



# **Biochemische eigenschappen der coli-typhusbacteriën : de vergisting van eenige organische zuren**

<https://hdl.handle.net/1874/322562>

Apr. 192. 1936.

# Biochemische eigenschappen der coli-typhusbacteriën

De vergifting van eenige organische zuren

J. H. van der Grint

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.











BIOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN DER  
COLI-TYPHUSBACTERIËN  
DE VERGISTING VAN EENIGE ORGANISCHE ZUREN





*Diss. Utrecht 1936*

# BIOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN DER COLI-TYPHUSBACTERIËN

DE VERGISTING VAN EENIGE ORGANISCHE ZUREN

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE  
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT  
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS  
DR. W. E. RINGER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT  
DER GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN  
SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN  
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT  
DER WIS- EN NATUURKUNDE OP MAANDAG  
7 DECEMBER 1936, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR  
DOOR

JACQUES HENRI VAN DER GRIENT

GEBOREN TE LINSCHOTEN



1936

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS, UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.



*Aan mijn Ouders*





*Nu door het verschijnen van dit proefschrift mijn studie aan deze Universiteit een einde heeft genomen, voel ik mij gedrongen U, Hoogleraren, Oud-Hoogleraren en Lectoren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, mijn hartelijke dank uit te spreken voor alles, wat Gij aan mijn wetenschappelijke opleiding hebt bijgedragen.*

*Hooggeleerde DE GRAAFF, Hooggeachte Promotor, mijn dank gaat wel in het bijzonder naar U uit, die mij in de gelegenheid stelde, deze dissertatie zelfstandig te bewerken en mij van de groote paedagogische waarde van een dergelijk onderzoek overtuigde.*

*Ook voor Uw groote belangstelling in mijn werk en voor Uw critiek, die mij niet alleen voor het nemen van overijlde conclusies behoedde, maar die mij ook in moeilijke oogenblikken de te volgen weg duidelijk maakte, zal ik U steeds ten zeerste erkentelijk blijven.*

*Voor wat mijn collega's voor mij deden, zeg ik hun hartelijk dank.*

*Tenslotte dank ik het personeel van het Pharmaceutisch Laboratorium voor de door hen verleende medewerking.*





## HOOFDSTUK I.

### HISTORISCH OVERZICHT.

Reeds in de oudheid heeft de mensch te zijnen behoefte gebruik gemaakt van microbiologische processen. Het is vooral de bereiding van alcoholhoudende dranken geweest, die — hoewel in de aanvang natuurlijk nog geheel onbewust en onbegrepen — hem in aanraking met de micro-organismen bracht. Het duurde geruime tijd, alvorens in de 17de eeuw onze landgenoot *Antonie van Leeuwenhoek* met behulp van zijn eigenhandig geconstrueerde microscoop voor het eerst de bacteriën waarnam. Hoewel al spoedig gevonden werd, dat deze ééncellige „diertjes” ook in gistende en rot-tende zelfstandigheden voorkwamen, en ook, dat door lang voortgezet koken, zelfs bij langdurig bewaren onder goede afsluiting van de lucht, ontleding voorkomen werd, was het toch pas in de 19de eeuw, voordat *Pasteur* er in mocht slagen, zijn meening, dat gisting het uitsluitend gevolg was van de werkzaamheid van micro-organismen te doen zegevieren. Van deze tijd dateert het eigenlijke begin der microbiologische wetenschap. Hoewel betrekkelijk jong, heeft de industrie zich al spoedig meester gemaakt van haar belangrijke uitkomsten. Naast de alcoholindustrie, moge hier als voorbeeld mede de azijnzuurindustrie genoemd worden, waar volgens verschillende methoden de alcohol door azijnbacteriën tot azijnzuur wordt geoxydeerd. Een andere belangrijke gis-

ting, zij het niet door bacterie-, dan wel door schimmelwerking, is de vorming van citroenzuur uit glucose door verschillende soorten van de geslachten *Citromyces* en *Aspergillus* <sup>1)</sup>).

Tijdens de wereldoorlog werd aceton en daarnaast butylalcohol <sup>2)</sup> op groote schaal door vergisting van koolhydraten bereid, terwijl ook de gewone alcoholische gisting door het z.g. sulfietproces volgens *Neuberg* <sup>3)</sup> omgezet werd in een glycerinegisting, d.w.z. een gisting, waarbij glycerine hoofdproduct is.

Ook melkzuur is een product van de microbiologische industrie.

Sorbose is een stof, die door *B. xylinum* uit lijsterbessen <sup>4)</sup> of uit zuivere sorbiet <sup>5)</sup> verkregen wordt.

Dioxyaceton wordt technisch <sup>6)</sup> gemaakt; het is voor preparatieve doeleinden zeer gemakkelijk met behulp der sorbosebacteriën te bereiden <sup>7)</sup>).

Tenslotte moge als voorbeeld van een synthese door levende organismen nog genoemd worden het kojizuur, dat volgens voorschrift van *May* en medewerkers <sup>8)</sup> uit glucose bereid wordt door hierop *Aspergillus flavus* te enten. Hoewel het

<sup>1)</sup> Een samenvatting bij *A. Salmony*: Ch. Ztg. 51, 902 (1927).

*A. Frey*: Ch. Ztg. 55, 40 (1931).

<sup>2)</sup> Literatuuroverzicht bij *H. J. L. Donker*, Bijdrage tot de kennis der boterzuur-, butylalcohol- en acetongistingen, diss. Delft 1926.

<sup>3)</sup> *C. Neuberg* en *E. Reinfurth*: Bio. Z. 89, 365 (1918), 92, 234 (1918). B. 52, 1677 (1919).

<sup>4)</sup> *G. Bertrand*: C. r. 122, 900 (1896); Bull. soc. chim. (3) 15, 627 (1896).

<sup>5)</sup> *C. A. Lobry de Bruyn* en *W. Alberda van Ekenstein*: Rec. 19, 1 (1900).

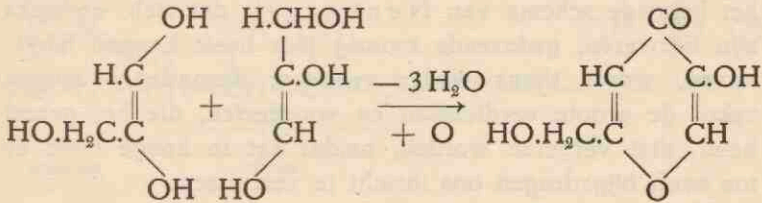
<sup>6)</sup> Patent der I. G. Farben: C. 1928, I, 2456; II, 184; 1930, II, 3461.

<sup>7)</sup> *A. Virtanen* en *B. Bärlund*: Bio. Z. 169, 169 (1926).

*K. Bernhauer* en *K. Schön*: H. S. 177, 107 (1928).

<sup>8)</sup> *O. E. May*, *A. J. Moyer*, *P. A. Wells* en *H. T. Herrick*: J. Am. Chem. Soc. 53, 774 (1931).

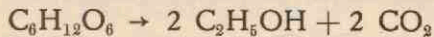
chemisme van deze reactie nog niet opgehelderd is, kan men zich voorstellen <sup>1)</sup>, dat het glucosemolecule daarbij gesplitst wordt in twee triosemoleculen en dat hieruit, door directe synthese, het kojizuur gevormd wordt:



In het voorbijgaan moge hier nog de aandacht worden gevestigd op het verband, dat tusschen gisting en ademhaling schijnt te bestaan. Reeds *Pasteur* doelde hierop, toen hij de gisting als een anaërobe ademhaling voorstelde. *Pfeffer* heeft dit later nog eens onderstreept, toen hij betoogde, dat er tusschen gisting en ademhaling feitelijk geen principieel verschil was. Bij de gisting worden de tusschenproducten opgehoopt, bij de ademhaling worden zij opgeruimd, slechts onder zeer bijzondere omstandigheden niet. Bij de ademhaling zijn dan ook kooldioxyde en water de eenig aantoonbare eindproducten.

Niettegenstaande een minitieuus onderzoek, waaraan vele onderzoekers deelnamen, is toch van zeer vele der genoemde ontleding en het verloop en het wezen der reactie bij lange na niet opgehelderd, maar al te dikwijls heeft men zich tot een chemie op papier moeten beperken.

Van de gewone alcoholische gisting werd door *Lavoisier* in het einde der 18de eeuw gevonden, dat daarbij alcohol en kooldioxyde ontstaan. Vijfentwintig jaar later stelde men daarvoor de volgende formule op:



<sup>1)</sup> F. Challenger, L. Klein en T. K. Walker: J. Chem. Soc. 134, 16 (1931).



In 1897 ontdekte B u c h n e r, dat ook celvrij perssap de gisting tot stand kon brengen.

Vele theorieën zijn er in de loop der tijden over het chemisme opgesteld. Het is onnoodig deze hier te herhalen. Ook het bekende schema van N e u b e r g<sup>1)</sup>, dat zich, ondanks zijn bezwaren, gedurende twintig jaar heeft kunnen handhaven, wordt thans weder verlaten; desondanks mogen zeker de groote verdiensten en voordeelen, die het gehad heeft, niet vergeten worden, omdat het in hooge mate er toe heeft bijgedragen ons inzicht te verruimen.

Willen wij een indruk geven, op welke wijze men zich thans het verloop der gisting voorstelt, dan moet er allereerst op worden gewezen, dat de tegenwoordige inzichten over de alcoholische gisting vooral het gevolg zijn van de grondleggende onderzoekingen van E m b d e n en zijn medewerkers over de glycolyse.

Wij zullen daarom met een zeer korte beschouwing, aan dit proces gewijd, beginnen, te meer, omdat het ook uit een ander oogpunt van belang is, nl. om het feit, dat hierbij melkzuur gevormd wordt, welke stof ook bij vele bacteriële suikervergistingen een groote rol speelt of althans schijnt te spelen.

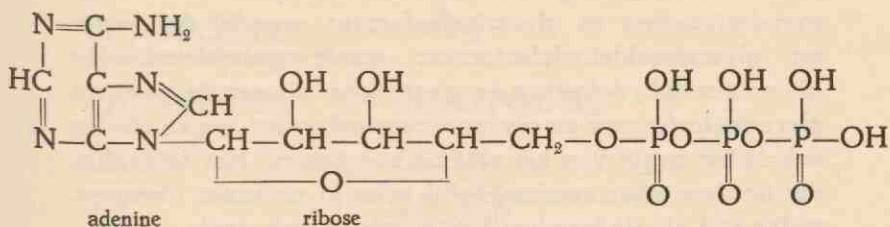
Bij beide processen neemt het fosforzuur een belangrijke plaats in. Reeds H a r d e n en Y o u n g hadden in 1905 bij de celvrije gisting een fructosedifosforzure ester geïsoleerd. E m b d e n slaagde er in uit de spier een hexosemonofosforzure ester te isoleeren, het zoogenaamde lactacidogeen. In beide gevallen neemt dus het fosforzuur aan de totstandkoming van het reactieverloop actief deel.

Volgens L o h m a n n<sup>2)</sup> is de glycolyse van het glycogeen alleen mogelijk, indien adenosine-trifosforzuur aanwezig is.

1) C. Neuberg: Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle, Jena 1913.

2) K. Lohmann: Naturw. 17, 624 (1929).

De structuur van deze verbinding wordt door genoemde onderzoeker als volgt aangenomen: <sup>1)</sup>



Parnas<sup>2)</sup> meent nu, dat de twee fosforzuurresten, die als pyrofosforzuur aanwezig zijn, direct, onder opname van één molecule water op één glycogeen-eenheid (= C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) worden overgedragen, waarbij een fructosedifosforzuur ontstaat.

Het ontstaan van deze verbinding is het begin van de glycolyse, die volgens Embden<sup>3)</sup>, dan als volgt zou verlopen.

Door intramoleculaire omzetting en daarop volgende splitsing ontstaan uit het fructosedifosforzuur één molecule dioxycetonfosforzuur en één molecule glycerinealdehydefosforzuur, die dismutatief met elkaar reageren onder vorming van glycerinefosforzuur en glycerinezuurfosforzuur (fosfoglycerinezuur).

Door Embden en Deuticke<sup>4)</sup> is aangetoond, dat het glycerinezuurfosforzuur in de spier fermentatief ontleed wordt in pyrodruivenzuur en fosforzuur. Voor het mecha-

<sup>1)</sup> K. Lohmann: Bio. Z. 282, 120 (1935).

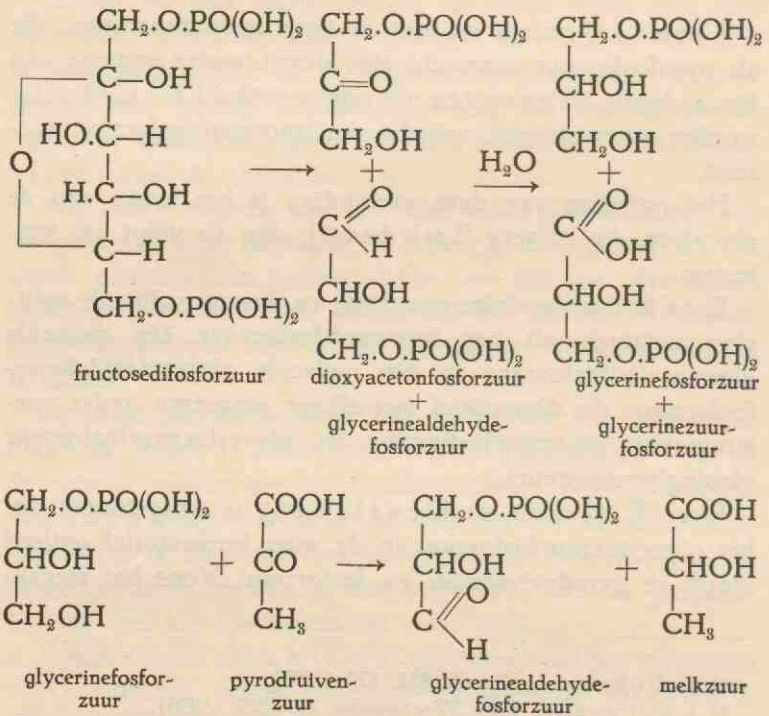
<sup>2)</sup> I. K. Parnas: Klin. Wochenschr. 14, 1017 (1935).

<sup>3)</sup> G. Embden, H. J. Deuticke en G. Kraft: Klin. Wochenschr. 12, 213 (1933).

<sup>4)</sup> G. Embden en H. J. Deuticke: H. S. 230, 29 (1934).

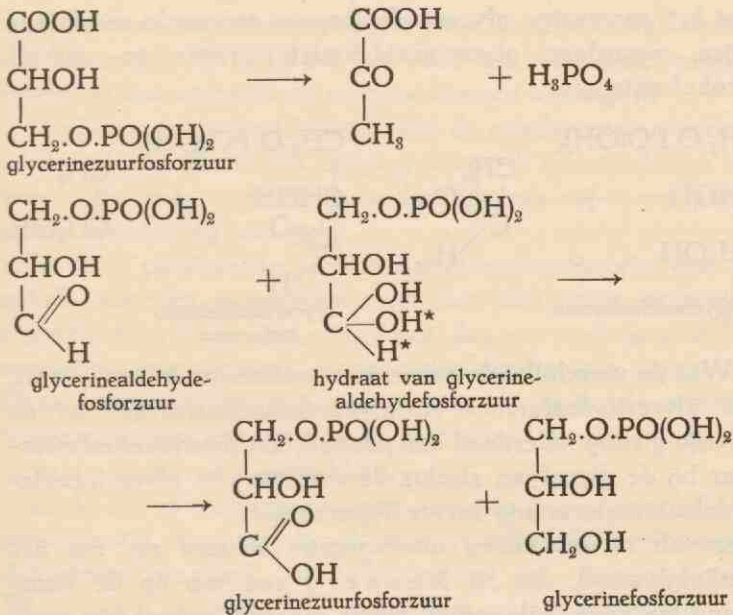
nisme van deze reactie zij naar de desbetreffende literatuur verwezen <sup>1)</sup>).

Melkzuur wordt gevormd door een oxydo-reductie van pyrodruivenzuur en glycerinefosforzuur, waarbij dit laatste tot glycerinealdehydefosforzuur wordt geoxydeerd. Dit glycerinealdehydefosforzuur gaat door dismutatie over in glycerinefosforzuur en glycerinezuurfosforzuur, welke stoffen ook in het begin van het schema voorkomen. Het blijkt dus, dat op deze wijze successievelijk alles in melkzuur overgaat, welke stof als eindproduct kan worden beschouwd:



<sup>1)</sup> K. Lohmann en O. Meyerhof: Bio. Z. 273, 60 (1934).

O. Meyerhof en W. Kiessling: Bio. Z. 276, 239 (1935).



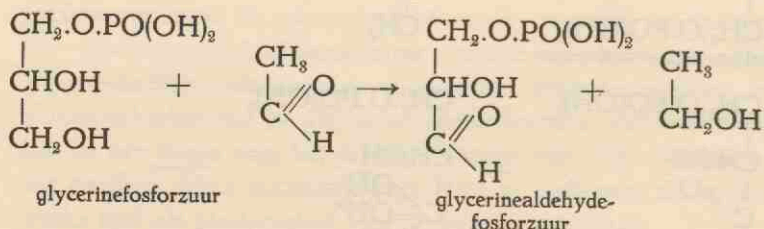
De met \* aangeduide waterstof-atomen gaan naar het andere molecule.

Wat nu de alcoholische gisting betreft, is het begin te zoeken in de zoogenaamde fosforyleering van het hexose-molecule, waarbij eerst een monofosforzure ester, de z.g. Robison-ester, ontstaat (die waarschijnlijk identiek is met het lactacidogeen van E m b d e n) en vervolgens een difosforzure ester, de z.g. Harden-Young-ester<sup>1)</sup>. Deze laatste splitst zich nu op de wijze, als is aangegeven in het schema van E m b d e n, in glycerinefosforzuur en glycerinezuurfosforzuur. Uit dit laatste ontstaat weer pyrodruivenzuur, dat onder de invloed van de carboxylase wordt gesplitst in acetaldehyde en kooldioxyde. Het acetaldehyde reageert

<sup>1)</sup> O. Meyerhof: Bio. Z. 273, 80 (1934).



met het aanwezige glycerinefosforzuur op oxydo-reductieve wijze, waardoor glycerinealdehydefosforzuur en aethylalcohol ontstaan:



Wat de verschillende genoemde tusschenproducten betreft, zijn glycerinefosforzuur en glycerinezuurfosforzuur bij de celvrije gisting inderdaad aangetoond, het dioxyacetonfosforzuur bij de glycolyse; slechts de omzetting in glycerinealdehydefosforzuur is nog zuiver hypothetisch.

Het valt in het boven uiteengezette schema op, dat het methylglyoxaal, dat bij Neuberger een zoo op de voorgrond tredende, belangrijke plaats inneemt, geheel niet meer genoemd wordt.

Dat Neuberger<sup>1)</sup> bij zijn vijfde vergistingsvorm uitsluitend methylglyoxaal vindt, is volgens Meyerhof<sup>2)</sup> te verklaren uit het feit, dat het glycerinealdehydefosforzuur gemakkelijk in methylglyoxaal overgaat. In de genoemde vergistingsvorm werkt Neuberger met, aan co-ferment sterk verarmd, gistextract (plasmolysesap), terwijl de normale dismutatie van het glycerinealdehydefosforzuur slechts in tegenwoordigheid van co-ferment tot stand komt, zoodat door het ontbreken van dit lichaam het glycerinealdehydefosforzuur gelegenheid krijgt zich om te zetten tot methylglyoxaal.

Een punt van groot belang in bovengenoemd schema

<sup>1)</sup> C. Neuberger en M. Kobel: Bio. Z. 203, 463 (1928); 210, 466 (1929); 229, 255 (1930).

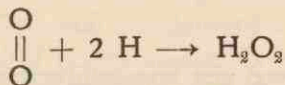
<sup>2)</sup> O. Meyerhof en W. Kiessling: Bio. Z. 267, 313 (1934).

vormen de biologische oxydaties. Hun beteekenis ligt hierin, dat zij, zooals *Wieland* het voor het eerst heeft aange-  
toond, in een zuurstofvrij medium kunnen verloop.

Wel was reeds lang bekend, dat de oxydeerende werking in de cel van fermenten uitging, maar *Wieland* was de eerste, die deze werking nader bestudeerde en er een plausibele voorstelling van gaf.

In 1913 publiceerde hij zijn dehydroëeringstheorie, die, in enkele woorden samengevat, zegt, dat biologische oxydaties eigenlijk dehydroëeringen zijn, d.w.z. dus niet verlopen onder opneming van zuurstof, maar onder afgifte van waterstof. Deze waterstof kan zich daarbij met verschillende stoffen, waterstofacceptoren genaamd, verbinden en zich dus aan directe waarneming onttrekken.

In de cel voltrekt de oxydatie zich echter wel met behulp van zuurstof. Toch speelt ook hier het dehydroëeringsferment, dehydrase genaamd, de belangrijkste rol, want volgens *Wieland* is zuurstof de natuurlijke waterstofacceptor, die zich met de, door de dehydrasen geactiveerde, waterstof verbindt; hierbij ontstaat evenwel geen water, maar waterstofperoxyde:



Inderdaad is in enkele gevallen dan ook waterstofperoxyde gevonden <sup>1)</sup>, maar daar in bijna alle levende cellen katalase voorkomt, zal het nooit tot een ophooping van deze, voor de

<sup>1)</sup> M. Dixon: *Biochem. J.* **19**, 507 (1925).

J. W. McLeod en J. Gordon: *J. path. Bact.* **25**, 139 (1922); **26**, 326, 332 (1923); **28**, 155 (1925); *Biochem. J.* **16**, 499 (1922).

O. T. Avery en H. J. Morgan: *J. exp. med.* **39**, 275, 289 (1924).

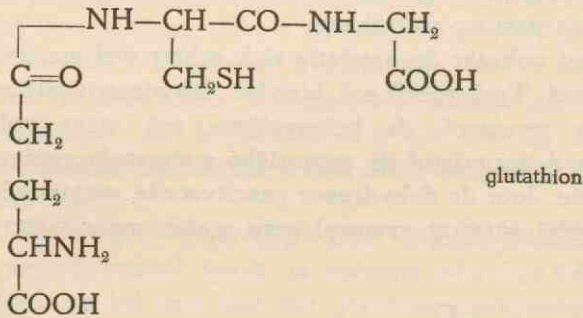
O. T. Avery en J. M. Neill: *J. exp. med.* **39**, 347, 357, 543 (1924).



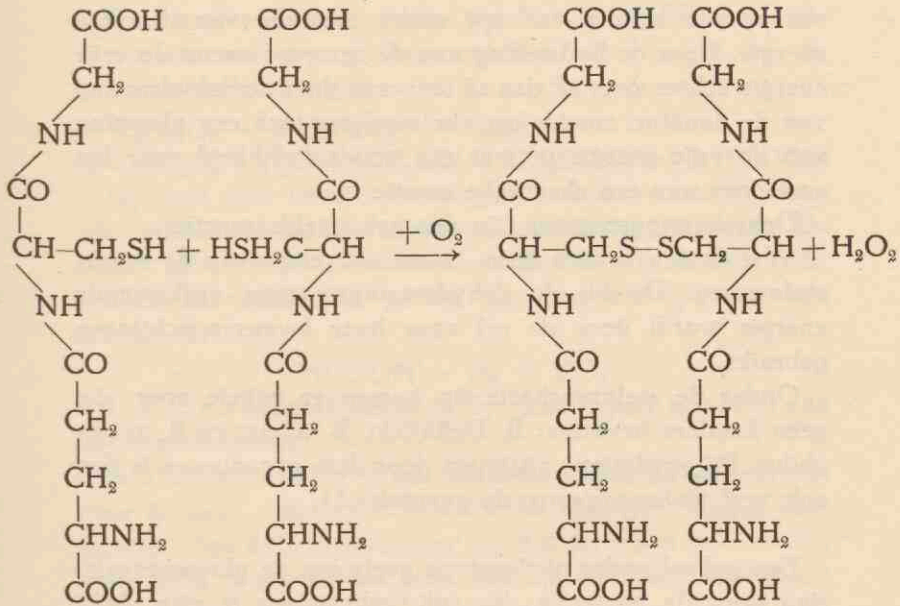
cel giftige, stof komen, zoodat men er doorgaans tevergeefs naar zal zoeken.

Volkomen in overeenstemming met deze voorstelling van zaken is het feit, dat in de cellen van anaërobe organismen geen katalase voorkomt. Dit enzym is ook niet noodzakelijk; immers, waar deze organismen slechts in een zuurstofvrije omgeving kunnen leven, zal er van vorming van waterstofperoxyde geen sprake zijn.

Wat de aard der dehydrasen betreft, hierover zijn wij nog zeer slecht georiënteerd. Het behoeven echter geen stoffen te zijn van een buitengewoon ingewikkelde samenstelling. Wij kunnen ons glutathion als een dehydrase denken:



Deze stof is zoowel een waterstofactivator als een waterstofoverdrager. Zij wordt dan ook in bijna alle levende weefsels en cellen aangetroffen. Aan de lucht treedt echter oxydatie op, waarbij waterstofperoxyde ontstaat, omdat de zuurstof weder als waterstofacceptor dienst doet:



Dit geoxydeerde product kan nu weer door waterstofdonatoren gereduceerd worden. Onder anaërobe omstandigheden zal er, zoodra het bovengenoemde product (aan te duiden als G.S.S.G) totaal gereduceerd is, geen verdere overdracht van waterstof plaats vinden. Is er echter een waterstofacceptor, b.v. methyleenblauw, aanwezig, dan zal dit de waterstof van het gevormde glutathion opnemen, waardoor dit weer in G.S.S.G overgaat en dan weer reduceerbaar is.

Wat het voorkomen van glutathion in bacteriën betreft, het is reeds aangetoond bij *B. alcaligenes*, *B. pyocyaneum*, *B. prodigiosum* en *B. fluorescens* <sup>1)</sup>.

Er moet hier op gewezen worden, dat het vrijmaken van twee waterstofatomen niet op zichzelf plaats vindt, daar dit

<sup>1)</sup> A. B. Callow en M. E. Robinson: *Biochem. J.* 19, 19 (1925).

een reactie is, die verloopt onder toename van de vrije energie. Door de hydreeing van de acceptor neemt de vrije energie echter meer af, dan zij toeneemt door de dehydreeing van de donator, zoodat het eindresultaat toch een afneming van de vrije energie is, wat een noodzakelijkheid voor het verloop van een chemische reactie is.

Dehydreeingsreacties zijn dus gekoppelde reacties.

Wat de dehydrasen doen, is een activeeren van de waterstofatomen. De bij de dehydreeingsreacties vrijkomende energie wordt door de cel voor haar levensverrichtingen gebruikt.

Onder de melkzuurbacteriën komen er enkele voor, die geen katalase bevatten: *B. Delbrücki*, *B. iugurt* en *B. acidophilus*. Bij oxydatieve gistingen door deze organismen is dan ook veel waterstofperoxyde gevonden <sup>1)</sup>.

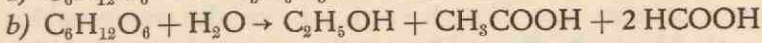
Een geheel ander gistingstype geeft ons de glucosevergisting door de bacteriën der coli-typhusgroep te zien. Men wordt vooral getroffen door het groote aantal stoffen, dat hierbij ontstaat. Naast de normale producten der gewone alcoholische gisting, als aethylalcohol en kooldioxyde, en van die der glycolyse, melkzuur, worden hier bovendien nog aangetroffen: waterstof, mierenzuur, azijnzuur, barnsteenzuur en soms ook acetylmethylcarbinol en 2-3 butyleenglycol; deze twee laatstgenoemde stoffen bij vergisting door *B. lactis aerogenes* en eenige typen van *B. pneumoniae* <sup>2)</sup>.

