

Über die Bildung der Paramilchsäure durch Gährung des Zuckers

von

M. Nencki und N. Sieber.

(Vorgelegt in der Sitzung am 9. Mai 1889.)

Bei Herstellung der Reinculturen von Rauschbrandbacillen haben wir gesehen, dass die aus der Geschwulst der Meer-schweinchen entnommene Flüssigkeit nicht allein die bisher als die einzige Ursache dieser Krankheit angesehenen beweglichen Bacillen, sondern auch einen anaëroben Mikrocooccus enthalte. Diese Mikrocooccen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 0.6 μ . Sie besitzen keine Eigenbewegung und erscheinen meistens in Form von Diplococcen; doch auch in längeren Gliedern zu 3, 4—6 vereint; auch in Haufen, ähnlich den Staphylococcusformen.

In hoher Cultur wächst der Mikrocooccus sowohl in Nähr-gelatine, wie in glycerinhaltigem Nähragar. Sein Wachsthum, namentlich bei Bruttemperatur ist ein sehr rasches. Schon innerhalb 24 Stunden nach der Impfung treten die Colonien auf, die in den nächsten acht Tagen rasch an Umfang zunehmen. Später scheint ein Stillstand in der Vermehrung einzutreten. Sie verflüssigen Nährgelatine nicht. Sie färben sich nach Gram auch mit wässerigem Methylenblau; am besten jedoch mit Ziehl'scher Fuchsinphenollösung. Die Coccen scheinen eine Kapsel zu besitzen, doch gelang es uns nicht, dieselbe durch Färbung deutlich zum Vorschein zu bringen. Wir bezeichnen diesen Mikroben aus weiter unten anzuführenden Gründen als *Mikrocooccus acidi paralactici*. Ob derselbe mit dem kürz-

lich von Gösta Grotenfelt¹ beschriebenen *Streptococcus acidilactici*, mit dem er manche Ähnlichkeit hat, identisch ist, wird man erst entscheiden können, wenn der Grotenfelt'sche Pilz auf sein Verhalten zu Kohlehydraten genauer untersucht sein wird. Sterile Milch wird durch unsern Mikroococcus bei Bruttemperatur nach 48 Stunden zur Gerinnung gebracht. Bei Zimmertemperatur erst später. Er ist pathogen und bewirkt beim Meerschweinchen Phlegmonen, welche unter geeigneten Umständen zu brandiger Nekrose und Tod des Thieres führen. Wir werden später hierauf zurückkommen.

Arloing² fand, dass die Culturen des Mikroococcus septicus puerperalis, namentlich aber die Bacillen des malignen Oedems und des Rauschbrandes die verschiedenen Kohlehydrate vergähren. Seine Angaben über die dabei auftretenden Producte sind ziemlich dürftig und lauten wie folgt:

„Si l'on étudie les produits de ces fermentations, on constate:

1. que les gaz sont constitués par un mélange à proportions variables d'acide carbonique et d'hydrogène;
2. que la partie liquide, à réaction plus ou moins acide suivant qu'on a ajouté ou non de la craie à la matière fermentescible, dégage une odeur lactique, et surtout butyrique, prononcée. Nos collègues, M. Péteaux et M. Cazeneuve, ont bien voulu examiner ce liquide et y ont constaté chimiquement la présence de l'acide butyrique. L'alcool est absent. Au commencement de la fermentation, surtout dans la lactose, il existe des traces d'acide lactique. À une certaine période de la fermentation de l'amidon, on décèle manifestement la glycose à l'aide de la liqueur cupropotassique.“

Um die Spaltungsproducte des Zuckers durch die Rauschbrandbacillen zu untersuchen, verfahren wir folgendermassen: 2 Liter steriler Rinderbouillon³ aus 1 Kilo Fleisch wurden mit 100g reinen schwach geglühten Kalkcarbonat und 200g krystallisirten, sogenannten amerikanischen, von Tromsdorf in Erfurt

¹ Fortschritte der Medicin, Jahrg. 1889, S. 124.

² Comptes rend. T. 101, p. 820.

³ Über die Bereitung derselben vergl. Fraenkel, Grundriss der Bakterienkunde, S. 85.

bezogenen Traubenzucker versetzt, hierauf noch an 2 Tagen bei 100° sterilisirt, dann mit Rauschbrandbacillen von einer eben vergährten Eiweisslösung inficirt, die Luft aus dem Kolben durch Kohlensäure ausgetrieben und bei 38° stehen gelassen. Schon nach 24 Stunden fand Gasentwicklung statt, die an folgenden Tagen intensiver wurde.

