

Untersuchungen über den Verderb wasserarmer Lebensmittel durch osmophile Mikroorganismen.

I. Verderb von Lebensmitteln durch osmophile Hefen.

Von

M. VON SCHELHORN*.

Mitteilung aus dem Institut für Lebensmitteltechnologie, München.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 2. November 1949.)

STILLE¹ führt in dieser Zeitschrift aus, daß getrocknete und wasserarme Lebensmittel lediglich einem Verderb durch xerophile Mikroorganismen ausgesetzt sind. Soweit hat STILLE natürlich recht. Durchaus nicht beipflichten kann man ihm dagegen, wenn er fortfährt: „Zu ihnen (= den xerophilen-osmophilen Mikroorganismen; Anm. d. Verf.) gehören ausschließlich Schimmelpilzarten, unter denen nach den bisherigen Feststellungen, insbesondere von HEINTZELER, und STILLE, *Aspergillus glaucus* das Extrem darstellt. Wir sind somit berechtigt, *Aspergillus glaucus* als die Leitform unter den xerophilen Arten zu betrachten.“

In der Tat ist *Aspergillus glaucus* weitgehend an hochkonzentrierte Substanzen angepaßt. STILLE fand in seinen Untersuchungen^{1, 2}, daß der Pilz zur Entfaltung eines verzweigten Mycel und zur Sporenbildung bei optimalen Temperaturverhältnissen einer relativen Luftfeuchtigkeit von mindestens 73 % bedarf und daß erst nach Überschreiten von 75 % relativer Luftfeuchtigkeit sich nach längerer Beobachtungsdauer eine geringfügige Ausbreitung des Pilzes makroskopisch erkennen läßt. Dazu wäre vielleicht zu ergänzen, daß in eigenen Versuchen der Verfasserin, über die an anderer Stelle näher berichtet wird, unter optimalen Ernährungs- und p_{H} -Verhältnissen, nämlich bei schwach saurer bis neutraler Reaktion zuckerreicher Nährsubstrate, noch im Gleichgewicht mit 73 % relativer Luftfeuchtigkeit die Ausbildung einer makroskopisch deutlich sichtbaren Schimmelpilzdecke beobachtet wurde und daß KAESS³ bei gewissen Süßwaren Schimmelpilzdecken bei einer relativen Luftfeuchtigkeit bis 72 % beobachtete.

Es gibt aber eine Gruppe von Mikroorganismen, die in Lebensmitteln weit höhere osmotische Werte auszuhalten vermögen und sich bei noch viel niedrigerer relativer Luftfeuchtigkeit vermehren können als osmophile Schimmelpilze. Es sind die osmophilen Hefen.

Diese Gruppe von Mikroorganismen wurde in Deutschland vor allem durch die Untersuchungen von KROEMER, KRUMBHOLZ und Mitarbeitern⁴⁻⁹ bekannt. Die genannten Forscher beschäftigten sich mit dem Problem der osmophilen Hefen vor allem im Hinblick auf die Vergärung von Trockenbeerenauslesen bei Wein. Nach den genannten Autoren sind es ausgesprochen kleinzellige Hefen mit schwachem Gärungsvermögen, Vertreter der Gattungen *Saccharomyces* und *Zygosaccharomyces*, die sich besonders durch die Fähigkeit, in hochkonzentrierten Lösungen existieren zu können, auszeichnen.

* Als Technische Assistentin wirkte Frä. O. WURMBACH bei der Durchführung der Versuche mit.

¹ STILLE, B.: Diese Z. 88, 9 (1948).

² STILLE, B.: Vorratspfl. u. Lebensmittelforsch. 5, 403 (1942).

³ KAESS, G.: Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 45, 29 (1949).

⁴ KROEMER, K., u. G. KRUMBHOLZ: Arch. Mikrobiol. 2, 352 (1931).

⁵ KRUMBHOLZ, G.: Arch. Mikrobiol. 2, 411 (1931).

⁶ KRUMBHOLZ, G.: Arch. Mikrobiol. 2, 601 (1931).

⁷ KARAMBOLOFF, N., u. K. KRUMBHOLZ: Arch. Mikrobiol. 3, 113 (1932).

