

## XXIII.

## Ueber Vorkommen und Bildung der Bernsteinsäure.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

Von Ferdinand Blumenthal,

Cand. med.

Die Entdeckung Pasteur's<sup>1)</sup>, dass bei der alkoholischen Gährung constant Bernsteinsäure durch die Lebensthätigkeit der Hefezellen entsteht, ist lange Zeit hindurch isolirt geblieben. Erst 17 oder 18 Jahre später wurde Bernsteinsäure von Alb. Fitz<sup>2)</sup> in erheblicher Quantität aus einem den Kohlehydraten nahestehenden Körper, dem Mannit, einem sechsatomigen Alkohol, erhalten und zwar durch Vergährung desselben durch Schizomyceten, hauptsächlich wohl *Bacillus subtilis*.

Hieran schloss sich im darauffolgenden Jahre die Auffindung derselben als Produkt der Zersetzung des Eiweiss durch Fäulnissbakterien durch E. und H. Salkowski<sup>3)</sup>. Die genannten Autoren fanden diese Säure bei der Fäulniss des Fleisches in ansehnlicher Quantität, so dass sie leicht rein dargestellt und analysirt werden konnte. Die Bildung derselben erfolgte sehr frühzeitig, so dass sie schon 20 Stunden nach Beginn der Fäulniss nachgewiesen werden konnte. Die Quantität der gebildeten Säure schätzten die genannten Autoren auf 1 pCt. des trocknen Eiweiss; es hat sich später gezeigt, dass diese Schätzung noch bei weitem zu niedrig ist, so dass die Menge derselben weit grösser ist, als die aus Zucker durch alkoholische Gährung erhaltene.

Durch diese Untersuchungen war nachgewiesen, dass die Bernsteinsäure als Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen auftreten kann und als solches in hohem Grade unabhängig ist von der Natur des Nährmaterials der Mikroorganismen.

<sup>1)</sup> Annales de Chimie et de Physique. 3<sup>ème</sup> Série. 1860. Tome 58. p. 334.

<sup>2)</sup> Bericht der deutschen chem. Gesellsch. Bd. X. S. 281 und XI. S. 42.

<sup>3)</sup> Ber. d. d. chem. Gesellsch. Bd. XII. S. 650.

Auf der anderen Seite liegen mancherlei Angaben darüber vor, dass die Bernsteinsäure sich auch in frischen normalen Organen vorfindet. Da die Bernsteinsäure ein Stoffwechselprodukt der Fäulnissbakterien ist, so liegt bei allen diesen Angaben der Verdacht nahe, dass die untersuchten Gewebe nicht in absolut frischem Zustande verarbeitet worden sind. Allerdings ist auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass auch die thierischen Zellen Bernsteinsäure bilden.

Auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. E. Sal-kowski habe ich die Frage, ob die Bernsteinsäure ein ausschliessliches Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen ist, oder ob sie auch den thierischen Zellen als Stoffwechselprodukt zukommt, zum Gegenstande einer Untersuchung gemacht.

Diese Frage ist deshalb von nicht geringem theoretischem Interesse, weil es nur wenige Verbindungen giebt, welche sowohl von Mikroorganismen als auch von den Zellen des Thierkörpers als Stoffwechselprodukte gebildet werden.

## I. Methoden der Untersuchung.

Da es keine Reactionen giebt, durch welche die Bernsteinsäure in Gemischen nachgewiesen werden kann, so bleibt zum Nachweis der Bernsteinsäure nichts anderes übrig, als sie als solche darzustellen und durch Reactionen zu identificiren.

In manchen Fällen kann an Stelle der Bernsteinsäure selbst auch ein Salz derselben dargestellt werden und dieses durch sogenannte Atomgewichtsbestimmung identificirt werden, d. h. durch eine Bestimmung des in einer gewogenen Quantität des dargestellten Salzes enthaltenen Metalls. Meistens wird hierzu das Silbersalz gewählt, weil sich der Silbergehalt ausserordentlich leicht durch einfaches Glühen bestimmen lässt.

Wie man auch die schliessliche Erkennung der Bernsteinsäure oder ihrer Salze ausführen mag, in jedem Falle handelt es sich um die angängige Isolirung der Bernsteinsäure, d. h. um ihre Trennung von einer Anzahl, mitunter grossen Anzahl ausserdem noch vorhandener Stoffe. Da die Natur dieser ausserdem noch vorhandenen Stoffe je nach dem Material, um welches es sich handelt, eine sehr verschiedene ist, so ist es einleuchtend, dass auch die Methode zur Aufsuchung der Bernsteinsäure nicht

ein und dieselbe sein kann, sondern nach der Natur des Untersuchungsmaterials wechseln muss.

1. Auffindung der Bernsteinsäure in gegohrenen alkoholhaltigen Flüssigkeiten.

Die Auffindung der Bernsteinsäure in derartigen Flüssigkeiten ist da, wo es sich nur um vergohrene Zuckerlösungen handelt, eine verhältnissmässig sehr einfache Aufgabe, da hierbei nur die Trennung von Glycerin und den kleinen Quantitäten von Extractivstoffen der Hefe in Betracht kommt. Pasteur, welcher in seiner berühmten Arbeit über die alkoholische Zuckergärung zuerst nachwies, dass die Bernsteinsäure ein constantes und wesentliches Produkt derselben sei, hat sich zu ihrem quantitativen Nachweis ihrer Ueberführung in ihr Calciumsalz mittelst Kalkwasser bedient, indem er das Calciumsalz wog und aus dem Gewicht die Menge der daran beteiligten Bernsteinsäure berechnete. Es ist diese Methode, wie man sich aus der Originalarbeit Pasteur's leicht überführen kann, eine sehr complicirte und schwer auszuführende. Ihr hauptsächlichster Mangel besteht, wie ich mich überzeugte, darin, dass bei jeder Trennung, die bei diesem Verfahren vorgenommen werden muss, etwas Bernsteinsäure verloren geht, indem Bernsteinsäure sowohl in die ätherischen Auszüge übergeht, als auch in den 80procentigen Alkohol, mit welchem das bernsteinsäure Calcium zu seiner Reinigung von den Extractivstoffen der Hefe behandelt war. In allen diesen Fällen konnte ich mit Hülfe der Methode des directen Ausschüttelns mittelst Aether, welche ich weiter unten beschrieben habe, Bernsteinsäure nachweisen und zwar betrug die hierbei noch gewonnene Menge 2—2,6 cg.

Abgesehen davon gelingt es mit dem Pasteur'schen Verfahren nur den Nachweis der freien Säure zu führen, während die eventuell an Alkalien gebundene Bernsteinsäure dabei unberücksichtigt bleibt.

Man könnte daran denken, die Bernsteinsäure direct durch Bindung mit Bleioxyd zu isoliren, ein Verfahren, welches sich zur Trennung von Bernsteinsäure und Milchsäure bewährt hatte. Die zunächst angestellten Controlversuche ergaben Folgendes:

20 g Hefe wurden mit 100 ccm Wasser versetzt und dies zum Sieden erhitzt, um die Hefezellen abzutöden. Diesem Gemisch

wurden 10 cem einer 5procentigen wässrigen Lösung von Bernsteinsäure und 2,5 g Glycerin hinzugefügt. Das Ganze wurde auf dem Wasserbad zur Syrupdicke verdampft. Der Rückstand wurde mit 90procentigem Alkohol ausgezogen, der Auszug filtrirt und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und mit Bleioxydhydrat gekocht<sup>1)</sup>. Der endgültig erhaltene Rückstand wurde, um den Antheil der in demselben enthaltenen Bernsteinsäure festzustellen, in das Silbersalz der Bernsteinsäure übergeführt und als solches getrocknet und gewogen. Dieses wurde sodann im Porzellantiigel geglüht und als met. Silber wieder gewogen<sup>2)</sup>. In diesen Fällen wurde gefunden:

	Bernsteinsaures Silberoxyd.	Met. Silber aus diesem.	pCt.	
1.	0,304 g	0,193 g	63,5	berechnet
2.	0,307 g	0,198 g	64,5	65,06.

Die Quantität der Bernsteinsäure kann man nun entweder aus dem bernsteinsauren Silberoxyd oder aus dem durch Glühen des bernsteinsauren Silbersalzes erhaltenen met. Silber berechnen. Demnach ergibt sich folgende kleine Tabelle.

	Bernsteinsäure			
	aus dem Silber- salz berechnet.	pCt.	aus dem met. Silber berechnet.	pCt.
1.	0,109	21,8	0,111	22,2
2.	0,109	21,8	0,109	21,8

Die grosse Differenz zwischen der ursprünglichen und endgültig erhaltenen Säure hat zum Theil seinen Grund darin, dass die Verluste, welche das Silberverfahren mit sich bringt, nicht unerheblich sind. Ist die Bernsteinsäure isolirt, so erhält man mit der Silberbestimmung, wie weiter unten gezeigt wird, 83—95 pCt., ist sie in Mischungen vorhanden, nur 66—74 pCt. wieder. Aber selbst unter Berücksichtigung dieser Verluste, bleiben die Resultate, die das Verfahren mit Bleioxydhydrat liefert, höchst mangelhafte. Hier sei noch bemerkt, was erst nach Anwendung der eben geschilderten Methode in Erfahrung gebracht wurde, dass J. Macagno<sup>3)</sup> sich des Bleihydroxyds

<sup>1)</sup> Die weitere Beschreibung des Verfahrens siehe S. 550.

<sup>2)</sup> Die genauere Beschreibung der Silberbestimmung siehe S. 547.

<sup>3)</sup> Bericht d. d. chem. Gesellsch. Bd. 8. S. 254.

zur Bindung der Bernsteinsäure im Wein schon früher bedient hat. Da jedoch sein Verfahren anscheinend sehr umständlich ist und die endgültig zum Nachweis der Bernsteinsäure angestellte Reaction mit Eisenchlorid nicht beweisend genug für das Vorhandensein derselben ist, so wurde es gar nicht erst versucht, dies Verfahren bei der Hefegährung anzuwenden.

