

Zur Stereochemie der Milchsäuregärung.

Von

R. O. Herzog und F. Hörth.¹⁾

(Aus dem chemischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe.

Der Redaktion zugegangen am 19. April 1909.)

Nach dem Nachweis, daß die Milchsäuregärung ein vom Leben der Gärungserreger trennbarer Vorgang ist, erscheint die Frage nach der stereochemischen Beziehung zwischen Enzym, Gärsubstrat und Gärprodukt naheliegend.

Man hat das Vorkommen sowohl der Rechts- wie der Linksmodifikation als Gärungsmilchsäure nachgewiesen,²⁾ ist aber, wie es scheint, zumeist der Ansicht, daß sich am häufigsten die inaktive Form bildet. Dazu ist aber zu bemerken, daß die Milchsäure erstens nur sehr schwaches Drehungsvermögen besitzt, so daß insbesondere kleine Mengen der aktiven Säure bei der gewöhnlichen Methode der Untersuchung leicht übersehen werden können, und daß zweitens die leichte Umwandelbarkeit in Lactid Schwierigkeiten hervorruft.

Nach den bisher erzielten Ergebnissen erscheint die aufgeworfene Frage kompliziert. Systematische Arbeiten haben Harden,³⁾ Kayser,⁴⁾ Péré⁵⁾ und Pottevin⁶⁾ geliefert.

¹⁾ Vgl. F. Hörth, Versuche zur Erkenntnis der Milchsäuregärung. Dissertation. Karlsruhe 1909.

²⁾ Das Vorkommen verschiedenartiger Milchsäure war bereits Liebig, Engelhardt und Strecker bekannt. Weiter haben sich Hilger (Liebig's Ann., Bd. CLX, S. 336 [1871]), Maly (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. VII, S. 1567 [1874]; vgl. auch Jahresber. f. Tierchem., 1874, S. 85), Nencki und Sieber (Monatsh. f. Chem., Bd. X, S. 532 [1889]), Schardinger (das., Bd. XI, S. 545 [1890]) u. a. mit dieser Frage beschäftigt.

³⁾ Proc. chem. Soc., Bd. XVII, S. 57 (1901).

⁴⁾ Ann. Pasteur, Bd. VIII, S. 736 (1894).

⁵⁾ Das., Bd. VII, S. 737 (1893).

⁶⁾ Das., Bd. XII, S. 49 (1898). — Vgl. auch die Zusammenstellung von H. Weigmann in Lafars Handb. d. Techn. Mykologie. Bd. II. Das. auch weitere Angaben.

Harden hat festgestellt, daß meistens nur ein mehr oder weniger großer Teil der gebildeten Milchsäure optisch aktiv ist. Die genannten französischen Forscher haben gefunden, daß auf die Natur des Gärproduktes die der Nährlösung, auch das Vorhandensein gewisser Stoffe in derselben, sowie die Temperatur von entscheidendem Einfluß sei. Kayser¹⁾ beobachtete die Bildung verschiedener Modifikationen der Milchsäure aus verschiedenen Gärsubstraten bei Gegenwart einer Art von Gärungserregern, aber auch verschiedener Milchsäuren aus demselben Gärsubstrat mit einem Erreger (je nach äußeren Bedingungen). Péré²⁾ fand dagegen Abhängigkeit vom Substrat. Zur richtigen Beurteilung dieser Resultate muß man sich aber daran erinnern, daß die Colibakterien, mit welchen alle die zitierten Versuche angestellt sind, sowohl wegen ihrer chemischen Vielseitigkeit als auch wegen der Möglichkeit, daß man mit morphologisch verwandten, aber physiologisch differierenden Mischungen arbeitet, ein ungünstiges Versuchsobjekt vorstellen.

Daher haben wir uns bemüht, neues experimentelles Material in der angegebenen Richtung herbeizuschaffen. Zu diesem Zwecke wurden verschiedene Arten von Milchsäurebakterien unter den gleichen Lebensbedingungen (also: identische Nährlösung, Temperatur usw.) auf verschiedene Gärsubstrate wirken gelassen. Bei der schwierigen Zugänglichkeit gewisser Zuckerarten und verwandter Stoffe, die als Gärsubstrat dienten, konnte in solchen Fällen eventuell nur qualitativ die Bildung von Säure konstatiert werden. Wo aber genügend Material vorhanden war, wurde nach Ablauf der Gärung festgestellt, wieviel und welche Form von Milchsäure gebildet war (auch auf den qualitativen Nachweis der Säure wurde Gewicht gelegt), ferner wurde die Menge des verarbeiteten Gärsubstrates bestimmt.

