



C10021
27700

P1012
4359

Bibliotheek TU Delft
P 1012 4359



C 212770

ONDERZOEKINGEN OVER HET GISTGESLACHT
BRETTANOMYCES

ONDERZOEKINGEN OVER HET GISTGESLACHT *BRETTANOMYCES*

PROEFSCHRIFT, TER VERKRIJGING
VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN
DE TECHNISCHE WETENSCHAP AAN
DE TECHNISCHE HOOGESCHOOL TE
DELFT, KRACHTENS ARTIKEL 2 VAN
HET KONINKLIJK BESLUIT VAN 16
SEPTEMBER 1927, STAATSBLAD No.
310 EN OP GEZAG VAN DEN RECTOR
MAGNIFICUS DR. J. A. VERAART,
HOOGLEERAAR IN DE AFDEELING
DER ALGEMEENE WETENSCHAPPEN,
VOOR EEN COMMISSIE UIT DEN SE-
NAAT TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG
3 MEI 1940, DES NAMIDDAGS
TE 4 UUR, DOOR

MATHIEU THEODOOR JOZEF CUSTERS

GEBOREN TE SWALMEN

NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP W. D. MEINEMA, HIPPOLYTUSBUURT 4
DELFT



DIT PROEFSCHRIFT IS GOEDGEKEURD DOOR DEN PROMOTOR
PROF. DR. IR. A. J. KLUYVER.

AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN OUDERS.
AAN MIJN AANSTAANDE VROUW.

INHOUD.

	Blz.
INLEIDING	11
HOOFDSTUK I.	
Overzicht der vroegere onderzoekingen over de gistsoorten van de „ <i>Brettanomyces</i> ”-groep en omlijning van het ingestelde onderzoek	14
HOOFDSTUK II.	
De in het onderzoek betrokken stammen	22
§ 1. Oriënteerende proefnemingen met de reeds aanwezige stammen	22
§ 2. Isolatie van <i>Brettanomyces</i> -stammen uit Belgische en Engelsche bieren	24
§ 3. Beknopt overzicht van alle onderzochte stammen	28
HOOFDSTUK III.	
De morfologische en physiologische kenmerken der onderzochte stammen	29
§ 1. De bij het systematisch onderzoek van gistsoorten toegepaste kenmerken en de methoden ter vaststelling hiervan	29
§ 2. De zuurvorming op suikerhoudende media als kenmerk ten dienste van de systematiek der gistsoorten	32
§ 3. Overzicht der verkregen resultaten	37
HOOFDSTUK IV.	
De systematische positie der onderzochte stammen	61
§ 1. Inleidende opmerkingen	61
§ 2. Bestaat er reden een afzonderlijk gistgeslacht <i>Brettanomyces</i> te handhaven?	63
§ 3. Diagnose van het geslacht <i>Brettanomyces</i>	69
§ 4. Indeling der onderzochte <i>Brettanomyces</i> -stammen in soorten	70

HOOFDSTUK V.

Blz.

De anaërobe dissimilatie van glucose door <i>Brettanomyces Claussenii</i>	80
§ 1. Oriënteerend onderzoek	80
§ 2. Inrichting der proeven en toegepaste analyse-methoden	82
§ 3. Quantitatieve proeven aangaande de vergisting van glucose	84
§ 4. Waarnemingen aangaande de surplus-alcoholvorming door <i>Brettanomyces Claussenii</i>	93
§ 5. Samenvatting der resultaten	101

HOOFDSTUK VI.

De oxydatieve dissimilatie van glucose door <i>Brettanomyces Claussenii</i>	102
§ 1. Oriënteerend onderzoek	102
§ 2. Inrichting der proefnemingen en toegepaste analyse-methoden	109
§ 3. Quantitatieve proeven aangaande de aërobe dissimilatie van glucose	113
§ 4. Samenvatting der resultaten	122

HOOFDSTUK VII.

Vergelijkend manometrisch onderzoek aangaande de stofwisseling van <i>Brettanomyces Claussenii</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	123
§ 1. Inleiding	123
§ 2. Opmerkingen betreffende de toegepaste methodiek	124
§ 3. Manometrische ademhalingsproeven met aethylalcohol als substraat	126
§ 4. Manometrische ademhalingsproeven met azijnzuur als substraat	139
§ 5. De invloed van zuurstof op de suikervergisting door <i>Brettanomyces Claussenii</i>	147
§ 6. De invloed van de voorgeschiedenis der <i>Brettanomyces</i> -cellen op de stofwisseling	154

HOOFDSTUK VIII.

Blz.

De beteekenis der verrichte waarnemingen voor ons
inzicht in het karakteristieke gedrag der *Brettano-*
myces-gisten 161

§ 1. Analyse van het gedrag der *Brettanomyces*-cultures 161

§ 2. Enkele opmerkingen aangaande de beteekenis van
het waargenomen negatieve PASTEUR-effect 166

SUMMARY 176

INLEIDING.

In de groote continentale brouwerijen is sedert het pionierswerk van EMIL CHRISTIAN HANSEN het gebruik van reïncultuurgist van het ondergist-type vrijwel algemeen. Des te meer trekt het de aandacht, dat zich hiernaast tot op den huidigen dag voor de bereiding van bepaalde biersoorten werkwijzen hebben gehandhaafd, waarbij als axioma is aanvaard, dat slechts de achtereenvolgende werking van een tweetal uiteenlopende gisttypen tot het gewenschte product leidt. Er bestaat aanleiding om te besluiten, dat dit ook thans nog geldt voor het grootste deel der in de Britsche brouwerijen geproduceerde bieren, hoewel hierbij moet worden opgemerkt, dat de Engelsche brouwerijliteratuur dienaangaande slechts spaarzame gegevens bevat. Hieraan kan nog worden toegevoegd, dat ook de Belgische brouwindustrie speciale biertypen kent, zooals de „lambic”, welke voor hun bereiding de medewerking van minstens twee gistsoorten schijnen te vereischen.

Voor de hier bedoelde biersoorten vindt men nu aangegeven, dat de „hoofdgisting” verloopt onder den invloed van een min of meer normale gistsoort van het bovengist-type, terwijl de „nagisting” zou worden bewerkstelligd door gistsoorten van zeer bijzonder karakter.

De eerste onderzoeker, die deze meening duidelijk heeft uitgesproken, is de Deensche brouwerij-microbioloog N. HJELTE CLAUSSEN, die in 1904 tevens reeds een voortreffelijke beschrijving gaf van een door hem uit Engelsch „Stock-beer” geïsoleerde gistsoort, welke hij voor de nagisting van dit bier verantwoordelijk meende te mogen stellen. Het door CLAUSSEN aangaande deze cultuur ingestelde onderzoek leidde hem tot het besluit, dat deze van de normale, tot dien tijd bekende, biergisten merkbaar verschilde en in verband met de herkomst der gist verbond hij daaraan den naam „*Brettanomyces*”¹⁾.

Sedert 1904 zijn nog door den Deenschen microbioloog

¹⁾ In de eerste publicatie van CLAUSSEN luidt de benaming „*Brittanomyces*”; blijkens schriftelijke mededeeling van den auteur is dit aan een drukfout te wijten.

SCHJØNNING en door de Belgische geleerden KUFFERATH en VAN LAER enkele onderzoekingen aan „*Brettanomyces*”-gisten gewijd.

Bij bestudeering der publicaties dezer onderzoekers krijgt men intusschen niet den indruk, dat de door hen verkregen uitkomsten het mogelijk maken een volledig beeld te ontwerpen van deze ongetwijfeld merkwaardige groep van „nagistings”-gisten.

Er scheen dan ook volop aanleiding te bestaan om te trachten onze kennis van deze micro-organismen wat verder te verdiepen. De beschikbare gegevens lieten toch nauwelijks twijfel, of de vertegenwoordigers der „*Brettanomyces*”-groep wijken in hun eigenschappen niet onbelangrijk af van de overgrote meerderheid der overige, zoo talrijke, bekende gistsoorten.

In dit opzicht is aanstonds melding te maken van den in vergelijking tot andere gistsoorten uiterst langzamen groei en de abnormaal geringe houdbaarheid der cultures.

Hierbij komt, dat men *Brettanomyces* algemeen aansprakelijk stelt voor het karakteristieke aroma en den bijzonderen smaak, waardoor zoowel de Engelsche Stock-bieren, zooals „Porter”, „Stout” en „Pale Ale”, als ook het Belgische bier „Lambic” zich kenmerken.

Aan deze gisten worden voorts talrijke andere opmerkelijke eigenschappen toegeschreven, zooals de vorming van een abnormaal hoog alcoholgehalte, de vergisting van maltodextrinen α en β — producten, welke door normale biergisten niet worden aangegrepen — en verder de vorming van een aanmerkelijke hoeveelheid zuur. Een hoog alcoholgehalte en een vrij hoog gehalte aan vluchtige en niet-vluchtige zuren is o. m. kenmerkend voor een biersoort als de lambic.

Om deze redenen was reeds, van algemeen microbiologisch standpunt beschouwd, een nadere studie dier organismen tenvolle gerechtvaardigd en dit te meer, omdat het zich liet aanzien, dat in deze groep uiteenlopende, tot dusver zeer onvoldoende gekarakteriseerde, soorten bestaan.

Tenslotte mag wellicht nog op het volgende worden gewezen. Er zijn verschillende aanwijzingen voorhanden, welke doen besluiten, dat men ook aan het onderzoek der „nagisting” van de met reincultuur-ondergist verkregen biersoorten tot dusver niet die aandacht heeft geschonken, als wel wenschelijk schijnt te zijn.

Men krijgt den indruk, dat algemeen op te losse gronden wordt

aangenomen, dat bij deze met ondergist bereide biersoorten de „nagisting” eveneens uitsluitend onder den invloed der toegevoegde reïncultuurgist verloopt. Tezeer schijnt men hierbij de mogelijkheid te veronachtzamen, dat ook in de „lagervaten” der met ondergist werkende brouwerijen zich ophoopingsprocessen kunnen voltrekken, welke de in deze vaten aanwezige microflora merkbaar doen afwijken van hetgeen men op grond van de gangbare voorstellingen zou verwachten.

Zonder te willen suggereeren, dat ook hierbij gisten van het *Brettanomyces*-type een rol spelen, lijkt toch ieder onderzoek, dat onze kennis der „nagisting”-verwekkers vermeerdert, ook in dit opzicht van belang.

Op grond van al deze overwegingen heb ik mij tot taak gesteld een aantal „*Brettanomyces*”-gisten van verschillende herkomst te isoleeren en hare eigenschappen met die van een aantal van elders verkregen reïncultures te vergelijken. In dit verband moge dadelijk worden opgemerkt, dat mij van den aanvang af een viertal cultures ter beschikking stonden, welke reeds vele jaren tevoren in de verzameling van de Gistafdeeling van het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” waren opgenomen, doch welke in systematisch opzicht nog slechts onvolledig waren bewerkt.

Uiteindelijk is er naar gestreefd, de aan deze cultures verrichte waarnemingen dienstbaar te maken aan een ordening der *Brettanomyces*-groep, alsmede aan het verkrijgen van een inzicht in het karakteristieke gedrag van de tot deze groep behorende soorten.

HOOFDSTUK I.

OVERZICHT DER VROEGERE ONDERZOEKINGEN OVER DE GISTSOORTEN VAN DE „BRETTANOMYCES”- GROEP EN OMLIJNING VAN HET INGESTELDE ONDERZOEK.

Zoals reeds in de Inleiding is vermeld, werd het gebruik van reïncultuurgist als zetgist voor de bierfabricage door EMIL CHRISTIAN HANSEN ingevoerd en wel voor het eerst in 1883 in de „Gamle Carlsberg”-brouwerij te Kopenhagen. Dit systeem vond, al was het na langen strijd, vrijwel algemeen toepassing, althans in die brouwerijen, welke met z.g. ondergisting werken, d. w. z. waar een gist wordt gebruikt, welke zich geleidelijk tijdens het gistingsproces op den bodem van de gistkuip verzamelt.

Het gebruik van reïncultures vond echter weinig ingang in Engeland, waar men zich hoofdzakelijk toelegt op de bereiding van speciale biersoorten, welke door bovengisting worden verkregen.

Terwijl de afwijzende houding der Engelsche brouwers tegenover de toepassing der reïncultuurgist aanvankelijk wellicht alleen aan conservatisme moet worden toegeschreven, is het langzamerhand duidelijk geworden, dat voor deze houding ook meer reële argumenten zijn aan te voeren.

Geleidelijk toch bleek de groote beteekenis, welke de z.g. „secondary fermentation” — aansluitend op de hoofdgisting — voor de karakteristieke eigenschappen van speciale Engelsche bieren heeft, waarbij het waarschijnlijk werd, dat deze „secondary fermentation” onder den invloed van andere gistsoorten dan die, welke de hoofdgisting bewerkten, verliep.

H. VAN LAER ¹⁾ hield zich reeds in 1894 met dit vraagstuk bezig en isoleerde verschillende gisten uit Porter-bier. Hij kreeg hierbij

¹⁾ H. VAN LAER, Transact. of Inst. Brew. 7, 55, 1894.

echter waarschijnlijk alleen wilde gisten van de typen *Pastorianus* en *ellipsoideus* in handen.

In een voordracht, gehouden in een vergadering in de Brewers Hall te Londen, getiteld: „On the method of HANSEN's Pure Yeast-system in the manufacturing of well-conditioned English Stock-Beers” sprak CLAUSSEN ¹⁾ over de moeilijkheid van het gebruik van reïncultures in de Engelsche brouwerijen in verband met de nagisting. Hij gaf hierbij als zijn meening te kennen, dat deze nagisting zou worden bewerkstelligd door een bijzondere gist, welke verschilde van de gist, aansprakelijk voor de hoofdgisting en welke hij als „secundaire gist” aanduidde. CLAUSSEN bewees nader, dat deze gist niet tot het geslacht *Saccharomyces* behoorde, maar een niet-sporevormende gist was, welke hij daarom bij de *Torula*-groep indeelde, ofschoon hij er gelijktijdig den naam *Brettanomyces* aan verbond.

In een tweede verhandeling ²⁾ beschreef CLAUSSEN op welke wijze hij *Brettanomyces* uit „ale” en uit „stout” isoleerde. Hij suspendeerde hiertoe een kleine hoeveelheid van het bezinksel uit de flesschen in gesmolten wortgelatine, liet deze stollen en cultiveerde bij $\pm 20^{\circ}$ C.

Na ± 3 dagen kwamen koloniën op van *Saccharomyces*-soorten en van wilde gisten, welke koloniën goed verder groeiden en vrij groot werden. Na langer cultiveeren kwamen tusschen deze groote heel kleine koloniën op, welke zeer langzaam groeiden en naar verhouding klein bleven. Hieronder bevonden zich echter ook koloniën van bacteriën. Uitgaande van de kleine gistkoloniën, legde hij met behulp van de methode van HANSEN, door uit te gaan van één enkele cel, reïncultures aan. Op deze wijze isoleerde CLAUSSEN verschillende *Brettanomyces*-stammen. Hij constateerde bij één en dezelfde cultuur soms zeer uiteenlopende celvormen, o.a. ronde, ovale, langwerpige en in oudere cultures zelfs typische myceliumvormen. Het gelukte hem niet deze gisten tot vorming van ascosporen te brengen. Door enting in wort, en ook zelfs in met *Saccharomyces*-gisten bereid bier, ontstond een langzaam verloopende gisting. Behalve koolzuur en alcohol werd door deze gisten volgens genoemde onderzoeker belangrijk meer zuur ge-

¹⁾ N. HJELTE CLAUSSEN, J. Inst. Brew. 10, 308, 1904.

²⁾ N. HJELTE CLAUSSEN, Wochenschr. f. Brauerei 22, 194, 1905.

vormd dan door de *Saccharomyces*-soorten. Enkele stammen vormden op wort een huid. Op wortgelatine ontstonden langzaam „Riesenkolonien”, welke na verschillende maanden de gelatine een weinig vervloeiden. CLAUSSEN nam verder een karakteristieke esterreek waar. De gisten groeiden het best bij $\pm 30^{\circ}\text{C}$.

Eenige jaren later verscheen een uitvoerige en belangrijke publicatie van den Deenschen onderzoeker SCHIØNNING¹⁾ over het voorkomen van *Torula* in Engelsche bieren.

SCHIØNNING verdeelt de door bovengisting verkregen Engelsche bieren in 2 groepen nl. de niet gelagerde „running beers” en de gelagerde sterkere „stock beers”. Tot de laatste behooren o.a. „ale” en „stout”, de bieren, welke ook CLAUSSEN voor de isolatie had gebruikt. SCHIØNNING isoleerde eveneens uit deze bieren „*Brettanomyces*” door een gedeelte van het bezinksel der flesschen op platen van wortgelatine af te strijken en gedurende 12 dagen bij 25°C . te cultiveeren. Hij verdeelde de aldus verkregen stammen in 2 groepen, nl. *Torula A* en *Torula B*. De vergisting van wort bij 20°C . was bij beide groepen zeer langzaam; SCHIØNNING vermeldt voor *Torula B* zelfs een gistingduur van een half jaar.

Dit neemt niet weg, dat op den duur zeer hoge eindvergistingsgraden werden bereikt. In een wort van $13,8^{\circ}$ Balling, waaraan 10% saccharose was toegevoegd, werd niet minder dan 10 gewichtspercent alcohol gevormd.

Torula A vertoonde meest onregelmatige celvormen, o.a. den ellipsoïden vorm en verder lange, worstvormige cellen en zelfs mycelium. Hij vermeldt voorts, dat een gedeelte der cellen aan het einde waren toegespitst. In wortcultures werd op den duur een dikke kaamhuid gevormd.

Torula B had een meer slanken en meer regelmatigen celvorm, de cellen waren meest worstvormig, ofschoon ellipsoïde cellen eveneens voorkwamen. Zeldzamer werden ook langgerekte cellen, en soms zelfs myceliumvorming, waargenomen. De gisten van deze groep vormden na lang staan in wort of bier een ring en soms een heel dunne huid.

Bij beide groepen werd nooit sporevorming waargenomen en gelatine werd na lang staan vervloeid. De optimum-temperatuur lag tusschen 30° en 35°C . Door cultiveeren der stammen in bier werd

¹⁾ H. SCHIØNNING, Compt. rend. Lab. Carlsberg 7, 138, 1907—1909.

de zuurgraad verhoogd. De cultures in wort waren in vergelijking tot die van gewone cultuurgisten in hetzelfde medium niet lang houdbaar. SCHIØNNING veronderstelde, dat dit een gevolg was van zuurvorming tijdens de gisting. Door toevoegen van calciumcarbonaat aan de wortcultures kon hij dan ook den levensduur dezer cultures verlengen.

De stammen van beide typen vergistten even goed glucose en fructose, terwijl maltose en saccharose door de stammen van *Torula B* langzamer werden vergist dan door die van *Torula A*. Door de stammen van *Torula B* werd bovendien lactose vergist.

SCHIØNNING heeft talrijke stammen uit Engelsche bieren geïsoleerd en toonde deze gisten ook in Deensche, Zweedsche en Amerikaansche bieren aan.

Zoals reeds in de Inleiding werd vermeld, wordt „*Brettanomyces*” ook aangetroffen in „lambic”, een speciaal Brusselsch bier. Van de artikelen, welke over „lambic” verschenen, zijn in verband met *Brettanomyces* alleen eenige publicaties van KUFFERATH en van VAN LAER van belang.

KUFFERATH isoleerde uit „lambic” talrijke gisten en bacteriën. In een voorloopige publicatie ¹⁾ geeft hij slechts een opsomming van de verschillende organismen en vermeldt hierbij, dat hij onder de verkregen giststammen vijf soorten kon onderscheiden.

Door een nader onderzoek, in samenwerking met VAN LAER ²⁾ verricht, kwam vast te staan, dat twee dezer soorten een vrij groote overeenkomst vertoonden met de *Brettanomyces*-gisten van CLAUSSEN. Deze beide soorten werden op het gistingsvermogen t. o. v. verschillende suikers onderzocht. Glucose, fructose en maltose werden vergist, saccharose en lactose niet. Deze proeven geven echter geen definitief uitsluitsel omtrent het gistingsvermogen dezer soorten, daar de suikers in een mineraal medium waren opgelost en genoemde onderzoekers zelf vermelden, dat saccharose door één der stammen in gistwater wel werd vergist.

In bierwort werd onder aërobe voorwaarden een vrij aanmerkelijke hoeveelheid zuur gevormd, hetwelk in hoofdzaak vluchtig zuur bleek te zijn. Door toevoeging van asparagine aan het bierwort kon de hoeveelheid gevormd niet-vluchtig zuur sterk worden vergroot.

¹⁾ H. KUFFERATH, C. R. Soc. Biolog. Belge 1920, p. 185.

²⁾ H. KUFFERATH et MARC H. VAN LAER, Bull. Soc. Chim. Belgique 30, 270, 1921.

Het voornaamste verschil der beide soorten was het uiterlijk op moutagar: de cultures der eerste soort waren vochtig en glanzend, die der tweede soort droog, op kaamgisticultures gelijkend. KUFFERATH en VAN LAER hebben deze twee soorten respectievelijk *Brettanomyces bruxellensis* en *Brettanomyces lambicus* genoemd.

In een latere verhandeling ¹⁾ wijst KUFFERATH er in de eerste plaats op, dat „lambic” gekenmerkt is door een hoog alcoholgehalte, een bijzonder aroma en een aanzienlijk gehalte aan vluchtige en niet-vluchtige zuren.

Hij geeft voorts een meer nauwkeurige beschrijving van de organismen, welke hij eerder uit „lambic” had geïsoleerd en van de door hem daarbij toegepaste methodiek. Door afstrijken van het bezinksel der flesschen op moutgelatine verkreeg hij gewone cultuurgist, wel- en niet-sporevormende kaamgisten en verder verschillende zuurvormende bacteriën, coccen en staafjes, waaronder het organisme, reeds door H. VAN LAER ²⁾ in 1900 beschreven als *Bacillus viscosus bruxellensis*. Deze bacterie, welke in „lambic” vrij geregeld schijnt te worden aangetroffen, kan hierin onder bepaalde voorwaarden een ziekte, gewoonlijk aangeduid als „à double face”, veroorzaken; het bier wordt hierbij visceus.

Eerst door voortgezette cultuur in aangezuurde wort-media, ten deele bij hogere temperatuur, slaagde KUFFERATH er in de secundaire gisten op te hoopen, waarna hij de hierboven reeds genoemde soorten *Brettanomyces bruxellensis* en *Brettanomyces lambicus* op moutagar kon isoleeren, een werkwijze, welke veelal een tijdsduur van 3 à 4 maanden vereischte. Deze gisten vertoonden de specifieke langzame gisting met het karakteristieke bouquet. De eerste soort is volgens KUFFERATH de meest voorkomende.

De optimum-temperatuur van beide soorten lag tusschen 30° en 33° C.

Volgens KUFFERATH zouden de in *Brettanomyces*-cultures aangetroffen vluchtige zuren, evenals de bouquetstoffen, alleen onder aërobe voorwaarden worden gevormd. De gistingen onder anaërobe voorwaarden waren gekenmerkt door een hoog alcoholgehalte. De vorming van het in de lambic aanwezige melkzuur werd toegeschreven aan de reeds genoemde bacterie *Bacillus viscosus bruxellensis*.

¹⁾ H. KUFFERATH, Ann. Soc. Zymologie pure et appl. 1, 7, 1926.

²⁾ H. VAN LAER, Ann. Inst. Pasteur 14, 82, 1900.

Ook KUFFERATH constateerde, dat de cultures der geïsoleerde *Brettanomyces*-stammen slecht houdbaar waren, ze dienden elke maand te worden overgeënt. Een dergelijke levensduur moet voor gistcultures als uitermate kort worden beschouwd.

M. H. VAN LAER ¹⁾ maakt in zijn verhandeling getiteld: „La fermentation des Lambics” ook melding van een sterke zuurvorming door *Brettanomyces*-gisten in bierwort. In tegenstelling tot de zienswijze van KUFFERATH, spreekt VAN LAER de meening uit, dat het gevormde zuur een mengsel van vluchtige en niet-vluchtige zuren is. Na zes maanden bedroeg het zuurgehalte 13,5 gram per liter, uitgedrukt als melkzuur.

Zoals uit deze korte bespreking blijkt, hebben alle genoemde onderzoekers *Brettanomyces*-gisten geïsoleerd uit Engelsche en Belgische bieren. In aansluiting hierop moeten we nog melding maken van een publicatie, waarin een niet uit bier geïsoleerde gist wordt beschreven, welke volgens de auteurs veel overeenkomst vertoonde met „*Brettanomyces*”.

KRUMBHOLZ en TAUSCHANOFF ²⁾ isoleerden nl. uit een spontaan in gisting geraakten Franschen druivenmost een gist, welke volgens deze onderzoekers moest worden ondergebracht in het door WILL in 1916 opgestelde geslacht *Mycotorula*. Sporevorming werd niet waargenomen en in oudere cultures trad pseudomyceliumvorming op. De suikers glucose, fructose, mannose, saccharose, maltose, galactose en lactose werden alle vergist. De onderzoekers constateerden in druivenmost een vrij belangrijke zuurvorming. Ze hebben voor deze gist den naam *Mycotorula intermedia* voorgesteld.

Uit de hierboven vermelde onderzoekingen over de gistsoorten van de *Brettanomyces*-groep komen eenige punten naar voren, welke bij mijn eigen onderzoek speciaal de aandacht hadden en waarop hier met enkele woorden nader zal worden ingegaan.

Men krijgt den indruk, dat de gisten, welke door genoemde onderzoekers uit de verschillende biersoorten werden geïsoleerd, een aantal kenmerken bezitten, welke men bij de overige bekende gistsoorten niet aantreft.

¹⁾ M. H. VAN LAER, Ann. Soc. Zymologie pure et appl. 1, 200, 1926.

²⁾ G. KRUMBHOLZ und W. TAUSCHANOFF, Zentralbl. f. Bakt. II, 88, 366, 1933.

Het is daarom opmerkelijk, dat de schrijvers bijna uitsluitend den nadruk leggen op de beteekenis van deze gisten voor practische doeleinden en weinig blijk geven te beseffen, dat deze organismen, van algemeen wetenschappelijk standpunt bezien, een zeer bijzondere plaats innemen in het uitgebreide rijk der gistsoorten.

Als eerste, op den voorgrond tredende eigenschap is in dit verband te noemen de belangrijke mate van zuurvorming, welke door alle onderzoekers werd geconstateerd bij cultiveeren van deze gisten in wort of in bier. Terwijl KUFFERATH en VAN LAER vermelden, dat het hierbij gevormde zuur in hoofdzaak vluchtig zuur is, wordt later door VAN LAER gezegd, dat het in bierwort door *Brettanomyces*-gisten gevormde zuur een mengsel is van vluchtige en niet-vluchtige zuren. Hij hecht blijkbaar aan de vorming dezer laatste zuren zooveel beteekenis, dat hij er toe overgaat het gehalte aan zuur der uitgegiste cultuurmedia in grammen melkzuur per liter uit te drukken. De overige schrijvers laten zich aangaande den aard van het gevormde zuur in het geheel niet uit.

Hier en daar vindt men verder, min of meer terloops, melding gemaakt van eigenaardige vormen van een deel der cellen. Maar vóór alles trekt de aandacht de uiterst langzame groei en gisting in wort, welke eigenschap gepaard gaat met de vorming van een karakteristiek bouquet. De geringe houdbaarheid der cultures, zoowel in vloeibare als op vaste media, is voorts vermeldenswaard.

Onze onvolledige kennis van de gisten dezer groep komt eveneens scherp tot uiting in de verwarde wijze van aanduiding van deze gisten. Zoowel de namen *Torula* als *Brettanomyces* worden als geslachtsnamen gebruikt, waarbij echter reeds dadelijk moet worden opgemerkt, dat een omschrijving van het geslacht *Brettanomyces* nimmer werd gegeven.

Uit deze korte beschouwing blijkt afdoende, dat, teneinde een scherpe voorstelling van deze merkwaardige groep van gisten te verkrijgen, verschillende punten om een nadere opheldering vragen.

Ik heb mij bij mijn onderzoek in de eerste plaats de vraag voorgelegd, of deze gisten inderdaad een min of meer zelfstandige natuurlijke groep vormen en zoo ja, waar deze groep in het systeem der gistsoorten moet worden ondergebracht. Een en ander bracht de noodzakelijkheid mede van een systematische studie

van de morphologische en physiologische eigenschappen van een groot aantal stammen van verschillende herkomst.

Voorts werd de in de literatuur regelmatig vermelde en toch in haar beteekenis slecht doorgronde eigenschap der *Brettanomyces*-gisten om in suikerhoudende media belangrijke hoeveelheden zuur te vormen nader onderzocht. Hiertoe werd in cultuurproeven de dissimilatie van glucose door deze gisten onder uiteenlopende voorwaarden bestudeerd en werden in aansluiting hierop stofwisselingsbalansen opgesteld. De hierbij verkregen resultaten maakten het wenschelijk een meer nauwkeurige studie van het dissimilatorisch vermogen van deze gisten te verrichten. Hiertoe werd de manometrische methode voor stofwisselingsonderzoek volgens WARBURG toegepast.

Teneinde de interpretatie der bij dit deel van het onderzoek verkregen resultaten te vergemakkelijken, werden overeenkomstige proefnemingen met een reincultuur van een gewone persgist, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, verricht.

In de volgende hoofdstukken zal verslag worden uitgebracht over de bij deze verschillende onderzoeken verkregen resultaten.

HOOFDSTUK II.

DE IN HET ONDERZOEK BETROKKEN STAMMEN.

§ 1. ORIËNTEERENDE PROEFNEMINGEN MET DE REEDS AANWEZIGE STAMMEN.

Alvorens over te gaan tot het isoleeren van *Brettanomyces*-stammen uit de daarvoor in aanmerking komende biersoorten, leek het wenschelijk mij eenigszins te oriënteren aangaande het gedrag van deze gistsoorten bij cultuur onder verschillende voorwaarden. De in de gistenverzameling van het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” aanwezige *Brettanomyces*-stammen worden in verband met hunne geringe houdbaarheid behalve op moutagar steeds ook in moutextract en op een gistagar-glucose-krijt-medium aangehouden.

Om het gedrag van deze gisten bij cultiveeren op platen na te gaan, werden van 3-weken oude buiscultures van de vier in de verzameling aanwezige stammen suspensies gemaakt, uit welke suspensies werd afgestreken op gistagar-glucose-krijt-platen, waarna de platen bij 30° C. werden bebroed. Merkwaardigerwijze was na 6 dagen op deze platen nog geen groei te bekennen. Het bleek nu echter, dat, indien zonder suspenderen uit dezelfde buizen op platen werd afgestreken, na 2 à 3 dagen cultiveeren bij 30° C. een vrij goede, zij het ook langzame, groei optrad. Bij afstrijken van een uitermate dikke suspensie kwamen na 5 à 6 dagen slechts enkele koloniën op.

Het is welhaast overbodig hier op te merken, dat het hierboven beschreven gedrag sterk afwijkend is van datgene, hetwelk alle meer bekende gistsoorten onder dergelijke voorwaarden te zien geven.

Teneinde eenig inzicht te verkrijgen in de oorzaken, welke aan dit abnormale verschijnsel ten grondslag liggen, heb ik dienaangaande eenige proefnemingen verricht.

In de eerste plaats leek het denkbaar, dat de cellen der *Brettanomyces*-gisten niet bestand zouden zijn tegen de volle zuurstof-

spanning der lucht, waaraan zij bij uitzaaiing op platen worden blootgesteld. Van dezelfde buizen werd daarom nogmaals op platen afgestreken, zoowel rechtstreeks als na suspenderen, doch ditmaal werd anaëroob, te weten in een waterstofatmosfeer, gecultiveerd. Bij deze proefneming werden evenwel dezelfde resultaten verkregen als onder aërobe voorwaarden: op de platen uitgaande van de suspensies kwamen slechts enkele koloniën op, daarentegen vertoonden de platen, waarop zonder suspenderen was afgestreken, wederom een behoorlijken groei.

Van een neiging tot anaërobie bij de *Brettanomyces*-gisten blijkt dus niets. Zoowel de aërobe als de anaërobe proefnemingen werden nog herhaald onder gebruikmaking van moutagar-, moutagar-krijt- en tomatenagar-platen, doch ook deze wijziging had geen invloed.

Gezien deze resultaten leek de eenig mogelijke verklaring voor het bovengenoemde gedrag, dat het meerendeel der cellen, welke bij het afstrijken op de plaat terecht kwamen, niet of weinig levenskrachtig waren. Om deze reden werden nu suspensies van slechts enkele dagen oude buiscultures op moutagar afgestreken; bij bebroeden der platen bij 30° C. trad nu inderdaad een vrij regelmatige, zij het weer langzame, groei op. Op deze wijze werden na vijf dagen goed-losliggende koloniën van behoorlijke dimensies verkregen.

Uit deze proefnemingen blijkt wel, dat het bij onderzoekingen met *Brettanomyces*-stammen aanbeveling verdient met zeer jonge cultures te werken.

Ik heb mij nu afgevraagd, of er behalve de opmerkelijk langzame groei nog andere kenmerken waren, welke een herkenning van koloniën van *Brettanomyces*-gisten temidden van andere gistkoloniën mogelijk maakten.

In dit verband kan worden opgemerkt, dat bij microscopisch onderzoek der koloniën nagenoeg steeds ook celvormen aanwezig bleken te zijn, welke de aandacht trokken, doordat de polen duidelijk waren toegespitst, een verschijnsel, waarvan door SCHIØNNING ook min of meer terloops melding is gemaakt. Deze karakteristieke celvorm kan wellicht het best als „ogief”-vormig worden omschreven.

Verder bleek het mij, dat de onderzochte cultures op krijthoudende media in den regel een zeer merkbare hoeveelheid zuur produceerden. Speciaal op gistagar-glucose-krijt-platen verraadt

dit verschijnsel zich onmiddellijk door het optreden van een opheldering rondom de koloniën.

Gewapend met de uitkomsten dezer voorloopige proefnemingen leek het nu mogelijk tot isolatie van nieuwe *Brettanomyces*-stammen over te gaan.

§ 2. ISOLATIE VAN *BRETTANOMYCES*-STAMMEN UIT BELGISCHE EN ENGELSCH BIJEN.

Wij zagen reeds in Hoofdstuk I, dat alle vroegere onderzoekers, die zich met *Brettanomyces* hebben bezig gehouden, deze gisten uit de Engelsche biersoorten „stout” of „ale”, of uit speciale Belgische bieren, zooals „lambic”, isoleerden. Als uitgangsmateriaal voor mijn isolaties heb ik daarom eveneens deze bieren genomen.

Dank zij de welwillende medewerking van den heer A. VOSSEN, directeur van de Brasserie „*Mort subite*” te Brussel, ben ik in de gelegenheid geweest mij van den gang van zaken bij de „lambic”-bereiding op de hoogte te stellen. In hoofdzaak geschiedt deze als volgt.

Het beslag voor de „Gueuze-lambic” wordt uit een mengsel van gerstemout en ongemouten tarwe bereid, waarbij de hoeveelheid van laatstgenoemde grondstof 40 à 50% van de totale storting bedraagt. Nadat dit beslag de gebruikelijke temperaturen voor de eiwitafbraak en voor de versuikering heeft doorlopen, wordt gefiltreerd, hop toegevoegd en het gehopte wort ongeveer 5 uur gekookt. De hoeveelheid toegevoegde hop bedraagt 800—900 gram per H.L. wort.

Om de beteekenis van dit getal beter te doen uitkomen, is het niet onbelangrijk te vermelden, dat voor de hier te lande bereide bieren en eveneens voor de in Duitschland gebrouwen normale biersoorten per H.L. wort maximaal 250 gram hop wordt toegevoegd.

Het aldus verkregen product wordt na filtreren in platte koelbakken gebracht, waar het \pm 24 uur verblijft; kunstmatige koeling heeft niet plaats.

Tijdens de koeling neemt het wort talrijke organismen uit de lucht op. Na afkoelen wordt het wort in houten vaten van ongeveer 2 H.L. inhoud gedaan en worden deze vaten in een vertrek met een temperatuur van 15°—18° C. geplaatst. Gist wordt niet toegevoegd; er treedt spontaan een langzame gisting in. Op de vaten

wordt een sluitstuk aangebracht, waarin zich een kleine opening bevindt; deze opening sluit zich op den duur vanzelf af met afscheidingsstoffen, welke door de optredende gisting komen bovendrijven.

Het bier blijft 2 à 3 jaren op deze fusten liggen en wordt dan na klaring op flesschen getapt, waarin de vergisting en de lagering nog ongeveer 2 jaren bij dezelfde temperatuur worden voortgezet. Het aldus verkregen product is de zoogenaamde „Gueuze-lambic”; zij heeft een stamwort van 13—14° Balling.

Het door twee à drie jaren op de fusten gisten en lageren ontstane product is op zich zelf reeds geschikt voor de consumptie. Het wordt dan ook wel in vaten onder den naam van „gueuze” in den handel gebracht.

Onder „krieken-lambic” verstaat men „lambic”, waaraan in de vaten een passende hoeveelheid kersen is toegevoegd.

Terloops zij hier nog vermeld, dat „faro” en „mars”, eveneens speciaal Brusselsche bieren, op ongeveer dezelfde wijze worden bereid als „lambic”; deze biersoorten hebben echter een lager stamwort dan „lambic”.

„Lambic” wordt alleen in het koude jaargetijde gebrouwen, nl. van October tot April. Men heeft in de laatste twintig jaren wel getracht, door gebruik te maken van reïncultures van de in „lambic” doorgaans aangetroffen gist- en bacteriesoorten, de gisting en lagering tot 5 à 6 maanden te verkorten en eveneens in den zomer te brouwen. Dit procédé heeft echter niet veel ingang gevonden.

Voor de nagisting van de lambic acht men nu *Brettanomyces*-gisten noodzakelijk; deze komen blijkbaar ook tijdens de koeling in het wort. Dit is niet zoo verwonderlijk, daar de lucht en de koelbakken ongetwijfeld voldoende met deze gisten zijn verontreinigd.

Door den heer VOSSEN werden mij welwillend enkele flesschen „lambic” afgestaan, evenals een monster dikke gist uit een vat met 3-jaren lang gelagerd bier *).

De gist werd in een steriele flesch vervoerd en in het laboratorium te Delft onmiddellijk in behandeling genomen.

*) Gaarne betuig ik hierbij den heer VOSSEN nogmaals mijn oprechten dank voor zijn in velerlei opzicht zoo waardevolle medewerking.

Een kleine hoeveelheid van deze gist werd na suspendeeren in steriel water op moutagar-, moutagar-krijt- en gistagar-glucose-krijt-platen afgestrekten. De platen werden bebroed bij 25°, 30° en 35° C.

Op de platen, welke bij 25° en 30° C. waren geplaatst, kon ik na twee dagen groote, op kaamgisten gelijkende koloniën waarnemen, doch geen zuurvormende. Enkele van deze koloniën werden op buizen afgestrekten. Deze cultures werden op gistend vermogen onderzocht; de resultaten waren negatief. Voor de vergisting van het wort bij de lambic-bereiding kunnen deze gisten dus niet verantwoordelijk zijn geweest.

Na 6 dagen merkte ik evenwel tusschen deze groote koloniën tal van kleinere op. Enkele kleine koloniën van de moutagar-platen werden onderzocht; de microscopische beelden vertoonden inderdaad overeenkomst met die van de door mij eerder onderzochte *Brettanomyces*-stammen. Beoordeeld naar celvorm en kolonievorm meende ik drie typen te kunnen onderscheiden. Voorloopig werd van ieder der typen één kolonie op gistagar-glucose-krijt-buizen afgestrekten. Deze zullen worden aangeduid als Lc. I, Lc. II en Lc. III.

Op de gistagar-glucose-krijt-platen werden na 8 dagen tusschen de kaamgisten enkele duidelijk zuurvormende gistkoloniën waargenomen. Twee macroscopisch verschillende kolonie-typen werden op bovengenoemde buizen afgestrekten. Deze cultures werden gemerkt Lc. IV en Lc. V.

Eveneens werden van de moutagar-krijt-platen, welke bij 30° en 35° C. waren bebroed, enkele zuurvormende gisten geïsoleerd op gistagar-glucose-krijt-buizen. Wederom naar cel- en kolonievorm beoordeeld, meende ik drie verschillende typen te kunnen onderscheiden: Lc. VI, Lc. VII en Lc. VIII. Het is alleszins denkbaar, dat enkele hiervan identiek zijn met één of meer van de vijf hiervoor genoemde stammen; dit zal dan uiteraard later bij het vaststellen van de morfologische en physiologische eigenschappen blijken.

Men zou nu terecht bezwaar kunnen maken tegen de door mij gevolgde werkwijze, waarbij de koloniën zonder toepassing van een tweede plaat op buizen werden afgestrekten. Dit gebeurde echter veiligheidshalve, daar, zooals wij eerder zagen, bij suspendeeren en afstrijken op platen van *Brettanomyces*-stammen dikwijls geen groei intreedt.

Nadat voldoende groei in de buizen was opgetreden, werden volgens de bekende methoden door suspendeeren en afstrijken op platen, en herhaling hiervan uitgaande van een hierbij verkregen losliggende kolonie, reïncultures aangelegd. De aldus verkregen cultures vormden alle in min of meerdere mate zuur op gistagar-glucose-krijt-buizen.

In tegenstelling tot deze positieve resultaten, slaagde ik er niet in uit het bezinksel der meegenomen flesschen „lambic” eenigerlei gistsoort te isoleeren.

Zooals reeds eerder werd opgemerkt, spelen *Brettanomyces*-gisten eveneens een rol bij de nagisting van de Engelsche biersoorten „ale” en „stout”. Lagering heeft hierbij niet in flesschen plaats, zooals bij „lambic”, maar uitsluitend in fusten. Wel worden deze bieren eveneens ongefiltreerd in flesschen getapt.

Ik onderzocht monsters hier te lande gebotteld „Pale Ale” en „Stout” afkomstig van Bass & Co., Brewers, Burton on Trent.

Ter isolatie van *Brettanomyces*-stammen uit deze monsters werd een gedeelte van het bezinksel afgestroken op moutagar-krijt- en op gistagar-glucose-krijt-platen, welke bij 30° C. werden bebroed.

Na 2 dagen werden verschillende gistkoloniën waargenomen, welke echter geen zuur bleken te vormen. Na 7 dagen werden evenwel weer tusschen deze koloniën zeer kleine zichtbaar, welke het krijt rondom de kolonie oplosten. Op de platen van „Stout” afkomstig, konden bij de zuurvormende koloniën twee typen worden onderscheiden, harde en zachte. De meerderheid bestond uit harde, welke onderling identiek bleken te zijn, wat betreft den kolonievorm en het microscopische beeld. Eén harde en één zachte kolonie werden op buizen afgestroken en daarna op de wijze, zooals bij de isoleering uit „lambic” is beschreven, in reïncultuur gebracht. De zachte cultuur zullen wij voorloopig St. I noemen en de harde St. II.

Van de platen, waarop het bezinksel van „Pale Ale” was afgestroken, konden alleen harde zuurvormende koloniën worden geïsoleerd. Deze waren kennelijk identiek met St. II. In dit verband zij er aan herinnerd, dat de bieren van dezelfde brouwerij afkomstig waren.

§ 3. BEKNOPT OVERZICHT VAN ALLE ONDERZOCHE STAMMEN.

Behalve de reeds genoemde vier *Brettanomyces*-stammen uit de gistenverzameling van het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” en de in de vorige paragraaf genoemde zelf geïsoleerde stammen, werden in den loop van het onderzoek nog een tweetal stammen van elders ontvangen.

Hieronder volgt een beknopt overzicht van alle stammen, welke in het onderzoek werden betrokken, waarbij tevens, voor zoover bekend, de herkomst is vermeld.

1. *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer (stam lambic 103 G). Deze cultuur ontving het „C. B. S.” van KUFFERATH in Januari 1931. De stam werd door KUFFERATH uit lambic geïsoleerd.
 - 2 en 3. *Brettanomyces* spec. stam 1106 Carlsberg en *Brettanomyces* spec. stam 1201 Carlsberg. Deze beide stammen ontving het „C. B. S.” eveneens van KUFFERATH in Januari 1931. KUFFERATH had deze stammen van KLÖCKER ontvangen. Blijkens een persoonlijk schrijven van Dr. N. HJELTE CLAUSSEN is stam 1201 één der door SCHIØNNING geïsoleerde en beschreven stammen; voor stam 1106 geldt vermoedelijk hetzelfde.
 4. *Brettanomyces* spec. stam Oudenaerde. Het „C. B. S.” ontving deze cultuur eveneens van KUFFERATH in Januari 1931.
 5. *Mycotorula intermedia* Krumbholz et Tauschanoff. Deze stam werd door KRUMBHOLZ en TAUSCHANOFF uit Franschen druivenmost geïsoleerd. Het „C. B. S.” ontving de cultuur van KRUMBHOLZ in September 1933.
 - 6—13. De in § 2 van dit hoofdstuk genoemde stammen, uit „lambic” geïsoleerd. Lc. I t/m Lc. VIII.
 - 14 en 15. De in § 2 van dit hoofdstuk genoemde stammen, uit Engelsch bier geïsoleerd. St. I en St. II.
 16. *Brettanomyces* spec. stam SHIMWELL. In Mei 1938 ontving het „C. B. S.” deze gistcultuur van Dr. J. L. SHIMWELL te Cork, met verzoek tot nadere identificatie. Deze gist werd door SHIMWELL uit Porter-bier van „The Cork Porter Brewery” geïsoleerd.
 17. *Brettanomyces* spec. Deze cultuur ontving het „C. B. S.” in October 1939 van het Skandinavisk Bryggeri Laboratorium te Kopenhagen.
-

HOOFDSTUK III.

DE MORPHOLOGISCHE EN PHYSIOLOGISCHE KENMERKEN DER ONDERZOCHE STAMMEN.

§ 1. DE BIJ HET SYSTEMATISCH ONDERZOEK VAN GISTSOORTEN TOEGEPASTE KENMERKEN EN DE METHODEN TER VASTSTELLING HIERVAN.

Het was aangewezen om bij het systematisch onderzoek der *Brettanomyces*-stammen zoo nauw mogelijk aansluiting te zoeken bij de methoden, welke in de Gistafdeeling van het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” voor de bestudeering van gistsoorten in het algemeen toepassing hebben gevonden. Voor een beschrijving van deze methoden kan ik in hoofdzaak volstaan met een verwijzing naar de monographieën van STELLING-DEKKER ¹⁾ en LODDER ²⁾.

