kleiner, runder Micrococcus und die bei einer früheren Erythritgärung²⁾ beobachtete Birnform; letztere fand sich nur im Anfang vor, später verschwand sie gänzlich.

Aus 30 g Erythrit wurden eine Spur Alkohol, 9.4 g Kalksalz der flüchtigen Säure und nur eine Spur Bernsteinsäure erhalten.

Das erste Gramm Kalksalz gab ein Silbersalz mit 56.7 pCt. Ag, das letzte 62.2 pCt. Ag; das letztere enthielt ein wenig Ameisensäure. Die flüchtige Säure besteht somit aus Buttersäure und Essigsäure nebst einer Spur Ameisensäure.

Bei einer früheren Erythritgärung war ausser flüchtiger Säure eine beträchtliche Menge Bernsteinsäure entstanden (aus 30 g Erythrit 13 g Kalksalz der flüchtigen Säure und 12.7 g Bernsteinsäure); bei dem jetzigen Versuch dagegen nur eine Spur. Es ergibt sich hieraus als sehr wahrscheinlich, dass bei jenem früheren Versuch keine einheitliche Gärung vorlag, und dass es zwei Erythritgärungen giebt; bei der einen entsteht als Hauptprodukt Bernsteinsäure, bei der anderen flüchtige Säure.

Weinsaurer Kalk.

Zu dem ersten Vorversuch wurden Kuhexcremente als Aussaat genommen.

¹⁾ Vergl. Hoppe-Seyler, Zeitschrift für physiol. Chemie II, 10.

²⁾ Diese Berichte XI, 1891.

Spaltpilzformen bei dem Hauptversuch. Ein länglicher *Micrococcus* und ein runder *Micrococcus*, also die nämlichen Formen wie bei den Versuchen mit glycerinsaurem Kalk, ausserdem gegen Ende der Gährung ein *Bacillus* von mittlerer Grösse und ein *Bacterium*.

Während des Verlaufs der Gährung suchte ich wiederholt und jedesmal vergeblich nach dem von Pasteur genau beschriebenen und abgebildeten Spaltpilz, der bei seinen Versuchen weinsauren Kalk in Gährung versetzte. Es giebt somit mehr als einen Spaltpilz der weinsauren Kalk zu vergähren vermag.

Gährungsprodukte aus 100 g Weinsäure: 0.7 g Alkohol vom Siedepunkt 79—81° C., also Aethylalkohol. 45.0 g Kalksalz der flüchtigen Säure. Dieselbe bestand fast ganz aus Essigsäure. Aus den ersten Grammen Kalksalz wurde eine kleine Menge einer höheren Säure abgeschieden, zweimal destillirt und der über 130° destillirende Antheil (1.4 g) in das Barytsalz übergeführt und auskrystallisiren gelassen; es wurden keine ausgebildeten Krystalle erhalten, sondern die undeutliche Form des buttersauren Baryts; das durch fraktionirte Fällung daraus erhaltene erste Silbersalz gab 58.1 pCt. Ag. Die höhere Säure ist somit Buttersäure und nicht Propionsäure. Die geringe Menge Buttersäure verdankt ihre Bildung vermuthlich einer Nebengährung. Das letzte Gramm Kalksalz enthielt keine Ameisensäure.

Nichtflüchtige Säure: 0.05 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 181°.

Wenn die Gährung nach der Gleichung



verläuft, so müssten aus 100 g Weinsäure 52.7 g essigsaurer Kalk erhalten werden.

Die sogenannte Butteressigsäure.

Ueber die sogenannte Butteressigsäure liegt eine confuse Literatur vor. Bei der Butteressigsäure handelt es sich um Gährungssäure aus weinsaurem Kalk und um von Nicklès angeblich synthetisch dargestellte Säure.