Die oben geschilderten Methoden beruhen auf der Ueberführung der Bernsteinsäure in ihr Kalk- bzw. Bleisalz. Die angegebenen Resultate zeigen, dass bei letzterem mit erheblichen Verlusten gearbeitet worden ist. Es fragte sich deshalb, ob es nicht möglich sei, dies zu vermeiden, indem, wie es E. Salkowski für die thierischen Flüssigkeiten empfiehlt<sup>1)</sup>, die Bernsteinsäure direct durch Ausschütteln mittelst alkoholhaltigen Aethers gewonnen wird. Zu diesem Zweck wurde folgendermaassen verfahren. Die vergohrene Flüssigkeit wurde filtrirt und zur Syrupdicke auf dem Wasserbad bei mässiger Flamme eingedampft. Der Rückstand wurde mit 90procentigem Alkohol ausgezogen und der Auszug filtrirt. Das Filtrat wurde zu Syrup eingedampft. Der Syrup wurde in Wasser gelöst, mit Salzsäure stark angesäuert und mit einem Gemisch von Aether und Alkohol (10:1) im Schütteltrichter mehrere Male durchgeschüttelt<sup>2)</sup>. Hierbei geht die Bernsteinsäure in den Aether über, und bleibt das Glycerin in der wässrigen Flüssigkeit zurück. Die ätherhaltige Flüssigkeit wurde abgehoben, der Aether abdestillirt und die Destillationsflasche mit etwas Alkohol ausgespült. Die vom abdestillirten Aether befreiten Rückstände wurden in einer Porzellanschale mit der Spülflüssigkeit vereinigt und vorsichtig zur Trockne verdampft, der Rückstand bei 80° getrocknet und gewogen. Ein Probegemisch, wie es oben beschrieben ist, ergab nach diesem Verfahren.

Aether. Rückstand. Berechnet.

1.	0,388 g	0,5 g
2.	0,4065 -	0,5 -
3.	0,408 -	0,5 -

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv f. Physiolog. Bd. 4. S. 95.

<sup>2)</sup> Die Ausschüttelung mit Aether muss natürlich so lange wiederholt werden, als Bernsteinsäure in diesen übergeht. Gewöhnlich genügen 4 bis 6 Ausschüttelungen.

Nach dem Silberverfahren behandelt, lieferte der ätherische Rückstand

1. 0,610 bernsteinsaures Silberoxyd,

2. 0,618 - - -

Dieses lieferte nach dem Glühen

1. 0,381 g met. Silber = 62,5 pCt.

2. 0,386 - - - = 62,5 - , berechnet 65,06.

Hieraus berechnet sich Bernsteinsäure

	Aus dem bernsteinsaur Silberoxyd.	pCt. der ur- sprünglichen Bernsteinsäure.	Aus dem met. Silber.	pCt. der ur- sprünglichen Bernsteinsäure.
1.	0,217 g	43,4	0,229 g	45,8
2.	0,216 -	43,2	0,232 -	46,4

Statt das Silberverfahren anzuwenden wurde im Fall 3 die Reinigung des Rückstandes durch Kohle und Thonplatten vorgenommen. Dazu wurde der ätherische Rückstand in Wasser gelöst und mit einer Messerspitze Knochenkohle bis zur Entfärbung gekocht, von der Kohle abfiltrirt und das Filtrat zur Trockne verdampft. Zur weiteren Reinigung wurde der Rückstand auf eine Thonplatte gebracht, nach etwa 24 Stunden vorsichtig abgenommen und auf einem tarirten Uhrglas getrocknet und gewogen. Es wurde im Fall 3 gefunden 0,297 g Bernsteinsäure = 59,4 pCt. der ursprünglichen Säure. Bei den meisten Versuchen wird man wegen der geringen Färbung des ätherischen Rückstandes sich die Entfärbung durch Kohle ersparen und den Rückstand direct auf Thonplatten bringen können. Dann dürfte das Resultat noch wesentlich günstiger ausfallen. Die so gewonnene Bernsteinsäure hatte ihren Schmelzpunkt bei 180°, war also fast chemisch rein.

Dieses Verfahren berücksichtigt auch die in Form von Salzen vorhandene Bernsteinsäure, indem dieselbe durch die Salzsäure aus diesen Verbindungen in Freiheit gesetzt wird.

Nach Beendigung dieser Vorversuche sollte es festgestellt werden, ob die zuletzt beschriebene Methode auch bei Gährungsversuchen, bei denen, wie Pasteur nachgewiesen, durch die Lebensthätigkeit der Hefezellen noch andere variable Produkte sich bilden, dem von Pasteur angegebenen Verfahren überlegen sei.

Es wurden deshalb je 200 g Rohrzucker, 10 g in Wasser suspendirte und aufgekochte Hefe mit 10 g frischer Hefe<sup>1)</sup> und

<sup>1)</sup> sogenannte Presshefe.

1 Liter Leitungswasser versetzt. Die Flasche, welche die Gährungsflüssigkeit enthielt, wurde mit einem nicht zu dicht schliessenden Glasstöpsel versehen und neben den Wärmeschrank gestellt, an einen Ort, dessen Temperatur constant zwischen  $26-30^{\circ}$  betrug. Das Ende der Gährung wurde durch den negativen Ausfall der Trommer'schen Probe festgestellt.

#### I. Versuch.

Nach 72 Stunden war die Gährung beendet. Die Flüssigkeit wurde filtrirt; das Filtrat auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft, die Rückstände mit Alkohol ausgezogen, der Auszug filtrirt, das Filtrat gemessen und in zwei ganz gleiche Theile getheilt.

Die eine Hälfte wurde mit Kalk behandelt, die Bernsteinsäure aus dem Kalksalz durch Lösung desselben mittelst Schwefelsäure und Ausschütteln der mit Wasser verdünnten Lösung durch Aether gewonnen.

Ihre Menge betrug 0,386 g.

Die andere Hälfte wurde nach dem oben zuletzt beschriebenen Ausschüttelungsverfahren mit Aether behandelt. Der ätherische Rückstand wurde durch Behandlung mit Kohle und auf Thonplatten gereinigt.

Menge der erhaltenen Bernsteinsäure 0,479 g.

#### II. Versuch.

Nach 36 Stunden war die Gährung beendet. Die vergohrene Flüssigkeit reagirte stark sauer.

Bis zu ihrer Trennung in zwei gleiche Hälften wurde sie, wie bei Versuch I angegeben, behandelt; dann die eine Hälfte nach Pasteur verarbeitet. Es wurde hierbei gefunden 0,704 g bernsteinsaurer Kalk; daraus berechnet sich Bernsteinsäure 0,5329 g. In den einzelnen Filtraten konnte, wie dies schon oben erwähnt ist, im Ganzen 0,026 g Bernsteinsäure nachgewiesen werden, indem die betreffenden Flüssigkeiten zur Trockne verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und die Bernsteinsäure durch Ausschütteln mit Aether gewonnen wurde.

Die andere Hälfte wurde nach dem Ausschüttelungsverfahren mit Aether behandelt. Der ätherische Rückstand wurde direct auf Thonplatten gebracht. Es wurde an Bernsteinsäure 0,594 g erhalten. Schmelzpunkt  $181^{\circ}$ .

#### III. Versuch.

Nach 96 Stunden war die Gährung beendet. Die vergohrene Flüssigkeit reagirte stark sauer.

Der eine Theil nach Pasteur behandelt, ergab 0,664 bernsteinsaures Calcium. Daraus berechnet sich Bernsteinsäure 0,5026 g. In den einzelnen Filtraten noch nachgewiesene Bernsteinsäure 0,021 g.

Die andere Hälfte nach dem Ausschüttelungsverfahren mit Aether behandelt.

Der ätherische Rückstand wurde direct auf Thonplatten gebracht. Menge der gefundenen Bernsteinsäure 0,578 g. Schmelzpunkt  $182^{\circ}$ .

Hieraus geht hervor, dass das von E. Salkowski zur Isolirung der Bernsteinsäure empfohlene Verfahren der Ausschüttelung mit alkoholhaltigem Aether (nach dem Ansäuern) vor den sonst angegebenen Verfahren den Vorzug verdient. Für andere Gährungen, bei denen die Bernsteinsäure nur als Nebenprodukt neben anderen Säuren auftritt, ist das Pasteur'sche Verfahren selbstverständlich nicht anwendbar, für diese auch nicht berechnet. Es ist für diese um so weniger anwendbar, als man bei diesen Gährungen vielfach genöthigt ist, dem Gährungsgemisch von Zeit zu Zeit Alkali zuzusetzen; die an Alkalien gebundene Bernsteinsäure durch das Pasteur'sche Verfahren aber nicht gefunden wird.

Für gegohrene Flüssigkeiten ist von Rau<sup>1)</sup> noch eine quantitative Methode angegeben worden, welche speciell für den Nachweis der Bernsteinsäure im Wein geeignet sein soll. Es war ursprünglich nur meine Absicht, das Vorkommen der Bernsteinsäure in den thierischen Flüssigkeiten zu prüfen, und ich versuchte deshalb diese Methode, welche ja erheblich genauer und einfacher zu sein schien, als die bisher bekannten, bei diesen anzuwenden. Rau verfuhr folgendermaassen:

100 cem Wein werden bis zur Syrupdicke verdampft, wiederholt auf dem Wasserbade mit kochendem Alkohol ausgezogen und der alkoholische Auszug jedesmal nach dem Erkalten abfiltrirt. Die Auszüge werden vermischt, der Destillation unterworfen und der Destillationsrückstand in wenig heissem Wasser gelöst. Nach dem Erkalten wird die Lösung, wenn sie trüb ist, filtrirt, hierauf mit Baryumnitratlösung und mit dem 3—4fachen Volumen 90procentigen Alkohols versetzt und tüchtig umgerührt. Nachdem sich der Niederschlag gut abgesetzt hat, wird er auf ein Filter gebracht, mit 70procentigem Alkohol gut ausgewaschen und hierauf eine Zeit lang mit einer genügenden Menge von Natriumcarbonatlösung erwärmt. Die Flüssigkeit wird hierauf abfiltrirt, mit Salpetersäure neutralisirt, auf ein kleines Volumen eingedampft und nach Neutralisation mit Ammoniak mit Magnesiamischung (aus Magnesiumnitrat, Ammoniumnitrat und Ammoniak bestehend) versetzt. Nach 3—4stündigem Stehen wird die Flüssigkeit abfiltrirt, mit Kalilauge erhitzt, bis alles Ammoniak entfernt ist, hierauf von dem ausgeschiedenen Magnesiumhydroxyd abfiltrirt und mit Salpetersäure ganz genau neutralisirt. Nun wird auf 100—150 cem verdünnt und mit Silbernitratlösung (1:20) ge-

<sup>1)</sup> Rau, Die Bernsteinsäure als Produkt der alkohol. Gährung zuckerhaltiger Flüssigkeiten, nebst Studien über quantitative Bestimmung derselben im Wein. München 1892, bei R. Oldenburg.



fällt. Der erhaltene Niederschlag wird auf einem tarirten Filter gesammelt, gut ausgewaschen, getrocknet und gewogen. Hierauf wird er zur Controle im Porzellantiegel geglüht und als metallisches Silber wieder gewogen. Die aus beiden Wägungen berechneten Resultate müssen übereinstimmen.

