

Über die Einwirkung der Bacillen des malignen Ödems auf Kohlehydrate und Milchsäure

(II. Mittheilung)

von

Richard Kerry, und Sigmund Fraenkel,

*Dr. med. et phil.**stud. med.*

Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie an der k. k. Universität
in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 9. Juli 1891.)

Milchsäure.

Um die in unserer ersten Mittheilung¹ angeregte Frage über den Ursprung des Äthylalkohols, den wir bei der Traubenzucker-gährung gefunden haben, zur Entscheidung zu bringen, haben wir neuerdings die Bacillen des malignen Ödems auf inactive Milchsäure, und zwar auf das Kalksalz derselben, einwirken lassen.

Wir stellten uns den milchsauren Kalk aus 150 g Milchsäure dar durch Neutralisirung derselben mit kohlen-saurem Kalk. Dieser milchsaure Kalk wurde in Bouillon gelöst, welche (nach C. Fraenkel) aus 1 kg Rindfleisch und 2 l Wasser dargestellt wurde. Der so gewonnenen Nährlösung wurden 15 g Pepton und 15 g Fleischextract (Kemmerich) zugesetzt. Nach erfolgter fractionirter Sterilisirung wurde der Kolben in gewohnter Weise beschickt und die Luft durch Wasserstoff verdrängt. Der so behandelte Kolben wurde bei Bruttemperatur der Gährung überlassen.

Der Versuch wurde nach 8—10 Tagen, also frühzeitig abgebrochen, da wir eventuell auftretende intermediäre Producte aufsuchen wollten.

¹ Diese Berichte. Bd. XCIX, Abth. II. b, Juli 1890.

Die Verarbeitung geschah in der Weise, dass wir die Flüssigkeit von dem zugesetzten überschüssigen kohlen-sauren Kalke abfiltrirten und das Filtrat zur Gewinnung der Alkohole neutral destillirten, so lange, als das Destillat die Lieben'sche Jodoformreaction gab. Hierauf wurde der Destillationsrückstand mit Wasser verdünnt, mit Oxalsäure angesäuert und zur Gewinnung der flüchtigen Fettsäuren mit Wasserdampf destillirt. Das so gewonnene Destillat wurde mit Barytwasser neutralisirt, eingedampft, wiederholt mit Alkohol von überschüssigem kohlen-sauren Baryt befreit und aus der Lösung des Baryumsalzes das Silbersalz dargestellt. Bei dieser mit salpetersaurem Silber vorgenommenen Umsetzung trat deutliche Reduction zu metallischem Silber auf, was auf Ameisensäure schliessen liess. Diese Vermuthung wurde bestätigt durch die weiteren für Ameisensäure charakteristischen Reactionen (Lösung von frischgefälltem Quecksilberoxyd, Reduction von salpetersaurem Quecksilberoxydul zu metallischem Quecksilber).

Zur Analyse des Silbersalzes wurden verwendet 0·2243 g. Dieselben ergaben 0·1270 g Ag, entsprechend 56·62% Silber. Buttersaures Silber erfordert 55·38% Silber. Die Differenz erklärt sich durch die qualitativ nachgewiesene Beimengung von Ameisensäure. Zur Bestimmung des gebildeten Alkohols wurde unter Abscheidung mit kohlen-saurem Kalium wiederholt destillirt. Es gelang die Abscheidung eines Alkohols. Eine Bestimmung des Siedepunktes liess die geringe Menge nicht zu. Dagegen überführten wir den gewonnenen Alkohol durch Oxydation mit chromsaurem Kalium und Schwefelsäure in die entsprechende Fettsäure. Diese wurde nach Beendigung der Oxydation im Dampfstrom überdestillirt und in ihr Baryumsalz überführt.

Die Bestimmung derselben ergab: 0·1936 g verwendete Substanz, hinterliessen nach dem Glühen 0·1351 g BaCO₃, entsprechend 48·52% Baryum. Propionsaures Baryum erfordert 48·41% Baryum. Die Fettsäure war demnach Propionsäure und stammte aus der Oxydation von Propylalkohol.

In dem nicht flüchtigen Reste der Flüssigkeit, welche voraussichtlich die nicht angegriffene verwendete Milchsäure enthielt, wurden nach Zerlegung der Kalkverbindungen durch Schwefelsäure ausser Spuren von Fleischmilchsäure, welche dem Fleische

und dem Fleischextracte entstammten, trotz wiederholter fractionirter Krystallisation der Kalk- und Zinksalze keine anderen fixen Säuren gefunden. Es haben daher die von uns verwendeten Bacillen nicht die Fähigkeit, aus der inactiven Milchsäure ihre activen Componenten abzuspalten.