Ik wil hier dus alleen de door mij vastgestelde kenmerken kort vermelden en ga op de hierbij toegepaste methoden slechts in, voor zoover deze in eenigerlei opzicht afwijken van de in genoemde geschriften aangegeven werkwijzen.

MORPHOLOGISCHE KENMERKEN.

- a. *Ascosporenvorming.*
- b. *Pseudomyceliumvorming.*
- c. *Celvorm en wijze van celvermeerdering.*
- d. *Uiterlijk der vloeistofcultures.*
- e. *Uiterlijk der cultures op vaste voedingsmedia.*

PHYSIOLOGISCHE KENMERKEN.

- f. *Gistingsvermogen ten opzichte van verschillende suikers.*
- g. *De assimilatie van verschillende suikers.*
- h. *De assimilatie van verschillende stikstofverbindingen.*
- i. *De bruikbaarheid van aethylalcohol als koolstofbron.*

¹⁾ N. M. STELLING-DEKKER, Die sporogenen Hefen. Amsterdam, 1931.

²⁾ J. LODDER, Die anaskosporogenen Hefen. Erste Hälfte. Amsterdam, 1934.

Wat deze kenmerken aangaat, heb ik slechts enkele opmerkingen te maken over de vaststelling der onder *b*, *c* en *g* genoemde kenmerken.

b. Pseudomyceliumvorming.

De vaststelling van het al of niet aanwezig zijn van deze voor de systematiek der anasco sporogene gisten zoo belangrijke eigenschap geschiedde in eerste instantie geheel volgens de in het boek van LODDER (l.c.) uitvoerig weergegeven methode van RIVALIER en SEYDEL ¹⁾. Aangezien deze methode bij toepassing op de onderzochte *Brettanomyces*-stammen nagenoeg volledig negatieve resultaten opleverde, heb ik gemeend niet te mogen nalaten het onderzoek nog eens te herhalen onder toepassing van aardappelagar, een medium, dat Mej. LODDER mij inmiddels had aanbevolen, als zijnde gunstiger voor de pseudomyceliumvorming. Het voorschrift voor de bereiding van dit medium laat ik hieronder volgen:

„100 gram geschilde, gewasschen en fijn gemalen aardappelen worden met 300 cm³ water gemengd en \pm 20 uur op een koude plaats bewaard, daarna door een doekje gezeefd en 1 uur bij 115° C. gesteriliseerd. Van het op deze wijze verkregen extract worden 230 cm³ met 770 cm³ water, 20 gram glucose en 20 gram agar 1/2 uur bij 110° C. gesteriliseerd.”

Nog zij opgemerkt, dat de cultures bij 25° C. werden geplaatst. Bij gebruik van lage glasdoozen kon met behulp van een zwak objectief de groei van de cultures door het deksel heen microscopisch worden gecontroleerd. De waarneming werd, voor zoover noodig, over drie weken uitgestrekt. Indien vorming van pseudomycelium werd vastgesteld, werden de voorwerp glazen uit de glasdoos genomen en onmiddellijk, zonder drogen of kleuren, microscopisch onderzocht.

Van eventueel aanwezig pseudomycelium werd in alle gevallen een tekening vervaardigd met behulp van oculair 10 \times en een objectief D van Zeiss onder gebruikmaking van een teekenprisma volgens ABBE. De vergrooting der teekeningen was steeds 420 \times .

¹⁾ E. RIVALIER et S. SEYDEL, Compt. Rend. Soc. Biol. **40**, 181, 1932; idem, Ann. d. Parasitol. **10**, 444, 1932.

Men zie ook de sedert verschenen uitvoerige publicatie van M. LANGERON et P. GUERRA, Ann. d. Parasitol. **16**, 36, 162, 429, 481, 1938.

c. Celvorm en wijze van celvermeerdering.

Voor de bestudeering van den celvorm werden de stammen in 30 cm³ moutextract in een kolfje van 100 cm³ inhoud geënt en gecultiveerd bij 25° C. Daar de cultures slechts zeer langzaam groeiden, moest — uitgaande van een buiscultuur — vrij sterk worden geënt en werden, in afwijking van den gebruikelijken termijn van 24 uur, de cultures eerst na 5 dagen microscopisch onderzocht.

In deze cultures werd eveneens de wijze van celvermeerdering nagegaan. De op den celvorm betrekking hebbende teekeningen werden onder toepassing van oculair 10× en een homogene olie-immersie $\frac{1}{12}$ van Zeiss met behulp van een teekenprisma vervaardigd; de vergrooting dezer teekeningen bedraagt 1000×.

g. De assimilatie van verschillende suikers.

Ofschoon het vermogen van gisting-verwekkende gistsoorten om bepaalde suikers al dan niet te assimileeren in de publicaties van STELLING-DEKKER en LODDER niet afzonderlijk is onderzocht, leek het mij in navolging van LANGERON en GUERRA (l.c.) wenschelijk dit onderzoek voor de *Brettanomyces*-stammen wel door te voeren. Hiervoor was de auxanographische methode van BEIJERINCK aangewezen, welke door Mej. LODDER ten dienste van de systematische bestudeering der niet-vergistende gistsoorten met succes is toegepast.

Ik meen goed te doen, de door deze schrijfster in dit verband gegeven aanwijzingen aan te vullen, door een beschrijving op te nemen van de bereiding der hierbij gebruikte uitgewasschen agar. Deze geschiedt als volgt:

„20 gram agar wordt in kleine stukjes geknipt en met 1 liter gedestilleerd water een week bij kamertemperatuur gezet. Hierna wordt flink uitgewasschen en zooveel gedestilleerd water aan de agar toegevoegd, tot het totaalgewicht 1 kg bedraagt. De kolf wordt nu op een waterbad verwarmd tot alle agar is opgelost, de inhoud opgekookt, gefiltreerd en gedurende 15 minuten bij 120° C. gesteriliseerd.”

Aan de aldus verkregen uitgewasschen agar werd dan 0,5% ammoniumsulfaat, 0,1% monokaliumphosphaat en 0,05% magnesiumsulfaat toegevoegd en het medium opnieuw gesteriliseerd.

Voor de verdere beschrijving van de uitvoering der methode ver-

wijs ik wederom naar LODDER (l.c.), waaraan dan evenwel nog één opmerking moet worden verbonden.

Terwijl het gebruikelijk is de op hare assimileerbaarheid te onderzoeken suikers in vasten vorm op de agarplaten te brengen, bracht deze werkwijze bij het onderzoek der *Brettanomyces*-stammen moeilijkheden met zich. Tengevolge van den langzamen groei dezer gistsoorten toch moesten de waarnemingen over een drietal dagen of soms nog langer worden uitgestrekt en dit had tengevolge, dat bij gebruik van de vaste, niet-gesteriliseerde suikers veelvuldig infecties optraden. Teneinde dit te voorkomen werd een druppel van een tevoren gesteriliseerde 20%-ige oplossing van de suiker in gedestilleerd water voor het aanleggen der diffusievelden gebruikt.

§ 2. DE ZUURVORMING OP SUIKERHOUDENDE MEDIA ALS KENMERK TEN DIENSTE VAN DE SYSTEMATIEK DER GISTSOORTEN.

In Hoofdstuk II § 1 is er reeds de aandacht op gevestigd, dat de in het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” aanwezige *Brettanomyces*-stammen reeds sedert tal van jaren ook op krijthoudende agarmedia worden aangehouden en dat op den duur het hierin aanwezige krijt tengevolge van de zuurvorming ten deele verdwijnt. In Hoofdstuk I is er ook reeds op gewezen, dat de vroegere onderzoekingen geen twijfel laten, dat deze geprononceerde zuurvorming in suikerhoudende media een karakteristieke eigenschap der door *Brettanomyces*-soorten verwekte gisting is.

Op het gebruikelijke gistagar-glucose-krijt-medium, dat 2% glucose en 2% krijt bevat, bleek de opheldering van het medium door het gevormde zuur echter aan groote schommelingen onderhevig te zijn. Een gelijkmatige verdeling van de groote hoeveelheid krijt in het agar-medium bleek moeilijk te bewerkstelligen, terwijl het krijt steeds in zoodanige overmaat aanwezig was, dat een beoordeeling van de mate van het in oplossing gaan zeer bezwaarlijk was.

Ik heb mij hierom afgevraagd, of het mogelijk zou zijn een medium zoodanig samen te stellen, dat daarin de zuurvorming der *Brettanomyces*-stammen duidelijk naar voren zou treden. Indien dan dit kenmerk scherp zou contrasteeren met het gedrag der overige gistsoorten op hetzelfde medium, zou dit wellicht

een nieuw en nuttig kenmerk ten dienste der gistsystematiek opleveren.

Ik ging hierbij van de gedachte uit, dat gebruik van een kleinere hoeveelheid krijt in het gistagar-glucose-krijt-medium de vaststelling van het oplossen van het krijt zou vergemakkelijken en dat in de tweede plaats een bepaalde concentratie van de glucose een optimale zuurvorming zou bewerken.

Er werden nu gistagar-glucose-krijt-media met verschillende hoeveelheden glucose en krijt samengesteld en hierop enkele van de in de verzameling van het „C. B. S.” aanwezige *Brettanomyces*-stammen afgestreken. Ofschoon 30° C. een meer geschikte temperatuur is voor het cultiveren van *Brettanomyces*-stammen, werden bij deze proeven de buizen bij 25° C. geplaatst, teneinde een snel uitdrogen van het medium tegen te gaan. Uit deze proeven kwam nu vast te staan, dat gistagar, waaraan 5% glucose en 0,5% krijt was toegevoegd, een zeer goede voedingsbodem voor *Brettanomyces*-gisten is en uitermate gunstig voor de waarneming van de mate van zuurvorming door deze gisten. Het bleek nl., dat na 10 dagen cultiveren bij 25° C. het krijt in de buizen practisch geheel was verdwenen. Voorts werd nagegaan, of het op deze wijze met „*Brettanomyces*” verkregen resultaat zich duidelijk onderscheidde van hetgene, dat andere gistsoorten bij cultiveering op hetzelfde medium opleveren. Er werd hiertoe een serie buiscultures aangelegd van alle *Brettanomyces*-stammen, welke ik op dat oogenblik tot mijn beschikking had en van een aantal gistsoorten van de belangrijkste geslachten, welke in de verzameling van het „C. B. S.” zijn vertegenwoordigd. Hieronder volgt een opsomming van de stammen, welke op genoemd medium werden afgestreken; indien er een bijzondere reden aanwezig was voor de keuze van een bepaalden stam, is dit hierbij vermeld.

A. BRETTANOMYCES-GISTEN.

1. *Brettanomyces bruxellensis*, stam lambic 103 G.
2. *Brettanomyces* spec. stam 1106 Carlsberg.
3. *Brettanomyces* spec. stam 1201 Carlsberg.
4. *Brettanomyces* spec. stam Oudenaerde.
5. *Mycotorula intermedia* Krumbholz et Tauschanoff.
- 6—13. De door mij uit lambic geïsoleerde stammen Lc. I t/m Lc. VIII.

B. SPOREVORMENDE GISTEN.

1. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I.
2. *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, een ondergist afkomstig van één der Nederlandsche brouwerijen.
3. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker, stam Champagne Cramant. FERNBACH en SCHOEN¹⁾ geven aan, dat deze stam bij aanwezigheid van krijt uit suiker pyrodruivenzuur vormt.
4. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, een stam uit een brouwerijbovengist geïsoleerd.
5. *Pichia belgica* (Lindner) Dekker.
6. *Zygosaccharomyces mongolicus* Saito.
7. *Hansenula suaveolens* (Klöcker) Dekker.
8. *Endomycopsis albicans* (Vuillemin) Dekker.
9. *Saccharomyces oviformis* Osterwalder.
10. *Zygopichia farinosa* (Lindner) Klöcker.
11. *Endomycopsis selenospora* (Nadson et Krassilnikov) Dekker.
12. *Hansenula javanica* (Groenewege) Dekker.

C. ANASCOSPOROGENE GISTEN.

I. GEEN PSEUDOMYCELIUM VORMEND.

1. *Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Saccardo.
2. *Torulopsis candida* (Saito) Lodder.
3. *Mycoderma* spec. uit bier geïsoleerd.
4. *Mycoderma vini* Desmazières.
5. *Kloeckera corticis* (Klöcker) Janke.
6. *Torulopsis dattila* (Kluyver) Lodder.
7. *Torulopsis bacillaris* (Kroemer et Krumbholz) Lodder.
8. *Mycoderma Lafarii* Janke.

Volgens JANKE²⁾ wordt door deze gist bij cultiveeren in bier, waaraan 2,5 % aethylalcohol is toegevoegd, uit den alcohol eerst azijnzuur gemaakt en wordt daarna het gevormde azijnzuur verder verbrand tot koolzuur en water.*

¹⁾ A. FERNBACH et M. SCHOEN, C. R. Acad. d. Sc. **170**, 764, 1920.

²⁾ A. JANKE, Archiv f. Mikrob. **1**, 176, 1930.

II. PSEUDOMYCELIUM VORMEND.

9. *Candida albicans* (Robin) Berkhout, stam VITRINGA.
10. *Candida* spec., stam DUCLAUX, de stam, welke door FERNBACH en SCHOEN¹⁾ bij uitstek geschikt werd bevonden voor de vorming van pyrodruivenzuur uit suikers bij aanwezigheid van kriet; deze cultuur is vroeger beschreven als *Mycolevure de Duclaux*.
11. *Candida Chevalieri* (Guilliermond) Westerdijk.
12. *Candida Krusei* (A. Castellani) Berkhout.
13. *Candida* spec., stam 49 NATTRASS.

De op Plaat I gereproduceerde foto's geven het aanzien van de buiscultures na 10 dagen cultiveeren bij 25° C.

Een beschouwing der plaat leert nu in de eerste plaats, dat alle onderzochte *Brettanomyces*-stammen een zoodanige zuurproductie hebben bewerkstelligd, dat het in de media aanwezige kriet praktisch volledig is verdwenen. Op de foto's is dit waarneembaar, doordat het medium zóó sterk is opgehelderd, dat de zwarte strepen op het papier, hetwelk met opzet achter de buizen was geplaatst, door de agar heen goed zichtbaar zijn.

Dat deze zuurproductie door de *Brettanomyces*-stammen zeer karakteristiek is, volgt voorts uit het feit, dat van de overige 25 onderzochte giststammen er onder de gekozen voorwaarden 23 geen zuur in eenigszins beteekenende hoeveelheid hadden geproduceerd. Het is opmerkelijk, dat zich onder deze stammen ook *Mycoderma Lafarii* Janke en *Candida* spec. stam DUCLAUX bevinden, daar toch voor deze gistsoorten buiten twijfel vaststaat, dat zij onder afwijkende voorwaarden tot een onmiskenbare zuurproductie in staat zijn.

Daarentegen is door dit oriënteerende onderzoek naar voren gekomen, dat er ook onder de sporogene gistsoorten een tweetal zijn aan te wijzen, nl. *Endomycopsis selenospora* (Nadson et Krassilnikov) Dekker en *Hansenula javanica* (Groenewege) Dekker, welke in zuurproductie onder de gekozen voorwaarden niet bij de *Brettanomyces*-stammen ten achter staan.

Ongetwijfeld zou een verdere uitbreiding van het onderzoek over de honderden tot dusver bekende gistsoorten nog wel meer van deze gevallen aan het licht brengen.

¹⁾ A. FERNBACH et M. SCHOEN, C. R. Acad. d. Sc. **157**, 1478, 1913; *ibid.* **158**, 1719, 1914; *ibid.* **170**, 764, 1920.

Het belangrijkste resultaat der ingestelde proefneming is intusschen, dat hoewel krachtige zuurproductie onder de beschreven cultuurvoorwaarden geen exclusieve eigenschap van de *Brettanomyces*-gisten is, nochtans *alle* onderzochte *Brettanomyces*-stammen door het bezit van deze eigenschap zijn gekenmerkt.

Hiermede schijnt de bruikbaarheid van het bewuste kenmerk voor de gistsystematiek afdoende gestaafd, waarbij nog moge worden opgemerkt, dat het geenszins uitgesloten lijkt, dat de aanbevolen onderzoeksmethodiek ook goede diensten zal kunnen bewijzen voor de onderscheiding van geslachten, of althans van soorten in andere natuurlijke groepen van het gistenrijk.

Teneinde misverstand te voorkomen, wil ik evenwel nadrukkelijk waarschuwen voor de onjuiste meening, dat de bovenvermelde standaardmethode nu ook in absoluten zin een antwoord zou geven op de vraag, of een bepaalde gistsoort al dan niet in staat is zuur uit suikers in het algemeen, of zelfs maar uit glucose, te vormen. De hierboven reeds naar voren gebrachte gevallen van *Mycoderma Lafarii* en van *Candida spec.* stam DUCLAUX volstaan reeds om het tegendeel te bewijzen. Iedere onderzoeker op het gebied der celphysiologie is er dan ook mede vertrouwd, dat de richting, waarin een gegeven substraat door een bepaalde celsoort wordt omgezet, in hooge mate afhankelijk is van het geheele complex der uitwendige voorwaarden (temperatuur, pH van het medium, mate van aëratie enz. enz.), alsmede ook van de voorgeschiedenis der bij het onderzoek betrokken cellen.

Een en ander neemt niet weg, dat het kenmerk der zuurvorming onder standaardvoorwaarden voor de gistsystematiek — naast de daarin reeds gebruikte physiologische kenmerken, waarvoor grootendeels hetzelfde geldt — waarde zal kunnen verkrijgen.

Voor de praktische doeleinden der systematiek laat ik hieronder het door mij voorgestelde kenmerk, alsmede de methode ter vaststelling hiervan, nog even scherp omschreven volgen.

Opgemerkt zij nog slechts, dat het hierboven vastgestelde kenmerk „zuurvorming uit glucose” desgewenscht zeer goed tot andere suikers kan worden uitgebreid.

Zuurvorming uit suikers.

Ter vaststelling van het al of niet aanwezig zijn bij een gistsoort van het kenmerk „zuurvorming uit suikers” wordt een buiscultuur

aangelegd op gistagar met 5% van de te onderzoeken suiker en 0,5% krijt en deze cultuur 10 dagen bij 25° C. bebroed. Het kenmerk „zuurvorming” wordt als positief gerapporteerd, indien de zuurvorming in die mate optreedt, dat een practisch volledige opheldering van het agar-medium wordt bewerkstelligd; indien wel eenige zuurvorming bemerkbaar is, doch genoemd resultaat niet volledig wordt bereikt, kan de aanduiding „zwak positief” toepassing vinden.

§ 3. OVERZICHT DER VERKREGEN RESULTATEN.

Bij het hieronder volgende systematische overzicht van de door mij vastgestelde eigenschappen der onderzochte stammen zal de volgorde worden aangehouden, welke in Hoofdstuk II § 3 is aangegeven.

Alle stammen werden eerst volgens de verschillende gebruikelijke methoden op het vermogen tot vorming van ascosporen onderzocht. Er moge mede worden volstaan, hier ter plaatse aan te geven, dat met alle stammen volledig negatieve resultaten werden verkregen.

Voorts werden bij het onderzoek naar de bruikbaarheid van verschillende stikstofverbindingen volgens de auxanographische methode met nitriet slechts zwak-positieve of twijfelachtige resultaten verkregen. Bij een later door mij ingesteld algemeen onderzoek naar de assimileerbaarheid van nitriet door uiteenloopende gistsoorten is aan het licht gekomen, dat deze eigenschap in hooge mate afhankelijk is van de pH van het medium, waarin men de gistcellen verdeelt. In het voor het onderzoek der stikstof-assimilatie gebruikelijke medium, waarvan de pH een waarde van 5,0—5,3 heeft, verkreeg ik uitsluitend goed positieve resultaten bij zeer lage nitrietconcentraties; hogere nitrietconcentraties oefenden een onmiskenbare giftwerking uit. Bij de auxanographische methode in haar gebruikelijke uitvoering uitte een en ander zich in het ontstaan van ringvormige groeizônes. Onderzoekt men de bewuste eigenschap evenwel in media met hogere pH, dan kan nitriet in merkbaar hogere concentraties worden geassimileerd.

Om deze redenen moet aan de hieronder in zake de nitriet-assimilatie door *Brettanomyces*-stammen meegedeelde uitkomsten slechts een betrekkelijke waarde worden toegekend, met dien verstande, dat alleen de positieve uitkomsten als voldoende zeker kunnen worden beschouwd.

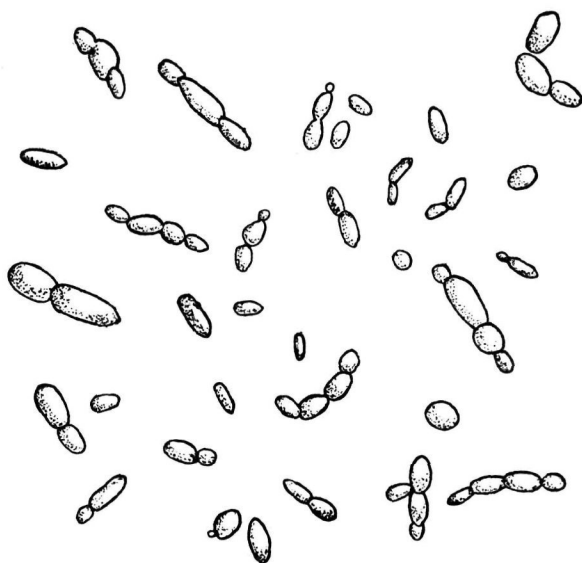
Brettanomyces bruxellensis Kufferath et van Laer.

Nadere aanduiding: lambic 103 G.

Lit.: H. KUFFERATH, Ann. Soc. Zymologie pure et appl. 1, 7, 1926.

KUFFERATH isoleerde deze gist uit lambic.

Het „C. B. S.” ontving de cultuur van KUFFERATH in Januari 1931.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.*Na 5 dagen 25° C.* cellen ovaal, veelal ogief-vormig toegespitst, $(2,5-4) \times (3-9) \mu$, celverband 1 t/m 4; dun huidje en bezinksel.Fig. 1. (*Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer)*). Vergr. 1000 \times .*Na 10 dagen 15° C.* dunne, matte, gladde huid.*Streekcultuur:* Op moutagar na 8 dagen 15° C. licht-geel, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

Op moutagar na 6 weken 15° C. iets zalmkleurig, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

*) Teneinde het uiteindelijk overzicht te vergemakkelijken zijn onder de teekeningen reeds de namen der soorten aangegeven, waartoe de betreffende stammen zijn gebracht. Men zie hiervoor Hoofdstuk IV.

Gaarne betuig ik hier mijn hartelijken dank aan Mej. Dr. T. Hof, die zoo vriendelijk was de afwerking der teekeningen te verzorgen.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. wit, glanzend, week, iets stralenvormend, weinig uitgespreid, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Geringe neiging tot pseudomyceliumvorming; enkele boompjes van langgerekte cellen met slecht ontwikkeld blastosporenapparaat.



Fig. 2. (*Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer). Vergr. 420 ×.

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:	glucose (fr., m.)	+		
galactose	—		maltose	+
saccharose	+		lactose	—

Suiker-assimilatie:	glucose (fr., m.)	+		
galactose	?		maltose	+
saccharose	+		lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

N-assimilatie:	kaliumnitraat	?	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Zeer zwakke groei.

Brettanomyces spec. stam 1106 Carlsberg.

Het „C. B. S.” ontving deze cultuur in Januari 1931 van KUFFERATH, die haar op zijn beurt van KLÖCKER had ontvangen. Het is waarschijnlijk een der door SCHIÖNNING geïsoleerde en beschreven stammen.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal, veelal ogief-vormig toegespitst, voor de overgrootste meerderheid der cellen gelden de maten: $(3-4) \times (4-12) \mu$; daarnaast enkele langgerekte cellen; meest losliggend of twee aan twee; geen huid; bezinksel.

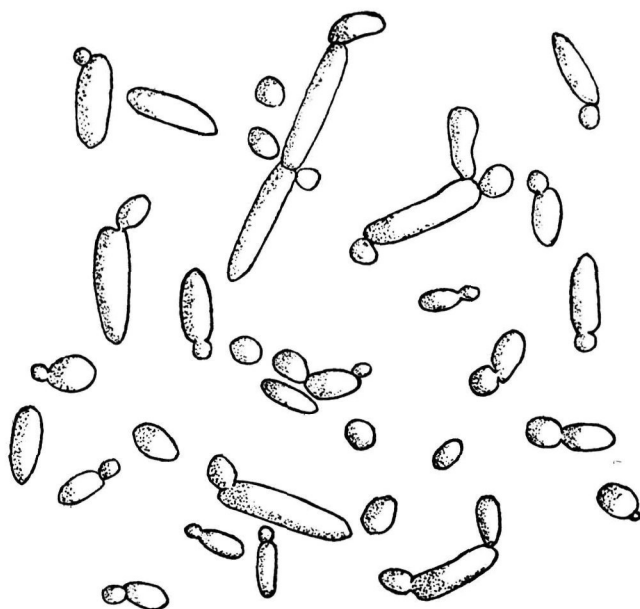


Fig. 3. (*Brettanomyces Claussenii* nov. spec.). Vergr. 1000 \times .

Na 10 dagen 15° C. geen huid.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. wit-geel, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.
 Op moutagar na 6 weken 15° C. geel, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.
 Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. zalmkleurig, glanzend, week, glad, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Zeer primitief pseudomycelium; slechts enkele langgerekte cellen.

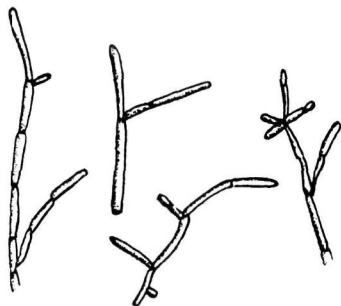


Fig. 4. (*Brettanomyces Claussenii* nov. spec.). Vergr 420 ×.

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:	glucose (fr., m.)	+		
	galactose	+	maltose	+
	saccharose	+	lactose	+

Suiker-assimilatie:	glucose (fr., m.)	+		
	galactose	+	maltose	+
	saccharose	+	lactose	+

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

N-assimilatie:	kaliumnitraat	+	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Vrij goede groei.

Brettanomyces spec. stam 1201 Carlsberg.

Het „C. B. S.” ontving deze cultuur in Januari 1931 van KUFFERATH, die haar van KLÖCKER had ontvangen.

Blijkens een persoonlijk schrijven van Dr. N. HJELTE CLAUSSEN is het een der door SCHJØNNING geïsoleerde en beschreven stammen.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal, veelal ogief-vormig toegespitst, voor de overgrootste meerderheid der cellen gelden de maten: $(2-4) \times (4-10) \mu$; verder enkele langgerekte cellen; meest twee aan twee of losliggend, enkele langere celverbanden; huid-eilandjes en bezinksel.

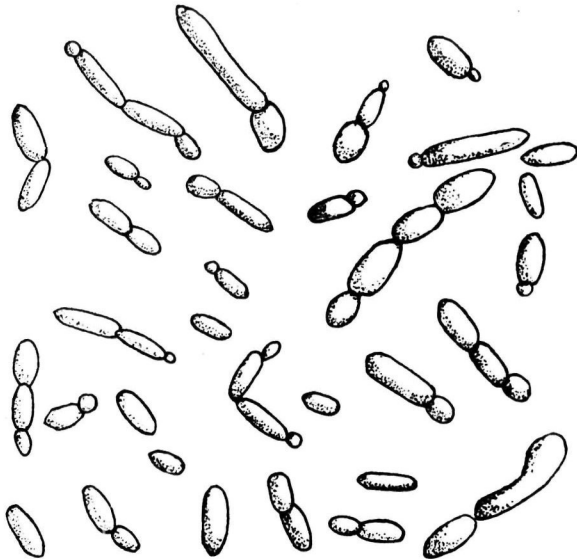


Fig. 5. (*Brettanomyces bruxellensis* var. *lentus* nov. var.). Vergr. 1000 \times .

Na 10 dagen 15° C. dunne, matte, gladde huid.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. geel, glanzend, week, glad, rand wit en zwak geplooid, weinig uitgespreid.
Op moutagar na 6 weken 15° C. geel, glanzend, week, gerimpeld, rand wit-geel en ongeveer glad.
Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. wit, glanzend, week, stralenvormend, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Enkele boompjes van langgerekte cellen met eenige neiging tot vorming van blastosporenapparaat. (Vgl. Fig. 6).

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:

	glucose (fr., m.)	+		
galactose	—		maltose	+
saccharose	+		lactose	—

Suiker-assimilatie:

	glucose (fr., m.)	+		
galactose	?		maltose	+
saccharose	+		lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

N-assimilatie:

kaliumnitraat	?	asparagine	+
kaliumnitriet	?	ureum	+ zeer zwak
ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Zeer zwakke groei.

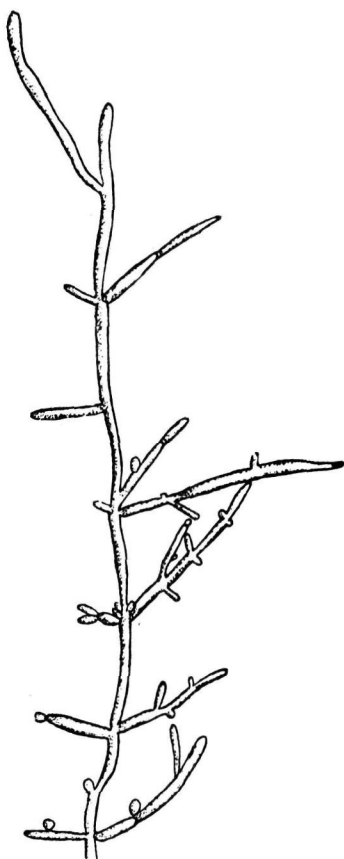


Fig. 6. (*Brettanomyces bruxellensis* var. *lentus* nov. var.). Vergr. 420 \times .

Brettanomyces spec. stam Oudenaerde.

Het „C. B. S.” ontving deze cultuur van KUFFERATH in Januari 1931.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen vrij klein, ovaal, enkele ogief-vormig toegespitst, (2,5—4) \times (4—9) μ , onregelmatig celverband, veelzijdige knopvorming; dun huidje en bezinksel.

Na 10 dagen 15° C. dunne, matte, gladde huid.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. crème-kleurig, glanzend, week, ruw, weinig uitgespreid.
 Op moutagar na 6 weken 15° C. wit tot zwak zalmkleurig, half mat, week, gerimpeld.
 Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. geel-bruin, half mat, week, ruw, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Geringe neiging tot pseudomyceliumvorming.

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:

	glucose (fr., m.)	+		
galactose	—		maltose	+
saccharose	+		lactose	—

Suiker-assimilatie:

	glucose (fr., m.)	+		
galactose	—		maltose	+ zwak
saccharose	+ zwak		lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

N-assimilatie:

	kaliumnitraat	?	asparagine	+
	kaliumnitriet	?	ureum	+ zeer zwak
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Geen groei.

Mycotorula intermedia Krumbholz et Tauschanoff.

Lit.: G. KRUMBHOLZ und W. TAUSCHANOFF, Zentralbl. f. Bakt. II, 88, 366, 1933.

KRUMBHOLZ en TAUSCHANOFF isoleerden deze gist uit Franschen druivenmost.

Het „C. B. S.” ontving de cultuur van KRUMBHOLZ in September 1933.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal, veelal ogievormig toegespitst, voor de overgrote meerderheid der cellen gelden de maten: $(2,5-4) \times (4-13) \mu$; daarnaast enkele langgerekte cellen; meest losliggend of twee aan twee, enkele kettingen van drie of vier cellen; dunne huid met plaatselijke verdikkingen en bezinksel.

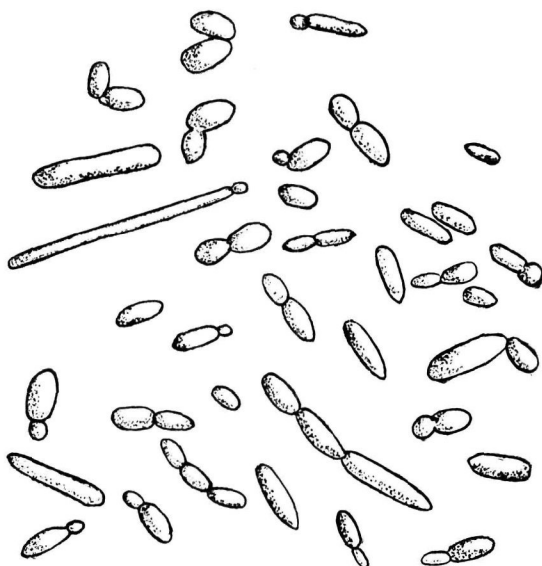


Fig. 7. (*Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer). Vergr. 1000 \times .

Na 10 dagen 15° C. dunne, matte huid, als boven.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. licht-geel, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.
 Op moutagar na 6 weken 15° C. geel, glanzend, week, rand vertoont iets stralenvorming.
 Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. zwak zalmkleurig, glanzend, week, glad, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Vorming van enkele boompjes met blastosporenapparaat. (Vgl. Fig. 8).

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:

	glucose (fr., m.)	+		
galactose	+	zwak	maltose	+
saccharose	+		lactose	—

Suiker-assimilatie:

	glucose (fr., m.)	+		
galactose	+		maltose	+
saccharose	+		lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

N-assimilatie:

kaliumnitraat	+	asparagine	+
kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+
ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Vrij goede groei.

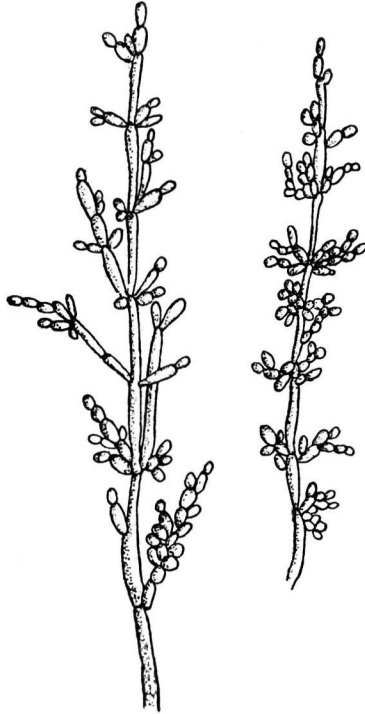


Fig. 8. (*Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer). Vergr. 420 \times .

Stam Lc. I.

De stam werd door den auteur in September 1938 uit „lambic“-sediment geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal tot rond, sommige ogief-vormig toegespitst, voor de overgrootste meerderheid der cellen gelden de maten: $(2,5-4,5) \times (3,5-7) \mu$; daarnaast enkele langgerekte cellen; vrij onregelmatig celverband (1 t/m 5); matte, gerimpelde huid met gasbellen en bezinsel.

Na 10 dagen 15° C. vrij dikke, matte, sterk gerimpelde huid met gasbellen.

Streekcultuur: *Op moutagar na 8 dagen 15° C.* lichtgeel, mat, week, fijn geribd, weinig uitgespreid.

Op moutagar na 6 weken 15° C. als na 8 dagen.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. wit, half mat, week, generfd, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Enkele boompjes van langgerekte cellen met primitief blastosporenapparaat.

Gelatineervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

<i>Vergisting van:</i>		glucose (fr., m.) +		
	galactose	—	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

<i>Suiker-assimilatie:</i>		glucose (fr., m.) +		
	galactose	+ zeer zwak	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Middelmattige groei.

Stam Lc. II.

De stam werd door den auteur in September 1938 uit „lambic“-sediment geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen vrij groot, eivormig, veelal ogief-vormig toegespitst, voor de overgrootte meerderheid der cellen gelden de maten: $(3-6) \times (4-12) \mu$; verder enkele langgerekte cellen; onregelmatig celverband; dun mat huidje en bezinksel.

Na 10 dagen 15° C. dunne, matte, gladde huid.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. geel, half glanzend, week, glad, rand iets stralenvormig, weinig uitgespreid.

Op moutagar 6 weken 15° C. als na 8 dagen.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. donkerbruin, hard, ruw, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Geringe neiging tot pseudomyceliumvorming.

Gelatineervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

<i>Vergisting van:</i>		glucose (fr., m.) +		
	galactose	—	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

<i>Suiker-assimilatie:</i>		glucose (fr., m.)	+	
	galactose		+ zwak	maltose +
	saccharose		+	lactose —

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+	zeer zwak	asparagine	+
	kaliumnitriet	?		ureum	+
	ammoniumsulfaat	+		pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Zeer zwakke groei.

Stam Lc. III.

De stam werd door den auteur in September 1938 uit „lambic”-sediment geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen vrij klein, ovaal, veelal ogief-vormig toegespitst, $(2,5-4,5) \times (4-7,5) \mu$, losliggend of twee aan twee; dunne huideilandjes en bezinksel.

Na 10 dagen 15° C. matte, gladde huid.

Streekcultuur: *Op moutagar na 8 dagen 15° C.* wit, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

Op moutagar na 6 weken 15° C. crème-geel, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. wit, mat, half hard, generfd, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Enkele boompjes met blastosporenapparaat.

Gelatineervloeiing: *Na 60 dagen 15° C.* negatief.

<i>Vergisting van:</i>		glucose (fr., m.)	+	
	galactose		—	maltose +
	saccharose		+	lactose —

<i>Suiker-assimilatie:</i>		glucose (fr., m.)	+	
	galactose		+ zwak	maltose +
	saccharose		+	lactose —

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+	zwak	asparagine	+
	kaliumnitriet	+	zwak	ureum	+
	ammoniumsulfaat	+		pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Vrij goede groei.

Stam Lc. IV.

De stam werd door den auteur in September 1938 uit „lambic”-sediment geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal of rond, sommige ogief-vormig toegespitst, voor de overgrootte meerderheid der cellen gelden de maten: $(2,5-4,5) \times (2,5-11) \mu$; verder veel langgerekte cellen, op pseudomycelium gelijkend; vrij onregelmatig celverband; huideilandjes en bezinksel.

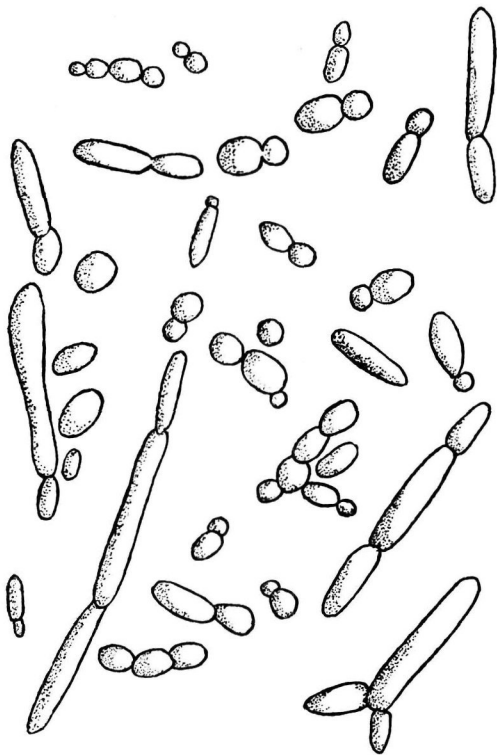


Fig. 9. (*Brettanomyces lambicus* Kufferath et van Laer). Vergr. 1000 \times .

Na 10 dagen 15° C. matte, gerimpelde huid.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. geel, mat, week, rand gerimpeld, weinig uitgespreid.

Op moutagar na 6 weken 15° C. zalmkleurig, mat, week, generfd, weinig uitgespreid.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. crème-geel, mat, week, ± glad, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Enkele boompjes met geringe neiging tot vorming van blastosporenapparaat.

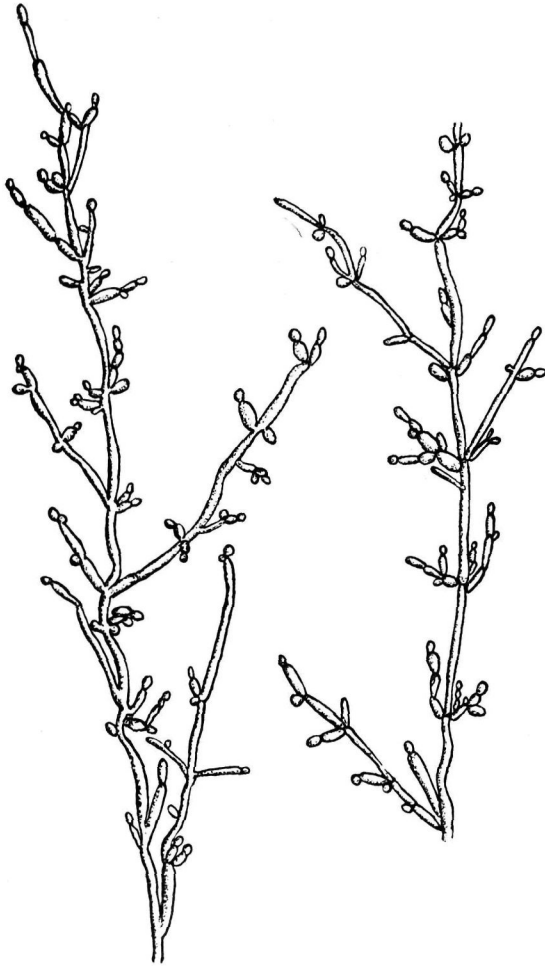


Fig. 10. (*Brettanomyces lambicus* Kufferath et van Laer). Vergr. 420 ×.

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:		glucose (fr., m.)	+	
	galactose	—		maltose +
	saccharose	+		lactose —

Suiker-assimilatie:		glucose (fr., m.)	+	
	galactose	?		maltose +
	saccharose	+		lactose —

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

N-assimilatie:	kaliumnitraat	+	zeer zwak	asparagine	+
	kaliumnitriet	+	zwak	ureum	?
	ammoniumsulfaat	+		pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Middelmatige groei.

Stam Lc. V.

De stam werd door den auteur in September 1938 uit „lambic”-sediment geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal of rond, voor de overgrootste meerderheid der cellen gelden de maten: $(2,5-4,5) \times (4-10) \mu$; verder enkele langgerekte cellen; onregelmatig celverband, veelzijdige knopvorming; zeer dun huidje en bezinksel.

Na 10 dagen 15° C. dunne, matte, gladde huid met gasbellen.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. wit, glanzend, week, ongeveer glad, weinig uitgespreid.

Op moutagar na 6 weken 15° C. geel, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. licht-geel, glanzend, week, rand fijne stralen, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Enkele primitieve boompjes van langgerekte cellen.

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:		glucose (fr., m.)	+	
	galactose	—		maltose +
	saccharose	+		lactose —

Suiker-assimilatie:		glucose (fr., m.)	+	
	galactose	?		maltose +
	saccharose	+		lactose —

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+ zwak
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Zeer zwakke groei.

Stam Lc. VI.

De stam werd door den auteur in September 1938 uit „lambic”-sediment geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen groot, eivormig, sommige ogief-vormig toegespitst, voor de overgrootte meerderheid der cellen gelden de maten: $(3-5,5) \times (3-15) \mu$; enkele langgerekte cellen; celverband 1 t/m 4; dikke, matte, gerimpelde huid en bezinksel.
Na 10 dagen 15° C. dikke, matte, sterk gerimpelde huid.

Streekcultuur: *Op moutagar na 8 dagen 15° C.* geel, mat, week, ± glad, weinig uitgespreid.

Op moutagar na 6 weken 15° C. geel, mat, week, rand licht-geel en glanzend.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. geel, half mat, week, fijn gerimpeld, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Enkele boompjes met blastosporenapparaat.

Gelatineervloeiing: *Na 60 dagen 15° C.* negatief.

<i>Vergisting van:</i>	glucose (fr., m.)	+		
	galactose	—	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

<i>Suiker-assimilatie:</i>	glucose (fr., m.)	+		
	galactose	+ zwak	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+ zwak	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+ zwak
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Vrij goede groei.

Stam Lc. VII.

De stam werd door den auteur in September 1938 uit „lambic”-sediment geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal of rond, voor de overgrootste meerderheid der cellen gelden de maten: $(2,5-5) \times (4-8) \mu$; daarnaast enkele langgerekte cellen; veelzijdige knopvorming, onregelmatig celverband; dunne huideilandjes en bezinksel.

Na 10 dagen 15° C. matte, gerimpelde huid.

Streekcultuur: *Op moutagar na 8 dagen 15° C.* geel, mat, week, witte gekartelde rand, weinig uitgespreid.

Op moutagar na 6 weken 15° C. als na 8 dagen.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. licht-geel, half mat, week, generfd, rand gekarteld, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Slechts zeer geringe neiging tot vorming van boompjes.

Gelatinevervloeiing: *Na 60 dagen 15° C.* negatief.

<i>Vergisting van:</i>		glucose (fr., m.) +		
	galactose	—	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

<i>Suiker-assimilatie:</i>		glucose (fr., m.) +		
	galactose	+ zeer zwak	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+ zwak	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Zwakke groei.

Stam Lc. VIII.

De stam werd door den auteur in September 1938 uit „lambic“-sediment geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal, sommige ogief-vormig toegespitst, voor de overgrootste meerderheid der cellen gelden de maten: $(2-5,5) \times (4,5-14) \mu$; enkele langgerekte cellen; kettingen van 2-4 cellen; enkele huideilandjes en bezinksel.

Na 10 dagen 15° C. matte, gladde huid.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. wit, mat, week, geplooide rand, weinig uitgespreid.
 Op moutagar na 6 weken 15° C. wit-geel, half glanzend, week, geplooid.
 Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. donkerbruin, mat, half hard, grof gerimpeld, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Slechts enkele langgerekte cellen.

Gelatineervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

<i>Vergisting van:</i>	glucose (fr., m.)	+		
	galactose	—	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

<i>Suiker-assimilatie:</i>	glucose (fr., m.)	+		
	galactose	?	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+	zwak	asparagine	+
	kaliumnitriet	+	zwak	ureum	+
	ammoniumsulfaat	+		pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Zeer zwakke groei.

Stam St. I.

De stam werd door den auteur in Januari 1939 uit „stout“-flesschenbier geïsoleerd.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen vrij klein, ovaal, sommige ogief-vormig toegespitst, $(2-4) \times (3,5-7) \mu$, meest losliggend of twee aan twee; geen huid; bezinksel.

Na 10 dagen 15° C. geen huid.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. licht-geel, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

Op moutagar na 6 weken 15° C. zalmkleurig, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. licht-geel, glanzend, week, glad, rand heel fijne uitloopers, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Geringe neiging tot pseudomyceliumvorming met primitief blastosporenapparaat.

Gelatineervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:	glucose (fr., m.)	+		
	galactose	—	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

Suiker-assimilatie:	glucose (fr., m.)	+		
	galactose	?	maltose	+
	saccharose	+	lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

N-assimilatie:	kaliumnitraat	+	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+ zeer zwak
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Zeer zwakke groei.

Stam St. II.

De stam werd door den auteur in Januari 1939 uit „stout“-flesschenbier geïsoleerd.

Groei in moutextract: Geen gisting.

Na 5 dagen 25° C. cellen ovaal of langwerpig, sommige ogievormig toegespitst; veel langgerekte cellen, op echt mycelium gelijkend; slijmige cultuur, geen huid.

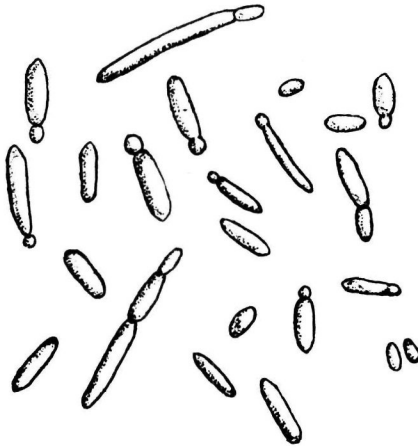


Fig. 11. (*Brettanomyces anomalus* nov. spec.). Vergr. 1000 ×.

Na 10 dagen 15° C. bezinksel, slijmige cultuur, zeer dun huidje.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. wit, in het midden ruw en week, rand met fijne uitloopers.

Op moutagar na 6 weken 15° C. licht-geel, half mat, in het midden ruw, rand met fijne, vast samenhangende uitloopers.

Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. donker-bruin, mat, in het midden week en ruw; rand hard, samenhangend en generfd.

Aardappelagar-cultuur: Uitloopers van smalle, langgerekte, vertakte cellen; aan één-cellig mycelium herinnerend¹⁾.

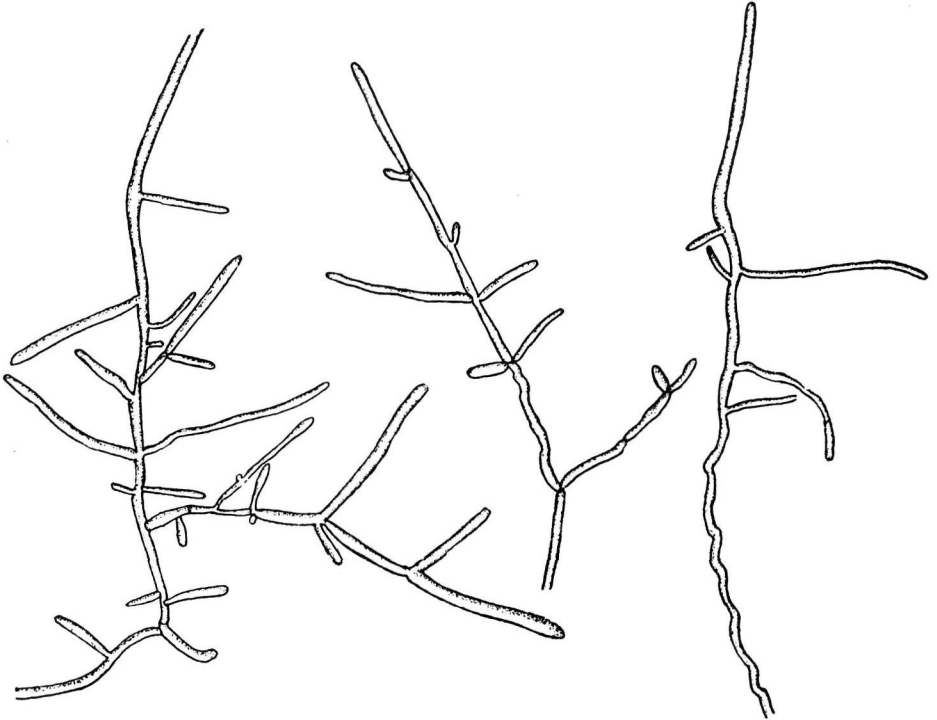


Fig. 12. (*Brettanomyces anomalus* nov. spec.). Vergr. 420 ×.

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

<i>Vergisting van:</i>	glucose (fr., m.)	+	maltose	—
	galactose	+	lactose	+
	saccharose	—		
<i>Suiker-assimilatie:</i>	glucose (fr., m.)	+	maltose	—
	galactose	+	lactose	+
	saccharose	+		

¹⁾ Wij hebben hier ongetwijfeld te doen met het onlangs door LANGERON en GUERRA beschreven verschijnsel van pseudo-kieming van blastosporen, waaraan deze onderzoekers den naam van „blastese” hebben verbonden (Vgl. M. LANGERON et P. GUERRA, Ann. d. Parasitol. 17, 447, 1940).

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

N-assimilatie:	kaliumnitraat	+	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+ zeer zwak
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Vrij goede groei.

Voor dezen stam moet even de aandacht worden gevestigd op het merkwaardige verschijnsel, dat blijkens de toegepaste onderzoekingsmethode saccharose niet werd vergist, niettegenstaande de auxanografische methode voor deze suiker een positief resultaat opleverde. Dit laatste is nauwelijks anders te interpreteren, dan door aan te nemen, dat deze gist in staat is het genoemde disaccharide in glucose en fructose te splitsen, doch indien dit zoo zou zijn, zou saccharose toch ook moeten worden vergist.

Dit verschijnsel kwam mij voor dermate paradoxaal te zijn, dat ik gemeend heb naar de oorzaak hiervan een meer diepgaand onderzoek te moeten instellen. Overeenkomstige waarnemingen waren toch reeds voor andere gistsoorten door verschillende onderzoekers verricht, welke onderzoekers evenwel de bewuste feiten grootendeels zonder enig commentaar hadden aanvaard.

Een en ander gaf aan het onderzoek een dergelijke uitbreiding, dat besloten werd de hierbij verkregen resultaten elders te publiceeren¹⁾. Hier zij slechts vermeld, dat dit onderzoek o.m. heeft uitgewezen, dat de hierboven beschreven stam wèl een zwak gistingsvermogen t.o.v. saccharose bezit, dat zich evenwel slechts manifesteert bij toepassing van methoden, welke van de standaardmethode merkbaar verschillen. In overeenstemming met LODDER (l.c.) meen ik intusschen deze uitkomst voor diagnostische doeleinden buiten beschouwing te moeten laten.

Brettanomyces spec. stam SHIMWELL.

Dr. J. L. SHIMWELL isoleerde deze cultuur uit Porter-bier van „The Cork Porter Brewery”.

Het „C. B. S.” ontving den stam van SHIMWELL in Mei 1938.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25° C. cellen vrij groot, ovaal of rond, sommige

¹⁾ A. J. KLUYVER and M. TH. J. CUSTERS, *Antonie van Leeuwenhoek* 6, 121, 1940.

ogief-vormig toegespitst, voor de overgrote meerderheid der cellen gelden de maten: $(3-6) \times (5-9) \mu$; verder enkele langgerekte cellen; onregelmatig celverband, veelzijdige knopvorming; geen huid; bezinksel.

Na 10 dagen 15°C . zeer dun, mat huidje.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15°C . wit, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.
Op moutagar na 6 weken 15°C . licht-geel, glanzend, week, \pm glad, weinig uitgespreid.
Op moutagar-krijt na 6 weken 15°C . iets zalmkleurig, glanzend, week, geplooid, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Geringe neiging tot pseudomyceliumvorming, slechts enkele boompjes met eenige aanleg voor vorming van blastosporen-apparaat.

Gelatineervloeiing: Na 60 dagen 15°C . negatief.

<i>Vergisting van:</i>	glucose (fr., m.)	+	
galactose	—	maltose	+
saccharose	+	lactose	—

<i>Suiker-assimilatie:</i>	glucose (fr., m.)	+	
galactose	+ zwak	maltose	+
saccharose	+	lactose	—

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+ zwak	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Zwakke groei.

Brettanomyces spec.

Het „C. B. S.” ontving den stam van het Skandinavisk Bryggeri Laboratorium te Kopenhagen in October 1939.

Groei in moutextract: Er treedt een langzame gisting in, welke evenwel zeer lang voortduurt.

Na 5 dagen 25°C . cellen ovaal, veelal ogief-vormig toegespitst, voor de overgrote meerderheid der cellen gelden de maten: $(2,5-4,5) \times (3,5-12) \mu$; daarnaast enkele langgerekte cellen; meest losliggend of twee aan twee; geen huid; bezinksel.

Na 10 dagen 15°C . geen huid.

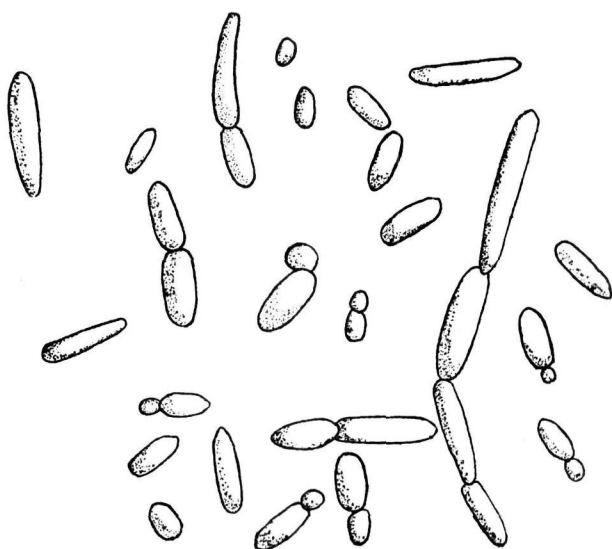


Fig. 13. (*Brettanomyces bruxellensis* var. *non-membranaefaciens* nov. var.).
Vergr. 1000 ×.

Streekcultuur: Op moutagar na 8 dagen 15° C. crème-achtig, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.
Op moutagar na 6 weken 15° C. geel, glanzend, week, ± glad, weinig uitgespreid.
Op moutagar-krijt na 6 weken 15° C. licht-geel, half mat, week, fijn gestraald, zuurvormend.

Aardappelagar-cultuur: Geringe neiging tot pseudomyceliumvorming.
(Vgl. Fig. 14).

Gelatinevervloeiing: Na 60 dagen 15° C. negatief.

Vergisting van:	glucose (fr., m.)	+
galactose	—	maltose +
saccharose	+	lactose —

Suiker-assimilatie:	glucose (fr., m.)	+
galactose	+ zeer zwak	maltose +
saccharose	+	lactose —

Zuurvorming uit glucose (volgens standaard-methode): Positief.



Fig. 14. (*Brettanomyces bruxellensis* var. *non-membranaefaciens* nov. var.).
Vergr. 420 ×.

<i>N-assimilatie:</i>	kaliumnitraat	+ zeer zwak	asparagine	+
	kaliumnitriet	+ zwak	ureum	+
	ammoniumsulfaat	+	pepton	+

Aethylalcohol als substraat: Matige groei.

HOOFDSTUK IV.

DE SYSTEMATISCHE POSITIE DER ONDERZOCHE STAMMEN.

§ 1. INLEIDENDE OPMERKINGEN.

In de voorafgaande hoofdstukken zijn de door mij uit lambic en de genoemde Engelsche bieren geïsoleerde giststammen, alsmede ook de kennelijk verwante van andere zijden verkregen cultures, korthedshalve als *Brettanomyces*-stammen aangeduid. Een dergelijke aanduiding impliceert in de eerste plaats de aanvaarding van een samenhoorigheid dezer stammen, maar voorts ook, dat deze samenhoorigheid reeds van andere zijde haar erkenning heeft gevonden door de vereeniging van dergelijke organismen in één geslacht, waaraan dan de naam *Brettanomyces* zou zijn gegeven.

Is het in dit opzicht ingenomen standpunt nu inderdaad gerechtvaardigd?

Om deze vraag te beantwoorden moeten wij nagaan, of de systematici reeds een geslacht *Brettanomyces* kennen en zoo ja, of dit geslacht zich bij de recente ontwikkeling der gistsystematiek heeft kunnen handhaven.

Wat het eerste punt betreft, moet er dan aan worden herinnerd, dat de naam *Brettanomyces* voor het eerst in 1904 door CLAUSSEN is gebruikt ter aanduiding van een door hem uit speciale Engelsche biersoorten geïsoleerde niet-sporevormende gistsoort, welke de „secondary fermentation” van deze biersoorten bewerkt. Om het belang dezer gist voor de Engelsche brouwindustrie goed te doen uitkomen, werd de naam *Brettanomyces* gekozen. Tot een juist begrip der situatie moet er evenwel op worden gewezen, dat CLAUSSEN aan deze benaming geen — of althans hoogstens een zeer ondergeschikte — systematische beteekenis hechtte. Hij spreekt toch duidelijk uit, dat hij de door hem geïsoleerde stammen rekent te behooren tot een speciale groep van het geslacht *Torula*. In

overeenstemming met deze zienswijze duidt ook SCHIØNNING in zijn belangrijke, in Hoofdstuk I reeds kort besproken, verhandeling de door hem onderscheiden typen van deze gisten respectievelijk als *Torula A* en *Torula B* aan.

Eerst GUILLIERMOND ¹⁾ is er toe overgegaan de „*Brettanomyces*”-gisten met een passenden soortnaam te vermelden. Op grond van den hierboven geschetsten gang van zaken stelt hij in het geslacht *Torula* een nieuwe soort op onder de benaming *Torula Brettanomyces*. De door hem voor deze soort gegeven beschrijving steunt geheel op de door CLAUSSEN en de door SCHIØNNING vastgestelde eigenschappen der door hen onderzochte stammen.

KUFFERATH en VAN LAER ²⁾ zijn de eerste onderzoekers geweest, die *Brettanomyces* als geslachtsnaam hebben gebruikt, hoewel hierbij dadelijk moet worden opgemerkt, dat deze geslachtsopstelling een zeer incidenteel karakter draagt. Een omschrijving der geslachtskenmerken wordt niet gegeven; feitelijk volstaan zij er mee aan een tweetal door hen uit lambic geïsoleerde gisttypen, welke groote overeenkomst met de door CLAUSSEN beschreven gisten vertoonden, de namen *Brettanomyces bruxellensis* en *Brettanomyces lambicus* te verbinden.

Sindsdien is *Brettanomyces* door verschillende schrijvers op gistsystematisch gebied als geslachtsnaam aanvaard. Zoo vermeldt KLÖCKER ³⁾ bij de systematische behandeling van de *fungi imperfecti* als 2de geslacht van de familie *Torulaceae* het geslacht: *Brettanomyces* Hjelte Claussen.

KLÖCKER eischt hier dus den auteursnaam van het geslacht op voor CLAUSSEN. Hoezeer de groote verdienste van dezen onderzoeker voor onze kennis van de bewuste organismengroep ook tenvolle moet worden erkend, nochtans lijkt deze handelwijze op grond van het hierboven uiteengezette formeel niet voldoende gerechtvaardigd en dienen aan den geslachtsnaam *Brettanomyces* de auteursnamen KUFFERATH en VAN LAER te worden verbonden.

Gezien de zoo uiterst incidenteele wijze, waarop *Brettanomyces* als geslacht in de gistsystematiek is ingevoerd, lijkt het niet overbodig te onderzoeken, of dit terecht is geschied. In de volgende

¹⁾ A. GUILLIERMOND, *Les levures*. Paris, 1912, p. 430.

²⁾ H. KUFFERATH et M. H. VAN LAER, *Bull. Soc. Chim. de la Belgique* **30**, 270, 1921.

³⁾ A. KLÖCKER, *Die Gärungsorganismen*. Berlin und Wien, 1924, p. 322 und 323.

paragraaf zal er naar worden gestreefd deze vraag mede op grond van de in het vorige hoofdstuk gerapporteerde uitkomsten van het onderzoek der aldaar vermelde stammen te beantwoorden.

§ 2. BESTAAT ER REDEN EEN AFZONDERLIJK GISTGESLACHT *BRETTANOMYCES* TE HANDHAVEN?

Bij de bestudeering der morphologische en physiologische eigenschappen der *Brettanomyces*-cultures is in de eerste plaats komen vast te staan, dat alle onderzochte stammen zonder uitzondering het vermogen tot vorming van ascosporen missen. Deze stammen moeten derhalve worden ondergebracht in de groote groep van de „anascosporogene gisten”. Wil nu *Brettanomyces* als een afzonderlijk geslacht worden gehandhaafd, dan moet worden nagegaan, of er inderdaad aanleiding bestaat, de onderzochte stammen op grond van het bezit van een bepaald eigenschappencomplex van de overige in de genoemde groep ondergebrachte gistsoorten afgescheiden te houden.

Om deze reden zullen allereerst de meest karakteristieke kenmerken, welke de onderzochte stammen gemeen hebben, hieronder kort worden samengevat.

Vóór alles wil ik dan het in morphologisch opzicht zoo belangrijke kenmerk van het vermogen tot pseudomyceliumvorming in beschouwing nemen.

Men vindt nu inderdaad bij alle onderzochte stammen van het voorkomen van dit vermogen melding gemaakt. Zooals evenwel uit de in Hoofdstuk III § 3 gegeven beschrijvingen blijkt, is dit vermogen bij de onderzochte stammen in den regel zeer weinig ontwikkeld. Met de methode van de voorwerpglasculures, welke zoo bij uitstek gunstig is gebleken voor het vaststellen van pseudomyceliumvorming, konden slechts na zeer lang cultiveeren, d.w.z. na 12—18 dagen, sporadisch als pseudomycelium te duiden uitloopers worden waargenomen. Om dit sobere resultaat te verkrijgen, moesten voor verschillende der onderzochte stammen meermalen nieuwe cultures worden aangelegd.

Zooals in Hoofdstuk III § 1 reeds is vermeld, was bovendien deze beperkte pseudomyceliumvorming geheel gebonden aan het gebruik van aardappelagar als medium, terwijl op peptonagar -2% glucose — het door RIVALIER en SEYDEL (l.c.) en eveneens door LODDER (l.c.) voor de voorwerpglasculures gebruikte medium

— door mij nimmer pseudomyceliumvorming werd waargenomen.

In dit verband dient er verder op te worden gewezen, dat — in tegenstelling tot het gedrag van de meeste pseudomyceliumvormende gisten, waarbij de boompjes langs de geheele lengte van den streep worden gevormd — de uitloopers slechts op die plekken van den streep verschenen, waar bij de enting een meer dan normale hoeveelheid gist was gedeponneerd. Toch trad ook op de dunnere plekken goede groei op; hierbij werd echter nooit eenige neiging tot pseudomyceliumvorming geconstateerd.

Voorts moet uiteraard aandacht worden geschonken aan den celvorm van de onderzochte stammen. Hierbij treft het nu, dat vele cellen aan één pool, sommige aan beide polen, ogief-vormig zijn toegespitst (Vergel.: Fig. 15). Deze karakteristieke celvorm

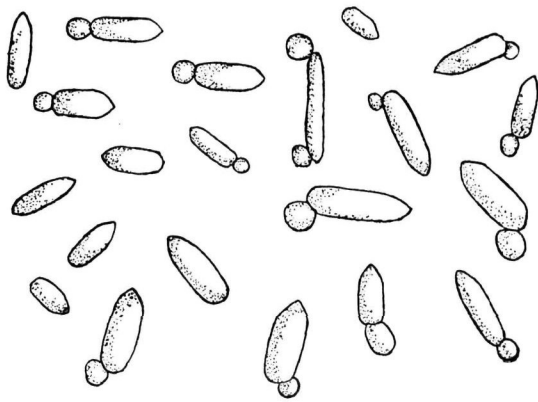


Fig. 15.

wordt, zoover mij bekend, bij de overige gistsoorten niet of slechts bij uitzondering aangetroffen. Bij deze uitspraak moet er op worden gewezen, dat de ogief-vorm principieel verschillend is van den bij sommige andere gistsoorten voorkomenden, tweezijdig toegespitsten ovaalvorm van het type: ().

Aan de hierboven genoemde kenmerken is nog het feit toe te voegen, dat de streekcultures op moutagar, welke vrij gauw een gele tot bruine tint aannemen, gekarakteriseerd zijn door een hoogen en weinig uitgespreiden groei.

Terwijl het hierboven beschreven complex van morphologische eigenschappen reeds sterk spreekt voor de natuurlijke verwantschap

der onderzochte stammen, wordt deze zienswijze nog krachtig gesteund door het op den voorgrond treden van speciale, zuiver physiologische kenmerken.

Als zoodanig is in de eerste plaats te noemen de voor gistsoorten opmerkelijk langzame groei in media als mout-extract, welke nochtans ook voor de *Brettanomyces*-gisten als optimaal gunstig moeten worden beschouwd. Gecorreleerd hiermede is een uiterst langzaam verloop der gisting in deze media, waarbij dan intusschen merkwaardigerwijze, blijkens de opgaven der vroegere onderzoekers, toch op den duur een abnormaal hooge eindvergiftingsgraad wordt bereikt.

In moutextract — evenals trouwens op moutagar — wordt een karakteristiek aroma gevormd; de betreffende cultures verspreiden een intens kruidachtigen geur, welke aan bisschopwijn doet denken.

Op de sterke zuurvorming in suikerhoudende media werd in het vorige hoofdstuk reeds bij herhaling en met nadruk de aandacht gevestigd.

Tenslotte is melding te maken van de, in vergelijking met andere gistcultures, zeer geringe houdbaarheid der normale moutagar-cultures. Blijkbaar sterven de cellen op dit medium snel af, een verschijnsel, dat wel zal samenhangen met de zoeven genoemde zuurvorming. In overeenstemming met deze zienswijze is de levensduur der cultures op krijthoudende media aanmerkelijk langer.

Op grond van het hierboven geschetste moet de primaire vraag, of de onderzochte stammen een natuurlijke groep vormen, naar mijn meening tenvolle bevestigend worden beantwoord.

Thans rest dus nog onder de oogen te zien, in hoeverre het hierboven genoemde eigenschappencomplex toelaat de bewuste natuurlijke groep van de bestaande geslachten van de groote groep der anascosporogene gisten rationeel af te grenzen.

LODDER (l.c.) onderscheidt in deze groep 3 families, nl. de *Nectaromycetaceae*, de *Torulopsidaceae* en de *Rhodotorulaceae*.

Daar bij de door mij onderzochte stammen geen vorming van karakteristieke conidiën wordt waargenomen en de cellen evenmin carotenoïde kleurstoffen bevatten, behooren de bestudeerde gisten tot de Familie der *Torulopsidaceae*. Deze familie is verdeeld in twee Onderfamilies, A. *Torulopsidoideae* en B. *Mycotoruloideae*. De eerste onderfamilie omvat de gisten, welke geen of slechts een

uiterst primitief pseudomycelium vormen, de tweede onderfamilie die, bij welke onder bepaalde voorwaarden een duidelijke pseudomyceliumvorming optreedt.

Gezien het feit, dat bij de in mijn onderzoek betrokken stammen het vermogen tot pseudomyceliumvorming, hoewel aanwezig, doorgaans toch slechts weinig geprononceerd is, bestaat er aanleiding om te toetsen, of deze stammen mogelijkerwijze bij één der geslachten van elk dezer onderfamilies kunnen worden ondergebracht.

In de *Torulopsidoideae* worden tot dusver onderscheiden de geslachten *Torulopsis* Berlese, *Pityrosporium* Sabouraud, *Mycoderma* Persoon emend. Leberle, *Kloeckera* Janke, *Asporomyces* Chaborski, *Trigonopsis* Schachner en *Schizoblastosporion* Ciferri.

Met uitzondering van *Torulopsis* en *Mycoderma* komen intusschen deze geslachten op grond van hun zeer karakteristieke morfologische eigenschappen reeds dadelijk niet voor verdere beschouwing in aanmerking.

Een aansluiting der bewuste stammen bij *Torulopsis* of bij *Mycoderma* is evenzeer te verwerpen, daar dit in de eerste plaats een miskenning zou beteekenen van den zoo typischen ogief-vorm, welke voor vele der cellen in de onderzochte cultures kenmerkend is. Hierbij komt dan het complex der physiologische eigenschappen, dat bij de vertegenwoordigers der beide genoemde geslachten evenmin wordt aangetroffen.

Tenslotte spreekt dan nog de aanwezigheid van een, weliswaar slecht ontwikkeld, vermogen tot vorming van pseudomycelium tegen een engere verwantschap als boven bedoeld.

Het is om deze laatste reden, dat LODDER (l.c.) zich reeds heeft uitgesproken ten gunste van een onderbrenging der *Brettanomyces*-gisten in de onderfamilie der *Mycotoruloideae*.

Sinds geruimen tijd is in het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” een nader systematisch onderzoek van alle tot deze onderfamilie behorende gistsoorten in bewerking, waarover binnenkort een verhandeling als 2de helft van het IIe deel der monographie — Die Hefesammlung des „Centraalbureau voor Schimmelcultures” — zal verschijnen. Kort geleden is aangaande dit onderzoek reeds een voorloopige mededeeling van DIDDENS en LODDER¹⁾

¹⁾ H. A. DIDDENS and J. LODDER, *Mycopathologia* 2, 1, 1939.

gepubliceerd, waarin wordt voorgesteld in de onderfamilie der *Mycotoruloideae* slechts twee geslachten te onderscheiden, nl. *Candida* Berkhout en *Trichosporon* Behrend. De gisten der *Brettanomyces*-groep worden daarbij in het geslacht *Candida* ondergebracht.

Dienaangaande valt in de eerste plaats op te merken, dat inderdaad van nauwere relaties tusschen de *Brettanomyces*-stammen en de vertegenwoordigers van het geslacht *Trichosporon* geen sprake is. Rest dus nog te beschouwen, of het anderzijds wenschelijk is de bewuste stammen met de zoo talrijke soorten van het geslacht *Candida* vereenigd te houden.

Reeds het feit, dat de overgrootte meerderheid dezer soorten gekenmerkt is door een geprononceerd vermogen tot vorming van pseudomycelium, pleit tegen deze zienswijze. Daar intusschen enkele, met typische *Candida*-soorten kennelijk tennauwste verwante, stammen eveneens slechts een spaarzaam mycelium vormen, is dit argument op zich zelf niet voldoende om een afscheiding te motiveeren. Combineert men evenwel het feit van het min of meer rudimentair blijven van het vermogen tot pseudomyceliumvorming der *Brettanomyces*-stammen met den meermalen genoemden karakteristieken celvorm en voorts met het zoo typeerende complex der physiologische eigenschappen, dan bestaat er mijns inziens alle reden om aan de beschouwde natuurlijke groep den rang van een geslacht toe te kennen.

Ter nadere motiveering zou ik nog het volgende willen opmerken.

Opneming der bestudeerde stammen, welke ten deele onderling vrij belangrijk afwijkende eigenschappen bezitten, in het geslacht *Candida* en vereeniging dezer stammen tot één soort, welke dan passend *Candida brettanomyces* zou kunnen worden genoemd, zou verschillende ongewenschte consequenties met zich brengen. In de eerste plaats zouden dan de, o.m. in gistingsvermogen ten opzichte der verschillende suikers, zoo uiteenlopende *Brettanomyces*-typen slechts als variëteiten kunnen worden onderscheiden. Maar voorts zou het een miskennis van den eisch eener natuurlijke verwantschap binnen het geslacht beteekenen, indien in *Candida* temidden van een aantal onderling niet essentieel verschillende soorten één soort zou voorkomen, welke zoowel door den ogievorm der cellen, als in het bijzonder ook door het complex der physiologische eigenschappen zoo geheel uit den toon zou vallen.

In dit verband wordt niet alleen gedacht aan de opmerkelijke eigenschap der zuurvorming en de daarmee waarschijnlijk nauw samenhangende, hoogst karakteristieke groei-eigenschappen, maar vooral ook aan het bij de *Brettanomyces*-stammen uitzonderlijk sterk ontwikkeld gistingsvermogen, dat zich in den hoogen eindvergistingsgraad der wortcultures, d.w.z. in de abnormaal sterke alcoholresistentie der cellen, uit. Al deze kenmerken contrasteeren scherp met hetgeen de beter bekende *Candida*-soorten in dit opzicht te zien geven. Wat het laatste kenmerk betreft, kan er op worden gewezen, dat het gistingsvermogen bij de *Candida*-soorten doorgaans slechts zwak of in het geheel niet is ontwikkeld, iets wat niet kan verwonderen, wanneer men beseft, dat juist in deze soorten zoo vele stammen worden ondergebracht, welke als parasiet of commensaal bij mensch of dier optreden.

Mocht men ondanks dit alles van oordeel zijn, dat de genoemde, in hoofdzaak van physiologischen aard zijnde, verschilpunten met den eisch van de natuurlijke verwantschap binnen het geslacht niet strijdig zijn, dan zou uiteraard nog kunnen worden overwogen *Brettanomyces* den rang van een subgenus binnen het geslacht *Candida* toe te kennen. Het hierboven genoemde bezwaar van de in variëteiten onvoldoende tot haar recht komende onderscheiding der verschillende *Brettanomyces*-typen zou hierdoor komen te vervallen. De practijk leert intusschen, dat subgenera voor niet streng geschoolde systematici een bron van hinderlijke verwarring vormen, zoodat m.i. reeds om deze reden ook een dergelijke oplossing geen aanbeveling verdient.

Op grond van al deze overwegingen lijkt het mij daarom voorloopig aangewezen, het geslacht *Brettanomyces* Kufferath et van Laer te handhaven en als derde geslacht, naast *Candida* en *Trichosporon*, in de onderfamilie der *Mycotoruloideae* onder te brengen.

Tenslotte moge nog één opmerking worden gemaakt.

Met het hierboven geleverde pleidooi voor de handhaving eener afscheiding tusschen de geslachten *Brettanomyces* en *Candida* heb ik geenszins willen zeggen, dat er tusschen deze beide geslachten geen natuurlijke verwantschap zou bestaan. In dit verband is er op te wijzen, dat bij *Mycotorula intermedia* het vermogen tot vorming van pseudomycelium met karakteristiek blastosporenapparaat in die mate is ontwikkeld, dat een nauwe verwantschap met sommige *Candida*-soorten onmiskienbaar aanwezig is. Anderzijds ver-

raadt het physiologische eigenschappencomplex van het genoemde organisme zijn groote verwantschap met de onderzochte *Brettanomyces*-stammen, iets waarop ook door de eerste beschrijvers der soort reeds de aandacht is gevestigd. Het is nu hoogst opmerkelijk, dat onder de onderzochte stammen *Mycotorula intermedia* de eenige is, welke een natuurlijke herkomst heeft; alle andere onderzochte cultures — en dit geldt ook voor alle overige in de literatuur beschreven stammen — zijn verkregen uit door menschenhand in stand gehouden technische bedrijven. Dit maakt het verleidelijk, al deze technisch toegepaste stammen te beschouwen als gedomesticeerde vormen van den stamvorm *Mycotorula intermedia*. De voortgezette cultuur van deze vormen onder de zoo eenzijdige voorwaarden, zooals deze in de brouwerijen zijn verwezenlijkt, zou dan hebben geleid tot een vrij belangrijk terugdringen van het vermogen tot pseudomyceliumvorming en het relatief op den voorgrond treden van den typischen ogief-vorm der cellen, alsmede tot het accentueeren van het gistingsvermogen met het daaraan verbonden verwerven eener krachtige resistentie tegen hooge alcoholconcentraties.

Indien deze zienswijze in de toekomst nader zou kunnen worden gedocumenteerd, zou er dus aanleiding bestaan het geslacht *Brettanomyces* te zien als een natuurlijke groep, ontstaan door een evolutie, welke haar uitgangspunt heeft genomen in een wellicht nog onbekende *Candida*-soort.

§ 3. DIAGNOSE VAN HET GESLACHT *BRETTANOMYCES*.

Alvorens over te gaan tot een beschouwing van de vraag, welke soorten in het geslacht *Brettanomyces* moeten worden onderscheiden, volgt hier allereerst een nadere omgrenzing van dit geslacht op grond van de in Hoofdstuk III beschreven morphologische en physiologische eigenschappen van de onderzochte stammen.

Brettanomyces Kufferath et van Laer.

Cellen ovaal of rond, veelal ogief-vormig toegespitst. Hiernaast ook langgerekte cellen. Vermeerdering door meerzijdige knopvorming leidende tot onregelmatig celverband. Zwakke neiging tot vorming van een weinig ontwikkeld pseudomycelium; zelden vorming van een primitief blastosporenapparaat. Vermogen tot

vorming van ascosporen ontbreekt. In moutextract langzame groei, in den regel gepaard met langzame, doch lang aanhoudende gisting; vorming van een bezinksel en al of niet van een huid; in dit medium, evenals op moutagar, vorming van een karakteristiek aroma. Onder aërobe voorwaarden krachtige zuurvorming uit suikers. Langzame groei en betrekkelijk vlug afsterven der cellen op moutagar; de cultures op moutagar-krijt en op gistagar-glucose-krijt iets langer houdbaar. Vermogen tot vergisting van suikers aanwezig. Kaliumnitraat, kaliumnitriet (in lage concentratie), ammoniumsulfaat, asparagine, ureum en pepton worden geassimileerd. In het aethylalcohol-medium zwakke tot matige groei, geen huidvorming.

§ 4. INDEELING DER ONDERZOCHE BRETTANOMYCES-STAMMEN IN SOORTEN.

Het is nu aangewezen de onderlinge verschillen en de punten van overeenkomst der onderzochte stammen na te gaan, teneinde de vraag te beantwoorden, welke uiteenlopende soorten daarin zijn te onderscheiden.

Het ligt hierbij voor de hand in de eerste plaats aandacht te schenken aan die cultures, welke het voor biergisten gebruikelijke gistingstype vertoonen, d.w.z. welke glucose (fr., m.), saccharose en maltose vergisten, doch lactose niet.

Tot deze categorie behooren ook de eerder genoemde, door KUFFERATH en VAN LAER uit lambic geïsoleerde *Brettanomyces*-stammen. In Hoofdstuk I is er reeds melding van gemaakt, dat deze onderzoekers hun stammen in twee groepen hebben verdeeld. De moutagar-cultures van het meerendeel der stammen waren glanzend. Hiertegenover stond een klein aantal stammen, die op moutagar karakteristieke, droge koloniën vormden, welke aan die van jonge kaamgist-cultures herinnerden.

KUFFERATH en VAN LAER vereenigden de eerstgenoemde stammen in één soort, namelijk *Brettanomyces bruxellensis*, terwijl zij de afwijkende stammen tot de soort *Brettanomyces lambicus* samenvoegden.

Bij een beschouwing der door mij onderzochte cultures trof het mij nu, dat onder de stammen van het beschouwde gistingstype er inderdaad een aantal waren, welke zich van alle overige onderscheidden door het droge, niet-glanzende uiterlijk der moutagar-

cultures. Dit geldt namelijk voor de uit lambic geïsoleerde stammen Lc. I, Lc. IV, Lc. VI en Lc. VII.

Het blijkt, dat deze cultures zich bovendien van de overige cultures van hetzelfde gistingstype onderscheiden door de vorming van een vrij stevige, matte, sterk gerimpelde huid, bij cultiveering in moutextract. De andere cultures vormen in dit medium, hetzij in het geheel geen, hetzij een dunne, gladde huid.

Onder deze omstandigheden bestaat er volop aanleiding de hierboven opgesomde stammen tot één soort te vereenigen, terwijl tevens niets zich tegen een identificatie met *Brettanomyces lambicus* verzet.

Op grond hiervan laat ik hieronder eerst een nadere omschrijving van deze soort volgen.

Brettanomyces lambicus Kufferath et van Laer ¹⁾.

Cellen ovaal of rond, daarnaast ook voorkomen van langgerekte cellen; veelal ogief-vormig toegespitst. Onregelmatig celverband. Zwakke neiging tot pseudomyceliumvorming; soms primitief blastosporenapparaat aanwezig. In moutextract langzame, doch lang aanhoudende gisting; bezinksel, vrij stevige, matte, sterk gerimpelde huid. Vergisting van glucose (fr., m.), saccharose en maltose. In een mineraal medium is groei met glucose (fr., m.), saccharose en maltose als C-bron mogelijk; met galactose soms zwakke groei. Kaliumnitraat, kaliumnitriet (in lage concentratie), ammoniumsulfaat, asparagine, ureum en pepton worden geassimileerd. In het aethylalcohol-medium zwakke tot vrij goede groei. Buiscultuur op moutargar (6 weken 15° C.) wit tot zwakgeel, droog en dof, week, soms zwak generfd, weinig uitgespreid.

Voor de overige stammen van het beschouwde gistingstype bestaat er alle reden om deze met *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer te identificeren.

Dit geldt uiteraard in de eerste plaats voor de van KUFFERATH ontvangen „stam lambic 103 G”, welke door dezen auteur zelf tot de genoemde soort is gebracht. Als practisch volledig identiek hiermede kunnen worden beschouwd de door mij uit lambic geïsoleerde stammen Lc. III en Lc. V, en de van SHIMWELL ontvangen „*Brettanomyces spec.*”.

¹⁾ Voor afbeeldingen zie men Fig. 9 en 10 (pag. 49 en 50).

Voor al deze stammen is nu karakteristiek, dat de moutagarcultures niet alleen glanzend, doch ook glad zijn, terwijl bij cultiveering in moutextract slechts een dunne, gladde huid wordt gevormd.

Hiernaast is melding te maken van het feit, dat een tweetal der onderzochte stammen, te weten de door mij uit „stout” geïsoleerde stam St. I en voorts de van het Skandinavisk Bryggeri Laboratorium te Kopenhagen ontvangen cultuur, weliswaar een geheel overeenkomstig beeld der moutagarcultures te zien geven, doch in zooverre een afwijkend gedrag vertoonen, dat zij bij cultiveering in moutextract in het geheel geen huid vormen.

Het lijkt aangewezen deze laatste stammen als een afzonderlijke variëteit van *Brettanomyces bruxellensis* te beschouwen, waarvoor de naam *non-membranaefaciens* passend lijkt te zijn.

Beschouwt men nu de nog resteerende cultures van het bewuste gistingstype — met uitzondering van *Mycotorula intermedia* — dan trekt het de aandacht, dat deze zich onderscheiden door de omstandigheid, dat de cultures op moutagar, hoewel zij glanzend zijn, vrij spoedig fijne rimpels vertoonen, welke op den duur tot een min of meer bloemkoolachtige plooiing leiden. Deze stammen zijn bovendien gekenmerkt door een zeer merkbaar langzameren groei op en in alle onderzochte media. Bij cultiveering in moutextract wordt ook weer een dunne, matte, gladde huid gevormd.

Het genoemde eigenschappencomplex wordt aangetroffen bij de stammen *Brettanomyces* spec. stam 1201 Carlsberg, *Brettanomyces* spec. stam Oudenaerde en bij de uit lambic geïsoleerde cultures Lc. II en Lc. VIII.

Het lijkt rationeel ook deze stammen als een afzonderlijke variëteit van *Brettanomyces bruxellensis* te beschouwen, waarvoor ik in verband met de zoo naar voren tredende eigenschap van den langzamen groei den naam *lentus* wil voorstellen.

Uiteindelijk moet dan nog aandacht worden geschonken aan *Mycotorula intermedia* Krumbholz et Tauschanoff. Deze cultuur doet haar naam in zooverre eer aan, dat zij in haar eigenschappen eenigszins tusschen de hoofdsoort *Brettanomyces bruxellensis* en de variëteit *lentus* in staat. Met de soort heeft zij den beteren groei gemeen, doch daarentegen vertoont de streekcultuur op moutagar een zekere neiging tot plooiing. Hoewel er voorts nog enkele andere kleine afwijkingen van de uit bier geïsoleerde stammen van *Brettanomyces bruxellensis* zijn te constateeren — zoo wordt bijv. galactose

krachtiger geassimileerd en zelfs ook zwak vergist — toch zijn deze verschillen te gering om een afscheiding van de genoemde soort, of zelfs maar de opstelling van een nieuwe variëteit te rechtvaardigen. Rekening houdende met de prioriteit, meen ik daarom het organisme van KRUMBHOLZ en TAUSCHANOFF als identiek met *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer te moeten beschouwen.

Hieronder laat ik de omschrijvingen van *Brettanomyces bruxellensis* en van de daarin onderscheiden variëteiten *non-membranaefaciens* en *lentus* volgen.

Brettanomyces bruxellensis Kufferath et van Laer ¹⁾.

Overwegend ovale cellen, veelal ogief-vormig toegespitst; ook voorkomen van ronde en langgerekte cellen. Onregelmatig celverband. Geringe neiging tot pseudomyceliumvorming, soms vorming van een blastosporenapparaat. In moutextract langzame, doch lang aanhoudende gisting; bezinksel, dunne, gladde huid. Vergisting van glucose (fr., m.), saccharose en maltose. In een mineraal medium is groei met glucose (fr., m.), saccharose en maltose als C-bron mogelijk; met galactose soms ook zwakke groei. Kaliumnitraat, kaliumnitriet (in lage concentratie), ammoniumsulfaat, asparagine, ureum en pepton worden geassimileerd. In het aethylalcoholmedium zwakke tot matige groei. Buiscultuur op moutagar (6 weken 15° C.) geel tot licht zalmkleurig, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

Brettanomyces bruxellensis var. *non-membranaefaciens* Custers ²⁾.

Deze variëteit onderscheidt zich van de soort hierin, dat bij groei in moutextract *geen* huid wordt gevormd.

Brettanomyces bruxellensis var. *lentus* Custers ³⁾.

Deze variëteit onderscheidt zich van de soort in de eerste plaats hierin, dat de streekcultuur op moutagar *niet glad*, doch karak-

¹⁾ Voor afbeeldingen zie men Fig. 1, 2, 7 en 8 (pag. 38, 39, 45 en 46).

²⁾ Voor afbeeldingen zie men Fig. 13 en 14 (pag. 59 en 60).

³⁾ Voor afbeeldingen zie men Fig. 5 en 6 (pag. 42 en 43).

teristiek *geplooid* is. Verder groeien de cultures in en op de verschillende media uitermate langzaam.

Thans resteert nog een nadere beschouwing van een tweetal stammen, welke op grond van een afwijkend gistingstype reeds dadelijk verraden, dat zij tot andere dan de tot dusver besproken soorten behooren.

Van deze beide stammen is er nu één, namelijk *Brettanomyces* spec. stam 1106 Carlsberg, welke onmiddellijk de aandacht trekt, doordat hij alle onderzochte suikers, te weten: glucose (fr., m.), galactose, saccharose, maltose en lactose vergist. Deze gistsoort vormt hiermede een hoogst opmerkelijke uitzondering op den veelvuldig vermelden empirischen vergistingsregel, volgens welken een gistsoort nimmer zoowel maltose als lactose vergist.

In dit verband is evenwel te vermelden, dat SCHIØNNING voor de door hem als *Torula B* aangeduide groep van *Brettanomyces*-gisten reeds het vermogen tot vergisting van maltose en lactose vaststelde.

Ook in verdere opzichten vertoont *Brettanomyces* spec. stam 1106 Carlsberg groote overeenkomst met *Torula B*, zooals die door SCHIØNNING is beschreven, zoodat met vrij groote zekerheid tot identiteit kan worden besloten.

SCHIØNNING is evenwel in gebreke gebleven aan deze gist een soortnaam te geven. Ik meen in den geest van dezen onderzoeker te handelen, door voor deze soort den naam *Claussenii* voor te stellen. SCHIØNNING toch verrichtte zijn onderzoek op instigatie van en in nauw contact met Dr. N. HJELTE CLAUSSEN, terwijl er ook overigens alle aanleiding bestaat op deze wijze uitdrukking te geven aan de verdiensten van dezen pionier-onderzoeker op het gebied der *Brettanomyces*-gisten.

Hieronder volgt nu een omschrijving van *Brettanomyces Claussenii* nov. spec.

Brettanomyces Claussenii Custers ¹⁾.

Cellen ovaal, veelal ogief-vormig toegespitst; daarnaast ook voorkomen van enkele langgerekte cellen. Meest losliggend of twee aan twee. Slechts zeer geringe neiging tot pseudomycelium-

¹⁾ Voor afbeeldingen zie men Fig. 3 en 4 (pag. 40 en 41).

vorming; geen blastosporenapparaat. In moutextract langzame, doch lang aanhoudende gisting; bezinksel, geen huid. Vergisting van glucose (fr., m.), galactose, saccharose, maltose en lactose. In een mineraal medium is groei met glucose (fr., m.), galactose, saccharose, maltose en lactose als C-bron mogelijk. Kaliumnitraat, kaliumnitriet (in lage concentratie), ammoniumsulfaat, asparagine, ureum en pepton worden geassimileerd. In het aethylalcohol-medium vrij goede groei. Buiscultuur op moutagar (6 weken 15° C.) geel, glanzend, week, glad, weinig uitgespreid.

Tenslotte blijft er dan nog één stam over, welke weer een ander gistingstype vertoont, in zooverre, dat glucose (fr., m.), galactose en lactose worden vergist, daarentegen maltose en saccharose¹⁾ niet. Dit geldt voor den uit „stout” geïsoleerden stam St. II.

Voorzoover bekend, is een *Brettanomyces*-stam, welke lactose wèl, doch maltose en saccharose niet vergist, tot dusver niet beschreven.

Aangezien de aanwezigheid van het vermogen om lactose en het gemis aan vermogen om maltose te vergisten voor een uit bier geïsoleerde gistsoort zeer van den norm afwijkend is, meen ik voor deze soort den naam *Brettanomyces anomalus* nov. spec. te mogen voorstellen.

Brettanomyces anomalus Custers²⁾.

Cellen ovaal, veelal ogief-vormig toegespitst of zeer langgerekt, soms pseudomycelium vormend. Op aardappelagar uitloopers van smalle, langgerekte, vertakte cellen (z.g. blastese). In moutextract geen gisting, slijmige cultuur, geen huid. Vergisting van glucose (fr., m.), galactose en lactose. In een mineraal medium is groei met glucose (fr., m.), galactose, saccharose en lactose als C-bron mogelijk. Kaliumnitraat, kaliumnitriet (in lage concentratie), ammoniumsulfaat, asparagine en pepton worden geassimileerd; ureum slechts zeer zwak. In het aethylalcohol-medium vrij goede groei. Buiscultuur op moutagar (6 weken 15° C.) licht-geel, half mat, in het midden ruw en week; rand met fijne, vast samenhangende uitloopers.

¹⁾ Wat deze laatste suiker betreft, vergelijkte men het voorbehoud gemaakt op pag. 57.

²⁾ Voor afbeeldingen zie men Fig. 11 en 12 (pag. 55 en 56).

