



Bijdrage tot de kennis der chemie van de melkzuurgisting

<https://hdl.handle.net/1874/274103>

1921

BIJDRAGE TOT DE KENNIS
DER CHEMIE VAN DE MELK-
ZUURGISTING



B. J. HOLWERDA

A. qu.
192

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER
CHEMIE VAN DE MELKZUURGISTING

A. 4^e 192, 1921.

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER CHEMIE VAN DE MELKZUURGISTING

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE ARTSENIJBEREIDKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE UTRECHT OP GEZAG VAN DEN RECTOR-
MAGNIFICUS Dr W. VOGELSANG, HOOGLEERAAR IN
DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, VOL-
GENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS-
SEN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP MAANDAG
11 APRIL 1921, DES NAMIDDAGS TE 3 UUR DOOR

BERTHA JOHANNA HOLWERDA

GEBOREN TE ROTTERDAM



BOEKDRUKKERIJ S. W. MELCHIOR, AMERSFOORT

AAN MIJN OUDERS

Bij het voltooien van dit proefschrift is het mij een aangename taak, mijn erkentelijkheid uit te spreken jegens allen, wier kennis en leiding mij tot voorlichting strekten bij mijn studiën.

Dat is in de eerste plaats jegens U, Hoogleeraren der Utrechtsche Universiteit, wier colleges ik het voorrecht had te mogen volgen.

Een afzonderlijk woord van dank wensch ik tot U te richten, Hooggeleerde SCHOORL, waar Gij mij als promotor zoo in alle opzichten welwillendheid en hulpvaardigheid hebt betoond.

Zeergeleerde VAN DAM, voor de wijze, waarop Gij mij bij de bewerking van dit proefschrift steeds met raad en daad hebt terzijde gestaan, betuig ik U mijn bijzonderen dank.

Den Directeur-Generaal van den Landbouw betuig ik hier mijn erkentelijkheid voor de gelegenheid, mij gegeven, aan het Rijkslandbouwproefstation te Hoorn een proefschrift te bewerken.

De belangstelling en vriendschap van U, Zeergeleerde GRUTTERINK, gedurende mijn studietijd ondervonden, zal mij steeds in aangename herinnering blijven.

INHOUD.

INLEIDING	Blz. 1
HOOFDSTUK I.	
DE DISSOCIATIECONSTANTE VAN MELKZUUR	5
a. <i>Bepalingen van het geleidingsvermogen</i>	7
b. <i>Potentiometrische bepalingen van zuur-zout mengsels</i> . . .	10
c. <i>Methode Bredig</i>	16
<i>Colorimetrische bepalingen</i>	23
<i>Opsporing van de oorzaak der afwijking in de dissociatie-</i> <i>constante, bepaald volgens Bredig van die, gevonden langs</i> <i>anderen weg</i>	28
HOOFDSTUK II.	
QUANTITATIEVE BEPALINGEN BIJ DE MELKZUURGISTING	37
ONDERZOEK IN WEI.	
1. <i>Onderzoek naar het optreden van een constante bij wille-</i> <i>keurige stammen van het geslacht Streptococcus lactis</i> . .	39
2. <i>Eventueele invloed van den ouderdom der culturen op de</i> <i>grootte der constante</i>	44
3. <i>Invloed van de samenstelling der wei op de grootte der</i> <i>constante</i>	46
4. <i>Mogelijkheid of de constante als biologisch kenmerk der</i> <i>bacteriën kan worden beschouwd</i>	51
6. <i>Invloed van het ontstaan van optisch actief melkzuur op de</i> <i>grootte der constante</i>	52
BEREIDING VAN EN ONDERZOEK DER EIGENSCHAPPEN DER MELKZUUR- BACTERIËN IN EEN KUNSTMATIGEN VOEDINGSBODEM.	
<i>Bereiding van een kunstmatigen voedingsbodem</i>	56
<i>Onderzoek van verschillende melkzuurbacteriën in dezen voe-</i> <i>dingsbodem</i>	60
<i>Beoordeeling van den graad van zuiverheid der gisting, door</i> <i>de bacteriën veroorzaakt, in deze cultuurvloeistof door:</i>	
1. <i>Aantooning van het niet ontstaan van vluchtig zuur</i> . . .	67
2. <i>Bepaling van de neutralisatiecurve van den voedingsbodem</i> <i>in vergelijking met de zuurgraden veroorzaakt door de</i> <i>bacteriën</i>	67
3. <i>Extractie en onderzoek van het door gisting ontstane zuur</i>	68
CONCLUSIES	71

INLEIDING.

De groei en de ontwikkeling van de meeste micro-organismen is in hooge mate afhankelijk van de waterstofionenconcentratie van het milieu, waarin ze leven. Hieraan is vooral sinds de onderzoeken van SÖRENSEN¹⁾ veel aandacht geschonken. Het verband, door hem aangetoond, tusschen de H-ionenconcentratie van een vloeistof en de optimale werking van verschillende enzymen, doet vooral de niet specifieke werking van verschillende zuren uitkomen. Dat de H-ionenconcentratie een dikwijls verwaarloosde factor is geweest bij vroegere biochemische onderzoeken, waar men gewoonlijk met media gewerkt had, die bufferende eigenschappen hebben, blijkt duidelijk uit zijn onderzoek. Toch is het noodig bij de biochemische studie van micro-organismen niet uitsluitend rekening te houden met de H-ionenconcentratie. Aan de werking, die de ongedissocieerde moleculen kunnen uitoefenen dient ook waarde toegekend te worden.

De volgende, gedeeltelijk tegenstrijdige, opgaven uit de literatuur doen uitkomen, dat beide factoren invloed uitoefenen bij biologische processen.

MICHAËLIS²⁾ vindt, dat *Bacterium coli* de H-ionenconcentratie van een vloeistof altijd tot dezelfde waarde opvoert, onafhankelijk van de begin-aciditeit ervan. Deze H-ionenconcentratie, 1×10^{-5} , wordt als een biologisch kenmerk van *Bacterium coli* beschouwd.

Door een meer uitgebreid onderzoek toont CLARK³⁾ aan, dat de bufferwerking van den voedingsbodem invloed heeft op de,

1) SÖRENSEN, Biochem. Zeitschr., 21, 131. (1909).

2) MICHAËLIS, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., 14, 170. (1912).

3) CLARK, Journ. of biolog. chem., 22, 87. (1915).

door deze bacteriën bereikte reële aciditeit. Hij acht een toxische werking van de ongedissocieerde moleculen niet uitgesloten en waarschuwt tegen het aannemen van een onder bepaalde omstandigheden constant gevonden grootheid als biologisch kenmerk; het is noodig de eventuele invloed van verschillende factoren op deze grootheid eerst na te gaan.

JOHANNESSEN¹⁾ meent de toxische werking, die organische zuren uitoefenen bij het doen eindigen van de alcoholische gisting te mogen toeschrijven aan de ongedissocieerde moleculen.

BIAL²⁾ vindt in tegenstelling daarmee dat de giftige werking door organische zuren op gist uitgeoefend, alleen afhankelijk is van de waterstofionenconcentratie.

PAUL, BIRSTEIN en REUSZ³⁾ schrijven de antiseptische werking van organische zuren toe zoowel aan de anionen als aan de ongedissocieerde moleculen.

De zuur produceerende melkzuurbacteriën veranderen door hun ontwikkeling de reactie van het milieu. Het einde van de ontwikkeling van micro-organismen wordt veroorzaakt doordat de door hen gevormde stoffen een bepaalde concentratie hebben bereikt. Bij de melkzuur gisting kan dit einde dus veroorzaakt worden door de H-ionenconcentratie of door de hoeveelheid ongedissocieerd melkzuur. De lactaationen komen, wat toxische werking betreft, niet in aanmerking. Dat blijkt uit het bekende feit, dat het mogelijk is door neutraliseering van het ontstane zuur met CaCO_3 ongeveer alle lactose van een voedingsbodem te vergisten.

Uit de onderzoeken van VAN DAM⁴⁾ en van SVANBERG⁵⁾ blijkt, dat bij kweken van melkzuurbacteriën in melkwei of melkserum⁶⁾ het einde van de gisting veroorzaakt kan worden

1) JOHANNESSEN, Biochem. Zeitsch., 47, 97. (1912).

2) BIAL, Zeitschr. physik. Chem., 40, 513. (1902).

3) PAUL, BIRSTEIN u. REUSZ, Biochem. Zeitschr., 29, 202. (1910).

4) VAN DAM, Biochem. Zeitschr., 87, 107, (1918).

5) SVANBERG, Inaugural Dissertation. (1918).

6) Onder melkwei wordt verstaan de vloeistof verkregen door afscheiding van de caseïne met leb; onder melkserum die, verkregen met een zuur.

zoowel door de hoeveelheid ongedissocieerd melkzuur, als door een hooge H-ionenconcentratie.

VAN DAM¹⁾ heeft aangetoond, dat gisting van gewone lactococcen, die bij de kaasbereiding worden gebruikt, in melkwei eindigt, wanneer de concentratie van het ongedissocieerde melkzuur $\pm 0,01$ N is. Deze waarde wordt bereikt in melkwei als zodanig en ook in die waaraan verschillende hoeveelheden Na lactaat zijn toegevoegd. De H-ionenconcentratie bleef in deze gevallen ver beneden die, welke schadelijk is voor de ontwikkeling van de bacteriën en waarvoor $10 \text{ à } 20 \times 10^{-5}$ was gevonden.

SVANBERG²⁾ vindt eveneens dat, bij het einde van de gisting in melkserum, veroorzaakt door lactococcen, de concentratie van het ongedissocieerde melkzuur $\pm 0,01$ N is. De zuurproductie van lactobacillen eindigt wanneer deze concentratie $\pm 0,1$ N is. Wanneer de bufferwerking van dit melkserum door toevoeging van Na lactaat wordt verhoogd, wordt deze concentratie bij het einde van de gisting toch niet hoger gevonden. Ook in dit geval werd niet de H-ionenconcentratie bereikt, die schadelijk was voor de ontwikkeling van de bacteriën. In met HCl, H₂SO₄ en H₃PO₄ aangezuurde melk kon Svanberg geen gisting van de door hem gebruikte stammen meer aantoonen, wanneer de H ionenconcentratie groter dan 25×10^{-5} werd.

De H-ionenconcentratie bij het einde van de gisting in melkwei of serum kan dus evenmin als de totale hoeveelheid gevormd zuur als biologisch kenmerk der melkzuurbacteriën dienen. Aangewezen hiervoor schijnt, zooals uit de genoemde onderzoekingen volgt, de hoeveelheid ongedissocieerd melkzuur.

De verschillende factoren, die invloed zouden kunnen hebben op deze grootheid, zijn door mij aan een meer uitgebreid onderzoek onderworpen. Er diende te worden nagegaan of de grenswaarde der concentratie van ongesplitste zuurmoleculen een altijd optredende eigenschap van willekeurige melkzuurbacteriën was. Evenals de resultaten verkregen door van Dam en door Svanberg, laten ook die, welke bij dit onderzoek zijn verkregen, duidelijk

¹⁾ VAN DAM loc. cit.

²⁾ SVANBERG loc. cit.

uitkomen van hoeveel belang het is bij bacteriologische proeven geheel gedefinieerde voedingsbodems te gebruiken; in dit geval speciaal wat betreft de bufferwerking. Er is bij dit onderzoek een poging aangewend om voor melkzuurbacteriën een voedingsbodem te bereiden, die aan dezen eisch voldoet en overigens in eigenschappen overeenkomt met de veel gebruikte melkwei, waarvan de wisselende samenstelling een nadeel is. De uitkomsten door VAN DAM¹⁾ verkregen bij een onderzoek over de vertering van caseïne door verschillende pepsinen wijzen op de mogelijkheid een caseïnepepton te kunnen verkrijgen, waarvan de eigenschappen constant zijn. Tevens heeft de in de literatuur verbreide meening, dat pepton voor melkzuurbacteriën een goede stikstofvoeding is, de richting bij het zoeken naar een dergelijken kunstmatigen voedingsbodem bepaald.

Voor de berekening van de concentratie van het ongedissocieerde melkzuur, aanwezig in een vloeistof, waarvan de reële zuurgraad en de totale hoeveelheid daarin gevormd zuur bekend is, is de juiste kennis van de dissociatieconstante van melkzuur noodig. De opgaven hiervoor zijn nog al uiteenlopend. Daar ook nog in 1918 van Amerikaansche zijde hiervoor weer een waarde is gepubliceerd, die zeer belangrijk afwijkt van de door Ostwald gegevene, is van eenige preparaten melkzuur de dissociatieconstante nog eens bepaald (25°) door gebruik te maken van verschillende methoden.

¹⁾ VAN DAM, Zeitschr. physiol. chem., 79, 247. (1912).

HOOFDSTUK I.

DE DISSOCIATIECONSTANTE VAN MELKZUUR.

De in lateren tijd gebruikte waarde voor de dissociatieconstante van melkzuur verschilt dikwijls zeer veel van de oorspronkelijk door OSTWALD ¹⁾ bepaalde. Door meting van het geleidingsvermogen vindt Ostwald $K = 1.38 \times 10^{-4}$ (25°).

GOLDSCHMIDT en BÜRKLE ²⁾ onderzochten den katalytischen invloed van het waterstofion op de vorming der azokleurstoffen. Indien voor melkzuur de door Ostwald bepaalde dissociatieconstante $K = 1.38 \times 10^{-4}$ werd genomen, bleek de berekende snelheidsconstante niet overeen te komen met de gevondene. Daarom werd door BERNOYS ³⁾ de dissociatieconstante van melkzuur opnieuw bepaald door metingen van het geleidingsvermogen. Hoewel uit de resultaten de gevolgtrekking wordt gemaakt, dat het onderzochte zuur niet geheel zuiver was, meenen ze toch een waarde $K = 3,1 \times 10^{-4}$ (25°) te mogen aannemen. In het handboek van V. Meijer en Jacobson wordt ook deze waarde aangegeven.

VAN SLIJKE en VAN SLIJKE ⁴⁾ vinden voor het moleculaire geleidingsvermogen van melkzuur een hoogere waarde dan Ostwald. Ze geven hierbij echter geen cijfers op, waaruit K te berekenen is.

VAN DAM ⁵⁾ bepaalt de dissociatieconstante van volgens Krafft gedestilleerd melkzuur. Uit metingen van het geleidingsvermogen wordt gevonden $K = 1,47 \times 10^{-4}$ (18°). Uit de ontledingssnelheid

¹⁾ OSTWALD, Zeitschr. physik. Chem., 2, 840. (1888).

²⁾ GOLDSCHMIDT u. BÜRKLE, Ber. d.d. Chem. Ges., 32, 64. (1899).

³⁾ BERNOYS, Ber. d.d. Chem. Ges., 32, 64. (1899).

⁴⁾ VAN SLIJKE and VAN SLIJKE, Am. Chem. Journ., 38, 400. (1907).

⁵⁾ VAN DAM, Versl. d. Rijks Landb. Proefst. 10, 5. (1911).

van diazoazijnzure aethylester, volgens Bredig, met melkzuur als katalysator, wordt $K = 1,47 \times 10^{-4}$ (18°) gevonden.

VAN SLIJKE en BAKER¹⁾ meten de H-ionenconcentratie van zuiver melkzuur en die van mengsels, bestaande uit calciumlactaat en melkzuur. Op beide wijzen wordt $K = 2,5 \times 10^{-4}$ (25°) gevonden. Ze houden echter geen rekening met de waarschijnlijk geringe of complexe ionisatie van calciumlactaat, waardoor de waarde, gevonden uit de metingen der H-ionenconcentratie der mengsels, wel te hoog kan zijn.

Daar, zoowel bij gebruik maken van eenzelfde bepalingswijze, als bij gebruik maken van verschillende methoden van onderzoek de opgaven van de dissociatieconstante van melkzuur niet dezelfde zijn, heb ik van verschillende preparaten melkzuur op verschillende wijze de dissociatieconstante opnieuw bepaald.

De preparaten waren:

- I. melkzuur van Merck. De stroperige vloeistof bevatte $\pm 89\%$ totaal zuur.
- II. een laboratoriumpreparaat uit Utrecht ($\pm 87,5\%$ totaal zuur). Het bleek later ongeveer $0,1\%$ H_2SO_4 te bevatten.
- III. een laboratoriumpreparaat uit Wageningen ($\pm 90\%$ totaal zuur).
- IV. melkzuur van Kahlbaum ($\pm 90\%$ totaal zuur).
- V. hetzelfde melkzuur van Kahlbaum door Prof. Schoorl volgens KRAFFT en DYES²⁾ in vacuo gedestilleerd. ($\pm 96\%$ totaal zuur).

De methoden van onderzoek van deze vijf zuren zijn hoofdzakelijk de volgende drie geweest:

a. de meting van het moleculaire geleidingsvermogen in verschillende verdunningen.

b. de electrometrische bepaling der waterstofionenconcentratie van zuiver melkzuur en die van mengsels bestaande uit melkzuur en Na lactaat, melkzuur en Ca lactaat, melkzuur en Zn lactaat.

c. de bepalingen der H-ionenconcentraties volgens Bredig.

Alle vijf preparaten waren na hydratatie optisch inactief.

Voor volledige hydratatie werd een ongeveer $0,5$ N oplossing in een platinaschaal op het waterbad ± 16 uur verwarmd. Verdamping

¹⁾ VAN SLYKE and BAKER, Journ. of Biol. Chem., **35**, 147. (1918).

²⁾ KRAFFT en DYES, Ber. d.d. Chem. Ges., **28**, 2589. (1895).

van het zuur werd zooveel mogelijk tegengegaan door de platina-schaal met een kwartsplaat af te sluiten. Bovendien was de inrichting zoo gemaakt, dat het zuur slechts met waterdamp afkomstig van gedestilleerd water in aanraking kon komen. Volledige hydratatie werd geconstateerd door 5 cm³ ongeveer 0,5 N zuur met 0,1 N loog te titreeren. De, door phenolphthaleïne, zwak rose vloeistof werd daarna vijf minuten of langer gekookt, de rose kleur moest dan of blijven bestaan of $\frac{1}{2}$ druppel 0,1 N loog moest de reactie weer alkalisch maken. Voor duplo-bepalingen van het geleidingsvermogen werd steeds een nieuwe hoeveelheid gehydrateerd.

Methode a.

Bij de meting van het geleidingsvermogen van melkzuur in een vat met gewoon geplatineerde electroden deed zich de moeilijkheid voor dat, dit niet constant bleek te zijn, maar bij staan toenam door ontleding van het zuur. Bij gebruik van blanke electroden was het geleidingsvermogen na drie kwartier nog onveranderd; er was ook een scherp minimum waar te nemen. De bepalingen van het geleidingsvermogen der zuren zijn daarom in een vat met blanke electroden uitgevoerd. Het geleidingsvermogen van het gebruikte water was hoogstens $1,2 \times 10^{-6}$, gewoonlijk $0,9 \times 10^{-6}$ en is van het gevonden geleidingsvermogen in zijn geheel afgetrokken. Daar het water namelijk steeds alkalisch op methylrood reageerde, en het geleidingsvermogen dus niet alleen van koolzuur afkomstig kon zijn, leek er me geen reden te zijn om het gevonden geleidingsvermogen niet of met de helft van dat van het water te verminderen ¹⁾.

Het aequivalent geleidingsvermogen van het waterstofion bij oneindige verdunning is 349 (25°) aangenomen, dat van het lactaation is berekend uit de opgaven van het geleidingsvermogen van Na lactaat van OSTWALD ²⁾ en 36,7 gevonden. Het aequivalent geleidingsvermogen van melkzuur bij oneindige verdunning is dus 385,7. In de volgende tabellen stelt x_{25} het specifiek geleidingsvermogen, verminderd met dat van het gebruikte water, voor; α de dissociatiegraad.

¹⁾ Zie KOHLRAUSGH u. HOLBORN, Das Leitvermögen der Elektrolyte. 2e druk, bl. 92.

²⁾ Ibid. bl. 178.

TABEL I.

Geleidingsvermogen van preparaat I.

Concentratie	x_{25}	α	K
0,1008 N	$1,489 \times 10^{-3}$	0,0383	$1,54 \times 10^{-4}$
0,0504 N	$1,051 \times 10^{-3}$	0,0541	$1,56 \times 10^{-4}$
0,0252 N	$7,272 \times 10^{-4}$	0,0748	$1,52 \times 10^{-4}$
0,0126 N	$5,042 \times 10^{-4}$	0,1035	$1,51 \times 10^{-4}$
0,0063 N	$3,486 \times 10^{-4}$	0,1435	$1,51 \times 10^{-4}$
0,0031 N	$2,289 \times 10^{-4}$	0,1883	$1,37 \times 10^{-4}$
0,0015 N	$1,544 \times 10^{-4}$	0,2540	$1,34 \times 10^{-4}$
0,1014 N	$1,496 \times 10^{-3}$	0,0383	$1,55 \times 10^{-4}$
0,0507 N	$1,049 \times 10^{-3}$	0,0536	$1,54 \times 10^{-4}$
0,0253 N	$7,236 \times 10^{-4}$	0,0740	$1,50 \times 10^{-4}$
0,0127 N	$5,023 \times 10^{-4}$	0,1028	$1,50 \times 10^{-4}$
0,0064 N	$3,486 \times 10^{-4}$	0,1430	$1,51 \times 10^{-4}$
0,0032 N	$2,360 \times 10^{-4}$	0,1930	$1,46 \times 10^{-4}$
0,0016 N	$1,570 \times 10^{-4}$	0,2570	$1,41 \times 10^{-4}$

TABEL II.

Geleidingsvermogen van preparaat II.