⁸ KROEMER, K., u. G. KRUMBHOLZ: Arch. Mikrobiol. 3, 384 (1932).

⁹ KRUMBHOLZ, G.: Obst- u. Gemüse-Verwert.-Ind, 23, 70 (1936).

In Kanada befaßten sich sehr intensiv LOCHHEAD und Mitarbeiter¹⁻⁴ mit den osmophilen Hefen, vorzugsweise mit der Untersuchung der Vergärbarkeit von Honig. Auch diese Forscher kamen zu dem Befund, daß in erster Linie Vertreter der Gattung *Zygosaccharomyces* in hochkonzentrierten Lösungen eine Gärung hervorrufen können.

Neuerdings gewannen die osmophilen Hefen in den USA besonderes Interesse bei der Untersuchung der Vergärbarkeit hochkonzentrierter Fruchtsaftkonzentrate. So erforschten LAURENCE und Mitarbeiter⁵ und INGRAM⁷ das Vergären von Orangenkonzentrat von 65° Brix durch osmophile Hefen. Nach MRAK⁸ sind osmophile Hefen, speziell *Zygosaccharomyces*-Formen, die Ursache für den Verderb ungenügend getrockneter Datteln. Nach FELLERS und CLAQUE⁹ tritt solches Sauerwerden von Datteln durch osmophile Hefen ein, wenn der Wassergehalt der Datteln 25% übersteigt.

Die im folgenden beschriebenen eigenen Untersuchungen über osmophile Hefen befassen sich vor allem mit der Lösung folgender Fragen:

1. Welches sind die optimalen Lebensbedingungen für osmophile Hefen?
2. Welches sind die Grenzkonzentrationen für die Lebensfähigkeit osmophiler Hefen?
3. Bei welchen Lebensmitteln ist ein Verderb durch osmophile Hefen zu erwarten?

1. Optimale Lebensbedingungen für osmophile Hefen.

a) Temperaturansprüche.

In einem Versuch wurden Fruchtsirupe verschiedener Konzentration mit gleichen Mengen einer durch natürliche Auslese gewonnenen, nicht näher definierten Population osmophiler Hefen beimpft. Die Proben wurden bei den Temperaturen 10°, 20° und 30° C gelagert.

Tab. 1 zeigt, innerhalb welcher Zeiten die Proben vergoren wurden. Die verschiedenen Konzentrationen der Substrate sind, wie dies in der Lebensmitteltechnologie üblich ist, durch die relative Luftfeuchtigkeit ausgedrückt, mit der sich die betreffenden Fruchtsirupe im Gleichgewicht befunden haben. Die Ermittlung dieser Werte erfolgte nach der von KAESS¹⁰ angegebenen Methode.

Tabelle 1. Vergärung von Fruchtsaftkonzentraten durch osmophile Hefen bei verschiedenen Temperaturen.

| Relative Luftfeuchtigkeit % | Vergärungszeit bei einer Lagertemperatur von | | |
|-----------------------------|--|-----------------------------|---------|
| | 10° C | 20° C | 30° C |
| 78 | 2 Monate | 13 Tage | 7 Tage |
| 74 | } in 6 Monaten nicht vergoren | 1 Monat | 10 Tage |
| 70 | | 2 Monate | 19 Tage |
| 66 | | in 6 Monaten nicht vergoren | |

Aus den Ergebnissen ist zu schließen, daß die osmophilen Hefen höhere Gärungstemperaturen bevorzugen. Durch Lagerung bei Kellertemperatur kann die Vergärung gefährdeter Substrate weitgehend hintangehalten werden. Diese Befunde decken sich mit den Angaben von KRUMBHOLZ¹¹.

¹ LOCHHEAD, A. G.: Canad. J. Res., **3**, 95 (1930).

² LOCHHEAD, A. G., u. L. FARREL: Canad. J. Res., **5**, 665 (1931).

³ LOCHHEAD, A. G., u. L. FARREL: Food Res. **1**, 517 (1936).

⁴ LOCHHEAD, A. G.: Canad. J. Res., **20**, 89 (1942).

