

# Über die Einwirkung von Natriumphosphat auf die Milchsäuregärung.

Von

Hans Euler und Olof Svanberg.

Mit fünf Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. Mai 1917.)

Die Überlegung, welche den hier mitzuteilenden Versuchen zugrunde liegt, war die folgende: Trotzdem ein direkter, einwandfreier Beweis noch nicht gelungen ist, daß Milchsäure ein Zwischenprodukt bei der alkoholischen Gärung bildet, so kann diese früher von Buchner und Meisenheimer<sup>1)</sup> und von Wohl vertretene Annahme keineswegs als ausgeschlossen betrachtet werden, sondern verdient eine erneute, eingehende Prüfung.

Nachdem anderseits durch Harden und Young feststeht, daß ein Kohlenhydratphosphorsäureester — er mag hier der Kürze halber Zymophosphat genannt werden — als Zwischenprodukt die alkoholische Gärung vermittelt, und nachdem durch die wichtigen Arbeiten von Embden und seinen Mitarbeitern<sup>2)</sup> nachgewiesen ist, daß aus Zymophosphat — Embdens Lactacidogen — durch Muskelpreßsaft Milchsäure gebildet wird, ist es jetzt eine der wichtigsten Fragen der Gärungschemie, zu ermitteln, in welcher Beziehung Milchsäure und Phosphorsäure bei der Gärung stehen.

In welchem Stadium der Hexosespaltung spielen die Phosphate ihre Rolle? Da es bis jetzt noch nicht gelungen ist, die ersten Phasen der alkoholischen Gärung durch Hefe einzeln zur Wirkung zu bringen, liegt es nahe, die Zuckerspaltung, welche

<sup>1)</sup> Buchner und Meisenheimer, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 37, S. 419 (1904) und Bd. 38, S. 620 (1905).

<sup>2)</sup> Embden und Mitarbeiter, Diese Zeitschr., Bd. 93, S. 1 (1916) und Bd. 98, S. 1 (1917).

die Hexosen durch Milchsäurebakterien erfahren, auf ihre Abhängigkeit von Phosphaten zu untersuchen. Erhält man hier ein dem bekannten Zymophosphat identisches Estersalz, so wäre damit der Beweis erbracht, daß die erste Hälfte der alkoholischen Gärung und der Gärungsspaltung der Hexosen durch Milchsäurebakterien analoge Vorgänge sind.

#### Züchten der Reinkultur.

Als Versuchsmaterial erhielten wir Bact. casei E, als Reinkultur in Milch vom bakteriologischen Institut der Zentralanstalt für landwirtschaftliche Versuche (Experimentalfäktet), dessen Vorstand, Herrn Prof. Chr. Barthel, wir bestens danken.

Die Milchreinkultur wurde in Molke übergeimpft. Für jede Versuchsserie wurde frisch bereitete Molke angewandt. Zum Herstellen der Molke wurde aus Magermilch das Casein mit Lab ausgefällt, die abfiltrierte Molke mit Hühnereiweiß geklärt, filtriert und im Dampfstrom sterilisiert. — Von der sterilen Molke wurden Gelatine- und Agarplatten gegossen und auf diese Weise festgestellt, ob die Molke ganz keimfrei war.

Nach Abkühlen der sterilen Molke wurde eine bestimmte Menge 24 Stunden alte Milchreinkultur in die Molke geimpft und im Thermostaten bei 42° C. 14 Stunden stehen gelassen. — Von der 14 Stunden alten Molkereinkultur mit sterilem Agar wurden Platten gegossen, um festzustellen, ob die Kulturen frei von fremden Keimen waren.

5. 5. 1917. 4 Erlenmeyer-Kolben à 300 ccm mit 50 ccm Molke und 5 ccm Milchreinkultur.

14. 5. 1917. 2 Erlenmeyer-Kolben à 300 ccm mit 50 ccm Molke und 5 ccm Milchreinkultur.

15. 5. 1917. 2 Erlenmeyer-Kolben à 300 ccm mit 50 ccm Molke und 5 ccm Milchreinkultur.

Außer beim Versuch vom 15. 5. 1917 haben alle Molke-reinkulturen 14 Stunden im Thermostaten bei 42° C. gestanden, Kulturen vom 15. 5. 1917 standen 28 Stunden im Thermostaten bei 42° C.

Alle Gelatine- und Agarplatten mit Molke waren steril.

