

Krystall bekannt, bei dem ohne Zustandsänderung der Ausdehnungskoeffizient bei steigender Temperatur in der angegebenen Weise abnimmt.

Jena, Mineralogisches Institut, März 1908.

---

**246. Eduard Buchner und Jakob Meisenheimer:  
Über Buttersäuregärung.**

(Vorläufige Mitteilung.)

[Aus dem chem. Laboratorium der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.]

(Eingegangen am 16. April 1908.)

Unter den Gärungsvorgängen verdient die Buttersäuregärung vom Standpunkt des Chemikers aus besonderes Interesse, weil dabei sowohl die sechsgliedrige Kohlenstoffkette des Traubenzuckers, wie die dreigliedrigen des Glycerins und der Milchsäure im wesentlichen unter Bildung viergliedriger Kohlenstoffketten, nämlich von *n*-Buttersäure und *n*-Butylalkohol, zerfallen. Bei der Zersetzung des Glycerins und der Milchsäure handelt es sich somit um eine Synthese, während im allgemeinen die Gärungserscheinungen auf den Abbau längerer Kohlenstoffketten in kürzere hinauslaufen. Wir haben deshalb eine nähere Untersuchung des chemischen Verlaufes dieser Vorgänge begonnen, wobei unser Augenmerk besonders auf die gleichzeitige quantitative Bestimmung der sämtlichen Gärprodukte gerichtet war. Außerdem wurde versucht, das Verständnis des Mechanismus der Reaktion durch vergleichendes Studium des Glycerin- und des Glucosezerfalls zu fördern.

Es sind eine ganze Reihe von Bakterien bekannt geworden, welche Buttersäuregärung erregen. Zu unseren Untersuchungen diente der *Bacillus butylicus* von A. Fitz, welcher dem einen von uns von früher her<sup>1)</sup> in Form eines Sporenpräparates noch zur Verfügung stand. Dieser Spaltpilz gehört zu den fakultativ anaeroben Organismen, während die am genauesten untersuchten Buttersäuregärungs-Erreger nach den umfangreichen Arbeiten von A. Schattenfroh und R. Graßberger<sup>2)</sup> streng anaerob sind. Soweit die vorliegenden Angaben erkennen lassen, scheinen jedoch die mit den verschiedenen Bakterien

---

<sup>1)</sup> Buchner, Ztschr. für physiol. Chem. **9**, 395 [1885].

<sup>2)</sup> Archiv für Hygiene **37**, 54 [1900]; **42**, 219 [1902]; **48**, 1 [1903]; **60**, 40 [1907].

erhaltenen Produkte wenigstens in qualitativer Hinsicht dieselben zu sein. Auf die Beziehungen des *Bacillus butylicus* zu anderen Organismen, insbesondere zum *Granulobacter saccharobutyricum*, mit dem er nach W. Beyerinck<sup>1)</sup> identisch sein soll, wird erst später in der ausführlichen Publikation eingegangen werden.

Es liegen bis jetzt nur zwei vollständig durchgeführte Versuche vor. Beim ersten derselben wurde Glycerin bei Anwesenheit anorganischer Nährsalze und von Calciumcarbonat vergoren. Die Gärflüssigkeit erfüllte einen 2 L-Kolben fast vollständig, durch welchen ab und zu Luft hindurch geleitet wurde. Die Gase passierten zunächst einen Trockenapparat, darauf zwei gewogene Absorptionsgefäße mit Kalilauge und wurden schließlich über Wasser aufgesammelt. Da sich der erste Kaliapparat nach 2 Monaten durch ausgeschiedenes Bicarbonat verstopfte, war eine Unterbrechung des Versuches für kurze Zeit erforderlich, was zu geringen Gasverlusten geführt haben wird. Infolge äußerer Gründe mußte der Versuch aufgearbeitet werden, bevor alles Glycerin vergoren war. Da aber die Methode von S. Zeisel und R. Fanto<sup>2)</sup> eine Bestimmung des unvergorenen Glycerins gestattete, sind dadurch keine weiteren Schwierigkeiten entstanden.

