

**258. Hugo Haehn, Max Glaubitz und Werner Gross:
Zur Frage der Vergärbarkeit der Dextrine (Amylo-hexaose und ver-
schiedene Heferasen¹⁾).**

[Aus d. Institut für Gärungsgewerbe d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 5. Juni 1937.)

Die chemisch-physiologischen Reaktionen der drei großen Gruppen der Mikroorganismen, der Bakterien, Hefen und Schimmelpilze, weisen in ihren Grundlagen eine gewisse Ähnlichkeit auf, sodaß man oft mit Erfolg von Einrichtungen der einen Gruppe von Organismen auf solche einer anderen schließen kann. Unter den Schimmelpilzen befinden sich viele Arten, die die Fähigkeit haben, Stärke energisch zu lösen, zu verzuckern. Wenn Brot z. B. von *Penicillium glaucum* befallen wird, so ist eine Vegetation des grünen Schimmelpilzes nur möglich, wenn das Substrat in erster Linie durch Amylasen zu Zucker hydrolysiert werden kann. In einigen Pilzen ist die amylytische Kraft so stark ausgebildet, daß sie technisch verwendet wird (Amylo-Verfahren, Taka-Diastase). Auch manche Bakterienarten, z. B. die Megaterium- und Heubazillen-Gruppen („Kartoffelbazillen“), haben teilweise recht starke amylytische Wirkung²⁾. Auch hier hat die Technik schon versucht, verschiedene Individuen in ihren Dienst zu stellen.

In der großen Gruppe der gärenden Hefen (Bier-, Wein- und Brennerei-Hefen) hat man dagegen nicht eine einzige Rasse mit einem Amylasegehalt gefunden, weshalb die Gärungsgewerbe, die in der Hauptsache Kulturhefen bevorzugen, von jeher gezwungen waren, die Aufschließung der Cerealien mit Hilfe von Pflanzen-Amylasen (Malz) zu bewerkstelligen. Hier war wir eine biochemische Reaktion vor uns, die die Gärhefen von den Bakterien und Schimmelpilzen unterscheidet. Angefügt sei, daß A. Düll³⁾ aus der Gruppe der nichtgärenden Hefen einige Arten isoliert hat, die in der Lage sind, Stärke allmählich amylytisch zu lösen und zu assimilieren.

Lange Zeit war man indes in dem Glauben, daß Hefen wenigstens die ersten Abbauprodukte der Stärke, die Dextrine, zu hydrolysieren imstande wären. Wir finden in der Literatur Angaben über Dextrinasen und über Heferasen, die Dextrine vergären. Leider wurden diese Feststellungen in einer Zeit gemacht, in der es noch keine wissenschaftliche Dextrin-Chemie gab. Aus diesem Grunde muß die Richtigkeit der älteren Ergebnisse heute angezweifelt werden. Wahrscheinlich wurden damals z. Tl. Dextrine verwendet, die vergärbare Zuckerarten beigemischt enthielten, und da die Versuche nicht quantitativ erfolgten, so konnte nicht beobachtet werden, ob die Kohlensäure dem Zucker oder dem Dextrin entstammte.

Die letzten Gärversuche mit Dextrinen in Maischen und einer Anzahl Spezialhefen sind im Institut für Gärungsgewerbe von G. Staiger und M. Glaubitz⁴⁾ angestellt worden. In einer technischen Versuchsanordnung sollte geprüft werden, ob in dextrinhaltigen Roggenmaischen bei Anwendung verschiedener Heferasen eine Steigerung der Alkoholausbaute zu beobachten ist, wenn vor Eintritt der Gärung die Amylase des Roggens durch Erhitzen auf 90° zerstört wurde. Daneben sollten Versuche mit einer künstlichen „Maische“, die neben Rohrzucker und Hefe-Extrakt als Stickstoff-

¹⁾ Kurze Mitteilung; die Hauptarbeit erscheint in der Zeitschrift für Spiritusindustrie.

²⁾ A. Düll, Ztrbl. Bakteriol. 88, 81 [1933].

³⁾ a. a. O.

⁴⁾ Ztschr. Spiritusind. 1925, 320; 1929, 243; 1933, 190.

quelle auch Dextrin (Kahlbaum reinst) enthielt, das erhaltene Ergebnis kontrollieren. Aber bei keinem Versuch war ein positives Ergebnis zu erzielen. Die Hefen Pombe, Logos, Hefe mellacei, Rasse 152 konnten keine höheren Alkoholausbeuten hervorbringen als die gewöhnlich verwendete Hefe Rasse XII. Selbst wenn Hefegemische zur Anwendung kamen, gab es keine Dextrinvergärung. Zum Schluß wurden Einhorn-Röhrchen mit gereinigtem Handels-Dextrin angesetzt, sogar Versuche mit „Bier-Dextrin“, gewonnen durch Fällen von hellem Lagerbier mit Alkohol, aber auch hier war alles Mühen vergeblich. Selbst ein Preßsaft der Hefe Pombe — Ausschaltung von möglichen Osmose-Hemmungen — führte nicht zum Ziel. Man kam endlich zu dem Ergebnis, daß die älteren Angaben der Literatur, Dextrine seien durch bestimmte Heferassen vergärbar, falsch sind.