Over het verloop van deze gisting, de z.g. gemengd-zure gisting, zijn in de literatuur zeer verschillende meeningen geuit. Wij zullen hiervan slechts enkele noemen, zonder daarbij de bedoeling te hebben het vóór en het tegen hiervan aan een critische bespreking te onderwerpen.

<sup>1)</sup> A. Bertho en H. Glück: *Naturw.* 19, 88 (1931); *Ann.* 494, 159 (1932).

<sup>2)</sup> W. C. de Graaff: *Ant. v. Leeuwenhoek* 3, 18 (1936).

De eerste onderzoeker, die zich een voorstelling poogde te vormen van deze gisting, was *Harden*<sup>1)</sup>, die de volgende formuleering gaf:



Hij stelt zich twee verschillende reacties voor, waarvan ééne uitsluitend tot de vorming van melkzuur zou leiden. De beide gasvormige producten, waterstof en kooldioxyde, zouden het uitsluitend gevolg zijn van een splitsing van mierenzuur:

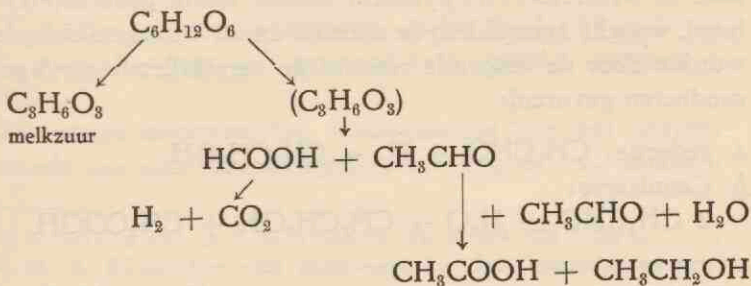


*Harden* schenkt hierbij in het geheel geen aandacht aan het barnsteenzuur.

In 1914 gaf *Grey*<sup>2)</sup> een schema, waarin hij wel spreekt over dit zuur, maar er in zijn schema toch geen plaats voor inruimt. Ook deze onderzoeker ziet het proces in twee deelen voltrokken, waarvan het ééne zich tot melkzuur stabiliseert en het andere, via een metastabiël tusschenproduct, tot mierenzuur en acetaldehyde leidt.

In het mierenzuur zoekt *Grey* eveneens de oorzakelijke bron van waterstof en kooldioxyde.

Het acetaldehyde gaat door een Cannizarro-reactie over in aethylalcohol en azijnzuur:

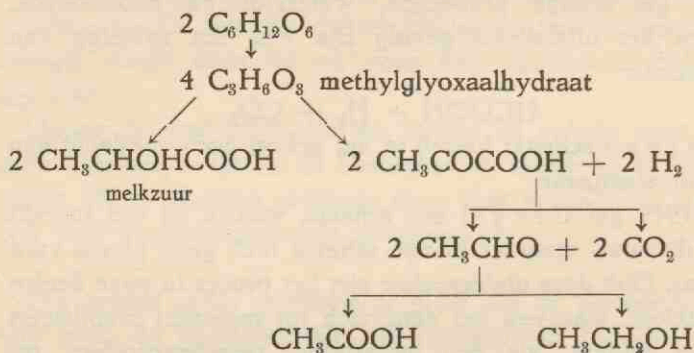


1) *A. Harden*: J. Chem. Soc. 79, 610 (1901).

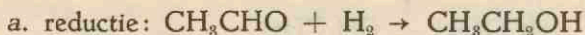
2) *E. C. Grey*: Proc. Roy. Soc. B. 87, 472 (1914).



Aan Ne u b e r g en G o r r <sup>1)</sup> is het gelukt methylglyoxaal met behulp van *B. coli* om te zetten in melkzuur. Op grond hiervan stellen zij een schema voor de gemengd-zure gisting op, dat aanvankelijk verloopt als de alcoholische gisting (volgens schema van Ne u b e r g), nl. tot de trap van het methylglyoxaalhydraat. Dit stabiliseert zich dan gedeeltelijk tot melkzuur en gedeeltelijk tot pyrodruivenzuur:



Ook De Graaff <sup>2)</sup> ziet het gistingsproces bestaande uit twee van elkaar onafhankelijke reacties. Het glucosemolecule wordt in tweeën gesplitst. Het ééne deel stabiliseert zich tot melkzuur, het andere deel gaat over in pyrodruivenzuur en waterstof. Het pyrodruivenzuur wordt gedecarboxyleerd, waarbij acetaldehyde ontstaat en uit dit acetaldehyde worden door de volgende reacties de verschillende gistingsproducten gevormd:



b. Cannizarro:



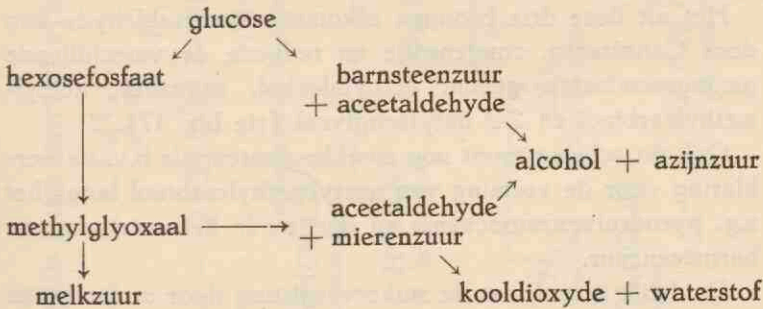
<sup>1)</sup> C. Ne u b e r g en G. G o r r : *Bio. Z.* 162, 490 (1925).

<sup>2)</sup> W. C. de Graaff : *Ned. Tijdschr. voor Hyg., Microbiol. en Serol.* 1, 43 (1926).

- c. hydroxydatie:  $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2$   
 d. condensatie:  $2 \text{CH}_3\text{CHO} \rightarrow \text{CH}_3\text{CHOHCOCH}_3$   
 e. condensatie en hydroxydatie:  
 $2 \text{CH}_3\text{CHO} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{COOHCH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 3 \text{H}_2$   
 f. reductie van (d):  
 $\text{CH}_3\text{CHOHCOCH}_3 + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3$

Virtanen<sup>1)</sup> denkt zich de zaak weer anders. Aan de ééne kant ontstaat, via een hexosefosfaat, methylglyoxaal en aan de andere kant geeft een directe splitsing van het glucosemolecule aanleiding tot het ontstaan van barnsteenzuur en aceetaldehyde.

Het schema ziet er als volgt uit:



Tenslotte nog de voorstelling, welke Scheffer<sup>2)</sup> en Kluver<sup>3)</sup> van de gemengd-zure gisting ontworpen hebben.

Zij nemen allereerst een fosforyleering van het hexosemolecule aan met daaropvolgende splitsing in 2 C<sub>3</sub>-stukken,

1) A. Virtanen en P. E. Simola: H. S. 163, 284 (1927).

2) M. A. Scheffer: De suikervergisting door bacteriën der coligroep, Diss. Delft, 1928.

3) A. J. Kluver: The chemical activities of microorganisms, Univ. London Press, 1931.



glycerinealdehyde, die door intramoleculaire reactie overgaan in methylglyoxaalhydraat. Deze laatste stof ondergaat nu een drietal ontledingen:

- a. omzetting tot melkzuur;
- b. ontleding in mierenzuur en aceetaldehyde;
- c. ontleding in pyrodruivenzuur en waterstof en decarboxylatie van het pyrodruivenzuur, waarbij aceetaldehyde ontstaat.

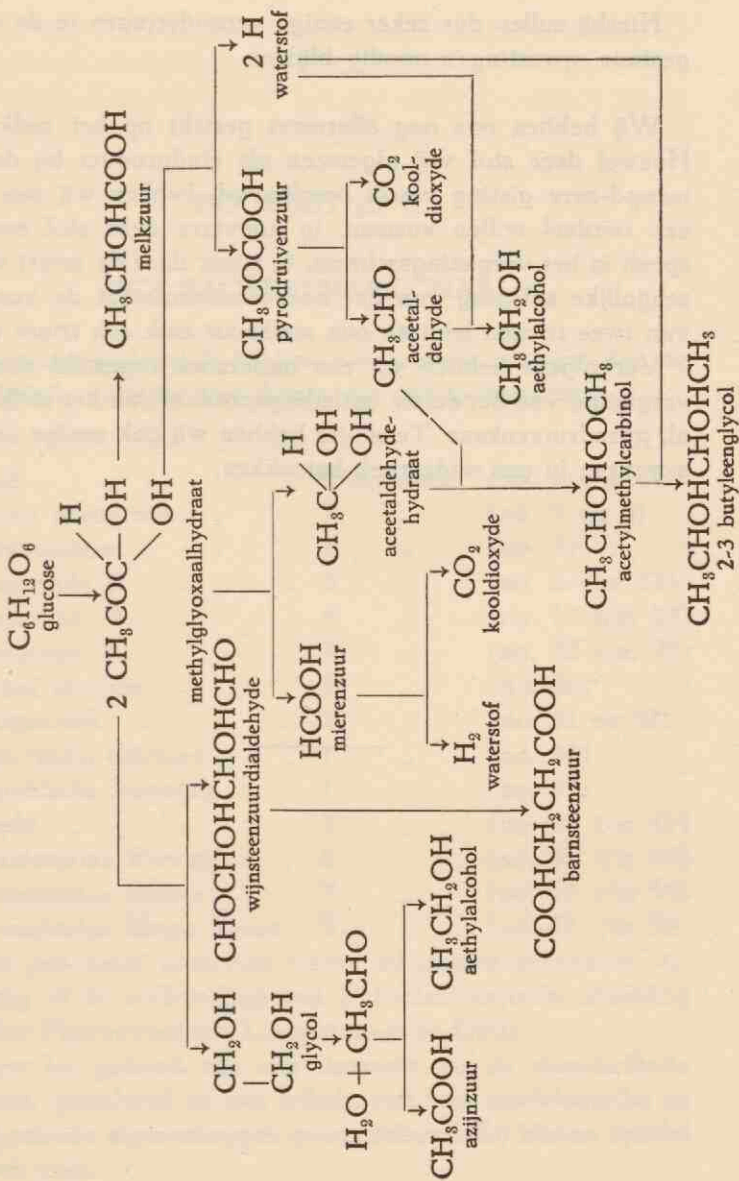
Voor het ontstaan van barnsteenzuur nemen zij een andere splitsing van het hexosemolecule aan, nl. in een  $C_4$ -stuk en een  $C_2$ -stuk, resp. wijnsteenzuurdialdehyde en glycol. Uit het eerste moet nu door een intramoleculaire omzetting barnsteenzuur, uit het glycol aceetaldehyde ontstaan.

Het uit deze drie bronnen afkomstige aceetaldehyde kan door Cannizarro, condensatie en reductie de verschillende gistingsproducten geven: aethylalcohol, azijnzuur, acetylmethylcarbinol en 2-3 butyleenglycol (zie blz. 17).

Ook dit schema toont nog zwakke punten, als b.v. de verklaring voor de vorming van acetylmethylcarbinol langs het z.g. pyrodruivenzuurschema en dan mede het ontstaan van barnsteenzuur.

Duidelijk is wel, dat de suikervergisting door de bacteriën der coli-typhusgroep een ingewikkeld proces is. Om hiervan een bevredigende verklaring te geven, zal het hoogst wenschelijk zijn eerst de verbindingen met een geringer aantal koolstofatomen op hun ontleedbaarheid te onderzoeken, om, met de gegevens hierdoor verkregen, te trachten met meer zekerheid conclusies te kunnen trekken aangaande het eigenlijke wezen der gemengd-zure gisting. Het belang hiervan springt des te meer in het oog, als men bedenkt, dat bij de vergisting van pentosen dezelfde producten ontstaan, die bij de glucosevergisting gevonden zijn.

SCHEMA VAN DE GEMENGD-ZURE GISTING VOLGENS KLUYVER EN SCHEFFER.



Hierbij zullen dus zeker eenige veranderingen in de voorgestane opvattingen noodig blijken.

Wij hebben ons oog allereerst gericht op het melkzuur. Hoewel deze stof vrij algemeen als eindproduct bij de gemengd-zure gisting wordt beschouwd, hebben wij ons toch een oordeel willen vormen, in hoeverre deze stof een rol speelt in het vergistingsschema, te meer, daar de meest waarschijnlijke splitsing van het hexosemolecule tot de vorming van twee triosen leidt en ook melkzuur zulk een triose is.

Vervolgens hebben wij een onderzoek ingesteld naar de vergisting van het eerste ontledingsproduct van het melkzuur, nl. pyrodruivenzuur. Tenslotte hebben wij ook eenige andere oxyzuren in ons onderzoek betrokken.

## HOOFDSTUK II.

### HET BACTERIEMATERIAAL.

Voor ons onderzoek hebben wij gebruik gemaakt van de navolgende vertegenwoordigers der coli-typhusgroep:

B. coli . . . . .	4 stammen	(no. 1 t/m 4)
B. lactis aerogenes . . . . .	2 „	(no. 5 en 6)
B. pneumoniae . . . . .	1 „	(no. 7)
B. paratyphi A . . . . .	6 „	(no. 8 t/m 13)
B. paratyphi B . . . . .	8 „	(no. 14 t/m 22)
B. paratyphi C . . . . .	7 „	(no. 23 t/m 29)
B. typhi murium . . . . .	1 „	(no. 30)
B. psittacosis . . . . .	2 „	(no. 31 en 32)
B. enteritidis Gärtner . . . . .	1 „	(no. 33)
B. enteritidis Aertrijck . . . . .	1 „	(no. 34)
B. typhi . . . . .	7 „	(no. 35 t/m 41)
B. dysenteriae Flexner . . . . .	8 „	(no. 42 t/m 49)
B. dysenteriae Sonne . . . . .	7 „	(no. 50 t/m 56)
B. dysenteriae Shiga Kruse . . . . .	3 „	(no. 57 t/m 59)

Alle genoemde bacteriën waren laboratoriumstammen, afkomstig uit de verzameling van de bacteriologische afdeling van het Pharmaceutisch Laboratorium te Utrecht.

Voor het gebruik zijn alle stammen via de plaatmethode opnieuw geïsoleerd en met behulp van hun morfologische en biochemische eigenschappen gecontroleerd. Zij bleken daarbij rein en juist.

Daar tot de eigenlijke coligroep (als *B. coli* beschreven) verschillende organismen met uiteenlopende eigenschappen worden ondergebracht, geven wij de resultaten van het onderzoek van deze stammen hier weer.

TABEL I.  
BIOCHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN EENIGE  
B. COLISTAMMEN.

Substraat	Bacteriestam			
	B. coli no. 1	no. 2	no. 3	no. 4
Glucose . . . .	+—	++	+—	++
Fructose . . . .	+—	++	+—	++
Galactose . . . .	+—	++	++	++
Mannose . . . .	+—	++	+—	++
Saccharose . . . .	—	—	—	—
Maltose . . . .	+—	++	++	++
Lactose . . . .	+—	++	+—	++
Raffinose . . . .	—	—	++	—
Rhamnose . . . .	+—	++	++	++
Arabinose . . . .	+—	++	++	++
Xylose . . . .	+—	++	++	++
Glycerine . . . .	+—	++	—	++
Dulciet . . . .	+—	—	—	++
Sorbiet . . . .	+—	++	—	++
Manniet . . . .	+—	++	++	++
Adoniet . . . .	—	—	—	—
Erythriet . . . .	—	—	—	—
Citraat . . . .	—	—	—	—
Indol uit pepton	+	+	—	+
Melk . . . . .	+	+	+	+
Gelatine . . . .	—	—	—	—

++ = zuur en gas.

+— = zuur.

*B. coli* no. 1 blijkt dus een niet-gasvormende colibacterie te zijn.

*B. coli* no. 2 behoort bij het *B. acidi lactici* type.

*B. coli* no. 3 reageert zeer onregelmatig.

*B. coli* no. 4 is als *B. coli commune* aan te duiden.



Morfologie: Polymorphe, asporogene, fac. anaërobe, zwak bewegelijke, Gram-negatieve staafjes.

B. pneumoniae vertoonde een negatieve reactie van Voges en Proskauer en was positief op citraat. Dit organisme behoort dus tot de z.g. Friedländergroep<sup>1)</sup>.

---

1) W. C. de Graaff: Ant. v. Leeuwenhoek 3, 18 (1936).



### HOOFDSTUK III.

#### LITERATUUROVERZICHT OVER DE AANTASTING VAN MELKZUUR EN MELKZURE ZOUTEN DOOR MICRO-ORGANISMEN.

De eerste onderzoekingen over de bacteriële ontleding van lactaten zijn afkomstig van Louis Pasteur<sup>1)</sup>, die met een boterzuurferment, een anaëroob organisme, werkte. Gekweekt op een oplossing van ammoniumlactaat, waaraan fosfaat was toegevoegd, bleek het organisme het lactaat in waterstof, kooldioxyde en boterzuur te ontleden.

Later heeft Fitz zich intensief beziggehouden met de vergisting van melkzuur.

Met een uit koefaeces geïsoleerde micrococcus<sup>2)</sup> verkrijgt hij uit melkzuur: n-boterzuur met sporen capronzuur, azijnzuur en barnsteenzuur.

Een bepaalde streptobacil<sup>3)</sup> doet propionzuur ontstaan met sporen boterzuur en azijnzuur.

Met een derde, niet nader omschreven organisme<sup>4)</sup>, vergist hij lactaat tot propionzuur met sporen boterzuur en alcohol.

Nog weer een andere bacterie<sup>5)</sup> geeft eveneens propionzuur met daarnaast sporen azijnzuur, barnsteenzuur en alcohol.

---

1) Jahresber. ü. d. Fortschr. d. Chem. 1862, 477.

2) A. Fitz: B. 11, 46 (1878).

3) A. Fitz: B. 11, 1891 (1878).

4) A. Fitz: B. 12, 479 (1879).

5) A. Fitz: B. 13, 1309 (1880).

Ook constateert hij het optreden van valerianaanzuur met sporen alcohol en kooldioxyde.

Met het boterzuurferment van Pasteur vindt Fitz: waterstof, kooldioxyde, aethylalcohol, butylalcohol, propionzuur, boterzuur (voornaamste product) en valerianaanzuur.

Tenslotte vindt Fitz<sup>1)</sup> een organisme, dat naast boterzuur ook propionzuur en sporen kooldioxyde, azijnzuur, barnsteenzuur en een niet geïdentificeerde alcohol produceert.

Lewkowitsch<sup>2)</sup> ontdekt, dat *Penicillium glaucum* op ammoniumlactaat gekweekt, alleen het linksdraaiende zout aantast.

Baginsky<sup>3)</sup> vindt, dat bij de vergisting van lactaat door *B. lactis aerogenes* boterzuur en sporen aethylalcohol ontstaan.

Kerry en Fraenkel<sup>4)</sup> stellen vast, dat *Bac. oedematis maligni* de volgende vergistingsproducten geeft: propylalcohol, mierenzuur en boterzuur.

Linossier<sup>5)</sup> beweert, in tegenstelling met Lewkowitsch, dat *Penicillium glaucum*, op lactaat gekweekt, het rechtsdraaiende zout aantast.

Frankland en MacGregor<sup>6)</sup> vergisten met een niet nader omschreven organisme; hierbij ontstaan voornamelijk boterzuur en sporen lagere vetzuren, waarbij hoofdzakelijk het rechtsdraaiende zout vergist wordt. Bij langdurige vergisting wordt echter ook het linksdraaiende isomeer ontleed. Zij vinden geen vergisting door *Bac. aethaceticus* en *Bac. aethaceto-succinicus*.

<sup>1)</sup> A. Fitz: B. 17, 1188 (1884).

<sup>2)</sup> J. Lewkowitsch: B. 16, 2720 (1883).

<sup>3)</sup> A. Baginsky: H. S. 12, 434 (1888).

<sup>4)</sup> R. Kerry en S. Fraenkel: Monatsh. 12, 350 (1891).

<sup>5)</sup> G. Linossier: Bull. soc. chim. (3) 6, 10 (1891).

<sup>6)</sup> P. Frankland en J. MacGregor: J. Chem. Soc. 63, 1328 (1893).

Schattenfroh<sup>1)</sup> krijgt met de *Bac. oedematis maligni* geen vergisting. Wel kan hij lactaten vergisten met *Bac. anthrax*. Uit calciumlactaat ontstaat dan gas, boterzuur en propionzuur.

Volgens Harden<sup>2)</sup> werkt *B. coli* op lactaat practisch niet in.

Ulpiani en Condelli<sup>3)</sup> enten choleravibrionen op een oplossing van natriumlactaat en zien, dat na verloop van tijd het rechtsdraaiende zout achterblijft.

Volgens Banning<sup>4)</sup> geven sommige azijnbacteriën, op melkzuur gekweekt, oxaalzuur.

Mazé<sup>5)</sup> heeft gevonden, dat melkzuur door een *Eurotyopsis*soort wordt geassimileerd. Er ontstonden daarbij kool-dioxyde en alcohol met daarnaast ook nog acetaldehyd.

Wehmer<sup>6)</sup> kweekt *Oidium lactis* en *Mycoderma aceti* op 1.2 % vrij melkzuur. Het zuur wordt geneutraliseerd en er ontstaat zelfs een alkalische reactie. Het proces is streng aëroob.

McKenzie en Harden<sup>7)</sup> vergisten lactaat met *Bac. subtilis*. Volgens hen blijft daarbij het linksdraaiende zuur achter.

*Aspergillus niger* en *Aspergillus griseus*, op ammoniumlactaat gekweekt, tasten daarentegen juist het linksdraaiende zuur aan. Ook een *Penicillium* en enkele *Saccharomyces*-soorten, waaronder *Saccharomyces cerevisiae*, op kalium-

1) A. Schattenfroh en R. Grassberger: Arch. Hyg. 48, 1 (1903); C. 1903, II, 843.

2) A. Harden: J. Chem. Soc. 79, 610 (1901).

3) C. Ulpiani en C. Condelli: Gazz. chim. Ital. 30, I, 376 (1900).

4) F. Banning: C. Bakt. 2e Abt. 8, 395, 520, 560 (1902).

5) P. Mazé: C. r. 134, 240 (1902).

6) C. Wehmer: Ber. Dtsch. bot. Ges. 21, 67 (1903); C. 1903, I, 1891.

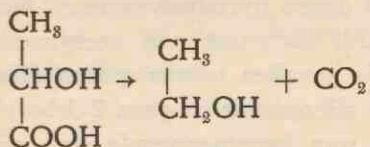
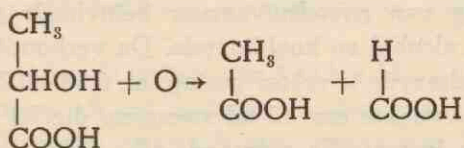
7) A. McKenzie en A. Harden: J. Chem. Soc. 83, 427 (1903).

lactaat gekweekt, breken het linksdraaiende isomeer het eerst af. In deze gevallen wordt, zij het veel langzamer, ook het rechtsdraaiende zuur aangetast.

Volgens Buchner en Meisenheimer<sup>1)</sup> ontstaan bij de inwerking van *Bac. butylicus* op melkzuur hoofdzakelijk boterzuur met daarnaast acetaldehyde en mierenzuur.

Herzog en Ripke<sup>2)</sup> entten *Mycoderma aceti* en *Oidium lactis* op een oplossing, die bestond uit 0.6—0.7 % ammoniumlactaat, 3—4 % glycerine en anorganische zouten; tevens was vrij melkzuur toegevoegd. Na zes weken was 68—94 % van het vrije zuur verdwenen. Ook nadat de schimmels door aceton en aether gedood waren en daarna geënt werden op een oplossing van vrij melkzuur in water, waaraan eenig toluol was toegevoegd, had nog decarboxylatie van het melkzuur plaats. De toevoeging van natriumlactaat werkte hier ongunstig.

Mazé<sup>3)</sup> vindt bij de vergisting van lactaat door de *Bac. aethaceto-succinicus* van Frankland alcohol, mierenzuur en azijnzuur:



1) E. Buchner en J. Meisenheimer: B. 41, 1410 (1908).

2) R. O. Herzog en O. Ripke: H. S. 73, 284 (1911).

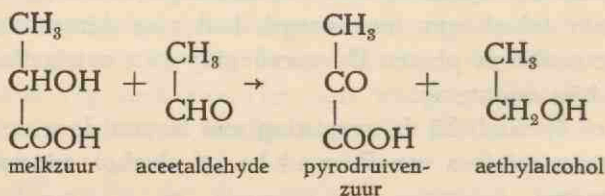
3) P. Mazé: C. r. 156, 1101 (1913).



Bij de oxydatie neemt hij pyrodruivenzuur aan als tusschenproduct. Hij kan dit zuur echter niet isoleeren. Bij vergisting met *Mycoderma aceti* ontstaat als hoofdproduct acetylmethylcarbinol.

Volgens Oppenheimer<sup>1)</sup> wordt melkzuur zelf niet door gistsap aangetast. Het wordt echter wel aangegrepen, indien aan de oplossing zouten van pyrodruivenzuur worden toegevoegd.

Palladin en Ssabinin<sup>2)</sup> verklaren dit als volgt: pyrodruivenzuur wordt door de carboxylase ontleed in acetaldehyde en kooldioxyde. Het acetaldehyde zal nu met het melkzuur reageeren volgens een oxydoreductie:



Toevoeging van pyrodruivenzuur beïnvloedt gunstig de vorming van alcohol en kooldioxyde. De verhouding aethylalcohol : kooldioxyde is echter gering, nl. 0.18—0.27.

Mazé<sup>3)</sup> kweekte een 12-tal stammen, die hij niet nader beschrijft, op lactaat. Er ontstond, afhankelijk van de gebruikte stam, na 4-32 dagen pyrodruivenzuur. Door sommige bacteriestammen wordt hiernaast nog acetylmethylcarbinol gevormd en in enkele gevallen tevens sporen diacetyl.

Mazé vindt geen mierenzuur en geen 2-3 butyleenglycol. Door het ontbreken van laatstgenoemde stof veronderstelt hij, dat het diacetyl niet is ontstaan door oxydatie van acetyl-

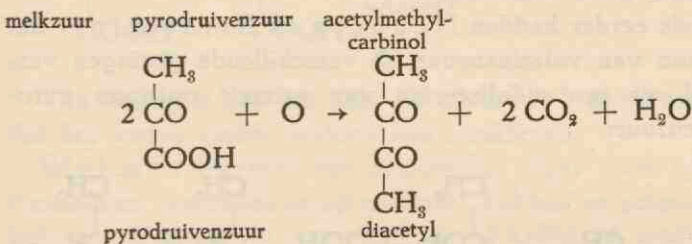
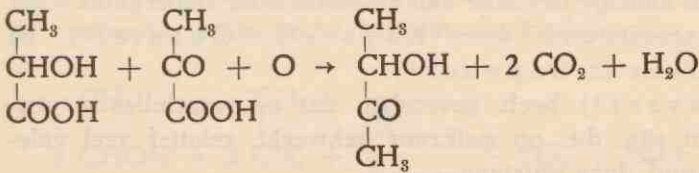
<sup>1)</sup> M. Oppenheimer: H. S. 93, 235 (1914).

<sup>2)</sup> W. Palladin en D. Ssabinin: Biochem. J. 10, 183 (1916).

<sup>3)</sup> P. Mazé: C. r. Soc. de biol. 81, 1150 (1918).



methylcarbinol. Om het ontstaan van diacetyl te verklaren, neemt M a z é dan de volgende reacties aan:



Ook het pyrodruivenzuur wordt weer verder ontleed. Er ontstaat azijnzuur in wisselende hoeveelheden, van sporen tot 50 % toe.

Dezelfde onderzoeker <sup>1)</sup> had reeds vroeger lactaten met behulp van een bepaalde Mucorsoort tot pyrodruivenzuur geoxydeerd.

