

Schiesslich sage ich den HH. Burkhardt und Schraube, welche mich bei dieser Untersuchung auf's eifrigste unterstützt haben, meinen besten Dank.

München, den 8. August 1876.

329. Moritz Traube: Ueber reine Alkoholhefe.

Wie Pasteur nachgewiesen hat¹⁾, rühren die Krankheiten des Biers von mikroskopischen Organismen her, die nicht, wie die Hefe, alkoholische Gährung, sondern Bildung von Milchsäure, Essigsäure etc. veranlassen, und der gewöhnlichen zur Bierbereitung benutzten Hefe beigemischt sind. Es ist ihm durch ein bis jetzt noch nicht veröffentlichtes Verfahren gelungen, eine ganz reine Hefe, frei von jeder Beimischung von Krankheitskeimen, darzustellen, und während man ein einigermaßen haltbares Bier bis jetzt nur nach der bairischen Braumethode durch Anwendung künstlich erzeugter niederer Temperatur erzielen konnte, zeigte er, dass man denselben Zweck ohne kostspielige Vorrichtungen auch bei gewöhnlicher Temperatur durch Benutzung reiner Hefe noch sicherer erreichen könne.

Man wird nicht verkennen, dass eine richtige Gährmethode — abgesehen vom wissenschaftlichen Interesse — eine hervorragend technische, ja fast national-ökonomische Bedeutung hat, vorzugsweis auch für Deutschland, wo die Bierbrauerei und Branntweimbrennerei mit zu den verbreitetsten und wichtigsten Gewerben zählen. Erfahrene Technologen behaupten, dass z. B. die Branntweimbrennerei nur $\frac{1}{4}$ des Alkohols erzielt, den sie aus den Kartoffeln ihrem Stärkegehalt nach gewinnen müsste, und der Verlust ist hauptsächlich eine Folge der mitlaufenden Milchsäuregährung.

Es ist mir nun ebenfalls gelungen, ganz reine Hefe darzustellen, nach einer sehr einfachen Methode, die sich von der Pasteur's unterscheiden dürfte, da er seinen Andeutungen zufolge (Comptes rend. 77, 1143) das verschiedene Verhalten der Hefe und des Krankheitskeime gegen Sauerstoff zur Beseitigung der letzteren benutzt hat.

Zur Darstellung reiner Hefe die Anwendung von Alkohol zu versuchen, wurde ich durch gelegentliche frühere Beobachtungen veranlasst, die es mir wahrscheinlich machten, dass Alkohol ein Gift für die organisirten Fäulnissfermente, nicht aber, wenigstens nicht in demselben Maasse, für die Hefe sei. Gleich die ersten darüber angestellten Versuche gaben den erwarteten Erfolg. Zum besseren Verständniss

¹⁾ Compt. rend. 77, 1140.

derselben dürfte es jedoch zweckmässig sein, einige Thatsachen bezüglich der Ernährung der Hefe und der Bacterien vorauszuschicken.

Pasteur hat eine vorzügliche Nährlösung für Hefe angegeben, bestehend aus der filtrirten Abkochung von 40 Grm. Bierhefe in 200 CC. Wasser, der man 100 Grm. Kandiszucker und Wasser bis zum Volum von 1 Liter zufügt.

Eine Spur gewöhnlicher Bierhefe, in diese Lösung eingeführt, vermehrt sich mit Leichtigkeit und die alkoholische Gärung des Zuckers ist eine meist fast vollständige und durch Bildung von Krankheitsfermenten wenig gestörte. Vermindert man jedoch das Verhältniss des Zuckers zum Hefeabsud, so hat die Nährlösung, wie ich gefunden habe, ganz andere Eigenschaften. Bringt man in eine Mischung, die auf 200 CC. Hefeabsud nur 20 Grm. Zucker oder noch weniger enthält, eine Aussaat von gewöhnlicher obergähriger Bierhefe, so entwickeln sich die Hefezellen schwierig und nur im Anfang, während die beigemengten Bacterien so überhand nehmen, dass die Lösung in wenigen Tagen intensive Fäulniss zeigt. Ueberwiegender Zuckergehalt der Nährlösung begünstigt demnach die Entwicklung der Hefe, relativer Reichthum an Eiweissstoffen (Hefeabsud) die Vermehrung der Bacterien und gerade Nährlösungen der letzteren Art wurden zu den nachstehenden Versuchen genommen, da sie vorzugsweis geeignet waren, die vorausgesetzte giftige Wirkung des Alkohols auf die Entwicklung der Bacterien deutlich hervortreten zu lassen.