Wie angeführt, litten die Ergebnisse der älteren Dextrin-Versuche infolge der damals noch wenig ausgebauten Dextrin-Chemie. Die neuere Zeit hat auf diesem Gebiet viel Aufklärung gebracht. Zu den erfreulichen Ergebnissen der letzten Jahre auf diesem Gebiete gehört die Auffindung eines scharf definierten Dextrins, das das bisher niedrigste Glied in der Dextrinreihe darstellt. Es handelt sich um die von Waldschmidt-Leitz⁵⁾ gewonnene kristallisierte Amylo-hexaose, also um ein Molekül, das eine Verkettung von 6 Glucose-Resten darstellt. Besonders hervorzuheben ist, daß dieses kleinste Dextrinmolekül auf rein physiologischem Wege (aus Erythrodextrin mittels der pankreas-Amylase) gewonnen wurde.

Es lag nun der Gedanke nahe, dieses wohl definierte Dextrin einmal auf Gärfähigkeit mit den verschiedensten Heferassen zu prüfen. Denn wenn sich herausstellen würde, daß dieses kleine Molekül unvergärbar ist, so wäre die Unvergärbarkeit der großen Dextrin-Moleküle erst recht anzunehmen. Es wäre dann bewiesen, daß ein reines, auf natürlichem Wege gewonnenes Dextrin, ein bestimmtes chemisches Individuum, unvergärbar ist, im Gegensatz zu den älteren Dextrinpräparaten, die sicher nur Gemische von größeren und kleineren Molekülen mit Glucose vorstellten. Sollte andererseits Vergärung stattfinden, so müßte die Hefe eine Amylo-hexaose-Dextrinase enthalten, da in der Hexaose bekanntlich kein einfaches Oligosaccharid vorliegt. Es stellte sich nun heraus, daß alle ausprobierten Hefen die Amylo-hexaose nicht angreifen. Da auch Staiger und Glaubitz zu negativen Ergebnissen gekommen waren, so sind nach allen vorliegenden neueren Versuchen die Dextrine unvergärbar.

Beschreibung der Versuche.

Zur praktischen Ausführung der Gärungen suchten wir uns zunächst eine zuverlässige, bequeme Kleingärmethode. Zwei Bedingungen wurden hier gestellt. Einmal mußte man mit wenig Substanz auskommen, andererseits sollte aber auch Zuverlässigkeit gesichert sein. Es schien uns im Gegensatz zu einer älteren Kleingärmethode notwendig, das Substrat noch in direkt wägbaren Mengen anzuwenden; auch war es wünschenswert, die Hefemenge dosiert zu sehen. So war man in der Lage, das Verhältnis von Substrat zu Hefe zahlenmäßig festzulegen.

Für diese besonderen Zwecke ließen wir uns Mikro-Einhorn-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von etwa 1.2 ccm herstellen, sodaß man mit

⁵⁾ Waldschmidt-Leitz u. Reichel, Ztschr. physiol. Chem. **223**, 76 [1934].

0.75 ccm Anstellflüssigkeit (= 17.5 mg Substrat) den 45 mm langen Reaktions-schenkel bequem füllen kann. Ein vergärbare Zucker (optimal 17.5 mg) füllt nun in 20 Std. etwa $\frac{3}{4}$ des Schenkels voll Kohlensäure. Hier kann es sich nicht um eine zufällige Ansammlung von Luftbläschen oder Gasen irgendwelcher Art handeln, sondern nur um Kohlensäure, vorausgesetzt, daß die mikroskopische Kontrolle keine Infektion zutage fördert. Wählt man bei den Versuchen ein Verhältnis von 5 Tln. Substrat und 1 Tl. Hefe, so werden gute Geschwindigkeiten erzielt. Die Kohlensäure wurde als Gasblase in mm gemessen und zum Schluß auf Löslichkeit in Lauge kontrolliert.

Zur Vermeidung von Infektionen verwendeten wir in Seidenpapier sterilisierte Gläschen und Pipetten. Überhaupt wurde bei jeder Operation, z. B. beim Abwiegen von Hefe und Substrat, aseptisch gearbeitet. Die Infektionsgefahr ist groß, namentlich bei den mit Diastasepräparaten versetzten Ansätzen. Die Einzelheiten werden in der Hauptarbeit beschrieben.

