Ueber die Einwirkung des künstlichen Magensaftes auf Essigsäure- und Milchsäure-Gährung.

(Preisgekrönt von der medicinischen Fakultät der Universität Strassburg.)

Von

Dr. E. Hirschfeld.

Die Umwandlung des Milchzuckers in Milchsäure findet unter dem Einflusse — ob unmittelbaren oder mittelbaren, muss noch unentschieden bleiben — einer ganzen Reihe von Mikroorganismen statt, deren Zahl schon durch die bisherigen Forschungen als eine sehr bedeutende festgestellt ist, die aber durch neue Untersuchungen immer noch vermehrt wird. Indessen ist man übereingekommen, einen als den „Milchsäurepilz“ κατ' ἐξοχὴν zu betrachten. Es ist dies der zuerst von Hüppe in seinen morphologischen und biologischen Eigenschaften genauer studirte, und von ihm als solcher bezeichnete, *Bacillus acidi lactici*.

Dieser *Bacillus* erscheint unter dem Mikroskope als ein kurzes, dickes Stäbchen, an dessen Ende, besonders wenn er aus Zuckerlösung gezüchtet ist, stark glänzende, kugelige Sporen ansitzen, der die Gelatine nicht verflüssigt. Während er im Stiche dünne, weisse Auflagerungen mit kleinen Knollen bildet, zeigt er im Striche einen, je nach dem Alter der Cultur, mehr oder weniger breiten, weissen Streifen, dessen gebuchtete Ränder besonders charakteristisch sind. Die Bildung der Milchsäure geht am günstigsten bei der Körpertemperatur vor sich; nicht allein Milchzucker, sondern auch andere Kohlehydrate, wie Rohrzucker, Dextrose und Mannit, können das Material hierzu liefern.

Den Einfluss des künstlichen Magensaftes auf den Gährungsvorgang zu studiren, ist auf zweierlei Wegen möglich. Der eine wäre der, dass man die Pepsinsalzsäure in verschiedenen Concentrationen, wie auch sonst in der Bacteriologie, zu den Culturen der Milchsäurebacillen hinzufügt und nun beobachtet, in wie weit

eine Beeinträchtigung oder gar Behinderung unter dem Einflusse dieses Agens stattfindet.

Während nun dieses Verfahren bei allen denjenigen Pilzen, welchen keine gährungserregende oder infectiöse Eigenschaften innewohnen, als das alleinig zulässige zu betrachten ist, haben wir gerade bei den Gährungspilzen in der Bestimmung der Menge der unter sonst gleichen Verhältnissen gebildeten Gährungsproducte einen bequemen und sicheren Maassstab für den Grad ihrer Wirksamkeit. Diese Methode haben auch wir befolgt, indem wir zugleich die Resultate der letzteren ab und zu durch die erstere kontrollirten.

Unter künstlichem Magensaft versteht man einen Auszug der von der Magenschleimhaut während des Lebens abgesonderten Fermente und der Chlorwasserstoffsäure. Die von der Muscularis abpräparirte Mucosa wird fein zerhackt, entweder nach der Wittich'schen Methode mit Glycerin ausgezogen, oder, wie zuerst Bidder und Schmidt angegeben haben, mit 0,1—0,2 proc. Salzsäure übergossen. Besonders die letztere Darstellungsweise liefert einen für unsere Zwecke sehr geeigneten künstlichen Magensaft, während wir mit der Glycerinextraction einen weiteren, den Gährungsvorgang möglicherweise beeinflussenden, Factor in unsere Versuche hineinbrächten.

Indem wir nun zu diesen Versuchen selbst übergehen, bemerken wir kurz vorher, dass wir dieselben in zwei Richtungen angestellt haben, nämlich 1) mit Reinculturen der Hüppe'schen Milchsäurebacillen, 2) durch Impfung mit sauer gewordener Milch selbst. Wir schildern zuerst die ersteren Versuchsreihen.

Die Reinculturen der Milchsäurebacillen — ich hatte dieselben durch die Güte eines Bekannten erhalten — wurden als solche durch ihr makroskopisches Verhalten in Strich und Stich erkannt, dann aber auch durch die mikroskopische Untersuchung mit gleichzeitiger Färbung mit Methylviolett. Von dieser ursprünglichen Reincultur wurden unter den bekannten Cautelen mit der geglühten Platinnadel eine Reihe von Reagenzgläsern, welche als Nährsubstrat Fleischinfuspeptongelatine enthielten, im Striche oder auch nach der Esmarch'schen Methode durch Vertheilung der Gelatine an den Wänden des Probirröhrchens, geimpft, da man auf diese Weise eine grössere Menge von Bacterien enthält als durch Stichkulturen. Zu einer jeden Versuchsreihe wurde eines

dieser Reagenzgläser in der Hand erwärmt, so dass die sich verflüssigende Gelatine der Strichculturen gewissermaassen zusammenschrumpfte und der weisse aus den Bacterien bestehende Belag sich von dem Nährsubstrat abhob und nunmehr leicht durch Schütteln mit sterilisirtem, destillirtem Wasser vollends entfernt werden konnte. Durch möglichst nachhaltiges Umschütteln des Probirröhrchens wurden die Bacterien möglichst gleichmässig in der Flüssigkeit vertheilt und nunmehr sofort die Kolben mit den sterilisirten Milchzuckerlösungen beschickt. Diese Milchzucker enthaltenden Nährlösungen wurden auf folgende Weise hergestellt.

Ein ungefähr $2\frac{1}{2}$ —3 Liter enthaltender Kolben, der wegen seiner Grösse nur schwer durch Erwärmen auf 160° im Sterilisationsofen hätte sterilisirt werden können, wurde zuerst mit Salzsäure gereinigt und dann so lange mit destillirtem Wasser ausgespült, bis die Spülflüssigkeit Lacmustinctur nicht mehr roth färbte. In diesen so gereinigten Kolben wurden gebracht

2000 cbcm Wasser,
60 gr Pepton,
21 gr Milchzucker,
8 gr Kaliumphosphat,
1,6 gr Magnesiumsulfat,
0,4 gr Calciumchlorid.

Was dann noch etwa an dem Hals des Kolbens kleben geblieben war, wurde mit etwa 100 cbcm Wasser nachgespült und dann, wohl umgeschüttelt, das Gefäss durch einen Wattepfropf verschlossen. Jetzt wurde es während dreier Tage jedesmal 15 Minuten lang bei 100° in den siedenden Wasserdämpfen des Koch'schen Ofens sterilisirt. Nachdem so eine gleichmässige Vertheilung des Nährmaterials erzeugt worden war, wurde noch heiss filtrirt und in die einzelnen Versuchskolben, welche im Trockenofen durch einstündiges Erhitzen auf 160° sterilisirt worden waren, je 100 cbcm der Lösung vertheilt. Da der ursprüngliche Kolben mit der gesammten Flüssigkeit in siedenden Wasserdämpfen erhitzt worden war, so hatte dieselbe annähernd ihr ursprüngliches Volumen beibehalten. Dann wurden sofort aus einer Bürette, welche titrirte 1 proc. Salzsäure enthielt, so viel Cubikcentimeter zufließen gelassen, als man der Versuchsflüssigkeit Hundertstel-Procent zusetzen wollte. Wurden die Versuche zu-

gleich mit Pepsin angestellt, so wurde aus einer anderen Bürette vorher filtrirte Pepsinlösung, welche durch Extraction der zerhackten gereinigten Schleimhaut eines Schweinemagens frisch bereitet worden war, entleert. Controllproben ergaben die Fermentlösung als kräftig Fibrin verdauend. Das Pepsin wurde immer in einer Menge von je 2 ccm hinzugesetzt, selbstverständlich, nachdem die Flüssigkeit in dem Kolben schon erkaltet war. Nunmehr wurden die so präparirten Nährlösungen mit annähernd gleichen Mengen der bacterienhaltigen Flüssigkeit rasch versetzt und dann der Einwirkung derselben in einem grossen Wasserbade, dessen Temperatur auf ungefähr 34° regulirt worden war, verschiedene Zeit lang, wie in den Tabellen angegeben ist, überlassen.

Wie schon oben erwähnt, haben wir in der Bestimmung der gebildeten Gährproducte einen sicheren Maassstab für die Lebenthätigkeit der die Gährung verursachenden Mikroorganismen.

Die Milchsäure wird gewöhnlich als milchsaures Zink oder als milchsaurer Kalk bestimmt. Diese Methode hier durchzuführen, wo wir eine so grosse Menge von Einzelversuchen hatten, wäre nicht gut durchführbar gewesen. Viel bequemer, und in ihren Resultaten durchaus nicht weniger genau, ist die Bestimmung der gebildeten Milchsäure durch Titration. Da indessen die Menge der Milchsäure bei der Vergährung des Milchzuckers selbst unter den günstigsten Bedingungen niemals sehr hohe Werthe erreicht, — so berichtet z. B. Hüppe, dass er in 3 Tagen durch seinen *Bac. acidi lact.* aus einer 3 proc. Milchzuckerlösung 0,32 % Milchsäure erhalten habe — so würde allerdings die Titration mit Normalalkalilauge, von der je 1 ccm bereits 0,09 Milchsäure entspricht, in Bezug auf Genauigkeit Einwürfe gestatten. In Folge dessen verwendeten wir zur Titration durchweg Zehntelnormal-Lauge, durch welche wir in den Stand gesetzt waren, Unterschiede von 0,0025 gr Milchsäure bequem zu constatiren.