Am 23. December 1875 wurden nachstehende drei Parallelversuche in Gang gesetzt:

Versuch 1. Ein Glaskölbchen wurde mit
 20 CC. Hefeabsud,
 10 CC. einer 20pCt. Kandis-Zuckerlösung,
 0,5 CC. 90pCt. Alkohol (von 0.838 spec. Gewicht bei 12½° C.)
 beschickt. Die Lösung enthielt sonach 1.5 pCt. absoluten Alkohols. Zuletzt wurde eine Spur frischobergährige Bierhefe eingeführt. Man hielt es nicht für nöthig, die Lösung vorher zu kochen, da man ja voraussetzte, dass die Vermehrung der Bacterienkeime von dem Alkohol würde gehindert werden.

Versuch 2 wurde genau in derselben Weise angestellt, wie der vorangehende, nur mit dem einzigen Unterschiede, dass die Menge des zugesetzten 90pCt. Alkohols 1 CC., d. h. 2.8 pCt. absoluten Alkohols betrug.

Versuch 3 ebenfalls in gleicher Weise angestellt, aber mit Zusatz von 2 CC. Alkohol (= 5.6 abs. Alk.)

Ferner wurden am nächsten Tage nachstehende vier Parallelversuche (Versuche 4—7) mit einer noch zuckerärmeren Lösung in Gang gebracht und der Inhalt der Kölbchen vor Zusatz des Alkohols und der Hefe gekocht.

Versuch 4. Ein Kölbchen wurde beschickt mit

- 20 CC. Hefeabsud,
- 7 CC. Wasser,
- 3 CC. 20procent. Zuckerlösung,
- 0.5 CC. 90procent. Alkohol,

so dass der Alkoholgehalt der Lösung 1.5 pCt. betrug. In die Mischung wurde eine Spur Hefe eingeführt.

Versuch 5 genau wie der vorige, aber mit 2 CC. Alkohol (= 5.6 pCt.)

Versuch 6 genau wie der vorige, aber mit 3 CC. Alkohol (= 8.2 pCt.).

Versuch 7 genau wie der vorige, aber ohne Zusatz von Alkohol. Die Experimente zeigten folgenden Verlauf:

Versuch 7, ohne Alkoholzusatz, ging am raschesten in Fäulniss über unter intensiver Vermehrung der Bacterien; Versuch 1 und 4 mit 1.5 pCt. Alkohol etwas später. Versuch 2 mit 2.8 pCt. Alkohol zeigte nach drei Tagen eine reichliche Vermehrung am Boden lagerner Hefezellen, während die überstehende Lösung nur äusserst schwach durch Bacterien getrübt war, die sich indessen in den darauf folgenden Tagen bis zur intensiven Trübung der Lösung vermehrten.

In Versuch 3 und 5 mit 5.6 pCt. und Versuch 6 mit 8.2 pCt. Alkohol schied sich eine reine, von allen anderen mikroskopischen Organismen freie Hefe aus, und zwar sehr langsam, am langsamsten in Versuch 6 mit dem stärksten Alkoholgehalt, wo eine deutlich sichtbare Hefevermehrung erst am sechsten Tage eintrat. Die in diesen drei Versuchen gebildete Hefe lag vollständig am Boden, und setzte sich, durch Umschütteln aufgerührt, sehr bald wieder ab. Die überstehende Lösung blieb Monate lang ganz klar und zeigte keine mikroskopischen Organismen.¹⁾

Das Ergebniss dieser Versuche lässt sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1) Die Entwicklung der Bacterien, auch aller übrigen Krankheitsfermente, sogar des *Mycoderma vini*, wird in Nährlösungen schon durch geringe Mengen (2.8 pCt.) Alkohol erheblich verzögert, durch grössere Mengen von 5.6 pCt. und darüber völlig unterdrückt.