Bei der Gährung der Milchsäure entstand daher bis zu der frühzeitigen Unterbrechung des Versuches Propylalkohol, Ameisensäure und Buttersäure. Äthylalkohol konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist aber vielleicht erlaubt, anzunehmen, dass im weiteren Verlaufe der Gährung aus dem Propylalkohol Äthylalkohol gebildet wird.

Milchzucker.

Zur Vergährung wurde eine Flüssigkeit verwendet, enthaltend 2 l Wasser, 7·5 g Fleischextract, 15 g Pepton, 300 g Milchzucker, 100 g kohlen-sauren Kalk.

Die Gährung verlief sehr langsam und träge und wurde erst nach 5—6 Wochen abgebrochen.

Die Verarbeitung geschah in der von uns bereits beschriebenen Weise, die Menge der Gährungsproducte war eine sehr geringe. Die flüchtigen Producte konnten nur durch die qualitativen Reactionen identificirt werden. Sie bestanden aus Äthylalkohol, Ameisensäure und Buttersäure. Die Ameisensäure wurde durch ihre charakteristischen Reductionen, die Buttersäure durch den Geruch und die Bildung von Buttersäureäthylester erkannt. Der Alkohol zeigte einen Siedepunkt (bei der Destillation im Linnemann'schen Rohre) von 78° C. Er wurde oxydirt und zeigte sein Oxydationsproduct den charakteristischen Geruch der Essigsäure; auch erzeugte Eisenchlorid mit dem Natriumsalze die Essigsäurereaction.

Die nicht flüchtige Säure erwies sich als Gährungsmilchsäure, wie die Analyse ihres Zinksalzes zeigte.

Verwendete lufttrockene Substanz 0·6379 g
 verlor beim Trocknen bei 115° bis zum constanten
 Gewicht 0·1199 g,
 entsprechend einem Gewichtsverluste an Krystallwasser von
 18·79%. Gährungsmilchsäures Zink enthält 18·18% Krystall-
 wasser.

Zur Zinkbestimmung wurden verwendet 0.5202 g ohne Krystallwasser. Dieselben ergaben 0.1752 g ZnO , entsprechend 27.52% . Gährungsmilchsäures Zink erfordert 27.27% ZnO.

Rohrzucker.

Zur Vergärung wurden verwendet: 250 g Rohrzucker in 2 l Wasser gelöst; dieser Lösung wurden 7.5 g Pepton, 15 g Fleischextract, 100 g kohlenaurer Kalk zugesetzt. Der verwendete Rohrzucker reducirte Fehling'sche Lösung nicht. Auch in diesem Falle verlief die Gärung sehr träge und waren die Mengen der flüchtigen Producte sehr geringe.

Als flüchtige Producte fanden sich auch hier Ameisensäure, Buttersäure und Äthylalkohol. Die Bestimmung des Alkohols gelang, wie bisher, durch die Identificirung seiner Oxydationsproducte (Aldehyd, Essigsäure).

Eine Siedepunktbestimmung war in Folge der geringen Menge nicht möglich. Ameisensäure und Buttersäure wurden in der oben erwähnten Weise nachgewiesen.

Im nicht flüchtigen Theile wurde Gährungsmilchsäure in grösserer Menge gefunden.

0.7861 g Zinksalz (lufttrocken) verloren 0.1489 g Wasser, entsprechend 18.94% (berechnet 18.18%) Krystallwasser.

Bei der Zinkbestimmung verblieben 0.2096 g ZnO , entsprechend 26.87% ZnO (berechnet 27.27%).

Stärke.

Da bei einem Vorversuche die Stärke nicht angegriffen wurde, entschlossen wir uns, bei einem zweiten Versuche dieselbe durch anhaltendes Kochen theilweise in lösliche Stärke zu überführen.

Wir verwendeten 250 g Weizenstärke, 3 l Wasser, 15 g Pepton, $7\frac{1}{2}\text{ g}$ Fleischextract, 100 g kohlenaurer Kalk. Die Gärung verlief ziemlich rasch und wurde nach drei Wochen abgebrochen. Die nicht in Lösung gegangene Stärke lag anscheinend unverändert am Boden des Kolbens. Es scheint daher, dass in diesem Falle nur die gelöste Stärke vergohren wurde. Von der ungegohrenen Stärke und dem kohlenaurer Kalk wurde

abfiltrirt. Das Filtrat reducirte Fehling'sche Lösung und drehte stark nach rechts. (Im Apparate von Soleil-Ventzke geprüft $5 \cdot 8\%$ Zucker entsprechend.) Wir versetzten daher einen Theil des Filtrates zur Fällung der Dextrine mit Alkohol und konnten im weiteren Filtrate weder Reduction der Fehling'schen Lösung, noch Drehung der Polarisationssebene nachweisen.