Die Normal-Lauge war, von der Oxalsäure ausgehend, bereitet worden.

Ausser in der gebildeten Säure haben wir noch in der Bestimmung des vergährten Milchzuckers — durch die Ablenkung des polarisirten Lichtstrahles — einen Maassstab für die Gährthätigkeit. Es müsste diese letztere Methode eigentlich sogar genauere Resultate liefern als die Titration. Denn während wir dort Alles, was zur Vergährung gelangt ist, feststellen können, sind wir hier

nur in der Lage, von den gebildeten Producten eines derselben, allerdings das hauptsächlichste, zu bestimmen. Denn neben der Milchsäure wird von dem *Bac. acidi lactici* stets noch etwas Kohlensäure gebildet, welche also nicht berücksichtigt wird. Indessen sind die Mengen derselben nur gering, und da bei allen Versuchen in der gleichen Weise verfahren wird, so wird an dem Resultate thatsächlich nichts geändert. Andererseits hat die Bestimmung des umgewandelten, oder richtiger gesagt, des der Umwandlung entgangenen, Milchzuckers ebenfalls ihre Bedenklichkeiten. Denn ganz abgesehen davon, dass die Flüssigkeit durch das hinzugefügte Pepton ziemlich intensiv gefärbt war, was ja vermieden werden könnte, indem man weniger Pepton, und dann das Witte'sche Pepton benutzt, welches von allen Präparaten noch am wenigsten gefärbt ist, kann durch das Pepton und die in ihm enthaltenen Beimengungen, welche ebenfalls den polarisirten Lichtstrahl abzulenken im Stande sind, ein Irrthum herbeigeführt werden. Ausserdem sind die gärenden Flüssigkeiten je lebhafter die Gährthätigkeit ist um so stärker getrübt, so dass sie erst filtrirt bzw. verdünnt werden müssten. Und schliesslich lässt sich noch ein dritter Einwand erheben. Wenn man nämlich eine Milchzuckerlösung längere Zeit bei 100° erwärmt, so findet häufig — allerdings nicht immer — eine mehr oder weniger starke Gelbfärbung der Flüssigkeit statt, ein Verhalten, welches auch schon von Hüppe beobachtet worden ist. Worauf die Gelbfärbung beruht, und unter welchen Umständen sie statt hat, ist nicht erklärt, da eine Zersetzung des Milchzuckers erst bei 105° beobachtet wird.

Indessen lässt sich allen Forschern, welche die Bestimmung des Milchzuckers durch den Polarisationsapparat ausgeführt haben, entgegenhalten, dass sie zugleich den Beweis hätten erbringen müssen, dass mit der Gelbfärbung der Milchzuckerlösung nicht zugleich eine Veränderung derselben in ihrem Verhalten gegen den polarisirten Lichtstrahl stattgefunden habe.

Da die Flüssigkeit ziemlich intensiv gefärbt war, so konnten weder Lacmustinctur noch Rosolsäure zur Titration verwendet werden, zumal die gleichzeitige Anwesenheit von Phosphaten einen deutlichen Umschlag der Farbstofflösung zu erkennen verhindert. Wir benutzten deshalb zur Titrirung Curcumapapier. Zur Controlle verfertigten wir uns eine Lösung von 2 cem $\frac{1}{10}$ NaOH in 100H₂O, und setzten dann zu der zu titirenden Flüssigkeit so viel Cubik-

centimeter der Zehntelnormallösung hinzu, bis alkalische Reaction eingetreten war, d. h. bis das eingetauchte Curcumapapier die Farbe eines in die Controllösung eingetauchten Curcumapapieres angenommen hatte. Alsdann wurde die Titration für beendet angesehen und von der gefundenen Zahl der zur Neutralisation erforderlich gewesen Lauge 2 ccm abgerechnet.

Die Einwürfe, welche gegen diese ganze Versuchsanordnung erhoben werden können, sind folgende:

1) Zweck der Arbeit ist es, die Einwirkung der Pepsinsalzsäure auf die Gährung kennen zu lernen. Nun wird aber zweifellos der Gährungsvorgang nicht allein durch von aussen zugesetzte Agentien behindert, sondern durch die aus dem Milchzucker selbst gebildete Milchsäure, welche für sich allein schon im Stande ist, eine vollständige Hemmung der Bacterienwirkung zu erzielen. Wenn es sich deshalb darum handelt, die gährungsfähige Substanz vollständig zu invertiren, fügt man dem Gährungsgemisch zur Neutralisation der gebildeten Säure Calciumcarbonat hinzu. Dieses hier anzuwenden, wo wir die Einwirkung der Salzsäure studiren wollten, war selbstverständlich nicht möglich. In Folge dessen dachte ich daran, die der Gährung überlassenen Kolben mit Aether zu versetzen; die Milchsäure geht dann in den Aether über, während die Salzsäure in ihrer wässerigen Lösung zurückbliebe. Indessen abgesehen von den mannichfachen Schwierigkeiten, welche diese Methode darbietet — leichte Verdunstbarkeit des Aethers — ist sie deshalb zu verwerfen, weil sich stets eine gewisse Menge Aether in Wasser löst, und somit eine nicht näher controllirte Beeinflussung seitens des Aethers auf die Wirkung der Bacterien stattfindet.

Wir müssen daher im Auge behalten, dass nur in den Fällen, in welchen die Salzsäure von vornherein eine Milchsäurebildung nicht gestattet, die reine Salzsäurewirkung allein studirt wird. In allen anderen Fällen, in welchen es noch zum Auftreten von Milchsäure kommt, findet eine Behinderung bezw. vollständige Hemmung des Gährungsvorganges nicht eben bloss durch die Salzsäure, sondern auch zugleich durch den complicirenden Einfluss der Milchsäure statt.

2) Es muss ferner die Frage aufgeworfen werden, ob nicht bei dem Zufließenlassen der Pepsinlösung, der Salzsäure und der bacterienhaltigen Flüssigkeit, wenn dasselbe auch möglichst rasch

ausgeführt wurde, doch noch eine Verunreinigung durch in der Luft enthaltene Keime stattgefunden hat. Die Möglichkeit muss entschieden zugegeben werden, indessen ist hervorzuheben, dass, auch falls eine Verunreinigung stattgefunden haben sollte, die Milchsäurebacillen sich stets in der überwiegenden Majorität befunden haben.

3) Durch das Hinzufügen des Kaliumphosphates nicht allein, sondern auch durch das Pepton wird eine saure Reaction der Nährlösung erzeugt. Also auch dieses käme noch zu dem Einfluss der Milchsäure hinzu. Indessen ist zu betonen, dass diese Verhältnisse den im Magen vorkommenden natürlichen Verdauungsvorgängen am besten entsprechen, da die Reaction der meisten Nahrungsmittel, speciell des Fleisches, durch das in ihm enthaltene Kaliumphosphat, ebenfalls eine saure ist. Ausserdem haben wir nicht immer die gleiche Menge und das gleiche Phosphat angewendet, sondern häufig, wie in den Tabellen angegeben ist, eine Neutralisation vorgenommen, so dass der vorhandene Aciditätsgrad und die Phosphatmenge variierte. Wenn es schliesslich Bedenken erregen sollte, dass bei der gleichzeitigen Anwesenheit eines phosphorsauren Salzes durch die stärkere Chlorwasserstoffsäure die Phosphorsäure aus ihrem Salze in Freiheit gesetzt würde, so möchte ich mir erlauben, darauf aufmerksam zu machen, dass das gleiche Verhältniss — nämlich das gleichzeitige Auftreten von Phosphaten und freier Salzsäure — im Magen existirt und Zweck der Arbeit ist, die Einwirkung der Pepsinsalzsäure, als der vom Magen gelieferten Materialien, auf die Milchsäuregährung, zu deren Unterhaltung Phosphorsäure unumgänglich nothwendig ist, zu studiren. Ausserdem haben wir dadurch, dass wir die verschiedenen Salze der Phosphorsäure — durch Neutralisation aus dem ursprünglichen sauren Phosphat erhalten — als Nährsubstrat verwandten, den natürlichen Verdauungsvorgängen im Magen analoge Verhältnisse zu schaffen gesucht.

Dieses wäre der erste Theil der Versuche über Milchsäuregährung, welche wir mit Reinkulturen des Hüppe'schen *Bac. acidi lactici* angestellt haben.

In dem zweiten Theile haben wir ausser dem Impfmateriail noch einige andere wesentliche Aenderungen vorgenommen. Um einer Zersetzung der Milchzuckerlösung vorzubeugen, haben wir Nährflüssigkeit in dem gemeinsamen Kolben zuerst ohne den

Milchzucker erhitzt. Die Menge und die Art der hinzugesetzten Phosphate ist bei jeder einzelnen Versuchsreihe besonders angegeben.