⁵ LOCHHEAD, A. G., u. G. B. LANDERKIN: J. of Bacteriol. **44**, 343 (1942).

⁶ LAURENCE, C. A., E. L. MOORE, E. WIEDERHOLD u. K. K. VELDHUIS: Fruit Prod. J. **26**, 101 (1946).

⁷ INGRAM, M.: Food Manufact. **24**, 77 (1949).

⁸ MRAK, E. M.: Rep. 18th Ann. Date Growers Inst. **3** (1940).

⁹ FELLERS, C. R., u. J. A. CLAQUE: Fruit Prod. J. **21**, 326 (1942).

¹⁰ KAESS, G.: Zit. S. 117, Anm. 3.

¹¹ KRUMBHOLZ, G.: Zit. S. 117, Anm. 9.

b) Optimale p_H -Verhältnisse für osmophile Hefen.

Es wurde versucht, den optimalen p_H -Bereich für das Gärvermögen und die Zellvermehrung der osmophilen Hefen festzustellen.

Zur Untersuchung gelangten:

Zygosaccharomyces priorianus (Reinkultur aus dem Institut für Technische Mykologie Weihenstephan),

Zygosaccharomyces mellis acidii (Reinkultur aus dem Sortiment von S. WINDISCH)

Candida stellata (Reinkultur aus dem Sortiment von S. WINDISCH),

Zygosaccharomyces Barkeri (Reinkultur, von Verfasserin isoliert und von S. WINDISCH bestimmt).

Als Nährsubstrat diente Apfelkonzentrat mit einem Trockensubstanzgehalt von 30%, das nach HJORTH-HANSEN¹ mit organischen Säuren gepuffert und mittels Salzsäure bzw. Natronlauge auf die gewünschten p_H -Werte von 3, 4, 5 und 6 eingestellt worden war.

Mittels Durham-Gärröhrchen wurde festgestellt, daß bei den untersuchten osmophilen Hefarten der optimale Bereich der Gärung zwischen p_H 4 und 5 liegt. Die Zahl der innerhalb eines bestimmten Zeitabschnittes bei den verschiedenen p_H -Werten gebildeten Hefezellen wurde mittels des Plattenverfahrens ermittelt.

Auch hierbei schnitten die Proben von p_H 4 und 5 annähernd gleich gut ab, während sich bei p_H 3 in der gleichen Zeit nur der hundertste Teil der Hefezellen bildete. Das Optimum der osmophilen Hefen liegt somit um p_H 4—5.

Nach HJORTH-HANSEN liegt das p_H -Optimum für *Saccharomyces cerevisiae* bei p_H 4,4—4,8, für *Saccharomyces ellipsoideus* bei p_H 4,5. Damit stehen die ermittelten Werte für osmophile Hefen in guter Übereinstimmung. WINDISCH und ENDERS² nehmen an, daß gute Widerstandsfähigkeit osmophiler Hefen gegen hohe Konzentrationen am meisten bei p_H -Werten in der Nähe des isoelektrischen Punktes der Hefen festzustellen sein müsse. Die Frage des isoelektrischen Punktes der Hefezellen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, und WINDISCH und ENDERS drücken sich nicht ganz klar aus. Es ist ja zu unterscheiden zwischen den isoelektrischen Punkten der Zellmembran und des Zellinnern (vgl. DRAWERT³). Man möchte annehmen, daß hier, wo es sich in erster Linie um Fragen der Elastizität der Zellmembran handelt, der isoelektrische Punkt der Zellmembran die ausschlaggebende Rolle spielt. Daher wurden Untersuchungen über die isoelektrischen Punkte der Zellmembranen von Bierhefe und zahlreichen Stämmen osmophiler Hefen durchgeführt.