Concentratie	x_{25}	α	K
0,1015 N	$1,518 \times 10^{-3}$	0,0387	$1,59 \times 10^{-4}$
0,0507 N	$1,054 \times 10^{-3}$	0,0538	$1,55 \times 10^{-4}$
0,0254 N	$7,331 \times 10^{-4}$	0,0749	$1,54 \times 10^{-4}$
0,0127 N	$5,033 \times 10^{-4}$	0,1030	$1,50 \times 10^{-4}$
0,0063 N	$3,446 \times 10^{-4}$	0,1410	$1,47 \times 10^{-4}$
0,0032 N	$2,366 \times 10^{-4}$	0,1930	$1,47 \times 10^{-4}$
0,0016 N	$1,575 \times 10^{-4}$	0,2570	$1,41 \times 10^{-4}$
0,1021 N	$1,526 \times 10^{-3}$	0,0387	$1,59 \times 10^{-4}$
0,0510 N	$1,072 \times 10^{-3}$	0,0544	$1,59 \times 10^{-4}$
0,0255 N	$7,448 \times 10^{-4}$	0,0756	$1,58 \times 10^{-4}$
0,0127 N	$5,127 \times 10^{-4}$	0,1041	$1,54 \times 10^{-4}$
0,0064 N	$3,504 \times 10^{-4}$	0,1423	$1,50 \times 10^{-4}$
0,0032 N	$2,386 \times 10^{-4}$	0,1940	$1,49 \times 10^{-4}$
0,0016 N	$1,590 \times 10^{-4}$	0,2583	$1,43 \times 10^{-4}$

TABEL III.

Geleidingsvermogen van preparaat III.

Concentratie	x_{25}	α	K
0,1040 N	$1,492 \times 10^{-3}$	0,0372	$1,46 \times 10^{-4}$
0,0520 N	$1,048 \times 10^{-3}$	0,0522	$1,46 \times 10^{-4}$
0,0260 N	$7,282 \times 10^{-4}$	0,0726	$1,47 \times 10^{-4}$
0,0130 N	$5,040 \times 10^{-4}$	0,1005	$1,46 \times 10^{-4}$

Concentratie	x_{25}	α	K
0,0065 N	$3,483 \times 10^{-4}$	0,1389	$1,46 \times 10^{-4}$
0,0032 N	$2,379 \times 10^{-4}$	0,1900	$1,37 \times 10^{-4}$
0,0016 N	$1,584 \times 10^{-4}$	0,2527	$1,37 \times 10^{-4}$
0,0976 N	$1,420 \times 10^{-3}$	0,0377	$1,45 \times 10^{-4}$
0,0488 N	$1,009 \times 10^{-3}$	0,0536	$1,48 \times 10^{-4}$
0,0244 N	$7,036 \times 10^{-4}$	0,0748	$1,47 \times 10^{-4}$
0,0122 N	$4,826 \times 10^{-4}$	0,1026	$1,43 \times 10^{-4}$
0,0061 N	$3,341 \times 10^{-4}$	0,1420	$1,43 \times 10^{-4}$
0,0030 N	$2,230 \times 10^{-4}$	0,1895	$1,35 \times 10^{-4}$
0,0015 N	$1,515 \times 10^{-4}$	0,2576	$1,36 \times 10^{-4}$

TABEL IV.

Geleidingsvermogen van preparaat IV.

Concentratie	x_{25}	α	K
0,1014 N	$1,449 \times 10^{-3}$	0,0370	$1,45 \times 10^{-4}$
0,0507 N	$1,020 \times 10^{-3}$	0,0522	$1,45 \times 10^{-4}$
0,0253 N	$7,060 \times 10^{-4}$	0,0722	$1,43 \times 10^{-4}$
0,0127 N	$4,856 \times 10^{-4}$	0,0998	$1,40 \times 10^{-4}$
0,0063 N	$3,338 \times 10^{-4}$	0,1365	$1,37 \times 10^{-4}$
0,0032 N	$2,278 \times 10^{-4}$	0,1863	$1,35 \times 10^{-4}$
0,0016 N	$1,540 \times 10^{-4}$	0,2519	$1,35 \times 10^{-4}$
0,1026 N	$1,470 \times 10^{-3}$	0,0372	$1,47 \times 10^{-4}$
0,0511 N	$1,026 \times 10^{-3}$	0,0520	$1,46 \times 10^{-4}$
0,0255 N	$7,130 \times 10^{-4}$	0,0725	$1,44 \times 10^{-4}$
0,0128 N	$4,886 \times 10^{-4}$	0,0990	$1,39 \times 10^{-4}$
0,0064 N	$3,418 \times 10^{-4}$	0,1385	$1,42 \times 10^{-4}$
0,0032 N	$2,304 \times 10^{-4}$	0,1860	$1,36 \times 10^{-4}$
0,0016 N	$1,551 \times 10^{-4}$	0,2513	$1,35 \times 10^{-4}$

TABEL V

Geleidingsvermogen van preparaat V.

Concentratie	x_{25}	α	K
0,1018 N	$1,483 \times 10^{-3}$	0,0378	$1,51 \times 10^{-4}$
0,0509 N	$1,046 \times 10^{-3}$	0,0533	$1,53 \times 10^{-4}$
0,0254 N	$7,290 \times 10^{-4}$	0,0742	$1,51 \times 10^{-4}$
0,0127 N	$5,077 \times 10^{-4}$	0,1034	$1,51 \times 10^{-4}$
0,0064 N	$3,494 \times 10^{-4}$	0,1423	$1,50 \times 10^{-4}$
0,0032 N	$2,367 \times 10^{-4}$	0,1930	$1,47 \times 10^{-4}$
0,0016 N	$1,599 \times 10^{-4}$	0,2614	$1,47 \times 10^{-4}$
0,1029 N	$1,484 \times 10^{-3}$	0,0374	$1,50 \times 10^{-4}$
0,0514 N	$1,044 \times 10^{-3}$	0,0526	$1,50 \times 10^{-4}$

Concentratie	x_{25}	α	K
0,0257 N	$7,292 \times 10^{-4}$	0,0735	$1,50 \times 10^{-4}$
0,0128 N	$5,091 \times 10^{-4}$	0,1031	$1,51 \times 10^{-4}$
0,0064 N	$3,498 \times 10^{-4}$	0,1417	$1,49 \times 10^{-4}$
0,0032 N	$2,371 \times 10^{-4}$	0,1921	$1,46 \times 10^{-4}$
0,0016 N	$1,602 \times 10^{-4}$	0,2595	$1,46 \times 10^{-4}$

Een bespreking der uitkomsten volgt in verband met die, verkregen volgens de andere methoden.

Methode b.

VAN SLIJKE en BAKER¹⁾ meten de H-ionenconcentratie van zuiver melkzuur met een waterstofelectrode. Deze meting is bij vloeistoffen, die geen bufferende werking hebben gewoonlijk slecht uitvoerbaar; bij gebruik maken van een schud-electrode zijn nog wel eens goede uitkomsten te krijgen. Om het gebruik van een schud-electrode te omgaan heb ik voor de bepaling van de H-ionenconcentratie van melkzuur gebruik gemaakt van een klein electrodevat. Daar werd onderin een langzame stroom waterstof geleid, zoodat de vloeistof geheel in voortdurende beweging was. Er stelde zich een potentiaalverschil met de afleidingselectrode in, dat vooral bij de meer verdunde oplossingen niet constant was. Zoo veranderde de potentiaal van $\pm 0,005$ N melkzuur in 3 kwartier ongeveer 4 millivolt, waardoor de dissociatieconstante schijnbaar van $1,34 \times 10^{-4}$ tot $1,85 \times 10^{-4}$ steeg. Bij ongeveer 0,1 N oplossingen stelde zich een meer constant potentiaalverschil in. Echter werd nooit bij herhaling van de proef met hetzelfde zuur eenzelfde waarde gevonden. $K = 1,69 \times 10^{-4}$ en $K = 1,86 \times 10^{-4}$ waren de uitkomsten van een duplo-bepaling. Daar ook bij het meest zuivere melkzuur (preparaat V) dergelijke uitkomsten zijn verkregen is deze electrometrische methode niet verder toegepast.

Wel is langs electrometrischen weg de waterstofionenconcentratie bepaald van mengsels bestaande uit:

1^o melkzuur en Ca lactaat.

2^o " " Zn "

3^o " " Na "

Het meten van deze mengsels met de waterstofelectrode gaf

¹⁾ VAN SLIJKE and BAKER, loc. cit.

geen aanleiding tot moeilijkheden. Als afleidingselectrode is steeds de verzadigde calomelelectrode gebruikt. Deze en de gaselectrode waren in een waterthermostaat van 25° geplaatst. De gebruikte apparaten werden herhaaldelijk met een azijnzuur-natronloog mengsel gecontroleerd.

Voor de berekening van de dissociatieconstante uit de H-ionenconcentratie van één der bovengenoemde mengsels is het noodig de dissociatiegraad, α , van het toegevoegde lactaat te kennen. Van den dissociatiegraad van oplossingen van Ca- en Zn lactaat is niet veel bekend. Deze is bepaald uit het geleidingsvermogen van de zouten in verschillend sterke oplossingen.

Als calciumlactaat zijn 2 verschillende preparaten gebruikt, beide bereid door herhaald omkristalliseeren van Ca-lactaat. De sterkte van de oplossingen moet bepaald worden door het CaO-gehalte van het zout. Dit is van één preparaat gevonden door directe gloeiing als 22,65%, door neerslaan als Ca oxalaat 22,55%; het andere preparaat bevatte 19,18% CaO (directe gloeiing).

Het aequivalent geleidingsvermogen bij oneindige verdunning van Ca-lactaat is 96,6 genomen, dat van het lactaation 36,7; van $\frac{1}{2}$ Ca 59,9 (25°).

Daar de dissociatiegraden van de beide verschillende preparaten, zoowel als die van de duplo-bepalingen bevredigend overeenstemden, zal ik alleen de gemiddelden hiervan opgeven, die ook voor de verdere berekeningen zijn gebruikt.

TABEL VI.

Dissociatie van Ca lactaat 25°.

Concentratie.	Dissociatiegraad α .
0,1000 N	0,446
0,0500 N	0,545
0,0250 N	0,640
0,0125 N	0,720
0,0062 N	0,788
0,0031 N	0,843
0,0016 N	0,895

Zinklactaat werd bereid door melkzuur met de berekende hoeveelheid ZnCO_3 te verwarmen. Daarna werd gefiltreerd en

het kristallisaat, dat in het filtraat ontstond werd herhaaldelijk omgekristalliseerd (3 maal). Het luchtdroge preparaat werd geanalyseerd.

Door drogen bij 120° — 130° werd het watergehalte = 18,50% gevonden. Het ZnO gehalte van het anhydrische preparaat was bij directe gloeiing 33,39%; bij wegen als ZnS 33,30%. Daar het ZnO gehalte van anhydrisch Zn lactaat 33,43% is, was het preparaat waarschijnlijk dus wel zuiver. Toch is dit nog éénmaal omgekristalliseerd en daarvan ook weer de dissociatie bepaald. Het aequivalent geleidingsvermogen van $\frac{1}{2}$ Zn 54,2 bij oneindige verdunning geeft voor Zn lactaat $54,2 + 36,7 = 90,9$. Ook hier stemden duplo-bepalingen en die van de 2 verschillende preparaten voldoende overeen.

TABEL VII.

Dissociatie van Zn lactaat 25° .

Concentratie.	Dissociatiegraad α .
0,1000 N	0,238
0,0500 N	0,324
0,0250 N	0,420
0,0125 N	0,532
0,0062 N	0,644
0,0031 N	0,750
0,0015 N	0,846

De dissociatiegraad van Na-lactaat is door OSTWALD¹⁾ bepaald. Toch is de dissociatiegraad van dit zout nog eenige malen bepaald. Daartoe werd melkzuur van bekende sterkte met natronloog precies geneutraliseerd en van deze oplossing het geleidingsvermogen in verschillende verdunningen gemeten. Het plan was om bij de bacteriologische proeven den invloed ook van sterke lactaatoplossingen op de melkzuur gisting na te gaan. De grootste concentratie, waarvoor Ostwald de dissociatie bepaalde is $\pm 0,03$ N. Om bovengenoemde reden is de sterkste oplossing waarvan de dissociatie gemeten is $\pm 0,25$ N geweest. Hoewel bij een zoo sterke oplossing de ionenbeweeglijkheid niet meer onafhankelijk is van de concentratie der oplossing en de disso-

1) OSTWALD, loc. cit.

ciatiegraad dan niet meer gelijk genomen mag worden aan de verhouding van het aequivalent geleidingsvermogen van de oplossing tot dat bij oneindige verdunning, was toch voor het te gebruiken doel de dissociatie van de sterkere oplossingen op deze wijze voldoende te benaderen. Het aequivalent geleidingsvermogen van Na bij oneindige verdunning 50,9, geeft voor Na-lactaat $50,9 + 36,7 = 87,6$.

TABEL VIII.

Dissociatie van Na lactaat 25°.

Concentratie.	Dissociatiegraad α .	α berekend uit waarn. v. OSTWALD.
0,2390 N	0,679	
0,1195 N	0,743	
0,0598 N	0,796	
0,0505 N	0,810	0,815
0,0253 N	0,850	0,851
0,0126 N	0,884	0,882
0,0063 N	0,918	0,912
0,0032 N	0,938	0,932
0,0016 N	0,956	0,960

De uitkomsten verkregen met methode b van de verschillende preparaten zijn:

TABEL IX.

Potentiaalmetingen van zuur-zoutmengsels van preparaat I.

Concentratie melkzuur	Concentratie Ca lactaat	α	C_H	K
$10,08 \times 10^{-3}$	100×10^{-3}	0,446	$3,16 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-4}$
$10,08 \times 10^{-3}$	125×10^{-3}	0,397	$2,57 \times 10^{-5}$	$1,27 \times 10^{-4}$
$10,08 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,495	$3,80 \times 10^{-5}$	$1,41 \times 10^{-4}$
$5,04 \times 10^{-3}$	50×10^{-3}	0,545	$2,69 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-4}$
Concentratie melkzuur	Concentratie Zn lactaat	α	C_H	K
$20,14 \times 10^{-3}$	105×10^{-3}	0,229	$9,77 \times 10^{-5}$	$1,17 \times 10^{-4}$
$10,07 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,281	$5,89 \times 10^{-5}$	$1,24 \times 10^{-4}$
$10,07 \times 10^{-3}$	45×10^{-3}	0,332	$8,71 \times 10^{-5}$	$1,30 \times 10^{-4}$
$10,07 \times 10^{-3}$	15×10^{-3}	0,507	$1,74 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-4}$

Concentratie melkzuur	Concentratie Na lactaat	α	C_H	K
$10,81 \times 10^{-3}$	$39,89 \times 10^{-3}$	0,831	$4,90 \times 10^{-5}$	$1,51 \times 10^{-4}$
$10,45 \times 10^{-3}$	$19,95 \times 10^{-3}$	0,863	$8,71 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-4}$
$5,83 \times 10^{-3}$	$44,87 \times 10^{-3}$	0,823	$2,40 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-4}$
$5,46 \times 10^{-3}$	$24,94 \times 10^{-3}$	0,855	$3,98 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-4}$

TABEL X.

Potentiaalmetingen van zuur-zoutmengsels van preparaat II.

Concentratie melkzuur	Concentratie Ca lactaat	α	C_H	K
$10,21 \times 10^{-3}$	100×10^{-3}	0,446	$2,95 \times 10^{-5}$	$1,30 \times 10^{-4}$
$10,21 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,501	$3,80 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-4}$
$10,21 \times 10^{-3}$	50×10^{-3}	0,545	$5,01 \times 10^{-5}$	$1,34 \times 10^{-4}$
$10,21 \times 10^{-3}$	25×10^{-3}	0,640	$9,12 \times 10^{-5}$	$1,43 \times 10^{-4}$
Concentratie melkzuur	Concentratie Zn lactaat	α	C_H	K
$20,42 \times 10^{-3}$	99×10^{-3}	0,237	$1,05 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-4}$
$10,21 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,280	$6,03 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-4}$
$10,21 \times 10^{-3}$	45×10^{-3}	0,332	$8,32 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$10,21 \times 10^{-3}$	15×10^{-3}	0,505	$1,86 \times 10^{-4}$	$1,38 \times 10^{-4}$
Concentratie melkzuur	Concentratie Na lactaat	α	C_H	K
$5,85 \times 10^{-3}$	$44,88 \times 10^{-3}$	0,823	$2,51 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-4}$
$10,81 \times 10^{-3}$	$39,89 \times 10^{-3}$	0,831	$5,13 \times 10^{-5}$	$1,57 \times 10^{-4}$
$5,45 \times 10^{-3}$	$24,95 \times 10^{-3}$	0,855	$4,07 \times 10^{-5}$	$1,59 \times 10^{-4}$
$10,79 \times 10^{-3}$	$19,95 \times 10^{-3}$	0,863	$9,33 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^{-4}$

TABEL XI.

Potentiaalmetingen van zuur-zoutmengsels van preparaat III.

Concentratie melkzuur	Concentratie Ca lactaat	α	C_H	K
$9,76 \times 10^{-3}$	100×10^{-3}	0,451	$3,09 \times 10^{-5}$	$1,43 \times 10^{-4}$
$9,76 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,501	$3,72 \times 10^{-5}$	$1,44 \times 10^{-4}$
$9,76 \times 10^{-3}$	50×10^{-3}	0,552	$4,90 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^{-4}$
$9,76 \times 10^{-3}$	25×10^{-3}	0,646	$8,71 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-4}$
Concentratie melkzuur	Concentratie Zn lactaat	α	C_H	K
$19,52 \times 10^{-3}$	99×10^{-3}	0,237	$1,02 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$9,76 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,280	$6,31 \times 10^{-5}$	$1,36 \times 10^{-4}$
$9,76 \times 10^{-3}$	45×10^{-3}	0,332	$7,94 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$9,76 \times 10^{-3}$	15×10^{-3}	0,505	$1,82 \times 10^{-4}$	$1,42 \times 10^{-4}$

Concentratie melkzuur	Concentratie Na lactaat	α	C_H	K
$6,17 \times 10^{-3}$	$44,88 \times 10^{-3}$	0,823	$2,69 \times 10^{-5}$	$1,59 \times 10^{-4}$
$12,16 \times 10^{-3}$	$39,89 \times 10^{-3}$	0,831	$5,62 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-4}$
$6,28 \times 10^{-3}$	$24,95 \times 10^{-3}$	0,855	$4,57 \times 10^{-5}$	$1,55 \times 10^{-4}$
$11,28 \times 10^{-3}$	$19,95 \times 10^{-3}$	0,863	$1,05 \times 10^{-4}$	$1,59 \times 10^{-4}$

TABEL XII.

Potentiaalmetingen van zuur-zoutmengsels van preparaat IV.

Concentratie melkzuur	Concentratie Ca lactaat	α	C_H	K
$10,22 \times 10^{-3}$	100×10^{-3}	0,451	$3,16 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-4}$
$10,22 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,501	$3,80 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-4}$
$10,22 \times 10^{-3}$	50×10^{-3}	0,552	$5,37 \times 10^{-5}$	$1,46 \times 10^{-4}$
$10,22 \times 10^{-3}$	25×10^{-3}	0,646	$9,33 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-4}$

Concentratie melkzuur	Concentratie Zn lactaat	α	C_H	K
$20,44 \times 10^{-3}$	99×10^{-3}	0,237	$1,12 \times 10^{-4}$	$1,30 \times 10^{-4}$
$10,22 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,280	$6,61 \times 10^{-5}$	$1,36 \times 10^{-4}$
$10,22 \times 10^{-3}$	45×10^{-3}	0,332	$8,32 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$10,22 \times 10^{-3}$	15×10^{-3}	0,505	$1,74 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-4}$

Concentratie melkzuur	Concentratie Na lactaat	α	C_H	K
$5,7 \times 10^{-3}$	45×10^{-3}	0,823	$2,40 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-4}$
$10,7 \times 10^{-3}$	40×10^{-3}	0,831	$5,01 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-4}$
$5,42 \times 10^{-3}$	25×10^{-3}	0,855	$3,98 \times 10^{-5}$	$1,57 \times 10^{-4}$
$10,42 \times 10^{-3}$	20×10^{-3}	0,863	$9,77 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-4}$

TABEL XIII.

Potentiaalmetingen van zuur-zoutmengsels van preparaat V.

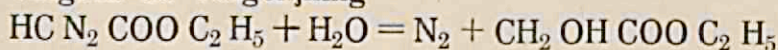
Concentratie melkzuur	Concentratie Ca lactaat	α	C_H	K
$10,18 \times 10^{-3}$	100×10^{-3}	0,451	$2,95 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-4}$
$10,18 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,501	$3,98 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-4}$
$10,18 \times 10^{-3}$	50×10^{-3}	0,552	$5,25 \times 10^{-5}$	$1,43 \times 10^{-4}$
$10,18 \times 10^{-3}$	25×10^{-3}	0,646	$8,91 \times 10^{-5}$	$1,43 \times 10^{-4}$

Concentratie melkzuur	Concentratie Zn lactaat	α	C_H	K
$20,36 \times 10^{-3}$	99×10^{-3}	0,237	$1,20 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$
$10,18 \times 10^{-3}$	75×10^{-3}	0,280	$6,46 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-4}$
$10,18 \times 10^{-3}$	45×10^{-3}	0,332	$8,32 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$10,18 \times 10^{-3}$	15×10^{-3}	0,505	$1,78 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-4}$

Concentratie melkzuur	Concentratie Na lactaat	α	C_H	K
$11,36 \times 10^{-3}$	$40,09 \times 10^{-3}$	0,826	$5,37 \times 10^{-5}$	$1,57 \times 10^{-4}$
$6,35 \times 10^{-3}$	$45,10 \times 10^{-3}$	0,818	$2,69 \times 10^{-5}$	$1,57 \times 10^{-4}$
$10,82 \times 10^{-3}$	$20,05 \times 10^{-3}$	0,864	$9,12 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-4}$
$5,81 \times 10^{-3}$	$25,06 \times 10^{-3}$	0,851	$4,17 \times 10^{-5}$	$1,55 \times 10^{-4}$

Methode c.

BREDIG¹⁾ maakt gebruik van de katalytische werking, die waterstofionen uitoefenen op de ontledingssnelheid van diazo-azijnzure aethylester, om de H-ionenconcentratie van een vloeistof te bepalen. De ontleding van dezen ester onder N ontwikkeling volgens de vergelijking



is, indien overmaat water ten opzichte van ester aanwezig is, een monomoleculaire reactie, zooals Bredig aantoonde. De hoeveelheid gevormde stikstof is dan op ieder tijdstip evenredig met de hoeveelheid dan aanwezige ester of

$$\frac{dx}{dt} = K(a-x)$$

a is de aanvangsconcentratie van den ester, gemeten door de hoeveelheid totaal gevormde stikstof, x is de hoeveelheid ontlede ester op het tijdstip t, ook gemeten door de hoeveelheid gevormde stikstof.