Met verschillende gistsoorten konden M a z é en R u o t <sup>2)</sup> zowel lactaten als vrij melkzuur oxydeeren tot pyrodruivenzuur. De oxydatie geschiedt met behulp van luchtzuurstof. De opbrengst is  $\pm 50\%$ .

K e r b <sup>3)</sup> wijst er op, dat cultuurgisten niet in staat zijn het melkzuur te oxydeeren.

F e r n b a c h en S c h o e n <sup>4)</sup> ontdekken verschillende

<sup>1)</sup> P. Mazé en M. Ruot: C. r. Soc. de biol. 79, 706 (1916).

<sup>2)</sup> P. Mazé en M. Ruot: C. r. Soc. de biol. 80, 336 (1917).

<sup>3)</sup> J. Kerb: B. 52, 1795 (1919).

J. Kerb en K. Zeckendorf: Bio. Z. 122, 307 (1921).

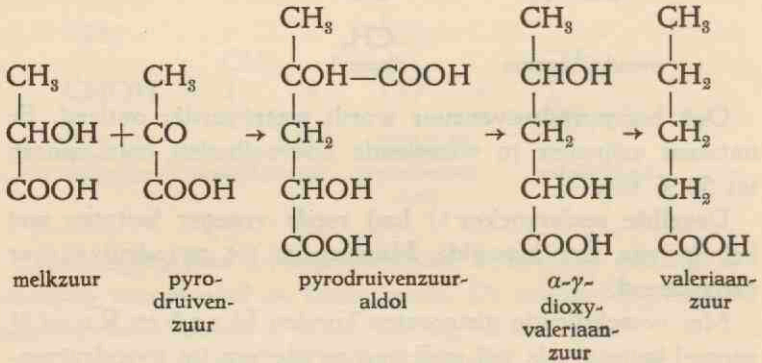
<sup>4)</sup> A. Fernbach en M. Schoen: C. r. 157, 1478 (1913); 158, 1719 (1914); 170, 764 (1920).

gisten, die de oxydatie van lactaten tot pyrodruivenzuur tot stand brengen.

Een analoge oxydatie van melkzuur door *Aspergillus niger* is geconstateerd door Kayser<sup>1)</sup>, Quastel<sup>2)</sup> en Walker en Coppock<sup>3)</sup>.

Kayser<sup>4)</sup> heeft gevonden, dat er verschillende gist-rassen zijn, die, op melkzuur gekweekt, relatief veel valeriaanzuur doen ontstaan.

Reeds eerder hadden Neuberg en Arinstein<sup>5)</sup> het ontstaan van valeriaanzuur bij verschillende gistingen verklaard uit een aldoliseering van primair ontstaan pyrodruivenzuur:



De voor de reductie benodigde waterstof zou dan geleverd worden door het melkzuur zelf, dat in dit geval in pyrodruivenzuur overgaat. Ook de vorming van boterzuur,

1) E. Kayser: Bull. Soc. chim. biol. 6, 234 (1924).

2) J. H. Quastel, M. Stephenson en M. D. Whetham: Biochem. J. 19, 304 (1925).

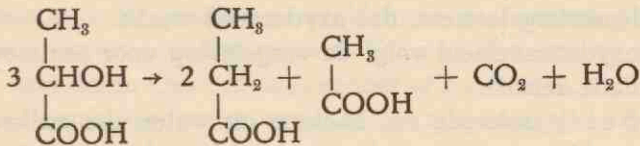
3) T. K. Walker en P. D. Coppock: J. Chem. Soc. 132, 803 (1928).

4) E. Kayser: C. r. 176, 1662 (1923); 179, 295 (1924).

5) C. Neuberg en B. Arinstein: Bio. Z. 117, 269 (1921).

propionzuur en butylalcohol trachten Ne u b e r g en A r i n s t e i n uit een dergelijk pyrodruivenzuuraldol te verklaren.

M a u r e r <sup>1)</sup> liet melkzuur vergisten door *B. propionicum*. Er ontstonden propionzuur, azijnzuur en kooldioxyde:



Van belang is ook het door W e h m e r <sup>2)</sup> gevonden feit, dat het kation groote invloed kan uitoefenen.

W e h m e r kweekte een *Aspergillus niger* stam op calciumlactaat eenerzijds en op natrium-, kalium- en ammoniumlactaat anderzijds. In het eerste geval kreeg hij uitsluitend calciumcarbonaat afgescheiden; in het tweede geval ontstonden respectievelijk natrium-, kalium- en ammoniumoxalaat.

Volgens W e h m e r is het niet zeker, dat bij het calciumzout ook eerst calciumoxalaat is gevormd; in het geval, dat wel calciumoxalaat zou ontstaan, zou dit dan toch oogenblikkelijk ontleed moeten worden.

Eenzelfde gedrag ten opzichte van de verschillende kationen stelde T h i e s <sup>3)</sup> vast voor een *Aspergillus fumaricus*.

B e r r o n en H a s t i n g s <sup>4)</sup> hebben een suspensie van gonococcen, die eenige tijd in de ijskast (3° C) had gestaan, op melkzuur geënt. Na drie kwartier is het melkzuur voor

<sup>1)</sup> K. Maurer: *Bio. Z.* **191**, 83 (1927).

<sup>2)</sup> C. Wehmer: *Bio. Z.* **197**, 427 (1928).  
*B.* **62**, 2672 (1929).

<sup>3)</sup> W. Thies: *B.* **64**, 214 (1931).

<sup>4)</sup> E. S. G. Berron en A. B. Hastings: *J. Biol. Chem.* **100**, 155 (1933).

97 % tot pyrodruivenzuur geoxydeerd, maar de bacteriën hebben de eigenschap verloren om dit zuur verder af te breken.

Volgens deze auteurs zouden er twee enzymen in het spel zijn, nl. een dehydrase, die het melkzuur instabiel maakt en een ademhalingsferment, dat oxydeerend werkt.

De oxydatiesnelheid volgt de vergelijking voor een monomoleculaire reactie.

Aubel<sup>1)</sup> isoleerde een bacterie uit water, die melkzuur aantast en hieruit azijnzuur en acetaldehyde vormt.

Neuberg en Tir<sup>2)</sup> laten levende gist en gistpreparaten inwerken op melkzuur. Er heeft gasontwikkeling plaats, welk gas uit kooldioxyde blijkt te bestaan.

Nagai<sup>3)</sup> vergist melkzuur als natrium- en calciumlactaat met behulp van de sulfietmethode van Neuberg, door aan de cultuurvloeistof 2 % natriumsulfiet toe te voegen.

Met *B. lactis aerogenes* krijgt hij uit 2 g calciumlactaat maximaal 48 mg acetaldehyde.

Ook Walker en Coppock<sup>4)</sup> passen de sulfietmethode toe. Bij vergisting met *Aspergillus niger* vinden zij geen acetaldehyde. Toch wordt dit als tusschenproduct aangenomen, daar zij na 4 weken sporen aethylalcohol vinden.

Er zijn in de literatuur nog een groot aantal onderzoekingen vermeld, waarin melkzuur door verschillende bacteriën geoxydeerd wordt en wel, bij aanwezigheid van methyleenblauw of andere waterstofacceptoren. Wij noemen hiervan de volgende:

---

1) E. Aubel: C. r. 176, 332 (1923).

2) C. Neuberg en L. Tir: Bio. Z. 32, 323 (1911).

3) K. Nagai: Bio. Z. 141, 266 (1923).

4) T. K. Walker en P. D. Coppock: J. Chem. Soc. 132, 803 (1928).



Palladin en Lowtschinowskaja<sup>1)</sup> brengen gist samen met melkzuur en methyleenblauw. Er ontstaat pyrodruivenzuur, dat zelf weer gedecarboxyleerd wordt.

Harden en Norris<sup>2)</sup> vinden, dat melkzuur door gedroogde gist snel geoxydeerd wordt, als methyleenblauw aanwezig is. Er ontstaat aceetaldehyde, dat volgens hen afkomstig is uit pyrodruivenzuur. Dit zuur konden zij echter niet aantoonen. Ook ontstaan sporen aethylalcohol. Een groot gedeelte van het lactaat wordt echter niet teruggevonden.

Volgens Palladin en Ssabinin<sup>3)</sup> gaat de vergisting van melkzuur met behulp van methyleenblauw sneller dan met behulp van pyrodruivenzuur (pag. 26). In dit geval wordt ook een weinig aceetaldehyde gevonden, maar meer aethylalcohol.

In het eerste geval is de vorming van aethylalcohol niet mogelijk door de aanwezigheid van groote hoeveelheden waterstofacceptor, i.c. methyleenblauw.

Cook en Stephenson<sup>4)</sup> oxydeeren melkzuur m.b.v. *B. coli*. Per molecule lactaat worden  $\pm 4$  atomen zuurstof opgenomen. Zij wijzen tevens op het merkwaardige feit, dat bij een oxydoreductie aceetaldehyde nooit geoxydeerd wordt.

Cook, Haldane en Mopson<sup>5)</sup> doodden *B. coli* met toluol. Het blijkt, dat deze gedooide bacteriën nog in staat zijn melkzuur tot pyrodruivenzuur te oxydeeren. Dit laatste zuur blijft echter onaangetast. De reactie gaat ook anaëroob, indien van methyleenblauw wordt gebruik gemaakt. Zij

1) W. Palladin en E. Lowtschinowskaja: *Bio. Z.* **65**, 129 (1914).

2) A. Harden en R. V. Norris: *Biochem. J.* **9**, 330 (1915).

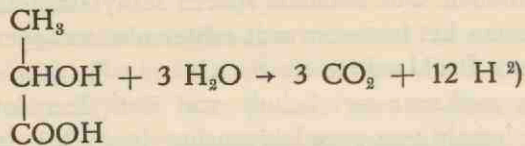
3) W. Palladin en D. Ssabinin: *Biochem. J.* **10**, 183 (1916).

4) R. P. Cook en M. Stephenson: *Biochem. J.* **22**, 1368 (1928).

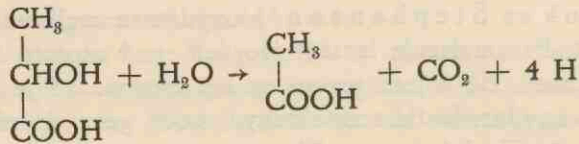
5) R. P. Cook, J. B. S. Haldane en L. W. Mopson: *Naturw.* **18**, 848 (1930); *Biochem. J.* **25**, 534 (1931).

nemen de werking aan van een melkzuurdehydrogenase en een ademhalingsferment.

B a a r s <sup>1)</sup> heeft aangetoond, dat een sulfaatreducerende bacterie, *Vibrio rubentschickii*, melkzuur onder strikt anaërobe omstandigheden, als waterstofdonator kan gebruiken, waarbij dit zuur volkomen in kooldioxyde en waterstof gesplitst wordt:



Voor een stam van *Vibrio desulfuricans* vond B a a r s, dat de splitsing minder ver ging. Het gefermenteerde lactaat werd teruggevonden als 60.5 % azijnzuur en 33.9 % kooldioxyde.



Stickland <sup>3)</sup> gebruikt als waterstofacceptor natriumnitrat. *B. coli* oxydeert melkzuur dan zowel aëroob als anaëroob tot pyrodruivenzuur, waarbij het nitrat tot nitriet wordt gereduceerd.

Ook Braun en Wördehoff <sup>4)</sup> hebben lactaten tot

<sup>1)</sup> J. K. Baars: Over sulfaatreductie door bacteriën, Diss. Delft, 1930.

<sup>2)</sup> A. J. Kluyver: The chemical activities of microorganisms, Univ. London Press, 1931.

<sup>3)</sup> L. H. Stickland: Biochem. J. 25, 1543, (1931).

<sup>4)</sup> H. Braun en P. H. Wördehoff: C. Bakt. 1e Abt. 128, 50 (1933).

pyrodruivenzuur geoxydeerd met behulp van methyleenblauw, fumaarzuur en kaliumnitraat als waterstofacceptor. Zij gebruikten stammen van *B. coli* en *B. dysenteriae* Flexner.

Voor het verlopen van een dergelijke oxydo-reductie geven zij de volgende voorwaarden:

- a. beide stoffen moeten geactiveerd kunnen worden; de ééne als donator, de andere als acceptor;
- b. de voor de groei noodige energie moet bij het oxydo-reductieproces vrij komen;
- c. het resultaat moet zijn: een stof, die voor de celopbouw kan dienen.

Aaron<sup>1)</sup> heeft voor de paratyphus B organismen nagegaan, welke stoffen als waterstofacceptor kunnen dienen bij de anaërobe dehydrering van lactaat. Volgens genoemde auteur komen hiervoor in aanmerking: methyleenblauw, nitraat, fumaraat, malaat, asparaginaat en asparagine.

Resumeeren wij nu, wat het resultaat is van de vergisting van lactaten door bacteriën van de coli-typhusgroep, dan krijgen wij het volgende:

- B. coli* (zonder en met waterstofacceptor) → pyrodruivenzuur;
- B. lactis aerogenes* → boterzuur en aethylalcohol;
- B. paratyphi* B (met waterstofacceptor) → pyrodruivenzuur;
- B. dysenteriae* Flexner (met waterstofacceptor) → pyrodruivenzuur.

---

1) K. Aaron: Bio. Z. 268, 121 (1934).

## HOOFDSTUK IV.

### DE VERGISTING VAN MELKZUUR.

#### *Eigen onderzoek.*

Voor vergistingsproeven is het melkzuur als zoodanig niet geschikt. Evenals alle oxyzuren heeft het een sterk bactericide werking. Deze giftige werking is, volgens T e k e l e n b u r g <sup>1)</sup>, het gevolg, zoowel van de waterstofionen, als van de ongedissocieerde zuurmoleculen. De invloed van de anionen is hiernaast verwaarloosbaar klein. Bovendien hebben de verschillende, ongunstig werkende invloeden nog een versterkende werking op elkaar.

In zoutvorm daarentegen kunnen de zuren dienen als koolstofbron voor de bacteriën. Daarnaast is echter ook nog een stikstofbron noodig. Hiervoor ziet men meestal pepton- of gistwater gekozen. Het bezwaar hiervan is, dat deze stoffen een niet geheel bekende samenstelling hebben, terwijl ook de samenstelling van verschillende monsters, zelfs afkomstig uit dezelfde bron, niet steeds gelijk is.

Voor een analyse der vergistingsvloeistoffen is het natuurlijk ten zeerste gewenscht, dat beschikt kan worden over een scherp gedefinieerd medium.

De Graaff<sup>2)</sup> heeft er destijds, met het oog hierop,

---

<sup>1)</sup> F. Tekelenburg: De afsterving van micro-organismen onder den invloed van temperatuur, waterstofionen en ongedissocieerde zuren, Diss. Utrecht, 1926.

<sup>2)</sup> W. C. de Graaff: De biochemische eigenschappen der paratyphus bacillen, Leiden, 1918.



reeds op gewezen, dat de paratyphusbacteriën ook met secundair ammoniumfosfaat als stikstofbron kunnen toekomen.

Braun en Cahn-Bronner<sup>1)</sup> hebben voor de verschillende groepen der coli-typhusorganismen nagegaan, welke organische zuren kunnen dienen als koolstofbron, wanneer als stikstofbron uitsluitend het ammoniumzout van die zuren aanwezig is. Zij kwamen tot het resultaat, dat in aërobe omstandigheden *B. coli* en *B. paratyphi B*, in een milieu, waarin alleen ammoniumlactaat als koolstof- en stikstofbron aanwezig is, een flinke groei te zien gaven, terwijl *B. paratyphi A*, *B. typhi* en *B. dysenteriae* Shiga Kruse te verdeelen waren in ammoniak wel- en ammoniak niet-assimileerende stammen.

Hierdoor aangelokt hebben wij een voedingsbodem bereid, bestaande uit 2% ammoniumlactaat. Deze oplossing werd gesteriliseerd door haar gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op 110° C in de autoclaaf te verhitten. Voor wij de oplossing gebruikten hebben wij haar, evenals alle volgende oplossingen, gecontroleerd door haar 2 × 24 uur bij 35° C te plaatsen en door overenting op steriele bouillon. Hierna werd de oplossing geënt met een, met steriel water afgeslibde, 24 uur oude agarcultuur van *B. coli* no. 4. Deze stam had reeds eerder getoond op verschillende suikers en meerwaardige alcoholen door een sterke groei uit te munten.

Na 14 dagen zetten wij de vergisting stop en begonnen met de analyse der cultuurvloeistof. In die tijd hadden de bacteriën zich sterk vermeerderd, daar de vloeistof geheel troebel was geworden.

Wij zullen achtereenvolgens bespreken:

#### I. De gang der analyse:

---

<sup>1)</sup> H. Braun en C. E. Cahn-Bronner: Bio. Z. 131, 226, 272 (1922). Klin. Wochenschr. 1, 1824 (1922).

- II. onderzoek op de verschillende vergistingsproducten;
- III. resultaat van het onderzoek.

#### I. Gang der kwalitatieve analyse.

In het algemeen kunnen wij de vergistingsproducten in een vijftal groepen verdeelen. Dit zijn de volgende:

- a. *gasvormige producten*. Bij de coli-typhusgroep zijn tot dusverre als gaspen alleen kooldioxyde en waterstof aangetroffen.
- b. *vluchtige, neutrale en basische producten*. Hieronder worden gerangschikt aldehyden, alcoholen en ketonen en verder de basische producten als ammoniak, aminen en indol, die kunnen voorkomen in het geval, dat pepton als stikstofbron wordt gebruikt.
- c. *vluchtige zuren*. Dit zijn de lagere vetzuren.
- d. *niet-vluchtige zuren*.
- e. *niet-vluchtige, neutrale en basische verbindingen*. In deze groep treffen wij verbindingen aan als koolhydraten, glycerine, 2-3 butyleenglycol.

Van de uitgiste vloeistof worden 100—200 cm<sup>3</sup> aan een destillatie onderworpen. Is de vloeistof alkalisch, dan is het raadzaam, deze eerst met verdund zwavelzuur tot zwak zure reactie op congopapier aan te zuren. Het doel is uitsluitend het zeer hinderlijke schuimen van dergelijke vloeistoffen te voorkomen of althans zeer te beperken.

De vloeistof werd gedestilleerd uit een Kjeldahlkolf van 300 cm<sup>3</sup>, die door een spathelm met een koeler verbonden was.

In de eerste cm<sup>3</sup>, die overgingen, reageerden wij op *aceetaldehyde*, waarna wij verder  $\pm \frac{2}{3}$  gedeelte van de oplossing afdestilleerden. Het destillaat, na zwak alkalisch te zijn gemaakt met 10 % natriumhydroxyde, werd opnieuw aan een destillatie onderworpen. Ook hier gingen wij door tot  $\frac{2}{3}$  gedeelte was overgegaan en wij herhaalden deze bewerking met het destillaat, totdat een voldoende concentratie van de

vluchtige vergistingsproducten verkregen was. Het laatste destillaat onderzochten wij op *aethylalcohol*.

De zure rest van de eerste destillatie en de alkalische rest van de tweede destillatie werden bij elkaar gevoegd en met 4 N zwavelzuur aangezuurd tot juist zuur op congopapier. Wij brachten deze vloeistof in een Kjeldahlkolf van 500 cm<sup>3</sup> en destilleerden hieruit met stoom de *vluchtige zuren* af. De kolf was, om overspatten te voorkomen, weer van een spat-helm voorzien. Het destillaat werd gecondenseerd met behulp van een spiraalkoeler, daarna van een bolkoeler. De destillatie van mierenzuur levert geen moeilijkheden op. De andere vetzuren daarentegen wel, daar het veel tijd kost hen geheel over te stoomen. Hieraan kan echter tegemoet worden gekomen <sup>1)</sup> door de warme vloeistof met magnesiumsulfaat te verzadigen en vervolgens een zoo krachtig mogelijke stoomstraal door te leiden. Hierbij moet er voor gezorgd worden, dat het volume daarbij niet toeneemt.

Het destillaat vingen wij in gedeelten van 200 cm<sup>3</sup> op. Meestal was, nadat 1½ liter overgedestilleerd was, alle zuur uit de te onderzoeken vloeistof verwijderd. Het destillaat neutraliseerden wij met 10 % natriumhydroxyde en dampten de vloeistof tot een kleine rest in.

Een gedeelte van de ingedampte, geneutraliseerde oplossing werd gebruikt voor het onderzoek op *mierenzuur*. De rest dampten wij tot droog en onderzochten deze op de aanwezigheid van andere vluchtige zuren, o.a. *azijnzuur*.

De vloeistof, die in de destillatiekolf is achtergebleven, dient vervolgens voor het onderzoek naar de *niet-vluchtige zuren*. Om deze zuren hieruit te isoleeren, neutraliseert men de inhoud van de destillatiekolf met een 10 % natriumhydroxyde-oplossing en dampt vervolgens op een waterbad in. Als een

---

<sup>1)</sup> W. H. Olmsted, W. M. Whitaker en C. W. Duden: J. biol. Chem. 85, 109 (1929/30).



dikke stroop is overgebleven, zuurt men met verdund zwavelzuur weer aan tot de reactie juist zuur op congopapier is en maakt het geheel met uitgegloeid natriumsulfaat vast. Na 24 uur in de exsiccator gestaan te hebben, wordt de massa in een mortier fijngewreven en opnieuw 24 uur in de exsiccator gezet. Dit droge poeder wordt vervolgens in een Soxhlet-apparaat gedurende 12 uur met droge aether geëxtraheerd. In de aether lossen de niet-vluchtige zuren op. De aether wordt op een waterbad door destillatie verwijderd en de niet-vluchtige zuren blijven achter. In het geval, dat pepton gebruikt is, zijn de niet-vluchtige zuren sterk verontreinigd door ontledingsproducten van het pepton. Hebben wij met een vaste massa te doen, dan kan een gedeelte gebruikt worden om door sublimeren *barnsteen* zuur te verkrijgen. Is dit echter niet het geval, dan worden de niet-vluchtige zuren opgelost in 96 % alcohol en de oplossing gefiltreerd. Daarna kookt men, voegt eenige druppels phenolphtaleïne toe en vervolgens een gefiltreerde, verzadigde oplossing van bariumhydroxyde, tot de vloeistof juist even rood gekleurd is. Hierbij moet er op gelet worden, dat de alcoholconcentratie niet beneden 70 % komt. Er slaat bariumsuccinaat neer. Is de alcoholconcentratie beneden 70 %, dan slaat ook bariumlactaat neer.

Het barnsteen zuur kan uit het succinaat vrijgemaakt worden door het bariumzout in zoutzuur op te lossen en de oplossing daarna droog te dampen. Door sublimeren krijgt men tenslotte het barnsteen zuur vrij.

In het filtraat blijft *melk* zuur achter.

## II. Onderzoek op de verschillende gistingproducten.

### A. Gasvormige producten.

Voor het onderzoek hiernaar kweekt men in gistkolfjes. Het gas, dat ontstaat, verzamelt zich voor een groot gedeelte



boven de vloeistof in het gesloten been. Is er kooldioxyde aanwezig, dan vindt men dit, door in de vloeistof een stukje vast kaliumhydroxyde op te lossen. De hoeveelheid kooldioxyde in het boven de vloeistof staande gas wordt aangegeven door de vermindering van het gasvolume. De rest van het gas is waterstof, wat blijkt uit het feit, dat het met lucht een explosief mengsel geeft. Echter, ook koolwaterstoffen doen dit. Daarom brachten wij het gas over in een eudiometerbuis en voegden een overmaat zuurstof toe. <sup>1)</sup> Uit het verschil der gasvolumina voor en na de explosie kan dan de aard van het gistingsgas vastgesteld worden. Was er een koolwaterstof voorhanden, dan kan het ontstane kooldioxyde na de explosie met kaliumhydroxyde aangetoond worden.

## B. Vluchtige, neutrale verbindingen.

Als voorproef op de aanwezigheid van aldehyden en ketonen, voegt men een oplossing van 2-4 dinitrophenylhydrazine toe (2 g 2-4 dinitrophenylhydrazine, 40 cm<sup>3</sup> 25 % zoutzuur en 80 cm<sup>3</sup> water. <sup>2)</sup>

### *Acetaldehyde.*

Hierop reageert men, indien de hoeveelheid dinitrophenylhydrazon te klein is om een smeltpunt te kunnen bepalen, met de reactie van Rimini <sup>3)</sup>. Hiertoe wordt de te onderzoeken vloeistof gevoegd bij een mengsel van oplossingen van nitroprussidnatrium en een secundair amine; voor dit laatste namen wij piperidine. De samenstelling van het meng-

---

<sup>1)</sup> Uit blanco proeven met zuivere waterstof bleek, dat de verontreiniging van de toegevoegde zuurstof  $\pm 0.7\%$  bedroeg.

<sup>2)</sup> C. Neuberger: Bio. Z. 256, 475 (1932).

<sup>3)</sup> E. Rimini: C. 1898, II, 277.

sel is 1 deel 4 % nitroprussidnatrium- en 2 deelen 3 % piperidineoplossing.

Smeltpunt acetaldehydedinitrophenylhydrazon 167° C.

#### *Aethylalcohol.*

Hierop wordt gereageerd met de jodoformproef van Lieben<sup>1)</sup>: 5 cm<sup>3</sup> worden verwarmd 40—50° C en hieraan toegevoegd 6 druppels 10 % kaliumhydroxydeoplossing; daarna voegt men joodjoodkaliumoplossing toe tot de vloeistof zich bruin kleurt, ontkleurt met kaliumhydroxyde en koelt af. Bij aanwezigheid van aethylalcohol ontstaan zeshoekige kristallen van jodoform.

Was de aanwezigheid van acetaldehyde vastgesteld, dan moest dit eerst verwijderd worden, waartoe wij de vloeistof in een kolfje, voorzien van een opstijgende koeler, gedurende één uur met een 2-4 dinitrophenylhydrazineoplossing op het waterbad verwarmden. Na afloop werd de alcohol afgedestilleerd en in het destillaat de jodoformreactie uitgevoerd.

#### *Diacetyl en acetylmethylcarbinol.*

1. met de reactie van Voges en Proskauer.

De bacteriën worden gedurende vijf dagen gekweekt in een peptonhoudende voedingsoplossing. Na deze tijd wordt eenzelfde volume 10 % kaliumhydroxydeoplossing toegevoegd. Bij aanwezigheid van één of beide bovengenoemde verbindingen, ontstaat een roode eosine-achtige verkleuring.

De reactie berust op een oxydatie van het acetylmethylcarbinol — die in deze alkalische omgeving zich reeds aan de lucht voltrekt — tot diacetyl. Dit diacetyl geeft met bepaalde bestanddeelen van de pepton (kreatine en kreatinine) de roode verkleuring.

---

<sup>1)</sup> H. Meyer: Nachweis und Bestimmung organischer Verbindungen, Berlin, 1933.

2. met de reactie van L e m o i g n e<sup>1)</sup>).

25 cm<sup>3</sup> van de cultuurvloeistof worden met azijnzuur zwak aangezuurd. Het acetylmethylcarbinol wordt geoxydeerd tot diacetyl door 10 cm<sup>3</sup> 20 % ferrichlorideoplossing toe te voegen en vervolgens 10 cm<sup>3</sup> af te destilleeren. In het destillaat reageert men op het diacetyl als volgt: De vloeistof wordt met sodaoplossing geneutraliseerd op lakmoes. Daarna voegt men toe: 15 druppels 20 % zoutzuurhydroxylamineoplossing en 20 druppels 20 % natriumacetaatoplossing. Men verhit tot koken en voegt 5 druppels 10 % nikkelchlorideoplossing toe, kookt nog eenige minuten door en koelt af. Bij aanwezigheid van diacetyl ontstaat een rood neerslag van nikkeldimethylglyoxim.

#### *Indol.*

Van de basische producten is alleen het indol van belang. Hierop reageerden wij bij het onderzoek op de zuiverheid van de verschillende stammen, die wij in hoofdstuk II noemden.