An Reinkulturen von Milchsäurebakterien standen etwa 20 Arten, die zumeist von Král (Prag) stammten, zur Verfügung. Nach öfterem Überimpfen erwiesen sich endlich nur

¹⁾ Proc. chem. soc., Bd. XVII. S. 57 (1901).

²⁾ Das., Bd. XII. S. 63 (1898).

Milchsäure. Bestand das Substrat aus Kohlenhydraten, so wurde in einem dritten Teil der vergorenen Lösung ihre nicht verbrauchte Menge analysiert. Zur Feststellung, wieviel an Substrat ursprünglich vorhanden war, sowie zur Bestimmung einer kleinen Menge extrahierbarer, aus dem Fleische stammender Säure dienten ungeimpfte Lösungen, die parallel zu den geimpften hergestellt worden waren.

In den Fällen, wo nur 80 ccm Nährlösung vorhanden war, wurde von der Extraktion und Polarisation abgesehen. Bei Mannose und den Pentosen wurde aber der Restzucker analysiert.

Die Zuckerbestimmungen wurden nach Kjeldahl¹⁾ ausgeführt. Dies war ohne weiteres bei den Dextrose-, Fruktose- und Galaktoselösungen möglich. Bei den Biosen wurde vorgezogen, zuerst zu invertieren, da sowohl durch Fermente der Gärungserreger wie durch die vorhandene Säuerung der Eintritt einer unkontrollierbaren Hydrolyse möglich war. Für Invertzucker liegen Tabellen von Kjeldahl vor. Für das Hydrolysenprodukt des Milchzuckers sowie für Mannose, Arabinose und Xylose wurden neue berechnet (vgl. die folgende Mitteilung). — Fremdstoffe aus der Bouillon hatten keinen Einfluß auf die Zuckerbestimmung, wie nachgewiesen wurde.

Analyse der Milchsäure. Die Lösungen wurden auf dem Wasserbad (eventuell, um Verflüchtigung der Säure zu vermeiden, nach Neutralisation) eingeengt, mit etwa $\frac{1}{10}$ des Volumens 50%iger Schwefelsäure versetzt und im Extraktionsapparat nach Schacherl 24 Stunden extrahiert. Wie wir uns mehrfach überzeugt haben, ist diese Erschöpfung quantitativ.

Zum Beleg mögen folgende Versuche dienen: Je 500 ccm einer ungefähr $\frac{1}{20}$ -, $\frac{1}{50}$ - und $\frac{1}{100}$ -normalen Milchsäure werden etwa auf $\frac{1}{10}$ des Volumens eingeengt und weiter behandelt, wie oben angegeben.

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Ch., Bd. XXXV, S. 344 (1896). — Hydrolyse des Rohrzuckers: Meissl, Zeitschr. d. Ver. d. D. Zuckerind., Bd. XXIX, S. 1034. Preuss. das., Bd. XXXVIII, S. 722. Hydrolyse der Maltose: Meissl, Zeitschr. f. anal. Ch., Bd. XXII, S. 215. Milchzucker: Ost, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXIII, S. 3006.

Angewandte Milchsäurelösung	Vor der Extraktion verbrauchen 20 ccm an ccm $\frac{1}{20}$ -normal-NaOH	Nach der Extraktion verbrauchen 20 ccm an ccm $\frac{1}{20}$ -normal-NaOH
ca. $\frac{1}{20}$ -norm.	19,3	19,4
> $\frac{1}{50}$ - >	7,6	7,5
> $\frac{1}{100}$ - >	4,8	4,7

Die ungeimpfte Nährlösung gab eine kleine Menge Säure an Äther ab, die jeweils von der Gesamtmenge abgezogen wurde.

Fast bei jedem Versuch wurde auch qualitativ auf das Vorhandensein von Milchsäure geprüft. Dazu diente die von einem von uns angegebene Methode.¹⁾ Die wässrige Lösung wird mit ebensoviel Silbercarbonat versetzt, als zur Neutralisation nötig ist, und eingedampft. Das ausgeschiedene Silber-salz wird in einem Reagenzglas mit etwas alkoholischer Jod-lösung erhitzt und die Reaktionsprodukte (Acetaldehyd und Kohlensäure) durch ein Knierohr in ein zweites Reagenzglas mit einer Spur Wasser geleitet. Hier wird Aldehyd mittels wenig Nitroprussidnatrium und etwas Piperidin nachgewiesen: es entsteht eine blaue Färbung, die auf Zusatz von einer Spur Natronlauge nacheinander violett, rot und gelb wird.