Fernerhin haben wir zur Titration nicht mehr Curcumapapier, sondern ein sehr empfindliches rothes Lacmuspapier benutzt und in einer Reihe von Controllversuchen auch eine alkoholische Rosolsäurelösung¹⁾. Die Titration wurde in der Weise ausgeführt, dass die Flüssigkeit aus dem Versuchskolben in eine Schale ausgegossen wurde und dann aus der Bürette, unter Umrühren mit einem Glasstabe, so viel von der Zehntelnormallösung hinzufliessen gelassen, bis auf dem rothen eingetauchten und dann mit der Spritzflasche abgespülten Lacmuspapier der erste blaue Streifen sich zu zeigen beginnt. Dieses ist der Fall, wenn ein correspondirendes, sehr empfindliches, blaues Lacmuspapier noch ganz schwach, aber, wohl erkennbar, roth gefärbt wird. Es ist dieses Verhalten der Anwesenheit der Phosphate zuzuschreiben, die ja auch in einer Lacmuslösung einen deutlichen Umschlag zu erkennen verhindern. Sowie dieser erste blaue Streifen auftrat, wurde die Titration für beendet angesehen, und sämtliche in den Tabellen angegebenen Zahlen beziehen sich hierauf. Wenn wir Rosolsäure verwandten, so wurden aus der Bürette eine gleich grosse Menge des alkoholischen Rosolsäureextractes hinzufliessen gelassen; jedoch lieferte die Titrirung mit Lacmuspapier weit prägnantere Unterschiede als die mit Rosolsäure.

Im Uebrigen wurde bei der Sterilation der Gefässe, der Bereitung des Magensaftes in der gleichen Weise wie früher verfahren.

Zur Impfung der Nährlösung wurde sauer gewordene Milch statt der vorher angewandten Reinculturen benutzt. Wie schon oben erwähnt ist der von Hüppe aus saurer Milch isolirte *Bac. acidi lactici* nicht der einzige Milchzucker invertirende Pilz. Da nun die Form, in welcher diese Gärungserreger in den Magen-Darmkanal gelangen, in der grössten Anzahl der Fälle, namentlich bei Kindern „schlechte“ Milch ist, welche ausser dem Hüppeschen Milchsäurebacillus noch eine ganze Reihe von in gleicher Weise wirkenden Mikroorganismen enthält, so lag es nahe, die

1) Die Titration mit Lacmuspapier und Rosolsäure wurde stets bei Tageslicht und an ein und demselben Platze ausgeführt.

Gesamtwirkung zu studiren. Allerdings ist durch die neueren Untersuchungen von Baginsky erwiesen worden, dass das *Bacterium lactis*, welches zuerst von Escherich aus dem Milchkoth von Säuglingen gezüchtet worden ist, Milchzucker unter der Bildung von Essigsäure und Milchsäure zersetzt. In Folge dessen musste, da die Milchsäure nicht als solche bestimmt, sondern durch die zu der Neutralisation nothwendige Natronlauge berechnet wurde, nachgesehen werden, ob die von Baginsky für die Milchkothbakterien ermittelten Verhältnisse sich nicht in der sauren Milch wiederholten. Dies ist in der unten angegebenen Weise ausgeführt worden.

Die Impfungsflüssigkeit wurde in der folgenden Weise bereitet.

Frische ungekochte Milch wurde in einem Becherglase im Brütöfen 1—2 Tage stehen gelassen. Alsdann war die Milch zu einem das ganze Gefäss ausfüllenden Coagulum geronnen. Nun wurde vorsichtig mit einem gereinigten Glasstabe die oberste Rahmschicht abgehoben und das Uebrige dann mit destillirtem Wasser verrührt. Durch die Entfernung der oberflächlichen Rahmschicht werden zugleich von aussen hereingekommene zufällige Verunreinigungen, besonders aber die meisten Sprosspilze, beseitigt. Das mit dem Coagulum verrührte Wasser wurde direct zur Impfung der Versuchskolben in einer Menge von je 2ccm aus der Bürette zufließen gelassen und die infectirten Flüssigkeiten, wie früher, verschieden lange Zeit der Gährung überlassen.

Der grösste Theil der mit Wasser versetzten Milch war somit übrig geblieben. Es wurde absetzen gelassen und filtrirt; das Filtrat mit grösseren Mengen von Aether wiederholt ausgeschüttelt. Die gesammelten Aethermengen wurden filtrirt und abdestillirt, der Rückstand wieder in Wasser aufgenommen, und nunmehr ein Theil auf freiem Feuer der Destillation unterworfen. Im Destillate wurde keine Essigsäure aufgefunden, welche doch bei der Destillation in die Vorlage hätte übergehen müssen, wenn sie vorhanden gewesen wäre. Buttersäure und die anderen höheren Glieder der Fettsäurereihe fehlten ebenfalls. In dem im Destillationskolben zurückgebliebenen Rückstand konnte die Milchsäure ohne weiteres nachgewiesen werden.

Wenn man die mit Wasser ausgeschüttelte und abfiltrirte Milch noch längere Zeit (circa 14 Tage) stehen lässt und dann

die saure Flüssigkeit destillirt, so erhält man in der Vorlage in dem klaren wasserhellen Destillate mit Laemustinctur intensive Rothfärbung. Es war also hier eine flüchtige Säure gebildet worden.

Die Versuche mit saurer Milch haben wir nie länger als höchstens 3 Tage fortgesetzt, da in Folge der dann auftretenden bezw. dominirenden Entwicklung von Sprosspilzen damit zu viel weitere, nicht controllirbare Factoren in die Versuche hineingekommen wären.

Die Controllversuche der vorhandenen Acidität sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Tabellen¹⁾.

Milchsäuregährung.

I.

Zeit der Einwirkung $3\frac{3}{4}$ Stunden. Vorhandene Acidität 7 KOH. Neutralisation.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	6	0	6	0,054
1	4,5	2,74	1,76	0,016
3	9	8,22	0,78	0,007
5	14	13,7	0,29	0,003
6	18	16,44	1,56	0,014
7	19	19,18	— 0,18	0,000
8	22,5	21,92	0,58	0,005
9	25	24,66	0,34	0,003
10	28	27,4	0,6	0,005

II.

Zeit der Einwirkung 7 Stunden. Vorhandene Acidität = 3 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	16	3	13	0,117
1	13	5,74	7,26	0,065
3	17,5	11,22	6,28	0,057
5	20	15,82	4,18	0,038
6	21	19,44	1,56	0,014
7				
8	25,5	24,92	0,58	0,005
9	27	27,66	— 0,66	0,000

1) Die Erläuterung hierzu ist bei den Versuchstabellen über Essiggährung hinten angefügt.

III.

Zeit der Einwirkung 14 Stunden. Vorhandene Acidität = 7 KOH.
Neutralisation.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	15,5	0	18,5	0,168
1	16	2,74	13,26	0,119
3	18	8,22	9,78	0,088
5	17	13,7	3,3	0,03
6	17	16,4	0,6	0,005
7	23	19,18	3,82	0,034

IV.

Zeit der Einwirkung 24 Stunden. Vorhandene Acidität = 3 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	22	3	19	0,171
1	20	5,74	14,26	0,129
2	16,5	8,48	8,02	0,042
5	20	16,7	3,3	0,03
8	27	24,92	2,08	0,019
9	26,5	27,66	— 1,16	0,000
10	29,75	30,48	— 0,73	0,000
11	32,5	33,14	— 0,64	0,000

V

Zeit der Einwirkung 48 Stunden. Vorhandene Acidität = 3 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0 ¹⁾	24,5	3	21,5	0,194
1	22,5	5,74	16,76	0,151
3	18,5	11,22	7,28	0,066
7	23,5	22,11	1,39	0,013
8	24	24,92	— 0,92	0,000
9	26,75	27,66	— 0,91	0,000
10	29,75	30,4	— 0,65	0,000
11	32,75	33,14	— 0,39	0,000

VI.

Zeit der Einwirkung $4\frac{3}{4}$ Stunden. Pepsinzusatz. Vorhandene Acidität
= 4 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	11	4	7	0,063
1	12	6,74	5,26	0,047
3	13	12,22	0,78	0,007
5	17,5	17,7	— 0,2	0,000

1) In einem Controllversuche 26 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
7	26	23,18	2,82	0,025
9	33	28,66	4,34	0,039
11	33	34,14	— 1,14	0,000
13	39	39,62	— 0,62	0,000
15	43	45,1	— 2,1	0,000

VII.

Zeit der Einwirkung 13 Stunden. Pepsinzusatz. Vorhandene Acidität
= 1 KOH (nach der Neutralisation).

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0				
1	17	3,74	13,26	0,119
3	19	9,22	9,78	0,097
5	18	14,7	3,3	0,03
6	21	17,44	3,56	0,033
7	28,5	20,18	8,32	0,075
8	35	22,92	12,08	0,109
9	35,5	25,6	9,9	0,09

VIII.