Die Butteressigsäure wurde 1847 von Nicklès erfunden¹⁾. Sie soll die nämliche Zusammensetzung wie die Propionsäure haben, constant bei 140° sieden, unter nicht näher gekannten Bedingungen in ihre Componenten, Buttersäure und Essigsäure, zerfallen. Ihr Barytsalz soll in schön ausgebildeten Krystallen genau von der Krystallform des propionsauren Baryts krystallisiren. Dumas, Malaguti und Leblanc erklärten 1847 die Gährungssäure für Propionsäure,

¹⁾ Schon früher 1841 hatte Nöllner erkannt, dass die Gährungssäure aus weinsaurem Kalk sich in einigen Eigenschaften von der Essigsäure unterscheidet, und hatte sie deshalb Pseudoessigsäure genannt. Berzelius erklärte sie für ein Gemenge von Buttersäure und Essigsäure.

Limpricht und Uslar 1855 für ein Gemenge von Buttersäure und Essigsäure.

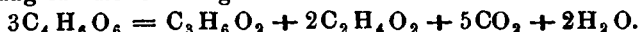
Die Confusion über die Butteressigsäure rührt hauptsächlich daher, dass man als selbstverständlich annahm, es gebe nur eine Gährung des weinsauren Kalkes, als seien die Gährungsprodukte stets dieselben; dann aber auch daher, dass die angebliche synthetische Darstellung von Nicklès ein Irrthum ist, wie ich nachweisen werde.

Die Literatur über die Butteressigsäure klärt sich in folgender Weise auf:

Es giebt 3 verschiedene Gährungen des weinsauren Kalkes, verursacht durch 3 verschiedene Spaltpilzformen.

1) Essigsäuregährung. Beleg: der oben beschriebene Gährversuch.

2) Propionsäuregährung. Belege: a. die Gährungssäure, die von Dumas, Malaguti und Leblanc untersucht wurde, war zweifellos Propionsäure, denn sie siedete constant bei 140° und gab ein gut krystallisirtes Barytsalz von der Krystallform des propionsauren Baryts. b. Pasteur giebt, allerdings mit einiger Reserve¹⁾, als Zersetzungsgleichung für die Gährung des weinsauren Kalkes:



3) Buttersäuregährung. Beleg: die von Limpricht und Uslar untersuchte Säure bestand zweifellos aus einem Gemenge von Buttersäure und Essigsäure; denn sie zerfiel bei der fractionirten Destillation leicht in diese zwei Säuren.

Nicklès untersuchte²⁾ zwei Sorten von Gährungssäure; die erste erkannte er als ein Gemenge von Buttersäure und Essigsäure. Nicklès interpretirte das so: die ursprüngliche Butteressigsäure war bereits wieder in die Componenten zerfallen. Die zweite Sorte siedete constant bei 140° und gab ein gut krystallisirendes Barytsalz. Nach Nicklès war das die eigentliche Butteressigsäure.

Ich interpretire die Nicklès'schen Angaben so: die erste Sorte von Gährungssäure ist von Anfang an nichts Anderes gewesen als ein Gemenge von Buttersäure und Essigsäure; sie stammte von einer Buttersäuregährung des weinsauren Kalkes. Die zweite Sorte war nicht Butteressigsäure, sondern die ächte Propionsäure; sie stammte von einer Propionsäuregährung des weinsauren Kalkes.

Limpricht und Uslar scheinen ausser dem Gemenge von Buttersäure und Essigsäure auch eine kleine Menge Propionsäure, wahr-

1) Etudes sur la bière, S. 279. Das Ziel der Pasteur'schen Versuche war nicht so sehr die Untersuchung der Gährungsprodukte, sondern biologische Studien über den gährungserregenden Spaltpilz. Pasteur constatirte, dass genau die Hälfte des Kalkes an Kohlensäure und die andere Hälfte an flüchtige Säure gebunden war; ferner dass bei der Gährung von 100 g weinsaurem Kalk 19.7 g CO_2 entwichen; obige Gleichung verlangt 19.7 g.