Der größte Teil der mit Äther extrahierten und wieder mit Wasser aufgenommenen Milchsäure diente zur Bestimmung ihrer optischen Aktivität. Zu diesem Zwecke wurde das 10 mal mehr als die freie Säure drehende Lithiumsalz angewendet. Die milchsaure Lösung wurde so lange mit dem (ziemlich schwer löslichen) Lithiumcarbonat versetzt, bis nichts mehr in Lösung ging, und nach Filtration polarisiert.²⁾

Zur Berechnung wurden aus reiner, nach J. C. Irvines³⁾ hergestellter Linksmilchsäure, bei verschiedenen Konzentrationen nach angegebener Weise Lithiumsalze hergestellt und ihre Drehung bestimmt.

¹⁾ R. O. Herzog, Liebigs Ann., Bd. CCCLI, S. 263.

²⁾ Das Salz dreht das polarisierte Licht in entgegengesetzter Richtung wie die freie Säure.

³⁾ Journ. of the chem. Soc., Bd. LXXXIX, II., S. 935 (1906).

Die folgende Tabelle gibt die Resultate wieder.

Linksmilch- säure in g pro 100 ccm	Menge des Lithium- salzes in g pro 100 ccm	Drehungs- winkel im 2 dm-Rohr	Aktive Milchsäure berechnet	Differenz zwischen ange- wandter und berechneter Säuremenge
5,390	5,751	+ 1,47 °	5,480	— 0,070
4,312	4,601	+ 1,18 °	4,288	+ 0,024
3,593	3,833	+ 1,01 °	3,619	— 0,026
2,695	2,875	+ 0,77 °	2,703	+ 0,008
1,796	1,916	+ 0,52 °	1,787	+ 0,009
0,980	1,045	+ 0,28 °	0,842	+ 0,038
0,513	0,547	+ 0,16 °	0,532	— 0,019
0,1256	0,230	+ 0,05 °	0,165	+ 0,050

Diese Daten werden zur Berechnung der Gleichung $c = 3,28 \alpha + 0,3 \alpha^2$ verwendet, in der c die Anzahl der in 100 ccm gelösten g-freien Milchsäure und α den Drehungswinkel des Lithiumsalzes (nach der gegebenen Vorschrift hergestellt, in 2 dm-Rohr abgelesen) bedeutet. Die 4. Kolonne der obigen Tabelle enthält die für die abgelesenen Winkel berechnete Säuremenge, die 5. die Differenz zwischen der beobachteten und berechneten Säuremenge. Man sieht, daß die Differenzen innerhalb der Beobachtungsfehler liegen. Die obige Gleichung konnte also zur Berechnung der Menge an optisch aktiver Milchsäure verwendet werden. <

Die folgenden Tabellen geben die direkt erhaltenen Versuchsdaten wieder.

Da die ursprünglichen, ungeimpften Nährlösungen, wie erwähnt, nach Ansäuerung mit Schwefelsäure, eine gewisse kleine Menge Säure an Äther abgeben, ist diese Menge für jede Art Nährlösung in mehreren parallelen Versuchen bestimmt worden. Die Menge entspricht meistens der Differenz, die man findet, wenn die durch die Gärung gesäuerte Nährlösung direkt und den wieder in Wasser aufgenommenen Ätherextrakt titriert (natürlich stets auf dasselbe Volumen bezogen). Mitunter — be-

sonders bei den Versuchen mit *Bac. Wehmeri* und *Bac. brass. ferm.* — finden sich aber größere Differenzen, die auf die Bildung von Nebenprodukten bei der Gärung zurückzuführen sind.

Die mit Äther erschöpften Nährlösungen gaben an das Extraktionsmittel eine kleine Menge von optisch aktiven Stoffen ab, deren Drehung auf folgende Weise bestimmt wurde. Nicht geimpfte Nährlösungen wurden auf 500 ccm aufgefüllt, davon 400 ccm eingedampft, extrahiert und nach dem Abdestillieren des Äthers das Extrakt in Wasser aufgenommen, auf das Volumen von 50 ccm gebracht, mit Lithiumcarbonat versetzt und polarisiert. Eine größere Anzahl ergab dabei eine wenig um $0,11^{\circ}$ schwankende Linksdrehung. In den Tabellen ist diese Korrektur bereits angebracht.

