

**ZUR MORPHOLOGIE UND
PHYSIOLOGIE EINIGER FÜR DIE
KÄSEREI WICHTIGER KAHMHEFEN
(MYCODERMA)**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT

ZU KIEL

VORGELEGT VON

AUGUST HUESMANN

AUS WENNEMANNSWISCH,
KREIS NORDERDITHMARSCHEN

SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH. 1926

ZUR MORPHOLOGIE UND
PHYSIOLOGIE EINIGER FÜR DIE
KÄSEREI WICHTIGER KAHMHEFEN
(MYCODERMA)

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT

ZU KIEL

VORGELEGT VON

AUGUST HUESMANN

AUS WENNEMANNSWISCH,
KREIS NORDERDITHMARSCHEN

KIEL 1926

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH 1926

Referent: Prof. Dr. Henneberg
Korreferent: Prof. Dr. Tischler
Tag der mündlichen Prüfung: 4. März 1926
Zum Druck genehmigt:
Ebeling, i. V. des Dekans. 12. April 1926

ISBN 978-3-662-31284-1 ISBN 978-3-662-31488-3 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-662-31488-3

Inhaltsangabe.

Einleitung (S. 1).

Botanischer Teil (S. 2).

I. Morphologie (S. 2).

A. Bei mikroskopischer Betrachtung (S. 2).

1. Die Kahlhefenzelle in den gewöhnlichen Nahrungsmitteln ohne besondere Zusätze (S. 2).

a) Zellform, Zellgröße, Zellinhalt (S. 3).

b) Sproßverbände (S. 4).

c) Mycelbildung (S. 4).

2. Die Kahlhefenzelle in Nahrungsmitteln mit besonderen Zusätzen (S. 5).

a) Zusatz von Zuckerarten (S. 5).

b) Zusatz von Säuren (S. 6).

c) Zusatz von Alkoholen (S. 7).

d) Zusatz von „Giften“ (S. 7).

B. Bei makroskopischer Betrachtung (S. 7).

1. Wachstum auf flüssigen Nahrungsmitteln (S. 7).

2. Wachstum auf festen Nahrungsmitteln (S. 8).

a) Auf Würzeagar (S. 8).

b) Auf Würzegeatine (S. 8).

c) Auf Bouillon-Gelatine (S. 9).

II. Physiologie (S. 9).

A. Lebensbedingungen (S. 9).

1. Temperatur (S. 9).

2. Luft (S. 9).

3. Feuchtigkeit (S. 10).

4. Licht (S. 10).

5. Nahrungsmittel (S. 10).

a) Ohne besondere Zusätze (S. 10).

b) Mit Zusätzen (S. 11).

1. Zuckerarten (S. 11).

2. Säuren (S. 12).

3. Alkohole (S. 13).

4. Stickstoffhaltige Salze (S. 13).

5. Andere Salze (S. 13).

6. „Gifte“ (S. 14).

B. Lebensäußerungen und Enzymtätigkeit (S. 15).

1. Wachstumsschnelligkeit (S. 15).

2. Fortpflanzung (S. 15).

3. Bildung von Geruchs- und Geschmacksstoffen (S. 15).

4. Gärvermögen (S. 15).

5. Reduktase (S. 15).

6. Fettspaltung (S. 16).

7. Eiweißabbau (S. 16).
 - a) Hühnereiweiß (S. 16).
 - b) Caseineiweiß (S. 16).
 1. Ohne Zusätze (S. 16).
 2. Mit Zusatz von Zuckerarten (S. 17).

Zusammenfassung (S. 18).

Chemisch-experimenteller Teil (S. 19).

I. Bisherige Arbeiten über den Eiweißabbau durch Mikroorganismen (S. 19).

II. Eigene Untersuchungen (S. 20).

Chemische Analyse der primären und sekundären Spaltprodukte bei dem Abbau von Caseineiweiß (S. 20).

1. Angaben über das angewandte Casein, Beimpfung und äußerliche Veränderungen während des Abbaues (S. 20).
 2. Die Verteilung des Stickstoffs in den Abbauprodukten (S. 20).
 3. Nachweis und Prüfung auf leicht zersetzliche und leicht flüchtige Spaltprodukte (S. 21).
 - a) Schwefelwasserstoff, Indol (S. 21).
 - b) Tryptophan (S. 21).
 - c) Mit Wasserdampf flüchtige Säuren (S. 21).
 - d) Mit Wasserdampf flüchtige Basen (S. 26).
 4. Untersuchung auf unverändertes Casein und ihm nahestehende Eiweißkörper (S. 28).
 - a) Behandlung mit Alkali (S. 28).
 - b) Behandlung mit Essigsäure (S. 28).
 5. Untersuchung auf Peptone und sekundäre Abbauprodukte (S. 28).
 - a) Fällung mit Gerbsäure (S. 28).
 - b) Fällung mit Bleisalzen (S. 28).
 1. Bleiacetat (S. 29).
 2. Bleiessig (S. 29).
 6. Untersuchung auf Hexonbasen (S. 30).
 - a) Fällung mit Phosphorwolframsäure (S. 30).
 - b) Bestimmung von Histidin (S. 30).
 - c) Bestimmung von Arginin (S. 31).
 - d) Bestimmung von Lysin (S. 31).
 7. Untersuchung auf Aminosäuren (S. 31).
 - a) Veresterung nach *Fischer* (S. 32).
 - b) Bestimmung von Tyrosin (S. 32).
 - c) Bestimmung von Prolin (S. 33).
 - d) Bestimmung von Leucin (S. 34).
 - e) Bestimmung von Alanin (S. 34).
 - f) Bestimmung von Valin (S. 35).
 - g) Bestimmung von Phenylalanin (S. 35).
 - h) Untersuchung auf Asparaginsäure und Glutaminsäure (S. 35).
 8. Zusammenfassung (S. 36).
-

Einleitung.

Die Kahlmhefen bilden zusammen mit den Weinhefen, den Milchsuckerhefen, den Torulahefen und den Fruchtätherhefen die Klasse der „wilden“ Hefen. Diese Hefen kommen überall in der Natur vor, im Gegensatz zu den „Kulturhefen“, welche, wegen ihrer besonderen Eigenschaften und Fähigkeiten für bestimmte Zwecke herangezüchtet, nur da zu finden sind, wo sie wegen dieser Eigenschaften gebraucht werden: die Spiritushefen in den Brennereien, die Bierhefen in den Brauereien und die Bäckereihefen in den Hefefabriken und Bäckereien. Von *Henneberg*¹⁾ ist eine der Bäckereihefe sehr nahestehende Art allerdings auch in der Natur vorgefunden worden. Dieser Fall gehört jedoch zu den ganz seltenen Ausnahmen.

Wenn auch die Kulturhefen in bezug auf ihre Wichtigkeit an erster Stelle stehen, so sind doch auch viele wilde Hefen, wie die Weinhefen und gewisse Kahlmhefenarten, für den Menschen von großer Bedeutung.

Je nach ihren Eigenschaften unterscheidet man bei den Kahlmhefen schädliche und nützliche Arten. Als Schädlinge sind z. B. die in Brauereien und Weinkeltereien vorkommenden, Alkohol verzehrenden Arten anzusehen; bei der Butter-, Margarine- und Käseherstellung werden die Arten mit starkem Fettspaltungs- und Peptonisierungsvermögen gefürchtet.

Eine große Zahl der bisher isolierten Kahlmhefen, es sind ungefähr 100 verschiedene Arten bekannt, weist natürlich auch eine große Verschiedenheit in ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften auf. So gibt es Kahlmhefen, die imstande sind, unter bestimmten Verhältnissen Sporen zu bilden, und solche, die diese Fähigkeit nicht besitzen. Nur die letzteren zählt *Meißner* zu den echten Kahlmhefen.

Von diesem und anderen Forschern werden sämtliche Hefen in 2 große Klassen eingeteilt: die Hefen mit Endosporenbildung, die Klasse der echten Sacharomyceten, und die Hefen ohne Endosporenbildung, die Klasse der Nichtsacharomyceten. In der letzteren unterscheidet man zwischen gärenden und nichtgärenden Hefen. Zu den nichtgärenden gehören die echten Kahlmhefen oder Mycodermen, von denen einige Arten der Gegenstand der vorliegenden Untersuchung sind.

Zu den echten Kahlmhefen gehören nach dieser Einteilung eine von *H. Will*²⁾ beschriebene Art, dann verschiedene von *Meißner*³⁾ aufgefundene Kahlmhefen, ferner die Mycodermen, die von *Hansen*, *Lindner*, *Lafar*⁴⁾ und anderen Forschern beschrieben worden sind.

Alle diese Arten, Rassen und Stämme der echten Kahlmhefe unterscheiden sich nun in morphologischen Eigenschaften, wie Zellform, Zellgröße, Wachstum in den verschiedenen Nahrungsmitteln wie auch physiologisch durch Eiweißpeptonisierung, Fettspaltung und andere wichtige Lebenserscheinungen.

Die sichere Identifizierung einer Kahlmhefenart auf Grund einer dieser Eigenschaften ist völlig unmöglich. Erst ein genaues Studium sämtlicher Lebenserscheinungen und Lebensbedingungen dieser Mikroorganismen ermöglicht eine leidlich sichere Unterscheidung der zahllosen verschiedenen Arten, Rassen und Stämme.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, für einige Mycodermaarten dieses Studium sowohl in morphologischer wie auch in physiologischer Hinsicht durchzuführen.

Zur Untersuchung gelangten 3 Kahlmhefen, die aus einer Harzkäsefabrik stammten.

Da die wirksame Teilnahme bestimmter Kahlmhefearten an der Reifung und Geschmacksbildung des Käses eine längst bekannte Tatsache ist, so schien mir gerade das Studium dieser aus Molkereien und Käseereien stammenden Arten für diese Gewerbe nicht unwichtig zu sein, um so mehr, als von allen an der Käsereifung beteiligten Mikroorganismen gerade die Kahlmhefen bisher sehr wenig wissenschaftlich untersucht worden sind. Wegen ihrer Wichtigkeit für die Käseerei habe ich in dieser Arbeit den Hauptwert darauf gelegt, das Verhalten der Kahlmhefen gegen Caseineiweiß genauer zu untersuchen, in der Hoffnung, auf diese Weise einen Beitrag zur Mykologie der Käsereifung liefern zu können.

Morphologie der Kahlmhefen bei mikroskopischer Betrachtung.

Bei der Beschreibung der morphologischen Eigenschaften einer Kahlmhefe muß berücksichtigt werden, daß eine bestimmte Zellform, welcher Art sie auch sei, niemals konstant, sondern immer nur das Ergebnis ganz bestimmter Lebensbedingungen ist. Der morphologische Charakter eines Stammes liegt also nicht in seiner ovalen, runden oder mycelartigen Zellform, sondern erstens darin, welche Formen dieser Stamm bei ganz bestimmten Lebensbedingungen bildet, und zweitens, wie dieser Stamm auf eine Veränderung der Lebensbedingungen durch Veränderung seiner Zellform reagiert.

Die Lebensbedingungen setzen sich aus verschiedenen Faktoren zusammen. Die Beeinflussung der Zellform durch diese oft nicht bestimmmbaren Faktoren ist so stark, daß man glauben könnte, eine völlig andere Kahlmhefenart vor sich zu haben, wenn nicht plötzlich ohne sichtbaren Grund die gewohnte Zellform wieder auftritt.

Diese Erscheinung wurde schon von *Meißner*⁵⁾ sowie von *Will*²⁾ bei den von ihnen untersuchten Kahlmhefen festgestellt.

Gerade die Morphologie der Kahlmhefenzelle zeigt, welche geringen diagnostischen Wert hier die Zellgestalt an und für sich besitzt, wenn sie für sich allein zur Unterscheidung der Arten benutzt wird. Wertvoll für diese Unterscheidung wird sie erst dann, wenn der Zusammenhang zwischen Zellform und Lebensbedingung genau bekannt ist.

Wenn daher im folgenden die morphologischen Eigenschaften der untersuchten Kahlmhefen beschrieben werden, so kann es sich nur um eine Beschreibung derjenigen Zellform handeln, die als Ergebnis der gewöhnlich vorhandenen Lebensbedingungen am häufigsten beobachtet wurde und deshalb als „normale“ Zellform bezeichnet werden kann. Eine willkürliche Änderung bestimmter Faktoren, ebenso wie eine unwillkürliche noch unbestimmter Faktoren der Lebensbedingungen wird oftmals eine Zellform ergeben, die wesentlich verschieden ist von der normalen Zellform.

Sehr lange, mycelartige Zellen, vermischt mit ovalen Zellen, zeigt die Kahlmhefe *J*. In ganz jungen Kulturen sowie bei längerer Züchtung im gleichen Nährboden fehlen die Mycelien häufig. Die Kahlmhefe *G* besitzt, besonders in etwas älteren Kulturen, eine mehr rundliche Form, einer Torulahefe nicht unähnlich. Diese Kahlmhefe zeigt die größte Zellform, hier beträgt das Verhältnis der Länge zur Breite meist 10 : 4 μ . Eine ebenfalls mehr längliche, doch kleinere Form mit häufig etwas zugespitzten Enden besitzt die Kahlmhefe *K*.

Die am häufigsten beobachtete Länge der Kahlmhefenzellen liegt etwa zwischen 9—11 μ , die Breite zwischen 4—6 μ .

Wie schon betont wurde, reagieren die Kahlmhefen auf Änderung mancher äußeren und inneren Faktoren, wie Luftzutritt, Zusammensetzung und Konzentration des Nährmittels usw. sofort, auch durch Veränderung ihrer Zellform.

Großen Einfluß, gerade auf die Zellform, scheint der Luftsauerstoff zu besitzen. Die Zellen am Rande einer Adhäsion- oder Tropfenkultur, aus der Kahlmhaut oder einer oben liegenden Kolonie einer Gelatine- oder Agarkultur sind in den meisten Fällen langgestreckt und schmaler als die Zellen, die nicht in so inniger Berührung mit dem Luftsauerstoff stehen.

Ebenso wie in der Zellform variieren die verschiedenen Stämme auch in der Zellgröße. Gut genährte Zellen aus jungen Kulturen sind im allgemeinen bei allen Arten größer als Zellen aus alten Kulturen oder solche, die unter ungünstigen Lebensbedingungen aufgewachsen sind.