Alle Agarplatten mit Molkereinkultur waren steril.

## Versuch 1 und 2.

2 ccm der Kulturlösung wurden in 50 Molke einpipetiert. 40 ccm 15%ige Glukoselösung, die auch 15%ig in bezug auf Natriumphosphat war und gegen Phenolphthalein neutral reagierte, wurde zugesetzt. Zur Neutralisation des Gemisches, welches durch die Kulturlösung sauer reagierte, wurden 13,9 (Versuch 1) bzw. 15,3 ccm einer 0,23 norm. NaOH-Lösung verbraucht.

Die Versuche wurden in Erlenmeyer-Kolben von 300 ccm Inhalt ausgeführt, welche in einem Thermostaten bei 42° standen. Durch einen feinen Gummischlauch konnte aus einer Bürette in den Kolben, der im übrigen durch Baumwolle bakteriendicht abgeschlossen war, Alkali zugesetzt werden. Der Titer des Alkalis war 0,23 n. Es wurde auf schwache Rotfärbung mit Phenolphthalein titriert.

Tabelle 1.

Stunden	Zugesetzt 0,001 Mol. NaOH	
	Versuch 1	Versuch 2
1	0,23	0,26
2	0,49	0,51
4	0,84	0,88
6	1,00	1,02
47	—	1,23
71	—	1,58

Die Bildung der Milchsäure wurde also allmählich immer schwächer und hörte schließlich auf. Der Verlauf der Milchsäurebildung ist auch in Fig. 1 dargestellt.

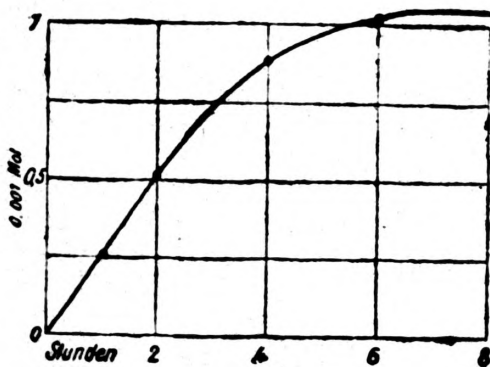


Fig. 1. Versuch. 2.

Ähnliche Resultate wurden in den

Versuchen 3 und 4

erhalten, welche genau in derselben Weise ausgeführt wurden.

Tabelle 2.

Stunden	Zugesetzt 0,001 Mol. NaOH	
	Versuch 1	Versuch 2
3	0,49	0,81
43	0,91	1,09
67	1,07	1,51

Zur Neutralisation vor Beginn des Versuchs wurden verbraucht:

Versuch 3: 16,5 ccm 0,23 n-NaOH.

› 4: 15,2 ›

Durch die fortschreitende Konzentration des Lactats scheint also eine Hemmung der Milchsäurebildung einzutreten. Im folgenden Versuch wurde deshalb in anderer Weise verfahren.

Versuch 5.

Zu 5 möglichst gleichen Mengen von Kulturlösung A, B, C und D wurden in denselben Mengen wie oben Glukose und Phosphat zugesetzt und unmittelbar darauf neutralisiert. Der Verlauf der Säurebildung geht aus Tabelle 3 und Fig. 2 hervor. Von allen Alkalinitätswerten (Tabelle 3) ist diejenige Alkalimenge — 40,1 ccm einer 0,23 norm. NaOH-Lösung =  $9,32 \times 10^{-3}$  Mol. — subtrahiert, welche für die Neutralisation der ursprünglichen Lösung erforderlich war.

Tabelle 3.

Stunden	Verbraucht Mol. NaOH $\times 10^{-3}$			
	A	B	C	D
2	0,67	—	—	—
4	1,14	—	—	—
6	1,62	1,37	—	—
22	2,46	3,32	8,70	—
30	2,90	4,20	9,21	—
48	3,20	4,62	10,05	15,30

Die Kultur B scheint etwas schwächer gewesen zu sein als die übrigen.



Fig. 2. Versuch 5.

### Versuch 6a.

Es wurde zunächst die Einwirkung des Natriumphosphats in saurer Lösung untersucht. Zu den Versuchsgemischen wurde kein Alkali zugesetzt. Vielmehr wurden denselben von Zeit zu Zeit je 10 ccm genommen, welche mit 0,023 norm. NaOH und Phenolphthalein als Indikator titriert wurden. Versuchstemperatur 42°.