Gereageerd werd met het reagens van Ehrlich, bestaande uit een oplossing van p-dimethylamidobenzaldehyde in zoutzure alcohol (1 deel p-dimethylamidobenzaldehyde, 21 deelen geconcentreerd zoutzuur en 100 deelen 96 % alcohol) en een verzadigde kaliumpersulfaatoplossing. Bij 1 deel cultuurvloeistof 0.5 deel p-dimethylamidobenzaldehydeoplossing en 0.5 deel kaliumpersulfaatoplossing.

Na enkele minuten ontstaat een roodkleuring. De kleurstof is met amyloalcohol uit te schudden.

#### **C. Vluchtige zuren.**

##### *Mierenzuur.*

Het onderzoek hiernaar wordt bemoeilijkt door het feit, dat er voor de verschillende zuren weinig specifieke reacties be-

<sup>1)</sup> A. J. Kluyver, H. J. L. Donker en F. Visser 't Hooft: Bio. Z. 161, 361 (1925).



staan. Het mierenzuur maakt hierop een gunstige uitzondering. Men kan hiervoor gebruik maken van de sterk reduceerende eigenschappen van dit zuur. Aan de neutrale oplossing der zuren wordt een sublimaatoplossing toegevoegd en het geheel op een waterbad verwarmd. Bij aanwezigheid van mierenzuur scheidt zich na eenige tijd calomel af, dat bij toevoegen van ammonia zwart wordt. Ook een zilvernitraatoplossing wordt gereduceerd onder afscheiding van zilver. Van de ingedampte rest, bevattende de natriumzouten der verschillende vluchtige zuren, werd met behulp van het p-phenyl  $\omega$ -broomacetophenon<sup>1)</sup> de overeenkomstige ester gemaakt:

15 mg van de natriumzouten worden met 60 mg p-phenyl  $\omega$ -broomacetophenon en 0.9 cm<sup>3</sup> 96 % alcohol gedurende 1 uur op het waterbad verwarmd. Na afkoelen kristalliseeren de esters uit, die uit 70 % alcohol omgekristalliseerd worden. Zoo noodig kan met kool ontkleurd worden. Door gefractioneerde kristallisatie worden de esters gescheiden.

Smeltpunt mierenzure ester :	76° C
„ azijnzure ester :	111° C
„ propionzure ester :	102° C
„ boterzure ester :	97° C.

Naast alle smeltpunten, die bepaald zijn, hebben wij ook de mengsmeltpunten van de verkregen stof en de ester van het zuivere overeenkomstige zuur vastgesteld.

#### *Aziijnzuur.*

Hierop hebben wij ook nog microchemisch gereageerd met natriumuranylformiaat<sup>2)</sup>. Er ontstaan fraaie, karakteristieke, tetraëdrische kristallen.

<sup>1)</sup> N. L. Drake en J. Bronitsky: J. Am. Chem. Soc. 52, 3715 (1930).

<sup>2)</sup> In een uitvoering van D. Krüger en E. Tschirch: Mik. 7, 320 (1928).



#### D. Niet-vluchtige zuren.

Hiervoor komen alleen melkzuur en barnsteenzuur in aanmerking.

##### *Melkzuur.*

Hierop wordt gereageerd met het reagens van D é n i g è s <sup>1)</sup> : 0.2 cm<sup>3</sup> oplossing worden met 2 cm<sup>3</sup> geconcentreerd zwavelzuur gedurende twee minuten in het waterbad verhit. Alle  $\alpha$ -oxyzuren, op deze wijze behandeld, splitsen mierenzuur af.

Na afkoelen wordt het tevens ontstane acetaldehyde aangetoond door toevoegen van 2 druppels guajacoloplossing. De vloeistof kleurt zich donkerrood.

Ook kan gebruik gemaakt worden van de reactie van R i m i n i door een, in een nitroprussidnatrium- en piperidineoplossing gedrenkt, papiertje in de damp boven de vloeistof te houden.

##### *Barnsteenzuur.*

In het sublimaat kan met loodacetaat microchemisch op barnsteenzuur gereageerd worden. Er ontstaan ruitvormige kristallen, die bij het zuivere zuur zeer karakteristiek zijn, maar bij aanwezigheid van verontreinigingen vrij sterk gedeformeerd kunnen zijn.

Verder hebben wij ook hier de p-phenylphenacylester gemaakt. Voor de tweebasische zuren is het noodig de verhitting met alcohol gedurende 2 uur voort te zetten.

Smeltpunt barnsteenzure ester 208° C.

Voor het aantoonen van barnsteenzuur ziet men wel eens de pyrrolreactie gebruiken. Ten aanzien van deze reactie moge opgemerkt worden, dat de uitkomst hiermede verkree-

---

<sup>1)</sup> E. Gorter en W. C. de Graaff: Klinische Diagnostiek, 3e druk, 1923, p. 252.

gen niet altijd betrouwbaar is, daar ook andere stoffen, waarvan wij hier alleen het melkzuur<sup>1)</sup> noemen, deze reactie geven. Door de gevoeligheid van deze reactie is een spoor melkzuur reeds voldoende om een foutieve conclusie te trekken.

### E. Niet-vluchtige neutrale producten.

#### 2—3 *Butyleenglycol*.

Hierop wordt gereageerd in de met ferrichloride geoxydeerde cultuurvloeistof<sup>2)</sup>, waaruit door destillatie het diacetyl verwijderd is. Men voegt 2 cm<sup>3</sup> broom en 3 g natriumacetaat toe en verhit gedurende 20 minuten, in een kolf met opstijgende koeler, op het waterbad. Na afkoelen wordt de overmaat broom met natriumthiosulfaat weggenomen en het ontstane diacetyl afgedestilleerd. Hierop wordt gereageerd op de wijze, die reeds vroeger beschreven is (pag. 41).

Tenslotte moeten wij nog de reactie beschrijven op een zuur, dat bij de gevolgde methode niet geïsoleerd wordt, daar het tengevolge van de hoge temperaturen ontleed is. Wij bedoelen het:

#### *Pyrodruivenzuur*.

Hierop kan direct in de cultuurvloeistof gereageerd worden. Het meest geschikt is hiervoor de reactie van Simon<sup>3)</sup>:

Aan 1 deel der cultuurvloeistof wordt toegevoegd 1 deel verzadigde ammoniumsulfaatoplossing en 0.5 deel 4 % nitroprussidnatriumoplossing. Na doorschudden voegt men 1 deel

<sup>1)</sup> A. J. Virtanen en Fontell: Ann. Scient. Fenn. A 26, no. 10 (1926).

<sup>2)</sup> H. R. Braak: Onderzoekingen over de vergisting van glycerine, Diss. Delft, 1928.

<sup>3)</sup> L. J. Simon: C. r. 125, 534 (1897).

20 % ammonia toe. De vloeistof kleurt zich na eenige tijd donkerblauw.

Zoals later beschreven zal worden, kan in een samengesteld milieu als een gistingsvloeistof, deze kleur sterk variëeren.

Meer zekerheid verkrijgt men dan ook door het pyrodruivenzuur neer te slaan als dinitrophenylhydrazon. Om dit zuiver in handen te krijgen is het wenschelijk, eerst het pepton en de bacterieëiwitten uit de cultuurvloeistof te verwijderen. Hiervoor is zeer geschikt het neerslaan van de genoemde producten met fosforwolfraamzuur <sup>1)</sup>:

Aan 5 deelen der cultuurvloeistof worden toegevoegd 2 deelen fosforwolfraamzuur (5 g fosforwolfraamzuur opgelost in 100 cm<sup>3</sup> 3 % zwavelzuur). Na 24 uur wordt afgefiltreerd en met water uitgewasschen. Daarna de 2-4 dinitrophenylhydrazineoplossing toegevoegd (2 g 2-4 dinitrophenylhydrazine in 120 cm<sup>3</sup> 2 N zoutzuur). Na 24 uur afgefiltreerd, uitgewasschen met verdund zoutzuur en daarna met water. Het neerslag wordt opgelost in 1 N sodaoplossing en, na filtreren, met zoutzuur opnieuw neergeslagen. Het gefiltreerde en uitgewasschen neerslag wordt bij 100°—110° C gedroogd.

Smeltpunt pyrodruivenzuurdinitrophenylhydrazon 213° C.

### III. Resultaat van het onderzoek.

Zoals boven reeds is medegedeeld, was de cultuur aangeslagen op een voedingsbodem, waarin uitsluitend ammoniumlactaat voorkwam. Van de hiervoor genoemde vergistingsproducten werd alleen een spoortje vluchtig zuur gevonden. Er was geen gas gevormd, terwijl de  $P_H$  nagenoeg onveranderd was. De  $P_H$  van de oplossing, waarvan wij waren uitgegaan, was 7.2. Van een verder onderzoek in deze richting werd daarom afgezien.

<sup>1)</sup> F. B. Seibert: J. Biol. Chem. 70, 265 (1926).



Vervolgens bereidden wij een voedingsbodem, die de volgende samenstelling had:

- 2 % ammoniumlactaat
- 0.5 % secundair ammoniumfosfaat
- 1 % pepton „Witte”
- 0.5 % natriumchloride.

Wij stelden de  $P_H$  hiervan vast op 7.2.

Over de samenstelling van deze oplossing het volgende: Om niet afhankelijk te zijn van een wisselende samenstelling van de pepton, werd hiervan een groote voorraad aangelegd. Door goed mengen in een mortier was deze hoeveelheid zoo homogeen mogelijk gemaakt. Wij bewaarden het preparaat in een flesch voorzien van een stop, gevuld met ongebluschte kalk.

Wij hadden de beschikking over een preparaat zuiver melkzuur van K a h l b a u m. Door neutralisatie in de warmte met ammonia kregen wij een ammoniumlactaatoplossing.

Wat betreft de toevoeging van fosfaat diene het volgende: Bij de vergisting van glucose was ons gebleken, dat, bij toevoeging van verschillende hoeveelheden secundair ammoniumfosfaat, een toevoeging van 0.5 % hiervan de groei het meest stimuleerde.

Ook de toevoeging van keukenzout schijnt in het algemeen de groei te bevorderen. Wat hiervan de oorzaak is, staat niet vast. Wij kunnen zoowel denken aan een verhooging van de osmotische druk als aan een specifieke werking van het natriumchloride.

Alvorens met de analyse te beginnen, bepaalden wij steeds de waterstofionenconcentratie met behulp van buffer-oplossingen van bepaalde  $P_H$  en neutraalrood of broomthymolblauw als indicator. Bij de beoordeeling van het resultaat hiervan, moet natuurlijk wel in het oog gehouden worden, dat, indien pepton als stikstofbron gebruikt wordt, hieruit



basische producten ontstaan, zooals ammoniak en aminen, die zich kenbaar maken door een verhooging van de  $P_H$ .

Met de bovengenoemde voedingsoplossing vulden wij gistkolfjes en entten deze met de verschillende bacteriën der colityphusgroep, om de gasvorming, door deze organismen veroorzaakt, na te gaan. In het gesloten been van deze gistkolfjes leven de bacteriën onder vrijwel anaërobe omstandigheden. Dit kan voor sterk aërobe organismen een bezwaar zijn. Oxydatieve gistingen zullen zich practisch alleen in het open been voltrekken en van een eventueele gasvorming zal men dan niet veel bemerken. Inderdaad vertoonden onze culturen wel groei in het open been, maar niet in het gesloten been. Daarom hebben wij de bacteriën ook geënt in wijde cultuurbuizen, voorzien van een klein gasbuisje, waarbij er voor gezorgd werd, dat de vloeistof niet te hoog in de cultuurbuis stond. Terwijl wij in de gistkolfjes nooit een spoor gas hebben gevonden, konden wij in de cultuurbuizen enkele malen het ontstaan van gas constateeren.

Een overzicht van de gevormde vergistingsproducten vindt men in tabel II. Deze heeft betrekking op de vergisting van  $250 \text{ cm}^3$  voedingsoplossing in Erlenmeijerkolven van  $500 \text{ cm}^3$ . De voedingsbodem werd in alle gevallen geënt met een afgeslibde, 24 uur oude, agarcultuur van de betreffende bacterie.

De typhusstam no. 38 werd ook onderzocht na een vergistingsduur van 84 dagen. Het resultaat was hetzelfde.

Bij alle gistingen ging de ontleding van het melkzuur slechts zeer langzaam.

Wat volgt nu uit dit resultaat?

Duidelijk blijkt wel, dat *mierenzuur* en *azijnzuur* feitelijk de eenige vergistingsproducten zijn. Wij constateerden ook, dat het azijnzuur in grootere hoeveelheden voorkwam dan het mierenzuur. Dit is echter niet verwonderlijk, daar, zooals uit het hoofdstuk over de vergisting van mierenzuur zal blij-

ken, de meeste organismen dit zuur ontleden in waterstof en kooldioxyde. Daar vooral *B. coli* dit in sterke mate doet, is het voorkomen van mierenzuur in slechts sporen bij *B. coli* verklaard.

Echter, er is een maar. Bij de vergisting van mierenzuur ontstaan, zooals gezegd, waterstof en kooldioxyde. Beide zijn gassen, maar wij vinden in slechts enkele gevallen een waarneembare gasvorming en wonderlijk, juist niet bij *B. coli*.

Bij het onderzoek van het gevormde gas bleek, dat daarin geen kooldioxyde voorkwam, zoodat het uitsluitend uit waterstof bestaat. Wij moeten dus aannemen, dat de gevormde hoeveelheden gas zeer gering zijn, zoodat zij, althans voor een groot gedeelte, in oplossing blijven. Deze oplosbaarheid is echter vooral voor waterstof niet groot. Maar er is nog een andere mogelijkheid, n.l. de adsorptie van beide gassen aan het pepton.

Voor de waterstof is dit reeds aangetoond door Braak<sup>1)</sup> en Groenewegen<sup>2)</sup>. Uit de onderzoekingen van Braak kan men eveneens met eenige waarschijnlijkheid concluderen, dat deze adsorptie van het kooldioxyde veel geringer is.

Om te onderzoeken of er kooldioxyde in de cultuurvloei-stof in opgeloste toestand aanwezig was, hebben wij deze vloeistof met verdund zwavelzuur vrij sterk aangezuurd. Door verwarming dreven wij het gas uit en leidden dit met behulp van een kooldioxyde-vrije stikstofstroom in een heldere barytoplossing. Inderdaad ontstond er al spoedig een dik neerslag van bariumcarbonaat. Bij de bacteriën der typhus- en dysenteriegroep ontstond echter geen neerslag.

---

1) H. R. Braak: Onderzoekingen over de vergisting van glycerine, Diss. Delft, 1928.

2) H. J. Groenewegen: De vergisting van aethaandiol- (1.2) door de bacteriën der coli-, typhus-, dysenterie-groep, Diss. Utrecht, 1935.

TABEL II.  
Overzicht van de vergisting van ammoniumlactaat door de organismen der coli-typhusgroep.

STAMMEN	B. coli no. 4	B. lactis aerogenes no. 5	B. pneum. Friedl. no. 7	B. paratyphi no. 16	B. paratyphi no. 20	B. paratyphi no. 23	B. typhi murtum no. 30	B. enteritidis Gartner no. 35	B. typhi no. 36	B. typhi no. 38	B. dysenteriae Flexner no. 49	B. dysenteriae Sonne no. 52
Duur der vergisting in dagen	17	20	27	25	14	28	84	25	84	21	56	35
pH . . . . .	7.4	7.8	7.4	7.6	7.6	6.9	7.2	7.4	6.3	7.1	6.2	6.0
Gasvorming . . . . .	—	—	—	+	—	+	+	—	—	spoor	—	spoor
Acetaldehyde . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Aethylalcohol . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Diacetyl . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetyl/methylcarbinol . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mierenzuur . . . . .	spoor	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Azijnzuur . . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Andere vluchtige zuren . . . . .	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pyrodruivenzuur . . . . .	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Barnsteenzuur . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-3 butyleenglycol . . . . .	—	spoor	spoor	—	—	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor	spoor

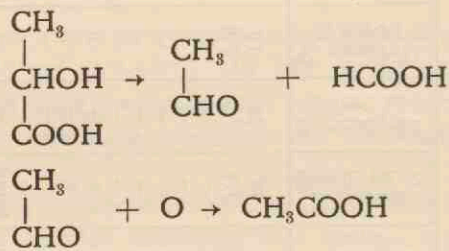
Bij deze laatste organismen wordt vrij veel mierenzuur gevormd. Dit blijkt ook uit de lage waarde van de  $P_H$  bij die bacteriën, welke niet in staat zijn het mierenzuur te ontleden.

Een groot gedeelte van het melkzuur vindt men na de vergisting onveranderd terug; het wordt dus slechts weinig of moeilijk aangetast.

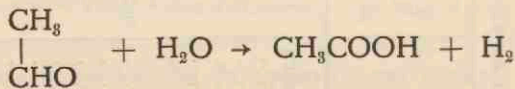
De volgende vraag is: Hoe ontstaan het mierenzuur en het azijnzuur?

Wij kunnen ons de volgende gevallen denken:

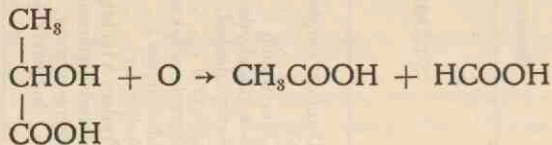
a. een directe splitsing van het melkzuurmolecule in acetaldehyde en mierenzuur en oxydatie van het acetaldehyde tot azijnzuur. Hiervoor zou pleiten het vinden van kleine hoeveelheden acetaldehyde bij de typhus- en dysenteriebacteriën nevens mierenzuur en azijnzuur:



Evenwel, wij kunnen ons deze laatste reactie ook als een hydroxydatie voorstellen:

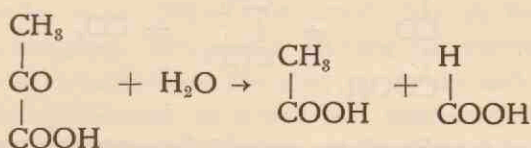
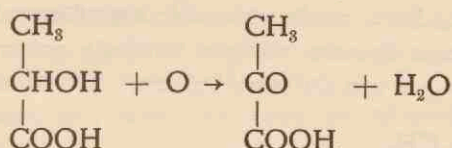


b. een directe oxydatie van het melkzuur tot azijnzuur en mierenzuur:





c. een oxydatie van het melkzuur tot pyrodruivenzuur en daarop volgende hydrolytische splitsing van dit laatste zuur:

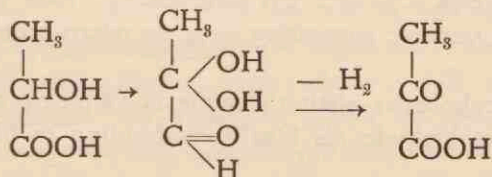


Over het verloop van de oxydatie tot pyrodruivenzuur kunnen wij twee mogelijkheden veronderstellen:

1. de oxydatie gaat direct met behulp van een melkzuurdehydrase <sup>1)</sup>).

2. de oxydatie gaat indirect via methylglyoxaal.

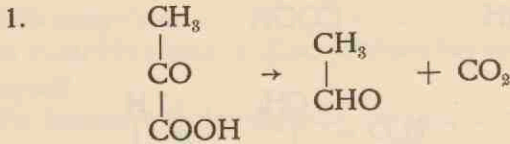
De grootste steun vindt deze laatste opvatting in het feit, dat het methylglyoxaal als een typische voortrap van het pyrodruivenzuur wordt aangenomen. In de laatste tijd is echter aan dit „typische” voorkomen in enkele gevallen ernstige twijfel gerezen. Het is ons ook niet gelukt deze stof in de uitgegiste vloeistof aan te toonen, hoewel natuurlijk de mogelijkheid bestaat, dat het gevormde methylglyoxaal in een zóó metastabiele vorm aanwezig is, dat het oogenblikkelijk weer verder omgezet wordt. Door dehydrering ontstaat dan uit het methylglyoxaal het pyrodruivenzuur:



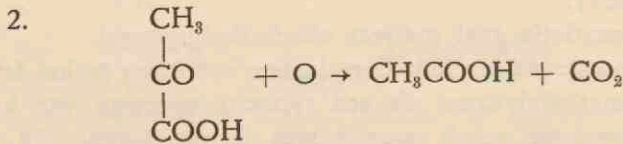
<sup>1)</sup> A. v. Szent Györgyi: Bio. Z. 157, 50 (1925).

Onzerzijds moet er op gewezen worden, dat deze intramoleculaire omzetting zuiver hypothetisch is.

Naast de onder c. reeds genoemde ontledingswijze van het pyrodruivenzuur kunnen wij ons tenslotte ook nog de volgende splitsingen van dit zuur denken:



dus een decarboxylatie, waarbij het ontstane acetaldehyde weer verder geoxydeerd kan worden of door een hydroxydatie, als boven reeds genoemd, in azijnzuur omgezet kan worden.



een directe oxydatie tot azijnzuur en kooldioxyde <sup>1)</sup>).

De onder c. genoemde meening, dat pyrodruivenzuur tussenproduct zou zijn, heeft veel voor. Zij wordt gesteund door het feit, dat wij in onze culturen eenige malen het pyrodruivenzuur aantreffen.

Om het optreden van deze stof nader te controleeren zou het wenschelijk zijn het pyrodruivenzuur vast te leggen, d.w.z. voor verdere aantasting door de micro-organismen te vrijwaren.

Bij de alcoholische gisting slaagde Neuberger destijds in, het acetaldehyde als bisulfietverbinding te blokkeeren.

1) N.B. Over de ontleding van pyrodruivenzuur door de bacteriën der coli-typhusgroep zal in een volgend hoofdstuk nader gesproken worden.

Nu is dit voor het pyrodruivenzuur niet mogelijk, daar de sulfietverbinding even snel wordt aangetast als het zuur zelf.

Ook het vastleggen als een, al of niet gesubstitueerd, phenylhydrazon is niet mogelijk wegens de groote giftigheid van deze producten voor de levende cel.

Wij hebben een meer uitgebreid en afzonderlijk daarop gericht onderzoek ingesteld naar het voorkomen van pyrodruivenzuur bij de vergisting van lactaat door de bacteriën der coli-typhusgroep. Wij entten daartoe de verschillende organismen in cultuurbuizen, die ieder  $\pm 10-15$  cm<sup>3</sup> van de lactaatoplossing bevatten. In iedere buis entten wij met een pipet P a s t e u r eenige druppels van een dik troebele bacteriesuspensie.

Na 14 dagen werden alle buizen met de reactie van S i m o n op pyrodruivenzuur onderzocht. Het resultaat van dit onderzoek is ondergebracht in tabel III. Daaruit blijkt, dat op een totaal van 59 stammen slechts 15 maal een positieve pyrodruivenzuurreactie voorkomt.

Het beste resultaat geven:

B. coli: 3 maal positief op 4 stammen

B. dysenteriae Flexner: 7 maal positief op 8 stammen;

daarna volgen:

B. typhi: 2 maal op 7 onderzochte stammen

B. paratyphi B: 2 maal op 9 onderzochte stammen

B. paratyphi A: 1 maal op 6 stammen.

Het was ons reeds eerder opgevallen, dat de paratyphus A- en de typhusbacteriën in het algemeen slecht groeien op de lactaatvoedingsbodem. Een cultuur van B. typhi no. 36, die aanvankelijk een negatieve reactie op pyrodruivenzuur had gegeven, was nog geruime tijd in de broedstoof blijven staan, vnl. om na te gaan of de groei der bacteriën zou toenemen.

TABEL III.

Overzicht over het ontstaan van pyrodruivenzuur bij de vergisting van ammoniumlactaat door de bacteriën der coli-typhusgroep.

Stammen	Pyro- druiven- zuur	Stammen	Pyro- druiven- zuur
B. coli no. 1 . . . . .	+	B. psittacosis no. 31 . . . .	-
B. " " 2 . . . . .	+	B. " " 32 . . . . .	-
B. " " 3 . . . . .	-	B. enteritidis Gärtner no. 33	-
B. " " 4 . . . . .	+	B. " " Aertrijck " 34	-
B. lactis aerogenes no. 5 .	-	B. typhi no. 35 . . . . .	+
B. " " " 6 .	-	B. " " 36 . . . . .	-
B. pneumoniae Friedl. no. 7	-	B. " " 37 . . . . .	-
B. paratyphi A no. 8 . . .	+	B. " " 38 . . . . .	+
B. " " A " 9 . . . . .	-	B. " " 39 . . . . .	-
B. " " A " 10 . . . . .	-	B. " " 40 . . . . .	-
B. " " A " 11 . . . . .	-	B. " " 41 . . . . .	-
B. " " A " 12 . . . . .	-	B. dysenteriae Flexner no. 42	+
B. " " A " 13 . . . . .	-	B. " " " " 43	+
B. " " B " 14 . . . . .	+	B. " " " " 44	+
B. " " B " 15 . . . . .	-	B. " " " " 45	+
B. " " B " 16 . . . . .	-	B. " " " " 46	+
B. " " B " 17 . . . . .	-	B. " " " " 47	-
B. " " B " 18 . . . . .	+	B. " " " " 48	+
B. " " B " 19 . . . . .	-	B. " " " " 49	+
B. " " B " 20 . . . . .	-	B. " " Sonne " 50	-
B. " " B " 21 . . . . .	-	B. " " " " 51	-
B. " " B " 22 . . . . .	-	B. " " " " 52	-
B. " " C " 23 . . . . .	-	B. " " " " 53	-
B. " " C " 24 . . . . .	-	B. " " " " 54	-
B. " " C " 25 . . . . .	-	B. " " " " 55	-
B. " " C " 26 . . . . .	-	B. " " " " 56	-
B. " " C " 27 . . . . .	-	B. " " Shiga Kruse " 57	-
B. " " C " 28 . . . . .	-	B. " " " " 58	-
B. " " C " 29 . . . . .	-	B. " " " " 59	-
B. typhi murium " 30 . . .	-		

Na een verblijf van 3 maanden in de broedstoof, was de vloeistof nog steeds zeer licht troebel. De reactie op pyrodruivenzuur was toen echter sterk positief geworden. Uit enkele cm<sup>3</sup> cultuur werd voldoende neerslag met 2-4 dinitrophenylhydrazine verkregen om daarvan het smeltpunt te



bepalen. Het neerslag werd nog gezuiverd volgens de methode, in het begin van dit hoofdstuk beschreven. Het smeltpunt werd vastgesteld op 209° C. Het mengsmeltpunt met zuiver pyrodruivenzuur 2-4 dinitrophenylhydrazon op 211° C.

Dit resultaat deed bij ons het vermoeden opkomen, dat de door de bacteriën veroorzaakte oxydatie van het melkzuur tot pyrodruivenzuur, van enzymatische aard zou zijn, terwijl daarentegen het ontstaan van het uit dit zuur gevormde mierenzuur en azijnzuur het gevolg zou zijn van de werkzaamheid van de levende cel.

Wij wilden nu trachten ook bij andere bacteriën het pyrodruivenzuur aan te toonen door de cultuurvloei-stof met een zeer gering aantal bacteriën te enten, in de hoop, dat het ontstaan van pyrodruivenzuur in dat geval sneller zou geschieden dan de ontleding van dat zuur.

In cultuurbuizen, bevattende  $\pm 10-15$  cm<sup>3</sup> voedingsoplossing, werd met een entnaald zeer weinig bacteriemateriaal gebracht. Na 3 weken broeden bij 35° C onderzochten wij de cultuur met de reactie van Simon. De groei van de paratyphus A-, de typhus- en de dysenteriebacteriën was zeer matig, terwijl daarentegen de bacteriën van de coli- en de paratyphus B groep zich vrij goed ontwikkeld hadden.