Unser zweiter Versuch betraf die Vergärung von Glucose, ebenfalls bei Gegenwart von Calciumcarbonat und anorganischen Nährsalzen. Die Nährlösung wurde in einen großen, mit Gummistopfen verschlossenen Kolben eingefüllt, der dann teilweise evacuiert und hierauf mit einem Barometerrohr verbunden wurde. Wenn der Innendruck infolge der entwickelten Gase etwa dem Luftdruck gleich geworden war, was sich am Stande des Quecksilbers direkt zu erkennen gab, wurden die Gase jedesmal in eine leere Flasche abgesaugt und analysiert. Bei Unterbrechung des Versuches erfolgte die Austreibung der gelösten Gase durch Erhitzen des ganzen Kolbens im siedenden Wasserbade unter Luftdurchleiten und ihre Bestimmung wie beim ersten Versuch. Nach anderthalb Monaten war der ganze Zucker verschwunden.

Es ergab sich, daß sowohl bei der Glycerin- als bei der Glucosegärung qualitativ dieselben Stoffe entstehen: *n*-Butylalkohol, Äthylalkohol, *n*-Buttersäure, Essigsäure, Ameisensäure, Milchsäure, Kohlendioxyd und Wasserstoff. Die gleichen Produkte sind auch schon von früheren Forschern beobachtet worden. Über die quantitativen Verhältnisse gibt die folgende Tabelle Auskunft:

---

<sup>1)</sup> Vergl. dazu O. Emmerling, diese Berichte **30**, 453 [1897].

<sup>2)</sup> Ztschr. für analyt. Chem. **42**, 549 [1903].

Es ergaben	n-Butyl- alkohol	Äthyl- alkohol	Kohlen- dioxyd	Wasser- stoff	Ameisen- säure	n-Butter- säure	Essig- säure	Milch- säure
100 g Glycerin . .	19,6	10,4	42,1	1,9	4,0	0,7	1,0	3,4
100 g Glucose . .	0,7	2,8	48,1	1,6	3,4	26,0	7,5	10,0

Beim Vergleich der Produkte aus Glycerin und aus Traubenzucker zeigt sich vor allem, daß aus ersterem Körper sehr viel größere Mengen von Alkoholen entstehen, während aus dem Kohlenhydrat überwiegend Buttersäure und Essigsäure gebildet werden, was infolge des höheren Prozentgehalts des Glycerins an Wasserstoff verständlich ist. Besondere Beachtung verdient das Auftreten von Milchsäure, welche auch schon Schattenfroh und Graßberger<sup>1)</sup> bei der Buttersäuregärung durch anaerobe Bakterien regelmäßig gefunden haben. Andererseits wird aber bekanntermaßen Calciumlactat von denselben Organismen ebenfalls unter Bildung von Butylalkohol bezw. Buttersäure vergoren<sup>2)</sup>).

Von dem entwickelten Kohlendioxyd ist natürlich nur ein Teil bei dem eigentlichen Gärungsvorgang entstanden; der Rest muß aus dem Calciumcarbonat durch die gebildeten Säuren in Freiheit gesetzt worden sein. Bringt man diesen Betrag, der sich aus der ermittelten Säuremenge leicht feststellen läßt, von dem gefundenen Kohlendioxyd in Abzug und berechnet dann aus den nachgewiesenen Gärprodukten je nach ihrem Kohlenstoffgehalt die Menge Glycerin bezw. Traubenzucker, aus welcher sie entstanden sind, so ergibt sich, daß in dem Glycerinversuch 83, in dem Glucoseversuch 85 % des Gärmaterials in den Gärprodukten wiedergefunden worden sind. In Berücksichtigung des komplizierten Reaktionsverlaufs und der Schwierigkeiten der analytischen Bestimmungen können diese vorläufigen Resultate als befriedigende betrachtet werden.

Wie läßt sich nun erklären, daß sowohl Glycerin wie Glucose hauptsächlich Körper mit viergliedriger Kohlenstoffkette liefern? Der Schlüssel dazu scheint uns in folgender Annahme zu liegen: zunächst wird die Glucose zu einem Körper mit dreigliedriger Kohlenstoffkette abgebaut; es tritt auch bei der Buttersäuregärung, ähnlich wie wir dies für die alkoholische Gärung durch Hefe wahrscheinlich

<sup>1)</sup> Archiv für Hygiene **37**, 83 [1900].