Zeit der Einwirkung 24 Stunden. Vorhandene Acidität = 4 KOH.
Pepsinzusatz.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	23	4	19	0,171
3	17	12,22	4,78	0,043
5	22	17,71	4,29	0,039
6	23	20,44	2,56	0,023
7	30	23,18	6,82	0,061
8	35	25,92	9,08	0,082
9	39,5	28,66	10,84	0,097
11	34	30,14	3,86	0,035
13	35,36	35,62	0,00	0,000

IX.

Zeit der Einwirkung 2 Tage. Vorhandene Acidität = 4 KOH. Pepsinzusatz

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	27	4	23	0,207
1	23	6,74	16,26	0,136
3	22	12,22	9,78	0,088
5	23	17,71	5,29	0,048
7	30,5	23,18	7,32	0,065
9				
11				

So weit die Versuche mit Reinculturen und Curcumatitrierung.
Bei den nunmehr folgenden ist mit Lacmuspapier titirt worden.

X.

Zeit der Einwirkung 1 Tag. Nährsubstrat = 0,2 % KH_2PO_4 .

Vorhandene Acidität = 5 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	24	5	19	0,171
1	17,5	7,74	9,76	0,088
3	19	13,22	5,78	0,052
4	16	15,96	0,04	0,003
5	21	18,71	2,29	0,021
7	26	24,18	1,28	0,012

XI.

Dieselben Verhältnisse wie vorhin. Pepsinzusatz.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	22	5	17	0,153
1	21	7,74	13,26	0,119
3	22	13,22	8,78	0,079
4	18,5	15,96	2,54	0,023
5	22	18,7	3,3	0,03
7	27,5	24,18	3,32	0,03
9	30	29,66	0,34	0,003

XII.

Zeit der Einwirkung 3 Tage. Nährsalz = 0,2 % KH_2PO_4 . Vorhandene
Acidität = 5 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	38,5	5	33,5	0,301
1	27	7,74	19,26	0,173
3	24,5	13,22	11,28	0,102
5	22	18,7	3,3	0,03

XIII.

Dieselben Verhältnisse wie vorhin. Pepsinzusatz.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
1	30	7,74	22,26	0,200
3	28,5	13,22	15,28	0,138
5	30,0	18,7	11,3	0,102
0	36	5	31	0,279

XIV.

Zeit der Einwirkung 42 Stunden. Vorhandene Acidität = 5 KOH.
Nährsubstrat 0,2 % KH_2PO_4 .

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	32	5	27	0,243
1	33,5	7,74	25,76	0,232
3	29,5	13,22	16,28	0,147
5	24	18,7	5,3	0,048
7	26,5	24,18	2,32	0,021
9	31	29,66	1,34	0,013

XV.

Dieselben Verhältnisse wie in XIV. Pepsinzusatz mit Variirung der Pepsinmenge.

	HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
3 P	5	25	19,7	5,3	0,048
4 P	7	26	25,18	0,82	0,007
5 P	9	35,5	31,66	3,84	0,025

XVI.

Dieselben Verhältnisse wie in XIV. Constanter Pepsinzusatz von 2 cbcm.
Vorhandene Acidität = 5 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	34	5	29	0,261
1	35	7,74	27,26	0,245
3	29	13,22	15,78	0,142
5	25	18,7	6,3	0,057
7	29	24,18	4,82	0,044
9	34	29,66	4,34	0,039

XVII.

Dieselben Verhältnisse wie in XVI. Nährmaterial = 0,4 KH_2PO_4 .
Acidität = 9 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	39	9	30	0,270
1	43	11,74	31,26	0,281
3	39	17,22	21,78	0,196

XVIII.

Zeit der Einwirkung 15 Stunden. Nährsubstrat = 0,1 % K_2HPO_4 .

Vorhandene Acidität = 2 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	15,5	2	13,5	0,121
1	14	4,74	9,26	0,101
2	11	7,48	3,52	0,023
3	12	10,22	1,78	0,016
4	14	12,96	1,04	0,009

XIX.

Dieselben Verhältnisse wie in XVIII, mit variirendem Pepsinzusatz.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
2 P 0	16,5	3	13,5	0,121
2 P 1	14,5	5,74	8,76	0,079
2 P 3	13,5	11,22	2,28	0,021
3 P 4	17	13,96	3,04	0,027
4 P 5	22	17,7	4,3	0,038
5 P 7	23	24,18	— 1,18	0,000
5 P 9	29	29,16	— 0,16	0,000

XX.

Dieselben Verhältnisse wie in XIX. Zeit der Einwirkung 3 Tage. Die Flüssigkeit enthielt viel Sprosspilze. Daher haben die Versuche nur bedingt Geltung.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
2 P 5	22,5	15,71	6,79	0,061
4 P 5	24	16,71	7,3	0,066
2 P 7	27	21,18	5,82	0,052
4 P 7	28,5	22,18	6,32	0,056
2 P 9	33,5	26,66	6,84	0,062
4 P 9	35	27,66	7,34	0,067

XXI.

Zeit der Einwirkung 42 Stunden. Nährmaterial 5 ccm einer 1 % Trikaliumphosphatlösung = 0,05 % K_3PO_4 . Pepsinzusatz. Vorhandene Acidität = 1 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	23	1	22	0,198
2	20	6,5	13,5	0,122
4	21	11,96	9,04	0,081
6	22	17,44	4,56	0,041
8	24	22,92	1,08	0,010
10	29	28,4	0,6	0,005
12	35	33,88	1,12	0,010

XXII.

Zeit der Einwirkung 42 Stunden. Nährmaterial 0,025 % H_3PO_4 . Vorhandene Acidität = 9 KOH. Pepsinzusatz.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	51,5	9	12,5	0,113
0,25	20	9,64	10,36	0,093
0,50	17	10,28	6,32	0,065
0,75	18	10,92	7,08	0,064
1	18	11,74	6,26	0,058
2	19	14,48	4,52	0,041
3	23	17,22	5,78	0,052
6	28	25,44	2,56	0,023
8	32,5	30,92	1,52	0,014

XXIII.

Zeit der Einwirkung 42 Stunden. Nährmaterial 0,05 % KH_2PO_4 . Zusatz Phosphorsäure und Pepsin, ersteres in 2,5 % Lösung.

H_3PO_4	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	27,5	2	25,5	0,230
1	23,5	9,74	93,76	0,124
2	29	17	12	0,108
3	32	24,5	7,5	0,068
4	36	32	4	0,036
5	38	39,5	— 1,5	0,000
6	Beide Kolben wurden, da sie keine Entwicklung von Microorganismen zeigten, neutralisirt.			
8				

Die 4 letzten Versuchskolben von XXI wurden neutralisirt einer weiteren Gährung überlassen. Bei der Titration nach $2\frac{1}{2}$ Tagen zeigten sie neue Säuerung. Die Titrationsergebnisse sind verloren gegangen.

Die 2 letzten Kolben von XXIII zeigten nach der Neutralisation, $2\frac{1}{2}$ Tage der Gährung überlassen, 13 KOH bzw. 7,5 KOH. Acidität.

XXIV.

Titration mit Rosolsäure.

Zeit der Einwirkung 42 Stunden. Vorhandene Acidität = 5 KOH. Nährsubstrat 0,2 % KH_2PO_4 .

HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0	32	5	27	0,243
0	31,5	7,74	23,76	0,214
3	27,5	13,22	14,28	0,129
5	21	18,7	2,3	0,021
7	25	24,18	0,82	0,007
9	31	29,66	1,34	0,012

XXV.

Dieselben Verhältnisse wie in XXIV. Pepsinzusatz mit Variirung der Pepsinmenge.

	HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
3 P	5	25	19,7	5,3	0,048
4 P	7	26	25,18	0,82	0,007
5 P	9	36	31,66	4,34	0,039

XXVI.

Dieselben Verhältnisse wie in XXIV. Constanter Pepsinzusatz von 2 cbcm.
Vorhandene Acidität = 5 KOH.

	HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0					
1		35	7,74	27,26	0,245
3		29	13,22	15,78	0,142
5		25	18,7	6,3	0,057
7		30	24,18	5,82	0,052
9		34,5	29,66	4,84	0,044

XXVII.

Dieselben Verhältnisse wie in XXIV. Nährmaterial = 0,4 % KH_2PO_4 .
Acidität = 9 KOH.

	HCl	KOH	V. S.	G. S.	M. S.
0		40	9	31	0,279
1		43	11,74	31,26	0,281
3		39	17,22	21,78	0,196

Wir gehen nunmehr kurz zu der Besprechung der Resultate über, welche wir aus unseren Versuchen erhalten haben.

1) Wenn man auf eine passend gewählte Nährlösung den *Bac. acidi lactici* oder sauer gewordene Milch überimpft, so findet eine Invertirung des Milchzuckers statt, welche in den ersten 13—24 Stunden am lebhaftesten ist; bei fortschreitender Säuerung wird sie schliesslich geringer und erreicht folgende durchschnittliche Werthe.

1. Tag = 0,16
2. „ = 0,23
3. „ = 0,29.

2) Schon ganz geringe Salzsäuregrade (0,01—0,02) genügen, um am Anfange die Milchsäurebildung energisch zu verlangsamen. Nach einiger Zeit ist das Hinderniss scheinbar überwunden, ohne

dass aber schliesslich dieselbe Menge wie ohne Salzsäurezusatz je erreicht wird.

