



Bijdrage tot de kennis der bacterieele gistingen

<https://hdl.handle.net/1874/281673>

A. qu. 192, 1924

**BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER
BACTERIEELE GISTINGEN**

A. J. LE FÈVRE

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER
BACTERIEELE GISTINGEN.

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



2494 520 0

Diss. Utrecht 1924

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER BACTERIEELE GISTINGEN.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN
GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUUR-
KUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE
UTRECHT OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAG-
NIFICUS DR. H. F. NIERSTRASZ, HOOGLEERAAR
IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUN-
DE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN
DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE
TE VERDEDIGEN OP MAANDAG 1 DECEMBER
1924, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

ANDRÉ JARICH LE FÈVRE
GEBOREN TE ARNHEM.



ELECTR. DRUKKERIJ L. E. BOSCH & ZON, UTRECHT

AAN MIJN TANTE
EN
AAN MIJN AANSTAANDE VROUW.

Bij het voltooien van dit proefschrift is het mij een behoefte, U, Hoogleeraren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, mijn dank te betuigen, voor het onderwijs, dat ik van U mocht ontvangen.

U, Hooggeleerde COHEN, dank ik ten zeerste voor het van U, op colleges en practica, genoten onderricht. In het bijzonder waardeer ik het, dat Gij mij na mijn doctoraalexamen op zoo welwillende wijze steun hebt verleend.

U Hooggeleerde VAN ROMBURGH, ben ik zeer erkentelijk voor al datgene, wat ik door Uw onderricht heb geleerd. De kritische geest, die in Uw onderwijs op den voorgrond treedt, zal voor mijn verder leven van groot nut zijn.

Met zeer veel genoegen, Hooggeleerde KRUYT, denk ik steeds terug aan Uw heldere en boeiende colleges. Voor het van U genoten onderwijs en Uw leerrijken, vriendschappelijken omgang, blijf ik U in hooge mate dankbaar.

U, Hooggeleerde DE GRAAFF, Hooggeachte Promotor, ben ik zeer veel verschuldigd, voor de bereidwillige wijze, waarop Gij mij steeds met raad en daad hebt bijgestaan bij de bewerking van dit proefschrift.

De belangstelling, die Gij bij mij hebt opgewekt voor de grondproblemen der biochemische wetenschappen, is mede oorzaak geweest, dat ik mijn studie onder uw leiding heb willen beëindigen.

Zeer waardeer ik Uw toewijding en hulpvaardigheid, die Gij mij steeds onverflauwd getoond hebt.

De uitbreiding mijner gezichtkring onder Uw leiding is voor mijne ontwikkeling van hooge waarde geweest.

Ook aan U, Hooggeleerde SCHOORL, mijn dank voor de welwillendheid, waarmede Gij mij steeds hebt willen ter zijde staan.

INHOUD

	Bladz.
INLEIDING	1
HOOFDSTUK I.	
Bacteriën-materiaal	10
HOOFDSTUK II.	
Gisting in tegenwoordigheid van sulfiet, de zoogenaamde sulfietgisting	13
HOOFDSTUK III.	
Qualitatief onderzoek van de vergistingsproducten ..	32
HOOFDSTUK IV.	
Quantitatief onderzoek van de vergistingsproducten ..	54
HOOFDSTUK V.	
Voorstelling en beschouwing, aangaande de gistings-schemata	78
HOOFDSTUK VI.	
Enzymen	98
SAMENVATTING	104

INLEIDING.

De ervaring leert, dat zoowel suikerrijke, plantaardige, als eiwitrijke, dierlijke producten gemakkelijk en spontaan in ontleding overgaan, wanneer zij eenigen tijd aan zich zelf worden overgelaten, maar, terwijl de eerstgenoemde zelfstandigheden doorgaans een gisting doen ontstaan, verwekken de laatstgenoemde stoffen een meer of minder intensieve rotting.

In het dagelijksch leven is men in staat deze beide processen gemakkelijk te onderscheiden, maar beschouwt men ze van uit een meer wetenschappelijk standpunt, dan blijken beide omzettingen moeilijker te onderkennen, ja zelfs een analogen aard te bezitten, omdat beide slechts door den invloed van microörganismen tot stand kunnen komen.

Het is voornamelijk PASTEUR geweest, die aantoonde, dat de gisting, zoowel als de rotting veroorzaakt worden door microben, waardoor hij het eerste licht deed opgaan, aangaande den waren aard en de ware beteekenis dezer, reeds sedert de oudheid, den mensch bekende processen. Een schrede verder wordt afgelegd, wanneer BUCHNER in 1897 bewijst, dat de alcoholische gisting een, van de levende gistcel af te scheiden, fermentatief proces is.

Met de ontdekking der zymase in het kiemvrije gistperssap, is dus het proefondervindelijk bewijs geleverd voor het bestaan van een zoogenaamde celvrije gisting.

Toch moet men op grond hiervan niet zeggen, dat daarmee de uitspraak van PASTEUR kwam te vervallen, die toch in de gisting een zuiver microbiologisch proces zag, want zonder levende gistcel, geen zymase.

Tegelijk begint er een nieuwe periode van onderzoek,

welke tracht door te dringen in het eigenlijke wezen van het gistingproces zelf.

De suikerontledingen, die door microörganismen worden veroorzaakt, worden doorgaans aangeduid door het product, dat 't meest op den voorgrond treedt. Zoo spreekt men van de *melkzure gisting*, waarbij uit koolhydraten in hoofdzaak melkzuur wordt gevormd, b.v.: $C_6 H_{12} O_6 = 2 C_3 H_6 O_3$; de *methaangisting*, waarbij nevens kooldioxyde groote hoeveelheden methaan uit het suikermolecuul ontstaan, b.v.: $C_6 H_{12} O_6 = 3 CH_4 + 3 CO_2$.

Een andere, zeer bekende gisting is de *boterzure gisting*. Hier onstaat, naast CO_2 en H_2 , belangrijke hoeveelheden boterzuur.

De gisting, welke in het volgende aan een nader onderzoek werd onderworpen, kan worden aangeduid met den naam van de *gemengd zure gisting*. Zij wordt o.a. veroorzaakt door een bepaalde groep van bacteriën n.l. de *coli-typhus*-familie.

De stoffen, die hier als eindproducten optreden, zijn: melkzuur, azijnzuur, mierenzuur en barnsteenzuur, welke aldus aanleiding werden te spreken van „*gemengd zure gisting*”; terwijl tevens gassen ontstaan, n.l. kooldioxyde en waterstof.

Hoewel de eindproducten van deze gisting bekend zijn, wordt een juist inzicht, aangaande het chemisme, dat hier onder den invloed der microscopisch kleine wezentjes tot stand komt, nog steeds gemist. Het is hier hetzelfde geval als het voor kort nog was met de alcoholische gisting, waarvan begin- en eindproducten bekend waren, maar waarvan de omzetting of de omzettingen, welke plaats grijpen, nog geheel in 't duister waren gehuld.

Het probleem, het wezen der gemengd zure gisting in studie te nemen, leek, na de gelukkige wijze, waarop NEUBERG zich met het vraagstuk der alcoholische gisting heeft bezig gehouden, zeer gewenscht, te meer nu NEUBERG van meening schijnt, dat, hetgeen hij voor de alcoholische

gisting tracht waar te maken, ook voor andere o.a. bacterieële-gisting zou gelden, ja, dat zijn opvatting een algemeene basis vormt ter verklaring van alle gistingsverschijnselen.

Als we de onderzoekingen over de gemengd zure gisting, veroorzaakt door de *coli-typhus*-groep, in de litteratuur naslaan, dan kunnen we twee verschillende richtingen van onderzoek vinden.

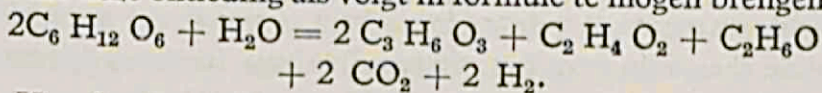
Eén groep van onderzoekers heeft zich daarbij voornamelijk bezig gehouden met het vinden van differentieel diagnostische kenmerken.

Zoo heeft b.v. DUCAMP ¹⁾ de ontleding van verschillende koolhydraten door *paratyphus*-bacteriën uitvoerig onderzocht.

Ook DE GRAAFF ²⁾ heeft de vergisting der koolhydraten door de *Paratyphioideeën* bestudeerd, maar, terwijl DUCAMP zijn onderzoek niet uit structuurchemisch standpunt heeft beschouwd, is dit door DE GRAAFF wel gedaan. Tevens is dit onderzoek meer systematisch en over de meer zeldzame suikers uitgebreid, terwijl bovendien verschillende stammen in onderzoek werden genomen.

De andere groep van onderzoekers heeft meer op het chemisch gebeuren, tijdens de ontledingen, gelet.

Zoo o.a. is het HARDEN ³⁾, die de vergisting van druiven-suiker door *Bact. coli (commune)* heeft bestudeerd. Hij meent deze ontleding als volgt in formule te mogen brengen:



Hoe fraai en verrassend kloppend op het eerste gezicht ook, houdt deze formule in het geheel geen rekening met mierenzuur, noch barnsteenzuur, twee producten, die bij deze gisting zonder eenigen twijfel steeds en zelfs in belangrijke hoeveelheid gevormd worden.

¹⁾ DUCAMP, Thèse de Lille 1907.

²⁾ W. C. DE GRAAFF, Tijdschr. v. Vergl. Geneesk. 1917, 1918, 1919.

³⁾ A. HARDEN, Journ. of the Chem. Soc. 79, 1901, 610.

HARDEN heeft bovendien de gassen, die ontstaan, geanalyseerd en zich de vraag gesteld, of deze steeds in een onderling constante verhouding ontstaan.

POTTEVIN¹⁾ heeft een zelfde onderzoek gedaan als HARDEN, maar gebruikte, in plaats van *coli*-, *paratyphus*-bacteriën. Hij vindt bij de ontleding van glucose de volgende eindproducten: alcohol, azijnzuur, melkzuur, barnsteen zuur, CO₂ en H₂; ook hier weder wordt van mierenzuur niet gesproken.

De laatste tien jaar heeft men zich in 't bijzonder toegelegd, om het chemisme van de gisting te bestudeeren. Zooals gezegd, is het NEUBERG, die zich dit onderwerp tot zijn levenswerk heeft gesteld.

Hoewel NEUBERG en zijn leerlingen zich voornamelijk met de alcoholische gisting hebben bezig gehouden, hebben zij toch ook onderzoekingen gedaan, ten opzichte van de bacterieële, boterzure en gemengd zure gisting.

De theorie, die hij heeft uitgewerkt voor de alcoholische gisting, biedt, naar hij meent, groote kans licht te verspreiden over het wezen der gisting in 't algemeen, althans geeft zij voldoende grond om te trachten erop voort te bouwen, in de hoop aldus een verklaring te vinden voor het ontstaan van de vele en uiteenlopende producten der gisting.

Voordat NEUBERG zich met het ontledingsprobleem bezig hield, waren er al vele onderzoekers geweest, die verschillende theorieën over het uiteenvallen van de koolhydraten onder invloed van microben hadden opgesteld.

Waar een alcoholische en een gemengd zure gisting zoo menigmaal gecombineerd optreden, bovendien de vorming van melkzuur uit suikerachtige materie, zoowel in het dierlijk organisme, als onder invloed van alkaliën, gemakkelijk tot stand komt, ligt het voor de hand te meenen, dat de

¹⁾ POTTEVIN, Ann. de l'Inst. Pasteur, 19, 1905, 426.

ontleding van het hexosemol. ($C_6 H_{12} O_6$) ingeleid wordt door een uiteenvallen in twee triosemol. ($C_3 H_6 O_3$).

Daar melkzuur dezelfde empirische formule heeft, werd de hexosesplitsing voorgesteld als het ontstaan van twee mol. melkzuur. Deze hypothese is het eerst uitgesproken door NENCKI, maar werd voornamelijk door BUCHNER en MEISENHEIMER verdedigd.

Ook heeft VON BAYER dezelfde gedachte gehad. Hij trachtte te verklaren, door het uittreden en weder intreden van de bestanddeelen van water, hoe een hexose-mol. kan overgaan in een lichaam van hypothetische structuur: $CH_3 - CHOH - C(OH)_2 - C(OH)_2 - CHOH - CH_3$, dat vervolgens, door uittreden van water, in $CH_3 - CHOH - CO - CO - CHOH - CH_3$ overgaat, welk lichaam gemakkelijk in twee mol. melkzuur uiteenvalt, waartoe slechts de medewerking van twee mol. water noodig is.

Hoewel deze hypothese onhoudbaar bleek, doordat gist noch melkzuur, noch de melkzure zouten ontleedt, werd de triosehypothese niet afgezworen. Er zijn immers nog andere stoffen, die dezelfde empirische formule hebben als melkzuur en zoo waagden BUCHNER en MEISENHEIMER thans de veronderstelling uit te spreken, dat dioxyaceton, LOEB, dat glycerinealdehyde en WOHL, dat methylglyoxaal het zoo lang gezochte tusschenproduct der alcoholische gisting was. Het experiment stelde deze onderzoekers spoedig te leur, daar genoemde stoffen door de levende gistcel slechts langzaam en moeilijk worden aangetast; zij konden dus bezwaarlijk als tusschenproducten bij het zoo stormachtig verloopende proces worden opgevat.

Hoewel de triosehypothese dus volgens de feiten onhoudbaar was, kreeg zij op onverwachte wijze steun door geheel andere biochemische omzettingen.

Bij deze omzettingen was gebleken, dat de α -ketonzuren als intermediaire stofwisselingsproducten in het dierlijk

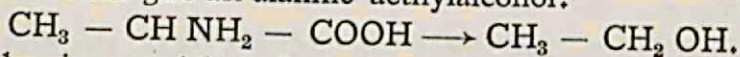
organisme optreden. Een dezer ketonzuren bleek het pyrodruivenzuur te zijn. Dit zuur, dat gemakkelijk door oxydatie uit methylglyoxaal onstaat, werd zelfs door FERNBACH en SCHOEN¹⁾ bij de alcoholische gisting, in tegenwoordigheid van CaCO_3 , aangetoond.

Het is de pathologie geweest, die ons het verband heeft geleerd tusschen de α -ketonzuren en de triosehypothese.

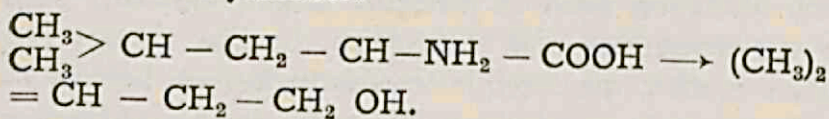
Door NEUBAUER is n.l. gevonden, dat de α -aminozuren, die in het eiwitmolecule voorkomen, door het dierlijk organisme over de α -ketonzuren als intermediaire producten worden afgebroken.

Naast de belangrijke ontdekking van NEUBAUER, toonde FELIX EHRLICH²⁾ aan, dat de gistcel in staat is de α -aminozuren, in een suikerhoudend milieu, om te zetten tot primaire aminen, welke één C atoom minder in het mol. bezitten.

Zoo vormt gist uit alanine aethylalcohol:



uit leucine amylalcohol:



Ook hier sprak NEUBAUER de gedachte uit, dat, in aansluiting en in overeenstemming met de desamineering door het dierlijk organisme, al weder de α -ketonzuren als primaire tusschenproducten zouden kunnen fungeeren en ook thans bewees het experiment de juistheid zijner veronderstelling.

Evenals de α -aminozuren, worden de α -ketonzuren door de gist tot primaire alcoholen met één C atoom minder omgezet.

¹⁾ FERNBACH en SCHOEN. Biochem. Zeitschr. 89, 1918, 365. C. R. 157, 1913, 1478.

²⁾ EHRLICH. Chem. Centr. 1906, II, 501, 1118.

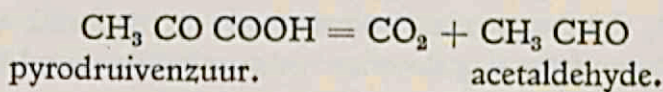
Ontstaat dus uit het phenylalanine ($C_6H_5CH_2CHNH_2COOH$) phenylalcohol ($C_6H_5CH_2CH_2OH$), uit het phenylpyrodruivenzuur ($C_6H_5CH_2COCOOH$) wordt dezelfde verbinding gevormd.

Dat de ontleding der α -aminozuren over de α -ketonzuren verloopt, en dat niet de α -oxyzuren tusschen producten zijn, bewees men uit het feit, dat de α -oxyzuren door de gistcel onaangetast bleven.

De ontdekking van EHRLICH is voor het probleem van de gisting van groot belang geweest. Zij verspreide licht over het ontstaan der foezelolie, welke niet langer als een product der suiker-, maar veeleer als een der eiwitontleding moet worden beschouwd, terwijl zij tevens NEUBAUER tot de uitspraak verleide, dat ook bij de suikerontleding, tijdens de alcoholische gisting, de ketonzuren, met name het pyrodruivenzuur, een rol van groote beteekenis zouden kunnen vervullen.

Hebben NEUBAUER en EHRLICH het licht ontstoken, de man, die hierop voortbouwende een geheel nieuwe gistings-theorie heeft opgesteld, die een beeld gaf van de verschillende fasen der ontleding van de suikerachtige materie van af het koolhydraat tot aan de eindproducten, is NEUBERG.

De eerste stap in deze richting is zijn ontdekking van de suikervrije gisting, n.l. de inwerking der gistcel uitsluitend op ketonzuren. Hij vindt, dat de levende gistcel, zoowel als het gistperssap, in staat blijken, die zuren te ontleden onder vorming van kooldioxyde en een aldehyde met één C atoom minder dan het zuur, dus:

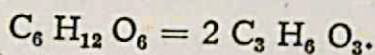


Hij neemt ter verklaring aan, dat de gistcel een bijzonder enzym produceert, de *carboxylase*, dat aansprakelijk voor die ontleding moet worden gesteld.

De suikervrije gisting brengt een nieuw inzicht, aangaande het wezen der alcoholische gisting.

NEUBERG bewijst niet alleen het bestaan der carboxylase in de levende gistcel, maar tevens in het gistperssap en in de kiemvrije gistpraeparaten. Hij heeft aangetoond, dat, waar een zymatische werking is ook steeds een carboxylase aanwezig is.

NEUBERG zegt dan ook „*Keine Zymase ohne Carboxylase*”. Zoo is de triosehypothese weer naar voren gebracht, omdat NEUBERG aanneemt, dat het hexosemol. uiteenvalt in twee triosemol. :



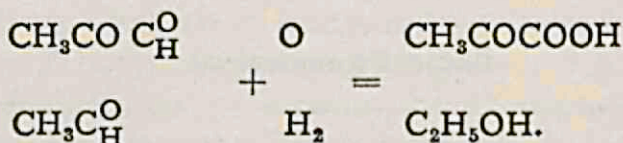
en zich daarbij denkt, dat de gevormde triose, het methylglyoxaal is, dat gemakkelijk en snel tot pyrodruivenzuur zich omzet, welk zuur onder invloed der carboxylase in kooldioxyde en acetaldehyde wordt ontleed.

Het bezwaar tegen deze hypothese is, dat het methylglyoxaal, waaruit de andere producten moeten ontstaan, door gist absoluut niet wordt ontleed.

NEUBERG heeft deze moeilijkheid omzeild, door er op te wijzen, dat er minstens 8 isomere vormen van het methylglyoxaal kunnen bestaan en dat de vorm, die ontstaat bij het uiteenvallen van het hexosemol. dus een andere zijn moet dan dien, welken wij door onze synthese kennen. Trouwens, de formule $CH_3 CO CHO$ of $C_3 H_4 O_2$ wijst er reeds op, dat een hydraat hier met groote waarschijnlijkheid een rol zal spelen, wil althans het eerste splitsingsproduct der suiker aan de formule van een triose $C_3 H_6 O_3$ voldoen.

NEUBERG krijgt een flinken steun voor zijn gedachte door het feit, dat het pyrodruivenzuur zoo gemakkelijk te vergisten is, en later nog doordat het hem gelukt acetaldehyde, het ontledingsproduct van het pyrodruivenzuur, vast te leggen. Door aan te nemen, dat pyrodruivenzuur als tussenproduct optreedt, is de moeilijkheid, om het ontstaan van kooldioxyde te verklaren, overwonnen.

NEUBERG denkt zich, dat de aethylalcohol ontstaat uit het acetaldehyde, en wel, door aan te nemen, dat het methylglyoxaal met het acetaldehyde de omzettingen van Cannizzaro volbrengt, als volgt:



Hierbij treedt pyrodruivenzuur op, dat uiteenvalt in $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{CO}_2$, onder de katalytische werking van de carboxylase.

NEUBERG heeft zich dus een beeld gevormd van de ontleding van 't suikermolecule door gist, en hoewel de eindproducten der gemengd zure gisting geheel andere zijn dan die der alcoholische gisting, heeft reeds hij getracht, in aansluiting met zijn theoretische en experimentele bewijzen, ook eenig licht te verspreiden over het wezen der koolhydraat-ontleding door de bacteriën.

Wil men doordringen in de ontleding van stoffen met zes C atomen, dan lijkt het ons noodzakelijk de vraag, welke van zeer samengestelden aard is, eenvoudiger te formuleeren en eerst de vergisting van stoffen met twee en drie C atomen te bestudeeren.

Dit werd dan ook gedaan en de stoffen, die hiervoor in aanmerking kwamen, geënt in hoofdzaak met de *coli*-bacteriën, daar het onderzoek veel te uitgebreid zou worden, om alle bacteriën van de *coli-typhus*-groep op al deze stoffen te laten inwerken. Alleen daar, waar de gisting met de andere bacteriën nieuwe inzichten kon geven, hetzij over den invloed der chemische structuur, hetzij over eventuele tusschenproducten, zijn ook die proeven ingezet.

Want een nauwkeurige studie van de omzettingen der suikers en suikerachtige lichamen met een gering aantal koolstofatomen, kan met waarschijnlijkheid een beter en gemakkelijker inzicht geven van de eigenlijke suikerontleding, of wel, daarvoor een waardevolle werkhypothese doen opstellen.

HOOFDSTUK I.

Bacteriën-materiaal.

De microörganismen, die het vermogen bezitten de koolhydraten te ontleden onder vorming van melkzuur, barnsteen-CO2 en H2, als eindproducten, kunnen tot een bepaalde groep n.l. tot die van de bacteriën der gemengd zure gisting worden samengevat. Tot deze groep behooren de *coli-typhus*achtige organismen, welke een zeer groot aantal verschillende soorten omvatten, die zoowel saprophyten als parasieten zijn.

Tot deze laatsten rekent men de *paratyphus*-, de *typhus*-, en de *dysenterie*-bacteriën, terwijl de meeste *coli*-bacteriën een saprophytisch karakter vertoonen.

Voor het volgend onderzoek zijn van al deze soorten eenige stammen in studie genomen, echter, om het te beperken, werd in hoofdzaak het meest actieve organisme, het *B. coli* gekozen.

De bacteriën werden, alvorens te worden gebruikt, steeds op hunne kenmerkende eigenschappen gecontroleerd. Dit geschiedde, door van de culturen verdunningen te maken in steriel water en hiervan platen te gieten. Na tweemaal 24 uur werden de geïsoleerde kolonies overgeënt op schuin gestolde agar en van deze culturen de eigenschappen nagegaan op de gebruikelijke en specifieke voedingsbodems. Tijdens het onderzoek werd tevens de zuiverheid der stammen gecontroleerd.

De proeven werden steeds genomen met 24 uur oude agar-culturen. Bij de drie *colistammen*, deed zich het eigenaardige verschijnsel voor, dat één der stammen een positieve

reactie van VOGES-PROSKAUER¹⁾ gaf, terwijl de twee andere deze reactie niet gaven.

Daar deze drie organismen eigenbeweging bezaten en een volkomen coliachtigen groei te zien gaven, werden zij alle drie als *coli*-bacteriën beschouwd, en het laatst bedoelde niet met *B. lactis aërogenes* (onbeweeglijk — slijmvorming) vereenzelvigd, daar we meenen, dat dit ongeoorloofd is.

De reactie van VOGES-PROSKAUER wordt in Amerika gebruikt om *faecale coli*- te onderscheiden van andere *coli*-bacteriën. Hier gebruikt men daarvoor meestal de proef van EIJKMAN. De reactie van V.-P. berust op het feit, dat de *coli*-bacteriën uit een bijzonderen voedingsbodem, waarin glucose is opgelost, diacetyl produceeren. Deze stof, die waarschijnlijk uit methylacetylcarbinol $\text{CH}_3 \text{ CH OH COCH}_3$ (aldolcondensatie van acetaldehyde) wordt gevormd, verbindt zich onder invloed van 10 % kaliloog met arginine of kreatine²⁾ tot een eösineachtig gekleurd lichaam, terwijl uit denzelfden voedingsbodem deze *coli*-bacterie niet zooveel zuurproduceert, dat methylroodduidelijkrood wordt gekleurd. Deze eene *colistam* gaf dus een positieve VOGES-PROSKAUER reactie, een negatieve methylrood-reactie en een negatieve vergisting bij 45° C. Dit is in volkomen overeenstemming met hetgeen VAN DONGEN en DE GRAAFF geconstateerd hebben, die voor het eerst een verband hebben aangetoond tusschen de gisting bij 45° C., de reactie op methylrood en die van VOGES-PROSKAUER.

Behalve de bacteriën der *coli-typhus*-groep werd bij dit onderzoek nog een andere bacterie gebruikt en wel voor de bereiding van dioxyceton, n.l. de *Acetobacter suboxydans*.

Deze bacterie heeft het vermogen, om glycerine om te zetten in dioxyceton, zooals in 't algemeen de meer-

¹⁾ O. VOGES en B. PROSKAUER. Tijdschr. v. Vergl. Geneesk. April 1922, blz. 121.