<sup>2)</sup> Vergl. E. Buchner, Ztschr. f. physiol. Chem. **9**, 396 [1885]; R. Graßberger und A. Schattenfroh, Archiv für Hygiene **48**, 22, 83, 102 [1903].

gemacht haben, Milchsäure als Zwischenprodukt<sup>1)</sup> auf. Stellt man sich weiter mit H. Schade<sup>2)</sup> vor, daß aus der Milchsäure in der nächsten Phase Acetaldehyd und Ameisensäure entstehen, so läßt sich nun die Bildung der viergliedrigen Ketten auf eine einfache Kondensation des Aldehyds zu Aldol zurückführen. Dieser letztere Körper kann sich dann entweder direkt, ähnlich wie Glycerinaldehyd in Milchsäure übergeht, in Buttersäure umlagern oder unter Wasserabspaltung Crotonaldehyd bilden, welcher durch Reduktion Butyraldehyd bzw. *n*-Butylalkohol liefern wird. Der Äthylalkohol entsteht aber auf dem gleichen Wege wie bei der Hefegärung.

Die Vorteile dieser Betrachtungsweise sind folgende:

1. Der Zerfall des Glycerins und der Glucose werden auf denselben Vorgang zurückgeführt, auf die Vergärung von Milchsäure. Die Bildung der letzteren Substanz aus Glycerin ist nicht unwahrscheinlich; man darf sich nur erinnern, daß nach E. Herter<sup>3)</sup> beim Schmelzen von Glycerin mit Kalihydrat unter Wasserstoffentwicklung Milchsäure entsteht.

2. Die auffallende Tatsache, daß ein beträchtlicher Wechsel zwischen den Gärprodukten stattfindet, daß bald mehr Milchsäure, bald überwiegend Buttersäure gebildet wird, worauf besonders A. Schattenfroh und R. Graßberger<sup>4)</sup> hinweisen, findet nunmehr ihre Erklärung. Die Bildung der Buttersäure geht immer über Milchsäure. Das Überwiegen der einen oder andern ist vom physiologischen Zustand der Organismen und von der Gärdauer abhängig.

3. Die Entstehung von Körpern mit viergliedriger Kohlenstoffkette aus solchen mit drei- und sechsgliedriger wird jetzt verständlich durch die Neigung zur Aldolbildung.

4. Das Auftreten der verschiedenen Nebenprodukte läßt sich erklären. Die Ameisensäure ist nach H. Schade direktes Gärprodukt und liefert im Falle weiterer Spaltung Kohlendioxyd und Wasserstoff. Durch den letzteren wird der nach H. Schade bei der Gärung gebildete Acetaldehyd zu Äthylalkohol reduziert, welcher in erheblicher Menge angetroffen wurde. Ob die Essigsäure direkt aus Zucker durch besondere Vorgänge entsteht oder durch teilweise Oxy-

<sup>1)</sup> Diese Berichte **39**, 3201 [1906]. Auf die neueren Einwände von A. Slatov (Journ. Chem. Soc. **93**, 231 [1908]) werden wir später zurückkommen.

<sup>2)</sup> Ztschr. f. physik. Chem. **60**, 510 [1907]; Biochem. Ztschr. **7**, 299 [1908].

<sup>3)</sup> Diese Berichte **11**, 1167 [1878]: vergl. auch die Angaben von M. Gläser und Th. Morawski, Monatsh. f. Chem. **10**, 578 [1889], sowie von J. U. Nef, Ann. d. Chem. **335**, 316 [1904].

<sup>4)</sup> Archiv für Hygiene **37**, 86 [1900]; **48**, 82 [1903]

dation von Acetaldehyd, läßt sich vorläufig nicht entscheiden; erinnert sei an ihr regelmäßiges Auftreten in geringer Menge bei der alkoholischen Gärung durch Hefe.

