Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 26 (1935)

Heft: 5-6

Artikel: Der Abbau des Nicotins bei der Fermentation des Tabaks

Autor: Weber, W.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-984113

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 16.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

1 cm³ Destillat wird mit 1 Tropfen Phenollösung und 1 cm³ Schwefelsäure (1+1) sorgfältig aufgekocht und 1 Minute lang derart erhitzt, dass die Flüssigkeit eben siedet, das Reagensglas aber an den obern Teilen noch nicht heiss wird. Bei grössern Formaldehydmengen tritt schon in der Hitze, noch deutlicher nach dem Abkühlen eine weisse Trübung auf. Die abgekühlte Flüssigkeit wird mit 1 cm³ konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Bei Anwesenheit von Formaldehyd oder Hexamethylentetramin tritt nun die violette, von einem weissen Ring überlagerte Schicht rein hervor.

Der Abbau des Nicotins bei der Fermentation des Tabaks.

Von W. WEBER

(aus dem agrikulturchemischen Laboratorium der E. T. H.)

Einleitung.

Obschon die Fermentation der wichtigste Vorgang bei der Aufbereitung des Tabaks ist, ist ihre Natur sehr wenig geklärt, was einmal darauf zurückzuführen ist, dass die verschiedenen nebeneinander verlaufenden Reaktionen die Untersuchung ausserordentlich erschweren, dann aber auch darauf, dass es sehr schwierig ist, eine Fermentation in einem durchsichtigen Laboratoriumsexperiment durchzuführen. Immerhin hat es an Erklärungen nicht gefehlt, die jedoch oft in der Auffassung nicht übereinstimmen. Auch über die Ursache der Abnahme des Nicotingehalts bei der Fermentation gehen die Meinungen weit auseinander. Einer der ersten Beobachter dieser Nicotinabnahme, die bis 25% der ursprünglichen Menge betragen kann, war *Suchsland*[1]), welcher vermutete, dass es sich dabei um die Ueberführung von Nicotin in Nicotianin oder Tabakcampher handelt. Ein solcher mysteriöser Körper konnte jedoch nie gefunden werden.

Auf Grund der Entdeckung von *Behrens*[2,3]), dass der Schimmelpilz Botrytis cinerea seinen Stickstoffbedarf mit Nicotin decken kann, sowie dass gewisse Bakterien in einer Nährlösung ausgezeichnet gedeihen, welche als einzige Stickstoffquelle Nicotin enthält, das dabei vollständig verschwindet, liegt die Vermutung nahe, dass die Nicotinabnahme bei der Fermentation auf dieselbe Ursache zurückzuführen ist. In neuerer Zeit war es *Faitelowitz*[4,5]), der die Abnahme des Nicotingehalts der Tätigkeit von Bakterien zuschrieb. Tabakbrei oder wässrige Extrakte von Tabak zeigten nach vierundzwanzigstündigem Stehen eine starke Verminderung des Nicotins unter gleichzeitiger Erhöhung der Alkalität der Flüssigkeit. Beide Erscheinungen unterbleiben bei Zusatz von Chloroform. Als Zersetzungsprodukte sollen sich nach *Faitelowitz* leicht flüchtige organische Basen bilden, die jedoch aus den Extrakten verdunsten. Da mit dem Abbau des Nicotins eine

Vervielfachung der Katalase-Aktivität eintritt, sei der bakterielle Charakter dieser Reaktion erwiesen. Die Vermehrung der Katalase wird von *Faitelowitz* jedoch nicht mit Versuchen belegt. Dass bei seiner Versuchsanordnung auch Fäulnisbakterien zur Wirkung kommen können, ist nicht verwunderlich. Sowohl *Fodor* und *Reifenberg*[6]) wie auch *Bodnar* und *Barta*[7]) beanstanden die Versuche von *Faitelowitz*. Die beiden letztgenannten führen die Nicotinabnahme bei seinen Versuchen auf die Flüchtigkeit des Nicotins zurück, was sie aber an Hand von Blindversuchen zu beweisen unterlassen.

Für die bei der Fermentation eintretende Nicotinverminderung macht *Loew*[8]) die von ihm erstmals im Tabakblatt gefundene Peroxydase verantwortlich, welche das Nicotin unter Bildung von Ammoniak zersetzen soll. Die Wirkung der Oxydationsenzyme auf Nicotin wurde auch von *Behrens*[9]) untersucht, jedoch mit negativem Erfolg. Die enzymatische Zersetzung von Nicotin bei der Fermentation scheint durch die Versuche von *Fodor* und *Reifenberg*[10,11]) an Wahrscheinlichkeit zu gewinnen. Es wurde gefunden, dass Tabakextrakte imstande sind, unter sterilen Bedingungen in Lösungen von reinem Nicotin einen Teil desselben zu zersetzen, wobei sich ergab, dass bei zunehmender nicotinspaltender Wirkung eines solchen Tabakextraktes auch seine Fähigkeit, Sauerstoff aufzunehmen, steigt, sodass in der Nicotinzersetzung ein enzymatischer Oxydationsprozess vermutet wird. Die Forscher unterlassen jedoch, in ein und demselben Versuch neben der Messung der Sauerstoff-Aufnahme die gleichzeitige Verminderung des Nicotingehaltes an Hand von Nicotinbestimmungen zu beobachten; schliesslich kann der aufgenommene Sauerstoff auch noch zur Oxydation anderer Stoffe Verwendung finden. Was den Zusammenhang zwischen Peroxydase- und Oxygenasegehalt eines Tabaks und der bei der Fermentation eintretenden Nicotinverminderung betrifft, so fand *L. Barta*[12]) keine Beziehungen, wohl aber scheint ein grösserer Gehalt von Katalase auch eine vermehrte Nicotinabnahme zu bewirken*.

Auf Grund des chemischen Verhaltens des Nicotins beim oxydativen Abbau halten es *Fodor* und *Reifenberg*[11]) für wahrscheinlich, dass bei dieser enzymatischen Oxydation Pyridin, Methylamin und Ammoniak entsteht. Ein eindeutiger Nachweis dieser Verbindungen wird jedoch nicht gegeben. *Bodnar* und *Barta*[13]) können keine Bildung von Pyridin und Methylamin feststellen.

Zusammengefasst ergeben die bisherigen Forschungen, dass ein enzymatischer Abbau des Nicotins möglich und bei der Fermentation sehr wahrscheinlich ist. Die Tätigkeit und Wirkung von Mikroorganismen kann nicht endgültig verneint werden, wird aber in den Hintergrund gedrängt. Der Nicotinabbau scheint ein Oxydationsvorgang zu sein. Aus der zugänglichen Literatur konnte jedoch nicht ersehen werden, welche Umwandlungen das

*) Ueber die Fermente im Tabak siehe die zahlreichen ausgezeichneten Arbeiten von C. Neuberg und Mitarbeitern in der Biochem. Zeitschrift.

Nicotin während der Fermentation erleidet. Auch in den zahlreichen mustergültigen Arbeiten aus dem unter der Leitung von *A. Schmuck* stehenden Institut für Tabakforschung in Krasnodar wird darüber nichts mitgeteilt.

Angesichts dieser Ergebnisse, sowie der eventuellen Möglichkeit, den Gang der Fermentation künstlich so zu beeinflussen, dass die Nicotinverminderung noch beträchtlicher wird, ist es gerechtfertigt, Ursache und Fortgang dieser Nicotinverminderung weiter aufzuklären.

I. Versuche mit Tabak.

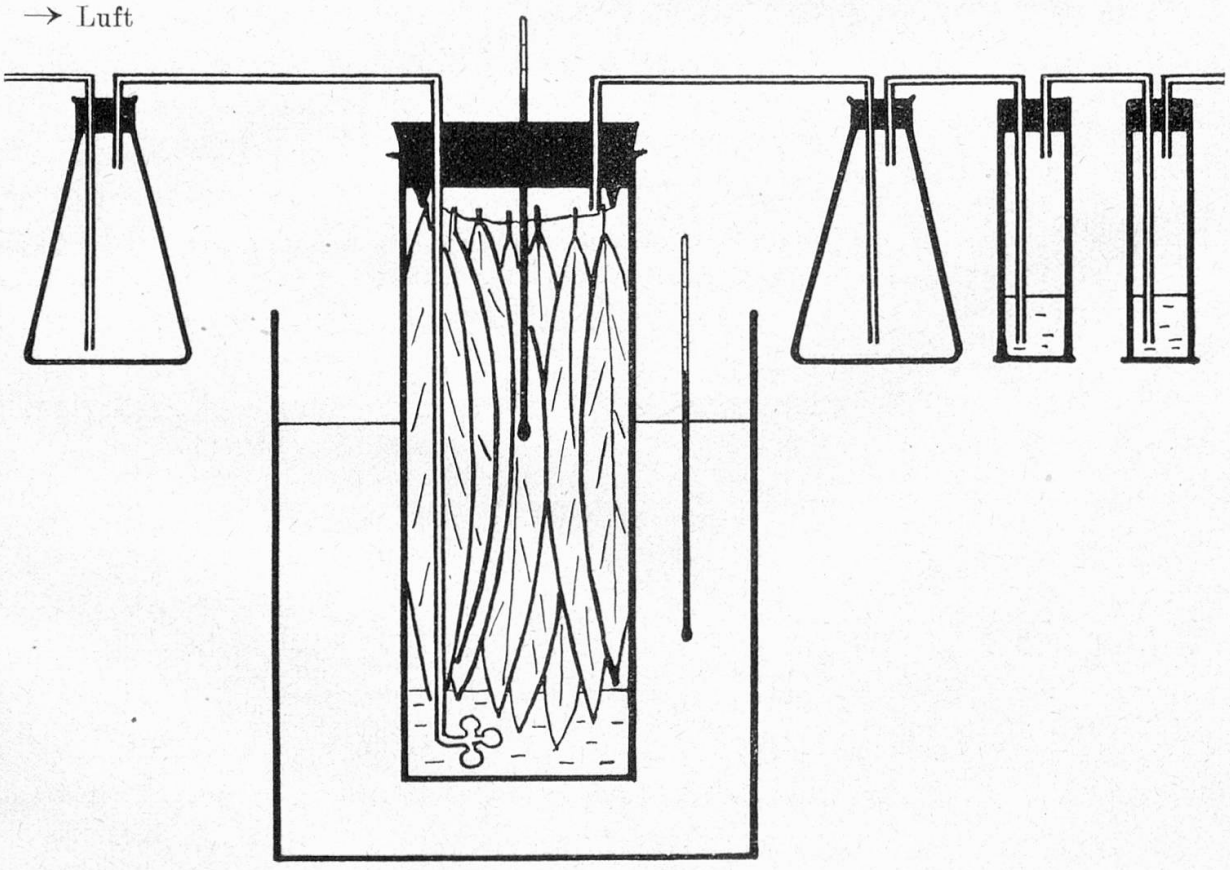
Als Grundlage dieser Versuche wurde ein patentiertes Entnicotinisierungsverfahren[14]) von Tabak benutzt, welches zum Teil auf den Untersuchungen und Ergebnissen von *Faitelowitz*[4]) beruht und darin besteht, dass der Tabak mit viel Wasser versetzt und die entstehende Lauge mit Luft durchströmt wird. Nach einiger Zeit verschwindet das Nicotin in der Lauge, was vom Erfinder durch die Tätigkeit von Mikroorganismen erklärt wird. Die in der Lauge auftretende alkalische Reaktion wird durch Säurezusatz zurückgedrängt. Nach erfolgter Behandlung wird die Lauge auf den Tabak gesprüht und auf diesem eingedunstet.

1. Behandlung von Tabak mit Wasser und Luft.

Versuch A_1. *a) Mit Zusatz von organischen Säuren.*

40 g eines amerikanischen Tabaks (Nicotingehalt 2,4%) werden angefeuchtet, die Blätter ausgeglättet und in einen grossen Glaszylinder gehängt,

Apparatur:



der in einem Thermostaten von 40° Badtemperatur steht. In den Zylinder werden 300 cm³ Wasser gegeben und mittels einer Wasserstrahlpumpe durch drei Tonverteiler Luft durch die Flüssigkeit geblasen, welche nach einiger Zeit stark zu schäumen beginnt. Der im Zylinder nicht mehr Platz findende Schaum wird in einer nachgeschalteten Flasche aufgefangen. Die abströmende Luft wird durch zwei mit Schwefelsäure und Kieselwolframsäure versetzte Waschflaschen geleitet, um abgeblasenes Nicotin zurückzuhalten.