2) Auch die Entwicklung der Hefe wird durch Zusatz

¹⁾ Bilden sich in einer Lösung Bacterien, so ist dieselbe immer mehr oder weniger getrübt, da diese leicht beweglichen Organismen lange Zeit suspendirt bleiben und sich erst nach eingetretener Bewegungslosigkeit absetzen. Die sich vermehrende Hefe dagegen bleibt bei Anwesenheit geringer Zuckermengen und damit verknüpfter Geringfügigkeit der Kohlensäureentwicklung am Boden liegen, ohne die überstehende Lösung zu trüben. Man kann demnach meist schon ohne Mikroskop sofort erkennen, ob sich in einer Flüssigkeit Hefe oder Bacterien bilden.

von Alkohol verlangsamt, findet aber selbst noch in Lösungen statt, die 8.2 pCt. Alkohol enthalten.

3) Demnach entwickelt sich in geeigneten Nährlösungen, die 5.6 bis 8.2 pCt. Alkohol enthalten (die Grenze des Minimums und Maximums wurde nicht genau ermittelt) reine Hefe. Es scheint, wie Versuch 3 ergibt, zur Erlangung solcher Hefe nicht einmal nöthig, die genügend alkoholhaltige Nährlösung vor dem Zusatz der Hefeaussaat durch Kochen von Bacterienkeimen zu befreien.

Es ist nun klar, dass, wenn man erst eine kleine Menge bacterienfreier Hefe nach dem oben ermittelten Verfahren gezüchtet hat, man beliebige Quantitäten derselben durch Aussaat in vorher gekochte Nährlösungen auch ohne weitere Anwendung von Alkohol gewinnen kann. Die weitere Cultur muss dann ohne Alkohol sogar in sehr eiweissreichen Nährlösungen gelingen, die sonst vorzugsweise zur Bacterienentwicklung geneigt sind, und das Gelingen der Cultur in solchen eiweissreichen Lösungen ist der beste Beweis dafür, dass die angewandte Hefeaussaat auch in der That völlig frei von Bacterien war, wie dies aus folgendem Versuch hervorgeht.

Versuch 8. 31, December 1875.

Spuren der bacterienfreien Hefe aus Versuch 5 wurden in zwei Kölbchen eingeführt, die je 20 CC. Hefeabsud, 7 CC. Wasser und 3 CC. 20procentiger Zuckerlösung enthielten. Vor der Aussaat waren die Lösungen selbstverständlich durch Kochen von mikroskopischen Keimen befreit worden. Hier hatte sich weit rascher, als bei Anwesenheit von Alkohol, schon in vier Tagen. eine sehr bedeutende Hefemenge, fast so viel, als sich überhaupt aus den Nährstoffen bilden konnte, abgesetzt, von solcher Reinheit, dass man mit dem Mikroskop keine Beimengung irgend eines anderen Organismus entdecken konnte, während die überstehende Lösung klar blieb und weder Bacterien noch sonst etwas Organisirtes enthielt.

Ein ebenso schlagendes, auch noch in anderer Beziehung wichtiges Ergebniss lieferte

Versuch 9. 31. December 1875.

In zwei Kölbchen mit je 20 CC. reinem, vorher gekochtem Hefeabsud ohne Zucker wurde dieselbe reine Hefe aus Versuch 5 ausgesät. Die Lösung, die durch gewöhnliche unreine Hefe bald in Fäulniss gerathen sein und Bacterien erzeugt haben würde, blieb wochenlang frei davon — der schärfste Beweis, dass die Hefeaussaat nicht die geringste Beimengung von Fäulniskeimen enthalten hatte.

Dagegen entwickelte sich auch hier am Boden des Kölbchens eine nicht unbeträchtliche Menge der reinsten Hefe, allerdings viel weniger, als in Versuch 8 bei Anwesenheit von

Zucker, aber in 8 Tagen doch soviel, dass die Flüssigkeit durch Aufrühren des Hefeniederschlages undurchsichtig trübe wurde.

Da der Hefeabsud, wie Erhitzen mit alkalischer Kupferoxyd- oder Indiglösung zeigte, keinen Traubenzucker enthält, so hat durch diesen Versuch die von mir aus früheren Beobachtungen¹⁾ gezogene Behauptung eine neue Bestätigung erhalten, dass die Hefe sich auch von blossen Eiweissstoffen ernähren könne.

In den meisten der angeführten Versuche wurden die Gährkölbchen nach der Methode von Fitz [diese Ber. VIII, S. 1540] durch über die Mündung gelegte, aus vierfachem Filtrirpapier hergestellte Kapseln geschlossen, was vollkommen genügte, die dann zum Kochen erhitzten Flüssigkeiten Monate hindurch vor dem Zutritt der atmosphärischen Keime zu schützen.