²⁾ Deze stoffen komen uit het pepton van den voedingsbodem.

waardige alcoholen tot ketosen, evenals de bekende sorbosebacterie van BERTRAND.

Een uitvoerige beschrijving van het organisme vindt men in het Tijdschrift voor Vergl. Geneeskunde, door KLUYVER en DE LEEUW.¹⁾

Het komt in 't kort hierop neer, dat deze microbe geënt wordt op verd. gistwater, waaraan 2% glycerine is toegevoegd. De kolf wordt 10 à 14 dagen bij 25° C. geplaatst; de glycerine is dan grootendeels omgezet in dioxyaceton. De kolfinhoud wordt afgefiltreerd en in vacuüm beneden 30° C. ingedampt. Er blijft een lichtbruine stroop in de kolf achter; deze wordt met een tienvoudige hoeveelheid abs. alcohol geschud. Dioxyaceton lost op, terwijl de verontreinigingen achterblijven; deze worden geheel neergeslagen door daarna de helft van het volume der oplossing aan aether toe te voegen. Na flink schudden, laat men 24 uur staan en filtreert dan de heldere vloeistof af. Deze lichtbruine vloeistof wordt weer beneden 30° C. in vacuüm ingedampt. De achterblijvende, bruine stroop wordt na eenige dagen vast, en door fijnwrijven onder abs. alcohol en affiltreren, verkrijgt men een zuiver wit dioxyaceton. Smpt. 79° à 80° C.

De bacterie, *A. suboxydans*, werd bewaard op moutagar-platen, waaraan eenig krijt was toegevoegd. De microben vormen op deze platen kristallen van Ca-oxygluconaat, waardoor de oppervlakte zeer hard wordt, hetgeen het overenten bijzonder bemoeilijkt. Daarom werden de bacteriën ook op verd. gistwater verder gekweekt, waarvan met behulp van een pipet PASTEUR werd afgeënt.

¹⁾ A. J. KLUYVER en F. G. J. DE LEEUW. Tijdschr. v. Vergel. Geneesk. April 1924.

De bacterie *A. Suboxydans* was mij welwillend door Prof. KLUYVER voor dit onderzoek afgestaan.

HOOFDSTUK II.

Gisting in tegenwoordigheid van sulfiet, de zogenaamde sulfietgisting.

§ 1. Al schijnt het niet gemakkelijk alle tusschenproducten der gisting aan te toonen, toch zijn alle proeven in deze richting belangrijk, omdat elk positief resultaat een stap nader tot het einddoel beteekent. Het bestaan van een intermediair product te constateeren, geschiedt door het vast te leggen aan bepaalde stoffen, zóó, dat het product aan een verdere ontleding geheel wordt onttrokken.

Een andere weg zou zijn, de samenstelling van het milieu van de gisting en de omstandigheden, waaronder deze tot stand komt, zóó te veranderen, dat bepaalde producten tot hoofdproducten werden.

Het is aan NEUBERG en zijn leerlingen gelukt door toevoeging van zwaveligzure zouten, *acetaldehyde* als tusschenproduct bij de alcoholische gisting vast te leggen.¹⁾ Deze „opvangmethode,” zooals NEUBERG die noemt, is later in het voorbijgaan door hem toegepast op enkele suiker-ontledingen door bacteriën.

Zoo laat NORD ²⁾ *B. coli*, *B. dysenteriae*, *B. lactis aërogenes*, dus *coli-typhus*-organismen, inwerken op glucose, manniet en glycerine, in tegenwoordigheid van sulfiet en vindt daarbij *acetaldehyde* in verschillende hoeveelheid.

Ook PETTERSON en FRED ³⁾ vinden *acetaldehyde* als zij

¹⁾ C. NEUBERG en E. REINFURTH. Biochem. Zeitschr. 89, 1918, 389.

²⁾ C. NEUBERG en F. F. NORD. Biochem. Zeitschr. 96, 1919, 133.

³⁾ PETTERSON en FRED. Journ. of Biol. Chem. Vol. 44 no. 1, 1920 October.

enkele suikers der pentosereeks laten vergisten, o.a. door *B. acetoaethylicum* en *Lactobacillus pentoaceticus*.

Ook zij hebben sulfiet toegevoegd, om met grooter zekerheid het acetaldehyde te kunnen aantoonen. Het was dus nog een open vraag, maar zeker eene van belang, of bij de gemengd zure gisting de ontleding onder invloed van *alle* typische vertegenwoordigers der *coli-typhus* groep steeds acetaldehyde als tusschenproduct doet vinden.

NEUBERG, die het ontstaan van acetaldehyde verklaart door het uiteenvallen van pyrodruivenzuur in acetaldehyde en kooldioxyde, heeft bij de alcoholische gisting ook getracht het pyrodruivenzuur zelf in handen te krijgen, hetgeen hem echter tot dusver niet gelukt is.

Bij de alcoholische gisting gaat het acetaldehyde door reductie over in aethylalcohol, terwijl bij de gemengd zure gisting waterstof als zoodanig vrijkomt en hoogstens een spoortje alcohol wordt gevormd. Toch wordt bij deze gisting, zooals we uit de proeven zullen aantoonen, steeds acetaldehyde als tusschenproduct gevonden. Hierbij moet dadelijk worden gezegd, dat ook zonder sulfiet, sporen aldehyde onder de gemengd zure gistingsproducten werden opgemerkt, maar in oneindig veel kleinere hoeveelheden, dan wanneer sulfiet werd toegevoegd.

Deze sulfiet-methode, die door NEUBERG en REINFURTH met succes is toegepast bij de alcoholische gisting, berust op het feit, dat acetaldehyde gebonden wordt aan secundaire, zwaveligzure zouten. Acetaldehyde is het eerste tusschenproduct, dat op deze wijze bij een gisting is vastgelegd.

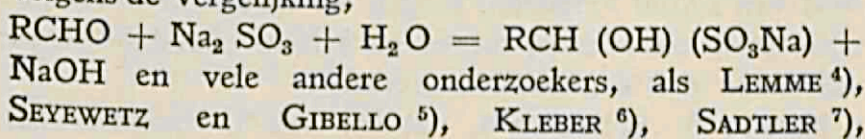
Wel had LOEB¹⁾ getracht, door toevoeging van aniline, ammoniak of phloroglucine bij gistende suikeroplossingen, tusschenproducten vast te leggen, maar hij verkreeg slechts negatieve resultaten.

¹⁾ W. LOEB. Zeitschr. f. Electr. Chem. 13, 1907, 511.

Ook FERNBACH en SCHOEN¹⁾ dachten pyrodruivenzuur vastgelegd te hebben met koolzure kalk. Deze proeven echter, door NEUBERG herhaald, bleken onjuist te zijn. Dat FERNBACH en SCHOEN zeker zóó geen pyrodruivenzuur-calcium konden afscheiden, blijkt nog ten overvloede hieruit, dat het Ca-zout van dit zuur goed oplosbaar is in water en dat het bovendien gemakkelijk door gist verder wordt ontleed. Er was dus geen reden het op deze wijze vast te leggen, laat staan aan het vergistende milieu te onttrekken.

NEUBERG en FÄRBER²⁾ zijn de eersten geweest, die, door in alkalisch milieu de gisting te doen plaats grijpen, constateerden, dat neutrale, zwaveligzure zouten in groote concentratie in 't geheel niet schadelijk op de gist werken. Dit was onverwacht, omdat het vrije zwaveligzuur, evenals de zure zouten daarvan, giftig, dus antiseptisch werken en in hun tegenwoordigheid geen behoorlijke vergisting mogelijk is.

Toen nu gevonden was, dat de neutrale, zwaveligzure zouten onschadelijk waren, hebben NEUBERG en REINFURTH getracht met deze zouten het acetaldehyde vast te leggen. Deze eigenschap der aldehyden in 't algemeen was reeds lang bekend. TIEMANN³⁾ heeft aangetoond, dat dinatriumsulfiet met enkele aldehyden zich om kan zetten volgens de vergelijking;



¹⁾ A. FERNBACH en M. SCHOEN. C. R. 157. 1913, 1478; 158. 1914, 1719.

²⁾ C. NEUBERG en E. FÄRBER. Biochem. Zeitschr. 78, 1917, 238.

³⁾ F. TIEMANN. B. B. 31, 1898, 3310; 32, 1899, 817.

⁴⁾ G. LEMME. Chem. Zeitg. 27, 1903, 896.

⁵⁾ A. SEYEWETZ en GIBELLO. Chem. Centr. 1904, II, 263.

⁶⁾ C. KLEBER. Pharm. Review 22, 1904, 94.

⁷⁾ S. S. SADTLER. Amer. Journ. of Pharm. 76, 1904, 84.

BURGESS¹⁾, AUERBACH en BARSCHALL²⁾, hebben hierop een methode voor quantitative bepaling van aldehyden gebaseerd, waarbij de gevormde natronloog acidimetrisch bepaald wordt.

Het is NEUBERG en REINFURTH gelukt het acetaldehyde vast te leggen. Een bedrag van 73,45 % van de toegevoegde hoeveelheid suiker, werd als aldehyde teruggevonden.

NORD heeft bij zijn proeven met bacteriën dezelfde resultaten gekregen, terwijl ik zelf met glycol 80 % terugvind als aan sulfiet gebonden acetaldehyde.

De aldehydesulfietverbinding, een maal tot stand gekomen, stoort de gisting in 't geheel niet; het is een zeer resistente verbinding, hetgeen blijkt uit het feit, dat men in de kolf geen spoor acetaldehyde kan ruiken. De overmaat sulfiet in de oplossing werkt bovendien de ontleding van de acetaldehyde-natriumbisulfietverbinding tegen, zoodat zelfs bij verwarming de verbinding zeer moeilijk uiteenvalt.

Eerst wanneer de overmaat sulfiet wordt weggenomen, door neer te slaan met bariumchloride, kan men door koken een hydrolytische splitsing bewerken, waarbij acetaldehyde in vrijheid wordt gesteld.³⁾ Deze splitsing is volledig, indien men kookt onder toevoeging van calciumcarbonaat.

Als we nu suikerhoudende vloeistoffen in tegenwoordigheid van sulfiet vergisten, mogen we verwachten, dat het suikermolecule (aldose, zoowel als ketose) zich dadelijk zal verbinden met een sulfietmolecule.

KERP,⁴⁾ RIETER⁵⁾, ROCQUES⁶⁾, zoowel als

¹⁾ H. C. BURGERS. *The Analyst*. 29, 1904, 78.

²⁾ FR. AUERBACH en H. BARSCHALL. *Arb. a. d. Kaiserl. Ges. Amte* 22, 1905, 588.

³⁾ De acetaldehyde-zwaveligzurebarium-verbinding is zeer oplosbaar in water.

⁴⁾ W. KERP. *Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh. Amte*. 21. 1904, 180.

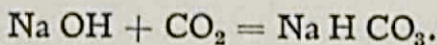
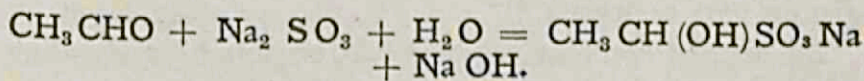
⁵⁾ E. RIETER. *Schweizer. Wochenschr. f. Chem. und Pharm.* 36. 1898, 41.

⁶⁾ H. ROCQUES. *Journ. Pharm. Chem.* (6) 7. 1898, 605.

FARNSTEINER¹⁾ hebben verbindingen van glucose met zwaveligzuur gekregen; ook van zuur natriumsulfiet met glucose zijn verbindingen bekend. Deze komen in twee optisch actieve isomeren voor, zoodat er in de vloeistof een evenwicht is tusschen het sterk linksdraaiende en het zwak rechtsdraaiende additieproduct.

Nu reageeren de secundaire alkalisulfieten zelf alkalisch en als zij met aldehyden reageeren, komt er bovendien alkalihydroxyde vrij; beide omstandigheden werken het ontstaan van complexe verbindingen der suikers tegen. Dit gebeurt ook met de onbestendige bisulfietverbindingen van de suikers, zoodat zeker in de dinatriumsulfieethoudende oplossing slechts een uiterst gering bedrag der suikers (in het meest ongunstige) geval zal gebonden zijn.

Dit blijkt ook wel, want bij aanwezigheid van veel sulfiet, wordt toch alle suiker, die voorhanden is, vergist. TIEMANN heeft aangetoond, dat voor het tot stand komen van aldehyde-bisulfietverbindingen, uit aldehyden en bisulfieten, een weinig natriumcarbonaat een goede katalysator is. Nu ontstaat bij de suikervergisting door bacteriën steeds kooldioxyde, dat zich verbindt met het vrij geworden natriumhydroxyde, zoodat hier van zelf eenig dubbelkoolzurenatrium ontstaat, waardoor de aldehyde-bisulfietverbinding gemakkelijker tot stand komt. De reacties, die zich in de gistingsvloeistof afspelen, nadat het acetaldehyde en het kooldioxyde zijn gevormd, kunnen dus als volgt worden in beeld gebracht.



¹⁾ K. FARNSTEINER. Zeitschr. f. Unters. d. Nähr. und Genussm. 5, 1902, 1124.
7, 1904 449.

Hoewel het sulfiet niet schadelijk op de microörganismen werkt, zijn er toch grenzen, waarbinnen de concentratie moet worden gehouden. Het gevolg hiervan is, dat men nimmer de theoretische hoeveelheid aldehyde kan binden. De groote overmaat sulfiet, die men dan noodig zou hebben, om de dissociatie van de complexe aldehydesulfietbinding tegen te gaan, zou schadelijk blijken voor den groei en de ontwikkeling der bacteriën en daardoor dus de gisting storen.¹⁾ De aldehyde opbrengst is dus niet geheel onafhankelijk van de hoeveelheid sulfiet, hoewel er geen rechtstreeksche betrekkingen tusschen beide bestaan. Daar het oplosbare dinatriumsulfiet in groote concentratie voor de bacteriën eenigszins giftig werkt, hebben we bij de quantitative aldehydebepalingen van het moeilijk oplosbare, neutrale calciumsulfiet $\text{CaSO}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ gebruik gemaakt.

NORD noemt dit een groote verbetering voor de „opvangmethode” omdat nu ook stoffen, als bijv. *glycerinealdehyde* en *dioxyaceton*, welke zeer gevoelig zijn voor het alkalisch reagerende secundair natriumsulfiet, toch onderzocht kunnen worden.

Glycerinealdehyde en dioxyaceton vormen met natriumbisulfiet gemakkelijk complexe verbindingen, terwijl zij dit met het neutrale, moeilijk oplosbare calciumsulfiet niet doen.

§ 2. NEUBERG en REINFURTH hebben nog een andere methode uitgewerkt om acetaldehyde bij de alcoholische gisting vast te leggen.²⁾

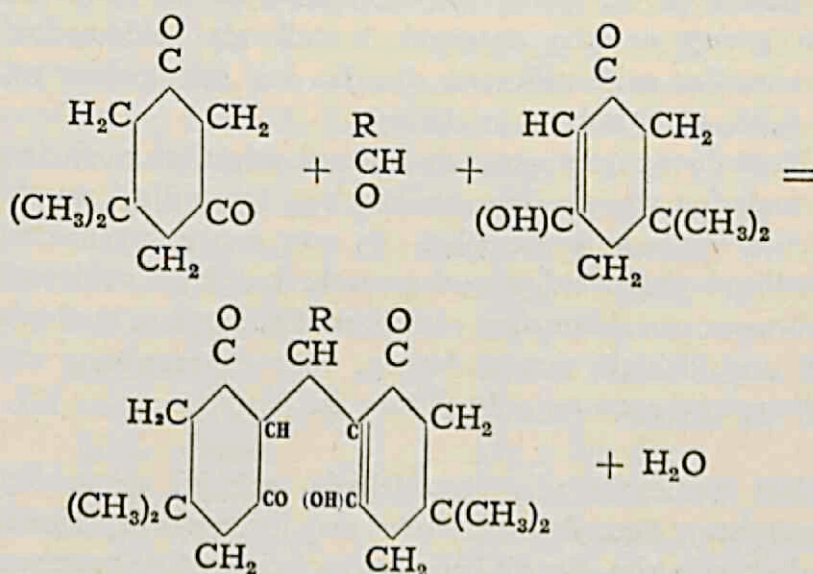
Zij hebben hiervoor een neutrale, organische verbinding

¹⁾ In ons geval, waar wij met bacteriën-materiaal bij 37° C. werken, bovendien calciumcarbonaat toevoegen, om de gevormde zuren te binden en te neutraliseeren, bewerken deze beide omstandigheden bovendien een kleine dissociatie van de aldehydesulfiet verbinding.

²⁾ C. NEUBERG en E. REINFURTH. Biochem. Zeitschr. 106. 1920, 281.

genomen, n.l. het door VORLÄNDER¹⁾ bereidde *dimethylhydroresorcine* (dimethyl-cyclohexaandion).

Deze stof, die kortheidshalve *dimedon* genoemd wordt, bezit de eigenschap, om zich met aldehyden te verbinden onder afsplitsing van een mol. water:



Daar de koolhydraten en ketonen dit niet doen, is dit dus een zeer geschikte stof, om het acetaldehyde, ook bij tegenwoordigheid der suikers, vast te leggen. De stof, die ontstaat door condensatie van twee mol. dimedon met één mol. acetaldehyde heet *aethylideen-bis-dimethylhydroresorcine* of *aldomedon*. Het dimedon is moeilijk oplosbaar, maar de hoeveelheid, die noodig is bij de gisting, lost, hoewel langzaam, toch geheel op. Daarentegen is het aldomedon in water nagenoeg absoluut onoplosbaar.

Door deze eigenschap is de stof dus gemakkelijk af te scheiden. Nu is het dimedon een protoplasmagift, zoodat

¹⁾ D. VORLÄNDER. B. B. 30. 1897, 1801.
Ann. 294. 1896, 253.

het slechts in kleine concentratie gebruikt werd door NEUBERG en REINFURTH bij de ontleding met gist. Toen ik deze methode op de bacteriegisting toepaste, bleek het, dat deze stof een sterk vergift was voor deze organismen, zoodat met een zeer verdunde oplossing van dimedon moest worden gewerkt. Het gevolg hiervan was, dat er slechts een gering neerslag ontstond, 't welk als „aldomedon” kon worden geïdentificeerd, doordat het onoplosbaar was in water en oplosbaar in alcohol.

Noch door wijziging van de hoeveelheid suiker, noch door verandering van de samenstelling van het milieu, waarbij zoowel van een organischen als van een anorganischen voedingsbodem werd gebruik gemaakt, kon ik een voldoende opbrengst aan aldomedon verkrijgen. Zoodat deze methode, om acetaldehyde vast te leggen, voor de vergisting met *coli-typhus*-bacteriën onbruikbaar is.

Het vastleggen van acetaldehyde, ook bij de koolhydraatgisting door deze bacteriën, mag het eerste experimenteel bewijs zijn, dat dit lichaam een intermediair tusschenproduct daarbij is. Gevonden werd, dat bijna alle stoffen, die worden aangetast, over het aldehyde worden afgebroken. Dit is dus geheel in analogie met hetgeen over de ontleding van die stoffen door gist is waargenomen. Ook hier weder blijkt de uitspraak van ARINSTEIN juist te zijn, wanneer hij zegt:

„Demnach beschreitet die Natur in den Grundzügen den selben Weg bei den wichtigsten biochemischen Abbaureactionen der Kohlenhydrate. Nur der Schlusszahl ist je nach der Lebensbedürfnissen der einzelnen Organismen verschieden.”

Experimenteel gedeelte.

§ 3. Zooals in de theoretische beschouwing is gezegd, gelukt het ook bij de bacterieële gisting het ontstaan van acetaldehyde door middel van de opvangmethode van NEUBERG en REINFURTH, aan te toonen.

Om zeker te zijn, dat acetaldehyde uitsluitend afkomstig is van de stof, die men wil laten vergisten, moet gewerkt worden, zoowel in anorganisch als in organisch milieu. Hoewel ik vele anorganische voedingsbodems heb gemaakt, met steeds verschillende stoffen in steeds wisselende concentraties, is het niet gelukt een anorganischen voedingsbodem te vinden, waarin de bacteriën, ook in tegenwoordigheid van sulfiet, zoo goed groeien, dat zij energie genoeg hebben, om de koolhydraten merkbaar te ontleden. De volgende anorganische voedingsbodems werden gemaakt.

I. 0,5 gr. $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	II. 1,0 gr. $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$
0,5 „ glucose	1,0 „ glucose
1,0 „ CaCO_3	1,0 „ Na_2CO_3
2,0 „ $\text{Na}_2 \text{SO}_3$ ¹⁾	2,0 „ $\text{Na}_2 \text{SO}_3$
100 c.C. H_2O .	100 c.C. H_2O .
III. 1,0 gr. $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	IV. 1,0 gr. $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$
1,0 „ glucose	1,0 „ Mg Cl_2
1,0 „ CaCO_3	1,0 „ NaCl
2,0 „ Na_2SO_3	1,0 „ CaCO_3
100 c.C. H_2O	2,0 „ Na_2SO_3
	1,0 „ glucose
	100 c.C. H_2O

Deze voedingsbodems geënt met *B. coli* gaven nimmer eenig resultaat bij het opsporen van acetaldehyde ²⁾. Daarna werd lakmoes aan deze oplossingen toegevoegd, wat ook geen verbetering gaf.

Vervolgens heb ik de hoeveelheden natriumsulfiet veranderd, daar deze verbinding toch eenigszins schadelijk voor de bacterie is, maar ook bij verschillende, kleinere concentraties van het sulfiet was er na 7 tot 12 dagen geen spoor aldehyde aan te toonen.³⁾

¹⁾ Het sulfiet werd anhydrisch berekend.

²⁾ Alleen bij I was een spoortje aldehyde aantoonbaar.

³⁾ Ook met den voedingsbodem van CAPALDI en PROSKAUER* werden slechts sporen aldehyde aangetoond.

*) CAPALDI en PROSKAUER. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 23. 1895, 452.

Het gevolg van deze voorproeven was, dat ik noodgedwongen tot een organisch milieu mijn toevlucht moest zoeken; de conclusie, dat ook de stikstofvoeding van groote beteekenis is voor het verloop der gisting! Op grond van dit resultaat werd toen besloten den volgenden voedingsbodem te bereiden.

1,0 gr. „Witte” pepton
 2,0 „ Na_2SO_3
 1,0 „ CaCO_3
 100 c.C. H_2O .

waaraan 2 gr. glucose werd toegevoegd.

Het bleek al dadelijk, dat de bacteriën in deze oplossing goed groeien wilden en ik kon reeds na 5 dagen duidelijk acetaldehyde aantoonen. Ik heb daarna steeds deze oplossing gebruikt, waarbij de hoeveelheden sulfiet wel eens veranderd werden, hetgeen echter geen belangrijke vermeerdering van aldehydeopbrengst gaf¹⁾.

De volgende werkwijze werd gevolgd.

Eerst werd een heldere 1 % „Witte” peptonoplossing gemaakt, door 10 gr. pepton op te lossen tot 1 L., deze op 117°C . in een autoclaaf gedurende 5 minuten te verwarmen en daarna helder te filtreeren.

Van deze oplossing werd telkens 100 c.C. genomen en in kolfjes van 200 c.C. inhoud gedaan; hierbij werd vervolgens 1 gr. CaCO_3 en 2gr Na_2SO_3 gevoegd en deze oplossing gedurende een half uur in stroomenden waterdamp gesteriliseerd.

Den volgenden dag werden 2 gr. van de te onderzoeken stof, zoo steriel mogelijk, bij de oplossing gevoegd; daarna werd weer een half uur in de autoclaaf op 100°C . verhit.

Voor bepaalde suikers, die in de alkalische oplossing gevaar loopen te verharsen, werd een afzonderlijke sterilisatie bij 100°C . van een waterige oplossing in dubbele

¹⁾ De blancoproef gaf steeds een negatieve acetaldehydereactie.

concentratie toegepast, deze steriele oplossing werd vervolgens bij de sulfiet-oplossing gevoegd.

Dat enkele koolhydraten, bijv. gulose, door de sterilisatie sterk verharsen, blijkt duidelijk, door de oplossing voor en na de sterilisatie te polariseeren¹⁾. De draaiing vermindert soms tot op de helft, hetgeen niet geschiedt, als we in waterige oplossing steriliseeren en daarna de twee steriele oplossingen samenbrengen.

Nadat de voedingsbodem zoo gesteriliseerd was, werd deze tot den volgenden dag bij 37° C. weg gezet, om de steriliteit te controleeren, eerst daarna werd de vloeistof met de bacterie geënt. De enting geschiedde met een 24 uur oude agarcultuur; deze werd met een steriel oogje van 1,5 m.M. doorsnede in de vloeistof gebracht. Er werd zooveel mogelijk getracht in elke 100 c.C. oplossing één oogje met bacteriën te brengen. Indien na twee dagen geen groei te zien was, werd opnieuw bijgeënt. De gisting had plaats in een broedstoof bij 37° C.

Eenige proefjes werden ingezet, om den eenigszins schadelijken invloed van de sulfiet-oplossing bij deze hooge temperatuur te kunnen beoordeelen.

Twee kolfjes met 100 c.C. alkalische bouillon werden geënt met *B. coli*, terwijl in een der kolfjes 2 gr. Na_2SO_3 was gevoegd. Na verloop van 2×24 uur was er een duidelijk verschil in groei in de beide kolfjes te zien. Een grooter verschil in groei was te zien, als beide kolfjes met een *paratyphus*stam geënt waren. Uit de verkregen resultaten blijkt dus, dat de microben niet geheel ongevoelig zijn voor de aanwezigheid van sulfiet-ionen. Het aantoonen van acetaldehyde had plaats na 7, soms na 12 dagen.