Es wurden zu einem Probeversuche dem wässrigen Auszug von je 200 g feingehacktem Kaninchenfleisch nach Coagulation der Eiweissstoffe mittelst Aufkochens und Entfernung derselben durch Filtration 0,1 g Bernsteinsäure hinzugefügt und dann nach Rau verfahren. Drei Versuche, also behandelt, ergaben nach genauer Neutralisation beim Zusatz von Silbernitrat einen so geringen Niederschlag, dass dessen Sammlung auf ein tarirtes Filter überhaupt nicht verlohnte.

Da es ohne weiteres nicht ersichtlich war, warum dies Verfahren beim Wein glänzende quantitative Resultate, bei thierischen Flüssigkeiten angewandt aber fast vollständig negative Resultate liefern sollte, so wurden Versuche an einem genau nach Rau hergestellten Kunstwein angestellt. Hier endeten 3 von mir angestellte Versuche ebenso ungünstig wie bei thierischen Flüssigkeiten; ein vierter Versuch, von Herrn Prof. E. Salkowski selbst angestellt, hatte ein ähnliches, vollkommen negatives Resultat.

Es galt nun festzustellen, worauf die Unbrauchbarkeit der Rau'schen Methode beruhen konnte, oder vielmehr beruhen musste. Zu diesem Zwecke wurden einzelne Theile derselben geprüft.

Je 0,1 g Bernsteinsäure wurden in Wasser gelöst, mit Natronhydrat genau neutralisirt, auf 120 ccm verdünnt und mit Silbernitrat (1:20) gefällt. Der Niederschlag wurde auf einem tarirten Filter gesammelt, mit wenig Wasser ausgewaschen und bei 100—120° 2—3 Stunden getrocknet und gewogen. Dann wurde er im Porzellantiegel geglüht und als metallisches Silber wieder gewogen.

Es wurde gefunden:

	Bernstein- saures Silber- oxyd.	Be- rechn.	pCt. des wieder- gefundenen Silbersalzes.	Davon metall. Silber	Ge- funden. pCt.	Für bernstein- saures Silber berechnet.
1.	0,266	0,2813	94,56	0,1725	64,85	65,06
2.	0,265		94,20	0,1744	65,81	
3.	0,234		83,19	0,150	64,11	
4.	0,268		95,28	0,1756	65,52	

Um den Einfluss des im Wein enthaltenen phosphorsauren Natrons auf das Resultat zu erproben, wurden 0,3 g Bernsteinsäure in Wasser gelöst,

mit Natronhydrat neutralisirt, auf 300 ccm verdünnt und in drei gleiche Theile getheilt. Jedem Theil wurden 2 ccm einer 10procentigen Lösung von phosphorsaurem Natron hinzugefügt und mit Magnesiamischung (3 ccm Magnesiumnitrat, 60 ccm Ammoniumnitrat, 80 ccm Ammoniak, 160 ccm Wasser) versetzt. Drei bis vier Stunden wurde die Flüssigkeit stehen gelassen, dann filtrirt und auf etwa 120 ccm eingeengt. Nachdem sie sich abgekühlt hatte, wurde sie mit Salpetersäure genau neutralisirt und mit Silbernitrat gefällt u. s. w. Es wurden gefunden:

	Bernstein- saurer Silber- oxyd.	Be- rechnet.	pCt.	Metall. Silber.	Gefunden in pCt. d. angewendeten Silbersalzes.	Be- rechnet pCt.
1.	0,2015	0,2813	71,28	0,1302	64,62	65,06
2.	0,1870		66,48	0,1240	66,31	
3.	0,2098		74,58	0,1348	64,25	

In diesem kleinen Theile des Verfahrens gehen bereits gegen 30 pCt. der ursprünglich vorhanden gewesenen Säure verloren.

Völlig unklar wird das ganze Princip der Methode und unbegreiflich die Behauptung, dass sie quantitativ sei, wenn man die übrigen Theile derselben einer Untersuchung unterzieht. Die unvollkommene Fällung der Bernsteinsäure in Gemischen durch Silbernitrat kann allein das gänzliche Versagen der Methode nicht erklären. Es konnte dies nur daran liegen, dass Baryumnitrat die Bernsteinsäure in unzureichender Weise fällt. Um diese Annahme zu prüfen, wurden folgende Versuche angestellt.

Je 0,1 g Bernsteinsäure wurden in 100 ccm Alkohol gelöst, eingedampft und der Rückstand in wenig heissem Wasser (10—15 ccm) gelöst: hierauf wurde mit Baryumnitratlösung und dem 3—4fachen Volumen 90procentigen Alkohols versetzt und tüchtig umgerührt. Nach etwa 60 Stunden wurde filtrirt, Rückstand und Filtrat besonders behandelt.

Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und mit Aether — wie oben angegeben — behandelt.

Das Filtrat wurde eingedampft; der Rückstand in Wasser gelöst und mit Salzsäure angesäuert. Dann wurde die Lösung mit Aether behandelt.

Es zeigte sich in 3 Versuchen, dass der Rückstand, der nach Rau die gesamte Bernsteinsäure hätte enthalten müssen, nur geringe Mengen dieser Säure aufwies, während sichtlich der grösste Theil derselben in das Filtrat übergegangen war.

Nach diesen Darlegungen muss das von Rau angegebene Verfahren quantitativ und qualitativ als unbrauchbar bezeichnet werden, wegen der ganz unvollkommenen Fällbarkeit der Bernsteinsäure durch Baryumnitrat und Silbernitrat.

Auch eine Combination der Aethermethode mit der Silberbestimmung wurde versucht, indem der ätherische Rückstand, in Wasser gelöst, mit  $\text{NH}_3$  neutralisirt und mit Silbernitrat gefällt wurde u. s. w.

Es wurde gefunden an bernsteinsauerm Silber:

1) 68,26 pCt., 2) 75,7 pCt., 3) 52,22 pCt.

derjenigen Menge, welche theoretisch hätte gefunden werden müssen.

An der gefundenen Menge war das Silber theilhaft im Fall

1) mit 65,67 pCt., 2) 62,44 pCt., 3) 61,90 pCt.

Im Fall 2 und 3 stimmt die Silberbestimmung zu wenig.

Nachdem sich so die Unbrauchbarkeit des Rau'schen Verfahrens ergeben hatte, wurde noch versucht auf andere Weise die Bernsteinsäure von der Apfelsäure zu trennen, jedoch ohne Erfolg.

## 2. Nachweis der Bernsteinsäure in normalen thierischen Flüssigkeiten und Gewebsauszügen.

Für den Nachweis in den thierischen Flüssigkeiten ist natürlich das Verfahren abhängig von den übrigen, daselbst vorkommenden Substanzen, es muss sich daher verschieden gestalten, je nachdem es sich um Auszüge aus frischen Organismen oder um gefaulte Flüssigkeiten handelt. Die Milchsäure, welche nur in den normalen, nicht fauligen Flüssigkeiten vorzukommen scheint, bietet in diesen bei der Isolirung der Bernsteinsäure eine bedeutende Schwierigkeit dar. Sie geht ebenfalls, wie die Bernsteinsäure, in den Aether über und es blieb somit nichts übrig, als die Löslichkeit ihrer Salze zu prüfen und das Verhalten derselben gewissen Reagentien gegenüber zur Trennung zu benutzen. Es zeigte sich hierbei, dass Milchsäure nicht wie die Bernsteinsäure, von Silbernitrat gefällt wird. Es ist aber zu dieser Trennung nicht zu rathen, da Silbernitrat noch mit zahlreichen anderen Substanzen (Chloride, Xanthinkörper u. s. w.) einen Niederschlag giebt und die Feststellung der Identität des bernsteinsauern Silbers bei Verunreinigungen zu complicirt und nicht genau genug sein würde.

Nachdem noch andere Trennungsversuche sich als unbrauchbar erwiesen hatten, wurde auf Anrathen des Herrn Prof. E. Sal-kowski folgender Weg eingeschlagen.

Die gleichzeitig Milchsäure und Bernsteinsäure enthaltende Flüssigkeit wurde mit Bleioxydhydrat auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft, der Rückstand zunächst mit Wasser behandelt, welches das milchsaure Blei aufnimmt, das bernsteinsäure Blei dagegen nicht löst; der nun noch bleibende Rückstand wurde in Eisessig gelöst, die Lösung mit Schwefelwasserstoff entbleit, vom Schwefelblei abfiltrirt und eingedampft. Dies Verfahren erwies sich als recht brauchbar.

Bei einer Mischung von:

I. je 10 ccm einer 2procentigen wässrigen Lösung von Bernsteinsäure (= 0,2 g) und Milchsäure (= 0,2 g) wurde wiedergefunden an Bernsteinsäure 1) 0,160 g, 2) 0,168 g.

II. Mischung von je 10 ccm einer 2procentigen wässrigen Lösung von Bernsteinsäure = 0,2 g und 25 ccm einer 4procentigen Lösung von Milchsäure = 1 g. Wiedergefunden

Bernsteinsäure 1) 0,156 g, 2) 0,180 g.

III. Mischung von je 10 ccm einer 2procentigen wässrigen Lösung von Bernsteinsäure = 0,2 g und 50 ccm einer 20procentigen Lösung von Milchsäure = 10 g wurden wiedergefunden

Bernsteinsäure 1) 0,150 g, 2) 0,157 g.

Die Quantität der wiedergefundenen Bernsteinsäure betrug zwischen 75 und 90 pCt. der ursprünglichen Säure und ist es möglich, mit Hülfe dieses Verfahrens geringe Mengen Bernstein-säure bei Anwesenheit grosser Mengen Milchsäure zu finden.

Zum Nachweis der Bernsteinsäure in den normalen thierischen Flüssigkeiten wurde demnach folgendermaassen verfahren.