Die Untersuchung erfolgte nach der STRUGGERSCHEN Fluoreszenzmethode, wie sie NORDMEYER⁴ für die Untersuchung des isoelektrischen Punktes von Bakterien anwendet. Nur wurde nach KÖLBEL⁵ nicht mit Alkohol fixiertes, sondern lebendes Zellmaterial verwendet. Ferner wurde versucht, den isoelektrischen Punkt der Zellmembranen der genannten Hefen nach DRAWERT³ mit Neutralrot festzustellen. Beide Methoden ergaben für die untersuchten osmophilen Hefen und für Bierhefe Werte, die bei p_H 3 lagen. Hier fehlt also eine direkte Beziehung zu dem p_H -Bereich der optimalen Gärung, Zellvermehrung und des Ertragens hoher Konzentrationen. Überdies wurde — außer in den angeführten Versuchen — auch bei Beobachtungen in der Praxis immer wieder festgestellt, daß ein Vergären durch osmophile Hefen

¹ HJORTH-HANSEN, : Biochem. Z. **301**, 292 (1939).

² WINDISCH, S., u. C. ENDERS: Brauwelt **1**, 151 (1946).

³ DRAWERT, H.: Flora **132**, 91 (1938).

⁴ NORDMEYER, N.: Zbl. Bakteriologie, I, **152**, 54 (1947).

⁵ KÖLBEL, H.: Z. Naturforsch. **2b**, 382 (1947).

am schnellsten bei Substraten um p_H 4—5 eintritt, langsamer bei solchen von höherem und geringerem Säuregrad.

2. Bis zu welchen Zuckerkonzentrationen ist eine Lebenstätigkeit osmophiler Hefen möglich?

KROEMER und KRUMBHOLZ¹ und auch WINDISCH und ENDERS² geben an, daß das Wachstum gewisser Hefen erst bei 90% Zucker unterbunden wird. Diese Konzentration wird von ihnen gewissermaßen als Grenze für die Lebensmöglichkeit osmophiler Hefen angesehen. Die Angabe ist aber mit einer gewissen Vorsicht hinzunehmen. KROEMER und KRUMBHOLZ verstehen nämlich unter der Bezeichnung „90% Zucker“ nicht Gewichtsprozent (entsprechend 90 g Zucker in 100 g Lösung), sondern eine Zuckerlösung, die 90 g Zucker in 100 cm³ Lösung enthält. Da das spezifische Gewicht einer solchen Lösung $s = \frac{20^\circ}{4^\circ} = 1,332$ ist, beträgt also die Konzentration in Gewichtsprozent ausgedrückt nur 67,6%. Eine solche Invertzuckerlösung steht aber mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 78% im Gleichgewicht. Wenn diese von KROEMER und KRUMBHOLZ angegebene Grenzkonzentration tatsächlich die Grenze für die Lebensfähigkeit osmophiler Hefen darstellen würde, dann wäre *Aspergillus glaucus* die xerophilste auf und in Lebensmitteln vorkommende Mikroorganismenart. Es konnte aber nachgewiesen werden, daß osmophile Hefen weit höhere osmotische Werte ertragen und sich dabei zu vermehren vermögen. Bei unseren lebensmitteltechnologischen Arbeiten konnte im Verlaufe einiger Wochen und Monate bei der Temperatur von 30° C vielfach ein Vergären von Sirupen und Fruchtkonzentraten durch osmophile Hefen bis zu Konzentrationen festgestellt werden, die 66% relativer Luftfeuchtigkeit entsprachen. Bei noch höheren Konzentrationen erfolgte die Gärung und Vermehrung der osmophilen Hefen immer langsamer.