Tot nader order is derhalve in het geslacht *Brettanomyces* met het voorkomen van de volgende soorten (en variëteiten) rekening te houden:

Brettanomyces bruxellensis Kufferath et van Laer.

- „ „ var. *non-membranaefaciens* nov. var.
 „ „ var. *lentus* nov. var.
 „ *lambicus* Kufferath et van Laer.
 „ *Claussenii* nov. spec.
 „ *anomalus* nov. spec.

Het lijkt voorts gewenscht, *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer als „type species” aan te wijzen. De van KUFFERATH afkomstige cultuur van deze soort wordt in de verzameling van het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” aangehouden.

Tenslotte laat ik dan hieronder nog een sleutel volgen, welke een snelle determineering dezer soorten mogelijk maakt.

*Sleutel ter bepaling van de soorten in het geslacht Brettanomyces
Kufferath et van Laer.*

1. a. Vergisting van glucose (fr., m.), galactose en lactose:
Brettanomyces anomalus Custers
- b. Vergisting van glucose (fr., m.), saccharose en maltose,
galactose niet of zeer zwak: (2)
- c. Vergisting van glucose (fr., m.), galactose, saccharose,
maltose en lactose:
Brettanomyces Claussenii Custers
2. a. Streekcultuur op moutagar dof, in moutextract een vrij
stevige, matte, sterk gerimpelde huid:
Brettanomyces lambicus Kufferath et
van Laer
- b. Streekcultuur op moutagar glanzend, in moutextract een
dunne, matte, gladde of in het geheel geen huid:
Brettanomyces bruxellensis Kufferath et
van Laer
Brettanomyces bruxellensis
var. *non-membranaefaciens* Custers
Brettanomyces bruxellensis var. *lentus*
Custers

Addendum.

Teneinde te voldoen aan Art. 38 van de „International Rules of Botanical Nomenclature” laat ik hieronder de Latijnsche diagnosen van de door mij aanvaarde — ten deele reeds eerder, doch slechts onvoldoende beschreven — soorten en variëteiten volgen. Volledigheidshalve laat ik hieraan de diagnose van het geslacht *Brettanomyces* voorafgaan ¹⁾.

Brettanomyces Kufferath et van Laer.

Cellulae ovoideae aut globosae, quaedam oblongae, plerumque „ogive” modo apicatae, ab omnibus partibus gemmas efformantes, catenam irregularem efficientes. Pseudomycelium primitivum cum blastosporis nullis aut minimis. Asci nulli. In musto maltato lente crescunt, plerumque cum fermentatione lenta, sed diuturna; formatur depositum, non semper pellicula. In musto maltato et in agaro maltato odor insignitus. In condicione aerobia vehementer acidum de saccharonibus formatur. Cellulae lente crescunt, relative celeriter moriuntur in agaro maltato, sed possunt vivere paulo longius in agaro maltato cum carbonate calcico et in agaro cerevisiae glucosato cum carbonate calcico. Fermentatio complurium saccharonum fit. Assimilatio nitratis potassii, nitrici potassii (in concentratione parva), sulfatis ammonici, asparaginae, urei, peptonis.

Brettanomyces bruxellensis Kufferath et van Laer.

Plerumque cellulae ovoideae, „ogive” modo apicatae, etiam globosae aut oblongae. Cellularum catena irregularis. Pseudomycelium primitivum, interdum cum blastosporis minimis. In musto maltato fermentatio lenta, sed diuturna; formatur depositum, pellicula tenuis et levis. Fermentatio glucosii (fructosii, mannosii), saccharosii, maltosii. In medio minerali cum glucosio (fr., m.), saccharosio, maltosio pro fonte carbonis cultura crescere potest, cum galactosio paene non crescit. Assimilatio nitratis potassii, nitrici potassii (in concentratione parva), sulfatis

¹⁾ Voor de bewerking dezer diagnosen betuig ik Mej. Dr. J. LODDER, Mej. Dr. H. A. DIDDENS, alsmede Mej. M. A. LINDENBURG (voor de taalkundige correctie), ook hier ter plaatse mijn welgemeenden dank.

ammonici, asparaginae, urei, peptonis. Cultura in agaro maltato in tubo (sex septimanas 15° C.) lutea aut subsalmonea, nitida, mollis, levis, paulum effusa.

Brettanomyces bruxellensis var. *non-membranaefaciens* Custers.

A specie differt: in musto maltato pellicula non formatur.

Brettanomyces bruxellensis var. *lentus* Custers.

A specie differt: cultura in agaro maltato in tubo non levis sed plicata, cellulae lentissime crescunt.

Brettanomyces lambicus Kufferath et van Laer.

Cellulae ovoideae aut globosae, quaedam oblongae, plerumque „ogive” modo apicatae. Cellularum catena irregularis. Pseudomycelium primitivum, interdum cum blastosporis minimis. In musto maltato fermentatio lenta, sed diuturna; formatur depositum et pellicula satis crassa, non nitida, rugosa. Fermentatio glucosii (fructosii, mannosii), saccharosii, maltosii. In medio minerali cum glucosio (fr., m.), saccharosio, maltosio pro fonte carbonis cultura crescere potest, cum galactosio paene non crescit. Assimilatio nitratis potassii, nitrici potassii (in concentratione parva), sulfatis ammonici, asparaginae, urei, peptonis. Cultura in agaro maltato in tubo (sex septimanas 15° C.) alba vel sublutea, sicca, non nitida, mollis, interdum paulum nervata, paulum effusa.

Brettanomyces Claussenii Custers.

Cellulae ovoideae, plerumque „ogive” modo apicatae, raro oblongae, plerumque singulae aut binae. Pseudomycelium primitivum, sine blastosporis. In musto maltato fermentatio lenta, sed diuturna; formatur depositum, sed pellicula non efformatur. Fermentatio glucosii (fructosii, mannosii), galactosii, saccharosii, maltosii, lactosii. In medio minerali cum glucosio (fr., m.), galactosio, saccharosio, maltosio, lactosio pro fonte carbonis cultura crescere potest. Assimilatio nitratis potassii, nitrici potassii (in concentratione parva), sulfatis ammonici, asparaginae, urei, peptonis. Cultura in agaro maltato in tubo (sex septimanas 15° C.) lutea, nitida, mollis, levis, paulum effusa.

Brettanomyces anomalus Custers.

Cellulae ovoideae aut oblongae, plerumque „ogive” modo apicatae. Pseudomycelium primitivum. Interdum cellulae valde elongatae ramosae (blastesis). In musto maltato fermentatio abest, cultura mucosa, pellicula abest. Fermentatio glucosii (fructosii, mannosii), galactosii, lactosii. In medio minerali cum glucosio (fr., m.), galactosio, saccharosio, lactosio pro fonte carbonis cultura crescere potest. Assimilatio nitratis potassii, nitrici potassii (in concentratione parva), sulfatis ammonici, asparaginae, peptonis (assimilatio urei minima est). Cultura in agaro maltato in tubo (sex septimanas 15° C.) sublutea, paulum nitens, in medio aspera et mollis; margo continuis fimbriis, firme cohaerentibus ornatus.

HOOFDSTUK V.

DE ANAËROBE DISSIMILATIE VAN GLUCOSE DOOR *BRETTANOMYCES CLAUSSENII*.

§ 1. ORIËNTEEREND ONDERZOEK.

In de voorafgaande hoofdstukken is afdoende gebleken, dat alle *Brettanomyces*-stammen het vermogen tot vergisting van suikers bezitten, doch dat hun stofwisseling anderzijds is gekenmerkt door de omstandigheid, dat onder daartoe passende voorwaarden uit glucose veel zuur wordt gevormd. Tevens is reeds in Hoofdstuk I opgemerkt, dat in de literatuur aangaande den aard van het gevormde zuur (of zuren!) allerminst zekerheid bestaat.

Om deze reden leek het van belang een nader onderzoek in te stellen naar de glucose-dissimilatie der *Brettanomyces*-gisten.

Bij de proefnemingen werd gebruik gemaakt van den eerder beschreven stam van *Brettanomyces Clausenii*, daar deze stam ongetwijfeld één der meest karakteristieke vertegenwoordigers van het geslacht is.

Allereerst overtuigde ik mij, dat deze stam geënt in buizen met gistwater-2% glucose, welke onder streng anaërobe voorwaarden gedurende enkele dagen bij 30° C. werden geplaatst, de suiker practisch volledig deed verdwijnen. Teneinde een indruk te krijgen, welke producten bij een dergelijke anaërobe vergisting der glucose werden gevormd, werd 800 cm³ cultuurvloeistof, aanwezig in een gistingskolf van 1 liter inhoud, geënt. Een proefneming op dergelijke schaal was noodig, daar voor een volledige analyse vrij veel cultuurmedium is vereischt.

Er trad een goede gisting in. Nadat deze was afgelopen, werd tot de kwalitatieve analyse der gistingsvloeistof overgegaan. Een gedeelte van het medium werd geneutraliseerd en hiervan met behulp van een spijkeropzet $\pm 2/3$ afgedestilleerd. De eerste druppels van het destillaat werden op acetaldehyde onderzocht met behulp van de reactie van RIMINI; de rest van het destillaat op

aethylalcohol met behulp van de jodoform-reactie volgens LIEBEN. De jodoform-reactie werd eveneens uitgevoerd met ammoniak-oplossing in plaats van met natronloog, teneinde eventueel aanwezig aceton aan te toonen.

Alleen aethylalcohol kon worden aangetoond, de uitslag der reacties op acetaldehyde en aceton was negatief.

De na destillatie der vluchtige producten overblijvende vloeistof werd met 25%-ig zwavelzuur aangezuurd op congorood-papier tot $\text{pH} = \pm 3,5$, waarna met stoom $\pm 500 \text{ cm}^3$ werd overgedestilleerd. Dit destillaat bleek geen zuur te bevatten.

Het residu van de destillatie der vluchtige zuren werd met soda-oplossing geneutraliseerd, op een waterbad tot bijna droog ingedampt, waarna 2 cm^3 50%-ig zwavelzuur werd toegevoegd. Hierop werd de geheele massa met watervrij natriumsulfaat tot een droog poeder aangewreven. Dit poeder werd vervolgens in een SOXHLET-apparaat gedurende 8 uren met aether geëxtraheerd, waarna de aether werd afgedampt. Het overblijvende residu werd opgelost in 100 cm^3 96%-igen alcohol. Door een gedeelte hiervan met water te verdunnen en te titreeren volgens de methode, zooals door BERTRAND en THOMAS ¹⁾ voor melkzuur is aangegeven, werd naar de eventueele aanwezigheid van niet-vluchtig zuur gezocht. De titratie komt hierop neer, dat men een overmaat loog van bekende sterkte toevoegt, vijf minuten op een temperatuur even beneden het kookpunt verwarmt en vervolgens na afkoeling de overmaat loog met 0,1 n zwavelzuur terugtitreert.

Ofschoon er een kleine hoeveelheid niet-vluchtig zuur werd aangetoond, bleek later uit de quantitative proeven, dat de hierbij gevonden waarde gelijk was aan die, welke werd verkregen bij het onderzoek van het niet-geënte medium.

De reacties op acetylmethylcarbinol en op 2,3-butyleenglycol volgens LEMOIGNE en SCHEFFER gaven eveneens negatieve resultaten.

Het kwalitatieve onderzoek wees dus voorloopig uit, dat onder anaërobe voorwaarden in gistwater-glucose alleen koolzuur en aethylalcohol worden gevormd.

Teneinde dit nader te bewijzen, leek het wenschelijk een quanti-

¹⁾ G. BERTRAND et P. THOMAS, Guide pour les manipulations de chimie biologique. 2me Ed. Paris, 1913. p. 156.

tatief onderzoek te verrichten en in aansluiting hierop gistingsbalansen op te stellen. Ter vergelijking geschiedde dit ook voor een reïncultuur van persgist.

§ 2. INRICHTING DER PROEVEN EN TOEGEPASTE ANALYSE-METHODEN.

De uitvoering der proefnemingen was steeds dezelfde. 800 cm³ cultuurvloeistof werden in een gistingskolf van 1 liter inhoud gedurende 20 à 25 minuten bij 110° C. gesteriliseerd. Op de kolf was door middel van een slijpstuk een kraantrechtter aangebracht, terwijl aan den glazen opzet zich tevens een zijbuis bevond, waaruit het gevormde gas kon ontwijken. De kraantrechtter was naar beneden verlengd met een glasbuis, welke tot ongeveer op den bodem der kolf reikte. Zoowel de vultrechtter als de afvoerbuis konden met een kraantje worden afgesloten. De rechtter en de monding van de afvoerbuis werden van wattenproppen voorzien.

Na sterilisatie werd de kolf zoo heet mogelijk uit den autoclaaf genomen en onmiddellijk aan een stikstof-bombe aangesloten, zoodat tijdens het afkoelen de kolf zich geleidelijk met stikstof, welke eerst nog door een waschflesch met alkalische pyrogallol-oplossing streek, vulde. Aan de anaërobe voorwaarden was op die manier practisch volledig voldaan. Na afkoelen op kamertemperatuur werd met 15 cm³ dikke gistsuspensie door den rechtter geënt, waarna met steriel water werd nagespoeld.

De suspensie werd bereid, door den genoemden stam te enten in een kolfje met 35 cm³ moutextract, bij 30° C. gedurende ± 5 dagen te cultiveeren, de bovenstaande vloeistof af te gieten, de dikke gist met 20 cm³ steriel water te wasschen, na bezinking af te gieten en de bezonken gist in 15 cm³ steriel water te suspenderen.

De afvoerbuis van de kolf werd verbonden met een z.g. bellen-tellertje, waarin zich een weinig kwik bevond. Hierachter volgden 2 U-buisjes gevuld met chloorcalcium om de gasvormige producten te drogen, 3 U-buisjes gevuld met natronkalk om koolzuur op te vangen, welke natronkalk door doorleiding van droge koolzuurvrije lucht bij 30° C. was voorgedroogd. Hierna kwam een U-buisje met chloorcalcium, waarin het eventueel uit de natronkalk-buisjes ontwijkende water werd opgenomen, en daarachter nog een U-buisje met chloorcalcium en een met natronkalk om koolzuur en water uit de lucht tegen te houden.

De eerstgenoemde chloorcalcium-buisjes, dus de buisjes tusschen den bellenteller en de natronkalk-buisjes, werden tevoren met koolzuur verzadigd, door anderhalf uur koolzuur door te leiden; daarna werd wederom koolzuurvrije lucht doorgeleid tot er geen koolzuur meer ontweek.

De geheele beschreven apparatuur was in een ruimte met constante temperatuur van 30° C. opgesteld.

Zoodra de gisting was geëindigd, werd de kolf \pm 10 minuten geschud en daarna met koolzuurvrij (uitgekookt) gedestilleerd water bijgevuld. Hierop werd direct achter de kolf een waschflesch met sterk zwavelzuur ingeschakeld en vervolgens werd ruim 1 uur koolzuurvrije lucht door de kolf geleid, om het opgeloste vrije koolzuur zooveel mogelijk in de natronkalk-buisjes te drijven, waardoor verlies bij het openen der kolf wordt voorkomen. Daarna werd de inhoud van de kolf tot een bekend volume aangevuld en tot de quantitative analyse overgegaan.

De verschillende bepalingen werden in hoofdzaak uitgevoerd volgens de methoden, welke in de dissertaties van BRAAK ¹⁾ en van VAN DER LEK ²⁾ zijn beschreven. Ik volsta hier dus met de volgende opmerkingen.

De gevormde aethylalcohol werd bepaald volgens beide in genoemde verhandelingen beschreven methoden, nl. èn met den pycnometer èn volgens NORTHROP.

Daar bij de kwalitatieve analyse slechts zeer geringe hoeveelheden niet-vluchtige zuren konden worden aangetoond, werden in de na afdestilleeren der vluchtige neutrale producten overgebleven vloeistof eventueel aanwezige vluchtige en niet-vluchtige zuren gezamenlijk bepaald door aether-extractie van het tevoren aangezuurde milieu, zooals door VIRTANEN ³⁾ is aangegeven.

Ter contrôle werden in het niet-geënte medium eveneens aethylalcohol en zuur bepaald. Hiertoe werd een passende hoeveelheid cultuurvloeistof van dezelfde samenstelling in een Erlenmeyer tegelijk met het te enten medium gesteriliseerd, en in de aldus verkregen vloeistof de analyse verricht. De hierbij gevonden geringe hoeveelheden werden bij het opmaken der balansen in mindering gebracht.

¹⁾ H. R. BRAAK, *Onderzoekingen over vergisting van glycerine*. Delft, 1928.

²⁾ J. B. VAN DER LEK, *Onderzoekingen over de butylalcoholgisting*. Delft, 1930.

³⁾ A. I. VIRTANEN, *Acta Chemica Fennica A*, **6**, 1933.

Uit de uitgegiste vloeistof werd in alle gevallen afgestreken op peptonagar- en op moutagar-platen, welke vervolgens 48 uren bij 30° C. werden bebroed. Een en ander geschiedde om zekerheid te verkrijgen, dat tijdens de eigenlijke gistingsproef geen infectie was ingetreden. Indien uitzonderingsgewijze wel infectie had plaats gevonden, werden de inmiddels verkregen analyse-resultaten vanzelfsprekend buiten beschouwing gelaten.

§ 3. QUANTITATIEVE PROEVEN AANGAANDE DE VERGISTING VAN GLUCOSE.

Bij de eerste proefneming werd als cultuurvloeistof een 2%-ige oplossing van glucose in gistwater gebruikt. De vergisting verliep vrij vlot. Na 4 dagen was de gasontwikkeling volledig afgelopen en één dag later werd met de analyse begonnen. De resultaten hiervan zijn in Tabel I samengevat.

TABEL I.

Anaërobe dissimilatie van *Brettanomyces Clausenii* in gistwater-2 % glucose; temp. 30° C.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.	Aantal m.Mol. per 100 m.Mol. vergiste glucose	M.Aeq. „beschikbare waterstof”	„Beschikbare waterstof” in procenten
Toegevoegde glucose	17,015					
Onvergiste glucose	0,989					
Vergiste glucose	16,026	100	89,0	100	2136	100
Koolzuur	6,928	29,5	157,5	177,0		
Aethylalcohol . .	8,940	72,8	194,3	218,3	2331,6	109,2
Totaal		102,3				109,2

Behalve de in Tabel I genoemde reactieproducten, werd een kleine hoeveelheid zuur aangetroffen. Deze hoeveelheid was echter nog iets kleiner dan die van de blancobepaling in gistwater, zoodat met zekerheid kan worden aangenomen, dat er tijdens de gisting geen zuur was gevormd.

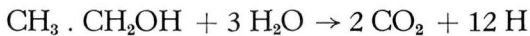
De alcohol werd op de beide genoemde methoden bepaald, nl. met den pycnometer en volgens de methode NORTHROP. Hierbij werden volkomen overeenstemmende waarden verkregen, waaruit ik voorloopig besloot, dat het verkregen destillaat alleen aethylalcohol bevatte. Dat er geen andere primaire alcoholen waren gevormd, werd bovendien op de volgende wijze bevestigd.

10 cm³ van het destillaat werden in een drukfleschje met 15 cm³ van een verzadigde kaliumbichromaat-oplossing in 20%-ig zwavelzuur gedurende één uur bij 50° C. verwarmd. De primaire alcoholen worden hierbij tot de overeenkomstige zuren geoxydeerd. Na afkoelen werd met gedestilleerd water tot ± 400 cm³ verdund, waarna deze vloeistof aan een stoomdestillatie werd onderworpen.

De hierna uitgevoerde destillatie volgens DUCLAUX wees uit, dat de door stoomdestillatie verkregen vloeistof alleen azijnzuur bevatte.

Voor de in Tabel I weergegeven berekeningen verwijs ik naar een publicatie van BARKER ¹⁾. Kolommen 1 en 2 behoeven geen nadere verklaring. Kolom 3 geeft de in de producten teruggevonden hoeveelheid koolstof aan in procenten van de koolstof der vergiste glucose. Kolom 4 vermeldt de waargenomen hoeveelheden millimolen glucose en reactieproducten, terwijl kolom 5 deze hoeveelheden per 100 millimolen vergiste glucose aangeeft.

In kolom 6 zijn de milli-aequivalenten „beschikbare waterstof” opgegeven. Onder „beschikbare waterstof” verstaat men het aantal atomen waterstof, dat per molecuul vrijkomt bij volledige dehydrogenatie van het molecuul tot koolzuur. Dit, vermenigvuldigd met het aantal millimolen, geeft dus de milli-aequivalenten „beschikbare waterstof”, bijv.:



De specifieke factor voor aethylalcohol is bijgevolg 12. Het getal

¹⁾ H. A. BARKER, Proc. Kon. Akad. v. Wet. Amsterdam **39**, 674, 1936.

194,3 uit kolom 4 moeten wij dus met 12 vermenigvuldigen en krijgen dan: $194,3 \times 12 = 2331,6$ in kolom 6.

Kolom 7 geeft hetzelfde aan, maar nu in procenten van de „beschikbare waterstof” van de vergiste glucose. Het is duidelijk, dat in beginsel zoowel de koolstof als de beschikbare waterstof quantitatief in de reactieproducten moeten worden teruggevonden. Op deze wijze krijgen we dus naast de koolstofbalans ook een oxydo-reductie-balans.

Bij beschouwing van de 3e en de 7e kolom blijkt, dat de voor de gistingproducten in totaal verkregen getallen wat grooter zijn dan 100, nl. ruim 102 en ruim 109.

Vergelijkt men verder in de 4e kolom de aantallen millimolen koolzuur en aethylalcohol, dan blijkt, dat er 36,8 millimolen alcohol meer zijn gevormd.

Alvorens hieraan echter eenige conclusie te verbinden zullen hier eerst nog de resultaten van een tweede onder dezelfde voorwaarden uitgevoerde vergisting worden vermeld. De duur dezer proef was 7 dagen. De resultaten zijn in Tabel II opgenomen.

TABEL II.

Anaërobe dissimilatie van *Brettanomyces Claussenii* in gistwater-2% glucose; temp. 30° C.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.	Aantal m.Mol. per 100 m.Mol. vergiste glucose	M.Aeq. „beschikbare waterstof”	„Beschikbare waterstof” in procenten
Toegevoegde glucose	16,320					
Onvergiste glucose	0,618					
Vergiste glucose	15,702	100	87,2	100	2093	100
Koolzuur	6,581	28,6	149,6	171,6		
Aethylalcohol	8,467	70,3	184,1	211,1	2209,3	105,6
Totaal		98,9				105,6

Er blijkt weer meer alcohol te zijn gevormd dan koolzuur, het surplus bedraagt ditmaal 34,5 millimolen.

Uiteraard draagt deze beide malen waargenomen afwijking van de voor de normale gistingsreactie kenmerkende verhouding dezer producten, nl. van 1 : 1, een eenigszins verrassend karakter.

Teneinde na te gaan, of deze afwijking inderdaad reëel is en niet op rekening van analysefouten moet worden gesteld, besloot ik eveneens een gistingsbalans op te stellen voor een meer gewone gistsoort, waarvoor ik *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, uitkoos. Hierbij werd dezelfde cultuurvloeistof gebruikt als bij de vorige proeven; de enting geschiedde eveneens op dezelfde wijze. De duur der proef was 5 dagen. De resultaten zijn hieronder in Tabel III weergegeven.

TABEL III.

Anaërobie dissimilatie van *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, in gistwater- 2% glucose; temp. 30° C.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.	Aantal m.Mol. per 100 m. Mol. vergiste glucose	M.Aeq. „beschikbare waterstof”	„Beschikbare waterstof” in procenten
Toegevoegde glucose	16,000					
Onvergiste glucose	0,186					
Vergiste glucose	15,814	100	87,9	100	2110	100
Koolzuur	6,804	29,3	154,6	175,9		
Aethylalcohol .	7,357	60,7	159,9	181,9	1918,8	90,9
Totaal		90,0				90,9

Het treft hier, dat zoowel het koolstofrendement als het rendement aan „beschikbare waterstof” beneden 100% blijven.

Het belangrijkste is evenwel, dat het verschil in aantal millimolen aethylalcohol en koolzuur hier zoo gering is, dat het binnen de foutengrens blijft.

Wij mogen hieruit besluiten, dat het bij de *Brettanomyces*-gistingen waargenomen surplus aan alcohol niet aan analysefouten is toe te schrijven. Dan rijst echter de vraag, of dit surplus inderdaad uit de vergiste suiker afkomstig is, dan wel uit organische bestanddeelen van het gistwater. Dit punt zal in de volgende paragraaf nader ter sprake komen.

De voornaamste conclusie, welke wij voorloopig uit de hierboven beschreven proefnemingen kunnen trekken, is, dat bij vergisting van glucose door *Brettanomyces Claussenii* onder de genoemde voorwaarden geen zuur wordt gevormd.

Ik heb me nu afgevraagd of toevoeging van krijt aan het medium zuurvorming tengevolge zou hebben. Zooals reeds in Hoofdstuk III is vermeld, toonden FERNBACH en SCHOEN aan, dat bij de dissimilatie van suikers door bepaalde gistsoorten belangrijke hoeveelheden pyrodruivenzuur worden gevormd, indien men de vergisting laat verlopen in een mineraal medium, waaraan 5% krijt is toegevoegd. Het medium werd op deze wijze op een pH van 6,8—6,9 gehouden. Bij afwezigheid van krijt verkregen de genoemde onderzoekers met dezelfde gistsoorten geen pyrodruivenzuur.

Ofschoon de vergistingen in de minerale media onder aërobe voorwaarden plaats vonden, besloten zij uit hun proefnemingen, dat hiermede het experimenteele bewijs was geleverd voor het optreden van pyrodruivenzuur als tusschenproduct bij de alcoholische vergisting van suiker. Bij de proeven bij aanwezigheid van krijt zou dan een gedeelte van dit tusschenproduct als calciumpyruvaat worden vastgelegd.

Deze zienswijze is intusschen aanvechtbaar, omdat de pyrodruivenzuurvorming onder anaërobe voorwaarden niet was te verwezenlijken, zoodat er meer reden zou zijn om te besluiten, dat het pyrodruivenzuur tusschenproduct bij de oxydatie van de suiker is.

Hier kan direct worden opgemerkt, dat bij de door mij genomen proefnemingen met *Brettanomyces Claussenii* onder de door

FERNBACH en SCHOEN aangegeven voorwaarden slechts sporen pyrodruivenzuur konden worden aangetoond. Niettemin bestond er alle reden de glucosevergisting door *Brettanomyces Claussenii* onder anaërobe voorwaarden ook bij aanwezigheid van krijt na te gaan.

Om een indruk te krijgen, in hoeverre het mogelijk was glucose in krijthoudende media quantitatief door *Brettanomyces Claussenii* te laten vergisten, werden buizen met gistwater-2% glucose, waaraan verder 2% krijt was toegevoegd, met deze gistsoort geënt en onder anaërobe voorwaarden gecultiveerd. Merkwaardigerwijze was evenwel in deze buizen na 6 dagen nog geen gisting ingetreden, terwijl in contrôle-buizen zonder krijt na 2 dagen reeds volop gasontwikkeling was waar te nemen.

Daar het niet uitgesloten scheen, dat deze mislukking was toe te schrijven aan een ongunstige werking van het krijt op bepaalde bestanddeelen van het gistwater, besloot ik te trachten de anaërobe vergisting in tegenwoordigheid van krijt in een in hoofdzaak mineraal medium te laten verlopen. Alle ervaringen, welke met *Brettanomyces*-cultures tot dusver waren verkregen, maakten het intuschen waarschijnlijk, dat deze gistsoorten een sterke behoefte aan „bios”-componenten zouden hebben. Om deze reden werd aan het minerale medium steeds een hoeveelheid gistaautolysaat toegevoegd, dat op de volgende manier was bereid.

1 kg persgist werd met 1 liter leidingwater tot een dikke pap fijngewreven, deze pap 24 uur in den thermostaat bij 50° C. geplaatst, daarna opgekookt, gefiltreerd, met loog op pH = 6,0 gebracht, nogmaals opgekookt, gefiltreerd en gesteriliseerd.

Teneinde de minimum hoeveelheid toe te voegen gistaautolysaat vast te stellen, werd de volgende voorloopige proevenserie ingezet.

Buizen met leidingwater, waaraan 2% glucose, 0,5% ammoniumsulfaat, 2% krijt en verschillende hoeveelheden gistaautolysaat waren toegevoegd, werden geënt met *Brettanomyces Claussenii*. Er werd onder anaërobe voorwaarden bij 30° C. gecultiveerd. Per cm³ bevatte het medium dus 20 mg glucose; na 4 dagen werd de nog aanwezige glucose bepaald. De resultaten zijn in Tabel IV samengevat.

TABEL IV.

Invloed van toenemende hoeveelheden gistautolysaat op de vergisting van glucose (2%) door *Brettanomyces Claussenii* in leidingwater, waaraan verder was toegevoegd 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 2% krijt; temp. 30° C.

pH vóór de enting	Aantal cm ³ gistautolysaat per 20 cm ³ cultuurvloeistof	Na 4 dagen nog aanwezige glucose in mg per cm ³
8,2	0,3	15,5
7,9	0,6	12,1
7,6	1,0	10,4
7,4	2,0	7,6
7,2	3,0	6,5

Uit de getallen in Tabel IV blijkt, dat 2,0 cm³ autolysaat per 20 cm³ cultuurvloeistof voldoende is om een behoorlijke vergisting te verkrijgen.

Een afzonderlijke proevenserie leerde, dat toevoeging van fosfaat (KH_2PO_4) aan het medium geenszins bevorderlijk was. Blijkbaar wordt door het gistautolysaat voldoende in de fosfaatbehoefte voorzien.

Met het hierboven optimaal bevonden medium werden nu weer eenige quantitative vergistingsproeven verricht.

De gebruikte apparatuur en de bij het onderzoek toegepaste methoden waren in hoofdzaak dezelfde als in § 2 werden beschreven.

Slechts de bepaling van het bij de gisting gevormde koolzuur was uiteraard in de krijt-houdende media ietwat gecompliceerder. Het gevormde koolzuur is hier de hoeveelheid in de natronkalkbuisjes opgevangen koolzuur + de hoeveelheid vrij, als carbonaat en als bicarbonaat na de gisting aanwezig koolzuur, verminderd met de hoeveelheid koolzuur, als carbonaat en bicarbonaat aanwezig vóór de enting.

Om deze laatste hoeveelheid te bepalen werd tegelijk met de eigenlijke gistingskolf een Erlenmeyer, welke hetzelfde medium bevatte, gesteriliseerd, waarna in deze vloeistof de hoeveelheid als

carbonaat en bicarbonaat aanwezig koolzuur, alsmede ook de beginconcentratie van de glucose en de pH werden bepaald. Ook werden in deze vloeistof blanco-bepalingen van alcohol en zuur verricht.

In de volgende tabellen zijn de uitkomsten der blanco-bepalingen reeds in rekening gebracht.

Bij het onderzoek der uitgegiste vloeistof op de aanwezigheid van eventueel gevormde zuren moest nog met het volgende rekening worden gehouden. Nadat de alcohol was afgedestilleerd, werd het krijt afgefiltreerd, alvorens de vloeistof op de aanwezige zuren werd onderzocht. Dientengevolge werd hierbij alleen aandacht geschonken aan zuren met in water oplosbare calciumzouten. De mogelijkheid mocht echter niet worden verwaarloosd, dat er een zuur zou zijn gevormd, waarvan het calciumzout in water onoplosbaar is.

Reeds dadelijk moge worden opgemerkt, dat dit bij de hieronder beschreven proefnemingen niet het geval was. Het bleek toch, dat, indien het op het filter achterblijvende, hoofdzakelijk uit calciumcarbonaat bestaande, neerslag werd opgelost in verdund zoutzuur en deze oplossing vervolgens met ammoniak weer alkalisch werd gemaakt, er slechts een zeer geringe troebeling ontstond.

Daar het was gebleken, dat in de voorloopige proefnemingen in buizen de vergisting in het medium met krijt langzamer verliep dan in het eerder gebruikte medium zonder krijt, werd bij de balansen met krijt met de dubbele hoeveelheid gistsuspensie geënt.

Tabel V geeft de resultaten van de vergisting van glucose door *Brettanomyces Claussenii* in het bovengenoemde medium. De duur der proef was 10 dagen, de vergisting verliep overigens normaal.

TABEL V.

Anaërobe dissimilatie van *Brettanomyces Claussenii* in leidingwater, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% krijt, 10% gistautolysaat; pH vóór de enting = 7,70; temp. 30° C.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.	Aantal m.Mol. per 100 m.Mol. vergistte glucose	M.Aeq. „beschikbare waterstof”	„Beschikbare waterstof” in procenten
Toegevoegde glucose	14,953					
Onvergistte glucose	0,528					
Vergistte glucose	14,425	100	80,1	100	1922	100
Koolzuur	6,126	29,0	139,2	173,8		
Aethylalcohol .	6,825	61,7	148,4	185,3	1780,8	92,7
Totaal		90,7				92,7

Ter contrôle werd een tweede gisting ingezet, waarvan de resultaten in Tabel VI volgen. De duur dezer proef was 10 dagen.

De uitkomsten in Tabel VI zijn in goede overeenstemming met die vermeld in Tabel V.

Uit de beide laatste proefnemingen blijkt dus, dat ook bij aanwezigheid van krijt, koolzuur en aethylalcohol de eenige gistingsproducten zijn. Er werden noch vluchtige, noch niet-vluchtige zuren aangetroffen.

Ook bij deze vergistingen overtreft het aantal millimolen aethylalcohol weer dat van het koolzuur; het verschil is hier evenwel belangrijk geringer dan bij de vergistingen in gistwater.

Voorts dient te worden opgemerkt, dat in het onderzochte milieu zowel het koolstofrendement als het rendement aan „beschikbare waterstof”, in tegenstelling met wat de overeenkomstige proefnemingen in gistwater te zien gaven, aanmerkelijk beneden 100% blijven. In de volgende paragraaf wordt hierop teruggekomen.

TABEL VI.

Anaërobe dissimilatie van *Brettanomyces Claussenii* in leidingwater, waaraan werd toegevoegd 3% glucose, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% krijt, 10% gistautolysaat; pH vóór de enting = 7,75; temp. 30° C.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.	Aantal m.Mol. per 100 m.Mol. vergiste glucose	M.Aeq. „beschikbare waterstof”	„Beschikbare waterstof” in procenten
Toegevoegde glucose	22,500					
Onvergiste glucose	0,525					
Vergiste glucose	21,975	100	122,1	100	2930	100
Koolzuur	9,167	28,4	208,3	170,6		
Aethylalcohol .	10,020	59,5	217,8	178,4	2613,6	89,2
Totaal		87,9				89,2

§ 4. WAARNEMINGEN AANGAANDE DE SURPLUS-ALCOHOLVORMING DOOR *BRETTANOMYCES CLAUSSENII*.

In de vorige paragraaf werd de mogelijkheid geopperd, dat het bij de vergisting van glucose door *Brettanomyces Claussenii* in gistwater — en in mindere mate ook in het minerale medium met gistautolysaat — optredende surplus van alcohol t.o.v. koolzuur niet uit de vergiste suiker afkomstig zou zijn, maar uit de organische bestanddeelen der in deze media verwerkte gist.

Teneinde dit na te gaan, lag het in de eerste plaats voor de hand te trachten de glucose-vergisting in een meer verdund gistwater door te voeren.

Voorloopige proeven, waarbij *Brettanomyces Claussenii* werd geënt in buizen, welke een 2%-ige glucose oplossing in verschillende verdunningen van gistwater bevatten en welke bij

30° C. onder anaërobe voorwaarden werden gecultiveerd, gaven de in Tabel VII samengevatte uitkomsten.

TABEL VII.

Glucose-vergisting door *Brettanomyces Claussenii* in gistwater van verschillende verdunning, waaraan 2% glucose werd toegevoegd; temp. 30° C.

2% glucose in:	Na 6 dagen nog aanwezige glucose per cm ³ (in mg)
Onverdund gistwater	5,4
Gistwater 10 : 10	9,5
Gistwater 6 : 14	8,4
Gistwater 2 : 18	14,9

Gistwater 10 : 10 beteekent: 10 gistwater op 10 leidingwater; voor de volgende verdunningen geldt een overeenkomstige notatie. Per cm³ uiteindelijke cultuurvloeistof waren steeds 20 mg glucose opgelost.

De verkregen uitkomsten zijn niet erg bevredigend; een medium met verdund gistwater schijnt te arm te zijn aan bepaalde voor de *Brettanomyces*-gist noodzakelijke voedingsstoffen.

Er werd nu getracht dit tekort op te heffen door toevoegen van fosphaat en ammoniumsulfaat. Bovendien werd in enkele der volgende proefjes het verdunde gistwater vervangen door leidingwater, waaraan kleine hoeveelheden „Marmite” (geautolyseerde gist) werden toegevoegd. De beginconcentratie der glucose was wederom 20 mg per cm³.

Tabel VIII geeft de hiermede verkregen resultaten weer.

Hieruit zien wij, dat inderdaad in een medium verkregen door toevoeging van fosphaat en ammoniumsulfaat aan verdund gistwater, de glucose practisch volledig tot vergisting kan worden gebracht. Toevoeging van „Marmite” aan een zuiver mineraal medium leverde daarentegen niet het gewenschte resultaat op.

Het bij de volgende quantitative proefnemingen gebruikte medium werd nu verkregen door in 200 cm³ gistwater + 600 cm³

TABEL VIII.

Glucose-vergisting door *Brettanomyces Claussenii* in media van uiteenlopende samenstelling; temp. 30° C.

Samenstelling medium: 2% glucose in:	Na 5 dagen nog aanwezige glucose per cm ³ (in mg)
Leidingwater 0,1% KH ₂ PO ₄ ; 0,5% (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,05% Marmite	12
Leidingwater 0,1% KH ₂ PO ₄ ; 0,5% (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1% Marmite	10
Verdund gistwater 1 : 3; 0,1% KH ₂ PO ₄ ; 0,5% (NH ₄) ₂ SO ₄	3,4
Verdund gistwater 2 : 5; 0,1% KH ₂ PO ₄ ; 0,5% (NH ₄) ₂ SO ₄	1,5

leidingwater, 0,1% KH₂PO₄, 0,5% ammoniumsulfaat en 2% glucose op te lossen.

De eerste proef verliep vlot. Na 2 dagen kon reeds volop gasontwikkeling worden waargenomen, welke na 6 dagen ophield. Na 7 dagen werd tot de analyse overgegaan.

De resultaten hiervan volgen in Tabel IX.

TABEL IX.

Anaërobe dissimilatie van *Brettanomyces Claussenii* in gistwater 1:3, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,1% KH_2PO_4 en 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; temp. 30° C.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.	Aantal m.Mol. per 100 m.Mol. vergiste glucose	M.Aeq. „beschikbare waterstof”	„Beschikbare waterstof” in procenten
Toegevoegde glucose	16,000					
Onvergiste glucose	0,109					
Vergiste glucose	15,891	100	88,3	100	2119	100
Koolzuur	6,611	28,4	150,3	170,2		
Aethylalcohol .	7,210	59,2	156,7	177,5	1880,4	88,7
Totaal		87,6				88,7

Uit Tabel IX blijkt nu, dat door gebruik van verdund gistwater het waargenomen surplus aan alcohol sterk is gereduceerd in vergelijking met de bij de proefnemingen met niet-verdund gistwater gevonden hoeveelheden (Tabellen I en II). Tevens liggen, evenals bij de proeven met *Saccharomyces cerevisiae* in onverdund gistwater (Tabel III) en ook bij die met *Brettanomyces Claussenii* in het minerale medium met krijt (Tabellen V en VI), zoowel het koolstofrendement als het rendement aan „beschikbare waterstof” in de nabijheid van 90%.

Alvorens hier nader op in te gaan, zal ik eerst in Tabel X de resultaten laten volgen, welke met een tweede gisting in verdund gistwater werden verkregen en waarvan eveneens een gistingsbalans werd opgesteld.

Bij deze proefneming verliep de vergisting iets langzamer, zoodat eerst na 10 dagen tot de analyse kon worden overgegaan.

TABEL X.

Anaërobe dissimilatie van *Brettanomyces Claussenii* in gistwater 1 : 3, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,1% KH_2PO_4 en 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; temp. 30° C.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.	Aantal m.Mol. per 100 m.Mol. vergistte glucose	M.Aeq. „beschikbare waterstof”	„Beschikbare waterstof” in procenten
Toegevoegde glucose	16,000					
Onvergistte glucose	0,046					
Vergistte glucose	15,954	100	88,6	100	2126	100
Koolzuur	6,648	28,4	151,1	170,5		
Aethylalcohol .	7,491	61,2	162,8	183,7	1953,6	91,9
Totaal		89,6				91,9

De Tabellen IX en X komen zeer goed overeen. Ook in Tabel X is het verschil tusschen de millimolen aethylalcohol en koolzuur veel geringer dan bij de gistingen in verdund gistwater.

Het resultaat der beide laatste proefnemingen geeft een sterke aanwijzing, dat het in de eerste proefnemingen geconstateerde surplus aan alcohol boven het koolzuur niet uit de vergistte suiker is ontstaan, doch uit bestanddeelen van het gistwater.

Aanvaardt men deze veronderstelling en onttrekt men dus de surplus hoeveelheid alcohol aan de in de Tabellen I en II vermelde koolstofbalansen, dan ondergaan hierdoor de cijfers de in Tabel XI aangegeven wijzigingen:

TABEL XI.

	koolstofbalans	
	oorspronkelijk	gecorrigeerd
Tabel I . . .	102,3	88,5
Tabel II . . .	98,9	85,7

Men ziet uit de in Tabel XI genoemde cijfers, dat in de veronderstelling, dat de surplus-alcohol niet uit de suiker afkomstig is, de koolstofbalansen een nagenoeg even groot tekort te zien geven, als dit het geval is bij de normale glucose-vergisting door *Saccharomyces cerevisiae* en bij de glucose-vergisting door *Brettanomyces Claussenii* in de verdunde gistwatermedia en in de media met gistaulyfaat.

Nu is een dergelijk tekort ook onafwijsbaar te verwachten, daar bij de balansen geen rekening is gehouden met het feit, dat een deel der verdwenen glucose is geassimileerd, d.w.z. voor de vorming van nieuw celmateriaal is verbruikt. Dat dit deel der verdwenen glucose 10—15% van de totale hoeveelheid bedraagt, is ongetwijfeld onder de gekozen proefvoorwaarden een zeer aannemelijke uitkomst.

Overigens moge hieraan dadelijk worden toegevoegd, dat de toegepaste correctie, mede in verband met de in de overige balansen naar voren tredende analysefouten, uiteraard slechts een benaderend karakter kan dragen.

De conclusie, dat het surplus aan alcohol niet uit de suiker afkomstig is, vindt haar bevestiging in de resultaten, welke met de hieronder weergegeven proefnemingen werden verkregen, waaraan de volgende gedachtengang ten grondslag lag.

Ent men twee even groote hoeveelheden cultuurmedia, waarin verschillende hoeveelheden glucose zijn opgelost, doch welke overigens van geheel dezelfde samenstelling zijn, met gelijke hoeveelheden van eenzelfde gistsuspensie en laat men de glucose in deze media vergisten, dan moet — indien bovenstaande conclusie juist is — het surplus komen te vervallen bij die uitkomsten, welke men verkrijgt door de bij analyse van de beide gistingen verkregen hoeveelheden reactieproducten van elkaar af te trekken.

Als cultuurvloeistof werd een medium van dezelfde samenstelling gebruikt als bij de in de vorige paragraaf beschreven proefnemingen met krijt, met dien verstande, dat verschillende hoeveelheden glucose werden opgelost. De totale hoeveelheid cultuurvloeistof bedroeg in beide gevallen 800 cm³.

De resultaten der gistingen zijn in Tabel XII vereenigd.

TABEL XII.

Anaërobe dissimilatie van *Brettanomyces Clausenii* in leidingwater, waaraan werd toegevoegd 0,5% (NH₄)₂SO₄, 2% krijt, 10% gistautolysaat en verder verschillende hoeveelheden glucose; temp. 30° C.

I		II	
	Grammen		Grammen
Toegevoegde glucose	7,373	Toegevoegde glucose	14,630
Onvergiste glucose	0,133	Onvergiste glucose	0,220
Vergiste glucose	7,240	Vergiste glucose	14,410
Koolzuur	2,788	Koolzuur	6,354
Aethylalcohol	3,402	Aethylalcohol	7,050

Met de getallen, welke men verkrijgt door de uitkomsten van I van die van II af te trekken, werd nu een koolstof- en een oxydo-reductie-balans opgemaakt, waarvan de resultaten in Tabel XIII zijn weergegeven.

TABEL XIII.

Balans, berekend uit de verschillen der uitkomsten van de proefnemingen, weergegeven in Tabel XII.

II— I						
	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.	Aantal m.Mol. per 100 m.Mol. vergiste glucose	M.Aeq. „beschikbare waterstof”	„Beschikbare waterstof” in procenten
Vergiste glucose	7,170	100	39,8	100	955	100
Koolzuur	3,566	33,9	81,1	203,8		
Aethylalcohol .	3,648	66,4	79,3	199,2	951,6	99,6
Totaal		100,3				99,6

In Tabel XIII is het aantal millimolen aethylalcohol nagenoeg gelijk aan dat van koolzuur, hetgeen dus inhoudt, dat uit de vergiste glucose gelijke aantallen millimolen koolzuur en aethylalcohol zijn ontstaan en wel aantallen, welke het dubbele zijn van dat der millimolen vergiste glucose.

Hier geldt dus practisch volledig de normale gistingvergelijking:



Het treft voorts, dat zoowel het koolstofrendement als het rendement aan „beschikbare waterstof” nagenoeg 100% bedragen, hetgeen beteekent, dat onder de gegeven omstandigheden bij beide gistingen evenveel glucose voor de vorming van nieuw celmateriaal is verbruikt.

Tot dusver is aangenomen, dat het bij de afzonderlijke balansen waargenomen surplus aan alcohol inderdaad uitsluitend aethylalcohol is. Het feit, dat de DuCLaux-reeks van het bij de oxydatie volgens Northrop gevormde zuur, met die van azijnzuur overeenstemde, spreekt zeker tengunste van die opvatting. Een en ander

zou inhouden, dat *Brettanomyces* uit bepaalde bestanddeelen van het gistwater, respectievelijk van het gistautolysaat, aethylalcohol vormt, zonder dat daaraan eenige koolzuurproductie is gekoppeld.

Dit is intusschen een moeilijk verklaarbaar iets.