Der Zellinhalt weist zwischen den einzelnen Stämmen nur sehr geringe Unterschiede auf. Von den Kulturhefen unterscheiden sich die Kahlmhefen schon durch das hellere Aussehen der Zellen. Sie sehen im Vergleich mit diesen viel leerer aus, was auf geringen Eiweißgehalt schließen läßt. Eine starke Körnelung, wie sie bei den Kulturhefen häufig ist, findet man bei der Kahlmhefe nur ganz selten. Vakuolen sind in der Kahlmhefenzelle meist zwei bis drei vorhanden. In jungen

Zellen sind sie verhältnismäßig klein, in älteren verschmelzen sie meist zu einer großen, die dann fast den ganzen Zellraum einnimmt. Fast durchweg sind zwei bis drei Fetttröpfchen, die dicht am Rand der Vakuolen liegen, in den Zellen enthalten. Am größten sind sie in Zellen, die am Rand einer Adhäsionskultur liegen, oder in den sog. „Luftzellen“, die aus dem Nährboden herausragen. In Ausstrichkulturen von Würzeagar und in oben liegenden Kolonien von Plattenkulturen sind die Kahlmhefezellen meist fetthaltiger als in Flüssigkeitskulturen. Diese Erscheinung ist auf die Einwirkung des Luftsauerstoffs zurückzuführen. Besonders in älteren Kulturen sind die stark lichtbrechenden Fetttröpfchen, die sich durch ihre Rotfärbung mit Sudan leicht nachweisen lassen, deutlich zu erkennen. Glykogen läßt sich in jungen Kahlmhefezellen nicht nachweisen. Nur in älteren Kulturen erhält man manchmal mit Jod mehr oder weniger rotbraune Pünktchen, die das Vorhandensein dieses Reservestoffes anzeigen. Durch bestimmte Zusätze, wie Zucker, kann der Glykogengehalt vergrößert werden.

Das Auftreten eines bei Kulturhefen sehr oft beobachteten phosphorsäurehaltigen Reservestoffes, das Volutin, konnte bei unseren Kahlmhefen nicht beobachtet werden. Nach *Henneberg* besteht zwischen dieser Substanz und dem Gärvermögen der Kulturhefen ein gewisser Zusammenhang; das den echten Kahlmhefen mangelnde Gärvermögen läßt sich vielleicht auf das Fehlen dieses Stoffes zurückführen.

In Würze-Federstrichkulturen bilden einige der untersuchten Kahlmhefen, wie *J* und *G*, sehr schön ausgebildete Sproßverbände, während andere, wie z. B. Kahlmhefe *K*, mehr in unregelmäßigen Haufen wachsen.

Es hat sich gezeigt, daß die Temperatur nicht ohne Einfluß auf die Bildung der Sproßverbände ist. Bei niedriger Temperatur werden im allgemeinen bessere und festere Verbände gebildet als bei Bruttemperatur. Überhaupt scheinen höhere Wärmegrade, die zuerst als sehr günstig erscheinen und auf das Wachstum fördernd einwirken, auf die Dauer einen weniger günstigen Einfluß zu haben. Längere Zeit bei optimaler Temperatur gezüchtete Kahlmhefe besaß meist kleinere und zartere Zellformen als die unter gewöhnlichen Umständen gewachsene. Eine Würzekultur der Kahlmhefe *K* verlor durch längere Führung bei Bruttemperatur fast ganz die Fähigkeit, Sproßverbände zu bilden. Diese Erscheinung ist wohl als eine Art Degeneration anzusehen.

Sehr verschieden verhalten sich die Kahlmhefearten in bezug auf Mycelbildung. Die Kahlmhefe *J* bildet oft sehr langgestreckte Mycelfäden, bei der Kahlmhefe *G* ist diese Erscheinung nur in älteren Kulturen zu beobachten, und bei der Kahlmhefe *K* tritt Mycelbildung nur bei reichlichem Luftzutritt, wie z. B. am Rand von Adhäsionskulturen, ein. Die von dieser Kahlmhefe gebildeten Mycelien sind meist bedeutend kürzer als bei den Kahlmhefen *J* und *G*.

Von großem Einfluß auf die Zellform der Kahlmhefe sind außer Temperatur und Luftzutritt auch noch Zusätze verschiedener Art und Menge zu den betreffenden Nährmitteln. Man kann zwischen Zusätzen, die für die Kahlmhefe von günstigem Einfluß sind, und solchen mit ungünstiger, giftiger Wirkung unterscheiden.

Auf jede dieser Eigenschaften wird die Kahlmhefenzelle verschieden reagieren. Eine dieser Reaktionen, die am deutlichsten zu erkennen und zu verfolgen ist, besteht in der Veränderung der Zellform und der Zellgröße.

Es kann hier natürlich nicht die Aufgabe sein, die Wirkung sämtlicher möglichen Zusätze auf die Kahlmhefen zu studieren, vielmehr habe ich solche Zusätze ausgewählt, die für die Praxis von Interesse sind. Solche sind z. B. die Zuckerarten (Einkochen von Früchten, Weinkelerei), organische Säuren (Weinessig- und Essigfabrikation), die wichtigsten Alkohole (Brauerei, Brennerei), dann Salze (Käserei) und schließlich verschiedene Gifte, die als Desinfektionsmittel und Antiseptica besonders im Milchgewerbe eine Rolle spielen.

Worin bestehen nun die morphologischen Veränderungen der Kahlmhefenzellen beim Zusatz solcher Stoffe?

Die Kahlmhefe *J* wurde in Würze mit verschiedenen Mengen von Malzzucker gezüchtet. Ohne Zuckerzusatz bildet diese Hefe normale, ovale Zellen und viel langgestreckte Mycelfäden. Bei einem Zuckergehalt von 5% werden die Zellen kürzer und breiter, bei 10% Malzzuckergehalt sind die meisten Zellen kreisrund geworden, die Mycelien sind fast ganz verschwunden. Der Glykogengehalt ist meist stärker geworden. Ein großer Teil der Zellen ist abgestorben. Bei 15% Zuckerzusatz sind keine Mycelien mehr zu finden, die Zellen sind klein und rund, ungefähr 50% davon sind tot.

Anders verhält sich die Kahlmhefe *K*. Diese bildet in ganz jungen Kulturen meist normale, längliche, häufig etwas zugespitzte Zellen. Wie später gezeigt werden wird, kann diese Hefe Malzzucker bedeutend besser verwerten als die Kahlmhefe *J*. Die Formveränderung bei Malzzuckerzusatz scheint hier gerade in entgegengesetztem Sinne zu verlaufen wie bei der Mycelhefe *J*. Während ohne Malzzuckerzusatz normale Zellen ohne Mycelien gebildet werden, verschwinden sie bei 10—20% Zucker mehr und mehr, um längeren, mycelartigen Zellen und abnorm großen Riesenzellen Platz zu machen. Bei 20% Zuckergehalt sind im Gegensatz zu der Kahlmhefe *J* die meisten Zellen noch lebend; erst bei 30% Malzzucker überwiegen die toten Zellen. Bei dieser Konzentration war bei der Kahlmhefe *J* ein Wachstum überhaupt nicht mehr festzustellen.

Diese völlig verschiedene Reaktion der Kahlmhefen *J* und *K* auf dasselbe Reagens läßt sich vielleicht durch die bei diesen Hefen ver-

schiedene Verwertungsmöglichkeit des Malzzuckers erklären. Die Kahlmhefe *J* kann den Malzzucker nicht gut verwerten. Besonders bei stärkerer Zuckerkonzentration macht sich eine „Vergiftungserscheinung“ bemerkbar, die neben der Osmose die Verkleinerung der Zelle und das Verschwinden der langen Mycelien verursacht.

Die Kahlmhefe *K* dagegen ist ein sehr guter Malzzuckerwerkerter und daher nicht so empfindlich gegen eine höhere Zuckerkonzentration wie Kahlmhefe *J*. Sie verkleinert nicht ihre Oberfläche bei Malzzuckerzusatz, sondern vergrößert sie. Erst bei 30% Malzzuckerzusatz tritt durch die Wirkung der Osmose eine Verkleinerung und Abrundung der Zellen ein.

Gegen Traubenzucker verhält sich die Kahlmhefe *J* insofern anders als gegen Malzzucker, als durch diesen Zucker die Mycelbildung nicht unterdrückt, sondern wesentlich verstärkt wird. Bei einem Zusatz von 10% zu Würze werden kaum noch normale, ovale Zellen, sondern fast nur noch lange Mycelien gebildet.

Die Kahlmhefe *K* zeigt bei Traubenzuckerzusatz dieselbe Reaktion wie bei Malzzuckerzusatz. Auch hier tritt Bildung von Mycelien und abnormen Riesenzellen ein, die noch vorhandenen normalen Zellen sind meist etwas vergrößert.

Diese mycelbildende Wirkung des Traubenzuckers wurde auch bei Kahlmhefe *G* beobachtet.

Während also Malzzucker für Kahlmhefe *J* eine Verkleinerung, für Kahlmhefe *K* dagegen eine Vergrößerung der Zellform hervorruft, bewirkt Traubenzucker sowohl bei Kahlmhefe *J* wie bei *G* und *K* eine Zellvergrößerung, verbunden mit starker Mycelbildung.

Für andere Zuckerarten, wie Milchzucker und Rohrzucker, ist diese verschiedene Reaktion durch Formveränderung nicht so deutlich und konstant. Bei der maximalen Zuckerkonzentration wurde in allen Fällen eine starke Verkleinerung der Zellform festgestellt, was wohl hauptsächlich auf Osmose zurückzuführen ist.

Die Erscheinung, daß die Kahlmhefen auf Zusatz schädlicher Stoffe durch Verkleinerung ihrer Zelloberfläche reagieren, tritt auch ein beim Zusatz von Säuren, wie Essigsäure und Milchsäure. Besonders die Essigsäure zeichnet sich durch ihre Giftwirkung auf die Kahlmhefe aus. Schon bei 0,1% bis 0,3% bemerkt man eine starke Verkleinerung der Zellen. Bei 0,5% Essigsäure, dem Maximum der zu ertragenden Menge, sind selbst bei der Mycelhefe *J* alle Mycelien verschwunden, es werden nur noch kreisrunde Zellen gebildet.

Milchsäure kann in wesentlich größeren Mengen vertragen werden. Bei der Mycelhefe *J* war bei einer Menge von 1% Milchsäure in Würze noch keine Zellveränderung wahrzunehmen; bei 2% Milchsäure wurden die Mycelien weniger, bei 4% lagen hauptsächlich nur noch runde und

ovale Zellen vor. Ungefähr 50% von ihnen waren tot. Auch bei allen anderen angewandten Zusätzen, einerlei ob es sich um Zusatz von verschiedenen Alkoholen, verschiedenen Salzen oder spezifischen Pilzgiften handelte, ließ sich die Beobachtung der Zellverkleinerung machen. Ist der Stoff, der zugesetzt wird, von Natur aus nicht schädlich für die Kahlmhefe, so kann bei stärkerer Konzentration eine Verkleinerung der Form festgestellt werden. Bei spezifischen Giften, wie Essigsäure, Formalin, Kaliumbichromat und Benzoesäure tritt diese Reaktion naturgemäß schon bei ganz geringer Konzentration ein.

Morphologie der Kahlmhefe bei makroskopischer Betrachtung.

Makroskopisch sind alle Kahlmhefearten sofort an einer Erscheinung zu erkennen, die dieser Gruppe der wilden Hefen auch ihren Namen gegeben hat: Es ist dies die Bildung einer weißlichen bis grauen Haut, der Kahlmhaut, auf sämtlichen flüssigen Nahrungsmitteln. Wie schon erwähnt wurde, tritt eine Hautbildung zwar auch bei vielen anderen Mikroorganismen auf, doch sind diese Häute durchaus verschieden von der typischen Kahlmhaut.

Die Entstehung der Kahlmhaut läßt sich so erklären, daß die einzelnen Sproßverbände sich zusammenschließen und durch ihr geringes spezifisches Gewicht, bedingt durch den Gehalt an Fett- und „Luftzellen“, das Ganze schwimmfähig erhalten.

Erst bei zunehmender Dicke wird sie dann schließlich so schwer, daß sie, besonders beim Schütteln der Flüssigkeit, zu Boden sinkt, um so lange durch neue Haut ersetzt zu werden, wie ein Wachstum der Kahlmhefe noch vor sich geht.

Mikroskopisch betrachtet, besteht die Kahlmhaut aus meist etwas größeren, oft wurstförmigen oder mycelartigen Zellen mit starkem Fettinhalt; auffällig sind die vielen „Luftzellen“, die aus der Flüssigkeit herausragen und an ihrem bläulichen Glanz und der starken Lichtbrechung leicht zu erkennen sind.

Bemerkenswerte, immer wiederkehrende Unterschiede bestehen zwischen den einzelnen Häuten der untersuchten Kahlmhefe nicht. In allen Fällen ist die Kahlmhaut zuerst hauchdünn, völlig glatt und grau gefärbt. Sie hat das Bestreben, sich an den Wänden der Gefäße hochzuziehen. Auch beim Schütteln sinkt sie nicht unter. Nach einigen Tagen tritt eine Faltung und Runzelung ein, sie sieht durch eingeschlossene Luftbläschen weißlicher aus und sinkt bei zunehmender Dicke schließlich stückweise zu Boden. Bei optimaler Temperatur wird durch schnelleres Wachstum die Haut schneller gefaltet als bei niedrigeren Wärmegraden.

Für eine sichere makroskopische Unterscheidung der einzelnen Rassen kann die Kahlmhaut also nicht dienen.

Geeigneter hierfür sind die Kulturen auf passenden festen Nährböden. Als solche kommen vor allem Würzeagar und Würzegeatine in Frage. Charakteristisch sind auf diesen Nährböden besonders die Riesenkulturen und die Striche auf schräg gelegten Nährböden.

Es muß hier darauf hingewiesen werden, daß das Bild derselben Art auf genau gleichem Nährboden durchaus nicht immer dasselbe ist. Neben der Temperatur und dem Ernährungszustand der Impfkulturen gibt es noch eine Menge anderer ausschlaggebender Faktoren, von denen Luftfeuchtigkeit, Dicke der Gelatine- bzw. Agarschicht und Zusammensetzung des vorhergehenden Nährmittels nur die wichtigsten sind. Auch die Menge des Impfmateri als sowie die Art und Weise, wie dieses auf das Nährsubstrat gebracht wurde, ist von Einfluß auf die entstehenden Bildungsformen.

Immerhin kann gewissen, bei möglichster Einhaltung konstanter Bedingungen immer wiederkehrenden Merkmalen ein diagnostischer Wert natürlich nicht abgesprochen werden. Besonders charakteristisch sind die Wachstumsformen der Riesenkolonien. Die Riesenkultur der Kahlmhefe *J* liegt verhältnismäßig dünn auf und bildet nach einigen Tagen einen rein weißen, meist etwas erhabenen, gebuchteten Rand; der Mittelpunkt der Kolonie ist feucht glänzend, der Rand trocken. Bei Kahlmhefe *G* ist der Mittelpunkt der Kolonie meist erhaben, um allmählich immer flacher und flacher zu werden. Die weiße Randfärbung fehlt, die Außenpartien sind bei dieser Hefe völlig trocken, die Mitte ist feucht glänzend. Beiden gemeinsam ist ein ziemlich glatter Rand ohne Behaarung. Ganz anders ist das Bild bei Kahlmhefe *K*. Diese wächst in grauen, eingeweideförmigen und völlig voneinander getrennten Strängen, die sich oft weit in die Luft erheben, kleine Türme bildend. Manchmal sind diese Stränge noch von einem glatten und trockenen Rand umgeben.