Geïntegreerd geeft deze vergelijking de snelheidsconstante K van de reactie.

$$K = \frac{1}{0,4343t} \times \log \frac{a}{a-x}$$

Bredig vindt K evenredig met de H-ionenconcentratie van de vloeistof, waaraan de ester wordt toegevoegd. Voor 0,001 N HNO_3 , dat als geheel gedissocieerd is beschouwd, waar de H-ionenconcentratie dus ook gelijk 10^{-3} genomen kan worden, vindt hij $K = 385 \times 10^{-4}$, als gemiddelde van een groot aantal bepalingen. Betrokken op een vloeistof met H-ionenconcentratie = 1 N is K dus 38,5 en voor een willekeurige vloeistof, met een snelheidsconstante K, is $C_H = \frac{K}{38,5}$

¹⁾ BREDIG, Verhandlungen des naturhist. medizin. Vereins zu Heidelberg, NF, IX Band 1 Heft.

Zie ook FRAENKEL, Zeitsch. physik. Chem., 60, 202. (1907).

De bepalingen van de H-ionenconcentraties van melkzuur zijn uitgevoerd op de manier, zooals door Bredig is aangegeven. Een beschrijving van een toestel, geschikt voor het schudden van het reactiemengsel en tevens voor het meten van het ontwikkelde gas, wordt gegeven door WALTON ¹⁾. De ester werd bewaard op barythydraat en vóór het gebruik eenige cm³ in vacuo afgedestilleerd. Afgedestilleerde ester werd nooit langer dan 2 dagen bewaard. De met baryt bewaarde ester bleef eenige maanden goed, wat gecontroleerd werd door een bepaling met 0,001 N HNO₃ en door te constateeren, dat de ester door water gedurende den tijd, dat een bepaling duurde, niet merkbaar werd ontleed. Drie verschillende esterpreparaten zijn gebruikt, waarvan herhaaldelijk geconstateerd werd, dat de ontleding met HNO₃ de juiste snelheidsconstante gaf. De tijd t is gemeten in minuten; de hoeveelheid gevormde stikstof in cm³.

De uitkomsten, volgens methode c verkregen, zijn:

Preparaat I.

TABEL XIV.

Katalysator 0,00877 N melkzuur

a = 35,1.

t	a-x	K
3	31,1	403×10^{-4}
5	28,7	402×10^{-4}
8	25,35	404×10^{-4}
10	23,35	408×10^{-4}
13	20,75	404×10^{-4}
16	18,40	404×10^{-4}
20	15,60	405×10^{-4}
25	12,78	404×10^{-4}
30	10,40	405×10^{-4}
35	8,48	406×10^{-4}
46	5,55	401×10^{-4}
66	2,40	407×10^{-4}
		gem. 404×10^{-4}

$$C_H = 1,05 \times 10^{-3}$$

$$K \text{ melkz.} = 1,43 \times 10^{-4}$$

¹⁾ WALTON, Zeitschr. Physik. Chem., 47, 188. (1904).

Katalysator 0,00917 N melkzuur

 $a = 27,58.$

t	a-x	K	
1	26,38	444×10^{-4}	
3	24,28	425×10^{-4}	
6	21,43	421×10^{-4}	
9	18,93	420×10^{-4}	$C_H = 1,10 \times 10^{-3}$
12	16,63	422×10^{-4}	K melkz. = $1,50 \times 10^{-4}$
16	14,13	447×10^{-4}	
21	11,56	414×10^{-4}	
27	8,90	419×10^{-4}	
34	6,68	417×10^{-4}	
44	4,48	418×10^{-4}	
55	2,98	418×10^{-4}	
		gem. 424×10^{-4}	

Preparaat II.

TABEL XV.

Katalysator 0,01011 N melkzuur

 $a = 22,86.$

t	a-x	K	
2	20,90	449×10^{-4}	
5	18,22	453×10^{-4}	
8	15,92	452×10^{-4}	
12	13,35	448×10^{-4}	$C_H = 1,18 \times 10^{-3}$
16	11,10	452×10^{-4}	K melkz. = $1,55 \times 10^{-4}$
21	8,75	457×10^{-4}	
26	6,95	458×10^{-4}	
60	1,47	457×10^{-4}	
		gem. 453×10^{-4}	

Katalysator 0,01011 N melkzuur

 $a = 28,75.$

t	a-x	K	
4	24,00	452×10^{-4}	
6	21,92	453×10^{-4}	
9	19,17	451×10^{-4}	
12	16,75	451×10^{-4}	
16	14,02	449×10^{-4}	$C_H = 1,18 \times 10^{-3}$
20	11,67	451×10^{-4}	K melkz. = $1,55 \times 10^{-4}$
25	9,20	455×10^{-4}	
30	7,30	457×10^{-4}	
55	2,70	455×10^{-4}	
		gem. 453×10^{-4}	

Preparaat III.

TABEL XVI.

Katalysator 0,01030 N melkzuur

 $a = 28,80$.

t	a-x	K	
2	26,50	417×10^{-4}	
4	24,32	422×10^{-4}	
6	22,38	421×10^{-4}	$C_H = 1,09 \times 10^{-3}$
8	20,58	420×10^{-4}	K melkz. = $1,29 \times 10^{-4}$
11	18,15	420×10^{-4}	
14	16,05	418×10^{-4}	
18	13,60	417×10^{-4}	
22	11,50	417×10^{-4}	
27	9,28	420×10^{-4}	
32	7,43	423×10^{-4}	
53	3,10	421×10^{-4}	
		gem. 420×10^{-4}	

Katalysator 0,00966 N melkzuur

 $a = 34,65$.

t	a-x	K	
1	33,30	398×10^{-4}	
2	32,00	398×10^{-4}	
3	30,75	400×10^{-4}	$C_H = 1,04 \times 10^{-3}$
4	29,53	400×10^{-4}	K melkz. = $1,27 \times 10^{-4}$
5	28,35	398×10^{-4}	
7	26,13	403×10^{-4}	
9	24,13	402×10^{-4}	
11	22,22	404×10^{-4}	
14	19,73	402×10^{-4}	
17	17,45	404×10^{-4}	
38	7,45	404×10^{-4}	
43	6,07	405×10^{-4}	
		gem. 402×10^{-4}	

Katalysator 0,00193 N melkzuur

 $a = 36,89$

t	a-x	K	
2	35,68	167×10^{-4}	
6	33,42	165×10^{-4}	
9	31,79	165×10^{-4}	
12	30,25	165×10^{-4}	
15	28,75	166×10^{-4}	
18	27,30	167×10^{-4}	$C_H = 0,431 \times 10^{-3}$
22	25,58	166×10^{-4}	$K_{\text{melkz.}} = 1,23 \times 10^{-4}$
26	23,92	167×10^{-4}	
31	22,02	166×10^{-4}	
36	20,26	166×10^{-4}	
41	18,62	166×10^{-4}	
51	15,70	167×10^{-4}	
61	13,25	168×10^{-4}	
71	11,19	168×10^{-4}	
		gem. 166×10^{-4}	

Preparaat IV; duplo-bepalingen van ongeveer eenzelfde concentratie worden verder niet vermeld, omdat de dissociatieconstanten van melkzuur, uit deze bepalingen berekend, niet meer dan drie eenheden in de 2e decimaal verschillen.

TABEL XVII.

Katalysator 0,01016 N melkzuur

 $a = 32,00$

t	a-x	K	
2	29,42	420×10^{-4}	
4	27,03	421×10^{-4}	
6	24,83	422×10^{-4}	
9	21,93	420×10^{-4}	
12	19,33	420×10^{-4}	$C_H = 1,085 \times 10^{-3}$
16	16,35	420×10^{-4}	$K_{\text{melkz.}} = 1,30 \times 10^{-4}$
20	13,87	418×10^{-4}	
25	11,30	416×10^{-4}	
30	9,23	414×10^{-4}	
52	3,68	416×10^{-4}	
63	2,33	416×10^{-4}	
		gem. 418×10^{-4}	

Katalysator 0,00506 N melkzuur

 $a = 30,00$

t	a-x	K	
4	26,70	291×10^{-4}	
6	25,22	289×10^{-4}	
9	23,18	287×10^{-4}	
12	21,30	286×10^{-4}	
15	19,50	287×10^{-4}	$C_H = 0,748 \times 10^{-3}$
19	17,40	287×10^{-4}	K melkz. = $1,27 \times 10^{-4}$
23	15,50	287×10^{-4}	
27	13,80	287×10^{-4}	
32	11,95	288×10^{-4}	
37	10,30	289×10^{-4}	
42	8,90	289×10^{-4}	
52	6,70	288×10^{-4}	
63	4,90	287×10^{-4}	
		gem. 288×10^{-4}	

Katalysator 0,00255 N melkzuur

 $a = 37,69$

t	a-x	K	
2	36,20	201×10^{-4}	
5	34,18	196×10^{-4}	
8	32,22	196×10^{-4}	
11	30,31	198×10^{-4}	
15	27,95	199×10^{-4}	
20	25,28	200×10^{-4}	
25	22,90	199×10^{-4}	$C_H = 0,517 \times 10^{-3}$
30	20,72	199×10^{-4}	K melkz. = $1,31 \times 10^{-4}$
40	17,02	199×10^{-4}	
50	13,88	200×10^{-4}	
60	11,30	201×10^{-4}	
70	9,20	201×10^{-4}	
80	7,50	202×10^{-4}	
90	6,08	202×10^{-4}	
		gem. 199×10^{-4}	

Preparaat V.

TABEL XVIII.
Katalysator 0,009614 N melkzuur
a = 36,47

t	a-x	K	
4	30,95	410×10^{-4}	
6	28,54	409×10^{-4}	
9	25,37	403×10^{-4}	
12	22,45	404×10^{-4}	$C_H = 1,060 \times 10^{-3}$
16	18,95	410×10^{-4}	K melkz. = $1,32 \times 10^{-4}$
20	16,05	410×10^{-4}	
25	13,12	409×10^{-4}	
30	10,65	410×10^{-4}	
40	7,09	409×10^{-4}	
50	4,72	409×10^{-4}	
62	2,95	406×10^{-4}	
75	1,77	403×10^{-4}	
		gem. 408×10^{-4}	

Katalysator 0,004572 N melkzuur
a = 32,98

t	a-x	K	
3	30,35	278×10^{-4}	
7	27,15	278×10^{-4}	
12	23,63	278×10^{-4}	
17	20,59	277×10^{-4}	$C_H = 0,717 \times 10^{-3}$
22	17,92	277×10^{-4}	K melkz. = $1,33 \times 10^{-4}$
29	14,78	277×10^{-4}	
41	10,70	275×10^{-4}	
51	8,12	273×10^{-4}	
62	6,04	274×10^{-4}	
77	4,07	272×10^{-4}	
		gem. 276×10^{-4}	

Katalysator 0,00226 N melkzuur
a = 36,25

t	a-x	K	
3	34,32	182×10^{-4}	
11	33,47	184×10^{-4}	
16	27,00	184×10^{-4}	$C_H = 0,475 \times 10^{-3}$
22	24,20	184×10^{-4}	K melkz. = $1,26 \times 10^{-4}$
28	21,72	183×10^{-4}	
35	19,09	183×10^{-4}	
45	15,82	184×10^{-4}	
55	13,18	184×10^{-4}	
73	9,50	183×10^{-4}	
91	6,92	182×10^{-4}	
		gem. 183×10^{-4}	

Van preparaat V is de H-ionenconcentratie van het zuivere zuur ook colorimetrisch bepaald. De gebruikte indicatoren waren tropaeoline-00 en methanylgeel. De bepalingen werden uitgevoerd in reageerbuizen van gelijken diameter en als vergelijkingsvloeistoffen werden versch gemaakte HCl oplossing gebruikt. Daar bij deze wijze van werken een stoornis zou kunnen optreden door de aanwezigheid van de ongedissocieerde zuurmoleculen, die eenigzins vergelijkbaar is met de zoutfout van den indicator, is getracht hierin eenig inzicht te krijgen. Daartoe werd van 0,1 mol. fosphaatoplossing (fosphaat + HCl) en 0,4 mol. acetaatoplossing (Na acetaat + HCl) de H-ionenconcentratie electrometrisch bepaald. Daarna werd deze colorimetrisch bepaald met HCl als vergelijkingsvloeistof.

De uitkomst hiervan was het volgende, de H-ionenconcentratie uitgedrukt als de negatieve machtslogarithme p_H :

p_H (H electrode)	p_H (colorimetrisch)
0,1 mol. fosphaat 2,25	2,25 met tropaeoline 00
0,4 mol. acetaat 2,03	2,09 " "
0,1 mol. fosphaat 2,27	2,27 " methanylgeel
0,4 mol. acetaat 2,46	2,50 " "

In een 0,1 mol. melkzuur oplossing behoeft naar alle waarschijnlijkheid geen rekening gehouden te worden met een mogelijk foutieve aanwijzing van deze indicatoren.

Met den indicator tetrabroomphenolsulfonphtaleine zijn geen goede uitkomsten verkregen. Het preparaat, dat ik tot mijn beschikking had, vertoonde in zoutoplossingen een kleur, die zeer afwijkend was van die in zuiver HCl van dezelfde waterstof-ionenconcentratie.

De uitkomst van de colorimetrische bepalingen was in 0,0924 N. melkzuur:

	C_H	K
met tropaeoline-00	$3,69 \times 10^{-3}$	$1,54 \times 10^{-4}$
met methanylgeel	$3,63 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^{-4}$

De verschillen, die optreden bij de bepaling van de dissociatieconstante volgens verschillende methoden, en die zich bij alle

vijf preparaten vrij regelmatig herhalen, hebben nog tot de overweging geleid om de H-ionenconcentratie van melkzuur te bepalen door de snelheid der rietsuikerinversie. Hoewel deze methode onafhankelijk is van de voorgaanden is hiervan toch afgezien. De invloed van de niet gedissocieerde zuurmoleculen op de snelheid van rietsuikerinversie is namelijk zeer slecht mathematisch uit te drukken, zoodat voor een nauwkeurige bepaling de methode toch eigenlijk niet in aanmerking komt, afgezien van den langen duur ($\pm$ drie weken), die een bepaling met 0,1 N melkzuur bij 25° zou eischen.

Zoo vindt OSTWALD¹⁾ geen constante verhouding tusschen inversiesnelheid en H-ionenconcentratie; 0,5 N HCl. inverteert $6,07 \times$ zoo snel als 0,1 N. ARRHENIUS²⁾ heeft den invloed nagegaan van de ongedissocieerde moleculen van een zwak zuur op de inversiesnelheid. Deze verhoogden de inversieconstante, hoe sterker het zuur, hoe grooter de relatieve invloed. COHEN³⁾ vindt, dat rietsuiker bij 80° door water duidelijk wordt geïnverteerd en schrijft dit toe aan de zure eigenschappen van rietsuiker, glucose en fructose, door hem aangetoond.

Bij de beoordeeling der uitkomsten, verkregen met de verschillende preparaten volgens de drie methoden, kan preparaat II buiten beschouwing blijven wegens het H₂SO₄ gehalte.

De verkregen uitkomsten zijn dus:

Preparaat I.

Methode a.		Methode b.		
		mengsels	mengsels	mengsels
		Na lact.-melkz.	Ca lact.-melkz.	Zn lact.-melkz.
$1,54 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-4}$			
$1,56 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-4}$			
$1,52 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-4}$	$1,17 \times 10^{-4}$
$1,51 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-4}$	$1,24 \times 10^{-4}$
$1,37 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-4}$	$1,53 \times 10^{-4}$	$1,41 \times 10^{-4}$	$1,30 \times 10^{-4}$
$1,37 \times 10^{-4}$	$1,41 \times 10^{-4}$	$1,56 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-4}$
		Methode c.		
		$1,43 \times 10^{-4}$		
		$1,50 \times 10^{-4}$		

1) OSTWALD, Journ. f. prakt. chem., 31, 307. (1885).

2) ARRHENIUS, Zeitschr. physik. chem., 4, 237. (1889).

3) COHEN, Zeitschr. physik. chem., 37, 69. (1901).

Preparaat III.

Methode a.		Methode b.		
		mengsels	mengsels	mengsels
		Na lact.-melkz.	Ca lact.-melkz.	Zn lact.-melkz.
$1,46 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-4}$			
$1,46 \times 10^{-4}$	$1,48 \times 10^{-4}$			
$1,47 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-4}$	$1,59 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$1,46 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,53 \times 10^{-4}$	$1,44 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-4}$
$1,46 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$1,37 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^{-4}$	$1,59 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-4}$	$1,44 \times 10^{-4}$
$1,37 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-4}$			

Methode c.

$1,29 = 10^{-4}$

$1,27 \times 10^{-4}$

$1,23 \times 10^{-4}$

Preparaat IV.

Methode a.		Methode b.		
		mengsels	mengsels	mengsels
		Na lact.-melkz.	Ca lact.-melkz.	Zn lact.-melkz.
$1,45 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-4}$			
$1,45 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-4}$			
$1,43 \times 10^{-4}$	$1,44 \times 10^{-4}$	$1,56 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-4}$	$1,30 \times 10^{-4}$
$1,40 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$	$1,56 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-4}$
$1,37 \times 10^{-4}$	$1,42 \times 10^{-4}$	$1,57 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$1,35 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-4}$	$1,62 \times 10^{-4}$	$1,48 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-4}$
$1,35 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^{-4}$			

Methode c.

$1,30 \times 10^{-4}$

$1,27 \times 10^{-4}$

$1,31 \times 10^{-4}$

Preparaat V.

Methode a.		Methode b.		
		mengsels	mengsels	mengsels
		Na lact.-melkz.	Ca lact.-melkz.	Zn lact.-melkz.
$1,51 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$			
$1,53 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$			
$1,51 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$	$1,57 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$
$1,51 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-4}$	$1,57 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^{-4}$
$1,50 \times 10^{-4}$	$1,49 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-4}$
$1,47 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-4}$
$1,47 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-4}$			

Methode c.

$1,32 \times 10^{-4}$

$1,33 \times 10^{-4}$

$1,26 \times 10^{-4}$

Colorimetrisch

$1,54 \times 10^{-4}$

$1,49 \times 10^{-4}$

Zonder op het oogenblik nog op een bespreking van de afwijkingen, die de uitkomsten der verschillende methoden vertoonen, nader in te gaan, meen ik er toch reeds de conclusie uit te mogen trekken, dat waarden als 3.1×10^{-4} (Goldschmidt en Bürkle) en die van den meest recenten datum 2.5×10^{-4} (Van Slyke en Baker 1918) niet juist kunnen zijn en de waarde voor K bij 25° het dichtst ligt bij de door Ostwald gegevene. De laagste waarde, die gevonden is, is 1.17×10^{-4} , de hoogste 1.62×10^{-4} . Dat de meting der H-ionenconcentratie van een oplossing van een zuiver zuur zonder eenige bufferwerking zooals van Slyke en Baker doen, niet altijd de juiste uitkomst kan geven, is ook voor melkzuur aangetoond. Worden echter bovendien hun waarden, verkregen langs electrometrischen weg met mengsels van Ca lactaat en melkzuur, omgerekend met den gevonden dissociatiegraad van Ca lactaat (zie bl. 11), dan wordt voor de dissociatieconstante van melkzuur gevonden:

$$1.41 \times 10^{-4}$$

$$1.34 \times 10^{-4}$$

$$1.34 \times 10^{-4}$$

$$1.35 \times 10^{-4}$$

$$1.30 \times 10^{-4}$$

enz.

Deze waarden wijken niet noemenswaard af van die, op dezelfde wijze gevonden, bij de vier boven besproken preparaten. Dat van Slyke en Baker door directe meting der H-ionenconcentratie van zuiver melkzuur waarden vinden, die overeenkomen met de, op foutieve wijze berekende uitkomsten, verkregen door metingen aan mengsels, moet dus aan compensatie van fouten worden toegeschreven. Het is ook niet onmogelijk, dat ze een minder zuiver preparaat gebruikt hebben, een verontreiniging komt bij meting van de H-ionenconcentratie van het zuur eerder tot uiting dan bij de meting van mengsels.

Preparaat V kan op grond van de zuivering, die er op toegepast is, als een zuiver preparaat beschouwd worden. Bij vergelijking van de cijfers, die de verschillende methoden ook voor dit zuur opleveren, is het niet mogelijk zonder meer tot een waarde van K te besluiten.

Methode b is niet de meest nauwkeurige om tot de waarde voor K te komen. Uit de metingen van de mengsels van Na lactaat en melkzuur blijkt, dat wel eens een waarde wordt gevonden, die buiten de andere valt. Een afwijking van $\frac{1}{2}$ millivolt in de potentiaalmeting geeft dan ook een verandering van ongeveer vier eenheden in de 2e decimaal der dissociatieconstante. Bij de metingen, verricht met mengsels van Ca lactaat en melkzuur en bij die met mengsels van Zn lactaat en melkzuur, ondergaat de uitkomst waarschijnlijk den invloed van het niet juist kennen der lactaationenconcentratie in oplossingen van Ca lactaat en in die van Zn lactaat. De lage dissociatiegraad, bij deze zouten gevonden, naast de bekende neiging van Ca en Zn om complexe ionen te vormen, deed al dadelijk vermoeden, dat in een oplossing van Ca lactaat en in een van Zn lactaat andere ionen dan Ca- en lactaat-, resp. Zn- en lactaationen bestaan. Dat de metingen van deze mengsels toch zijn uitgevoerd naast die van Na lactaat en melkzuur, was om te zien of de in de literatuur voorkomende afwijking van K hierdoor misschien verklaard zou worden. Dit is gebleken niet het geval te zijn. De electrometrische bepalingen, verricht met mengsels van melkzuur en Na lactaat, doen zien, dat deze methode bruikbare uitkomsten geeft, aangezien hier van complexe ionisatie geen sprake kan zijn; die, verricht met mengsels van Ca lactaat en melkzuur, resp. met Zn lactaat en melkzuur, wijken, hoewel niet veel, toch duidelijk van de eerstgenoemde af. De verklaring hiervan is naar alle waarschijnlijkheid de bovengenoemde onzekerheid in de lactaationenconcentratie.

Viscositeitsmetingen, verricht aan oplossingen van 0,1 N Zn-, 0,1 N Ca- en 0,1 N Na lactaat (25°), hebben doen zien, dat de uitkomst der berekening van de lactaationenconcentratie uit het geleidingsvermogen, in oplossingen van Zn lactaat en Ca lactaat niet den invloed ondergaat van een abnormaal hoge viscositeit van deze oplossingen in vergelijking met die van Na lactaat. Dit maakt het nog meer waarschijnlijk, dat bij oplossingen van Zn lactaat en Ca lactaat aan complexiteit gedacht moet worden.