#### Versuchsgemisch:

50 ccm Molke mit 2 ccm Kulturlösung,

20 „ 25%ige Glykoselösung,

20 „ 8%ige Na-Phosphatlösung neutralisiert gegen Phenolphthalein  
bezw. 20 ccm Wasser,

92 ccm.

Tabelle 4.

Stunden	Verbraucht Mol. NaOH $\times 10^{-3}$			
	Ohne Phosphat <sup>1)</sup>		Mit Phosphat	
	1	2	3	4
2	0,58	0,94	2,04	3,11
4	1,19	1,79	4,08	5,78
23	4,12	4,35	13,78	15,60
25	4,35	4,56	14,53	16,44

Phosphat beschleunigt also die Milchsäurebildung in saurer Lösung. Daß das Phosphat hier nicht als Puffer dient, d. h. eine günstigere Wasserstoffkonzentration hervorruft, wurde

<sup>1)</sup> Durch die zugesetzte Molke enthält auch diese Lösung Phosphat, und zwar etwa  $\frac{1}{10}$  der im Parallelversuch zugesetzten Phosphatmenge.



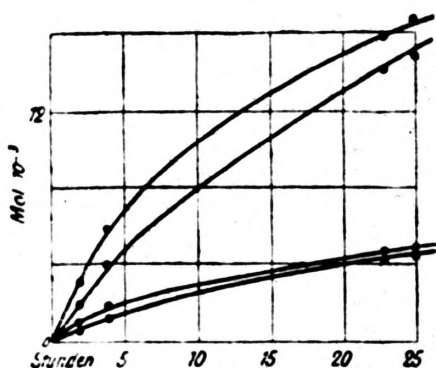


Fig. 3. Versuch 6.

experimentell nach der Sörensenschen Methode und zwar mit Kongo als Indikator festgestellt.

Gegen diesen Indikator zeigten nämlich beide Lösungen nach Schluß des Versuches sehr angenähert die gleiche Acidität.

### Versuch 6b.

Die Versuchslösungen hatten folgende Zusammensetzung:

- 50 ccm Molke mit 6 ccm Kultur,
- 20 > 25% ige Glykoselösung,
- 20 > 5% ige Na-Phosphatlösung bezw. 20 ccm Wasser
- 96 ccm

Tabelle 5.

Stunden	Verbraucht Mol. NaOH $\times 10^{-3}$					
	Ohne Phosphat		Mit Phosphat.			
	1	2	3	4	5	6
2	0,51	0,51	0,89	1,11	0,98	0,89
4	1,00	1,03	1,83	2,25	2,16	1,83
20	3,26	3,26	5,92	6,20	6,25	5,72
23	3,80	3,79	6,79	7,03	7,15	6,45

In Nr. 5 wurde zu Beginn und zum Schluß der Gärung die freie Phosphorsäure bestimmt. In 10 ccm wurde gefunden:

vor der Gärung: 0,0654 g  $Mg_2P_2O_7$   
 nach > > : 0,0657 >  $Mg_4P_2O_7$ .

Eine Abnahme des freien Phosphats hatte also nicht stattgefunden.

### Versuch 7.

Wie Euler und Tholin<sup>1)</sup> nachgewiesen haben, verzögern Phosphate die Kohlensäureentwicklung, wenn die alkoholische Gärung in alkalischer Lösung verläuft. In Rücksicht auf diese

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 97, S. 269 (1916).

Versuche wurde nun auch untersucht, ob sich der gleiche Einfluß auch bei der Milchsäurebildung geltend macht.

Versuchsmischung :

50 ccm Molke mit 6 ccm Kulturlösung,  
 20 „ 25 % ige Glukoselösung,  
 20 „ 5 % ige Na-Phosphatlösung bezw. Wasser  
 96 ccm

Beiden Lösungen wurden Proben von je 10 ccm zu quantitativen  $\text{PO}_4$ -Bestimmungen entnommen.

Die Lösungen wurden während der ganzen Versuchsdauer auf schwache Alkalinität gegen Phenolphthalein ( $p_H = 9$ ) gehalten, in dem in kurzen Zwischenräumen verdünnte Natronlauge (0,23 norm.) zugesetzt wurde.

Vor Beginn des Versuches wurden zugesetzt:

zu 1: 19,0 ccm = 4,41 ccm Mol.  $10^{-3}$  NaOH  
 „ 2: 20,6 „ = 4,78 „ „  $10^{-3}$  NaOH.