Ebenso charakteristisch wie die Riesenkulturen sind die Striche in schräg gelegten Röhrcchen auf Würzeagar. Der Ausstrich von Hefe *J* ist weiß-grau gefärbt und feucht glänzend, der Rand ist gebuchtet und stellenweise behaart. Kahlmhefe *G* ist mehr weiß und völlig trocken mit glattem unbehaarten Rand. Der weißlich-graue Ausstrich der Kahlmhefe *K* zeigt wieder die charakteristischen eingeweideförmigen Wülste, die auch bei den Riesenkolonien immer beobachtet wurden.

Da diese beobachteten Wachstumsformen immer wiederkehren, also für eine Art spezifisch zu sein scheinen, so ist eine makroskopische Unterscheidung der Kahlmhefen auf Grund dieser Erscheinungen bis zu einem gewissen Grade durchaus möglich.

Weniger geeignet als Nährsubstrat für eine Unterscheidung der Wachstumsform bei den verschiedenen Kahlmhefearten ist die Würzegeatine. Hier tritt ein physiologischer Vorgang, die Verflüssigung des Nährbodens durch Zersetzung

des Gelatineeiweißes, mit in Erscheinung und verhindert dadurch die Bildung von charakteristischen, deutlich sichtbaren Bildungsformen. Schon hier macht sich das durchaus verschiedene Verhalten der Kähmhefen *J*, *G*, *K* gegen Eiweiß deutlich an dem Aussehen der Riesenkulturen bemerkbar. Die Kähmhefe *J* bildet um ihre, auch hier wieder mit dem typischen weißen Rand versehene, Riesenkolonie eine breite, flüssige Zone, ein Zeichen ihrer starken proteolytischen Wirksamkeit. Die grau-gelbliche Riesenkolonie der Kähmhefe *G* verflüssigt die Gelatine nur im Bereich der Kolonie, wobei diese als kompakte Masse langsam in die Flüssigkeit hineinsinkt. Die Kähmhefe *K* bildet grau gefärbte, stark erhabene Kolonien, die die Gelatine wesentlich langsamer verflüssigen. Ein Einsinken der Kolonie in die Gelatine findet nicht statt.

Dieselben Beobachtungen, besonders in bezug auf Gelatineverflüssigung, wurden bei dem Wachstum der Kähmhefen auf Bouillongelatine gemacht, doch zeigten die untersuchten Kähmhefen auf diesem Substrat ein schwächeres Wachstum als auf Würzenährböden.

Physiologie der Kähmhefen.

Lebensbedingungen.

Von den Wachstumsbedingungen ist eine günstige Temperatur wohl eine der wichtigsten. Oberhalb und unterhalb einer gewissen Grenze hört bei den Kähmhefen, wie bei allen Organismen, das Wachstum auf, ohne daß ein Überschreiten dieser Grenze den sofortigen Tod zur Folge haben muß. Für alle untersuchten Kähmhefen liegt die Grenze, innerhalb derer noch ein ziemlich kräftiges Wachstum beobachtet werden kann, bei ca. 20° und 32°. Das Temperaturoptimum liegt bei den Stämmen *J* und *K* bei 29—30°, für die Kähmhefe *G* bei 25—26°. Bei 35° und 37° war keine der Kähmhefen imstande, auf Bierwürze eine Kähmhaut zu bilden.

Wie alle *Mycodermen*, so zeigten sich auch die untersuchten Arten als fast obligate Aerobier. In Bierwürze und anderen flüssigen Nährmitteln findet nur Oberflächenwachstum statt. Erst allmählich tritt dann von oben herab eine Trübung des Mediums ein. In Stiehkulturen in festem Würzeagar ist ebenfalls nur Oberflächenwachstum vorhanden, ein Wachstum innerhalb des Agars findet nicht statt.

Besonders luftbedürftig scheint die Kähmhefe *J* zu sein. In Plattenkulturen zeigt sie fast nur Oberflächenkolonien, unter der Oberfläche treten nur ganz selten kleine, schmale Kolonien auf. Caseineiweiß, das im Kolben mit der Kähmhefe *J* beimpft war, wurde bei dauerndem Umschütteln eher verflüssigt als solches, das durch die gebildete Kähmhaut teilweise von der Luft abgeschlossen war. Auch die für diese Kähmhefe charakteristische Erscheinung der Bildung von Ausläufern aus den Tröpfchen- oder Adhäsionskulturen in die umgebende Luftschicht hinaus ist wohl als Zeichen großen Luftbedürfnisses zu werten. Im Tröpfchen wächst ein sproßverband dieser Kähmhefe nach innen

meist in gewöhnlichen ovalen Zellen, nach dem Rande zu aber in langen Mycelien, welche, etwas Wasser mitziehend, in die umgebende Luft hineinwachsen und bald lebhaft aussprossen. Es hat den Anschein, als ob die Hefe möglichst schnell aus dem Tröpfchen heraus in luftreichere Verhältnisse zu gelangen sucht.

Ganz anders verhält sich hier die Kahlmhefe *K*. Diese bildet wohl unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs längere und schmälere Zellen, wächst aber niemals in die umgebende Luftschicht hinein; in den meisten Fällen bleibt sie sogar in einem gewissen Abstand vom Rand.

Für das Wachstum der Kahlmhefen ist der Sauerstoff also unentbehrlich. Dagegen ist für eine Erhaltung der Lebensfähigkeit der Sauerstoff nicht in diesem Grade notwendig. Die in alten Würzekulturen einen aus versunkenen Hautteilchen bestehenden Bodensatz bildenden Kahlmhefezellen waren nach 12 Monaten, in frische Würze gebracht, noch lebensfähig, trotzdem sie doch während dieser Zeit mit der Luft nicht in direkte Berührung kommen konnten.

Für die Entwicklung der Kahlmhefen ebenfalls unerlässlich ist die Gegenwart einer gewissen Feuchtigkeit. Wie bei den meisten Mikroorganismen, so findet auch hier auf völlig trockenem Substrat kein Wachstum statt. Die Lebensfähigkeit wird bei fehlender Feuchtigkeit nicht vernichtet. Der eingetrocknete Rückstand einer Würzekultur von Kahlmhefe *J* war nach 6 Monaten noch fortpflanzungsfähig.

Gegen Licht scheint die Kahlmhefe verhältnismäßig unempfindlich zu sein. Durch diffuses Tageslicht konnten keine schädigenden Wirkungen erzielt werden.

Als günstige Nährmittel kommt für die Kahlmhefe vor allem die saure Bierwürze in Betracht. Auf dieser zeigten alle untersuchten Arten nach einem Tage eine kräftige Kahlmhaut. Ebenso gut ist das Wachstum auf Würzegeleatine und Würzeagar. Dieser Nährboden wurde besonders angewandt bei Herstellung von Reinkulturen, da hier die bei der Gelatine oft eintretende Verflüssigung und damit das Zusammenfließen der Kolonien vermieden wurde. Auch auf steriler Milch findet ein kräftiges Wachstum der Kahlmhefen statt. Hefewasser, durch Abkochen von Preßhefe hergestellt, ist ohne besondere Kohlenstoffquelle kein gutes Nährmittel für die Kahlmhefen. Die untersuchten Arten wuchsen nur entweder sehr schwach oder gar nicht. Besser ist das Wachstum, wenn eine besondere Kohlenstoffquelle zugegeben wird. Fleischwasserbouillon ist für die Züchtung der Kahlmhefen ein ungünstiges Nährmittel. Mit Gelatine zusammen war sie jedoch für die Kahlmhefen *J* und *G* recht günstig, während die Kahlmhefe *K* nur kümmerlich gedieh.

Durch besondere Zusätze zu den Nährmitteln kann das Wachstum der Kahlmhefen stark beeinflußt werden, sowohl in günstigem wie in

schädlichen Sinne. Sehr verschieden ist die Wirkung der Zuckerarten. Eigenartigerweise ist beobachtet worden, daß ein und derselbe Zucker, zu verschiedenen Nährsubstraten gegeben, oft eine ganz verschiedene Wirkung hat. So wirkt beispielsweise der Traubenzucker stark hemmend auf das Wachstum der Kahlmhefe *J* ein. Diese Hemmung wurde in Würzenährböden, Milch und Bouillonährböden deutlich beobachtet. In Hefewasser war dieser Zucker jedoch von sehr günstigem Einfluß. Auch auf die Kahlmhefe *G* wirkte er in den meisten Nährböden stark hemmend, um in Hefewasser plötzlich wieder stark fördernde Wirkung zu zeigen. Es zeigt sich hier die bekannte Tatsache, daß bei Gegenwart verschiedener Kohlenstoffquellen in einem Nährboden nur der am leichtesten assimilierbare in Anspruch genommen wird. In diesem Fall ziehen die Kahlmhefen bestimmte Stickstoffverbindungen als Kohlenstoffquelle dem Traubenzucker vor. Dieser wird erst angegriffen, wenn anders gebundener Kohlenstoff gar nicht oder nur in minimalen Mengen geboten wird.

Auf die Kahlmhefe *K* ist die Wirkung des Traubenzuckers anders: Hier ist er in allen Nährböden von sehr günstiger Wirkung. Am meisten tritt diese in Milch hervor, wo die Hefen *J* und *G* besonders stark gehemmt werden.

Weniger großen Einfluß besitzen Rohr- und Milchzucker auf diese drei Kahlmhefen. In Würzeagar und Gelatine bewirkt Rohrzucker für *G* und *K* eine schwache Förderung. In kohlenstoffarmen Nährmitteln, wie Hefewasser, werden diese Zuckerarten von den Kahlmhefen gern verwertet, sonst werden andere Kohlenstoffquellen vorgezogen.

Auffallend ist die Wirkung von Malzzucker auf die Hefen *J* und *K*. Für Kahlmhefe *J* ist er in Hefewasser von stark fördernder, in den Würzenährböden dagegen von stark hemmender Wirkung. Für alle Nährmittel außerordentlich günstig ist dieser Zucker für die Kahlmhefe *K*.

Das verschiedene Verhalten dieser beiden Kahlmhefen gegen Malzzucker in Würze tritt auch bei ihrer Züchtung in Würze mit verschiedenen Mengen Malzzucker hervor. Die Kahlmhefe *J* bildet in Bierwürze ohne Malzzucker bereits nach 15—20 Stunden, bei einem Malzzuckergehalt von 5% nach 2 Tagen, bei 10% erst nach 4 Tagen eine Kahlmhaut; bei 20% Malzzucker erfolgt ein Wachstum nicht mehr. Bei der Kahlmhefe *K* dagegen tritt die Hautbildung bei 5% und 10% Malzzucker ebenso schnell wie bei der Kontrollprobe ohne Zucker, d. h. nach 20—24 Stunden, ein. Bei 20—25 und 30% war nach 2—3 Tagen eine starke Hautbildung eingetreten. Wie schon im morphologischen Teil erwähnt worden ist, reduziert die Kahlmhefe *J* hierbei die langen Mycelien zu kleinen, runden Zellen, während die Kahlmhefe *K* ihre Zellen in die Länge zieht und lange, wurstförmige Formen, vermischt mit abnorm großen Riesenzellen, bildet.

Milchsäure kann von sämtlichen Kahlmhefen gut verwertet werden. Geringe Mengen wie 0,1% wirken fördernd auf das Wachstum ein. Gleiche Mengen Casein wurden mit der Kahlmhefe *J* beimpft und steigende Mengen von Milchsäure hinzugesetzt. Das Casein mit 0,1% Milchsäurezusatz war zuerst verflüssigt, dann folgte die Probe ohne Milchsäure und hierauf nacheinander nach der Menge der zugesetzten Säure die anderen Proben. Bei den Versuchen bis zu 2% Milchsäurezusatz begann der Abbau des Caseins bereits nach 2 Tagen, bis 4% Säure nach 4 Tagen. Bis zu einem Zusatz von 3% Milchsäure endete der Abbau mit einer völligen Verflüssigung des Caseins, bei 4% Säuregehalt war die Kahlmhefe nach anfänglichem Wachstum so geschwächt, daß das Wachstum sistierte. Bei langsamer Gewöhnung konnte in Bierwürze auch noch bei 5 und 6% ein, wenn auch nur schwaches Wachstum erreicht werden.

Wie die Kahlmhefe *J* verhalten sich auch die anderen untersuchten Kahlmhefen. Nur Kahlmhefe *K* macht insofern eine Ausnahme, als sie schon bei 2% Säure nur noch schwaches Wachstum zeigt.

Diese verhältnismäßig geringe Empfindlichkeit wurde auch schon bei anderen Kahlmhefen beobachtet. Die von *Henneberg*¹⁾ untersuchten Arten zeigten bei 2,5% Milchsäuregehalt ein sehr gutes, bei 4,5% Säure noch schwaches Wachstum. *Meißner* fand, daß von neun von ihm untersuchten Kahlmhefestämmen sechs außerordentlich gute Milchsäureverwerter waren.

Wesentlich anders ist die Wirkung der Essigsäure auf die Kahlmhefen. Hier wirkt bereits eine Menge von 0,1% sehr schädlich auf die Kahlmhefe ein. Bei 0,3% Essigsäurezusatz zu einer Caseinlösung beginnt die Kahlmhefe erst nach 5 Tagen eine dünne Haut zu bilden, nach 7 Tagen wird das Casein merklich angegriffen. Ein Zusatz von 0,5% läßt die Kahlmhefe nicht mehr aufkommen, selbst nach 4 Wochen war trotz wiederholter Beimpfung keine Hautbildung erfolgt. Nur durch langsame Gewöhnung konnte die Kahlmhefe *J* bei dieser Säurekonzentration zu schwachem Wachstum gebracht werden. Es wurde Bierwürze in verschiedenen Proben mit Kahlmhefe beimpft und mit steigenden Mengen Essigsäure von 0,1% bis 1% versetzt und dann jedesmal aus der gerade noch gewachsenen Probe eine Überimpfung vorgenommen. Auf diese Art gelingt es, nach 8 Tagen bei 0,5% Essigsäuregehalt noch ein schwaches Wachstum in Bierwürze zu erreichen. An größere Mengen Essigsäure waren die untersuchten Kahlmhefen nicht zu gewöhnen.

Kahlmhefen, die aus einer Essigfabrik stammten, zeigten nach *Henneberg*¹⁾ in Bierwürze mit 0,5% Essigsäure schon nach einem Tage ziemlich kräftiges Wachstum. Sie wuchsen noch bei 3% Essigsäure. Auf das Vorkommen in Essigfabriken ist zurückzuführen, daß diese

Kahlmhefenarten besser Essigsäure vertragen können als die aus Molkeereien und Käseereien stammenden Arten.