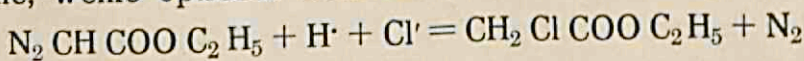
Te dien einde heb ik de uitkomsten, verkregen met de potentiometrische bepalingen der mengsels van Ca- resp. Zn lactaat en melk-

zuur niet gebruikt om de lactaationenconcentratie van de oplossingen van Ca- en Zn lactaat te berekenen. De meting der H-ionenconcentratie had, indien ze voor dit doel gebruikt moest worden, een grootere maat van nauwkeurigheid vereischt. Er is namelijk altijd met een capillair electrometer gewerkt als nul-instrument; een galvanometer had dan toch tenminste gebruikt moeten worden.

Methode a en c lijken beide zeer nauwkeurige bepalingswijzen om de dissociatieconstante van een zuur te leeren kennen. De methode volgens Bredig geeft uitkomsten, waarvan de duplo-bepalingen altijd onderling zeer weinig afwijken; de reactieconstante is in alle onderzochte gevallen goed constant gevonden. De methode volgens Bredig heeft niettemin bij nagenoeg alle zuren een lagere waarde opgeleverd voor K, dan die verkregen door meting van het geleidingsvermogen.¹⁾ Ik heb bij de berekeningen van de bacteriologische proeven voor K de waarde genomen, gevonden uit de metingen van het geleidingsvermogen van preparaat V in verschillende verdunningen. Een poging namelijk, om het verschil in de uitkomsten, verkregen met methode a en die met c op te helderen, is in zoo verre geslaagd, dat ik daar de conclusie uit meen te mogen trekken, dat de methode volgens Bredig voor een nauwkeurige bepaling der dissociatieconstante van melkzuur niet in aanmerking kan komen en een weinig te lage waarden voor K *moet* geven.

K melkzuur = $1,5 \times 10^{-4}$ (25°) is de waarde, die naar alle waarschijnlijkheid het dichtst bij de juiste is.

Daar de methode Bredig altijd lagere waarden voor K opleverde, dan die gevonden langs anderen weg, is allereerst gedacht aan het optreden van een nevenreactie bij de esterontleding, analoog aan die, welke optreedt wanneer zoutzuur aanwezig is.



¹⁾ Door van Dam (loc. cit.) is bij 18° geen afwijking gevonden bij gebruik maken van het geleidingsvermogen en de methode Bredig ter bepaling van K. Of de verklaring van deze overeenstemming te zoeken is in de temperatuurcoëfficiënt, door van Dam gebruikt, wordt ook door het hier volgende onderzoek niet opgehelderd.

Deze bijreactie verraadt zich, daar het werkzame katalytische agens dan verbruikt wordt, door een afneming van de snelheidsconstante tijdens de reactie. De snelheidsconstante is echter met melkzuur, ook als de proef zeer lang werd voortgezet, altijd constant gevonden; er is nooit een neiging tot afneming geconstateerd kunnen worden. Dit maakt het niet waarschijnlijk, dat het melkzuur anders dan katalytisch bij de reactie in werking treedt.

Wanneer het melkzuur tijdens de reactie op de één of andere wijze werd verbruikt, zou het geleidingsvermogen na afloop der reactie, vergeleken met dat van zuur van dezelfde concentratie waaraan evenveel water als in het andere geval ester was toegevoegd, nl. 1 0/0, zeer duidelijk afgenomen moeten zijn. Proeven hierover genomen, waarbij melkzuur vergeleken werd met azijnzuur (een zuur waarmee Bredig goede resultaten heeft verkregen) gaven zulke onregelmatige uitkomsten, dat er geen conclusie uit te trekken was. Bij een systematisch onderzoek, later verricht met propionzuur, bleek dit te moeten worden toegeschreven aan de verzeeping van de gevormde glycolzure aethylester. Een mengsel van propionzuur en ontlede diazoglycolzure aethylester had geen constant geleidingsvermogen. Dit werd iedere 24 uur gemeten en het nam regelmatig toe. Op deze manier was dus niet tot een bruikbare verklaring van het verschijnsel te komen.

Om een algemeene verklaring voor de afwijking te vinden was het noodig om eerst met andere zwakke organische zuren bepalingen te verrichten. Het eenige éénbasische zwakke organische zuur, dat Bredig heeft gebruikt bij de contrôle van zijn methode, is azijnzuur geweest. Zooals bekend, is mierenzuur, dat een veel sterker zuur is dan azijnzuur, hiervan een veel voorkomende verontreiniging.

De uitkomsten, verkregen met de methode Bredig, zijn door mij vergeleken met die, verkregen uit de meting van het geleidingsvermogen in verschillende verdunningen, bij de volgende drie organische zuren:

- 1e azijnzuur
- 2e propionzuur
- 3e boterzuur.

Het azijnzuur was een preparaat afkomstig, van Prof. Schoorl bereid door herhaald uitvriezen van zuiver azijnzuur. Het bevatte slechts 0,01 % mierenzuur.

Het propionzuur was een preparaat van Kahlbaum. Er werd van het zuur als zoodanig het geleidingsvermogen in verschillende verdunningen bepaald. De waarde voor de dissociatieconstante, gevonden bij verschillende verdunningen, was een vrij goed constante en vrijwel overeenkomend met de in de literatuur opgegevene. Het propionzuur werd daarna gefractionneerd gedestilleerd. Van twee op elkaar volgende fracties werd weer het geleidingsvermogen in vier verdunningen bepaald. De uitkomsten hiervan waren zoo goed overeenstemmend en weken zoo weinig af van die van het oorspronkelijke zuur, dat dit als een zuiver preparaat is beschouwd. Voor de bepalingen volgens Bredig is één van de twee onderzochte fracties gebruikt.

Het normale boterzuur was ook een preparaat van Kahlbaum; is geheel op dezelfde wijze als propionzuur onderzocht en gedestilleerd. De uitkomsten waren hier ook zoo bevredigend, dat tot een zuiver preparaat besloten kon worden.

De uitkomsten, verkregen volgens de twee verschillende methoden met de drie zuren, zijn de volgende. Opgave van duplo-bepalingen is bij beide methoden achterwege gelaten omdat die bevredigend klopten. Die van het geleidingsvermogen, gemeten met ongeplatineerde electroden, hadden de vereischte overeenstemming; die van de methode volgens Bredig, alle bepaald bij 25°, wijken hoogstens twee eenheden in de 2e decimaal in de waarde der dissociatieconstante van het betreffende zuur onderling af.

Azijnzuur.

Methode a. Het equivalent geleidingsvermogen van azijnzuur bij oneindige verdunning is $349 + 42,6 = 391,6$ genomen.

TABEL XIX.

Geleidingsvermogen azijnzuur.

concentratie	χ_{25}	α	K
0,1016 N	$5,320 \times 10^{-4}$	0,0134	$1,85 \times 10^{-5}$
0,0508 N	$3,703 \times 10^{-4}$	0,0186	$1,79 \times 10^{-5}$
0,0254 N	$2,598 \times 10^{-4}$	0,0262	$1,79 \times 10^{-5}$
0,0127 N	$1,816 \times 10^{-4}$	0,0369	$1,80 \times 10^{-5}$
0,0064 N	$1,282 \times 10^{-4}$	0,0515	$1,78 \times 10^{-5}$
0,0032 N	$0,887 \times 10^{-4}$	0,0713	$1,74 \times 10^{-5}$

Methode c.

TABEL XX.
Katalysator 0,1031 N azijnzuur
a = 33,10.

t	a-x	K	
2	29,95	500×10^{-4}	
4	27,12	498×10^{-4}	$C_H = 1,30 \times 10^{-3}$
7	23,38	496×10^{-4}	$K_{\text{azijnz.}} = 1,66 \times 10^{-5}$
10	20,15	497×10^{-4}	
14	16,50	497×10^{-4}	
18	13,47	499×10^{-4}	
23	10,48	500×10^{-4}	
38	4,90	503×10^{-4}	
48	2,88	509×10^{-4}	
		gem. 500×10^{-4}	

Katalysator 0,02026 N azijnzuur
a = 36,95

t	a-x	K	
3	34,60	219×10^{-4}	
6	32,35	221×10^{-4}	$C_H = 0,574 \times 10^{-3}$
10	29,70	218×10^{-4}	$K_{\text{azijnz.}} = 1,67 \times 10^{-5}$
15	26,64	218×10^{-4}	
20	23,78	220×10^{-4}	
27	20,32	221×10^{-4}	
35	16,90	223×10^{-4}	
48	12,67	223×10^{-4}	
62	9,39	221×10^{-4}	
83	5,87	222×10^{-4}	
		gem. 221×10^{-4}	

De literatuur geeft voor de waarde van $K_{\text{azijnzuur}} 1,8 \times 10^{-5}$ (25)¹⁾.
Propionzuur.

Methode a. Het aequivalent geleidingsvermogen bij oneindige verdunning voor propionzuur is $349 + 37,9 = 386,9$ genomen.

TABEL XXI.
Geleidingsvermogen propionzuur.

concentratie	χ_{25}	α	K
0,1038 N	$4,664 \times 10^{-4}$	0,0116	$1,41 \times 10^{-5}$
0,0542 N	$3,352 \times 10^{-4}$	0,0160	$1,42 \times 10^{-5}$
0,0259 N	$2,330 \times 10^{-4}$	0,0233	$1,44 \times 10^{-5}$
0,0065 N	$1,144 \times 10^{-4}$	0,0455	$1,41 \times 10^{-5}$
0,0033 N	$8,012 \times 10^{-5}$	0,0637	$1,41 \times 10^{-5}$

¹⁾ Zie voor de opgave van de dissociatieconstanten van organische zuren (25⁰) bv. de tabellen in KOHLRAUSCH u. HOLBORN, Das Leitvermögen der Elektrolyte 2e Auflage.

Methode c.

TABEL XXII.
Katalysator 0,1137 N propionzuur
 $a = 32,62$.

t	a-x	K	
2	29,77	457×10^{-4}	
4	27,16	458×10^{-4}	
6	24,78	458×10^{-4}	
9	21,55	461×10^{-4}	$C_H = 1,20 \times 10^{-3}$
12	18,78	460×10^{-4}	K propionz. $= 1,28 \times 10^{-5}$
16	15,65	459×10^{-4}	
20	12,95	462×10^{-4}	
25	10,23	464×10^{-4}	
40	5,05	466×10^{-4}	
50	3,13	469×10^{-4}	
85	0,62	466×10^{-4}	
		gem. 462×10^{-4}	

De literatuur geeft voor K propionzuur de waarde $1,3 \times 10^{-5}$ aan.

Boterzuur.

methode a. Het aequivalent geleidingsvermogen van boterzuur bij oneindige verdunning is $349 + 34,1 = 383,1$ genomen.

TABEL XXIII.
Geleidingsvermogen boterzuur.

Concentratie	χ_{25}	α	K
0,0498 N	$3,254 \times 10^{-4}$	0,0171	$1,47 \times 10^{-5}$
0,0249 N	$2,330 \times 10^{-4}$	0,0244	$1,52 \times 10^{-5}$
0,0125 N	$1,627 \times 10^{-4}$	0,0341	$1,50 \times 10^{-5}$
0,0062 N	$1,143 \times 10^{-4}$	0,0479	$1,50 \times 10^{-5}$
0,0031 N	$7,950 \times 10^{-5}$	0,0667	$1,48 \times 10^{-5}$
0,0016 N	$5,462 \times 10^{-5}$	0,0917	$1,44 \times 10^{-5}$

Methode c.

TABEL XXIV.
Katalysator 0,09328 N boterzuur.
 $a = 35,98$

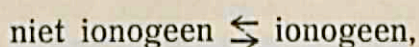
t	a-x	K	
2	33,05	427×10^{-4}	
4	30,30	431×10^{-4}	
6	27,85	428×10^{-4}	$C_H = 1,12 \times 10^{-3}$
9	24,50	429×10^{-4}	K boterz. $= 1,35 \times 10^{-5}$
12	21,48	431×10^{-4}	
16	18,10	430×10^{-4}	
21	14,60	430×10^{-4}	
26	11,82	429×10^{-4}	
34	8,38	430×10^{-4}	
46	5,00	430×10^{-4}	
59	2,78	435×10^{-4}	
		gem. 430×10^{-4}	

De literatuur geeft voor K boterzuur $1,5 \times 10^{-5}$.

Uit de cijfers blijkt, dat bij de drie onderzochte zuren dezelfde soort afwijking als bij melkzuur wordt gevonden. Het zou mogelijk kunnen zijn, dat er door de toevoeging van den ester invloed wordt uitgeoefend op de dissociatie van het zuur.

ARRHENIUS¹⁾ heeft een uitvoerige studie gemaakt over den invloed, die toevoeging van kleine hoeveelheden niet-electrolyten op het geleidingsvermogen van electrolyten uitoefent. De invloed van verschillende suikers, alcoholen en esters is hierbij nagegaan. Hij komt tot de conclusie, dat bij zwakke electrolyten de vermindering van het geleidingsvermogen niet alleen veroorzaakt wordt door de ontstane verhoogde viscositeit van de vloeistof. Bij zwakke zuren wordt door toevoeging van niet-geleiders de dissociatie verminderd.

KOLTHOFF²⁾ gebruikt den grooten invloed, die kleine hoeveelheden alcohol op het geleidingsvermogen van organische zuren hebben, om het alcoholgehalte van een vloeistof te bepalen. Hij acht het waarschijnlijk, dat het evenwicht:



dat in een waterige oplossing van organische zuren bestaat, door alcohol naar links wordt verplaatst. Dit is een andere verklaring van de door Arrhenius onderzochte gevallen, maar komt toch ook hierop neer, dat een zwak organisch zuur in een milieu, waarvan een zeer klein gedeelte van het water is vervangen door een niet-electrolyt, een kleinere dissociatieconstante heeft dan in een waterig milieu.

Ik heb het waarschijnlijk geacht, dat de regelmatig terugkeerende afwijking in de dissociatieconstanten van zwakke organische zuren, gevonden met de methode Bredig, was toe te schrijven aan den invloed van het milieu. Er is daarom gemeten of de vermindering van het geleidingsvermogen van HNO_3 bij vervanging van 1% water door glycolzure aethyl-ester relatief kleiner was dan die van het geleidingsvermogen

1) ARRHENIUS Zeitschr. Physik. Chem., 9, 487. (1892).

2) KOLTHOFF, Rec. trav. chim., 39, 126. (1920).

der organische zuren. Er is bij het begin van de reactie volgens Bredig diazo-ester aanwezig, die tijdens de reactie verandert in glycolzure ester. Het was niet mogelijk om den invloed van den diazo-ester op het geleidingsvermogen van de zuren te meten, omdat deze onder gasontwikkeling ontleedt. Er kan echter wel worden aangenomen, dat de invloed van deze twee esters niet veel zal verschillen. De glycolzure aethylester is bereid volgens FISCHER.¹⁾ Het verkregen product werd eenige malen gefractioneerd. Ten slotte is een fractie, die tusschen 159° en 160° overging, gebruikt. Het geleidingsvermogen van een 1% waterige oplossing van dezen ester was 3×10^{-6} (25°) en nam iets toe door verzeeping. De invloed van den ester op het geleidingsvermogen van zuren is nagegaan. In het ééne geval werd aan de oplossing van het zuur 1% (volume) water toegevoegd, in het andere 1% ester.

De uitkomsten waren de volgende, in de eerste cijferkolom is het geleidingsvermogen van de oplossing van het zuur vermeld, in de 2de dat van het zuur, wanneer 1% van het oplosmiddel door ester is vervangen, in de 3de de relatieve vermindering, in %, die het geleidingsvermogen hierdoor ondergaat.

			χ_{25} zuur in H ₂ O	χ_{25} zuur + ester	Δ
H NO ₃	± 0,001	N	$4,162 \times 10^{-4}$	$4,094 \times 10^{-4}$	1,63 %
azijnzuur	± 0,1	N	$5,296 \times 10^{-4}$	$5,101 \times 10^{-4}$	3,68 %
propionz.	± 0,1	N	$4,575 \times 10^{-4}$	$4,388 \times 10^{-4}$	4,09 %
boterzuur	± 0,1	N	$4,563 \times 10^{-4}$	$4,373 \times 10^{-4}$	4,16 %
melkzuur	± 0,01	N	$4,385 \times 10^{-4}$	$4,142 \times 10^{-4}$	5,52 %
melkzuur	± 0,005	N	$2,948 \times 10^{-4}$	$2,802 \times 10^{-4}$	4,92 %
melkzuur	± 0,0025	N	$2,007 \times 10^{-4}$	$1,902 \times 10^{-4}$	5,23 %

Duplo-bepalingen gaven vrijwel overeenstemmende waarden, hoewel de metingen aan eenige onzekerheid onderhevig zijn door het betrekkelijk groote, en niet geheel constante, geleidingsvermogen van den glycolzuren ester zelf. Er kan echter toch wel de conclusie uit getrokken worden, dat in een milieu waarin 1% ester aanwezig is, zooals bij de uitvoering van de methode Bredig het geval is, deze zuren een iets lagere dissociatie-

¹⁾ FISCHER, Ber. d. d. chem. Ges., 28, 3256. (1895).

constante dan in water moeten vertoonen. De bepaling der H ionenconcentratie volgens Bredig is, in den vorm waarin ze door Bredig is gegeven, niet geschikt voor nauwkeurige bepaling der dissociatieconstante van zwakke organische zuren.

Men kan aannemen, dat de invloed, die de toevoeging van een niet-electrolyt op het geleidingsvermogen heeft van een zwak zuur, uit twee factoren is samengesteld. De ééne factor bestaat in de verhooging der viscositeit. Bij sterke en zwakke zuren kan men aannemen dat, de invloed der viscositeit dezelfde is. Het grootste gedeelte van het geleidingsvermogen van een zuur wordt veroorzaakt door het H-ion, dat bij allen hetzelfde is. Daarbij komt dan bij zwakke electrolyten de invloed, die de niet-electrolyt heeft op de dissociatie, of op het evenwicht ionogeen $\rightleftharpoons$ niet ionogeen, wat praktisch op hetzelfde neerkomt.

Bij kleine hoeveelheden toegevoegde niet-electrolyt zijn deze twee factoren als additief te beschouwen, zooals ARRHENIUS ¹⁾ dat aangeeft.

Uit de afwijking van de dissociatieconstante van een zwak zuur, gevonden met de methode Bredig, is de invloed te berekenen die 1 % ester op den dissociatiegraad van het zuur heeft. Bij de metingen van het geleidingsvermogen ondergaat de uitkomst zoowel den invloed van de verandering der viscositeit als die van den dissociatiegraad. Het verschil van de twee afwijkingen bij deze zwakke zuren zou, indien de bepalingen voldoende nauwkeurig geweest waren, (wat, zooals boven bij meting van het geleidingsvermogen is aangegeven, nog wel eens wat te wenschen overlaat) ongeveer de invloed van de verandering der viscositeit moeten zijn: d.i. de invloed, die toevoeging van 1 % ester op het geleidingsvermogen van HNO_3 heeft, n.l. $\pm 1,6\%$.

Het is gebleken, dat de bepalingen op deze wijze niet voldoende nauwkeurig zijn uit te voeren om den invloed, die toevoeging van 1 % ester heeft op het geleidingsvermogen van zwakke zuren, te splitsen in de twee factoren, waaruit hij is samengesteld. Dit blijkt uit de volgende tabel; K is de disso-

¹⁾ ARRHENIUS, loc. cit.

ciatieconstante van het betreffende zuur, gevonden uit meting van het geleidingsvermogen, α ber. is de daaruit berekende dissociatiegraad, α gev. de dissociatiegraad, gevonden uit een bepaling volgens Bredig; factor II is de afwijking, op deze wijze in den dissociatiegraad gevonden in $\%$ uitgedrukt, factor I + II de procentische invloed van 1 $\%$ ester op het geleidingsvermogen. Het verschil tusschen factor I + II en factor II zou de invloed moeten zijn, die de verandering der viscositeit op het geleidingsvermogen heeft en dus $\pm 1,6$. Het blijkt wel, dat dit niet het geval is.

TABEL XXV.

	K	α ber.	α gev.	factor II	factor I + II
0,0096 N melkz.	$1,50 \times 10^{-4}$	0,117	0,110	5,13	5,52
0,0046 N melkz.	$1,50 \times 10^{-4}$	0,165	0,157	4,85	4,92
0,0026 N melkz.	$1,50 \times 10^{-4}$	0,215	0,203	5,58	5,23
0,0995 N azijnz.	$1,80 \times 10^{-5}$	0,0134	0,0131	2,24	3,68
0,1137 N propionz.	$1,41 \times 10^{-5}$	0,0111	0,0106	4,50	4,09
0,0933 N boterz.	$1,48 \times 10^{-5}$	0,0125	0,0120	4,00	4,16

Hoewel de meting van het geleidingsvermogen van de zuren, waaraan ester is toegevoegd, evenals deze meting van den ester, opgelost in water, onnauwkeurig is door de verzeeping, is het toch opmerkelijk, dat het verschil tusschen factor II en factor I + II nergens in de nabijheid ligt van de waarde van den invloed, die de ester heeft op het geleidingsvermogen van HNO_3 d.i. 1,6. Een verklaring hiervan heb ik niet kunnen vinden.

HOOFDSTUK II.

QUANTITATIEVE BEPALINGEN BIJ DE MELKZUURGISTING.

Het oorspronkelijke doel van dit bacteriologische onderzoek, verricht met melkzuurbacteriën, was de samenstelling van een kunstmatigen voedingsbodem daarvoor, die in eigenschappen vergelijkbaar zou zijn met melkwei. Een dergelijke voedingsbodem zou, om waarde te hebben, gemakkelijk reproduceerbaar moeten zijn en dus nauwkeurig omschreven; de voedingsstoffen zouden zooveel mogelijk gelijkwaardig moeten zijn aan die, welke in de wei voorkomen, de bufferwerking en de zuurgraad ervan zouden constant moeten zijn.