Nach 12 Stunden reagiert der Schaum gegen Lakmus stark alkalisch. Um die Alkalität etwas abzuschwächen, werden 2 cm³ $\frac{n}{5}$ Zitronensäure zugegeben. Weitere Säurezusätze:

nach	14	Stunden	4	cm³ $\frac{n}{5}$	Zitronensäure
»	16	»	4	»	»
»	17	»	5	»	»
»	18	»	5	»	»
»	19	»	10	»	»
»	20	»	10	»	»
»	21	»	10	»	»
»	22	»	10	»	»
»	36	»	10	»	»
»	37	»	10	»	»
»	38	»	10	»	»
»	39	»	10	»	»
»	40	»	20	»	»
»	42	»	20	»	»
»	43	»	20	»	»
»	44	»	20	»	»

Nach 60 Stunden Abbruch des Versuchs.

Gesamte zugesetzte Säuremenge: 180 cm³. Die Flüssigkeit reagiert am Ende des Versuchs immer noch alkalisch.

Gesamte Flüssigkeitsmenge am Ende des Versuchs 450 cm³. Mit dem Ausspülen des Zylinders ergeben sich zusammen 500 cm³. In einem aliquoten Teil wird das Nicotin bestimmt durch Wasserdampfdestillation und Fällung mit Kieselwolframsäure.

50 cm³ Lauge enthalten . . . . . 0,0239 g Nicotin
500 » » » . . . . . 0,239 » »

Gewicht des wasserfreien Tabaks nach dem Versuch 30,5 g

Nicotingehalt: 0,43 %

Im Tabak verbliebenes Nicotin: 0,131 g

Waschflaschenflüssigkeit: Der Inhalt der ersten Waschflasche ist durch abgeblasenes Nicotin getrübt worden.

Verdunstetes Nicotin: 0,007 g

In beiden Waschflaschen lassen sich mit Nessler's Reagens bedeutende Mengen von Ammoniak nachweisen.

Bilanz:

Gesamte Nicotinmenge zu Beginn des Versuches . (40 g Tabak, Wassergehalt 14 %, Nicotingehalt 2,4 %)	0,825 g
Nicotin in der Lauge	0,239 g
Nicotin im Tabak nach dem Versuch	0,131 g
Abgeblasenes Nicotin	0,007 g
Nicotinabnahme	0,448 g
	= *54,4 %*

Analoge Ausführung der folgenden Versuche.

Versuch A_2.

Angewandt: 50 g Sorte «Grossblättrig, Nr. 2».
Nicotingehalt: 2,0 %.
Wassergehalt: 6 %.

Zugesetzte Menge Wasser: 300 cm³.

Versuchsdauer: 43 Stunden.

Nach 12 Stunden wird dem alkalisch reagierenden Schaum von Stunde zu Stunde $\frac{n}{5}$ Zitronensäure zugesetzt, im ganzen 145 cm³.

Flüssigkeitsmenge nach dem Versuch 560 cm³. Nicotinbestimmung in einem aliquoten Teil.

50 cm³ enthalten	0,0102 g Nicotin
560 » »	0,114 g »

Gewicht des wasserfreien Tabaks nach dem Versuch: 36 g.
Nicotingehalt: 0,22 %.
Im Tabak verbliebenes Nicotin: 0,072 g.

Die Waschflaschenflüssigkeit enthält kein abgeblasenes Nicotin, hingegen gibt Nessler's Reagens eine dicke braune Fällung.

Bilanz:

Gesamte Nicotinmenge zu Beginn des Versuches .	0,940 g
Nicotin in der Lauge	0,114 g
Nicotin im Tabak nach dem Versuch	0,072 g
Nicotinabnahme	0,754 g
	= *80,5 %*

Versuch A_3.

Angewandt: 50 g Marke Kentucky.
Nicotingehalt: 6 %.
Wassergehalt: 9 %.

Zugesetzte Menge Wasser: 300 cm³.

Dauer des Versuchs: 56 Stunden.

Während des Versuchs zugesetzte Menge $\frac{n}{5}$ Zitronensäure: 140 cm³.
Menge der Lauge nach dem Versuch: 500 cm³.

50 cm³ enthalten . . . . . 0,133 g Nicotin
500 » » . . . . . 1,33 g »

Gewicht des wasserfreien Tabaks nach dem Versuch: 32 g.
Nicotingehalt: 0,5%.
Im Tabak verbliebenes Nicotin: 0,16 g.
Abgeblasenes Nicotin: 0,005 g.

Bilanz:

Gesamte Nicotinmenge zu Beginn des Versuches .	2,701 g
Nicotin in der Lauge	1,335 g
Nicotin im Tabak nach dem Versuch	0,167 g
Abgeblasenes Nicotin	0,005 g
Nicotinabnahme	1,194 g
	= *44,2 %*

Versuch A_4.

Angewandt: 30 g Marke Rio Grande.
Nicotingehalt: 2,4%.
Wassergehalt: 14 %.

Zugesetzte Menge Wasser: 300 cm³.

Dauer des Versuchs: 40 Stunden.

Da nach 15 Stunden die Flüssigkeit noch nicht schäumt, wird eine Spur Saponin zugefügt.

Im ganzen zugesetzte Säuremenge: 30 cm³ $\frac{n}{5}$ Zitronensäure.

Menge der Lauge nach dem Versuch: 350 cm³.

Um das Saponin, welches bei der Nicotinbestimmung die Wasserdampfdestillation durch starkes Schäumen verunmöglicht, zu zerstören, wird die für die Bestimmung verwendete Lauge mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert und aufgekocht.

40 cm³ Lauge enthalten . . . . . 0,0041 g Nicotin
350 » » » . . . . . 0,036 g »

Gewicht des wasserfreien Tabaks nach dem Versuch: 21 g.
Nicotingehalt: 0,1%.
Im Tabak verbliebenes Nicotin: 0,021 g.
Abgeblasenes Nicotin: 0.

Bilanz:

Gesamte Nicotinmenge zu Beginn des Versuches .	0,618 g
Nicotin in der Lauge	0,036 g
Nicotin im Tabak nach dem Versuch	0,021 g
Nicotinabnahme	0,561 g
	= *91 %*

Versuch A_5.

Angewandt: 500 g Marke Kentucky.
Nicotingehalt: 4,8%.
Wassergehalt: 6,5%.

Zugesetzte Menge Wasser: 1500 cm³.

Dauer des Versuchs: 150 Stunden.

Nach 3 Tagen werden die Blätter umgekehrt aufgehängt, sodass sie nach und nach vollständig ausgelaugt werden.

Im ganzen zugesetzte Säuremenge: 250 cm³ $\frac{n}{5}$ Zitronensäure.

Menge der Lauge nach dem Versuch: 1500 cm³.

50 cm³ Lauge enthalten	0,256 g	Nicotin
1500 » » »	7,68 g	»

Gewicht des wasserfreien Tabaks nach dem Versuch: 280 g.

Nicotingehalt: 2,95%.

Im Tabak verbliebenes Nicotin: 7,61 g.

Abgeblasenes Nicotin: 0,034 g.

Bilanz:

Gesamte Nicotinmenge zu Beginn des Versuches	22,44 g
Nicotin in der Lauge	7,68 g
Nicotin im Tabak nach dem Versuch	7,61 g
Abgeblasenes Nicotin	0,03 g
Nicotinmenge nach dem Versuch	15,32 g
Nicotinabnahme	7,12 g
	= *31,8 %*

b) Ohne Zusatz von organischen Säuren.

Versuch A_6.

Angewandt: 50 g Marke Kentucky.
Nicotingehalt: 3,3%.
Wassergehalt: 6,8%.

Zugesetzte Menge Wasser: 100 cm³.

Dauer des Versuchs: 40 Stunden.

Trotz steigender Alkalität wird keine Säure zugesetzt.

Menge der Lauge nach dem Versuch: 100 cm³.

30 cm³ Lauge enthalten	0,059 g	Nicotin
100 » » »	0,197 g	»

Gewicht des wasserfreien Tabaks nach dem Versuch: 39 g.

Nicotingehalt: 0,8%.

Abgeblasenes Nicotin: 0.

Bilanz:

Gesamte Nicotinmenge zu Beginn des Versuches	1,535 g
Nicotin in der Lauge	0,197 g
Nicotin im Tabak nach dem Versuch	0,281 g
Nicotinabnahme	1,057 g
	= *68,8 %*

Die in den erwähnten Patenten gemachten Angaben über die Nicotinabnahme können bestätigt werden. Ob sich das Nicotin dabei unter Bildung von Ammoniak zersetzt oder ob dieses aus Eiweisskörpern entsteht, kann vorerst noch nicht entschieden werden. Sicher wirken sich aber die entstehenden grossen Mengen Ammoniak auf die Qualität eines so behandelten Tabakes nicht günstig aus.

2. Behandlung von Tabak mit feuchter Luft.

Da die Möglichkeit besteht, dass eine Nicotinabnahme eintritt, wenn die für eine erneute Gärung des Tabaks günstige Feuchtigkeit und Temperatur vorhanden ist, und dass diese Nicotinverminderung um so grösser ist, je besser die Luft zirkulieren kann, so wurden folgende Versuche angestellt:

Versuch B_1.

70 g trockener Tabakblätter (Nicotingehalt 4,2%, Wassergehalt 5,9%) werden in enger Packung in einen Zylinder gehängt, dessen Boden mit einer 4 cm hohen Wasserschicht bedeckt ist, durch welche ein energischer Luftstrom geblasen wird. Die Temperatur des in einem Thermostaten stehenden Zylinders wird so reguliert, dass die über die Blätter streichende, mit Feuchtigkeit beladene Luft eine Temperatur von 38 bis 40° besitzt. Dauer des Versuchs 100 Stunden. Ergebnisse siehe in folgender Tabelle.

Versuch B_2.

Ein zweiter Versuch in gleicher Ausführung und unter gleichen Bedingungen wird mit einer unfermentierten, im Garten des hiesigen botanischen Institutes gezogenen* nicotinärmeren Sorte ausgeführt.

Die Resultate beider Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 1.

Marke	Wassergehalt		Nicotingehalt		Nicotin-abnahme
	vorher	nachher	vorher	nachher	
Kentucky	5,9 %	35,8 %	4,2 %	3,4 %	19 %
E. T. H.	6,4 %	38,9 %	0,9 %	0,7 %	22 %

Es zeigt sich auch bei dieser Behandlung des Tabaks eine Nicotinabnahme, die offenbar auf dieselbe Ursache zurückzuführen ist, wie bei der Behandlung des Tabaks mit Wasser und durchströmender Luft.

3. Die Flüchtigkeit des Nicotins.

Da in den beiden Patenten keine Angaben über ein Abfangen der austretenden Gase gemacht werden, schien es im Hinblick auf die gesundheitschädigende Wirkung von Nicotindämpfen in der Luft zweckmässig, die Flüchtigkeit des Nicotins zu untersuchen.

*) Für die freundliche Ueberlassung des Geländes bin ich Herrn Prof. Dr. P. Jaccard sehr dankbar.

Versuch C_1.

Durch 50 cm³ einer 1%igen wässrigen Nicotinlösung, der etwas Saponin zugesetzt ist, wird ein lebhafter Luftstrom geblasen und die Heizung so reguliert, dass die Temperatur des Schaumes 37° beträgt. In zwei nachgeschalteten Waschflaschen wird das entweichende Nicotin mit Kieselwolframsäure und etwas Schwefelsäure aufgefangen. Nach 88 Stunden ist in der Lösung nur noch wenig Nicotin nachzuweisen, dafür hat sich in den Waschflaschen ein dicker Niederschlag von Nicotin-Kieselwolframat gebildet, der durch Erhitzen in Lösung gebracht, nach dem Ausfallen in der Kälte abgenutscht und gewogen wird.

Gewicht des Niederschlages: 4,328 g = 0,438 g Nicotin.

Das in der Lösung verbliebene Nicotin wird ebenfalls mit Kieselwolframsäure gefällt und gewogen.

Gewicht des Niederschlages: 0,121 g = 0,013 g Nicotin.
Angewandtes Nicotin: 0,5 g.
Wieder gefundenes Nicotin: 0,451 g.
Abgeblasenes Nicotin: 0,438 g = 87,6%.

Der Versuch demonstriert die grosse Flüchtigkeit des Nicotins. Es müsste bei dem beschriebenen Verfahren dafür gesorgt werden, dass dampfförmiges Nicotin abgefangen wird.

Versuch C_2.

Eine Lösung von 0,049 g Nicotin in 25 cm³ Wasser wird in einer grossen Petri-Schale (Durchmesser 18 cm) 48 Stunden bei Zimmertemperatur unbedeckt stehen gelassen. Nach dieser Zeit ergibt eine Nicotinbestimmung 0,048 g Nicotin.

Unter diesen Bedingungen ist die Flüchtigkeit des Nicotins praktisch gleich null, kommt deshalb bei den Versuchen von *Faitelowitz*[4]) entgegen der Annahme von *Bodnar* und *Barta*[7]) nicht in Frage.

4. Untersuchung der Wirkung von Luft auf Nicotin.

Da das Nicotin schon beim Stehen an der Luft angegriffen wird, war zu versuchen, ob das Nicotin durch die enge Berührung mit Luft oxydiert wird.