5. Die hauptsächlichsten Gärungsvorgänge werden als nahe verwandte Prozesse erkannt. Der Zusammenhang zwischen der Buttersäuregärung und der alkoholischen Gärung durch Hefe ist soeben mehrfach klargelegt worden. Die Milchsäuregärung erscheint als eine Vorstufe sowohl der alkoholischen als der Buttersäuregärung. Ähnliche Betrachtungen lassen sich leicht auch auf die Methangärung der Cellulose übertragen, bei welcher, analog wie bei der Buttersäuregärung Ameisensäure in Kohlendioxyd und Wasserstoff<sup>1)</sup> zerfällt, Essigsäure in Kohlendioxyd und Methan gespalten wird. Bei allen diesen durch Mikroorganismen bewirkten Umsetzungen treten möglicherweise dieselben oder sich sehr nahe stehende Enzyme in Tätigkeit. Auch mit anderen Vorgängen in den Lebewesen bestehen vielleicht enge Beziehungen, nämlich mit dem Übergang von Kohlenhydraten in Fette<sup>2)</sup>. Bei der Buttersäuregärung wird aus dem Traubenzucker eine richtige Fettsäure mit vollständig reduzierter Kohlenstoffkette gebildet. Ähnlich mag wohl auch durch eine fortgesetzte Aldolkondensation<sup>3)</sup> der Aufbau der Palmitin- und Stearinsäure aus Zucker erfolgen.

Eine Anzahl dieser Hypothesen wird sich vielleicht experimentell prüfen lassen. Auf rein chemischem Wege ist die Bildung von Buttersäure aus Milchsäure durch Schmelzen mit Alkali<sup>4)</sup> erzielt und beim Erhitzen von Glycerin mit Kaliumhydroxyd<sup>5)</sup> wahrscheinlich gemacht worden. Ebenso hat E. Duclaux<sup>6)</sup> nachgewiesen, daß aus Calciumlactat durch Einwirkung des Sonnenlichts bei Gegenwart von Quecksilbersalzen Bildung von buttersauren Salzen erfolgt. Endlich erhielt vor kurzem O. Makowka<sup>7)</sup> durch Schmelzen von Palladiumacetylen mit Kali quantitativ Buttersäure; diese letztere Reaktion kann kaum anders als über Zwischenprodukte wie Aldol bezw. Crotonaldehyd verlaufen, worauf auch schon der Verfasser hinweist.

Einige Versuche zum Nachweis, daß es sich auch bei der Buttersäuregärung um die Wirkung von Enzymen handelt, haben bis jetzt

1) Vergl. H. Franzen und G. Braun, *Biochem. Ztschr.* **8**, 29 [1908].

2) Vergl. Emil Fischer, *Organische Synthese und Biologie*, Berlin, J. Springer, 1908, 11.

3) Vergl. H. St. Raper, *Chem. Zentralbl.* **1908**, I, 223.

4) F. Hoppe-Seyler, *Ztschr. für physiol. Chem.* **2**, 14 [1878].

5) E. Herter, diese *Berichte* **11**, 1167 [1878].

6) *Bull. soc. chim.* [2] **47**, 385 [1887]; *Annal. de l'Institut national agronom.* **10**, 29 [1886].

7) Diese *Berichte* **41**, 828 [1908].

nicht zum Ziele geführt, was angesichts des höchst komplizierten Vorganges der Buttersäurebildung nicht zu verwundern ist. Die Arbeiten werden auch durch die Anwesenheit der sehr widerstandsfähigen Dauersporen des *Bacillus butylicus*, welche die Acetonbehandlung lebend überstehen, wesentlich erschwert.

#### Experimentelles.

Zur Bestimmung der gebildeten Alkohole in den vorliegenden Versuchen 1. und 2. wurden die vergorenen Flüssigkeiten zur Hälfte abdestilliert. Mit den Alkoholen ging dabei ein gelbliches, in Wasser unlösliches, übel riechendes Öl über, welches beim Kochen mit Bleicarbonat dieses infolge Bildung von Bleisulfid schwärzte. Es bestand demnach, jedenfalls zum Teil, aus Schwefelverbindungen, deren Natur indessen wegen zu geringer Menge bisher nicht aufgeklärt werden konnte. Durch wiederholtes abwechselndes Destillieren mit Säure und Alkali ließ sich das Öl fast völlig entfernen. In dem auf ein kleines Volumen zurückgeführten Destillat wurde zunächst die Gesamtmenge der vorhandenen Alkohole nach R. Gaunt<sup>1)</sup> ermittelt. Zur Bestimmung des Verhältnisses, in welchem Äthyl- und Butylalkohol in der wäßrigen Flüssigkeit vorlagen, diente das Verfahren von E. Duclaux<sup>2)</sup>, welches darauf beruht, daß die Viscosität einer wäßrigen Lösung schon durch die Gegenwart geringer Mengen von Äthyl- oder Butylalkohol in sehr verschiedenem Maße geändert wird. Die Viscosität wurde in höchst einfacher Weise mit dem Duclauxschen Tropfenzähler gemessen; die Zahl der Tropfen, in welchen ein bestimmtes Volumen der Lösung (2 ccm) von bekanntem Gesamtgehalt an Alkoholen aus einer engen Öffnung ausfloß, gestattete ohne weiteres, das Verhältnis von Äthyl- zu Butylalkohol aus einer vorher aufgestellten Tabelle zu entnehmen. Eine große Zahl von Kontrollbestimmungen überzeugte uns von der Brauchbarkeit der Methode; die Fehler dürften keinesfalls 10 % erreichen.