Elken dag werd de kolf omgeschud, om het calcium-carbonaat van den bodem door de vloeistof heen te mengen.

¹⁾ Het volume werd in een maatkolf constant gehouden.

Dit calciumcarbonaat diende n.l. om de onstane zuren te neutraliseeren.

Men moet er voor zorgen, dat de zuurgraad der oplossing niet te hoog wordt, daar anders de bacteriën afsterven, althans zich niet verder ontwikkelen.

De kolfinhoud werd in een destilleerkolf gebracht, waarin per 100 c.C. vloeistof 10 gr. CaCO_3 aanwezig was; deze diende om de dissociatie van de complexe aldehydesulfietverbinding te bevorderen.

Vervolgens werd de overmaat sulfiet neergeslagen met 20 c.C. eener 25 % BaCl_2 oplossing. Deze onverbruikte sulfiet zou de dissociatie van de complexe verbinding immers tegenwerken.

De kolf, die voorzien was van een LIEBIGSCHE- en een spiraalkoeler, werd voorzichtig verhit ¹⁾. De gecondenceerde vloeistof werd in een zuigerlemeyer, die verbonden was aan den spiraalkoeler en in een ijsbad stond, opgevangen.

In deze erlemeyer werden 5 c.C. 96 % alcohol ²⁾ gedaan, zoodat de mogelijk meekomende aldehydedampen hierin worden opgelost en vastgehouden. 10 c.C. destillaat werden opgevangen en hierin gereageerd op acetaldehyde.

a) Met de kleurreactie volgens RIMINI ³⁾.

3 c.C. van het destillaat worden met 0.5 c.C. 4 % nitroprussidnatrium geschud en hierbij 1 c.C. 3 % piperidine oplossing gevoegd; een karakteristieke blauwkleuring wijst op acetaldehyde. Deze reactie kunnen we ook dadelijk toepassen op de gistingsvloeistof, maar dan is zij lang niet zoo duidelijk en gevoelig, daarom destilleerde ik steeds de oplossing en reageerde op 't destillaat.

b) Met een andere hoeveelheid van het destillaat werd met *p. nitrophenylhydrazine* het hydrazon gemaakt. Dit

¹⁾ Indien het neerslag groot was, werd dit eerst afgefiltreerd.

²⁾ Deze alcohol werd op afwezigheid van aldehyde gecontroleerd.

³⁾ B. B. 32 1900, 3388.

hydrazon, dat uit prachtige gele, naaldjes bestaat, werd met water gewasschen, vervolgens gedroogd, waarna het kon worden geïdentificeerd door het smeltpunt, 128°C .

Steeds werd een mengproef met eenig authentiek hydrazon gemaakt en geconstateerd, dat het smeltpunt constant bleef.

Onder het microscoop is het duidelijk te onderscheiden van het hydrazon van aceton, smpt. 148°C . en ook van het p. nitrophenylhydrazine zelf, smpt. 157°C .

Daar voor deze proeven de organische voedingsbodems aangewezen zijn, was het noodig, om zeker te zijn, dat de acetaldehyde alleen afkomstig is van de te onderzoeken stof, steeds een blanco proef tevens in te zetten.

Het is n.l. lang niet onmogelijk, dat de pepton „Witte”, een stof, waarvan de samenstelling niet bekend is en bovendien wisselt, ook door de bacteriën onder vorming van acetaldehyde ontleed wordt.

Het was daarom zoo'n voordeel geweest, als we een goeden anorganischen voedingsbodem hadden kunnen vinden.

Gelukkig zijn echter alle blanco proeven zonder een spoor acetaldehyde-ontwikkeling verlopen. Het aldehyde, dat ik bij mijn proeven heb vastgelegd, is dus ongetwijfeld afkomstig geweest van de ontlede, toegevoegde stof.

Een zeer groot aantal stoffen werden onderzocht, niet alleen koolhydraten, doch ook meerwaardige alcoholen. Daarnaast werden verschillende andere stoffen in studie genomen, welke eventueel als tusschenproduct, of als eindproduct bij de suikerontleding zouden kunnen optreden. Hiervoor kwamen ook eenige zuren in aanmerking, die in den vorm hunner Ca- of Na-zouten gebruikt werden.

Het spreekt van zelf, dat de zuren als zoodanig niet onderzocht konden worden, daar in de oplossing het onmisbare calciumcarbonaat aanwezig diende te zijn, bovendien zou de H-ionenconcentratie te hoog worden voor de bacterieontwikkeling. De door mij voor dit onder-

zoek gebruikte koolhydraten, welke alle na onderzoek bleken chemisch zuiver te zijn, waren:

Hexosen, *d. mannose*, *d. glucose*, *d. galactose*, *d. fructose*,
l. idose, *l. gulose*.

Hexieten, *d. manniet*, *d. sorbiet*, *i. dulciet*.

Pentosen, *l. arabinose*, *l. xylose*, *l. rhamnose*.

Pentieten, *l. arabiet*, *i. adoniet*.

Tetrietten, *i. erythriet*.

Disacchariden, *maltose*, *lactose*, *saccharose*.

Trisacchariden, *raffinose*.

Zuren, *l. gluconzuur*.

Verder werden nog de volgende stoffen gebruikt: *glycol*, *glycerine*¹⁾, *glycerinealdehyde*, *methyglyoxaal*, *dioxyaceton*, *pyrodruivenzuur*, *glycerinezuur*, *melkzuur*, *barnsteen*zuur, *glycolzuur*, *azijnzuur* en *mierenzuur*.

Ook deze stoffen werden op zuiverheid gecontroleerd, hierbij bleek, dat *glycerinealdehyde* een weinig *dioxyaceton* bevatte, terwijl het *methyglyoxaal*, dat slechts in een 3 % oplossing aanwezig was, een weinig zuur reageerde en tevens een spoortje alcohol bevatte.

Het *pyrodruivenzuur* werd bereid, volgens voorschrift van DE JONG²⁾. Het gehalte aan *pyrodruivenzuur* werd bepaald door dit als *phenylhydrazon* neer te slaan en te wegen³⁾. Het *glycerinezuur* werd volgens de methode van ZINNO⁴⁾ bereid, als *Ca-zout* afgescheiden en uit verd. alcohol omgekristalliseerd.

Over de bereiding van *dioxyaceton* zie blz. 12.

¹⁾ Glycerine kreeg ik van Prof. SCHOORL als gekristalliseerde stof, het estergetal der verontreinigingen bedroeg 1,6.

In zijn laboratorium werd ook het *methyglyoxaal* gemaakt.

²⁾ A. W. K. de JONG. Diss. Utrecht 1900.

³⁾ Twee bepalingen gaven 90,7 en 90,9 procent zuiver *pyrodruivenzuur*.

⁴⁾ ZINNO. Pharm. C. H. 38. 1897, 780.

Het glycol werd gezuiverd door het tweemaal te destilleeren, en den laatsten keer dat gedeelte op te vangen, dat bij 197° C. overging.

Zooals uit de proeven blijken zal, werden al deze stoffen geënt met *coli*-bacteriën en de meeste ook met de andere bacteriën van de *coli-typhus*-groep.

De *coli*-bacteriën zijn de geschikste vertegenwoordigers van deze groep, daar zij het best groeien en de meeste energie ontwikkelen om de stoffen, welke haar worden voor-gezet, aan te tasten. Het gevolg hiervan is, dat de hoeveelheden acetaldehyde, die ontwikkeld worden uit eenzelfde stof door de verschillende bacteriën, niet alle even groot zijn. Steeds werd waargenomen, dat de *colistammen* en de *paratyphus B*- stammen, veel meer acetaldehyde uit een zelfde hoeveelheid stof produceeren, dan de *paratyphus A*-, *typhus*- en *dysenterie*-bacteriën. Ja, het waren voor deze drie laatste bacteriën dikwijls slechts sporen acetaldehyde, die konden worden aangetoond. Deze kleine hoeveelheden aldehyde werden dan ook alleen met de kleur-reactie van RIMINI geconstateerd, daar deze veel gevoeliger is, dan het aantoonen door een hydrazon van het aldehyde te maken.

Van enkele stoffen stonden mij maar kleine hoeveelheden ter beschikking, waardoor dan ook alleen met *coli*-bacteriën werd geënt.

De verkregen uitkomsten na 12 dagen bij 37° C., zijn in de tabellen op bl. 28 en 29 verzameld.

Hierbij kan nog vermeld worden, dat de proeven genomen zijn, met 3 *coli*, 9 *paratyphus B*, 2 *paratyphus A*, 2 *typhus* en 5 *dysenteriestammen*¹⁾, terwijl bij elke reeks van proeven een blancoproef werd ingezet, die een contrôle was op volkomen steriliteit der gebruikte koolhydraat-peptonoplossingen.

¹⁾ Indien voldoende stof voorhanden was.

Acetaldehyde als tusschenproduct der koolhydraatontleding.

TABEL I.

	<i>Bact.</i> <i>Coli</i> (3)	<i>Bact.</i> <i>Parat. B.</i> (9)	<i>Bact.</i> <i>Parat. A.</i> (2)	<i>Bact.</i> <i>Typhi</i> (2)	<i>Bact.</i> <i>Dys</i> ¹⁾ (5)
d. glucose.....	+	+	+	+	+
d. mannose.....	+	+	+	+	+
d. galactose	+	+	+	+	+
d. fructose	+	+	+	+	+
l. gulose	—	—	—	—	—
l. idose	—	—	—	—	—
d. manniet	+	+	+	+	+ ²⁾
d. sorbiet	+	+	+	+	—
i. dulciet	+	+	+	+	—
l. arabinose	+	+	+	+	+
l. xylose	+	+	sp. ³⁾	+	sp.
l. rhamnose	+	+	+	—	—
l. arabiet	—	—	—	—	—
i. adoniet	—	—	—	—	—
i. erythriet	—	—	—	—	—
maltose	+	+	+	+	+ ⁴⁾
saccharose	+	—	—	—	—
lactose	+	—	—	—	—
raffinose	+	—	—	—	—
l. gluconzuur	+	+			

Uit deze proeven blijkt, dat bij de ontleding der meeste koolhydraten acetaldehyde als tusschenproduct optreedt. De vraag of de stoffen, die een negatieve acetaldehydereactie gaven, door de bacteriën op een andere manier ontleed worden, dan wel onaangepast blijven, zullen we in hoofdstuk V beantwoorden.

¹⁾ De 5 dysenterie stammen waren: *Shiga Kruse*, *Flexner*, *Strong*, *Hiss* en *Y*.

²⁾ De stam *Shiga Kruse* gaf een negatieve reactie.

³⁾ Sp. = sporen.

⁴⁾ De stammen *Hiss* en *Shiga Kruse* gaven negatieve reacties.

TABEL II.

	<i>Bact.</i> <i>Coli</i> (3)	<i>Bact.</i> <i>Parat. B.</i> (9)	<i>Bact.</i> <i>Parat. A.</i> (2)	<i>Bact.</i> <i>Typhi</i> (2)	<i>Bact.</i> <i>Dys</i> (5)
glycol	+	sp.	sp.	sp.	sp.
glycerine	+	sp.	sp.	sp.	sp.
glycerinealdehyde ¹⁾ ..	+	+	sp.	sp.	sp.
methylglyoxaal ¹⁾ ..	—	—	—	—	—
dioxyaceton ¹⁾	+	+	sp.	sp.	sp.
pyrodruivenzuur ¹⁾ ..	+	+	+	+	+
glycerinezuur	+	+	+	+	sp.
glycolzuur	+	—	—	—	—
melkzuur	sp.	sp.	—	—	—
barnsteenzuur	—	—	—	—	—
azijnzuur	—	—	—	—	—
mierenzuur	—	—	—	—	—

Als we de resultaten der proeven bekijken, dan zien we, dat de meeste koolhydraatachtige stoffen acetaldehyde als tusschenproduct vormen, terwijl de vier zuren, die als eindproducten der gemengd zure gisting optreden, geen acetaldehyde geven; slechts melkzuur gaf een spoortje blauwkleuring met de reactie van RIMINI bij *coli* en *paratyphus B.*

Echter alle stoffen, met uitzondering van methylglyoxaal, die in de eerste plaats in aanmerking zouden kunnen komen als tusschenproduct bij de suikerontleding, geven bijna alle *acetaldehyde*.

§ 4. De proeven, die genomen werden met *dimedon* inplaats van sulfiet, zijn als volgt uitgevoerd.

Eenige voorproeven werden ingezet met een pepton-acetaldehydeoplossing. Dit peptonwater bevatte 1 % aldehyde en werd in kolfjes, waarin verschillende hoeveelheden *dimedon* waren ingewogen, verdeeld. Deze kolfjes werden gedurende 24 uur in de stoof bij 37° C. geplaatst. Op den bodem had zich een neerslag gevormd, dat afgefiltreerd werd, uitgewasschen met water en opgelost in weinig abs. alcohol. Deze oplossing werd vervolgens in een

¹⁾ Zie over het steriliseeren van deze stoffen blz. 43 en 44.

bekerglas met water uitgegoten, waarbij het aldomedon neersloeg. Den volgende dag werd dit neerslag afgefiltreerd en uit verdunden alcohol omgekristalliseerd, smeltpunt 139°C .

Het dimedon, dat niet gebonden was, lostte in het water op; door indampen werd in alle kolfjes, waaraan van 1 tot 5 gr. dimedon was toegevoegd, nog dimedon terug gevonden, smeltpunt 142°C .

Nadat deze proefjes goede resultaten hadden gegeven, werd de volgende voedingsbodem gemaakt voor de bacteriële gisting.

100 c.C. H_2O .

2 gr. glucose.

1 gr. diammoniumphosfaat.

1 gr. dimedon.

Deze werd na sterilisatie (3 achtereenvolgende dagen op 100°C .), geënt met *B. coli*. De kolf werd elken dag omgeschud, daar het dimedon aan de oppervlakte blijft drijven en slechts langzaam oplost.

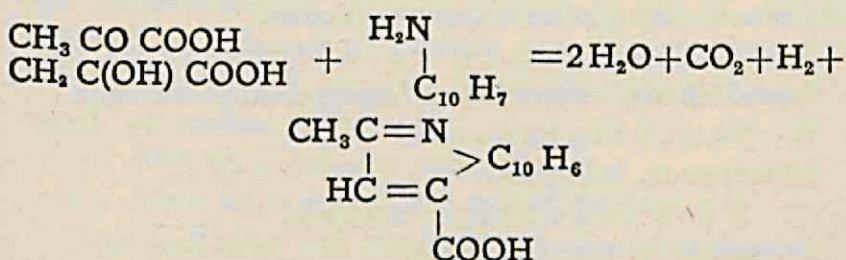
De oplossing werd na eenige dagen zwak troebel, maar van een flink neerslag was geen sprake. Na verloop van 14 dagen werd de kolfinhoud gecentrifugeerd en het geringe sediment als boven behandeld. Er ontstond na uitgieten in water geen neerslag, slechts enkele witte vlokjes waren te zien. Deze werden door centrifugeeren verzameld, maar de hoeveelheid was te klein voor verdere behandelingen. Er werd slechts geconstateerd, dat het neerslag oplosbaar was in alcohol en door toevoeging van veel water weer neersloeg.

Ik heb deze proeven nog eenige malen herhaald, waarbij de hoeveelheid dimedon steeds geringer werd genomen, maar verkreeg geen voldoende neerslag, om het aldomedon duidelijk aan te toonen.

Dat de bacteriën op den voedingsbodem zonder dimedon goed wilden groeien, was van te voren geconstateerd, zoodat de remmende werking bij de proeven aan den schadelijken invloed van het dimedon op de bacteriën moet worden toe-

geschreven. Ook in een voedingsbodem met *pepton* en *dimedon* wilden de bacteriën niet groeien.

§ 5. Nadat de methode om acetaldehyde te binden met sulfiet zoo gunstige resultaten bij de bacterieële gisting had gegeven, heb ik getracht nog een ander product vast te leggen. Het was n.l. aan VON GRAB gelukt, het pyrodruivenzuur door middel van de synthese van DÖBNER¹⁾ met β naphthylamine te condenseeren en zoo kreeg hij het α methyl- β naphthocinchoninezuur.



Deze reactie kon echter niet voor de gisting met *colityphus*-bacteriën worden gebruikt, daar het β naphthylamine een zeer sterk bacteriegift is, zoodat er in de kolfjes voor deze proeven geen groei plaats vond.

¹⁾ Synthese v. DÖBNER B. B. 27, 1894, 2020.

HOOFDSTUK III.

Qualitatief onderzoek van de vergistingsproducten.

§ 1. De methoden van onderzoek.

De producten, die door de bacteriën der *coli-typhus*groep uit suikers en suikerachtige stoffen worden gevormd, zijn onder te brengen in de volgende groepen:

A. Vluchtige neutrale lichamen¹⁾,
Acetaldehyde, aethylalcohol, acetyl-methyl-carbinol.

B. Vluchtige zuren,
Mierenzuur, azijnzuur.

C. Niet vluchtige zuren,
Melkzuur en barnsteenzuur.

D. Gassen,
Kooldioxyde en waterstof.

Hierbij is op te merken, dat allereerst een onderzoek werd ingesteld naar de mogelijke aanwezigheid van aceton, formaldehyde, methylalcohol; deze stoffen konden echter nimmer worden aangetoond.

Het systematisch onderzoek naar de vertegenwoordigers dezer vier groepen werd als volgt uitgevoerd:

A. Daar al deze onderzoeken in een peptonoplossing waaraan calciumcarbonaat is toegevoegd, uitgevoerd zijn, zijn de eventueel aanwezige zuren in den vorm hunner Ca-zouten aanwezig. Men kan dus de neutrale, vluchtige producten dadelijk afdestilleeren. Van de 500 c.C. gistingsvloeistof wordt 300 c.C. afgedestilleerd, en het destillaat wordt nogmaals gedestilleerd, waardoor de vluchtige producten meer geconcentreerd worden. Dit wordt nog een

¹⁾ De gasvormige producten worden afzonderlijk behandeld.

derde maal herhaald tot men 100 c.C. destillaat heeft. Hiermee reageert men op de betreffende stoffen als volgt:

a. Op acetaldehyde met de reactie van RIMINI¹⁾.

Terwijl daarnaast een hydrazon gemaakt wordt met p. nitrophenylhydrazine. Smeltpunt 128° C.

b. Op alcohol.

Waar het zeer lastig is om deze stof naast acetaldehyde aan te toonen, moet het aldehyde eerst verwijderd worden. De vloeistof wordt met een flinke overmaat p. nitrophenylhydrazineoplossing in 30 % azijnzuur een uur lang aan een terugvloeikoeler gekookt. Daarna wordt een gedeelte afgedestilleerd en op afwezigheid van aldehyde gereageerd met de kleurreactie van RIMINI. Is aldehyde afwezig, dan wordt op alcohol gereageerd:

1e. Met de jodoformreactie.

2e. Door de vorming van aethylbenzoaat.

Deze reactie kan ook uitgevoerd worden, als het aldehyde nog niet verwijderd is. Ik heb dit met eenige proefjes waar, naast alcohol acetaldehyde aanwezig was, geconstateerd.

3e. Met de reactie van BLANKSMA²⁾.

Daartoe voegt men aan 2 c.C. geconcentreerde oplossing toe, 33 mgr. metallisch natrium en 274 mgr. 1. 2. 4. chloor-dinitrobenzol. Men verwarmt even, waarna op den bodem kristallen van NaCl zich vormen, terwijl in de vloeistof de naaldjes van 2.4 dinitrophenetol uitkristalliseeren. Deze worden omgekristalliseerd uit benzine. Smpt. 85° C. (opgegeven 85.2° C.).

c. Op acetyl-methyl-carbinol: met FEHLINGS reagens, dat door deze stof reeds in de koude wordt gereduceerd (aldehyden reduceeren eerst bij verwarmen). Terwijl ik deze stof geen enkele maal heb kunnen aantonen met deze reactie, noch zooals in de verhandeling staat van

¹⁾ RIMINI. Chem. Centr. 1898, II, 277.

²⁾ J. J. BLANKSMA. Chem. Weekbl. 1914, 206.

GRIMBERT (1901), door er een hydrazon van te maken ¹⁾, verkreeg ik bij enkele stoffen wel een positieve reactie VOGES-PROSKAUER, die zeker ook wijst op de aanwezigheid van het acetyl-methyl-carbinol ²⁾).

De bacteriën der *coli-typhus*groep hebben de eigenschap ook de pepton van den voedingsbodem te ontleden. Op enkele afbraakproducten van de pepton werd volledigheds-halve gereageerd.

1e Op ammoniak en aminen: met NESSLER's reagens.

Aminen zijn volgens deze reactie van ammoniak te onderscheiden, doordat de kleur van het neerslag niet bruin is, maar bij de prim. aminen lichtgeel bij de secund. en tert. wit.

2e. Op indol: met de reactie van EHRLICH³⁾.

10 c.C. cultuurvloeistof worden vermengd met 5 c.C. sterk zoutzuur (s.g. 1,2) en op dit mengsel worden zeer voorzichtig 2 c.C. para-dimethylaminobenzaldehydeoplossing geschonken, zóó, dat een duidelijke scheidingsvlakte bewaard blijft.

Een roodviolet ring wijst op indol.

Deze reactie is zeer gevoelig, GORTER en de GRAAFF ⁴⁾ geven op 1 : 10000000.

B. In de 200 c.C. vloeistof, die na de eerste destillatie in de kolf zijn achter gebleven, zijn de Ca.-zouten van de zuren aanwezig.

Hiervan worden 100 c.C. gebruikt voor de bepaling der vluchtige zuren. Door toevoeging van zwavelzuur worden deze zuren in vrijheid gesteld en vervolgens 50 c.C. afgedestilleerd. Deze worden geneutraliseerd en tot een klein

¹⁾ Diss. NIJDAM. Leiden 1907, 41.

²⁾ VOGES-PROSKAUER. Zie Standard Methods of Water Analysis.

³⁾ EHRLICH. D. Med. Wochenschr. 1901.

⁴⁾ GORTER en de GRAAFF. C. R. de la Soc. de Biol. 64, 1908, 402.

volume ingedampt en daarin de reactie's op mierenzuur en azijnzuur uitgevoerd.

1e. M i e r e n z u u r.

a. Met de reactie van SÉRULLAS¹⁾.

Mercurizouten worden door mierenzuur gereduceerd via mercurozouten tot metallisch kwik, dat als een grijs praecipitaat optreedt.

Deze reactie is gevoelig tot 1 : 1000, terwijl het ontstaan van mercurozouten door het optreden eener witte troebeling van HgCl na toevoeging van NaCl nog veel gevoeliger is (1 : 100000).

b. Met de reactie van HEHNER²⁾.

Het mierenzuur wordt door magnesium- of ijzerpoeder gereduceerd tot formaldehyde. Dit aldehyde wordt aangetoond door een kleurreactie, o.a. door de oplossing laagsgewijze te brengen op een oplossing van zoutzure morphine in sterk zwavelzuur, waardoor een paarsgekleurde zône ontstaat.

Voor deze beide reacties moet men zeker zijn, dat zwaveligzuur niet aanwezig is, daar dit storend werkt.

2e. A z i j n z u u r wordt aangetoond:

a. Door verhitting van de drooggedampte Ca-zouten en de dampen van aceton, die hierdoor ontstaan, op te vangen in water. In deze waterige oplossing wordt het aceton aangetoond met salicylaldehyde en vast kaliumhydroxyde; er ontstaat dan een roodgekleurde zône.

b. Door de kakodylreactie:

Verhitting van de drooggedampte Na-zouten met water-vrij Na_2CO_3 en een weinig As_2O_3 .

C. De andere 100 c.C. werden tot ongeveer 50 c.C. ingedampt en vervolgens geperforeerd, na toevoeging van verdund zwavelzuur tot dit in overmaat aanwezig was en

¹⁾ SÉRULLAS Chem. Centr. 1831, 868.

²⁾ HEHNER. The Analyst 21, 1896. 94.

filtratie van het na eenigen tijd neergeslagen gips. Hierbij deed zich het bezwaar voor, dat de doorstrijkende vloeistof met de aetherdruppels een emulsie vormde; ik heb toen een losse prop ontvette watten, onder de zijbuis van een wijden perforator aangebracht ¹⁾).

Op deze wijze kon de perforatie eenige etmalen achtereen zonder stoornis worden voorgezet.

De zoo verkregen aetheroplossing wordt op een waterbad verdampt, waardoor ook de aanwezige vluchtige zuren verwijderd worden.

Het residu bestaat uit een scherp riekende stroop, waarin soms kristalletjes te zien zijn. Deze stroop wordt opgelost in $\pm$ 50 c.C. alcohol van 96 % en, na toevoeging van phenolphthaleïne, wordt aan de kokende oplossing een verzadigde, waterige barytoplossing toegevoegd tot blijvende roodkleuring.

Hierdoor ontstaat een neerslag van Ba-succinaat, deze stof is onoplosbaar in alcohol sterker dan 70 %. Aan elke 50 c.C. alcoholische oplossing mag dus maar 10 c.C. barytoplossing worden toegevoegd, is de blijvende, roode kleur nog niet opgetreden, dan moet eerst nog eens 50 c.C. sterke alcohol worden toegevoegd. Het Ba-succinaat wordt afgefiltreerd en na met alcohol te zijn schoongewassen, opgelost in enkele c.C. verdund zoutzuur. De oplossing wordt op een waterbad tot droog ingedampt op een horlogeglas. Uit het residu wordt het barnsteenzuur door sublimatie verkregen, dit geschiedt door een ander horlogeglas er op te leggen en boven een microvlammetje te verhitten.

Op barnsteenzuur wordt vervolgens gereageerd met Pb-acetaat, waarbij de ruitvormige kristallen van Pb-succinaat ontstaan.