Versuch D.

Durch eine Lösung von 5 g Nicotin in 350 cm³ Wasser wird ein starker Luftstrom geblasen. Die Versuchsanordnung ist dieselbe wie bei den Versuchen A, mit dem Unterschied, dass auf den Zylinder ein Rückflusskühler gesetzt wird, der ein Abdunsten des Nicotins verhindern soll. Durch Zusatz von etwas Saponin wird die Flüssigkeit zum Schäumen gebracht.

Dauer des Versuches: 134 Stunden.

Flüssigkeitsmenge nach dem Versuch: 347 cm³.

15 cm³ enthalten	. . . . .	0,197 g Nicotin
347 » »	. . . . .	4,557 g »

In die Waschflaschen abgedunstet: 0,064 g Nicotin.
Wieder gefundenes Nicotin: 4,62 g.

Die Differenz von 0,38 g = 7,6% Nicotin, die eventuell oxydiert worden ist, ist zu gering, als dass sie in den Versuchen A mit Tabak in Betracht fallen würde.

II. Versuche mit Tabaklauge.

1. Behandlung von Tabaklauge mit durchströmender Luft.

Um die Wirkung verschiedener Zusätze zu studieren, werden der Einfachheit halber lediglich wässerige Tabakauszüge der Behandlung mit Luft unterworfen, wobei dieselbe Versuchsanordnung wie bei den Versuchen mit Tabak angewendet wird. Die Tabakauszüge werden erhalten durch dreimaliges zwei Stunden langes Digerieren und Abpressen des gemahlenen Tabaks mit kaltem Wasser.

Versuch E_1. *a) Mit Säurezusatz.*

25 g Kentucky-Tabak werden dreimal mit 150 cm³ Wasser ausgezogen. Ausführung des Versuches mit 250 cm³ des Extraktes. Die Flüssigkeit beginnt nach einiger Zeit zu schäumen, wobei sie zugleich gegen Lakmus stark alkalische Reaktion annimmt. Von Zeit zu Zeit werden in kleinen Portionen 50 cm³ $\frac{n}{5}$ Zitronensäure zugegeben.

Dauer des Versuchs: 55 Stunden.

250 cm³ Lauge enthalten vor dem Versuch	0,525 g	Nicotin
Menge der Lauge nach dem Versuch: 350 cm³		(mit Spülwasser)
350 cm³ Lauge enthalten nach dem Versuch	0,345 g	Nicotin
Waschflascheninhalt	0,016 g	»

Bilanz:

Nicotinmenge vor dem Versuch	0,525 g
Nicotinmenge nach dem Versuch	0,361 g
Nicotinabnahme	0,164 g
	= *31,3 %*

Versuch E_2. *b) Ohne Säurezusatz.*

Angewandt: Auszug von 40 g der Sorte «Grossblättrig, Nr. 2» mit 3 Mal 200 cm³ Wasser.

Dauer des Versuchs: 70 Stunden.

300 cm³ Lauge enthalten vor dem Versuch	0,525 g	Nicotin
Menge der Lauge nach dem Versuch: 350 cm³		(mit Spülwasser)
350 cm³ Lauge enthalten nach dem Versuch	0,013 g	Nicotin
Waschflascheninhalt	0,003 g	»

Bilanz:

Nicotinmenge vor dem Versuch	0,525 g
Nicotinmenge nach dem Versuch	0,017 g
Nicotinabnahme	0,508 g
	= *97 %*

Versuch E_3.

Angewandt: 50 cm³ eines Auszuges von 50 g Kentucky mit 3 Mal 150 cm³ Wasser.

Dauer des Versuchs: 60 Stunden.

50 cm³ Lauge enthalten vor dem Versuch: 0,142 g Nicotin.

Nicotinbestimmung in der ganzen Flüssigkeit nach Abbruch des Versuchs.

Bilanz:

Nicotinmenge vor dem Versuch	0,142 g
Nicotinmenge nach dem Versuch	0,005 g
Nicotinabnahme	0,137 g
	= *96 %*

Ein Vergleich der Ergebnisse der Versuche E_2 und E_3 mit demjenigen von Versuch E_1 lässt vermuten, dass schwach alkalische bis neutrale Reaktion auf den Nicotinabbau eher hemmend wirkt, da ohne Säurezusatz eine wesentlich grössere Nicotinabnahme erfolgt. Allerdings dauerten die Versuche E_2 und E_3 etwas länger.

Versuch E_4. *c) Mit Zusatz von Natriumfluorid.*

Angewandt: 300 cm³ eines Auszuges von 1000 g der Sorte «Grossblättrige, Nr. 2», mit 3 Mal 150 cm³ Wasser.

Zusatz von 0,5 g Natriumfluorid.

Dauer des Versuchs: 54 Stunden.

Nicotingehalt der ganzen Lauge vor dem Versuch . .	0,609 g
Nicotingehalt der Lauge nach dem Versuch	0,521 g
Nicotinabnahme	0,088 g
	= *14,5 %*

Vor dem Zusatz von Natriumfluorid wurden 3 Tropfen der Lauge auf Nähragar und Gelatine geimpft und in Plattenkulturen beobachtet. Nach 64 Stunden sind von Auge einige Tausend Bakterienkolonien sichtbar. Dasselbe wird nach dem Versuch ausgeführt, wobei nach 64 Stunden ca. 200 Kolonien zu sehen sind. Die Lauge ist also nicht vollständig steril geworden, immerhin ist die Zahl der Keime bedeutend gesunken. Dementsprechend verschwanden 14,5% des Nicotins.

Versuch E_5.

Angewandt: 200 cm³ eines wässerigen Auszuges von 30 g der Sorte «Grossblättrige, Nr. 2».

Zusatz von 10 g Natriumfluorid.

Dauer des Versuches: 54 Stunden.

Nicotingehalt der ganzen Lauge vor dem Versuch . .	0,190 g
Nicotingehalt der Lauge nach dem Versuch	0,190 g

Dieser Zusatz von Natriumfluorid bewirkte vollständige sterile Bedingungen, wie Impfungen auf Nähragar und Gelatine zeigten. Gleichzeitig trat auch *keine Nicotinverminderung* ein.

Versuch E_6. *d) Mit Zusatz von Sublimat.*

Angewandt: 200 cm³ eines wässerigen Auszuges von 35 g Kentucky-Tabak.

Zusatz von 1 g Sublimat.

Dauer des Versuchs: 50 Stunden.

Gesamtnicotinmenge vor dem Versuch	1,026 g
Gesamtnicotinmenge nach dem Versuch	0,948 g
Nicotinabnahme	0,078 g
	= *7 %*

Impfung auf Nähragar und Gelatine am Ende des Versuchs zeigt völlige Sterilität.

Versuch E_7. *e) Aufgekochte Tabaklauge und sterile Luft.*

Angewandt: 100 cm³ Tabaklauge.

Die Lauge wird innerhalb 48 Stunden zweimal kurz aufgekocht. Die durchströmende Luft wird vor dem Eintritt in den Zylinder durch Bichromat-Schwefelsäure und einen mit Watte gefüllten Turm geleitet.

Dauer des Versuchs: 50 Stunden

Gesamtnicotinmenge vor dem Versuch	0,122 g
Gesamtnicotinmenge nach dem Versuch	0,112 g
Nicotinabnahme	0,010 g
	= *8,2 %*

Untersuchung der Tabaklauge mit Plattenkulturen vor dem Aufkochen, direkt nach dem Aufkochen und am Ende des Versuchs zeigt im zweiten Fall vollständige Sterilität, während die Zahl der Keime nach dem Versuch ca. 100 Mal kleiner ist als vor dem Versuch.

Versuch E_8. *f) Mit Zusatz von Saponin.*

Angewandt: 500 cm³ eines Auszuges von 250 g Kentucky mit 3 Mal 300 cm³ Wasser.

Da die Lauge nach 48 Stunden noch nicht schäumt, wird der Versuch abgebrochen und das abgedunstete Wasser wieder ersetzt.

25 cm³ der Lauge enthalten zu Beginn	0,128 g	Nicotin
25 cm³ » » » nach 48 Stunden . . .	0,047 g	»
Nicotinabnahme	0,081 g	
	= *63,3 %*	

450 cm³ der Lauge werden sofort wieder angesetzt. Um die Flüssigkeit beim Durchströmen der Luft zum Schäumen zu bringen, wird eine Spur Saponin zugefügt und nach weiteren 48 Stunden der Nicotingehalt bestimmt.

25 cm³ der Lauge enthalten vor Zugabe von Saponin . .	0,047 g	Nicotin
26 » » » » nach 48 Stunden	0,005 g	»
Nicotinabnahme nach Saponinzugabe	0,042 g	
	= *89,3 %*	
Nicotinabnahme im ganzen Versuch	0,123 g	
	= *96,1 %*	

Starkes Schäumen bewirkt eine bessere Durchlüftung und beschleunigt den Nicotinabbau wesentlich.

Tabelle 2: *Zusammenstellung der Ergebnisse der Versuche A, B, E.*

Versuch	Art des Versuches	Versuchs-dauer	Nicotin-abnahme	Zusatz
A_1	Durchleiten von Luft durch Tabak und Lauge	60 Std.	54 %	180 cm³ $\frac{n}{5}$ Zitr'sre.
A_2	»	43 »	80 %	145 cm³ S.
A_3	»	56 »	44 %	140 cm³ S.
A_4	»	40 »	91 %	30 cm³ S.
A_5	»	150 »	32 %	250 cm³ S.
A_6	»	40 »	69 %	—
B_1	Tabak in feuchter Luft	100 »	19 %	—
B_2	»	100 »	22 %	—
E_1	Durchleiten von Luft durch wässerigen Auszug v. Tabak	55 »	31 %	50 cm³ S.
E_2	»	70 »	97 %	—
E_3	»	60 »	96 %	—
E_4	»	54 »	14 %	0,5 g NaF
E_5	»	54 »	0 %	10 g NaF
E_6	»	50 »	7 %	1 g $HgCl_2$
E_7	Durchleiten von steriler Luft durch aufgekochte Tabaklauge	50 »	8 %	—

2. Versuche mit Tabaklauge in Petri-Schalen mit antiseptischen Zusätzen.

Versuch F_1.

50 g gemahlener Kentucky-Tabak werden mit 300 cm³ kaltem Wasser ausgezogen und von der so erhaltenen Tabaklauge 125 cm³ folgendermassen in 5 grosse sterile Petri-Schalen (Durchmesser 18 cm) verteilt:

1. Schale 25 cm³ Tabaklauge, nicht sterilisiert.
2. » » » » , Zusatz von 1 g NaF.
3. » » » » , » » 0,1 g $HgCl_2$.
4. » » » » , » » 1 cm³ $CHCl_3$.
5. » » » » , durch 2 maliges Erhitzen auf 100° sterilisiert.

Nach 48 Stunden wird in allen Schalen der Nicotingehalt bestimmt.

25 cm³ frische Lauge enthalten vor dem Versuch 0,071 g Nicotin.

Tabelle 3:

Schale Nr.	Sterilisiert mit	Nicotin nach 48 Stunden	Nicotinabnahme
1	nicht steril	0,043 g	0,028 g = 39,5 %
2	NaF	0,070 g	0,001 g
3	$HgCl_2$	0,071 g	—
4	$CHCl_3$	0,072 g	—
5	Hitze	0,070 g	0,001 g

Die Werte demonstrieren zugleich die Genauigkeit der benutzten und am Schluss kurz beschriebenen Nicotinbestimmungsmethode, sofern stets unter gleichen Bedingungen gearbeitet wird.

Impfungen auf Nähragar und Gelatine ergaben, dass die Schalen 2 bis 5 vollständig keimfrei waren. Am Ende des Versuches reagierten sie neutral gegen Lakmus, während die Lauge in der Schale 1 stark alkalisch geworden war.

Versuch F_2.

150 cm³ eines wässerigen Auszuges von 50 g Kentucky-Tabak mit 3 Mal 100 cm³ Wasser werden in 6 Petri-Schalen verteilt und durch verschiedene Zusätze sterilisiert.

1. Schale 25 cm³ Tabaklauge, nicht sterilisiert.
2. » » » » , Zusatz von 1 g NaF.
3. » » » » , » » 0,5 g $HgCl_2$.
4. » » » » , » » 1 cm³ $CHCl_3$.
5. » » » » , » » 1 » CH_2O.
6. » » » » , durch 2 maliges Erhitzen auf 100° sterilisiert.

Nicotinbestimmungen nach 14 Tagen.

25 cm³ frische Lauge enthalten vor dem Versuch 0,104 g Nicotin.