Auffallend ist die verhältnismäßig große Empfindlichkeit der untersuchten Kahlmhefen gegen Äthylalkohol. Ein Zusatz von 1 Volumprozent zu Bierwürze wurde ohne Schaden ertragen, bei 2% Alkoholgehalt trat nach 3 Tagen, bei 3% erst nach 5 Tagen ein zuerst nur sehr schwaches Wachstum ein. Durch langsame Gewöhnung gelang es, bei 4% nach 6 Tagen und bei 5% nach 7 Tagen ein äußerst kümmerliches Wachstum der Kahlmhefe zu erreichen. Die saure Reaktion des Nährmittels wurde durch das Verschwinden des Alkohols nicht stärker, Säure ist also nicht gebildet worden.

Andere Alkoholarten erwiesen sich als weniger schädlich. Glycerin und Mannit werden bis zu 10% ohne Schaden ertragen. Auch bei einem Zusatz von 15 und 20% tritt nach kurzer Zeit kräftiges Wachstum ein. Mengen von 1—2% beider Alkoholarten wirken auf das Wachstum günstig ein.

Die Kahlmhefe ist also imstande, ihren Bedarf an Kohlenstoff sowohl aus Zuckerarten wie aus organischen Säuren und Alkoholen zu entnehmen. Die Verwertungsmöglichkeit dieser Kohlenstoffquellen ist für einzelne Kahlmhefearten verschieden.

Die Fähigkeit, auch den Stickstoff in organischen und anorganischen Salzen zu assimilieren, wurde durch Zusatz verschiedener stickstoffhaltiger Salze festgestellt. Ammoniumchlorid und Asparagin wirken in Mengen von 0,1—0,5% günstig. Besonders ist dies der Fall für die Kahlmhefe *G*, welche, sonst in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den Kahlmhefen *J* und *K* stehend, bei diesen Zusätzen an die erste Stelle rückte. Die Kahlmhefe *K* zeigte diese günstige Beeinflussung in nicht so starkem Maße. Bei 2% Salzzusatz trat für alle drei Hefen eine schädigende Wirkung ein. Weniger wirkungsvoll war ein Zusatz von Salpeter. Mengen von 3,5—4% in Bierwürze ermöglichten nach einigen Tagen noch ein kräftiges Wachstum. Ebenso verhielt sich das Kaliumnitrit; auch hier fand bei 3—4% nach 3 Tagen ein kräftiges Wachstum statt.

Gegen Kochsalz sind die Kahlmhefen recht unempfindlich. Zusätze von 0,5—1,5% haben keinen Einfluß auf das Wachstum. Eine Hautbildung tritt hier ebenso schnell ein wie in Bierwürze ohne Salzzusatz. Auch die Ausstriche auf Würzeagar zeigten bei dieser Konzentration keinen Unterschied. Bei 5% Kochsalz beginnt die Hautbildung ebenfalls nach einem Tage, bei 10% nach 3 Tagen, bei 15% nach 8 Tagen, und bei 20% tritt nach wiederholter Beimpfung aus weniger starken Salzlösungen nach 15 Tagen eine dünne Kahlhaut auf. Das mikroskopische Bild der Kahlhaut zeigt nur kleine, runde Zellen, ohne jegliche Mycelbildung.

Natriumsulfat wird bis zu 3,5% gut ertragen. Bei größeren Mengen tritt erst nach einigen Tagen Wachstum ein. Gegen Natriumsulfit scheinen die Kahlmhefen etwas empfindlicher zu sein. Bei 1% fand normales Wachstum statt, bei Zusatz von Salzmengen bis zu 5% trat starke Hemmung ein. Eine stärkere Konzentration, bis zu 9%, kann die Kahlmhefe nur durch langsame Gewöhnung ertragen.

Als Desinfektionsmittel für Milch u. dgl. kommen die genannten Stoffe nicht in Betracht, da sie erst bei einer Konzentration wirken, die die Güte und den Geschmack der zu schützenden Stoffe wesentlich beeinträchtigen würde. Für solche Zwecke gibt es bestimmte, im Milchgewerbe schon längst bekannte Antiseptica, deren Wirkung auf die Kahlmhefen sich als sehr verschieden erwies.

Die hier in Frage kommende Benzoesäure ist das einzige Pilzgift, dessen Zusatz zu Margarine gesetzlich gestattet ist. Das Nahrungsmittelgesetz hat als zulässige Höchstmenge 0,1% Benzoesäurezusatz festgesetzt. Diese Menge wirkt auf die Kahlmhefe nicht abtötend, nicht einmal schwächend ein.

Auf Bierwürze mit 0,1% Benzoesäuregehalt tritt ebenso schnell wie auf der Kontrollprobe ohne Säure eine Kahlmhautbildung ein; Milch mit 0,1% Säure wird ebenso kräftig peptonisiert wie ohne Zusatz. Eine Schwächung der Kahlmhefe tritt erst bei 0,2% Säuregehalt ein. Diese geht aber nicht so weit, daß die Kahlmhefe nicht mehr imstande wäre, Milch zu peptonisieren. Ein Abbau findet auch hier noch statt, nur mit starker Hemmung. Erst ein Zusatz von 0,3% Benzoesäure verhindert die Zersetzung der Milch, schwaches Wachstum kann durch oftmalige Beimpfung auch hier noch erreicht werden. Soll die Benzoesäure also als Antisepticum besonders gegen Kahlmhefen dienen, so ist mindestens ein Zusatz von 0,25% erforderlich.

Als wesentlich schärferes Pilzgift erweist sich der Formaldehyd. Da ein Teil dieses Aldehyds auf die Milch reduzierend einwirkt, so wird die Menge des giftig wirkenden Stoffes dadurch verringert. Ein genauer Prozentgehalt an wirklich vorhandenem Pilzgift kann daher nicht angegeben werden. Für diese Versuche wurde frisches, 40proz. Handelsformalin angewandt. Von dieser Flüssigkeit wurde 1 ccm auf 100 ccm verdünnt, 5 Tropfen hiervon wirkten, in 10 ccm Bierwürze gebracht, absolut tödlich auf die Kahlmhefen ein. Diese zugesetzte Menge entspricht ungefähr einem Gehalt von 0,005% an konzentriertem Formalin; bei 0,001% Formalinzusatz zeigten die Kahlmhefen *J* und *G* ein schwaches Wachstum, Kahlmhefe *K* dagegen nicht.

Eine Menge von 0,002% wird wohl in der Praxis genügen, um eine wirklich schädigende Wirkung der Kahlmhefen auszuschließen. Da diese Menge den Geschmack und die Güte von Milch nicht merklich beeinträchtigen wird, so ist das Formalin als Antisepticum gegen Kahlmhefen brauchbar.

Ein anderes, im Milchgewerbe oft für Fettproben angewandtes Pilzgift ist das Kaliumbichromat. In seiner Wirkung als Antisepticum

speziell für Kahlmhefen steht es zwischen der Benzoesäure und dem Formalin. Ein Zusatz von 0,001% wirkte nicht schädigend, doch etwas hemmend ein. Bei 0,005% tritt eine deutlichere Giftwirkung hervor: Das Wachstum ist nur sehr schwach, Milch wird erst nach 5—6 Tagen angegriffen, ohne daß selbst die am stärksten peptonisierenden Kahlmhefearten imstande waren, sie völlig abzubauen. Bei 0,01% Zusatz konnte weder in Milch noch in Würze ein Wachstum aufkommen. Diese Menge von Kaliumbichromat ist zu einer wirksamen Bekämpfung der Kahlmhefen also notwendig.

Lebensäußerungen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit ist bei den Kahlmhefen sehr groß. Von den untersuchten Arten wuchs die Kahlmhefe *J* am schnellsten. Diese bildet bei 30° auf Würze schon nach 12—15 Stunden eine Kahlmhaut. Verhältnismäßig langsam wächst Kahlmhefe *K*, hier tritt die Hautbildung meist erst nach 24—36 Stunden ein.

Natürlich spielen der Ernährungszustand der Hefen, das Alter und viele andere Faktoren hierbei eine große Rolle.

Die Fortpflanzung geht ausschließlich durch Sprossung vor sich. Eine Sporenbildung konnte bei reichlichem Sauerstoffzutritt weder bei gut genährter noch bei hungernder Kahlmhefe erreicht werden.

Von den untersuchten Kahlmhefearten sind außer der Hefe *K* alle Arten imstande, eiweißhaltige Nährböden stark zu zersetzen. Hierbei tritt ein intensiver Geruch nach Ammoniak und altem Käse auf. Wie später gezeigt wird, ist der letztere auf die Bildung bestimmter Fettsäuren zurückzuführen. Andere stark riechende flüchtige Stoffe, wie Schwefelwasserstoff, Indol und Skatol, werden von den Kahlmhefen nicht gebildet. Aus Milchzucker können die untersuchten Kahlmhefen keine Säure bilden. Wohl aber werden in der Milch nach 1—2 Tagen stark bitter, peptonartig schmeckende Stoffe entwickelt, welche die Milch ungenießbar machen. Bei den Eiweiß stark zersetzenden Hefen ist die Bitterstoffbildung besonders stark; aber auch bei der äußerlich Eiweiß nicht abbauenden Hefe *K* tritt diese Geschmacksveränderung ein. Es ist daher anzunehmen, daß auch diese Kahlmhefe imstande ist, das Eiweiß wenigstens teilweise bis zur Bildung von Peptonen zu zerlegen, falls nicht andere spezifische Bitterstoffe entstehen.

Ein Gärvermögen wurde bei keiner der untersuchten Kahlmhefen festgestellt. Zur Untersuchung gelangten Traubenzucker, Rohrzucker, Milchzucker, Malzzucker, Mannose und Raffinose, in Mengen von 5 und 10%, in Würze gelöst.

Eine Untersuchung auf das Reduktionsvermögen der Kahlmhefen mit Methylenblau in Milch zeigte, daß besonders die Kahlmhefe *J* imstande war, reichlich Reduktase zu produzieren. Mit Kahlmhefe *J* be-

impfte Milch wurde nach zweitägigem Wachstum in einer Stunde 25 Min. entfärbt, nach 3 Tagen begann die Entfärbung nach 45 Min., nach 4 Tagen bereits nach 25 Min.

Alle untersuchten Kahlmhefen waren imstande, fettsplattende Enzyme zu bilden. Die Fettsplattung ging bei den verschiedenen Arten mit verschiedener Stärke vor sich. Während Kahlmhefe *J* reichlich Lipase produzieren kann, besitzt Kahlmhefe *K* diese Fähigkeit in wesentlich schwächerem Maßstabe.

Ein sehr wichtiges Merkmal, das zu einer Einteilung der Kahlmhefen in physiologische Gruppen sehr geeignet ist, besteht in der Verschiedenheit, mit der die einzelnen Arten proteolytische Enzyme zu bilden vermögen. Schon rein äußerlich lassen sich die Kahlmhefen durch ihre Einwirkung auf eine bestimmte Eiweißart, wie z. B. Casein, in drei große Gruppen einteilen: die Gruppe der Casein stark abbauenden, die Gruppe der mittelstark abbauenden und die Gruppe der Casein nicht abbauenden Arten. Zur Gruppe 1 ist die Kahlmhefe *J*, zur Gruppe 2 die Kahlmhefe *G* und zur Gruppe 3 die Kahlmhefe *K* zu rechnen.

Durch chemische Hilfsmittel, wie fraktionierte Fällung einzelner Abbaustufen, Formoltitration, läßt sich natürlich noch eine viel feinere Differenzierung dieser Einteilung ermöglichen.

Weil aber die physiologischen Eigenschaften der untersuchten Kahlmhefen ebenfalls durchaus nicht konstant, sondern von den herrschenden Lebensbedingungen in starkem Maße abhängig sind, so lassen sie sich ebenso wie die morphologischen Eigenschaften für sich allein nicht als sichere Basis für eine Einteilung der verschiedenen Kahlmhefearten benutzen.

Da die untersuchten Kahlmhefen *J*, *G* und *K* aus einer Harzkäsefabrik stammten, lag es auf der Hand, als abzubauen Eiweißart Casein zu wählen. Geronnenes Hühnereiweiß wird weder bei alkalischer noch bei saurer Reaktion angegriffen.

Die Fähigkeit, proteolytische Enzyme zu produzieren, ist bei den Mikroorganismen in verschiedenem Umfang vorhanden. Von den untersuchten Kahlmhefen werden Labenzyme entweder gar nicht oder nur in so geringem Maßstabe gebildet, daß ein Gerinnen der Milch unter gewöhnlichen Umständen nicht erfolgt. Peptische und tryptische Enzyme werden reichlich gebildet, am meisten von der Kahlmhefe *J*. Bei *G* trat die Entwicklung von Trypsin und Erepsin sehr gegen das Pepsin zurück, was schon rein äußerlich an der geringeren Durchsichtigkeit der zersetzten Milch festgestellt werden kann. Die Kahlmhefe *K* ist unter gewöhnlichen Verhältnissen nicht imstande, proteolytische Enzyme in größerer Menge zu erzeugen.

Mit den drei Kahlmhefen beimpfte Milchproben zeigten nach einem Tage alle eine kräftige Kahlmhaut. Während die Probe mit Kahlmhefe *K*

sich nicht weiter veränderte, war bei *J* nach weiteren 24 Stunden bereits 0,25 cm der Milch im Röhrchen peptonisiert. Die Probe mit Kahlmhefe *G* war noch nicht weiter verändert. Nach 3 Tagen hatte Kahlmhefe *J* 1 cm, Kahlmhefe *G* 0,2 cm peptonisiert. Nach 4 Tagen war das Verhältnis der peptonisierten Milch für die Hefen *J* und *G* wie 2 cm zu 0,5 cm, nach 6 Tagen 2,5 cm zu 0,8 cm, nach 8 Tagen 3 cm zu 1 cm.

Von auffallendem Einfluß auf den Eiweißabbau dieser Kahlmhefenarten ist der Zusatz verschiedener Zucker. Während Milch- und Rohrzucker eine geringe hemmende Wirkung besitzen, ist Malzzucker und besonders Traubenzucker von recht großem, aber eigenartigerweise für die einzelnen Kahlmhefen verschiedenem Einfluß. Für Kahlmhefe *J* sind beide Zuckerarten, besonders der Traubenzucker, ein starkes Hemmungsmittel; die Peptonisierung der Milch wird hierdurch wesentlich verlangsamt, außerdem erfolgt vorher eine Gerinnung der Milch. Während für die Kahlmhefe *G* der Malzzucker nicht so stark hemmt, ist der Einfluß von Traubenzucker ebenso wie bei Kahlmhefe *J*. Auch hier tritt vor der Peptonisierung ein Gerinnen der Milch ein. Ganz anders verhält sich Kahlmhefe *K*. Hier bilden beide Zuckerarten ein stark förderndes Mittel. Besonders durch Traubenzucker wird die Kahlmhefe so günstig beeinflußt, daß sie plötzlich imstande ist, proteolytische Enzyme zu erzeugen und die Milch zu peptonisieren. Auch Labenzym wird jetzt gebildet, was am Gerinnen der Milch festgestellt werden kann.