In tabel IV vindt men het resultaat van dit onderzoek. Het blijkt hieruit, dat de meeste stammen inderdaad een positieve reactie geven, maar het was de vraag of de sterk afwijkende kleurreacties wel als van pyrodruivenzuur afkomstig mochten worden beschouwd. Om dit na te gaan hebben wij 50 cm<sup>3</sup> van de lactaatoplossing in kolfjes geënt met één oogje cultuur van de stammen: B. enteritidis Gärtner no. 33, B. paratyphi A no. 10, B. paratyphi A no. 13 en B. coli no. 4.

Deze laatste gold tevens als blanco proef, daar bij deze stam wèl de karakteristieke blauwkleuring optrad, die kenmerkend is voor pyrodruivenzuur bij toevoeging van nitroprussidnatrium en ammoniak.

TABEL IV.

Overzicht over het ontstaan van pyrodruivenzuur bij de oxydatie van melkzuur door een geringe hoeveelheid bacteriën van de coli-typhusgroep.

Stammen	Reactie van Simon
B. coli no. 1 . . . . .	blauwviolet
B. " " 4 . . . . .	donkerblauw
B. lactis aerogenes no. 5 . . . . .	—
B. " " 6 . . . . .	—
B. pneumoniae Friedländer no. 7 . . . . .	—
B. paratyphi A no. 8 . . . . .	donkerblauw
B. " A " 9 . . . . .	donkerblauw
B. " A " 10 . . . . .	heldergroen
B. " A " 11 . . . . .	donkerblauw
B. " A " 12 . . . . .	donkerblauw
B. " A " 13 . . . . .	intensief donkergroen
B. " B " 14 . . . . .	donkerblauw
B. " B " 15 . . . . .	donkerblauw
B. " C " 23 . . . . .	blauwgroen
B. " C " 26 . . . . .	—
B. typhi murium " 30 . . . . .	—
B. psittacosis " 31 . . . . .	—
B. " " 32 . . . . .	—
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	intensief donkergroen
B. " Aertrijck no. 34 . . . . .	donkerblauw
B. typhi no. 35 . . . . .	donkerblauw
B. " " 36 . . . . .	donkerblauw
B. " " 37 . . . . .	donkerblauw
B. " " 38 . . . . .	donkerblauw
B. " " 39 . . . . .	donkerblauw
B. " " 40 . . . . .	donkerblauw
B. " " 41 . . . . .	donkerblauw
B. dysenteriae Flexner no 42 . . . . .	blauwgroen
B. " " " 49 . . . . .	groen
B. " Sonne " 50 . . . . .	groen
B. " " " 52 . . . . .	blauw
B. " Shiga Kruse no. 57 . . . . .	groen
B. " " " " 59 . . . . .	blauwviolet

Na drie weken bij 35° C gebroed te hebben, kwam de cultuur in onderzoek. Allereerst werd, ter verwijdering van het pepton, deze stof met fosforwolfraamzuur neergeslagen <sup>1)</sup> en in het heldere filtraat met 2-4 dinitrophenylhydrazine gereageerd.

<sup>1)</sup> Zie pag. 45.

Bij alle vier onderzochte stammen ontstond een geel neerslag. Dit werd afgefiltreerd, gewasschen met verdund zoutzuur en water, opgelost in 1 N natriumcarbonaatoplossing en hieruit weer met verdund zoutzuur de 2-4 dinitrophenylhydrazonen neergeslagen.

De smeltpuntsbepalingen hadden het volgende resultaat:

B. coli no. 4 . . . . .	Smeltpunt dinitrophenylhydrazon	210° C
B. paratyphi A no. 10 . . . . .	" "	210° C
B. " A no. 13 . . . . .	" "	213° C
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	" "	210° C.

Hieruit volgt dus, dat wij ook bij deze, geheel afwijkende, kleurreacties toch met pyrodruivenzuur te doen hebben. Wat de oorzaak van deze afwijking is, weten wij niet. Gezien echter de ingewikkelde en gedeeltelijk zelfs onbekende samenstelling (pepton) van ons milieu, is het zeer verleidelijk hierin de oorzaak van het „kleurenspeel” te zien.

Zooals uit tabel IV blijkt, bleven er nog eenige gevallen over, waarbij het niet mogelijk was, op deze manier pyrodruivenzuur aan te toonen. Wij hebben getracht, ook in deze gevallen een positief resultaat te bereiken, door binnen nauwer tijdgrenzen op deze stof te reageeren.

Wij kozen hiervoor *B. lactis aerogenes* no. 5 en onderzochten hiernaast ook twee positieve stammen, nl. *B. coli* no. 4 en *B. typhi* no. 38. Het resultaat toont tabel V.

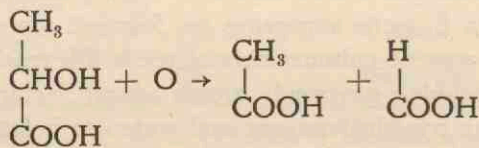
De drie culturen waren met zeer weinig bacteriën geënt. De stam van *B. lactis aerogenes* no. 5 groeit echter snel. Na acht dagen was de cultuurvloeistof reeds dik troebel geworden. Het inmiddels gevormde groote aantal bacteriën zal het optreden van pyrodruivenzuur wel weten te beletten, omdat ieder molecule, dat van dit zuur ontstaat, onmiddellijk door een bacterie aangetast wordt.

TABEL V.

Overzicht over het ontstaan van pyrodruivenzuur bij de vergisting van melkzuur door bacteriën der coli-typhusgroep.

Reactie van Simon na:	B. coli no. 4	B. typhi no. 38	B. lactis aerogenes no. 5
1 uur	—	—	—
1½ "	—	—	—
2½ "	—	—	—
4 "	—	—	—
5½ "	—	—	—
6 "	—	—	—
24 "	—	—	—
31 "	—	+	—
48 "	—	+	—
72 "	spoor	—	—
96 "	+	—	—
5 dagen	+	—	—
6 "	—	—	—
7 "	—	—	—
8 "	—	—	—

Het is ons dus op grond van deze proeven niet mogelijk uit te maken of de oxydatie van melkzuur door *B. lactis aerogenes* geschiedt via het pyrodruivenzuur, omdat dit zuur oogenblikkelijk ontleed kan worden en aan onze waarneming wordt onttrokken, of wel, dat deze oxydatie een direct aangrijpen van het melkzuurmolecule tengevolge heeft, waardoor zonder tusschentrap mierenzuur en azijnzuur ontstaan:



Wat het eerste geval betreft, kunnen wij ons ook denken, dat de enzymconcentratie van *B. lactis aerogenes* slechts gering is.

De langzame oxydatie van het melkzuur, die hiervan het



gevolg zou moeten zijn, wordt echter weer verhoogd door de snelle ontwikkeling der bacteriën, zoodat het eindresultaat weer hetzelfde kan zijn als bij de andere bacteriën van de coli-typhusgroep.

Wij hebben nog getracht ter verdere oplossing van dit vraagstuk de enzymreactie vrij te maken van de reactie, die door de levende cel zelf tot stand komt.

In principe zijn hiervoor verschillende wegen mogelijk. Wij kunnen b.v. een peptonwatercultuur van de bacterie door een of ander bacteriefilter filtreren en met het steriele filtraat de proeven uitvoeren. Daarnaast kunnen wij de bacterie doden met behulp van aceton, toluol e.d., zonder dat de enzymwerking verhinderd wordt.

Wat de eerste methode betreft, deze kan in slechts enkele gevallen succes hebben.

Willstätter<sup>1)</sup> onderscheidt drie soorten enzymen:

- a. lyo-enzymen: deze zijn oplosbaar en komen vrij voor in het celvocht;
- b. endo-enzymen: dit zijn de in het „Zellgerüst” onoplosbare enzymen;
- c. desmo-enzymen: deze zijn aan het protoplasma verbonden.

Alleen wanneer de enzymen vrij voorkomen en niet aan de bacterie gebonden zijn, zullen wij hen in het bacteriefiltraat kunnen verwachten. Het is duidelijk, dat alleen de onder a. genoemde enzymen aan deze voorwaarde voldoen. De vraag rijst: Onder welke groep hoort het oxydeerende ferment van de bacteriën uit de coli-typhusgroep thuis?

Om deze vraag te kunnen beantwoorden, hebben wij van de navolgende stammen een peptonwatercultuur aangelegd:

- B. coli no. 4
- B. paratyphi A no. 8
- B. typhi no. 35
- B. dysenteriae Sonne no. 52.

<sup>1)</sup> R. Willstätter: H. S. 229, 251 (1934).

Deze culturen werden 14 dagen bij 35° C bebroed. Na afloop hiervan werden de culturen door een van te voren gesteriliseerd Seitz E.K. bacteriefilter gefiltreerd. Het glasheldere filtraat controleerden wij op steriliteit door het gedurende 2 × 24 uur in de broedstoof te plaatsen. De vloeistof bleef volmaakt helder. Daarna entten wij met deze oplossing een lactaatvoedingsbodem, waarvan de samenstelling gelijk was aan diegene, die voor de vorige proeven gebruikt werd.

Iedere twee dagen reageerden wij op pyrodruivenzuur. Na twee weken was het resultaat echter nog negatief, zoodat naar alle waarschijnlijkheid het gezochte ferment niet onder de bovengenoemde lyo-enzymen thuishoort, maar op een of andere wijze aan het bacterielichaam is gebonden. Hoe en van welke aard deze binding is, blijft echter een onopgeloste vraag.

Vervolgens hebben wij de tweede weg bewandeld. Hiertoe werd een 24 uur oude agarcultuur van de betreffende bacterie met steriel water afgesluid en daaraan eenige druppels toluol toegevoegd. De toluol schudden wij goed door de bacterie-emulsie heen en herhaalden dit, nadat de vloeistof zich weer in twee lagen gescheiden had, nog verscheidene malen.

Vervolgens controleerden wij of de bacteriën gestorven waren door een druppel van de bacterie-emulsie op alkalische bouillon te enten en bij 35° C te broeden. De bouillon bleef helder; ook na overenten op een tweede buis met alkalische bouillon konden wij hierin geen leven meer constateeren, ook niet bij overenting op een plaat.

Nu konden de gedoode bacteriën op de lactaatoplossing geënt worden. Na 12 dagen bij 35° C gestaan te hebben, onderzochten wij alle culturen op de reactie van S i m o n. Ook controleerden wij nogmaals of de inhoud van de, met lactaatvoedingsbodem gevulde, buizen steriel gebleven was.

De resultaten zijn opgenomen in tabel VI.

TABEL VI.

Overzicht over de oxydatie van melkzuur met door toluol gedooide bacteriën van de coli-typhusgroep.

Stammen	Reactie van Simon
B. coli no. 4 . . . . .	lichtgroen
B. lactis aerogenes no. 5 . . . . .	heldergroen
B. " " " 6 . . . . .	groen
B. pneumoniae Friedländer no. 7 . . . . .	heldergroen
B. paratyphi A no. 8 . . . . .	lichtgroen
B. " B " 14 . . . . .	groen
B. " C " 23 . . . . .	heldergroen
B. typhi murium no. 30 . . . . .	lichtgroen
B. psittacosis no. 31 . . . . .	groen
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	groen
B. typhi no. 35 . . . . .	heldergroen
B. dysenteriae Flexner no. 42 . . . . .	groen
B. " Sonne " 50 . . . . .	groen
B. " Shiga Kruse no. 57 . . . . .	lichtgroen

Met 2-4 dinitrophenylhydrazine ontstond eveneens een neerslag.

Wij kunnen dus besluiten, dat, vast verbonden met het bacteriëlichaam, een ferment voorkomt, dat in staat blijkt, onafhankelijk van de functies van de levende cel, melkzuur tot pyrodruivenzuur te oxydeeren.

Dit geldt ook voor die bacteriën, die, zooals B. lactis aerogenes, bij de culturen met levende cellen geen aantoonbare hoeveelheden pyrodruivenzuur vormen!

Nu zijn reeds vroeger door Engelsche onderzoekers <sup>1)</sup> onderzoeken gedaan over de oxydatie van melkzuur door B. coli in tegenwoordigheid van methyleenblauw. Het methyleenblauw werkt hier als waterstofacceptor. Wij hebben in onze proeven echter geen specifieke waterstofacceptor toegevoegd. In ons geval blijven dan ook twee mogelijkheden over:

<sup>1)</sup> Zie Hoofdstuk III.



In de eerste plaats bestanddeelen uit de pepton. Hierop zou b.v. kunnen wijzen de moeilijke vergisting van een lactaat-oplossing, waaraan geen pepton is toegevoegd. Wij weten, dat pepton ook waterstof kan adsorbeeren; het schijnt dus van te voren niet onmogelijk, dat het als waterstofacceptor kan dienst doen.

In de tweede plaats kan de zuurstof uit de lucht als waterstofacceptor fungeeren. Volgens W i e l a n d is zuurstof zelfs de natuurlijke waterstofacceptor.

De methyleenblauw-methode gaat ook door onder anaërobe omstandigheden. Dit is trouwens heel begrijpelijk, omdat de luchtzuurstof in dit geval geen rol speelt. De reeds bovengenoemde onderzoekers werken eveneens met, door toluol gedooide, bacteriën, zoodat ook zij uitsluitend met de aanwezige enzymen werken.

Om nu uit te maken, wat in ons geval de waterstofacceptor is, zal het noodig zijn de proeven in een anaërobe omgeving te doen plaats hebben. Voor het geval, dat in de pepton een geschikte waterstofacceptor voorkomt, zullen wij pyrodruivenzuur vinden; voor het geval, dat alleen zuurstof als waterstofacceptor fungeert, zullen wij deze stof niet vinden.

Het apparaat, waarin wij deze anaërobe gisting lieten plaats vinden, bestond uit een vacuumexsiccator, waarvan wij allereerst nagingen, dat deze luchtdicht afsloot. De exsiccator bezat een helmvormig bovenstuk, voorzien van een ringvormige goot, welke laatste gevuld werd met een alkalische pyrogallolopplossing. In de exsiccator zelf plaatsten wij de, met de bacteriën geënte, cultuurbuizen, die wij op 40° C verwarmd hadden. Vervolgens moest de exsiccator met stikstof gevuld worden. Daar het er in ons geval ten zeerste op aankwam, dat inderdaad alle zuurstof verwijderd was, moest hieraan groote zorg besteed worden.

Wij gingen als volgt te werk:

a. bereiding der alkalische pyrogallolopplossing.



Een geconcentreerde, waterige oplossing van pyrogallol werd gekookt en onder doorleiding van zuivere stikstof (zie sub b.) afgekoeld. Eenzelfde volume 30 % natriumhydroxyde werd eveneens opgekookt ter verwijdering van opgeloste lucht en daarna, terwijl stikstof werd doorgeleid, afgekoeld.

Deze twee oplossingen mengden wij niet dadelijk, maar brachten eerst alleen de pyrogalloloplossing in de ringvormige goot van de exsiccator. Daarna sloten wij de exsiccator.

b. zuivering der gebruikte stikstof.

Dit gas, dat wij uit een gascylinder verkregen, bevatte vrij veel zuurstof. Wij leidden het daarom door een oven, waarin twee buizen van moeilijk smeltbaar glas, gevuld met rolletjes kopergeas. Het gedeeltelijk reeds geoxydeerde koper reduceerden wij door methylalcohol damp door de verhitte buizen te leiden. Over het op deze wijze gereduceerde gas leidden wij nu de stikstofstroom. Voordat wij deze zuurstofvrije stikstof in de exsiccator toelieten, controleerden wij het gas nogmaals door het door een alkalische pyrogalloloplossing te leiden, die zich in drie achter elkaar geschakelde waschfleschjes bevond. Bij het afbreken van de leiding kon er wel zuurstof in de twee buitenste waschfleschjes binnendringen; het middelste mocht niet donker worden.

c. vullen van de exsiccator.

Met behulp van een waterstraalluchtpomp pompten wij de exsiccator leeg (de druk was toen  $\pm 15$  mm). Door middel van een driewegkraan zetten wij nu de pomp af en lieten de stikstof toestroomen, totdat de druk weer één atmosfeer was geworden. Toen brachten wij opnieuw de pomp in verbinding met de exsiccator en pompten deze opnieuw leeg. Nadat nogmaals stikstof toegevoerd was, werd de geheele bewerking nog eens herhaald. Eerst nu werd de natriumhydroxydeoplossing toegevoegd. Hiertoe maakten wij de gummistop, waarmee het helmvormige bovenstuk van boven was gesloten, los en lieten met een pipet de loogoplossing bij de

pyrogalloloplassing vloeien. Nadat de toestel weer gesloten was, pompten wij hem voor de laatste maal leeg en lieten toen stikstof toe, totdat de druk  $\pm 600$  mm was. Dit om te voorkomen, dat door uitzetting van het gas in de broedstoof het bovenstuk er af gedrukt zou worden.

Dat al deze maatregelen voldoende waren, bleek wel uit het feit, dat de pyrogalloloplassing zich niet donker kleurde.

De culturen werden gedurende 25 dagen in de broedstoof bij  $35^{\circ}$  C bebroed. Daarna openden wij de exsiccator en onderzochten de culturen.

TABEL VII.

Overzicht over het ontstaan van pyrodruivenzuur bij de anaërobie vergisting van ammoniumlactaat door de bacteriën der coli-typhusgroep.

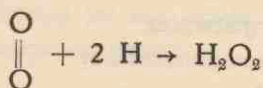
Stammen	Reactie op pyrodruivenzuur
B. coli no. 1 . . . . .	—
B. " " 4 . . . . .	—
B. lactis aerogenes no. 5 . . . . .	—
B. " " " 6 . . . . .	—
B. pneumoniae Friedländer no. 7 . . . . .	—
B. paratyphi A no. 8 . . . . .	—
B. " A " 12 . . . . .	—
B. " B " 14 . . . . .	—
B. " B " 15 . . . . .	—
B. " C " 23 . . . . .	—
B. " C " 26 . . . . .	—
B. typhi murium " 30 . . . . .	—
B. psittacosis " 31 . . . . .	—
B. " " 32 . . . . .	—
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	—
B. " Aertrijck " 34 . . . . .	—
B. typhi no. 35 . . . . .	—
B. " " 36 . . . . .	—
B. dysenteriae Flexner no. 42 . . . . .	—
B. " " " 49 . . . . .	—
B. " Sonne " 50 . . . . .	—
B. " " " 52 . . . . .	—
B. " Shiga Kruse no. 57 . . . . .	—
B. " " " " 59 . . . . .	—

In de eerste plaats viel ons op, dat zeer weinig groei te zien was. Daarna reageerden wij op pyrodruivenzuur met nitroprussidnatrium en ammoniak.

Het resultaat staat vermeld in tabel VII.

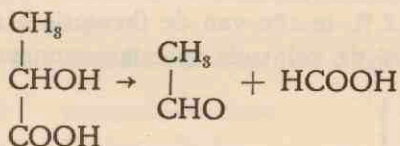
In geen enkel geval van de onderzochte 24 stammen kregen wij dus met de reactie van S i m o n een positief resultaat.

Hieruit volgt, dat het de luchtzuurstof is, die de oxydatie tot stand brengt en daarbij als waterstofacceptor optreedt. Wij hebben er in hoofdstuk I reeds op gewezen, dat voor deze dehydroeringen de volgende formule wordt aangenomen:



Daar echter de organismen van de coli-typhusgroep een sterke katalasewerking hebben, is het niet mogelijk dit waterstofperoxyde aan te toonen, daar het direct weer ontleed wordt.

Bij de bespreking van de door ons bij de vergisting van ammoniumlactaat verkregen resultaten, hebben wij ook gewezen op de mogelijkheid van de volgende splitsing van het melkzuurmolecule:



Dit in verband met het vinden van acetaldehyde en mierenzuur. Het aldehyde zou dan voor het grootste gedeelte in azijnzuur moeten worden omgezet, daar dit aldehyde slechts in sporen, en dan nog maar in enkele gevallen, kon worden aangetoond, terwijl condensatie tot acetylmethylcarbinol of diacetyl niet plaats vindt.

Wij hebben aan dit feit nog eens bijzondere aandacht geschonken in verband met het door Nagai<sup>1)</sup>, met behulp van de sulfietmethode, verrichte onderzoek over de vergifting van calcium- en natriumlactaat met *B. coli* en *B. lactis aerogenes*.

Volgens genoemde onderzoeker ontstaat zonder sulfiet geen acetaldehyde, wat in overeenstemming is met de ook door ons voor die organismen verkregen resultaten.

Zijn sulfietvoedingsbodem heeft de volgende samenstelling:

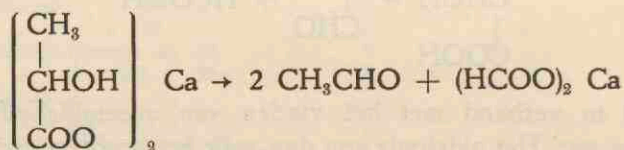
10 g calciumlactaat  
 500 cm<sup>3</sup> gistwater  
 2.5 g ammoniumsulfaat  
 30 g krijt  
 37.5 cm<sup>3</sup> 25 % natriumsulfietoplossing.

Deze oplossing ent hij o.a. met 15 oogjes van een cultuur van *B. lactis aerogenes* en onderzoekt na verschillende tijden de hoeveelheid acetaldehyde.

Zijn resultaat is:

na 10 dagen . . . . 33 mg acetaldehyde  
 na 14 „ . . . . 48 „ „  
 na 20 „ . . . . 14 „ (l) acetaldehyde.

Rekenen wij uit hoeveel dit is, dan blijkt het resp.  $\pm 4\%$ ,  $\pm 6\%$  en  $\pm 2\%$  te zijn van de theoretisch mogelijke hoeveelheid, als wij de volgende splitsing aannemen:



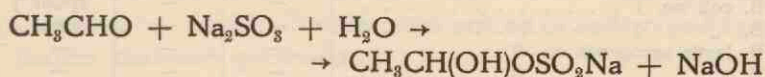
Voor een ophoopingmethode kan dit zeker niet als een bijzonder treffend resultaat worden aangemerkt. Meer eigen-

<sup>1)</sup> K. Nagai: Bio. Z. 141, 266 (1923).



aardig is echter nog het resultaat, dat hij na 20 dagen krijgt, waar nl. de hoeveelheid aceetaldehyde tot op minder dan  $\frac{1}{3}$  gedeelte van de opbrengst van 14 dagen is verminderd!

Wij hebben deze proeven voor een groot aantal organismen der coli-typhusgroep nagewerkt. In de eerste experimenten van Neuberger werkt hij met natrium- of calciumbisulfiet. Deze stof is echter in ons geval ongeschikt, daar zij voor de bacteriën giftige eigenschappen heeft. Echter kan gebruik gemaakt worden van het natriumsulfiet. Ook deze stof verbindt zich met aldehyden tot een product, dat door de bacteriën niet verder aangetast wordt:



Er ontstaat dus een alkalische reactie bij deze sulfietgisting. Wij hebben uit de oplossing het calciumcarbonaat, dat Nagai toevoegt, weggelaten. Deze stof voegt men alleen toe om groote hoeveelheden zuur te neutraliseeren. Nu hebben wij bij de normale gistingen, althans voor de gasvormende bacteriën der coli-typhusgroep, geen hooge zuurgraad aangetroffen. In de tweede plaats zal de hoeveelheid natriumhydroxyde, die bij de aceetaldehydebinding vrij komt, neutraliseerend werken.

Wij hebben onze voedingsbodem als volgt samengesteld:

2 %	ammoniumlactaat
1 %	pepton „Witte”
0.16 %	secundair ammoniumfosfaat
0.5 %	natriumchloride
1 %	natriumsulfiet.

De  $P_H$  van deze oplossing was 7.2.

Wij steriliseerden haar door filtratie door een Seitz E.K. bacteriefilter, vulden vervolgens steriele cultuurbuizen met

$\pm 20 \text{ cm}^3$  van deze oplossing en entten daarna met een 24 uur oude agarcultuur van de verschillende stammen. De stammen werden onderzocht, zoowel na 14 dagen als na 4 weken.

In tabel VIII zijn de uitkomsten hiervan weergegeven.

TABEL VIII.

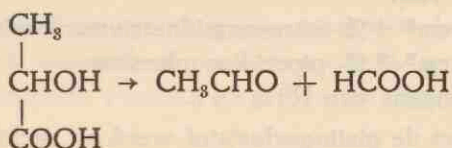
Overzicht over het ontstaan van acetaldehyde bij de vergisting van ammoniumlactaat door de bacteriën der coli-typhusgroep.

Stammen	Aëroob met sulfiet	Anaëroob zonder sulfiet	Anaëroob met sulfiet
B. coli no. 1 . . . . .	—	—	spoor <sup>1)</sup>
B. " " 4 . . . . .	—	—	spoor
B. lactis aerogenes no. 5 . . . . .	—	—	—
B. " " 6 . . . . .	—	—	—
B. pneumoniae Friedländer no. 7 . . . . .	—	—	—
B. paratyphi A no. 8 . . . . .	—	—	—
B. " A " 12 . . . . .	—	—	spoor
B. " B " 14 . . . . .	—	—	—
B. " B " 15 . . . . .	—	—	spoor
B. " C " 23 . . . . .	—	—	spoor
B. " C " 26 . . . . .	—	—	spoor
B. typhi murium no. 30 . . . . .	—	—	—
B. psittacosis " 31 . . . . .	—	—	—
B. " " 32 . . . . .	—	—	—
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	—	—	—
B. " Aertrijck no. 34 . . . . .	—	—	—
B. typhi no. 35 . . . . .	—	—	spoor
B. " " 36 . . . . .	—	—	—
B. dysenteriae Flexner no. 42 . . . . .	—	—	—
B. " " " 49 . . . . .	—	—	—
B. " Sonne " 50 . . . . .	—	—	—
B. " " " 52 . . . . .	—	—	spoor
B. " Shiga Kruse no. 57 . . . . .	—	—	—
B. " " " " 59 . . . . .	—	—	—

Hierboven hebben wij reeds medegedeeld, dat onder anaërobe omstandigheden geen pyrodruivenzuur wordt gevormd. Het zou echter mogelijk kunnen zijn, dat onder deze omstan-

<sup>1)</sup> De aanduiding „spoor” in deze tabel heeft betrekking op hoeveelheden van  $\pm 0.5 \text{ mg}$  acetaldehyde.

digheden het melkzuur op een andere wijze wordt gesplitst, nl. op de volgende:



Om deze mogelijkheid te toetsen, kweekten wij een aantal stammen van de coli-typhusgroep in cultuurbuizen op de normale lactaatvoedingsbodem. Deze werden op de reeds eerder beschreven methode<sup>1)</sup> anaëroob gekweekt. Volledigheids-halve hebben wij dezelfde stammen ook op de sulfietvoedingsbodem anaëroob gekweekt.

De resultaten van deze beide onderzoeken zijn eveneens in tabel VIII opgenomen.

Het resultaat is dus, dat bij de melkzuurvergisting, althans onder deze omstandigheden, geen acetaldehyde gevormd wordt. De sporen acetaldehyde, die bij de anaërobe sulfietgisting ontstaan, mogen zeker niet beschouwd worden als een normaal product van de bacteriestofwisseling.

Om de gevoeligheid van de reactie op acetaldehyde te vergrooten, hebben wij haar op de volgende wijze uitgevoerd:

De uitgegiste vloeistof brachten wij in een Jena rondbodemkolf van 250 cm<sup>3</sup>, welke gesloten werd door een gummistop, voorzien van twee doorboringen. Door de eene doorboring ging een korte, rechte koeler, door de andere een inleidbuisje, dat onder de vloeistofspiegel in de kolf uitmondde. De koeler was aan de bovenzijde verbonden met een tweemaal rechthoekig omgebogen buisje, welk buisje aan de andere zijde verbonden was met een lange inleidbuis, die geplaatst was

<sup>1)</sup> Zie pag. 62.



in een lange, wijde, aan één zijde toegesmolten buis. De inleidbuis reikt nagenoeg tot de bodem. In de wijde buis komt een mengsel van:

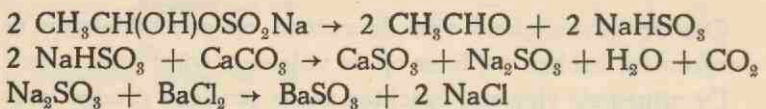
5 cm<sup>3</sup> 4 % nitroprussidnatriumoplossing en

10 cm<sup>3</sup> 3 % piperidineoplossing,

zijnde het reagens van R i m i n i.