Tabelle 4:

Schale Nr.	Sterilisiert mit	Nicotin nach 14 Tagen	Nicotinabnahme
1	nicht steril	0,002 g	0,102 g = 98 %
2	NaF	0,103 g	0,001 g = 1 %
3	$HgCl_2$	0,102 g	0,002 g = 2 %
4	$CHCl_3$	0,101 g	0,003 g = 3 %
5	CH_2O	0,100 g	0,004 g = 4 %
6	Hitze	0,100 g	0,004 g = 4 %

Die geringe Nicotinabnahme in den Schalen 2 bis 6 ist wahrscheinlich der Flüchtigkeit des Nicotins zuzuschreiben. Die Inhalte dieser Schalen waren total steril, wie Impfungen auf Nähragar und Gelatine zeigten.

Die Versuchsserien E und F lassen vermuten, dass den Mikroorganismen bei der Nicotinverminderung eine grosse Bedeutung zukommt. Immerhin ist zu bedenken, dass auch die Wirksamkeit von Fermenten durch Zusätze von organischen Stoffen infolge Ausflockung vollständig gehemmt werden kann und durch Aufkochen überhaupt aufgehoben wird, sodass eine Fermentwirkung auf Grund dieser Versuche noch nicht ausgeschlossen ist.

III. Versuche mit Bakterienkulturen.

1. Züchtung von Kulturen.

50 g Tabak (Kentucky) werden dreimal mit je 100 cm³ kalten Wassers ausgezogen. Drei Tropfen des so erhaltenen Auszuges werden auf Gelatine geimpft und davon noch zwei weitere Verdünnungen hergestellt. Nach 60 Stunden sind in der 2. Verdünnung die Kolonien so gross geworden, dass auf Grund von äusserlich verschiedenen Merkmalen (verschiedene Gestalt und Farbe, Verflüssigung des Nährbodens) sechs Kolonien als voneinander verschieden betrachtet werden können. Diese 6 Kolonien werden durch Strich- und Stichimpfung weitergezüchtet und für die folgenden Versuche verwendet.

Versuch G_1. ***2. Impfung steriler Tabaklauge mit Bakterienkulturen.***

Ein Tabakauszug, erhalten durch dreimaliges Extrahieren von 25 g Kentucky mit je 300 cm³ kaltem Wasser, wird durch zweimaliges Aufkochen sterilisiert. Sechs sterile Petri-Schalen (Durchmesser 18 cm) werden mit je 25 cm³ des sterilen Extraktes versetzt und mit den sechs Kulturen geimpft.

Bestimmung des Nicotingehaltes nach 21 Tagen.

Nicotingehalt der frischen Lauge: 25 cm³ enthalten 0,064 g Nicotin.

Tabelle 5:

Schale Nr.	Kultur Nr.	Nicotingehalt nach 21 Tagen	Nicotinabnahme
1	1	0,065 g	—
2	2	0,060 g	0,005 g = 7,7 %
3	3	0,065 g	—
4	4	0,065 g	—
5	5	0,063 g	—
6	6	0,003 g	0,061 g = 95,2 %

Während in den ersten 5 Schalen keine wesentliche Veränderung des Nicotingehaltes auftritt, ist der Nicotingehalt in der 6. Schale ausserordentlich stark gesunken. Prüfung mit Nessler's Reagens ergibt, dass in den Schalen 1 bis 5 Ammoniak gebildet worden ist. In Schale 6 hingegen lässt sich kein Ammoniak nachweisen, obschon die Flüssigkeit gegen Lakmus auch leicht alkalische Reaktion angenommen hat, was auf die Entstehung anderer Basen zurückzuführen ist.

Versuch G_2.

50 g Tabak Marke «Nostrano» werden dreimal mit je 100 cm³ kaltem Wasser ausgezogen, in 25 cm³ des Auszuges das Nicotin bestimmt, weitere 25 cm³ in einer Petri-Schale 17 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen und der Rest durch zweimaliges Aufkochen sterilisiert. 6 sterile Petri-Schalen werden mit je 25 cm³ des sterilen Auszuges versetzt und mit den Kulturen 1 bis 6 geimpft. Nach 17 Tagen Bestimmung des Nicotingehalts.

Nicotingehalt der frischen Lauge: 25 cm³ enthalten 0,076 g Nicotin.

Tabelle 6:

Schale Nr.	Kultur Nr.	Nicotingehalt nach 17 Tagen	Nicotinabnahme
1	1	0,071 g	—
2	2	0,075 g	—
3	3	0,072 g	—
4	4	0,074 g	—
5	5	0,072 g	—
6	6	0,003 g	0,073 = 96 %
7	nicht sterilisiert	0,005 g	0,071 = 93 %

Auch in diesem Versuch bewirkt die Impfung mit Kultur Nr. 6 eine ganz bedeutende Nicotinabnahme. Als Abbauprodukt entsteht kein Ammoniak. Das Auftreten desselben bei Impfung mit anderen Kolonien und im nichtsterilen Auszug ist offenbar nur auf die Zersetzung von Eiweiss-Stoffen zurückzuführen.

Die Kultur 6 enthält im Gegensatz zu den übrigen Kolonien ein Gelatine verflüssigendes, Fluoreszenz erregendes Bakterium. Die Kultur wird im landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut von Herrn Prof. Dr. M. Düggeli näher untersucht und an anderer Stelle beschrieben.

Versuch G_3.

1500 cm³ eines Auszuges von 150 g Kentucky-Tabak mit dreimal 500 cm³ Wasser werden durch zweimaliges Aufkochen sterilisiert und wie bei der Versuchsserie E mit durchströmender Luft behandelt, die jedoch vor dem Eintritt in die Lauge durch einen Watteturm und eine Waschflasche mit Bichromat-Schwefelsäure geleitet wird. Temperatur der Lauge: 38°. Nach 200 Stunden wird der Versuch abgebrochen und das abgedunstete Wasser wieder ersetzt.

25 cm³ Lauge enthalten zu Beginn des Versuchs .	0,043 g	Nicotin
25 » » » nach 200 Stunden . . .	0,040 g	»
Abgeblasenes Nicotin aus den Waschflaschen . .	0,002 g	»

1400 cm³ der Tabaklauge werden sofort wieder angesetzt und mit Kultur Nr. 6 geimpft. Nicotinbestimmung nach 48 Stunden.

25 cm³ enthalten vor dem Impfen	0,040 g	Nicotin
25 » » 48 Stunden nach dem Impfen .	0,001 g	»
Nicotinabnahme	0,039 g	
	= *97 %*	

Dieser Versuch demonstriert die ausserordentliche Wirksamkeit der Kultur Nr. 6, welche imstande ist, das Nicotin in erstaunlich kurzer Zeit abzubauen, wobei noch nicht näher bekannte Basen entstehen, mit deren Untersuchung wir uns weiter beschäftigen.

Versuch H. **3. Abhängigkeit des Nicotinabbaus von der Konzentration.**

Verwendung eines wässrigen, durch zweimaliges Aufkochen sterilisierten Extraktes von Kentucky-Tabak. 25 cm³ werden verwendet zur Bestimmung des Nicotingehaltes.

Durch Verdünnen mit Wasser werden drei verschiedene Konzentrationen hergestellt, 4 Petri-Schalen mit je 25 cm³ einer bestimmten Konzentration versetzt und mit Kultur Nr. 6 geimpft.

Ansätze:

1. 25 cm³ des unverdünnten Tabakextraktes.
2. 25 cm³ eines mit Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnten Extraktes.
3. 25 cm³, Verdünnung 1:2.
4. 25 cm³, Verdünnung 1:3.

Bestimmung des Nicotingehaltes nach 17 Tagen.

Nicotingehalt von 25 cm³ unverdünnter Lauge vor dem Versuch: 0,189 g.

Tabelle 7:

Ansatz	Verdünnung	Nicotingehalt vor Versuch	Nicotingehalt nach Versuch	Nicotinabnahme
1	—	0,189 g	0,186 g	0,003 g = 1,6 %
2	1 : 1	0,094 g	0,089 g	0,005 g = 5,3 %
3	1 : 2	0,063 g	0,003 g	0,060 g = 95 %
4	1 : 3	0,047 g	0,033 g	0,014 g = 30 %

Offenbar wirkt das Nicotin in zu grosser Konzentration störend auf die Tätigkeit der Bakterien. In diesem Sinne würde eine grosse Verdünnung günstig auf den Abbauvorgang wirken. Dadurch wird aber auch die Konzentration der Nährstoffe kleiner, wie auch der osmotische Druck und das p_H der Lösung verändert, sodass sich für eine bestimmte Konzentration ein Optimum der Bedingungen einstellt.

Versuch J_1. **4. Ueber die Abbaugeschwindigkeit.**

Ein wässriger Auszug von «Nostrano»-Tabak wird durch zweimaliges Aufkochen sterilisiert und mit Kultur Nr. 6 geimpft. Viermal je 25 cm³ der so vorbereiteten Lösung werden in 4 sterilen Petri-Schalen bei Zimmer-

temperatur stehen gelassen. Nach bestimmten Zeitabschnitten wird in einer Schale nach der andern das Nicotin bestimmt.

Nicotingehalt der ursprünglichen Lösung: 25 cm³ enthalten 0,076 g Nicotin.

Tabelle 8:

Schale Nr.	Bestimmung nach	Nicotingehalt	Nicotinabnahme
1	4 Tagen	0,046 g	0,030 g = 39,5 %
2	7 Tagen	0,030 g	0,046 g = 60,5 %
3	9 Tagen	0,025 g	0,051 g = 67,0 %
4	15 Tagen	0,017 g	0,059 g = 77,5 %

Versuch J_2.

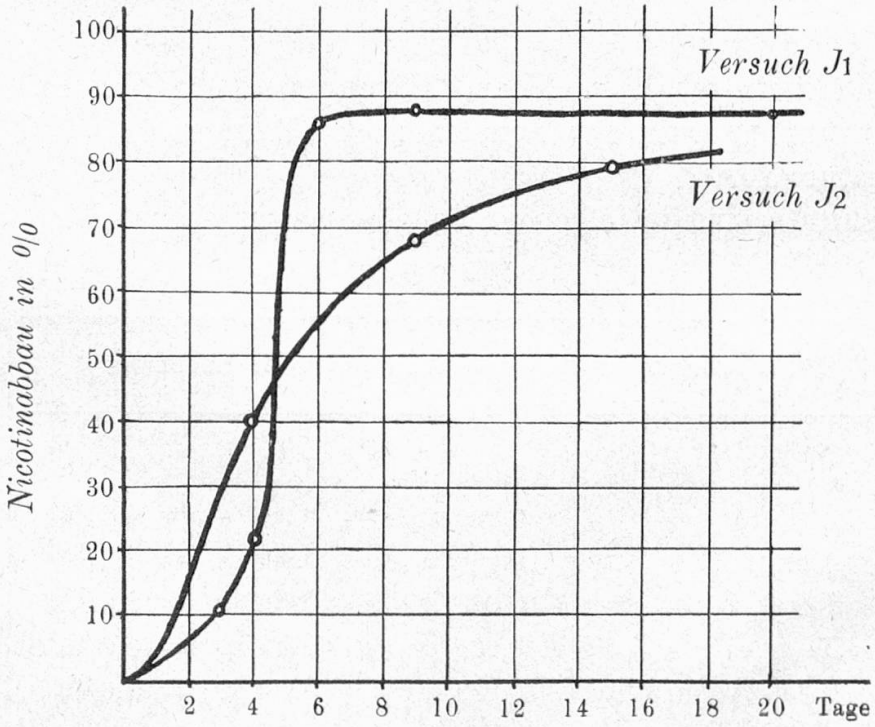
Ausführung wie J_1. Verwendung eines wässrigen «Nostrano»-Auszuges.

Nicotingehalt der frischen Lauge: 25 cm³ enthalten 0,055 g Nicotin.

Tabelle 9:

Schale Nr.	Bestimmung nach	Nicotingehalt	Nicotinabnahme
1	3 Tagen	0,049 g	0,006 g = 10,9 %
2	4 Tagen	0,043 g	0,012 g = 21,8 %
3	6 Tagen	0,008 g	0,047 g = 85,4 %
4	9 Tagen	0,007 g	0,048 g = 87,2 %
5	20 Tagen	0,007 g	0,048 g = 87,2 %

Graphische Darstellung der Ergebnisse der Versuche J_1 u. J_2.



Die beiden Versuche zeigen, dass die Geschwindigkeit des Nicotinabbaus in den ersten Tagen am grössten ist. Nach einiger Zeit flaut sie stark ab, und die letzten Reste des Nicotins werden nur noch sehr langsam abgebaut. Möglicherweise wird die Wirkung der Bakterien durch eigene Ausscheidungsprodukte mit der Zeit gehemmt, oder aber es sind die noch unbekannten Abbauprodukte des Nicotins, welche einen schädlichen Einfluss ausüben.

5. Züchtung von Bakterien in künstlichen Nährlösungen.

Um die Wirkung der Kultur Nr. 6 näher zu studieren, wird versucht, dieselbe in künstlichen Nährlösungen zu züchten, welche zum Teil als einzige Stickstoffkomponente Nicotin enthalten.

Versuch K_1.