Das am dritten Tage aufgefangene Gas bestand aus 72, 28 Vol. % CO_2 und 27, 74 Vol. % H_2 .

Methan war nicht vorhanden. Am fünften Tage, als die Gasentwicklung nachzulassen begann, wurde wieder eine Gasprobe entnommen und analysirt. Sie bestand aus 77,96 Vol. % CO_2 und 21, 89 Vol. % H . Von da ab war die Gasentwicklung nur eine sehr schwache. Am 15. Tage wurde der Versuch unterbrochen und der Kolbeninhalt untersucht. Mikroskopisch fanden sich in der schwach nach Käse riechenden Lösung, nur die beweglichen zum Theil sporenhaltigen Bacillen vor.

Die Flüssigkeit enthielt noch unveränderten Zucker, und zwar betrug die Menge desselben 69, 6g. Sie wurde destillirt wobei aber nur Spuren eines Jodoform bildenden Körpers übergingen. Sie wurde daher mit Oxalsäure bis zur vollständigen Ausfällung des gelösten Kalkes versetzt, vom Kalkoxalat abfiltrirt und von neuem destillirt. In das Destillat gingen die flüchtigen Fettsäuren, aus Essigsäure und Buttersäure, vorwiegend aus der Letzteren bestehend, über. Ihre Menge war jedoch gering und betrug nur einige cm^3 . Der Retortenrückstand wurde jetzt auf dem Wasserbade bis zum Syrup verdunstet und mit Äther extrahirt. In den Äther ging Milchsäure über, ihre Menge betrug über 50g und die Krystallwasser- und Zinkbestimmung ergaben, dass es Gährungsmilchsäure war. 0·8248g. bei 110° getrocknet verloren 0·1502g am Gewicht = 18·21% und hinterliessen nach dem Glühen 0·4488g Zn O = 26·86% Zn .

Wir wiederholten den Versuch mit der Abänderung, dass der Zucker nicht in Rinderbouillon, sondern in Hefeabkochung aufgelöst wurde. Ein Liter Hefeabkochung, 25g CO_3Ca und 100g Dextrose wurden steril gemacht und mit einer Rauschbrandcultur, die lange, bewegliche Bacillen und viele Sporen enthielt, inficirt. Die Luft wurde auch hier, wie in allen folgenden Versuchen, durch Kohlensäure ausgetrieben. Am folgenden Tage

lebhaft Gasentwicklung, die am siebenten Tage ganz aufhörte. Die, wie im vorigen Versuche verarbeitete Nährlösung enthielt Gährungsmilchsäure. 0·2203 g des Zinksalzes verloren bei 110° 0·0397 g an Gewicht oder 18·0%.

Wird eine zuckerhaltige Nährlösung nicht mit einer Reincultur, sondern mit der serösen Flüssigkeit aus der Geschwulst des rauschbrandkranken Thieres geimpft, so entsteht ebenfalls Gährungsmilchsäure. Eine sterile Nährlösung, welche auf 3 Liter Wasser 3 g Pepton (Chapoteau), 100 g amerikanischen Traubenzucker und 50 g Calciumcarbonat enthielt, wurde mit einer solchen serösen Flüssigkeit inficirt. Die Gasentwicklung begann hier erst am dritten Tage. Am sechsten Tage wurde der Versuch unterbrochen und die Nährlösung, in welcher sich bewegliche Stäbchen vorfanden, wovon nur wenige sporenhaltig waren, wie oben verarbeitet. 0·3640 g des erhaltenen Zinklactats verloren beim Trocknen 0·0659 g an Gewicht = 18·1%.

Aus diesen Versuchen, und wir haben noch mehrere mit gleichem Resultate angestellt, geht mit Sicherheit hervor, dass die Rauschbrandbacillen den Zucker zunächst in die gewöhnliche, sogenannte Gährungsmilchsäure verwandeln, aus der hierauf unter Kohlensäure und Wasserstoffentwicklung Buttersäure entsteht. Die Zersetzung des Zuckers ist keine vollständige, indem auch nach längerem Stehen, und wenn die Gasentwicklung aufgehört hat, die Nährlösung noch unveränderten Zucker enthält. Hervorheben möchten wir noch, dass die Rauschbrandbacillen aus der Zuckerlösung beim Meerschweinchen keine Erkrankung mehr hervorrufen.