Het alcoholische filtraat bevat het oplosbare Ba-lactaat. Na verdrijving van de alcohol wordt 20 c.C. water

¹⁾ Diss. J. SMIT 1913, 58.

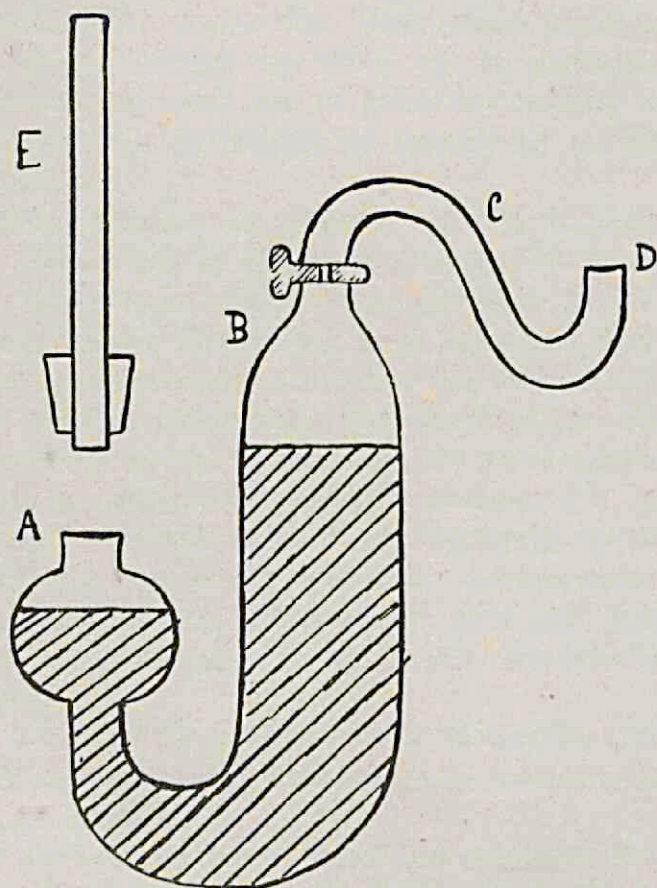
toegevoegd en van de oplossing de rotatie bepaald in een buis van 10 c.M. Deze was voor het gevonden melkzuur eenige minuten rechts. (De zouten draaien tegengesteld). Een gedeelte van deze oplossing wordt vervolgens door een alkalische permanganaatoplossing geoxydeerd, waardoor het melkzuur omgezet wordt in pyrodruivenzuur.

Het pyrodruivenzuur wordt aangetoond door alkalisch maken met loog en daarna een korreltje nitroprussidnatrium toe te voegen (roodkleuring), waarna bij aanzuren met azijnzuur een voorbijgaande blauwkleuring optreedt.

De gasanalyse.

§ 2. D. De gasvormige producten, die zeer dikwijls bij de vergistingen door bacteriën der *coli-typhus*groep worden geproduceerd, zijn op eenvoudige wijze te analyseeren.

Hiervoor wordt een giskolfje gebruikt, dat van boven uitgetrokken is tot een tweemaal omgebogen buisje. Dit buisje is voorzien van een kraan. (zie fig.). De kolf wordt



met de gistingsvloeistof gevuld en daarna twee dagen achter-een gesteriliseerd op 100° C. De opening A is voorzien van

een wattenprop. Vervolgens wordt de vloeistof geënt en eenige dagen in de broedstoof bij 37° C. geplaatst. Nadat zich het gas bij B heeft verzameld, wordt de gistkolf uit de stoof genomen en het gas, dat zich gevormd heeft, uit de kolf geperst.

De wattenprop bij A wordt weggenomen en de opening voorzien met een gummistop met lange, glazen buis E, zóó, dat de opening goed is afgesloten. Het omgebogen buisje C wordt geheel met water gevuld; het is een tamelijk wijd buisje, zoodat het, door de kolf een beetje schuin te houden, gemakkelijk vol gespoten kan worden.

Dit buisje wordt vervolgens in een bekerglas met verzadigde keukenzout-oplossing geplaatst, de opening D blijft onder de pekel.

Een nauwe eudiometerbuis wordt boven deze opening geplaatst, zoodat bij openen der kraan en door in de buis E water te gieten, het gas uit B in de eudiometerbuis wordt geperst. Deze buis met gas wordt in een diepen cylinder met water gebracht en het volume van het gas afgelezen. Nu brengt men een stukje kaliumhydroxyde onder water in de eudiometerbuis en schudt deze eenige keeren flink om ¹⁾).

Nadat de buis weer in den cylinder is geplaatst en de temperatuur van het water in den cylinder heeft aangenomen, wordt het volume weer afgelezen. Het verschil is natuurlijk de hoeveelheid kooldioxyde, welke is geabsorbeerd, terwijl het gas, dat overblijft, uit waterstof bestaat. Dat hier geen andere gassen onder gemengd zijn, werd geconstateerd door dit overblijvende gas te mengen ²⁾ met lucht of zuivere zuurstof en daarna een vonk door het mengsel te slaan. Het blijkt dan, dat al het gevormde gas

¹⁾ Dit kan gemakkelijk gebeuren door met den duim de buis van onderen af te sluiten.

²⁾ Het gas wordt weer boven zuiver water gebracht.

verdwenen is. Er is geen CO_2 ontstaan, hetgeen gecontroleerd wordt door het gas, nadat de vonk doorgeslagen is, weer met loog te schudden en het volume te controleeren. Methaan is er dus niet gevormd. Uit de genomen proeven blijkt ook, dat er geen stikstof ontstaan is.

Hieronder volgen de resultaten van eenige proeven.

Bij een bepaalde gisting ontstond 21.8 c.C. gas; hiervan was 3,4 c.C. kooldioxyde, de gasrest, die onderzocht moest worden, was dus 18,4 c.C.

Hierbij werd 20,6 c.C. zuivere zuurstof gevoegd, het volume werd dus 39 c.C.

De buis werd in den cylinder een eindje omhoog getrokken, zoodat het gas onder een kleineren druk stond dan één atmosfeer.

De vonk werd er door geslagen en nadat de vloeistof weer in rust was gekomen, het volume afgelezen. 11,6 c.C. ¹⁾. De contractie was dus $39 - 11,6 = 27,4$ c.C.; hiervan bestond $\frac{2}{3}$ uit waterstof; $27,4 \times \frac{2}{3} = 18,3$ c.C.

Het bleek dus, dat al het gas uit zuivere waterstof bestond.

Een ander voorbeeld gaf de volgende uitkomsten.

Hier werd lucht gebruikt in plaats van zuivere zuurstof.

Hoeveelheid gas	15	c.C.
kooldioxyde	1,6	„
rest	13,4	„
rest + lucht	53,6	„
lucht dus	40,2	„
hierin zuurstof	8	„
theoretisch noodige O_2	6,7	„
volume na explosie	33,8	„
contractie	19,8	„

Hiervan dus $19,8 \times \frac{2}{3} = 13,2$ c.C. waterstof.

Uit de genomen proeven is te besluiten, dat er bij deze

¹⁾ Daarna werd het gas weer geschud met loog en bleef het volume constant.

gistingen slechts twee gassen geproduceerd worden n.l. kooldioxyde en waterstof.

Hierbij deed zich het eigenaardige verschijnsel voor, dat de verhouding van deze twee gassen bij eenzelfde vergisting niet constant was. Zoo ontstond in de eene kolf in 24 uur b.v. 20 c.C. gas, terwijl in eenzelfde kolf met denzelfden inhoud en geënt met dezelfde bacterie, slechts 12 c.C. was gevormd.

Waterstof ontstaat bij deze gistingen het meest, terwijl het kooldioxyde-gehalte eerst gering is, later toeneemt, een maximum bereikt en dan weer afneemt.

De verhoudingsgetallen van deze gassen zijn dus zeer betrekkelijk en hangen van verschillende omstandigheden af, o.a. zeer sterk van den duur van de gisting, maar het spreekt, dat bijv. ook de oplosbaarheid van de gassen in den voedingsbodem ¹⁾ een rol speelt. Ook meen ik opgemerkt te hebben, dat de zuurgraad van het milieu invloed uitoefent, waarschijnlijk, omdat deze merkbaar inwerkt op den groei der geënte organismen, dus ook op de gasvorming. Een kleine verandering in de waterstofionen-concentratie van de gistingsvloei-stof gaf dadelijk groote verschillen in de hoeveelheid gevormd gas. Om dit te constateeren werd een reeks gistbuisjes met 100 c.C. peptonwater gevuld, terwijl in elk buisje 2 gram glucose werd opgelost.

Aan deze buisjes werd thans melkzuur toegevoegd in verschillende hoeveelheid. De waterstofionen-concentraties werden met behulp van indicatoren bepaald ²⁾. Nadat de buisjes met *B. coli* geënt waren en 24 uur in de broedstoof hadden gestaan, was er reeds een duidelijk verschil in gasontwikkeling te zien. In het gistkolfje met een PH van 6.1

¹⁾ Kooldioxyde lost ongeveer 50 maal zoo goed op in water als waterstof bij een temp. van 20° C.

²⁾ Dr. I. M. KOLTHOFF verleende hierbij zijn zeer gewaardeerde hulp.

had de sterkste ontwikkeling plaats gehad, terwijl in het buisje met een PH van 4,2 geen gas gevormd was.

Een uitgebreid onderzoek, om het verband tusschen waterstofionen-concentratie en bacterie-ontwikkeling te bestudeeren, zou zeker van groot belang zijn.

Ook de zuren, die als eindproducten bij de verschillende gistingen ontstaan, veranderen den zuurgraad van het milieu zeer sterk. Meestal wordt dan ook calciumcarbonaat aan den voedingsbodem toegevoegd om deze zuren te binden, waardoor de gisting tot het einde toe verlopen kan. Dit kunnen wij bij deze proeven, waar het ons om de gassen te doen is, niet toevoegen; de ontstane zuren zouden uit het carbonaat kooldioxyde vrijmaken, hetgeen storend zou werken.

Experimenteel gedeelte.

§ 3. Het doel was, inzicht te krijgen in de ontleding der hexosen, daarom hebben wij 't onderzoek systematisch opgezet en ons de vraag gesteld, hoe gedragen de microben zich t.o.v. suikers of suikerachtige lichamen van zeer eenvoudige samenstelling.

Gekozen werden dus *glycol* (2 w. alcohol), *glycerine* (3 w. alcohol), terwijl bovendien werden onderzocht de mogelijke tusschenproducten, als *glycerinealdehyde*, *dioxyaceton*, *methylglyoxaal*. Voor het onderzoek werden deze stoffen tot een hoeveelheid van 5 gr. opgelost in 500 c.C. peptonwater. (Dit peptonwater werd gemaakt door 10 gram pepton „Witte” op te lossen in één liter water. Deze oplossing werd gedurende 10 minuten op 117° C. gesteriliseerd, daarna gefiltreerd en weer gesteriliseerd bij 100° C.).

Aan den voedingsbodem werd vervolgens 5 gr. calciumcarbonaat toegevoegd en twee achtereenvolgende dagen gesteriliseerd bij 100° C.

Deze proeven werden alleen met *B. coli* ingezet en slechts voor een enkele stof ook met *paratyphus B* bacteriën.

De kolven werden geënt met een oogje van een 24 uur oude agarcultuur.

Als contrôle diende een kolf met 500 c.C. peptonwater met krijt, waarin geen groei optrad. Ook deze kolf werd aan hetzelfde kwalitatieve onderzoek onderworpen.

Hieronder volgen de resultaten.

a. *glycol*.

Het *glycol* was gezuiverd door destillatie, kookpunt 197° C. De kolf met *glycol* werd geënt met *B. coli* en gedurende 26 dagen in de broedstoof bij 37° C. geplaatst.

De kolfinhoud werd op de aangegeven wijze onder-

zocht. De reactie was neutraal. In het destillaat werd *acetaldehyde*, *ammoniak* en een spoor *indol* aangetoond. De reactie op *acetaldehyde* was sterk positief, zoowel de proef van RIMINI als de hydrazonvorming. Alle andere reacties, onder A genoemd vielen, negatief uit.

Van de vluchtige zuren werd alleen *azijnzuur* gevonden, geen mierenzuur. Ook de reacties op barnsteenzuur en melkzuur waren zonder eenig resultaat.

Glycol geeft bij de ontleding geen gasvormige producten, noch met *B. coli*, noch met de andere bacteriën van deze groep. Een kolf met glycoloplossing geënt met een *paratyphus B* stam gaf dezelfde splitsingsproducten als met de *B. coli*, maar in veel kleinere hoeveelheden.

b. Glycerine.

Voor deze proeven werd zeer zuivere, gekristalliseerde glycerine gebruikt ¹⁾.

Nadat de kolf geënt was en een maand in de stoof had gestaan, begon de vloeistof te klaren en er trad geen kool-dioxyde-ontwikkeling meer op.

De kolfinhoud reageerde neutraal en werd gedestilleerd.

Het destillaat volgens A reageerde alkalisch; hierin werden aangetoond, groote hoeveelheden *acetaldehyde*, sporen *alcohol* en, als splitsingsproducten van den voedingsbodem, *ammoniak* en *indol*.

De andere reacties waren negatief.

Het onderzoek onder B leverde een sterk positieve reactie op *azijnzuur*.

Mierenzuur werd *niet* gevonden.

De perforatie met aether geschiedde na aanzuren met zwavelzuur en de stroop, die overbleef na verdamping der aether, bevatte enkele kristalletjes. Deze stroop gaf een zeer stekenden damp. Met barytwater ontstond in de *alcoh.* op-

¹⁾ Zie blz. 26.

lossing een troebeling. Op de beschreven wijze werden *barnsteen* en *melkzuur* aangetoond. De lactaat-oplossing draaide eenige minuten links: er was dus rechts melkzuur aanwezig¹⁾. Het melkzuur werd ook microchemisch aangetoond met Yt.-nitraat. De Yt-lactaat kristallen tusschen gekruiste nicols geplaatst, gaven een assenkruis te zien. Het melkzuur was echter maar in zeer geringe hoeveelheid aanwezig.

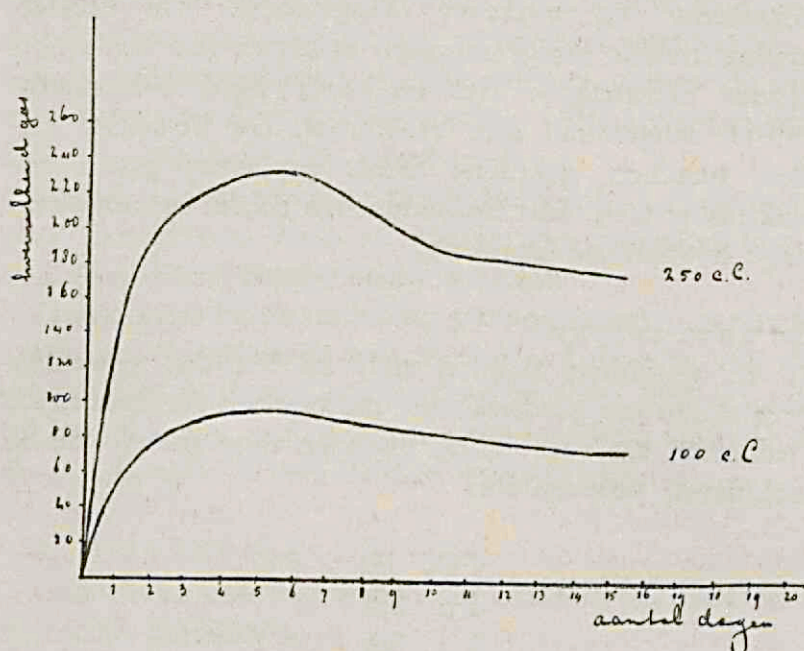
De gasanalyse.

In de gistkolfjes hadden zich na één dag geweldige hoeveelheden gas gevormd; het gas bestond uit *kooldioxyde* en *waterstof*. De verhouding tusschen deze gassen was in verschillende proeven als:

CO ₂	H ₂
1 :	5,4
1 :	8,1
1 :	6
1 :	7,1

Na een dag of zes had het gasvolume zijn maximum bereikt en daarna begon het volume te verminderen; de verhouding liep terug tot 1 : 3,5; 1 : 4. Het kooldioxyde-gehalte begon weer af te nemen. Onderstaande grafische voorstelling geeft een beeld van de gasontwikkeling in een kolf van 250 c.C. inhoud gevuld met een 2 % glycerine oplossing en een van 100 c.C. met denzelfden inhoud.

¹⁾ PERÉ. Ann. de Pasteur 1893 en 1898.



Dat het kooldioxydegehalte later afneemt, moet worden toegeschreven aan 't feit, dat de bacteriën uit de pepton ammoniak produceeren, hetgeen zich verbindt met het koolzuur tot carbonaat en bicarbonaat ¹⁾).

c. Glycerinealdehyde.

Deze stof heb ik niet zuiver kunnen krijgen; ze was steeds verontreinigd met eenig dioxyaceton ²⁾. Het was voor deze proeven echter niet zoo bezwaarlijk, daar het dioxyaceton, zooals later zal blijken, niet zoo snel wordt ontleed als het glycerinealdehyde, zoodat het op de gasontwikkeling

¹⁾ Mierenzuur werd zelfs na 20 dagen niet in de gistkolf gevonden.

²⁾ Dioxyaceton wordt aangetoond met de reactie van DENIGÈS. C. R. 1909, I, 172.

na één dag geen invloed uitoefent. Bij de analyse werd zooals steeds alleen op de hoofdproducten gelet en niet op sporen van bijproducten.

Het glycerinealdehyde vergist krachtig en werd na drie weken geanalyseerd.

A. Positief *ammoniak* en *indol*.

Acetaldehyde en *alcohol* werden beide in geringe hoeveelheid aangetoond.

Van de stoffen onder B werd hier slechts *azijnzuur* gevonden; beide reacties op deze stof waren zeer sterk positief.

C. In het perforaat waren *barnsteen*zuur en *melk*zuur afwezig.

Voor deze proef werd de glycerinealdehydeoplossing door kaarsfiltratie¹⁾ gesteriliseerd. Het was mij n.l. gebleken, dat bij verhitting op 100° C. verharsing optrad, waardoor de vloeistof zich bruinkleurde. De gasanalyse gaf ook voor een gefiltreerde oplossing veel meer gas, dan eenzelfde oplossing, die bij 100° C. gesteriliseerd was.

De verhouding der gassen ($\text{CO}_2 : \text{H}_2$) liep nog al uit een, na een dag b.v. 1 : 3,5; 1 : 4,3; 1 : 3,1.

Na meerdere dagen nam het kooldioxyde-gehalte in verhouding toe; zoo vond ik na 4 dagen 1 : 2,4.

De analyse met *paratyphus B* bacteriën gaf dezelfde producten als met *B. coli*; er werd voor deze bacteriën ook gas gevonden, hetgeen bij glycerine niet het geval was.

d. Dioxyaceton.

Het dioxyaceton, dat door gisting van glycerine met de *A. suboxydans* ontstaan was, werd, door eenige malen fijn wrijven onder absoluten alcohol en daarna snel afzuigen, nogmaals gereinigd. Het was toen een zuiver wit praeparaat; smeltpunt tegen 80° C. Deze stof heeft de eigenschap

¹⁾ Zie blz. 48.

in waterige oplossing zeer sterk te verharsen, daarom werd de vloeistof door een CHAMBERLAND-kaars gefiltreerd. Deze kaars houdt de bacteriën tegen en de oplossing, die hij doorlaat, is steriel. Men moet hierbij erg oppassen en zeer goed controleeren of de vloeistof werkelijk steriel is; het gebeurt dikwijls, dat deze kaarsen kleine barstjes bevatten, waardoor de bacteriën meefiltreeren.

De kaars en de kolf, waar de vloeistof in gefiltreerd wordt, moeten droog gesteriliseerd worden in een droogstoof gedurende een half uur op 170°C .

Nadat de vloeistof gefiltreerd en steriel calciumcarbonaat was toegevoegd, wachtte ik drie dagen, om te zien of er groei in de kolf optrad. Was dit niet het geval, dan werd de kolf met de bacteriën geënt en geplaatst in de broedstoof bij 37°C .

De vloeistof, die lichtgeel was, werd door het staan bij deze broedtemperatuur steeds donkerder, doordat ook bij deze temperatuur verharsing optreedt.

De analyse gaf *veel azijnzuur* met daarnaast sporen *aldehyde, alcohol, indol* en *ammoniak*, terwijl de reactie van VOGES-PROSKAUER duidelijk positief was.

De gasontwikkeling had zeer langzaam plaats: eerst na 3 à 4 dagen waren er eenige c.c. gas gevormd. Het gas bestond voor ongeveer $\frac{1}{2}$ gedeelte uit *kooldioxyde*, terwijl de rest *waterstof* was. Ook de *paratyphus B* stammen gaven gas, terwijl de andere bacteriën geen gas ontwikkelden.

De mogelijkheid, dat de verharsingsproducten de ontleding zouden beïnvloeden, heb ik willen uitschakelen, door deze zelfde proeven te herhalen bij kamertemperatuur. De vloeistof behield toen de lichtgele kleur.

Bij deze proeven werden dezelfde resultaten verkregen: ook hier had weer een zeer langzame ontleding van het dioxyceton plaats.

Dat werkelijk het dioxyceton veel minder krachtig wordt aangetast dan b.v. glycerine, bewijst het volgende proefje:

In een gistkolfje van 200 c.C. ontstond bij kamertemperatuur, na 3 dagen, 6 c.C. gas uit een 1 % dioxycetonoplossing, terwijl uit een 1 % glycerineoplossing reeds na 1 dag 24 c.C. gas gevormd werden.

e. Glycerinezuur.

Dit zuur¹⁾, dat gemaakt was door oxydatie van glycerine, werd in het calciumzout omgezet met behulp van CaCO_3 . Na affiltratie van de overmaat krijt en indamping van de vloeistof tot klein volume, werd het zout door alcohol geprecipiteerd; het was een witte, kristallijne stof.

Daar het mol. gewicht van dit zout ongeveer tweemaal zoo groot is als van het vrije zuur, werd 10 gr. zout opgelost in 500 c.C. peptonwater, terwijl slechts 2 gr. krijt werd toegevoegd.

Ook deze stof werd langzaam ontleed; na drie dagen was er slechts een zwakken bacteriegroei waar te nemen. Na vier weken werd de kolfinhoud verwerkt.

A. De vluchtige, neutrale producten zijn: veel *acetaldehyde*, *ammoniak* en *indol*. Alcohol werd niet aangetoond.

B. Het zure destillaat bevatte alleen *azijnzuur*, terwijl de reacties op melkzuur en barnsteenzuur in het perforaat negatief uitvielen.

Het gas, dat eerst na eenige dagen zich vormde, bestond alleen uit waterstof, daar het kooldioxyde werd gebonden tot carbonaat en bicarbonaat.

De analyse van de producten, ontstaan door de gisting met *paratyphus B* bacteriën gaf dezelfde resultaten als met *B. coli*.

f. Pyrodruivenzuur.

Dit zuur, dat in de laatste jaren een van de belangrijkste

¹⁾ Het glycerinezuur was inactief en bereid, volgens voorschrift van ZINNO Pharm. C. H. 38. 1897, 780.

stoffen is, welke in aanmerking komen, om als tusschen-product bij de alcoholische gisting op te treden, werd aan een nauwkeurig onderzoek onderworpen. Het was bereid uit kaliumbitartraat en kaliumbisulfaat, volgens de methode uitgewerkt door de JONG¹⁾. In de geconcentreerde oplossing werd de hoeveelheid zuiver pyrodruivenzuur bepaald door het als hydrazon neer te slaan en dit te wegen; twee bepalingen gaven 90.7 en 90.9 % zuiver zuur.

Iets meer dan 5 gr. van deze oplossing werd in 500 c.C. peptonwater opgelost en daarna met loog op lakmoes geneutraliseerd. Deze neutrale vloeistof werd door een kaars gefiltreerd en vervolgens gecontroleerd of zij steriel was. 24 Januari werd de kolf geënt met de bacterie en 20 Februari geanalyseerd. Door een proefje te nemen met phenylhydrazine bleek, dat al het pyrodruivenzuur verdwenen was; er ontstond geen neerslag.

De reacties op het destillaat gaven het volgend resultaat:

Positieve reactie VOGES-PROSKAUER, dus ook hier heeft zich eenig *acetyl-methyl-carbinol* gevormd.

Acetaldehyde werd niet gevonden, terwijl de reacties op *ammoniak* en *indol* slechts zwak positief waren. Na aanzuren, destilleerde *azijnzuur* over.

Melkzuur en barnsteen zuur werden niet aangetoond.

De gasanalyse gaf tot resultaat, dat na één dag groote hoeveelheden gas waren gevormd, bestaande uit *kooldioxyde* en *waterstof*. Meestal vond ik een verhouding van deze twee gasen als 3 : 5 na één dag. Het kooldioxyde werd na meerdere dagen gebonden tot bicarbonaat: $\text{CH}_3\text{COCOONa} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}} + \text{NaHCO}_3$.

Hier vinden we dus een groot verschil met de ontleding van het glycerinezure-zout; daar bestond het gas alleen uit waterstof en werd het kooldioxyde dus dadelijk gebonden.

¹⁾ A. W. K. DE JONG. Diss. Utrecht 1900.

Bij het pyrodruivenzuur, dat zeer sterk vergist, komt het kooldioxyde eerst in vrijheid en wordt dan gebonden.

De *paratyphus B* bacteriën ontleden pyrodruivenzuur niet zoo sterk als de *coli*-bacteriën, maar zij geven dezelfde producten.

Ik heb bij alle ontledingen opgemerkt, dat de *paratyphus B* bacteriën de stoffen niet zoo sterk aantasten als de *coli* bacteriën; meestal waren het slechts sporen, die aange-toond werden.