Verwendung einer Nährlösung nach *Uschinsky:*

500 g Wasser,
20 g Glyzerin,
3,5 g Kochsalz,
1,5 g prim. Kaliumphosphat,
0,2 g Magnesiumsulfat,
0,05 g Calziumchlorid.

An Stelle der von *Uschinsky* vorgeschriebenen Stickstoffbestandteile werden 1,5 g Nicotin zugegeben, sodass die Nicotinkonzentration ungefähr derjenigen in Versuch H als Optimum gefundenen entspricht. Nach erfolgter Sterilisation werden 6 sterile Petri-Schalen mit je 25 cm^3 dieser Lösung versetzt und mit Kultur Nr. 6 geimpft. Drei Schalen erhalten noch einen Zusatz von je 1 mg Ammonsulfat und einer 4. Schale wird 1 mg Asparagin zugefügt, beides steril.

Genauer Nicotingehalt in 25 cm^3 Lösung: 0,063 g Nicotin.
Nicotinbestimmung in den Schalen nach 17 Tagen.
Temperatur: 25°.
Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 10:

Schale Nr.	Zusatz	Nicotingehalt	Nicotinabnahme
1	—	0,059 g	0,004 g = 6,3 %
2	—	0,060 g	0,003 g = 4,8 %
3	$(NH_4)_2SO_4$	0,060 g	0,003 g = 4,8 %
4	»	0,062 g	0,001 g = 1,6 %
5	»	0,061 g	0,002 g = 3,2 %
6	Asparagin	0,062 g	0,001 g = 1,6 %

Versuch K_2.

Verwendung einer modifizierten Nährlösung nach Fränkel:

7 g Kochsalz,
2 g Kaliumbisphosphat,
1000 g Wasser.

An Stelle der Stickstoffbestandteile treten ca. 1,4 g Nicotin.

Genauer Nicotingehalt: 25 cm³ Nährlösung enthalten 0,054 g.

Nicotinbestimmung nach 21 Tagen.

Tabelle 11:

Schale Nr.	Zusatz	Nicotingehalt	Nicotinabnahme
1	—	0,054 g	—
2	1 mg $(NH_4)_2SO_4$	0,052 g	0,002 g = 3,7 %
3	Spur Asparagin	0,051 g	0,003 g = 5,6 %
4	Spur Asparagin + 1 g Glyzerin	0,053 g	0,001 g = 1,8 %

Aus den Versuchen K_1 und K_2 ist zu sehen, dass in Nährlösungen nach *Uschinsky* und *Fränkel*, die mit Bakterien der Kultur Nr. 6 geimpft werden, an Stelle der Stickstoffbestandteile gegebenes Nicotin praktisch nicht abgebaut wird. Allerdings sind die jeweils gefundenen Werte stets etwas kleiner als die Ursprungswerte, doch liegen die Unterschiede noch innerhalb der Fehlergrenzen. Wie Impfversuche zeigen, sind in allen Schalen die Bakterien am Leben geblieben. Eine Vermehrung, die wie bei Impfungen auf Tabakextrakt zu starker Trübung führt, ist jedoch nicht bemerkbar. Offenbar eignen sich die beiden Nährlösungen nicht für die Züchtung der Kultur 6. Um eine Nährlösung zu finden, welche den Anforderungen der Kultur 6 genügt, werden in dem folgenden Versuch die Stickstoff- und Kohlenstoffquellen systematisch variiert und kombiniert.

Versuch K_3.

16 Kulturkolben (Erlenmeyer mit breiten Böden, Inhalt 400 cm³) werden mit je 50 cm³ Nährlösung versetzt, welche folgende mineralische Zusammensetzung hat:

10 cm³ einer 10 %igen Lösung von KH_2PO_4
10 » » 1 %igen » » $CaCl_2$
10 » » 1 %igen » » NaCl
30 » » 1 %igen » » $MgSO_4 . 7H_2O$
1 » » 1 %igen » » $FeCl_3$
939 cm³ destilliertes Wasser.

Ausser den anorganischen Bestandteilen enthält die Stammlösung noch ca. 2,9 g Nicotin.

Genauer Nicotingehalt von 25 cm³: 0,0725 g Nicotin.

Die einzelnen Kolben erhalten verschiedene Zusätze von Stickstoff- und Kohlenstoffnahrung, wie in der folgenden Tabelle zu sehen ist, und werden mit Kultur Nr. 6 geimpft.

Tabelle 12:

Kolben Nr.	Stickstoffnahrung	Kohlenstoffnahrung
1	—	—
2	0,25 g Harnstoff	—
3	0,25 g Asparagin	—
4	0,25 g Ammonnitrat	—
5	—	1 g Traubenzucker
6	—	1 g Glyzerin
7	—	1 g Zitronensäure
8	0,25 g Harnstoff	1 g Traubenzucker
9	0,25 g Harnstoff	1 g Glyzerin
10	0,25 g Harnstoff	1 g Zitronensäure
11	0,25 g Asparagin	1 g Traubenzucker
12	0,25 g Asparagin	1 g Glyzerin
13	0,25 g Asparagin	1 g Zitronensäure
14	0,25 g Ammonitrat	1 g Traubenzucker
15	0,25 g Ammonitrat	1 g Glyzerin
16	0,25 g Ammonitrat	1 g Zitronensäure

Die 16 Kolben werden an dunklem Ort bei Zimmertemperatur 21 Tage lang stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird in jedem Kolben in 10 cm^3 Flüssigkeit der Nicotingehalt bestimmt und mit Nessler's Reagens auf die Bildung von Ammoniak geprüft.

Genauer Nicotingehalt von 10 cm^3 ursprünglicher Stammlösung: 0,029 g Nicotin.

Resultate siehe Tabelle 13.

Tabelle 13:

Kolben Nr.	Nicotingehalt in 10 cm^3	Nicotinabnahme	NH_3-Bildung	Beobachtungen
1	0,028 g	0,001 g	—	keine Vermehrung
2	0,028 g	0,001 g	—	Trübung
3	0,027 g	0,002 g	NH_3	Trübung
4	0,027 g	0,002 g	(NH_3)	Trübung
5	0,029 g	—	—	keine Vermehrung
6	0,028 g	0,001 g	—	keine Vermehrung
7	0,029 g	—	—	keine Vermehrung
8	0,029 g	—	NH_3	Trübung

Kolben Nr.	Nicotingehalt in 10 cm³	Nicotinabnahme	NH_3-Bildung	Beobachtungen
9	0,029 g	—	NH_3	Trübung
10	0,029 g	—	—	keine Vermehrung
11	0,019 g	*0,010 g = 34,5 %*	NH_3	Trübung
12	0,028 g	0,001 g	NH_3	Trübung
13	0,027 g	0,002 g	—	keine Vermehrung
14	0,029 g	—	(NH_3)	schwache Trübung
15	0,029 g	—	(NH_3)	schwache Trübung
16	0,027 g	0,002 g	(NH_3)	keine Vermehrung

Die in der Spalte NH_3-Bildung eingeklammerten Befunde sind selbstverständlich, da als Stickstoffzusatz Ammonnitrat angewandt worden ist.

Kolben 11 (Zusätze: Asparagin und Traubenzucker) zeigt allein eine Verringerung des Nicotingehaltes. In den übrigen Kolben hat keine Nicotinabnahme stattgefunden, obschon ausser in den mit Zitronensäure versetzten Kolben 7, 10, 13 und 16, sowie den Kolben 1, 5 und 6, welche als Stickstoffquelle nur Nicotin enthalten, die Bakterien lebhaft gediehen.

Die Züchtung von Bakterien in einer Nährlösung entsprechend der Zusammensetzung von Kolben 11 wird im nächsten Versuch in grösseren Ansätzen ausgeführt.

Versuch K_4.

Herstellung von 3 Liter Nährlösung folgender Zusammensetzung:

30 cm³ 10 %ige Lösung von KH_2PO_4
30 » 1 %ige » » $CaCl_2$
30 » 1 %ige » » $NaCl$
90 » 1 %ige » » $MgSO_4 . 7H_2O$
3 » 1 %ige » » $FeCl_3$
2817 cm³ Wasser, darin gelöst:
4,5004 g Nicotin
15,00 g Asparagin
60,0 g Traubenzucker

Von dieser Nährlösung werden 1,5 Liter in 25 Kulturkolben verteilt, diese im Dampftopf sterilisiert und mit je einer Platinöse des Inhaltes von Kolben 11 in Versuch K_3 geimpft. Nach 21 Tagen werden die trüben Inhalte von 24 Kolben vereinigt und durch ein Kieselgurfilter filtriert. In 10 cm³ des Filtrates wird der Nicotingehalt bestimmt.

10 cm³ Lösung enthalten vor dem Versuch .	0,0150 g Nicotin
10 » » » nach 21 Tagen . .	0,0072 g »
Nicotinabnahme	*0,0078 g = 52 %*

Das Filtrat wird für die Prüfung auf eventuell gebildetes Pyridin und Methylamin verwendet (siehe Seite 245).

IV. Untersuchung der Nährsubstrate auf Fermentgehalt und -wirkung.

Nachdem nun einwandfrei feststeht, dass die Bakterien der Kultur Nr. 6 imstande sind, Nicotin abzubauen, sofern das Nährsubstrat ihre Entwicklung und Vermehrung erlaubt, stellt sich nun die Frage, ob das Nicotin mit Hilfe eines von den Bakterien produzierten Fermentes abgebaut wird. Auf Grund der Ergebnisse der Versuchserie K darf allerdings noch nicht geschlossen werden, dass das Nicotin den Bakterien nicht als Stickstoffnahrung dienen kann, da sie nur gedeihen und sich vermehren können bei Anwesenheit von weiteren Stickstoffkörpern, denn schliesslich hat man es mit Lebewesen zu tun, die je nach der Umwelt sich oft sehr verschieden verhalten können.

1. Untersuchung von Tabaklauge.

250 cm³ eines Auszuges von 200 g Tabak Marke «Burley» mit 1500 cm³ Wasser werden in 4 Kulturkolben verteilt, durch halbstündiges Erhitzen im Dampftopf sterilisiert und mit Kultur Nr. 6 geimpft. Nach 8 Tagen werden die vereinigten Inhalte durch ein Kieselgurfilter keimfrei filtriert. Zweimal 10 cm³ des Filtrates dienen zur Bestimmung des Nicotingehaltes.

10 cm³ des Extraktes enthalten vor dem Impfen . .	0,0150 g	Nicotin
10 » » Filtrates » nach 8 Stunden . .	0,0087 g	»
Nicotinabnahme	0,0063 g	»
	= *42 %*	

Ausführung der Filtration zur Erzielung einer keimfreien Lauge: Eine Saugflasche, eine Nutsche und zwei Papierrundfilter, sowie etwa 5 g Kieselgur werden durch einstündiges Erhitzen auf 150° sterilisiert. Nach dem Abkühlen wird die Absaugvorrichtung zusammengestellt und das Filter mit etwas sterilem Wasser angefeuchtet. Unter Saugen mit der Wasserstrahlpumpe wird sodann eine Aufschlämmung des Kieselgurs in sterilem Wasser zu einer 1 mm hohen Schicht über das Filter gegossen. Nach dem Abgiessen des Wassers in der Saugflasche wird mit der Filtration begonnen. Die ersten 50 cm³ des Filtrates werden jedoch nochmals zurückgegossen. Nach 10-maligem Ausspülen der Saugflasche mit keimfreiem Wasser wird die Filtration fortgesetzt. Das nunmehr sich ansammelnde Filtrat ist vollständig keimfrei, wie Impfungen vor und nach der Filtration auf Nähragar ergeben.

a) Nachweis von Oxygenase, Peroxydase und Katalase. [15])

Versuch L.

Prüfung auf Oxygenase:

Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Befunden anderer Forscher vergleichen zu können, wird die von Bach geprägte, die zusammengesetzte Natur der Oxydasen betonende Bezeichnung «Oxygenase» ebenfalls gebraucht, obschon die neuesten Forschungen auf dem Gebiete der Enzyme [16])

den Nachweis erbracht haben, dass die Natur der Oxydasen nicht komplexer Art ist. Aus den gleichen Gründen wird die von Bach und den jüngeren Forschern beschriebene Bestimmungsmethode auch hier verwendet.

20 cm³ des obigen keimfrei filtrierten Tabakextraktes werden mit 25 cm³ Wasser verdünnt und mit 5 cm³ einer 10%igen Lösung von Pyrogallol versetzt. Nach 48stündigem Stehen wird die Flüssigkeit durch eine Asbestschicht filtriert. Das sich ansammelnde Purpurogallin wird mit kaltem Wasser gewaschen und in konzentrierter Schwefelsäure gelöst. Die stark saure Lösung wird mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt und das Purpurogallin mit $\frac{n}{10}$ Kaliumpermanganat titriert. Die Flüssigkeit wird nach und nach vollständig farblos, da auch die Farbstoffe oxydiert werden. Zur deutlichen Erkennung des Endpunktes wird die Lösung mit Vorteil vor Schluss der Titration etwas erwärmt.