Wir bemühten uns weiterhin, die Grenzen der Lebensfähigkeit osmophiler Hefen in hochkonzentrierten, zuckerreichen Substraten festzustellen. Da noch nicht bekannt ist, welche Hefenart hinsichtlich der Osmophilie als Extrem anzusehen ist, suchten wir durch natürliche Selektion einen besonders widerstandsfähigen Stamm zu ermitteln. Es wurden zu diesem Zweck Hefen von vertrocknenden Früchten, gärendem Malz und Sirup sowie ähnlichen gärenden, hochkonzentrierten Substraten gesammelt. Diese Hefen sowie auch Reinkulturen von anderen osmophilen Arten wurden als Population in Fruchtsirupe von immer höherer Konzentration überimpft. Dabei blieb in Birnenkonzentrat von 80% Trockensubstanz eine Hefe als offenbar resistenste Form übrig, die von S. WINDISCH als *Zygosaccharomyces Barkeri* bestimmt wurde. Mit einer Reinkultur dieser Hefeart wurden nun die weiteren Untersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich, daß zu der Erforschung der Grenzkonzentrationen für osmophile Hefen weder Rohrzucker noch Invertzucker als Nährsubstrat verwendet werden kann, da die Löslichkeitsgrenze dieser Zucker bei den fraglichen Temperaturen im Bereich von Konzentrationen liegt, die von osmophilen Hefen ohne weiteres ertragen werden. Für derartige Untersuchungen ist wegen ihrer erheblich besseren Löslichkeit in Wasser nur Fructose brauchbar. Mit Fructose und mit Sirupen, die reich an Fructose sind, können Konzentrate mit rund 84 Gew.-% Trockensubstanz hergestellt werden, die einer relativen Luftfeuchtigkeit von 56% das Gleichgewicht zu halten vermögen. Da in den Nachkriegsjahren reine Fructose sehr schwer

¹ KROEMER, K., u. G. KRUMBHOLZ: Zit. S. 117, Anm. 4.

² WINDISCH, S., u. C. ENDERS: Zit. S. 119, Anm. 2.

erhältlich war und da die Mikroorganismen vermutlich ungünstige Lebensbedingungen auf natürlichen Substraten besser ertragen als auf synthetischen Nährböden, wählten wir als Substrate für die weiteren Untersuchungen mit *Zygosaccharomyces Barkeri* natürliche fructosereiche Sirupe. Sehr gute Dienste leistete ein aus Topinamburknollen durch Inulinverzuckerung hergestellter Fructosesirup „Topimalz“. Das Substrat hatte einen p_H -Wert von 4,8. Die Versuchsanordnung zur Feststellung der Grenzkonzentrationen von *Zygosaccharomyces Barkeri* auf diesem Fructosesirup war folgende:

Mittels der kürzlich von KAESS¹ beschriebenen Methode wurde zunächst festgestellt, bei welchem Trockensubstanzgehalt (gemessen mit dem Refraktometer) der Sirup mit bestimmten relativen Luftfeuchtigkeiten zwischen 62 und 66% im Gleichgewicht stand. Sodann wurden die betreffenden Konzentrate hergestellt. Je 10 g dieser Konzentrate wurden mit 0,05 g einer Aufschwemmung von *Zygosaccharomyces Barkeri* in dem „Topimalz“-Sirup die gemäß Kontrollversuchen nach dem Plattengußverfahren durchschnittlich 21400 lebende Hefezellen pro 0,05 g enthielt, verrührt. Auf 1 g des beimpften Fructosesirups kamen somit rund 2140 Hefezellen. Nach der Impfung wurden die Proben mit einem Glasstab kräftig umgerührt und in flache offene Schälchen ausgegossen. Sie wurden dann in Weckgläsern untergebracht, in welchen durch Schwefelsäure die gewünschte relative Luftfeuchtigkeit eingestellt und konstant erhalten wurde. Eine Sterilisation der Substrate vor der Beimpfung war bei diesen Versuchen nicht notwendig, da andere als die eingepflichten Mikroorganismen sich bei derartig hohen Konzentrationen ohnehin nicht vermehren konnten. Da die eingepflichte Hefemenge im Vergleich zur Nährlösung eine sehr geringe war und ihre Vermehrung sehr langsam vor sich ging, konnten Änderungen der Versuchsbedingungen durch den Stoffwechsel der Hefen während der Beobachtungszeit nicht ins Gewicht fallen. Die Lagerung der Versuche erfolgte bei 30° C.