3) Bei mittleren Salzsäuregaben (0,03—0,04) wird die Lebendthätigkeit der Bakterien noch weiter herabgedrückt.

4) Noch höhere Salzsäuregaben beschränken die Milchsäurebildung auf ein Minimum. Eine vollständige Aufhebung wird bei einem Salzsäuregehalt von 0,07—0,08 % erreicht. Eine ganz genaue Grenze lässt sich schwer feststellen, da die gebildeten Milchsäuremengen Werthen von kaum 1 cem $\frac{1}{10}$ Normallösung entsprechen, welche in keinem Verhältniss zu den zugesetzten Säuremengen stehen. Ein Fehler bei der Titration kann in solchen Grenzen selbstverständlich leicht vorkommen.

5) Pepsin für sich allein ist ohne jeglichen Einfluss auf die Milchsäuregährung.

6) Bei gleichzeitigem Salzsäure- und Pepsin-Zusatz ist die Hemmung der Milchsäurebildung geringer als ohne Pepsin.

7) Die vollständige Sistirung des Gährvorganges liegt bei einem Procentgehalt von 0,11—0,12 %.

8) Reinkulturen des *Bac. acidi lactici* und saure Milch verhalten sich gegen Salzsäure und Pepsinsalzsäure im wesentlichen gleich.

9) Die verschiedene Menge und verschiedene Natur (ob Mono- oder Biphosphat) der phosphorsauren Salze hat auf die Wirkung der Salzsäure keinen wesentlichen Einfluss.

10) Steigerung des Pepsinzusatzes bei hohen Salzsäuregaben ergibt kein anderes Resultat.

11) Phosphorsäure hemmt die Milchsäurebildung bei 0,2—0,25 Procent.

12) Benutzt man anstatt der phosphorsauren Salze Phosphorsäure als Nährsubstrat (0,025 %), so findet keine Hemmung der Invertirung schon bei Pepsinsalzsäure 0,08 % statt.

Wenn wir diese einzelnen Resultate durchgehen, so fällt uns die grosse Empfindlichkeit des Milchsäurepilzes schon gegen ganz geringe Salzsäuregrade auf. Indessen verhält er sich ebenso gegen die von ihm selbst producirt Milchsäure. Wenn sich daher eine gewisse Menge Milchsäure angesammelt hat, so wirkt diese nunmehr ebenso verlangsamend wie die, in anderen Versuchen hinzugesetzte, Salzsäure. Daraus erklärt sich das in Nr. 2 beobachtete Verhalten.

Ziemlich auffällig erscheint das Ergebniss, dass Pepsinsalzsäure schwächer antibacteriell wirkt, als Salzsäure für sich allein. Indessen da durch verschiedene Versuche wahrscheinlich gemacht worden ist, dass sich Pepsin und Salzsäure im Magen in einer chemischen Verbindung befinden, und da man kaum annehmen kann, dass die chemische Energie der Chlorwasserstoffsäure dadurch gesteigert wird, sondern viel wahrscheinlicher eine Schwächung stattfindet, so erklärt sich damit auch, dass die Pepsinsäure schwächer antibacteriell wirkt, als die entsprechende Mineralsäure, welche schon in so hoher Verdünnung antifermentative Wirkungen zu entfalten im Stande ist.

Es lag daher nahe, zu untersuchen, wie sich die Verhältnisse stellen, wenn man den Pepsinzusatz steigert, indem man dann annehmen könnte, dass dadurch eine grössere Menge Chlorwasserstoffsäure gebunden würde. Diese Versuchsreihen haben nun ergeben, dass die Menge des Pepsins, welches zugesetzt wird, ohne wesentlichen Einfluss auf den Gährungsvorgang bleibt.

Hervorzuheben wäre noch das Resultat, dass, gleichgültig ob Monokalium oder Dikaliumphosphat und in welcher Menge dieselben verwendet werden, in der Wirkung der hinzugetretenen Salzsäure sich keine deutlichen Unterschiede constatiren lassen. Die zur Controlle angestellten Phosphorsäureversuche ergaben eine Sistirung der Gährung durch diese Säure erst bei einem Procentgehalt von 0,2—0,25%. Indessen selbst die vollständige Aufhebung des Gährungsvorganges ist nicht gleichbedeutend mit dem Tode der Bacterien. Vielmehr hat sich herausgestellt, dass, wenn man die Nährlösungen, in welchen keine Gährung mehr stattgefunden hat, neutralisirt, alsdann eine, allerdings abgeschwächte Gährung eintritt.

Es führt dies weiter auf die Frage nach dem Vorhandensein eines von den Bacterien producirtten Fermentes, welches sich vielleicht anders gegen Pepsinsalzsäure verhielte, als die Mikroorganismen selbst. Die Methode, nach welcher Hüppe auf dieses fragliche Milchsäureferment gefahndet hat, und dabei zu einem negativen Resultate gekommen ist, ist nicht ganz einwurfsfrei. Hüppe fällte die wässrige Lösung mit Alkohol und bearbeitete bloss den so erhaltenen Niederschlag weiter. Nun aber ergab sich mir bei Gelegenheit anderer Untersuchungen, dass, wenn man einen wässerigen Malzauszug mit Alcohol einer fractionirten Fäl-

lung unterwirft, in den beiden ersten Niederschlägen kein Ferment enthalten ist. Erst im dritten, noch reichlicher im vierten wurde, die Diastase aufgefunden. Es liegt also nahe, ähnliche Verhältnisse bei dem eventuellen, ebenfalls ein Kohlehydrat invertirenden, Milchsäure-Fermente zu vermuthen. Zu diesem Zwecke schlugen wir folgendes Verfahren ein. Die vom Casein befreite wässerige Lösung wird in einen mit einem doppelt durchbohrten Kautschuk versehenen Kolben gebracht, in dessen einer Oeffnung ein Thermometer bis in die Flüssigkeit eintaucht, durch welches die Temperatur auf 38° regulirt werden kann. Durch die andere Oeffnung ist der Kolben mit einem Kühler verbunden, der als Vorlage eine luftdicht angefügte Saugflasche enthält, die mit einer Wasserstrahlluftpumpe verbunden ist. Der Rückstand im Destillationskolben¹⁾ wird weiter mit Alkohol und Aether gereinigt, in weniger Wasser gelöst, mit einem mehrfachen Volumen Alkohol gefällt und dann in wässriger Lösung in Bezug auf sein fermentatives Vermögen untersucht. Leider konnte dieser Versuch bis jetzt nicht zu Ende geführt werden, da die Destillation bei 38° trotz der Absaugung mit der Wasserstrahlluftpumpe lange Zeit in Anspruch nimmt, und zum Nachweise des Fermentes jedenfalls grosse Flüssigkeitsmengen verarbeitet werden müssen.

Lassen sich die Ergebnisse dieser Versuchsreihen ohne weiteres auf die natürlichen Vorgänge im Magen übertragen?

Der durchschnittliche Salzsäuregehalt des Magens beträgt bekanntlich 0,2 Procent. Das ist ein Säuregrad, der weit denjenigen übersteigt, den wir nach unseren Versuchen als ausreichend zur vollständigen Aufhebung der Milchsäuregährung gefunden haben. Nun aber kommen im Magen Gährungen jeglicher Art sehr häufig vor. Wie lässt sich nun die letztere, sicher festgestellte Thatsache mit unseren Versuchsergebnissen in Einklang bringen?

Gährungen des Mageninhaltes finden sich vorzüglich bei zwei pathologischen Zuständen der Magenschleimhaut, d. i. der einfache Katarrh des Magens und ferner die Gastrectasie. Der anatomische Befund des Katarrhes zeigt uns die Oberfläche mit

1) Nach dem Abdestilliren bei 38° .

einem Belage bedeckt, welcher aus Schleim oder aus schleimig degenerirten Epithelien besteht. Dieser Schleim ist es nun, welcher, einerseits chemisch, durch seine alkalische Reaction den sauren Magensaft wenigstens zum Theil neutralisirt und andererseits mechanisch die in Gährung befindlichen Partikelchen überzieht, und somit der Einwirkung der Chlorwasserstoffsäure entzieht. Dieselben schädlichen Momente wirken bei der Gastrectasie mit. Hier kommt noch die Stagnation des Mageninhaltes hinzu. Die paretische Muskulatur ist nicht im Stande, die Magencontenta, selbst auf den abnormen Reiz den die Gährungsproducte hervorrufen, die ihrerseits wieder die Gastritis unterhalten, herauszubefördern. Die einmal in Gährung befindlichen Massen, geschützt durch die Schleimumhüllung gegen den zum Theil neutralisirten sauren Magensaft, können so ungestört weiter faulen.