In einem Kontrollversuch werden 20 cm³ des Filtrates vor der Zugabe des Pyrogallols durch 5 Minuten langes Erhitzen auf dem Wasserbad inaktiviert und darauf unter denselben Bedingungen genau gleich behandelt wie der Hauptversuch. Die Differenz zwischen dem Permanganatverbrauch des Hauptversuches und demjenigen des Kontrollversuches kann als ein Mass für die Oxygenasewirkung betrachtet werden.

Hauptversuch:	Verbrauchtes Permanganat . . .	5,2 cm³
Kontrollversuch:	» » . . .	4,9 »
Differenz:	. . . . .	0,3 cm³

Die Differenz von 0,3 cm³ ist so klein, dass von einer Oxygenasewirkung direkt nicht mehr gesprochen werden kann. Da die Oxydasen zum Teil jedoch zu den relativ unbeständigen und leicht vergiftbaren Fermenten gehören, bedeutet dieser Befund nicht, dass eine Oxydasewirkung von vornherein ausgeschlossen ist.

Prüfung auf Peroxydase:

20 cm³ des Filtrates, versetzt mit 20 cm³ Wasser, 5 cm³ einer 10%igen Lösung von Pyrogallol und 5 cm³ einer 1%igen Lösung von Hydroperoxyd werden nach 48stündigem Stehen durch Asbest filtriert. Das mit Wasser gewaschene und in konzentrierter Schwefelsäure gelöste Purpurogallin wird wie bei der Bestimmung der Oxygenase mit $\frac{n}{10}$ Permanganat titriert. Wiederum ist es notwendig, den Permanganatverbrauch mit demjenigen eines Kontrollversuches mit inaktiviertem Filtrat zu vergleichen.

Hauptversuch:	Verbrauchtes Permanganat . . .	8,4 cm³
Kontrollversuch:	» » . . .	2,7 »
Differenz	. . . . .	5,7 cm³

Peroxydase ist also deutlich nachweisbar. Ein Vorhandensein dieses Fermentes vor dem Impfen ist ausgeschlossen, da das halbstündige Erhitzen des Tabakextraktes im Dampftopf höchstwahrscheinlich sämtliche Fermente zerstört, sodass nur eine Neubildung durch Bakterien in Frage kommt.

Prüfung auf Katalase:

Zu 20 cm³ des Filtrates, verdünnt mit 25 cm³ Wasser, werden 5 cm³ einer 1%igen Lösung von Hydroperoxyd gegeben. Nach 30minütigem Stehen bei Zimmertemperatur wird die Lösung mit 5 cm³ $\frac{n}{10}$ Schwefelsäure angesäuert und das nicht zersetzte Wasserstoffsuperoxyd mit $\frac{n}{10}$ Permanganat bis zur bleibenden Rosafärbung titriert. Gleichzeitig wird ein Kontrollversuch mit inaktiviertem Extrakt ausgeführt.

Hauptversuch:	Verbrauchtes Permanganat . .	11,7 cm³
Kontrollversuch:	» » . .	36,5 »
Differenz		24,8 cm³

Der Unterschied im Permanganatverbrauch ergibt, dass ein grosser Teil des Hydroperoxydes zersetzt worden ist, was durch die Anwesenheit von Katalase erklärt werden kann, die ebenfalls durch die Bakterien gebildet worden ist.

Versuch M. *b) Prüfung auf Wirksamkeit gegenüber Nicotin.*

20 cm³ eines durch zweimaliges Aufkochen sterilisierten Tabakauszuges werden mit 10 cm³ des obigen keimfreien Filtrates versetzt und in einer grossen Petri-Schale 60 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, worauf in 10 cm³ Flüssigkeit der Nicotingehalt bestimmt wird.

20 cm³ Tabakauszug enthalten	0,0258 g Nicotin
10 cm³ Filtrat enthalten	0,0087 g »
Gesamtnicotin zu Beginn	0,0345 g
Gesamtnicotin nach 60 Stunden	0,0332 g
Nicotinabnahme	0,0013 g = *3,8 %*

Der geringe Unterschied im Nicotingehalt berechtigt nicht zur Annahme einer Fermentwirkung des keimfreien Filtrates, da Veränderungen des Nicotingehaltes in dieser Grössenordnung auch in den durch Hitze sterilisierten Tabakextrakten der Versuchserie F festgestellt worden sind.

2. Untersuchung künstlicher Nährlösung.

Herstellung einer Nährlösung, welche die in Versuch K_3 angegebene Zusammensetzung besitzt und folgende Zusätze erhält:

2,5 g Asparagin in 500 cm³ Lösung
10 g Traubenzucker in 500 cm³ Lösung
0,65 g Nicotin in 500 cm³ Lösung

10 Kulturkolben werden mit je 40 cm³ Nährlösung versetzt und mit Kultur Nr. 6 geimpft. Nach 14tägigem Stehen bei Zimmertemperatur werden die vereinigten Inhalte keimfrei filtriert. In zweimal 10 cm³ wird der Nicotingehalt bestimmt.

10 cm³ Nährlösung enthalten vor dem Versuch	0,013 g Nicotin
10 cm³ Nährlosung enthalten nach 14 Tagen	0,010 g »
Nicotinabnahme	0,003 g = *23 %*

a) Prüfung auf Oxygenase, Peroxydase und Katalase.

Versuch N.

Für die einzelnen Bestimmungen werden je 20 cm³ des Filtrates verwendet. Ueber die Ausführung sei auf Seite ff. verwiesen.

Prüfung auf Oxygenase:

Hauptversuch:	Verbrauchtes Permanganat . . .	1,4 cm³
Kontrollversuch:	» » . . .	1,2 »
Differenz	. . . . .	0,2 cm³

Prüfung auf Peroxydase:

Hauptversuch:	Verbrauchtes Permanganat . . .	1,2 cm³
Kontrollversuch:	» » . . .	1,1 »
Differenz	. . . . .	0,1 cm³

Prüfung auf Katalase:

Hauptversuch:	Verbrauchtes Permanganat . . .	31,6 cm³
Kontrollversuch:	» » . . .	31,8 »
Differenz	. . . . .	0,2 cm³

Nach den kleinen Differenzen zwischen Haupt- und Kontrollversuchen zu schliessen, ist in der Nährlösung von den Bakterien weder Oxygenase und Peroxydase, noch Katalase produziert worden. Dessen ungeachtet hat sich der Nicotingehalt der Nährlösung um 23% verringert.

b) Prüfung auf Wirksamkeit gegenüber Nicotin.

Versuch O.

20 cm³ eines durch zweimaliges Aufkochen sterilisierten Auszuges von Burley-Tabak werden in grossen Petri-Schalen mit 10 cm³ des Nährlösungsfiltrates versetzt. Nach 60 Stunden wird der Nicotingehalt bestimmt.

20 cm³ Burley-Auszug enthalten	0,0258 g Nicotin
10 cm³ Filtrat enthalten	0,0100 g »
Gesamtnicotin zu Beginn	0,0358 g
Gesamtnicotin nach 60 Stunden	0,0351 g

Der praktisch gleichbleibende Nicotingehalt zeigt, dass das Filtrat nicht in der Lage ist, weiteres Nicotin abzubauen, sodass es als unwirksam bezeichnet werden muss.

3. Versuche mit Trockenferment.

a) Anreicherung der Fermente.

Versuch P.

500 g Tabak, Marke «Nostrano», werden mit 4 Liter kaltem Wasser ausgezogen. Der Extrakt wird zum Sieden erhitzt, wobei Eiweisstoffe ausfallen, und durch ein Kieselgurfilter filtriert. 25 Kulturkolben werden mit je 100 cm³ des Filtrates versetzt. Nach zweimaliger Sterilisation im Dampf-

topf werden die Kolbeninhalte mit den Bakterien der Kultur Nr. 6 geimpft. Nach 21 Tagen zeigt eine Nicotinbestimmung, dass alles Nicotin abgebaut worden ist. Die Kolbeninhalte werden nun durch ein Kieselgurfilter filtriert, welches den grössten Teil der Bakterien zurückhält.

4 Tropfen der unfiltrierten Flüssigkeit werden in Nähragar geimpft, davon verschiedene Verdünnungen hergestellt und auf Platten gegossen. Dasselbe wird mit dem Filtrat ausgeführt.

1. Verdünnung unfiltriert . . .	Zahl der Keime	ca. 6000
1. Verdünnung filtriert	» » »	25
2. Verdünnung unfiltriert . . .	» » »	ca. 200
2. Verdünnung filtriert	» » »	0

Aus einer Probe des Filtrates fällt durch Zusatz der etwa dreifachen Menge Alkohol oder Aceton oder durch Sättigen mit Ammonsulfat ein fester Körper aus. Dieser wird aus der 2,5 Liter betragenden Hauptmenge durch Zusatz von ca. 6 Liter Alkohol gewonnen. Nach dem Abnutschen wird er mit Alkohol und Aether gewaschen. Nach Aufarbeitung eines zweiten, gleich grossen Ansatzes werden 6,5 g eines Trockenpräparates erhalten, welches zur weiteren Reinigung nochmals in 300 cm³ Wasser gelöst, mit 2 Liter Alkohol wiederum ausgefällt, abgenutscht und an der Luft getrocknet wird. Diese Reinigung wird noch zweimal wiederholt.

b) Nachweis von Oxygenase, Peroxydase und Katalase.

Versuch Q.

0,2 g des Trockenpräparates werden in 200 cm³ Wasser gelöst. Zum Nachweis der Oxydationsfermente dienen je 20 cm³ dieser Lösung entsprechend 0,02 g Ferment.

Prüfung auf Oxygenase:

Hauptversuch: Verbrauchtes Permanganat . . .	8,7 cm³
Kontrollversuch: » » . . .	5,2 »
Differenz = Mass für Oxygenasegehalt	3,5 cm³

Prüfung auf Peroxydase:

Hauptversuch: Verbrauchtes Permanganat . . .	12,1 cm³
Kontrollversuch: » » . . .	3,7 »
Differenz = Mass für Peroxydasegehalt	8,4 cm³

Prüfung auf Katalase:

Hauptversuch: Verbrauchtes Permanganat . . .	6,7 cm³
Kontrollversuch: » » . . .	27,5 »
Differenz = Mass für Katalasegehalt	20,8 cm³

Das aus mit Kultur 6 geimpfter Tabaklauge gewonnene Trockenpräparat enthält sowohl Oxygenase und Peroxydase, wie auch Katalase, diese sogar in relativ grosser Menge.

c) Prüfung auf Wirksamkeit gegenüber Nicotin.

Versuch R_1.

200 cm³ eines Tabakextraktes der Marke Burley werden durch Zusatz von 1 g in 1 cm³ Aether gelöstem Thymol sterilisiert und mit einer ebenfalls mit Thymol sterilisierten Lösung von 0,2 g des Trockenpräparates in 5 cm³ Wasser versetzt. Von beiden Lösungen bestätigen Impfungen auf Gelatine die vollständige Keimfreiheit. In der für die Versuchsserie E verwendeten Apparatur wird nun durch diese so behandelte Tabaklauge mit Watte und Bichromat-Schwefelsäure gereinigte Luft geblasen. Die Temperatur der Flüssigkeit beträgt 38,5°. Nach 48 Stunden wird in einem aliquoten Teil der Flüssigkeit das Nicotin bestimmt.

Gesamtnicotin zu Beginn des Versuches . .	0,274 g
Gesamtnicotin nach 48 Stunden	0,260 g
Nicotinabnahme	0,014 g = *5,1 %*

Versuch R_2.

Gleiche Ausführung wie Versuch R_1.

Angewandt: 100 cm³ eines Extraktes von «Burley».
0,4 g Trockenpräparat in 10 cm³ Wasser.

Dauer des Versuchs: 96 Stunden.

Temperatur: 38,5°.

Gesamtnicotin vor dem Versuch	0,1292 g
Gesamtnicotin nach 36 Stunden	0,1183 g
Nicotinabnahme	0,0109 g = *7,7 %*

Impfungen auf Gelatine ergeben, dass in beiden Versuchen die Flüssigkeit keimfrei geblieben ist. Die geringe Abnahme des Nicotingehaltes entspricht derjenigen, welche im Versuch D, Seite 222, beim Durchleiten von Luft durch Nicotinlösung festgestellt worden ist. Auf keinen Fall darf sie der Wirkung der Oxydationsfermente zugeschrieben werden, welche besonders im Versuch R_2 in relativ hoher Konzentration zugegeben worden sind.

Versuch R_3.

250 cm³ einer wässerigen Nicotinlösung, enthaltend 0,277 g Nicotin, werden mit 3 Tropfen n NaOH schwach alkalisch gemacht und mit 0,25 g des Trockenpräparates versetzt. Nach Zusatz von 2 cm³ Toluol wird ein kräftiger Luftstrom durch die Flüssigkeit geblasen, welche sofort stark aufschäumt.