Der Grund für die Hemmung des Caseinabbaues durch Traubenzucker bei den Kahlmhefen *J* und *G* ist wohl darin zu suchen, daß diese Hefen besser und leichter den Traubenzucker verwerten können als das komplizierte Eiweißmolekül. Es ist wahrscheinlich, daß es außer diesem Zucker auch noch andere Stoffe gibt, die ebenfalls von den Kahlmhefen als Nahrungsquelle dem Eiweiß vorgezogen werden und aus diesem Grunde das Casein vor dem Abbau und vor der Verflüssigung schützen.

Hierauf beruht vielleicht die Tatsache, daß oftmals Kahlmhefen mit ähnlich stark abbauenden Fähigkeiten wie *J* in Käsen gefunden werden, ohne daß es zu einer Verflüssigung des Käsestoffes gekommen wäre. Es sind dann wahrscheinlich Stoffe vorhanden gewesen, welche, wie der Traubenzucker, aus irgendeinem Grunde von der Kahlmhefe lieber verwertet worden sind als das Caseineiweiß.

Es besteht also die Möglichkeit, eine gerade in Weichkäsen, wie Limburger und Harzer, oftmals eintretende Verflüssigung, das sogenannte „Laufen“ der Käse wirksam zu bekämpfen durch Zusätze, die wie Traubenzucker eine schützende Wirkung auf den Käsestoff ausüben.

Bevor man sich hier aber von weiteren Forschungen Erfolg versprechen kann, muß vor allem sowohl die bakteriologische Seite des Eiweißabbaues im Käse, d. h. das genaue Studium derjenigen Mikroorganismen, die bei diesem Abbau, der Reifung, beteiligt sind, wie auch

die chemische Seite, nämlich die Untersuchung der chemischen Reaktionen im Eiweißmolekül bei der Reifung des Käses, genau untersucht werden. Erst wenn hier alle Unklarheiten verschwunden sind, kann daran gedacht werden, den gewöhnlichen Verlauf des Caseinabbaues willkürlich so abzuändern, daß etwaige schädliche Wirkungen vermieden werden.

Um zu der Chemie der Käsureifung einen Teil beizutragen, habe ich im zweiten Abschnitt dieser Arbeit eine analytische Untersuchung der beim Caseinabbau durch Kahlmhefe entstehenden Spaltprodukte vorgenommen.

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse des ersten Teiles dieser Arbeit sind im folgenden kurz zusammengestellt:

Die untersuchten Kahlmhefen *J*, *G* und *K* unterscheiden sich voneinander sowohl in vielen morphologischen wie physiologischen Eigenschaften.

Als diagnostisch brauchbare Faktoren können vor allem herangezogen werden:

1. Morphologisch:

a) Wachstum in Federstrichen und in den „Häuten“ (Aussehen, Größe und Form der einzelnen Zelle; Sproßverbände).

b) Wachstum auf festen Nährböden (Riesenkolonien und Ausstriche auf Würzeagar).

2. Physiologisch:

a) Verflüssigung von Würzegeatine.

b) Peptonisierung der Milch.

c) Abbau von Casein.

Die starke Variabilität der Kahlmhefen, die oftmals durch nicht genau bestimmbare Faktoren hervorgerufen werden kann, macht eine sichere Unterscheidung nach *einem* der angegebenen Faktoren unmöglich. (So hat sich herausgestellt, daß die Kahlmhefe *J* im Laufe der Untersuchungen das Mycelbildungsvermögen fast eingebüßt hat, während andererseits die Kahlmhefe *K* plötzlich häufige Mycelbildung zeigt.)

Erst die Berücksichtigung *sämtlicher* morphologischen und physiologischen Eigenschaften sowie das genaue Studium des Zusammenhangs zwischen diesen Eigenschaften und den sie hervorrufenden Lebensbedingungen ermöglicht also eine einigermaßen sichere Unterscheidung der verschiedenen Kahlmhefearten.

Fettpaltende und reduzierende Enzyme wurden bei den drei untersuchten Kahlmhefen, alkoholbildende und milchsäurebildende Enzyme bei keiner Kahlmhefe festgestellt. Eiweißabbauende Enzyme wurden von Kahlmhefe *J* in starkem Maße, von Kahlmhefe *G* in geringerem Maße

produziert. Die hierzu nicht befähigte Kahlmhefe *K* erhielt diese Fähigkeit durch Zusatz von Traubenzucker. Eine Labgerinnung in der Milch trat bei Zusatz von Traubenzucker zur Milch ein, was sehr bemerkenswert erscheint.

Malzzucker und Traubenzucker waren in ihrer Wirkung auf die Kahlmhefen *J*, *G* und *K* verschieden: Beide Zucker wirkten auf das Wachstum der Kahlmhefen *J* und *G* hemmend, auf Kahlmhefe *K* fördernd ein. Die Wirkung des Traubenzuckers war stärker als die des Malzzuckers.

Neben diesen hauptsächlich wissenschaftlich in Betracht kommenden Ergebnissen lassen sich auch für die praktische Milchwirtschaft wichtige Folgerungen ziehen:

Die untersuchten Kahlmhefen gehören zu denjenigen Mikroorganismen, die in der frischen Käsemasse die vorhandene Milchsäure verzehren und dadurch für die eigentlichen Käseerfer günstige Lebensbedingungen schaffen.

An der Erzeugung des Käsegeruchs können sie beteiligt sein.

In anderen Betrieben, wo die Säure als Schutzmittel gegen weitere Zersetzung notwendig ist (Einsäuerung von Viehfutter, Gurken), sind die untersuchten Kahlmhefen als Schädlinge anzusehen.

Wegen ihres Fettspaltungsvermögens haben die untersuchten Kahlmhefen bei der Butter- und Margarineherstellung als Schädlinge zu gelten.

Durch die starke Caseinverflüssigung kann die Kahlmhefe *J* in der Käseerei schädigend wirken.

Das Abbauvermögen kann bei dieser Kahlmhefe durch Zusatz von Traubenzucker oder Malzzucker gehemmt werden.

Chemisch-experimenteller Teil.

Analytische Untersuchungen von Eiweißspaltungen durch Mikroorganismen sind bisher in großer Zahl ausgeführt worden. In den meisten Fällen wurde nicht mit Reinkulturen, sondern mit Bakteriengemischen gearbeitet, man überließ die zu untersuchende Eiweißart einfach einer allgemeinen Fäulnis. Für die Bakteriologie sind nur solche Untersuchungen von Wichtigkeit, bei denen mit Reinkulturen gearbeitet worden ist. An dieser Stelle sind vor allem die Arbeiten von *Taylor*⁶⁾ über die Einwirkung von *Bact. coli* und *Bact. proteus* auf Casein und die Untersuchungen von *W. Grimmer*⁷⁾ über die Einwirkung von *Oidium lactis* und *Bac. mesentericus* auf Casein zu erwähnen.

Untersuchungen, welche die genaue analytische Feststellung der bei der Einwirkung von Kahlmhefen auf Casein entstehenden Spaltprodukte zum Ziele gehabt haben, sind bisher noch nicht angestellt worden. In Anbetracht der Wichtigkeit, die diese Mikroorganismen besonders für die Käseerei besitzen, schien es wünschenswert, ihre Einwirkung auf Casein analytisch näher zu untersuchen.

Eigene Untersuchungen.

Für den Versuch wurden 500 g lufttrockenes Casein angewandt, das durch Spontansäuerung aus Magermilch hergestellt worden war. Der Stickstoffgehalt betrug 12,65%, entsprechend einem Gesamtstickstoffgehalt von 63,25 g für 500 g Casein. Der Milchzuckergehalt wurde zu 0,73%, der Fettgehalt zu 3,2% festgestellt. Um den bei der Käse- reifung vorliegenden Verhältnissen möglichst nahe zu kommen, wurden die letzteren Beimengungen nicht entfernt.

Das Casein wurde mit 4 l Wasser verrührt, nach völliger Sterilisation mit der Kahlhefe *J* beimpft und bei 30° dem Abbau überlassen. Nach drei Monaten war das anfangs sehr üppige Wachstum nur noch sehr schwach. Die Caseinkörner waren völlig verschwunden, statt dessen hatte sich ein zäher, schleimiger Bodensatz gebildet. Die völlig klare Flüssigkeit hatte sich dunkelbraun gefärbt. Nach völliger Sistierung des Wachstums wurde das Digestionsgemisch der Untersuchung unter- worfen.

Hierzu wurde der Kolbeninhalt, der stark alkalische Reaktion besaß und intensiv nach Limburger Käse roch, filtriert. Der schleimige Rück- stand wurde so lange mit warmem Wasser gewaschen, bis das Wasch- wasser keine alkalische Reaktion mehr zeigte. Filtrat und Waschwasser wurden miteinander vereinigt und auf genau 3000 ccm gefüllt.

Um einen ungefähren Anhaltspunkt über die Verteilung des Stick- stoffs in den einzelnen Abbauprodukten zu erhalten, wurden 50 ccm dieser Lösung abpipettiert und durch geeignete Fällungen analysiert. Die abgetrennten 50 ccm, entsprechend 8,33 g Casein, wurden auf 100 ccm aufgefüllt, so daß 10 ccm dieser Flüssigkeit einem Caseingehalt von 0,833 g entsprachen. Für die einzelnen Fällungen wurden jedesmal 10 ccm angewandt. Die Stickstoffbestimmungen wurden nach *Kjeldahl* ausgeführt. Die Bestimmung des Gesamtgehalts an löslichem Stickstoff ergab einen Gehalt von 11,16%. Da der Stickstoffgehalt des Caseins vor dem Abbau 12,65% betrug, so lagen also 1,49% des Stickstoffs in ungelöster Form vor. Ob es sich hierbei um unangegriffenes Casein oder um Zellschubstanz der Kahlhefen handelt, wird später entschieden werden.

Mit Essigsäure trat nur eine ganz geringe Trübung ein, ein Zeichen, daß gelöstes Caseineiweiß oder eiweißähnliche Substanzen in wesent- licher Menge nicht mehr vorlagen.

Die Peptone wurden durch Gerbsäure gefällt. Der Niederschlag enthielt 2,49% Stickstoff.

Die Hexonbasen wurden durch Phosphorwolframsäure zur Fällung gebracht. Sie enthielten 3,02% Stickstoff. Da durch die Phosphor- wolframsäure auch das vorhandene Ammoniak mit gefällt wird, so mußte dieses aus dem Niederschlag entfernt werden, was durch Zer-

legung mit Baryt und nachfolgender Destillation geschah. Der Destillationsrückstand enthielt noch 2,75% Hexonbasenstickstoff, während die Differenz von 0,27% als Ammoniakstickstoff zu werten war.

In dem Filtrat von Gerbsäure- und Phosphorwolframsäurefällung war der Aminosäurestickstoff in einer Menge von 5,65% enthalten.

Die Berechnung dieser Werte auf Prozentgehalt an Gesamt- und löslichem Stickstoff ergibt folgende Werte:

	Menge des Stickstoffs in		
	g auf 100 g Casein	% des Gesamt- stickstoffs	% des lösl. Stickstoffs
Stickstoffgehalt des Caseins vor dem Abbau	12,65	100	—
löslicher Stickstoff	11,16	88,20	100
Stickstoff, fällbar durch Gerbsäure	2,49	19,68	22,31
Stickstoff, fällbar durch Phosphorwolframsäure	3,02	23,84	27,02
davon Ammoniak-Stickstoff	0,27	2,12	2,43
Aminosäuren-Stickstoff	5,65	44,70	50,67

Aus dieser Übersicht ist zu ersehen, daß die Kähmhefe das Casein in weitgehendstem Maße abgebaut hat. 88,20% des Gesamtstickstoffs sind in lösliche Form überführt worden. Von diesen bestanden nur 22,31% aus Peptonstickstoff, während nahezu 80% aus den einfachsten Eiweißbausteinen, den Hexonbasen und Aminosäuren, stammten.

Im physiologischen Teil dieser Arbeit ist gezeigt worden, daß der Milchzucker eine hemmende Wirkung auf die proteolytische Tätigkeit der Kähmhefe ausübt. Da das angewandte Casein ebenfalls einen Milchzuckergehalt von ca. 0,7% besaß, so wird diese hemmende Wirkung auch bei diesem Abbau in Betracht zu ziehen sein. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die Kähmhefe völlig milchzuckerfreies Casein in noch weitergehendem Maßstabe abbauen kann.

Flüchtige Stoffe.

Zur weiteren Untersuchung wurde eine Prüfung auf leicht flüchtige und leicht zersetzliche Spaltprodukte vorgenommen.

Eine Prüfung auf Schwefelwasserstoff und Indol verlief negativ. Auch das Tryptophan konnte nicht nachgewiesen werden. Es war anzunehmen, daß diese leicht zersetzliche Aminosäure einem weiteren Abbau in sekundäre Spaltprodukte anheimgefallen war.

Zur Bestimmung der flüchtigen Säuren und Basen wurde hierauf die gesamte Flüssigkeitsmenge einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Sie wurde so lange ausgedehnt, bis Lackmus durch das Destillat nicht mehr gebläut wurde.

Um einen ungefähren Anhaltspunkt über die Natur der übergehenden Säuren zu erlangen, wurde der erste Teil des Destillats, ca. 100 ccm, in verdünnter Schwefelsäure aufgefangen. Nachdem dieser Teil noch weiter mit Schwefelsäure angesäuert worden war, wurde er einer zweiten

Wasserdampfdestillation unterworfen, wobei die flüchtigen Säuren übergangen, während die flüchtigen Basen in Form von schwefelsauren Salzen im Destillationskolben zurückblieben. Das durch diese Destillation erhaltene Destillat wurde mit Baryt neutralisiert, überschüssiges Baryt durch Einleiten von Kohlendioxyd ausgefällt und das Filtrat von Bariumsulfat und Bariumcarbonat auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Die trockenen Bariumsalze wurden analysiert: 0,1770 g ergaben 0,1473 g $\text{BaSO}_4 = 48,97\%$ Ba.

Von den in Frage kommenden fettsauren Salzen enthalten:

Ameisensaures Barium	60,35%	Barium
Essigsäures Barium	53,78%	„
Propionsäures Barium	48,46%	„
Buttersäures Barium	44,17%	„
Valeriansäures Barium	40,45%	„

Die analysierte Substanz schien also hauptsächlich aus propionsäurem Barium zu bestehen, das mit Salzen anderer Fettsäuren vermischt war. Um diese zu identifizieren, wurde der größte Teil des ersten Destillats in verdünnter Salzsäure aufgefangen und zur Trennung der Säuren und Basen einer zweiten Wasserdampfdestillation unterworfen. Das hierdurch erhaltene Destillat enthielt neben Salzsäure die flüchtigen Säuren; es besaß einen stechenden, scharfen Geruch. Nach 5stündiger Destillation zeigte das jetzt übergehende Destillat nur noch schwach saure Reaktion, eine Prüfung mit Silbernitrat in salpetersaurer Lösung gab einen rein weißen, flockigen Niederschlag, der sich in überschüssigem Ammoniak leicht löste. Die jetzt noch übergehende Säure bestand also nur noch aus Salzsäure. Die Destillation wurde unterbrochen und das Destillat zur Gewinnung der Fettsäuren im Schütteltrichter erschöpfend ausgeäthert. Der ätherische Extrakt wurde 24 Stunden lang über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und dann der Äther abdestilliert. Der Rückstand bestand aus einer gelblich gefärbten, stark sauren Flüssigkeit von intensivem Geruch nach ranziger Butter und Schweiß. Er wurde einer zweiten Destillation unter Atmosphärendruck unterworfen und das Destillat in folgende Fraktionen eingeteilt:

Fraktion	Siedepunkt
1	von 90—102°
2	„ 102—119°
3	„ 119—141°
4	„ 141—162°
5	„ 162—175°
6	„ 175—205°

Im Destillationskolben blieb ein ganz geringer, stark braun gefärbter Rückstand zurück, der zum Teil später fest wurde. Für eine Analyse reichte die Menge dieses Rückstandes nicht aus.