Es kommt vielleicht ein weiteres Moment hinzu, weshalb der Magensaft im Magen, trotz der stärkeren Acidität, nicht in demselben Grade antiseptisch wirkt, wie der künstliche Magensaft in unseren Versuchskolben. Die natürliche Aufgabe der Pepsinsalzsäure ist die Peptonisation der Eiweisskörper, ein Geschäft, das sofort beginnt, sowie Nahrung eingenommen wird. Dieselbe Pepsinsalzsäure, welche eine chemische Umsetzung in den Eiweisskörpern hervorbringt, hat gleichzeitig das lebende Protoplasma der Bakterien zu verändern oder kurz gesagt: Die Pepsinsalzsäure wird im Magen schon durch die Eiweisskörper in Anspruch genommen.

Eine Entscheidung dieser Frage wäre leicht dadurch herbeizuführen, dass man Pepsinsalzsäure mit den Culturen der Bakterien bei Anwesenheit und Abwesenheit von Fibrin zusammenbringt und nun beobachtet, ob und welche Aenderung in der Wirkung des künstlichen Magensaftes zu constatiren ist.

Die Oxydation des Aethylalkoholes zu Essigsäure und das dadurch bewirkte Sauerwerden von alkoholarmen Getränken, insbesondere bei dem Bier und beim Wein, ist eine seit langen Jahren bekannte Thatsache. Schon frühzeitig führte dieses Verhalten technisch einerseits zu einer Ausnützung des Vorganges bei der Essigfabrication, andererseits zu Versuchen, wie man dieser Invertirung des Weingeistes, wenn sie unerwünscht auftritt, entgegenzutreten im Stande sei. Der erste, welcher den chemischen Vorgang dabei näher untersuchte, war am Ende des vorigen

Jahrhunderts Lavoisier und noch vor ihm der Abbé Rozier. Beide fanden, dass es sich bei der Bildung von Essigsäure aus Aethylalkohol stets um eine Aufnahme von Sauerstoff aus der Luft handle.

In ähnlicher Weise, wie man Anfangs das Casein als das die Milchsäuregährung hervorrufende Ferment auffasste, glaubte Berzelius in der Essigsäure selbst das ursächliche Agens dieser Gährung entdeckt zu haben. Für diese Annahme schienen die Thatsache zu sprechen, dass in neutralen oder nur schwachsauren Flüssigkeiten die Gährung nicht gut vor sich geht; ist dagegen bereits ein bestimmter Procentgehalt an Essigsäure vorhanden, so ist die weitere Oxydation des Alkoholes eine sehr lebhaft. Bald aber traten alle Untersuchungen hinter denen von Liebig und Pasteur zurück, welche in jahrzehntelangem Streite, in zahlreichen Veröffentlichungen ihre Theorien immer weiter ausbauten und die gegentheiligen Ansichten auf das Heftigste bekämpften. Ohne auf die Einzelheiten dieser Untersuchungen einzugehen, müssen wir doch die wesentlichsten Punkte hervorheben, weil der Kernpunkt des ganzen Streites das Thema dieser Untersuchung auf das Innigste berührt. Denn wenn wir den Einfluss der Salzsäure auf die Bildung der Essigsäure studiren wollen, ist es natürlich von der grössten Wichtigkeit zu wissen, ob dieser Vorgang auf der Thätigkeit von Mikroorganismen beruht, oder als nichts weiter als eine Oxydation des Alkoholes durch den Sauerstoff der Luft, ähnlich wie beim Platinrohr, aufzufassen ist. Ist der Vorgang der ersteren Art, wie Pasteur behauptete, so wird natürlich die Einwirkung der Salzsäure eine ganz andere sein, als wenn — die von Liebig vertretene Ansicht — die Essigbildung stets nur ein rein chemischer Vorgang ist. Später wurden diese Pasteur'schen Theorien von Adolf Mayer weiter ausgebaut, welcher auf Grund seiner Versuche (Störung der Essigsäurebildung durch Steigerung des Alkoholgehaltes oder geringes Ueberschreiten des Temperatur-Optimum) zu dem Schlusse kommt:

„Kurz, ich stehe nicht an, die Auffassung der Essiggährung, als wesentlich identisch mit dem Gesamtstoffwechsel jener kleinen Organismen, als die natürlichste zu bezeichnen.“

Was die Morphologie des *Bacterium aceti* anbetrifft, so präsentirt es sich nach den Untersuchungen von Hansen und von Zopf in sehr verschiedenen Formen: 1) *Micrococcus*form, 2) die

Kurzstäbchenform, 3) die Längsstäbchenform, 4) die Leptothrixform; welche sämmtlich Zoogloebildung eingehen können; er hat die Eigenschaft, mit Jod gelb gefärbt zu werden, während das *Mycoderma Pasteurianum*, welches ebenfalls die Essiggärung einzuleiten im Stande ist, mit Jodlösung eine blaue Farbe annimmt. Am besten gedeiht er bei einer Temperatur zwischen 30—34° in einem Nährsubstrate, welches bereits freie Essigsäure enthält. Der zu den Sprosspilzen gehörende Kahmpilz *Saccharomyces Mycoderma* hat mit der eigentlichen Essiggärung nichts zu thun; nach Nägeli soll er dem *Bacterium aceti* durch Verzehung der vorhandenen Fruchtsäuren den Boden vorbereiten.

Bei der Anstellung der Essiggährungsversuche verfahren wir in Bezug auf Sterilisation und Zusammensetzung des Nährsubstrates in ähnlicher Weise, wie bei den Milchsäureversuchen. In einem Kolben sterilisirt

2000 ccm Wasser
20 gr Pepton
1,6 gr Magnesiumsulfat
0,5 gr Calciumchlorid
4 gr¹⁾ Kaliumbiphosphat.

Auch hier gelangte das phosphorsaure Salz in der verschiedensten Weise und Menge zur Verwendung. Nachdem die Nährflüssigkeit in die einzelnen Kolben zu je 100 ccm vertheilt worden war, worauf dabei gesehen wurde, dass im Allgemeinen die Flüssigkeitsoberfläche überall eine gleich grosse war, wurden zu jedem Glase 5 ccm eines 96 proc. Feinsprites hinzugesetzt, und dann die Salzsäure und das Pepsin, wie es eben die einzelnen Versuche erforderten. Titirt wurde mit Normalnatronlösung und Zehntelnormallösung.

Der Umschlag der Reaction wurde durch den ersten blauen Streifen auf empfindlichem Lakmuspapier als eingetreten angesehen.

Die Impfflüssigkeit wurde auf folgende Weise bereitet. Gewöhnliches Lagerbier von einem Alcoholgehalt von ungefähr 4—5 Proc. wurde in einem Becherglase im Brütoven bei einer Temperatur von 32—34° unbedeckt mehrere Tage stehen gelassen.

1) Abweichungen von der Phosphatmenge bei den einzelnen Versuchsreihen angegeben.

Nach Verlauf von 3 Tagen hat sich eine dünne weisse Decke gebildet, welche sich bei der mikroskopischen Untersuchung als aus *Bacillus aceticus* bestehend, sowohl durch seine Form als durch die charakteristische Gelbfärbung mit Jod auswies. Indessen die mikroskopische Untersuchung wäre nicht einmal nöthig gewesen, da allein schon der starke Geruch nach Essigsäure den Vorgang zu erklären im Stande war. Von diesem ursprünglich sauer gewordenen Bier wurden 100 ccm der angegebenen Nährlösung in einem Becherglase weiter inficirt, und zum schnelleren Wachsthum des *Mycoderma* 2 ccm Eisessig aus der Bürette zufließen gelassen und dann zwischen 30—34° in den Brütöfen hingestellt. Schon nach 2 Tagen hatte sich eine deutliche Essigmutter gebildet, die sich bei der mikroskopischen Untersuchung als lediglich aus den Essigsäurebacillen bestehend erwies. Diese Flüssigkeit wurde nun zur Inficirung der Nährkolben in der Weise benutzt, dass die Essigmutter gehörig mit einem Glasstabe mit der darunter stehenden Flüssigkeit verrührt wurde, und dann von diesem Gemenge, nachdem es rasch in die Bürette gegossen war, damit keine Trennung in Schichten wieder stattfände, bei den ersten Versuchen je 2, bei den späteren Reihen nur immer je 1 ccm in den Versuchskolben hineinlaufen gelassen.

Diese so inficirten Flüssigkeiten werden im Wasserbade oder in dem Brütöfen, dessen Temperatur auf 28—32° regulirt ist, der Gährung überlassen.

Bei diesen Versuchsreihen konnte man, auch wenn man nicht sehr scrupulös verfuhr, vor einer Verunreinigung mit anderen Mikroorganismen ziemlich sicher sein. Denn kein anderer Pilz ist im Stande, bei der stark sauren (essigsäuren) Reaction, bei welcher der *Bacillus aceticus* am besten gedeiht, überhaupt nur fortzukommen. Ein Zweifel, dass die gebildete Säure Essigsäure sei, konnte hier überhaupt nicht vorliegen. Sie wurde allein durch den Geruch schon nachgewiesen. Eine Bildung von Buttersäure wurde in keinem der Versuche beobachtet. Der durch die Titration ermittelte Säuregrad correspondirte im Allgemeinen mit der Ausbildung der Essigmutter. Eine Beimengung des *Saccharomyces Mycoderma*, welcher die Säuren weiter oxydirt, dessen Vorhandensein natürlich jedes Titrationsergebniss illusorisch gemacht hätte, brauchte schon deshalb nicht gefürchtet zu werden, weil dieser bei einer Temperatur über von 26° seine Wirksamkeit nicht

mehr entfalten kann. In einzelnen Fällen wurden Controllproben, denen weder von dem sauren Magensaft noch von der Salzsäure etwas zugesetzt war, abdestillirt, das Destillat mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ übersättigt, der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure als Baryumcarbonat niedergeschlagen, filtrirt und mit Schwefelsäure versetzt, bis keine Ausfällung von Baryumsulfat mehr stattfand. Der gesammelte Niederschlag von schwefelsaurem Baryt wurde getrocknet und gewogen, und daraus die Menge der Essigsäure berechnet.