Temperatur des Schaumes: 34°.

Dauer des Versuchs: 96 Stunden.

Das im Ueberlaufgefäss angesammelte Wasser und die Inhalte der Waschflaschen enthalten nach Prüfung mit Kieselwolframsäure kein Nicotin. Nach Abbruch des Versuchs wird der Kolbeninhalt auf 250 cm³ aufgefüllt und in zweimal je 10 cm³ der Nicotingehalt bestimmt.

10 cm³ der Lösung enthalten vor dem Versuch . .	0,0111 g Nicotin
10 cm³ der Lösung enthalten nach 96 Stunden . .	0,0103 g »
Nicotinabnahme	0,0008 g = 7,2 %

Ein zweiter Ansatz ergibt eine Nicotinverminderung von 4%. Diese geringen Abnahmen dürfen ebenfalls nicht auf die Wirkung der Fermente zurückgeführt werden.

Die Versuche L und Q zeigen, dass die Bakterien der Kultur Nr. 6 die Eigenschaft besitzen, unter gewissen Bedingungen Oxygenase, Peroxydase und Katalase zu erzeugen. Auf Grund der Versuche M, N und R muss jedoch eine Einwirkung dieser Fermente auf den Abbauvorgang des Nicotins verneint werden.

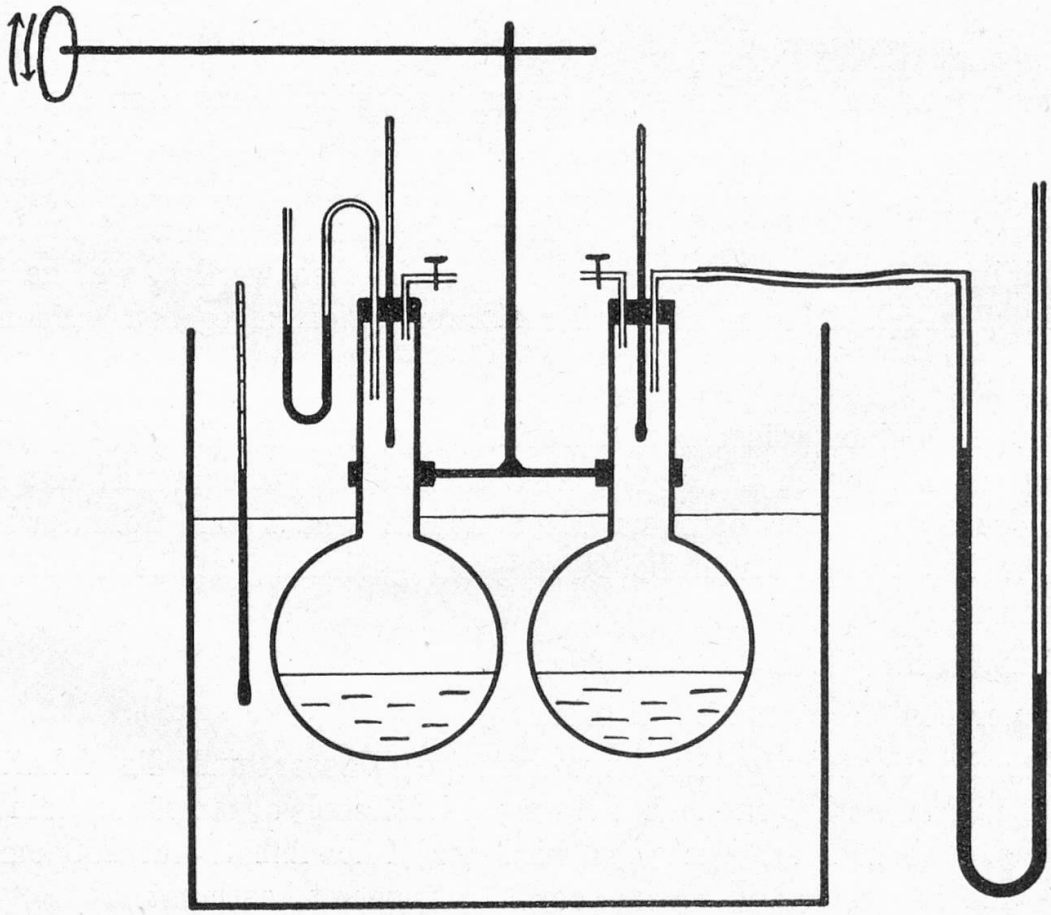
V. Einige Faktoren des bakteriellen Nicotinabbaus.

1. Die Rolle des Sauerstoffs.

In früheren Versuchen ist gezeigt worden, dass eine innige Berührung der geimpften Tabaklauge mit Luft den Nicotinabbau wesentlich fördert, sodass vermutet werden kann, dass dem Sauerstoff bei diesem Vorgang eine gewisse Bedeutung zukommt. Eine eingehende Untersuchung dieser Verhältnisse wird in den folgenden Versuchen vorgenommen.

Versuch S_1.

25 cm³ eines durch zweimaliges Aufkochen sterilisierten Auszuges von 200 g «Burley» mit 1500 cm³ Wasser werden in ein steriles Rundkölbchen



von 100 cm³ Inhalt gegeben, welches mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen wird. Durch das eine Loch ist das Kölbchen mit einem Wassermanometer in Verbindung. Im zweiten Loch steckt ein Thermometer, das jedoch nicht in die Flüssigkeit eintaucht, und durch das dritte Loch führt ein Glasrohr mit Hahn. Das Kölbchen wird an einer Schüttelmaschine so befestigt, dass es in einem Thermostaten schwingen kann.

Ein zweites, gleich grosses Kölbchen, das jedoch nur 25 cm³ destilliertes Wasser enthält, wird auf dieselbe Weise in den Thermostaten gehängt und dient sowohl als Blindversuch, wie auch als Luftthermometer.

Die Skizze auf Seite 242 stellt die beschriebene Apparatur dar.

Nachdem der Inhalt des Kölbchens mit der Kultur Nr. 6 geimpft worden ist, wird es bei geöffnetem Hahn in den Thermostaten gehängt und langsam hin und her geschwungen. Sobald die Temperatur im Innern des Kölbchens sich ausgeglichen hat, wird der Hahn geschlossen, sodass es nunmehr nur noch mit dem Manometer in Verbindung steht. Eventuelle kleine Temperaturschwankungen lassen sich im Blindversuch schön beobachten und können so am Ende des Versuchs berücksichtigt werden. Nach etwa 12 Stunden lässt sich an dem auf Volumen geeichten Manometer eine kleine Volumenabnahme beobachten, die langsam aber stetig fortschreitet. Um keine zu grossen Unterdrucke auftreten zu lassen, wird von Zeit zu Zeit der Druck durch Oeffnen des Hahns ausgeglichen. Die Temperatur der Luft im Kölbchen beträgt während des ganzen Versuches 38,2°. Nach 96 Stunden wird der Versuch abgebrochen und in der gesamten Flüssigkeit das Nicotin bestimmt.

Gesamtnicotin zu Beginn	0,0450 g
Gesamtnicotin nach 96 Stunden . . .	0,0402 g
Nicotinabnahme	0,0048 g = *10,7 %*
Sauerstoffaufnahme	*2,70 cm³* (38°, 720 mm) = 3,2 mg

Gleiche Ausführung der folgenden Versuche.

Versuch S_2.

Angewandt: 25 cm³ Extrakt von «Burley».
Versuchsdauer: 48 Stunden.
Temperatur im Kölbchen: 38,5°.

Gesamtnicotin zu Beginn	0,0450 g
Gesamtnicotin nach 48 Stunden . .	0,0423 g
Nicotinabnahme	0,0027 g = *6 %*
Sauerstoffaufnahme	*2,23 cm³* (38°, 720 mm) = 2,65 mg

Versuch S_3.

Angewandt: 25 cm³ Extrakt von «Burley».
Versuchsdauer: 144 Stunden.
Temperatur im Kölbchen: 41,3°.

Gesamtnicotin zu Beginn	0,0450 g
Gesamtnicotin nach 144 Stunden .	0,0370 g
Nicotinabnahme	0,0080 g = *17,7 %*
Sauerstoffaufnahme	*6,40 cm³* (41°, 720 mm) = 7,76 mg

Versuch S_4.

Angewandt: 20 cm³ Extrakt von «Burley», versetzt mit 20 cm³ des Oxydationsfermente enthaltenden, keimfrei filtrierten Tabakextraktes von Versuch L.

Keine Impfung mit Kultur Nr. 6.
Versuchsdauer: 72 Stunden.
Temperatur im Kölbchen: 38,3°.

Gesamtnicotin zu Beginn	0,0432 g
Gesamtnicotin nach 72 Stunden	0,0428 g
Nicotinabnahme	0,0004 g

Entsprechend der geringfügigen Nicotinabnahme ist auch keine Sauerstoffaufnahme zu beobachten.

Versuch S_5.

Angewandt: 25 cm³ Extrakt von «Burley».
Temperatur im Kölbchen: 38,0°.

Nach 48 Stunden werden dem Kölbchen 5 cm³ Flüssigkeit zur Bestimmung des Nicotingehaltes entnommen und der Rest des Inhaltes durch Zusatz von etwas Toluol sterilisiert. Nach weiteren 48 Stunden wird der Nicotingehalt nochmals ermittelt.

Gesamtnicotin zu Beginn	0,0450 g
Gesamtnicotin nach 48 Stunden . .	0,0402 g
Nicotinabnahme	0,0048 g = *10,7 %*
Sauerstoffaufnahme	*2,30 cm³* (38°, 720 mm) = 2,74 mg
Gesamtnicotin unmittelbar v. Thymolzus.	0,0322 g
Gesamtnicotin 48 Stunden nach Thymolzus. . . .	0,0318 g
Nicotinabnahme	0,0004 g

Weiterer Sauerstoff ist nicht aufgenommen worden.

Versuch S_6.

Angewandt: 25 cm³ einer Nährlösung, welche die in Versuch K_3 angegebene Zusammensetzung mit denselben Zusätzen, ausgenommen Nicotin, besitzt.

Impfung mit Kultur Nr. 6.
Versuchsdauer: 130 Stunden.
Temperatur im Kölbchen: 40,2°.

Im Laufe der Zeit ist eher eine kleine Volumenzunahme zu beobachten. Impfungen auf Agar und Gelatine zeigen, dass die Bakterien sehr gut ge-

diehen sind und sich reichlich vermehrt haben, was sich auch an der auftretenden Trübung kundtut.

Aus der Versuchsserie S ist zu ersehen, dass parallel mit der Nicotinabnahme eine Sauerstoffaufnahme vor sich geht, wie dies auch *Fodor* und *Reifenberg* in ihren Versuchen feststellen konnten[10]). Da die Anwesenheit von Oxydationsfermenten allein keine Sauerstoffaufnahme mit sich bringt, ist auch nach diesen Versuchen die Wirkung dieser Fermente ausgeschlossen. Ein Vergleich der Ergebnisse des Versuches S_6 mit denjenigen der übrigen Versuche ergibt, dass die Sauerstoffaufnahme nicht lediglich mit der Atmung der Bakterien zusammenhängt. Auf Grund dieser Versuche, sowie der Versuche A und E, welche die Wirkung inniger Berührung der Tabaklauge mit Luft demonstrieren, darf geschlossen werden, dass es sich bei dem vorliegenden bakteriellen Nicotinabbau um einen Oxydationsprozess handelt.

2. Prüfung auf Pyridin als Abbauprodukt [13, 17]).

Das im Versuch K_4 gewonnene Filtrat der Nährlösung, in welcher mittels Impfung mit Kultur Nr. 6 ein Nicotinabbau von 52% bewirkt worden ist, wird mit Schwefelsäure angesäuert und auf dem Wasserbade auf 50 cm³ eingeengt. Nun wird es mit Natronlauge alkalisch gemacht und die flüchtigen Basen mit Wasserdampf in verdünnte Salzsäure abdestilliert bis die Menge des Destillates ca. 500 cm³ beträgt. Das Nicotin wird mit Kieselwolframsäure ausgefällt, die milchige Flüssigkeit kurze Zeit auf 90° erhitzt und nach dreistündigem Stehen das Nicotin-Kieselwolframat abfiltriert. Die Kieselwolframsäure vermag das Pyridin nicht abzuscheiden, wenn dieses in grosser Verdünnung vorliegt. Das saure Filtrat wird wiederum eingeengt, alkalisch gemacht und mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat II wird in zwei Teile geteilt und im einen auf Pyridin geprüft nach der Methode von *Kulikow* und *Krestowosdwigenskaja*[17]). Der andere Teil des Destillates wird für die Prüfung auf Methylamin verwendet.