Die zunächst mitgeteilten Versuche waren mit 400 ccm Nährlösung angestellt. Für die Analyse wurde auf 500 ccm aufgefüllt. 20 ccm wurden zur Titration verwendet, 400 ccm respektiv 430 ccm bei den Biosen dienten zur Ätherextraktion. Das Extrakt wurde in soviel Wasser aufgenommen, daß das Volumen der zur Polarisation angewandten Flüssigkeit stets 50 ccm betrug. Die Acidität der unvergorenen Nährlösung (mit Äther in saurer Lösung extrahiert) entsprach $3,5$ ccm $1/20$ -normal-NaOH, nur bei Fruktose $5,5$ ccm $1/20$ -normal-NaOH. — Zur Zuckerbestimmung wurden bei Dextrose, Fruktose und Galaktose 30 ccm der auf 500 ccm aufgefüllten Lösung auf 100 ccm verdünnt und von dieser Lösung 30 ccm zur Kjeldahlschen Zuckerbestimmung verwendet. Bei den Rohrzuckerbestimmungen wurden 30 ccm der auf 500 ccm verdünnten Lösung in einem 100 ccm-Meßkolben invertiert und dann bis auf die Marke aufgefüllt, hiervon dienten 30 ccm zur Analyse. Bei Maltose wurden 50 ccm der auf 500 ccm verdünnten Lösung in einem 100 ccm-Meßkolben hydrolysiert, bis zur Marke aufgefüllt, hiervon 30 ccm analysiert. Bei Milchzucker wurden 50 ccm der Nährlösung im 250 ccm-Kolben hydrolysiert, zur Marke aufgefüllt und davon 30 ccm zur Bestimmung benutzt.

Als Gehalt der unvergorenen Lösungen an Substrat wurde durch die Zuckeranalyse gefunden:

Fructose.

	20 ccm der ursprünglichen Lösung verbrauchen an ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH		Drehung des in 50 ccm H_2O gelösten Ätherextraktes	mg Kupfer gefunden
	vor	nach der Extraktion		
1.	14,46	8,00	- 0,21°	116,48
2a.	21,36	6,8	+ 0,15°	Spuren
2b.	21,4	12,5	+ 0,13°	0
3.	26,4	9,5	+ 0,18°	Spuren
4.	20,5	16,0	+ 0,11°	96,8
5.	27,48	19,5	+ 0,11°	70,72
6.	32,2	26,5	- 1,13°	45,56
7.	27,3	23,3	- 0,91°	71,5
8.	7,3	4,5	- 0,10°	134,64
9.	7,2	4,0	0	127,2

Galaktose.

	20 ccm der ursprünglichen Lösung verbrauchen an ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH		Drehung des in 50 ccm H_2O gelösten Ätherextraktes	mg Kupfer gefunden
	vor	nach der Extraktion		
1.	8,77	6,5	- 0,04°	138,72
2.	20,6	11,3	+ 0,11°	63,84
3.	19,3	16,6	+ 0,35°	0
4.	3,5	—	—	158,4
5.	13,8	9,2	+ 0,11°	121,68
6.	23,11	19,3	- 0,86°	86,7
7.	21,8	19,3	- 0,74°	89,6
8.	5,6	3,8	+ 0,11°	138,88
9.	6,0	3,0	+ 0,11°	141,6

Rohrzucker.

	20 ccm der ursprünglichen Lösung verbrauchen an ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH		Drehung des in 50 ccm H ₂ O gelösten Ätherextraktes	mg Kupfer gefunden
	von	nach der Extraktion		
1.	8,9	5,76	— 0,11°	229,1
2.	30,0	15,96	+ 0,27°	0
3.	26,5	20,2	+ 0,29°	Spuren
4a.	18,2	12,56	+ 0,15°	180,48
4b.	15,8	13,40	+ 0,17°	191,2
5.	21,5	17,56	+ 0,13°	175,68
7.	16,62	12,2	— 0,34°	198,08
8.	7,9	3,9	— 0,05°	206,7
9.	7,3	5,48	0	150,24

Maltose.

	20 ccm der ursprünglichen Lösung verbrauchen an ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH		Drehung des in 50 ccm H ₂ O gelösten Ätherextraktes	mg Kupfer gefunden
	vor	nach der Extraktion		
1.	7,96	8,6	— 0,05°	227,2
2.	24,4	20,2	+ 0,25°	0
3.	19,76	18,0	+ 0,17°	Spuren
4.	23,7	20,0	verunglückt	143,5
5.	28,9	27,5	+ 0,14°	109,6
6.	17,0	14,4	— 0,21°	191,5
7.	21,4	16,3	— 0,23°	167,68
8.	7,2	4,0	0°	193,4
9.	6,4	5,6	0°	212,08

Milchzucker.