Derartige Experimente erfordern naturgemäß eine Reihe von Kontrollversuchen. Zunächst mußten wir die Hefe allein mit Wasser ansetzen, um durch ihre Selbstgärung den Glykogengehalt zu bestimmen. Ratsam ist es indes, glykogenfreie Proben zu verwenden, um im Kontrollversuch keine Kohlensäure-Entwicklung zu haben. Um bei unvergärbaren Polysacchariden die Lebens- und Gärkraft der Hefe zu beweisen, wurde ein Gläschen mit Glucose und Hefe angesetzt, oder aber das Polysaccharid wurde zuerst vor der Hefezugabe mit Hilfe eines amylasehaltigen Präparates verzuckert. In diesem Falle war natürlich eine besondere Prüfung der Amylase auf vergärbare Zucker notwendig. Es kamen drei verschiedene Amylasepräparate zur Verwendung, nämlich Superclastase, aus dem *Bac. mesentericus* (Seclin) gewonnen, und zwei Präparate der Firma Dr. Fränckel und Dr. Landau: Diastase (reinst) und Taka-Diastase.

Nachdem sich die Methode mit bekannten Zuckerarten und schließlich mit Stärke bewährt hatte, prüften wir die Vergärbbarkeit der Amylo-hexaose

Tabelle 1. Natürliche Kartoffelstärke, obergärige Brennerhefe, verschiedene Amylasen.

Flüssigkeitsvolumen: 0.75 ccm je Röhrchen; Verzuckerung $\frac{1}{8}$ Stde. bei 55°; T: 32°.

Nr.	Hefe in mg	Substrat in mg	Amylasen in mg	mm CO ₂ in 18 Std.	Mikroskopischer Befund
1	3.5	17.5	—	0	keine Infektion Hefe normal
2	3.5	17.5	0.3 Diastase Fränckel	45	„
3	3.5	—	0.3 Diastase Fränckel	0	„
4	14.0	—	—	—	„
5	3.5	17.5	0.6 Taka-Diastase	40	„
6	3.5	—	0.6 Taka-Diastase	0	„
7	3.5	17.5	etwa 5 Super- clastase	20	„
8	3.5	—	„	0	„

durch verschiedene Heferasen. Dabei zeigte sich, daß keine der verwendeten Hefen instande war, das Dextrin anzugreifen. Von den geprüften 7 Heferasen: Obergärige Brennerihefe Rasse M (bestehend aus 4 Arten), untergärige Bierhefe Rasse U, die Typen Saaz, Froberg, Saccharomyces Brasiliensis Lindner (= Hefe Logos van Laer), Schizosaccharomyces Pombe Lindner und Schizosaccharomyces octosporus Beijerinck waren die drei letztgenannten Arten früher als starke Dextrinvergärer bezeichnet worden. Wurde indes die Amylo-hexaose vor dem Hefezusatz mit den genannten Diastasepräparaten behandelt, so trat Gärung ein. Trotz 10-facher Vermaischungszeit im Vergleich zur Stärke schien noch nicht alle Hexaose hydrolysiert zu sein; denn die bei der Gärung entwickelte CO₂-Menge betrug nur etwa den dritten Teil des Gases, das aus der gleichen Menge Glucose oder Stärke frei wird.

Tabelle 2. Amylo-hexaose, obergärige Brennerihefe, Taka-Diastase. Flüssigkeitsvolumen: 0.75 ccm je Röhrchen. T: 32°. Lösung nicht gepuffert. Nr. 2 5 Stdn. bei 55° verzuckert.

Nr.	Brennerihefe in mg	Substrat in mg	Taka-Diastase in mg	mm CO ₂ in 17 Stdn.	Mikroskopischer Befund
1	8.75	17.5	—	0	keine Infektion, Hefe zeigt In- volutionsformen
2	8.75	17.5	0.6	13	Hefe gesund
3	8.75	—	0.6	0	„
4	8.75	—	—	—	„

Tabelle 3. Amylo-hexaose, Heferasse Saaz, Diastase (Fränckel). Flüssigkeitsvolumen: 0.75 ccm je Röhrchen. T: 32°. Phosphatpufferlösung pH 5.0. Nr. 3 5 Stdn. bei 55° verzuckert.

Nr.	Hefe Saaz in mg	Substrat in mg	Diastase in mg	mm CO ₂ in 19 Stdn.	Mikroskopischer Befund
1	8.75	17.5 Hexaose	—	0	keine Infektion, Hefe gesund
2	8.75	17.5 Glucose	—	30	„
3	8.75	17.5 Hexaose	0.6	10	geringe Infektion, Hefe gesund
4	8.75	—	0.6	0	„
5	8.75	—	—	0	keine Infektion

Wenn das Diastasepräparat infiziert ist, so prüft man die Aktivität der Hefe mit Glucose wie in Versuch Nr. 2, Tab. 3.

Das erste Hexaosepräparat erhielten wir durch die Liebenswürdigkeit von Hrn. Prof. Waldschmidt-Leitz in Prag, wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken. Die zweite Probe stellten wir uns nach der bekannten Methode⁵⁾ her.

Die vorliegende Arbeit wurde im Interesse des Forschungsdienstes der Landbauwissenschaft ausgeführt, der auch die Mittel in dankenswerter Weise zur Verfügung stellte.