Prüfung auf Pyridin: 20 cm³ Bromwasser werden mit einer 10%igen Lösung von KCN versetzt bis die Bromfarbe verschwunden ist. Das dabei entstandene Bromcyan wird mit 10 cm³ Amylalkohol ausgezogen und dieser im Scheidetrichter von der wässerigen Lösung getrennt. 20 cm³ des obigen Destillates II werden nun mit 1 cm³ des bromcyanhaltigen Amylalkohols versetzt und gut durchgeschüttelt. Nach Zusatz von 1 cm³ einer gesättigten, wässerigen Lösung von Anilin und weiteren 10 cm³ Amylalkohol und nochmaligem energischem Schütteln nimmt die Alkoholschicht eine gelbe Farbe an, die nach und nach intensiver wird. Ein Vergleich des Farbtons mit analog ausgeführten Blindversuchen, zu welchen einmal destilliertes Wasser, das andere Mal eine Lösung von 1 mg Pyridin in 100 cm³ Wasser benutzt wird, ergibt die Abwesenheit von Pyridin, welches nach *Kulikow* auf diese Weise noch in einer Verdünnung von 0,025 mg im Liter nachgewiesen werden kann.

Die Ausführung dieses Nachweises mit wässerigen Lösungen von Kollidin und reinstem Nicotin fallen überraschenderweise positiv aus. Ob diese Verbindungen tatsächlich auch eine Gelbfärbung verursachen oder ob sie durch Spuren von Pyridin verunreinigt sind, kann nicht entschieden werden.

Ein Teil der Tabaklauge von Versuch G_3, in welcher nach Impfung mit Kultur Nr. 6 das Nicotin zu 97% abgebaut worden ist, wird auf dieselbe Weise mit negativem Erfolg auf die Anwesenheit von Pyridin geprüft.

Die Vermutung von *Fodor* und *Reifenberg*[11]), dass unter den Abbauprodukten des Nicotins Pyridin zu finden sei, kann bei unseren Versuchen nicht bestätigt werden, zu welchem Befund auch *Bodnar* und *Barta*[13]) bei Versuchen mit fermentierendem Tabak gekommen waren.

3. Nachweis von Methylamin [13, 18]).

Der zweite Teil des Destillates II des vorigen Versuchs, welches nicotin- und kieselwoframsäurefrei ist, wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert. Die alkoholische Lösung wird wiederum eingedunstet und der Rückstand nochmals in absolutem Alkohol aufgenommen. Diese Reinigung wird ein drittes Mal ausgeführt und die zuletzt zurückbleibenden Salze werden in 10 cm^3 Wasser gelöst. Zur Abtrennung des immer noch vorhandenen Ammoniaks wird zu der Lösung 5 g reinstes gelbes Quecksilberoxyd gegeben und die Aufschlämmung zwei Stunden gut durchgeschüttelt, wobei das Ammoniak mit dem Quecksilberoxyd eine schwer lösliche Verbindung eingeht. Von dieser und dem überschüssigen Quecksilberoxyd wird abfiltriert, das Filtrat alkalisch gemacht und die flüchtigen ammoniakfreien Basen mit Wasserdampf abdestilliert. Das Destillat reagiert gegen Methylrot alkalisch, riecht schwach nach Methylamin und gibt mit Nessler's Reagens die für Methylamin typische hellgelbe Fällung. Mit Kieselwolframsäure wird ein beim Verdünnen wieder in Lösung gehender Niederschlag erhalten. Pikrolonsäure gibt eine Trübung, eine kristalline Ausscheidung ist jedoch auch nach Impfung mit Methylamin-Pikrolonat nicht zu erhalten.

Zum gleichen Resultat führt die analog ausgeführte Untersuchung des Waschflascheninhaltes von Versuch G_3.

Eine Bildung von Methylamin aus Asparagin ist sehr unwahrscheinlich, sodass es als Abbauprodukt von Nicotin betrachtet werden darf.

Weiteren Aufschluss über die Abbauprodukte des Nicotins wird eine ausführliche Stickstoffbilanz, in welcher Gesamtstickstoff, Basenstickstoff, Amin-N, Ammoniak-N, Amid-N und Nicotingehalt einer Tabaklauge vor und nach Einwirkung der Bakterien miteinander verglichen werden, geben. Die Ergebnisse dieser Versuche werden später veröffentlicht werden.

VI. Zur Methodik der Nicotinbestimmungen [19]).

1. Die Nicotinbestimmung im Tabak.

Die Bestimmungen werden nach einem etwas modifizierten Kieselwolframsäure-Verfahren ausgeführt. Das Nicotin wird aus dem Tabak mit Natronlauge frei gemacht, da nach nie veröffentlichten Untersuchungen im hiesigen Institut, sowie nach den Mitteilungen von *Waser* und *Stähli* [20]) einerseits, und *Pyriki* [21,22]) andererseits, mit Magnesiumoxyd nicht alles Nicotin in Freiheit gesetzt wird. Nach der Fällung des Nicotins mit Kieselwolframsäure wird die milchige Flüssigkeit kurze Zeit auf 80 bis 90° erhitzt, wobei Klärung und bei der Abkühlung eine kristalline Abscheidung des Nicotin-Kieselwolframates eintritt. Dieses wird auf einem Goochtiegel gesammelt, mit verdünnter Salzsäure gewaschen, eine Stunde bei 120° getrocknet und gewogen. Gewicht des Niederschlages mal 0,1012 ergibt die Menge Nicotin.

Die Bestimmung wird ausgeführt mit etwa 2 g zerkleinertem Tabak, welche in einen Kolben von 150 cm^3 Inhalt gegeben und mit 40 cm^3 Wasser durchgemischt werden. Nach Zusatz von 10 g Kochsalz und 5 cm^3 einer 30%igen Natronlauge wird das Nicotin mit Wasserdampf in eine mit 2—3 cm^3 10%iger Salzsäure beschickte Vorlage destilliert. Wenn eine Probe des Destillates mit Kieselwolframsäure keine Opaleszenz mehr gibt, wird die Destillation abgebrochen. Im Destillat wird das Nicotin mit Kieselwolframsäure gefällt und nach kurzem Erhitzen, wie oben beschrieben, filtriert, getrocknet und gewogen.

2. Die Nicotinbestimmung im Tabakextrakt.

5—25 cm^3 des Tabakextraktes werden mit 5 cm^3 30%iger Natronlauge, 10 g Kochsalz und soviel Wasser versetzt, dass die Flüssigkeitsmenge etwa 50 cm^3 beträgt. Das Nicotin wird mit Wasserdampf in 3 cm^3 10%ige Salzsäure destilliert und mit Kieselwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wird wie bei der Bestimmung des Nicotins im Tabak behandelt und zum Schluss gewogen.

3. Darstellung der Kieselwolframsäure.

Da die Qualität der Kieselwolframsäure für die kristalline Ausbildung des Nicotin-Kieselwolframates von grosser Bedeutung ist, wurde für sämtliche in dieser Arbeit vorgenommenen Nicotinbestimmungen ein selbsthergestelltes Produkt verwendet. Die Darstellung der Kieselwolframsäure gründet sich dabei auf ihre Löslichkeit in Aether und soll kurz beschrieben werden:

1000 g Natriumwolframat ($Na_2WO_4 . 2\ H_2O$) werden in möglichst wenig heissem Wasser gelöst und unter Umrühren mit 117,1 g einer 26,3%igen Wasserglaslösung versetzt. Die stark alkalisch reagierende Flüssigkeit wird vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure neutralisiert und über Nacht

stehen gelassen, wobei sich eine Menge Natriumsulfat abscheidet. Von diesem wird abgenutscht und das Filtrat im Scheidetrichter mit Aether und 50%iger Schwefelsäure versetzt. Die Kieselwolframsäure bildet mit Aether ölige Tropfen, die sich von der übrigen Flüssigkeit scharf trennen. Die ätherige Lösung wird in dünner Schicht in grosse Kristallisierschalen gegossen. Aus diesen scheidet sich nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur die Kieselwolframsäure in schönen Kristallen und ausserordentlich rein aus. Ausbeute: 670 g = 75% der Theorie (berechnet auf WO_3).

Für die Anregung zur Ausführung der vorliegenden Arbeit und für das ständige grosse Interesse, welches er dafür bekundete, bin ich Herrn Prof. Dr. E. Winterstein zu grossem Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. M. Düggeli schulde ich ebenfalls Dank für die zahlreichen wertvollen Ratschläge und die Ueberlassung der bakteriologischen Gerätschaften.

Zusammenfassung.

1. Inniges Durchlüften von stark feuchtem Tabak oder von Tabaklauge (patentiertes Verfahren) führt zu einem weitgehenden Abbau des Nicotins. Verflüchtigung des Nicotins oder Oxydation durch Luftsauerstoff ohne Katalysatoren kommt nicht in Frage.

2. Der Nicotinabbau wird durch antiseptisch wirkende Stoffe gehemmt.

3. Nicotin kann in sterilen Tabaklaugen durch Impfung mit auf dem Tabakblatt vorkommenden Bakterien fast vollständig abgebaut werden.

4. Der Nicotinabbau ist bei einer bestimmten Konzentration des Tabakauszuges ein Maximum.

5. Die Abbaugeschwindigkeit ist in den ersten Stadien am grössten.

6. Es gelingt, das Nicotin in einer künstlichen Nährlösung durch Impfung mit Bakterien zum Teil abzubauen.

7. Die Bakterien sind imstande, unter gewissen Bedingungen Oxygenase, Peroxydase und Katalase zu produzieren.

8. Es wird ein Trockenpräparat hergestellt, welches die genannten Fermente stark angereichert enthält.

9. Der Nicotinabbau wird in unseren Versuchen nicht durch Oxygenase, Peroxydase und Katalase bewirkt.

10. Mit der Nicotinabnahme geht gleichzeitig eine Sauerstoffaufnahme vor sich. Der Nicotinabbau darf als ein Oxydationsprozess angesehen werden.

11. Die Frage, ob das Nicotin den Bakterien als Nahrung dient oder ob es auf fermentativem Wege abgebaut wird, kann nicht endgültig

beantwortet werden. Eine Fermentwirkung scheint aber wahrscheinlicher zu sein. Das Ferment ist aber ausserhalb der lebenden Zelle nicht mehr wirksam.

12. Pyridin tritt als Abbauprodukt des Nicotins nicht auf.

13. Das bei der Fermentation von Tabak entstehende Ammoniak stammt nicht aus dem Nicotin. Es ist wohl auf den Abbau der Amide und der Aminosäuren zurückzuführen.

14. Methylamin kann als Abbauprodukt des Nicotins nachgewiesen werden.

15. Es wird eine Methode zur Darstellung von Kieselwolframsäure gegeben.

Literaturverzeichnis.

1) *E. Suchsland,* Ber. d. deutsch. bot. Ges. **9**, 79, 1891.

2) *J. Behrens,* Zeitschr. f. Pflanzenkrankheiten, **3**, 82, 1893.

3) *J. Behrens,* Zentralbl. f. Bakt. **7**, **II**, 1, 1901.

4) *A. Faitelowitz,* Bioch. Z. **224**, 459, 1930.

5) *A. Faitelowitz,* Biochem. Journ. **21**, 226, 1927.

6) *A. Fodor* u. *A. Reifenberg,* Bioch. Z. **228**, 327, 1930.

7) *J. Bodnar* u. *L. Barta,* Bioch. Z. **233**, 311, 1931.

8) *O. Loew,* Zentralbl. f. Bakteriologie **7**, **II**, 673, 1901.

9) *J. Behrens,* Lafar, Handbuch d. tech. Mykologie, Bd. 5, 1.

10) *A. Fodor* u. *A. Reifenberg,* Biochem. Journ. **19**, 830, 1935.

11) *A. Fodor* u. *A. Reifenberg,* Zeitschr. physiol. Chem. **162**, 1, 1927.

12) *L. Barta,* Bioch. Z. **257**, 406, 1933.

13) *J. Bodnar* u. *L. Barta,* Bioch. Z. **247**, 218, 1932.

14) *D. R. P.* 557151 und *D. R. P.* 557285.

15) *A. Bach* u. *A. Oparin,* Bioch. Z. **134**, 183, 1923.

16) *H. v. Euler,* Chemie der Enzyme, 1934.

17) *I. W. Kulikow* u. *T. N. Kresdowosdwigenskaja,* Z. f. analyt. Chem. **79**, 452, 1929.

18) *G. Klein,* Handb. f. Pflanzenanal. Bd. 4, 1. Teil, S. 233 ff.

19) *P. König* u. *W. Dörr,* Zeitschr. Unters. Lebensm. **67**, 113, 1934.

20) *E. Waser* u. *M. Stähli,* Zeitschr. Unters. Lebensm. **64**, 470 u. 569, 1932.

21) *C. Pyriki,* Pharm. Zentralh. **74**, 17, 1933.

22) *C. Pyriki,* Ztschr. Unters. Lebensm. **68**, 554, 1934.