Die Bestimmung der Milchsäure erfolgte in gewohnter Weise durch erschöpfendes Ausäthern eines abgemessenen Teiles des angesäuerten Destillationsrückstandes; sie kam in Form ihres Zinksalzes zur Wägung. Eine Prüfung des von A. Partheil<sup>3)</sup> vorgeschlagenen

<sup>1)</sup> Ztschr. für analyt. Chem. **44**, 106 [1905].

<sup>2)</sup> Traité de Microbiologie **4**, 26 [1901].

<sup>3)</sup> Ztschr. f. d. Untersuchung der Nahrungs- u. Genußmittel **5**, 1053 [1902].  
Nach A. Bistrzycki und B. v. Siemiradzki (diese Berichte **39**, 55 [1906]) entwickelt Milchsäure mit konzentrierter Schwefelsäure nur 80–85% der theoretischen Menge Kohlenoxyd.

Verfahrens zur quantitativen Analyse der Milchsäure ergab, entgegen der Mitteilung von G. Paris<sup>1)</sup>, stets zu niedrige Werte, und zwar im günstigsten Falle um 7%. Dagegen zeigte ein Kontrollversuch, daß die Methode der Milchsäurebestimmung in Form des Zinksalzes mit reinen Milchsäurelösungen sehr gute Zahlen liefert. Eine Lösung, die der direkten Titration nach dem Erhitzen mit überschüssiger Natronlauge zufolge 1.18 g Milchsäure enthielt, gab 1.925 g lufttrocknes Zinksalz, entsprechend 1.17 g Milchsäure. Selbstverständlich werden die Resultate ungenauer, wenn die Milchsäure aus kompliziert zusammengesetzten Gemischen, wie sie im allgemeinen in den Gärungsflüssigkeiten vorliegen, herausgeholt werden muß; aber dasselbe gilt noch in verstärktem Maße für die Partheilsche Methode.

Aus dem Rest des Destillationsrückstandes wurden nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure die flüchtigen Säuren, also Ameisensäure, Essigsäure und Buttersäure mit Dampf abgetrieben. Im Destillate ließ sich die Ameisensäure leicht und genau durch Erhitzen eines abgemessenen Teiles mit Quecksilberchlorid und Natriumnitrit<sup>2)</sup> ermitteln. Die übrig bleibende Hauptmenge wurde neutralisiert, eingengt und zur Zerstörung der Ameisensäure nach D. S. Macnair<sup>3)</sup> mit Chromsäure und Schwefelsäure gekocht. Schwierigkeiten bot die Trennung des nunmehr noch vorhandenen Gemenges von Essigsäure und Buttersäure. In dem Glucoseversuch wurde ein Näherungswert in der Weise erhalten, daß die mit Natronlauge genau neutralisierte Lösung mit Silbernitrat fraktioniert gefällt und die Silbersalze analysiert wurden. Da dabei die Gesamtmenge der vorhandenen Säuren in die Silbersalze umgewandelt und als solche ausgefällt worden waren (die Abscheidung der letzten Fraktion erfolgte durch Zusatz von Alkohol), so ließ sich aus den Silberzahlen immerhin mit einiger Annäherung auf das Verhältnis zwischen Essig- und Buttersäure schließen. Eine genauere Bestimmung gestattete die zweite Methode, welche im Glycerinversuch zur Verwendung kam. Diese, von E. Duclaux<sup>4)</sup> beschrieben, gründet sich auf die verschiedene Flüchtigkeit beider Säuren mit Wasserdampf; die Essigsäure geht viel langsamer über als Buttersäure. Destilliert man nun eine abgemessene Menge (110 ccm), fängt je 10 oder 20 ccm gesondert auf und titriert diese für sich, so kann man aus den gefundenen Zahlen unter Berücksichtigung der vorhandenen Gesamtmenge von Säuren auf den relativen Gehalt an Essig-

<sup>1)</sup> Chem. Zentralbl. 1908, I, 773.