Der wässrige Auszug des fein zerkackten Fleisches (Organ) wurde aufgekocht und durch Leinewand colirt; der Rückstand wurde unter der Presse von jeder Flüssigkeit befreit und die Filtrate vereinigt. Nach schwacher Ansäuerung mit Essigsäure wurden durch Kochen die Eiweissstoffe coagulirt und das Filtrat zur Syrupdicke verdampft. Nun wurde mit Wasser gelöst, filtrirt und das Filtrat stark mit HCl angesäuert. Die wässrige Flüssigkeit wurde wiederholt mit einem Gemisch von Aether und 90procentigem Alkohol (10:1) im Schütteltrichter durchgeschüttelt. Die ätherischen Auszüge wurden durch Destillation vom Aether befreit, der Rückstand in Wasser gelöst und in einer Porzellanschale mit 1—2 Messerspitzen Bleioxydhydrat gekocht, auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft und der erhaltene Rückstand mit heissem Wasser übergossen. Das milchsaure Blei, welches hierbei in Lösung ging, wurde abfiltrirt, der übrig gebliebene Rückstand mit Eisessig übergossen, erwärmt und durch dasselbe Filter filtrirt und mit Wasser nachgewaschen. Die Flüssigkeit wurde durch Schwefelwasserstoff entbleit, vom Schwefelblei abfiltrirt und das Filtrat zur Trockne verdampft. War der Rückstand nicht ganz rein, so wurde er mit einem Gemisch von absolutem Alkohol und Aether zu gleichen Theilen versetzt, worin Bernsteinsäure leicht

löslich ist. Dann wurde filtrirt und zur Trockne verdampft. War Bernsteinsäure vorhanden, so schied sie sich krystallinisch aus.

### 3. Nachweis der Bernsteinsäure in Fäulnismischungen.

Beim Nachweis der Bernsteinsäure in den Fäulnismischungen sind die Schwierigkeiten der Isolirung der Bernsteinsäure abhängig von der Gegenwart der Fäulnisprodukte, namentlich der Fettsäuren mit höherem Molekulargewicht, sowie der Phenylessigsäure und der Hydrozimmtsäure, mehr aber noch der nicht flüchtigen aromatischen Oxyssäuren und der Scatolcarbonsäure. Für die vollständige Trennung von den letzteren giebt es noch keine Methode, doch sind sie bei kurzdauernder Fäulnis nur in geringer Menge vorhanden.

Bei vorliegenden Untersuchungen, bei denen es sich nur um kurzdauernde Fäulnis handelte, für gewöhnlich 24—72 Stunden, kam es demnach nur darauf an, die Trennung der Bernsteinsäure von der Hydrozimmtsäure und der Phenylessigsäure herbeizuführen und so konnte das Verfahren, welches E. und H. Salkowski<sup>1)</sup> für die Untersuchung der Eiweissfäulnis im Ganzen angegeben haben, etwas vereinfacht werden.

In vorliegenden Versuchen ist bei den Fäulnismischungen im Wesentlichen folgendermaassen verfahren worden.

Die gefaulte Flüssigkeit wurde zur Hälfte eingedampft eventuell aus einem eisernen Verschlussstopf destillirt, welcher gestattete, das entweichende Methylmercaptan in einer 3procentigen Quecksilbercyanidlösung aufzufangen. Während des Eindampfens wurde die Flüssigkeit durch Zusatz von Schwefelsäure schwach sauer gehalten, um die Eiweisskörper zu coaguliren. Nun wurde filtrirt und unter Zusatz von Natriumcarbonat bis zur alkalischen Reaction stark eingedampft und etwa mit dem 3fachen Volumen 90procentigen Alkohols versetzt und nach 24 Stunden filtrirt<sup>2)</sup>. Das Filtrat wurde in einer Porzellanschale bis zur Syrupdicke eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure oder Salzsäure<sup>3)</sup> angesäuert. Darauf wurde filtrirt, das Filtrat im Schütteltrichter mit einem Gemisch von Aether und Alkohol (6:1) mehrere Male durchgeschüttelt, der Aether abgehoben und abdestillirt. Der Destillationsrückstand wurde eingedampft.

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Practicum. S. 286—297.

<sup>2)</sup> In 2 Fällen wurde die gefaulte Flüssigkeit stark eingedampft und direct mit dem dreifachen Volumen Alkohol versetzt. Da diese Modification keine Störung verursacht, so ist sie der Einfachheit halber vorzuziehen.

<sup>3)</sup> Bei vorliegenden Versuchen ist im Anfang Salzsäure angewandt worden, später wurde zur Schwefelsäure übergegangen, weil sich beim Ver-

Es zeigte sich nun im Laufe der Versuche, dass, wenn vor der Ausschüttelung mit Aether der wässrige Auszug nur ganz schwach angesäuert wird, der grösste Theil der Hydrozimmt- und Phenylelessigsäure in den Aether übergeht, während die Bernsteinsäure bis auf Spuren in der wässrigen Lösung zurückbleibt und erst nach sehr starkem Ansäuern aus ihren Verbindungen in Freiheit gesetzt, von dem Aether aufgenommen wird. Diese Thatsache wurde zur leichteren und sicheren Gewinnung der Bernsteinsäure benutzt, indem die zu extrahirende Flüssigkeit Anfangs nur schwach angesäuert und mit Aether ausgeschüttelt wurde (in diesen Auszügen befanden sich die genannten Säuren), dann stark angesäuert und wieder mit Aether ausgeschüttelt wurde. In diese Aetherauszüge ging die Bernsteinsäure über. Da die Bernsteinsäure nicht gleich beim ersten Ausschütteln vollständig in den Aether übergeht, so muss man mehrere Male extrahiren, mindestens so lange, bis die ätherische Flüssigkeit im Schütteltrichter ganz klar und ungefärbt erscheint; dampft man diesen ätherischen Auszug in einer besonderen Schale ein, so kann man aus der Menge des erhaltenen Rückstandes einen Schluss ziehen, ob noch eine weitere Extraction sich verlohnt. Mit 5 Extractionen nach der starken Ansäuerung bin ich in der Regel ausgekommen. Die nach der starken Ansäuerung erhaltenen Rückstände wurden in Wasser gelöst, vereinigt und mit Knochenkohle bis zur Entfärbung gekocht. Von der Kohle wurde abfiltrirt und das Filtrat eingedampft. War der Rückstand noch etwas unrein, was fast immer noch der Fall war, so wurde er auf eine Thonplatte gebracht, auf welcher die Bernsteinsäure rein zurückblieb. Die so erhaltene Bernsteinsäure wurde bei  $80^{\circ}$  2 bis 3 Stunden getrocknet und gewogen. Der nach schwacher Ansäuerung er-

dunsten des Aetherauszeuges Kochsalz in störender Weise ausschied. Die Entfernung des Kochsalzes wurde erzielt durch wiederholte Extraction mit absolutem Alkohol. Aber auch die Verwendung der Schwefelsäure hat ihre Schattenseiten. Es schied sich fast immer im Schütteltrichter beim Umschütteln mit Aether und Alkohol etwas schwefelsaures Natron aus, das durch Abgiessen oder Filtration zu entfernen ist. Da aber wenigstens nach Ansäuerung mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  der ätherische Auszug frei ist von anorganischen Salzen, so ist Schwefelsäure vorzuziehen.

haltene Rückstand wurde für sich ebenso oder nach dem Bleioxydhydratverfahren behandelt. Er enthielt aber stets nur Spuren von Bernsteinsäure, wie aus den einzelnen Resultaten zu ersehen ist, Spuren, welche, da das Verfahren doch nur ein annähernd quantitatives ist, vernachlässigt werden können.

Diese zuletzt geschilderte Methode wurde da nicht angewandt, wo es sich gleichzeitig um Parallelversuche mit normalen thierischen Flüssigkeiten handelte. Bei diesen wurde der ätherische Rückstand zur Trennung der Milchsäure von der Bernsteinsäure mit Bleioxydhydrat behandelt. Es sind dies sämtliche Versuche mit Thymus, Milz und Ascitesflüssigkeit, sowie ein Theil der Versuche mit Rindfleisch.

Im Anschluss an die Erörterung der Methoden zur Isolirung der Bernsteinsäure erscheint es nöthig, darüber zu sprechen, was als Beweis für das Vorhandensein von Bernsteinsäure gelten soll.

E. Salkowski führt folgende Reactionen an<sup>1)</sup>:

1) Im Glühröhrchen erhitzt, schmilzt die Säure und sublimirt unter theilweisem Uebergang in Bernsteinsäureanhydrid.

2) Beim Erhitzen auf dem Platinblech verflüssigt sie sich unter Bildung von Dämpfen, welche ausserordentlich zum Husten reizen.

3) Versetzt man die wässrige Lösung mit neutralem Bleiacetat, so bleibt sie zunächst klar, erwärmt man aber gelind und schüttelt die Mischung, so scheidet sich Bleisuccinat als schwerer krystallinischer Niederschlag aus.

Wo es irgend anging, namentlich, wo es sich um Constatirung der Reinheit der Säure handelt, wurde der Schmelzpunkt bestimmt, der bei 180° von einigen, von anderen bei 183° angegeben ist.

Da aber die Menge des erhaltenen endgültigen Rückstandes oft sehr klein ist, so ist es in diesen Fällen gar nicht möglich, die Reactionen 1 und 3, sowie die Schmelzbestimmung zu machen. Hier ist man allein auf das Verhalten des Rückstandes auf dem Platinblech angewiesen. Der Reiz, den die Dämpfe der Bernsteinsäure ausüben, ist ein so starker, dass, wer diese Probe einmal gemacht hat, durch dieselbe sofort die Bernsteinsäure erkennen wird. Es ist daher ein positiver Ausfall dieser

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Practicum der phys. u. path. Chemie. S. 303.

Probe unter Umständen schon für sich allein für das Vorhandensein von Bernsteinsäure genügend. Man darf dabei nicht übersehen, dass der Gang zur Isolirung der Säure gewissermaassen eine Reihe von Reactionen darstellt.