Ten slotte werd een kolf waarin alleen peptonwater en calciumcarbonaat, geënt met *coli*-bacteriën en na dertig dagen geanalyseerd.

Gevonden: *ammoniak*, *indol* en een spoortje *vluchtigzuur*. Barnsteen- en melkzuur werden niet gevonden.

§ 4. Overzicht van de resultaten.

De in § 3 verkregen resultaten¹⁾ laten zich tot de volgende tabel vereenigen:

Stoffen.	Neutr. vl. prod.	vl. zuren.	Niet vl. zuren.	Gasvormige prod.
glycol.	acetaldehyde.	azijnzuur	geen.	geen.
glycerine	acetaldehyde sporen alcohol	azijnzuur	barnsteen- zuur. melkzuur.	CO ₂ en H ₂
glycerinealdehyde.	sporen aldehyde sporen alcohol.	azijnzuur	geen.	CO ₂ en H ₂
glycerinezuur	acetaldehyde	azijnzuur	geen.	— H ₂
dioxyaceton .	sporen aldehyde sporen alcohol sporen acetyl- methyl-carbinol	azijnzuur	geen.	CO ₂ en H ₂
pyrodruivenzuur	sporen acetyl- methyl-carbinol.	azijnzuur	geen.	CO ₂ en H ₂
peptonwater.	geen.	sp. zuur.	geen.	geen.

Allereerst treft hierbij de groote eenvormigheid in den aard der producten, zoo geven al deze stoffen *azijnzuur*, terwijl de meeste ook *acetaldehyde* vormen.

¹⁾ Deze tabel geldt uitsluitend voor de ontleding door de *coli*-bacteriën; de ontledingsproducten van het pepton zijn hierin niet opgenomen.

Bevreemdend is zeker het feit, dat alleen glycerine, barnsteen- en melkzuur vormt, terwijl noch glycerine-aldehyde noch glycerinezuur een spoor van deze stoffen produceeren.

Mierenzuur werd in 't geheel niet aangetoond, daarentegen is het bij de suikerontleding altijd aanwezig.

Kooldioxyde, zoowel als waterstof worden bij deze ontledingen steeds gevonden, uitgezonderd bij die van glycol. Deze laatste stof wijkt dus af van een van de hoofdkenmerken van de gemengd zure gisting door de *coli*-bacteriën.

In het volgende hoofdstuk zullen, van de hier gevonden producten, de methoden der quantitatieve bepaling besproken en aan enkele stoffen getoetst worden.

HOOFDSTUK IV.

Quantitatief onderzoek van de vergistingsproducten. Bespreking der methoden.

Voor de quantitatieve bepaling van organische lichamen staan ons helaas nog weinig beproefde methoden ten dienste, zelfs waar het geldt de meest eenvoudige verbindingen. Vooral indien deze stoffen in mengsels moeten worden bepaald, laten bijna steeds de bestaande methoden ons min of meer in den steek, zoodat men dan daarbij voortdurend voor allerlei soms nog geheel onopgeloste problemen komt te staan, wanneer men in de quantitatieve verhoudingen van het mengsel wenscht door te dringen.

In oplossingen, zooals ze doorgaans bij het bacteriologisch onderzoek worden gebruikt, heeft men hoogst samengestelde mengsels van zeer uiteenlopende, organische stoffen te zien, als van de bestanddeelen der voedingsbodem, zoowel als van de eventueele splitsingsproducten daarvan, waardoor de bekende methoden menigmaal niet of uiterst bezwaarlijk zijn toe te passen.

De resultaten, die tot dusver bij het onderzoek der bacterieële ontledingen verkregen werden, zijn dan ook in 't meerendeel der gevallen slechts benaderend.

Een volkomen sluitende koolstofbalans van een vergiste stof is een ideaal toestand, die elke onderzoeker op dit gebied, voorloopig nog maar als een illusie moet beschouwen, of de omstandigheden moeten hem al zeer gunstig zijn. Daar nauwkeurige, quantitatieve bepalingen haast onmogelijk zijn in de gebruikelijke gistingsoptlossingen, is het apriori dan ook overbodig om sporen van stoffen te willen bepalen. De fouten zouden dan te groote afmetingen

gaan aannemen, om eenige waarde aan de uitkomst te mogen hechten.

Op grond van deze overwegingen werd bij dit onderzoek steeds afgezien deze minimale hoeveelheden te bepalen.

Als algemeene gang moge het volgende worden vermeld:

a. Vluchtige, neutrale producten.

Hiervoor komt in de eerste plaats in aanmerking het *acetaldehyde*. Deze stof werd in hetzelfde destilleer-toestel, als beschreven staat op blz. 23 afgedestilleerd, alleen werd het acetaldehyde, dat als damp in de kolf achter bleef, door een stoomstraal uitgedreven.

De vloeistof werd opgevangen in een maatkolf van 100 c.C., die geheel in ijs geplaatst was en waarin van te voren eenige c.C. alcohol waren gebracht.

Meestal werd uitgegaan van 50 c.C. gistingsvloeistof en nadat ongeveer 25 c.C. waren afgedestilleerd, werd begonnen met de inleiding van stoom, totdat 100 c.C. in de maatkolf waren opgevangen.

Daarin werd het acetaldehyde bepaald volgens de methode van RIPPER¹⁾.

Deze methode berust op het volgende principe:

Een bisulfiet-oplossing van bekende sterkte wordt vermengd met de aldehyde-oplossing; het aldehyde wordt door het bisulfiet gebonden en door titratie met jodium wordt bepaald hoeveel bisulfiet gebonden werd.

Ik heb eenige veranderingen aan deze methode aangebracht, daar mij dadelijk bleek, dat, als de jodium-oplossing bij het mengsel van bisulfiet en acetaldehyde werd gevoegd er gasvormig SO_2 ontweek, hetgeen dus blijkbaar niet snel genoeg tot sulfaat geoxydeerd was. Om dit te vermijden werd de oplossing van bisulfiet en acetaldehyde gepipeteerd onder de oppervlakte van een bepaalde hoeveel-

¹⁾ RIPPER. Monatshefte d. Chem. 1900, 1079.

heid gestelde jodium. Door de vloeistof langzaam toe te voegen ontweek er hoegenaamd geen SO_2 .

De bisulfiet-oplossing bevatte ongeveer 12 gr. KHSO_3 per liter. Deze oplossing werd steeds versch gemaakt en om haar zoo constant mogelijk te houden werd bovendien 10 % alcohol toegevoegd.

De deugdelijkheid der methode werd getoetst aan een aldehydeoplossing, waarvan het gehalte met behulp van het p. nitrophenylhydrazine nauwkeurig was bepaald. Door verdunning van zuiver aldehyde, werd een oplossing van 300 c.C. gemaakt, die ongeveer een half procent aldehyde bevatte. Hiervan werden 25 c.C. afgepipeteerd en in een bekerglaasje gedaan, waarna een oplossing van p. nitrophenylhydrazine in 30 % azijnzuur werd toegevoegd, totdat geen neerslag meer ontstond. Na 24 uur staan werd op een gewogen filter afgefiltreerd en na drogen in een droogstoof op 100°C. , het gewicht van het hydrazon bepaald.

Twee bepalingen gaven 499 en 496 mgr. hydrazon, hetgeen overeenkomt met 122 mgr. acetaldehyde in 25 c.C. oplossing. Ook volgens de methode RIPPER werd in deze oplossing het acetaldehyde bepaald, gevonden in 25 c.C. 120 en 121 mgr. acetaldehyde, hetgeen dus zeer bevredigend overeenkomt met de gewichtsanalytische bepaling.

b. Vluchtig zuur.

Mierenzuur werd blijkens de kwalitatieve analyse bij de ontledingen van de onderzochte stoffen niet gevonden, dus kwam als vluchtig zuur alleen *azijnzuur* in aanmerking. De methode, die voor de quantitative bepaling van dit zuur het eenvoudigst en doeltreffendst bleek, was het zuur door stoomdestillatie uit de oplossing geheel te verdrijven en daarna het overgedestilleerde zuur door titratie te bepalen.

50 c.C. vloeistof werden met zwavelzuur (4 N). zuur gemaakt, hetgeen gecontroleerd werd op een methyl-

violetpapiertje, vervolgens met stoom over gedestilleerd en opgevangen in een maatkolf van 1 L. Hiervan werden 500 c.C. afgepipeteerd en getitreerd met 0,1 n. loog, de andere 500 c.C. dienden als contrôleproef. Deze methode bleek twee fouten in te sluiten:

1e. De laatste sporen zuur blijven hardnekkig in de destillatiekolf achter, zij zijn eerst bij veel langere stoomdestillatie daaruit te verwijderen.

2e. De titratie van 500 c.C. is bezwaarlijk daar in zoo'n groote hoeveelheid vloeistof een ruime overmaat loog moet worden toegevoegd om een blijvende kleuromslag van den indicator te bewerkstelligen. Deze twee bezwaren heffen elkaar echter eenigszins op, hetgeen blijkt uit de afzonderlijk genomen proeven.

250 mgr. azijnzuur (als Ca-zout) werden in 250 c.C. peptonwater opgelost; hiervan werden 50 c.C. afgepipeteerd en na aanzuren, aan stoomdestillatie onderworpen.

Het destillaat werd getitreerd, 500 c.C. verbruikten 8,12 c.C. 0,0998 n. loog, dit komt overeen met 8,1 c.C. 0,1 n. loog = azijnzuur of met 48,6 mgr. azijnzuur in 50 c.C. vloeistof. De contrôleproef gaf in 50 c.C. 48,9 mgr. azijnzuur. Deze uitkomsten bleken dus vrij goed overeen te stemmen, en op grond daarvan werd deze methode van werken gevolgd ¹⁾.

Melkzuur, dat ook een weinig vluchtig is, werd alleen bij de ontleding van glycerine gevonden, en slechts in zeer kleine hoeveelheid. Ik heb het deel, dat daarvan overging verwaarloosd en als azijnzuur in rekening gebracht.

c. Gasvormige producten.

Het kooldioxyde werd opgevangen door twee U-vormige

¹⁾ De destillatie methode van DUCLAUX (Traité de microb. III blz. 384) gaf oneindig veel slechtere uitkomsten, deze methode is voor quantitatieve bepalingen te onnauwkeurig, zooals trouwens ook reeds anderen, o.a. JAN SMIT (Diss. Amsterdam) opmerkten.

buisjes gevuld met natronkalk, die voor en na de proef gewogen werden. Daar echter het vrij wordende zuur uit het calciumcarbonaat ook kooldioxyde in vrijheid stelt, moet dit dus in rekening worden gebracht.

Dit werd gedaan door voor en na de gisting het Ca-gehalte van de vloeistof te bepalen. Daartoe werd eerst de oplossing zorgvuldig door een gehard filter gefiltreerd, om ook de zeer fijne krijtdeeltjes te verwijderen; bepaald werd dus de opgeloste hoeveelheid Ca-ion. Dit Ca werd, na toevoeging van een weinig NH_4Cl , bij kookhitte geprecipiteerd met NH_4 -oxalaat. Na uitwasschen van het neerslag (geen neerslag in het filtraat met CaCl_2) werd het filter doorgestoken, met kokend, verdund zwavelzuur en kokend water schoongespoeld en het oxalaat, na toevoeging van overmaat 50 % H_2SO_4 , getitreerd met 0,1 n. KMnO_4 .

Hieruit kan men berekenen de hoeveelheid zuur, die gevormd was en vervolgens ook de hoeveelheid kooldioxyde, die door het gevormde zuur uit het aanwezige calciumcarbonaat vrij gemaakt werd.

Deze hoeveelheid werd afgetrokken van de hoeveelheid kooldioxyde, die in de natronkalkbuisjes opgenomen was, om zodoende de hoeveelheid koolzuur, welke door de gisting was ontstaan, te bepalen.

d. Niet vluchtige zuren.

Hiervoor komen in aanmerking barnsteenzuur en melkzuur.

Het barnsteenzuur werd bepaald als Ba-succinaat en wel op de volgende wijze:

25 c.C. gistingsvloeistof werden in een wijden perforator ¹⁾ gedurende twee dagen geperforeerd, nadat zij met verdund zwavelzuur aangezuurd waren. De aetherische oplossing, die een weinig geel gekleurd was, werd droog gedampt op

¹⁾ Voorzien van een wattenprop.

een waterbad en het residu in 100 c.C. 96 % alcohol opgenomen. De heldere oplossing werd op een waterbad verhit en nadat eenige druppels phenolphthaleïne waren toegevoegd, werd bij de kokende oplossing een koud verzadigde, waterige oplossing van baryt gedruppeld, tot een blijvende roodkleuring was ontstaan.

Daarna werd nog even opgekookt, waarbij het gevormde neerslag zich verzamelde.

Vervolgens werd het kolfje met een gummistop, doorboord met een natronkalkbuisje, gesloten.

Was de kolf totaal afgekoeld en de bovenstaande vloeistof helder, dan werd ze snel door een gewogen Gooch-kroes afgefiltreerd en met 96 % alcohol nagewassen.

Na ten slotte één keer met aether te zijn nagespoeld, werd bij 100° C. gedroogd en daarna gewogen.

Het gevaar van deze methode is, dat zich gemakkelijk BaCO_3 kan vormen¹⁾, daarom moet bij afkoeling van de kolf de lucht slechts toetreden door een natronkalkbuisje, terwijl men bovendien moet zorgen, dat slechts ten hoogste één druppel overmaat barytwater aanwezig is.

Een blancoproef gaf het volgende resultaat: 200 mgr. zuiver, gesublimeerd barnsteen zuur leverden 0,4329 gr. Ba-succinaat, overeenkomende met 201,9 mgr. zuur.

M e l k z u u r werd bepaald, door het getal, gevonden voor de totale zuurgraad, te verminderen met de getallen, gevonden voor azijnzuur en barnsteen zuur. De totale zuurgraad werd bepaald, door voor en na de gisting het Ca-gehalte van de vloeistof te bepalen²⁾.

e. Ten slotte moeten nog de methoden besproken worden, op welke wijze de vergistende stoffen zelf quantitatief bepaald werden.

¹⁾ Diss. JAN SMIT. Amsterdam 1913.

²⁾ Zie blz. 58.

De stoffen, waarvan ik de ontleding quantitatief onderzocht heb, zijn glycol, glycerine en pyro-druivenzuur.

Dit laatste zuur werd weer als phenylhydrazon neergeslagen en bepaald als op blz. 50.

Verdere bespreking is dus overbodig.

In de litteratuur zijn vele quantitative glycerine bepalingen bekend, die op geheel verschillende eigenschappen van de glycerine berusten.

Zoo wordt volgens de methode van ZEISEL de glycerine met HJ omgezet in isopropyljodide. In deze oplossing wordt vervolgens het jodide met zilvernitraat neergeslagen en dit gewichtsanalytisch bepaald.

Een andere bepaling berust op het principe, om glycerine om te zetten in triacetaat en hiervan het verzeepingsgetal te bepalen.

In bier en wijn wordt glycerine bepaald door indampen met kwartszand en vervolgens extractie van het residu met alcohol, of beter met aceton. Deze methode leek het meest geschikt om hier, in het peptonhoudende milieu, gebruikt te worden. Pepton wordt door aceton en ook door alcohol neergeslagen, terwijl ook het Ca-acetaat, dat in de oplossing voorkomt, in aceton niet oplosbaar bleek.

Toch moest de methode een weinig worden veranderd en wel zoo, dat niet geheel tot droog werd ingedampt, daar dan het residu de glycerine zoo stevig vast houdt, dat deze er niet meer quantitatief is uit te extraheeren.

De proef werd als volgt uitgevoerd:

50 c.C. der glycerinepeptonoplossing werden tot een klein volume (± 3 c.C.) ingedampt, vervolgens onder omschudden eenige druppels 96 % alcohol toegevoegd en daarna aceton. Indien de aceton dadelijk werd toegevoegd, sloeg een klonterige massa neer, terwijl door de voorbehandeling met alcohol een fraai wit vlokkelig neerslag ontstond. Na 24 uur staan werd het neerslag afgefiltreerd en

eenige keeren eerst met aceton en daarna met alcohol nage-wasschen. De vloeistof werd vervolgens verdampt op een waterbad en de achter gebleven glycerine gewogen.

Dat deze methode bevredigende resultaten geeft, bewijzen de volgende proeven.

Zuivere glycerine werd twee dagen bewaard in een exsiccator boven zwavelzuur, hiervan werd 812 mgr. opgelost in 100 c.C. peptonwater.

In deze oplossing werd de glycerine bepaald, als boven beschreven en vervolgens, voordat ze gewogen werd, weer twee dagen in denzelfden zwavelzuur exsiccator gedroogd.

Voor elke bepaling was 50 c.C. gebruikt, gevonden 407 en 409 mgr. glycerine. Hieruit blijkt, dat niet al de bestanddeelen van de pepton neergeslagen zijn, of dat de laatste sporen water niet verwijderd worden. Langer in een exsiccator plaatsen gaf geen beter resultaat, toch is de bepaling voor dit onderzoek als nauwkeurig genoeg, geaccepteerd. Om te controleeren of het aanwezige Ca-acetaat en de fijne krijtdeeltjes nog invloed zouden kunnen hebben, werd een peptonoplossing bereid, waaraan toegevoegd was 2 % Ca-acetaat en 2 % krijt, en bovendien aan 50 c.C. 351 mgr. glycerine.

Met een pipet van 50 c.C. werd de vloeistof na bezinken, opgezogen en vervolgens door een hard filter gefiltreerd. Na schoonwasschen met water, werd het glycerinegehalte in de vloeistof bepaald; gevonden : 350 en 353 mgr. dus ook hier bleek deze methode bruikbaar te zijn.

Glycol.

De methode, die voor glycerine gebruikt werd, is ook toegepast om het glycol te bepalen. Glycol lost goed op in alcohol en aceton, dus de behandeling, als bij glycerine beschreven, werd hier op dezelfde wijze gevolgd. Nu heeft watervrij glycol de eigenschap om zeer gemakkelijk waterdamp aan te trekken, wanneer het aan de lucht staat;

binnen twee weken neemt het 60 % in gewicht toe en vormt een hydraat met twee mol. water ¹⁾. Eerst na 4 à 5 dagen in een zwavelzuur exsiccator te hebben gestaan bleef het gewicht constant. De proeven gaven minder goede resultaten dan met glycerine, hoewel deze methode toch ook voor glycol nog wel bruikbaar is.

50 c.C. peptonwater met 2 % Ca-acetaat en 2 % Ca-carbonaat bevatten 775 mgr. glycol. In twee proefjes werden 759 en 763 mgr. teruggevonden. Daar het verschil nog al groot was, wilde ik controleren of de glycol met het afdestilleeren niet een weinig vluchtig was. De genomen proeven toonden aan, dat in het destillaat met CuSO_4 en loog een spoortje glycol kon worden gevonden ²⁾.

Ik heb toen getracht een andere methode te volgen. Glycol werd daartoe in alkalisch milieu geoxydeerd met permanganaat en na aanzuren werd het permanganaat teruggetitreerd. Deze methode mislukte evenwel geheel, daar de concentratie van het glycol in de oplossing zoo gering was, dat er bijna geen verschil tusschen een 1 % glycol oplossing en een blanco peptonwateroplossing gevonden werd. Ik was daarom genoodzaakt de extractie methode met aceton te volgen.

Volledige quantitatieve analyse.

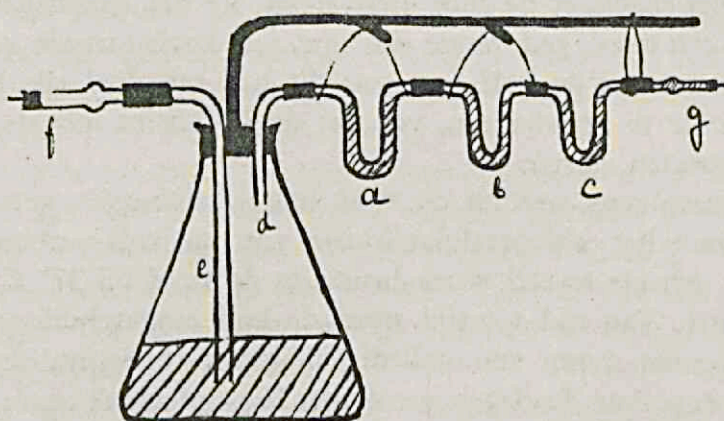
De uitvoering van een volledige quantitatieve analyse van een vergiste stof geschiedde nu als volgt:

In een erlemeyerkolf van 1 L. werden 500 c.C. 1 % pepton oplossing afgemeten en deze bij 100° C. gesteriliseerd. Den volgenden dag werd een bepaalde hoeveelheid zuivere, te vergisten stof afgewogen en deze aan de peptonoplossing, tegelijk met 5 gr. Ca-carbonaat, toegevoegd, daarna werd

¹⁾ de FORCRAND. C. R. 132, 1901, 688.

²⁾ Er werd een blanco proef naast gedaan.

de kolf opnieuw in stroomenden damp gesteriliseerd. De kolf werd gesloten met een steriele, driemaal doorboorde gummistop, voorzien van een opzet, bestaande uit drie U-vormige buizen, (zie fig.) waarvan *a* met calciumchloride, de beide andere, *b* en *c*, met natronkalk gevuld waren. De hen verbindende buisjes hangen aan twee



glazen staafjes, die op hun beurt aan een dikkere glazen staaf vastgesmolten zijn, welke laatste met een omgebogen einde in de gummistop van de kolf is bevestigd. Door deze stop gaan bovendien het buisje *d*, dat naar de U-buizen leidt, en het buisje *e*, dat onder de vloeistofspiegel uitmondt. Aan het andere einde draagt dit laatste een wijdere buis *f*, gevuld met natronkalk en watten. Een dergelijke buis *g* sluit, achter de laatste U-buis, het toestel met inhoud aan de andere zijde van de buitenlucht af. Binnendringen van koolzuur en infecties wordt door deze inrichting geheel tegengegaan.

Voordat de vloeistof met de bacterie geënt werd, pipetteerde ik met een steriele pipet 100 c.C. vloeistof uit de kolf. Hiervan werden 50 c.C. gebruikt voor twee Cabepalingen, terwijl met de overgebleven 50 c.C. een con-

trôle proef werd ingesteld op de hoeveelheid in oplossing gebrachte zuivere stof.

De 400 c.C. cultuurvloestof werden vervolgens geënt met een oogje van een 24 uur oude agarcultuur van het te bestudeeren microörganisme. Vervolgens werd de kolf gesloten met de gummistop, echter zonder verbonden te zijn met de U-vormige buisjes. De stop en de buisjes, zoover ze onder de stop uitkwamen, werden gesteriliseerd.

Toen werd, gedurende één uur, een koolzuurvrije luchtstroom door de kolf gezogen; dit had ten doel alle kooldioxyde te verwijderen, voordat de U-buisjes met de kolf verbonden waren.

Vervolgens werden de twee natronkalkbuisjes gewogen en met het chloorcalciumbuisje aan de kolf verbonden. Het geheele toestel werd daarna in de stoof bij 37° C. geplaatst. Van tijd tot tijd werd de kolf omgeschud om de gevormde zuren zoo volledig mogelijk te neutraliseeren. Na ongeveer 30 dagen werd met het onderzoek begonnen, de gisting kon dan als geëindigd worden beschouwd.

Nu werd weer een koolzuurvrije luchtstroom door de vloestof gezogen, waarna de twee natronkalkbuisjes gewogen werden.

Vervolgens werden 50 c.C. afgepipeteerd voor de bepaling van de onvergiste stof en tweemaal 25 c.C. voor de Ca bepaling.

Voor de bepaling van het vluchtig zuur dienden 50 c.C., deze werden met stoom gedestilleerd en het destillaat met 0.1 n. loog getitreerd. Voor de barnsteenzuur bepaling werden telkens 25 c.C. geperforeerd. Melkzuur werd, zooals gezegd, niet rechtstreeks bepaald.

200 c.C. werden gebruikt voor de acetaldehyde-bepaling. Daar bleek, dat het acetaldehyde in de broedstoof bij 37° C. uit de kolf vervluchtigt, werd een afzonderlijke proef ingesteld, om de hoeveelheid acetaldehyde te bepalen, die tijdens de proef bij 37° C. ontweek. Hiervoor werd een

kolf gebruikt van denzelfden inhoud en deze in een thermostaat bij 37° C. geplaatst, terwijl de gassen condenseerden in een maatkolfje van 100 c.C. gevuld met water, dat buiten de thermostaat onder stroomend water voortdurend werd afgekoeld. Nadat deze kolf even lang had staan gisten als de andere, werd de maatkolf tot 100 c.C. aangevuld en hierin het aldehyde bepaald volgens de gewijzigde methode van RIPPER. Ook in deze kolf werd de hoeveelheid vergiste stof (zie boven) bepaald. Zoo kon dan bij de volledige proef een juiste correctiefactor worden aangebracht voor het acetaldehyde.

De proeven voor de quantitatieve analyse werden steeds geënt met *coli*-bacteriën. Deze microörganismen doen de verschillende stoffen zoo volledig mogelijk ontleden, waardoor we dus een duidelijk beeld krijgen van de verhouding van de producten, die ontstaan bij de gemengd zure gisting.

Bovendien moest een keuze worden gedaan, daar een volledig onderzoek met alle vertegenwoordigers der *colityphus*groep veel te uitgebreid zou worden en zeer veel tijd zou vereischen.

Experimenteel gedeelte.

De vergisting van glycol.

Allereerst werden, volgens de beschreven methode, de uit het glycol gevormde producten, bepaald. Uit de kwalitatieve analyse was gebleken, dat bij deze ontleding alleen acetaldehyde en azijnzuur ontstaan. Het absorptietoestelletje voor gassen kon dus bij deze bepaling geheel vervallen; de kolf werd dan ook slechts met een wattenprop gesloten.

