

## 194. Julius Renning: Über kochbeständige Heferasen. (Vorläufige Mitteilung).

(Eingegangen am 13. März 1929.)

Die in der einschlägigen Literatur vorhandenen Angaben über die Widerstandsfähigkeit der verschiedenen Heferasen gegen Erhitzung in feuchtem Zustande lauten meist dahingehend, daß die Hefen schon durch relativ geringe Wärmegrade abgetötet werden. Einzig *Saccharomyces thermantitonus* soll die Erwärmung auf 84° einige Zeit ohne Schaden aushalten. Über die Hitze-Beständigkeit von Hefe-Sporen konnten keine Angaben gefunden werden.

In zahlreichen Versuchsreihen wurde nun gefunden, daß die im Handel erhältlichen sog. Südwein-Hefen (d. h. Hefen, die bis zu 15% Alkohol und darüber zu bilden vermögen) resp. ihre Sporen die Erhitzung sehr wohl überstehen, die notwendig ist, um den von ihnen in einer 30—35-proz. nährkräftigen Zuckerlösung gebildeten Alkohol abzudestillieren. Denn eine neue Gärung tritt regelmäßig wieder ein, wenn der abgekühlte Destillations-Rückstand einschl. der inzwischen abgesetzten, durch Umschwenken wieder aufgeschüttelten Hefe in einer sorgfältig gereinigten Flasche mit ungefähr der gleichen Menge einer  $\frac{1}{2}$  Stde. gekochten 20-proz. Zuckerlösung vermischt wurde, so daß eine ca. 10-proz. Zuckerlösung entstand, und die Flüssigkeit mit einer Ölschicht abgeschlossen wurde.

Die neue Gärung beginnt in der Regel am 4. bis 6. Tage nach dem Vermischen der Flüssigkeiten. Um eine Wirkung von Enzymen kann es sich also nicht handeln, denn diese müßte ja schon während der Abkühlung des Destillations-Rückstandes oder mindestens unmittelbar nach der Zufügung der Zuckerlösung eintreten. Die neue Gärung wird vielmehr sicherlich von den aus den hitze-beständigen Sporen gebildeten neuen Hefezellen veranlaßt, denn sie tritt erst nach Ablauf der für die Bildung der neuen Zellen notwendigen „Inkubationszeit“ ein und liefert nach Herstellung und Einhalten der gleichen Gärungs-Bedingungen wie bei der Ausgangs-Hefe eine Alkohol-Ausbeute von der gleichen Größenordnung wie die Ausgangs-Hefe.

Die Übereinstimmung der Ausbeuten beider Gärungen ist im Hinblick auf die Ausbeute-Schwankungen, wie sie auch bei normalen Gärführungen von Fall zu Fall auftreten, völlig befriedigend. Während einige Ansätze genau die gleiche Ausbeute lieferten, war sie bei anderen etwas niedriger, bei einer weiteren Gruppe sogar etwas höher als diejenige der Ausgangs-Gärung; die erzeugten Alkohol-Mengen entsprechen einer Bildung von 12 bis 14 Vol.-%.

Verfahren wurde in allen Fällen wie folgt: Die zu untersuchenden Hefen wurden in 1-Liter-Flaschen mit Gäverschluß in üblicher Weise herangezogen. Nach beendeter Gärung wurde zunächst eine Kontroll-Destillation vorgenommen, um die von der Ausgangs-Gärung gebildete Alkohol-Menge festzustellen. Zu diesem Zweck wurde ein 500-ccm-Kolben mit ca. 385 ccm der vergorenen Flüssigkeit, aus welcher sich die Hefe zum größten Teil am Boden der Gärflasche abgesetzt hatte, beschickt, der Kolben mit dem Verbindungsrohr zum Kühler versehen und in ein Kochgefäß eingesetzt, das mit soviel Wasser gefüllt wurde, daß der Kolben bis ca. 2 cm unter dem Halsansatz im Wasser stand, und die Verbindung mit dem Kühler hergestellt. Das Kochgefäß wurde mit einem Gasbrenner geheizt, und zwar die ersten 10 Min. mit großer Flamme, bis das Wasser fast bis zum Kochen erwärmt war; zu diesem Zeitpunkt war auch der Kolbeninhalt soweit erwärmt, daß der Kochbeginn deutlich sichtbar war; nun wurde die Flamme

bis auf die Hälfte reduziert, worauf nach einigen Min. der Alkohol abzudestillieren begann; nach weiteren ca. 25 Min. wurde die Flamme wieder voll vergrößert und damit während 10 Min. das Wasser zum starken Sieden gebracht, um die letzten Alkohol-Anteile auszutreiben. Die Gesamtdauer des Kochprozesses betrug somit ca. 50 Min.