<sup>2)</sup> E. Buchner, J. Meisenheimer und H. Schade, diese Berichte 39, 4226 [1906].

<sup>3)</sup> Ztschr. für analyt. Chem. 27, 398 [1888]; Chem. News 55, 229 [1887].

<sup>4)</sup> Traité de Microbiologie 3, 384 [1900].

und Buttersäure schließen und diesen mit Hilfe einer von Duclaux aufgestellten Tabelle berechnen. Vielfache Analysen mit reinen Essigsäure- und Buttersäurelösungen und mit Gemengen von beiden bewiesen uns, daß die Methode auf etwa 5—10% genaue Werte liefert.

Die Duclauxschen Methoden zur Bestimmung des Äthyl- und Butylalkohols, bezw. der Essig- und Buttersäure neben einander können natürlich nur dann Verwendung finden, wenn außer diesen keine anderen Alkohole oder Säuren vorliegen. Daß diese Voraussetzung in unserem Falle zutrifft, davon haben wir uns in einem im größeren Maßstabe durchgeführten Versuche (s. u. Nr. 3) überzeugt, bei welchem so viel von dem Alkohol- und Säuregemisch erhalten wurde, daß zur Trennung durch fraktionierte Destillation geschritten werden konnte. Es ergab sich die Abwesenheit von Propylalkohol und Propionsäure.

1. Etwa 50 g käufliches Glycerin, 0.1 g Kaliumphosphat, 0.05 g Magnesiumsulfat und 1 g Ammoniumsulfat wurden in Wasser zu genau 1 l gelöst, mittels eines weiteren l Wasser in den Gärkolben übergeführt und nach Zusatz von 10 g Calciumcarbonat sterilisiert. 10 ccm dienten zur Glycerinbestimmung; nach deren Ergebnis kamen insgesamt 45.1 g Glycerin in Anwendung. Am 16. Mai 1907 wurde mit 10 ccm einer etwa 8 Tage alten Reinkultur des *Bacillus butylicus* in der gleichen Nährlösung geimpft und der Kolben mit dem schon oben kurz beschriebenen Apparat verbunden. Die Bakterien entwickelten sich bei 37° nur langsam; erst nach 4 Wochen war deutliche Gärung zu bemerken. Am 8. Juli verstopfte sich der Kaliapparat; trotz aller Vorsicht ging infolge des im Innern entstandenen Überdrucks beim Auswechseln ein geringer Teil der Gärungsgase verloren. Wegen des Ferienbeginns mußte der Versuch am 5. August 1907 unterbrochen werden, ehe die Gärung zu Ende war. Zu diesem Zwecke wurde der Kolben 1—1½ Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt und gleichzeitig Luft hindurch geleitet, um alle Gärungsgase auszutreiben und in die Vorlagen überzuführen. Nach Auseinandernehmen des Apparates wurde die Gärflüssigkeit etwa zu  $\frac{2}{3}$  abdestilliert, der Rückstand auf genau 1 l aufgefüllt und in 10 ccm davon der Glyceringehalt bestimmt. Es waren im ganzen noch 20.1 g Glycerin vorhanden, mithin 25.0 g vergoren. — In dem vorgelegten Kolben hatten sich bis zur ersten Unterbrechung 4.3 l feuchtes Gas (760 mm, 20°), am Schluß nochmals 5.5 l (758 mm, 16°) angesammelt. Gas I bestand aus 55.6% Wasserstoff, 6.3% Sauerstoff und 38.1% Stickstoff, Gas II enthielt 58.4% Wasserstoff, 7.8% Sauerstoff und 33.8% Stickstoff<sup>1)</sup>. Daraus berechnen sich insgesamt  $0.196 \text{ g} + 0.267 \text{ g} = 0.463 \text{ g}$  Wasserstoff. Gleichzeitig waren in den Kali-

<sup>1)</sup> Es war also weniger Sauerstoff im Verhältnis zum Stickstoff vorhanden als der normalen Luftzusammensetzung entspricht. Das Defizit dürfte zum Teil auf Sauerstoffverbrauch während der Gärung, zum Teil auf selektive Absorption durch das Sperrwasser zurückzuführen sein.



apparaten 10.52 g Kohlendioxyd absorbiert worden. Methan war nicht vorhanden.