	20 ccm der ursprünglichen Lösung verbrauchen an ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH		Drehung des in 50 ccm H_2O gelösten Ätherextraktes	mg-Kupfer gefunden
	vor	nach der Extraktion		
1.	3,4	—	—	114,6
2.	15,35	7,4	+ 0,14°	70,0
3.	29,0	25,4	+ 0,21°	0
4.	3,4	—	—	112,2
5.	10,2	7,8	0°	93,8
6.	8,4	5,9	0°	101,7
9.	5,0	1,4	— 0,06°	91,1

Mannit.

Volumen der Nährlösung: 400 ccm; Acidität des Ätherextraktes der ungeimpften Lösung: 3,5 ccm $\frac{1}{20}$ -normal-NaOH. Da es an einer sicheren Methode fehlt, den unveränderten Mannit zurückzubestimmen, wurde bloß die gebildete Säure und ihr Drehungswinkel bestimmt. Zur Prüfung, ob reine Milchsäure vorlag, wurden die Zinksalze hergestellt, deren Menge aber mit der der titrierten Säure nie übereinstimmte, es lag also ein Gemisch von Milchsäure mit einer oder mehreren andern Säuren (vielleicht Essigsäure) vor.

	20 ccm der ursprünglichen Lösung verbrauchen an ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH		Drehung des in 50 ccm H_2O gelösten Ätherextraktes
	vor	nach der Extraktion	
1.	3,5	—	—
2.	28,0	15,9	+ 0,21°
3.	20,9	15,2	+ 0,23°
5.	20,1	17,2	0
6.	14,2	12,5	— 0,64°
7.	14,4	13,1	— 0,61°
9.	3,5	—	—

Mannose.

Volumen der Nährlösung: 80 ccm; auf 100 ccm aufgefüllt, 20 ccm titriert. Auf eine Ätherextraktion mußte bei der kleinen Menge verzichtet werden. Die Acidität der ungeimpften Lösung: 2,30 ccm NaOH. Von der auf 100 ccm aufgefüllten Lösung wurden 50 ccm auf 250 ccm verdünnt und hiervon 30 ccm zur Analyse des Zuckers verwendet. — In 100 ccm der ursprünglichen Lösung waren 1,030 g Mannose enthalten.

	20 ccm der auf 100 ccm aufgefüllten Lösung verbrauchen ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH	mg Kupfer gefunden
1.	4,0	122,4
2.	9,4	69,36
4.	8,9	104,56
5.	10,9	102,0
6.	15,8	87,36
7.	14,5	90,08
9.	4,8	110,0

Arabinose.

Volumen der Nährlösung: 80 ccm; auf 100 ccm aufgefüllt, 20 ccm titriert. Auf Ätherextraktion wie weiterhin wegen der kleinen Mengen verzichtet. Acidität der ungeimpften Lösung: 2,6 ccm $\frac{1}{20}$ -normal-NaOH. Von der auf 100 ccm aufgefüllten Lösung 50 ccm auf 100 ccm aufgefüllt und hier Zuckeranalyse ausgeführt. 100 ccm der ursprünglichen Lösung enthielten 0,512 g Arabinose.

	20 ccm der auf 100 ccm aufgefüllten Lösung verbrauchen ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH	mg Kupfer gefunden
1.	3,9	156,24
2.	24,6	0
3.	22,3	Spuren
4.	3,4	158,88
5.	3,6	157,12
6.	3,4	158,16
7.	0	160

Xylose.

Behandlung wie bei Arabinose. Acidität der ursprünglichen Lösung: 2,40 ccm $\frac{1}{20}$ -normal-NaOH: 100 ccm derselben enthielten 0,494 g Xylose.

Deutliche Säuerung trat nur mit *Bac. brass. ferm.* (3.) ein und zwar verbrauchten 20 ccm der auf 100 ccm verdünnten Lösung 11,40 ccm $\frac{1}{20}$ -normal-NaOH. Die Zuckerbestimmung ergab 120,48 mg Kupfer.

Raffinose und Methylglykosid.

Volumen der ursprünglichen Lösung: 80 ccm; Acidität: 0,83 ccm $\frac{1}{20}$ -normal-NaOH. Gehalt an Gärsubstrat: $\frac{1}{2}$ g. Zur Analyse: Lösung auf 250 ccm verdünnt, hiervon 20 ccm mit $\frac{1}{20}$ -normal-NaOH titriert; weitere Analyse wegen Mangels an Material nicht durchführbar.

	20 ccm der auf 250 ccm verdünnten Raffinoselösung verbrauchen ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH	20 ccm der auf 250 ccm verdünnten Xyloselösung verbrauchen an ccm $\frac{1}{20}$ -norm.-NaOH
1.	1,60	1,48
2.	2,30	5,10
3.	10,2	7,9
4.	1,7	1,92
5.	3,5	2,40
6.	3,1	4,16
7.	1,2	4,70

Dulcitol, Erythrit und Glycerin wurden von keinem der angewandten Gärungserreger zur Säuerung verwendet.