Tegen de voor de hand liggende veronderstelling, dat door de *Brettanomyces*-gist abnormaal groote hoeveelheden der normale foeselalcoholen zouden worden gevormd, pleit in de eerste plaats, dat dit dan tot uiting had moeten komen in de DuCLAUx-reeks van het bij de oxydatie volgens NORTHROP gevormde zuur.

Ook indien men zou willen aannemen, dat de hoeveelheden der gevormde hoogere zuren te gering zouden zijn om bij de analyse naar voren te treden, dan zou hiermede het verkregen resultaat nog niet zijn opgehelderd. Immers bij de vorming der foeselalcoholen uit de aminozuren komt steeds per molecule alcohol ook een molecule koolzuur vrij.

Wij moeten dus wel besluiten, dat *Brettanomyces Claussenii* een nog onbekende omzetting van één of meer gistwaterbestanddeelen bewerkstelligt.

§ 5. SAMENVATTING DER RESULTATEN.

De in dit hoofdstuk verkregen resultaten kunnen als volgt kort worden samengevat.

Onder streng anaërobe voorwaarden voltrekt de vergisting van glucose door *Brettanomyces Claussenii* zich op dezelfde wijze als de vergisting van deze suiker door gewone persgist, *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. Uit 1 molecuul glucose ontstaan 2 moleculen aethylalcohol en 2 moleculen koolzuur. Zuurvorming heeft niet plaats, evenmin worden nog andere reactieproducten gevormd.

Ook bij toevoeging van krijt aan het medium werd geen zuurproductie waargenomen.

Bij de vergisting van glucose door *Brettanomyces Claussenii* in gistwater en in een medium, hetwelk gistautolysaat bevatte, werd een extra hoeveelheid aethylalcohol gevormd, welke uit organische bestanddeelen van het gistwater en van het gistautolysaat moet zijn ontstaan, zonder dat hieraan merkwaardigerwijze eenige koolzuurproductie was gekoppeld.

HOOFDSTUK VI.

DE OXYDATIEVE DISSIMILATIE VAN GLUCOSE DOOR *BRETTANOMYCES CLAUSSENI*.

§ 1. ORIËNTEEREND ONDERZOEK.

In het vorige hoofdstuk is gebleken, dat bij de vergisting van glucose door *Brettanomyces Claussenii* onder anaërobe voorwaarden geen zuur wordt gevormd. Hiertegenover staat het feit, dat in aërobe buiscultures op moutagar-krijt en op gistagar-glucose-krijt een min of meer volledig oplossen van het krijt plaats vindt. Het lag dus voor de hand thans proefnemingen te verrichten aangaande de zuurvorming bij toetreding van zuurstof en dit zoowel bij aanwezigheid als bij afwezigheid van krijt.

Om een eersten indruk te verkrijgen van den invloed van de zuurstof op de suikerstofwisseling werden 150 cm³ cultuurvloeistof in een Erlenmeyer van 500 cm³ inhoud geënt met *Brettanomyces Claussenii* en vervolgens gedurende enkele dagen in een schudmachine bij 30° C. geschud. Deze schudmethode¹⁾ brengt een intensieve menging van de cultuurvloeistof met lucht teweeg. Als medium gebruikte ik een oplossing van 2% glucose, 0,5% ammoniumsulfaat en 0,1% KH₂PO₄ in verdund gistwater, hetzelfde medium, dat ook bij enkele der voorafgaande quantitative vergistingsproeven was gebruikt. De Erlenmeyer was afgesloten met een wattenprop, waardoor een kort glazen buisje stak, om eventueel verstoppingen door nat worden van den wattenprop te voorkomen.

Na 5 dagen schudden werd het medium op eventueel nog aanwezige glucose onderzocht; deze bleek evenwel volledig te zijn verdwenen. Verder werd kwalitatief op de aanwezigheid van vluchtige en niet-vluchtige zuren gereageerd. Hiertoe werd na afdestilleeren van den alcohol, zooals bij de anaërobe proeven be-

¹⁾ Men zie hiervoor: L. H. C. PERQUIN, Bijdrage tot de kennis der oxydatieve dissimilatie van *Aspergillus niger* van Tieghem. Delft, 1938.

schreven, de rest met 25%-ig zwavelzuur aangezuurd op $\text{pH} = 3,5$, hierna aan een stoomdestillatie onderworpen en het destillaat getitreerd met 0,1 n bariet-oplossing. Uit deze titratie bleek, dat er inderdaad vluchtig zuur was gevormd.

Het geneutraliseerde destillaat werd op een waterbad ingedampt tot $\pm 30 \text{ cm}^3$, overgespoeld in een maatcilinder van 100 cm^3 , aangezuurd met de berekende hoeveelheid zwavelzuur, met gedistilleerd water aangevuld tot een volume van 100 cm^3 en hierin na bezinken van het gevormde bariumsulfaat de destillatie volgens DUCLAUX, in den uitvoeringsvorm van VAN DER LEK (l. c.), verricht. Het destillaat werd in porties van 20 cm^3 opgevangen en getitreerd met 0,05 n bariet-oplossing.

De volgende reeks werd gevonden:

Destillaat in cm^3	Verbruikte cm^3 0,05 n bariet-oplossing	% van totaal zuur in 100 cm^3 destillaat
20	7,50	15,5
40	15,75	32,4
60	24,90	51,3
80	35,40	73,0
100	48,50	100,0

Deze reeks ligt het dichtste bij die van zuiver azijnzuur; dit zuur kon verder ook worden aangetoond met behulp van de kakodyl-reactie.

De bij de stoomdestillatie achtergebleven vloeistof werd op niet-vluchtige zuren onderzocht. Het resultaat was echter negatief.

Daar het waarschijnlijk was, dat de geconstateerde aërobe zuurvorming door aanwezigheid van krijt in het medium nog zou kunnen worden opgevoerd, leek het gewenscht na te gaan, of onder aërobe voorwaarden in hetzelfde medium met krijt een goede verwerking van de glucose kon worden verkregen. Evenals bij de anaërobe proefnemingen bleek echter geenerlei ontwikkeling in het krijthoudende medium plaats te hebben.

Om deze reden werd de schudproef herhaald in het bij de anaërobe proefnemingen deugdelijk gebleken medium bestaande uit 2% glucose, 0,5% ammoniumsulfaat, 10% gistautolysaat en 2% krijt in leidingwater. Ter contrôle werd bij twee der vier proefnemingen geen krijt toegevoegd.

In de cultures zonder krijt was de glucose na 3 dagen schudden bij 30° C. wederom practisch geheel verdwenen; in de media met krijt werd evenwel het teleurstellend resultaat verkregen, dat aan het einde der proef de glucose nog quantitatief aanwezig was.

In het medium zonder krijt werden alcohol, vluchtige en niet-vluchtige zuren quantitatief bepaald volgens de in § 2 van dit hoofdstuk aangegeven analyse-methoden. Het bleek hierbij, dat ongeveer 15% van de verdwenen glucose als vluchtige zuren werd teruggevonden, niet-vluchtige zuren waren niet gevormd; de gevonden hoeveelheid alcohol was vrij gering. Vermoedelijk is door het schudden de alcohol gedeeltelijk uit de Erlenmeyers ver-vluchtigd. De DUCLAUX-destillatie der vluchtige zuren wees wederom op zuiver azijnzuur.

Uit deze proeven is dus gebleken, dat door aëreeren bij de om-zetting van glucose door *Brettanomyces Clausenii*, behalve kool-zuur en alcohol, ook azijnzuur wordt gevormd.

Intusschen kwam het er op aan, na te gaan, waarom het minerale medium met autolysaat-toevoeging bij aanwezigheid van krijt geen ontwikkeling van de gist toeliet, terwijl toch dit medium bij de in Hoofdstuk V beschreven anaërobe proefnemingen althans in den regel goed had voldaan.

Het dienaangaande ingestelde onderzoek bracht nu evenwel een verschijnsel aan het licht, dat mij tot dusver was ontgaan. Bij de in het vorige hoofdstuk beschreven proefnemingen was de hoeveelheid vergiste glucose steeds vastgesteld door bepaling van de hoeveelheid van deze suiker vóór en na de vergisting. Bij de nu ondernomen proeven meende ik aanvankelijk de bepaling der beginconcentratie te kunnen ontgaan door de hoeveelheid in de kolven gebrachte zeer zuivere glucose (C. P. van Pfanstiehl, 0,5% H₂O) nauwkeurig af te wegen. Contrôle-bepalingen leerden mij evenwel spoedig, dat de toegevoegde glucose in het gesterili-seerde medium geenszins quantitatief kon worden teruggevonden.

Naar aanleiding hiervan heb ik mij allereerst de vraag voorge-legd, in hoeverre er kans bestond, dat de in het vorige hoofdstuk opgestelde balansen een correctie zouden moeten ondergaan in verband met het feit, dat aan de gistingkolven meer glucose was toegevoegd dan op grond van de bepaling der aanvangsconcentratie is aangenomen.

Het komt mij voor, dat dit niet het geval is. Immers in Tabel XIII,

welke een berekening geeft van het verschil van twee balansen, werd zowel een koolstofrendement als een rendement aan „beschikbare waterstof” van rond 100% verkregen. Aangezien bij de sterilisatie der beide media met uiteenlopende suikerconcentratie ongetwijfeld verschillende hoeveelheden glucose zullen zijn ontleed, moeten wij hieruit besluiten, dat de wel toegevoegde, maar bij de bepaling van de beginconcentratie niet meer teruggevonden glucose bij de proeven I en II uit Tabel XII inderdaad aan de vergisting is onttrokken.

Wat het gesignaleerde verschijnsel zelve betreft, moet er nu op worden gewezen, dat het reeds zeer lang bekend is, dat bij het in een autoclaaf steriliseeren van bepaalde suikerhoudende media een deel van de suikers wordt ontleed.

Eenerzijds zijn de suikerchemici er reeds lang mee vertrouwd, dat verhitting van glucose in alkalisch reagerende media tot een veelal zeer belangrijke ontleding van deze suiker aanleiding geeft. Ook microbiologen hebben deze ervaring herhaaldelijk opgedaan bij sterilisatie van zelfs maar zwak alkalisch reagerende media. Zoo constateerde WATERMAN ¹⁾ bij het steriliseeren van een glucose-oplossing in leidingwater op 120° C. een belangrijke ontleding van deze suiker. Dat ook hier de hydroxylionen verantwoordelijk waren voor de intredende ontleding bleek wel uit de omstandigheid, dat deze door toevoeging van kleine hoeveelheden zuur-reagerende stoffen, zooals bijv. KH_2PO_4 , kon worden opgeheven.

Van latere ervaringen van microbiologische zijde noem ik nog slechts het meer recente artikel van SMITH ²⁾, waarin eveneens wordt aangetoond, dat in een mineraal glucose-houdend medium met een pH = 8,0 aanmerkelijke hoeveelheden van deze suiker worden ontleed, indien dit medium bij 120° C. wordt gesteriliseerd, of zelfs maar wat langeren tijd op kooktemperatuur wordt verhit.

Anderzijds is in de biochemische literatuur ook bij herhaling aandacht geschonken aan een andere reactie, welke voor het verdwijnen van glucose bij sterilisatie van bepaalde voedingsmedia verantwoordelijk kan zijn. Dit is de bij hogere temperatuur sterk versnelde reactie tusschen glucose en de in bedoelde media voor-

¹⁾ H. I. WATERMAN, Chem. Weekblad **10**, 739, 1913; *ibid.* **14**, 119, 1917.

²⁾ M. L. SMITH, Biochem. J. **26**, 1467, 1932.

komende aminozuren, welk proces door een zwak alkalische reactie zeer in de hand wordt gewerkt. Achtereenvolgens hebben KOSTYTSCHEW, VON EULER, NEUBERG en hunne medewerkers deze omzettingen uitvoerig bestudeerd, terwijl vóór enkele jaren ook FRANKEL en KATCHALSKY ¹⁾ nog eens op deze aangelegenheid zijn teruggekomen.

Aangezien in het door mij gebruikte gistautolysaat-krijt-medium zoowel de mogelijkheid van een zuivere alkaliwerking, als die van een reactie tusschen de glucose en aminozuren, aanwezig waren, was het aangewezen dienaangaande een nader onderzoek in te stellen. Het was toch in het bijzonder voor de aërobe proefnemingen van veel belang een glucose-houdend medium samen te stellen, dat ondanks de aanwezigheid van krijt, bij sterilisatie niet tot glucose-ontleding aanleiding gaf.

In de eerste plaats heb ik getracht, of niet door toepassing van gescheiden sterilisatie van sommige der componenten bij het eerder gebruikte minerale medium met gistautolysaat het euvel kon worden vermeden.

Tabel XIV geeft een overzicht van de hierop betrekking hebbende proefnemingen.

Bedoeld medium bevat, zooals bekend, per 100 cm³: 2 gram glucose, 0,5 gram ammoniumsulfaat, 2 gram krijt en 10% gistautolysaat. Per 2,5 cm³ waren dus 50 mg glucose opgelost.

De van ieder der componenten gebruikte hoeveelheden waren steeds als boven aangegeven; zij zijn dus in de tabel niet meer herhaald. Voor het bereiden van de oplossingen werd leidingwater gebruikt. De sterilisatie geschiedde door 20 minuten op 110° C. te verhitten.

Uit de proeven 1 tot en met 4 blijkt reeds duidelijk, dat het verdwijnen van de glucose niet alleen moet worden toegeschreven aan het *steriliseeren met krijt*. Proefneming 5 levert verder het rechtstreeksche bewijs, dat reeds het samenbrengen der componenten bij kamertemperatuur binnen enkele uren een aanmerkelijke hoeveelheid van de toegevoegde suiker doet verdwijnen.

Om nader te onderzoeken, welke van de genoemde bestanddeelen van het medium de oorzaak was van het verdwijnen van

¹⁾ M. FRANKEL and A. KATCHALSKY, Biochem. J. 31, 1595, 1937; men zie ook de hier geciteerde oudere literatuur.

TABEL XIV.

Het verdwijnen van glucose in media met krijt.

Wijze van samenstellen en steriliseeren:	Teruggevonden hoeveelheid glucose in mg per 2,5 cm ³
1. Gluc. + (NH ₄) ₂ SO ₄ in 40 cm ³ water gesteriliseerd. Krijt + autolysaat, aangevuld met water tot 40 cm ³ en gesteriliseerd.	na steriliseeren samengevoegd en met water aangevuld tot 100 cm ³ 44,6
2. Gluc. + krijt in 40 cm ³ water gesteriliseerd. (NH ₄) ₂ SO ₄ + autolysaat, aangevuld met water tot 40 cm ³ en gesteriliseerd.	als bij 1. 41,0
3. Gluc. + autolysaat, aangevuld met water tot 40 cm ³ en gesteriliseerd. (NH ₄) ₂ SO ₄ + krijt in 40 cm ³ water gesteriliseerd.	als bij 1. 44,0
4. Gluc. + (NH ₄) ₂ SO ₄ + krijt + autolysaat aangevuld met water tot 100 cm ³ en gesteriliseerd.	43,6
5. Gluc. + (NH ₄) ₂ SO ₄ + krijt + autolysaat aangevuld met water tot 100 cm ³ ; niet gesteriliseerd (na eenige uren onderzocht).	44,4

de suiker, werden de in Tabel XV aangeduide oplossingen gemaakt, welke weer dezelfde hoeveelheden der bestanddeelen als hierboven opgegeven bevatten. Deze oplossingen werden niet gesteriliseerd en nadat zij 15 minuten bij kamertemperatuur hadden gestaan, werd de glucose bepaald. In verband met het gebruik van gistwater bij de in het vorige hoofdstuk beschreven proefnemingen werd ook een oplossing van 2% glucose in gistwater in het onderzoek betrokken.

TABEL XV.

Het verdwijnen van glucose in oplossingen van verschillende samenstelling bij lage temperatuur.

Medium	pH van het medium	Teruggevonden hoeveelheid glucose in mg per 2,5 cm ³
1. Gluc. in 100 cm ³ water		48,6
2. Gluc. +(NH ₄) ₂ SO ₄ in 100 cm ³ water		49,0
3. Gluc. + autolysaat, aangevuld met water tot 100 cm ³	6,24	49,3
4. Gluc. in 100 cm ³ gistwater .	6,72	49,0
5. Gluc. + krijt in 100 cm ³ water	9,67	42,7

Overtuigend blijkt uit deze waarnemingen, dat de suiker bij lage temperatuur uitsluitend bij aanwezigheid van krijt verdwijnt. Ongetwijfeld zal dit effect aan de hoge pH moeten worden toegeschreven.

Medium 5 werd nog aangezuurd met zoutzuur, waarna de suiker na een half uur opnieuw werd bepaald. Het hierbij verkregen resultaat was echter hetzelfde, hetgeen dus beteekent, dat in een oplossing van glucose, welke eenigen tijd aan een hoge pH wordt blootgesteld, zelfs bij kamertemperatuur een deel van de suiker irreversibel wordt ontleed.

Media 3 en 4 werden nu nog gesteriliseerd en hierin opnieuw de glucose bepaald. De sterilisatie bleek echter geen vermindering

van het suikergehalte te hebben veroorzaakt. Van een reactie tusschen de glucose en de aminozuren — aanwezig respectievelijk in het gistautolysaat en in het gistwater — was dus onder de gegeven voorwaarden geen sprake.

De pH van medium 5 is opmerkelijk hoog (9,67). Waarschijnlijk was het krijt bij de voorafgegane droge sterilisatie op te hooge temperatuur gebracht, waardoor een weinig CaO was gevormd. Om deze reden werd een nieuw monster krijt zoo laag mogelijk gesteriliseerd, n.l. 2×3 uur bij 150°C . Een suspensie hiervan in water gaf een pH van 9,24.

Bij gebruik van op deze wijze gesteriliseerd krijt en van een op eenigszins afwijkende wijze bereid gistautolysaat, konden media met krijt worden samengesteld, welke na sterilisatie een pH lager dan 7,0 bezaten. Hiertoe werd het gistautolysaat als volgt bereid.

1 kg persgist werd met 1 liter leidingwater aangewreven, gedurende 40—45 uur bij 50°C . geplaatst, daarna opgekookt, gefiltreerd, op pH = 5,5 gebracht, nogmaals opgekookt, gefiltreerd en een half uur op 110°C gesteriliseerd.

In de hieronder vermelde media werd na sterilisatie de hierbij aangegeven pH vastgesteld:

2% glucose + 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 2% krijt + 10% gistautolysaat in leidingwater	pH = 6,90
2% glucose + 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 2% krijt + 15% gistautolysaat in leidingwater	pH = 6,58
2% glucose + 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 2% krijt + 20% gistautolysaat in leidingwater	pH = 6,41

Een analyse van deze media wees uit, dat hierin de toegevoegde glucose ook na sterilisatie voor 100% aanwezig was.

Bij de verdere proefnemingen bleek nu, dat in deze zwak zure media ook onder aërobe voorwaarden een goede aantasting van de glucose door *Brettanomyces Claussenii* werd verkregen.

§ 2. INRICHTING DER PROEFNEMINGEN EN TOEGEPASTE ANALYSE-METHODEN.

Voor de quantitative proefnemingen werd aanvankelijk gebruik gemaakt van dezelfde apparatuur als bij de anaërobe proefnemingen was toegepast, met dien verstande, dat thans continu koolzuurvrij gemaakte lucht, welke daarna ter verhooging van het vochtgehalte

ook nog door een waschflesch met water passeerde, door het medium werd geleid.

Het bij de proefnemingen gevormde koolzuur werd geabsorbeerd in een verzadigde bariet-oplossing, welke na afloop werd teruggetitreerd met zoutzuur, waarbij in navolging van WALKER¹⁾ thymolphtaleïne als indicator werd gebruikt. SCHOLLENBERGER²⁾ heeft nl. aangetoond, dat thymolphtaleïne met een kleuromslag bij $\text{pH} \pm 10,0$ voordeelen heeft t.o.v. phenolphtaleïne. Bij gebruik van thymolphtaleïne behoeft het gevormde bariumcarbonaat niet te worden afgefiltreerd en de geringe hoeveelheid opgelost bariumcarbonaat heeft geen invloed op den kleuromslag. Bij de titratie, welke met 0,3 n zoutzuur geschiedde, werd gezorgd voor het koolzuurvrij maken van het gebruikte glaswerk, zooals Erlenmeyer, pipet enz.

Bij de eerste quantitative proefnemingen deed zich het onverwachte verschijnsel voor, dat noch in de uitgegiste cultuurvloeistof, noch in de waschflesschen met water, noch in die met zwavelzuur alcohol kon worden aangetoond. De mogelijkheid bleef evenwel bestaan, dat de tijdens de proefneming gevormde alcohol door de doorgeleide lucht volledig was meegevoerd.

Een daartoe opzettelijk verrichte proefneming leerde, dat uit een alcohol-water mengsel, met 1% alcohol, reeds na 4 dagen lucht doorleiden bij 30° C. meer dan de helft van den alcohol uit de vloeistof was verdwenen.

De vraag rees dus, of de met de lucht medegevoerde alcohol volledig kon worden tegengehouden en wel op zoodanige wijze, dat daaraan een quantitative bepaling zou zijn te verbinden.

Zooals bekend is, berusten verschillende bepalingsmethoden van alcohol op een oxydatie tot azijnzuur in een mengsel van kaliumbichromaat en zwavelzuur, hetgeen doorgaans bij hoogere temperatuur in een hermetisch gesloten vat geschiedt.

JANKE en KROPACSY³⁾ hebben in verband met een studie over de oxydatie van aethylalcohol door azijnbacteriën een methode uitgewerkt, waarbij met behulp van een passende concentratie van het kaliumbichromaat de alcohol in een gesloten vat in 1 uur bij 40° C. volledig tot azijnzuur werd geoxydeerd. Ik besloot dus te

1) H. H. WALKER, J. of Bact. **24**, 169, 1932.

2) G. J. SCHOLLENBERGER, Ind. and Eng. Chem. **20**, 1101, 1928.

3) A. JANKE und S. KROPACSY, Biochem. Z. **278**, 30, 1935.

onderzoeken, of de door de lucht meegevoerde alcohol volledig in een zoodanig kaliumbichromaat-zwavelzuur mengsel zou worden tegengehouden en of deze alcohol daarin dan na afloop der proef, op grond van een inmiddels voltrokken omzetting in azijnzuur, quantitatief zou kunnen worden bepaald.

Hiertoe werden 100 cm^3 gedestilleerd water, waaraan $\pm 1\%$ alcohol was toegevoegd, in de schudmachine bij 30° C . drie dagen geschud, waarbij tevens lucht werd doorgeleid. De uitstroomende lucht streek door twee achter elkaar geplaatste Erlenmeyers van 500 cm^3 inhoud, welke elk 100 cm^3 van een $\pm 0,5 \text{ n}$ kaliumbichromaat-oplossing (in water) + 250 cm^3 50% -ig zwavelzuur bevatten. De Erlenmeyers waren eveneens in de op 30° C . verwarmde ruimte opgesteld.

Na 3 dagen was het bichromaat-zwavelzuur mengsel in den eersten Erlenmeyer donker geworden, de kleur van de vloeistof in den tweeden was onveranderd gebleven.

Rekening houdende met de mogelijkheid, dat de eerste Erlenmeyer nog kleine hoeveelheden onveranderden alcohol zou bevatten, werd de inhoud der beide Erlenmeyers samengevoegd, met gedestilleerd water aangevuld tot 1 liter en hiervan 50 cm^3 in een drukfleschje $3/4$ uur in een kokend waterbad verhit. Na afkoelen werd de inhoud quantitatief overgespoeld in een Erlenmeyer van 1 liter inhoud en 10 cm^3 30% -ige joodkalium-oplossing toegevoegd. Nadat enkele minuten was gewacht voor het vrijkomen van het jodium, werd de vloeistof met $0,1 \text{ n}$ thiosulfaatoplossing getitreerd. Tegen het einde der titratie werd met gedestilleerd water verdund tot $\pm 400 \text{ cm}^3$, 3 cm^3 stijfsel-oplossing toegevoegd en getitreerd tot verdwijnen van de blauwe kleur.

Nu werd dus nagegaan in hoeverre de in den Erlenmeyer teruggehouden alcohol na toepassing der beschreven werkwijze inderdaad tot een zoodanig verbruik aan bichromaat had aanleiding gegeven, als overeenkomt met zijn oxydatie tot azijnzuur.

De hoeveelheid alcohol vóór en na het lucht doorleiden in de aëratiekolf aanwezig werd op de gewone wijze volgens NORTHROP bepaald. Deze hoeveelheden bedroegen respectievelijk 925 mg en 507 mg . De uit de kolf verdreven hoeveelheid alcohol, namelijk 418 mg , komt bij oxydatie tot azijnzuur overeen met $363,5 \text{ cm}^3$ $0,1 \text{ n}$ thiosulfaatoplossing.

Het onder toepassing der beschreven werkwijze in het bichro-

maat-zwavelzuur mengsel geconstateerde bichromaatverbruik bleek nu te corresponderen met $366,4 \text{ cm}^3$ $0,1 \text{ n}$ thiosulfaatoplossing. Hieraan kan worden toegevoegd, dat een contrôle-proefneming leerde, dat dit bichromaatverbruik kennelijk reeds in de Erlenmeyers had plaats gevonden; indien namelijk de behandeling in het drukfleschje achterwege werd gelaten, bracht dit geen verandering in de uitkomst.

Wij mogen uit de genoemde cijfers besluiten, dat inderdaad het bichromaat-zwavelzuur mengsel bij 30° C . den teruggehouden alcohol eveneens quantitatief tot azijnzuur heeft geoxydeerd, waardoor dus de mogelijkheid van een quantitative bepaling van allen, eventueel in aërobe stofwisselingsproeven gevormden alcohol is gegeven.

Nog werd een soortgelijke proef genomen, waarbij de tijdsduur tot zes dagen werd uitgestrekt. Hieruit bleek, dat ook bij langer voortzetten der proef, de alcohol in het bichromaat-zwavelzuur mengsel niet verder dan tot azijnzuur wordt geoxydeerd.

De bij de aërobe proefnemingen gevormde alcohol is dus de som van den in de cultuurvloeistof aanwezigen alcohol en van den in het kaliumbichromaat-zwavelzuur mengsel opgevangen alcohol.

Voor de bepaling der vluchtige zuren werd als volgt te werk gegaan. De na afdestilleeren van den aethylalcohol overgebleven vloeistof werd gefiltreerd en het neerslag met gedestilleerd water uitgewasschen. Het gezamenlijke filtraat werd aangezuurd met zwavelzuur op $\text{pH} \pm 3,5$ (op congorood-papier als indicator), aan een stoomdestillatie onderworpen en het hierbij verkregen destillaat verder onderzocht, zooals in § 1 is beschreven.

Daar het oriënteerend onderzoek het onwaarschijnlijk maakte, dat er niet-vluchtige zuren werden gevormd, werd alleen een enkele maal een bepaling uitgevoerd ter vergelijking met een bepaling in het ongeënte medium.

Ter vaststelling van de beginconcentratie van glucose, de pH, de blanco alcohol, vluchtige en niet-vluchtige zuren, werd tegelijk met de te enten cultuurvloeistof een passende hoeveelheid van hetzelfde medium in een aparte kolf gesteriliseerd. Hierin werd tevens het als carbonaat en als bicarbonaat aanwezige koolzuur bepaald.

Ook overigens geschieden al deze bepalingen op de wijze, zooals in Hoofdstuk V is aangegeven. De inrichting der proefneming was nu als volgt.

300 cm³ cultuurvloeistof werden in een Erlenmeyer-kolf van 1 liter inhoud, welke met een wattenprop was afgesloten, gedurende een half uur bij 110° C gesteriliseerd. Na afkoelen werd met een suspensie van de te onderzoeken gistsoort geënt en de wattenprop vervangen door een dubbel doorboorde gummikurk, waarin 2 omgebogen glazen buisjes waren aangebracht, nl. één lang voor het inleiden van lucht en één kort voor den luchtafvoer. De gummikurk met buisjes was tevoren, in papier gewikkeld, in den autoclaaf gesteriliseerd. Een kraantje onder aan de cultuurkolf maakte het mogelijk gedurende de proef een monster af te tappen om de in de vloeistof nog aanwezige glucose te bepalen.

De Erlenmeyer werd vervolgens in de schudmachine geplaatst en op de persluchtleiding aangesloten.

De lucht streek achtereenvolgens door twee waschflesschen met 50%-ige KOH, door één met gedestilleerd water, dan door een steriel wattenfilter om daarna de cultuurvloeistof te passeeren; de snelheid van den luchtstroom bedroeg ± 40 cm³ per minuut.

De afvoerbuis van de kolf werd verbonden met het absorptieapparaat, hetwelk niet werd geschud. Dit bestond uit drie Erlenmeyers van 1 liter inhoud en een PETTENKOFER-buis. Ieder der eerste twee Erlenmeyers bevatte 200 cm³ $\pm 0,5$ n kaliumbichromaat-oplossing (in water) + 500 cm³ zwavelzuur van 50%, de derde bevatte 700 cm³ gestelde verzadigde bariet-oplossing. In de PETTENKOFER-buis bevond zich 200 cm³ van dezelfde bariet-oplossing om de laatste resten koolzuur op te vangen. Deze buis was op zoodanige wijze met den laatsten Erlenmeyer verbonden, dat zij indien noodig door een nieuwe kon worden vervangen, zonder de proefneming te onderbreken.

Na het beëindigen van de proef werd de cultuurvloeistof tot 500 cm³ aangevuld en geanalyseerd.

Uit de uitgegiste vloeistof werd wederom ter contrôle in alle gevallen afgestreeken op peptonagar- en op moutagar-platen, waarna deze platen gedurende 48 uren bij 30° C. werden bebroed.

§ 3. QUANTITATIEVE PROEVEN AANGAANDE DE AËROBE DISSIMILATIE VAN GLUCOSE.

Het kwam er thans op aan, in het in § 1 beschreven minerale medium met krijt kwantitatieve stofwisselingsproeven onder zuurstoftoetreding te verrichten.

Daar bij deze proeven door den toevoer van lucht veel gemakkelijker celvermeerdering intrad dan bij de anaërobe proeven, werd minder sterk geënt. Hierbij werd als volgt te werk gegaan. De te onderzoeken stam werd gedurende ± 5 dagen in een kolfje met 35 cm^3 moutextract bij 30° C. gecultiveerd. Hierna werd de heldere vloeistof afgegoten, het neerslag met steriel water uitgewassen, na bezinken de bovenstaande vloeistof weer afgegoten en het neerslag in 30 cm^3 steriel water gesuspenseerd. Van deze suspensie werd 4 cm^3 voor de enting gebruikt.

Bij de eerste proef met *Brettanomyces Claussenii* was de suiker na 48 uur practisch verdwenen. Na 52 uur werd de proef afgebroken.

Tabel XVI geeft de resultaten weer. In deze en in de hierop volgende tabellen zijn de correcties voor de blanco-bepalingen van het medium reeds verwerkt.

Doordat de verbruikte zuurstof niet was bepaald, kon hier alleen een koolstofbalans worden opgemaakt.

TABEL XVI.

Oxydatieve dissimilatie van *Brettanomyces Claussenii* in leidingwater, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% gistautolysaat, 2% krijt; pH vóór de enting = 6,4; temp. 30° C.

Duur der proefneming 52 uren.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.
Toegevoegde glucose .	5,940		
Resteerende ,, .	0,109		
Verbruikte ,, .	5,831	100	32,4
Koolzuur	2,471	28,9	56,2
Aethylalcohol	2,394	53,5	52,0
Azijnzuur	0,124	2,1	2,1
			} 54,1
Totaal		84,5	

Uit Tabel XVI blijkt, dat uitsluitend koolzuur, aethylalcohol en azijnzuur zijn gevormd; de gevonden hoeveelheid azijnzuur is echter heel gering. Het grootste gedeelte van den aethylalcohol, namelijk 2,243 gram, was in de cultuurkolf achtergebleven.

De voornaamste conclusie, welke wij uit deze uitkomsten kunnen trekken, is, dat in strijd met de verwachting in het gebruikte medium ook onder vrij sterk aërobe voorwaarden zich toch een practisch zuivere alcoholische gisting heeft voltrokken.

Ofschoon vrij zwak was geënt, is er blijkbaar een zeer sterke groei opgetreden. Een groot percentage van de verbruikte glucose toch werd niet teruggevonden in den vorm van stofwisselingsproducten; deze glucose moet dus wel als nieuw celmateriaal zijn vastgelegd.

Een tweede proef werd ingezet, waarbij, toen na 50 uur bleek, dat de glucose practisch volledig was verbruikt, de aëratie nog 40 uur werd voortgezet. Gedurende deze periode werd echter langzamer lucht doorgeleid om te voorkomen, dat teveel alcohol uit de cultuurvloeistof zou worden verdreven.

De resultaten van deze proefneming zijn in Tabel XVII weer-gegeven.

TABEL XVII.

Oxydatieve dissimilatie van *Brettanomyces Claussenii* in leiding-water, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% gistautolysaat, 2% krijt; pH vóór de enting = 6,3; temp. 30° C.
Duur der proefneming 90 uren.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m. Mol.
Toegevoegde glucose	5,670		
Resteerende „	0,123		
Verbruikte „	5,547	100	30,8
Koolzuur	2,855	35,1	64,9
Aethylalcohol	1,183	27,8	25,7
Azijnzuur	1,714	30,9	28,6
			} 54,3
Totaal		93,8	

Uit Tabel XVII blijkt, dat er ditmaal veel zuur is gevormd; daarentegen is de gevonden hoeveelheid aethylalcohol aanmerkelijk kleiner dan bij de vorige proef. Evenals bij de vorige proefneming was het grootste gedeelte van den alcohol in de cultuurkolf achtergebleven. In het bichromaat-zwavelzuur mengsel waren slechts 233 mg opgevangen.

Vergelijken we de getallen in de kolom van het aantal millimolen van Tabel XVI en XVII dan blijkt het volgende.

In Tabel XVI verschilt de som van de aantallen millimolen gevonden alcohol en azijnzuur (54,1) slechts weinig van het aantal waargenomen millimolen koolzuur (56,2).

In Tabel XVII blijkt daarentegen een vrij groot verschil te bestaan tusschen de som van deze aantallen (54,3) en het aantal millimolen koolzuur (64,9).

Men krijgt uit deze resultaten den indruk, dat ook bij deze proefneming het eerste stadium een practisch zuivere alcoholische gisting is geweest en dat de primair gevormde alcohol ten deele is geoxydeerd tot azijnzuur, ten deele verder is geoxydeerd tot koolzuur en water. Op grond hiervan lijkt het aannemelijk, dat bij voortzetting van de aëratie uiteindelijk alleen koolzuur en water als stofwisselingsproducten zullen optreden.

De volgende schudproef werd daarom over langeren tijdsduur, namelijk over 6 dagen uitgestrekt. Na 2 dagen was de toegevoegde glucose op enkele milligrammen na verbruikt. Gedurende de eerste 2 dagen werd met een snelheid van $\pm 40 \text{ cm}^3$ per minuut geaëreerd en gedurende de volgende 4 dagen met ongeveer de helft van deze snelheid.

Door toevallige omstandigheden werd bij deze proefneming slechts 150 cm^3 cultuurvloeistof gebruikt, d.i. de helft van de in de vorige proeven toegepaste hoeveelheid. Daar de suikerconcentratie hier eveneens 2% bedroeg, was de toegevoegde hoeveelheid glucose dus ook slechts de helft.

Overigens geschiedde alles op dezelfde wijze als bij de voorafgaande proefnemingen. De resultaten zijn in Tabel XVIII samengevat.

TABEL XVIII.

Oxydatieve dissimilatie van *Brettanomyces Claussenii* in leidingwater, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% gistautolysaat, 2% krijt; pH vóór de enting = 6,6; temp. 30° C.
Duur der proefneming 144 uren.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.
Toegevoegde glucose .	2,970		
Resteerende ,, .	0,103		
Verbruikte ,, .	2,867	100	15,9
Koolzuur	1,816	43,2	41,3
Aethylalcohol	0,329	15,0	7,2
Azijnzuur	0,390	13,6	6,5
			}13,7
Totaal		71,8	

Bij de analyse bleek, dat er geen alcohol meer in de cultuurvloeistof aanwezig was; de in de tabel opgegeven hoeveelheid aethylalcohol was volledig in het bichromaat-zwavelzuur mengsel opgevangen.

De hoeveelheid koolzuur vóór de enting als carbonaat en als bicarbonaat in de cultuurvloeistof aanwezig bedroeg 1,230 gram, en de overeenkomstige hoeveelheid na de proef 0,900 gram. Dit geeft een sterke aanwijzing, dat er primair meer zuur is gevormd dan er uiteindelijk werd aangetroffen.

Op grond van de uitkomsten der drie hierboven beschreven proefnemingen is men geneigd te besluiten, dat aanvankelijk gevormde aethylalcohol bij voortgezette aëratie eerst tot azijnzuur wordt geoxydeerd en het gevormde azijnzuur verder tot koolzuur en water.

Bij deze conclusie moet echter eenige voorzichtigheid worden betracht. Voor de veronderstelling, dat er ook bij de beide laatste proefnemingen in het eerste stadium een practisch zuivere alcoholische gisting heeft plaats gevonden, is geen bewijs aanwezig.

Onder de voorwaarden der proefneming kon toch geen volledige analyse van de cultuurvloeistof worden gemaakt op het oogenblik, dat de suiker bleek te zijn verdwenen. Het feit, dat bij de eerste proefneming op dit oogenblik inderdaad slechts aethylalcohol en koolzuur in stoichiometrische verhouding waren gevormd, laat zich niet zonder meer op de beide andere proefnemingen overdragen, aangezien de zekerheid ontbreekt, dat de aëratievoorwaarden bij de drie proeven volkomen gelijk waren. De mate van aërobiose, waaronder een cel verkeert, is toch van twee factoren afhankelijk, namelijk: 1e van de hoeveelheid aan het medium toegevoerde lucht en 2e van de hoeveelheid in de cultuurvloeistof aanwezige cellen. Weliswaar is er naar gestreefd de hoeveelheid toegevoerde lucht bij de verschillende proeven praktisch gelijk te houden, maar de hoeveelheid der aanwezige cellen was tengevolge van den intredenden groei niet streng te reguleeren. Met zekerheid kan daarom niet worden besloten, dat het gevormde azijnzuur uitsluitend is ontstaan door oxydatie van aethylalcohol. De mogelijkheid bestaat, dat er bij de beide laatste proeven door het aanwezig zijn van betere aëratievoorwaarden voor de afzonderlijke cellen, ook azijnzuur en eventueel ook koolzuur was gevormd door rechtstreeksche oxydatie van de glucose. Uiteindelijk zou dit beteekenen een oxydatie van het acetaldehyde, dat door decarboxylatie van pyrodruivenzuur, zoowel bij de anaërobe als bij de aërobe dissimilatie van de suiker als tusschenproduct zal optreden.

Uit een en ander volgt, dat aan de waargenomen verschijnselen verschillende mogelijkheden ten grondslag liggen. Alleen is duidelijk komen vast te staan, dat er bij de oxydatieve dissimilatie van glucose door *Brettanomyces Claussenii*, bij de toegepaste mate van aëratie, in een bepaalde phase van het proces belangrijke hoeveelheden azijnzuur worden gevormd.

Het was thans van belang na te gaan, of bij de oxydatieve dissimilatie van glucose door een andere *Brettanomyces*-soort overeenkomstige resultaten zouden worden verkregen.

Hiertoe maakte ik gebruik van *Brettanomyces bruxellensis* Kufferrath et van Laer, stam lambic 103 G. De enting geschiedde geheel op dezelfde wijze als bij de vorige proeven.

Tusschentijdsche glucose-bepalingen bij deze proefneming wезen uit, dat de glucose na 72 uur schudden en aëreeren praktisch volledig was verbruikt; hierna werd de aëratie nog 32 uur voort-

gezet met verminderde snelheid, op dezelfde wijze als hierboven beschreven. De verkregen resultaten volgen in Tabel XIX.

TABEL XIX.

Oxydatieve dissimilatie van *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer, stam lambic 103 G, in leidingwater, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% gistautolysaat, 2% krijt; pH vóór de enting = 6,4; temp. 30° C. Duur der proefneming 104 uren.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.
Toegevoegde glucose .	5,760		
Resteerende „ .	0,240		
Verbruikte „ .	5,520	100	30,7
Koolzuur	3,305	40,8	75,1
Aethylalcohol	0,028	0,7	0,6
Azijnzuur	1,576	28,6	26,3
			} 26,9
Totaal		70,1	

Uit Tabel XIX blijkt, dat ook door *Brettanomyces bruxellensis* naast koolzuur en aethylalcohol een belangrijke hoeveelheid azijnzuur wordt gevormd. Andere producten werden niet aangetroffen.

Ook hier valt een groot verschil tusschen de som van de aantallen millimolen gevonden alcohol en azijnzuur (26,9) en het aantal millimolen koolzuur (75,1) te constateeren.

Ik heb nu verder nagegaan, of de vorming van azijnzuur bij de oxydatieve dissimilatie van glucose onder de toegepaste voorwaarden een specifieke eigenschap van *Brettanomyces*-gisten is, of dat andere gisten dit ook doen.

Hiertoe werd allereerst een soortgelijke proef ingezet met *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I.

In totaal duurde deze proef 110 uur. Tusschentijdsche glucosebepalingen wezen uit, dat na 48 uur nog slechts 1,5 mg glucose per cm^3 aanwezig was. Van dit oogenblik af werd evenals bij de andere onderzoeken langzamer lucht doorgeleid. Tabel XX geeft de hierbij verkregen resultaten.

TABEL XX.

Oxydatieve dissimilatie van *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, in leidingwater, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15% gistautolysaat, 2% krijt; pH vóór de enting = 6,4; temp. 30° C. Duur der proefneming 110 uren.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.
Toegevoegde glucose	5,670		
Resteerende „	0,200		
Verbruikte „	5,470	100	30,4
Koolzuur	5,161	64,3	117,3
Aethylalcohol	0,066	1,6	1,4
Azijnzuur	0	0	0
Totaal		65,9	

Uit Tabel XX zien wij, dat als stofwisselingsproduct practisch alleen koolzuur, naast een kleine hoeveelheid aethylalcohol, werd aangetroffen. Zuren werden niet gevonden. De hoeveelheid vóór de enting in het medium als carbonaat en bicarbonaat aanwezig koolzuur bedroeg 2,436 gram en die na afbreken der proef 2,390 gram. Het geringe verschil tusschen deze getallen wijst er op, dat er ook tijdens de proef geen noemenswaardige hoeveelheid zuur in het medium is afgescheiden.

Ruim een derde gedeelte van de verbruikte glucose blijkt in nieuw gevormd celmateriaal te zijn vastgelegd.

Ik besloot deze waarnemingen nog tot een andere gistsoort uit te breiden en koos hiervoor een stam van een bier-ondergist,

Saccharomyces carlsbergensis Hansen. Hierbij deden zich aanvankelijk enkele moeilijkheden voor. Ofschoon bij de entcultuur bij 30° C. normale groei werd verkregen, trad in de cultuurkolf herhaaldelijk geen groei in. Ik kreeg den indruk, dat de temperatuur van 30° C. voor dezen stam bij cultiveeren onder sterk aërobe voorwaarden te hoog is.

Daarom werd een volgende proef uitgevoerd in een lokaal, waarin een vrij constante temperatuur van 23° à 24° C. heerschte.

De Erlenmeyers met kaliumbichromaat-zwavelzuur werden in een waterbad constant op 30° C. gehouden.

De duur van de proefneming was 72 uur; de resultaten zijn in Tabel XXI samengevat.

TABEL XXI.

Oxydatieve dissimilatie van *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen in leidingwater, waaraan werd toegevoegd 2% glucose, 0,5% (NH₄)₂SO₄, 15% gistautolysaat, 2% krijt; pH vóór de enting = 6,6; temp. 24° C. Duur der proefneming 72 uren.

	Grammen	Procenten koolstof	Aantal m.Mol.
Toegevoegde glucose	6,150		
Resteerende „	0,305		
Verbruikte „	5,845	100	32,5
Koolzuur	4,807	56,1	109,3
Aethylalcohol	0,860	19,2	18,7
Azijnsuur	0	0	0
Totaal		75,3	

Tabel XXI vertoont veel overeenstemming met Tabel XX.

Evenals bij de proef met *Saccharomyces cerevisiae* kon geen azijnsuurvorming worden aangetoond, terwijl de hoeveelheid verdwenen glucose hier ook in hoofdzaak als koolzuur werd teruggevonden. Dit resultaat is eenigszins onverwacht, aangezien men in de

literatuur vrij algemeen vindt aangegeven, dat *Saccharomyces carlsbergensis* slechts een zwakke ademhaling bezit.

Een en ander rechtvaardigt voorloopig te besluiten, dat de vorming van azijnzuur bij de oxydatieve dissimilatie van glucose onder de gekozen voorwaarden een karakteristieke eigenschap van *Brettanomyces*-gisten is.

De beschreven cultuurproeven laten ons echter in onwetendheid aangaande het nadere verloop van deze dissimilatie. Hierop zal onder meer in het volgende hoofdstuk worden teruggekomen.

§ 4. SAMENVATTING DER RESULTATEN.

De in dit hoofdstuk verkregen resultaten kunnen als volgt kort worden samengevat.

De oxydatieve glucose-dissimilatie door *Brettanomyces Claussenii* en door *Brettanomyces bruxellensis* werd in cultuurproeven onderzocht. Hierbij deed zich de moeilijkheid voor, dat het noodig was een methode uit te werken, waarbij de met de doorgeleide lucht meegevoerde alcohol volledig werd tegen gehouden en wel op zoodanige wijze, dat daaraan een quantitative bepaling was te verbinden.

Dit bleek nu inderdaad mogelijk te zijn door de uitstroomende lucht door een mengsel van kaliumbichromaat-zwavelzuur te leiden, waarin de aethylalcohol quantitatief tot azijnzuur wordt geoxydeerd.

Als stofwisselingsproducten bleken bij de oxydatieve dissimilatie uitsluitend koolzuur, aethylalcohol en azijnzuur te zijn gevormd. Bij voortgezette aëratie werd een aanmerkelijk grotere hoeveelheid koolzuur gevonden dan met de som van de vastgestelde hoeveelheden aethylalcohol en azijnzuur overeenkwam.

Om na te gaan, of de vorming van azijnzuur onder de gekozen voorwaarden een specifieke eigenschap van „*Brettanomyces*” is, werden onder gelijke voorwaarden proeven ingezet met *Saccharomyces cerevisiae* Hansen en met *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen. Met deze gistsoorten werden alleen koolzuur en aethylalcohol als reactieproducten gevonden. De hierbij gevonden hoeveelheid koolzuur was grooter dan met de vastgestelde hoeveelheid aethylalcohol overeenkwam.