Opgelost werden 4,915 gr. zuivere, boven zwavelzuur gedroogde glycol in 500 c.C. peptonwater, waaraan ongeveer 3 gr. Ca-carbonaat was toegevoegd. Na de sterilisatie werden 100 c.C. steriel afgepipeteerd, waarvan 50 c.C. gebruikt werden voor een glycolbepaling; gevonden werd daarbij 485 mgr.

Dit getal werd voor de verdere berekening als de juiste hoeveelheid glycol aangenomen. De fout, die aan de bepaling kleeft, werd door het glycolgehalte voor en na de vergisting op dezelfde manier te bepalen, eenigszins geëlimineerd.

Voor de Ca-bepaling in 25 c.C. cultuurvloeistof, die hier ingesteld werd als contrôle op de hoeveelheid totaal zuur, waren noodig 2,08 en 2,12 dus gemiddeld 2,10 c.C. 0,0987 n. permanganaat, dat is 2,07 c.C. 0,1 n.

De kolfinhoud werd met een 24 uur oude agarcultuur geënt en 30 dagen in de broedstoof geplaatst. De analyse gaf de volgende resultaten:

Voor de Ca-bepalingen in 25 c.C. vloeistof waren noodig 9,41 en 9,46 c.C. 0,0986 n. permanganaat = 9,34 c.C. 0,1 n. Het verschil van voor en na de ontleding bedraagt dus 7,24 c.C. 0,1 n.

Dit calcium was aanwezig als Ca-acetaat, dus komen die 7,24 c.C. 0,1 n. permanganaat overeen met 7,24 c.C.

0,1 n. azijnzuur = 43,44 mgr. per 25 c.C. of 87 mgr. per 50 c.C. gistingsvloeistof.

50 c.C. vloeistof werden voor de azijnzuurbepaling met stoom gedestilleerd en opgevangen tot één liter.

De helft hiervan nam ter neutralisatie 7,18 c.C. 0,1 n. NaOH; dit komt overeen met 14,36 c.C. 0,1 n. zuur per 50 c.C. gistingsvloeistof = $14,36 \times 6 = 86$ mgr. azijnzuur, hetgeen met het reeds gevonden cijfer volkomen overeenstemt.

Vervolgens werd de hoeveelheid onvergiste glycol bepaald. Dit geschiedde door 50 c.C. vloeistof te filtreren, daarna in te dampen en te extraheeren met aceton. Gevonden werd, dat 229 mgr. vergist was, dus $485 - 229 = 256$ mgr. glycol is onveranderd nog aanwezig.

Voor de bepaling van het acetaldehyde werden 200 c.C. afgepipeteerd en gedestilleerd. Nadat ongeveer 50 c.C. was opgevangen, werd stoom door de kolf gedreven, totdat 100 c.C. in de maatkolf was opgevangen.

50 c.C. van de NaHSO_3 oplossing werden getitreerd; hiervoor waren noodig gemiddeld 54,03 c.C. 0,1 n. J_2 oplossing. (54,05 en 54,02 c.C.).

50 c.C. bisulfietoplossing + 25 c.C. aldehydeoplossing verbruikten 49,52 en 49,48 c.C. 0,1 n. J_2 . Verschil is dus 4,53 c.C. 0,1 n. J_2 ; dit komt overeen met $4,53 \times 0,17348 \times 0,1 = 80$ mgr. acetaldehyde in 25 c.C. destillaat en deze zijn afkomstig van 50 c.C. gistingsvloeistof.

De proef, die ingesteld werd, om het aldehyde, dat tijdens de ontleding in de stoof vervluchtigd was, te bepalen, gaf het volgende resultaat:

300 c.C. peptonwater met 2,894 gr. glycol werden in een thermostaat geplaatst en de dampen opgevangen in een maatkolf met 80 c.C. water. Deze kolf bleef ook 30 dagen staan, en nadat de maatkolf tot 100 c.C. was aangevuld, werd hierin het acetaldehyde bepaald.

50 c.C. bisulfiet verbruikten 53,22 en 53,19 c.C. 0,1 n. J_2 , gemiddeld 53,21 c.C.

50 c.C. bisulfiet + 25 c.C. aldehyde verbruikten 52,61 en 52,63 c.C. gemiddeld 52,62 c.C. 0,1 n. J_2 . Verschil is dus 0,59 c.C. 0,1 n. J_2 .

Nu werd bij deze proef per 50 c.C. vloeistof 233 mgr. glycol teruggevonden, er is dus ontleed $482 - 233 = 249$ mgr. Deze 249 mgr. glycol ontwikkelden 0,59 c.C. 0,1 n. acetaldehyde, dat is dus per 100 mgr. glycol 0,22 c.C. 0,1 n. acetaldehyde. Deze correctie moeten we bij de volledige analyse in rekening brengen. Daar waren 229 mgr. glycol ontleed, waarvoor we dus een vermeerdering aan acetaldehyde in rekening moeten brengen van $\frac{229}{100} \times 0,22 = 0,50$ c.C. 0,1 n. aldehyde = 9 mgr. aldehyde; totaal was er dus ontstaan 89 mgr. acetaldehyde.

We kunnen nu de gistingsbalans voor de koolstof per 50 c.C. vloeistof opmaken, deze wordt als volgt:

verdwenen stof	gevormde producten in mgr.		berekend als C.
229 mgr. glycol; berekend als C. 88,6 mgr.	acetaldehyde	89 mgr.	48,5 mgr.
	azijnzuur	87 „	34,8 „
	totaal	176 mgr.	83,3 mgr. of 94 %

Bij een andere proef werden de volgende cijfers gevonden. De kolf had 28 dagen in de stoof gestaan.

verdwenen stof	gevormde producten in mgr.		berekend als C.
222 mgr. glycol; berekend als C. 86 mgr.	acetaldehyde	83 mgr.	45,2 mgr.
	azijnzuur	89 „	35,6 „
	totaal	162 mgr.	80,8 mgr. of 93,9 %

Opvallend hierbij is, dat in beide proeven een groote hoeveelheid glycol onaangetast bleef.

Dit kan niet zijn oorzaak vinden in den zuurgraad van het milieu, daar het calciumcarbonaat steeds in overmaat aanwezig was.

Het moet dus gezocht worden in de concentratie van het acetaldehyde. Zooals bekend, is dit een bacteriegift, indien het in grootere concentratie aanwezig is. Om deze remmende werking te demonstreeren werd een klein proefje genomen met ongeveer een half procentige acetaldehydeoplossing in peptonwater en geënt met *B. coli*. Het bleek, dat bij deze concentratie van acetaldehyde de bacteriën niet wilden groeien. Het is dus zeer wel mogelijk, dat de grensconcentratie, waarbij de bacteriën nog kunnen vergisten, gelegen is bij een concentratie, zooals die bij de genomen proeven, na ongeveer drie weken, was. Ook dit werd nagegaan en het bleek, dat de bacteriën bij een concentratie van 0,2 % aan acetaldehyde niet afsterven, maar zich ook niet ontwikkelen in de peptonoplossing. De vergisting vindt dus door de gevormde hoeveelheid acetaldehyde een natuurlijk einde.

Het te kort van 6 % aan C. kan voor een gedeelte worden toegeschreven aan het gewicht van de gevormde bacteriën. KRUSE¹⁾ geeft in zijn boek een lijst op voor het C. gehalte van de meeste bacteriën en dit is gemiddeld 50 % van het gewicht²⁾ der microörganismen.

Met glycol werd nog een andere, quantitative proef ingezet en wel, om te bepalen de hoeveelheid acetaldehyde, die werd vastgelegd aan sulfiet; theoretisch toch zou al het aldehyde vastgelegd moeten worden.

Voor deze proef werden 400 c.C. peptonwater met 4,042 gr. glycol. in een kolf gebracht, waarin 2 gr. krijt en 3 gr.

1) Dr. W. KRUSE. Allgemeine Mikrobiologie blz. 54.

2) Zie hierover bij vergisting van glycerine.

versch neergeslagen CaSO_3 ¹⁾ aanwezig waren. Na sterilisatie werden 50 c.C. afgepipeteerd voor een glycolbepaling. Gevonden werd 501 mgr.

De kolf werd geënt met *B. coli* en van 18 Maart tot 20 April in de stoof geplaatst. Voor de analyse werden 50 c.C. gebruikt, om de hoeveelheid onontleed glycol te bepalen.

Dit geschiedde niet geheel volgens de beschreven methode, daar hier het sulfiet en de dubbelverbinding van aldehyde en sulfiet aanwezig waren. De overmaat van het sulfiet werd ter verwijdering eerst neergeslagen met 20 c.C. 25 % BaCl_2 oplossing. Vervolgens werd de aldehydesulfietverbinding door koken met Ba(OH)_2 ontleed; het vrijkomende sulfiet werd weder als BaSO_3 neergeslagen. De overmaat bariumhydroxyde werd door CO_2 omgezet in carbonaat.

Hierbij ontstaat ook bicarbonaat, dat door koken weder omgezet wordt in carbonaat. Na affiltratie en eenige malen schoonwasschen met water, werd de vloeistof ingedampt en het glycol door extractie bepaald. Teruggevonden in 50 c.C. 352 mgr. glycol; er was dus ontleed $501 - 352 = 149$ mgr.

De acetaldehydebepaling geschiedde met 200 c.C. gistingsvloeistof; deze werden met stoom gedestilleerd en het destillaat tot 100 c.C. aangevuld.

50 c.C. bisulfietoplossing verbruikten 43,58 en 43,62 c.C. 0,1 n. J_2 oplossing.

50 c.C. bisulfiet + 25 c.C. aldehydeoplossing verbruikten 41,19 en 41,15 c.C. 0,1 n. J_2 . Verschil is dus 2,43 c.C. 0,1 n. J_2 . Dit komt overeen met 84 mgr. acetaldehyde in 50 c.C. gistingsvloeistof. Theoretisch zouden er uit 149 mgr. glycol

¹⁾ NORD. (Biochem. Zeitschr. 96 blz. 164) geeft de voorkeur aan CaSO_3 , boven Na_2SO_3 voor quantitative bepalingen. 1e Omdat CaSO_3 neutraal reageert, terwijl Na_2SO_3 sterk alkalisch reageert, en 2e het Na_2SO_3 maakt bij de reactie met acetaldehyde natronloog vrij, hetgeen de condensatiereactie van sulfiet en aldehyde zeer tegenwerkt. Deze schadelijke invloed is bij het gebruik van CaSO_3 veel geringer.

105,6 mgr. acetaldehyde moeten gevormd zijn; er is dus maar 80 % vastgelegd.

Hierbij wordt verondersteld, dat er geen acetaldehyde vervluchtigd was, maar bij het ontstaan dadelijk door het bisulfiet gebonden werd, hetgeen ook het meest waarschijnlijk is.

Naast het aldehyde was een spoor azijnzuur aantoonbaar; er was dus een weinig aldehyde geoxydeerd.

Dat er hier zoo weinig glycol vergist werd, moet toegeschreven worden aan den eenigszins schadelijken invloed van de sulfiet-ionen op de ontwikkeling der bacteriën.

Vergisting van glycerine.

Volgens de qual. analyse ontstaan hierbij, acetaldehyde, azijnzuur, barnsteen- en melkzuur, kooldioxyde en waterstof.

10,880 gr. zuivere, gekristalliseerde glycerine werden opgelost in 600 c.C. peptonwater, waaraan 4 gr. CaCO_3 was toegevoegd. Na sterilisatie werden 100 c.C. afgepipeerd. De contrôlebepaling leverde 901 mgr. glycerine per 50 c.C. vloeistof (theoretisch 907 mgr.). De hoeveelheid opgelost Ca bedroeg per 25 c.C.: 2,12 c.C. 0,1 normaal. De kolf werd gesloten met het apparaat, om het gevormde kooldioxyde op te vangen. De glazenbuisjes, die onder de gummistop uitkwamen, werden nog eens extra geflambeerd. De vloeistof was met een jonge cultuur der *coli*-bacterie geënt op 12 April. Gedurende één uur werd een koolzuurvrije luchtstroom door de kolf gezogen. De kolf werd daarna in de broedstoof geplaatst.

De analyse geschiedde op 14 Mei, dus na 32 dagen. De kolf werd in een bak met ijswater geplaatst, terwijl direkt achter de kolf een waschfleschje met 100 c.C. gedest. water ingeschakeld werd, waardoor het meegevoerde acetaldehyde werd tegengehouden. Een koolzuurvrije luchtstroom werd gedurende één uur door de vloeistof gezogen.

De gewichtstoename der natronkalkbuisjes bedroeg

$37,324 - 35,496 = 1,828$ en $28,276 - 27,960 = 0,316$. totaal 2,144 gr. CO_2 . Dit komt overeen met 214,4 mgr. CO_2 per 50 c.C. gistingsvloeistof ¹⁾).

Vervolgens werd het Ca-gehalte bepaald in 25 c.C. Noodig waren 13,4 c.C. 0,1 n. permanganaat. Dus totaal Ca-gehalte per 50 c.C. 26,8 c.C. 0,1 n. Oorspronkelijk waren aanwezig in 50 c.C. onvergiste vloeistof 4,24 c.C. 0,1 n. Er was dus een hoeveelheid, overeenkomende met 22,6 c.C. 0,1 n. KMnO_4 , in oplossing gegaan, daarbij uit het krijt vrijmakende $22,6 \times 2,2 = 49,6$ mgr. CO_2 . Uit de glycerine werd dus $214,4 - 49,6 = 164,8$ mgr. CO_2 ontwikkeld.

Ter bepaling van de hoeveelheid glycerine, die niet aangetast was, werden 50 c.C. gebruikt. Gevonden 393 mgr. Ontleed was er dus $901 - 393 = 508$ mgr. glycerine. Voor de acetaldehyde bepaling werden 200 c.C. vloeistof gebruikt; hierbij werden 40 c.C. vloeistof gevoegd uit het waschfleschje. Bij de destillatie met stoom werden 100 c.C. opgevangen en getitreerd. Gevonden in 25 c.C. destillaat 2,56 0,1 n. J_2 . Dit komt overeen met 44 mgr. acetaldehyde in 50 c.C. gistingsvloeistof. De proef, die ingesteld werd om het aldehyde te bepalen, dat tijdens de vergisting verdampt was, leverde per 100 mgr. glycerine voor 50 c.C. vloeistof 0,21 c.C. 0,1 n. J_2 .

De correctie wordt dus $\frac{508}{100} \times 0,21 = 1,07$ c.C. 0,1 n. = 18,4 mgr. acetaldehyde. De totale hoeveelheid gevormde acetaldehyde is dus 62,4 mgr. per 50 c.C. De bepaling van azijnzuur leverde voor 50 c.C. vloeistof 17,79 c.C. 0,0902 n. zuur, hetgeen overeenkomt met 96,36 mgr. azijnzuur ²⁾).

¹⁾ Zie blz. 73.

²⁾ Om nog eens een contrôle op de kwalitatieve analyse te kunnen uitoefenen, werden de $1\frac{1}{2}$ L destillaat na neutralisatie ingedampt tot een klein volume en vervolgens een reactie op mierenzuur ingesteld. Met 10 c.C. eener oplossing van 10 % HgCl_2 , 3 % NaCl en 3 gr. Na-acetaat. Er ontstond geen neerslag van HgCl_2 .

In 25 c.C. vloeistof werd het barnsteenzuur bepaald; gewicht van het Ba-succinaat was 28 mgr., dit komt overeen met 13 mgr. zuur of per 50 c.C. 26 mgr. (4,4 c.C. 0,1 n. zuur) barnsteenzuur.

We hebben dus totaal gevonden aan zuur door de Ca-bepaling 22,6 c.C. 0,1 n.

Teruggevonden als azijnzuur 16,06 c.C. 0,1 n.

„ barnsteenzuur 4,4 c.C. 0,1 n.

Samen 20,46 c.C. 0,1 n.

Voor het melkzuur blijft dus 2,14 c.C. 0,1 n. zuur, overeenkomende met 19,3 mgr. melkzuur in 50 c.C. vloeistof. De gistingsbalans is dus:

verdwenen stof.	gevormde producten in mgr.	berekend als C.	proc. der glycerine als C.
508 mgr. glycerine; berekend als C. 198,8 mgr.	acetaldehyde 44 mgr.	24 mgr.	12,1 %
	azijnzuur 96,3 „	38,5 „	19,4 %
	barnsteenzuur 26 „	10,6 „	5,3 %
	melkzuur 19,3 „	7,7 „	3,9 %
	koolzuur 166 „	90,5 „	45,5 %
	totaal 351,6 mgr.	171,3 mgr.	86,2 %

Bij deze analyse bleef een gedeelte van het CO_2 als bicarbonaat in oplossing, hetgeen met een luchtstroom bij lage temperatuur niet ontleedt, met als gevolg, dat dus al het koolzuur niet verwijderd werd.

Bij een andere analyse werd het CO_2 verwijderd door de kolf in een waterbad van 50°C . te plaatsen ¹⁾ en daarna een luchtstroom door de vloeistof te zuigen. Thans werden

¹⁾ Dissertatie J. SMIT. Amsterdam 1913.

echter twee waschfleschjes ingeschakeld, om het acetaldehyde vast te houden. De uitkomst hier verkregen was iets gunstiger, het azijnzuur- en barnsteenzuurgehalte bleken iets hooger, terwijl het melkzuurgehalte daardoor iets lager was. Ook koolzuur was iets hooger. Gevonden werden de volgende cijfers:

verdwenen stof.	gevormde producten in mgr.	berekend als C.	proc. der glycerine als C.
487 mgr. glycerine ; berekend als C. 190,5 mgr.	acetaldehyde 43,2 mgr.	23,6 mgr.	12,4 %
	azijnzuur 98 „	39,2 „	20,6 %
	barnsteenzuur 28,5 „	11,6 „	6,1 %
	melkzuur 13,8 „	5,5 „	2,9 %
	koolzuur 163,2 „	89, „	46,7 %
	totaal 346,7 mgr.	168,9 mgr.	88,7 %

Zooals reeds gezegd werd op blz. 69, bestaat de helft van het gewicht van de bacteriën uit koolstof. De glycerinepeptonoplossing bleek een zeer goeden voedingsbodem voor de *coli*-bacteriën; de microörganismen ontwikkelden er zich veel beter in, dan in een glycolpeptonoplossing. Om nu eenigszins een beeld te krijgen van de hoeveelheid koolstof, die noodig is om de bacteriën op te bouwen, heb ik het gewicht van de microben bepaald in 50 c.C. glycerinepeptonwater. Het kolfje met deze vloeistof werd, nadat het met *B. coli* geënt was, een maand in de stoof gezet. Vervolgens werden de bacteriën van de vloeistof electrisch afgecentrifugeerd, met steriel water volkomen schoongewasschen en daarna gedroogd.

Het gewicht van de bacteriën was 76 mgr., hiervan is dus de helft koolstof. Deze 38 mgr. koolstof zijn niet alleen van de glycerine afkomstig, maar ook voor een gedeelte

natuurlijk van de pepton. Stel, dat 50 % van de glycerine afkomstig is, dan komen nu in de gistingsbalans in totaal $168,9 + 17 = 185,9$ mgr. C. of 97,6 %.

Vergisting van pyrodruivenzuur.

Voor de bepaling van de ontledingsproducten (azijnzuur, sporen acetyl-methyl-carbinol, kooldioxyde en waterstof) van dit zuur, werd de analyse eenigszins gewijzigd. Hier werd n.l. geen calciumcarbonaat bij de oplossing gevoegd, maar het zuur werd geneutraliseerd met loog t.o.v. phenol-phtaleïne ¹⁾.

Ongeveer 6 gram van het praeparaat, dat beschreven staat op blz. 50, werd opgelost in 500 c.C. peptonwater. Vervolgens werd de oplossing geneutraliseerd en door een CHAMBERLANDkaars gefiltreerd. Nadat de vloeistof twee dagen in de stoof had gestaan, werd de inhoud op steriliteit gecontroleerd.

50 c.C. werden afgepipeteerd voor een pyrodruivenzuurbepaling. Met phenylhydrazine-zoutzuur werd het hydrazon gemaakt, gevonden in 25 c.C. (voor twee bepalingen) 526 en 525 mgr. hydrazon, terwijl het filtraat met waschwater telkens 100 c.C. was. Hierin waren 13 mgr. hydrazon opgelost, dus totaal hydrazon 538 mgr. Dit komt overeen met 537 mgr. pyrodruivenzuur in 50 c.C. gistingsvloeistof. De kolf werd met het absorptietoestelletje gesloten, nadat met een jonge cultuur van *B. coli* geënt was. Het pyrodruivenzure zout vergistte zeer krachtig. Het was dan ook niet te verwonderen, dat na vier weken, toen de kolfinhoud geanalyseerd werd, bleek, dat al het pyrodruivenzuur ontleed was.

Zowel vóór, als na de ontleding werd het koolzuur weer door een luchtstroom verdreven; hierbij werd de kolf op gewone temperatuur gehouden. Het had n.l. geen zin om

¹⁾ Deze stof is zeer giftig voor bacteriën, dus werd slechts zeer weinig indicator toegevoegd.

de kolf op 50° C. te brengen, daar het opgeloste en gebonden koolzuur afzonderlijk werden bepaald. Voor de bepaling van het gebonden koolzuur werd het toestelletje van RUPP¹⁾ gebruikt, waarbij voor elke bepaling 25 c.C. vloeistof in het erlemeyertje werden gepipeteerd.

Het principe van deze methode is, dat het toestel gewogen wordt met vloeistof en een pipetje met zuur. Vervolgens wordt het zuur bij de vloeistof gevoegd en zoodoende komt het koolzuur vrij, dat ontwijkt. Nadat het apparaat op een microvlammetje is verhit en een langzame koolzuurvrije luchtstroom wordt doorgezogen, weegt men het toestel opnieuw; het verschil is de hoeveelheid kooldioxyde. De waterdamp wordt vastgehouden in een chloorcalciumbuisje.

Er werd in 25 c.C. vloeistof, volgens deze methode, 81 mgr. CO₂ gevonden; dat is in 50 c.C. 162 mgr. CO₂.

De twee natronkalkbuisjes gaven een vermeerdering van 28,345 — 28,109 = 0,236 en 36,535 — 35,848 = 0,687 gr. CO₂, dat is voor 50 c.C. vloeistof²⁾ 105 mgr.; totaal was er ontstaan 105 + 162 = 267 mgr. CO₂.

Voor de bepaling van het azijnzuur werden 50 c.C. met stoom gedestilleerd tot een liter. Voor de neutralisatie van het destillaat waren noodig 58,54 c.C. 0,1 n. loog. Dit komt overeen met 351,2 mgr. azijnzuur.

De gistingsbalans wordt dus:

verdwenen zuur.	gevormde producten in mgr.	berekend als C.	proc. v.h. zuur als C.
537 mgr.; berekend als C. 219,7 mgr.	azijnzuur 351,2 mgr. kooldioxyde 267 „	140,5 mgr. 72,8 „	64 % 33,1 %
	totaal 618,2 mgr.	213,3 mgr.	97,1 %

¹⁾ RUPP. Zeitschr. f. Anal. Chemie 51, 1912, 487.

²⁾ Er was slechts 440 c.C. vloeistof in de kolf; bij de kaarsfiltratie waren 60 c.C. achtergebleven. De kolfinhoud werd dan ook pas na de ontleding gemeten.

Als we uit het ontlede pyrodruivenzuur de theoretisch ontwikkelde hoeveelheid kooldioxyde berekenen, komen we op 268,5 mgr., hetgeen dus goed overeenkomt met de gevonden waarde.

Het te kort kunnen we toeschrijven aan sporen acetyl-methyl-carbinol, welke bij deze ontleding gevonden worden en voor een gedeelte ook aan het gewicht van de gevormde bacteriën.

Een contrôleproef gaf de volgende cijfers:

verdwenen zuur.	gevormde producten in mgr.	berekend als C.	proc. v.h. zuur berekend als C.
496 mgr.; berekend als C. 202,9 mgr.	azijnzuur 321 mgr. kooldioxyde 246,4 „	128,4 mgr. 67,2 „	63,3 % 33,1 %
	totaal 567,4 mgr.	195,6 mgr.	96,4 %

Ook hier bleek weer, dat het percentage koolzuur vrij goed klopte met de berekende hoeveelheid.

Het was misschien nauwkeuriger geweest, indien we bij de analyse van glycerine ook het opgeloste en gebonden koolzuur bepaald hadden met behulp van het toestelletje van RUPP. Dit bracht echter zijn bezwaren mee, daar bij glycerine tevens krijgt in de oplossing aanwezig was, waardoor dus een filtratie noodig was. Het gevolg hiervan zou zijn, uitwasschen van het filter en daardoor zou het volume te groot worden, om voor deze methode bruikbaar te zijn. Bij indamping zou CO_2 verloren gaan, om deze reden werd de andere methode gekozen ¹⁾.

¹⁾ Titratiemethoden zijn in een peptonhoudend milieu niet uit te voeren. Deze stof bleek een te sterke buffer te zijn, zoodat een omslag nooit scherp was te zien.

HOOFDSTUK V.

Voorstelling en beschouwing, aangaande de gistingsschemata.

Het is thans wenschelijk, om op grond van de verkregen resultaten, welke in het voorgaande hoofdstuk zijn medegedeeld, een verklaring te zoeken voor het ontstaan van de verschillende producten, welke als eindproducten bij de verschillende gistingen werden gevonden.

Waar wij hier te doen hebben, met stoffen, die een kleiner aantal C. atomen bezitten dan de koolhydraten, is het probleem, een plausibele verklaring te geven van de verschillende trappen, die doorlopen worden, voor het eindproduct is ontstaan, oogenschiijnlijk eenvoudiger. Maar desniettegenstaande de opzet zoo eenvoudig mogelijk is gehouden, hebben hier omzettingen plaats, welke wij met onze gewone, chemische begrippen, ons niet goed kunnen voorstellen. Hier hebben ons slechts uitsluitend de feiten den weg te wijzen.