Zur übersichtlichen Darstellung der direkten Versuchsergebnisse dient ihre Anordnung in den folgenden Tabellen. Die erste Vertikalkolonne derselben gibt das zur Nährlösung

zugesetzte Gärsubstrat an; die zweite Kolonne enthält die Substratmenge, die nicht angegriffen wurde, in Prozent der ursprünglich zugesetzten (Substratrest in Prozent): die dritte die Menge an gebildeter Säure, als Milchsäure und in Prozent des angewandten Substrats berechnet (Säure gebildet in Prozent): die vierte die Summe der in der 2. und 3. Kolonne angegebenen Zahlen soll also im normalen Fall 100 betragen (Substratrest + Milchsäure): die fünfte Kolonne gibt die Drehungsrichtung der Milchsäure — also das dem Lithiumsalze entgegengesetzte — an; die letzte Reihe enthält die Menge der aktiven, in Prozenten der gebildeten Säure ausgedrückt (Prozent Milchsäure aktiv).

1. Bacillus Beijerincki.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	37	63	100	d	53
Fruktose	73	20	93	d	48
Galaktose	87	12	99	d	13
Rohrzucker	82	13	95	d	32
Maltose	85	11	96	d	20
Milchzucker	100	0	—	—	—
Mannit	—	0	—	—	—
Mannose	97	3	100	—	—
Arabinose	97	5	102	—	—
Xylose	100	0	—	—	—
Methylglykosid	—	1.5	—	—	—
Raffinose	—	1.6	—	—	—

2. *Bacillus brassicae fermentatae*.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	0	41	41	l	35
Fruktose	0	17	17	l	40
Galaktose	37	27	64	l	18
Rohrzucker	0	37	37	l	30
Maltose	0	51	51	l	21
Milchzucker	61	15	76	l	32
Mannit	—	36	—	l	24
Mannose	53	15	68	—	—
Arabinose	0	97	97	—	—
Xylose	61	41	102	—	—
Methylglykosid	—	9,8	—	—	—
Raffinose	—	3,3	—	—	—

3. *Bacillus Wehmeri*.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	0	49	49	l	27
Fruktose	0	23	23	l	35
Galaktose	0	38	38	l	41
Rohrzucker	0	47	47	l	25
Maltose	0	41	41	l	18
Milchzucker	0	60	60	l	14
Mannit	—	34	—	l	28
Arabinose	0	86	86	—	—
Xylose	100	0	100	—	—
Methylglykosid	—	16	—	—	—
Raffinose	—	21	—	—	—

4. *Bacillus Leichmanni* I.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	41	68	109	1	18
Fruktose	65	37	102	1	13
Galaktose	100	0	100	—	—
Rohrzucker	62	30	92	1	20
Maltose	50	50	100	verunglückt	
Milchzucker	100	0	100	—	—
Mannose	82	14	96	—	—
Arabinose	99	3	102	—	—
Xylose	100	0	100	—	—
Methylglykosid	—	2.4	—	—	—
Raffinose	—	2	—	—	—

5. *Bacillus cucumeris fermentati*.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	36	63	99	1	26
Fruktose	43	48	91	1	10
Galaktose	75	22	97	1	21
Rohrzucker	60	41	101	1	12
Maltose	37	65	102	1	9
Milchzucker	83	16	99	i	0
Mannit	—	37	—	i	0
Mannose	81	19	100	—	—
Arabinose	98	4	102	—	—
Xylose	100	0	100	—	—
Methylglykosid	—	3.5	—	—	—
Raffinose	—	6	—	—	—

6. *Bacterium lactis acidii* aus Preßhefe D.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	0	95	95	d	80
Fruktose	28	65	93	d	86
Galaktose	52	46	98	d	87
Maltose	69	34	103	d	26
Milchzucker	90	11	101	i	0
Mannit	—	24	—	d	110
Mannose	68	38	106	—	—
Arabinose	98	3	101	—	—
Xylose	100	0	100	—	—
Methylglykosid	—	7,5	—	—	—
Raffinose	—	1,6	—	—	—

7. *Bacterium lactis acidii* aus Preßhefe p.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	0	91	91	d	74
Fruktose	44	54	98	d	82
Galaktose	54	44	98	d	78
Rohrzucker	69	30	99	d	46
Maltose	59	41	100	d	25
Mannit	—	24,5	—	d	102
Mannose	70	26	106	—	—
Arabinose	100	0	100	—	—
Xylose	100	0	100	—	—
Methylglykosid	—	8,7	—	—	—
Raffinose	—	0,8	—	—	—

8. *Bacterium lactis acidii* aus Preßhefe a₁.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	84	13	97	d	45
Fruktose	86	4,5	90,5	d	100
Galaktose	87	5	92	l	100
Rohrzucker	73	9	82	d	21
Maltose	68	8	76	i	0

9. *Bacterium lactis acidii* aus Preßhefe g.