Etwas anders verhält sich der aus den Rauschbrandgeschwülsten von uns isolirte Mikrocooccus. Er vergärrt ebenfalls Zucker und viel intensiver und vollständiger, als wie die Rauschbrandbacillen. Die hier entstandene Milchsäure ist aber die Fleisch- oder Paramilchsäure, deren Zinksalz in Wasser leichter löslich, nur zwei Moleküle Krystallwasser enthält und optisch activ ist. Wir bezeichnen daher den von uns isolirten Mikrocooccus als *Mikrocooccus acidi paralactici*.

Ein Liter Rinderbouillon, 50 g CO₂ Ca und 100 g Dextrose wurde mit den Coccen inficirt. Schon nach 18 Stunden bei Bruttemperatur begann die Gasentwicklung, welche allmählich

immer stärker wurde, so dass die Flüssigkeit stark schäumte. Die Gasentwicklung dauerte bis zum sechsten Tage. Am neunten Tage wurde der Kolben geöffnet, wobei ein schwacher, nicht unangenehmer Geruch nach Käse auftrat. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden nur die Mikrococcen gefunden. Die vergährte Flüssigkeit, welche nur Spuren unzersetzten Zuckers enthielt, wurde jetzt mit Oxalsäure, bis zur völligen Ausfällung des gelösten Kalks versetzt, filtrirt, eingedampft und mit Äther extrahirt. Nach Abdestilliren des Äthers wurde der Rückstand mit viel Wasser versetzt und mit Zinkhydroxyd gekocht. Aus dem eingedampften Filtrate krystallisirte das Zinklactat aus, das einmal aus Wasser umkrystalisirt, folgende Zahlen ergab: $0.279g$ des lufttrocknen Salzes verloren bei 110° $0.0358g = 12.83\%$ H_2O und hinterliessen nach dem Glühen $0.0809g ZnO = 26.69\%$ Zn . Wir können hier nicht genau die Ausbeute an Milchsäure angeben, doch betrug sie jedenfalls mehr als die Hälfte des angewendeten Zuckers. Der Versuch wurde ceteris paribus wiederholt. Zur Aussaat diente die gleiche Cultur der Koken, und es wurde nur Paramilchsäure erhalten. $0.3856g$ des Zinksalzes verloren bei 110° $0.0491g$ an Gewicht $= 12.88\%$ und hinterliessen nach dem Glühen $0.1215g ZnO = 26.69\%$ Zn . Aus der vergährten Lösung wurden Übertragungen des Mikrocooccus auf Nährgelatine und Agar in „hoher Cultur“ gemacht und durch Infection von den Culturen aus, von Neuem nur Paramilchsäure erhalten, so dass es jetzt eine leichte Sache ist, diese bis jetzt schwer zugängliche Säure sich in grossen Mengen zu verschaffen. Von besonderem Interesse ist noch folgender Versuch, bei welchem die zur Infection verwendete Cultur nicht rein war und ausser dem Mikrocooccus acidi paralactici auch noch Bacillen oder deren Sporen enthielt.

$200g$ Dextrose und $100g CO_3Ca$ in 2 Liter Rinderbouillon wurden nach der Sterilisation mit einer älteren Agarcultur des Mikrocooccus infectirt. Schon nach 24 Stunden fand eine lebhaft Gasentwicklung statt und die Flüssigkeit schäumte stark. Am dritten Tage wurden innerhalb 3 Minuten $44cm^3$ Gas aufgefangen, deren Analyse folgendes Resultat ergab:

Aufgefangenes Gasvolumen	Hgdruck in <i>mm</i>	Temperatur	Auf 0° und 760 <i>mm</i> Druck reducirtes Volumen
44	695	11·6	38·00
nach Absorbtion der Kohlensäure:			
31·4	369	12	14·18
nach Zusatz von Sauerstoff:			
53·7	467	12	30·9
nach der Verpuffung:			
23·4	332	12	9·5
nach Zusatz von Kali:			
23	327	10·4	9·52

Das Gas bestand demnach aus 62·69 Vol. % CO₂ und 37·31 Vol. % H₂.

Am sechsten Tage liess die Gasentwicklung nach und hörte am achten Tage ganz auf. Am zehnten Tage wurde der Kolben geöffnet. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die vergährte Lösung ausser dem *M. acidi paralactici* noch ziemlich viele bewegliche Bacillen enthielt. In der Lösung war keine Spur Zucker mehr vorhanden.