2) Ann. Chem. 61, 348.

scheinlich herrührend von einem anderen Gährversuch, unter den Händen gehabt zu haben, denn sie erwähnen ein Barytsalz in gut ausgebildeten Krystallen¹⁾).

Nicklès will die Butteressigsäure synthetisch in folgender Weise erhalten haben²⁾. Giesst man die Lösung eines Gemenges von buttersaurem und essigsurem Natron (gleiche Moleküle) nach und nach in verdünnte Schwefelsäure, so ist die abgeschiedene Säure Butteressigsäure; ihr Barytsalz soll in der Form des propionsauren Baryts krystallisiren.

Zur Prüfung dieser Angaben stellte ich folgende Versuche an. Ich liess buttersauren Baryt³⁾ und essigsuren Baryt getrennt durch langsames Verdunstenlassen krystallisiren, um ihre Formen kennen zu lernen; ersterer scheidet sich in undeutlich ausgebildeten Gestalten aus, letzterer in nadelförmigen Krystallen mit gut ausgebildeten Flächen. Ich liess ferner ein Gemenge von buttersaurem und essigsurem Baryt (gleiche Moleküle) auskrystallisiren; es wurden nur undeutlich krystallisirte Formen erhalten; anscheinend schied sich zuerst buttersaurer Baryt aus und zuletzt essigsaurer Baryt, letzterer schlecht ausgebildet wegen der Anwesenheit von buttersaurem Baryt. Der Versuch wurde dreimal gemacht, stets mit demselben Resultat. Niemals wurde die schöne Krystallform des propionsauren Baryts oder des Doppelsalzes von propionsaurem und essigsurem Baryt erhalten⁴⁾.

Es wurde ferner eine gesättigte Lösung von buttersaurem und essigsurem Natron (gleiche Moleküle) in Schwefelsäure, die mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt war, nach und nach eingegossen, die abgeschiedene Säure abgehoben, in das Barytsalz übergeführt und krystallisiren gelassen. Das Resultat war genau dasselbe wie bei den obigen 3 Versuchen.

Wenn Nicklès wirklich Krystalle von der Form des propionsauren Baryts erhielt, so ist anzunehmen, dass in der Buttersäure, die er zu dem Versuch verwandte, von vornherein Propionsäure enthalten war.

Ich habe ferner die durch Eingiessen des Gemenges der Natronsalze in Schwefelsäure abgeschiedene Säure der fractionirten Destillation unterworfen. Sie zerfiel sofort in Buttersäure und Essigsäure. Nicht einmal bei der ersten Destillation zeigte sich ein constanter Siedepunkt um 140° herum. Der Quecksilberfaden stieg gleichmässig zwischen 135 und 145°. Nach öfter wiederholter Destillation wurden

1) Ann. Chem. 94, 330.

2) Jahresbericht 1858, 294.

3) Die zu diesen Versuchen verwandte Buttersäure siedete bei 162—164°.

4) Vgl. über letztere zwei Formen die Mittheilungen von Zepharovich, P. Friedländer und mir in P. Groth's Zeitschrift für Krystallographie III, 210—214.

von den anfangs abgewogenen 22 g Buttersäure vom Siedepunkt 162—164° wiedererhalten 15.6 g vom Siedepunkt 157—164°; der fehlende kleine Rest war zum kleinsten Theile in den minimalen Fractionen von 121—157°, zum grössten Theile in der Natriumbisulfatlösung geblieben.

Resumé: Die sogenannte Butteressigsäure existirt nicht.

Propionsäuregährung des milchsauren Kalkes¹⁾.

Ich berichte nur über die Gährungsprodukte; die Untersuchung über den gährungserregenden Spaltpilz ist noch nicht abgeschlossen.

Gährungsprodukte aus 50 g milchsaurem Kalk. Eine Spur Alkohol, 20.3 g Kalksalz der flüchtigen Säure.