HOOFDSTUK VII.

VERGELIJKEND MANOMETRISCH ONDERZOEK AAN- GAANDE DE STOFWISSELING VAN *BRETTANOMYCES* *CLAUSSENI* EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

§ 1. INLEIDING.

De in de beide voorafgaande hoofdstukken beschreven proefnemingen hebben in zooverre een inzicht in de afwijkende stofwisseling van *Brettanomyces* gegeven, dat is komen vast te staan, dat bij oxydatieve dissimilatie van glucose door *Brettanomyces Claussenii* en door *Brettanomyces bruxellensis* naast koolzuur en aethylalcohol, azijnzuur als stofwisselingsproduct optreedt. Daarentegen konden bij de oxydatieve dissimilatie van glucose door *Saccharomyces cerevisiae* en door *Saccharomyces carlsbergensis* onder de gekozen voorwaarden alleen koolzuur en aethylalcohol worden aangetoond.

Intusschen kon niet met zekerheid worden uitgemaakt, of het in de *Brettanomyces*-cultures aangetroffen azijnzuur — dat bij voortgezette aëratie dier cultures naar alle waarschijnlijkheid weer wordt omgezet — door oxydatie van den primair door gisting gevormden aethylalcohol of door rechtstreeksche omzetting van de suiker was ontstaan.

Zooals in § 3 van het vorige hoofdstuk is vermeld, werd onder aërobe voorwaarden zoowel met *Saccharomyces cerevisiae* als met *Brettanomyces Claussenii* een grootere hoeveelheid koolzuur gevonden dan met de vastgestelde hoeveelheid aethylalcohol, respectievelijk aethylalcohol + azijnzuur, overeenkwam. Of dit surplus aan koolzuur uitsluitend door oxydatie van primair gevormd azijnzuur of ook door rechtstreeksche oxydatie van de suiker ontstaat, kon evenwel wederom niet worden uitgemaakt.

Bij beschouwing van het geheel der afwijkende eigenschappen van de *Brettanomyces*-gisten krijgt men den indruk, dat de bijzondere instelling dezer organismen ten opzichte van de zuurstof — leidende tot het voor gisten zoo abnormale stofwisselingspro-

duct: azijnzuur — hierbij in sterke mate is betrokken. Eenerzijds leek dus een meer gedetailleerde bestudeering van de wijze, waarop de zuurstof in de normale gistingstofwisseling ingrijpt, van veel belang. Maar hiernaast mocht men verwachten, dat ook een nader onderzoek naar de beteekenis der zuurstof als eigenschap-bepalende factor in de „voorgeschiedenis” der *Brettanomyces*-cellen, meer licht op de eigenaardigheden dier gistsoorten zou werpen.

Wat nu het eerste punt aangaat, was het aangewezen het dissimilatorische gedrag te onderzoeken onder zoodanige voorwaarden, dat hierbij de groei der cellen practisch geheel werd uitgesloten.

Dit nu is mogelijk door toepassing van de door WARBURG uitgewerkte manometrische methode van stofwisselingsonderzoek. Deze methode heeft t.o.v. de voorafgaande cultuurproeven tevens het voordeel, dat bij de proefnemingen onder aërobe voorwaarden het zuurstofverbruik gemakkelijk quantitatief kan worden gevolgd.

De verschillende proefnemingen werden wederom uitgevoerd onder gebruikmaking van de gistsoort *Brettanomyces Claussenii*. Waar het noodig bleek, werden vergelijkende proeven verricht met *Saccharomyces cerevisiae*.

In de eerste plaats was het aangewezen ademhalingsproeven te verrichten met uitsluiting van de gistingstofwisseling. Hiervoor schenen op grond der voorafgaande ervaringen aethylalcohol en azijnzuur de aangewezen substraten. In aansluiting hierop is dan de invloed van de zuurstof op de suikervergisting nader onderzocht.

Na een korte bespreking van de toegepaste methodiek volgt een beschrijving van de bij de achtereenvolgende proefnemingen verkregen resultaten.

Aangaande mijn waarnemingen in zake het tweede hierboven genoemde punt, merk ik hier slechts op, dat over de verkregen uitkomsten in § 6 is gerapporteerd.

§ 2. OPMERKINGEN BETREFFENDE DE TOEGEPASTE METHODIEK.

De manometrische methode volgens WARBURG is zoo algemeen bekend, dat hier met enkele korte opmerkingen kan worden volstaan.

De gebruikte gist was van platen afkomstig, welke enkele dagen bij 30° C. waren bebroed. Voor *Brettanomyces*-gisten werd in verband met de zuurvorming moutagar-krijt en voor *Saccharomyces cerevisiae* moutagar als voedingsmedium gebruikt. De gistcellen

werden met leidingwater van de platen gespoten, afgecentrifugeerd, opgeroerd met leidingwater, weer afgecentrifugeerd en deze handelingen nogmaals herhaald.

Een passende hoeveelheid van de verkregen dikke gistbrei werd in de voor ieder afzonderlijk experiment gekozen bufferoplossing gebracht. Voor het bepalen van het percentage droge-stof van de gist werd 500 mg van de gistbrei op een horlogeglasje afgewogen en bij 105° C. gedurende ongeveer 10 uren gedroogd.

Ook het substraat werd steeds toegevoegd in den vorm van een oplossing in de gebruikte bufferoplossing. De totale hoeveelheid gebruikte suspensie + substraat bedroeg in alle gevallen 2 cm³, terwijl in die vaatjes, waarin het zuurstofverbruik werd bepaald, 0,2 cm³ 20%-ige KOH in het kleine middenvaatje op een zich daarin bevindend schijfje filtreerpapier werd gebracht. De zuurstofopneming en de koolzuurproductie werden, voor zoover mogelijk, in duplo bepaald, terwijl in de meeste gevallen eveneens de endogene ademhaling werd vastgesteld.

Bij gebruik van media met een pH boven 5 werd in de ademhalingsproeven voor de vaststelling van de koolzuurproductie 0,2 cm³ 10%-ig H₂SO₄ in het zijvaatje gebracht. Door dit zuur aan het medium toe te voegen, kon in ieder afzonderlijk apparaat de hoeveelheid opgelost en gebonden koolzuur op elk gewenscht oogenblik worden bepaald. In één apparaat werd dan bij het begin der aflezing de reeds in het medium aanwezige hoeveelheid koolzuur vastgesteld. Indien tusschentijdsche bepalingen noodig bleken te zijn, werden hiertoe meerdere apparaten met zuur ingezet.

De bepalingen van de anaërobe gisting werden in een stikstof-atmosfeer uitgevoerd. Hiertoe werd door de hiervoor gebruikte vaatjes gedurende twintig minuten een stikstofstroom geleid, welke stikstof zorgvuldig zuurstofvrij was gemaakt door deze over een kopergaas te laten strijken, dat electricisch op een temperatuur van 500° C. werd verhit.

Voor de verdere bijzonderheden der methodiek, de berekening enz. verwijs ik naar de geschriften van KREBS¹⁾ en van DIXON²⁾.

¹⁾ H. A. KREBS, in: C. OPPENHEIMER, Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig, 1929. Bd. III, p. 635.

²⁾ M. DIXON, Manometric Methods. Cambridge, 1934.

§ 3. MANOMETRISCHE ADEMHALINGSPROEVEN MET AETHYL-ALCOHOL ALS SUBSTRAAT.

Het lijkt niet overbodig hier nogmaals te vermelden, dat — teneinde den invloed van zuurstof op het dissimilatorische gedrag van *Brettanomyces*-gisten nader te onderzoeken — het was aangewezen in de eerste plaats enkele ademhalingsproeven te verrichten met aethylalcohol als substraat. Dit substraat toch heeft ten opzichte van suikers het voordeel, dat de complicatie van een gelijktijdig optredend gistingsproces is uitgesloten, zoodat zoowel het zuurstofverbruik als de koolzuurproductie, welke bij de ademhaling optreden, onmiddellijk quantitatief kunnen worden gevolgd.

Oriënterende proefnemingen met *Brettanomyces Claussenii* leerden nu spoedig, dat cellen, afkomstig van moutagar-krijt-platen, welke gedurende drie dagen bij 30° C. waren bebroed, een goede ademhaling met aethylalcohol als substraat te zien gaven. Een hoeveelheid van 32 mg gecentrifugeerde gist per vaatje bleek hierbij zeer gunstig te zijn. Bij alle in deze paragraaf beschreven proefnemingen met deze gistsoort werd daarom genoemde hoeveelheid van de gist, welke de in § 2 vermelde behandeling had ondergaan, in de vaatjes gebracht. Er zal verder bij elke proefneming alleen het droge-stof gewicht per vaatje worden vermeld.

Voor *Saccharomyces cerevisiae* bleek per vaatje een hoeveelheid van 16 mg gecentrifugeerde gist, afkomstig van moutagar-platen, welke gedurende 48 uren bij 30° C. waren bebroed, voldoende te zijn. Ook hierbij zal verder eveneens alleen het droge-stof gewicht worden vermeld.

De eerste proef met *Brettanomyces Claussenii* werd uitgevoerd in een fosphaatmedium met pH = 4,35. 1,6 cm³ van de gistsuspensie in 2/15 mol. KH₂PO₄-oplossing werd in het vaatje gebracht, terwijl 0,4 cm³ van genoemde bufferoplossing, welke een passende hoeveelheid alcohol bevatte, in het zijvaatje werd gepipetteerd. Suspensie en substraat werden dus eerst bij elkaar gevoegd, nadat temperatuurs- en evenwichtsinstelling waren bereikt. De alcoholconcentratie was zoo gekozen, dat deze, na bij elkaar voegen van suspensie en substraat, 1% bedroeg. De bij deze proefneming verkregen resultaten zijn in Tabel XXII weergegeven.

TABEL XXII.

Ademhaling van *Brettanomyces Claussenii* in aethylalcohol-phosphaatmedium met pH = 4,35 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 6,08 mg droge gist.

Tijdsduur	Aethylalcohol als substraat				Zonder substraat	
	Zuurstof- verbruik in mm ³	Koolzuur- productie in mm ³	Adem- halings- quotient	Q _{O₂} *	Zuurstof- verbruik in mm ³	Koolzuur- productie in mm ³
1e uur	186	15	0,08	30,6	45	37
2e „	175	5	0,03	28,8	31	30
3e „	185	11	0,06	30,4	26	28
4e „	212	14	0,07	34,9	25	25
5e „	241	72	0,30	39,6	16	21
6e „	249	93	0,37	40,6	14	15
Totaal	1248	210			157	156

*) Q_{O₂} (ademhalingsintensiteit) is het aantal mm³ zuurstof per uur verbruikt door een hoeveelheid gist overeenkomende met 1 mg droge gist.

Tabel XXII leert, dat de ademhaling gedurende de eerste drie uren vrijwel constant is gebleven, terwijl daarna een vrij belangrijke stijging is opgetreden. Tegelijk met deze stijging werd de koolzuurproductie, welke gedurende de eerste vier uren practisch nihil was, sterk verhoogd. In de eerste uren heeft dus in hoofdzaak een oxydatie plaats gegrepen, waarbij geen koolzuur werd gevormd. Deze gang van zaken maakt het in hooge mate waarschijnlijk, dat in de tweede phase der proefneming naast de primaire oxydatie, waarbij geen koolzuur ontstaat, een oxydatie optreedt van het in de eerste uren geaccumuleerde onvolledige oxydatieproduct.

Na afloop der proef werd in de gevallen waarin zich in het middenvaatje KOH voor de absorptie van koolzuur bevond, de pH van het medium bepaald. Deze bleek te zijn gedaald tot 3,75. Er moet bijgevolg een belangrijke hoeveelheid zuur zijn gevormd. Mede in verband met de in het voorafgaande hoofdstuk vermelde waarnemingen, mag met groote zekerheid worden besloten, dat het door de onvolledige oxydatie gevormde product azijnzuur is.

Uit de twee laatste kolommen volgt, dat de reservestof, welke bij afwezigheid van substraat wordt verbrand, de samenstelling van een koolhydraat $(\text{CH}_2\text{O})_n$ moet hebben. Men zou zich kunnen afvragen, of er aanleiding bestaat de waarden der blanco-bepalingen van de verkregen waarden met aethylalcohol af te trekken. Deze vraag moet echter ontkennend worden beantwoord. Immers in de proef met aethylalcohol zijn er in de eerste vier uren in totaal slechts 45 mm^3 koolzuur geproduceerd, terwijl deze hoeveelheid bij de bepaling zonder substraat 120 mm^3 bedraagt. Dit is een sterke aanwijzing, dat, indien er substraat aanwezig is, de reservestof niet wordt aangegrepen.

Vervolgens werd een zelfde proef ingezet met *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, van welke proef de resultaten in Tabel XXIII volgen.

TABEL XXIII.

Ademhaling van *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, in aethylalcohol-phosphaatmedium met $\text{pH} = 4,35$ bij 30°C .
Elk vaatje bevatte $2,72 \text{ mg}$ droge gist.

Tijdsduur	Aethylalcohol als substraat				Zonder substraat	
	Zuurstof- verbruik in mm^3	Koolzuur- productie in mm^3	Adem- halings- quotient	Q_{O_2}	Zuurstof- verbruik in mm^3	Koolzuur- productie in mm^3
1e uur	188	54	0,29	69,1	83	68
2e „	159	76	0,48	58,5	29	28
3e „	150	81	0,54	55,1	20	23
4e „	150	88	0,59	55,1	23	14
5e „	151	91	0,60	55,5	17	14
6e „	147	95	0,65	54,0	15	13
Totaal	945	485			187	160

Wij zien uit Tabel XXIII in de eerste plaats, dat in overeenstemming met wat voor *Brettanomyces Claussenii* geldt, de reservestof, welke bij afwezigheid van substraat wordt verbrand, de samenstelling van een koolhydraat $(\text{CH}_2\text{O})_n$ heeft.

Wat de proefnemingen met substraat betreft, valt op te merken, dat de Q_{O_2} geen stijging vertoont, zooals bij *Brettanomyces Claussenii*, doch met uitzondering van de in het eerste uur vastgestelde waarde, vrijwel constant is. Een vrij sterke daling na het eerste uur schijnt voor *Saccharomyces cerevisiae* een veel voorkomend verschijnsel te zijn; dit werd door HOGERHEIDE ¹⁾, en ook door mijzelf bij andere proefnemingen, herhaaldelijk geconstateerd. Voorts blijkt, dat het ademhalingsquotiënt in het eerste uur ongeveer de helft van de theoretische waarde voor volledige oxydatie van aethylalcohol bedraagt, doch in de volgende uren een snelle stijging vertoont en uiteindelijk praktisch deze waarde, te weten: 0,67, bereikt.

Aan deze waarnemingen kunnen nu verschillende mogelijkheden ten grondslag liggen. In de eerste plaats is er geen twijfel, dat in de eerste phase der proefneming naast elkaar een volledige oxydatie van den aethylalcohol tot koolzuur en water en een onvolledige oxydatie van dit substraat plaats hebben. De verkregen uitkomsten toonen verder onmiskenbaar, dat in de tweede phase een oxydatie, welke met koolzuurproductie gepaard gaat, in toenemende mate op den voorgrond treedt. Hiervoor kunnen nu twee oorzaken verantwoordelijk zijn. In de eerste plaats is het denkbaar, dat van de beide hierboven aangeduide oxydatiewegen van den aethylalcohol degene, welke tot koolzuurvorming leidt, steeds meer ten opzichte van de onvolledige oxydatie gaat overheerschen. Het feit, dat in het laatste uur der proefneming een ademhalingsquotiënt wordt aangetroffen, dat aan de theoretische waarde voor volledige verbranding van aethylalcohol beantwoordt, schijnt op het eerste gezicht voor deze voorstelling te pleiten. Nochtans lijkt deze mogelijkheid niet zeer aannemelijk, aangezien het niet is in te zien, waarom onder de practisch constant blijvende voorwaarden een dergelijke verschuiving zou intreden. Veel begrijpelijker wordt de waargenomen gang van zaken, wanneer men wederom veronderstelt, dat het in de primaire phase gevormde onvolledige oxydatieproduct, dat wel weer nauwelijks iets anders als azijnzuur kan zijn, tengevolge van de plaats vindende accumulatie, in toenemende mate als substraat voor de ademhaling begint te fungeeren. Het bereiken

¹⁾ J. C. HOGERHEIDE, Bijdrage tot de kennis van de reactie van PASTEUR. Leiden, 1935.

van de theoretische waarde van het ademhalingsquotiënt voor de volledige verbranding van aethylalcohol zou dan slechts beteeke-
nen, dat naast de beide primaire oxydatieprocessen van den aethyl-
alcohol zich een oxydatieproces van het eerder gevormde azijnzuur
superponeert en wel in die mate, dat evenveel azijnzuur wordt ge-
oxydeerd als gelijktijdig uit onvolledige oxydatie van aethylalcohol
ontstaat. De pH van het medium was na afloop 4,28, hetgeen in
overeenstemming met de voorafgaande beschouwingen op de aan-
wezigheid van een geringe hoeveelheid zuur wijst.

Uit deze proefnemingsserie is dus met groote waarschijnlijkheid
naar voren gekomen, dat — in tegenstelling met hetgeen de in
Hoofdstuk VI beschreven proefnemingen zouden doen ver-
wachten — er eveneens voor *Saccharomyces cerevisiae* wel degelijk
voorwaarden zijn te vinden, waaronder ook deze gistsoort azijn-
zuur vormt.

Toch is deze uitkomst niet geheel verrassend, aangezien reeds
eerder door WIELAND en medewerkers is gerapporteerd, dat zij
bij cultuurgist een oxydatie van aethylalcohol tot azijnzuur hadden
kunnen waarnemen. In een eerste publicatie van WIELAND en
CLAREN ¹⁾ wordt zelfs geconcludeerd, dat bij manometrische adem-
halingsproeven met aethylalcohol als substraat de opgenomen
zuurstof nagenoeg uitsluitend voor een oxydatie tot azijnzuur zou
zijn verbruikt. Aangaande dit resultaat zijn intusschen verschil-
lende opmerkingen te maken.

In de eerste plaats moet er op worden gewezen, dat de ge-
noemde auteurs niet met een reincultuur van *Saccharomyces*
cerevisiae hebben gewerkt, doch met technische „reine untergärige
Bierhefe, die nur einige Male gegoren hatte”. Hierbij komt, dat
deze gist een speciale behandeling had ondergaan om haar armer
aan reservestoffen te doen worden, welke behandeling bestond in
een schudden van de gist in een met toluol half-verzadigde phos-
phaatoplossing (pH = 6,8) gedurende 15 uur bij 30 C. in een zuur-
stofatmosfeer. Onder deze omstandigheden zal geen microbio-
loog vertrouwen kunnen hebben, dat het uiteindelijk verkregen
gistpraeparaat niet in belangrijke mate met gedurende deze be-
handeling geaccumuleerde azijnbacteriën verontreinigd is geweest.

Opmerkelijk is verder reeds, dat WIELAND en SONDERHOFF ²⁾ in

¹⁾ H. WIELAND und O. B. CLAREN, Ann. der Chemie **492**, 183, 1931.

²⁾ H. WIELAND und R. SONDERHOFF, Ann. der Chemie **499**, 213, 1932.

een spoedig daarna verschenen publicatie vermelden, dat hetzelfde gistpraeparaat bij gebruik van azijnzuur als substraat, dit zuur oxydeerde tot koolzuur en water en wel met een snelheid, welke bij die van de eerder waargenomen oxydatie van aethylalcohol tot azijnzuur niet achterstond.

Belangrijker is evenwel, dat WIELAND en WILLE ¹⁾ in een latere mededeeling de uitkomsten van WIELAND en CLAREN herroepen. Onder in achtneming van verschillende foutenbronnen, welke zich bij de eerdere proefnemingen hadden doen gelden, wordt thans geconcludeerd, dat het onderzochte gistpraeparaat reeds dadelijk een vrij volledige oxydatie van alcohol tot koolzuur en water bewerkt. De waargenomen ademhalingsquotiënten bedroegen voor een proefduur van 1 uur: 0,48, voor een van 2 uur: 0,55, wat dus altijd nog inhoudt, dat een niet te verwaarloozen hoeveelheid azijnzuur mede was gevormd.

Dit laatste resultaat is dus min of meer op één lijn te stellen met hetgeen hierboven omtrent het gedrag van *Saccharomyces cerevisiae* werd vastgesteld.

Anderzijds moet worden opgemerkt, dat de waargenomen azijnzuurvorming op het eerste gezicht moeilijk vereenigbaar is met de eerder verrichte waarneming, dat bij de oxydatieve dissimilatie van glucose door deze gistsoort geen spoor azijnzuur werd aangetroffen, terwijl toch bij onder dezelfde voorwaarden met *Brettanomyces Clausenii* uitgevoerde proefnemingen in bepaalde gevallen vrij groote hoeveelheden van dit zuur konden worden vastgesteld. Te dien opzichte moet nu evenwel direct worden opgemerkt, dat bij de bedoelde cultuurproeven geheel andere voorwaarden aanwezig waren. In de eerste plaats waren bij deze proeven goede voorwaarden voor den groei gerealiseerd, doch meer nog trekt het de aandacht, dat de pH van de bij deze proeven gebruikte media sterk afwijkt van die van het hierboven toegepaste fosphaat-medium. Ik heb mij daarom afgevraagd, of het verkrijgen van de uiteenlopende resultaten wellicht aan de verschillen in de pH moest worden geweten.

Teneinde dit na te gaan, werden de volgende manometrische ademhalingsproeven met aethylalcohol als substraat uitgevoerd in een medium met een pH, welke vrijwel gelijk was aan die van

¹⁾ H. WIELAND und F. WILLE, Ann. der Chemie 503, 70, 1933.

de bij de cultuurproeven gebruikte media, namelijk 6,4. Daar bij deze pH zeer zeker een groote hoeveelheid van het eventueel gevormde koolzuur in het medium zou worden vastgehouden, werd in de apparaten, welke voor de koolzuurbepaling dienden, 0,2 cm³ 10%-ig zwavelzuur in het zijvaatje gebracht. Er werden nu zooveel extra-apparaten ingezet, dat na elk uur één hiervan kon worden gebruikt voor de bepaling van de op dat tijdstip aanwezige hoeveelheid opgelost koolzuur. Hiertoe werd het zuur uit het zijvaatje door omschudden bij de suspensie gebracht; het apparaat werd nog eenigen tijd meegeschud, waarbij de hoogste stand van de vloeistof in den manometer werd afgelezen. Op den duur treedt namelijk merkwaardigerwijze weer een zekere teruggang in den stand van de manometervloeistof op. De verklaring hiervan bleek te zijn, dat de gistcellen in het aangezuurde medium na eenigen tijd weer een meetbare ademhaling vertoonen.

Daar de gebruikte apparaten slechts één zijvaatje hadden, werden bij de proeven, welke bij een hooge pH verliepen, de gistsuspensie en het substraat reeds onmiddellijk samen in het vaasje gebracht. De gebruikte buffer werd samengesteld uit passende hoeveelheden van oplossingen van 2/15 mol. Na₂HPO₄ · 2 H₂O en 2/15 mol. KH₂PO₄. Als ademhalingssubstraat werd aethylalcohol in een uiteindelijke concentratie van 1% gebruikt.

De verkregen resultaten met *Brettanomyces Claussenii* zijn in Tabel XXIV samengevat.

Er doet zich hier het opmerkelijke verschijnsel voor, dat er in het geheel geen koolzuur is gevormd ondanks het feit, dat er een goede ademhaling valt te constateeren. Er heeft hier bijgevolg gedurende den geheelen waarnemingstijd een onvolledige oxydatie van den aethylalcohol plaats gevonden. De pH na afloop der proef was 6,10, hetgeen er op wijst, dat er een belangrijke hoeveelheid zuur was gevormd, hetgeen naar alle waarschijnlijkheid wederom azijnzuur is.

In tegenstelling met hetgeen de bij pH = 4,35 verrichte proefneming te zien gaf, vertoont de Q_{O₂} geen stijging.

De resultaten van een soortgelijke met *Saccharomyces cerevisiae* uitgevoerde proefneming zijn in Tabel XXV samengevat.

TABEL XXIV.

Ademhaling van *Brettanomyces Claussenii* in aethylalcohol-phosphaatmedium met pH = 6,4 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 5,44 mg droge gist.

Tijdsduur	Aethylalcohol als substraat				Zonder substraat
	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurproductie in mm ³	Ademhalingsquotiënt	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³
1e uur	175	0	0	32,2	54
2e „	166	0	0	30,5	38
3e „	167	0	0	30,7	27
4e „	171	0	0	31,4	26
5e „	173	0	0	31,8	20
Totaal	852	0			165

TABEL XXV.

Ademhaling van *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, in aethylalcohol-phosphaatmedium met pH = 6,4 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 2,56 mg droge gist.

Tijdsduur	Aethylalcohol als substraat				Zonder substraat
	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurproductie in mm ³	Ademhalingsquotiënt	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³
1e uur	176	38	0,22	68,8	40
2e „	163	74	0,45	63,7	25
3e „	172	91	0,53	67,2	18
4e „	188	115	0,61	73,4	13
5e „	162	92	0,57	63,3	14
Totaal	861	410			110

Uit Tabel XXV blijkt, dat het ademhalingsquotiënt in het medium met $\text{pH} = 6,4$ gedurende het geheele verloop van de proefneming practisch overeenkomt met de hiervoor vastgestelde waarden bij $\text{pH} = 4,35$. Verder is de Q_{O_2} vrijwel constant, doch een weinig hooger dan bij de vorige proefneming met deze gist.

Na afloop bleek, dat de pH van het medium practisch niet was veranderd.

Uit een en ander volgt, dat — in tegenstelling met het eerder vermelde gedrag van *Brettanomyces Claussenii* — de verhooging van de pH in de wijze van oxydatie van aethylalcohol door *Saccharomyces cerevisiae* slechts een zeer geringe wijziging heeft teweeggebracht.

Op grond van deze uitkomsten werd nu nagegaan, of door verlaging van de pH beneden 4,0 de koolzuurproductie door beide gistsoorten nog was op te voeren. Daar het niet mogelijk is, een aethylalcohol-phosphaatmedium samen te stellen met een lagere pH dan $\pm 4,35$, werd voor deze proeven een phtalaatbuffer gebruikt.

De resultaten, welke in dit medium, hetwelk 1% aethylalcohol als substraat bevatte, met *Brettanomyces Claussenii* werden verkregen, volgen in Tabel XXVI. Gistsuspensie en substraat konden thans weer bij elkaar worden gevoegd, nadat evenwichts- en temperatuursinstelling waren bereikt.

Tabel XXVI leert nu, dat er thans ruim tweemaal zooveel koolzuur is gevormd dan bij de in Tabel XXII weergegeven proefneming bij $\text{pH} = 4,35$, terwijl toch het totale zuurstofverbruik in beide gevallen vrijwel gelijk is. Het ademhalingsquotiënt, dat in de eerste twee uren nul is, stijgt daarna vrij snel tot de theoretische waarde voor volledige verbranding van aethylalcohol en komt in de beide laatste uren zelfs aanmerkelijk boven deze waarde uit. Deze stijging tot boven de theoretische waarde levert in de eerste plaats het rechtstreeksche bewijs, dat in de tweede phase dezer proefneming naast de primaire oxydatie, waarbij geen koolzuur ontstaat, een oxydatie optreedt van het in de eerste uren geaccumuleerde onvolledige oxydatieproduct, azijnzuur. Voorts volgt hieruit, dat *Brettanomyces Claussenii* bij dezen zuurgraad een voorkeur heeft voor azijnzuur boven aethylalcohol, wat in het bijzonder duidelijk blijkt, omdat dit zuur ook in de laatste phase der proefneming

TABEL XXVI.

Ademhaling van *Brettanomyces Claussenii* in aethylalcohol-phtalaat medium met pH = 3,77 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 5,76 mg droge gist.

Tijdsduur	Aethylalcohol als substraat				Zonder substraat
	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurproductie in mm ³	Ademhalingsquotient	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³
1e uur	183	0	0	31,8	32
2e „	186	0	0	32,3	7
3e „	202	47	0,23	35,1	0
4e „	211	110	0,52	36,6	0
5e „	216	160	0,74	37,5	0
6e „	230	193	0,84	39,9	0
Totaal	1228	510			39

ongetwijfeld in veel lagere concentratie dan de aethylalcohol aanwezig is geweest.

Tenslotte schijnt de stijging van de Q_{O₂} er op te wijzen, dat de gist bij de lage pH — rekening houdende met de concentratie waarbij beide verbindingen aanwezig zijn — ten opzichte van azijnzuur een sterkere ademhalingsactiviteit vertoont dan ten opzichte van aethylalcohol.

De voornaamste conclusie echter, welke uit de hierboven gedane waarnemingen moet worden getrokken, is deze, dat verlaging van de pH sterk de verbranding van het primair gevormde azijnzuur bevordert. In overeenstemming hiermede is de slechts zeer geringe daling van de pH tijdens de proefneming. Deze was namelijk aan het einde der proef 3,74.

Met *Saccharomyces cerevisiae* werden bij een soortgelijke proef de in Tabel XXVII gegeven uitkomsten verkregen.

TABEL XXVII.

Ademhaling van *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, in aethylalcohol-phtalaat medium met pH = 3,77 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 2,7 mg droge gist.

Tijdsduur	Aethylalcohol als substraat				Zonder substraat
	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurproductie in mm ³	Ademhalingsquotiënt	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³
1e uur	200	50	0,25	73,5	105
2e „	176	99	0,56	64,7	58
3e „	174	104	0,59	64,0	34
4e „	179	117	0,65	65,8	19
5e „	175	114	0,65	64,3	15
6e „	191	142	0,74	70,2	10
Totaal	1095	626			241

Uit de cijfers van Tabel XXVII blijkt, dat verlagings van de pH tot beneden 4,0 ook bij persgist een betrekkelijk aanzienlijke wijziging in het oxydatieproces teweegbrengt. In de eerste plaats bereikt het ademhalingsquotiënt sneller de theoretische waarde voor volledige verbranding van aethylalcohol dan in het medium met pH = 4,35. Voorts stijgt dit quotiënt bij voortzetting der proef onder de gekozen voorwaarden zelfs tot boven deze waarde. Dit laatste verschijnsel levert het rechtstreeksche bewijs, dat ook bij deze gist het in de primaire phase onder meer gevormde onvolledige oxydatieproduct tengevolge van de plaats vindende accumulatie, in toenemende mate als ademhalingssubstraat begint te fungeren. Immers, indien het hier uitsluitend om een verschuiving van de beide oxydatietypen van aethylalcohol ten gunste der volledige oxydatie ging, zou het ademhalingsquotiënt van 0,67 niet kunnen worden overschreden.

Uit genoemd verschijnsel volgt tevens, dat ook deze gist bij de lage pH van het medium een voorkeur heeft voor azijnzuur boven aethylalcohol als ademhalingssubstraat.

Om het overzicht over de verkregen resultaten te vergemakkelijken, heb ik de bij de verschillende proefnemingen gevonden

waarden voor het ademhalingsquotiënt en voor de ademhalingsintensiteit in twee tabellen vereenigd, welke hieronder volgen (Tabel XXVIII en XXIX).

TABEL XXVIII.

De met *Brettanomyces Claussenii* vastgestelde ademhalingsquotiënten en ademhalingsintensiteiten met aethylalcohol als substraat bij uiteenlopende pH.

Tijdsduur	pH = 6,40		pH = 4,35		pH = 3,77	
	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$	Q_{O_2}	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$	Q_{O_2}	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$	Q_{O_2}
1e uur	0	32,2	0,08	30,6	0	31,8
2e „	0	30,5	0,03	28,8	0	32,3
3e „	0	30,7	0,06	30,4	0,23	35,1
4e „	0	31,4	0,07	34,9	0,52	36,6
5e „	0	31,8	0,30	39,6	0,74	37,5
6e „	—	—	0,37	40,6	0,84	39,9

TABEL XXIX.

De met *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, vastgestelde ademhalingsquotiënten en ademhalingsintensiteiten met aethylalcohol als substraat bij uiteenlopende pH.

Tijdsduur	pH = 6,40		pH = 4,35		pH = 3,77	
	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$	Q_{O_2}	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$	Q_{O_2}	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$	Q_{O_2}
1e uur	0,22	68,8	0,29	69,1	0,25	73,5
2e „	0,45	63,7	0,48	58,5	0,56	64,7
3e „	0,53	67,2	0,54	55,1	0,59	64,0
4e „	0,61	73,4	0,59	55,1	0,65	65,8
5e „	0,57	63,3	0,60	55,5	0,65	64,3
6e „	—	—	0,65	54,0	0,74	70,2

Uit de Tabellen XXVIII en XXIX blijkt nu duidelijk, dat de wijze van oxydatie van aethylalcohol door *Brettanomyces Clausenii* sterk afhankelijk is van de pH van het medium, terwijl deze oxydatiewijze bij *Saccharomyces cerevisiae* binnen het onderzochte gebied een veel geringere afhankelijkheid van de pH vertoont.

In den hierboven ontwikkelden gedachtengang beteekent dit, dat onder de gekozen voorwaarden bij *Brettanomyces Clausenii* het enzyme, hetwelk de dehydrogeneering van azijnzuur bewerkstelligt — de azijnzuur-dehydrogenase — bij pH = 6,40 practisch volledig inactief is, terwijl bij voortgezette verlaging van de pH een sterk toenemende activiteit tot uiting komt. Daarentegen vertoont het enzyme, hetwelk voor de dehydrogeneering van aethylalcohol tot azijnzuur verantwoordelijk is — „de alcoholo-acetase”¹⁾ — in het onderzochte traject slechts geringe schommelingen in activiteit.

Bij *Saccharomyces cerevisiae* zou dan de activiteit van de azijnzuur-dehydrogenase tusschen pH 6,40 en 4,35 vrijwel constant en slechts een weinig lager dan die van de alcoholo-acetase zijn. Verdere verlaging van de pH heeft echter bij deze gist eveneens een vrij aanzienlijke stijging van de activiteit der azijnzuur-dehydrogenase ten gevolge.

De voorafgaande beschouwing herinnert nu aan hetgeen bekend is betreffende het uiteenlopende gedrag van azijnbacteriën. De bacteriën behorende tot de suboxydans-groep, oxydeeren aethylalcohol slechts tot azijnzuur, terwijl die van de andere groepen het vermogen bezitten het primaire uit alcohol gevormd azijnzuur tot koolzuur en water verder te oxydeeren.

In dit verband is het eveneens van belang te vermelden, dat JANKE²⁾ de vorming van een aanzienlijke hoeveelheid azijnzuur kon vaststellen bij cultiveering van de gistsoort *Mycoderma Lafarii* in bier, waaraan een passende hoeveelheid alcohol was toegevoegd, terwijl bij voortzetting der proef over langeren termijn wederom een verdwijnen van dit zuur intrad. Hier ontmoeten wij dus het duidelijke geval van een gistsoort, welker physiologische eigenschappen die van azijnbacteriën benaderen.

Evenwel moet er op worden gewezen, dat het bewuste gedrag

¹⁾ Deze barbaarsche naam is gevormd naar analogie met in de enzymchemie gangbare benamingen als „succino-fumarase” e.d.

²⁾ A. JANKE, Archiv f. Mikrobiol. 1, 176, 1930.

van *Mycoderma Lafarii* van dat van *Brettanomyces* in één opzicht belangrijk afwijkt, in zooverre dat *Mycoderma Lafarii* niet in staat is suikers te vergisten. In overeenstemming hiermede kon ook ik met *Mycoderma Lafarii* uitsluitend vorming van azijnzuur vaststellen, indien aethylalcohol als koolstofbron werd gebruikt; in suikerhoudende media werd daarentegen geen zuur gevormd.

Het was uiteraard aangewezen, de hierboven getrokken conclusies nader te toetsen door thans rechtstreeksche waarnemingen te verrichten over het gedrag der beide gistsoorten ten opzichte van azijnzuur als ademhalingssubstraat en wel in media met uiteenlopende pH.

In de volgende paragraaf zal hieraan aandacht worden geschonken.

§ 4. MANOMETRISCHE ADEMHALINGSPROEVEN MET AZIJNZUUR ALS SUBSTRAAT.

Bij de hier volgende proefnemingen werd de gist op dezelfde wijze gecultiveerd als bij de proeven met aethylalcohol als substraat.

Omdat bij deze proefnemingen in de zijvaatjes zuur moest worden gebracht voor vrijmaking van het koolzuur — de meeste ademhalingsproeven met azijnzuur als substraat werden namelijk in media met pH hooger dan 5,0 verricht — moesten de gistsuspensie en het substraat wederom voorafgaande aan de phase der evenwichtsinstelling samen worden gebracht.

Allereerst moest worden nagegaan, of *Brettanomyces Claussenii* onder de voorwaarden van de manometrische methode in staat was azijnzuur, in den vorm van natriumacetaat aan het medium toegevoegd, tot koolzuur en water te verbranden. Hiertoe werd de ademhaling van deze gist bepaald in een 2/15 mol. KH_2PO_4 -oplossing, waaraan 0,75 % natriumacetaat werd toegevoegd. Dit medium had een pH van 5,5. Als contrôle werd tevens een apparaat ingezet met 1% aethylalcohol als substraat in een fosphaatmedium met dezelfde pH.

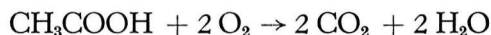
Bij de eerste proefnemingen, waarvan de resultaten in Tabel XXX volgen, werd de waarneming slechts over drie uren uitgestrekt.

TABEL XXX.

Ademhaling van *Brettanomyces Claussenii* met azijnzuur en met aethylalcohol als substraat in fosphaatbuffer met pH = 5,5 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 5,76 mg droge gist.

Tijdsduur	Azijnzuur als substraat			Aethylalcohol als substraat		Zonder substraat
	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurproductie in mm ³	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³
1e uur	80	81	13,9	229	39,8	41
2e „	97	99	16,8	213	37,0	33
3e „	104	107	18,1	229	39,8	28
Totaal	281	287		671		102

Uit Tabel XXX blijkt, dat *Brettanomyces Claussenii* bij pH = 5,5 inderdaad het vermogen bezit azijnzuur volledig te verbranden tot koolzuur en water volgens de reactie:



Evenwel vertoont deze gist bij genoemde pH geheel volgens de verwachting met azijnzuur een aanmerkelijk lagere ademhalingsintensiteit dan met aethylalcohol als substraat.

Overeenkomstig het in de vorige paragraaf beschreven onderzoek over de oxydatie van aethylalcohol, was het nu aangewezen ook de oxydatie van azijnzuur bij een hogere en bij een lagere pH na te gaan.

Bij pH = 6,8 werden nu de in Tabel XXXI weergegeven resultaten verkregen.

TABEL XXXI.

Ademhaling van *Brettanomyces Claussenii* met azijnzuur en met aethylalcohol als substraat in fosphaatbuffer met pH = 6,8 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 5,12 mg droge gist.

Tijdsduur	Azijnzuur als substraat		Aethylalcohol als substraat			Zonder substraat
	Zuurstofverbruik in mm ³	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurproductie in mm ³	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³
1e uur	37	7,2	152	14	29,7	27
2e ,,	44	8,6	166	11	32,4	20
3e ,,	43	8,4	176	4	34,4	18
Totaal	124		494	29		65

Tabel XXXI leert, dat de ademhaling met aethylalcohol als substraat door de verhooging van de pH een weinig in intensiteit is gedaald, een verschijnsel, dat ook reeds bij de proefnemingen, welke in de vorige paragraaf zijn beschreven, werd geconstateerd. Met azijnzuur als substraat is de Q_{O₂} in belangrijk sterkere mate afgenomen dan met aethylalcohol.

Ofschoon bij de oxydatie van aethylalcohol slechts een zeer geringe hoeveelheid koolzuur is gevormd, heeft er toch met acetaat een vrij aanzienlijke verbranding van azijnzuur tot koolzuur en water plaats gevonden. Dit op het eerste gezicht onverwachte resultaat wordt evenwel dadelijk begrijpelijk, wanneer men beseft, dat de gist in het laatste geval geen ander substraat dan azijnzuur tot haar beschikking heeft.

Teneinde de oxydatie van azijnzuur bij een pH van ongeveer 4,0 na te gaan werd aanvankelijk, overeenkomstig de proefnemingen met aethylalcohol, een phtalaatbuffer gebruikt.

Hierbij kwam nu het zeer opmerkelijke verschijnsel aan het licht, dat met *Brettanomyces Claussenii* in genoemde bufferoplossing, waaraan 0,75 % natriumacetaat was toegevoegd — welk medium dan een pH van 4,0 had — geen zuurstofverbruik viel te constateeren. Zonder toevoeging van acetaat had evenwel de normale blanco-zuur-

stofopneming plaats, terwijl met 1% aethylalcohol als substraat een Q_{O_2} van 30,7 kon worden vastgesteld. Een tweede poging, waarbij ik gebruik maakte van den azijnzuur-acetaatbuffer volgens WALPOLE, bracht geen verbetering. Deze bufferoplossing (pH = 4,42) had een totale acetaatconcentratie van 0,2 molair en diende bij deze proefneming tevens als substraat. De contrôle, met toevoeging van 1% aethylalcohol aan dit medium, liet ook slechts een gering zuurstofverbruik zien, er werd namelijk een Q_{O_2} van 13,8 vastgesteld.

Dit resultaat is nu zeker verrassend, daar bij de eerder beschreven proefnemingen met aethylalcohol als substraat bij een nog iets lagere pH een verbranding van aethylalcohol via azijnzuur tot koolzuur en water werd geconstateerd. Alles wijst er op, dat het de hoge concentratie van het ongedissocieerde azijnzuur is, welke bij de proefnemingen met azijnzuur als substraat remmend op de ademhaling werkt.

In dit verband is het van belang op te merken, dat de azijnzuur-acetaatbuffer eveneens een remmende werking op de ademhaling van persgist uitoefende, terwijl met deze gist in een fosfaatmedium van pH = 6,4 toch ook een goede oxydatie van azijnzuur, als natriumacetaat toegevoegd, plaats vond. Deze laatste resultaten zullen hier niet in een afzonderlijke tabel worden vermeld, daar het gedrag van persgist ten opzichte van azijnzuur voldoende uit de volgende proeven blijkt.

Deze verdere proeven werden genomen met het oog op de wenschelijkheid nog enkele waarnemingen met *Brettanomyces Claussenii* te verrichten op zoodanige wijze, dat de uiteenlopende pH-afhankelijkheid van de alcoholo-acetase en van de azijnzuurdehydrogenase kon worden getoetst onder uitsluiting van de verschillen in cultuurvoorwaarden, welke bij de vorige proeven waarschijnlijk invloed hadden uitgeoefend. Dit nu kon alleen worden bereikt door de waarnemingen bij verschillende pH in één proef te vereenigen, uitgaande van één enkele portie gist. Overeenkomstige waarnemingen werden met *Saccharomyces cerevisiae* verricht.

De ongunstige resultaten, welke hierboven werden vermeld bij gebruik van den phtalaatbuffer en van den azijnzuur-acetaatbuffer noopten mij echter het onderzoek te beperken tot dat pH-gebied, hetwelk met fosfaatbuffer — in niet te hoge concentratie — kon worden bestreken. De minimum waarde van de pH, welke

langs dezen weg kon worden bereikt, was 5,3; deze werd verkregen door toevoeging van 0,3% natriumacetaat aan een 3%-ige KH_2PO_4 -oplossing. Het leek mij niet raadzaam een nog kleinere hoeveelheid acetaat te gebruiken, daar een geringere concentratie niet voldoende waarborg scheen te bieden voor het verkrijgen van een optimale ademhaling gedurende het geheele verloop van de proefneming. Het medium met $\text{pH} = 7,0$ was eveneens zoodanig samengesteld, dat de totale fosfaatconcentratie 3% bedroeg.

Met *Brettanomyces Claussenii* in 0,3% natriumacetaat- en in 0,3% aethylalcohol-fosfaatmedium werden de in Tabel XXXII weergegeven resultaten verkregen.

TABEL XXXII.

Ademhaling van *Brettanomyces Claussenii* resp. met 0,3% natrium-acetaat en met 0,3% aethylalcohol als substraat in fosphaat-buffers met pH 7,0 en 5,3 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 5,12 mg droge gist.

Tijdsduur	pH = 7,0							
	Azijnzuur als substraat			Zonder substr.	Aethylalcohol als substraat			
	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurprod. in mm ³	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurprod. in mm ³	Ademhalingsquotient	Q _{O₂}
1e uur ..	36	} 178	7,0	19	153	15	0,10	29,9
2e „ ..	31		6,1	14	148	8	0,05	28,9
3e „ ..	29		5,7	2	166	7	0,04	32,2
4e „ ..	32		6,2	14	168	17	0,10	32,9
5e „ ..	29		5,7	16	167	13	0,08	32,4
6e „ ..	30		5,9	15	174	17	0,10	34,0
Totaal ..	187	178		80	976	77		
	pH = 5,3							
1e uur ..	51	48	10,0	28	153	10	0,07	29,9
2e „ ..	59	53	11,5	27	173	11	0,06	33,8
3e „ ..	55	56	10,7	21	176	19	0,11	34,4
4e „ ..	66	72	12,9	14	198	55	0,28	38,7
5e „ ..	78	77	15,2	16	232	138	0,59	45,3
6e „ ..	88	86	17,2	22	224	182	0,81	43,8
Totaal ..	397	392		128	1156	415		

Tabel XXXII laat nu duidelijk zien, dat in beide media de ademhaling van *Brettanomyces Claussenii* met azijnzuur als substraat veel lager is dan met aethylalcohol, hetgeen dus inhoudt, dat de azijnzuur-dehydrogenase een veel geringere activiteit ontplooit dan de alcoholo-acetase. Bovendien zien wij wederom, dat door verlaging van de pH de activiteit der azijnzuur-dehydrogenase sterk wordt verhoogd. In overeenstemming hiermede is bij pH = 5,3 de koolzuurproductie met aethylalcohol als substraat aanzienlijk hooger dan bij pH = 7,0.

Daarentegen ondergaat de activiteit van de alcoholo-acetase naar verhouding een aanmerkelijk geringere verlaging door verhooging van de pH.

Hiermede is het rechtstreeksche bewijs geleverd voor een zeer uiteenlopend gedrag van de beide genoemde dehydrogenasen bij *Brettanomyces Claussenii*, waarbij speciaal een veel grootere pH-afhankelijkheid van de azijnzuur-dehydrogenase dan van de alcoholo-acetase tot uiting komt.