Ein geringer Theil wurde davon in sterile Röhren abgegossen und die Hauptmenge, da sie einen alkoholischen Geruch besass, aus einer tubulirten Retorte destillirt. Das Destillat gab mit Jod und Kalilauge viel Jodoform; wesshalb wir es mit Pottasche übersättigten, wobei sich der übergegangene Alkohol als eine leicht bewegliche, oben aufschwimmende Flüssigkeit trennte. Die Menge des Rohproductes betrug 13 *cm*³. Der Alkohol wurde über Ätzkalk getrocknet und aus einem Fractionirkölbehen destillirt. Die Temperatur stieg rasch auf 114°, wobei der Siedepunkt bei 705 Bst constant blieb. 0·2372 *g* der bei 114° übergegangenen Fraction gaben 0·5596 *g* CO₂ und 0·2922 *g* H₂O, oder 64·65% C und 13·68% H. Butylalkohol = C₄H₁₀O enthält 64·87% C und 13·51% H. Normaler Butylalkohol siedet bei 760 Bst, u. 116·9°. Der hier in Bern herrschende Barometerstand ist erheblich geringer, wodurch sich der etwas erniedrigte Siedepunkt des Alkohols erklärt, und es unterliegt keinem Zweifel, dass der erhaltene Alkohol normaler Butylalkohol war.

Aus dem Retortenrückstande wurde der gelöste Kalk durch Oxalsäure vollkommen ausgefällt und die Flüssigkeit von neuem destillirt. Es ging jetzt in grossen Mengen eine flüchtige Fettsäure über, die sich schon durch ihren Geruch als Buttersäure kennzeichnete. Das Destillat wurde mit Soda neutralisirt, zum Trocknen verdunstet, das rückständige Natronsalz mit 30procentiger Schwefelsäure versetzt und die abgeschiedene Fettsäure über Phosphorsäureanhydrid getrocknet und rectificirt. Auch hier stieg der Quecksilberfaden rasch auf 158—159°, bei welcher Temperatur fast alles überging. Ein Theil der überdestillirten Säure wurde in das Silbersalz verwandelt, welches nach dem Trocknen analysirt mit der Formel $C_4 H_7 Ag O_2$ übereinstimmende Zahlen ergab. 0.0934 g des trockenen Salzes hinterliessen nach dem Glühen 0.0518 g Ag = 55, 46% Ag.

Buttersaures Silber enthält 55.38% Ag. Etwa 2 cm³ der Säure mit kohlensaurem Guanidin erhitzt, gaben ein in viereckigen Tafeln krystallisirendes Guanamin.¹ Es lag also normale Buttersäure vor.

Nach Entfernung der Buttersäure wurde die rückständige Lösung in gleicher Weise wie in früheren Versuchen, auf dem Wasserbade concentrirt, mit Äther ausgeschüttelt und die nach Abdestilliren des Äthers hinterbliebene Milchsäure durch Kochen mit Zinkhydroxyd in das Zinksalz verwandelt. Das zuerst auskrystallisirte, in Wasser schwer lösliche Salz ergab bei der Krystallwasser- und Zinkbestimmung folgende Zahlen: 0.4312 g des lufttrockenen Salzes verloren bei 100° 0.0780 g an Gewicht = 18.06% H₂O und hinterliessen nach dem Glühen 0.1179 g ZnO = 26.86% Zn. Es war dies die gewöhnlich bei der Gährung auftretende Milchsäure mit 3 Mol. Krystallwasser. Die von der ersten Krystallisation abfiltrirte Lauge hinterliess nach dem Verdunsten ein Salz, das aus Wasser umkrystallisirt sich als paramilchsaures Zink erwies. 0.2887 g des lufttrockenen Salzes verloren bei 110° getrocknet 0.0367 g an Gewicht = 12.71% H₂O.

¹ Über die Anwendung des kohlensauren Guanidins zur Erkennung der flüchtigen Fettsäuren. vergl. M. Nencki: Über die Zersetzung der Gelatine und des Eiweisses bei der Fäulniss mit Pankreas. Bern 1876, S. 23.