Tabelle 6.

Stunden	Verbraucht Mol. NaOH $10^{-3}$	
	1. Ohne Phosphat	2. Mit Phosphat
1	0,35	0,19
2	0,65	0,34
3	0,93	0,49
4	1,16	0,58
5	1,43	0,71
6	1,66	0,78

Es ergibt sich also aus diesem Versuch, daß das Phosphat in alkalischer Lösung in umgekehrtem Sinne wirkt, wie in saurer und somit die Milchsäurebildung hemmt. Auch in dieser Hinsicht besteht also eine Analogie zwischen der Milchsäuregärung und der alkoholischen Gärung.

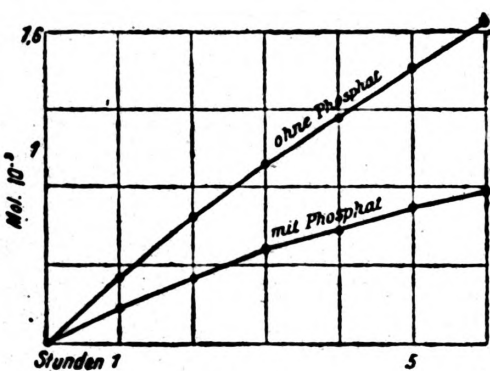


Fig. 4.

Das Ergebnis der quantitativen  $\text{PO}_4$ -Bestimmung ist folgendes:

1. Ohne Phosphatzusatz: Der Phosphatgehalt der Lösung stammt aus der Molke.

$$\begin{array}{l}
 10 \text{ ccm ergeben: vor der Gärung } 0,0062 \text{ g } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \\
 \text{nach } > > > \underline{0,0046 \text{ g } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7} \\
 \text{Verbraucht } 0,0016 \text{ g } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \\
 = 0,82 \text{ Mol.} \times 10^{-3} \text{ PO}_4.
 \end{array}$$

Dies entspricht ungefähr 5% der entstandenen Milchsäure in Mol. gerechnet.

2. Mit Phosphatzusatz.

$$\begin{array}{l}
 10 \text{ ccm ergeben: vor der Gärung } 0,0622 \text{ g } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \\
 > > > \underline{0,0581 \text{ g } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7} \\
 \text{Verbraucht } 0,0041 \text{ g } \text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \\
 = 0,16 \text{ Mol.} \times 10^{-3} \text{ PO}_4.
 \end{array}$$

### Versuch 8a.

Die Bildung des Zymophosphats macht sich bei Anwendung lebender Hefe nur in Gegenwart von Protoplasmagiften, besonders Toluol, geltend. Es konnte deshalb erwartet werden, daß auch bei den Milchsäurebakterien eine Anreicherung des gebildeten Phosphates eintritt, wenn dem Versuch eine geeignete Menge Toluol zugesetzt wird.

#### Versuchsmischung:

- 50 ccm Molke mit 6 ccm Kulturlösung.
- 20 > 25% ige Glukoselösung,
- 20 > 5% ige Na-Phosphatlösung.

10 ccm wurden entnommen und mit 0,023 norm. NaOH titriert.

Tabelle 7.

Stunden	Verbr. Mol. NaOH $\times 10^{-3}$ für die ganze Versuchsmischung	
	1. Ohne Toluol	2. Mit 0,5 ccm Toluol
2½	0,86	0,19
5	1,69	0,35
24	4,80	0,44



In zwei quantitativen  $\text{PO}_4$ -Bestimmungen ergaben 10 ccm der mit Toluol vergifteten Lösung:

vor der Gärung: 0,0636 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$   
 nach „ „ : 0,0642 „  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

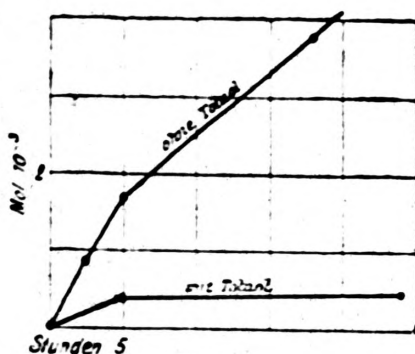


Fig. 5.

### Versuch 8b.

Ein ähnlicher Versuch wurde mit einer konzentrierten Bakterienkultur gemacht.