De kolf met de gistingsvloeistof werd nu zacht verwarmd, waardoor het aceetaldehyde vrij kwam. Het inleidbuisje was verbonden met een stikstofcylinder. Door een stikstofstroom door de toestel te leiden kon het aceetaldehyde meegesleept worden in het reagens van R i m i n i. Al naarmate de hoeveelheid aceetaldehyde, kleurt dit mengsel zich van geel, geelgroen, groen, groenblauw tot blauw. Zijn er slechts sporen aldehyde aanwezig, dan ziet men, als de stikstofstroom wordt uitgeschakeld, een blauw wolkje onder de meniscus in de inleidbuis.

Bij de sulfietgisting krijgt men het aceetaldehyde door verwarming wel vrij uit de verbinding met het sulfiet, maar om het daarbij tevens ontstane natriumbisulfiet te binden, wordt 1 g calciumcarbonaat en 25 cm<sup>3</sup> 20 % bariumchlorideoplossing toegevoegd.



Wij hebben ons nog een indruk willen vormen over de hoeveelheid melkzuur, die vergist wordt.

Als vergistingsproducten hebben wij gevonden: pyrodruivenzuur, mierenzuur en azijnzuur. Laat men de vergisting plaats vinden door een groot aantal bacteriën, dan vindt men geen, of slechts een spoor, pyrodruivenzuur. Uitgezonderd de typhus- en dysenteriebacteriën splitsen alle organismen het mierenzuur in waterstof en kooldioxyde. Bij *B. coli*



no. 4 gaat dit zóó ver, dat men slechts sporen mierenzuur aantreft. Het gevormde zuur is dus practisch uitsluitend azijnzuur.

Wij hebben van de volgende stammen de hoeveelheid vluchtig zuur bepaald, nl. *B. coli* no. 4, *B. typhi* no. 36 en 38, *B. dysenteriae* Flexner no. 49 en *B. dysenteriae* Sonne no. 52.

Voor *B. coli* hebben wij gerekend, dat alle zuur azijnzuur is, bij de andere stammen, dat in het vluchtig zuur gelijke hoeveelheden mierenzuur en azijnzuur aanwezig zijn. Van de gevonden hoeveelheid trokken wij eerst nog de hoeveelheid vluchtig zuur af, die ontstaat bij de vergisting van een blanco peptonoplossing door de betreffende bacterie. Deze hoeveelheid schommelt voor 100 cm<sup>3</sup> 1 % peptonoplossing tusschen 5.5 en 8.6 cm<sup>3</sup> 0.1 N natriumhydroxyde.

Daar uit één grammolecule melkzuur één grammolecule azijnzuur ontstaat, geeft de hoeveelheid ontstaan azijnzuur (in grammoleculen) tevens de hoeveelheid melkzuur (eveneens in grammoleculen), die vergist is.

In de volgende tabel is het resultaat opgenomen. De oplossing bevat 2.38 % ammoniumlactaat.

Stammen	Duur der vergisting	Hoeveelheid cultuurvloeistof	Vluchtige zuren in cm <sup>3</sup> 0.1 N NaOH	Aantal gr. mol. azijnzuur	Hoeveelheid vergist melkzuur
<i>B. coli</i> no. 4	17 dagen	250 cm <sup>3</sup>	200 cm <sup>3</sup>	0.02	36.4 %
<i>B. typhi</i> no. 36	84 "	200 "	158 "	0.0079	18.0 %
<i>B. typhi</i> no. 38	21 "	250 "	52 "	0.0026	4.7 %
<i>B. typhi</i> no. 38	84 "	200 "	150 "	0.0075	17.0 %
<i>B. dysenteriae</i> Flexner no. 49	56 "	200 "	240 "	0.012	27.3 %
<i>B. dysenteriae</i> Sonne no. 52	35 "	200 "	281 "	0.014	31.8 %

Hieruit volgt, dat de vergisting langzaam verloopt, maar

dat de hoeveelheid vergist melkzuur vrij aanzienlijk wordt. Tevens kan men hieruit besluiten, dat — indien een koolstofbron aanwezig is, die gemakkelijk vergist wordt, zooals bij de gemengd-zure gisting het geval is, waar de vergisting na eenige dagen is afgelopen — de vergisting van het melkzuur een practisch te verwaarloozen factor is.

Temperatuur	Wet	Wet	Wet	Wet	Wet
15°C	100	100	100	100	100
20°C	100	100	100	100	100
25°C	100	100	100	100	100
30°C	100	100	100	100	100
35°C	100	100	100	100	100
40°C	100	100	100	100	100
45°C	100	100	100	100	100
50°C	100	100	100	100	100
55°C	100	100	100	100	100
60°C	100	100	100	100	100
65°C	100	100	100	100	100
70°C	100	100	100	100	100
75°C	100	100	100	100	100
80°C	100	100	100	100	100
85°C	100	100	100	100	100
90°C	100	100	100	100	100
95°C	100	100	100	100	100
100°C	100	100	100	100	100

## HOOFDSTUK V.

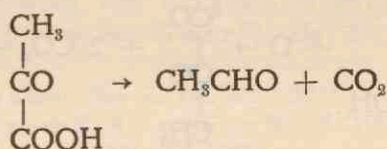
### DE VERGISTING VAN PYRODRUIVENZUUR.

In het voorgaande hoofdstuk hebben wij gezien, dat het primaire ontledingsproduct van melkzuur het pyrodruivenzuur is. Wij hebben daarvan toen aangenomen, dat het gesplitst werd in mierenzuur en azijnzuur. Deze reactie zou verbonden zijn aan de levende cel.

Wij hebben daarom, aansluitend aan de melkzuurvergisting, ook de vergisting van pyrodruivenzuur door de bacteriën der coli-typhusgroep ter hand genomen.

#### Literatuuroverzicht over de vergisting van pyrodruivenzuur.

Neubauer<sup>1)</sup> heeft ontdekt, dat het pyrodruivenzuur door levende gistcellen vergist wordt. De ontleding is een decarboxylatie:



Het ferment, dat deze werking uitoefent, is later door Neuberger<sup>2)</sup> met de naam carboxylase bestempeld.

Neuberger en medewerkers hebben eveneens vele pogin-

<sup>1)</sup> O. Neubauer en K. Fromherz: H. S. 70, 350 (1910/11).

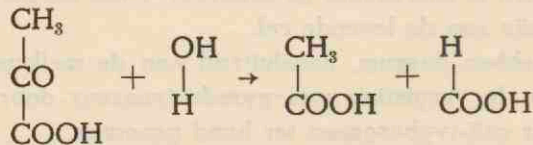
<sup>2)</sup> C. Neuberger: B. 44, 2479 (1911).

gen in het werk gesteld om een vergisting van het pyrodruivenzuur te verkrijgen. Aanvankelijk met weinig succes <sup>1)</sup>, slaagden zij er later eveneens in dit zuur te doen vergisten <sup>2, 3)</sup>.

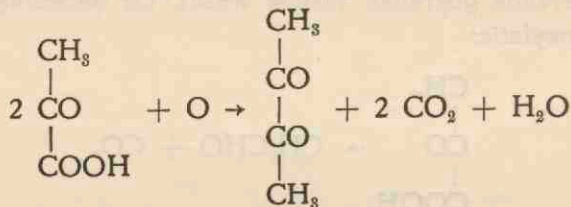
Neuberg <sup>4)</sup> ontdekt, dat rottingsbacteriën het pyrodruivenzuur niet decarboxyleeren, maar geheel andere producten doen ontstaan, nl. azijnzuur, waterstof en kooldioxyde. Deze twee laatste stoffen denkt hij zich ontstaan uit een splitsing van mierenzuur:



De vergistingsproducten zouden dus zijn mierenzuur en azijnzuur. Hij komt hierdoor tot de volgende vergelijking:



Mazé <sup>5)</sup> schrijft aan bepaalde organismen, die hij niet nader beschrijft, het vermogen toe pyrodruivenzuur te oxydeeren tot diacetyl:



1) C. Neuberg en A. Hildesheimer: *Bio. Z.* 31, 172 (1911).

2) C. Neuberg en L. Karczag: *Bio. Z.* 36, 69 (1911).

3) C. Neuberg en J. Kerb: *Bio. Z.* 53, 406 (1913).

4) C. Neuberg: *Bio. Z.* 67, 90, 122 (1914);

C. Neuberg en B. Rewald: *Bio. Z.* 71, 122 (1915).

5) P. Mazé: *C. r. Soc. de Biol.* 81, 1150 (1918).

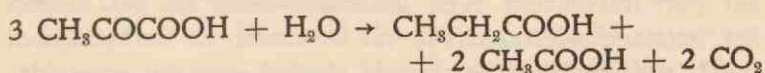


Nagayama<sup>1)</sup> ontdekt, dat een schimmel: *Aspergillus niger* mutante en ook andere schimmels het vermogen bezitten pyrodruivenzuur te decarboxyleeren.

Bij de inwerking van boterzuurbacteriën op pyrodruivenzuur vinden Neuberg en Arinstein<sup>2)</sup> eveneens mierenzuur en azijnzuur.

Nagai<sup>3)</sup> laat pyrodruivenzuur door *B. coli* vergisten bij aanwezigheid van natriumsulfiet. Zijn resultaat is, dat er acetaldehyde wordt gevormd.

Virtanen<sup>4)</sup> kweekt propionzuurbacteriën op pyrodruivenzuur. Deze organismen vergisten dit zuur tot propionzuur, azijnzuur en kooldioxyde:



Daarnaast ontstaat ook dikwijls barnsteenzuur.

Le Fèvre<sup>5)</sup> beschrijft in zijn dissertatie de inwerking van *B. coli* op pyrodruivenzuur. Er ontstaan volgens deze auteur: waterstof en kooldioxyde in de verhouding 3 : 5, azijnzuur en sporen acetylmethylcarbinol. Geen acetaldehyde, melkzuur en barnsteenzuur.

Bij de z.g. sulfietgisting ontstaat daarentegen met bovengenoemd organisme wel acetaldehyde.

Bij de verklaring van de gemengd-zure gisting nemen zoowel Neuberg en Gorr<sup>6)</sup> als Scheffer<sup>7)</sup> en

1) T. Nagayama : *Bio. Z.* 116, 303 (1921).

2) C. Neuberg en B. Arinstein : *Bio. Z.* 117, 269 (1921).

3) K. Nagai : *Bio. Z.* 141, 266 (1923).

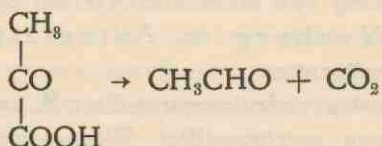
4) A. J. Virtanen : *Soc. Scient. Fenn.* 1, 36 (1923); 2, 20 (1925).  
Virtanen en Karström : *Acta Chim. Fenn.* 7, 17 (1931).

5) A. J. Le Fèvre : Bijdrage tot de kennis der bacteriële gisting, *Diss. Utrecht*, 1924.

6) C. Neuberg en G. Gorr : *Bio. Z.* 162, 490 (1925).

7) M. A. Scheffer : De suikervergisting door bacteriën der coli-groep, *Diss. Delft*, 1928.

Kluyver<sup>1)</sup> aan, dat het in het schema van deze vergisting voorkomende pyrodruivenzuur door de coligroep ontleed wordt onder afsplitsing van kooldioxyde:



Ook de Graaff<sup>2)</sup> neemt deze reactie op in het schema der gemengd-zure gisting.

Neuberg en Windisch<sup>3)</sup> vinden, dat azijnbacteriën het pyrodruivenzuur eerst decarboxyleeren en dat daarna het ontstane acetaldehyde tot azijnzuur en aethylalcohol wordt gedismuteerd, waarna de alcohol weer tot acetaldehyde wordt geoxydeerd.

Aan Gottschalk<sup>4)</sup> gelukt het, door middel van een bepaalde stam van *Rhizopus nigricans*, uit pyrodruivenzuur-calcium als eenige koolstofbron, in vrij groote hoeveelheden fumaarzuur te verkrijgen (tot 32 % van de theoretische hoeveelheid); daarnaast worden azijnzuur en sporen melkzuur gevormd. Als hem later deze vergisting niet meer gelukt, schrijft hij dit toe aan een degeneratie van de oorzakelijke schimmelcultuur<sup>5)</sup>.

Maurer<sup>6)</sup> kweekte propionzuurbacteriën op pyrodruivenzuur. Zijn resultaten stemmen overeen met die van

1) A. J. Kluyver: The chemical activities of microorganisms, Univ. of London Press, 1931.

2) W. C. de Graaff: Ned. Tijdschr. voor Hyg., Microbiol. en Serol., 1, 43 (1926).

3) C. Neuberg en F. Windisch: Bio. Z. 166, 454 (1925).

4) A. Gottschalk: H. S. 152, 136 (1926); 172, 314 (1927).

5) A. Gottschalk: H. S. 182, 311 (1929).

6) K. Maurer: Bio. Z. 191, 83 (1927).

Virtanen, nl. vorming van propionzuur, azijnzuur en kooldioxyde.

Bij de vergisting van pyrodruivenzuur door *B. coli* vindt Van den Bergh<sup>1)</sup> als eenige vergistingsproducten mierenzuur en azijnzuur.

Bij de sulfietgisting daarentegen zou de splitsing anders verlopen en wel als een gewone decarboxylatie, dus vorming van acetaldehyde en kooldioxyde.

Volgens Cook en Stephenson<sup>2)</sup> ontstaat bij de vergisting van pyrodruivenzuur door *B. coli* een stof, die geen aldehyde eigenschappen heeft (reactie van Rimini negatief), maar deze eigenschappen wel verkrijgt na verhitting met weinig alkali.

Quastel en Wooldridge<sup>3)</sup> vinden bij de vergisting van pyrodruivenzuur door *B. coli*: mierenzuur, lagere vetzuren en melkzuur.

Tikka<sup>4)</sup> geeft aan, dat bij de vergisting van pyrodruivenzuur door *B. coli* ontstaan: mierenzuur en azijnzuur. Het mierenzuur ondergaat hierna een ontleding tot waterstof en kooldioxyde. De hierbij ontstane waterstof reduceert het pyrodruivenzuur gedeeltelijk tot melkzuur.

### Eigen onderzoekingen.

Wij hadden de beschikking over een preparaat pyrodruivenzuur, afkomstig van Fraenkel en Landau, „reinst”. Alvorens dit te gebruiken, destilleerden wij het in vacuum. Kpt. 15 mm 62° C.

Dat dit zuur nog niet geheel zuiver was, blijkt uit de vol-

1) V. H. van den Bergh: Bijdrage tot de kennis van de biochemie der dysenteriebacteriën, Diss. Utrecht, 1928.

2) R. P. Cook en M. Stephenson: Biochem. J. 22, 1368 (1928).

3) J. H. Quastel en W. R. Wooldridge: Biochem. J. 23, 115 (1929).

4) J. Tikka: C. 1934, I, 2146.



gende gegevens: Getitreerd met 0.1 N natriumhydroxyde vonden wij een gehalte aan pyrodruivenzuur van 99.16 %, neergeslagen als 2-4 dinitrophenylhydrazon vonden wij 95.79 %.

Het gedestilleerde zuur neutraliseerden wij met een 5 % natriumcarbonaatoplossing.

De gebruikte voedingsbodem had de volgende samenstelling:

- 2 % pyrodruivenzuurnatrium
- 1 % pepton „Witte”
- 0.5 % secundair ammoniumfosfaat
- 0.5 % natriumchloride.

De  $P_H$  van deze oplossing bedroeg 7.4.

Deze voedingsbodem kan niet door hoge verhitting gesteriliseerd worden. Daarom filtreerden wij de vloeistof door een Seitz E.K. bacteriefilter.

Het spreekt vanzelf, dat het geheele filterapparaat, zowel hier als in de vroeger genoemde gevallen, van te voren gesteriliseerd werd. Wij deden dit door het in een autoclaaf 30 min op 120° C te verhitten.

Nadat wij gecontroleerd hadden, dat de oplossing steriel was, vulden wij hiermede steriele gistkolfjes en entten hierop de verschillende bacteriën der coli-typhusgroep, teneinde eventueele gasvorming na te gaan. Reeds na 24 uur waren in verscheidene van deze kolfjes gasbellen te zien. De gisting verliep snel. Na vijf dagen trad geen verandering in het gasvolume meer op. Wij onderzochten het gas volgens de in hoofdstuk IV besproken methode. Het resultaat is opgenomen in Tabel IX.

Tevens onderzochten wij de  $P_H$  van de uitgegiste vloeistof. Deze is eveneens in Tabel IX aangegeven.



TABEL IX.

Vergisting van pyrodruivenzuur door de coli-typhusbacteriën.  
Overzicht van de zuur- en gasvorming.

Stammen	PH (na 5 dagen)	Gas	Verhouding CO <sub>2</sub> : H <sub>2</sub>
B. coli no. 1 . . . . .	6.2	spoor	
B. " " 101 . . . . .	6.2	+	2 : 1
B. lactis aerogenes no. 102 . . . . .	6.6	+	1 : 1
B. pneumoniae Friedländer no. 7 . . . . .	7.4	+	1 : 9
B. " " 103 . . . . .	6.6	—	
B. paratyphi A no. " 8 . . . . .	6.2	—	
B. " " A " 12 . . . . .	6.4	+	1 : 1
B. " " A " 104 . . . . .	6.6	—	
B. " " B " 14 . . . . .	6.4	+	
B. " " B " 15 . . . . .	6.4	+	1 : 1
B. " " B " 105 . . . . .	6.6	+	3 : 1
B. " " C " 23 . . . . .	6.6	+	1 : 2
B. " " C " 26 . . . . .	6.6	+	1 : 2
B. " " C " 106 . . . . .	6.2	+	1 : 4
B. typhi murium no. 30 . . . . .	6.2	+	1 : 1
B. psittacosis no. 31 . . . . .	6.2	+	1 : 1
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	6.6	+	1 : 1
B. " " " 107 . . . . .	6.4	+	1 : 2
B. " " Aertrijck " 34 . . . . .	6.2	+	1 : 1
B. typhi no. 35 . . . . .	6.4	—	
B. " " 36 . . . . .	6.4	—	
B. " " 108 . . . . .	6.2	—	
B. dysenteriae Flexner no. 42 . . . . .	6.2	—	
B. " " " 46 . . . . .	6.2	—	
B. " " " 49 . . . . .	6.2	—	
B. " " Sonne " 50 . . . . .	6.0	—	
B. " " " 52 . . . . .	6.2	—	
B. " " " 55 . . . . .	6.0	—	
B. " " Schmitz " 109 . . . . .	6.2	—	
B. " " Hiss " 110 . . . . .	6.2	weinig	2 : 3
B. " " Shiga Kruse " 57 . . . . .	6.2	—	
B. " " " 59 . . . . .	7.2	—bact. †	
B. " " " 111 . . . . .	6.6	—	
B. faecalis alcaligenes no. 112 . . . . .	8.2	—	

Het blijkt, dat op een enkele uitzondering na, de voedingsoplossing sterk zuur is geworden, hetgeen al een aanwijzing is, dat de splitsing van het pyrodruivenzuur aanleiding is tot

het ontstaan van mierenzuur en azijnzuur. Eén van de beide zuren zal hierbij in de vorm van zijn natriumzout ontstaan, voor de ander is hiertoe geen gelegenheid. Het is ook volkomen begrijpelijk, dat het gasvolume na eenige dagen niet meer verandert. De hooge zuurgraad belemmert nl. de groei der bacteriën. Onverklaarbaar is echter het gedrag van *B. pneumoniae* no. 7. Wij kunnen wel aannemen, dat mierenzuur voor het grootste gedeelte ontleed wordt, maar hierbij ontstaan gelijke hoeveelheden kooldioxyde en waterstof. Het kooldioxyde kan ook niet als bicarbonaat in oplossing zijn, daar dit door het, dan vrije, azijnzuur ontleed wordt.

Bij een vergaande ontleding van het mierenzuur is het begrijpelijk, dat de  $P_H$  weer stijgen zal.

Wij hebben hierna nog een vergelijking willen maken van de invloed, die de verschillende kationen uitoefenen. Hiervoor gebruikten wij het calcium- en het natriumzout. Om deze twee zouten te kunnen vergelijken, lieten wij uit de voedingsbodem het fosfaat weg. Verder is de samenstelling, zooals wij die reeds boven aangaven. De  $P_H$  voor beide oplossingen bedroeg 7.4.

In Tabel X zijn de resultaten van deze proeven opgenomen. Er zijn in deze tabel verschillende feiten, die opvallen. In de eerste plaats: als wij deze tabel vergelijken met de vorige, springt het duidelijk in het oog, dat de  $P_H$  bij nagenoeg alle stammen hooger geworden is. Dat dit een gevolg is van de langere vergistingsduur wordt waarschijnlijk, als men ziet, dat de culturen, die slechts zeven dagen gegist hebben, ook een lagere  $P_H$  hebben.

In de tweede plaats: *B. pneumoniae* no. 7 heeft een geheel andere verhouding kooldioxyde : waterstof gekregen. Daarentegen zijn er weer andere stammen, die plotseling uitsluitend waterstof als gasvormig product geven. Hieruit volgt, dat de groote wisselingen niet te verklaren zijn uit een verschil in oplosbaarheid der beide gassen. Vooral bij de

TABEL X.

Overzicht over de vergisting van pyrodruivenzuurnatrium en -calcium door de bacteriën der coli-typhusgroep.

Stammen	Pyrodruivenzuurnatrium				Pyrodruivenzuurcalcium			
	Tijd	PH	CO <sub>2</sub> :H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	Tijd	PH	CO <sub>2</sub> :H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>
B. coli no. 1 . . . . .	16 d	8.2	geen gas	—	12 d	6.1	geen gas	—
B. " " 4 . . . . .	12 "	7.4	1 : 4	83 0/0	12 "	7.4	geen CO <sub>2</sub>	85 0/0
B. lactis aerogenes no. 5 .	12 "	7.3	1 : 4	86 0/0	12 "	7.4	2 : 5	90 0/0
B. " " " 6 .	16 "	7.2	geen CO <sub>2</sub>	86 0/0	16 "	7.3	1 : 3	83 0/0
B. pneumoniae Friedl. no. 7	7 "	7.2	1 : 2	89 0/0	12 "	6.6	2 : 5	91 0/0
B. paratyphi A no. 8 . .	16 "	7.0	geen CO <sub>2</sub>	82 0/0	12 "	6.2	geen gas	—
B. " A " 12 . .	7 "	6.4	2 : 3	87 0/0	16 "	6.2	geen gas	—
B. " B " 14 . .	7 "	7.0	2 : 3	91 0/0	14 "	6.0	1 : 2	88 0/0
B. " B " 15 . .	7 "	6.8	2 : 5	89 0/0	16 "	7.2	geen CO <sub>2</sub>	86 0/0
B. " C " 23 . .	16 "	8.4	1 : 8	81 0/0	16 "	7.4	1 : 6 CO <sub>2</sub>	—
B. " C " 26 . .	7 "	6.2	1 : 2	92 0/0	14 "	6.9	geen CO <sub>2</sub>	82 0/0
B. typhi murium " 30 . .	16 "	9.0	1 : 2	—	16 "	6.6	geen gas	—
B. psittacosis " 31 . .	12 "	6.8	1 : 2	85 0/0	12 "	7.4	geen CO <sub>2</sub>	82 0/0
B. " " 32 . .	7 "	6.6	1 : 3	81 0/0	12 "	7.4	2 : 7	94 0/0
B. enteritidis Gärtner no. 33	7 "	6.3	1 : 1	92 0/0	7 "	7.0	1 : 2	93 0/0
B. " Aertrijck " 34	16 "	7.0	1 : 2	82 0/0	16 "	7.4	2 : 7	87 0/0
B. typhi no. 35 . . . . .					12 "	6.2	geen gas	—
B. " " 36 . . . . .					12 "	6.1	" "	—
B. dys. Flexner no. 42					12 "	6.2	" "	—
B. " " " 49					12 "	6.3	" "	—
B. " Sonne " 50					12 "	6.0	" "	—
B. " " " 52					12 "	6.0	" "	—
B. " " " 55					12 "	6.0	" "	—
B. " Shiga Kruse " 57					12 "	6.3	" "	—
B. " " " " 59					12 "	6.2	" "	—



vergisting van het calciumzout treden zeer groote verschillen op. In de gevallen, dat geen gas is gevormd, is de  $P_H$ , in vergelijking met de andere wel-gasvormende stammen, aanmerkelijk lager. Het schijnt, dat de organismen het calciumformiaat minder snel aantasten dan het overeenkomstige natriumzout.

De percentages waterstof, opgenomen in de 5de en 9de kolom, slaan op de hoeveelheid waterstof, aanwezig in het gas, dat overblijft na absorptie van het kooldioxyde. Deze hoeveelheid waterstof werd in een eudiometer bepaald door menging met zuurstof enz., zooals in Hoofdstuk III beschreven is.

Dat het van kooldioxyde bevrijde gas geen 100 % waterstof is, kan het gevolg zijn van uit de voedingsoplossing meegesleepte lucht en van waterdamp.

Er zijn geen koolwaterstoffen bij de vergisting gevormd. Het gas, dat na de verbranding overblijft, bevat nl. geen kooldioxyde. Bij schudden met kaliumhydroxyde neemt het volume niet af.

Voor de groote verschillen in de gassenstelling, hebben wij echter geen verklaring kunnen vinden. Bij vergelijking van Tabel IX en X, krijgt men de indruk, dat de afwijkingen van de verhouding 1 : 1 grooter worden, naarmate de vergistingstijd langer duurt en men zou geneigd zijn, hierin een absorptie of een verbruik van het kooldioxyde te zien.

Wat het oploopen van de  $P_H$  betreft, hierin behoeft men niets abnormaals te zien. Het is een bekend feit, dat bacteriën een zuur of alkalisch milieu trachten te neutraliseeren door de vorming van basische resp. zure producten; in dit geval kunnen het basische stoffen uit de pepton zijn.

Vervolgens hebben wij een onderzoek ingesteld naar de andere niet-gasvormige vergistingsproducten.

De gang van het onderzoek was dezelfde als die bij de



melkzuurvergisting gebezigd, evenals de gebruikte reacties ter identificatie van de gevormde producten.

Wij gingen uit van de voedingsoplossing, die in het begin van dit hoofdstuk is beschreven, d.w.z. het calciumzout van het pyrodruivenzuur zonder fosfaat.

De volgende stammen werden in het onderzoek betrokken:

- B. coli no. 4
- B. lactis aerogenes no. 5
- B. pneumoniae no. 7
- B. paratyphi A no. 8
- B. paratyphi B no. 14
- B. paratyphi C no. 23
- B. typhi murium no. 30
- B. psittacosis no. 31
- B. enteritidis Gärtner no. 33
- B. enteritidis Aertrijck no. 34
- B. typhi no. 36
- B. dysenteriae Flexner no. 42
- B. dysenteriae Sonne no. 52
- B. dysenteriae Shiga Kruse no. 57.

Om de vergisting niet te belemmeren door een te groote hoeveelheid vrij zuur, voegden wij aan alle voedingsoplossingen gesteriliseerd krijt toe. Dit krijt is een bron van infectie; het is daarom noodzakelijk dit eerst gedurende één uur bij 180° C droog te steriliseeren. Het is niet voldoende als men het in peptonwater gedurende een half uur in de autoclaaf op 110° C verhit.