## II. Die Entstehung der Bernsteinsäure durch Lebensvorgänge von Mikroorganismen.

Bei der Alkoholgährung zerlegt der Hefepilz den Zucker in der Richtung des Entstehens von Bernsteinsäure. Die Constanz dieser Zerlegung, welche von Pasteur nachgewiesen ist, bleibt unter den verschiedensten Bedingungen bestehen, so dass sie ohne jeden Zweifel der Wirkung des Hefepilzes allein zugeschrieben werden darf. Ebenfalls scheint den Fäulnissbakterien die Fähigkeit eigen zu sein, Bernsteinsäure zu bilden. E. und H. Salkowski waren die ersten, welche nachwiesen, dass bei der Eiweissfäulniss Bernsteinsäure constant entstehe. In dieser Richtung sind auch zu verwerthen die Befunde von Marie Ekunina<sup>1)</sup>, welche bei der Leberfäulniss, und E. Brieger<sup>2)</sup>, der im jauchigen Eiter Bernsteinsäure fand. Ebenso wurden auch in den Versuchen von E. und H. Salkowski, in welchen Fibrin der Fäulniss unterworfen wurde, stets reichlich Bernsteinsäure erhalten, jedoch sind die näheren Angaben hierüber noch nicht veröffentlicht.

Ebenfalls auf Rechnung der bakteriellen Zersetzung in der Richtung der Entstehung von Bernsteinsäure sind die weiter unten angegebenen Befunde zu setzen. Ich habe in Culturen von Fäulnissbakterien Bernsteinsäure gefunden.

Die Fäulnissbakterien waren so gewonnen, dass 10 g gehacktes Rindfleisch mit 100 ccm Wasser und 2 ccm Natriumcarbonat<sup>3)</sup> 48 Stunden im Wärmeschrank stehen gelassen wurden. Dann wurde mit einer ausgeglühten Platinnadel eine faulige Fleischflocke in eine Peptonlösung gebracht, die aus 10 g Pepton, 400 ccm Wasser und 2 ccm concentrirte Natriumcarbonatlösung hergestellt war. Die Peptonlösung wurde mit Watte verschlossen 48 Stunden im Wärmeschrank, dessen Temperatur constant 39—41° betrug, stehen gelassen und dann, stark faulig riechend, untersucht. Die Menge der gefundenen Bernsteinsäure konnte wegen stattgefundener Verluste derselben nicht

<sup>1)</sup> Journal für praktische Chemie. 21. 479.

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiol. Chemie. 5. 366—369.

<sup>3)</sup> E. Salkowski, Practicum. S. 291.



festgestellt werden. Ihre Identität wurde nachgewiesen durch die Dämpfe und die Reaction mit neutralem Bleiacetat. Die Menge war nur gering und betrug höchstens einige Centigramm.

Auch in den Culturen anderer Mikroorganismen ist Bernsteinsäure gefunden worden. So fand sie Kunz<sup>1)</sup> in den Culturen des *Bacillus strumitis* Tavel und des *Spirillum cholerae asiaticae*; Fitz bei der Gährung des Mannits durch Schizomyceten, wie bereits im ersten Theil erwähnt. Tate<sup>2)</sup> züchtete aus reifen Birnen, wie weiter unten genauer berichtet wird, ein Gemisch von Stäbchen und Kokken, die aus Traubenzucker und Mannit sehr beträchtliche Mengen Bernsteinsäure bildeten.

Hierher gehören auch einige Beobachtungen, welche ich über die Bildung der Bernsteinsäure aus Milch durch bakterielle Einwirkung gemacht habe.

Ich fand in einer Milch<sup>3)</sup>, welche etwa 2½ Monate im Laboratorium sich selbst überlassen und vollkommen verkäst war, 0,378 g Bernsteinsäure. Die Quantität der verarbeiteten Milch betrug ursprünglich etwa 500 ccm. Ausserdem wurden noch Leucin und flüchtige Fettsäuren gefunden, dagegen keine Milchsäure.

Nach diesem Befunde war es klar, dass die Bildung der Bernsteinsäure nur durch bakterische Prozesse vor sich gegangen sein konnte, und dass die Bernsteinsäure bildenden specifischen Mikroorganismen in dieser Milch enthalten sein mussten. Nach diesen Mikroorganismen wurde nun gefahndet.

Es wurden 3 Oehsen aus der verkästen Milch in ein Röhrchen, welches verflüssigte Gelatine enthielt, übergeimpft, aus diesem 2 Oehsen in ein zweites ebensolches Gelatineröhrchen. Diese beiden Röhrchen wurden auf Platten ausgegossen. Die erste Platte war nach 48 Stunden bereits verflüssigt und in Folge dessen unbrauchbar. Die zweite wurde mit 25facher Vergrößerung untersucht. Es hatten sich besonders 2 Arten entwickelt:

- 1) diffuse Colonien,
- 2) runde Colonien.

Von jeder dieser Arten wurde ein Theil mittelst einer Platinnadel auf Gelatine übertragen.

<sup>1)</sup> Baumgarten's Jahresberichte. 1888.

<sup>2)</sup> s. S. 563.

<sup>3)</sup> Der verkäste Rückstand der Milch wurde mit 1½ Liter Wasser extrahirt und dann nach der Methode verfahren, wie sie oben für faulige Flüssigkeiten angegeben ist.

Beide wuchsen sehr rasch in die Tiefe, weniger schnell in die Breite; nach 48 Stunden begann bereits die Verflüssigung der Gelatine; bei der runden Art etwas schneller, als bei der diffusen. Nach wenigen Tagen hatte die diffuse Art längs der Glaswand der verflüssigten Gelatine ein Häutchen gebildet; die runde Art dagegen nicht. Deckglaspräparate liessen die diffuse Art als mächtige Stäbchen erkennen, gleichend *Oidium lactis*, nur dadurch verschieden, dass *Oidium lactis* alkalisch reagirende Gelatine nicht verflüssigt<sup>1)</sup>. Allerdings hatte ich die diffuse Art nicht in Reincultur erhalten, sondern es fanden sich einige Stäbchen und namentlich Kokken vor, so dass es trotz der Verflüssigung der Gelatine sehr wahrscheinlich ist, dass ich *Oidium lactis* erhalten habe. Die runden Colonien auf Deckglas untersucht, erwiesen sich, mit Methylviolett gefärbt, als kurze Stäbchen. Hier hatte ich anscheinend eine Reincultur erhalten.

Nachdem dies über Aussehen und Wachsthum der beiden Mikrobenarten festgestellt war, wurde untersucht, ob einer von beiden oder beide als Bernsteinsäure bildende Mikroben anzusehen waren.

#### I. Versuch.

Von der diffusen Art (*Oidium lactis*?) wurden 4 Oehsen aus der Gelatine auf 500 ccm vorher sterilisirte frische Milch übertragen. Die Flasche, welche die Milch enthielt, wurde mit Watte verschlossen und bei 26—30° stehen gelassen. Nach 20 Stunden war die Milch bereits coagulirt, nach einigen Tagen zeigten sich fettartige Häutchen auf der Milch. Nach 10 Tagen wurde die Verarbeitung<sup>2)</sup> begonnen. Die Reaction der Milch war nunmehr stark sauer. Ihr Geruch erinnerte an Parmesankäse. Bei der Untersuchung zeigte es sich, dass ein grosser Theil von Milchzucker noch nicht zersetzt war. Es wurden sehr grosse Mengen von Milchsäure im ätherischen Rückstand gefunden. Nun wurde versucht durch Behandlung mit Bleioxydhydrat eventuell vorhandene Bernsteinsäure aufzufinden. Nach dem Verdampfen der entbleiten Flüssigkeit zeigte sich ein minimaler krystallinischer Rückstand, der die Hustenreaction gab.

Es waren also nur geringe Spuren von Bernsteinsäure gefunden worden.

#### II. Versuch.

500 ccm sterilisirte frische Milch in gleicher Weise wie I. mit der runden Art (kurze Stäbchen) geimpft. Nach 20 Stunden war die Milch coagulirt. Es zeigte sich keine Häutchenbildung. Nach 10 Tagen wurde die Untersuchung begonnen. Die Flüssigkeit reagierte stark sauer und erinnerte ihr Geruch an Parmesankäse. Es wurden noch sehr beträchtliche Mengen Milchzucker gefunden. Bei der Untersuchung erhielt ich Spuren von Milchsäure und an Bernsteinsäure 0,138 g. Der Schmelzpunkt derselben lag bei 181°.

<sup>1)</sup> Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. S. 354.

<sup>2)</sup> Methode der gefaulten Flüssigkeiten.

Wenn man bedenkt, dass die zur Untersuchung gelangte Milch etwa 20 g Milchzucker und 25 g Eiweissstoffe enthielt, von denen sichtlich nur der kleinere Theil zerlegt war, so muss die Menge der gefundenen Bernsteinsäure eine verhältnissmässig grosse genannt werden, so dass wohl behauptet werden darf, dass die kleinen Stäbchen, welche auf der Platte die runden Colonien bilden, die specifischen Bernsteinsäurebildner in der Milch sind. Ob sie mit den von Tate in reifen Birnen gefundenen identisch sind, kann natürlich ohne Weiteres nicht entschieden werden. Um zu controliren, ob die zur Untersuchung gelangende Milch nicht vielleicht beim Ueberimpfen der runden Art verunreinigt durch andere Bakterienarten war, wurde, ehe die Untersuchung begonnen wurde, eine Oehse aus der Milch auf Gelatine übertragen. Diese Gelatine verflüssigte sich jetzt nur sehr langsam und das Wachsthum war gleichfalls ein sehr schwaches. Deckglaspräparate aus der Gelatine nach 4 Tagen angefertigt, liessen aber Reincultur von kurzen Stäbchen erkennen. Dass die Gelatine jetzt sehr viel langsamer verflüssigt wurde und ihr Wachsthum nur sehr schwach war, hat entschieden seinen Grund darin, dass durch die in der Milch gebildete, nicht gebundene Säure die Lebensfähigkeit dieser Bacillen abgeschwächt wurde.

### III. Kommt Bernsteinsäure als Produkt des Stoffwechsels der Wirbelthiere vor?

Nach diesen Angaben, welche darthun, dass die Bernsteinsäure durch die Thätigkeit der Bakterien gebildet wird, namentlich durch solche Mikroben, welche post mortem den thierischen Organismus in Angriff nehmen, kann die Möglichkeit nicht ohne Weiteres von der Hand gewiesen werden, dass die Bernsteinsäure in jedem Fall, in welchem man sie in den Organen gefunden hat, ihre Entstehung der Thätigkeit der Bakterien verdankt. Es handelte sich also darum, festzustellen, ob sie, wie Gorup-Besanez<sup>1)</sup> behauptet, in der Milz des Rindes, der Thymus und Thyreoidea des Kalbes normaler Weise vorkäme oder ob der Verdacht postmortaler Bildung gerechtfertigt sei. Bei der Prüfung dieser Frage konnte die Untersuchung

<sup>1)</sup> Annalen der Chemie und Pharmacie. XCVIII. S. 28.

nicht auf die von Gorup-Besanez angeführten Organe beschränkt bleiben, sondern es mussten, da die cadaveröse Bildung der Bernsteinsäure in Betracht kam, auch andere eiweisshaltige thierische Flüssigkeiten untersucht werden. Es wurden zu diesem Zweck der bequemen Beschaffung wegen hauptsächlich Versuche mit Rind- und Pferdefleisch und des besonderen Interesses halber mit Ascitesflüssigkeit vorgenommen.