Das die Alkohole enthaltende wäßrige Destillat wurde nach der Vereinigung mit dem Anteil, welcher bei der Gärung in das Schwefelsäure- und Chlorcalciumrohr mitgerissen war, auf 400 ccm konzentriert. Depression 0.600°, entsprechend 1.41 % Alkohol, berechnet auf Äthylalkohol. Ein Teil dieser Flüssigkeit wurde so stark verdünnt, daß die Konzentration noch 0.5 % Äthylalkohol entsprach. Von dieser Lösung flossen 2 ccm aus dem Duclauxschen Tropfenzähler bei 15° in 121 Tropfen aus. Aus dieser Zahl ergibt sich nach besonderen, mit einem Gemenge der reinen Alkohole angestellten Versuchen das Verhältnis von Äthylalkohol zu Butylalkohol wie 46:54 (in Molekulargewichten). Es berechnen sich so schließlich: 2.60 g Äthylalkohol, 4.90 g *n*-Butylalkohol.

Der nach dem Abdestillieren der Alkohole verbleibende Rückstand wurde zunächst zur Prüfung auf eventuell gebildetes Trimethylenglykol<sup>1)</sup> 3 Tage im Pipschen Apparat mit Äther extrahiert; es gingen nur unwägbare Spuren in den Äther. Die Lösung wurde jetzt stark eingedampft und auf 250 ccm aufgefüllt. Davon dienten 150 ccm zur Milchsäurebestimmung; es wurden 0.84 g Zinklactat gefunden. Daraus berechnen sich auf die Gesamtmenge: 0.84 g Milchsäure. — Die noch übrigen 100 ccm gaben bei der Destillation mit Phosphorsäure ein Destillat, welches 22.0 ccm  $\frac{n}{2}$ -Natronlauge zu neutralisieren imstande war; auf die Gesamtmenge berechnen sich daraus 55.6 ccm  $\frac{n}{2}$ -Lauge. Von der darin enthaltenen flüchtigen Säure erwiesen sich 1.01 g als Ameisensäure. Diese entsprechen 43.9 ccm  $\frac{n}{2}$ -Lauge, mithin bleiben für die andern flüchtigen Säuren nur 11.7 ccm. Das Verfahren der fraktionierten Wasserdampfdestillation von Duclaux ergab nach Zerstörung der Ameisensäure mit Chromsäure ein Verhältnis von Essigsäure zu Buttersäure wie 2:1 (nach Molekulargewichten). Danach berechnen sich: 0.24 g Essigsäure, 0.18 g Buttersäure.

2. 20.0 g Glucose wurden in einem Liter der gleichen anorganischen Nährlösung wie in 1. gelöst und nach Zusatz von 15 g Calciumcarbonat in einem 5-l-Kolben sterilisiert. Am 22. 6. 1907 wurde der Kolbeninhalt mit 10 ccm einer etwa 8 Tage alten Reinkultur des Butylbacillus in zweiprozentiger Glucoselösung geimpft, der Kolben mit Gummistopfen verschlossen und auf etwa 300 mm evakuiert. Versuchstemperatur: 30—40°. Die Gärung setzte rasch und stürmisch binnen 2 Tagen ein und vollendete sich in 3—4 Wochen. Als der Versuch am 6. 8. 07 aufgearbeitet wurde, war mit Fehlingscher Lösung kein Zucker mehr nachweisbar. Während der Gärung waren 0.326 g Wasserstoff und 9.62 g Kohlendioxyd entwickelt worden. Die aufgefundenen Gase enthielten auch in diesem Versuche weniger Sauerstoff (im ganzen — 0.564 g), als aus der Zusammensetzung der Luft und dem vorgefundenen Stickstoffgehalt zu berechnen war.