Vele biochemische reacties verlopen onder invloed van katalysatoren. Willen wij dus in 't chemisch laboratorium dergelijke reacties ten uitvoer brengen, dan moeten we dus trachten een katalysator te vinden, die deze werking kan uitvoeren.

Zoo heeft WIELAND¹⁾ de biochemische oxydatie van aldehyden tot zuren in zijn laboratorium kunnen bewerkstelligen met behulp van de fijn verdeelde metalen der platinagroep. Hij stelt zich dit verschijnsel zoo voor, dat de aldehyden zich eerst met water verbinden en dat deze

¹⁾ WIELAND. B. B. 46, 1913, 3327.

verbindingen, onder invloed van den katalysator, gedehydreed worden. De waterstof vindt dan meestal een acceptor (b.v. de luchtzuurstof), maar soms ook wordt ze als gas in vrijheid gesteld. De oxydatie, welke door middel van de zuurstof van het watermolecule tot stand komt, duiden wij in 't vervolg aan als *hydroxydatie*; de overgang van aldehyde in zuur derhalve aldus:



Een tweede moeilijkheid bij de oplossing van het probleem, is het feit, dat een stof voor kan komen in verschillende isomere vormen. Terwijl de bacteriën den eenen vorm kunnen aantasten, ontleden zij den anderen vorm misschien in 't geheel niet. Willen wij dus van een dergelijke stof onderzoeken, of zij eventueel als tusschenproduct bij een vergisting een rol speelt en hebben wij juist den anderen isomeren vorm van die stof in handen, omdat deze het gewone, synthetische product is, dan blijkt dus die stof niet te worden aangetast, zou dus als tusschenproduct niet in aanmerking komen. Men moet daarom altijd zeer voorzichtig zijn met bepaalde stoffen geheel buiten te sluiten als tusschenproducten bij de bacterieële vergistingen.

Wanneer wij er in geslaagd zijn voor de meest eenvoudige stoffen een aannemelijke verklaring te geven, hoe zij door bepaalde bacteriën worden afgebroken, dan kan deze mogelijk tevens eenig licht verspreiden, aangaande de ontleding van meer ingewikkelde stoffen, als b.v. de koolhydraten, welke ons, uit den aard der zaak het meest interesseeren.

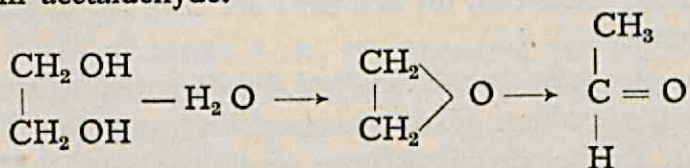
Van niet te miskennen invloed, bij de ontleding van verschillende stoffen, is de samenstelling van den kweekbodem. Zoowel de stikstofbron als de waterstofionen-concentratie hebben grooten invloed op de ontwikkeling der organismen. De bacteriën hebben stikstof noodig voor den opbouw van hun protoplasma. Het spreekt dus van zelf

dat de vorm, waarin de stikstof in den voedingsbodem voorkomt, in nauwe betrekking staat tot de ontwikkeling en vitaliteit van de bacterie. Meestal groeien de bacteriën beter in kweekbodems met organische stikstof, dan in die, waarin de stikstof voorkomt in anorganische verbinding.

De waterstofionen-concentratie van het milieu doet ook zijn invloed gelden op de ontwikkeling van de bacterie. Het gebied der PH, waarbij deze microörganismen zich goed kunnen ontwikkelen, is voor de verschillende stammen zeer uiteenlopend. Hoewel het van de meeste bacteriën nog niet bekend is, staat wel vast, dat dit gebied voor velen niet zeer ruim is. Zooals we b.v. weten, ontwikkelen zich in de melk eerst de *streptococcen*. Zij produceeren zuur en doordat de zuurgraad voor hen te groot wordt, sterven zij af en eerst thans komen de *melkzuurbacteriën* op den voorgrond, die de zuurvorming voortzetten. Voor deze laatsten is het gebied der PH waarbij zij kunnen leven, dus veel grooter dan voor de *Streptococcus lacticus*.

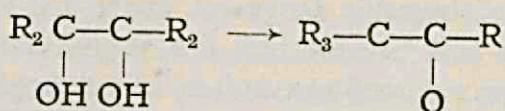
Beginnen we thans onze beschouwingen met de eenvoudigste stof het glycol, dan hebben we in hoofdstuk III gezien, dat deze stof ontleed wordt onder vorming van acetaldehyde en azijnzuur.

Om deze omzetting te verklaren, nemen wij aan, dat het glycol in staat is de bestanddeelen van één mol. water te verliezen en over te gaan in aethyleenoxyde, welke verbinding door intermoleculaire atoomverschuiving kan overgaan in acetaldehyde.



De omzetting van glycol in het oxyde is een zeer belangrijke, daar deze in de verdere bespreking dikwijls ter sprake komt, zoodra twee OH groepen naast elkaar voorkomen.

De intermoleculaire atoomverschuiving van het oxyde kunnen we opvatten als een pinakolineomzetting:

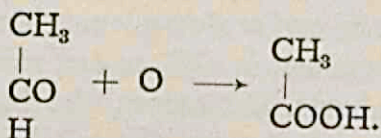


De omzetting van glycol in acetaldehyde wordt in het laboratorium uitgevoerd, door glycol te verhitten op 500°—550° C., terwijl ook het aethyleenoxyde bij deze temperatuur overgaat in het acetaldehyde.

IPATIEW¹⁾ heeft aangetoond, dat, wanneer deze laatste reactie in tegenwoordigheid van aluminiumoxyde verloopt, het oxyde reeds bij 250° C. overgaat in acetaldehyde.

Het is dus zeer aannemelijk, dat de reactie, door de bacteriën bewerkstelligd, op dezelfde wijze verloopt; de omstandigheden zullen in de gistingskolf zóó zijn, dat de microorganismen deze omzetting bij gewone temperatuur kunnen tot standbrengen.

De tweede phase van deze reactie is de overgang van het aldehyde in azijnzuur. Deze omzetting zouden we als een gewone oxydatiereactie kunnen opvatten.



Dat dit werkelijk een oxydatie is, welke door de zuurstof van de atmosfeer tot stand komt, wordt bewezen door de gisting in een waterstofatmosfeer, dus onder volkomen afsluiting der luchtzuurstof, te doen plaats hebben.

Hiertoe werd een kolf van PASTEUR gevuld met 300 c.C. peptonwater, waaraan 3 gr. glycol en 2 gr. calciumcarbonaat was toegevoegd. Na sterilisatie werd geënt met *B. coli*. Vervolgens werd de kolf met zuivere waterstof gevuld en

¹⁾ IPATIEW B. B. 36, 1903, 2016.
Ann. 335, 1904, 197.

gedurende 14 dagen had de gisting in een voortdurenden stroom van H_2 plaats ¹⁾.

De waterstof borrelde langzaam door; aan het afvoerbuisje van de kolf bevond zich een ventiel van BUNSEN, zoodat er geen zuurstof van buiten kon toetreden.

De analyse gaf groote hoeveelheden *acetaldehyde*, maar geen spoor van *azijnzuur*, zoodat de bovengenoemde veronderstelling hiermee ten volle werd bevestigd.

Bij de ontleding van glycol door de *coli*-bacteriën moet dus *de atoomverschuiving de energiebron* zijn. Een tweede conclusie is, dat hier pyrodruivenzuur geen tusschenproduct is, ondanks het feit, dat *acetaldehyde* ontstaat.

Pyrodruivenzuur.

Als ontledingsproducten werden gevonden: CO_2 , H_2 en *azijnzuur*.

De ontleding van het pyrodruivenzuur kunnen we ons, volgens NEUBERG, aldus voorstellen: eerst wordt CO_2 afgesplitst en daarna het aldehyde geoxydeerd tot zuur, waarbij waterstof vrijkomt.

NEUBERG ²⁾ denkt zich voor het eerste gedeelte der reactie een enzym, dat hij *carboxylase* noemt. Het zou alle α keton-zuren kunnen splitsen in CO_2 en een aldehyde, dat één C. atoom minder bevat. Dit enzym, dat NEUBERG bij de gist heeft gevonden, kunnen we dus ook bij de ontleding der bacteriën aannemen, hetgeen b.v. ARINSTEIN ³⁾ ook voor de boterzure gisting met *B. butylicus* Fitz heeft aangenomen.

BODNAR ⁴⁾ heeft zich met de bestudeering van de *carboxylase* bezig gehouden en gevonden, dat het een bestand-

¹⁾ Het waterstofgas werd gewasschen door zwavelzuur, een permanganaat- en een alk. pyrogalloloplossing. Het gas was afkomstig uit een cylinder en bevatte volgens analyse $\pm 1\%$ zuurstof.

²⁾ C. NEUBERG en L. KARCZAG. Biochem. Zeitschr. 36, 1911, 68.

³⁾ B. ARINSTEIN. Biochem. Zeitschr. 117, 1921, 269.

⁴⁾ J. BODNAR. Biochem. Zeitschr. 72, 1916, 193.

deel is van de *zymase*, hetgeen door NEUBERG en ROSENTHAL¹⁾ nader bewezen is.

Dat de carboxylase ook in het dierlijk lichaam voorkomt hebben MAYER²⁾ en TSCHERNORUTZKI³⁾ aangetoond, terwijl ZALESKI en MARX⁴⁾ gevonden hebben, dat ook de hoogere planten het vermogen bezitten pyrodruivenzuur te splitsen.

Men ziet, dat de carboxylase dus zeer verspreid in de natuur voorkomt en niet alleen bij de ontleding van koolhydraten, maar ook bij de splitsing van eiwitten door microorganismen een van de belangrijkste enzymen kan zijn.

De oxydatie van acetaldehyde, welke hier eveneens tot stand komt, heeft echter een ander karakter; wij moeten haar opvatten als een *hydroxydatie*. De waterstof, die bij de reactie vrij komt, verbindt zich hier *niet* met de zuurstof der lucht of met een anderen acceptor, maar ontwijkt gasvorming.

NEUBERG en ARINSTEIN, die de boterzure gisting bestudeerden, noemen dit verschijnsel een „*waterstofgisting*.”

Hieruit volgt, dat, wanneer we het pyrodruivenzuur vergisten in een waterstofatmosfeer, dus onder anaërobe omstandigheden, de oxydatie van acetaldehyde tot zuur toch even goed moet plaats vinden. De proef, als contrôle hierop ingesteld, gaf bevestiging van deze veronderstelling. Er werd n.l. hier geen acetaldehyde gevonden, maar wel azijnzuur⁵⁾.

1) C. NEUBERG en P. ROSENTHAL. Biochem. Zeitschr. 61, 1914, 171.

2) P. MAYER. Biochem. Zeitschr. 40, 1912, 441.

3) M. TSCHERNORUTZKI. Biochem. Zeitschr. 43, 1912, 486.

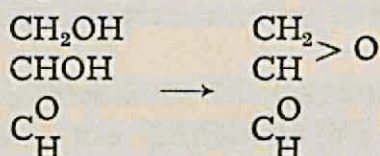
4) W. ZALESKI en E. MARX. Biochem. Zeitschr. 47, 1912, 184.

5) Als we in de litteratuur nagaan de ontleding van het pyrodruivenzure-zout door gist, dan blijkt, dat er ontstaat acetaldehyde, CO₂ en Na₂CO₃. Doordat acetaldehyde een protoplasma gift is, gelukt het nooit al het pyrodruivenzure-zout te ontleden. Zoo vonden NEUBERG en KARZAG, dat slechts 40 % van het zuur ontleed was. Doordat bij de bacteriegisting geen acetaldehyde blijft bestaan, kan de ontleding tot het eind toe voortgaan en wordt hier al het zout ontleed.

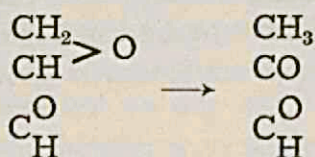
Met behulp van de ontleding van glycol en pyrodruivenzuur, kunnen we nu de ontleding der meer ingewikkelde stoffen met 3 C. atomen trachten te verklaren.

Vooreerst dan glycerinealdehyde.

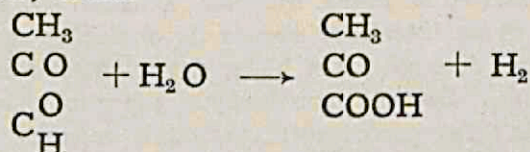
Gezien de eindproducten, die ontstaan, acetaldehyde, azijnzuur, CO_2 en H_2 , blijkt het, dat deze bijna dezelfde zijn, als die, welke uit het pyrodruivenzuur worden gevormd. Het is dus zeer waarschijnlijk, dat het glycerinealdehyde eerst overgaat in pyrodruivenzuur en dat dit op de boven beschreven wijze, geheel aansluitende aan NEUBERG'S opvatting, ontleed wordt. Om de overgang glycerinealdehyde pyrodruivenzuur plausibel te maken, nemen wij een dehydratatie aan, welke in 't glycerinealdehydemolecule tot stand wordt gebracht.



Op deze wijze hebben wij weder de glycolformule voor ons en mogen in aansluiting daarmede de „glycolomzetting” doen plaats grijpen n.l.:



Hierbij ontstaat dus methylglyoxaal, hetwelk door hydroxydatie overgaat in het overeenkomstige zuur, waarbij waterstof vrij komt.



Het pyrodruivenzuur valt thans weder uiteen in kooldioxyde en acetaldehyde, waarna dit laatste voor een ge-

deelte, door hydroxydatie, overgaat in azijnzuur, waarbij nogmaals waterstof onstaat.

Bij deze ontleding zou dus tweemaal zooveel waterstof moeten ontstaan als kooldioxyde; dat dit in werkelijkheid varieert, mogen we aan verschillende omstandigheden toeschrijven.

Het is n.l. zeer wel mogelijk, dat bij de aërobe gisting naast de hydroxydatie, ook een gewone luctoxydatie kan plaats vinden voor de overgang van methylglyoxaal en acetaldehyde in de overeenkomstige zuren. Deze oxydatie zal dan weer afhankelijk zijn van den vorm der gistingskolf¹⁾, temperatuur en reactie van het milieu. Hiermee zou dan ook verklaard worden, waarom de verhouding der twee gasen CO_2 en H_2 bij de verschillende proeven zoo uit elkaar loopt; zelden treft men twee proeven aan waar de mengverhouding der gasen in beide hetzelfde is. De anaërobe ontleding van glycerinealdehyde gaf dezelfde producten als de aërobe vergisting, zoodat daardoor de hydroxydatie bewezen wordt.

Een andere voorstelling der ontleding van het glycerinealdehyde zou zijn haar te doen verlopen over het glycerinezuur, door hydroxydatie²⁾. Uit het feit echter, dat de ontleding van glycerinezuur oneindig veel langzamer verloopt dan die van glycerinealdehyde, volgt, dat, hoewel misschien niet geheel, toch grootendeels en voornamelijk het glycerinealdehyde eerst omgezet wordt in het methylglyoxaal³⁾.

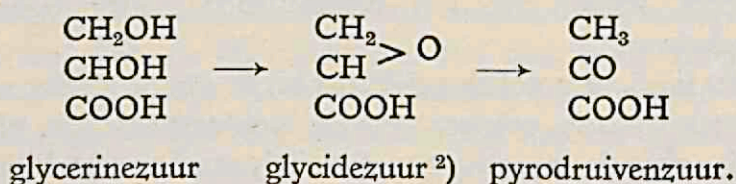
¹⁾ Hiermee staat in verband de hoeveelheid lucht, die in aanraking komt met het vloeistofoppervlak.

²⁾ Zie voor de verdere ontleding bij glycerinezuur bldz. 86.

³⁾ Het methylglyoxaal, dat in het chemisch laboratorium gemaakt wordt, kan door de *coli*-bacteriën *niet* ontleed worden. NEUBERG heeft echter erop gewezen, dat 8 isomere vormen voor deze stof bestaanbaar zijn; hij veronderstelt, dat het methylglyoxaal, dat tijdens de alcoholische gisting ontstaat, een der isomere vormen is, die wel ontleedbaar blijkt te zijn.

Glycerinezuur¹⁾.

Bij de ontleding ontstaan CO_2 , H_2 , acetaldehyde en azijnzuur. De ontleding van dit zuur kunnen we ons op de volgende wijze voorstellen:



Het pyrodruivenzuur valt vervolgens uiteen in acetaldehyde en CO_2 . Een gedeelte van het acetaldehyde wordt verder geoxydeerd tot azijnzuur, waarbij waterstof vrijkomt, terwijl een andere gedeelte, als eindproduct blijkbaar, blijft bestaan.

Deze ontleding verloopt slechts zéér langzaam. Na eenige dagen komt er eerst gas ontwikkeling, er schijnen dus producten aanwezig te zijn, die moeilijk worden aangegrepen.

Waarschijnlijk gaat de „glycolomzetting” in tegenwoordigheid van een carboxylgroep zeer lastig, dit leid ik af uit het verschil in snelheid, waarmee glycerine, glycerinealdehyde en glycerinezuur worden ontleed. Hoe verder de oxydatie aan het eindstandige koolstofatoom heeft plaats gehad, hoe minder intensief en hoe minder snel heeft de vergisting plaats. Ten bewijze hiervan en in analogie hiermee werd geconstateerd, dat glycol ontleed wordt, terwijl glycolzuur onaangetast blijft!

Glycerinezuur gaat bij langeren tijd staan over in het anhydried, hetgeen een zeer bestendige verbinding is, welke eerst bij lang koken met water overgaat in het zuur. Het is misschien niet uitgesloten, dat ook deze vorm een rol speelt bij de zoo opvallend vertraagde ontleding van het glycerinezuur.

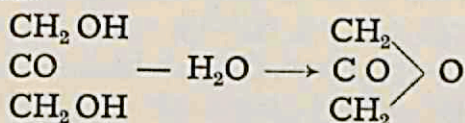
¹⁾ Glyzerinezuur was inactief.
Nef. Ann. 335, 1904, 208.

Dioxyaceton.

Zoals we uit de kwalitatieve analyse gezien hebben, ontstaan bij de ontleding van deze stof azijnzuur, kooldioxyde en waterstof.

Het spreekt dus van zelf, dat we ook hier weer intermediair het pyrodruivenzuur moeten ontstaan denken, gezien de eindproducten ¹⁾.

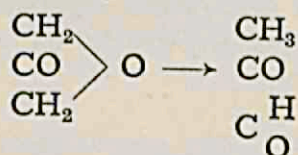
We kunnen ons dit alleen zoo voorstellen, dat we een uittreden van water aannemen, tusschen de twee buitenste koolstofatomen.



Deze stof bezit een vierring; nu zijn er stoffen bekend met een ring van 3 koolstof- en één zuurstofatoom. Hoewel deze stof nog niet bekend is, kent men wel isomeren ervan. Zoo geeft MEYER en JACOBSON ²⁾ aan de monoöxyderivaten

van het trimethyleenoxyde de formule $\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CO} \\ | \quad | \\ \text{CH}_2 - \text{O} \end{array}$, en zegt

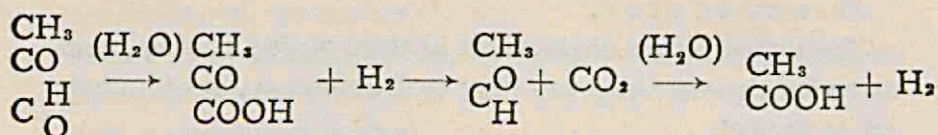
dat het onbestendige verbindigen zijn, die tot de β lactonen behooren. Het is dus zeer wel mogelijk, dat bovengenoemde stof als intermediair product optreedt en overgaat door opening der ring en intermoleculaire atoomverschuiving in het pyrodruivenzuuraldehyde:



Deze stof gaat dan over in het overeenkomstige zuur en door de carboxylase-splitsing ontstaan acetaldehyde en kooldioxyde.

¹⁾ Bij deze ontleding ontstaat ook, evenals bij die van pyrodruivenzuur, acetyl-methyl-carbinol. Het ontstaan van deze stof wordt op blz. 91 behandeld.

²⁾ V. MEYER en P. JACOBSON, II, 3, I blz. 41.

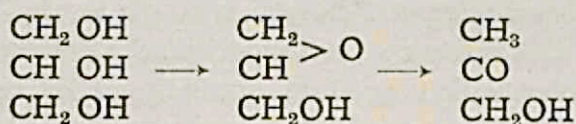


Glycerine.

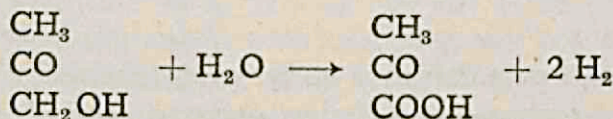
Zooals we in hoofdstuk III gezien hebben ontstaan bij de vergisting van glycerine: azijnzuur, barnsteenzuur, melkzuur, acetaldehyde, kooldioxyde en waterstof.

Deze ontleding geeft ons plotseling een geheel ander beeld. Hier beginnen wij, feitelijk zonder eenige inleiding, het proces voor ons te zien, dat zich bij de suikers voordoet, waar immers eveneens de genoemde eindproducten worden gevormd, benevens mierenzuur, dat echter merkwaardiger wijze hier *niet* werd gevonden.

Hoe moeten we ons het ontstaan van al deze producten voorstellen? De stoffen acetaldehyde en kooldioxyde wijzen zeer waarschijnlijk op het intermediair ontstaan van pyrodruivenzuur uit glycerine. Dit kunnen we ons als volgt denken:



Vervolgens wordt deze laatste verbinding geoxydeerd met water tot pyrodruivenzuur, waarbij dan twee mol. waterstof vrijkomen.



Het pyrodruivenzuur valt uiteen in acetaldehyde en kooldioxyde, terwijl een gedeelte van het aldehyde door hydroxydatie overgaat in azijnzuur.

De oxydatie van alcohol tot zuur, zooals we hier veronderstellen, is in de biochemie bekend. Zoowel onder invloed van levende bacteriën als van „dauerpraeparaten” wordt b.v. aethylalcohol omgezet in azijnzuur buiten toetreding van de luchtzuurstof¹⁾

Dat ook bij ontleding van glycerine de luchtzuurstof geen rol speelt, werd geconstateerd door de vergisting te doen plaats hebben in anaërobe omgeving, n.l. in een geëvacueerden exsiccator, waarin een alkalische pyrogalloloplossing was gebracht. Door gebruik te maken van een drieluugs kraan werd de loog pas aan de pyrogallol toegevoegd, nadat eerst de kolf luchtledig was gezogen, zoodat zeker de laatste sporen zuurstof, door de versch bereide pyrogalloloplossing, werden weggenomen.

Ook bij deze anaërobe vergisting ontstonden dezelfde eindproducten als bij de aërobe ontleding, zoodat we de oxydatie ook hier geheel als een hydroxydatie moeten opvatten.

Is dus door de omzetting van glycerine in pyrodruivenzuur het ontstaan van enkele producten verklaard, hiermee is nog geen oplossing gevonden voor het ontstaan van barnsteen- en melkzuur.

In 't algemeen verbindt men aan 't begrip „gisting” de voorstelling, dat hier een proces zich afspeelt, waarmee de organismen groote moleculen kunnen afbreken waardoor zij energie winnen. Met het verkleinen van de moleculen staat echter in nauw verband het omgekeerde proces n.l. het vergrooten.

Het was dus van groot belang, enzymen op te sporen, die kernsynthetische eigenschappen bezitten.

Reeds lang waren er enzymatische syntheses bekend zooals de opbouw van vetzure esters, disacchariden, eiwitten met behulp van lipasen, glucosidasen en proteasen. Bij deze

¹⁾ B. B. 46, 1913, 3335.

molecule-koppeling vinden er alleen reacties plaats tusschen koolstof en zuurstof of tusschen koolstof en stikstof atomen. Een geheel afzonderlijke groep vormen echter die enzymen, die de koolstof-koolstofketen verbreken, zooals de zymase en de carboxylase.

Een fermentatieve vereeniging van de splitsingsproducten van korte koolstofketens door middel van hunne koolstof-atomen tot langere ketens, was tot voor kort nog niet gevonden. Dit gelukte eerst NEUBERG en HIRSCH ¹⁾, toen zij het enzym de *carboligase* vonden in de gist.

Als men aan een gistende suikeroplossing benzaldehyde toevoegt, ontstaat een product, dat is samengesteld uit één mol. bitteramandelolie en een mol. acetaldehyde.

NEUBERG en OHLE ²⁾ hebben de formule van deze verbinding bepaald en gevonden, dat het phenyl-acetyl-carbinol $C_6H_5 - CHOH - CO - CH_3$ was.

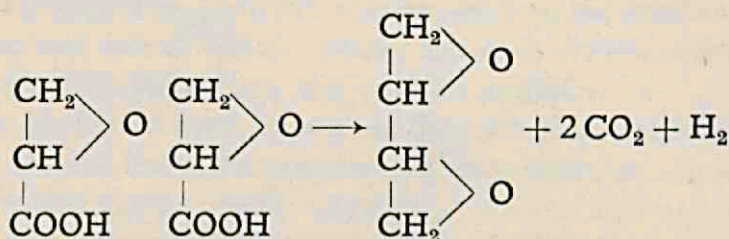
Dit proces is een zuiver enzymatisch proces d.w.z. ook bij celvrije gisting wordt dit product geproduceerd. Het bijzondere bij deze reactie is, dat wanneer men benzaldehyde met acetaldehyde samenbrengt, het ferment niet werkzaam is en er dus geen koppeling plaats heeft; wel als men in plaats van acetaldehyde pyrodruivenzuur gebruikt. Dit hangt denkelijk samen met het feit, dat het acetaldehyde, hetgeen door carboxylase splitsing van pyrodruivenzuur ontstaat, den gewenschten „*reactionfähigen*” vorm bezit voor een koolstof-koolstof koppeling. Hieruit volgt dus, dat het *pyrodruivenzuur* het uitgangspunt is voor kernsynthetische reacties. Bij de vergisting van glycerine hebben we nu in het barnsteen-*zuur* ook een stof, die ontstaan is door koolstof koppeling, een andere mogelijkheid toch is niet denkbaar. Uit de voorgaande beschouwing volgt, dat we ook hier het *pyrodruivenzuur* als uitgangspunt voor het ontstaan van barn-

¹⁾ C. NEUBERG en J. HIRSCH. Biochem. Zeitschr. 115, 1921, 282.