Das erste Gramm Kalksalz gab ein Silbersalz mit 59.6 pCt. Ag (propionsaures Silber verlangt 59.7); das letzte Gramm enthielt keine Ameisensäure und gab ein Silbersalz mit 63.7 pCt. Ag. Alles übrige Kalksalz wurde in das Natronsalz übergeführt und mit Schwefelsäure die Säure abgeschieden; aus der Natriumbisulfatlösung wurde durch Versetzen mit Wasser, Destilliren u. s. w. noch eine ziemliche Menge Säure gewonnen. Nach öfter wiederholter, fractionirter Destillation siedete die Hauptmenge bei 135—141°; die letzten paar Tropfen gingen bei 141—143½° über. Das daraus bereitete Barytsalz krystallisirte in grossen, schön ausgebildeten Krystallen von der Form des Doppelsalzes von propionsaurem und essigsäurem Baryt.

Nichtflüchtige Säure. Eine kleine Menge flüssiger Säure, wahrscheinlich unzersetzt gebliebene Milchsäure.

Diese Gährung ist eine ganz einheitliche Propionsäuregährung; es wurde keine Buttersäure dabei gebildet.

Bis vor Kurzem war es bekanntlich herrschende Ansicht, dass bei der Gährung des milchsauren Kalkes (und bei der Gährung überhaupt) niemals Propionsäure auftrate.

Diese Ansicht ist jetzt dahin zu modificiren, dass nur bei der reinen Buttersäuregährung keine Propionsäure gebildet wird.

Die in Vergessenheit gerathene, von Vielen wohl auch bezweifelte Propionsäuregährung Strecker's²⁾ gewinnt jetzt erneutes Interesse. Er hat zwar den Siedepunkt seiner Säure nicht bestimmt, doch ist nach seinen Angaben nicht zu bezweifeln, dass er wirklich Propionsäure unter den Händen hatte. Er zerlegte die Rohsäure durch wiederholtes fractionirtes Sättigen mit Potasche und Destillation, und fand, dass sie aus Propionsäure und Essigsäure nebst einer Spur einer höheren Säure bestand. Von propionsaurem Salz stellte er unter

¹⁾ Vgl. meinen ersten Versuch (diese Berichte XI, 1898), bei welchem die Propionsäuregährung nicht ganz einheitlich verlief.

²⁾ Ann. Chem. 1854, 92, 80.

Anderem das Barytsalz dar, das er in schön ausgebildeten Krystallen erhielt.

Gelatin und Eiweiss.

Bei Spaltpilzgährungen ist Alkohol ein sehr häufiges Gährungsprodukt. Um zu sehen, ob auch bei der Fäulniss von Gelatin und Eiweiss, die ja durch Spaltpilze verursacht wird, Alkohol aufträte, stellte ich zwei Versuche mit je 100 g Gelatin und Eiweiss an.

Bei der Gelatinfäulniss hatte sich kein Alkohol gebildet, bei der Eiweissfäulniss zweifelhafte Spuren. Doch verdiente bei Fäulnissversuchen mit grösseren Mengen Eiweiss das Suchen nach Alkohol Berücksichtigung.

Gährungswasserstoff.

Von einigen Autoren werden dem Gährungswasserstoff weitgehende Reductionswirkungen zugeschrieben. Er soll Sulfate reduciren, Milchsäure in Propionsäure, Aepfelsäure in Bernsteinsäure überführen, ja er soll sogar flüchtige Fettsäuren zu den entsprechenden Alkoholen reduciren.

Nach dem was bis jetzt sicher über den Gährungswasserstoff constatirt ist, sind seine Reductionswirkungen etwa denen des Natriumamalgamwasserstoffs an die Seite zu stellen.

Gährungswasserstoff führt Invertzucker in Mannit über, er reducirt Nitrate, er führt Indigblau in Indigweiss über. Er lässt dagegen Sulfate unberührt. Ich habe Dutzende von Spaltpilzgährungen, bei denen Wasserstoff frei wird, durchgeführt, ohne dass von dem zugesetzten Sulfat eine Spur reducirt worden wäre. Andererseits habe ich intensive Sulfatreduction beobachtet in Fällen, wo gleichzeitig keine Spur Gährung stattfand. Ich halte die Sulfatreduction für verursacht durch einen Spaltpilz (wahrscheinlich einen *Micrococcus*¹⁾); mit dem Gährungswasserstoff hat die Sulfatreduction nichts zu thun.