Dadurch, dass wir die Anzahl der zu 100 ccm zugesetzten 1 proc. Chlorwasserstoffsäure mit dem Procentgehalt am Hundertstel Procent einfach identificiren, begehen wir einen Fehler, da ja die Flüssigkeit durch die hinzugesetzte Salzsäure noch mehr verdünnt wird. In der That ist also der Salzsäuregehalt stets um ein wenig geringer, als die Anzahl der hinzugesetzten und in der Tabelle angegebenen Cubikcentimeter beträgt. Wenn wir nichtsdestoweniger dabei geblieben sind, so geschah dies nur der Uebersichtlichkeit und der leichteren Berechnung wegen.

Die Flüssigkeit, von welcher abgeimpft wurde, wurde titirt. Bei jeder einzelnen Versuchsreihe ist der gefundene Säuregrad, hinzuaddirt zu dem bereits vorhandenen, als „Vorhandene Acidität“ angegeben.

Es ist nothwendig, die Essiggährungsversuche über eine längere Zeit fortzusetzen, da sonst die gebildeten Werthe zu klein sind, und kein deutliches Resultat ergeben, weshalb wir eine Reihe von Versuchen, die mit Curcumapapier titirt waren und wo die Beobachtungszeit eine unzureichende war, erst gar nicht mehr erwähnt haben.

Essigsäuregährung.

I.

Zeit der Einwirkung 48 Stunden. Nährsalz $0,2 \text{ KH}_2\text{PO}_4$. Vorhandene Acidität = 2,4 Normal-Lauge. Titration mit $\frac{1}{10}$ Normallösung ausgeführt. Zahlen beziehen sich auf Normallösung.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	3,2	2,4	0,8	0,048
5	12,5	3,8	8,7	0,522
10	5,1	5,2	0,0	0,000
15	6,2	6,6	0,0	0,000
20	7,5	7,9	0,0	0,000
25	9,3	9,3	0,0	0,000
30	10,7	10,7	0,0	0,000
35	12,0	12,0	0,0	0,000

II.

Dieselben Verhältnisse wie bei I. Indessen ist Pepsin hinzugesetzt.

Vorhandene Acidität = 2,5 Normal-Lauge.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	3,0	2,5	0,5	0,03
5	5,3	3,9	1,4	0,084
10	4,8	5,2	— 0,4	0,000
15	6,6	6,6	0,0	0,000
20	4,5	7,9	0,0	0,000
25	9,0	9,3	0,0	0,000
30	10,6	10,7	0,0	0,000
35	12,2	12,1	0,0	0,000

III.

Zeit der Einwirkung 3 Tage. Nährsalz 0,1 % K_2HPO_4 . Vorhandene Acidität = 1,1 Normal-Lauge. Titration mit Normal-Lauge ausgeführt.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	22	1,11	20,9	1,254
1	26,5	1,4	25,1	1,506
2	26,5	1,7	24,8	1,488
4	29	2,2	26,8	1,608
5	24	2,5	21,5	1,290
6	22	2,8	19,2	1,152
3	24	2,0	22	1,320

IV.

Dieselben Verhältnisse wie bei III. Ausserdem Pepsinzusatz.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	24,5	1,1	23,4	1,404
1	26	1,4	24,6	1,476
2	21	1,7	19,3	1,158
3	14	2,0	12	0,72
4	21	2,2	18,8	1,128
5	20	2,5	17,5	1,050
6	16,5	2,8	13,7	0,822

V.

Dieselben Verhältnisse wie vorhin. Variirung des Pepsinzusatzes.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
3 P 4	19	2,3	16,7	1,002
4 P 5	19	2,6	16,4	0,984
4 P 6	23	2,9	20,1	1,206

VI.

Zeit der Einwirkung 3 Tage. Nährmaterial 5 cbcm einer 1 % KH_2PO_4 -Lösung = 0,05 % KH_2PO_4 . Vorhandene Acidität = 0,9 Pepsinzusatz. Titration mit Normallösung bei den 3 letzten Versuchen $\frac{1}{10}$ Normallösung, da in denselben keine Bildung von Essigmutter.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	24	0,9	23,1	1,384
1	26	1,2	24,8	1,488
3	25,5	1,7	23,8	1,428
5	17	2,3	14,7	0,882
7	3,3	2,9	0,4	0,002
9	3,5	3,4	0,1	0,001
11	4,0	4,0	0,0	0,000

VII.

Dieselben Verhältnisse wie in VI. Nährsalz 5 cbcm einer 1 % Dikaliumphosphatlösung = 0,05 % K_2HPO_4 . Vorhandene Acidität = 0,7. Auch hier in den 3 letzten Versuchen keine Bildung von Essigmutter.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	21,5	0,7	20,8	1,248
1	28	1,0	27	1,620
3	24	1,6	22,4	1,344
5	16,5	2,1	14,4	0,864
7	3,1	2,7	0,4	0,002
9	3,6	3,2	0,4	0,001
11	3,8	3,8	0,0	0,000

VIII.

Zeit der Einwirkung 3 Tage. Nährsalz 5 cbcm 1 % K_2HPO_4 -Lösung = 0,05 % K_2HPO_4 . Zusatz Pepsin und H_3PO_4 , aber keine Salzsäure. Vorhandene Acidität = 0,7 KOH.

Phosphors. in cbcm 1 %	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0		0,7		
2,5	28	1,4	26,6	1,596
5,0	19	2,9	16,1	0,966
1,0	4,2	4,4	— 0,2	0,000
1,5	5,4	5,8	— 0,4	0,000
2,0	Neutralisirt mit 7 KOH		Keine Titration, da keine Spur von Essigmutter.	
2,5				
3,0				

IX.

Die 3 letzten Versuchskolben von VI, neutralisirt, werden weitere 3 Tage der Gährung überlassen.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
7	16,5	0	16,5	0,60
9	7	0	7,0	0,42
11	10	0	10	0,60

X.

Die 3 letzten Versuchskolben von VII werden neutralisirt der Gährung überlassen. 3 Tage.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
7	14	0,0	14	0,84
9	16	0,0	16	0,96
11	8,5	0,0	8,5	0,51

XI.

Die 5 letzten Versuche von VIII werden neutralisirt der Gährung überlassen. 3 Tage.

Ph. S.	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
1,0	12	0,0	12	0,72
1,5	4,5	0,0	4,5	0,27
2,0	5,5	0,0	5,5	0,33
2,5	3,5	0,0	3,5	0,21
3,0	0,0	0,0	0,0	0,00

XII.

Zeit der Einwirkung $3\frac{1}{2}$ Tage. Nährsubstrat $0,2 \text{ KH}_2\text{PO}_4$. Vorhandene Acidität = 1,2 KOH. Kein Pepsinzusatz.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	16	1,2	14,8	0,888
1	16	1,5	14,5	0,870
2	29	1,8	27,2	1,632
3	23	2,0	21,0	1,260
5	3	2,6	0,4	0,002
6	3,2	2,9	0,3	0,002
7	3,4	3,2	0,22	0,001

XIII.

Dieselben Verhältnisse wie vorher. Pepsinzusatz. Vorhandene Acidität
= 1,3 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	26	1,3	24,7	1,482
1	30	1,6	28,4	1,704
3	27	2,1	26,9	1,614
5	7,2	2,7	4,5	0,270
6	3,1	3,0	0,1	0,001

XIV.

Dieselben Verhältnisse wie in XIII. Vorhandene Phosphatmenge = 0,4 %
 KH_2PO_4 . Vorhandene Acidität = 1,7 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0	33	1,7	31,3	1,818
1	32	2,0	30,0	1,800
2	30	2,2	27,8	1,668
3	31	2,5	28,5	1,710
4	23	3,0	20	1,200
7	3,6	3,6	0,0	0,000
10	4,3	4,4	— 0,1	0,000

XV.

Zeit der Einwirkung 4 Tage. Nährsubstrat 0,025 % H_3PO_4 . Zusatz Salzsäure
und Pepsin. Vorhandene Acidität = 1,4 KOH.

HCl	KOH	V. S.	G. S.	E. S.
0,25	17,5	1,5	16	0,96
0,50	16	1,5	14,5	0,84
0,75	16	1,6	14,4	0,86
1,00	22	1,7	20,3	1,218
2		Neutralisirt mit 2 KOH, da keine Essigmutter.		
6	10	2,2	7,8	0,468
6		Neutralisirt mit 2 KOH, da keine Essigmutter.		
0	21	1,4	19,6	1,176

XVI.