Zwei Kolben enthielten:

- 8 ccm Kultur.
- 50 „ Molke, steril.
- 20 „ 30% ige Glukoselösung.
- 20 „ Natriumphosphatlösung, neutralisiert.

Versuchstemperatur 45—46°: die Temperatur wurde, absichtlich, etwas über der optimalen Gärtemperatur gehalten.

Vergärung in natürlicher Acidität: es wurde also während der Gärung kein Alkali zugesetzt.

Von Zeit zu Zeit wurden 10 ccm-Proben entnommen und mit 0,023 norm. NaOH titriert.

Tabelle 8.

Stunden	Alkaliverbrauch in $10^{-3}$ Mol.		$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in 10 ccm	
	A	B	A	B
0	5.8	5.8	0.0788	0.0784
3	— 0.91	— 0.91	0.0780	0.0795
7	1.77	1.75	0.0794	0.0795

Die elektrometrische Messung ergab für die Konzentration der Wasserstoffionen am Schluß des Versuches

$$p_{\text{H}} = 4.7. \text{ bzw. } C = 0,00002.$$

Auch bei diesem Versuch blieb also das Phosphat vollkommen unverestert.

### Versuch 9.

Die Milchsäuregärung wird in der Regel in der Weise geleitet, daß Calciumlactat während der Gärung gebildet wird; dadurch wird eine weitergehende Vergärung des Zuckers erzielt. In welcher Weise Lactationen bzw. freie Milchsäure und Wasserstoffionen die Reaktion beeinflussen, ist bis jetzt aus der Literatur noch nicht zu ersehen. Wir haben deswegen folgenden Versuch angestellt:

Je 2 Kolben A und B wurden in folgender Weise beschickt:

- 6 ccm Kultur (dieselbe hatte sich 28 Stunden im Thermostaten bei 42° entwickelt),  
 50 » Molke,  
 20 » 30%ige Glukoselösung,  
 10 » 10%iges Natriumphosphat, neutralisiert.

Hierzu wurde gegeben

In Versuch A:

10 ccm Wasser.

In Versuch B:

1 ccm Milchsäure (=  $13.8 \cdot 10^{-3}$  Mol.) neutralisiert mit 4 norm. NaOH, verdünnt auf 10 ccm.

Gärung bei 42° ohne Alkalizusatz, also bei natürlicher Acidität; von Zeit zu Zeit werden Proben von 10 ccm entnommen, welche mit 0,024 norm. Natronlauge gegen Phenolphthalein titriert wurden.

Alkaliverbrauch vor Beginn des Versuchs (Zeit 0)

in A:  $3.79 \cdot 10^{-3}$  Mol.

» B:  $3.63 \cdot 10^{-3}$  Mol.

berechnet für die gesamte Kulturlösung.

Tabelle 9.

Stunden	Alkaliverbrauch (Milchsäurebildung) während des Versuchs, gesamte Kultur $10^{-3}$ Mol.	
	A	B
2	0.91	0.89
4	1.76	1.69
20	4.88	5.72
23	4.99	6.17

Die Gärung, welche anfangs im Versuch B etwas langsamer war, wurde also gegen Ende des Versuchs bei B erheblich kräftiger als bei A; es war also durch das zugesetzte Natriumlactat eine Beschleunigung der Milchsäuregärung eingetreten.

In welcher Weise hier die Beeinflussung der H-Konzentration eine Rolle spielt, muß erst festgestellt werden.

Nach elektrometrischen Messungen betrug die Konzentration der H-Ionen bei

A	B
0,0004	0,0002.

### Zusammenfassung.

Als wesentlichstes Ergebnis wurde gefunden, daß die Milchsäuregärung (zunächst durch die hier untersuchten Bakterien) durch Alkaliphosphat

in saurer Lösung beschleunigt,  
in alkalischer Lösung verzögert wird.

In dieser Hinsicht hat sich also eine vollständige Analogie zu der Hefegärung ergeben.

Eine Veresterung des anorganischen Phosphates zu einem dem Gärungs-Zymophosphat (Kohlenhydratphosphorsäureester) analogen Produkt hat sich bis jetzt noch nicht nachweisen lassen. Dabei ist aber zu bedenken, daß die Versuche bis jetzt nur mit verhältnismäßig schwachen Bakterienemulsionen und zwar nur mit lebenden Zellen ausgeführt wurden; sie werden mit stärkeren Kulturen und mit Bakterien-Trockenpräparaten weiter geführt.