Die Sulfatreduction durch Spaltpilze verdiente eine genauere Untersuchung. Ein interessanter Punkt dabei ist, dass zur Sulfatreduction Energie verbraucht wird; es muss also gleichzeitig noch ein anderer Vorgang stattfinden, bei welchem Energie frei wird.

Was die angebliche Reduction von Milchsäure zu Propionsäure durch Gährungswasserstoff anbelangt, so genügt zur Widerlegung die Anführung der Thatsache, dass bei der reinen Buttersäuregährung des milchsauren Kalkes keine Spur Propionsäure gebildet wird.

¹⁾ Beggiatoen, die bekanntlich in Mineralquellen Sulfate reduciren, traten bei meinen Versuchen niemals auf.

Aepfelsaurer Kalk und Glycerin.

Aus einer Anzahl kleinerer und zwei grösserer Versuche ergab sich als Resultat, dass derjenige Spaltpilz, der äpfelsauren Kalk in bernsteinsauren, essigsaurer und kohlen-sauren Kalk verwandelt, auch Glycerin in Gährung versetzt. Die Form des Spaltpilzes ändert sich beim Aussäen von der einen in die andere Gährflüssigkeit und umgekehrt nicht.

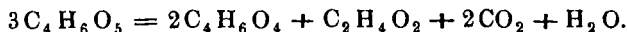
Diese Versuche sind weniger von chemischem als von botanisch-morphologischem Interesse in Bezug auf die offene Fundamentalfrage der Constanz oder Variabilität der Spaltpilzformen; ich werde hierauf in Verbindung mit anderen Thatsachen später zurückkommen.

1) Aepfelsaurer Kalk. 1 Tag nach der Aussaat war die Flüssigkeit in stürmischer Gährung; 5 Tage nach der Aussaat war die Gährung völlig beendigt. Die Gährung war eine glatte, durchaus einheitliche. Während des ganzen Verlaufs derselben war nur ein und dieselbe Spaltpilzform vorhanden. Es sind kleine, dünne Stäbchen, die Zellen oft paarweise zusammen.

Gährungsprodukte aus 53.6 g Aepfelsäure: 0.5 g Alkohol vom Siedepunkt 78—79°, also Aethylalkohol. 10.8 g Kalksalz der flüchtigen Säure. Das erste Gramm Kalksalz gab ein Silbersalz mit 64.4 pCt. Ag, das letzte enthielt keine Ameisensäure. Die flüchtige Säure besteht somit aus reiner Essigsäure.

Nichtflüchtige Säure: 30.8 g Bernsteinsäure. Die Hauptmenge krystallisirte aus der concentrirten Chlorcalciumlösung beim Erkalten in farblosen Krystallen aus, der Rest wurde durch Ausschütteln mit Aether gewonnen.

Die Mengen von Essigsäure und Bernsteinsäure stimmen wieder genau auf die in der Mittheilung IV als wahrscheinlich angenommene Gleichung:



Hiernach müssten aus 53.6 g Aepfelsäure 10.5 g essigsaurer Kalk und 31.4 g Bernsteinsäure erhalten werden.

Die Gleichung kann demnach als erwiesen angenommen werden.

2) Glycerin. Spaltpilz der nämliche wie oben. Produkte aus 50 g Glycerin: 10.6 g Alkohol vom Siedepunkt 78½—80°. 3.6 g Kalksalz der flüchtigen Säure; das erste Gramm Kalksalz gab ein Silbersalz mit 62.9 pCt. Ag; die zwei letzten Gramm bestanden wesentlich aus ameisensaurem Kalk. Nichtflüchtige Säure: 0.03 g Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 181°.