Vorstehende Versuche wurden im December 1875 angestellt bei einer Zimmer-Temperatur von ungefähr 12—15⁰ C. Durch einige nachträgliche Versuche im Laufe dieses Sommers habe ich gefunden, dass bei der Züchtung der Hefe in alkoholhaltigen Nährlösungen wahrscheinlich auch die Temperatur von Bedeutung ist. Bei Sommerwärme (ca. 25⁰ im Zimmer) wurde selbst bei Zusatz von 10.6 pCt. Alkohol zu den Nährlösungen keine absolut reine Hefe erzielt, da dann neben der Hefe noch bacterienartige Gebilde zur Entwicklung gelangen.²⁾

Hat man erst durch Aussaat frischer obergähriger Bierhefe in Nährlösungen von 5.6 bis circa 11 pCt. Alkoholgehalt bei niederer Temperatur [ca. 12—15⁰ C.] ganz reine Hefe erzielt, so wird durch weitere Aussaat derselben in alkoholfreien Nährlösungen selbst bei 35⁰ C. vollkommen reine Hefe gezüchtet.

Mikroskopisch lässt sich die Reinheit einer Hefe schwer feststellen, insofern man einen sehr geringen Inhalt an anderen Organismen leicht übersehen kann. Desto sicherer ist, wie bereits erwähnt, die Prüfung durch Aussaat in eiweissreichen, aber zuckerarmen Nährlösungen oder in reiner Hefeabkochung, bei Anwendung erhöhter Temperatur von ca. 30⁰ C. Ist die Hefe nicht rein, so wird die Lösung

¹⁾ Diese Berichte VII, S. 882.

²⁾ Ich muss es indess, an der Fortsetzung der Versuche verhindert, vorläufig dahin gestellt sein lassen, ob das Missglücken der Versuche im Sommer der höheren Temperatur, oder einem anderen Umstände zuzuschreiben ist. Zu den Versuchen im Sommer war nicht, wie im Winter, frische obergährige Bierhefe, sondern Presshefe als Aussaat verwandt worden, die bekanntlich mit Kartoffelstärke vermischt ist und dadurch möglicherweise eine Beimengung von einer Art Bacterien erhalten hat, die sich auch bei starkem Alkoholgehalt der Nährlösung vermehren.

bald trübe und wimmelt innerhalb vierundzwanzig Stunden von anderen Organismen.

Im entgegengesetzten Falle bleiben die Nährlösungen ungetrübt von Bacterien, frei von Schimmelbildungen oder *Mycoderma vini* und zuletzt erhält man eine klare Flüssigkeit, aus der sich eine Schicht reiner Hefe am Boden abgelagert hat.

In seiner jüngsten Arbeit „über Gährung“ [Landwirthschaftliche Jahrbücher 1876, S. 281] hat Brefeld die Richtigkeit meiner von ihm früher angefochtenen Behauptungen, wenn auch nur indirect, im Allgemeinen anerkannt, und bestreitet nur noch den von mir aufgestellten Satz, dass die Hefe sich von Eiweissstoffen allein [ohne Zucker] nähren könne, der indess in dem oben mitgetheilten Experiment 9 [Wachsthum der Hefe in zuckerfreier Hefeabkochung] eine wesentliche Stütze findet. Ob freilich diese Vermehrung in zuckerfreien Lösungen auch ohne Sauerstoff stattfinden könne — dieses in mehrfacher Beziehung entscheidende Experimente anzustellen, habe ich bis jetzt nicht ermöglichen können.

Erfreulich war es mir, dass Brefeld nunmehr auch meine chemische Theorie¹⁾ annehmbar findet, die die Wirkung der Hefe auf ihre Fähigkeit, gleichzeitig reduciren und oxydiren zu können, zurückführt — eine Fähigkeit, die, wie ich gezeigt habe, auch todte chemische Stoffe in ähnlicher Weise besitzen.