Es sind also in diesem Versuche sowohl die optisch inactive, als auch die active Milchsäure entstanden. Die Menge der ersteren war überwiegend, etwa $\frac{2}{3}$ betragend, und es unterliegt wohl keinem Zweifel, dass jeder der beiden in der Nährlösung vorhandenen Mikroben die seinem Stoffwechsel eigenthümliche Milchsäure gebildet hat. Die Isomerie der beiden Säuren, welche beide Ethylidenmilchsäuren sind, ist noch immer nicht aufgeklärt; ebenso die Thatsache, dass im Thierkörper und durch gewisse Mikroben aus Zucker die optisch active, durch Alkalien und durch andere bestimmte Spaltpilze dagegen die optisch inactive Modification entsteht, und es wird ein grosser Schritt in der Chemie vorwärts sein, wenn auch hierüber Klarheit gebracht wird. Noch möchten wir bemerken, dass ein mit der vergährten Nährlösung unter Zusatz von etwas Zucker und einem Tropfen Milchsäure inficirtes junges Kaninchen nach 30 Stunden an Rauschbrand zu Grunde ging. In dem Tumor fanden sich vorwiegend bewegliche, auch sporenhaltige Stäbchen vor, nur wenige Coccen, meistens als Diplococcen; dagegen enthielt die Milz, die übrigens nicht vergrössert war, zahlreiche Coccen und Diplococcen, die auch im Herzblute vorhanden waren. Die Frage über die Beziehung des *Mikrococcus acidi paralactici* zum Rauschbrand und dessen pathogene Wirkung wird gegenwärtig von uns untersucht und behalten wir uns weitere Mittheilungen darüber vor. Hier sei noch bemerkt, dass in einem Versuche, wo wir sterile Zuckerlösung mit einer anscheinend, wenigstens der mikroskopischen Untersuchung nach, Reincultur der Stäbchen inficirten, nach vollendeter Gährung darin nur Coccen vorfanden, und auch nur Fleischmilchsäure erhielten. Die nächste Erklärung dafür ist an eine Verunreinigung der Cultur zu denken. Unwissenschaftlich wäre es aber, auch die Frage der Polymorphie der Rauschbrandbacillen nicht einer genaueren Untersuchung werth zu erachten.

Die Paramilchsäure als Gährungsproduct der Kohlehydrate ist schon wiederholt erhalten worden, so zum Beispiel von Hilger¹ bei Gährung des Inosits mit faulem Käse, entgegen dem früheren Befunde von Strecker und Vohl, die aus Inosit die

¹ Ann. chem. Pharm. Bd. 160, S. 336.

inactive Milchsäure mit 18⁰/₀ Krystallwasser erhielten. Der Befund Hilger's veranlasste Vohl¹ den Gährungsversuch mit 250g Inosit zu wiederholen, wobei er wiederum die inactive Milchsäure erhielt.

Es ist interessant zu sehen, wie der Streit, ob aus Inosit die active oder inactive Milchsäure entsteht, erst durch die Bakteriologie entschieden wird. Die Angaben beider Chemiker sind richtig, nur hat Hilger offenbar einen Mikroben bei seiner Gährung gehabt, der aus Inosit die Paramilchsäure bildet. Kurz darauf fand Maly,² dass bei Anwendung von Magenschleimhaut als Ferment aus den gewöhnlichen Zuckerarten „zwar nicht immer, aber doch etwa in der Hälfte der Fälle auch eine kleine Menge Paramilchsäure sich bildete. In einem Falle bestand die ganze Menge der gebildeten Säure aus Paramilchsäure“.

Mit Recht sagt Maly, dass die Entstehung von Fleischmilchsäure durch Gährung des Zuckers nicht mehr bezweifelt werden kann. Beide Ethyldenmilchsäuren, sowohl die inactive wie die active, sind Gährungsproducte der Kohlehydrate. Die Benennung „Fleischmilchsäure“ hat für die optisch active Säure keinen Sinn mehr, wesshalb es von nun ab richtig sein wird, sie als Paramilchsäure zu bezeichnen. Wir wollen nicht in Abrede stellen, dass die in thierischen Geweben und namentlich im Muskel vorkommende Paramilchsäure zum geringen Theil auch aus Eiweissstoffen entstehen kann. Die wahrscheinlichste und natürlichste Annahme ist aber, dass diese Säure im Thierkörper aus Glykogen und anderen Kohlehydraten gebildet wird.

¹ Berl. chem. Ber. 1876, S. 985.

² Dessen Jahresbericht für 1874, S. 85.