Zooals in de inleiding werd gezegd, maken de onderzoekingen van VAN DAM¹⁾ en van SVANBERG²⁾ het zeer waarschijnlijk, dat bij het einde van de melkzuur gisting de hoeveelheid ongedissocieerde melkzuurmoleculen een constante waarde heeft. Uit de genoemde onderzoekingen blijkt immers, dat, ook wanneer de H-ionenconcentratie van de melkwei of het melkserum verkleind wordt door toevoeging van Na-lactaat, toch de gisting eindigt bij een bepaalde concentratie van de ongedissocieerde melkzuurmoleculen. Het lijkt dus de aangewezen weg om bij beoordeeling van melkzuur gisting in verschillende voedingsbodems de concentraties ongedissocieerd melkzuur met elkaar te vergelijken. Het is immers gebleken, dat de hoeveelheid totaal gevormd zuur evenmin als de bereikte H-ionenconcentratie voor een bepaalde stam een constante waarde heeft. Deze beide factoren veranderen met de bufferwerking van het voedingsmedium, ook al wordt dit overigens onveranderd gelaten.

¹⁾ VAN DAM, Biochem. Zeitschr., 87, 107. (1918).

²⁾ SVANBERG, Inaugural Dissertation. (1918).

Het onderzoek naar de hoeveelheid ongedissocieerde melkzuurmoleculen, waarbij de gisting eindigt diende voor willekeurige stammen bevestigd, en op sommige punten eenigszins uitgebreid te worden, wanneer de waarde van de constante als beoordeelingsfactor van de melkzuur gisting moet dienen ook in andere voedingsbodem dan wei. Ik zal deze hoeveelheid, uitgedrukt in gram-moleculen per L, in het vervolg korthedshalve de constante van de bacterie noemen en met de schrijfwijze C_{HM} aanduiden.

Deze punten zijn:

1. Aan eenige willekeurige stammen van het geslacht *Streptococcus lactis* na te gaan of bij groei in wei een constante voor de bacterie wordt gevonden.
2. Eventuele invloed van den ouderdom der culturen op de grootte der constante.
3. Invloed van de samenstelling der wei op de grootte der constante.
4. Indien de constante voor een bepaalde reincultuur onafhankelijk mocht blijken te zijn van den ouderdom der cultuur en van verandering in samenstelling der wei, bestaat de mogelijkheid, dat de grootte van de constante een kenmerk ter differentiatie van de stammen onderling kan zijn.
5. De mogelijkheid, dat het vinden van een constante al of niet afhankelijk is van de vorming van optisch actief melkzuur.

De isolatie der bacteriën, voor het onderzoek in wei en in den kunstmatigen voedingsbodem gebruikt, geschiedde op de gewone wijze via een plaatcultuur. Er werd in alle gevallen een plaatcultuur op weigelatine aangelegd van melk, die bij 25° was gecoaguleerd na 24 uur staan.

In Januari 1920 is geïsoleerd stam A en stam O uit melk, afkomstig van de proefzuivelboerderij te Hoorn; A uit volle melk, O uit centrifugemelk.

In Maart 1920 is stam R geïsoleerd uit handelsmelk.

Uit melk, afkomstig van 3 verschillende boerderijen in den omtrek van Hoorn, zijn in Mei 1920 geïsoleerd de stammen K en B en D.

De stammen A, R, K en D zijn gedurende het jaar, dat er mee geëxperimenteerd is geworden, altijd in staat gebleven melk

binnen 24 uur te doen coaguleeren bij 25° . De stammen O en B hebben daarvoor bij 25° steeds 2×24 uur noodig gehad. Om de reinculturen te behouden werden ze om den anderen dag overgeënt in gesteriliseerde centrifugemelk. Microscopisch vertoonden ze allemaal het gewone beeld van lactoccen (diplo-streptococcen).

In Februari 1920 bleek, dat stam A en stam O niet meer groeiden in gewone mengmelk.

Daar hierbij te denken was aan het bekende feit, dat melk afkomstig van nieuwmelksche koeien dikwijls een slechte voedingsbodem is voor melkzuurbacteriën, zijn vanaf dien tijd de reinculturen altijd overgeënt in melk afkomstig van oudmelksche koeien. Het verschijnsel heeft zich toen niet meer voorgedaan. Bovendien konden de stammen A en O in deze melk weer tot normalen groei gebracht worden.

Punt 1. Bepaling van de constante van de geïsoleerde stammen bij groei in wei.

De melkwei werd bereid door melk bij $\pm 37^{\circ}$ met stremsel te doen stremmen. Bij het kweken van de melkzuurbacteriën in melkwei hebben zich onverwachte moeilijkheden vertoond. Het is met geen enkelen stam gelukt om in gesteriliseerde wei, waaraan niets was toegevoegd, een dergelijke zuurvorming te verkrijgen, dat deze als normale melkzuur gisting was te beschouwen.

In wei van gewone mengmelk, gemaakt met vloeibaar stremsel, bleek geen enkele stam de potentieele zuurgraad hoger op te voeren dan $10 \text{ à } 15 \text{ cm}^3$ 0,1 N zuur per 100 cm^3 .

Zes verschillende soorten, ook door middel van vloeibaar stremsel verkregen wei, afkomstig van 6 verschillende koeien, bleken alle 6 een even slechte voedingsbodem voor de bacteriën te zijn. Behalve met de reincultuur der bacteriën zijn deze 6 soorten wei ook geënt met zg. zuursel voor de boterbereiding, aanwezig op het Rijkslandbouwproefstation te Hoorn. Dit is namelijk te beschouwen als een mengsel van zeer krachtige melkzuurbacteriën. Daar in geen enkel geval normale zuurvorming werd verkregen met dit zuursel, en ook de reincultuurstammen slechte zuurvorming vertoonden, werd het waarschijnlijk, dat de oorzaak der afwijking

in den voedingsbodem en niet in de geïsoleerde stammen was te zoeken.

De mogelijkheid, dat het vloeibare stremsel een conserveermiddel kon bevatten, dat groei van melkzuurbacteriën tegenging, is overwogen. De proeven zijn daarom herhaald met veel verschillende soorten wei, verkregen door middel van droog stremselpoeder „Hansen”, dat geen ander conserveermiddel dan natriumchloride bevat. Echter met hetzelfde resultaat. SVANBERG ¹⁾ gebruikt voor het kweken van melkzuurbacteriën melkserum, verkregen door melk te coaguleeren met zoutzuur. Terwijl Svanberg in een dergelijken stikstofarmen voedingsbodem een normale melkzure gisting verkreeg, was bij mij de groei daarin zoo gering, dat ook van een poging om dezen te gebruiken, moest worden afgezien. Daar in wei, waaraan 0,5 % of 0.75 % pepton was toegevoegd met alle stammen een goede zuurvorming was te verkrijgen, heb ik de proeven over melkzuur gisting in wei moeten verrichten met wei, waaraan pepton was toegevoegd. Ik heb het noodig geacht de mislukte pogingen, om in gesteriliseerde melkwei, waaraan niets was toegevoegd, normale melkzuur gisting te verkrijgen, hier mede te deelen, omdat dit Van Dam en Svanberg wel gelukt is en ik geen verklaring kan geven waarom het *nu* niet verkregen kon worden. Ik heb gedurende het jaar 1920 nog dikwijls een poging aangewend om in gesteriliseerde wei zonder toevoeging normale gisting door de melkzuurbacteriën te veroorzaken. Echter altijd met negatief resultaat.

De proeven, genomen voor de bepaling van de constante van een bepaalde reincultuur, zijn op dezelfde wijze verricht als door VAN DAM ²⁾. Bij 45 cm³ wei werd een bekende hoeveelheid Na lactaat gepipetteerd of gewogen, daarna opgevuld tot 50 cm³. Na nog eens gesteriliseerd te zijn, werd deze voedingsbodem met een druppel van de reincultuur geënt. Er is met deze betrekkelijk groote hoeveelheid geënt om zodoende eenigszins onafhankelijk te zijn van de individuele verschillen van een

¹⁾ SVANBERG loc. cit. Zie bovendien Zeitschr. f. physiol. Chem., 108, 120. (1919)

²⁾ VAN DAM loc. cit.

reincultuur. Na afloop der gisting (dat was minstens 7 dagen na enting) bij 25° werd de totaal gevormde hoeveelheid melkzuur uit de titercijfers gevonden; de H-ionenconcentratie van de uitgegiste cultuur werd electrometrisch bepaald. Uit deze gegevens is de constante van de bacterie, C_{HM} , te berekenen.

$$\text{Immers: } K = \frac{C_H \times C_M}{C_{HM}} \quad (1)$$

K is de dissociatieconstante van melkzuur, C_H en C_M : de H-ionenconcentratie en de lactaationenconcentratie.

$$K = 1,5 \times 10^{-4}$$

C_H wordt gemeten.

C_M is te berekenen uit de hoeveelheid gevormd melkzuur en de hoeveelheid toegevoegd Na lactaat. Daar de reële zuurgraad van de culturen nooit hoger wordt opgevoerd dan $\pm 10^{-4} N$, benadert men de lactaationenconcentratie van het gevormde melkzuur het beste, door dit als Na lactaat aanwezig te rekenen. De geheele hoeveelheid aanwezig lactaat wordt dan gevonden: $C_M = \alpha (L - C_{HM})$.

L is dan de som van het toegevoegde lactaat en de hoeveelheid gevormd melkzuur.

Deze waarde voor C_M ingevoerd in vergelijking (1) geeft:

$$C_{HM} = \frac{L}{1 + \frac{K}{C_H \times \alpha}} \quad (2)$$

In de culturen, waarin de gisting plaats vindt zonder toevoeging van Na lactaat, is deze wijze van berekening der lactaationen concentratie iets onzeker. Wanneer men in dit geval het gevormde melkzuur aanwezig denkt te zijn als Na lactaat, is het mogelijk dat een merkbaar deel aanwezig is als K- of Ca lactaat, waarvoor dan niet de dissociatiegraad van Na lactaat in rekening gebracht zou mogen worden. Ik meen een geringe afwijking der C_{HM} waarde, gevonden in culturen, waaraan geen Na lactaat is toegevoegd, van die, gevonden in culturen met toegevoegd Na lactaat, op grond van deze onzekerheid te mogen verwachten.

De uitkomsten der proeven, verricht in Mei 1920 met de zes

genoemde bacteriestammen in wei (Wei I) waaraan 0,75 % pepton was toegevoegd, waardoor het N gehalte 0,14 % geworden was, zijn de volgende. De dissociatiegraad van Na-lactaat is door graphische interpolatie gevonden uit de waarden van Tabel VIII.

TABEL XXVI.

Stam A in Wei I (Mei 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0334 N	$6,61 \times 10^{-5}$	0,84	0,0090
0,020 N	0,0319 N	$4,57 \times 10^{-5}$	0,80	0,0102
0,040 N	0,0308 N	$3,55 \times 10^{-5}$	0,79	0,0112
0,060 N	0,0301 N	$2,82 \times 10^{-5}$	0,77	0,0111
0,080 N	0,0296 N	$2,45 \times 10^{-5}$	0,75	0,0119
0,100 N	0,0296 N	$1,91 \times 10^{-5}$	0,73	0,0110
				gem. 0,0107

Stam O.

TABEL XXVII.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0304 N	$5,50 \times 10^{-5}$	0,84	0,0072
0,020 N	0,0295 N	$4,07 \times 10^{-5}$	0,81	0,0089
0,040 N	0,0286 N	$3,09 \times 10^{-5}$	0,79	0,0096
0,060 N	0,0267 N	$2,45 \times 10^{-5}$	0,77	0,0097
0,080 N	0,0261 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,75	0,0094
0,100 N	0,0256 N	$1,74 \times 10^{-5}$	0,74	0,0102
				gem. 0,0092

Stam K.

TABEL XXVIII.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0394 N	$8,91 \times 10^{-5}$	0,83	0,0130
0,020 N	0,0338 N	$5,37 \times 10^{-5}$	0,80	0,0120
0,060 N	0,0314 N	$3,16 \times 10^{-5}$	0,77	0,0127
0,080 N	0,0302 N	$2,82 \times 10^{-5}$	0,75	0,0136
0,100 N	0,0306 N	$2,40 \times 10^{-5}$	0,74	0,0138
0,236 N	0,0264 N	$0,89 \times 10^{-5}$	0,67	0,0100
				gem. 0,0130

Stam D.

TABEL XXIX.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0382 N	$8,71 \times 10^{-5}$	0,83	0,0125
0,020 N	0,0348 N	$5,37 \times 10^{-5}$	0,80	0,0122
0,060 N	0,0312 N	$3,02 \times 10^{-5}$	0,77	0,0122
0,080 N	0,0304 N	$2,45 \times 10^{-5}$	0,75	0,0121
0,100 N	0,0310 N	$2,29 \times 10^{-5}$	0,74	0,0133
0,234 N	0,0256 N	$1,00 \times 10^{-5}$	0,67	0,0111
				gem. 0,0125

Stam R.

TABEL XXX.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0374 N	$8,71 \times 10^{-5}$	0,83	0,0122
0,020 N	0,0342 N	$5,37 \times 10^{-5}$	0,80	0,0121
0,060 N	0,0310 N	$2,88 \times 10^{-5}$	0,77	0,0117
0,080 N	0,0306 N	$2,40 \times 10^{-5}$	0,75	0,0119
0,100 N	0,0302 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,74	0,0114
0,238 N	0,0210 N	$0,93 \times 10^{-5}$	0,67	0,0097
				gem. 0,0119

Stam B.

TABEL XXXI.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0338 N	$7,59 \times 10^{-5}$	0,84	0,0101
0,020 N	0,0326 N	$5,25 \times 10^{-5}$	0,81	0,0116
0,060 N	0,0294 N	$2,82 \times 10^{-5}$	0,77	0,0113
0,080 N	0,0292 N	$2,45 \times 10^{-5}$	0,75	0,0119
0,100 N	0,0278 N	$2,14 \times 10^{-5}$	0,74	0,0122
0,232 N	0,0198 N	$0,69 \times 10^{-5}$	0,67	0,0095
				gem. 0,0114

Uit de cijfers, verkregen met zes willekeurige stammen, blijkt wel, bij vergelijking van den 3en en 5en kolom, dat ook hier bij het einde van de melkzuur gisting de hoeveelheid ongedissocieerde melkzuur moleculen constant is. De tijd verlopen sinds de isolatie der bacteriën, was zeer verschillend. Stam A was $\pm 4\frac{1}{2}$ maand oud, evenals O; R was $3\frac{1}{2}$ maand oud; K, B en D waren juist geïsoleerd, toen de proeven er mee genomen zijn. Wanneer de gisting plaats heeft in een milieu, waarvan de

lactaationenconcentratie $\pm 0,25$ N is, schijnt hier ook een nadeelige invloed op de gisting op te treden. Het kan ook zijn, dat de groote osmotische druk een rol gaat spelen. De waarde van C_{HM} , verkregen in culturen, waaraan zooveel Na-lactaat is toegevoegd, dat de concentratie hiervan grooter dan 0,1 N is, vertoont gewoonlijk een afwijking van die, gevonden in de andere culturen. Ze is meestal lager. Hoewel bij verdere bepalingen deze invloed van een sterke lactaatconcentratie niet altijd tot uiting komt, is voor de berekening van de constante van de bacterie, d.i. het gemiddelde der C_{HM} waarden, verkregen uit een serie bepalingen als boven beschreven, de waarde verkregen uit een cultuur waarvan de concentratie aan toegevoegd Na-lactaat $> 0,1$ N was, niet voor de berekening van dit gemiddelde meegeteld.

Punt 2.

Om na te gaan of voor eenzelfde reincultuur de ouderdom daarvan invloed heeft op de grootte van de constante, zijn stam A en B op verschillende tijdstippen in eenzelfde wei geënt. Stam A is in Juni opnieuw in Wei I gekweekt. Stam B en stam A zijn in Juli en in November 1920 gekweekt in wei (Wei II) waaraan 0,5 % pepton was toegevoegd.

TABEL XXXII.

Stam A in Wei I (Juni 1920).

concentratie toegev. Na lactaat	concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0384 N	$8,91 \times 10^{-5}$	0,83	0,0127
0,020 N	0,0360 N	$6,03 \times 10^{-5}$	0,80	0,0136
0,040 N	0,0338 N	$4,17 \times 10^{-5}$	0,78	0,0132
0,060 N	0,0325 N	$3,55 \times 10^{-5}$	0,77	0,0142
0,080 N	0,0319 N	$3,02 \times 10^{-5}$	0,75	0,0147
0,100 N	0,0311 N	$2,45 \times 10^{-5}$	0,73	0,0140
				gem. 0,0137

In Mei was de gemiddelde waarde voor C_{HM} van stam A in Wei I 0,0107. (Tabel XXVI).

TABEL XXXIII.

Stam A in Wei II (Juli 1920).

concentratie toegev. Na lactaat	concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0316 N	$7,08 \times 10^{-5}$	0,84	0,0090
0,020 N	0,0296 N	$4,47 \times 10^{-5}$	0,81	0,0096
0,040 N	0,0282 N	$3,63 \times 10^{-5}$	0,79	0,0087
0,060 N	0,0266 N	$2,19 \times 10^{-5}$	0,77	0,0089
0,080 N	0,0254 N	$1,78 \times 10^{-5}$	0,75	0,0086
0,200 N	0,0196 N	$0,87 \times 10^{-5}$	0,69	0,0085
				gem. 0,0089

TABEL XXXIV.

Stam A in Wei II (Nov. 1920).

concentratie toegev. Na lactaat	concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0302 N	$8,91 \times 10^{-5}$	0,84	0,0100
0,020 N	0,0281 N	$5,25 \times 10^{-5}$	0,81	0,0106
0,060 N	0,0238 N	$2,69 \times 10^{-5}$	0,77	0,0102
0,080 N	0,0226 N	$2,19 \times 10^{-5}$	0,76	0,0103
0,100 N	0,0206 N	$1,74 \times 10^{-5}$	0,74	0,0095
0,182 N	0,0177 N	$1,02 \times 10^{-5}$	0,70	0,0091
				gem. 0,0101

TABEL XXXV.

Stam B in Wei II (Juli 1920).

concentratie toegev. Na lactaat	concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0224 N	$5,25 \times 10^{-5}$	0,85	0,0051
0,020 N	0,0200 N	$2,88 \times 10^{-5}$	0,83	0,0055
0,040 N	0,0180 N	$1,91 \times 10^{-5}$	0,80	0,0054
0,060 N	0,0152 N	$1,23 \times 10^{-5}$	0,78	0,0045
0,080 N	0,0142 N	$1,02 \times 10^{-5}$	0,77	0,0047
0,206 N	0,0104 N	$0,42 \times 10^{-5}$	0,69	0,0041
				gem. 0,0050

TABEL XXXVI.

Stam B in Wei II (Nov. 1920).

concentratie toegev. Na lactaat	concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0210 N	$4,57 \times 10^{-5}$	0,86	0,0044
0,020 N	0,0185 N	$2,63 \times 10^{-5}$	0,83	0,0049
0,060 N	0,0138 N	$1,20 \times 10^{-5}$	0,78	0,0042
0,080 N	0,0125 N	$0,98 \times 10^{-5}$	0,77	0,0044
0,100 N	0,0119 N	$0,79 \times 10^{-5}$	0,75	0,0044
0,182 N	0,0114 N	$0,42 \times 10^{-5}$	0,70	0,0037
				gem. 0,0045

Er is uit deze proeven, naar mijn meening, slechts deze conclusie te trekken, dat de constante van een bacteriestam in een bepaalden voedingsbodem niet op ieder tijdstip geheel dezelfde is. Een verzwakking van de bacterie door den tijd is op deze wijze ook niet geconstateerd kunnen worden.

Voor stam A wordt de constante in Wei II en in Wei I iets grooter bij ouder worden der reincultuur, voor stam B is een, zij het geringe, afneming daarvan te constateeren in Wei II. De waarde voor B in Wei I gevonden in Mei 1920 nl. 0,0114 (Tabel XXXI) wijkt wel zeer veel af van die in Juli en Nov. in Wei II gevonden. Hoewel in Mei niet dezelfde voedingsbodem gebruikt is als in Juli en November wijst dit groote verschil toch wel eenigszins op een verzwakking van de bacterie door den tijd.

Punt 3.

Om den invloed van de samenstelling van den voedingsbodem te onderzoeken, is hoofdzakelijk rekening gehouden met de N-houdende bestanddeelen. Er is bij dit geheele bacteriologische onderzoek namelijk geen poging aangewend om den invloed na te gaan, die andere koolhydraten dan lactose op de melkzuur gisting hebben; het is een bekend feit, dat de melkzuurbacteriën voor verandering in de anorganische bestanddeelen van den voedingsbodem niet zeer gevoelig zijn. Het was in dit geval mogelijk om den invloed na te gaan, die een verandering van de stikstofhoudende bestanddeelen in quantitatieven zin, op de waarde van C_{HM} heeft. Daartoe behoefde slechts het peptongehalte

van een bepaalde wei veranderd te worden. Stam A en Stam B zijn gelijktijdig geënt in Wei II (pepton 0,5%) en in Wei II (pepton 0,75%). Ook de invloed van een geringe verhooging van het peptongehalte, n.l. van 0,75% tot 0,82%, op de waarde van C_{HM} is voor Stam A in Wei I nagegaan.

Een verandering van de stikstofhoudende bestanddeelen van de wei in kwalitatieven zin is getracht te verkrijgen door wei te bereiden van melk, afkomstig van verschillende koeien. De samenstelling van het voedsel van deze koeien was gedurende eenigen tijd zeer verschillend geweest. Stam A is gelijktijdig geënt in 4 dergelijke weimonsters.

TABEL XXXVII.

Stam A in Wei I (pepton 0,82%).

concentratie toegev. Na lactaat	concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0400 N	$8,32 \times 10^{-5}$	0,83	0,0126
0,025 N	0,0356 N	$4,47 \times 10^{-5}$	0,79	0,0115
0,062 N	0,0321 N	$3,02 \times 10^{-5}$	0,76	0,0126
0,102 N	0,0315 N	$2,29 \times 10^{-5}$	0,75	0,0137
0,124 N	0,0309 N	$1,91 \times 10^{-5}$	0,73	0,0132
0,155 N	0,0293 N	$1,70 \times 10^{-5}$	0,71	0,0137
				gem. 0,0127

Bij gelijktijdige enting in Wei I (pepton 0,75%) was als gemiddelde voor C_{HM} 0,0137 gevonden. (Tabel XXXII).