In bestimmten Zeitabständen wurden von den Versuchsansätzen Proben entnommen, in denen die Zahl der noch lebenden Hefezellen mittels des Plattengußverfahrens bestimmt wurden. Die dabei notwendigen Manipulationen, insbesondere die Herstellung der Verdünnungen nach dem Verfahren von KOCH, erforderten eine gewisse Sorgfalt. Wie schon LJUN² ausführt und auch WINDISCH und ENDERS³ betonen, ist nämlich für die Pflanzenzelle rasche Wiederaufnahme von Wasser viel gefahrvoller als langsamer Wasserentzug. Daher wurde als Flüssigkeit zur Herstellung der zum Zählverfahren notwendigen Verdünnungen statt reinen Wassers stets hochkonzentrierte sterile Zuckerlösung genommen. Die Platten wurden mit einem Agarnährboden gegossen, der 100 g Wasser, 50 g Glucose, 10 g Malzextrakt und 3 g Agar-Agar enthielt und mit Salzsäure auf p_H 5 eingestellt war. So sollte vermieden werden, daß die Hefezellen durch plötzliche Übertragung aus Hochkonzentrationen in verdünntere Substrate abgetötet wurden. Tab. 2 zeigt die Ergebnisse des Versuchs nach zweimonatiger Lagerung bei 30° C.

Tabelle 2. Vermehrung von *Zygosaccharomyces Barkeri* in Fructosesirup verschiedener Konzentration.

Einsaat: 2140 Hefezellen.

| Konzentration des Sirups % Trockensubstanz | Im Gleichgewicht mit % relativer Luftfeuchtigkeit | Zahl der Hefezellen nach 2 Monaten | Vermehrungsfaktor |
|---|---|---------------------------------------|-------------------|
| 84 | 62 | ≈ 5000 | 2,3 |
| 83 | 63 | ≈ 12000 | 5,6 |
| 81,5 | 64 | ≈ 21000 | 9,8 |
| 80,5 | 65 | ≈ 28000 | 13,1 |

Da sich höhere osmotische Werte als 62% relativer Luftfeuchtigkeit entsprechend mit dem „Topimalz“ nicht herstellen ließen, konnte der „Latenzpunkt“, d. h. diejenige Konzentration, bei der sich die Hefe bei 30° C nicht mehr vermehren konnte, mit diesem Substrat nicht erreicht werden. Die Extrapolation der graphisch dargestellten Ergebnisse (vgl. Abb. 1) zeigt aber, daß die Vermehrung

¹ KAESS, G.: Zit. S. 117, Anm. 3.

² LJUN, W. S.: Protoplasma 19, 414 (1933).

³ WINDISCH, S., u. C. ENDERS: Zit. S. 119, Anm. 2.

von *Zygosaccharomyces Barkeri* unter den angegebenen Versuchsbedingungen in der Versuchszeit in Konzentraten entsprechend 61,5% rel. Luftfeuchtigkeit mit großer Wahrscheinlichkeit gleich 0 gewesen wäre.

Wenn auch anzunehmen ist, daß bei noch längeren Beobachtungszeiten auch bei 61,5% relativer Luftfeuchtigkeit noch eine gewisse geringfügige Vermehrung von *Zygosaccharomyces Barkeri* möglich gewesen wäre, so ist doch wahrscheinlich, daß die Vermehrung der betreffenden Hefeart bei 60—61% relativer Luftfeuchtigkeit im wesentlichen zum Erliegen kommt.

Weitere Versuche über die Grenze der Vermehrungsfähigkeit von *Zygosaccharomyces Barkeri* wurden unter Verwendung von Birnenkonzentrat mit hohem Fruchtzuckergehalt, hergestellt aus Früchten der Sorte „Bosks Flaschenbirne“, durchgeführt.

Die Versuchsanordnung war ähnlich wie bei den Versuchen mit „Topimalz“. Das Birnenkonzentrat hatte einen p_H -Wert von 4,5. Mit diesem Substrat konnten noch etwas tiefere relative Luftfeuchtigkeiten erreicht werden, und man konnte dadurch der Grenzkonzentration für die Lebensmöglichkeit von *Zygosaccharomyces Barkeri* noch etwas näher kommen:

Bei Konzentrationen von 80,5% Trockensubstanz im Gleichgewicht mit 58% relativer Luftfeuchtigkeit war nach fünfmonatiger Lagerzeit keine der eingebrachten Hefezellen mehr am Leben. — Bei Konzentrationen von 79,5% Trockensubstanz, im Gleichgewicht mit 60% relativer Luftfeuchtigkeit wurden nach fünfmonatiger Lagerzeit durch das Plattengußverfahren noch einzelne lebende Hefezellen ermittelt, da-

gegen waren nach sechsmonatiger Lagerzeit alle Hefezellen abgestorben. — Bei Konzentrationen von 78% Trockensubstanz, im Gleichgewicht mit 62% relativer Luftfeuchtigkeit, hatten sich die eingebrachten Hefezellen innerhalb von 6 Monaten etwa auf das Zehnfache vermehrt.