Wenn durch diese Vordestillation festgestellt war, daß die Hefe die zu erwartende Alkohol-Menge gebildet hatte, wurde in einer 2. Operation auch die Hefe dem Kochprozeß unterworfen. Aus dem Gärgefäß, das nunmehr noch ca. 600 ccm Flüssigkeit einschließlich der abgelagerten Hefe enthielt, wurde die Hälfte der Flüssigkeit in ein Vorratsgefäß abgossen, in den verbleibenden ca. 300 ccm die Hefe durch Umschwenken gut verteilt und mit dieser Aufschwemmung der gleiche, sorgfältig gereinigte 500-ccm-Rundkolben beschickt, worauf das an ca. 385 ccm noch fehlende Quantum aus dem Vorratsgefäß ergänzt wurde. Auf diese Weise gelangte die Gesamtmenge der Hefe in das Destillations-Gefäß.

Das Abdestillieren des Alkohols wurde nunmehr in genau der gleichen Weise wie bei der Kontroll-Destillation vorgenommen, so daß auch hierbei die Gesamtdauer des Prozesses ca. 50 Min. betrug. Nach beendigter Destillation wurde das absteigende Ende des Verbindungsrohrs aus dem Kühlerkopf gelöst und sofort mit einem starken Pfropfen steriler Watte verschlossen, der Kolben samt Verbindungsrohr aus dem Kochgefäß genommen und zum Abkühlen beiseite gestellt. Inzwischen waren in einem sauberen Gefäß 100 g Würfelzucker in 500 ccm Wasser aufgelöst und darnach zum Sieden erhitzt worden; von dem Zeitpunkt an, bei welchem bei aufgelegtem Deckel kräftiger Dampfaustritt zu sehen war, wurde die Zuckerlösung noch 30—35 Min. mit kleiner Flamme weitergekocht und schließlich, zugedeckt, abkühlen gelassen.

Das Vermischen der beiden Flüssigkeiten erfolgte immer in einer sorgfältig gereinigten  $\frac{3}{4}$ -Liter-Weinflasche aus farblosem Glas mit aufgewölbtem Boden; in dem Kolbeninhalt wurde die abgesetzte Hefe durch Umschwenken wieder verteilt, das Verbindungsrohr samt Stopfen abgenommen und die Flüssigkeit in die Flasche gegossen, wonach sie etwa zur Hälfte gefüllt war; darauf wurde die Zuckerlösung in kräftigem Strahl dazugegeben, bis die Flasche bis auf einige cm unter dem Rand gefüllt war; unmittelbar darauf wurde eine ca. 2 cm starke Ölschicht aufgebracht.

Wenn sich nach einiger Zeit die Hefe und der „Trub“ am Flaschenboden abgesetzt haben, so ist eine 1—3 cm hohe Ringschicht in dem Raume zwischen Flaschenwand und dem aufgewölbten Boden entstanden; wenn nach Ablauf der für die Ausbildung der neuen Hefezellen aus den Sporen notwendigen Zeit die neue Gärung beginnt, so ist das Erscheinen und der Austritt der ersten Kohlensäure-Blasen, sowie die weitere Entwicklung der Gärung aus dieser Bodenschicht einwandfrei zu beobachten. Die sich allmählich verstärkende Gärung ist gewöhnlich, die nötige Gärwärme vorausgesetzt, in ca. 8—10 Stdn. voll in Gang gekommen.