TABEL XXXVIII.

Stam A in Wei II (pepton 0,75%).

concentratie toegev. Na lactaat	concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0318 N	$8,71 \times 10^{-5}$	0,84	0,0104
0,020 N	0,0302 N	$5,37 \times 10^{-5}$	0,81	0,0113
0,060 N	0,0274 N	$3,02 \times 10^{-5}$	0,77	0,0117
0,080 N	0,0263 N	$2,45 \times 10^{-5}$	0,76	0,0117
0,100 N	0,0246 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,74	0,0109
0,176 N	0,0200 N	$1,15 \times 10^{-5}$	0,70	0,0100
				gem. 0,0112

Gelijktijdige gisting van A in Wei II (pepton 0,5%) had als gemiddelde voor C_{HM} de waarde 0,0101 opgeleverd. (Tabel XXXIV).

TABEL XXXIX.

Stam B in Wei II (pepton 0,75%).

Conconratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0248 N	$5,37 \times 10^{-5}$	0,85	0,0058
0,020 N	0,0201 N	$2,82 \times 10^{-5}$	0,83	0,0054
0,060 N	0,0166 N	$1,45 \times 10^{-5}$	0,78	0,0054
0,080 N	0,0156 N	$1,15 \times 10^{-5}$	0,76	0,0053
0,100 N	0,0140 N	$0,87 \times 10^{-5}$	0,75	0,0048
0,178 N	0,0124 N	$0,48 \times 10^{-5}$	0,71	0,0042
				gem. 0,0053

Bij gelijktijdige enting van B in Wei II (pepton 0,5%) was het gemiddelde van de waarden voor C_{HM} 0,0045. (Tabel XXXVI).

De gelijktijdige enting van A in de 4 soorten wei, afkomstig van verschillende koeien, heeft de volgende uitkomsten opgeleverd. De 4 soorten wei zullen Wei III, Wei IV, Wei V en Wei VI genoemd worden. Ze bevatten alle vier 0,75% pepton.

TABEL XL.

Stam A in Wei III.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0272 N	$7,08 \times 10^{-5}$	0,85	0,0078
0,020 N	0,0256 N	$4,57 \times 10^{-5}$	0,82	0,0091
0,060 N	0,0236 N	$2,57 \times 10^{-5}$	0,78	0,0098
0,080 N	0,0228 N	$2,04 \times 10^{-5}$	0,76	0,0096
0,100 N	0,0216 N	$1,74 \times 10^{-5}$	0,74	0,0096
0,127 N	0,0198 N	$1,32 \times 10^{-5}$	0,73	0,0089
				gem. 0,0092

TABEL XLI.

Stam A in Wei IV.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0277 N	$7,94 \times 10^{-5}$	0,85	0,0086
0,020 N	0,0258 N	$4,79 \times 10^{-5}$	0,82	0,0095
0,060 N	0,0234 N	$2,57 \times 10^{-5}$	0,77	0,0097
0,080 N	0,0220 N	$2,14 \times 10^{-5}$	0,76	0,0100
0,100 N	0,0202 N	$1,82 \times 10^{-5}$	0,74	0,0099
0,145 N	0,0182 N	$1,15 \times 10^{-5}$	0,72	0,0085
				gem. 0,0095

TABEL XLII.

Stam A in Wei V.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0317 N	$8,71 \times 10^{-5}$	0,84	0,0104
0,020 N	0,0299 N	$5,37 \times 10^{-5}$	0,81	0,0112
0,060 N	0,0271 N	$2,88 \times 10^{-5}$	0,77	0,0112
0,080 N	0,0262 N	$2,46 \times 10^{-5}$	0,76	0,0118
0,100 N	0,0252 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,74	0,0110
0,140 N	0,0234 N	$1,48 \times 10^{-5}$	0,72	0,0109
				gem. 0,0111

TABEL XLIII.

Stam A in Wei VI.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0271 N	$8,71 \times 10^{-5}$	0,85	0,0090
0,020 N	0,0253 N	$5,25 \times 10^{-5}$	0,82	0,0101
0,060 N	0,0228 N	$2,82 \times 10^{-5}$	0,78	0,0106
0,080 N	0,0208 N	$2,14 \times 10^{-5}$	0,76	0,0099
0,100 N	0,0192 N	$1,62 \times 10^{-5}$	0,74	0,0088
0,138 N	0,0190 N	$1,38 \times 10^{-5}$	0,73	0,0099
				gem. 0,0097

Uit deze waarnemingen blijkt, dat de constante van een bacteriestam door verandering van den voedingsbodem, wat betreft de N bestanddeelen, ook verandering ondergaat. Zoowel in wei, waarvan alleen het peptongehalte was veranderd, als in verschillende soorten wei is de gemiddelde waarde van C_{HM}

niet geheel constant. Verhooging van het peptongehalte van Wei II van 0,5 % tot 0,75 % maakt dat zoowel voor stam A als voor stam B een hogere waarde voor C_{HM} gevonden wordt. De geringe verandering van het peptongehalte van Wei I wijst weer op een invloed daarvan in tegengestelden zin op de waarde van C_{HM} . Dat in wei van verschillende herkomst, ondanks het feit, dat het peptongehalte in alle gelijk was, de constante van de bacterie niet in alle gevallen dezelfde waarde heeft, blijkt uit de cijfers.

Hoewel uit de bepalingen van ORLA JENSEN¹⁾ volgt, dat de concentratie van de suiker geen invloed heeft op de totale hoeveelheid zuur, die door gisting ontstaat in een bepaalden voedingsbodem, heb ik deze proef herhaald met stam A, waarbij dan tevens geconstateerd werd, dat verhooging van het lactosegehalte van de wei geen invloed had op de constante.

Stam A is daartoe gelijktijdig geënt in Wei V en in Wei V, waaraan 5 % lactose was toegevoegd. Uit de bepalingen der C_{HM} waarden van de uitgegiste vloeistoffen blijkt, dat geen invloed van de lactoseconcentratie valt te constateeren.

TABEL XLIV.

Stam A in Wei V.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0308 N	$8,91 \times 10^{-5}$	0,84	0,0103
0,020 N	0,0288 N	$5,25 \times 10^{-5}$	0,81	0,0107
0,060 N	0,0260 N	$2,88 \times 10^{-5}$	0,77	0,0111
0,100 N	0,0230 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,74	0,0108
				gem. 0,0107

TABEL XLV.

Stam A in Wei V. (5 % lactose toegev.)

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0306 N	$8,71 \times 10^{-5}$	0,84	0,0101
0,020 N	0,0286 N	$5,01 \times 10^{-5}$	0,81	0,0103
0,060 N	0,0258 N	$2,69 \times 10^{-5}$	0,77	0,0104
0,100 N	0,0226 N	$1,90 \times 10^{-5}$	0,74	0,0105
				gem. 0,0104

¹⁾ ORLA JENSEN, Mémoires de l'Académie des Sciences et des Lettres de Danemark, Section des Sciences 8^{me} serie, t V, No. 2, p. 94.

Punt 4.

Is het mogelijk, om met behulp van de uitkomsten der bepalingen van C_{HM} in wei te beoordeelen, of de constante van een bacterie op deze wijze bepaald, als biologisch kenmerk ervoor kan dienen? Met stam A waren 10 series bepalingen verricht. De hoogste waarde voor C_{HM} was = 0,0137, de laagste = 0,0089.

Voor B is de hoogste waarde 0,0114 geweest, de laagste 0,0045. Het is dus niet mogelijk om uit één serie bepalingen van de waarden van C_{HM} , waarbij de gisting eindigt, zich een oordeel te vormen over het weerstandsvermogen van een bacteriestam ten opzichte der ongedissocieerde melkzuurmoleculen, althans bij gebruik van de veelvuldig aangewende melkwei. Het is mogelijk, dat bv. voor stam A (waarmee het grootste aantal waarnemingen is verricht) de gemiddelde waarden van C_{HM} toevallige afwijkingen vertoonen van een vaste waarde; meer waarschijnlijk is echter, dat er van serie tot serie een veranderlijke waarde voor C_{HM} optreedt of, m. a. w. dat het gedrag der bacteriën in biochemisch opzicht veranderlijk is. Deze laatste onderstelling wordt nog gesteund door de uitkomsten der duplo-bepalingen van Tabel XL en XLI (gelijktijdige enting).

Stam A in Wei III.

TABEL XLVI.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0268 N	$7,25 \times 10^{-5}$	0,85	0,0078
0,020 N	0,0256 N	$4,57 \times 10^{-5}$	0,82	0,0091
0,060 N	0,0238 N	$2,57 \times 10^{-5}$	0,78	0,0099
0,080 N	0,0232 N	$2,09 \times 10^{-5}$	0,76	0,0099
0,100 N	0,0218 N	$1,78 \times 10^{-5}$	0,74	0,0098
0,133 N	0,0192 N	$1,23 \times 10^{-5}$	0,73	0,0086
				gem. 0,0093

Het gemiddelde der duplo-bepalingen was 0,0092. (Tabel XL).

Stam A in Wei IV.

TABEL XLVII.

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0282 N	$8,32 \times 10^{-5}$	0,85	0,0090
0,020 N	0,0258 N	$4,79 \times 10^{-5}$	0,82	0,0095
0,060 N	0,0236 N	$2,63 \times 10^{-5}$	0,77	0,0099
0,080 N	0,0220 N	$2,14 \times 10^{-5}$	0,76	0,0100
0,100 N	0,0202 N	$1,82 \times 10^{-5}$	0,74	0,0099
0,136 N	0,0184 N	$1,18 \times 10^{-5}$	0,73	0,0084
				gem. 0,0097

Het gemiddelde der duplo-bepalingen was 0,0095 (Tabel XLI). Ook de C_{HM} waarden, die bereikt worden in drie culturen, waarvan de hoeveelheid toegevoegd Na lactaat dezelfde is, vertoonen slechts zeer geringe onderlinge afwijking. Er zijn veel te weinig duplo-bepalingen verricht om de grootte van de fout in de bepaling der C_{HM} waarde te berekenen. Uit de proeven in wei is echter deze conclusie te trekken: de concentratie der ongedissocieerde melkzuurmoleculen, waartoe een reincultuur een voedingsbodem opvoert, is een veranderlijke grootte. Behalve den invloed van den ouderdom der reincultuur ondergaat deze grootte dien van de samenstelling van het milieu. Deze laatste invloed doet uitkomen, dat het wenschelijk is de melkzuurbacteriën in een kunstmatigen voedingsbodem te kweken, die als standaardvloeistof zou moeten dienen. Dat de ouderdom van de reincultuur invloed heeft op de geproduceerde hoeveelheid zuur, was te verwachten. Over het algemeen geldt de meening, dat bij ouder worden een reincultuur verzwakt¹⁾. Dit is ook eenvoudig te constateeren door titratie op verschillende tijden van het gevormde zuur in eenzelfde voedingsbodem.

Punt 5.

De mogelijkheid, dat bij de melkzuur gisting optisch actief melkzuur ontstaat, is niet uitgesloten. De opgaven in de literatuur over het ontstaan van actief melkzuur, en de factoren, die daar eventueel invloed op zouden kunnen uitoefenen, zooals de C en de N voeding, zijn nog al tegenstrijdig. Daar de oudere onderzoekers zooals Péré, Pottevin, Kozai enz. colistammen gebruikt hebben, zal ik hun resultaten niet alle vermelden.

HERZOG en HÖRTH²⁾ hebben voor hun onderzoek verschillende reinculturen van echte melkzuurbacteriën gebruikt. Ze komen tot het resultaat, dat gewoonlijk bij de melkzuur gisting optisch actief melkzuur ontstaat, hoewel niet één zuivere modificatie. De samenstelling van het vergiste substraat, wat betreft C en N bestanddeelen, heeft hierop geen invloed.

1) Zie b.v. WEIGMANN, Mykologie der Milch, bl. 53, 1e druk.

2) HERZOG u. HÖRTH, Zeitschr. physiol. Chem., 60, 131. (1909).

Tot deze laatste conclusie komt ook ORLA JENSEN¹⁾, die vindt, dat zoowel links, rechts, als inactief melkzuur bij de gisting kan ontstaan.

Het was dus eigenlijk wel te verwachten, dat niet alle zes stammen, waarmee geëxperimenteerd is geworden, inactief melkzuur zouden geven. Wanneer bij de gisting optisch actief melkzuur ontstaat, is bij het einde van de gisting in een cultuur, waaraan geen lactaat is toegevoegd, de concentratie der ongesplitste moleculen (bv. d-modificatie) $\pm 0,01$ N, terwijl in een cultuur, waaraan zooveel inactief Nalactaat is toegevoegd, dat de concentratie daarvan $\pm 0,1$ N is, bij het einde van de gisting, de concentratie van het inactieve ongedissocieerde melkzuur dezelfde waarde heeft bereikt. In een milieu immers, waar de inactieve lactaatconcentratie veel grooter is dan de actieve zuurconcentratie, zal het ongedissocieerde inactieve zuur in meerdere mate aanwezig zijn dan het ongedissocieerde actieve. Hierbij moet dan de onderstelling gemaakt worden, dat de dissociatieconstanten der twee zuren niet noemenswaard verschillen, iets wat ook nog eenige toelichting vereischt.

De specifieke rotatie van melkzuur is zeer klein. Om een hoeveelheid melkzuur door gisting te krijgen, waarvan de optische activiteit beoordeeld kon worden, was het noodig de gisting in wei onder toevoeging van CaCO_3 te doen verlopen. Stam A is in wei II geënt, terwijl herhaaldelijk het gevormde melkzuur met gesteriliseerd CaCO_3 werd geneutraliseerd. Nadat kon worden aangenomen, dat een voldoende hoeveelheid lactose was vergist, werd de wei alkalisch gemaakt op phenolphtaleïne, om de aanwezige phosphaten neer te slaan, gefiltreerd en ingedampt tot een bruikbaar volume. Daarna werd zuur gemaakt met HCl (zuur op methylooranje of op tusschentint op methanylgeel) en uitgeschud met aether. Perforatie van de peptonrijke vloeistof was niet mogelijk. Om ophooping van mogelijke verontreinigingen van den aether te voorkomen, werd voor het uitschudden altijd dezelfde hoeveelheid aether gebruikt, nadat deze van het

¹⁾ ORLA JENSEN. Mémoires de l'Académie des Sciences et des Lettres de Danemark Section des Sciences, 8^{me} Serie, t. V, No. 2, p. 101 et 95.

uitgeschudde zuur was afgedestilleerd. Aan de reiniging van den aether is bijzondere zorg besteed. De gereinigde aether werd ten slotte vóór het gebruik afgedestilleerd van Na. Het perforaat van normaal H Cl met dezen aether gaf na acht uur perforeren een zeer twijfelachtige chloridereactie.

Na verwijdering van den aether werd het uitgeschudde zuur ($\pm 2,8$ gram) opgenomen in water en gehydrateerd. Een oplossing van $\pm 14\%$ in water vertoonde een draaiing van $+0,75^\circ$ in een 2 dM. buis. De specifieke rotatie van dit zuur was dus $\pm +2,7$, d.i. hooger dan HOPPE-SEYLER en ARAKI¹⁾ opgeven voor de specifieke rotatie van zuiver rechtsch melkzuur bij deze concentratie n.l. $[\alpha]_D = 1,57$ tot $1,89$, lager dan WISLICENUS²⁾ n.l. $[\alpha]_D = 2,78$. De slechte overeenstemming in de opgeven van de specifieke rotatie van melkzuur zal misschien veroorzaakt worden door de aanwezigheid van lactide, dat sterk links draait³⁾. De aanwezigheid van lactose kon niet worden aangetoond in het uitgeschudde melkzuur. Het bij gisting door stam A, in wei, ontstane melkzuur was, zoo niet geheel, dan toch in ieder geval grootendeels de d-modificatie.

Het geleidingsvermogen van het zuur is bepaald in verschillende verdunningen.

TABEL XLVIII.

Concentratie	χ_{25}	α	K
0,0633 N	$1,144 \times 10^{-3}$	0,0468	$1,45 \times 10^{-4}$
0,0238 N	$6,866 \times 10^{-4}$	0,0749	$1,44 \times 10^{-4}$
0,0119 N	$4,744 \times 10^{-4}$	0,1035	$1,42 \times 10^{-4}$
0,0059 N	$3,267 \times 10^{-4}$	0,1426	$1,41 \times 10^{-4}$
0,0030 N	$2,225 \times 10^{-4}$	0,1942	$1,39 \times 10^{-4}$

De geconcentreerde waterige oplossing van het zuur vertoonde een zeer geringe chloride reactie. Na afloop van bovengenoemde bepalingen is twee gram van het zuur verascht met chloridevrij CaCO_3 en in de salpeterzure oplossing van de asch het chloridegehalte nephelometrisch geschat. Dit was $0,002\%$. Hoewel de

1) HOPPE-SEYLER en ARAKI, Zeitschr. physiol. Chemie, 20, 369. (1895).

2) WISLICENUS, Lieb. Ann. 164, 324. (1872).

3) Zie ook LANDOLT, Das optische Drehungsvermögen, S. 470, 2e Auflage.

relatieve fout van de methode van bepaling wel 100% kan zijn, is de aanwezige hoeveelheid chloride zoo gering, dat van merkbaren invloed op het geleidingsvermogen en de dissociatieconstante van het verkregen zuur geen sprake kan zijn.

De proef is herhaald door stam A te laten gisten in Wei IV onder toevoeging van CaCO_3 .

Een 14%ige oplossing van het zuur vertoonde een draaiing $= +0,72^\circ$ in een 2 dM. buis, wat met een $[\alpha]_D = +2,6$ overeenkomt; ook hier dus in ieder geval overwegend d-modificatie.

Het geleidingsvermogen van het zuur in verschillende verdunningen was:

TABEL XLIX.

Concentratie	χ_{25}	α	K
0,1012 N	$1,451 \times 10^{-3}$	0,0372	$1,46 \times 10^{-4}$
0,0506 N	$1,015 \times 10^{-3}$	0,0520	$1,44 \times 10^{-4}$
0,0253 N	$7,076 \times 10^{-4}$	0,0726	$1,44 \times 10^{-4}$
0,0126 N	$4,910 \times 10^{-4}$	0,1010	$1,43 \times 10^{-4}$
0,0063 N	$3,368 \times 10^{-4}$	0,1386	$1,40 \times 10^{-4}$
0,0031 N	$2,285 \times 10^{-4}$	0,1910	$1,40 \times 10^{-4}$

Uit de proeven blijkt, dat de dissociatieconstante van dit optisch actief melkzuur weinig afwijkt van die, gevonden bij de inactieve preparaten. (Zie bl. 2). Voor de berekening der concentratie van het ongedissocieerde melkzuur, aanwezig in een cultuur, is het niet noodig rekening te houden met de modificatie, die bij de gisting ontstaat. Geen enkele van de onderzochte inactieve melkzuurpreparaten vertoont een duidelijken gang van de dissociatieconstante bij verschillende verdunningen. Wanneer de dissociatieconstanten van d- en l-modificatie van elkaar verschilden of wanneer bij het inactieve melkzuur sprake kon zijn van een racemische verbinding, die een andere dissociatieconstante had dan de samenstellende componenten, zou een geprononceerde gang moeten optreden. Een verschil echter van b.v. 30% in de waarde van K, wat bij de berekening van C_{HM} in culturen zonder toevoeging en in culturen, die $\pm 0,1$ N aan inactief lactaat zijn, niet verwaarloosd zou mogen worden, is op deze wijze niet te vinden.

Zooals te verwachten was, is uit de metingen van het geleidings-

vermogen van het optisch actieve zuur gebleken, dat voor de verschillende melkzuurmodificaties geen verschil in geleidingsvermogen wordt gevonden.

Wanneer men nu stam A laat groeien in een serie voedingsbodems, waarvan de concentratie aan inactief Na lactaat opklimt van 0 tot 0,1 N, dan is, zooals is gebleken, bij het einde van de gisting de concentratie van de ongedissocieerde melkzuurmoleculen constant. Nu bestaat die hoeveelheid in de cultuur, waaraan geen Na lactaat is toegevoegd, overwegend uit de d-modificatie (wanneer n.l. met stam A is geënt); in de cultuur, waarvan de concentratie aan inactief Na lactaat = 0,1 N is, hoofdzakelijk uit inactief melkzuur. De physiologische werking van de melkzuurmoleculen blijkt hier dus onafhankelijk te zijn van de optische modificatie.

Bij de bereiding van een kunstmatigen voedingsbodem voor melkzuurbacteriën is het in hoofdzaak de N bron, waarmee zich moeilijkheden kunnen voordoen. De anorganische bestanddeelen, die in wei voorkomen zijn gemakkelijk zuiver te krijgen evenals lactose. Bovendien zijn de melkzuurbacteriën niet zeer gevoelig voor veranderingen van de anorganische bestanddeelen van het milieu, waarin ze moeten groeien. Anders is het met de N verbindingen. Anorganische N komt geheel niet in aanmerking, ook een enkelvoudig aminozuur is voor een melkzuurbacterie niet voldoende. De melkzuurbacteriën hebben de geheele serie afbraakproducten van een volledig eiwit voor hun ontwikkeling nodig. In het algemeen geldt pepton als een goede N voeding voor melkzuurbacteriën. HUEPPE¹⁾ en KAYSER²⁾ geven zelfs aan dat het de beste N bron er voor is. ORLA JENSEN³⁾ meent te mogen aannemen dat caseïnepepton een betere voedingsbodem is dan fibrinepepton (Pepton Witte). Hoewel aan deze onderzoekingen weinig beteekenis is te hechten in quantitatieven zin, daar er geen rekening is gehouden met de bufferwerking van het milieu, blijkt er toch wel uit, dat pepton een N bron is, waar melkzuur-

¹⁾ HUEPPE, Mitt. Kais. Ges. Amt, 2, 309. (1884).

²⁾ KAYSER, Ann. Pasteur, 8, 737. (1894).

³⁾ ORLA JENSEN, Centralbl. f. Bakt, II Abt IV, 196. (1898).

bacteriën waarschijnlijk mee kunnen volstaan. Natuurlijk voldoet handelspepton niet aan den eisch, dat zuurgraad en bufferwerking van een oplossing constant zijn. Dat is door WRIGHT¹⁾ experimenteel aangetoond, die de onderlinge afwijkingen, verkregen bij het standarizeeren van desinfectantia langs bacteriologischen weg, toeschrijft aan de wisselende eigenschappen, die een peptonhoudende voedingsbodem in deze opzichten bezit.