Versuch 2 und 6 von XV wurden neutralisirt der weiteren Gährung
überlassen. In beiden hatten sich nach einigen Tagen Essigmuttern gebildet,
in Versuch 2 aber $1\frac{1}{2}$ Tage eher, wie in Versuch 6 und viel stärker, als in
letzterem. Beide Flüssigkeiten gelangten nicht zur Titration.

Erläuterung zu den Tabellen.

Die Zahlenangaben beziehen sich bei den Milchsäureversuchen auf $\frac{1}{10}$ Normal-Lauge; bei der Essiggährung auf Normal-Lauge.

Wo sich in den Reihen Lücken befinden, ist der Versuch zwar angestellt, aber nicht, weil verunglückt, zu Ende geführt worden.

Die Versuchsreihen, welche die Ueberschrift tragen: „Dieselben Verhältnisse wie vorher“ sind von derselben Impfflüssigkeit inficirt.

Die erste Columnne enthält die zugesetzte Salzsäure in Hundertstel-Procent. Wo weniger wie 0,01% HCl zugesetzt, wurde eine 0,25 proc. Salzsäure in die Versuchskolben zufließen gelassen. Die zwei Controllreihen mit Phosphorsäure verstehen sich bei der Essiggährung auf Hundertstel, bei der Milchzucker-Gährung auf Vierzigstel-Procent.

Die zweite Columnne = KOH enthält die bei der Titration gefundene, zur Neutralisation erforderliche Menge ccm der Normal-lösung bei der Essiggährung, der Zehntelnormallauge bei der Milchsäuregährung.

Die dritte Columnne = V. S. bezeichnet die vorhandene Säure bei der Essiggährung in Normal-, bei der Milchsäuregährung in Zehntelnormal-Lauge.

Die vierte Columnne = G. S. enthält die Differenz der correspondirenden Werthe der zweiten und dritten Reihe.

Die fünfte Columnne = M. S. bzw. E. S. ergiebt die herausgerechnete Menge Milchsäure bzw. Essigsäure.

Bei der Besprechung der Resultate sind zu kleine Werthe, die in den Tabellen noch angegeben waren, vernachlässigt werden.

Die Nährlösung der Milchsäureversuche mit saurer Milch enthielt 1% Pepton, 0,025 CaCl₂, 0,08 MgSO₄ und verschiedene Mengen von Phosphaten, bei den einzelnen Reihen angegeben.

In den Fällen, in welchen Phosphorsäure als Nährsubstrat benutzt wurde, war dieselbe wie folgt zusammengesetzt: 1% Pepton, 0,025 % CaCl₂, 0,05 % MgSO₄, 0,05 % K₂SO₄ und 0,05 % KCl und 0,025 % H₃PO₄.

Die durch diese Versuchsreihen ermittelten Resultate lassen sich in Kurzem in folgende allgemeine Sätze zusammenfassen.

1) Wenn man in ein, passend gewähltes, schwach essigsäures Nährsubstrat, welches 5 Proc. Alkohol enthält, Reinkulturen des *Bac. aceticus* überimpft, so wird aus dem Alkohol Essigsäure gebildet. Die durchschnittlich so erhaltenen Säuremengen sind in

2 Tagen 0,5 Essigsäure,

3 „ 1,0—1,2 Essigsäure.

Die Menge der dabei gebildeten Säure ist verschieden, je nach dem ursprünglichen Gehalt an Essigsäure.

2) Ein geringer Zusatz von Salzsäure bewirkt eine energische Beschleunigung der Oxydation (0,01—0,02 HCl).

3) Mittlere Gaben von Salzsäure wirken ebenfalls verstärkend auf den Gährungsprocess ein, indessen nicht in solchem Grade, wie bei geringer salzsaurer Acidität (0,03—0,04—0,05 HCl).

4) Ein Procentgehalt von 0,06—0,07 HCl hebt den Gährungsvorgang vollständig auf.

5) Pepsin + Chlorwasserstoffsäure wirken in ähnlicher Weise wie die Säure allein. Die schwächere antibacterielle Wirkung der Pepsinsalzsäure tritt nicht immer und in derselben prägnanten Weise hervor, wie bei der Gährung des Milchzuckers.

6) Die Menge und die Natur (d. h. ob einfach oder zweifach saures Salz) der Phosphate hat keinen wesentlichen Einfluss auf den Salzsäuregrad, welcher nothwendig ist, um die Bacterienthätigkeit aufzuheben.

7) Phosphorsäure unterbricht bei einem Procentgehalt von 0,1 die Oxydation des Alkoholes.

8) Diejenige Menge von Salzsäure, welche nothwendig ist, um eine vollständige Aufhebung des Gährungsprocesses herbeizuführen, reicht nicht hin, die Bacterien abzutöden. Denn neutralisirt man die zugesetzte Säure, so tritt Gährung ein, allerdings in progressiver Abschwächung. Bei einem Pepsinsalzsäuregehalt von 0,12 Proc. sind die Bacterien definitiv abgetödet.

9) Benutzt man anstatt der Phosphate 0,025 dreibasische Phosphorsäure als Nährsubstrat, so finden wir, dass bei 0,06 Proc. Salzsäure der Gährungsprocess sistirt ist. Nach der Neutralisation geht er aber auch hier weiter.

So weit die thatsächlichen Ergebnisse. Bei der Betrachtung derselben fällt uns vor allem auf, dass die prägnante schwächere

Wirkung der Pepsinsalzsäure nicht so hervortritt, wie bei der Milchsäuregährung. Dies hat seinen Grund wohl darin, dass bei der Essiggährung sehr viel mechanische Verhältnisse mitspielen (Struktur, Grösse der Mycodermahaut, welche sich nach so viel äusseren Umständen richten, dass naturgemäss unter sonst gleichen Verhältnissen ganz gleiche Resultate sich nicht immer erzielen lassen. Die Grösse der oxydirenden Oberfläche war ja im allgemeinen bei allen Gefässen dieselbe, indessen ein geringes Anstossen genügte z. B., wie ich mich in einer Reihe von Einzelversuchen überzeugte, die bewegten Gläser gegenüber den unbewegten zu benachtheiligen.

Eine andere Erklärung wäre die, dass eine ähnliche Verbindung wie zwischen Pepsin und Salzsäure zwischen Pepsin und Essigsäure existire, was ja nicht so unwahrscheinlich ist, da die beiden letzteren Agentien ebenfalls eine verdauende Wirkung zu entfalten im Stande sind. Dann müsste man annehmen, dass in unseren Versuchen das Pepsin an die gebildete Essigsäure geht, so dass freie Salzsäure zur Wirkung kommt. Schliesslich muss man noch bedenken, dass durch das Hinzufügen des sauren Pepsin-extractes (0,12) eine, allerdings geringe, Steigerung des Säuregrades (bei 2 ccm circa 0,002) thatsächlich herbeigeführt wird ¹⁾.

Dass geringe Gaben Salzsäure befördernd auf die Essiggährung einwirken, ist durchaus nicht verwunderlich. Es correspondirt mit dem Verhalten des *Bac. aceticus* gegen Essigsäure, das in Nr. 1 constatirt worden ist.

Da es im wesentlichen gleichgültig ist, ob man dieselbe Menge Menophosphat oder Diphosphat als Nährsalz benützt, da ferner eine Variirung der Menge dieser Salze ebenfalls ohne Einfluss bleibt, so erscheint der Schluss gerechtfertigt, dass eine Umsetzung zwischen der Salzsäure und den Phosphaten bei diesen Versuchen nicht erfolgt ist. Wenn man die reine Salzsäurewirkung studirt, indem man Phosphorsäure als Nährsubstrat benutzt, so ergeben sich nur geringe Unterschiede gegen die Wirkung der Chlorwasserstoffsäure bei der Anwesenheit von phosphorsauren Salzen.

Die Frage, ob die durch diese Versuche erhaltenen Resultate

1) Der Grad der zugefügten Säure ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

sich auf die Essiggährung im Magen übertragen lassen, muss entschieden verneint werden. Denn diese Versuche sind angestellt bei einer Temperatur unter 35° . Wenn wir aber unsere Culturen circa 15 Minuten bei $38-40^{\circ}$ hielten, so erwiesen sich dieselben zur Impfung in einzelnen Fällen als unwirksam. Blieben die Versuchskolben ständig bei Körpertemperatur, so war in keinem Falle Essigsäure gebildet worden.

Die Vergährung des Alkoholes zu Essigsäure durch das *Mycoderma aceti* s. *Bacillus aceticus* findet also im Magen nicht statt. Wo die Essiggährung trotzdem auftritt, muss sie durch andere Organismen bewirkt werden, und an solchen hat es auch in der That keinen Mangel.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, zu erwähnen, dass ein seit 7 Wochen bis heute fortgeführter Versuch, mit einem Procentgehalt von Pepsin $\text{HCl} = 0,1$ und $0,15$, bis jetzt noch eine ganz klare Nährlösung zeigt, an welcher noch keine Spur einer Essigmutter zu bemerken ist.