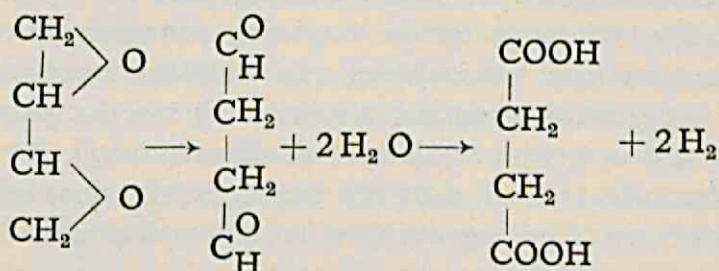
²⁾ C. NEUBERG en H. OHLE. Biochem. Zeitschr. 121, 1921, 312.

steenzuur moeten aannemen. Ik heb mij dit als volgt gedacht:

Het pyrodruivenzuur is aanwezig in zijn tautomeren vorm, en nu ontstaat uit twee mol. van deze stof onder invloed van de carboxylase twee onverzadigde brokstukken, die door de werking van het enzym, de carboligase, gekoppeld worden, terwijl er kooldioxyde en waterstof vrij komt, aldus:



Deze laatste verbinding gaat door intermoleculaire atoomverschuiving over in het aldehyde van barnsteenzuur, dat door hydroxydatie omgezet wordt in het overeenkomstige zuur.

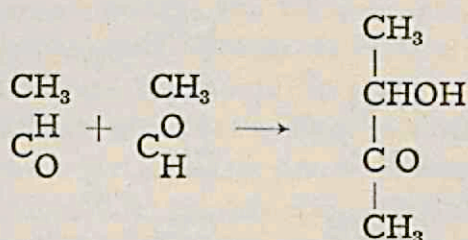


Waarom nu bij de vergisting van glycerinealdehyde en glycerinezuur, waar toch ook het pyrodruivenzuur als tussenproduct ontstaat, geen barnsteenzuur wordt gevormd, is nog een onopgelost probleem gebleven; het houdt misschien verband met de structuur van het pyrodruivenzuur en het acetaldehyde, zooals het bij die ontledingen ontstaat.

Een andere stof, die ook door koolstofkoppeling moet ontstaan, is het *acetyl-methyl-carbinol*.

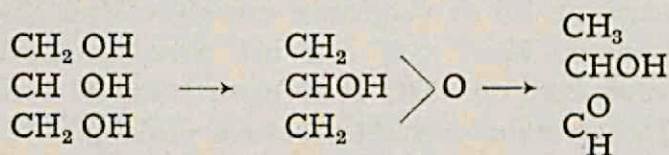
Deze stof ontstaat bij kleine hoeveelheden bij de vergisting van dioxyaceton en pyrodruivenzuur.

Zooals we gezien hebben ontstaat uit dioxyaceton ook intermediair het pyrodruivenzuur, deze laatste stof nu zal door het enzym, de carboxylase, gesplitst worden. Het acetaldehyde, dat dan ontstaat, zal in een vorm aanwezig moeten zijn, die gemakkelijk de aldolcondensatie volbrengt. Hierbij zal mogelijk ook de carboligase zijn invloed doen gelden.



Ook hier kunnen we weer dezelfde vraag stellen als bij het barnsteen zuur, waarom ontstaat deze stof niet altijd waar pyrodruivenzuur optreedt? Het antwoord zal wellicht op structuurchemisch gebied zijn gelegen!

Keeren we terug tot de vergisting van glycerine, dan moeten we nog het ontstaan van *melkzuur* beschouwen. Om het ontstaan te verklaren nemen wij aan, dat glycerine eenzelfde omzetting ondergaat als dioxyaceton¹⁾. De stof, die dan ontstaat, bezit weer een vierring, welke door openen en atoomverschuiving overgaat in het melkzuuraldehyde, aldus:



Door hydroxydatie gaat deze laatste stof dan over in melkzuur. Uit het feit, dat dioxyaceton zoo langzaam vergist kan men de conclusie trekken, dat de waterafsplitsing

¹⁾ Vergelijk NEF. Ann. 335, 1904. 208.

van de 1—3 koolstofatomen uiterst moeilijk door de bacteriën tot stand komt. Voor glycerine zal deze omzetting ook verre ten achter staan bij de omzetting tot pyrodruivenzuur, en hierin zullen we dus de oorzaak moeten vinden voor de geringe hoeveelheid melkzuur, die ontstaat.

De groote hoeveelheden melkzuur, die bij de koolhydraatvergisting gevormd worden, moeten we waarschijnlijk op een geheel andere manier ontstaan denken. Hierbij zal ook het mierenzuur wel een rol spelen.

Dit zuur werd nooit bij een van de beschreven ontledingen door de *coli*-bacteriën aangetoond, terwijl het bij de ontleding der suikers steeds ontstaat.

Nu bleek uit eenige proefjes, die werden ingezet, dat het mierenzure-natrium door de *coli*-bacteriën langzaam in CO_2 en H_2 wordt gesplitst, hetgeen ook door verschillende onderzoekers gevonden was¹⁾. De uitspraak van sommigen, dat het mierenzuur ontstaat door reductie van het kooldioxyde lijkt dan ook onwaarschijnlijk, maar niet geheel onmogelijk, als omkeerbare reactie. Waar wij echter de ontleding van glycerine en van pyrodruivenzuur, wat snelheid en gasontwikkeling betreft, zeker mogen vergelijken met de vergisting van glucose door de *coli*-bacteriën, waarbij tevens CO_2 en H_2 ontstaan, echter geen mierenzuur, komt het ons voor, dat men met de voorstelling „koolzuur-reductie” zich wel wat al te gemakkelijk van de zaak afmaakt.

Een merkwaardig verschijnsel deed zich nog voor bij de anaërobe vergisting van glycerine. Zooals gezegd, ontstonden bij de ontleding in het luchtledige dezelfde producten als bij de aërobe vergisting, daarentegen in een waterstof-atmosfeer werd plotseling *aethylalcohol* aangetoond en slechts sporen acetaldehyde. Doordat hier een van de ontledingsproducten in overmaat wordt toegevoegd, kon het

¹⁾ PAKES en JOLLYMAN. Journ. Chem. Soc. 79, I, 1901, 386.

een verschuiving van het evenwicht zijn, dat dit niet zoo is, werd geconstateerd door de gisting te laten verlopen in een koolzuuratmosfeer. Kooldioxyde toch is ook een splitsingsproduct, maar nu werd geen spoor aethylalcohol gevonden.

We moeten dus het ontstaan van aethylalcohol als een gewone reductie van het acetaldehyde beschouwen. De andere eindproducten waren hetzelfde gebleven als bij de aërobe ontleding.

Aan het slot van deze beschouwingen gekomen, wensch ik nog eens in het bijzonder erop te wijzen, dat de gistings-schemata slechts opgesteld werden voor het *B. coli*, dus zonder meer niet voor andere organismen zijn toe te passen. Ik meen goed te doen daarop nadrukkelijk te wijzen, omdat men vooral in den tegenwoordigen tijd de neiging ziet ontstaan op grond van een zeer beperkt onderzoek te generaliseeren en dit iets is, waarvoor men zich ter dege heeft te wachten.

Daar lang niet alle onderzochte koolhydraten en meerwaardige alcoholen acetaldehyde als tusschenproduct gaven, werd de vraag gesteld, of deze stoffen dan ook op een andere wijze ontleed worden?

Van de beschikbare koolhydraten werden 0,5 % oplossingen gemaakt in peptonwater. Voor de sterilisatie werden deze oplossingen nauwkeurig geneutraliseerd op lakmoes, dat aan den voedingsbodem werd toegevoegd. Vervolgens werden alle bacteriën der *coli-typhus*-groep op deze verschillende peptonoplossingen geënt en na 5 dagen werd geconstateerd of er zuur, gas, of beide waren gevormd, m.a.w. of de toegevoegde stoffen ontleed waren.

Voor de *dysenterie*-bacteriën, die verschillend op sommige koolhydraten inwerken, werd een afzonderlijke tabel opgesteld. Deze bacteriën geven nooit gasontwikkeling, dus zijn deze kolommen in tabel II vervallen.

De proeven werden in de broedstoof bij 37° C. geplaatst.
Het volgend overzicht geeft een duidelijk beeld van de resultaten.

*Ontleding der koolhydraten door de verschillende stammen
der coli-typhus groep.*

TABEL I.

Stoffen.	<i>B. coli</i> (3)		<i>B. para-</i> <i>typhus B</i> (9)		<i>B. para-</i> <i>typhus A</i> (2)		<i>B. typhus</i> (2)	
d. glucose	z.	g.	z.	g.	z.	g.	z.	—
d. mannose	z.	g.	z.	g.	z.	g.	z.	—
d. galactose	z.	g.	z.	g.	z.	g.	z.	—
d. fructose	z.	g.	z.	g.	z.	g.	z.	—
l. gulose	—	—	—	—	—	—	—	—
l. idose	—	—	—	—	—	—	—	—
d. manniet	z.	g.	z.	g.	z.	g.	z.	—
d. sorbiet	z.	g.	z.	g.	z.	g.	z.	—
i. dulciet	z.	g.	z.	g.	z.	g.	z.	—
l. arabinose	z.	g.	z.	g.	z.	sp.	z.	—
l. xylose	z.	g.	z.	g.	sp.	—	z.	—
l. rhamnose	z.	g.	z.	g.	z.	—	—	—
l. arabiet	—	—	—	—	—	—	—	—
i. adoniet	—	—	—	—	—	—	—	—
maltose	z.	g.	z.	g.	z.	g.	z.	—
saccharose	z.	g.	—	—	—	—	—	—
lactose	z.	g.	—	—	—	—	—	—
raffinose	z.	g.	—	—	—	—	—	—
i. erythriet	—	—	—	—	—	—	—	—
glycerine	z.	g.	sp.	—	sp.	—	sp.	—
dioxyaceton	z.	g.	z.	g.	z.	—	z.	—
glycol	z.	—	sp.	—	sp.	—	sp.	—

z. = zuur. g. = gas. sp. = sporen — = geen zuur resp. gas.

TABEL II.

Stoffen.	<i>Dys.</i> <i>Flexner.</i>	<i>Dys.</i> <i>Hiss.</i>	<i>Dys.</i> Y.	<i>Dys.</i> <i>Shiga-</i> <i>Kruse.</i>	<i>Dys.</i> <i>Strong.</i>
d. glucose	z.	z.	z.	z.	z.
d. mannose ...	z.	z.	z.	z.	z.
d. galactose ...	z.	z.	z.	z.	z.
d. fructose	z.	z.	z.	z.	z.
l. gulose	—	—	—	—	—
l. idose	—	—	—	—	—
d. manniet	z.	z.	z.	—	z.
d. sorbiet	—	—	—	—	—
i. dulciet	—	—	—	—	—
l. arabinose ...	z.	z.	z.	z.	z.
l. xylose	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.
l. rhamnose ..	—	—	—	—	—
l. arabiet	—	—	—	—	—
i. adoniet	—	—	—	—	—
lactose	—	—	—	—	—
maltose	z.	—	sp.	—	z.
saccharose	—	—	—	—	—
raffinose	—	—	—	—	—
i. erythriet ...	—	—	—	—	—
glycerine	—	—	—	—	—
dioxyaceton ...	z.	sp.	z.	sp.	sp.
glycol	—	—	—	—	—

Vergelijken we nu de resultaten van deze proeven met de tabel op blz. 28, dan zien we, dat de stoffen, die zuur resp. gas of beide produceeren, ook een positieve reactie op acetaldehyde geven.

Wij kunnen hieruit de conclusie trekken, dat *alle stoffen, die ontleed worden door de bacteriën der coli-typhus-groep, acetaldehyde als tusschenproduct doen ontstaan.*

Uit tabel II volgt, dat enkele van deze koolhydraat-oplossingen voor de verschillende soorten van *dysenterie-bacteriën* zeer geschikte differentiaaldiagnostica zijn.

HOOFDSTUK VI.

Enzymen.

Een van de vragen, welke zeer zeker is te stellen, is deze: *Is de gemengd zure gisting veroorzaakt door de coli-typhus-bacteriën een enzymatisch proces of niet?* Is het proces enzymatisch, dan zal het mogelijk zijn ook hier, evenals bij de gist, een zoogenaamd celvrije gisting te produceeren.

Ik heb langs verschillende wegen getracht de enzymen in vrijheid te stellen en vervolgens gecontroleerd of deze gisting teweeg brachten.

Wij hebben rekening te houden met het feit, dat het zoowel *ecto-* als *endo-*enzymen kunnen zijn, die hier een rol spelen. De eerste stap was dan ook de vloeibare bacterieculturen door een CHAMBERLAND-kaars te filtreeren. De *ecto-*enzymen gaan voor een groot gedeelte met de vloeistof door de kaars heen, zoodat wij in het filtraat deze kunnen aantoonen, door de vloeistof aan een suikeroplossing toe te voegen en te zien of er gisting plaats heeft.

Dit onderzoek werd uitgevoerd met 300 c.C. alkalischen bouillon. Deze oplossing werd geënt met twee oogjes *coli-bacteriën* en 14 dagen in de stoof geplaatst. Vervolgens werd de vloeistof door een porceleinen kaars gefiltreerd en het filtraat gecontroleerd op afwezigheid van bacteriën, door overenten op bouillon. 5 c.C. van het steriele filtraat werden in gistkolfjes gevoegd bij 10 c.C. 3 % oplossing van glucose, glycerine en pyrodruivenzuur en deze kolfjes bij 37° C. geplaatst.

Indien de bacteriën *ecto-*enzymen geproduceerd hadden, zou in deze kolfjes gisting moeten plaats hebben. Na drie

dagen was er geen spoor gas gevormd en was er van gisting geen sprake.

Er werd vervolgens, in analogie met de ontleding door enzymen van de gist, een weinig verdund gistwater bij de verschillende oplossingen gedaan. Er zit n.l. in dit gistwater een *co-enzym*, dat noodig is, om de ontleding van de suikerhoudende vloeistof met gistperssap te doen plaats grijpen. Doch ook na toevoeging van dit verdunde gistwater trad in de kolfjes geen gisting op. *Ecto*-enzymen zijn dus afwezig.

Wij moesten derhalve nu zoeken naar *endo*-enzymen van de bacteriën.

Dit werd op zeer verschillende wijzen gedaan.

1°. De bacteriën werden geënt op alkalischen bouillon en veertien dagen bij 37° C. geplaatst. Nadat er flinke groei was opgetreden, werden de microörganismen afgecentrifugeerd en in een centrifugebuis verzameld. De bacteriën werden in deze buis gedood door middel van *aceton*, waarbij deze vloeistof gedurende een week op de organismen staan bleef. Vervolgens werd de buis, die met een wattenprop gesloten was, in de stoof geplaatst, waardoor na 2 dagen, de *aceton* geheel verdampt was. De bacteriekoek, die overbleef, werd, na verwrijven met een steriel spateltje, in de verschillende gistkolfjes gebracht. Weer had geen gisting plaats. De mogelijkheid bestond natuurlijk, dat de *aceton* ook de enzymen had vernietigd. Daarom werd nog een ander bacterie-doodend middel gebruikt n.l. *toluol*. Nadat weer een flinke dosis levend bacteriën-materiaal verzameld was, werd dit over vijf verschillende gistbuisjes verdeeld. In elk buisje, dat voor $\frac{1}{4}$ gevuld was, werden drie druppels *toluol* gedaan. Daarna werd het eerste buisje een kwartier lang geschud en vervolgens een oogje van de bacterie-emulsie uitgestreken over een agarplaat, om te controleeren of al de bacteriën gedood waren, terwijl het gistkolfje geheel gevuld werd met een 3 % glucoseoplossing.

De andere gistkolfjes werden achtereenvolgens een kwartier langer geschud en verder op dezelfde manier behandeld.

In het eerste kolfje trad gisting op. Na drie uur was dit reeds duidelijk te zien, maar den volgenden dag bleek, dat vele kolonies op de eerste agarplaat gegroeid waren. Na één kwartier schudden waren dus niet alle bacteriën gedood.

In de andere kolfjes had geen gisting plaats en ook de agarplaten waren steriel gebleven.

Volgens deze methode waren er dus geen enzymen gevonden, die gisting konden veroorzaken. Het is lang niet onmogelijk, dat door het dooden van het microörganisme met aceton of toluol, de bacterie zoover intact blijft, dat toch de endo-enzymen niet naar buiten komen. Er werden daarom nog eenige andere proeven ingesteld om te trachten de endo-enzymen buiten de bacteriecel te brengen.

*Vette olien bezitten de eigenschap bacteriën op te lossen*¹⁾. Van deze eigenschap heb ik gebruik gemaakt om de bacteriën te dooden en te trachten aldus de eventueel aanwezige endo-enzymen in oplossing te krijgen.

Een flinke dosis bacteriën-materiaal werd gedurende een maand in een wijde reageerbuis in aanraking gebracht met 20 c.C. zuivere Arachisolie. Met een steriele spatel werd de vloeistof iederen dag flink omgeroerd en men zag duidelijk dat de hoeveelheid bacteriën-materiaal verminderde. Na 30 dagen waren nog slechts bruine vliesjes op den bodem van de buis te zien. Er werden toen een paar oogjes van deze olie overgeënt op alkalische bouillon, om de steriliteit te beoordeelen. Er had echter geen groei meer plaats, zoodat kon worden aangenomen, dat alle bacteriën opgelost of gedood waren.

De olie werd in een gistkolf gebracht en half gevuld met steriel water. De kolf werd met een steriele gummistop gesloten en in een schudmachine gedurende 12 uur geschud.

¹⁾ DISS. LANSBERG. Leiden 1919.

Dit had ten doel de enzymen uit de olie in het water te verdeelen. Den volgenden dag werd een sterke glucose-oplossing aan de vloeistof toegevoegd, zoodat de eindconcentratie $\pm 2\%$ was.

Vervolgens werd de kolf in de stoof bij 37°C . geplaatst. Gisting had echter niet plaats. Dezelfde proeven werden herhaald, maar in plaats van glucose werden glycerine en pyrodruivenzuur gebruikt. Ook deze stoffen werden niet ontleed.

Nadat al deze proeven negatieve resultaten hadden opgeleverd, werd besloten, om zeker te zijn, dat werkelijk geen enzymen aanwezig zijn, *bacterieperssap* te gaan bereiden.

Prof. SÖHNGEN stelde mij in de gelegenheid, om in zijn laboratorium, waar een bacteriepers aanwezig is, deze proeven ten uitvoer te brengen¹⁾.

Dit perssap wordt gemaakt op dezelfde wijze als men gistperssap maakt. De bacteriën worden met infusoriën en kwartszand vermengd en vervolgens door een zeef gewreven, zoodat er een droog, fijnkorrelig poeder ontstaat. Dit laatste wordt in een mortier fijngewreven.

Deze laatste bewerking moet zeer nauwkeurig en lang gebeuren, daar anders de meeste bacteriën in leven blijven. Wanneer men lang genoeg heeft gewreven, moet er een plastische massa ontstaan, die geheel aan den stamper blijft kleven. Deze massa wordt vervolgens in de pers gebracht in een vochtig uitgeknepen persdoek. De bacteriepers bestaat uit een kleinen, stalen cylinder, waarin van boven een opening zit, die doorloopt tot een fijne zeef. Onder deze zeef is een bakje, waarin het sap wordt opgevangen. In de holte brengt men de persdoek met inhoud en sluit de opening af met een stalen schijf. Dit heele toestelletje brengt men onder een glycerinepers. Deze pers zet men langzaam aan, daar anders de persdoek barst. Men kan zoo een druk

¹⁾ Waarvoor ik Prof. SÖHNGEN nogmaals mijn oprechten dank betuig.

op de bacteriën uitoefenen van 300 tot 350 atmosfeer; hooger druk is niet noodig. Het sap verzamelt zich in het bakje. Het spreekt vanzelf, dat deze heele bewerking moeilijk steriel uitgevoerd kan worden. Dit feit is echter van niet zoo groot belang, als men bedenkt, dat de groote hoeveelheid bacteriën, waarvan men uitgaat, weinig verontreinigd zullen worden door een enkele bacterie, die tijdens het persen in het sap komt. Daarbij komt, dat de enzymen de gisting binnen drie uur moeten bewerken, terwijl die enkele bacteriën, dat niet binnen 24 uur duidelijk te zien geven. Men zou het perssap nog door een kaars kunnen filtreren. Dit is echter niet aan te bevelen, daar de kaars misschien enkele enzymen tegenhoudt. Nadat ik eerst van bovengist het perssap had gemaakt, om de methode van werken te leeren kennen, heb ik ook van de *coli*-bacteriën een perssap gemaakt.

Daarvoor was natuurlijk een reusachtige hoeveelheid bacteriën-materiaal noodig. Uit genomen proeven bleek, dat de *coli*-bacteriën het best op moutagar wilden groeien; hierop vormen ze een dikke laag. Ook in moutextract groeiden ze goed, zoodat ik 20 groote moutagar platen en 10 kolven met moutextract heb ingezet. Deze liet ik vier dagen groeien en verzamelde toen de bacteriën in een mortier. Van de platen werden de bacteriën voorzichtig afgeschraapt, terwijl de kolven werden gecentrifugeerd. Zodoende werd een flinke hoeveelheid bacteriën-materiaal verzameld. Deze werd met zand en infusoriënarde gewreven en vervolgens geperst. Voordat de massa geperst werd, heb ik onder de microscoop gecontroleerd of de bacteriën stuk waren. De meeste bacteriën waren fijn-gewreven en slechts een enkele was intact gebleven. Na het persen werd het sap ook onder de microscoop bekeken; hier was een enkele bacterie in te vinden, doch zooals reeds gezegd, zal deze geen invloed uitoefenen op de enzymen van de groote hoeveelheid, die geperst werd

(enzymen veroorzaken reeds na drie uur gisting). Het heldere perssap werd in een gistkolfje met een geconc. glucose oplossing gebracht en in de stoof bij 33° C. geplaatst; na drie uur was er van gisting geen sprake. Ook een kolfje met glycerine gaf geen gasontwikkeling. Dat er werkelijk bacterieperssap in de vloeistof uit de pers aanwezig was, constateerde ik door in het sap de aanwezigheid van het enzym *katalase* aan te toonen met een druppel H_2O_2 . Er ontstond n.l. een duidelijke opbruising, hoewel niet zoo sterk als met het gistperssap. In verband met het feit, dat ook in deze laatste proef geen gunstig resultaat verkregen is, meen ik te moeten concluderen, *dat de gisting door de coli-typhus-bacteriën geen enzymatisch proces is.*

SAMENVATTING.

1°. Bij de vergisting van verschillende suikers en suikerachtige stoffen door bacteriën der *coli-typhus*groep bleek steeds acetaldehyde als tusschenproduct op te treden.

2°. Een overzicht werd gegeven van de producten, door deze bacteriën uit verschillende stoffen met 2 en 3 C atomen gevormd.

3°. Een uitvoerige bespreking volgde, over de methoden ter quantitatieve bepaling der producten. Vervolgens werd de quantitatieve analyse van de ontledingsproducten van glycol, glycerine en pyrodruivenzuur gegeven.

4°. De resultaten werden besproken in verband met het chemisme der omzettingen.

5°. Ten slotte werd nagegaan of het vergistingsproces door bacteriën een enzymatisch karakter heeft.

STELLINGEN.

I.

De aldehydebepaling volgens RIPPER dient gewijzigd te worden.

RIPPER. Monatshefte d. Chem. 1900, 1079.

II.

De opvatting, dat aminozuren, bij het iso-electrische punt, hoofdzakelijk als „Zwitterionen” optreden, is boven de oude opvattingen te verkiezen.

BJERRUM, Zeitschr. f. physik. Chem. 104.

III.

Acetaldehyde is tusschenproduct bij alle suikerontledingen.

IV.

De meening, dat toevoeging van menagewater een na-deelige invloed zou uitoefenen op de biologische reiniging van afvalwater, is onjuist.

V.

De elementairanalyse volgens HESLINGA is voor vaste stoffen te verkiezen boven de gebruikelijke methode van DUMAS.

REC. 1924, 551.

VI.

De conclusie van JAEGER en GERMS, dat geel en rood loodoxyde in verhouding van enantiotropie tot elkaar staan, vereischt nadere bevestiging.

JAEGER en GERMS, Zeitschr. f. an. Chem. 119,
1921 145.

VII.

BRUN heeft door zijn proeven niet bewezen, dat de vulkanische exhalatie op zich zelf, volkomen watervrij is.

WOLFF, Der Vulkanismus, blz. 86.

VIII.

De eind PH van microbenculturen kan niet geacht worden een eigenschap van deze microörganismen te zijn.

IX.

Toevoegen van arsenigzuur voor het omladen van een chroomhydroxyde sol, volgens SEN en DHAR, is overbodig.

SEN en DHAR, Koll. Zeitschr. 34, I, 1924.

X.

De biochemische eigenschappen der bacteriën zijn van meer belang dan de morphologische.