Das alkoholhaltige Destillat der Gärflüssigkeit zeigte nach der Konzentration auf 300 ccm eine Gefrierpunktsdepression von 0.090°, was einem Äthyl-

<sup>1)</sup> E. Buchner, Ztschr. f. physiol. Chem. 9, 409 [1885].

alkoholgehalt von 0.21 % entsprechen würde. Durch nochmaliges Destillieren wurde der Gehalt auf 0.5 % erhöht. 2 ccm lieferten nunmehr im Tropfenzähler bei 15° 106 Tropfen. Daraus ergibt sich das Verhältnis Äthylalkohol : Butylalkohol wie 86 : 14; entsprechend 0.55 g Äthylalkohol und 0.14 g *n*-Butylalkohol.

Von dem nach Abdestillieren der Alkohole hinterbleibenden Rückstand wurde zum Nachweis eventuell gebildeten Glycerins oder Trimethylenglykols eine Probe mit Jodwasserstoffsäure erhitzt: Es entstand in der Vorlage nur soviel Jodsilber, als 0.27 g Glycerin für die Gesamtmenge entspricht. Weiter wurden gefunden: 2.0 g Milchsäure und 0.68 g Ameisensäure. Die außerdem vorhandenen flüchtigen Säuren neutralisierten 167.9 ccm  $\frac{1}{2}$ -*n*. Natronlauge. Von diesen flüchtigen Säuren wurde ein Teil mit Silbernitrat fraktioniert gefällt. I. Fraktion: 4.0 g; 55.9 % Ag. II. Fraktion. 2.2 g; 57.0 % Ag. III. Fraktion. 1.3 g; 61.8 % Ag. IV. Fraktion (mit Alkohol niedergeschlagen). 0.9 g; 62.2 % Ag (ber. auf  $C_2H_3O_2Ag$ : 64.7 %, auf  $C_4H_7O_2Ag$ : 55.4 % Ag). Demnach stehen Essigsäure und Buttersäure zu einander etwa im Gewichtsverhältnis von 2:7 oder nach Molekulargewichten von 29:71. So ergeben sich im ganzen: 1.5 g Essigsäure und 5.2 g Buttersäure.

3. Im folgenden Versuche wurden nur die Alkohole und flüchtigen Säuren berücksichtigt: 20 l Nährlösung, enthaltend 5 % Glycerin und 2 % Fleischextrakt, wurden in 5 5-l-Kolben verteilt, nach Zusatz von je 25 g Calciumcarbonat sterilisiert und mit dem Butylbacillus geimpft. Nach 10-tägiger Gärung bei 30—40° wurden daraus isoliert: 55 g über Kaliumcarbonat getrocknete Alkohole, 22 g Bleiformiat und 17 g eines Gemenges von Calciumsalzen flüchtiger Fettsäuren. Weitere 4 l derselben Nährlösung lieferten in 6 Wochen: 24 g Rohalkohole, 22 g Bleiformiat und 12.5 g Calciumsalze. Ein achtmaliges Fraktionieren der vereinigten Alkohole ergab folgende Fraktionen: I. 77—85°: 24 g. II. Gleichmäßig über das Temperaturintervall 85—110° verteilt 5 g. III. 110—116°: 45.1 g. Es waren demnach nur Äthyl- und *n*-Butylalkohol, kein Propylalkohol vorhanden.

Von den zwei Calciumsalzproben wurde je 1 g mit Chromsäure gekocht und dann nach der Methode der fraktionierten Dampfdestillation auf ihren Gehalt an Essigsäure und Buttersäure geprüft; in beiden Fällen ergab sich genau übereinstimmend das Verhältnis Essigsäure zu Buttersäure wie 2:1 (vergl. auch Versuch 1). Der Rest der Calciumsalze wurde mit konzentrierter Schwefelsäure destilliert und das Übergehende fraktioniert. Ein dreimaliges Durchfraktionieren lieferte folgende Fraktionen: I. 100—110°: 4.5 g. II. 110—125°: 9.5 g. III. 125—145°: 1.5 g. IV. 145—162°: 3.5 g. Die ersten Fraktionen bestanden offenbar wesentlich aus Essigsäure, der noch Ameisensäure beigemischt war, die vierte aus Buttersäure. Propionsäure war in irgend erheblicher Menge sicherlich nicht vorhanden.