Die Ergebnisse, die mit dem Birnenkonzentrat als Substrat erzielt wurden, decken sich gut mit denjenigen mit dem „Topimalz“.

Aus beiden Versuchsreihen geht hervor, daß *Zygosaccharomyces Barkeri* sich in zuckerreichen Substraten, die im Gleichgewicht mit rund 62% relativer Luftfeuchtigkeit stehen, noch schwach zu vermehren vermag und bei Konzentrationen im Gleichgewicht mit 60% relativer Luftfeuchtigkeit noch monatelang am Leben bleibt, wenn er sich auch nicht mehr vermehrt.

Jedenfalls geht aus den angeführten Untersuchungen mit absoluter Sicherheit hervor, daß nicht Schimmelpilze, sondern Hefen das Extrem der Xerophilie darstellen.

Der „Letalpunkt“, d. h. derjenige osmotische Wert, bei dem die eingebrachten Hefezellen sofort absterben, konnte in den bisherigen Versuchen noch nicht ermittelt werden. Da eine bei 30° C gesättigte Lösung von Fructose (dem bestlöslichen Zucker) nach unseren Untersuchungen im Gleichgewicht mit etwa 60% relativer Luftfeuchtigkeit steht, andererseits aber auch in Birnenkonzentrate entsprechend 56% relativer Luftfeuchtigkeit eingebrachte Zellen von *Zygosaccharomyces Barkeri* wochenlang am Leben bleiben, muß bezweifelt werden, ob unter Verwendung von Zucker eine Lösung, die so konzentriert ist, daß in sie eingebrachte osmophile Hefezellen unter sonst optimalen Lebensbedingungen lediglich aus osmotischen Gründen sofort absterben, überhaupt realisierbar ist.

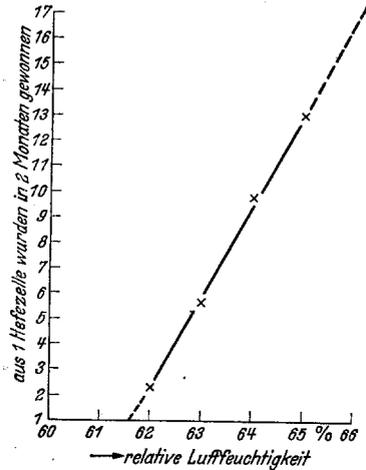


Abb. 1. Vermehrung von *Zygosaccharomyces Barkeri* bei verschiedenen relativen Luftfeuchtigkeiten innerhalb von 2 Monaten. — durch Beobachtungen belegter Verlauf der Kurve, - - - - - angenommener Verlauf der Kurve.

3. Bei welchen Lebensmitteln ist ein Verderb durch osmophile Hefen zu erwarten?

Für den Lebensmitteltechnologien ergibt sich aus den bisherigen Ausführungen die Schlußfolgerung, daß gewisse Lebensmittel, die infolge ihres geringen Wassergehaltes gegen Verschimmeln geschützt sind, immerhin noch durch osmophile Hefen in Gärung versetzt werden können. Es trifft dies für alle Konzentrate zu, die im Gleichgewicht mit relativen Luftfeuchtigkeiten von rund 75—62% stehen. Tab. 3 gibt eine Übersicht über die diesbezüglichen Werte für eine Reihe von gesättigten Lösungen, Sirupen usw. Sie veranschaulicht, daß außer konzentrierter Fructoselösung keine gesättigten Zuckerlösungen vor dem Vergären sicher sind. Malzextrakt ist ebenfalls nicht unangreifbar für osmophile Hefen und wird in der Tat leicht „sauer“, was auf deren Stoffwechselprodukte zurückzuführen ist.