	Substrat- rest in %	Säure gebildet in %	Substrat- rest + Milch- säure	Drehungs- richtung	% Milch- säure aktiv
Dextrose	82	12	94	i	0
Fruktose	81	4	85	i	0
Galaktose	89	6	95	l	80
Rohrzucker	50	9	50	i	0
Maltose	78	8	86	i	0
Milchzucker	80	3	83	d	70
Mannit	—	0	—	—	—
Mannose	95	5	100	—	—
Methylglykosid	—	0	—	—	—
Raffinose	—	0	—	—	—

Die Tabellen führen zu folgenden Schlüssen:

1. Sowohl Aldehyd- wie Ketonalkohole, sowie Stoffe mit Alkoholgruppen allein können ein geeignetes Substrat für die Milchsäuregärung abgeben; ferner haben sich, der bisherigen Erfahrung gemäß, Pentosen, Hexosen, Disaccharide und ein Trisaccharid und ein Glykosid als brauchbar erwiesen. Das

Verhalten der Disaccharide macht es höchst wahrscheinlich, daß wie bei der alkoholischen auch bei der Milchsäuregärung dem Zerreißen der Kohlenstoffkette eine Hydrolyse vorangehen muß. So erklärt wohl das Fehlen der Lactase die Unangreifbarkeit des Milchzuckers durch *Bacillus Leichmann I.*, der Dextrose verarbeitet.¹⁾

Welche bestimmte Konfiguration das Substrat besitzen muß, um angegriffen zu werden, kann man bisher wohl nicht sagen.²⁾ Die drei unangegriffenen Stoffe Glycerin, Erythrit und Dulcitol sind optisch inaktiv, die beiden zuletzt genannten durch intramolekulare Kompensation.

In welcher Weise Mannit und die Pentosen zerfallen, ferner ob mitunter gebildete andere Säuren als Milchsäure mit der Gärung direkt zusammenhängen, kann aus den bisherigen Versuchen nicht erschlossen werden.³⁾

2. Die Menge der gefundenen Milchsäure korrespondiert mit der des ursprünglich vorhandenen und der übrig gebliebenen Substrates oftmals in der Weise, daß kein Verlust erfolgt ist. In anderen Fällen, wie bei *B. brass. ferm.* und *B. Wehmer* ist dagegen stets ein Defizit vorhanden. Der erste Fall beweist, daß die optische Aktivität nicht etwa immer so entstanden ist, daß allein inaktive Säure gebildet wurde, von der eine Modifikation oxydiert oder sonst verändert wurde, eine Ansicht, die öfters ausgesprochen wurde.

3. Die entstandene Milchsäure ist in den meisten Fällen optisch aktiv, seltener stellt aber die gesamte Milchsäure einen isolierten Antipoden dar, sondern zumeist ist eine erhebliche Menge inaktiv und nur ein Teil aktiv, wie das auch Harden gefunden hat.

4. Von 2 Fällen abgesehen (*B. lac. ac. a₁* und *B. lac. ac. g*) findet man, daß die optische Aktivität der entstandenen Säure unabhängig vom Substrat ist (sofern dieses nur überhaupt angreifbar ist) und allein von der Natur des Gärungs-

¹⁾ Vgl. aber gerade zu dem Vers. mit *Bac. Leichmann Lafar* Handb. 2. Aufl., Bd. II, S. 92.

²⁾ Vgl. auch Harden, l. c.

³⁾ Es besteht die Absicht, diese Frage weiter zu untersuchen.

erregers abhängt. Eine Art Gärungserreger liefert einen Überschuß von stets derselben optischen Modifikation oder die inaktive Säure allein aus verschiedenen Substraten. Was die angeführten beiden Ausnahmen betrifft, so liegt im Falle des *B. lac. ac. g* die Frage so, daß aus Galaktose die l- und aus Milchsäure die d-Modifikation gebildet worden sein soll, während Dextrose die i-Milchsäure lieferte. Es ist unter diesen Umständen wohl nahezu gewiß, daß es sich um ein Versehen bei der Ablesung eines Drehungswinkels handelte, zumal die fraglichen Winkel sehr klein waren. Auch ist der Gedanke nicht von der Hand zu weisen, daß andere optisch aktive Stoffe kleine Störungen hervorgerufen haben könnten. Ebenso ist bei der sehr großen Anzahl von übereinstimmenden Fällen die Annahme sehr berechtigt, daß auch bei dem zweiten Ausnahmefall (*B. lac. ac. a₁* — Galaktose) ein Versehen vorliegt, da es sich auch wiederum um einen sehr kleinen Winkel handelt. Man darf also wohl annehmen, daß der oben ausgesprochene Satz ohne Einschränkung gilt.