Hrn. Pasteur, der die ihm von mir gemachten Einwürfe für widerlegt erklärt [Comptes rend. 1875, S. 452 und 1876, S. 1078], bitte ich, mit diesem Urtheil noch zurückzuhalten. Es ist nicht ganz meine Schuld, dass ich bisher die Versuche, die ich für entscheidend halte, noch nicht angestellt habe. Sollten dieselben, wider mein Vermuthen, für seine Anschauungsweise sprechen, so werde ich nicht zögern, dies unumwunden anzuerkennen. — Das verstünde sich bei Jedem von selbst, der das Interesse der Wissenschaft im Auge hat, wäre überdies auch unaufschiebbare Pflicht einem Manne gegenüber, dessen bahnbrechende Leistungen in ihrer verdienten Anerkennung durch Rechthaberei nicht beeinträchtigt werden dürften.

Vorläufig halte ich indess das jüngste Experiment Pasteur's für nicht ganz unantastbar. Unter Anderem kann, wie bereits Ad. Meyer²⁾ hervorgehoben hat [Landw. Jahrb. S. 977], der Glashahn an

¹⁾ Moritz Traube, Theorie der Fermentwirkungen. Berlin, 1858. Ferd. Dümmler.

²⁾ Meyer macht mir an derselben Stelle den Vorwurf, ich hätte in meinen Versuchen einen Kautschukverschluss, der ebenfalls Diffusion zulässt, gebraucht. Das war jedoch nur in den Versuchen 3 und 4 [diese Ber., S. 876], die ich deshalb nach dieser Richtung hin selbst nicht für beweiskräftig erklärte, der Fall, nicht aber in den Versuchen 6 und 7 und ebensowenig in den laut Anm. S. 880 angestellten, in welchen die mit der sauerstoffgasfreien Nährlösung gefüllten Kolben mit der Mündung tief in Quecksilber tauchten.

dem Apparat zwischen dem Gährungsballon und der Atmosphäre eine Gasdiffusion zugelassen haben, die bei der langen Dauer des Versuchs [unzweifelhaft mehrere Wochen] wohl in's Gewicht fallen mochte.

Bekanntlich entdeckte Doebereiner die Gasdiffusion zufällig dadurch, dass er den Wasserspiegel in einer mit Wasserstoff gefüllten, gesprungenen Glocke steigen sah. Der kreisförmige Spalt aber, den der Hahn mit der Bohrung bildet, ist bezüglich der Gasdiffusion wenig Anderes, als ein Riss im Glase.

Breslau, 13. Juli 1876.

330. R. Gnehm: Aurantia, ein neuer künstlicher Farbstoff.

(Eingegangen am 10. August.)

Seit einiger Zeit wird von der Berliner Actien-Gesellschaft für Anilinfarbenfabrikation unter dem Namen „Aurantia“ eine Substanz in den Handel gebracht, welche sich durch die Eigenschaft, Seide und Wolle prachtvoll orange zu färben, auszeichnet. Von verschiedenen Seiten, namentlich von Hrn. Nölting in Lyon und Hru. O. Meister in Thalweil, auf die Aehnlichkeit dieser Substanz mit einem von mir beschriebenen Körper aufmerksam gemacht, habe ich mich bemüht, die Zusammensetzung dieses Farbstoffes festzustellen.

Obgleich die Menge des mir zur Verfügung stehenden Materials zu gering war, als dass damit eine eingehende Untersuchung hätte vorgenommen werden können, so gelang es namentlich durch mir von Hrn. Nölting gütigst gemachten Mittheilungen doch, den Körper zu identificiren.

Das Handelsprodukt bildet ein ziegelrothes Pulver und löst sich in Wasser auf; durch Umkrystallisiren erhält man rothbraune Krystalle, das Ammoniaksalz einer bei 238° unter Zersetzung schmelzenden Säure, welche nach allen Eigenschaften zweifellos mit dem von mir in diesen Berichten¹⁾ beschriebenen Dipicrylamin (Hexanitrodiphenylamin) identisch ist. Der färbende Bestandtheil der Handelswaare ist somit das von mir ebenfalls beschriebene Ammoniaksalz des Hexanitrodiphenylamins.

Die färbenden Eigenschaften des Hexanitrodiphenylamins und seiner Salze, welche mir schon länger bekannt sind, veranlassten mich, in der bekannten Anilinfarbenfabrik von Bindschedler und Busch in Basel, Versuche im Grossen zur Bereitung von Orangefarbstoffen vorzunehmen. Schon im Spätjahr 1874 wurde das Ammoniumhexa-

¹⁾ Diese Berichte, VII, 1399. Irrthümlicher Weise ist hier der Schmelzpunkt zu 233° — 234° angegeben, während er später bei 238° gefunden wurde.