De resultaten van een soortgelijke proefneming met *Saccharomyces cerevisiae* zijn in Tabel XXXIII samengevat.

TABEL XXXIII.

Ademhaling van *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, resp. met 0,3% natriumacetaat en met 0,3% aethylalcohol als substraat in fosphaatbuffers met pH 7,0 en 5,3 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 2,88 mg droge gist.

Tijdsduur	pH = 7,0							
	Azijnzuur als substraat			Zonder substr.	Aethylalcohol als substraat			
	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurprod. in mm ³	Q _{O₂}	Zuurstofverbruik in mm ³	Zuurstofverbruik in mm ³	Koolzuurprod. in mm ³	Ademhalingsquotient	Q _{O₂}
1e uur ..	105	}374	36,5	78	183	}182	}0,50	63,5
2e „ ..	146		50,7	41	182			63,2
3e „ ..	147		51,0	32	182			63,2
4e „ ..	156	}486	54,2	25	184	}230	}0,63	63,9
5e „ ..	156		54,2	24	186			64,6
6e „ ..	153		53,1	21	188			65,3
Totaal ..	863	860		221	1105	731		
pH = 5,3								
1e uur ..	103	94	35,8	—	219	98	0,45	76,0
2e „ ..	190	185	66,0	—	216	135	0,63	75,0
3e „ ..	195	197	67,7	—	199	132	0,66	69,1
4e „ ..	174	178	60,4	—	202	137	0,68	70,1
5e „ ..	151	151	52,4	—	182	124	0,68	63,2
6e „ ..	156	158	54,2	—	184	123	0,67	63,9
Totaal ..	969	963			1202	749		

Uit Tabel XXXIII volgt, dat bij *Saccharomyces cerevisiae* zowel de activiteit van de alcoholo-acetase als die van de azijnzuurdehydrogenase in veel geringere mate afnemen door verhooging van de pH van 5,3 op 7,0 dan die van de overeenkomstige enzymen bij *Brettanomyces Claussenii*. Bovendien is bij eerstgenoemde gistsoort bij beide pH's het zuurstofverbruik met natriumacetaat als substraat slechts een weinig lager dan met aethylalcohol als substraat.

Een en ander maakt begrijpelijk, dat bij de aërobe dissimilatie van glucose door *Saccharomyces cerevisiae* in de cultuurproeven geen azijnzuur werd waargenomen zooals bij de overeenkomstige proeven met *Brettanomyces Claussenii*, doch alleen de uiteindelijke oxydatieproducten van glucose, te weten koolzuur en water. Immers, indien bij deze proeven intermediair azijnzuur werd gevormd — hetzij door rechtstreeksche oxydatie van de suiker, hetzij door dehydrogeneering van primair gevormden aethylalcohol — laat zich verwachten, dat dit reactieproduct, volgens de hierboven verkregen resultaten, met vrij groote snelheid wederom zou verdwijnen. De geringe snelheid, waarmede daarentegen azijnzuur, speciaal bij hooge pH, door *Brettanomyces Claussenii* wordt verbrand, verklaart in zekere mate eveneens het feit, dat bij de aërobe dissimilatie van glucose door deze gist in de cultuurproeven een vrij groote hoeveelheid azijnzuur na bepaalden tijd kon worden waargenomen. Het intusschen bij deze gistsoort wel aanwezig zijn van het vermogen tot verbranding van azijnzuur tot koolzuur en water steunt de eerder geuite veronderstelling, dat het azijnzuur, dat gevormd is bij de in Hoofdstuk VI beschreven cultuurproef met korten aëratietijd, bij voortgezette aëratie weer zou zijn verdwenen en wel — zooals in de proefneming bij langdurige aëratie kennelijk is geschied — in koolzuur en water zou zijn omgezet.

§ 5. DE INVLOED VAN ZUURSTOF OP DE SUIKERVERGISTING DOOR *BRETTANOMYCES CLAUSSENI*.

De in de beide voorafgaande paragrafen beschreven proefnemingen geven uiteraard reeds eenig inzicht in het mechanisme van de aërobe dissimilatie van glucose door beide genoemde gisttypen, doordat zij licht werpen op de oxydatiewijze van de hierbij eventueel optredende reactieproducten, aethylalcohol en azijnzuur. Toch was het gewenscht hiernaast ook rechtstreeksche manome-

trische waarnemingen te verrichten met glucose als substraat, teneinde den invloed van zuurstof op de suikervergisting door *Brettanomyces Claussenii* nader vast te stellen.

Naast de ademhaling werden bij deze proeven dus steeds ook de aërobe en de anaërobe gisting bepaald.

Wederom werd de voor deze proefnemingen benodigde gist op platen gecultiveerd en wel op geheel dezelfde wijze als eerder beschreven, d.w.z., dat *Brettanomyces Claussenii* gedurende drie dagen op moutagar-krijt-platen werd gecultiveerd en *Saccharomyces cerevisiae* gedurende twee dagen op moutagar-platen.

De aldus verkregen gist werd, na de bekende behandeling te hebben ondergaan, in een 2,5%-ige KH_2PO_4 -oplossing gesuspenderd. Van deze gistsuspensie werd een passende hoeveelheid in de apparaten gebracht. Het substraat, eveneens in genoemde fosphaatoplossing opgelost, werd bij het begin der aflezing uit het zijvatje toegevoegd. De glucose-concentratie bedroeg na het bij elkaar voegen van substraat en suspensie 2%.

Tabel XXXIV geeft de bij de eerste proefneming met *Brettanomyces Claussenii* verkregen resultaten weer.

TABEL XXXIV.

Ademhaling, aërobe en anaërobe gisting van *Brettanomyces Claussenii* in 2% glucose-phosphaatmedium met $\text{pH} = 4,5$ bij 30°C . Elk vaatje bevatte 5,76 mg droge gist.

Tijdsduur	Q_{O_2}	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{O}_2}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$
1e uur	33,5	25,2	5,0
2e „	36,1	10,3	5,6
3e „	37,3	9,7	6,9

De beteekenis der gebruikte symbolen is als volgt:

Q_{O_2} (ademhalingsintensiteit) is het aantal mm^3 zuurstof per uur verbruikt door een hoeveelheid gist overeenkomende met 1 mg droge gist.

$Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ (intensiteit der anaërobe gisting) drukt uit het aantal $\text{mm}^3 \text{CO}_2$,

dat in denzelfden tijd en door dezelfde hoeveelheid gist in een stikstofatmosfeer wordt gevormd.

$Q_{\text{CO}_2}^{\text{O}_2}$ (intensiteit der aërobe gisting) is het aantal $\text{mm}^3 \text{CO}_2$, dat onder dezelfde voorwaarden, doch dan in tegenwoordigheid van zuurstof, door het gistingsproces wordt gevormd. Deze hoeveelheid koolzuur wordt dus verkregen door van de totale bij zuurstofaanwezigheid verkregen hoeveelheid koolzuur de door de ademhaling geproduceerde hoeveelheid af te trekken, waarbij deze laatste dan wordt berekend uit de hoeveelheid opgenomen zuurstof in de veronderstelling, dat het ademhalingsquotiënt = 1 is.

In de eerste plaats zien wij uit Tabel XXXIV, dat de Q_{O_2} en de $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ een geringe stijging vertoonen; de gist heeft dus blijkbaar eenigen tijd noodig om zich aan het milieu aan te passen. In strijd hiermede is de sterke daling, welke de $Q_{\text{CO}_2}^{\text{O}_2}$, speciaal na het eerste uur, vertoont.

Hiernaast trekt bovenal het feit de aandacht, dat de waarden voor de $Q_{\text{CO}_2}^{\text{O}_2}$ aanmerkelijk hooger zijn dan die van de $Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$. Dit toch beteekent, dat onder aërobe voorwaarden per tijdseenheid meer suiker wordt vergist dan onder anaërobe voorwaarden.

Tenslotte treft de wel uiterst geringe absolute waarde der anaërobe gisting.

Alvorens evenwel nader op de beteekenis van deze waarnemingen in te gaan, besloot ik eerst nog een tweede proefneming te verrichten, teneinde mij van de juistheid dezer uitkomsten te overtuigen. Ter vergelijking werd ditmaal een soortgelijke proef met *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, gedaan.

De vaatjes van de serie met *Brettanomyces Claussenii* bevatten elk 5,92 mg droge gist en die van de serie met *Saccharomyces cerevisiae* elk 2,80 mg. Daar in een zuur medium werd gewerkt, konden de gistsuspensie en het substraat wederom bij elkaar worden gevoegd, nadat instelling van temperatuur en evenwicht was bereikt.

De met beide gistsoorten verkregen resultaten zijn in Tabel XXXV samengevat.

TABEL XXXV.

Ademhaling, aërobe en anaërobe gisting van *Brettanomyces Claussenii* en van *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, in 2% glucose-phosphaatmedium met pH = 4,5 bij 30° C.

Tijdsduur	<i>Brettanomyces Claussenii</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{O_2}$	$Q_{CO_2}^{N_2}$	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{O_2}$	$Q_{CO_2}^{N_2}$
1e uur	37,8	18,6	3,0	54,6	55,0	129,7
2e ,,	39,2	9,6	3,4	51,1	101,8	133,2
3e ,,	39,9	7,4	3,4	48,6	115,4	140,0

De in Tabel XXXV voor *Brettanomyces Claussenii* weergegeven uitkomsten vertoonen geheel hetzelfde beeld als boven beschreven.

In de eerste plaats treft wederom een sterke daling van de $Q_{CO_2}^{O_2}$; bij *Saccharomyces cerevisiae* valt daarentegen juist een sterke stijging van deze grootte waar te nemen. Voorts vertoont eerstgenoemde gistsoort, evenals bij de vorige proefneming, het verschijnsel, dat de anaërobe gisting wederom aanmerkelijk lager is dan die onder aërobe voorwaarden. Tenslotte treedt de uitzonderlijk lage waarde der anaërobe gisting bij *Brettanomyces Claussenii* nog duidelijker naar voren.

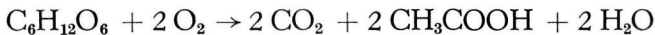
De drie genoemde verschijnselen zullen thans achtereenvolgens aan een analyse worden onderworpen.

a. De daling van de $Q_{CO_2}^{O_2}$

Hierbij rijst allereerst de vraag, of dit verschijnsel inderdaad reëel is. In dit verband moet er namelijk aan worden herinnerd, dat bij aërobe dissimilatie van glucose door *Brettanomyces Claussenii* in de cultuurproeven een belangrijke hoeveelheid azijnzuur was gevormd. Verder wezen de manometrische ademhalingsproeven met aethylalcohol als substraat eveneens op een intermediaire azijnzuurvorming bij de verbranding van dit substraat.

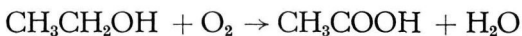
Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat door genoemde gistsoort bij de hierboven beschreven manometrische proefneming uit glucose onder aërobe voorwaarden eveneens azijnzuur is gevormd naast de optredende alcoholische gisting en een eventueel plaats vindende volledige verbranding van glucose. De vraag is nu, op welke wijze een azijnzuurvorming in de uitkomsten betreffende het zuurstofverbruik en de koolzuurproductie tot uiting komt.

Aan deze zuurvorming liggen kennelijk twee mogelijkheden ten grondslag. In de eerste plaats zou er azijnzuur kunnen zijn gevormd door rechtstreeksche onvolledige oxydatie van de suiker volgens de reactievergelijking:



Dit proces zou geen invloed hebben op de uitkomsten van de berekening der aërobe gisting. Immers bij deze berekening wordt voor het ademhalingskoolzuur een bedrag aangenomen gelijk aan de hoeveelheid opgenomen zuurstof, d.w.z. hierbij is een ademhalingsquotiënt = 1 verondersteld en dit quotiënt treedt eveneens bij de hierboven genoemde omzetting op.

Een tweede mogelijkheid is evenwel, dat azijnzuur ontstaat door onvolledige oxydatie van primair gevormden aethylalcohol volgens de vergelijking:



Deze reactie kan evenwel eerst na eenigen tijd intreden, aangezien er in het begin der proefneming geen aethylalcohol in het medium aanwezig is.

Wat is nu bij de boven beschreven proefnemingen met *Brettanomyces Claussenii* het geval? De daling van de $Q_{\text{CO}_2}^{\text{O}_2}$ geeft een sterke aanwijzing ten gunste van de zienswijze, dat er langzamerhand in stijgende mate een oxydatie intreedt van een in de eerste phase zich ophoepend reactieproduct, voor welke oxydatie het ademhalingsquotiënt kleiner is dan 1. Immers in dit geval is bij de berekening van de waarde van de $Q_{\text{CO}_2}^{\text{O}_2}$ een te groote — op de onjuiste basis van een ademhalingsquotiënt 1 uit het zuurstofverbruik berekende — hoeveelheid koolzuur van de totaal vastgestelde hoeveelheid afgetrokken.

De veronderstelling, dat naarmate de proefneming voortduurt de tengevolge der aërobe gisting accumuleerende alcohol geleidelijk

een oxydatie tot azijnzuur ondergaat, is dus geschikt om een verklaring der waargenomen daling van de $Q_{CO_2}^{O_2}$ te geven. Deze daling toch zou dan slechts schijnbaar zijn en op een onjuiste praemisse bij de berekening berusten. Aan de voor $Q_{CO_2}^{O_2}$ opgegeven cijfers mag dus met groote waarschijnlijkheid slechts betrekkelijke waarde worden toegekend; in werkelijkheid zal de aërobe gisting hoger zijn.

Dit laatste beteekent, dat het hierboven reeds gesignaleerde verschijnsel van het overtreffen der anaërobe door de aërobe gisting nog in sterkere mate geldt dan in de opgegeven cijfers tot uiting komt.

Terwijl op deze opmerkelijke uitkomst van het onderzoek hieronder zal worden teruggekomen, wil ik eerst nog een enkele opmerking maken over de wijzen, waarop de zuurstof in het plaats gevonden hebbende chemisme is betrokken.

Hoe zeer ook veel pleit voor de zienswijze, dat een oxydatie van alcohol tot azijnzuur onder zuurstofopneming is verlopen, nochtans is het niet aannemelijk, dat deze reactie verantwoordelijk is voor het volledige zuurstofverbruik. Tegen dit denkbeeld verzet zich het feit, dat de Q_{O_2} reeds in het eerste uur vrijwel gelijk was aan die in de beide laatste uren, terwijl toch bij den aanvang van de proefneming in het geheel geen aethylalcohol aanwezig was. Een deel van de zuurstof is dus ongetwijfeld voor een oxydatie van glucose gebruikt, hetzij voor een volledige verbranding tot koolzuur en water, hetzij voor een onvolledige oxydatie tot azijnzuur en koolzuur volgens de boven gegeven reactievergelijking. Ook bestaat de mogelijkheid, dat deze beide processen naast elkaar hebben plaats gevonden.

Tenslotte zij er op gewezen, dat bij *Saccharomyces cerevisiae* de $Q_{CO_2}^{O_2}$ een zoodanige stijging vertoont — waarvoor de oorzaak niet rechtstreeks is aan te geven —, dat er allermint eenige aanwijzing bestaat, dat ook hier een onvolledige oxydatie van primair gevormden alcohol tot azijnzuur zou zijn ingetreden.

b. *Vergelijking van aërobe en anaërobe gisting.*

Het tweede punt, dat bij een beschouwing der stofwisselingsuitkomsten van *Brettanomyces Claussenii* in sterke mate de aan-

dacht trekt, is het feit, dat de intensiteit van de aërobe gisting hooger is dan die van de anaërobe gisting. Sedert het klassieke werk van PASTEUR over den invloed van de zuurstof op de alcoholische gisting heeft toch vrij algemeen de opvatting ingang gevonden, dat deze invloed in een terugdringing der gistingsintensiteit zou bestaan. Weliswaar hebben tegengestelde inzichten zich geruimen tijd kunnen handhaven, maar in 1925 bracht MEYERHOF¹⁾ met behulp van de manometrische techniek het strenge bewijs van de juistheid van PASTEUR's uitspraak.

Sedert is de remmende werking van de zuurstof — dus van de ademhaling — op de gisting bij alle hierop onderzochte celsoorten aangetroffen en onder de benaming van „reactie van PASTEUR” (of ook wel: „reactie van PASTEUR-MEYERHOF”) is het genoemde effect geworden tot één der pijlers van het hedendaagsche stofwisselingsonderzoek.

Voor een betrekkelijk groot aantal uiteenlopende gistsoorten is het optreden van de „reactie van PASTEUR” nog vrij recent door HOGERHEIDE (l.c.) aangetoond.

Dit alles in aanmerking genomen, trekt het nu wel zeer de aandacht, dat blijkens de beschreven proefneming *Brettanomyces Claussenii* een omgekeerd gedrag vertoont en dus, wat men zou kunnen noemen, „een negatief PASTEUR-effect” te zien geeft. Op de beteekenis van dit verschijnsel zal in Hoofdstuk VIII § 2 nader worden ingegaan.

Het is welhaast overbodig hier op te merken, dat *Saccharomyces cerevisiae* ook in de hierboven medegedeelde proefneming het normale effect vertoont.

c. *De absolute waarde der anaërobe gisting.*

Tenslotte moet speciaal de aandacht worden gevestigd op het verschijnsel, dat *Brettanomyces Claussenii* bij beide proefnemingen een anaërobe gisting laat zien, welke toch wel als uitermate zwak moet worden gekenmerkt. In aanmerking nemende, dat de intensiteit der ademhaling, en ook die der aërobe gisting in de eerste phase, alleszins redelijk mogen worden genoemd, mag de oorzaak der zwakke anaërobe gisting niet worden geweten aan het gebruik van cellen, welke in algemeen opzicht te weinig vitaal zouden moeten worden geacht.

¹⁾ O. MEYERHOF, Biochem. Z. **162**, 43, 1925.

In de volgende paragraaf zal ook op dit punt worden teruggekomen.

§ 6. DE INVLOED VAN DE VOORGESCHIEDENIS DER *BRETTANOMYCES*-CELLEN OP DE STOFWISSELING.

Karakteristiek voor de hedendaagsche ontwikkeling der microbiologie is het steeds meer op den voorgrond treden van het inzicht, dat bij stofwisselingsproeven van korten duur en waarbij groei practisch is uitgesloten, de verkregen uitkomsten in hooge mate afhankelijk zijn van de voorgeschiedenis van het gebruikte celmateriaal. Een enkel voorbeeld moge tot toelichting dienen.

De Finsche geleerde KARSTRÖM ¹⁾ vond, dat cellen van één en denzelfden stam van *Bacterium coli* altijd het vermogen bezitten glucose te vergisten, maar dat deze zelfde cellen alleen dan arabinose vergisten, indien zij zijn gegroeid in een medium, dat deze suiker bevat.

Hier hebben wij dus het treffend verschijnsel, dat normale levenskrachtige cellen van één en denzelfden bacteriestam onder volkomen gelijke uitwendige omstandigheden, d.w.z. in het arabinose-medium, een absoluut verschillend gedrag vertoonen.

Een tweede voorbeeld, waarbij het uiteenlopend gedrag der cellen echter niet zooals hierboven tot het gezichtspunt „aanpassing” kan worden teruggevoerd, vinden wij in het onderzoek van PERQUIN (l.c.) over de citroenzuur- en de gluconzuurvorming door *Aspergillus niger*. Deze onderzoeker stelde onder meer vast, dat met de schudmethode verkregen homogeen mycelium, afkomstig van één en denzelfden stam, het vermogen bezit glucose hoofdzakelijk tot gluconzuur te oxydeeren, indien het medium waarin het mycelium is gevormd slechts zeer beperkte hoeveelheden stikstof en phosphor bevat. Daarentegen kan uit glucose alleen dan een belangrijke hoeveelheid citroenzuur worden gevormd, indien in het medium der groeifase aanmerkelijk grootere hoeveelheden van de genoemde elementen aanwezig zijn.

Deze enkele voorbeelden, waaraan nog talrijke andere zouden kunnen worden toegevoegd, toonen reeds duidelijk aan, dat de voorgeschiedenis der cellen een bepalende factor kan zijn voor den aard der stofwisselingsprocessen dezer cellen.

¹⁾ Men vergelijke hiervoor het samenvattende overzicht van H. KARSTRÖM, *Ergebn. d. Enzymforschung* **7**, 350, 1938.

Ik heb mij daarom afgevraagd, of hiervan ook sprake zou zijn bij het verschijnsel van het negatief PASTEUR-effect, hetwelk *Brettanomyces Claussenii* bij de boven beschreven manometrische proefnemingen met glucose als substraat vertoonde. In het bijzonder leek het mij geenszins uitgesloten, dat zekere bij de toegepaste cultiveeringsmethode werkzame factoren oorzaak konden zijn, dat genoemde gistsoort onder strikt anaërobe omstandigheden een zoo uitermate zwakke gisting bewerkte.

De bij bedoelde proefnemingen gebruikte cellen van *Brettanomyces Claussenii* waren afkomstig van moutagar-krijt-platen, welke gedurende drie dagen bij 30° C. werden bebroed. Ik besloot thans de verschillende stofwisselingsprocessen van deze gistsoort te bepalen in een glucose-phosphaatmedium bij gebruikmaking van celmateriaal afkomstig van moutagar-krijt-platen, welke gedurende zeven dagen bij 30° C. werden bebroed. De manometrische waarnemingen werden verder op dezelfde wijze uitgevoerd, zooals HOOGERHEIDE (l.c.) dit bij zijn bepalingen van de overeenkomstige grootheden bij de uiteenlopende gistsoorten deed, d.w.z., dat een passende hoeveelheid van de gist in een 2,5%-ige KH_2PO_4 -oplossing, waaraan tevoren reeds 2% glucose was toegevoegd, werd gesuspendeerd.

Van deze suspensie werden 2 cm³ in elk vaatje gebracht, waarna de gebruikelijke voorbereidingen volgden, zooals het met stikstof vullen van de apparaten, waarin de anaërobe gisting werd bepaald, enz.

Door toevallige omstandigheden bevatte bij deze proefneming elk vaatje slechts ongeveer de helft van de bij de tot nu toe beschreven proefnemingen met *Brettanomyces Claussenii* gebruikte hoeveelheid gist en verder werden de waarnemingen slechts over één uur uitgestrekt. De resultaten van deze proefneming zijn in Tabel XXXVI samengevat.

TABEL XXXVI.

Ademhaling, aërobe en anaërobe gisting van *Brettanomyces Claussenii* in 2% glucose-phosphaatmedium met pH = 4,5 bij 30° C. Elk vaatje bevatte 2,72 mg droge gist.

Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{O_2}$	$Q_{CO_2}^{N_2}$
28,3	13,2	83,8

De uitkomsten van Tabel XXXVI verraden onmiddellijk den grooten invloed van de voorgeschiedenis der cellen op de verschillende vastgestelde stofwisselingsprocessen. Immers het treft hier dadelijk, dat de ademhalingsintensiteit met glucose als substraat belangrijk lager is dan die bij de proeven, waarbij gist werd gebruikt, afkomstig van platen, welke slechts drie dagen bij 30° C. waren bebroed. Voorts ligt de aërobe gisting veel lager dan de anaërobe gisting. Hierbij moet worden opgemerkt, dat de waarde van de $Q_{CO_2}^{O_2}$ een correctie behoeft tengevolge van de ongetwijfeld wederom opgetreden onvolledige oxydatie van aethylalcohol tot azijnzuur. Doch zelfs indien men aanneemt, dat er tengevolge van de zuurstofopneming heelemaal geen koolzuur is gevormd, dan nog ligt de $Q_{CO_2}^{O_2}$ na correctie aanmerkelijk lager dan de $Q_{CO_2}^{N_2}$, hetgeen beteekent, dat *Brettanomyces Claussenii* dit keer een normaal PASTEUR-effect vertoont.

Tenslotte moet melding worden gemaakt van het verschijnsel, dat genoemde gistsoort bij deze proef onder anaërobe voorwaarden een intensieve gisting vertoont.

Deze nu van de eerder vermelde zoo afwijkende uitkomsten geven aanleiding te besluiten, dat de invloed van de voorgeschiedenis voor het inzicht in de karakteristieke eigenschappen van *Brettanomyces* van essentieel belang is.

Het was daarom aangewezen, den invloed van de cultuurvoorwaarden van het gebruikte celmateriaal op de stofwisselingsprocessen wat meer systematisch te onderzoeken. Hiertoe leek het wenschelijk, uitgaande van één en dezelfde suspensie celmateriaal onder uiteenlopende voorwaarden te kweken en de aldus ver-

kregen verschillende cel-populaties aan een vergelijkend onderzoek te onderwerpen.

Te dien einde werd een vrij dikke suspensie van *Brettanomyces Claussenii*-cellen op vijftien moutagar-krijt-platen afgestrekten. Tien van deze platen werden onder aërobe voorwaarden bij 30° C. bebroed en de overige vijf platen onder streng anaërobe voorwaarden, te weten in een waterstofatmosfeer. Er werden nu drie proeven uitgevoerd, waarbij de ademhaling, de aërobe en de anaërobe gisting werden bepaald in een 2% glucose-phosphaatmedium met pH = 4,4. Bij de eerste proef werd gist van vijf platen gebruikt, welke gedurende 64 uren onder aërobe voorwaarden was gecultiveerd, bij een tweede proef de gist van de overige platen, welke onder dezelfde voorwaarden 168 uren waren bebroed, terwijl met de in de zuurstofvrije atmosfeer gecultiveerde gist na 144 uren een proefneming werd verricht. Bij deze proeven werden bovendien de ademhaling en de anaërobe gisting zonder toevoeging van substraat bepaald. De blanco anaërobe gisting was practisch nul en de blanco ademhaling in verhouding tot de ademhaling bij toevoeging van substraat zoo gering, dat het geen zin heeft de hiervoor verkregen waarden te vermelden. De overige bij deze drie proefnemingen verkregen resultaten zijn in Tabel XXXVII samengevat.

TABEL XXXVII.

Ademhaling, aërobe en anaërobe gisting van *Brettanomyces Claussenii* in 2% glucose-phosphaatmedium met pH = 4,4 bij 30° C., bij gebruik van cellen, welke onder uiteenlopende voorwaarden waren gecultiveerd.

Tijdsduur	Methode van cultiveeren der gist								
	64 uren aëroob			168 uren aëroob			144 uren anaëroob		
	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ^{O₂}	Q _{CO₂} ^{N₂}	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ^{O₂}	Q _{CO₂} ^{N₂}	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ^{O₂}	Q _{CO₂} ^{N₂}
1e uur ...	46,6	9,6	4,7	27,4	9,7	17,9	8,2	77,0	82,2
2e ,, ...	44,6	3,7	4,4	27,5	5,6	25,7	10,0	70,4	71,2
3e ,, ...	44,1	6,1	5,6	27,5	3,8	26,9	12,1	68,4	51,9

Wat leeren ons nu de cijfers van Tabel XXXVII?

In de eerste plaats zien wij, dat de ademhalingsintensiteit van de cellen met anaërobe voorgeschiedenis veel lager is dan die van de jonge aëroob gekweekte cultuur, terwijl voor de anaërobe gistingsintensiteit juist het omgekeerde geldt. De waarden van de Q_{O_2} en van de $Q_{CO_2}^{N_2}$ bij de proefneming met het gedurende 168 uren aëroob gekweekte celmateriaal liggen nu juist tusschen de andere gevonden waarden in. Dit resultaat is begrijpelijk, indien men bedenkt, dat bij voortgezet aëroob cultiveeren op platen een deel der cellen zeker onder minder sterk aërobe voorwaarden worden gevormd.

Tenslotte blijkt, dat de cellen der jonge aërobe cultuur wederom een negatief PASTEUR-effect vertoonen. Weliswaar ligt de $Q_{CO_2}^{O_2}$ slechts weinig hooger dan de $Q_{CO_2}^{N_2}$, terwijl tevens van een sterke daling van de $Q_{CO_2}^{O_2}$ niet kan worden gesproken. In dit verband moet worden opgemerkt, dat bij deze proefneming iets andere voorwaarden aanwezig waren dan bij de proeven, waarop de Tabellen XXXIV en XXXV betrekking hebben. Bij laatstgenoemde proeven werden suspensie en substraat bij elkaar gevoegd na het bereiken van evenwichts- en temperatuurstelling, terwijl bij de waarnemingen van Tabel XXXVII suspensie en substraat reeds vóór de voorbereidende handelingen met elkaar in aanraking waren. Naar alle waarschijnlijkheid was de $Q_{CO_2}^{O_2}$ tengevolge van de na eenigen tijd intredende onvolledige oxydatie van primair gevormden aethylalcohol tot azijnzuur, reeds vóór dat met de aflezing werd begonnen, merkbaar gedaald. Om deze reden zal men moeten aannemen, dat de waarneming over het eerste uur ook reeds een correctie behoeft, met dien verstande, dat de waarde voor de $Q_{CO_2}^{O_2}$ in het eerste uur in werkelijkheid hooger zal zijn geweest. Een en ander zou beteekenen, dat de cellen van de jonge aërobe cultuur aanvankelijk een aanmerkelijk sterker negatief PASTEUR-effect zouden hebben te zien gegeven. Voor de cellen van de beide andere cultuures kan in dit geval niet met zekerheid worden beslist, of deze, hetzij een normaal, hetzij een negatief PASTEUR-effect vertoonen. Dit toch is afhankelijk van de grootte der noodzakelijkerwijze aan te brengen correctie voor de naar alle waarschijnlijkheid wederom ingetreden onvolledige oxydatie.

Het was nu gewenscht te onderzoeken, welken invloed de voorgeschiedenis der cellen bij een andere meer normale gistsoort op de verschillende stofwisselingsprocessen heeft. Hiertoe werden wederom vergelijkende proefnemingen verricht met *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I.

De hiervoor gebruikte gist werd uitgaande van één suspensie op moutagar-platen gecultiveerd en wel gedurende 24 uren, respectievelijk 96 uren, onder aërobe voorwaarden en gedurende 72 uren onder strikt anaërobe voorwaarden.

De verkregen resultaten zijn in Tabel XXXVIII weergegeven.

TABEL XXXVIII.

Ademhaling, aërobe en anaërobe gisting van *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, stam Delft I, in 2% glucose-phosphaatmedium met pH = 4,4 bij 30° C., bij gebruik van cellen, welke onder uiteenlopende voorwaarden waren gecultiveerd.

Tijdsduur	Methode van cultiveeren der gist								
	24 uren aëroob			96 uren aëroob			72 uren anaëroob		
	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ^{O₂}	Q _{CO₂} ^{N₂}	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ^{O₂}	Q _{CO₂} ^{N₂}	Q _{O₂}	Q _{CO₂} ^{O₂}	Q _{CO₂} ^{N₂}
1e uur . . .	51,1	199,7	239,3	68,6	37,2	157,1	12,5	122,9	145,1
2e „ . . .	45,4	266,4	196,4	75,3	51,7	167,9	8,7	120,1	127,4
3e „ . . .	49,7	228,2	211,1	60,5	96,6	167,9	8,3	130,9	134,0

Uit Tabel XXXVIII blijkt, dat de ademhalingsintensiteit van het celmateriaal, waaraan een anaërobe voorgeschiedenis ten grondslag ligt, evenals bij *Brettanomyces Claussenii*, aanmerkelijk lager is dan die van de cellen met een aërobe voorgeschiedenis. Daarentegen heeft bij *Saccharomyces cerevisiae* het langer onder aërobe voorwaarden cultiveeren een merkbare stijging van de Q_{O₂} veroorzaakt.

Eveneens in tegenstelling met de opgedane ervaringen met *Brettanomyces Claussenini* liggen de gevonden waarden voor de anaërobe

gisting van de anaëroob gekweekte cellen veel lager dan die van het celmateriaal met aërobe voorgeschiedenis.

Saccharomyces cerevisiae geeft, zooals was te verwachten, nageoeg in alle gevallen het normale positieve PASTEUR-effect te zien. In de serie met de jonge aëroob gecultiveerde cellen, treden weliswaar in het tweede en derde uur afwijkingen op, waarvan de oorzaak hier in het midden moet worden gelaten.

De voornaamste conclusie, welke uit de beide voorafgaande proefnemingen moet worden getrokken, is deze, dat de voorgeschiedenis van het gebruikte celmateriaal grooten invloed heeft op de stofwisseling van *Brettanomyces Claussenii*, terwijl dit bij normale persgist, wat betreft de vastgestelde grootheden, in geringere mate en in niet duidelijk aan te geven richting het geval is.

In plaats van hier een samenvatting der in dit hoofdstuk verkregen uitkomsten te laten volgen, lijkt het loonender tegelijkertijd de beteekenis van deze voor ons inzicht in het karakteristieke gedrag der *Brettanomyces*-gisten in een slothoofdstuk in beschouwing te nemen.

HOOFDSTUK VIII.

DE BETEKENIS DER VERRICHTE WAARNEMINGEN VOOR ONS INZICHT IN HET KARAKTERISTIEKE GEDRAG DER *BRETTANOMYCES*-GISTEN.

§ 1. ANALYSE VAN HET GEDRAG DER *BRETTANOMYCES*-CULTURES.

Reeds de beschouwing van het macroscopische beeld der moutagar-buiscultures van de *Brettanomyces*-gisten en de betrekkelijk geringe houdbaarheid dezer gisten op dit medium, alsmede het opmerkelijk verschijnsel van de oplossing van een groot gedeelte van het krijt bij aërobe buiscultures op een moutagar-krijt- en op een gistagar-glucose-krijt-medium, verraden het bij deze gisten aanwezig zijn van een eigenschappencomplex, dat bij de overige bekende vertegenwoordigers der groote groep van gistsoorten niet wordt aangetroffen. In deze kenmerken, waaraan nog het verschijnsel van een zeer langzaam intredende, doch lang aanhoudende gisting bij cultiveering in moutextract moet worden toegevoegd, ligt datgene opgesloten, wat ik zou willen noemen: „het geheim van *Brettanomyces*”.

In de hier volgende uiteenzetting zal er naar worden gestreefd, de in de voorafgaande hoofdstukken vastgestelde feiten aangaande de stofwisseling van *Brettanomyces Claussenii* dienstbaar te maken aan het verkrijgen van een inzicht in het gedrag der *Brettanomyces*-cultures.

In de eerste plaats zal dan hier nader worden ingegaan op het van andere gistsoorten zoo afwijkende gedrag, dat *Brettanomyces*-gisten te zien geven bij cultiveering in vloeibare suikerhoudende media, zooals moutextract.

Ent men op de gebruikelijke wijze een weinig gist van een jonge aërobe buiscultuur in een kolfje met moutextract en plaatst men dit kolfje bij 25° C., dan ziet men eerst na enkele dagen zeer spaarzaam gasbellen opstijgen en heel langzaam een troebeling ontstaan. Na vier à vijf dagen vertoont de cultuur een middelmatig sterke gisting, welke nog vele dagen voortduurt. Dit beteekent, dat er

zich in het kolfje nog steeds vergistbare bestanddeelen bevinden, welke nog niet door de gist zijn verbruikt.

Vergelijkt men hiermee een soortgelijke cultuur van normale persgist, dan ziet men, dat reeds spoedig na de enting een snel toenemende gasontwikkeling optreedt. Na verloop van ongeveer veertig uren is de vloeistof sterk troebel en is de gisting practisch afgelopen. De suiker en de overige vergistbare bestanddeelen blijken vrijwel volledig te zijn omgezet.

Wanneer wij trachten ons een voorstelling te maken van hetgeen zich afspeelt bij een dergelijke moutextract-cultuur van persgist, dan verdient het aanbeveling eerst scherp voor oogen te stellen, wat over de stofwisseling van deze gistsoort is komen vast te staan.

Uit de manometrische proefnemingen met glucose als substraat is nu gebleken, dat zoowel jonge aëroob gecultiveerde, als oudere onder dezelfde voorwaarden gevormde cellen van deze gist een goed ademhalingsvermogen bezitten, doch tevens een krachtig gistingsvermogen, zoowel onder aërobe als onder anaërobe voorwaarden. Verder is duidelijk naar voren gekomen, dat deze gist onder vrijwel alle omstandigheden een normaal PASTEUR-effect te zien geeft.

Wanneer men nu enkele cellen van een jonge aërobe buiscultuur in een kolfje met moutextract ent, zullen deze cellen onder de aanwezige aërobe voorwaarden een goede ademhaling, doch tevens een intensieve aërobe gisting vertoonen.

De cellen verdeelen zich door de optredende koolzuurontwikkeling vrijwel gelijkmatig door het geheele medium. Terwijl de cellen, welke tijdelijk meer aan de oppervlakte verkeerden, een meer aërobe stofwisseling zullen hebben, zal de meerderheid der cellen, welke zich in de diepere lagen van het medium bevinden, op een meer anaërobe stofwisseling zijn aangewezen. Dit beteekent echter geen aanmerkelijke vertraging in den groei, daar deze aëroob gecultiveerde cellen, zooals wij hebben gezien, zeer goed anaëroob kunnen gisten.

Naarmate nu het medium meer wordt gereduceerd tengevolge van het zuurstofverbruik door de ademhaling der cellen, zal dit stofwisselingsproces langzamerhand in intensiteit afnemen, doch hiermede gaat dan direct een stijging van de gisting gepaard. Deze stijging compenseert de vertraging in groei, welke anders uit de zwakker wordende ademhaling zou voortvloeien.

De zuurstof zal tenslotte vrij snel uit het medium verdwijnen, waardoor de omzetting van de suiker met nog grootere snelheid zal plaats grijpen als gevolg van een meer en meer op den voorgrond tredende gisting. Na betrekkelijk korten tijd houden de stofwisselingsprocessen op, daar de belangrijkste voedingsbestanddeelen — vóór alles de rechtstreeks aantastbare koolhydraten — uit het medium zijn verdwenen.

Wil men zich nu hiertegenover een voorstelling maken van een soortgelijke cultuur van een *Brettanomyces*-gist, dan is het gewenscht de voornaamste bij het voorafgaande onderzoek naar voren gekomen eigenschappen van deze gisten nog even kort samen te vatten.

Er moet dan in de eerste plaats worden herinnerd aan de groote afhankelijkheid van de stofwisseling der *Brettanomyces*-gisten van de voorgeschiedenis der cellen.

Uit de proeven met cellen van *Brettanomyces Clausenii*, welke een uiteenlopende voorgeschiedenis hadden, is onder meer gebleken, dat deze cellen slechts dan een sterk gistingsvermogen bezitten, indien de cellen onder anaërobe voorwaarden zijn gegroeid.

Voorts zagen wij, dat jonge aëroob gecultiveerde *Brettanomyces*-cellen een negatief PASTEUR-effect vertoonen, hetgeen inhoudt, dat het vermogen van deze cellen tot de primaire afbraak van een glucose-molecuul — de splitsing in twee C_3 -componenten — onder anaërobe voorwaarden gedeeltelijk is geïnactiveerd.

Een derde opmerkelijke eigenschap van *Brettanomyces*-gisten is deze, dat deze gisten azijnzuur vormen bij aërobe dissimilatie van glucose. Uit de manometrische proefnemingen met uiteenlopende substraten kon met vrij groote zekerheid worden besloten, dat dit zuur hoofdzakelijk ontstaat door onvolledige oxydatie van aethylalcohol, welke door de naast de ademhaling optredende alcoholische gisting primair wordt gevormd.

De manometrische ademhalingsproeven met aethylalcohol en met azijnzuur als substraat hebben verder geleerd, dat de oxydatie van azijnzuur tot koolzuur en water in hooge mate afhankelijk is van de pH van het medium. Zoo werd bij pH \pm 6,8 uit alcohol alleen azijnzuur gevormd, terwijl bij pH \pm 4,0 het primair gevormde azijnzuur een langzame totale verbranding onderging.

Op welke wijze kan men zich nu, op grond van deze eigen-

schappen, een voorstelling maken van een moutextract-cultuur van een *Brettanomyces*-gist?

Hiertoe gaan wij, evenals bij de hierboven gegeven beschouwing van de overeenkomstige persgistcultuur, wederom uit van een jonge aërobe buiscultuur, waarvan in moutextract wordt geënt. De *Brettanomyces*-cellen komen in gering aantal in een relatief sterk geaëreerd medium. Deze gistcellen zullen onder de in dit medium heersche aërobe voorwaarden practisch alleen een ademhaling vertoonen en zich dus hierin aanvankelijk vermeerderen op de wijze, zooals deze wordt aangetroffen bij obligaat aërobe organismen. Dit is reeds dadelijk een groot verschil met het gedrag van persgist in de eerste uren. Hierbij komt nog, dat *Brettanomyces*-gisten in het algemeen een veel geringere stofwisselingsactiviteit vertoonen dan persgist. Er zal in het kolfje bijgevolg slechts een zeer langzame koolzuurproductie plaats hebben, waardoor er minder strooming in de vloeistof ontstaat dan bij persgist. Dit zal er toe leiden, dat een gedeelte der cellen zich blijvend in de diepere lagen zal ophouden, welke lagen vanzelfsprekend minder zuurstof hebben. Daar al deze aëroob gevormde cellen onder anaërobe voorwaarden slechts een zeer geringe gistingsactiviteit bezitten, zullen zij hier grootendeels tot inactiviteit zijn gedoemd. Dientengevolge treedt er in het kolfje slechts een zeer langzame groei op. Desniettemin zal er geleidelijk een daling van de zuurstofspanning plaats vinden, waardoor aan de nu tot stand komende cellen een in toenemende mate minder aërobe voorgeschiedenis ten grondslag ligt. Deze cellen zullen een ademhaling, doch tevens een geringe aërobe gisting bewerken. Onder anaërobe voorwaarden echter vertoonen deze cellen practisch nog geen gisting; dit toch zijn de cellen met een zoodanige voorgeschiedenis, dat daarbij een negatief PASTEUR-effect optreedt. Dit leidt tot de op het eerste gezicht paradoxale situatie, dat deze cellen, naarmate het medium meer anaëroob wordt, èn in hun ademhaling èn in hun gisting worden geremd. Een en ander maakt het begrijpelijk, dat bij cultiveering in moutextract, ook na vrij langen tijd nog slechts een zeer spaarzame groei en gisting optreden. Door deze remming van ademhaling en gisting wordt het medium slechts uiterst langzaam meer anaëroob. Aan de in dit stadium nieuw gevormde cellen ligt, naarmate het medium sterker zal worden gereduceerd, een in stijgende mate anaërobe voorgeschiedenis ten grondslag, waardoor het medium

voortdurend rijker wordt aan cellen, welke een lagere ademhaling laten zien, doch een betere gisting. Dit leidt op den duur tot een stadium, waarin het medium sterk is gereduceerd en waarin dan een relatief goede gisting valt te constateeren. In dit stadium zullen cellen worden gevormd, welke een normaal PASTEUR-effect vertoonen, hetgeen beteekent, dat de gisting wordt gestimuleerd. De gistingsintensiteit per cel blijft echter belangrijk zwakker dan die van persgist-cellen, waardoor het aanzienlijk langeren tijd zal duren vóór dat de beschikbare voedingsbestanddeelen zullen zijn verbruikt.

Het karakteristieke in de gegeven voorstelling van de *Brettanomyces*-moutextract-cultuur is dus hierin gelegen, dat hierbij een stadium ontstaat, waarin èn de ademhaling èn de gisting worden geremd tengevolge van een daling van de zuurstofspanning in het medium.

Tot dusver werd de eigenschap van de azijnzuurvorming door deze gisten buiten beschouwing gelaten. In dit verband kan worden opgemerkt, dat de voorwaarden hiervoor in de eerste phase ongunstig zijn, daar er dan nog niet voldoende alcohol aanwezig is. Naarmate er tengevolge van de geleidelijk intredende gistingsstofwisseling meer alcohol wordt gevormd, wordt het medium echter ook in stijgende mate meer anaëroob, zoodat voorloopig de voorwaarden voor de zuurvorming ongunstig blijven. Eerst in de phase, waarin de suiker volledig is verbruikt en de gisting ophoudt, kan door opneming van zuurstof uit de lucht een onvolledige oxydatie van den gevormden aethylalcohol tot azijnzuur plaats grijpen.

Aanmerkelijk gunstiger zullen daarentegen de voorwaarden voor de zuurvorming zijn bij cultiveering van *Brettanomyces*-gisten onder aërobe voorwaarden op een suikerhoudend vast medium, zooals moutagar. Na de allereerste streng aërobe phase zullen spoedig, te weten in het inwendige der streekcultuur, cellen worden gevormd, welke, omdat zij onder minder aërobe voorwaarden ontstaan, èn een vrij goede ademhaling èn een vrij belangrijke aërobe gisting kunnen ontplooiën. Er wordt door deze cellen bijgevolg reeds vrij gauw aethylalcohol gevormd, welke door de nagenoeg uitsluitend ademende cellen der oppervlaktelaag voor een belangrijk deel tot azijnzuur zal worden geoxydeerd.

Het effect van deze zuurvorming op de gistcellen zal nu geheel afhankelijk zijn van de in het medium heerschende pH. Voor de

gebruikelijke moutagar zal dit medium een duidelijk bufferende werking hebben binnen het pH-gebied van 6,0 en 5,0. Dit nu is een zeer ongunstige constellatie, daar in dit gebied eenerzijds de pH te hoog is om een eenigszins belangrijke oxydatie van azijnzuur door de *Brettanomyces*-cellen mogelijk te doen zijn en anderzijds niet hoog genoeg om het ontstaan van een schadelijke concentratie van ongedissocieerd azijnzuur te voorkomen. Een en ander maakt de allerwege geconstateerde geringe houdbaarheid van de mout-agarcultures begrijpelijk, alsmede ook de verhooging dezer houdbaarheid door toevoeging van krijt aan het medium, waardoor het optreden van ongedissocieerd azijnzuur in de onmiddellijke omgeving der gistcellen weliswaar niet geheel wordt voorkomen, maar niettemin belangrijk wordt tegengegaan.

§ 2. ENKELE OPMERKINGEN AANGAANDE DE BETEKENIS VAN HET WAARGENOMEN NEGATIEVE PASTEUR-EFFECT.

Van de verschillende in de vorige paragrafen medegedeelde uitkomsten trekt de waarneming aangaande het optreden van een negatief PASTEUR-effect bij onder bepaalde voorwaarden gecultiveerde *Brettanomyces*-cellen wel het meest de aandacht. Het lijkt dan ook niet overbodig hier nog even kort bij de betekenis van dit verschijnsel stil te staan, waartoe het gewenscht is hier allereerst een beknopt overzicht te geven van de bestaande inzichten aangaande het wezen van het PASTEUR-effect¹⁾.