Alle vergistingen lieten wij gedurende 3 weken bij 37° C verlopen.

Het resultaat van de vergisting was:

#### 1) vluchtige neutrale producten:

De onder deze groep te rangschikken verbindingen: acceet-

aldehyde, aethylalcohol, diacetyl en acetylmethylcarbinol, hebben wij in geen der onderzochte gevallen aangetroffen.

## 2) vluchtige zuren:

*Mierenzuur* werd bij alle stammen gevonden, uitgezonderd bij *B. coli* no. 4. Een spoor mierenzuur vonden wij bij *B. lactis aerogenes* no. 5.

*Azijnzuur* kwam bij alle gistingen voor. Dat bij *B. coli* alleen azijnzuur ontstaat, zal waarschijnlijk hieraan te wijten zijn, dat alle mierenzuur gedurende de vergisting ontleed is. Dit is eerder aan te nemen, dan dat er een splitsing zou zijn in acetaldehyde en kooldioxyde, gevolgd door een hydroxydatie van het acetaldehyde.

## 3) niet vluchtige zuren:

*Melkzuur* vonden wij bij de navolgende organismen: *B. coli*, *B. lactis aerogenes*, *B. pneumoniae*, *B. paratyphi A*, *B. paratyphi B*, *B. paratyphi C*, *B. typhi murium*, *B. psittacosis*, *B. enteritidis Gärtner* en *B. enteritidis Aertrijk*.

Dit zijn juist de gasvormende bacteriën, zoodat het voor de hand ligt, het ontstaan van melkzuur hiermede in verband te brengen. Met een bacteriële werking heeft dit niets uitstaande; wij hebben alleen te maken met een chemische reductie van het pyrodruivenzuur door de gevormde waterstof.

Bij de andere, niet-gasvormende bacteriën hebben wij geen spoor melkzuur gevonden.

*Barnsteenzuur*. Van dit zuur vonden wij geringe hoeveelheden bij alle gebruikte stammen. Het is echter niet zeker, dat dit inderdaad door een biochemische reactie uit het pyrodruivenzuur afkomstig is. Uit een blanco peptonvoedingsbodem konden wij nl. eveneens geringe hoeveelheden barnsteenzuur isoleren.

Naar aanleiding van mededeelingen van Nagai<sup>1)</sup>, Le Fèvre<sup>2)</sup> en Van den Bergh<sup>3)</sup>, als zou bij de z.g. sulfietgisting van pyrodruivenzuur door de coli-typhus-bacteriën ook aceetaldehyde ontstaan, hebben wij deze proeven herhaald. Wij gebruikten hiervoor de volgende voedingsbodem:

- 3 % pyrodruivenzuurnatrium, resp. -calcium
  - 1 % pepton „Witte”
  - 0.5 % natriumchloride
  - 1 % gekristalliseerd natriumsulfiet ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{aq}$ )
- $\text{P}_\text{H} = 7.0.$

Ook deze oplossing werd gesteriliseerd door filtreren door een Seitz E.K. bacteriefilter.

Wij entten in wijde cultuurbuizen 20 cm<sup>3</sup> oplossing met een groote hoeveelheid bacteriën en onderzochten, na 18 dagen broeden bij 35° C. op de gebruikelijke wijze<sup>4)</sup>, de cultuur op aceetaldehyde.

Het resultaat is opgenomen in Tabel XI.

Het blijkt, dat in  $\pm 50\%$  van de gevallen aceetaldehyde ontstaat, zij het dan ook in zeer geringe hoeveelheden. Ook zou men uit de tabel kunnen opmaken, dat uit de natriumverbinding iets meer aldehyde gevormd wordt.

Wij hebben nog enkele andere stammen onderzocht; wij kweekten deze stammen alleen op het natriumzout en reageerden na 14 dagen op aceetaldehyde.

Voor het resultaat zie Tabel XII.

<sup>1)</sup> K. Nagai: Bio. Z. 141, 266 (1923).

<sup>2)</sup> A. J. le Fèvre: Bijdrage tot de kennis der bacteriële gisting, Diss. Utrecht, 1924.

<sup>3)</sup> V. H. van den Bergh: Bijdrage tot de kennis der biochemie der dysenteriebacteriën, Diss. Utrecht, 1928.

<sup>4)</sup> Zie bij Hoofdstuk IV, de sulfietgisting van melkzuur.

TABEL XI.

Resultaat van de sulfietgisting van pyrodruivenzuur door de coli-typhusbacteriën.

Stammen	Aceetaldehyde	
	Pyrodruivenzuurnatrium	Pyrodruivenzuurcalcium
B. coli no. 4 . . . . .	—	z.w.
B. lactis aerogenes no. 5 . . . . .	+	z.w.
B. pneumoniae no. 7 . . . . .	w.	sp.
B. paratyphi A no. 8 . . . . .	—	sp.
B. " B " 14 . . . . .	z.w.	sp.
B. " C " 23 . . . . .	z.w.	—
B. typhi murium no. 30 . . . . .	—	—
B. psittacosis no. 32 . . . . .	—	—
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	—	—
B. " Aertrijck no. 34 . . . . .	—	—
B. typhi no. 35 . . . . .	sp.	—
B. dysenteriae Flexner no. 42 . . . . .	z.w.	z.w.
B. " Sonne " 50 . . . . .	sp.	sp.
B. " Shiga Kruse no. 57 . . . . .	—	—

— = geen aceetaldehyde. sp. = spoor. z.w. = zeer weinig,  $\pm 1.5\%$   
 w. = weinig,  $\pm 2.5\%$ . + =  $\pm 4\%$ .

TABEL XII.

Resultaat van de sulfietgisting van pyrodruivenzuurnatrium door de coli-typhusbacteriën.

Stammen	Aceetaldehyde
B. coli no. 1 . . . . .	w.
B. lactis aerogenes no. 6 . . . . .	sp.
B. paratyphi A no. 12 . . . . .	—
B. " B " 15 . . . . .	sp.
B. " C " 26 . . . . .	—
B. psittacosis no. 31 . . . . .	sp.
B. typhi no. 36 . . . . .	—
B. dysenteriae Flexner no. 49 . . . . .	—
B. " Sonne " 52 . . . . .	z.w.
B. " Shiga Kruse no. 59 . . . . .	sp.



Zooals wij wel verwachtten, komt het resultaat overeen met dat in de vorige tabel. Er ontstaan slechts geringe hoeveelheden aceetaldehyde, waarbij in de verschillende ondergroepen nog variaties optreden.

Wij kunnen hieruit dus besluiten, dat door toevoeging van sulfiet de vergisting voor een klein gedeelte in de richting van de decarboxylatie wordt geleid, maar dat de normale vergistingsvorm toch blijft: de ontleding in mierenzuur en azijnzuur.

Bij de sulfietgisting namen wij nog het volgende waar: Bij het leiden van de aceetaldehyde-houdende stikstofstroom door het mengsel van nitroprussidnatrium en piperidine, ontstond in vele gevallen, naast of in plaats van de blauwe kleur, een roodbruine kleur. Wij hebben bij eenige vergistingen, waar deze kleurreactie vrij sterk was, het gasmengsel in een warme 2-4 dinitrophenylhydrazine oplossing geleid. Er ontstond hierbij echter geen neerslag, maar in het uitstroomende gas werd een papiertje, gedrenkt in de oplossing van *Rimini*, violet gekleurd. Wij zijn er niet in geslaagd deze vluchtige stof, die dus geen aldehyde of keton is, te identificeren. Wij vonden deze stof vnl. bij: *B. coli* no. 1, *B. lactis aerogenes* no. 5 en 6, *B. pneumoniae* no. 7, *B. paratyphi A* no. 12, *B. paratyphi B* no. 14 en 15, *B. paratyphi C* no. 23, *B. typhi murium* no. 30, *B. psittacosis* no. 31 en 32, *B. enteritidis Gärtner* no. 33, *B. enteritidis Aertrijck* no. 34, *B. typhi* no. 36 en *B. dysenteriae Flexner* no. 49.

Tot slot nog de volgende opmerking. *Neuberg* heeft de sulfietgisting toegepast om tusschenproducten, die anders door verdere omzetting aan onze waarneming zouden ontsnappen, vast te leggen. Bij het pyrodruivenzuur daarentegen is aceetaldehyde — indien gevormd — juist eindproduct. Bij de normale vergisting van dit zuur door de bacteriën der *coli*-typhusgroep ontstaat geen aceetaldehyde. Als deze stof

dus bij de sulfietgisting ontstaat, kan dit alleen, doordat de vergisting in een geheel andere richting wordt geleid. Bij de gewone alcoholische gisting ontstaat door sulfiettoevoeging weliswaar ook een ander eindproduct, maar dat is alleen het gevolg van het feit, dat door het vastleggen van het acetaldehyde de normale reactie niet kan verlopen, wat iets anders is dan de gedwongen omlegging bij de pyrodruivensulfietsulfietgisting.

## HOOFDSTUK VI.

### DE VERGISTING VAN MIERENZUUR.

Het is reeds sinds lang bekend, dat mierenzuur gemakkelijk vergist wordt. Braun<sup>1)</sup> heeft er echter op gewezen, dat formiaten eigenlijk geen goede koolstofbronnen zijn, daar groei hierop slechts optreedt, als organische stikstof i.c. een pepton aanwezig is. Braun werkte met organismen van de coli-typhusgroep, waarvan werkzaam zijn de coli- en paratyphusbacteriën.

Duclaux<sup>2)</sup> nam waar, dat gist in staat was een verdunde mierenzuuroplossing (0.04—0.07 %) te verbranden. Eveneens was *Tyrothrix tenuis* hiertoe in staat.

Maassen<sup>3)</sup> onderzocht een reeks bacteriën op hun vermogen om mierenzuur te splitsen. Hij verdeelt deze in drie soorten:

a) bacteriën, die gemakkelijk mierenzuur aantasten. Hieronder rangschikt hij: *Bac. acidi lactici*, *Bac. cyanogenes*, *Bac. diphtheriae columbarum*, *Bac. fluorescens*, *Bac. fluorescens putidus*, *Bac. prodigiosus*, *Bac. pyocyaneus* en *Proteus vulgaris*.

b) organismen, die mierenzuur minder sterk aantasten, waaronder volgens hem thuis behooren: *Bac. pneumoniae*

---

1) H. Braun en C. E. Cahn-Bronner: *Klin. Wochenschr.* 1, 1824, (1922); *Bio. Z.* 131, 226, 272 (1922).

2) M. E. Duclaux: *Ann. inst. Pasteur.* 6, 593 (1892).

3) A. Maassen: *Arb. Kaiserl. Gesundh.* XII, 340 (1896).

Friedländer, *Bact. coli commune*, *Bac. typhi abdominalis* en *Bact. lactis aerogenes*.

c) organismen, die mierenzuur niet aantasten. Hiertoe rekt hij: *Bac. diptheriae hominum* en *Bac. cholerae asiaticae*.

Daarna doen Pakes en Jollyman<sup>1)</sup> een uitgebreid onderzoek over de vergisting van mierenzuur.

Zij vergisten natriumformiaat met behulp van *B. enteritidis* Gärtner. Er wordt gas gevormd, bestaande uit kooldioxyde en waterstof. De hoeveelheid kooldioxyde is  $\pm 21\%$ . De rest van het kooldioxyde is als bicarbonaat gebonden:

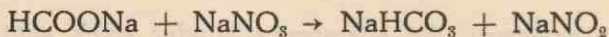


Zij hebben hun onderzoek met verscheidene andere bacteriën herhaald. Wij noemen enkele hiervan, ter vergelijking met het onderzoek van Massen.

Zij verkregen een positief resultaat bij: 80 stammen van *B. coli communis*, 2 stammen *B. enteritidis* Gärtner, 2 stammen *B. pneumoniae* Friedländer, 2 stammen *B. lactis aerogenes*, *B. cloacae*, *B. cholerae gallinarum*, *Proteus vulgaris* en *B. prodigiosus*.

Geen vergisting bij: *B. typhi abdominalis*, 2 stammen *B. pyocyaneus*, *B. fluorescens non-liquefaciens*, *B. cholerae suis*, *Vibrio cholerae*, e.a.

In een volgende publicatie<sup>2)</sup> vergisten zij natriumformiaat bij aanwezigheid van natriumnitraat. Er ontstaat nu in het geheel geen gas (dus ook geen kooldioxyde!). Het nitraat heeft als waterstofacceptor dienst gedaan:



Is echter een groote overmaat formiaat aanwezig, dan ont-

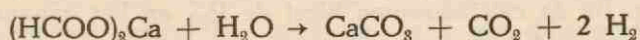
1) W. C. C. Pakes en W. H. Jollyman: *J. Chem. Soc.* 79, 386 (1901).

2) W. C. C. Pakes en W. H. Jollyman: *J. Chem. Soc.* 79, 459 (1901).



staan kooldioxyde en stikstof. Zij deden deze proeven met *B. coli communis* en *B. enteritidis* Gärtner.

Omeliansky<sup>1)</sup> isoleert een bacterie uit paardenfaeces, die hij de naam *B. formicicum* geeft en die eveneens calciumformiaat ontleedt in kooldioxyde en waterstof. Ook hier ontstaat vrij kooldioxyde in hoeveelheden tot 33.5 % toe. De bacterie is facultatief anaëroob.



Het eindresultaat stemt dus goed met de formule overeen.

De latere onderzoeken komen alle met de genoemde overeen in zoverre, dat er een splitsing in kooldioxyde en waterstof wordt aangenomen. Over het voorkomen van kooldioxyde in het gistingsgas wordt weinig medegedeeld. In zijn reeds meerdere malen aangehaalde dissertatie beschrijft Van den Bergh, dat hij bij de vergisting van mierenzuur alleen waterstof als gas krijgt. Het leek ons daarom nuttig deze proeven nog eens te herhalen.

Wij konden de mededeeling van Braun, dat de coli- en paratyphusorganismen niet op formiaat alleen kunnen groeien, bevestigen. Men mag hiertoe geen groote hoeveelheden bacteriën enten, daar in dat geval een gedeelte der bacteriën ten koste van het andere deel leeft.

Daarna maakten wij gebruik van een peptonhoudende voedingsbodem:

- 3 % natriumformiaat
- 1 % pepton „Witte”
- 0.5 % natriumchloride
- 0.5 % secundair ammoniumfosfaat.

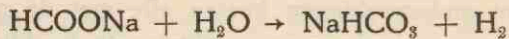
De  $P_{\text{H}}$  was 7.0.

1) W. Omeliansky: C. Bakt. 2. Abt. 11, 177, 256 (1904).

Wij maakten ook gebruik van het calciumzout en lieten dan het fosfaat weg. Van deze oplossing was de  $P_H$  7.2.

Bij de typhus- en dysenteriebacteriën namen wij nooit eenige vergisting waar. Bij de meeste andere bacteriën had een gasvorming plaats, die soms vrij gering was. Het gas bestond uitsluitend uit waterstof. Bij de natriumzouten liep de  $P_H$  sterk omhoog en in de oplossing was carbonaat aanwezig. Bij de calciumzouten bleef de  $P_H$  op het aanvangspeil, maar ook hier was carbonaat gevormd.

Het is duidelijk, dat de reactie als volgt verloopt:



In de volgende tabel (tabel XIII) geven wij de vorming van waterstof bij deze twee zouten weer. Wij lieten ter vergelijking het fosfaat uit de eerste oplossing weg.

TABEL XIII.

Vorming van waterstof bij de vergisting van formiaten door bacteriën der coli- en paratyphusgroep.

Stammen	Tijd in dagen; hoeveelheid in $\text{cm}^3$											$P_H$	
	Na 1	2	3	4	5	7	8	14	21	63			
<i>Natriumformiaat</i>													
B. coli no. 1 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.6
B. paratyphi C no. 26 . . .	5	22	26	28	30	31	31	35	35				9.0
B. psittacosis no. 32 . . .	5	24	40	50	55	57	58	66	70				9.0
B. lactis aerogenes no. 5 .	sp.	8	12	17	20	22	24	28	26				9.0
<i>Calciumformiaat</i>													
B. coli no. 1 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7.4
B. paratyphi C no. 26 . . .	10	26	36	43	53	57	61	78	83				7.2
B. psittacosis no. 32 . . .	7	27	47	47	51	55	56	62	65				7.4
B. lactis aerogenes no. 5 .	sp.	3	4	3	3	3	3	5	11	52			7.4

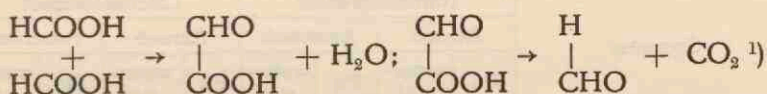
De culturen bevonden zich in groote gistkolven. Wij entten  $\pm 150 \text{ cm}^3$  met 2 afgeslibde, 24 uur oude agarculturen van de bacteriën.

Het blijkt, dat deze colibacterie een slechte gasvormer is. Ook bij de vergisting van pyrodruivenzuur had deze stam geen of slechts een spoor gas gevormd. *B. paratyphi C* vormt veel meer gas uit het calcium- dan uit het natriumzout. *B. psittacosis* geeft uit het calciumzout aanvankelijk ook meer gas, maar na acht dagen is daarentegen de gasvorming uit het natriumzout grooter. *B. lactis aerogenes* groeit slechts matig, maar past zich beter bij het natriumzout aan. Eerst na langere tijd schijnt het organisme ook het calciumzout te kunnen assimileren.

Het is merkwaardig, dat de gebruikte *B. coli* de  $P_H$  van de voedingsbodem met natriumformaat sterk verhoogt, zonder nochtans het mierenzuur te splitsen.

Bij de calciumzouten kon de vorming van carbonaat geconstateerd worden door de vorming van korsten calciumbicarbonaat, die de oppervlakte van de gistingstvloeistof bedekten.

Het uitblijven van gasvorming bij *B. coli* no. 1 zou het gevolg kunnen zijn van een reduceerende werking, b.v. van een reductie van het mierenzuur tot formaldehyde via glyoxylzuur:



Wij hebben hierop gereageerd met galluszuur en geconcentreerd zwavelzuur <sup>2)</sup> en tevens met morfine en geconcentreerd zwavelzuur <sup>3)</sup>. Het resultaat was negatief. Dit was ook wel te verwachten. Uit de biochemische eigenschappen

<sup>1)</sup> Deze hypothese is reeds geuit door O. Loew: C. Bakt. 1 Abt. 12, 462 (1892).

<sup>2)</sup> E. Chierici: C. 1931, II, 95.

<sup>3)</sup> T. Piccoli, C. 1934, I, 2208.



van deze bacterie <sup>1)</sup> blijkt duidelijk, dat dit organisme een niet-gasvormer is. Ook bij eenige gasvormers hebben wij tevergeefs naar formaldehyde gezocht. Wij hebben trouwens nooit een ander vergistingsproduct gevonden dan de beide genoemde gasvormige, nl. waterstof en kooldioxyde.

Bij het onderzoek van het gevormde gas kregen wij voor de hoeveelheid waterstof waarden, die overeenkomen met die, gevonden bij de pyrodruivenzuurvergisting. Dit was eveneens het geval bij de anaërobe mierenzuurvergisting. Wij zullen er daarom van afzien, deze in extenso weer te geven. Bij de anaërobe vergisting, die practisch geheel verliep als de aërobe vergisting, deed zich nog het merkwaardige feit voor, dat de gasvorming bij het natriumzout grooter was dan bij het calciumzout, terwijl dit bij de aërobe vergisting in het algemeen juist tegengesteld was.

In Tabel XIV is het resultaat opgenomen van een vergisting, die na 14 dagen stopgezet is.

TABEL XIV.

Vergelijking van de hoeveelheid waterstof, ontstaan bij de aërobe en anaërobe vergisting van natrium- en calciumformiaat.

Stammen	Natriumformiaat				Calciumformiaat			
	Aëroob		Anaëroob		Aëroob		Anaëroob	
	P <sub>H</sub>	waterstof	P <sub>H</sub>	waterstof	P <sub>H</sub>	waterstof	P <sub>H</sub>	waterstof
B. coli no. 4 . . . . .	8.2	47 cm <sup>3</sup>	8.8	93 cm <sup>3</sup>	7.4	102 cm <sup>3</sup>	7.6	72 cm <sup>3</sup>
B. lactis aërogenes no. 5 .	8.8	14 "	8.8	50 "	7.6	19 "	8.0	4 "
B. pneumoniae Frl. no. 7 .	7.0	22 "	8.7	51 "	7.6	20 "	8.0	27 "
B. paratyphi A no. 12 . .	8.5	34 "	8.7	26 "	7.4	48 "	8.0	5 "
B. " B " 14 . . . . .	9.0	60 "	8.8	68 "	7.4	78 "	7.8	56 "
B. " C " 26 . . . . .	8.7	16 "	8.8	60 "	7.2	116 "	8.0	77 "
B. typhi murium no. 30 .	9.0	26 "	8.6	4 "	7.6	27 "	8.0	34 "
B. psittacosis no. 31 . . .	8.0	15 "	8.8	52 "	7.5	46 "	7.9	35 "
B. enteritidis Gärtner no. 33	9.0	33 "	8.8	"	7.5	40 "	7.8	76 "
B. " Aertrijck " 34	8.8	30 "	9.0	52 "	6.4	38 "	8.0	24 "

1) Zie Hoofdstuk II.



De anaërobe vergisting werd uitgevoerd in het apparaat, dat reeds eerder in Hoofdstuk IV beschreven is.

Het is ons, zooals reeds boven medegedeeld is, nooit gelukt, kooldioxyde in het gistingsgas aan te toonen, wat vroegere onderzoekers als P a k e s en J o l l y m a n en ook O m e l i a n s k y wel vinden. Trouwens, het lijkt eenigszins onwaarschijnlijk, dat dit gebeurt. Wordt natriumformiaat gesplitst, dan ontstaat er naast kooldioxyde tevens natriumhydroxyde, welke stoffen zich dadelijk tot natriumbicarbonaat zullen verbinden.

De formule van O m e l i a n s k y klopt goed met het experiment; waarschijnlijk is het proces ook hier via het bicarbonaat verlopen.

## HOOFDSTUK VII.

### DE VERGISTING VAN EENIGE ANDERE OXYZUREN.

De bedoeling hiervan was, na te gaan, in hoeverre behalve melkzuur ook andere oxyzuren door de bacteriën der colityphusgroep worden aangetast, vnl., of ook hier de hydroxylgroep wordt geoxydeerd.

Wij hebben hiervoor gekozen: glycolzuur ( $C_2$ ),  $\beta$ -oxypropionzuur ( $C_3$ ),  $\alpha$ -oxyboterzuur en  $\beta$ -oxyboterzuur ( $C_4$ ).

#### A. Glycolzuur.

Over de vergisting van dit zuur komen in de literatuur slechts zeer weinig gegevens voor.

Banning<sup>1)</sup> ziet, dat azijnbacteriën op glycolzuur gekweekt, hieruit oxaalzuur doen ontstaan.

Volgens Harden en Norris<sup>2)</sup> wordt glycolzuur door gedroogde gist, in tegenwoordigheid van methyleenblauw, slechts langzaam geoxydeerd.

Raistrick en Clark<sup>3)</sup> zeggen, dat *Aspergillus niger* goed op glycolzuur groeit. Wat de stofwisselingsproducten betreft, zeggen deze onderzoekers alleen, dat geen oxaalzuur ontstaat.

1) F. Banning: C. Bakt. 2. Abt. 8, 395, 520, 560 (1902).

2) A. Harden en R. V. Norris: Biochem. J. 9, 330 (1915).

3) H. Raistrick en A. B. Clark: C. 1920, I, 686; Biochem. J. 13, 329 (1919).

Le Fèvre<sup>1)</sup> ontdekt, dat de colibacteriën bij de sulfietgisting van glycolzuur uit dit zuur aceetaldehyde vormen.

Aan Challenger, Subramaniam en Walker<sup>2)</sup> gelukt het glycolzuurammonium met behulp van *Aspergillus niger* in oxaalzuur om te zetten. Gebruikten zij het calciumzout, dan konden deze onderzoekers ook glyoxylzuur aantoonen.

Butterworth en Walker<sup>3)</sup> maken de afbraak van azijnzuur door *B. pyocyaneum* via glycolzuur en glyoxylzuur waarschijnlijk.

Bernhauer en Siebenäuger<sup>4)</sup> kweeken *Aspergillus niger* op glycolzuurnatrium. Er ontstaan citroenzuur en oxaalzuur.

#### *Eigen onderzoek.*

Wij gingen uit van een voedingsbodem met de volgende samenstelling.

- 2 % glycolzuur, geneutraliseerd met ammonia
- 0.5 % secundair ammoniumfosfaat
- 1 % pepton „Witte”
- 0.5 % natriumchloride.

De  $P_H$  stelden wij vast op 7.2.

Wij entten op deze oplossing de verschillende reeds meer malen genoemde vertegenwoordigers der coli-typhusbacteriën. Het bleek ons al spoedig, dat dit zuur geen geschikte voedingsbodem is, daar alleen de coliorganismen zich hierop

<sup>1)</sup> A. J. le Fèvre: Bijdrage tot de kennis der bacteriële gisting. Diss. Utrecht, 1924.

<sup>2)</sup> F. Challenger, V. Subramaniam en T. K. Walker: J. Chem. Soc. 130, 200 (1927).

<sup>3)</sup> J. Butterworth en T. K. Walker: Biochem. J. 23, 926 (1929).

<sup>4)</sup> K. Bernhauer en H. Siebenäuger: Bio. Z. 240, 231 (1931).

vermeerderden. Wij hebben het onderzoek toen alleen met *B. coli* no. 4 voortgezet.

Na 14 dagen was de cultuur sterk alkalisch geworden. Dat dit het gevolg was van het ontstaan van carbonaten, konden wij aantonen door de oplossing met verdund zwavelzuur aan te zuren en een koolzuurvrije stikstofstroom door de vloeistof te leiden. Het uitstroomende gasmengsel deed in een heldere barytoplossing een neerslag ontstaan.

Wij konden geen vluchtige en niet-vluchtige, neutrale verbindingen, noch vluchtige of niet-vluchtige zuren aantonen.

Dit leidde er toe, dat wij de mogelijkheid van een totale verbranding van het glycolzuur in overweging namen. Hiertoe was het noodig de hoeveelheid ontstaan kooldioxyde quantitatief te bepalen.

Wij gingen uit van de volgende oplossing:

- 2.500 % glycolzuur, geneutraliseerd met ammonia
- 0.175 % primair kaliumfosfaat
- 0.96 % secundair natriumfosfaat
- 0.5 % secundair kaliumfosfaat
- 0.5 % natriumchloride
- 1 % pepton „Witte”,
- aangevuld tot 100 cm<sup>3</sup>.

Deze oplossing entten wij met *B. coli* no. 4 en broedden gedurende 6 weken bij 35° C, waarna wij de vergisting stopzetten.

In een afzonderlijke proef hadden wij geconstateerd, dat bij deze vergisting geen gasvorming optreedt. Al het kooldioxyde is dus als carbonaat of bicarbonaat gebonden.

De wattenprop, die de vergistingskolf afsloot, vervingen wij door een rubber stop, waarin drie doorboringen; hierdoor gingen een inleidbuis, reikend tot aan de bodem, een afvoerbuis, vlak onder de stop uitmondend en een druppel-trechter. Het afvoerbuisje verbonden wij met twee wijde,



achter elkaar geschakelde, aan één zijde toegesmolten buizen, beide voorzien van inleid- en afvoerbuis. Deze wijde buizen vulden wij resp. met 20 en 10 cm<sup>3</sup> verzadigde barytoplossing. Het laatste afvoerbuisje was met een natronkalkbuisje verbonden. De inleidbuis in de gistkolf verbonden wij, via een waschfleschje, gevuld met 50 % kaliumhydroxydeoplossing, met een stikstofcylinder. De druppeltrechter vulden wij met 25 % zoutzuur. Nu lieten wij het zoutzuur in de gistkolf vloeien en dreven onder zachte verwarming het vrijgemaakte kooldioxyde met een stikstofstroom in de barytoplossing. Nadat alle kooldioxyde gebonden was, titreerden wij de barytoplossing met 0.1 N zoutzuur.