Nunmehr wurde dieser gut gärenden Flüssigkeit der nötige Nährstoff zugefügt, indem man sie (nach Entfernung der Ölschicht), genau wie es bei der Bereitung der Ausgangs-Gärungsflüssigkeit geschehen war, in einem 1-Liter-Pulverglas mit 150 g zerschnittenen Feigen an warmem Ort stehen ließ, wobei unter deutlicher Gärungssteigerung die in den Feigen enthaltenen Nährstoffe und der Zucker zum größten Teil herausgelöst werden, danach wurde die Flüssigkeit von den Feigen abgeseiht, in die gereinigte 1-Literflasche, die zur Ausgangs-Gärung benutzt worden war, abgefüllt und soviel Zucker darin zur Auflösung gebracht, daß nach Ergänzung des an ca. einem Liter fehlenden Quantums durch reines Wasser unter Einrechnung des aus der gekochten Zuckerlösung schon vorhandenen und des aus den Feigen herausgelösten Zuckers eine ca. 30—35-proz. Lösung entstand.

Damit waren für die zweite Gärung die völlig gleichen Verhältnisse hergestellt, wie sie bei der Ausgangs-Gärung geherrscht hatten; die neue Gärung verlief dementsprechend, wenn tunlichst für annähernd die gleiche Gärwärme Sorge getragen wurde, völlig gleichlaufend wie die Ausgangs-Gärung; nach beendeter Gärung wurde die Alkohol-Ausbeute in der gleichen Weise wie bei jener durch eine Kontroll-Destillation festgestellt. Die in beiden Fällen gefundenen Ausbeuten sind also zweifellos unmittelbar vergleichbar, und ihre gute Übereinstimmung bedeutet, daß in beiden Fällen die gleichen Ursachen wirksam waren.

Läßt man bei kritischer Würdigung obiger Befunde die Existenz kochbeständiger Hefe-Sporen zunächst einmal dahingestellt, so bleibt nur die Möglichkeit, daß die neue Gärung durch auf irgendeine Weise in die gekochten Flüssigkeiten gelangte Hefe-Keime veranlaßt wird. Eine direkte Infektion mit lebenden Zellen der untersuchten Hefen ist bei der strikte durchgeführten exakten Reinigung aller Gefäße und sachgemäßen Arbeitsweise ausgeschlossen, schon aus dem Grunde, weil ja in diesem Falle die neue Gärung sicherlich nicht erst am 4.—6. Tag, sondern innerhalb der ersten 24 Stdn. eingesetzt haben würde.

Es bleibt somit nur noch die Annahme übrig, daß entweder mit der Zuckerlösung die Gärungs-Erreger eingeführt werden, oder daß durch die beim Einfüllen der Flüssigkeiten in die Gärflasche mithineingewirbelte Luft Hefe-Keime hinzugelangen. Nimmt man an, daß durch die Zuckerlösung die Erreger der neuen Gärung eingeführt werden, so ist damit natürlich die Existenz einer in wäßriger Lösung kochbeständigen Hefe resp. ihrer Sporen akzeptiert, denn die Zuckerlösung wurde ja  $\frac{1}{2}$  Sde. gekocht. Nun tritt aber auch, wie mehrfach einwandfrei festgestellt wurde, die neue Gärung in gleicher Weise ein, entwickelt sich analog und liefert unter denselben Bedingungen die gleiche Ausbeute, wenn man den für das Ingangkommen der neuen Gärung nötigen Zucker nicht erst dem Destillations-Rückstand in der gekochten Zuckerlösung zuführt, sondern ihn bereits vor der Destillation der vergorenen, die zu untersuchende Hefe enthaltenden Flüssigkeit zusetzt.

Dies wurde bewiesen, indem aus einem 2-Liter-Ausgangs-Gäransatz nach vorgenommener Kontroll-Destillation eine 2-malige Beschickung des Destillations-Kolbens mit nachfolgendem Kochprozeß vorgenommen wurde, wobei in beiden Fällen durch entsprechende Auflockerung der Hefe dafür gesorgt war, daß das entsprechende Hefe-Quantum in den Kolben gelangte. Während die erste Destillation normal durchgeführt und dem Destillations-Rückstand die gekochte Zuckerlösung zugefügt wurde, wurden in dem 2. Kolbeninhalt 40 g Würfelzucker zur Auflösung gebracht, darauf die Destillation in gleicher Weise durchgeführt und der Destillations-Rückstand samt der Hefe in eine entsprechende kleinere (sog. halbe) Flasche abgefüllt und mit Öl verschlossen.