Es fragt sich, wie die gemachten Beobachtungen mit unseren übrigen Kenntnissen von der Enzymwirkung in Übereinstimmung zu bringen sind. Stellt man sich auf den Standpunkt der streng spezifischen Wirkungsweise der Enzyme, so könnte man wohl annehmen, daß sich zwei verschiedene Enzyme in den Pilzen befinden, eines, das die d-, und eines, das die l-Modifikation der Milchsäure bildet. Das, welches schneller wirkt oder reichlicher vorhanden ist, liefert den merkbaren Überschuß der einen Modifikation; ist nur das eine Enzym vorhanden, dann bildet sich die eine Modifikation rein; wirken beide gleichmäßig, dann entsteht i-Milchsäure.

Eine andere mögliche Annahme ist, daß nur ein Enzym vorhanden ist, das sowohl die Bildung der d- wie die der l-Modifikation, aber zumeist verschieden schnell und damit in der Regel einen Überschuß der einen Form veranlaßt; der Unterschied der katalytischen Wirkung kann sogar so groß sein, daß das Maximum an zu bildender Säure schon in der einen Modifikation geliefert ist, bevor eine merkbare Menge der Antipoden noch vorhanden ist. Diese Annahme basiert auf den

Erfahrungen, wie sie auf biologischem Gebiete von H. D. Dakin,¹⁾ A. Mac Kenzie und A. Harden,²⁾ R. O. Herzog und A. Meier³⁾ gemacht wurden, und entspricht völlig der von Bredig und Fajans⁴⁾ an der Hand von quantitativen Messungen entwickelten Theorie der stereochemisch beeinflussten Katalyse. Von der zuerst entwickelten Anschauung hat sie den Vorzug größerer Einfachheit und daher größerer Wahrscheinlichkeit.

Welcher Erklärung man sich aber auch zuneigt, man wird kaum der Annahme entgehen können, daß sich zunächst ein racemischer oder inaktiver Stoff aus dem Gärsubstrat bilden muß, etwa Glycerinaldehyd⁵⁾ oder Dioxyaceton,⁶⁾ Substanzen, aus denen erst weiter die Milchsäure hervorgeht. Natürlich besteht auch die Möglichkeit, an die Mitwirkung mehrerer Enzyme zu denken.

Wir kommen also zu der Auffassung, daß die Form der gebildeten Milchsäure — bis auf ihre Angreifbarkeit durch das Enzym — nicht von der Konfiguration des Substrates, sondern nur von der Natur des Fermentes und der von ihm (und anderen Faktoren) erteilten Reaktionsbeschleunigung abhängt, die ein bei der Umwandlung sich bildendes, höchstwahrscheinlich inaktives oder racemisches Zwischenprodukt erleidet.

¹⁾ Journ. of Physiology, Bd. XXX, S. 253 (1904), Bd. XXXII, S. 199 (1905).

²⁾ Proc. chem. Soc., Bd. XIX, S. 18 (1903).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 57 (1909): Es sei hier auch noch auf folgenden Versuch hingewiesen. Brachte man *Penicillium glaucum* in Bierwürze, der das Ammonsalz von inaktiver Mandelsäure zugesetzt war, zur Entwicklung, so war nach 2 Monaten unter der nicht angegriffenen Säure ein erheblicher Teil linksdrehend. Wurde erst zu den auf Bierwürze gewachsenen Pilzen *i*-mandelsaures Ammon gebracht, so blieb die rechtsdrehende Modiifikation übrig.

⁴⁾ Ber. d. D. chem. Ges., Bd. XXXXI, S. 752 (1908).

⁵⁾ Wohl u. Oesterlein, das., Bd. XXXIV, S. 1139 (1901), ferner Bd. XXXIII, S. 3093 (1900), vgl. auch Nef, Ann. d. Chem., Bd. CCCXXXV, S. 254.

⁶⁾ P. Boysen-Jensen, Ber. d. D. bot. Ges., Bd. XXVIa, S. 666 (1908).