Die gewonnenen Fraktionen wurden unter gewöhnlichem Druck nochmals einzeln destilliert und hierbei in Fraktionen eingeteilt, deren Siedepunkte ungefähr den Siedepunkten der sie zur Hauptsache bildenden Fettsäuren entsprach. Es wurden folgende Fraktionen erhalten:

Fraktion	Siedepunkt	Name
1	von 98—101°	Ameisensäure
2	„ 116—119°	Essigsäure
3	„ 138—141°	Propionsäure
4	„ 159—162°	Buttersäure
5	„ 172—175°	Valeriansäure
6	„ 202—206°	Capronsäure

Untersuchung von Fraktion 1. Diese Fraktion bestand aus einer völlig farblosen, an der Luft stark rauchenden Flüssigkeit von stechendem Geruch. In Eiswasser gestellt, erstarrte sie sofort zu einem Krystallbrei. Ein Teil wurde zur Darstellung des Silbersalzes, ein zweiter Teil zur Darstellung des Bariumsalszes verwandt.

Das Silbersalz färbte sich, trotzdem eine Einwirkung des Lichtes möglichst vermieden wurde, bald so stark, daß von einer Silberbestimmung abgesehen werden mußte. Diese Eigenschaft ist charakteristisch für ameisensaures Silber.

Die Bestimmung des Bariumsalszes ergab folgende Werte:

Best. 1 : 0,1553 g Substanz ergaben 0,1578 g BaSO₄ = 59,79% Ba.

Best. 2 : 0,2015 g Substanz ergaben 0,2059 g BaSO₄ = 60,13% Ba.

Reines ameisensaures Barium von der Formel (HCOO)₂ Ba verlangt 60,40% Ba.

Fraktion I bestand also hauptsächlich aus Ameisensäure. Da die Fraktion nicht den genauen Siedepunkt der Ameisensäure besaß, waren geringfügige Beimengungen von anderen Säuren wahrscheinlich.

Die Ameisensäure ist als sekundäres Spaltprodukt schon von verschiedenen Forschern festgestellt worden. Es handelt sich meist um Versuche, bei denen bestimmte primäre Abbauprodukte entweder einer allgemeinen Fäulnis oder der Einwirkung einer einzigen Art von Mikroorganismen unterworfen wurden. Von *W. Brasch*⁸⁾ wurde sie durch Einwirkung von *Bac. putrificus* auf Serin, von *Neuberg*⁹⁾ aus Valin und Asparaginsäure und von *D. Ackermann*¹¹⁾ aus Glutaminsäure erhalten.

Besonders interessant ist die Entstehung der Ameisensäure aus der Glutaminsäure und der Asparaginsäure. Beide Aminosäuren zählen zu den regelmäßig im Eiweiß vorkommenden primären Spaltprodukten. Sie konnten beim Abbau des Caseins durch Kähmhefe beide nicht aufgefunden werden, so daß die Entstehung der Ameisensäure aus diesen Körpern mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen ist.

Untersuchung von Fraktion 2. Die Menge dieser Fraktion war zu gering, um Identifizierungsversuche anstellen zu können. Im Eis-

schränk erstarrte sie nicht; der Geruch war nicht typisch essigsäureartig. Es schien vielmehr eine Mischung von Ameisensäure mit höheren Fettsäuren vorzuliegen.

Untersuchung von Fraktion 3. Im Gegensatz zu der Fraktion 1 war diese Fraktion auch nach längerem Aufbewahren über konz. Schwefelsäure im Eisschränk bei $+2^{\circ}$ bis $+3^{\circ}$ C nicht erstarrt. Das dargestellte Silbersalz, feine, nadelförmige, in siedendem Wasser leicht lösliche Krystalle, ergab folgenden Silberwert:

Best. 1: 0,9522 g Subst. ergaben 0,6985 g AgCl = 55,21% Ag.

Da reines Silberpropionat 59,60% Ag verlangt, schien diese Fraktion, dem Ergebnis der Analyse nach zu urteilen, eine ziemlich grobe Verunreinigung, wahrscheinlich durch andere Fettsäuren, zu enthalten. Sie wurde deshalb nochmals einer sorgfältigen Destillation unterzogen und hierbei nur das Destillat von $140\text{--}141^{\circ}$ aufgefangan. Von der erhaltenen Menge wurde wiederum das Silbersalz hergestellt, zweimal aus heißem Wasser umkrystallisiert und nach erfolgter Gewichtskonstanz analysiert:

Best. 2: 0,0871 g Substanz ergaben 0,0688 g AgCl = 59,45% Ag.

Die Darstellung des Bariumsalzes konnte leider nicht ausgeführt werden, da die restliche Menge hierzu nicht ausreichte. Trotzdem aber dürfte durch vorstehende Analysen die Propionsäure mit genügender Sicherheit identifiziert worden sein.

Diese Säure, die an Menge alle anderen aufgefundenen Säuren übertraf, ist bereits von verschiedenen Forschern als sekundäres Eiweißspaltprodukt festgestellt worden. Die gebildete große Menge läßt sich daraus erklären, daß die Möglichkeit ihrer Entstehung aus primären Spaltprodukten besonders groß ist. So wurde sie von *W. Brasch*⁸⁾, *Nawiasky*¹²⁾, *Neuberg*¹³⁾, *Abderhalden*¹⁴⁾ und *Effront*¹⁵⁾ aus verschiedenen Aminosäuren, wie Alanin, Serin, Aspargiansäure und Glutaminsäure, erhalten.

Wie später gezeigt werden wird, wurden Asparaginsäure und Glutaminsäure nicht unter den Spaltprodukten des Caseins gefunden, trotzdem sie zu den regelmäßig vorkommenden Bausteinen des Eiweißes zählen. Diese beiden Aminosäuren scheinen also in erster Linie die Ausgangssubstanz für die entstandene Propionsäure gebildet zu haben.

Untersuchung von Fraktion 4. Diese Fraktion, die ebenfalls im Eisschränk nicht erstarrte, besaß einen besonders intensiven Geruch. Das Silbersalz, in bekannter Weise hergestellt, war in kaltem Wasser sehr schwer löslich; es wurde mehrmals aus heißem Wasser umkrystallisiert, woraus es sich beim Abkühlen in feinen Nadeln ausschied. Im Schmelzpunktröhrchen in konz. Schwefelsäure erhitzt, färbte es sich bei 150° braun, um bei höherer Temperatur völlig zu verkohlen, ohne zu schmelzen. Silberbestimmung:

0,1002 g Substanz ergaben 0,0703 g AgCl = 52,81% Ag.

Da reines Silberbutyrat 55,33% Ag verlangt, bestand auch hier wieder die Wahrscheinlichkeit, daß diese Fraktion Beimengungen anderer Säuren enthielt. Diese Wahrscheinlichkeit wurde verstärkt, als sich herausstellte, daß die vorliegende Fraktion ein, wenn auch nur sehr geringes, optisches Drehungsvermögen besaß. Reine Buttersäure ist optisch inaktiv, da sie kein asymmetrisches Kohlenstoffatom besitzt. Bei der vorliegenden Fraktion lag also eine Verunreinigung vor, die aus höheren, optisch aktiven Fettsäuren bestehen mußte. Um die Fraktion hiervon zu befreien, wurde sie einer zweimaligen Destillation unterzogen, wobei jedesmal nur die Fraktion von 160—162° aufgefangen wurde.

Eine Bestimmung des dargestellten Silbersalzes ergab folgenden Wert:

0,0854 g Substanz ergaben 0,0622 g AgCl = 54,82% Ag,
berechnet für Ag C₄H₇O₂ = 55,33% Ag.

Der etwas ungenaue Wert ist wohl dadurch zu erklären, daß die Fraktion immer noch geringe Mengen fremder Beimengungen enthielt, die selbst durch zweimalige Destillation nicht entfernt werden konnten. Zu einer weiteren Reinigung reichte die Menge der noch vorhandenen Säure leider nicht aus.

Der Rest der Fraktion wurde zur Darstellung des Calciumsalzes verwandt. Es wurde hergestellt durch Kochen der Fraktion mit Calciumcarbonat und sehr viel Wasser. Wenn dieses Salz auch nicht in analysierbarer Menge erhalten werden konnte, so war es doch möglich, eine wichtige und charakteristische Eigenschaft des Calciumbutyrats bestätigt zu finden: Wurde das Salz in kaltem Wasser gelöst, so trübte sich die Lösung beim Erwärmen. Nach Literaturangaben besitzt reines Calciumbutyrat bei 70—80° seine geringste Wasserlöslichkeit. Durch vorstehende Analysen und Beobachtungen dürfte die Buttersäure identifiziert worden sein.

Ihre Entstehung durch Einwirkung von Mikroorganismen auf Eiweißstoffe bzw. deren Bausteine ist bereits von mehreren Forschern, wie *W. Brasch*⁸⁾, *Bopp*¹⁶⁾, *Effront*¹⁵⁾, *Grimmer*⁷⁾, *Nawiasky*¹²⁾, *Nencki*¹⁸⁾ und *Neuberg*¹⁷⁾, festgestellt worden.

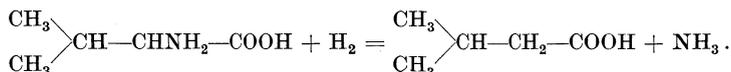
Untersuchung von Fraktion 5. Diese Fraktion besaß einen intensiven Geruch nach altem Käse. Da auch sie sehr wahrscheinlich mit anderen Fettsäuren vermengt war, wurde sie ebenfalls einer zweimaligen Destillation unterzogen. Aufgefangen wurde die Fraktion von 170—174°.

Das dargestellte Silbersalz kristallisierte in flachen Blättchen, die sich beim Erhitzen im Schmelzpunktröhrchen schnell unter Braunfärbung zersetzten. Eine Silberbestimmung ergab folgenden Wert:

0,0952 g Subst. ergaben 0,0659 g AgCl = 52,10% Ag
berechnet für AgC₅H₉O₂ = 51,62% Ag.

Zu weiteren Identifizierungsversuchen reichte die vorhandene Menge nicht aus. Die Wahrscheinlichkeit bestand aber, daß die vorliegende Fraktion zum größten Teil aus der gewöhnlichen Valeriansäure (Isopropyllessigsäure) bestand.

Diese Säure läßt sich wohl am einfachsten aus der α -Aminoisovaleriansäure, dem Valin, durch reduktive Desaminierung entstanden denken:



In der Tat wurde sie von *Neuberg*⁹⁾ bei der Fäulnis des Valins erhalten. Derselbe Forscher isolierte sie ebenfalls aus den Spaltprodukten von der Fäulnis ausgesetztem reinem Casein. Von *Nencki*¹⁸⁾ und von *Nawiasky*¹²⁾ wurde diese Säure als Umwandlungsprodukt des Leucins durch *Bact. proteus vulgaris* festgestellt.

Untersuchung von Fraktion 6. Diese Fraktion besaß einen sehr widerlichen Geruch nach Schweiß. Sie wurde nochmals destilliert und hierbei die Fraktion von 200—205° aufgefangen. Das dargestellte Silber-salz krystallisierte aus Wasser nicht wie gewöhnlich in Nadeln, sondern in zusammengeballten Flocken, die ebenfalls leicht zersetzlich waren.

Die Silberbestimmung des Salzes ergab:

$$\begin{array}{l} 0,0652 \text{ g Substanz ergaben } 0,0415 \text{ g AgCl} = 47,90\% \text{ Ag,} \\ \text{berechnet für Ag C}_6\text{H}_{11}\text{O}_2 = 48,38\% \text{ Ag.} \end{array}$$

Diese Fraktion dürfte wohl hauptsächlich aus der normalen Capron-säure bestehen.

Diese Säure wurde von *Nawiasky*¹²⁾ als Spaltprodukt des Leucins durch Einwirkung von *Bact. proteus vulgaris* erhalten. *C. Neuberg*¹⁹⁾ isolierte sie aus Casein, das einer allgemeinen Fäulnis ausgesetzt worden war.

Die über 205° siedenden Anteile, die teilweise im Destillationskolben fest geworden waren, waren in zu geringer Menge vorhanden, als daß sie analysiert werden konnten. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sie sich aus höheren Fettsäuren zusammensetzten.

Der von den flüchtigen Säuren befreite Destillationsrückstand der Wasserdampfdestillation enthielt diejenigen flüchtigen Basen, die in dem Digestionsgemisch in ungebundener Form vorhanden gewesen waren. Der größte Teil der durch den Abbau gebildeten Basen befand sich jedoch noch in der Hauptflüssigkeit in Form von Salzen, die nicht flüchtig sind und infolgedessen bei der ersten Wasserdampfdestillation im Destillationsrückstand zurückgeblieben waren. Hieraus wurden sie durch eine später zu besprechende Fällung mit Phosphorwolframsäure, zusammen mit anderen Abbauprodukten, niedergeschlagen. Aus dem

Andere flüchtige Basen waren, wenn überhaupt gebildet, doch nur in äußerst geringer Menge vorhanden. Daß sie entstanden waren, wird durch den Stickstoffgehalt des rohen Basengemisches wahrscheinlich gemacht. Außerdem sind in der Literatur zahlreiche Angaben vorhanden, nach denen besonders die verschiedenen Methylamine als sekundäre Eiweißspaltprodukte festgestellt worden sind.

Prüfung auf Casein.

Von der Tatsache ausgehend, daß das Caseineiweiß in stark verdünnter Natronlauge verhältnismäßig leicht löslich ist, während das Pilzeiweiß nur in ganz geringem Maße bei längerer Behandlung mit Alkali in Lösung geht, wurde die Untersuchung des festen Rückstandes in folgender Weise vorgenommen:

Ein Teil der getrockneten Masse wurde mit stark verdünnter Natronlauge kurze Zeit behandelt. Eine Lösung des Rückstandes wurde nicht beobachtet. Es wurde filtriert und das Filtrat mit verdünnter Salzsäure neutralisiert. Die Lösung blieb klar, ein Zeichen dafür, daß der Rückstand sich aus Pilzeiweiß zusammensetzte. Es war also alles Casein in Lösung überführt worden.