Die neue Gärung begann in beiden Fällen nach Ablauf fast genau der gleichen Zeit (vom Zeitpunkt der Abfüllung an gerechnet) und entwickelte sich in gleicher Weise; die gut gärenden Flüssigkeiten wurden danach in in beschriebener Weise mit Nährstoff versehen, wobei im 2. Falle das fehlende Flüssigkeitsquantum durch Wasser ergänzt wurde. Nachdem die beiden Ansätze wie oben in 1-Liter-Flaschen übergeführt und mit dem nötigen Zucker versehen waren, verlief die Gärung völlig analog, und die Kontroll-Destillationen ergaben eine genau übereinstimmende Ausbeute.

Nach diesem Befund müßte also der käufliche Würfelzucker, wenn er für die neue Gärung die Veranlassung sein soll, eine Hefe mit Südwein-Hefen-Charakter enthalten, deren Sporen in alkoholisch-wäßriger Lösung kochbeständig sind — eine doch etwas unwahrscheinliche Annahme; daß auch nicht durch das Wasser, in welchem der Zucker aufgelöst war, die Erreger der neuen Gärung zugeführt wurden, ergibt sich aus diesem Befund ebenfalls mit Sicherheit, denn der 2. schon zucker-haltige Destillations-Rückstand wurde ja unverdünnt abgefüllt.

Zur Beurteilung der Möglichkeit, daß beim Vermischen der Flüssigkeiten aus der Luft Hefe-Keime in die Mischung gelangt sein könnten, wurden wiederholt Zuckerlösungen untersucht, welche, teils mit anorganischem, teils mit organischem Nährstoff versehen, mehrere Stunden bis zu einem Tag in offenen Gefäßen, öfter umgerührt, in dem Arbeitsraum gestanden hatten, in welchem die Vermischungen vorgenommen wurden; in keinem Fall wurde der Eintritt einer Gärung innerhalb 8 Tagen beobachtet. Daß die Lösungen jeweils für den Eintritt und die Entwicklung einer Gärung geeignet waren, wurde durch Impfen mit einer einem normalen Ansatz entnommenen Hefe festgestellt.

In Anbetracht der Tatsache, daß bei gleicher Alkohol-Ausbeute unter gleichen Gärbedingungen auch annähernd die gleichen Hefemengen vorhanden gewesen sein müssen, kommt die Infektion mit Luft-Hefekeimen als alleinige Ursache der neuen Gärung nicht in Frage; denn es müßten ja in der relativ kleinen Luftmenge, die mechanisch in die Mischung gelangt, so reichlich Keime vorhanden sein, daß sich daraus soviel Hefezellen entwickeln können, wie in der Ausgangs-Gärung vorhanden waren, deren Hefe gewöhnlich in mehreren Generationen herangezüchtet, d. h. vermehrt worden war; dies kann wohl als ausgeschlossen gelten.

Es bleibt somit nur die Möglichkeit übrig, daß die neue Gärung durch die Hefezellen veranlaßt wird, die sich aus den kochbeständigen Sporen der Ausgangs-Hefe gebildet haben.

Daß die Bildung kochbeständiger Sporen nicht allein auf die reingezüchteten Südwein-Hefen beschränkt ist, scheint aus Untersuchungen hervorzugehen, die an Abkochungen verschiedener Früchte vorgenommen wurden. Bei sachgemäßer Herstellung unter Beifügung von soviel Zucker, daß ca. 10-proz. Lösungen entstehen, ergab sich bei der Mehrzahl der Eintritt einer Gärung am 4.—6. Tag nach dem Abfüllen, was die Anwesenheit von mindestens in Wasser kochbeständigen Sporen bedeutet. Für zwei Formen der diesen Gärungen zugrunde liegenden Frucht-Hefen wurde bereits festgestellt, daß ihre Sporen auch den Destillations-Prozeß überstehen. Die übrigen bedürfen noch weiteren Studiums; die hierfür nötigen Versuche sind im Gange. Ich bitte daher die Herren Fachgenossen, mir dieses Arbeitsgebiet noch einige Zeit überlassen zu wollen.

---