Om een peptonhoudende vloeistof te verkrijgen, die gemakkelijk reproduceerbaar is, moet men uitgaan van een zeer zuiver eiwit. In dit geval was caseïne daarvoor aangewezen.

Hoewel vóór 1914 door Merck en door Kahlbaum zuivere caseïne preparaten in den handel werden gebracht, die misschien ook voor dit doel geschikt zouden zijn, ben ik genoodzaakt geweest de caseïne zelf te bereiden, daar de genoemde preparaten niet meer in voldoende hoeveelheid verkrijgbaar waren. Voor de bereiding van de caseïne is in hoofdzaak het voorschrift van HAMMARSTEN²⁾ gevolgd. 9 L. centrifuge melk werden verdund met 14 L. water. Onder zeer krachtig roeren met een electromotor werd de caseïne met azijnzuur, dat langzaam bij de melk druppelde, neergeslagen. Na herhaaldelijk afhevelen van de bovenstaande vloeistof en vervanging van deze door gedestilleerd water, werd de caseïne weer onder krachtig roeren opgelost in natronloog. De reactie mag hierbij op lakmoes niet alkalisch worden. Daarna werd gefiltreerd en opnieuw geprecipiteerd. Deze bewerkingen werden vier maal herhaald. De caseïne werd dan, na neergeslagen te zijn, in alcohol gebracht, vervolgens in aether, afgezogen en na drogen aan de lucht door een fijne zeef gezeefd. Het aschgehalte van een op deze wijze bereid preparaat was 0,09⁰/₀.

Het N gehalte van verschillende soorten wei is in de nabijheid van 0,06⁰/₀, dat van wei, waaraan pepton is toegevoegd en waarin de melkzuurbacteriën zich normaal ontwikkelden, ongeveer 0,15⁰/₀.

Wanneer het N gehalte van den kunstmatigen voedingsbodem

1) WRIGHT, Journ. of Bacteriology, **2**, 315. (1917).

2) HAMMARSTEN, Lehrbuch der physiol. Chem., S. 615, 8e Auflage.

door, op hierna te beschrijven wijze bereide caseïnepepton, op 0,1% of 0,2% werd gebracht bleken de melkzuurbacteriën zich daarin niet goed te ontwikkelen. De zuurvorming was uiterst gering. Verandering van fosphaat, Ca- of citraatgehalte had geen merkbaren invloed. Het N-gehalte moest tot 0,4% opgevoerd worden om een goeden groei te krijgen.

Doordat het stikstofgehalte van den voedingsbodem zoo hoog moest worden opgevoerd, was het niet meer mogelijk om de cultuurvloeistof te bereiden volgens het eerst gedachte schema; dat was nl.: peptoniseering van de caseïne in zwak zure oplossing gedurende korten tijd door middel van een zuiver enzym-preparaat,¹⁾ filtratie, toevoeging van Ca- en Mg-zout en overige bestanddeelen. Om het vereischte stikstofgehalte snel te bereiken (wat noodig is om een helder filtreerbare vloeistof te krijgen) moest een vrij aanzienlijke hoeveelheid pepsine gebruikt worden en de vertering plaats hebben in sterk zure oplossing (0,3 N HCl). Daar ik niet de beschikking had over dergelijke hoeveelheden van de zuivere pepsine „Pekelharing”, is de kunstmatige voedingsbodem bereid met handelspepsine. Hoewel de verontreinigingen, die in handelspepsine voorkomen zeker niet altijd dezelfde zijn, is uit het volgende onderzoek toch gebleken, dat ook met deze pepsine een voedingsbodem verkregen kan worden, waarvan de eigenschappen constant zijn.

Dat de bufferwerking van deze cultuurvloeistof door het hoge stikstofgehalte onaangenaam groot is en een groote overmaat caseïne noodig is om dit stikstofgehalte snel te bereiken kan dus als een nadeel ervan beschouwd worden. Wanneer echter was gebleken, dat de gisting in den kunstmatigen voedingsbodem normaal verliep, zouden de genoemde nadeelen bij het gebruik ervan toch niet een overwegend bezwaar behoeven te zijn.

Op de volgende wijze was een caseïnepepton bevattende vloeistof te krijgen, waarvan het N-gehalte ongeveer 0,8% was:

50 gram caseïne worden gesuspenderd in 500 cm³ 0,3 N HCl, daarna wordt toegevoegd 2 gram pepsine opgelost in 50 cm.³ 0,3 N HCl. De vloeistof wordt twee dagen in een broedstoof bij

¹⁾ VAN DAM, Zeitschr. physiol. Chem. 61, 147. (1909).

37° C. geplaatst. De goed filtreerbare vloeistof heeft dan een N-gehalte van $\pm 0,8\%$.

Een caseïnepepton houdende vloeistof, op deze manier bereid, heeft in alle gevallen overeenstemming gegeven tusschen rotatie en N-gehalte (bepaald volgens Kjeldahl). Bij de voorloopige proeven met stikstofarmeren voedingsbodem was gebleken dat 1° draaiing in een 2 dM. buis overeenkomt met $0,075\%$ N.

De peptoniseering van caseïnepreparaten, afkomstig van verschillende bereidingen heeft wat dit betreft de volgende uitkomsten opgeleverd: (α is de draaiing in een 2 dM. buis).

TABEL L.

—	α	N (ber.)	N (gev.)
Preparaat I	6,40°	0,480 %	0,476 %
" II	10,86°	0,814 %	0,819 %
" III	10,96°	0,822 %	0,825 %
" IV	11,23°	0,842 %	0,842 %
" V	10,85°	0,814 %	0,813 %

De rotatie ondervindt geen merkbaren invloed van neutralisatie van het zuur, noch van verwarming op 100° C. gedurende $\frac{1}{2}$ uur. Dit laatste was van belang in verband met de sterilisatie van den voedingsbodem, daar dit er op wijst, dat de stikstofverbindingen hierdoor niet veranderen. Hoewel de overeenstemming tusschen rotatie en N gehalte in al deze gevallen niet een afdoend bewijs is, dat deze verbindingen dan ook in alle gevallen dezelfde zijn, kan in ieder geval toch het N gehalte van de caseïnepepton bevattende vloeistof uit de rotatie daarvan worden gevonden.

De zure oplossing van caseïnepepton verkrijgt een geschikten zuurgraad, wanneer per 500 cm.³ 49 cm.³ 3 N natronloog wordt toegevoegd. Ze kan dan met water en de verschillende zoutoplossingen tot een gehalte van $0,4\%$ N verdund worden.

Door eenige oriënteerende proeven was gevonden, dat toevoeging van Na- of Cacitraat geen invloed had op de hoeveelheid geproduceerd zuur. De toevoeging van citraat aan den voedingsbodem is achterwege gelaten, daar bij latere extractie van het gevormde zuur en onderzoek daarvan, de aanwezigheid van citroenzuur wel hinderlijk kon zijn.

De eerste kunstmatige voedingsbodem, waarmee eenige series bepalingen van de constante van een paar stammen zijn verricht bestond uit een mengsel van de volgende oplossingen:

1. geneutraliseerde caseïnepepton. Eindconcentratie 0,4 % N.
2. 0,36 mol. fosfaat. Eindconcentratie 0,03 mol. fosfaat (PO_4'''). De fosfaat oplossing bestond uit 88,16 gr.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12 \text{ H}_2\text{O} + 15,53 \text{ gr. K H}_2\text{PO}_4$ per L.

3. mol. CaCl_2 eindconcentratie 0,01 mol. CaCl_2 .
4. mol. MgCl_2 „ 0,005 mol. MgCl_2 .

In dit mengsel werd zooveel lactose opgelost, dat de concentratie daarvan $2\frac{1}{2}\%$ was. De vloeistof was helder, na gefractionneerde sterilisatie was ze iets opalescent; er zette zich echter, ook na zeer lang staan, niet het geringste neerslag af. p_{H} was = 6,28.

Hinderlijk was bij de titratie de gele kleur en de bufferwerking. Deze voedingsbodem eischte, wanneer er 10 % water aan was toegevoegd 30,8 cm.³ 0,1 N NaOH ter neutralisatie van 100 cm.³ op phenolphthaleïne.

Het was gebleken, dat 5 dagen nadat een kolf met een bacteriestam was geënt, de zuurgraad hiervan niet meer toenam. Er zijn echter altijd minstens 7 dagen na het enten verstreken, vóór de bereikte zuurgraden werden bepaald.

De bepalingen der constante in dezen voedingsbodem (Caseïnepepton I) hebben de volgende uitkomsten gegeven.

TABEL LI.

Stam A in Caseïnepepton I (Mei 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_{H}	α	C_{HM}
0	0,0380 N	$4,07 \times 10^{-5}$	0,83	0,0064
0,020 N	0,0340 N	$2,69 \times 10^{-5}$	0,80	0,0068
0,040 N	0,0288 N	$2,04 \times 10^{-5}$	0,79	0,0067
0,060 N	0,0268 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,77	0,0079
0,080 N	0,0252 N	$1,82 \times 10^{-5}$	0,76	0,0091
0,100 N	0,0244 N	$1,74 \times 10^{-5}$	0,74	0,0098

TABEL LII.

Stam K in Caseinepepton I (Mei 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0352 N	$3,26 \times 10^{-5}$	0,83	0,0054
0,020 N	0,0372 N	$3,16 \times 10^{-5}$	0,80	0,0083
0,040 N	0,0372 N	$2,45 \times 10^{-5}$	0,78	0,0087
0,060 N	0,0362 N	$2,29 \times 10^{-5}$	0,76	0,0100
0,080 N	0,0350 N	$2,09 \times 10^{-5}$	0,75	0,0109
0,100 N	0,0351 N	$1,91 \times 10^{-5}$	0,73	0,0115

TABEL LIII.

Stam B in Caseinepepton I (Mei 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0364 N	$3,39 \times 10^{-5}$	0,83	0,0058
0,020 N	0,0378 N	$2,88 \times 10^{-5}$	0,80	0,0077
0,040 N	0,0376 N	$2,40 \times 10^{-5}$	0,78	0,0086
0,060 N	0,0380 N	$2,45 \times 10^{-5}$	0,76	0,0109
0,080 N	0,0378 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,74	0,0103
0,100 N	0,0380 N	$1,91 \times 10^{-5}$	0,73	0,0117

Hoewel in alle gevallen door toevoeging van Na lactaat de H-ionenconcentratie van een cultuur minder hoog wordt opgevoerd dan die van een cultuur, waaraan niets is toegevoegd, is het toch niet goed mogelijk om van een constante waarde der concentratie aan ongedissocieerde melkzuurmoleculen te spreken bij het einde van de gisting. De constante vertoont in alle drie onderzochte gevallen een duidelijken gang. Het kan zijn, dat in een dergelijken voedingsbodem de gisting minder zuiver verloopt, dan in wei of wei, waaraan pepton is toegevoegd. Wanneer er namelijk bij de gisting naast melkzuur een merkbare hoeveelheid andere zuren met een andere dissociatieconstante ontstaat, kan de berekening voor de concentratie aan ongedissocieerde zuurmoleculen niet meer worden toegepast. Het is ook mogelijk, dat de gisting in dezen voedingsbodem aan andere wetten gehoorzaamt dan in wei.

Het was dus noodig om in de eerste plaats na te gaan of ook bij verandering der samenstelling van den voedingsbodem geen constante voor de verschillende bacteriestammen werd gevonden.

Het N gehalte van den voedingsbodem, caseinepepton I is van 0,4% tot 0,46% verhoogd (caseinepepton II), terwijl de concentratie der andere bestanddeelen dezelfde werd gelaten. In dezen voedingsbodem is alleen met stam A een serie bepalingen verricht.

Met alle zes reïnculturen is een serie bepalingen verricht in een voedingsbodem, die als volgt was samengesteld: (caseinepepton III) geneutraliseerde pepton-oplossing. Eindconcentratie 0,4% N.

0,2 mol. fosphaat opl. (d.i. 49,25 gr. Na_2HPO_4 12 H_2O + 8,25 gr. KH_2PO_4 per L.) eindconcentratie 0,01 mol. fosphaat.

mol. CaCl_2 : eindconcentratie 0,001 mol. Ca.

mol. MgCl_2 : eindconcentratie 0,005 mol. Mg.

lactose: eindconcentratie $2\frac{1}{2}\%$.

Het is gewenscht om bij de bereiding van caseinepepton de pepsine niet langer dan 2×24 uur te laten inwerken. De gele kleur van de afgefilterde vloeistof is dan minimaal; bij langere inwerkingsduur wordt het N gehalte niet veel verhoogd, terwijl de bij de titratie hinderlijk gele kleur toeneemt. De omslag bij de titratie op phenolphthaleïne van den voedingsbodem kan door toevoeging van een verdunde methyleenblauwoplossing (de hoeveelheid daarvan hangt af van de kleur, die de voedingsbodem vertoont) wel iets verbeterd worden. De overgang van de groene kleur tot kleurloos is in veel gevallen scherper waar te nemen dan van licht geel tot zwak rose.

Het N gehalte van caseinepepton III is ten slotte nog verhoogd van 0,4% tot 0,8%, de eindconcentratie der andere bestanddeelen dezelfde gelaten (caseinepepton IV). Stam A is gelijktijdig in caseinepepton III en in caseinepepton IV geënt.

TABEL LIV.

Stam A in caseinepepton II ($\text{N} = 0,46\%$; $\text{PO}_4''' = 0,03$ mol) (Mei 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_HM
0	0,0346 N	$3,80 \times 10^{-5}$	0,83	0,0060
0,020 N	0,0302 N	$3,16 \times 10^{-5}$	0,81	0,0073
0,060 N	0,0280 N	$2,14 \times 10^{-5}$	0,79	0,0069
0,080 N	0,0274 N	$1,62 \times 10^{-5}$	0,75	0,0081
0,100 N	0,0276 N	$1,82 \times 10^{-5}$	0,74	0,0105

TABEL LV

Stam A in caseinepepton III ($N = 0,4\%$; $PO_4''' = 0,01$ mol.) (Mei 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0335 N	$3,89 \times 10^{-5}$	0,84	0,0060
0,020 N	0,0324 N	$2,69 \times 10^{-5}$	0,81	0,0066
0,040 N	0,0312 N	$2,29 \times 10^{-5}$	0,78	0,0076
0,060 N	0,0304 N	$1,74 \times 10^{-5}$	0,77	0,0074
0,080 N	0,0300 N	$1,66 \times 10^{-5}$	0,75	0,0084
0,100 N	0,0308 N	$1,62 \times 10^{-5}$	0,74	0,0097

TABEL LVI.

Stam B in caseinepepton III (Juni 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0336 N	$3,98 \times 10^{-5}$	0,84	0,0061
0,020 N	0,0336 N	$2,82 \times 10^{-5}$	0,80	0,0070
0,040 N	0,0316 N	$2,14 \times 10^{-5}$	0,78	0,0072
0,060 N	0,0272 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,77	0,0079
0,080 N	0,0316 N	$1,91 \times 10^{-5}$	0,75	0,0097
0,100 N	0,0300 N	$1,62 \times 10^{-5}$	0,74	0,0096

TABEL LVII.

Stam K in caseinepepton III (Juni 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0290 N	$3,16 \times 10^{-5}$	0,84	0,0044
0,020 N	0,0268 N	$2,40 \times 10^{-5}$	0,81	0,0054
0,040 N	0,0236 N	$1,62 \times 10^{-5}$	0,79	0,0050
0,060 N	0,0256 N	$1,55 \times 10^{-5}$	0,77	0,0063
0,080 N	0,0248 N	$1,48 \times 10^{-5}$	0,76	0,0073
0,100 N	0,0244 N	$1,29 \times 10^{-5}$	0,74	0,0074

TABEL LVIII.

Stam O in caseinepepton III (Juni 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0216 N	$1,66 \times 10^{-5}$	0,86	0,0019
0,020 N	0,0196 N	$1,10 \times 10^{-5}$	0,83	0,0023
0,040 N	0,0204 N	$1,02 \times 10^{-5}$	0,79	0,0031
0,060 N	0,0193 N	$0,85 \times 10^{-5}$	0,78	0,0034
0,080 N	0,0192 N	$0,63 \times 10^{-5}$	0,76	0,0031
0,100 N	0,0228 N	$0,93 \times 10^{-5}$	0,74	0,0054

TABEL LIX.

Stam R in caseinepepton III (Juni 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0302 N	$2,88 \times 10^{-5}$	0,84	0,0042
0,020 N	0,0280 N	$2,29 \times 10^{-5}$	0,81	0,0053
0,040 N	0,0276 N	$1,82 \times 10^{-5}$	0,79	0,0059
0,060 N	0,0260 N	$1,66 \times 10^{-5}$	0,77	0,0068
0,080 N	0,0268 N	$1,48 \times 10^{-5}$	0,75	0,0074
0,100 N	0,0252 N	$1,32 \times 10^{-5}$	0,74	0,0077

TABEL LX.

Stam D in caseinepepton III (Juni 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0296 N	$3,16 \times 10^{-5}$	0,84	0,0045
0,020 N	0,0300 N	$2,82 \times 10^{-5}$	0,81	0,0066
0,040 N	0,0296 N	$2,29 \times 10^{-5}$	0,79	0,0075
0,060 N	0,0296 N	$2,00 \times 10^{-5}$	0,77	0,0083
0,080 N	0,0293 N	$1,78 \times 10^{-5}$	0,75	0,0089
0,100 N	0,0288 N	$1,62 \times 10^{-5}$	0,74	0,0095

Gelijktijdige enting van A in caseine pepton III en in caseine pepton IV heeft de volgende waarden gegeven:

TABEL LXI.

Stam A in Caseinepepton III ($N = 0,4\%$); (Nov. 1920.)

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0400 N	$6,03 \times 10^{-5}$	0,83	0,0100
0,020 N	0,0369 N	$4,47 \times 10^{-5}$	0,80	0,0109
0,060 N	0,0359 N	$2,82 \times 10^{-5}$	0,76	0,0120
0,080 N	0,0363 N	$2,57 \times 10^{-5}$	0,75	0,0132
0,100 N	0,0331 N	$1,90 \times 10^{-5}$	0,74	0,0114
0,162 N	0,0350 N	$1,74 \times 10^{-5}$	0,70	0,0148

TABEL LXII.

Stam A in Caseinepepton IV ($N = 0,8\%$); (Nov. 1920).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C_H	α	C_{HM}
0	0,0521 N	$5,25 \times 10^{-5}$	0,81	0,0115
0,020 N	0,0497 N	$3,98 \times 10^{-5}$	0,79	0,0121
0,060 N	0,0489 N	$3,02 \times 10^{-5}$	0,75	0,0143
0,080 N	0,0481 N	$2,69 \times 10^{-5}$	0,74	0,0150
0,100 N	0,0477 N	$2,40 \times 10^{-5}$	0,73	0,0154
0,163 N	0,0459 N	$1,74 \times 10^{-5}$	0,70	0,0157

Uit deze proeven blijkt:

De zes stammen vertoonen bij enten in caseinepepton niet de constante waarde aan ongedissocieerde melkzuurmoleculen bij het einde van de gisting, die ze in wei, waaraan pepton is toegevoegd, vertoonen.

De waarden voor C_{HM} verkregen in caseinepepton III door gisting van A, zijn in November 1920 belangrijk hooger dan in Juni 1920 (Tabel LV en LXI). De gang in de constante van de bacterie is noch door een geringe verhooging in het N-gehalte van den voedingsbodem (Tabel LI en Tabel LIV) noch door verdubbeling daarvan (Tabel LXI en Tabel LXII) op te heffen.

Hoewel in eenige voorproeven was aangetoond, dat de titreeraciditeit van de caseinepepton veroorzaakt door de verschillende stammen na vijf dagen niet meer vermeerderde, heeft het groote verschil in C_{HM} waarden, gevonden voor A in Juni en in November, nog aanleiding gegeven om te onderzoeken of vier weken broeden nog een andere uitkomst geeft dan acht dagen. De culturen waren namelijk in Juni na acht dagen onderzocht; in November na vier weken.

Het is gebleken, dat hierdoor geen verschil optreedt. Stam A en stam B zijn geënt in caseinepepton III; na acht dagen werd aan de cultuur met een steriele pipet een hoeveelheid ontnomen, voldoende ter bepaling van C_{HM} ; dit werd na vier weken herhaald. Er bleek praktisch geen verschil op te treden tusschen de C_{HM} waarden, gevonden op verschillende tijden na de enting.

TABEL LXIII.

	C_{HM} na 8 dagen	C_{HM} na 28 dagen	
Stam A	0,0064	0,0065	in caseinepepton III.
Stam A	0,0077	0,0076	{ in caseinepept. III, waarvan concen- tratie toegev. Na-lact. 0,04 N is.
Stam B	0,0060	0,0059	in caseinepepton III.

Verhooging van het melksuikergehalte bleek ook geen invloed op de C_{HM} waarde te hebben, noch op den titreeraciditeit. Het lactosegehalte van caseinepepton III is daartoe verhoogd tot

5⁰/₀. Stam A is gelijktijdig geënt in caseinepepton III (lactose 2¹/₂ ⁰/₀) en in caseinepepton III (lactose 5⁰/₀).

De uitgiste culturen hebben de volgende uitkomsten gegeven:

TABEL LXIV.

Stam A in Caseinepepton III (lactose 2¹/₂ ⁰/₀).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C _H	α	C _{HM}
0	0,0340 N	$3,98 \times 10^{-5}$	0,84	0,0062
0,020 N	0,0324 N	$2,88 \times 10^{-5}$	0,81	0,0071
0,060 N	0,0312 N	$1,95 \times 10^{-5}$	0,77	0,0083
0,100 N	0,0294 N	$1,59 \times 10^{-5}$	0,74	0,0094

TABEL LXV.

Stam A in Caseinepepton III (lactose 5⁰/₀).