Zur Entfernung der wasserlöslichen, aber den wahren Eiweißkörpern noch sehr nahestehenden Spaltprodukte wurde die Abbaulösung in der Hitze mit stark verdünnter Essigsäure versetzt, wodurch nach *Winterstein* die Tyroalbumine gefällt werden. Es trat nur eine ganz geringe Trübung ein, die mit Hilfe einer gesättigten Lösung von Kaliumalaun abfiltriert werden konnte.

Prüfung auf Peptone.

Für die Prüfung der Abbaulösung auf ihren Gehalt an Peptonen und auf evtl. gebildete sekundäre Abbauprodukte kommen zwei verschiedene Verfahren in Frage:

1. Fällung mit Gerbsäure.
2. Fällung mit Bleisalzen.

Durch beide Reagenzien werden fast genau die gleichen Mengen stickstoffhaltiger Stoffe gefällt. Der Unterschied der Fällungen besteht darin, daß bei Anwendung von Bleisalzen die Fällung der Peptone in zwei Fraktionen geteilt werden kann.

1. Fällung des größten Teils der Peptone durch Bleiacetat.
2. Fällung der bei alkalischer Reaktion fallenden Peptone durch Bleiessig.

Durch dies Reagens werden aber ebenfalls evtl. gebildete Oxy-carbonsäuren gefällt, auf deren Auffindung hier großer Wert gelegt wurde. Diese werden durch Gerbsäure nicht zur Fällung gebracht. Es ist klar, daß es für die Isolierung dieser Säuren, von denen vor allem

Bernsteinsäure in Betracht kommt, von bedeutendem Vorteil ist, wenn die große Menge der durch Bleiacetat fällbaren stickstoffhaltigen Substanzen vorher eliminiert ist. Aus diesem Grunde wurde von der an und für sich einfacheren Fällung mit Gerbsäure abgesehen und die Fällung durch Bleiacetat und Bleiessig vorgenommen.

Um zu große Verdünnung zu vermeiden, wurde eine 35proz. Bleiacetatlösung angewandt. Da der Niederschlag der Peptone in Wasser etwas, in einem Überschuß des Fällungsmittels aber verhältnismäßig stark löslich war, so wurde zur Vermeidung eines solchen Überschusses durch Reagensglasversuch die günstigste Menge des Fällungsmittels festgestellt. Die gefundene optimale Menge wurde nun auf die Hauptflüssigkeit berechnet und hinzugesetzt. Nach 24 Stunden hatte sich der entstandene Niederschlag gut abgesetzt, er wurde abfiltriert und auf der Wasserstrahlpumpe nach Auswaschen mit wenig Wasser scharf abgesogen.

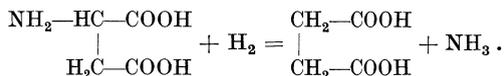
Nachdem auf diese Weise die größte Menge der Peptone entfernt worden war, wurde das neutrale, klare Filtrat mit Bleiessig gefällt. Da bei diesem Niederschlag in bezug auf Löslichkeit dasselbe gilt wie beim Bleiacetatniederschlag, so mußte auch bei dieser Fällung ein Überschuß des Fällungsmittels sorgfältig vermieden werden. Nach 24 Stunden wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und auf der Pumpe scharf abgesogen.

Zur weiteren Untersuchung wurde der Niederschlag im Becherglas in destilliertem Wasser suspendiert und mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt. Überschüssige Schwefelsäure wurde durch Baryt, ein Überschuß hiervon durch Einleiten von Kohlendioxyd quantitativ entfernt. Die Niederschläge wurden abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbad bis zur Sirupdicke eingedampft. Nach Aufbewahren im Exsiccator schieden sich neben braungefärbten, amorphen Massen Krystalle aus. Die ganze Masse wurde mit warmem Alkohol mehrmals gewaschen und hierauf die alkoholische Flüssigkeit auf dem Wasserbad vom Alkohol befreit. Die zurückbleibende, dunkelbraun gefärbte Masse wurde in wenig Schwefelsäure aufgenommen und mit geglühtem Natriumsulfat verrieben. Hierauf wurde die Masse erschöpfend ausgeäthert, der gelbgefärbte Ätherextrakt mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und dann auf dem Wasserbad der Äther eingedampft. Der Rückstand war harzig. Nach dreitägigem Aufbewahren im Exsiccator begannen sich tafelfartige Krystalle abzuscheiden, die nach Behandlung mit Tierkohle und mehrfachem Umkrystallisieren aus Alkohol und Wasser einen Schmelzpunkt von 179—182° zeigten. Reine Bernsteinsäure schmilzt bei 184—185°.

Von der Substanz wurde das Bariumsalz hergestellt und durch seine Analyse die Bernsteinsäure als solche identifiziert:

0,1941 g ergaben 0,1776 g $\text{BaSO}_4 = 53,85\%$ Ba,
berechnet für bernsteinsaures Ba = 54,20% Ba.

Die Entstehung der Bernsteinsäure wäre durch eine reduktive Desaminierung der Asparaginsäure nach folgendem Schema möglich:



Die Richtigkeit dieser Theorie wurde zuerst von *Nawiasky*¹²⁾ bewiesen, der bei der Einwirkung von *Proteus* auf Asparaginsäure 44,4% der theoretisch möglichen Menge Bernsteinsäure erhielt. Später wurde sie auch noch von anderen Forschern, wie *Neuberg*¹³⁾, *Brasch*⁸⁾ u. a. als Umwandlungsprodukt der Asparaginsäure isoliert. Wenn die Asparaginsäure also durch energisch abbauende Mikroorganismen, wie *Bakt. proteus* oder *Bac. putrificus*, ohne weiteres abbaubar ist, so scheint sie weniger energisch abbauenden Mikroorganismen gegenüber widerstandsfähiger zu sein. *Grimmer*⁷⁾ gibt an, daß er bei Einwirkung von *Oidium lactis* auf Asparaginsäure keine Bernsteinsäure erhalten konnte. Durch Einwirkung desselben Pilzes auf Glutaminsäure wurde jedoch Bernsteinsäure als Spaltprodukt festgestellt. Dasselbe Resultat erhielten *Nawiasky*¹²⁾ und *Brasch*⁸⁾ durch Einwirkung von *Proteus* auf Glutaminsäure.

Bei dem Abbau des Caseins durch Kahlhefen scheint die Glutaminsäure am meisten als Ausgangssubstanz für die Bildung der Bernsteinsäure in Frage zu kommen, da sie, wie später festgestellt werden wird, nicht unter den Spaltprodukten nachzuweisen war, trotzdem sie als regelmäßig vorkommender Baustein des Caseineiweißes zu gelten hat.

Die Hexonbasen.

In der Hauptflüssigkeit befinden sich jetzt nur noch die Aminosäuren und ein Teil der Basen, die an die Aminosäuren gebunden sind und daher bei der ersten Wasserdampfdestillation nicht mit übergegangen waren.

Diese Basen sowie die drei basischen Aminosäuren Histidin, Arginin und Lysin wurden durch eine Fällung mit der optimalen Menge einer ca. 25 proz. Phosphorwolframsäure in 5 proz. schwefelsaurer Lösung aus der Hauptflüssigkeit entfernt.

Um den entstandenen Niederschlag von den Basen zu befreien, wurde er mit Baryt zerlegt und durch eine Wasserdampfdestillation die freigemachten Basen entfernt.

Bestimmung der Hexonbasen. Der Destillationsrückstand wurde nach dem Verfahren von *Kossel*²⁶⁾ auf Hexonbasen verarbeitet.

Die Chlorbestimmung des nach diesem Verfahren erhaltenen Histidinchlorids ergab folgenden Wert:

$$0,0853 \text{ g ergaben } 0,1146 \text{ g AgCl} = 33,24\% \text{ Cl.}$$

Das weiter gereinigte Salz wurde nochmals analysiert:

0,0441 g ergaben 0,0564 g AgCl = 31,64% Cl,
berechnet für $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2 HCl$ = 31,09% Cl.

Das Histidin dürfte hierdurch mit genügender Sicherheit identifiziert worden sein.

Das nach demselben Verfahren erhaltene Arginin wurde zur Identifizierung in das neutrale Nitrat überführt. Hierzu wurde die im Filtrat noch vorhandene Schwefelsäure durch Baryt, ein Überschuß hiervon durch Kohlendioxyd entfernt. Das Filtrat vom Bariumsulfat und Bariumcarbonat wurde mit Salpetersäure angesäuert und zur Trockne eingedampft. Nach Reinigung mit Tierkohle und zweimaliger Umkrystallisation aus heißem 96 proz. Alkohol wurde das Arginnitrat als eine weiße, krystallinische Masse erhalten, die, durch das Mikroskop betrachtet, aus drusenartig verfilzten Nadelchen bestand. Sie besaß keinen scharfen Schmelzpunkt; in kaltem Alkohol war sie schwer, in heißem Alkohol leicht löslich.

Eine Bestimmung des Krystallwassergehaltes ergab folgenden Wert: 1,8220 g Substanz verloren im Trockenschrank bei 115°: 0,0574 g Wasser = 3,15%.

Nach Literaturangaben krystallisiert das neutrale Arginnitrat mit $\frac{1}{2}$ Mol. Krystallwasser.

Ber. für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + \frac{1}{2}$ Mol. H_2O : 3,66% H_2O ,
gef. : 3,15% H_2O .

Die Verbrennung ergab für C und H folgende Werte:

Best. 1: 0,1420 g ergaben 0,1491 g CO_2 u. 0,0881 g H_2O = 28,65% C u. 6,94% H,
Best. 2: 0,1885 g ergaben 0,1999 g CO_2 u. 0,1181 g H_2O = 28,93% C u. 7,01% H.
Ber. für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + \frac{1}{2}$ Mol. H_2O : 29,25% C u. 6,55% H.

Die Substanz ist also als Arginnitrat anzusprechen.

Von dem erhaltenen Lysin wurde das Pikrat hergestellt. Es war in kaltem Wasser schwer, in siedendem Wasser ziemlich leicht löslich. Aus heißem Wasser schied sich aus der Lösung beim Abkühlen das Pikrat in nadelförmigen Krystallen aus, die bei 217—218° schmolzen. Reines Lysinpikrat verlangt einen Schmelzpunkt von 220°.

Zur weiteren Identifizierung wurde die salzsaure Verbindung des Lysins hergestellt. Die Chlorbestimmung dieses Salzes ergab folgenden Wert:

0,0655 g ergaben 0,0846 g AgCl = 31,95% Cl,
Ber. für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2 HCl$ = 32,37% Cl.

Die vorliegende Substanz bestand also aus reinem Lysin.

Die Aminosäuren.

In dem Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlages befanden sich jetzt nur noch die Aminosäuren.

Zu ihrer Isolierung wurde folgendermaßen vorgegangen: Die im Filtrat noch vorhandene geringe Menge von Phosphorwolframsäure

sowie die zugesetzte Schwefelsäure wurde durch Baryt, ein Überschuß hiervon durch Kohlendioxyd quantitativ entfernt. Nach Filtration und gründlicher Auswaschung der Niederschläge wurde das Filtrat stark eingengt. Hierbei schieden sich geringe Mengen von Krystallen aus, die abfiltriert, in kochendem Wasser gelöst und mit etwas Tierkohle gereinigt wurden. Beim Eindampfen der Lösung schieden sich die Krystalle in Form von feinen Nadeln ab. Mit *Millons* Reagens zeigten sie eine stark fleischrote Färbung, die ebenso wie die Krystallform und die Löslichkeit auf Tyrosin hinwies.

Zu weiteren Identifizierungsversuchen reichte die Menge der ausgeschiedenen Krystalle nicht aus.

Das Filtrat der Lösung, nach weiterem Eindampfen ein dicker Sirup, aus dem sich keine Krystalle mehr ausgeschieden hatten, wurde nun unter Eiskühlung mit trockenem Chlorwasserstoffgas gesättigt und einige Tage bei 0° aufbewahrt. Krystallabscheidungen konnten nicht festgestellt werden. Glutaminsäure schien also nicht vorhanden zu sein.

Die Hauptflüssigkeit wurde jetzt bis zur Sirupdicke eingedampft und dann nach der Methode von *E. Fischer* verestert.

Die Destillation der Ester wurde bei einem Druck von 14 mm ausgeführt. Eine wünschenswerte Destillation bei einem Druck von weniger als 1 mm konnte nicht durchgeführt werden, da eine geeignete Apparatur nicht zur Verfügung stand. Es war also zu befürchten, daß die Ausbeute an Estern, besonders an den höhersiedenden, durch teilweise Zersetzung und Verharzung nicht unwesentlich herabgesetzt werden würde.

Das Destillat wurde in folgende vier Fraktionen eingeteilt:

Fraktion 1	von	20— 60°	(Sp. 14)
„ 2	„	60— 90°	do.
„ 3	„	90—110°	do.
„ 4	„	110—150°	do.

Fraktion 4 hatte bereits sehr stark unter Zersetzung zu leiden. Der Destillationsrückstand war größtenteils verharzt.

Die erhaltenen Fraktionen, die alkalische Reaktion zeigten, wurden nun, jede für sich, im Kolben mit der zehnfachen Menge Wasser versetzt und 10 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Bei den Fraktionen 3 und 4 hatte sich beim Zusatz des Wassers eine ölartige Substanz ausgeschieden, die durch Schütteln mit Äther entfernt und später identifiziert wurde.

Die verseiften Ester, die auch nach Abkühlung keine krystallinischen Abscheidungen zeigten, wurden jetzt bei 15—17 mm Druck bis zur Trockne eingedampft. Um etwa vorhandenes Prolin, das sich durch seine Alkohollöslichkeit von den anderen Aminosäuren unterscheidet, zu isolieren, wurden die drei Trockenrückstände jetzt mit absolutem

Alkohol am Rückflußkühler gekocht und heiß filtriert. Bei allen Fraktionen trat bei Abkühlung der Filtrate eine Trübung ein. Diese Trübung, die aus weniger leicht in Alkohol löslichen Aminosäuren bestand, wurde abfiltriert und mit dem völlig unlöslichen Teil vereinigt. Der klare, alkoholische Extrakt wurde dann im Vakuum wieder bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand jetzt mit kaltem, absolutem Alkohol behandelt. Ein Teil der Substanz ging in Lösung, der unlösliche Rückstand wurde wieder mit dem alkoholunlöslichen Hauptteil der Aminosäuren vereinigt.

Die in Lösung gegangene Menge wurde nun zur Reinigung nochmals eingedampft und wieder mit kaltem, absolutem Alkohol extrahiert. Bis auf ganz geringe Rückstände ging jetzt alles in Lösung. Die wieder bis zur Trockne eingedampfte Substanz wurde durch Kochen mit Barytwasser racemisiert, dann das Baryt durch verdünnte Schwefelsäure entfernt und die wässrige Lösung mit Kupfercarbonat behandelt. Die blaue Lösung wurde eingedampft, das erhaltene Kupfersalz mehrmals aus Wasser umkrystallisiert und im Trockenschrank bei ca. 100° getrocknet. Nach erreichter Gewichtskonstanz wurde der Kupfergehalt gravimetrisch bestimmt.