#### 1. Versuche mit Rindfleisch.

Rindfleisch, so wie es vom Schlächter eingekauft war, wurde gehackt, ein Theil a sofort auf Bernsteinsäure verarbeitet, ein Theil b mit Wasser (und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung) angerührt in den Wärmeschrank gestellt, und die Temperatur constant auf  $39-41^\circ$  gehalten<sup>1)</sup>.

1. a) 100 g mit 400 ccm Wasser versetzt, wurde, wie es für normale thierische Flüssigkeiten oben angegeben ist, behandelt. Der ätherische Rückstand, an dem eine Krystallisation direct nicht wahrnehmbar war, wurde ohne vorherige Behandlung mit Bleioxydhydrat auf eine Thonplatte gebracht. Der nunmehr bleibende Rückstand charakterisirte sich durch seinen Schmelzpunkt von  $49^\circ$  und seine sonstigen Eigenschaften als Fettsäuregemisch.

b) 100 g mit 400 ccm Wasser und 20 ccm Natriumcarbonat (aus Versehen statt mit 10 ccm) versetzt. Nach 24stündiger Fäulniss verarbeitet. Die Flüssigkeit roch noch nicht stark faulig. Der Rückstand enthielt viel Fettsäuren. Schmelzpunkt derselben  $54^\circ$ . Erhitzt giebt er keine Hustenreaction.

2. a) 100 g mit 400 ccm Wasser versetzt. Der ätherische Rückstand lässt keine Bernsteinsäure erkennen. Schmelzpunkt  $52^\circ$ .

b) 100 g mit 400 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  und 10 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung versetzt, nach 22stündiger Fäulniss, stark faulig riechend, untersucht.

Der geringe ätherische Rückstand zeigt Krystallisation und giebt auf dem Platinblech erhitzt die Hustenreaction. Also Spuren von Bernsteinsäure.

In den folgenden Versuchen wurden die ätherischen Rückstände mit Bleioxydhydrat, wie oben angegeben, behandelt.

3. a) 100 g mit 400 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt. Der geringe Rückstand hatte eine schmierige Beschaffenheit und unbestimmte Consistenz. Er liess keine Bernsteinsäure erkennen.

b) 100 g Rindfleisch wurden mit 400 ccm Wasser und 10 ccm Natriumcarbonat versetzt und in den Wärmeschrank zur Fäulniss gestellt. Dort blieben sie 25 Stunden und wurden dann in Arbeit genommen. Der ätherische Rückstand gab die Hustenreaction. Nach der weiteren Behandlung desselben mit Bleioxydhydrat u. s. w. wurde ein krystallinischer Rückstand

<sup>1)</sup> Bei diesen Versuchen war noch nicht auf den Grad der Ansäuerung vor dem Ausschütteln der Bernsteinsäure mittelst Aethers geachtet worden.

erhalten, der alle Reactionen auf Bernsteinsäure zeigte und dessen Schmelzpunkt  $176^{\circ}$  war.

Die Menge des in diesem Falle gefundenen Rückstandes war der Schätzung nach grösser als die bei 2b) gefundene Quantität.

4. 50 g Liebig's Fleischextract wurden wie 3. behandelt. Schmieriger, zum Theil krystallinischer Rückstand, in welchem sich keine Bernsteinsäure nachweisen liess.

5. 500 g Rindfleisch wurden sofort nach dem Einkauf in Arbeit genommen. Es blieb ein geringer schmieriger Rückstand. Bernsteinsäure konnte darin nicht nachgewiesen werden.

6. In 150 g Cibil's Fleischextract liess sich ebenfalls keine Bernsteinsäure finden.

## 2. Versuche an Rindermilzen.

Etwa 48 Stunden, nachdem die Thiere getödtet waren, wurden von 5 Pfund Rindermilzen je 500 und 600 g verarbeitet. Der Rest wurde auf Eis im Eisschrank aufbewahrt.

A. 500 g von den sofort verarbeiteten Milzen ergaben, nach oben angegebener Methode behandelt, nach mehrfacher Umkrystallisation, abwechselnd mit Wasser und einer Mischung von absolutem Alkohol und Aether zu gleichen Theilen folgendes Resultat. Es wurden wenige kleine gelblich gefärbte Krystalle erhalten, die auf dem Platinblech erhitzt die Hustenreaction gaben<sup>1)</sup>.

B. 600 g wie A. behandelt, ebenfalls sogleich verarbeitet. Es wurde ein minimaler, gelblich gefärbter Rückstand erhalten, dessen Dämpfe beim Einathmen kratzten, aber keinen Hustenreiz ausübten. Zu weiteren Reactionen reichte der Rückstand nicht aus.

C. 520 g, welche 7 Tage auf Eis gelegen hatten, wurden wie A. verarbeitet.

Ein geringer krystallinischer Rückstand zeigte sich, dessen Identität mit Bernsteinsäure durch die Hustenprobe, sowie durch sein charakteristisches Verhalten zu neutralem Bleiacetat nachgewiesen wurde. Der Schmelzpunkt dieses Rückstandes betrug  $163^{\circ}$ . Nach der Extraction des wässrigen Rückstandes mit Alkohol bildeten sich beim Eindampfen dieser Lösung auf derselben kleine Häutchen; dieselben liessen mikroskopisch untersucht Leucin erkennen. Diese Häutchen sind bei den nicht gefaulten Milzen nicht beobachtet worden.

D. 660 g, nach 7tägigem Aufbewahren auf Eis nach Analogie von A. behandelt, lassen ebenfalls Leucin und Bernsteinsäure erkennen.

## 3. Versuche mit Ascitesflüssigkeit.

1. 500 g wurden 24 Stunden nach der Punction verarbeitet nach dem oben angegebenen Verfahren. Es wurde ein krystallinischer Rückstand ge-

<sup>1)</sup> Die gelbliche Farbe rührte von einer kleinen Quantität Salpetersäure her, durch die das Bleioxydpräparat verunreinigt war.

funden, der zum grössten Theil aus anorganischen Salzen bestand. Bernsteinsäure war nicht nachweisbar.

2. 500 ccm derselben Flüssigkeit nach 5tägigem Stehen im Laboratorium, faulig riechend, verarbeitet. Es wurden Spuren von Bernsteinsäure gefunden. Dieselbe konnte nur durch die Hustenprobe erkannt werden.

3. 100 ccm einer frischen Leiche entnommen, sofort untersucht. Keine Bernsteinsäure nachweisbar.

4. 500 ccm von derselben Flüssigkeit sofort untersucht, keine Bernsteinsäure nachweisbar.

5. 250 ccm von derselben Flüssigkeit nach 4tägigem Stehen im Laboratorium untersucht, stark faulig riechend. Spuren von Bernsteinsäure.

#### 4. Versuche mit Thymus.

1. 340 g wurden gleich nach dem Einkauf fein zerhackt, mit 50 ccm Wasser versetzt und bei 50° digerirt. Dann wurde colirt und mit Essigsäure angesäuert. Durch Erhitzen wurden die Eiweissstoffe, welche eine hell-rosa Färbung zeigten, coagulirt und dann weiter, wie oben angegeben, verfahren. Es konnte keine Bernsteinsäure nachgewiesen werden.

2. 430 g Thymus ebenso behandelt, lassen keine Bernsteinsäure finden. In diesem Falle fehlte die Rosafärbung der Eiweissstoffe.

#### 5. Versuche mit Pferdefleisch.

1. a) 500 g gleich nach dem Einkauf gehackt und mit 2 Liter Leitungswasser und etwas Chloroform versetzt. Dies wurde im Wärmeschrank bei 39—41° 48 Stunden stehen gelassen und dann untersucht. Es war in dem schmierigen Rückstand keine Bernsteinsäure nachzuweisen.

b) 500 g desselben Fleisches mit 2 Liter Wasser und 30 ccm Natriumcarbonat versetzt, nach 48 stündiger Fäulniss untersucht.

Es wurde ein schmieriger ätherischer Rückstand erhalten, der Hydrozimsäure und Phenylessigsäure, jedoch keine Bernsteinsäure erkennen liess. Daran, dass keine Bernsteinsäure gefunden wurde, mögen zwei Umstände Schuld haben: erstens der zu grosse Alkalizusatz, der, wenn er zu reichlich wird, wie weiter unten erörtert werden wird, die Bernsteinsäurebildung zu hemmen scheint; zweitens ist vielleicht der wässrige Auszug vor seiner Ausschüttelung mit Aether zu schwach angesäuert gewesen, eine Vermuthung, die sich leider nicht mehr controliren liess, als diese Möglichkeit bei einem späteren Versuche festgestellt wurde, da die betreffende Flüssigkeit schon fortgegossen war.

2. 500 g nach 48 stündiger Fäulniss zur Controie von 1 b) untersucht. Es sollte hier geprüft werden, ob der grosse Alkalizusatz an dem negativen Resultate von 1 b) Schuld sei. Zu diesem Zweck wurde das gehackte Fleisch, ehe es faulen gelassen wurde, mit 2 Liter Wasser und nur 15 ccm Natriumcarbonat versetzt, ein Alkalizusatz, wie er früher von E. Salkowski zur Gewinnung der Bernsteinsäure aus Pferdefleisch angewandt war. Bei diesem Versuch wurden zuerst in dem ätherischen Rückstand nur Spuren von Bern-

steinsäure gefunden. Der ätherische Rückstand weiter behandelt nach E. Salkowski's Practicum S. 289 ergab 0,017 g Bernsteinsäure. Bei nochmaliger Prüfung der wässrigen Lösung, welche zum Ausschütteln mit Aether benutzt war, ergab sich, dass dieselbe nur schwach sauer war. Es lag nun die Möglichkeit vor, dass vielleicht der grösste Theil der Bernsteinsäure, der hauptsächlich als Natriumsalz in der Lösung sich befand, noch nicht aus seiner Verbindung befreit war. Diese Vermuthung wurde nunmehr durch starke Ansäuerung der wässrigen Lösung geprüft. Die Lösung wurde dann mit Aether in der oben angegebenen Weise ausgeschüttelt. Beim Eindampfen des ätherischen Rückstandes erstarrte derselbe nunmehr krystallinisch. Die Krystalle wurden durch Behandlung mit Kohle in wässriger Lösung, Eindampfen, Absaugen der Krystalle auf Thonplatten, wie oben angegeben, gereinigt und gewogen. Es wurde gefunden **1,933 g!** Hustenprobe, Reaction mit neutralem Bleiacetat und Schmelzpunkt  $178^{\circ}$  liessen erkennen, dass es sich um Bernsteinsäure handelte.