Es scheint daher die lösliche Stärke direct in die nun zu besprechenden Körper zu zerfallen, ohne dass eine vorherige Saccharificirung derselben stattfindet.

Der grösste Theil des Filtrates wurde zur Gewinnung des Alkohols neutral destillirt, hierauf nach Abdestilliren von etwa 200 cm^3 mit H_2SO_4 angesäuert und zur Isolirung der Fettsäuren weiter destillirt. Die Destillate wurden in bereits besprochener Weise weiter verarbeitet.

In diesem Falle waren die Gährungsproducte in verhältnissmässig grösserer Menge vorhanden. Der Alkohol, von dem wir etwa $2\text{--}3 \text{ cm}^3$ erhielten, ging scharf bei $78 \cdot 4^\circ \text{ C.}$ über, entsprechend dem Siedepunkte des Äthylalkohols, und gab auch die weiteren für Äthylalkohol charakteristischen Reactionen (Benzoësäureäthylester, Grünfärbung beim Kochen mit chromsaurem Kalium und Schwefelsäure unter Auftreten des Aldehydgeruches), weiter Oxydation desselben zu Essigsäure, welche qualitativ durch die Eisenchlorid- und die Kakodylreaction nachgewiesen wurde. Die flüchtigen Fettsäuren wurden als Barytsalze bestimmt.

$0 \cdot 6459 \text{ g}$ verwendete Substanz ergaben nach dem Glühen $0 \cdot 4592 \text{ BaCO}_3$, entsprechend $49 \cdot 44\%$ Ba. Diese von der für Buttersäure berechneten sehr abweichende Zahl liess auch hier die Anwesenheit einer niedrigeren Fettsäure vermuthen. Thatsächlich liess sich in der wässrigen Lösung des Baryumsalzes mittelst salpetersaurem Quecksilberoxydul, mit frischgefälltem Quecksilberoxyd Ameisensäure nachweisen. Beim Kochen mit salpetersaurem Silber erfolgt Reduction zu metallischem Silber, während ammoniakalische Silberlösung (im Gegensatze zur Essigsäure) keine Reduction zeigte. Auch liess sich mittelst der Kakodylreaction Essigsäure nicht nachweisen. Die Abwesenheit von Propionsäure konnten wir nicht beweisen, deren Anwesenheit ist auch nach den bisherigen Resultaten nicht anzunehmen.

Die nicht flüchtige Säure war auch in diesem Fall inactive Gährungsmilchsäure, und auch hier konnte nur eine dem Gehalte des Fleischextractes an Fleischmilchsäure entsprechende Menge derselben nachgewiesen werden.

0·8319 g Zinksalz (lufttrocken) verloren bei 115° 0·1537 g Krystallwasser, entsprechend 18·37% (berechnet 18·18%) und ergaben beim Glühen 0·2341 g ZnO, entsprechend 28·15% ZnO.

Wir haben endlich auch zur Zeit unserer ersten Mittheilung Vorversuche über die Möglichkeit, Cellulose zu vergähren, angestellt. Wir benützten damals Tannencellulose, welche ausser stickstoffhaltigen Substanzen schwefligsaure Salze und Lignin enthielt. Es ist uns damals auch thatsächlich gelungen, diese Cellulose zu vergähren und wir konnten die Bildung von Alkoholen, flüchtigen und fixen Säuren constatiren. Wiederholt angestellte Versuche, die Gährung mit reiner Cellulose (schwedischem Filtrirpapier, Bruns'scher Watte) unter Zusatz entsprechender Nährsalze hervorzurufen, sind uns bisher nicht gelungen.

Als Resultate der vorliegenden Untersuchung seien hervorgehoben, dass alle von uns untersuchten Kohlehydrate qualitativ gleichartige Gährungsproducte, und zwar Buttersäure, Ameisensäure, Äthylalkohol und Milchsäure liefern, dass die Milchsäure immer nur als inactive Form entsteht und zugesetzte Fleischmilchsäure überhaupt nicht angegriffen wird.

Auf das constante Vorkommen des Äthylalkohols als Product der beschriebenen anaëroben Gährung sei besonders verwiesen. Nach dem Versuche mit der Milchsäure erscheint es höchst wahrscheinlich, dass bei den von uns untersuchten Kohlehydratgährungen die entstehende Milchsäure die weitere Quelle der flüchtigen Gährungsproducte ist.