Zoals reeds is opgemerkt, vertoonen alle hierop tot dusver onderzochte celsoorten een zoogenaamd positief PASTEUR-effect, met welke woorden men tot uitdrukking brengt, dat de gistingstofwisseling onder aërobe voorwaarden teruggedrongen is in vergelijking tot deze stofwisseling bij afwezigheid van zuurstof.

Weliswaar is kort geleden door DAVIS²⁾ medegedeeld, dat hij bij de heterofermentatieve melkzuurbacteriën een negatief PASTEUR-effect had vastgesteld. Nadere bijzonderheden dienaangaande dienen intusschen te worden afgewacht. Uit de korte mededeeling van DAVIS krijgt men den indruk, dat de genoemde conclusie uit-

¹⁾ Voor een meer uitgebreide en voortreffelijk gedocumenteerde kritische analyse der tot medio 1937 verschenen publicaties zie men: D. BURK, Occ. Publ. of the Amer. Ass. for the Advancement of Science No. 4, 121, 1937.

²⁾ J. G. DAVIS, Nature 143, 765, 1939.

sluitend is gebaseerd op het feit, dat de bewuste bacteriën onder aërobe voorwaarden meer melkzuur hadden gevormd dan onder anaërobe voorwaarden. Aangezien nu evenwel de heterofermentatieve melkzuurgisting in hoofdzaak kan worden opgevat als een gemengde melkzuur- en aethylalcoholische gisting¹⁾, levert de bewuste waarneming nog geenszins het bewijs, dat de *totale* fermentatieve suikerontleding (glycolyse in ruimeren zin) bij aanwezigheid van zuurstof was verhoogd.

Omtrent de factoren, welke aan de reactie van PASTEUR ten grondslag liggen, zijn in den loop der jaren verschillende, ten deele sterk uiteenlopende meeningen geuit.

De oudste en tevens meest voor de hand liggende verklaring is ongetwijfeld de in eerste instantie van PFLÜGER en van PFEFFER afkomstige voorstelling, dat voor cellen, welke koolhydraten als substraat verwerken, de inleidende phase van de ademhalings- en van de gistingsomzetting dezelfde is (de zoogen. „unitaire theorie” van ademhaling en gisting). Onder anaërobe voorwaarden worden nu de primaire splitsingsproducten van het koolhydraat²⁾ in den vorm van de finale gistingsproducten — voor de dierlijke cellen doorgaans melkzuur, voor de plantaardige cellen veelal aethylalcohol en koolzuur — gestabiliseerd. Indien nu zuurstof tot deze gistende cellen toetreedt, wordt eenvoudig een deel der primaire splitsingsproducten in een andere richting verwerkt, d.w.z. zij worden door volledige verbranding in koolzuur en water overgevoerd. Uiteraard houdt dit een teruggang van de gistingsstofwisseling in.

De fraaie onderzoekingen van MEYERHOF³⁾ hebben evenwel in de studie van de reactie van PASTEUR een nieuwe phase ingeluid. Duidelijk is uit deze onderzoekingen naar voren gekomen, dat de hierboven geschetste verklaring geenszins toereikend is. Het bleek toch, dat de intensiteit der totale koolhydraatsplitsing, welke door de cellen respectievelijk onder aërobe en onder anaërobe voorwaarden wordt bewerkt, allerminst, zooals de unitaire theorie stilzwijgend veronderstelde, constant is. Overtuigend is komen vast te staan, dat deze intensiteit door toetreding van zuur-

¹⁾ A. J. KLUYVER, *Ergebn. d. Enzymforschung* **4**, 230, 1935.

²⁾ Onlangs hebben MORUZZI en medewerkers argumenten gegeven ten gunste van de zienswijze, dat dit tusschenproduct triosephosphorzuur is (G. MORUZZI, G. MORUZZI und M. A. BARTOLI, *Die Naturwissenschaften* **27**, 244, 1939; *Archivio di Scienze Biol.* **25**, 178, 1939).

³⁾ O. MEYERHOF, *Biochem. Zschr.* **162**, 43, 1925.

stof tot de gistende cellen aanmerkelijk wordt verlaagd. De door MEYERHOF van dit verschijnsel gegeven verklaring is nu, dat deze experimenteel gevonden terugdringing slechts schijnbaar is en haar oorzaak vindt in de omstandigheid, dat de bij zuurstoftoetreding intredende ademhaling aanleiding geeft tot een resynthese van het koolhydraat uit een deel der gevormde primaire splitsingsproducten.

Een gansch andere voorstelling ter verklaring van de reactie van PASTEUR is eenige jaren geleden door LIPMANN ¹⁾ ontwikkeld. Deze onderzoeker stelde allereerst vast, dat spierextract — in tegenstelling tot de cellen, waaruit dit extract was bereid — bij aanwezigheid en bij afwezigheid van zuurstof een even sterke glycolyse bewerkt. Dit wordt begrijpelijk, indien men beseft, dat bij de bereiding van dit extract de in de uitgangscellen aanwezige autoxydabele ademhalingsfermenten worden vernietigd. LIPMANN vond nu verder, dat de door het extract bewerkte glycolyse wel werd teruggedrongen, indien aan het onder aërobe voorwaarden verkeerende systeem bepaalde stoffen met hooge oxydoreductiepotentiaal, zooals chinon, jodium, phenol-indophenolderivaten, werden toegevoegd. Onder anaërobe voorwaarden werd de ingetreden remming der glycolyse evenwel weer na korten tijd opgeheven, waarbij bleek, dat dan de toegevoegde systemen in den gereduceerden toestand waren overgegaan. LIPMANN besluit uit deze proefnemingen, dat het glycolytisch ferment reversibel oxydeerbaar en in geoxydeerden toestand onwerkzaam is en meent hierin de verklaring van het mechanisme van de reactie van PASTEUR te mogen zien. In de tweede, reeds geciteerde verhandeling toont LIPMANN voorts aan, dat hetzelfde geldt voor de gisting, welke door uit biergist bereid maceratiesap wordt bewerkt.

Door HOOGERHEIDE ²⁾ zijn kort daarna waarnemingen aan levende gistcellen verricht, welke eveneens ten gunste van de door LIPMANN gegeven verklaring spreken. Deze onderzoeker wijst er intusschen op, dat deze verklaring geenszins strijdig is met de hierboven geschetste unitaire theorie van ademhaling en gisting en concludeert dan ook, dat de waargenomen terugdringing der suikersplitsing door de zuurstof ten deele op de basis der unitaire theorie, ten deele

¹⁾ F. LIPMANN, *Biochem. Zschr.* **265**, 133, 1933; *ibid.* **268**, 205, 1934.

²⁾ J. C. HOOGERHEIDE, *Bijdrage tot de kennis van de reactie van PASTEUR*. Leiden, 1935.

op grond van het zoeven genoemde „LIPMANN-effect” zal moeten worden verklaard. Ook zal het door MEYERHOF naar voren gebrachte verschijnsel der resynthese zijn invloed doen gelden.

Door de Engelsche onderzoekers DIXON en HOLMES¹⁾ is op grond van waarnemingen over de opheffende werking van kaliumionen op de PASTEUR-reactie van hersencellen de mogelijkheid geopperd, dat deze reactie geheel zou zijn terug te voeren op een verminderde toegankelijkheid van de glucose-verwerkende ferment-systemen voor dit substraat. De voorstelling, dat de cellen onder anaërobe voorwaarden meer permeabel voor glucose zijn dan onder aërobe voorwaarden, werd nu oogenschijnlijk gesteund door de onderzoekingen van RUNNSTRÖM en medewerkers²⁾, die uit hun proefnemingen meenden te mogen besluiten, dat fluoride onder anaërobe voorwaarden veel sneller in de gistcel dringt dan bij aanwezigheid van zuurstof. Intusschen heeft RUNNSTRÖM³⁾ in een recente publicatie in een voetnoot vermeldt, dat aan de door hem ter zake verrichte waarnemingen een andere interpretatie moet worden gegeven. RUNNSTRÖM en SPERBER⁴⁾ waren inmiddels zelf tot de slotsom gekomen, dat aan de PASTEUR-reactie vóór alles de door MEYERHOF en door LIPMANN aangegeven beginselen ten grondslag liggen.

In een tweede publicatie⁵⁾ heeft DIXON een nadere voorstelling gegeven van de wijze, waarop de mindere of meerdere toegankelijkheid van de ferment-systemen wordt gereguleerd. Hij geeft dan verder argumenten ten gunste van de zienswijze, dat de reversibele uitschakeling der betreffende katalysatoren wordt beheerscht door een specifiek, in quantitatief opzicht onbelangrijk, deel der totale ademhaling. Opheffing van deze remming — bijv. door toevoeging van HCN in lage concentratie — kan in dezen gedachtengang leiden tot een gedeeltelijke opheffing van het PASTEUR-effect — d.w.z. tot een stijging der aërobe gisting — bij een gelijktijdige stijging van de ademhaling. DIXON verwijst

¹⁾ K. C. DIXON and E. G. HOLMES, *Nature* **135**, 995, 1935.

²⁾ J. RUNNSTRÖM, A. RUNNSTRÖM und E. SPERBER, *Die Naturwissenschaften* **25**, 474, 1937; *ibid.* **25**, 540, 1937; J. RUNNSTRÖM und E. SPERBER, *Biochem. Zschr.* **298**, 340, 1938.

³⁾ J. RUNNSTRÖM, H. BOREI und E. SPERBER, *Arkiv för Kemi, Min. och Geol.* **13 A**, No. 22, 1939.

⁴⁾ J. RUNNSTRÖM and E. SPERBER, *Nature* **141**, 689, 1938.

⁵⁾ K. C. DIXON, *Nature* **137**, 742, 1936.

hierbij naar enkele waarnemingen, waarin een dergelijk resultaat inderdaad is geconstateerd.

Terwijl DIXON dus zijn zienswijze handhaaft, dat de inactivering van de fermentsystemen door zuurstof berust op een „ontoegankelijk-worden” van deze systemen voor het substraat, hebben in latere jaren verschillende onderzoekers zich aangesloten bij het door LIPMANN uitgesproken inzicht, dat dit „ontoegankelijk-worden” aan een reversibele oxydatie van het katalysatorsysteem der suikersplitsing is toe te schrijven. Ik noemde in dit verband reeds RUNNSTRÖM en SPERBER (l.c.) en verwijs verder naar de publicatie van GEMMILL en HELLERMAN ¹⁾ over de glycolyse in spierextract en naar die van FROMAGEOT en CHAIX ²⁾ over den invloed van zuurstof op de gistingsstofwisseling van *Propionibacterium pentosaceum*.

Een rechtstreeksch bewijs voor de reversibele oxydatie van een dehydrogenatie-katalysator door zuurstof, welke oxydatie tot een eveneens reversibele inactivering leidt, is voorts onlangs door GALE ³⁾ voor de uit cellen van *Bacterium coli* afgescheiden mierenzuur-dehydrogenase geleverd.

Nog is te vermelden, dat CHAIX en FROMAGEOT ⁴⁾ in een latere verhandeling over de reactie van PASTEUR bij *Propionibacterium pentosaceum* op grond van experimenteel gesteunde overwegingen besluiten, dat de inwerking van de zuurstof op de stofwisseling van de cellen dezer bacteriesoort van tweeledigen aard is. Deze cellen bevatten twee oxydatiesystemen, waarvan één het eigenlijke ademhalingsproces, het andere de oxydatie van het glycolytisch katalysatorsysteem beheerscht. Kleine hoeveelheden H₂S of cysteïne zijn in staat dit laatste oxydatiesysteem geheel uit te schakelen, zonder dat de eigenlijke ademhaling hierdoor in het minst wordt beïnvloed. Het resultaat is dan een aërobe suikerverwerking (ademhaling + aërobe gisting), welke in intensiteit gelijk of zelfs een enkel maal iets hooger is dan die van de anaërobe suikerverwerking.

Men vindt hier dus voor de genoemde bacteriesoort een experimenteële bevestiging van het eerder vermelde, door DIXON uitge-

¹⁾ C. L. GEMMILL and L. HELLERMAN, Amer. J. Physiol. **120**, 522, 1937.

²⁾ CL. FROMAGEOT et P. CHAIX, Enzymologia **3**, 288, 1937.

³⁾ E. F. GALE, Biochem. J. **33**, 1012, 1939.

⁴⁾ P. CHAIX et CL. FROMAGEOT, Enzymologia **6**, 33, 1939; P. CHAIX-AUDEMARD, Sur les relations existant entre respiration et fermentation chez *Propionibacterium pentosaceum*. Lyon, 1940.

spoken, vermoeden, dat de ademhaling gescheiden is van het oxydatieve inactiveringsproces van de suikerverwerkende katalysatorsystemen.

Vatten wij het voorafgaande samen, dan komt men tot de conclusie, dat het normale PASTEUR-effect ten deele moet worden verklaard op de basis van de unitaire theorie van ademhaling en gisting, doch voor een belangrijk deel zijn oorzaak vindt in een oxydatie van het suikersplitsend katalysatorsysteem door de zuurstof.

Wanneer wij ons nu afvragen, wat in dit verband het voorkomen van een negatief PASTEUR-effect bij *Brettanomyces Claussenii* beteekent, dan is de verleiding groot om bij de verklaring hiervan hetzelfde beginsel aan te houden en te besluiten, dat bij deze gistsoort onder volledig anaërobe voorwaarden een reversibele inactivering optreedt tengevolge van een te ver doorgevoerde reductie van het bewuste katalysatorsysteem.

Is nu een dergelijke voorstelling te aanvaarden?

Het komt mij voor, dat deze gedachte inderdaad niet onmiddellijk behoeft te worden verworpen. Alles toch, wat het recente onderzoek heeft geleerd aangaande den aard der bij oxydoreductieprocessen werkzame katalysatoren, wijst er op, dat deze katalysatoren zijn te beschouwen als een samenstel van een eiwitdrager en een reversibel oxydoreductiesysteem. Evenzeer als nu de katalysatorwerking van een zoodanig oxydoreductiesysteem door oxydatie kan worden uitgeschakeld, is het denkbaar, dat een practisch volledige overvoering van het systeem in den gereduceerden component een remmend effect op de katalysatorwerking zal uitoefenen.

Ook is de mogelijkheid niet uit te sluiten, dat een door reductie veroorzaakte inactivering van het katalysatorsysteem aangrijpt bij den eiwitdrager, daar toch met zekerheid is komen vast te staan, dat reductie tot activeering der kathepsinen leidt, d.w.z. tot een proteolyse der in de cel aanwezige eiwitsystemen.

Hoe dit ook zijn moge, het blijft alleszins denkbaar, dat het verschil tusschen de *Brettanomyces*-cellen en die der overige gistsoorten vóór alles hierin bestaat, dat in eerstgenoemde cellen bij volledige afsluiting van zuurstof om een of andere reden een meer geprononceerde reductie intreedt dan in laatstgenoemde.

Tenvolle moet evenwel worden erkend, dat de hier gegeven

voorstelling van het mechanisme van het negatieve PASTEUR-effect vooral snog een zuiver hypothetisch karakter draagt.

Alvorens deze bespreking af te sluiten, lijkt het intusschen gewenscht er op te wijzen, dat de waargenomen negatieve reactie van PASTEUR niet alleen staat en een niet te miskennen verwantschap bezit met een aantal andere buiten twijfel gestelde verschijnselen.

In de eerste plaats wil ik dan opmerken, dat weliswaar — zooals reeds meermalen is vermeld — bij andere gistsoorten een negatief PASTEUR-effect nimmer is aangetroffen, maar dat hierbij toch waarnemingen zijn verricht, welke min of meer in dezelfde richting wijzen. Dit moge als volgt worden toegelicht. Tot dusver is, in overeenstemming met het algemeene gebruik, onder PASTEUR-effect steeds verstaan het verschijnsel, dat de intensiteit der gisting bij zuurstoftoetreding geringer is dan bij volledige onthouding van zuurstof aan de cellen. Het ligt evenwel voor de hand er toe over te gaan aan deze wetmatigheid een uitbreiding te geven en te besluiten, dat bij toeneming der zuurstofconcentratie ook een toenemende terugdringing der gisting — althans tot een zeker minimum — zal plaats vinden. Rechtstreeksche waarneming ter toetsing van dezen „uitgebreiden regel van PASTEUR” heb ik niet aangetroffen. Tot op zekere hoogte is evenwel een antwoord op de vraag naar de juistheid van dezen regel te vinden in de beschouwing van het gedrag der aërobe gisting van gistcellen, waarbij de ademhaling in toenemende mate is geremd door de aanwezigheid van stijgende concentraties van specifieke ademhalingsvergiften, zooals blauwzuur en cysteïne. Dit geval is o.m. door HOGERHEIDE (l.c., pag. 44 en 45) voor cellen van persgist nagegaan. Beschouwt men de grafieken, waarin deze onderzoeker zijn uitkomsten heeft neergelegd, dan treft het, dat inderdaad overeenkomstig de verwachting aanvankelijk een verhooging der concentratie van de genoemde vergiften een verhooging van de aërobe gisting bewerkt, doch dat bij voortgezette concentratieverhooging der remmende stoffen — dus bij voortgezette afneming der concentratie van de werkzame zuurstof — opmerkelijkwijze de aërobe gisting weer onmiskenbaar afneemt. Nu moge men in dit verband bij een stof als blauwzuur aan een irreversibele giftwerking denken, voor een niet-celvreemde stof als cysteïne ligt het meer voor de hand de reduceerende werking van deze verbinding voor het geconstateerde effect verantwoordelijk

te stellen. Dit zou dus beteekenen, dat ook bij normale gistcellen een te ver doorgevoerde reductie van het glycolytisch katalysator-systeem dit systeem zou inactiveren.

In de tweede plaats meen ik, dat er aanleiding bestaat om verband te zoeken met een door mij van uit een geheel ander gezichtspunt verrichte reeks van waarnemingen.

Men vindt in de literatuur, zij het slechts min of meer terloops, herhaaldelijk melding gemaakt van het verschijnsel, dat er glucose-vergistende gisten zijn, welke bepaalde disacchariden wel als ademhalings- en als assimilatiesubstraat kunnen gebruiken, doch welke niet het vermogen bezitten deze disacchariden onder anaërobe voorwaarden te vergisten. Een voorbeeld hiervan is eveneens genoemd bij de beschrijving van de verschillende *Brettanomyces*-stammen in Hoofdstuk III. Men vindt hier aangegeven, dat met den uit „stout” geïsoleerden stam St. II, met saccharose een positief auxanogram was verkregen, doch dat deze stam, onderzocht volgens de hiervoor gebruikelijke standaardmethode, het vermogen miste deze suiker te vergisten.

In het naar aanleiding hiervan ingestelde uitvoerige onderzoek ¹⁾ werd een groot aantal gistsoorten betrokken, waarvoor analoge verschijnselen in de literatuur waren gerapporteerd. O. m. was dit het geval met *Torulopsis dattila* (Kluyver) Lodder, een gistsoort waarvoor HOEKE ²⁾ had vastgesteld, dat zij maltose onder aërobe voorwaarden zeer goed als ademhalings- en als assimilatiesubstraat kan gebruiken, ondanks het feit, dat deze gistsoort op grond van haar onvermogen tot vergisting van maltose reeds sedert tal van jaren toepassing vindt bij biochemische suikerbepalingen. Bij het door mij ingestelde onderzoek kon nu voor *Torulopsis dattila* het rechtstreeksche bewijs worden geleverd, dat de cellen het enzyme maltase bevatten; bij toevoeging van narcotica toch kon een hydrolytische splitsing van maltose tot glucose buiten twijfel worden gesteld. Dat maltose — in tegenstelling tot glucose — nochtans onder anaërobe voorwaarden niet wordt vergist, moet dus noodzakelijkerwijze beteekenen, dat onder genoemde voorwaarden de aanwezige maltase volledig buiten werking is gesteld.

¹⁾ Men zie hiervoor: A. J. KLUYVER and M. TH. J. CUSTERS, *Antonie van Leeuwenhoek* **6**, 121, 1940, in welke verhandeling het hieronder medegedeelde nader is gedocumenteerd.

²⁾ F. HOEKE, *Chem. Weekbl.* **36**, 237, 1939.

In dit verband is het nu ongetwijfeld hoogst opmerkelijk, dat onmiskenbaar kon worden vastgesteld, dat *Torulopsis dattila* onder bepaalde voorwaarden een aërobe vergisting van maltose te zien geeft, wat dus beteekent, dat deze gistsoort ten opzichte van het speciale substraat: maltose — geenszins evenwel t. o. v. glucose — een negatief PASTEUR-effect vertoont.

Tenslotte is in het beschouwde verband melding te maken van een nog gansch andere categorie van verschijnselen, waarmede iedere microbioloog wel vertrouwd is. Hiermede doel ik op de periodiek in de microbiologische literatuur steeds weer naar voren komende waarnemingen aangaande de onmisbaarheid van zuurstof voor alle facultatief anaërobe organismen bij voortgezette cultuur. Reeds PASTEUR heeft voor de biergist min of meer intuïtief op dit verschijnsel gewezen en zijn leerling COCHIN heeft daarvoor een scherpe experimenteele bewijsvoering geleverd ¹⁾. In de toepassing der open wortkoelers in de brouwerijen vindt dit gezichtspunt tot op den huidigen dag zijn erkenning.

Door BEIJERINCK ²⁾ is reeds in 1887 een krachtig pleidooi geleverd ten gunste van de zienswijze, dat de bedoelde onmisbaarheid der zuurstof voor alle, zoowel facultatief als obligaat, anaërobe cellen zou gelden. In een latere verhandeling ³⁾ heeft BEIJERINCK in deze uitspraak weliswaar een beperking aangebracht, in zoverre, dat kleine hoeveelheden zuurstof voor de vermeerdering der obligaat anaërobe cellen wel bevorderlijk, doch niet onmisbaar zouden zijn. Dit neemt intusschen niet weg, dat genoemde geleerde ook toen met grooten nadruk het standpunt heeft verdedigd, dat voor alle facultatief anaërobe cellen zuurstof in kleine hoeveelheden onontbeerlijk is voor de instandhouding der normale levensfuncties.

Het is verleidelijk in dit verband de conclusie, waartoe BEIJERINCK reeds 53 jaren geleden kwam, hier met diens eigen woorden weer te geven:

„De stelling, dat de vrije zuurstof noodzakelijk is voor het leven, heeft zich tot nu toe, niettegenstaande zij in 1861 dreigde om te storten, tegen alle verwachting weten staande te houden.

¹⁾ Men zie hiervoor: E. DUCLAUX, *Traité de Microbiologie* T. 3, p. 34, 1900.

²⁾ M. W. BEIJERINCK, *Handelingen van het Eerste Nederlandsche Natuur- en Geneeskundig Congres*. Amsterdam, 1887, p. 34.

³⁾ M. W. BEIJERINCK, *Proc. Kon. Akad. v. Wet.* Amsterdam 1, 14, 1898.

De beteekenis dezer stelling is echter geheel en al veranderd.

Toen zij ontstond werd gemeend dat de zuurstof noodzakelijk is omdat zij oxydatie veroorzaakt; — de ademhaling, de bron der levens-energie, werd als een oxydatieproces beschouwd.

In de gisting werd een bron van energie erkend, die de oxydatie kon vervangen. De heerschappij der zuurstof scheen gevallen.

Men had zich vergist. Van een geheel andere zijde, en met tot nu toe onbetwist recht, verscheen de vrije zuurstof plotseling opnieuw op het tooneel der wetenschap. In het geheimzinnige gewaad der excitabiliteits- of prikkelfunctie, noodzakelijk voor de instandhouding der levensbeweging, beheerscht zij, volgens de gegevens onzer hedendaagsche kennis, in onmeetbaar kleine hoeveelheden het leven in zijn ganschen omvang, van de hoogste verrichtingen der zenuwcellen tot de eenvoudigste der bacteriën.

De toekomst moet leeren of zij zich voor altijd op haar troon zal weten te handhaven.”

In het licht van deze woorden bezien, is men geneigd het door mij bij *Brettanomyces Claussenii* geconstateerde negatieve PASTEUR-effect te beschouwen als een geprononceerd geval van de algemeene eigenschap van alle facultatief anaërobe cellen om door voortgezette zuurstofonthouding in hare activiteiten te worden verlamd.

Terwijl bij de meeste celsoorten deze remming der in de cel aanwezige katalysatoren — aan welke remming naar alle waarschijnlijkheid een te ver doorgevoerde reductie ten grondslag ligt — zich eerst bij voortgezette cultuur en dan uiteindelijk op irreversibele wijze manifesteert, treedt dit verschijnsel bij de genoemde gistsoort reeds door de enkele zuurstofonttrekking bij tenvolle vitale cellen op. Dit proces draagt dan een reversibel karakter en komt als een negatieve reactie van PASTEUR tot uiting.

SUMMARY.

1. The earlier literature dealing with *Brettanomyces*-yeasts has been reviewed. From this survey one gets the impression that these yeasts possess several properties which are not met with in the great majority of ordinary yeast species. However, the survey also showed clearly that these properties have not been very clearly defined, and that their significance has only been insufficiently understood. (Chapter I).

2. A preliminary investigation of some *Brettanomyces*-strains present in the collection of the "Centraalbureau voor Schimmelcultures" was made. The experience obtained in this study was applied in subsequent attempts to isolate a large number of *Brettanomyces*-strains from Belgian and English beers. (Chapter II).

3. For the 17 strains obtained from various sources the main morphological and physiological characters were established. From this study it appeared that all these strains have several characteristic properties in common. In this respect reference may be made to the frequent occurrence of cells of a particular shape which can be best defined as "ogive"-shape (Cf. Fig. 15). Moreover, all strains investigated were found to be characterized by the ability to produce marked quantities of acid from glucose (Cf. Plate I). It was set forth that this property may be deemed to be of taxonomic importance, provided a rigid standardization of the external conditions of the test is adhered to. (Chapter III).

4. On the basis of the results of this systematic study arguments were given in favour of the view that it is desirable to maintain *Brettanomyces* Kufferath et van Laer as a separate genus in the subfamily *Mycotoruloideae* of the asporogenous yeasts. For the moment four species, and two varieties, should be distinguished within the genus. (Chapter IV).

5. The *anaerobic* dissimilation of glucose by *Brettanomyces Claussenii* under conditions of proliferation was studied. It was found that ethyl alcohol and carbon dioxide were the only dissimilatory products formed. Addition of chalk to the medium did

not alter this situation; appreciable amounts of acid could never be detected.

The only phenomenon worth noticing was that the amount of ethyl alcohol found, always slightly surpassed that of the carbon dioxide. The cause of this deviation from the classic equation for alcoholic fermentation has been discussed. (Chapter V).

6. An investigation of the *aerobic* dissimilation of glucose by *Brettanomyces Claussenii* and by *Brettanomyces bruxellensis* under similar conditions resulted in the establishment of a considerable amount of acetic acid besides the ethyl alcohol and the carbon dioxide. The observations made seemed to indicate that in the first phase of the experiment a pure alcoholic fermentation had occurred, and that the acetic acid was the product of the oxidation of the ethyl alcohol primarily formed, but no definite conclusion regarding this point could be arrived at.

Analogous experiments on the aerobic dissimilation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae* and by *Saccharomyces carlsbergensis* showed that no production of acetic acid had taken place.

For these experiments a method had to be devised allowing a quantitative determination of ethyl alcohol volatilized by the current of air passing through the culture media. (Chapter VI).

7. In manometric respiration experiments with ethyl alcohol as a substrate it was found that at $\text{pH} = 6.40$ *Brettanomyces Claussenii* oxidizes the alcohol to acetic acid only, whilst at $\text{pH} = 4.35$ and 3.77 the primarily formed acetic acid is further oxidized to carbon dioxide and water.

Additional experiments dealing with *Saccharomyces cerevisiae* showed that under certain conditions this species also forms acetic acid from alcohol, but that with this yeast the oxidation of the acid is much less dependent on the pH of the medium.

These results were corroborated and extended by a study of the behaviour of the two yeast types towards acetate as a respiration substrate. (Chapter VII § 1—4).

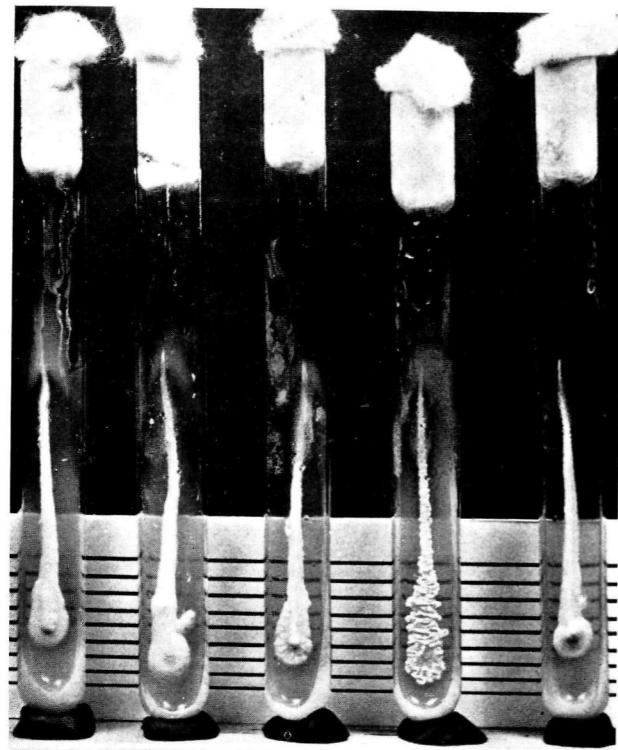
8. In addition manometric experiments were made to study the influence of oxygen on the fermentation of glucose by *Brettanomyces Claussenii*. It appeared that the aerobic fermentation showed an early decline which, however, is only apparent, and is caused by the formation of acetic acid from meanwhile accumulated ethyl alcohol. The low value of the anaerobic fermenta-

tion was another striking feature of the cells under investigation. The most remarkable result was the observation that the aerobic fermentation surpassed the anaerobic fermentation, which result may be formulated by the words that under the conditions of the experiments *Brettanomyces Clausenii* shows a negative PASTEUR-effect. (Chapter VII § 5).

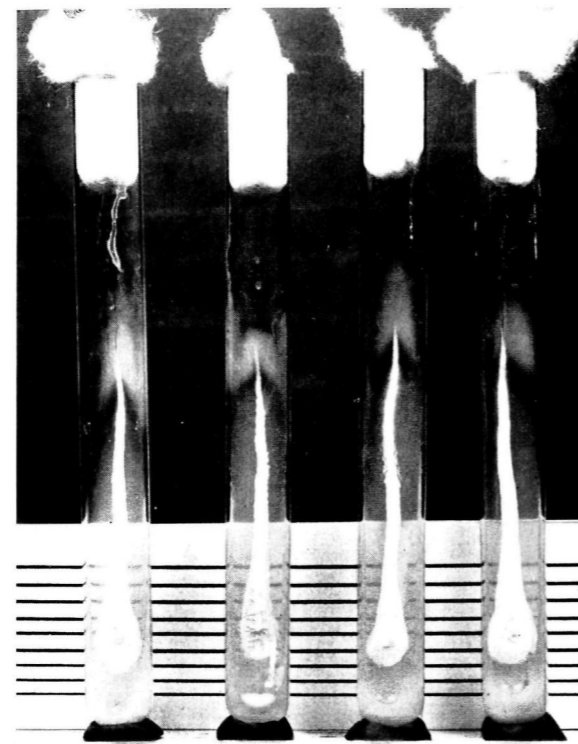
9. A further series of experiments was carried out in order to find out whether the previous history of the cells markedly influences their metabolic activities. This was, indeed, found to be the case. When using cells of older cultures higher values of both aerobic and anaerobic fermentation were observed, and these cells also showed a normal PASTEUR-effect. Cells derived from anaerobic cultures were characterized by a very low value of respiration, whilst the intensities of both aerobic and anaerobic fermentation were high, and almost equal.

Although in the case of *Saccharomyces cerevisiae* the previous history of the cells also influenced the intensities of the different activities, this influence was much less pronounced, and did not lead to regular changes in the nature of the metabolism. (Chapter VII § 6).

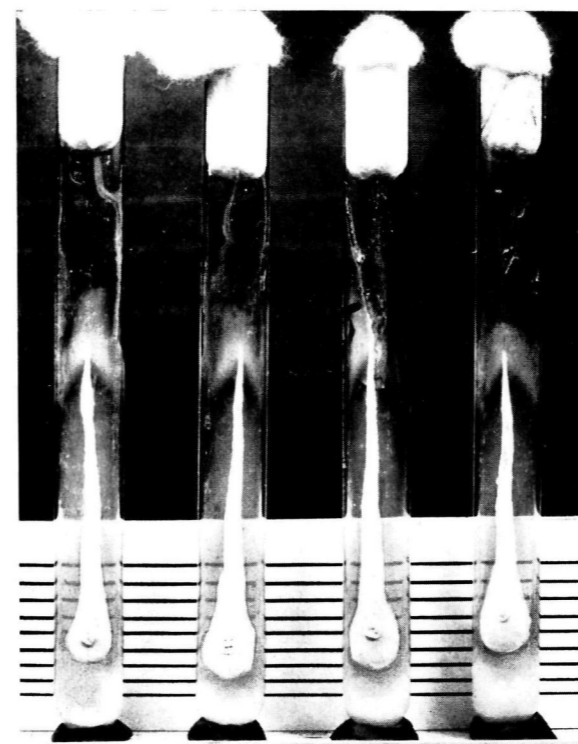
10. In a final chapter an attempt has been made to apply the foregoing results in order to obtain a better insight into the cultural behaviour of *Brettanomyces*-strains. Moreover, a discussion has been given of the causes underlying the negative PASTEUR-effect.



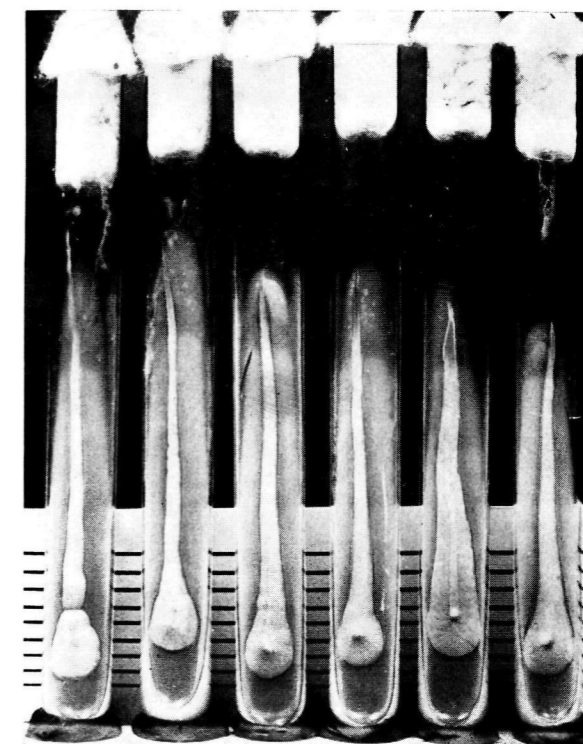
A 1 2 3 4 5
Brettanomyces-stammen.



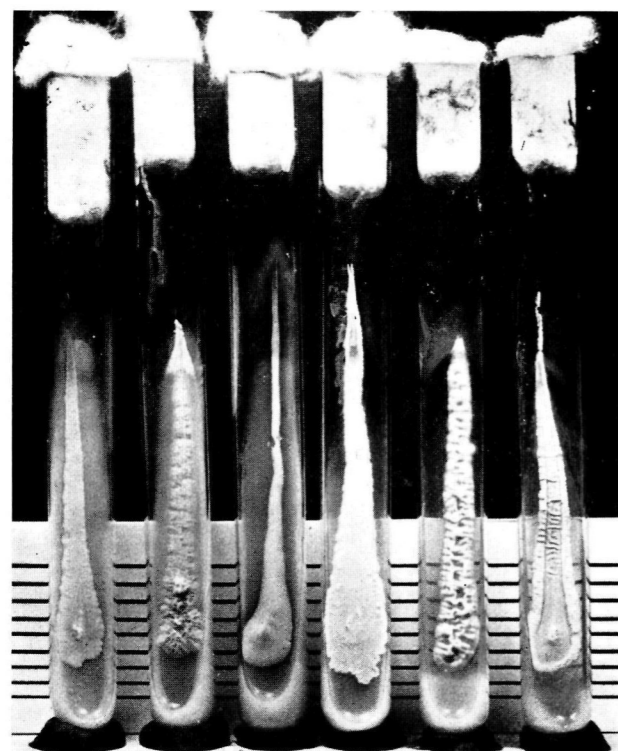
A 6 7 8 9
Brettanomyces-stammen.



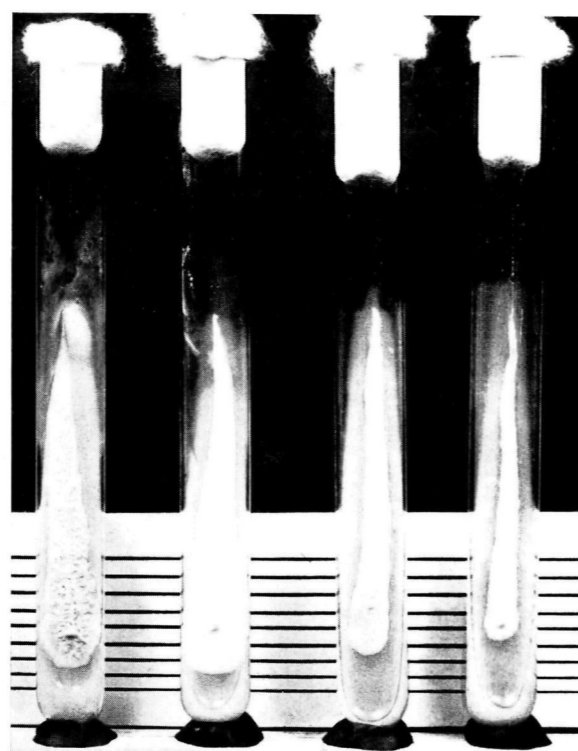
A 10 11 12 13
Brettanomyces-stammen.



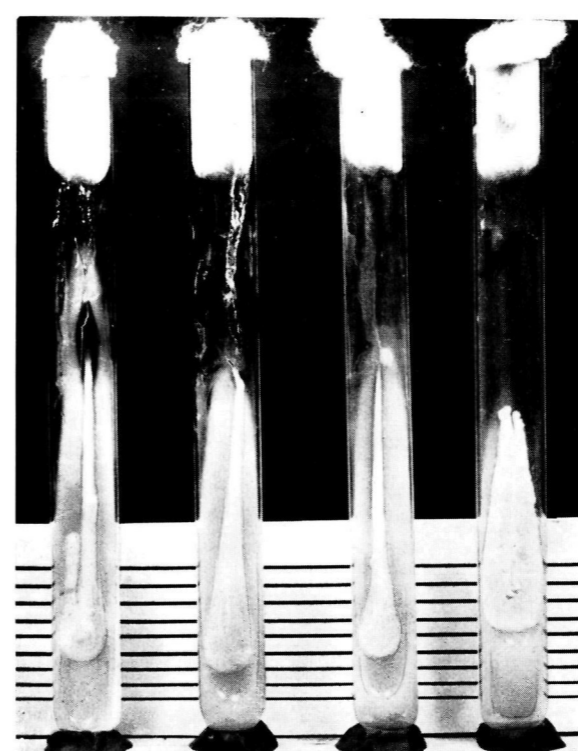
B 1 2 3 4 5 6
Stammen van sporevormende gistsoorten.



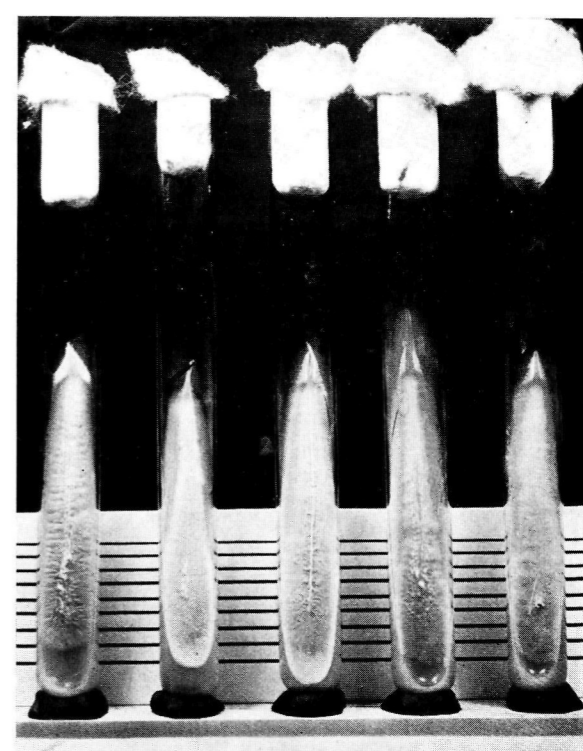
B 7 8 9 10 11 12
Stammen van sporevormende gistsoorten.



C 1 2 3 4
Stammen van niet-pseudomyceliumvormende
anascosporogene gistsoorten.



C 5 6 7 8
Stammen van niet-pseudomyceliumvormende
anascosporogene gistsoorten.



C 9 10 11 12 13
Stammen van pseudomyceliumvormende
anascosporogene gistsoorten.

PLAAT I.

Voor verdere bijzonderheden zie pag. 35.

STELLINGEN.

I.

De voor *Brettanomyces*-gisten zoo karakteristieke zuurvorming in suikerhoudende media is gebonden aan de aanwezigheid van zuurstof; het gevormde zuur is uitsluitend azijnzuur.

II.

Brettanomyces Claussenii vertoont afhankelijk van de voorwaarden, waaronder de cellen zijn ontstaan, een „positief” dan wel een „negatief” PASTEUR-effect.

III.

De conclusie van DAVIS, dat de door hem onderzochte heterofermentatieve melkzuurbacteriën een negatief PASTEUR-effect te zien geven, moet tot nader order als voorbarig worden beschouwd.

J. G. DAVIS, *Nature* **143**, 765, 1939.

IV.

Glucose-vergistende gistsoorten, welke maltose als ademhalings- en als assimilatiesubstraat kunnen gebruiken, doch deze suiker onder anaërobe voorwaarden niet vergisten, bevatten nochtans het maltose-hydrolyserende enzyme: maltase.

A. J. KLUYVER and M. TH. J. CUSTERS, *Antonie van Leeuwenhoek* **6**, 121, 1940.

V.

De meening van SHIMWELL en KIRKPATRICK, dat de biersarcina zich laat identificeeren met de „aroma-streptococcen”, is onhoudbaar.

J. L. SHIMWELL and W. F. KIRKPATRICK, *Journ. Inst. Brew.* **45**, 137, 1939.

VI.

De heerschende meening, dat de biersoorten, welke in de groote, met ondergisting werkende brouwerijen worden bereid, het product zijn van een reincultuur-gisting is onvoldoende gefundeerd.

VII.

Het is te betreuren, dat SÖHNGEN in de Inleiding tot zijn belangwekkende studie „Over Nederlandsche brouwergerst” (Wageningen, 1938) schrijft, dat het meerendeel der door de mout- en brouw-industrie ten aanzien van de Nederlandsche gerst naar voren gebrachte bezwaren gegrond bleek te zijn.

VIII.

De theorie van FREY-WYSSLING volgens welke lignine door desamineering en decarboxyleering van eiwitten zou ontstaan, is niet voldoende gefundeerd. De zienswijze van GRIFFIOEN, waarbij pectine als bouwsteen voor de lignine wordt aangenomen, is experimenteel beter gesteund.

A. FREY-WYSSLING, *Die Naturwissenschaften* **26**, 624, 1938.

K. GRIFFIOEN, diss. Leiden, 1938.

IX.

Indigo is een resonantie-hybride van minstens zes verschillende structuren.

J. VAN ALPHEN, *Chem. Weekbl.* **35**, 435, 1938.

X.

De door DREW gegeven voorstelling van het chemisme der chemo-luminescente oxydatie van 5-amino-phtaalhydrazide is waarschijnlijker dan die van ALBRECHT.

H. O. ALBRECHT, *Z. physik. Chemie* **136**, 321, 1928.

H. D. K. DREW, *Transact. Faraday Society* **35**, 207, 1939.

XI.

Het verdient aanbeveling na te gaan, in hoeverre bij het onderzoek naar den benevelingstoestand van automobilisten een rechtstreeksche bepaling van alcohol damp in de uitgeademde lucht voordeelen biedt boven de alcoholbepaling in bloed volgens WIDMARK.

E. M. P. WIDMARK, Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung. Berlin-Wien, 1932.

XII.

Een aanbevelenswaardige wijze om het Ba-gehalte van glas te bepalen is de Röntgen-spectrographische methode.

W. BÖTTGER u. Mitarb., Physik. Methoden d. anal. Chemie. Leipzig, 1933. Bd. I, p. 269.

XIII.

Wanneer men van lijnolie naast het normale jood-getal ook het rhodanometrische jood-getal bepaalt, kan de vrij omslachtige bepaling van het hexabromide-getal komen te vervallen.

XIV.

De bepaling van de onverzadigdheid van houtolie levert zooveel moeilijkheden op, dat de resultaten slechts als een benaderingswaarde mogen worden opgevat.

XV.

Het koelen van het wort gedurende de hoofdgisting met behulp van koude, langs de gistingsskuijen strijkende lucht biedt belangrijke voordeelen boven de meer gebruikelijke koeling met door buizen circuleerende koelvloeistof.

XVI.

Voor ontharding van brouwater verdient het kalksoda-procédé nog steeds de voorkeur boven de meer recent voorgestelde onthardingsmethoden.

XVII.

Het door MENZEL en anderen geopperde bezwaar tegen het feit, dat bij de moutanalyse volgens HARTONG in hare oorspronkelijke uitvoering het eindresultaat in één kwaliteitscijfer wordt uitgedrukt, kan grootendeels worden ondervangen door de bij 25° C., 45° C., 65° C. en 85° C. verkregen uitkomsten rechtstreeks in de eindbeoordeling te betrekken.

B. D. HARTONG, Wo. f. Brauerei **53**, 81, 116, 1936.

O. MENZEL, Wo. f. Brauerei **55**, 65, 1938.

B. D. HARTONG, Wo. f. Brauerei **55**, 119, 1938.

XVIII.

Het verdient aanbeveling de studenten in de scheikunde aan de Nederlandsche universiteiten in sterkere mate, dan thans veelal geschiedt, aan te moedigen reeds in de eerste phase van hun studie kennis te maken met de toepassingen der scheikunde in de samenleving.