3. 500 g zu gleicher Zeit und ebenso wie 2. behandelt, gleichfalls zur Prüfung von 1 b) angestellt. Der ätherische Rückstand nach schwacher Ansäuerung enthält 0,014 g Bernsteinsäure. Nach starker Ansäuerung **1,9975 g** Bernsteinsäure. Berechnet man, wie viel Bernsteinsäure sich in diesen beiden Fällen aus dem Eiweiss gebildet, so ergeben sich fast 2 pCt. des trockenen Eiweiss.

Diese Versuche unterstützen die Angabe Gorup-Besanez', dass die Bernsteinsäure ein Produkt des normalen Stoffwechsels sei, in keiner Weise. Es ist zwar auch hier einmal in der normalen Milz eine Spur Bernsteinsäure gefunden worden, doch ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses blutreiche, sehr schnell in Fäulniss übergehende Organ, nicht mehr frisch genug zur Verarbeitung gelangte. Bedenkt man nun ferner, mit welchen Massen Gorup-Besanez arbeitete — 168 Stück Thymusdrüsen vom Kalb und nicht unter 10 Pfund Rindermilzen auf einmal —, so ist in diesen Fällen gewiss nicht anzunehmen, dass die Organe in frischem Zustand zur Verarbeitung gelangten. Es muss auch nach den oben angeführten Versuchen als feststehend gelten, dass die Bernsteinsäure ein cadaveröses Produkt ist und es hindert uns nichts, anzunehmen, dass überall da, wo sie in thierischen Organen gefunden wurde, dieser Befund gleichfalls einer postmortalen Einwirkung zuzuschreiben ist. Wenn Gorup-Besanez ferner die Frische seiner Organe dadurch nachzuweisen sucht, dass er nur in der Milz, Thymus und Thyreoidea, sonst aber in keinem anderen Organ, obwohl dieselben in analogem Zustande zur Untersuchung kamen, Bern-

steinsäure gefunden habe, so muss darauf erwidert werden, wie später noch genauer dargelegt werden wird, dass es nicht blos von der Intensität der Fäulniss abhängt, ob keine Bernsteinsäure oder bis zu 2 pCt. der trockenen Eiweisssubstanz gebildet wird. Es können begleitende Umstände dahin wirken, dass in einem Falle eine geringe und kurze Einwirkung von Fäulnisserregern Mengen dieser Säure hervorbringt, welche im anderen Falle erst nach längerer Frist zur Entstehung gelangen können oder vielleicht überhaupt nicht.

#### IV. Aus welchen Stoffen bildet sich die Bernsteinsäure bei der bakteritischen Zersetzung?

Bei der Entstehung der Bernsteinsäure unter dem Einflusse von Bakterien ist es von Interesse, das Material, aus welchem dieselbe sich zu bilden pflegt, einer Betrachtung zu unterziehen und die Bedingungen und Mengenverhältnisse hierbei zu beobachten.

##### 1. Bildung von Bernsteinsäure aus Kohlehydraten.

Bei der Alkoholgährung stellt der Zucker (Traubenzucker, Frucht-, Rohr-, Milhzucker) das Material für die Entstehung der Bernsteinsäure dar und die Untersuchungen von Pasteur haben gezeigt, dass die langsame Gährung, welche sich über Wochen hinzieht, ihre Entstehung am meisten begünstigt. Die Menge der gebildeten Säure beträgt dabei unter den verschiedensten Verhältnissen 0,5—0,7 pCt. vom Gewicht des vergohrenen Zuckers. Pasteur hat dabei folgende wichtigen Beobachtungen gemacht. Je länger die Gährung dauert, je erschöpfter und älter die Hefe ist und je geringer die Nährmittel sind, welche ihr Wachsthum begünstigen, desto mehr Bernsteinsäure und Glycerin und desto weniger Alkohol bildet sich. Auch die Reaction der vorgohrenen Flüssigkeit zeigt an, wie die Vergährung in Bezug auf die Bildung von Bernsteinsäure und Glycerin verlaufen ist. Reagirt die Flüssigkeit sauer, so ist sie ungünstig verlaufen, reagirt sie neutral, sehr günstig. Saure Reaction zeigt häufig die Gegenwart von Milchsäure an, deren Entstehung die Hefe ungünstig zu beeinflussen scheint in Bezug auf die Bildung der Bernsteinsäure. Welches der Grund dieser Erscheinungen ist,



hat Pasteur nicht ermitteln können. Als Material für die alkoholische Zuckergärung eignen sich alle Zuckerarten, doch liefert nach Pasteur Milchsucker die besten Resultate.

Die Hefezellen sind aber nicht die einzigen Mikroorganismen, welche aus Kohlehydraten unter anderen Produkten Bernsteinsäure zu bilden vermögen. Die Beobachtung von Fitz ist schon oben erwähnt. Ferner ist auch das Gemisch von Bakterien, welche bei der Eiweissfäulniss thätig sind, im Stande, aus Kohlehydraten Bernsteinsäure zu produciren. Hierfür kann ich zunächst einen von E. Salkowski früher angestellten, nicht veröffentlichten Versuch anführen. 200 g Amylum wurden mit 3 Liter Wasser übergossen, in die Mischung einige Flocken faulenden Fleisches eingetragen, gut durchgerührt und bei etwa 40° stehen gelassen. Die Mischung nahm bald saure Reaction an, welche von Zeit zu Zeit durch Natriumcarbonatlösung beseitigt wurde, so dass die Mischung immer schwach alkalisch war. Nach 2 Monaten wurde die Mischung ganz so wie die Fäulnissgemische aus Fleisch verarbeitet. Nur zum Schluss war das Verfahren etwas anders. Die entstandenen Säuren waren, wie gewöhnlich, in den Aether übergeführt, der Aether abdestillirt. Aus dem beim Verdunsten des Aethers zurückbleibenden ölförmigen Rückstand wurden die reichlich vorhandenen flüchtigen Fettsäuren durch Destillation im Wasserdampfstrom entfernt, der dann bleibende Rückstand in Wasser gelöst und filtrirt, die Lösung mit basischem Bleiacetatgefällt, der Niederschlag abfiltrirt, ausgewaschen, in Essigsäure gelöst, die Lösung durch Einleiten von H<sub>2</sub>S entbleit, vom Schwefelblei abfiltrirt, das Filtrat zur Krystallisation eingedampft, die Krystalle dann auf einer Thonplatte abgesogen. Es wurden so 0,2 g völlig reine Bernsteinsäure vom Schmelzpunkt 183° erhalten. Natürlich ist diese Zahl nur eine Minimalzahl, da bei der Darstellung und Reinigung der Bernsteinsäure erhebliche Quantitäten verloren gegangen sein müssen.

Sodann hat in neuerer Zeit Tate<sup>1)</sup> aus reifen Birnen Mikroorganismen gezüchtet, nach der Beschreibung aus „Stäbchen und Kokken“ bestehend, welche aus Traubenzucker und Mannit

<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXVI. Referatband S. 878. Referat aus Journal of the Chem. Soc. 1893. p. 1263.

linksdrehende Milchsäure, daneben Alkohol und Bernsteinsäure erzeugen. Aus je 9 Mol. Traubenzucker bildeten sich bei der bakteriellen Zersetzung 2 Mol. Alkohol, 1 Mol. Bernsteinsäure und 7—8 Mol. linksdrehende Milchsäure, neben kleinen Mengen Essigsäure und Ameisensäure. Da das Molekulargewicht des Traubenzuckers 180, das der Bernsteinsäure 118 ist, so haben 1620 Theile Traubenzucker 118 Bernsteinsäure geliefert. Der Traubenzucker hat also 7,2 pCt. seines Gewichtes an Bernsteinsäure geliefert, wohl die grösste Quantität, welche je aus Kohlehydraten erhalten worden ist. Ich selbst habe folgenden Versuch mit Rohrzucker angestellt.

200 g Rohrzucker wurden mit 3 Liter Wasser übergossen, in die Mischung einige Flocken faulenden Fleisches eingetragen, mit 10 ccm Natriumcarbonat versetzt und gut durchgerührt; die Flüssigkeit wurde bei 40° stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde bald sauer und zeigte Buttersäuregeruch, so dass sie von Zeit zu Zeit immer wieder von Neuem mit je 10 ccm Natriumcarbonat alkalisirt werden musste. Es wurden 210 ccm Natriumcarbonat im Laufe der Zeit hinzugefügt. Es hatten sich also, da 10 ccm gelöstes  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ungefähr 1,6 g reines  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  enthielten, etwa 50 g Säure gebildet. Der Versuch wurde am 13. Januar begonnen und am 21. Februar abgeschlossen, obwohl ein grosser Theil des Zuckers noch nicht zerlegt war. Es wurden gefunden Essigsäure, Milchsäure und Bernsteinsäure. Die beiden letzteren in nicht unerheblichen Mengen.

## 2. Bildung der Bernsteinsäure aus Eiweiss.

Es ist als zweifellos anzusehen, dass auch durch Zersetzung von Eiweiss Bernsteinsäure entstehen kann. Zwar könnte man meinen, dass die Versuche an Fleisch allein nicht ganz beweisend seien wegen des Gehaltes desselben an Kohlehydraten, jedoch ist der Gehalt an Kohlehydraten für die unter Umständen sehr grosse Ausbeute an Bernsteinsäure viel zu gering und ausserdem ist sie auch im jauchigen Eiter, bei der Fibrinfäulniss und in faulender Ascitesflüssigkeit gefunden worden, wo dieser Einwand fortfällt. Die Menge der gebildeten Säure ist natürlich abhängig von den Bedingungen, unter welchen ihre Bildung stattfindet. Von grossem Einfluss auf die Quantität der bei der Fäulniss gebildeten Bernsteinsäure ist der Alkalescentzgrad der Mischungen.

Dies beweisen die folgenden Versuche.