Voor 30 cm<sup>3</sup> barytoplossing zijn noodig 97.14 cm<sup>3</sup> zoutzuur.

Idem na doorleiden van kooldioxyde 84.92 cm<sup>3</sup> zoutzuur.

Deze vermindering van 12.22 cm<sup>3</sup> zoutzuur komt overeen met 26.4 mg kooldioxyde.

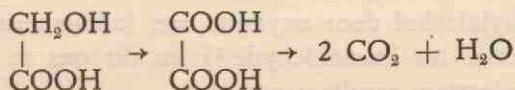
Een andere cultuur leverde, eveneens met *B. coli* no. 4, 27.9 mg kooldioxyde.

Uit 100 cm<sup>3</sup> van een 3 % glycolzuurnatriumoplossing met 0.5 % secundair ammoniumfosfaat, 0.5 % natriumchloride en 1 % pepton „Witte”, verkregen wij, na 4 weken broeden met *B. coli* no. 4, 64.4 mg kooldioxyde.

Het is mogelijk, dat het glycolzuur totaal verbrand wordt; de hoeveelheden hiervan zijn echter zóó gering, dat wij kunnen zeggen, dat deze stof practisch niet vergist wordt.

Voor de oxydatie zouden de volgende vier reacties in aanmerking kunnen komen.

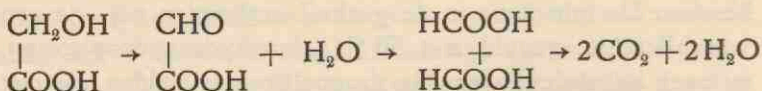
a) een directe oxydatie tot oxaalzuur en verbranding hiervan tot kooldioxyde en water:



Wij hebben echter bij de vergistingsproducten geen oxaal-

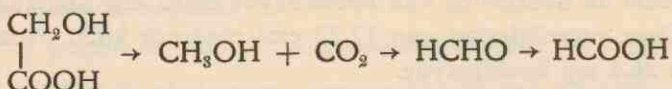
zuur aangetroffen. In Hoofdstuk VIII zal nog nader over de vergisting van oxaalzuur worden gesproken.

b) oxydatie tot glyoxylzuur en hydrolytische splitsing tot mierenzuur, dat verbrand wordt tot kooldioxyde en water:



Wij hebben echter noch glyoxylzuur, noch mierenzuur gevonden, terwijl mierenzuur niet totaal verbrand wordt, maar gesplitst in kooldioxyde en waterstof (zie Hoofdstuk VI).

c) als derde mogelijkheid is te denken aan een decarboxylatie tot methylalcohol, gevolgd door een oxydatie tot formaldehyde en mierenzuur:



Ook van deze tusschenproducten hebben wij niets kunnen aantonen.

d) een directe verbranding zonder tusschentrappen. Voor deze laatste meening pleit het feit, dat wij bij de anaërobe vergisting van glycolzuur door verschillende stammen der coli-typhusgroep geen groei waarnamen.

Voor deze verschillende stoffen gebruikten wij de volgende reacties:

op oxaalzuur met calciumacetaat. Er ontstond geen neerslag; ook onder het microscoop zagen wij geen kristallen;

op mierenzuur met sublimaat: resultaat negatief.

op glyoxylzuur met 2-4 dinitrophenylhydrazine. Fehling's oplossing werd niet gereduceerd;

op methylalcohol door oxydatie met kaliumpermanganaat en fosforzuur tot formaldehyde<sup>1)</sup> en dit gas te leiden in dimedonoplossing: resultaat negatief.

<sup>1)</sup> O. Mohr: Mik. 8, 156 (1930).

op formaldehyde met geconcentreerd zwavelzuur en galluszuur<sup>1)</sup>, eveneens met negatief resultaat.

Le Fèvre<sup>2)</sup> heeft medegedeeld, dat bij de sulfietgisting van glycolzuur aceetaldehyde ontstaat. Bij de gewone gisting van *B. coli* no. 4 hadden wij deze stof niet gevonden. De vorming daarvan moet wel langs een ingewikkelde weg verlopen, daar een sterke reductie noodig is om uit glycolzuur aceetaldehyde te verkrijgen. In de volgende tabel (tab. XV), is het resultaat opgenomen van de proeven, die wij gedaan hebben. Inderdaad is het niet te ontkennen, dat bij de aërobe sulfietgisting aceetaldehyde ontstaat. Wij hebben ons er van overtuigd, dat dit niet zijn oorzaak in de gebruikte pepton vindt.

Een voedingsbodem, bestaande uit pepton + sulfiet + fosfaat + keukenzout en geënt met de verschillende colityphusbacteriën, geeft nl. geen reactie op aceetaldehyde.

Echter, gezien het resultaat van deze sulfietgisting bij pyrodruivenzuur (Hoofdstuk V), vragen wij ons af, of wij in het toegevoegde sulfiet wel alleen een neutraal en onschuldig middel tot het vastleggen van aldehyde moeten zien en of het niet veeleer zèlf een rol (en mogelijk een groote rol) speelt. Het schijnt ons, dat het niet juist is, de conclusies, gebaseerd op een sulfietgisting, zonder meer over te brengen op de gewone, normale gisting<sup>3)</sup>.

---

1) E. Chierici: C. 1931, II, 95.

2) A. J. le Fèvre: Bijdrage tot de kennis der bacteriële gisting, Diss. Utrecht, 1924.

3) zie ook: H. Vinkenborg: Die Bedeutung des Acetaldehyds bei der alkoholischen Gärung, Diss. Utrecht, 1931.



TABEL XV.

Overzicht over het ontstaan van acetaldehyde bij de vergisting van glycolzuur door de coli-typhusbacteriën.

Stammen	Aëroob			Anaëroob		
	Uit glycolzuur- Na + ammonium- fosfaat	Uit glycolzuur- Na + ammonium- fosfaat + Na- sulfaat	Uit glycolzuur- Na + ammonium- fosfaat + pepton	Uit glycolzuur- Na + ammonium- fosfaat + pepton + Na sulfaat	Uit glycolzuur- Na + ammonium- fosfaat + pepton	Uit glycolzuur- Na + ammonium- fosfaat + pepton + Na-sulfaat
B. coli no. 1 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. " " 2 . . . . .	—	—	sp.	sp.	—	—
B. " " 3 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " 4 . . . . .	—	—	—	z.w.	—	—
B. paratyphi A no. 8 . . . . .	—	sp.	—	z.w.	—	—
B. " A " 11 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. " A " 12 . . . . .	—	z.w.	—	z.w.	—	—
B. " A " 13 . . . . .	—	—	—	z.w.	—	—
B. " B " 14 . . . . .	—	sp.	—	sp.	—	—
B. " B " 15 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " B " 17 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. " B " 18 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " C " 23 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. " C " 25 . . . . .	—	—	sp.	w.	—	—
B. " C " 26 . . . . .	—	—	—	w.	—	—
B. " C " 28 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. typhi murium " 30 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. psittacosis " 31 . . . . .	—	sp.	—	sp.	—	—
B. " " 32 . . . . .	—	—	—	w.	—	—
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. " Aertrijck " 34 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. typhi no. 35 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. " " 36 . . . . .	—	—	sp.	sp.	—	—
B. " " 38 . . . . .	—	—	—	sp.	—	—
B. " " 41 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. dys. Flexner no. 42 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " " 43 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " " 45 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " " 49 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " Sonne " 50 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " " 52 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " " 53 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " " 54 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " Shiga Kruse " 57 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " " 58 . . . . .	—	—	—	—	—	—
B. " " " 59 . . . . .	—	—	—	—	—	—

— = geen acetaldehyde  
 sp. = spoor  
 z.w. = zeer weinig,  $\pm 1.5\%$   
 w. = weinig,  $\pm 2.5\%$



## B. $\alpha$ -Oxyboterzuur.

Dit zuur vertoont de meeste overeenkomst met het melkzuur. In de literatuur hebben wij echter niets gevonden over vergisting van  $\alpha$ -oxyboterzuur.

Wij gingen uit van de volgende voedingsoplossing:

3 %  $\alpha$ -oxyboterzuurcalcium (een zuiver preparaat van  
Fraenkel en Landau)

1 % pepton „Witte”

0.5 % natriumchloride.

De  $P_H$  van deze oplossing was 6.8.

Het ging er ons voornamelijk om, na te gaan of dit  $\alpha$ -oxyzuur, evenals melkzuur, tot ketonzuur geoxydeerd wordt.

Wij entten de oplossing daarom met de verschillende bacteriën der coli-typhusgroep in cultuurbuizen, bevattende  $\pm 20 \text{ cm}^3$  van deze vloeistof en broedden bij  $35^\circ \text{ C}$ .

Na 14 dagen reageerden wij op de aanwezigheid van het ketonzuur met een oplossing van 2-4 dinitrophenylhydrazine (2 g 2-4 dinitrophenylhydrazine in  $120 \text{ cm}^3$  2 N zoutzuur).

In Tabel XVI is het resultaat hiervan weergegeven.

In de derde kolom van deze tabel is aangegeven de vergisting van dezelfde oplossing door middel van bacteriën, die vóór het enten met toluol gedood waren. Zooals reeds bij de melkzuurvergisting beschreven is, controleerden wij de bacterie-emulsie eerst op de aanwezigheid van levende kiemen, opdat wij er zeker van zouden zijn alleen met enzymwerking te doen te hebben. Ook deze oplossingen werden na 14 dagen broeden bij  $35^\circ \text{ C}$  onderzocht.

Uit de tabel ziet men duidelijk, dat de oplossingen, die met gedooide bacteriën waren geënt, in het algemeen meer neerslag geven dan die met levende organismen. Echter, ook het tegengestelde komt enkele malen voor.

Daar dit slechts één enkele reeks van waarnemingen be-

TABEL XVI.

Overzicht over de vergisting van  $\alpha$ -oxyboterzuur door de bacteriën der coli-typhusgroep.

Stammen	neerslag met 2-4 dinitrophenylhydrazine	
	met levende bacteriën	met gedooide bacteriën
B. coli no. 1 . . . . .	±	+
B. " " 4 . . . . .	+	++++
B. lactis aerogenes no. 5 . . . . .	-	-
B. " " 6 . . . . .	-	+
B. pneumoniae Friedl. no. 7 . . . . .	±	-
B. paratyphi A no. 8 . . . . .	-	++
B. " A " 12 . . . . .	++	+
B. " B " 14 . . . . .	+	+++
B. " B " 15 . . . . .	+	++++
B. " C " 23 . . . . .	+	-
B. " C " 26 . . . . .	+	+
B. typhi murium " 30 . . . . .	+	+
B. psittacosis " 31 . . . . .	+	++++
B. " " 32 . . . . .	+	++++
B. enteritidis Gärtner no. 33 . . . . .	+	-
B. " Aertrijck " 34 . . . . .	+	+
B. typhi no. 35 . . . . .	+	+
B. " " 36 . . . . .	±	-
B. dys. Flexner no. 42 . . . . .	+	+
B. " " 49 . . . . .	+	+
B. " Sonne " 50 . . . . .	+	+
B. " " 52 . . . . .	+	+++
B. " Shiga Kruse " 57 . . . . .	+	-
B. " " 59 . . . . .	±	-

++++ = zeer veel neerslag

+++ = veel neerslag

++ = vrij veel neerslag

+ = neerslag

± = spoor neerslag

- = geen neerslag

treft, is het niet mogelijk te zeggen of dit een toevalligheid is, dan wel of het enzymcomplex door de toluol of anderszins verstoord is.

Het neerslag hebben wij volgens de, bij het pyrodruivenzuurdinitrophenylhydrazon reeds beschreven, methode gereinigd. De stof loste slechts onder verwarming in 1 N natriumcarbonaat op; bij afkoelen kwam zij er in roodbruine amorfe vlokken weer uit. Wij filtreerden de warme oplossing en sloegen in het filtraat, door voorzichtig aanzuren met verdund zoutzuur, het dinitrophenylhydrazon weer neer. Daar het in natriumcarbonaat oplosbaar is, bewijst het een carboxylgroep te bezitten. Nadat wij het afgefiltreerd en uitgewasschen hadden met verdund zoutzuur en water, droogden wij het eerst tusschen filtreerpapier, daarna in een exsiccator. De fraaie gele kleur, die het aanvankelijk had, veranderde hierbij in een geelbruine tint. Het had een scherp smeltpunt, dat wij vaststelden op  $175^{\circ}$  C.

Helaas hadden wij niet de beschikking over een zuiver preparaat  $\alpha$ -ketoboterzuur, zoodat wij een mengsmeltpunt van het dinitrophenylhydrazon hiervan met het door ons verkregen product niet konden bepalen.

Wij hebben tenslotte nog nagegaan, welke de eindproducten van deze vergisting zijn. Hiertoe entten wij in een Erlenmeyerkolf  $200\text{ cm}^3$  van de bovengenoemde oplossing met één afgeslibde agarcultuur van *B. coli* no. 4 en analyseerden de vloeistof na 14 dagen broeden bij  $35^{\circ}$  C volgens de methode in Hoofdstuk IV beschreven.

Vluchtige neutrale verbindingen waren niet aanwezig.

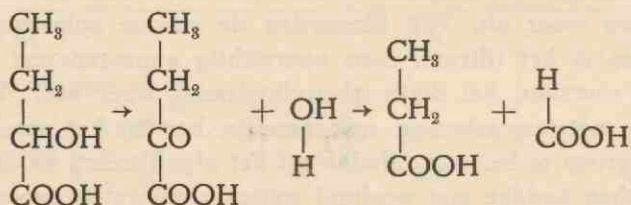
Vluchtige zuren: Wij vonden *mierenzuur* en *propionzuur*.

Het eerste zuur toonden wij aan door de reductie van een sublimaatoplossing. De hoeveelheid mierenzuur was niet zeer groot; het zuur ondergaat echter door *B. coli* weer een splitsing, zoodat deze geringe hoeveelheid ons niet verwondert.

Propionzuur toonden wij aan als p-phenylphenacylester. Smeltpunt 102° C.

In de niet-vluchtige zuren vonden wij nog groote hoeveelheden onvergist  $\alpha$ -oxyboterzuur.

De vergisting van  $\alpha$ -oxyboterzuur kunnen wij ons nu als volgt voorstellen:



De eerste reactie, nl. tot  $\alpha$ -ketoboterzuur, verloopt enzymatisch. Wij zien dus, dat het verloop der gisting overeenstemt met de ontleding van melkzuur.



### C. $\beta$ -Oxyboterzuur.

Dit zuur speelt een belangrijke rol bij de oxydatie van boterzuur tot acetylazijnzuur. Volgens de bekende regel van Knoop en Dakin grijpt de oxydatie van vetzuren in het dierlijk organisme op de  $\beta$ -plaats aan. De eerste trap voert tot  $\beta$ -oxyboterzuur, welke stof dan ook in de urine van diabetici wordt aangetroffen; de tweede trap gaat tot acetylazijnzuur, dat ook weer verdere ontledingen — tot aceton — kan ondergaan. Wat echter de ontleding van dit  $\beta$ -oxyboterzuur door micro-organismen betreft, hierover zijn slechts zeer schaarsche mededeelingen te vinden.

Bierry en Portier<sup>1)</sup> isoleeren een bacterie uit de testis van een duif, die, op  $\beta$ -oxyboterzuur gekweekt, hieruit aceetaldehyde en aceton vormt. Hun voedingsbodem bevatte 1% alkalizout van  $\beta$ -oxyboterzuur + pepton + nitraten. De reactie gaat waarschijnlijk via  $\beta$ -ketoboterzuur.

Raistrick en Clark<sup>2)</sup> zien, dat *Aspergillus niger* goed op  $\beta$ -oxyboterzuur groeit. Van de vergistingsproducten vertellen zij alleen, dat er geen oxaalzuur gevormd wordt.

Kühnau<sup>3)</sup> vindt bij de inwerking van leverfermenten op  $\beta$ -oxyboterzuur: barnsteenzuur, fumaarzuur, appelzuur, acetylazijnzuur, aceetaldehyde, pyrodruivenzuur, 1-3 butyleenglycol en sporen azijnzuur. Hoewel wij hier niet met micro-organismen te doen hebben, geven wij deze publicatie toch om een indruk te geven van het fermentatief vermogen van de lever.

Coppock, Subramaniam en Walker<sup>4)</sup> vinden, dat *Aspergillus niger* het  $\beta$ -oxyboterzuur oxydeert tot acetylazijnzuur en dit laatste zuur decarboxyleert tot aceton.

1) H. Bierry en P. Portier: C. r. 166, 1055 (1918).

2) H. Raistrick en A. B. Clark: Biochem. J. 13, 329 (1919).

3) J. Kühnau: Bio. Z. 200, 29 (1928).

4) P. D. Coppock, V. Subramaniam en T. K. Walker: J. Chem. Soc. 131, 1422 (1928).

Wij gingen uit van de volgende voedingsoplossing:

- 2 %  $\beta$ -oxyboterzuurcalcium
- 1 % pepton „Witte”
- 0.5 % natriumchloride.

De  $P_H$  was 7.2.

Wij entten dezelfde bacteriën, die ook voor het onderzoek naar de vergisting van  $\alpha$ -oxyboterzuur gebruikt zijn, in wijde cultuurbuizen op deze voedingsbodem en onderzochten na drie weken broeden bij 35° C met 2-4 dinitrophenylhydrazine of een carbonylgroep gevormd was, i.c. acetylazijnzuur.

Hetzelfde deden wij ook met bacteriën, die wij eerst met behulp van toluol gedood hadden.

Bij de laatstgenoemde proeven kregen wij bij alle stammen een negatief resultaat. Bij de vergisting met levende organismen kregen wij een zeer zwakke reactie bij de navolgende stammen:

- B. coli no. 1 en no. 4
- B. lactis aerogenes no. 5 en no. 6
- B. pneumoniae no. 7
- B. paratyphi C no. 26
- B. typhi murium no. 30.

De hoeveelheden waren echter te gering om deze nader te kunnen identificeren.

**D.  $\beta$ -oxypropionzuur.**

Over dit zuur hebben wij in de literatuur geen gegevens gevonden, wat betreft een vergisting door micro-organismen.

Wij maakten een voedingsbodem, die bestond uit:

2 %  $\beta$ -oxypropionzuurcalcium (een preparaat  
van Fraenkel en Landau)

1 % pepton „Witte”

0.5 % natriumchloride.

Wij entten deze oplossing met *B. coli* no. 4 en onderzochten na 6 weken broeden bij 35° C. De cultuur sloeg zeer slecht aan. Wij konden geen vergistingsproducten vinden, waaruit wij concludeeren, dat deze stof niet geschikt is als koolstofbron. Daar de configuratie van dit zuur het meest met glycolzuur overeenstemt — beide hebben een eindstandige hydroxylgroep — is deze structuur blijkbaar moeilijk voor de bacteriën toegankelijk. Met zekerheid valt hier natuurlijk nog niets over te zeggen; slechts een uitgebreid onderzoek zal hierover licht kunnen verspreiden.

## HOOFDSTUK VIII.

### DE VERGISTING VAN OXAALZUUR.

In verband met een mogelijke snelle vergisting van oxaalzuur, ontstaan bij de vergisting van glycolzuur, hebben wij ook van oxaalzuur de invloed nagegaan, hierop uitgeoefend door *B. coli*.

In de literatuur <sup>1)</sup> staan al zeer weinig gegevens over de vergisting van oxaalzuur aangegeven en deze wijzen alle op een zeer moeilijke vergisting.

Wij hebben slechts één geval gevonden, waarbij het oxaalzuur werd aangegrepen. *Bac. extorquens* <sup>2)</sup>, een uit de excrementen van regenwormen verkregen organisme, splitst oxaalzuur oxydatief, met behulp van luchtzuurstof, in carbonaten.

Ook Scholder en medewerker <sup>3)</sup> meenen een oxalaatvergistende bacterie gevonden te hebben. Zij zijn echter niet in staat dit organisme in een reïncultuur te kweken.

Wij gingen uit van de volgende voedingsbodem:

- 2 % natriumoxalaat
- 0.4 % pepton „Witte”
- 0.5 % natriumchloride
- 0.5 % secundair kaliumfosfaat.

De  $P_H$  van deze oplossing bedroeg 7.0.

<sup>1)</sup> C. Neubauer: Z. anal. Chem. 9, 392 (1870).

C. Wehmer: Ber. Deutsche Bot. Ges. 9, 218 (1891).

H. Braun en C. E. Cahn-Bronner: Bio. Z. 131, 243 (1922).

H. Braun, A. Stamatelakis en S. Kondo: Bio. Z. 145, 389 (1924).

<sup>2)</sup> K. Bassalik: Jahrb. wiss. Botanik 53, 255 (1914).

<sup>3)</sup> R. Scholder en C. F. Linström: B. 63, 2730 (1930).



De ongewone verhouding koolstofbron-stikstofbron ligt hierin, dat grootere hoeveelheden pepton met natriumoxalaat een neerslag geven.

100 cm<sup>3</sup> van deze oplossing entten wij met één afgeslibde agarcultuur van *B. coli* no. 4. De cultuur sloeg slecht aan. Na drie maanden zetten wij de vergisting stop, alhoewel de groei nog maar zeer matig was.

Daarna sloegen wij in de cultuur het pepton neer met 40 cm<sup>3</sup> fosforwolframaanzuur, filtreerden na eenige uren af en wuschen goed met water uit. De heldere oplossing werd tot koken verwarmd en hierbij 80 cm<sup>3</sup> van een eveneens warme oplossing van 1 N calciumacetaat gevoegd. Wij verwarmden nog 30 min op het waterbad en lieten het neerslag een nacht staan. De volgende dag zogen wij het neerslag af in een glazen filterkroes en wuschen goed uit. Daarna losten wij het neerslag op in 4 N zwavelzuur en titreerden het oxaalzuur met 0.1 N kaliumpermanganaatoplossing. Hetzelfde deden wij ook met 25 cm<sup>3</sup> van een niet-geënte oxaalzuuroplossing.

Het in zwavelzuur opgeloste neerslag, afkomstig uit de gegiste cultuur, vulden wij in een maatkolfje aan tot 100 cm<sup>3</sup>, pipetteerden hieruit telkens 25 cm<sup>3</sup> en titreerden deze hoeveelheid met kaliumpermanganaat.

#### Resultaat:

Benodigde aantal cm<sup>3</sup> kaliumpermanganaat:

voor de uitgegiste oplossing, gem.	76.41 cm <sup>3</sup>
voor de blanco oplossing . . . .	76.42 cm <sup>3</sup>

Hieruit volgt dus, dat de hoeveelheid oxaalzuur na drie maanden nog onveranderd was en dat wij geen rekening hebben te houden met een spoedige ontleding, indien het bij de glycolzuurgisting gevormd zou worden.

Uit de titratiecijfers volgt tevens, dat de juiste hoeveelheid natriumoxalaat, in de oplossing aanwezig, was 2,0481 g.

Volledigheidshalve hebben wij de cultuur nog onderzocht op vluchtige neutrale producten, vluchtige en niet-vluchtige zuren. Het resultaat was negatief.

## SAMENVATTING.

Een onderzoek werd ingesteld naar de werking van de bacteriën der coli-typhusgroep op eenige  $\alpha$ - en  $\beta$ -oxyzuren.

Het bleek, dat deze organismen een enzym bevatten, dat in staat is  $\alpha$ -oxyzuren, waarbij de hydroxylgroep niet eindstandig is, te oxydeeren tot de overeenkomstige ketonzuren.

De andere oxyzuren bleven door de inwerking van dit enzym onveranderd; tevens bleek de afwezigheid van een „ $\beta$ -hydroxydase”.

De oxydatie heeft plaats met behulp van luchtzuurstof. Het proces is streng aëroob; alleen, indien een waterstofacceptor aanwezig is, kan de reactie, die als een dehydrering is op te vatten, ook anaëroob plaats vinden.

De bij de oxydatie ontstane ketonzuren worden door de levende cel ontleed op een zoodanige wijze, dat onder opname van een molecule water het zuur gesplitst wordt in mierenzuur en een hooger vetzuur.

Mierenzuur wordt door coli- en paratyphusbacteriën vergist tot waterstof en kooldioxyde. Zij doen dit alleen, indien nog een organische stikstofbron aanwezig is. De typhus- en dysenteriebacteriën tasten dit zuur niet aan.

Oxaalzuur is voor *B. coli* een ongeschikte koolstofbron. De geheele hoeveelheid toegevoegd zuur wordt onveranderd teruggevonden.

---





## INHOUD.

	Blz.
HOOFDSTUK I.	
<b>Historisch overzicht . . . . .</b>	<b>1</b>
HOOFDSTUK II.	
<b>Het bacteriemateriaal . . . . .</b>	<b>19</b>
HOOFDSTUK III.	
<b>Literatuur over de aantasting van melkzure zouten door micro-organismen . . . . .</b>	<b>22</b>
HOOFDSTUK IV.	
<b>De vergisting van melkzuur . . . . .</b>	<b>34</b>
HOOFDSTUK V.	
<b>De vergisting van pyrodruivenzuur . . . . .</b>	<b>73</b>
HOOFDSTUK VI.	
<b>De vergisting van mierenzuur . . . . .</b>	<b>89</b>
HOOFDSTUK VII.	
<b>De vergisting van eenige andere oxyzuren . . . . .</b>	<b>96</b>
HOOFDSTUK VIII.	
<b>De vergisting van oxaalzuur . . . . .</b>	<b>110</b>
<b>Samenvatting . . . . .</b>	<b>113</b>

---



# STELLINGEN.

---

## I.

Het verdient aanbeveling voor de z.g. Eykmanproef bij het bacteriologisch wateronderzoek het pepton door glutaminezuur te vervangen.

W. Kauffmann en J. Smit, *Ant. v. Leeuwenhoek* 2, 334 (1935).

T. Folpmers, *Ant. v. Leeuwenhoek* 2, 343 (1935).

## II.

De theorie van Williams over de bacteriophag opent geen nieuwe gezichtspunten.

J. C. Williams, *J. Phys. Chem.* 40, 477 (1936).

## III.

Vele thermoluminescentie-verschijnselen moeten als chemoluminescentie opgevat worden.

H. Steinmetz en M. Alt, *Z. Krist.* 92, 363 (1935).

## IV.

De proeven van Hidnert vormen een onvoldoende bewijs voor zijn meening, dat antimoon tusschen 20° en 560° C geen polymorphie vertoont.

P. Hidnert, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* 14, 523 (1935).

## V.

De methode ter bepaling van keto-enolevenwichten volgens Seidel en medewerkers biedt in het algemeen geen voordeelen boven die van K. H. Meyer.

F. Seidel, W. Thier, A. Uber en J. Dittmer, *B.* 69, 650 (1936).





## VI.

Uit het onderzoek van Malachowski en medewerkers zijn geen conclusies te trekken omtrent het verloop der reactie tusschen natrium-benzyl-malonester en fumaarzure ester.

R. Malachowski, E. Bilbel en M. Bilinski-Tarasowicz, B. **69**, 1295 (1936).

## VII.

De meest aannemelijke verklaring van het electrophoretisch gedrag van kool in water is die van Verwey en de Boer.

E. J. W. Verwey, Chem. Weekbl. **33**, 414 (1936).

E. J. W. Verwey en J. H. de Boer, Rec. trav. chim. **55**, 675 (1936).

## VIII.

Voor het microchemisch aantonen van kalium verdient de reactie met dipikrylamine de voorkeur.

C. J. v. Nieuwenburg en T. v. d. Hoek, Mikrochem. **18**, 175 (1935).

---