Concentratie toegev. Na lactaat	Concentratie gevormd melkz.	C _H	α	C _{HM}
0	0,0340 N	$3,98 \times 10^{-5}$	0,84	0,0062
0,020 N	0,0316 N	$2,95 \times 10^{-5}$	0,81	0,0071
0,060 N	0,0304 N	$2,04 \times 10^{-5}$	0,77	0,0086
0,100 N	0,0292 N	$1,66 \times 10^{-5}$	0,74	0,0098

Er is ook aangetoond, dat de gisting in dezen voedingsbodem niet eindigt, doordat er van het begin af schadelijke stoffen voor de bacteriën aanwezig zijn, die ze langzaam doen afsterven. Wanneer namelijk na vijf dagen broeden, een cultuur opnieuw geënt werd met een druppel reincultuur, kon geen verhooging van de reeds verkregen C_{HM} waarde worden bereikt. Zoowel de titreeraciditeit als de reële aciditeit bleven dezelfde, als die waartoe de eerste enting de cultuur had opgevoerd.

Om te beoordeelen of de melkzuurgisting in de caseinepepton zuiver verloopt, zijn de volgende proeven verricht:

1e. Er is aangetoond dat vluchtig zuur bij deze gisting niet in merkbare hoeveelheid ontstaat.

2e. De reële zuurgraden, die worden verkregen door gisting van de verschillende stammen in caseinepepton III, zijn vergeleken met die, welke ontstaan wanneer hieraan zooveel melkzuur wordt toegevoegd als door de stammen wordt geproduceerd.

3e. Het door gisting, van stam A in caseinepepton III, ontstane

zuur, is daaruit, op dezelfde wijze als bij wei, geëxtraheerd. Het geleidingsvermogen ervan is in verschillende verdunningen bepaald.

1. Bij zuur maken van een cultuur met H_3PO_4 , bleek het destillaat hiervan, verkregen door stoom inleiden ongeveer dezelfde titreeraciditeit ($\pm 0,0001 N$) en ongeveer hetzelfde geleidingsvermogen ($x_{25} = 2,30 \times 10^{-5}$) te hebben als het destillaat verkregen van een voedingsbodem, waarin geen gisting had plaats gehad. Met het ontstaan van vluchtig zuur naast melkzuur behoeft dus niet rekening gehouden te worden.

2. De neutralisatiecurve van caseïnepepton III is bepaald door aan 45 cm^3 met behulp van een microburet een bepaalde hoeveelheid $\pm N$ melkzuur toe te voegen en op te vullen tot 50 cm^3 . Hierbij is gebleken, dat de neutralisatiecurven van twee preparaten caseïnepepton III, verkregen door vertering van twee verschillende caseïnepreparaten, overeenstemden.

TABEL LXVI.

Neutralisatiecurve caseïnepepton III.

Concentratie melkzuur	p_H
0	6,88
0,0225 N	4,85
0,0271 N	4,61
0,0345 N	4,39
0,0415 N	4,23
0,0552 N	4,00
0,0686 N	3,83

Door gisting van de verschillende stammen in caseïnepepton III is bij een potentieele aciditeit, vermeld in kolom II tabel LXVII, een reële aciditeit, vermeld in kolom III, gevonden; p_H berekend is de reële aciditeit, die de voedingsbodem zou verkrijgen, wanneer de door gisting ontstane hoeveelheid zuur in den vorm van zuiver melkzuur was toegevoegd.

TABEL LXVII.

Bacterie stam	Concentratie zuur	p _H gev.	p _H ber.
A	0,0400 N	4,22	4,26
A	0,0335 N	4,41	4,42
A	0,0343 N	4,38	4,39
A	0,0398 N	4,23	4,26
B	0,0385 N	4,27	4,30
B	0,0336 N	4,41	4,41
O	0,0252 N	4,69	4,71
O	0,0216 N	4,78	4,89
D	0,0355 N	4,34	4,36
D	0,0296 N	4,50	4,53
R	0,0367 N	4,33	4,34
R	0,0302 N	4,54	4,52
K	0,0356 N	4,35	4,36
K	0,0290 N	4,51	4,55

De overeenstemming tusschen p_H gev. en p_H ber. is (behalve in één geval, stam O) zoo, dat het waarschijnlijk is, dat het door gisting ontstane zuur een dissociatie constante heeft, die niet veel afwijkt van $1,5 \times 10^{-4}$.

Over het algemeen is echter de berekende aciditeit iets lager dan de door gisting veroorzaakte.

3. Om een hoeveelheid zuur te verkrijgen, voldoende om daarvan na extractie de dissociatieconstante in verschillende verdunningen te bepalen, moest de gisting in caseïnepepton III weer verlopen onder toevoeging van gesteriliseerd CaCO₃. Opmerkelijk was dat de zuurvorming toch zeer gering was. Bij de eerste proefneming werd slechts ongeveer 150 mgr. zuiver zuur verkregen. Het was mogelijk te constateeren, dat het zuur optisch actief was (d-modificatie). Meting van het geleidingsvermogen van het zuur gaf de volgende uitkomst:

TABEL LXVIII.

Concentratie	x ₂₅	α	K
0,01314 N	$5,165 \times 10^{-4}$	0,1019	$1,51 \times 10^{-4}$
0,00657 N	$3,517 \times 10^{-4}$	0,1388	$1,47 \times 10^{-4}$
0,00328 N	$2,382 \times 10^{-4}$	0,1882	$1,43 \times 10^{-4}$
0,00164 N	$1,598 \times 10^{-4}$	0,2526	$1,40 \times 10^{-4}$

Bij herhaling van deze proef werd meer melkzuur verkregen, zoodat de draaiing van een $\pm 3,3$ procentige oplossing bepaald kon worden. Deze was $0,166^\circ$ in een 2 dM. buis, wat overeenkomt met $[\alpha]_D = 2,5$. De aard van de stikstofbron blijkt dus hier geen invloed te hebben op de modificatie melkzuur, die ontstaat.

In wei zoowel als in caseïnepepton wordt door stam A overwegend d-melkzuur gevormd.

De meting van het geleidingsvermogen van het geëxtraheerde zuur heeft de volgende uitkomst gegeven:

TABEL LXIX.

Concentratie	χ_{25}	α	K
0,0335 N	$8,163 \times 10^{-4}$	0,0633	$1,43 \times 10^{-4}$
0,0167 N	$5,701 \times 10^{-4}$	0,0885	$1,43 \times 10^{-4}$
0,0084 N	$3,917 \times 10^{-4}$	0,1210	$1,40 \times 10^{-4}$
0,0042 N	$2,680 \times 10^{-4}$	0,1655	$1,38 \times 10^{-4}$
0,0021 N	$1,841 \times 10^{-4}$	0,2273	$1,40 \times 10^{-4}$

Uit de genomen proeven blijkt met vrij groote waarschijnlijkheid, dat de melkzuur gisting in caseïnepepton III niet minder zuiver verloopt dan in wei. Mogelijk zou nog zijn, dat bij gisting in caseïnepepton meer zuur reageerende, niet in aether oplosbare, stikstofverbindingen werden gevormd door de bacterie dan in wei.

Er zijn daarom eenige bepalingen van aminostikstof uitgevoerd volgens VAN SLIJKE¹⁾ in wei en in caseïnepepton.

TABEL LXX.

Aard van de vloeistof	Mgr. Aminostikstof per 100 cM.
Wei IV (niet geënt)	14,4
Wei IV geënt met A.	14,4
Wei IV (concentratie Na lactaat 0,1 N) geënt met A	16,8
Caseïnepepton III (niet geënt)	39,0
Caseïnepepton III geënt met A	39,6
Caseïnepepton III (concentratie Na lact. 0,1 N) geënt met A	43,2

¹⁾ ABDERHALDEN Handb. biochem. Arbeitsmeth., Band VI, S. 278. (1912).

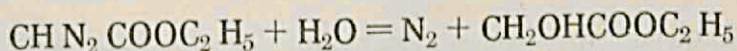
Hieruit blijkt, dat bij groei van A in wei de hoeveelheid aminostikstof niet toeneemt; wanneer de concentratie van het toegevoegde Na lactaat = 0,1 N is, valt een geringe toename te constateeren. Hetzelfde is van de caseinepepton te zeggen. Zoowel uit deze, als uit de andere proeven blijkt, dat de gevonden gang in de C_{HM} waarde niet verklaard kan worden, doordat de berekening van de concentratie aan ongedissocieerde melkzuurmoleculen op onjuiste wijze geschiedt.

Hoewel te verwachten is, dat in een cultuurvloeistof, die onvolgende voedingsstoffen bevat, ook geen constante wordt gevonden, (in de verschillende soorten wei namelijk, waarin slechte groei plaats had, is ook niet een constante gevonden), is toch een gang in de constante, zooals in alle gevallen in caseinepepton is gevonden, op grond hiervan niet te verklaren.

CONCLUSIES.

1. De meest waarschijnlijke waarde van de dissociatieconstante van melkzuur is op grond van metingen van het geleidingsvermogen, van electrometrische bepalingen van de H-ionenconcentratie van mengsels, bestaande uit Nalactaat en melkzuur, en van colorimetrische bepalingen: $1,5 \times 10^{-4}$. De veel hogere waarden, hiervoor opgegeven door BÜRKLE (1899), en door VAN SLYKE en BAKER (1918), zijn onjuist.

2. De methode, gegeven door Bredig, voor de bepaling der H-ionenconcentratie van een vloeistof, is voor de bepaling van de dissociatieconstante van organische zuren principieel onjuist. De vermoedelijke oorzaak hiervan is de invloed, die de aanwezigheid van den glycolzuren aethylester uitoefent op den dissociatiegraad van deze zuren. De ontleding van den diazoazijnzuren aethylester verloopt in alle onderzochte gevallen zeer nauwkeurig volgens de vergelijking



als een reactie van de 1e orde.

De grootte van de afwijking, die wordt verkregen bij de bepaling van de dissociatieconstante van organische zuren volgens de methode Bredig, van die, verkregen door meting van het geleidingsvermogen, blijkt eenigzins uit de volgende cijfers:

	K (volgens Bredig)	K (geleidingsvermogen)
melkzuur	$1,32 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$
azijnzuur	$1,66 \times 10^{-5}$	$1,80 \times 10^{-5}$
propionzuur	$1,28 \times 10^{-5}$	$1,42 \times 10^{-5}$
boterzuur	$1,35 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-5}$

3. De melkzuur gisting in wei, waaraan pepton is toegevoegd, eindigt wanneer de concentratie der ongedissocieerde melkzuurmoleculen een bepaalde waarde heeft bereikt, onafhankelijk van de bufferwerking van de wei. Dit geldt voor *verschillende* lactococcen, waarvoor ook *herhaaldelijk* een „constante” is gevonden.

4. Wijziging van de samenstelling van de wei veroorzaakt het optreden van *verschillende* waarden van deze constante voor eenzelfde stam. Er hebben dus ook andere factoren, dan de concentratie ongedissocieerde melkzuurmoleculen, invloed op het einde van de melkzuur gisting.

5. Er is aangetoond, dat de invloed van den ouderdom der reïncultuur er niet één is van regelmatige versterking of verzwakking. Het onderzoek is in dit opzicht echter niet uitgebreid genoeg. Voor één en dezelfde reïncultuur vindt men dus in den loop van den tijd niet dezelfde waarde voor C_{HM} .

6. In een kunstmatigen voedingsbodem is *niet* een constante waarde voor C_{HM} gevonden, maar een duidelijke gang, zoodat de oorspronkelijk bedoelde poging, n.l. het bereiden van een kunstmatigen voedingsbodem ter bepaling van deze constante niet is geslaagd.

7. Bacteriën, die optisch actief zuur produceeren (b.v. d-modificatie) worden door links draaiend zuur op volkomen overeenkomstige wijze in hun groei belemmerd als door het zuur dat ze zelf produceeren. De physiologische werking der twee modificaties schijnt dus dezelfde te zijn.

8. Zooals was te verwachten, is gebleken uit metingen van het geleidingsvermogen van optisch actieve zuren, die overwegend uit de d-modificatie bestonden, dat de waarden van de dissociatieconstanten voor links en rechts melkzuur aan elkaar gelijk zijn of slechts zeer weinig verschillen.

STELLINGEN

I

De methode van bepaling der dissociatieconstante van organische zuren volgens BREDIG is onjuist.

Zie deze diss. bl. 16.

II

Er is reden om aan te nemen, dat de remming van de ontwikkeling der melkzuurbacteriën aan een narcotische werking van het afgescheiden product is toe te schrijven.

III

De concentratie der ongedissocieerde melkzuurmoleculen, aanwezig bij het einde van de melkzuurgisting in wei, kan niet als biologisch kenmerk van de melkzuurbacteriën worden gebruikt.

Zie deze diss. bl. 2 en 3.

IV

De oorzaak van het dikwijls geconstateerde feit, dat melkzuurbacteriën een slechte ontwikkeling vertoonen in melk, afkomstig van nieuwmelksche koeien, is niet opgehelderd.

Zie deze diss. bl. 39.

V

De methode ter bepaling van Ca bij aanwezigheid van fosfaat, vermeld in TREADWELL, Lehrb. Anal. Chem. II bl. 382 (1919) is onjuist.

VI

MICHAËLIS' verklaring van den invloed van het milieu (reële aciditeit) op de werking der fermenten is niet bevredigend.

Biochem. Zeitschr. 35, 386. (1911); 57, 70. (1913); 53, 320. (1913); 58, 315. (1913).

VII

Ten onrechte meenen NEF en EVANS te mogen besluiten tot de onbestaanbaarheid van melkzuuraldehyde, resp. α -oxyphe-nylacetaldehyde.

Lieb. Ann., 335, 268. (1904).

Am. Chem. Journ. 35, 115. (1906).

VIII

Bij de quantitative bepaling van kleine hoeveelheden As, o.a. in verband met de onderzoeken van DE HAAS, heeft de titratie van den arseenspiegel met jodium volgens RAMBERG voordeelen boven die met $K_2Cr_2O_7$ en H_2SO_4 volgens BERNTROP.

DE HAAS, Arch. f. Ophthalmologie, 99, 16. (1919).

IX

De gelvorming van de fibrine is als een kristallisatieproces te beschouwen, dat reversibel is.

HEKMA, Biochem. Zeitschr., 77, 249. (1916).

STÜBEL, Pflüger's Arch., 181, 285. (1920).

X

De waarde, door KENDALL gevonden voor de beweeglijkheid van het H-ion, is te verkiezen boven die, gevonden door ROTHMUND en DRUCKER.

KENDALL, Journ. Chem. Soc. 101, 1275. (1912).

ROTHMUND en DRUCKER, Zeitschr. physik. Chem. 46, 827. (1903).

XI

De morphologische omschrijvingen van LINNAEUS, de CANDOLLE en van BENTHAM voor het lancetvormige blad zijn met elkaar in strijd.

LINNAEUS, *Philosophia botanica* p. 42.

DE CANDOLLE, *Théorie élém. de la bot.* p. 485.

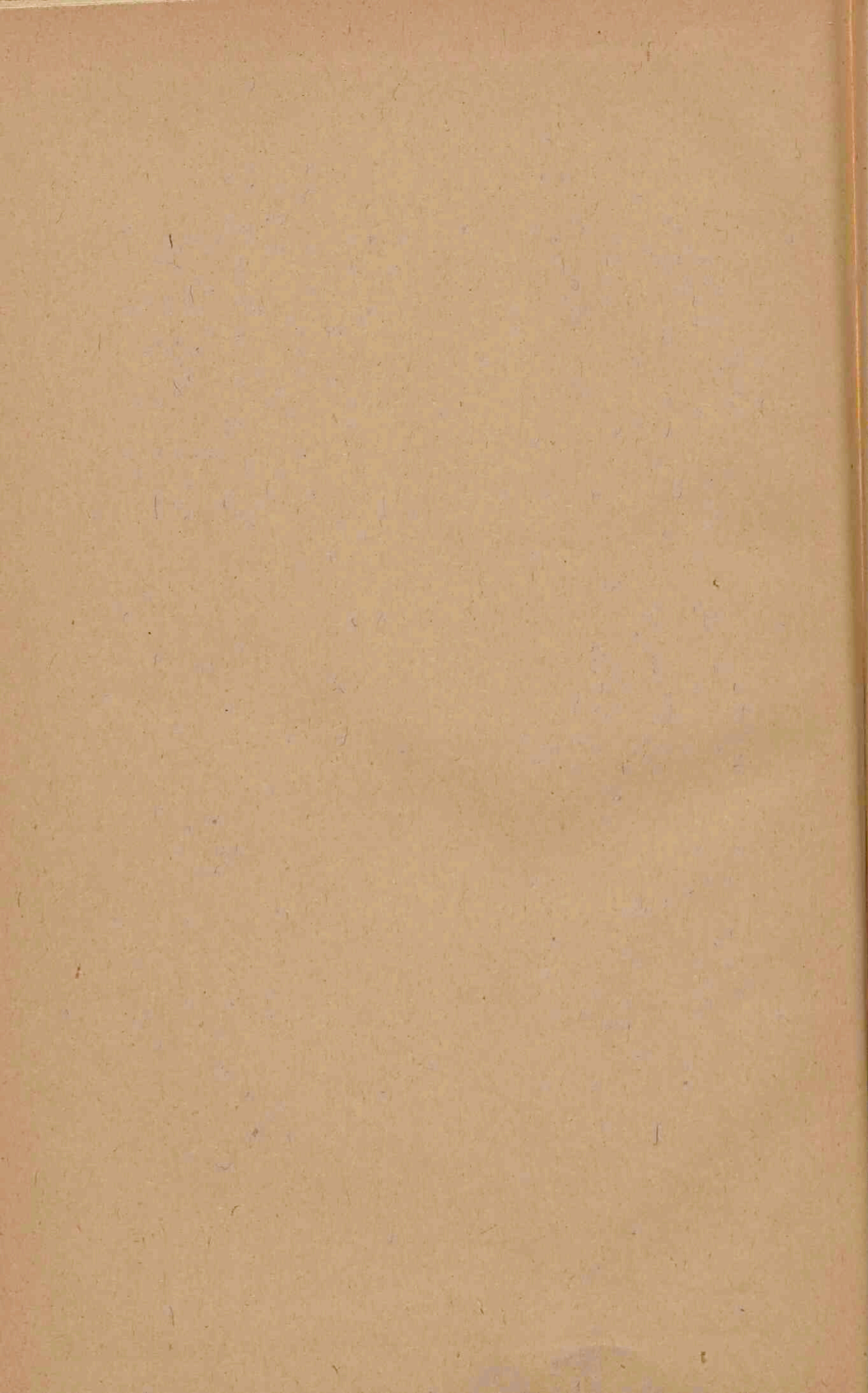
BENTHAM, *Outlines of Botany* p. 19.

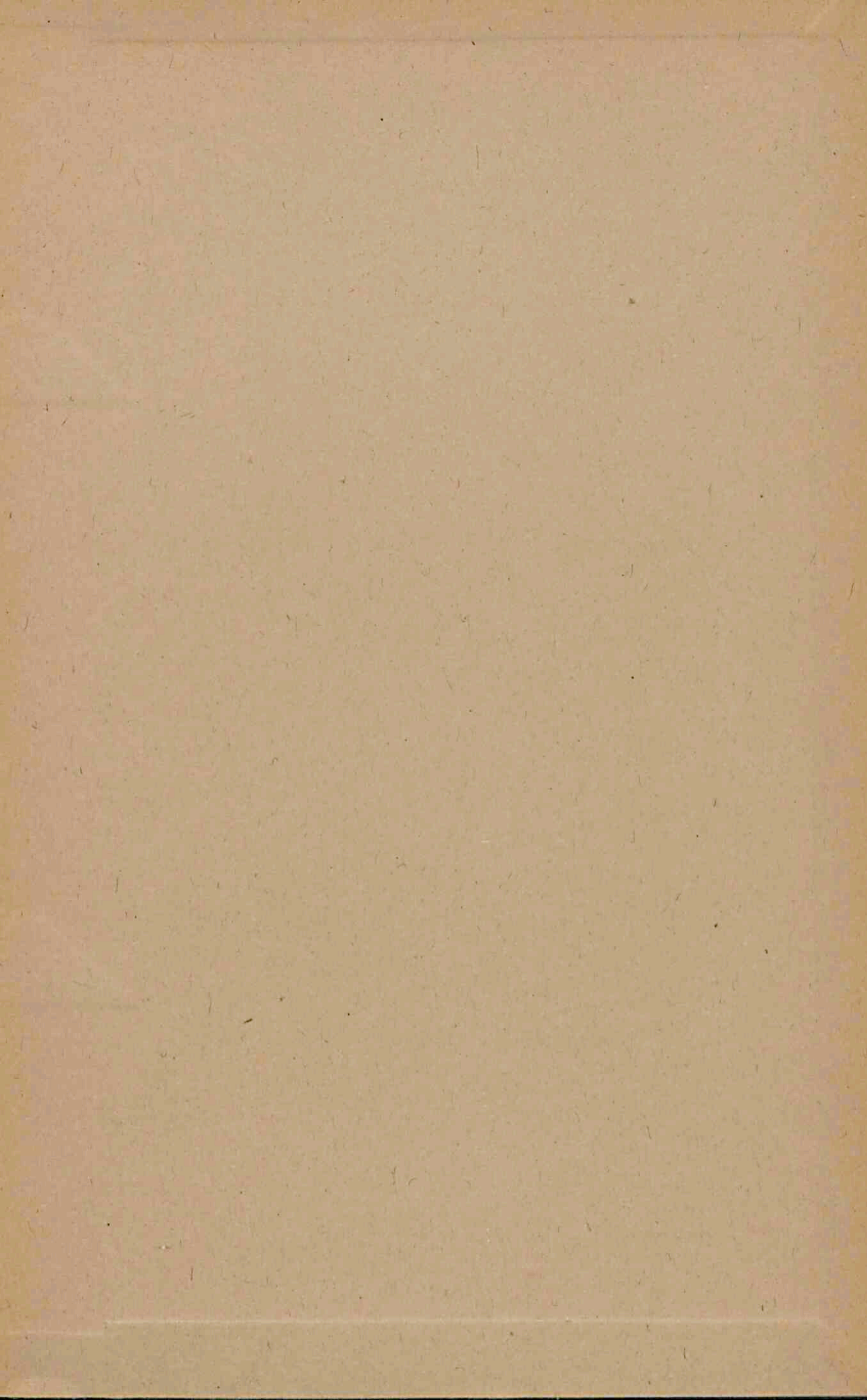
XII

Botanische tuinen streven er gewoonlijk naar veel plantensoorten te hebben. Voor wetenschappelijk doel behoorden ze er elk slechts weinige te kweken.

XIII

De oorzaak van de bevorderende werking van het Ca-ion op de phagocytose is niet voldoende opgehelderd.





A