1. 250 g Pferdefleisch wurden gehackt, mit 1 Liter Wasser und  $7\frac{1}{2}$  ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt, dann bei constanter Temperatur von 39—41° 48 Stunden

stehen gelassen und nach dem Verfahren, wie es oben für Fäulnisflüssigkeiten angegeben ist, untersucht. Es wurde gefunden an Bernsteinsäure 1,028 g.

2. 250 g von demselben Pferdefleisch ebenso behandelt, und mit 30 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt, ebenfalls nach 48stündiger Fäulnis untersucht. Es wurde gefunden an Bernsteinsäure 0,106 g.

3. 250 g Rindfleisch mit 1 Liter Wasser und  $7\frac{1}{2}$  ccm Natriumcarbonat versetzt, nach 48stündiger Fäulnis untersucht. Es wurde gefunden an Bernsteinsäure 0,467 g.

4. 250 g von demselben Rindfleisch ebenso behandelt ohne Alkalizusatz nach 48stündiger Fäulnis untersucht. Es wurde gefunden 0,314 g Bernsteinsäure.

Man kann aus diesen Versuchen erkennen, welche Bedeutung in den fauligen thierischen Flüssigkeiten der Gehalt an Alkali hat. Wie oben S. 561 bereits berichtet ist, lieferte Pferdefleisch bei einem Zusatz von Natriumcarbonat von 15 ccm der concentrirten Lösung auf 2 Liter Wasser ungefähr 2 pCt. seines Eiweissgehaltes, an Bernsteinsäure. Dieser Alkalizusatz scheint das Optimum für die Bildung dieser Säure zu sein. Dann folgt die natürliche Fäulnis, während bei einer Steigerung des künstlichen Alkaligehaltes um das Vierfache, nur noch der zehnte Theil Bernsteinsäure sich bildet. Gleichfalls scheint folgendes Ergebniss dafür zu sprechen, dass der Gehalt an Alkali ein wesentlicher Factor für die Intensität der Fäulnis ist. Als bei den Versuchen 3 und 4 die sich entwickelnden Gase in 3procentige Cyanquecksilberlösungen geleitet wurden, hatte sich im ersten Falle fast nur Quecksilbersulfid gebildet, ein Zeichen dafür, dass das entweichende Gas  $\text{H}_2\text{S}$  war; im zweiten Falle hingegen zeigte sich ganz überwiegend Quecksilbermercaptid von dem entstandenen Mercaptan herrührend. Aus allen diesen Versuchen geht also hervor, dass ein Plus oder Minus von Alkali sehr wesentliche Abweichungen in dem Ablauf der Zersetzungs Vorgänge verursacht. Im Hinblick auf solche Fälle kann man sich leicht vorstellen, dass die Mikroben, beeinflusst von dem Alkaligehalt des zu zersetzenden Materials in dem einen Falle Toxine bilden, in dem anderen nicht. Man könnte daran denken, auf diese Ursache es zurückzuführen, wenn nach erfolgter Infection

in dem einen Falle die Krankheit zu Tage tritt, in dem anderen nicht. Und es ist dieses vielleicht ein Punkt, der dazu beiträgt, den unbestimmten Einfluss von Ort und Zeit auf die toxische Thätigkeit der Bakterien zu erklären.

Um noch einmal auf den schon oben erwähnten Einwurf Gorup-Besanez' zurückzukommen, worin er die Frische seiner Organe zu beweisen sucht: es können, wie aus obigen Versuchen gefolgert werden muss, die hemmenden Momente der Bildung von Bernsteinsäure so sehr entgegenwirken, dass dieselbe gleich 0 wird. Nicht die alkalische Reaction der zu untersuchenden Flüssigkeit allein genügt, um der Entstehung dieser Säure nicht hinderlich zu sein, sondern der richtige Gehalt an Alkali. Wenn also Gorup-Besanez unter analogen Bedingungen in der Milz u. s. w. Bernsteinsäure gefunden hat, im Pankreas, in den Nieren dagegen nicht, so ist das kein Beweis für ihr Vorhandensein daselbst ante mortem, sondern dies muss nach vorliegenden Untersuchungen als Zeichen dafür angesehen werden, dass hier die zu ihrer Bildung günstigen, dort die ungünstigen Momente post mortem prävalirten.

Erwähnt mag hierbei noch werden, dass das Muskelfleisch der verschiedenen Wirbelthiere je nach seiner Zusammensetzung im Hinblick auf Eiweiss und Kohlehydrate verschiedene Resultate liefert in Bezug auf die Mengenverhältnisse der entstehenden Bernsteinsäure. Aus Rindfleisch wurde bei sonst durchaus auch hinsichtlich des Alkaligehaltes gleichartigen Bedingungen stets weniger Bernsteinsäure erhalten als aus Pferdefleisch, nemlich nur 1,8 pro mille gegenüber 4 pro mille vom Gewicht des frischen Fleisches. Man könnte daran denken, diesen Unterschied auf den grösseren Gehalt des Pferdefleisches an Kohlehydraten, nemlich Glykogen, zurückzuführen, jedoch ist der Gehalt des Pferdefleisches an Glykogen, wenn auch weit grösser, als im Rindfleisch, doch viel zu gering, um darauf die Bernsteinsäure zurückzuführen.

### 3. Bildung der Bernsteinsäure aus Leim.

100 g Gelatine wurden in 2 Liter Wasser gelöst, 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{MgSO}_4$  hinzugefügt, eine faulige Fleischflocke in das Gemisch eingetragen, mit 12 ccm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alkalisirt und bei constanter Temperatur von  $39-41^\circ$  stehen gelassen. Nach 8 Tagen wurde die Untersuchung nach der Methode

für gefaulte Flüssigkeiten begonnen. Es fand nur geringe Gasbildung statt und enthielt die Cyanquecksilberlösung nur geringe Mengen von Quecksilbermercaptid. Es wurde beim Eindampfen des ätherischen Rückstandes ein starker Geruch von Dämpfen der Phenylessigsäure bemerkt. Schliesslich blieb ein öliges Rückstand. Derselbe wurde mit Bleioxydhydrat behandelt und gelang es auf diese Weise, nicht geringe Mengen von Bernsteinsäure zu finden. Der wässrige Auszug aus dem durch Kochen mit Bleioxydhydrat erhaltenen Rückstande wurde gleichfalls durch  $H_2S$  entbleit, vom Schwefelblei abfiltrirt und das Filtrat eingedampft. Es wurde eine krystallinische weisse Masse erhalten, welche auf eine Thonplatte gebracht wurde. Die so erhaltenen weissen Krystalle wurden mikroskopisch und chemisch untersucht, doch kein Anhaltspunkt für ihre Zusammensetzung gefunden. Der Schmelzpunkt lag über  $200^{\circ}$ .

Mit einigen Worten möchte ich noch eingehen auf das Vorkommen von Bernsteinsäure in der Echinokokkenflüssigkeit, wo sie zuerst von Heintz<sup>1)</sup> gefunden wurde. Dass hier Irrthümer durch ihr Auftreten als Fäulnisprodukt vorkommen können, erscheint nach obigen Versuchen mit Ascitesflüssigkeit in der sich erst nach 4- bis 7tägiger Fäulnis Bernsteinsäure fand, so gut wie ausgeschlossen, da schwerlich jemand so lange warten dürfte, ehe er seine Versuche beginnt.

Fassen wir zum Schluss die Ergebnisse der Untersuchungen zusammen, so möchten sich dieselben in folgenden Sätzen ausdrücken lassen.

1) Die beste Methode zur Isolirung der Bernsteinsäure ist, in Uebereinstimmung mit älteren Angaben von E. Salkowski, ihre Ueberführung in alkoholhaltigen Aether.

2) Zur Reinigung der beim Verdunsten des Aetherauszeuges erhaltenen Bernsteinsäure lässt sich kein generelles Verfahren angeben. Dasselbe hängt ab von den besonderen Umständen.

3) Für Fäulnisgemischungen lässt sich mit Vortheil ein Verfahren der fractionirten Ansäuerung der mit Aether zu extrahirenden Flüssigkeit anwenden.

4) Die Bernsteinsäure ist ein Produkt der Lebensthätigkeit verschiedener Mikroorganismen und kann durch diese sowohl aus Kohlehydraten, sowie diesen nahestehenden Substanzen, als auch aus Eiweiss gebildet werden. Ihre Quantität ist in letzterem Falle von dem Alkaligehalt der Mischung abhängig.

<sup>1)</sup> Jen. Annalen der Physik u. Medicin. I. S. 180—191.

5) Die Organe enthalten in physiologisch frischem Zustande keine Bernsteinsäure. Wo sie sich in diesen findet, ist sie als postmortales Produkt anzusehen; sie ist also kein Stoffwechselprodukt der animalen Zellen, sondern der Mikroorganismen.

6) Beim Stehen sauer gewordene und Monate lang aufbewahrte Milch enthält Bernsteinsäure. Bei der bakteriologischen Untersuchung derselben findet man unter anderem einen kurze Stäbchen bildenden Bacillus, welcher auf Gelatine runde, scharf abbegrenzte, verflüssigende Colonien bildet. Impft man Milch mit einer Cultur dieser Kurzstäbchen, so bildet sich in ihr nach wenigen Tagen Bernsteinsäure.

Zum Schluss erfülle ich die ebenso ehrenvolle, wie angenehme Pflicht, Herrn Prof. E. Salkowski für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für die freundlichst jeder Zeit gewährte Unterstützung bei derselben meinen innigsten Dank auszudrücken.

---

## XXIV.

### Die Entstehung der zelligen Infiltration böartiger Tumoren.

Von W. Heidemann,

I. Assistenten am Pathologischen Institut der Universität Greifswald.

---

In Bd. 129 dieses Archivs (S. 77) habe ich Untersuchungen mitgeteilt über die Entstehung und die weiteren Schicksale der kleinzelligen Infiltration in der Umgebung von Carcinomen; ich habe damals gefunden, dass die kleinzellige Infiltration aus einer Umwandlung des Gewebes hervorgegangen ist, bei welcher im derben Fasergewebe an der Grenze des Carcinoms viele neue Zellen auftreten, welche hart an den Krebszapfen meist jungen Gewebszellen oder Leukocyten ähnlich sehen, dagegen in der Nähe der derben ruhenden Nachbarschaft solche Formen enthalten, die weder mit diesen Aehnlichkeit haben, noch überhaupt als voll ausgebildete Zellen zu betrachten sind.