Die Analyse ergab folgende Werte:

Best. 1 : 0,2285 g ergaben 0,0634 g CuO = 22,16% Cu,
 Best. 2 : 0,1812 g ergaben 0,0504 g CuO = 22,22% Cu,
 berechnet für $C_{10}H_{16}N_2O_4Cu$ = 21,81% Cu.

Zur weiteren Identifizierung wurde ein kleiner Teil des Kupfersalzes in wenig Wasser gelöst. Die blaue Lösung wurde etwas eingedampft und abgekühlt, wobei sich blaugefärbte Krystalle ausschieden, die abfiltriert und im Exsiccator getrocknet wurden.

Eine Kupferbestimmung dieser Substanz ergab folgenden Wert:

0,2021 g ergaben 0,0476 g CuO = 18,82% Cu.

Das mit 2 Molekülen Krystallwasser krystallisierende Kupferprolin verlangt 19,26% Kupfer.

Die vorliegende Substanz ist durch diese Analysen sowie durch ihre Löslichkeit in Alkohol als Prolin identifiziert.

Da die Versuche, die einzelnen Aminosäuren aus den verschiedenen Fraktionen direkt zu trennen, was auf Grund einer evtl. vorhandenen verschiedenen Löslichkeit in Äthyl- und Methylalkohol vielleicht möglich gewesen wäre, fehlschlügen, so wurde die Identifizierung auf dem Wege über die Kupfersalze versucht.

Hierzu wurden die Fraktionen einzeln in Wasser aufgenommen und mit Kupfercarbonat behandelt. Aus den Fraktionen 1—3 schieden sich bereits beim Erkalten der Lösung blaßblau gefärbte Blättchen aus, die in Wasser und Methylalkohol sehr schwer löslich waren. Sie wurden

heiß abfiltriert und bei 100° getrocknet. Im Schmelzpunktröhrchen waren sie bei 260° noch nicht geschmolzen; sie waren völlig geschmacklos. Eine Kupferbestimmung des Salzes ergab:

Schwerlösliches Salz aus Fraktion 1:
 0,1538 g ergaben 0,0382 g CuO = 19,84% Cu.
 Schwerlösliches Salz aus Fraktion 2:
 0,0925 g ergaben 0,0233 g CuO = 20,13% Cu.

Das Kupfersalz aus Fraktion 1 mit 19,84% Cu stimmt gut auf Leucinkupfer (ber. für $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$ = 19,63% Cu).

Der etwas höhere Kupfergehalt des Salzes aus Fraktion 2 ist wahrscheinlich durch eine geringe Beimischung von Valinkupfer zu erklären, welches 21,49% Cu verlangt.

Das Filtrat von Fraktion 1 wurde weiter eingeeengt, wobei sich wieder geringe Mengen einer krystallinischen Substanz ausschieden. Sie wurden abfiltriert und mit wenig Wasser erwärmt. Ein Teil der Krystalle ging leicht in Lösung, der Rest erst nach kurzem Erhitzen. Die Lösung wurde auf dem Wasserbad eingedampft, der im Exsiccator getrocknete Rückstand zur Analyse gebracht:

Best. 1 : 0,1582 g ergaben 0,0461 g CuO = 23,28% Cu.
 Best. 2 : 0,2001 g ergaben 0,0555 g CuO = 22,16% Cu.

Da die erhaltenen Werte weder für Leucin (19,63% Cu) noch für Valin (21,49% Cu) oder Alanin (26,51% Cu) stimmten, so lag hier wahrscheinlich eine Mischung dieser Aminosäuren vor, was ja die verschiedene Löslichkeit in Wasser schon anzeigte.

Ein Versuch, diese beiden Körper auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit in Wasser zu trennen, konnte wegen der erhaltenen geringen Mengen nicht ausgeführt werden.

Das Filtrat wurde nun weiter eingeeengt; sobald sich wägbare Mengen abgeschieden hatten, wurden diese analysiert:

0,1612 g ergaben 0,0516 g CuO = 25,57% Cu.

Der erhaltene Wert machte das Vorhandensein von Alanin (ber. 26,51% Cu) bereits sehr wahrscheinlich. Zur weiteren Identifizierung wurde der Rest des Filtrates völlig zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Methylalkohol behandelt. Der hierin unlösliche Anteil wurde abfiltriert, getrocknet und aus Wasser, in dem er mit blauer Farbe leicht löslich war, zweimal umkrystallisiert. Das noch einmal aus 50 proz. Alkohol umkrystallisierte Kupfersalz wurde abfiltriert und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Kupferbestimmung ergab folgenden Wert:

0,2150 g ergaben 0,0706 g CuO = 26,23% Cu,
 berechnet für Alaninkupfer = 26,51% Cu.

Hierdurch wurde das Vorhandensein von Alanin sichergestellt.

Ebenso wie bei Fraktion 1 wurde auch aus Fraktion 2 durch fraktionierte Krystallisation das schwerlösliche Leucinkupfer herausgeholt. Das Filtrat hiervon wurde völlig zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Methylalkohol gekocht. Während bei Fraktion 1 der größte Teil des Rückstandes hierbei ungelöst blieb, ging bei Fraktion 2 ein großer Teil in Lösung. Dieser wurde filtriert, wieder eingedampft, dann zweimal aus Methylalkohol umkrystallisiert und im Trockenschrank bei 95—100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Eine Kupferbestimmung des Salzes ergab folgenden Wert:

0,1985 g ergaben 0,0522 g CuO = 21,01% Cu.

Es lag also ziemlich reines Valin vor, das scheinbar mit etwas Leucin vermischt war.

Bei Fraktion 3 zeigte sich vor der Verseifung beim Zusatz von Wasser eine starke Trübung, bei Fraktion 4 eine Abscheidung einer ölartigen Masse, die durch Ausschütteln mit Äther entfernt und auf Phenylalanin untersucht wurde. Hierzu wurde die ätherische Lösung nach Waschen mit Wasser und nachfolgendem Trocknen mit geglühtem Natriumsulfat mit konz. Salzsäure versetzt und vorsichtig eingedampft, wodurch der Ester verseift wurde. Das sich bildende Chlorhydrat wurde nochmals in verdünnter Salzsäure aufgenommen und dann im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der Trockenrückstand wurde hierauf mit Wasser aufgenommen, die wässrige Lösung mit verdünntem Ammoniak versetzt und eingedampft. Der Rückstand wurde durch Waschen mit Eiswasser von den entstandenen Ammonsalzen befreit. Die freie Aminosäure wurde nun in heißem Wasser gelöst und durch Behandlung mit Kupfercarbonat das Kupfersalz hergestellt. Die Analyse ergab folgenden Wert:

0,0905 g ergaben 0,0181 g CuO = 15,97% Cu.

Dieser Wert stimmt annähernd auf Phenylalaninkupfer, welches 16,26% Cu verlangt. Der Rest der Aminosäure wurde nochmals aus heißem Wasser umkrystallisiert. Die erhaltene Substanz, deren Menge zu einer Darstellung des Kupfersalzes nicht ausreichte, besaß einen Schmelzpunkt von 276—279°. Reines Phenylalanin schmilzt bei 283°.

Die vorliegende Substanz war hierdurch als Phenylalanin identifiziert.

Der Kolbenrückstand hatte sich während der Destillation größtenteils zersetzt. Er wurde in heißem Wasser aufgenommen und durch Tierkohle möglichst gereinigt. Zur Untersuchung auf einen Gehalt an Asparaginsäure wurde das Filtrat mit wenig festem Baryt versetzt und 6 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die filtrierte, stark alkalische Lösung wurde im Eisschrank aufbewahrt. Selbst nach einigen Tagen

konnten keine krystallinischen Abscheidungen bemerkt werden. Hierauf wurde das in der Lösung vorhandene Baryt entfernt und das Filtrat zwei Stunden mit festem Kupfercarbonat gekocht. In dem erhaltenen Filtrat zeigten sich beim Abkühlen ebenfalls keine krystallinischen Abscheidungen.

Nach 3 Tagen wurde das Filtrat mit Schwefelwasserstoff gesättigt, das abgeschiedene Kupfersulfid abfiltriert und das Filtrat zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs erwärmt. Zur Untersuchung auf einen Gehalt an Glutaminsäure wurde die Lösung unter Eiskühlung mit getrocknetem Chlorwasserstoff gesättigt. Auch jetzt zeigten sich keine Krystalle.

Die Anwesenheit von Asparaginsäure und Glutaminsäure konnte somit nicht festgestellt werden.

Zusammenfassung.

Das Ergebnis über die qualitative Untersuchung des Caseinabbaus durch Kahlmhefe *J* ist, kurz zusammengefaßt, folgendes*):

Das Casein wird bei saurer Reaktion durch Kahlmhefen bis zu den einfachsten Bausteinen abgebaut.

Der Abbau geht nicht so weit, daß das ganze Eiweißmolekül in die einfachsten Bausteine zerlegt wird, es entstehen vielmehr auch größere Bruchstücke, wie Albumosen, Peptone, Peptide, die nicht weiter zerlegt werden.

Andererseits ist die Kahlmhefe imstande, die Aminosäuren noch weiter zu zerlegen in sekundäre Spaltprodukte von sowohl basischer als auch saurer Natur.

Die einzelnen Aminosäuren zeigen sich beim sekundären Abbau als verschieden leicht angreifbar. Tryptophan, Asparaginsäure und Glutaminsäure konnten mit Sicherheit überhaupt nicht nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, daß sie bei der langen Einwirkungsdauer vollständig in sekundäre Produkte umgewandelt worden sind. Ähnlich leicht angreifbar scheint das Tyrosin zu sein, das im Digestionsgemisch nur noch in geringen Mengen vorhanden zu sein schien. Ob und wie weit die anderen vorhandenen Aminosäuren angegriffen worden waren, konnte nicht festgestellt werden.

Die gebildeten sekundären basischen Spaltprodukte bestanden größtenteils aus Ammoniak. Es war jedoch nicht von der Hand zu weisen, daß auch andere basische Stoffe, dem Geruch nach Alkylamine, gebildet worden waren; jedoch nur in so minimalen Mengen, daß sie der Analyse entgingen.

Von flüchtigen Säuren wurden nachgewiesen Ameisensäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure und Capronsäure; außerdem die nicht

*) Es ist zu berücksichtigen, daß das angewandte Casein Beimengungen von Milchzucker und Fett enthielt.

flüchtige Bernsteinsäure. Die Propionsäure war am stärksten vertreten, die Ameisensäure, Valeriansäure und Capronsäure am schwächsten.

Die Hexonbasen Histidin, Arginin und Lysin konnten mit Sicherheit nachgewiesen werden, ebenso die Aminosäuren Prolin, Leucin, Alanin, Valin und Rhenylalanin. Die Anwesenheit von Tyrosin war wahrscheinlich, Glutaminsäure und Asparaginsäure waren nicht vorhanden.

Literaturverzeichnis.

- ¹⁾ *Henneberg, W.*, Gärungs-bakt.-Praktikum. Verlag Parey, Berlin 1909. — ²⁾ *Will, H.*, Zeitschr. für das gesamte Brauereiwesen **22**. 1899. — ³⁾ *Meißner, R.*, Landwirtschaftl. Jahrb. **30**. 1901. — ⁴⁾ *Lafar, F.*, Handbuch der technischen Mykologie **4**. 1907. — ⁵⁾ *Meißner, R.*, Berichte der Kgl. Württ. Weinbau-Versuchsanstalt Weinsberg 1904, S. 72. — ⁶⁾ *Taylor, A. E.*, Über Eiweißspaltung durch Bakterien. Zeitschr. f. physiol. Chemie **36**. — ⁷⁾ *Grimmer, W.*, Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen. Milchwirtschaftl. Forsch. 1921 u. 1924. — ⁸⁾ *Brasch, W.*, Weitere Untersuchungen über den bakteriellen Abbau der primären Eiweißspaltprodukte. Biochem. Zeitschr. **22**. 1909. — ⁹⁾ *Neuberg, C.*, und *C. Karczag*, Verhalten der d-l-Aminoisovaleriansäure bei der Fäulnis. Biochem. Zeitschr. **18**. — ¹⁰⁾ *Ehrlich, A.*, Zeitschrift des Vereins der deutschen Zuckerindustrie 55. Chem. Ber. **40**. 1907. — ¹¹⁾ *Ackermann, D.*, Zeitschr. f. physiol. Chemie **69**. 1910. — ¹²⁾ *Nawiasky, P.*, Über die Umsetzung von Aminosäuren durch *Bact. proteus vulgaris*. Arch. f. Hyg. **66**. 1908. — ¹³⁾ *Neuberg, C.*, und *C. Cappezzuoli*, Biochemische Umwandlung von Asparagin in Propionsäure. Biochem. Zeitschr. **18**. 1909. — ¹⁴⁾ *Abderhalden, E.*, und *A. Fodor*, Versuche über die bei der Fäulnis von Asparaginsäure entstehenden Abbaustufen. Zeitschr. f. physiol. Chemie **85**. 1913. — ¹⁵⁾ *Effront, J.*, Über die Gärung der Aminosäuren. Moniteur scient. (4), 23. I. 1909. — ¹⁶⁾ *Bopp, F.*, Einiges über Albumin, Casein und Fibrin. Liebigs Ann. d. Chem. **69**. 1849. — ¹⁷⁾ *Neuberg, C.*, und *Arinstein*, Biochem. Zeitschr. **117**. 1921. — ¹⁸⁾ *Nencki, M.*, Über die Zersetzung der Gelatine und des Eiweißes bei der Fäulnis. Bern 1876. — ¹⁹⁾ *Neuberg, C.*, und *E. Rosenberg*, Über die bei der Eiweißfäulnis auftretenden Fettsäuren. Biochem. Zeitschr. **7**. — ²⁰⁾ *Ackermann, D.*, Über die Entstehung der Fäulnisbasen. Zeitschr. f. physiol. Chemie **60**. — ²¹⁾ *Emmerling, O.*, Die Zersetzung von Fibrin durch Streptokokken. Chem. Ber. **30**. 1897. — ²²⁾ *Ssadikow, W. S.*, Biolytische Spaltung des Glutins. Biochem. Zeitschr. **41**. 1912. — ²³⁾ *Malenchini, V.*, Über Ptomaine im Käse. Zeitschr. f. Nahrungsm.-Untersuch. u. Hyg. **7**. 1892. — ²⁴⁾ *Emmerling, O.*, und *O. Reisser*, Zur Kenntnis eiweißspaltender Bakterien. Chem. Ber. **35**. 1902. — ²⁵⁾ *Hirsch, P.*, Die Einwirkung von Mikroorganismen auf die Eiweißkörper. Berlin 1918. — ²⁶⁾ *Kossel und Kutscher*, Zeitschr. f. physiol. Chemie **31**. 1900.