Tabelle 3. Luftfeuchtigkeitsgleichgewichte von lebensmitteltechnologisch wichtigen gesättigten Lösungen, Sirupen u. dgl.

| Substanz | Im Gleichgewicht mit % relativer Luftfeuchtigkeit |
|--|---|
| Bei 20° C gesättigte (66,8%ige ²) Saccharoselösung | 86,6 ³ |
| Bei 20° C gesättigte (47,0%ige ⁴) Glucoselösung | ≈92 ¹ |
| Bei 20° C gesättigte (62,5%ige ⁵) Invertzuckerlösung | ≈82 ¹ |
| Bei 20° C gesättigte (78,8%ige ⁶) Fructoselösung | ≈60 ¹ |
| Bei 20° C gesättigte (26,4%ige ⁷) Kochsalzlösung | 75 ³ |
| Malzextrakt mit 70—80% Trockensubstanz | 78 ¹ |
| Himbeersirup mit 65% Zucker | 80 ¹ |
| Marmelade mit 60% Trockensubstanz | 92 ¹ |
| Fruchtgelee | 75—76 ³ |
| Honig | ≈60 ¹ und ¹⁰ |
| „Topimalz“ mit 84% Trockensubstanz | 62 ¹ |

LOCHHEAD¹¹ fand im Honig lebende osmophile Hefezellen. Dieser Befund deckt sich recht wohl mit unseren Feststellungen. WINDISCH und ENDERS¹² erwähnen sog. „Salzhefen“, das sind halophile Formen. Auch das Vorkommen von Hefen auf stark gesalzenen Substraten wird verständlich, wenn man sich vor Augen hält, daß konzentrierte Kochsalzlösung mit nur 75% relativer Luftfeuchtigkeit im Gleichgewicht steht. Osmophile Hefen kommen in der Natur auf Früchten vor. Entsprechend den angegebenen p_H -Ansprüchen bilden sie vor allem für schwach sauer reagierende, hochkonzentrierte Substanzen eine Gefahr. Die Gefahr wird dadurch gemindert, daß osmophile Hefen im Gegensatz zu Schimmelpilzsporen

¹ Eigene Feststellung nach der von KAESS (vgl. S. 117, Anm. 3) angegebenen Methodik.

² HERZFELD, Z. Ver. deutsch. Zuckerind. **42**, 232 (1898).

³ DOWNS, H. T., u. E. P. PERMANN: Trans. Faraday Soc. **23**, 101 (1927).

⁴ JACKSON, R. F., u. C. G. SILSBEE: Bur. Standards, Sci. P. 437, Bull. **17**, 715 (1922).

⁵ JACKSON, R. F., u. C. G. SILSBEE: Bur. Standards, Tech. P. 259, Bull. **18**, 277 (1924).

⁶ COHN, G.: Fructose. In: Enzyklopädie der Technischen Chemie. Herausgeg. von ULLMANN. 2. Aufl. S. 432. Berlin u. Wien: Urban & Schwarzenberg 1940.

⁷ FRIEDRICH, H., V. GAERTNER, W. SIEGEL u. F. ULLMANN: Natriumverbindungen. In: Enzyklopädie der Technischen Chemie. Herausgeg. von ULLMANN. 2. Aufl. S. 45. Berlin und Wien: Urban & Schwarzenberg 1940.

⁸ OBERMILLER, J.: Z. physik. Chem. **109**, 145 (1924).

⁹ GROVER, D. W.: J. Soc. chem. Ind. **66**, 201 (1947).

¹⁰ HANSSON, A.: Fysiogr. Sällsk. Lund Förh. **11**, 18 (1942); ref. in dieser Z. **86**, 538 (1943).

¹¹ LOCHHEAD, A. G., Zit. S. 118, Anm. 1.

¹² WINDISCH, S., u. C. ENDERS: Zit. S. 119, Anm. 2.

durch Wärme leicht abzutöten sind. Dies ist der Grund, warum z. B. Sirupe und Malzextrakte, die während der Herstellung einer Hitzebehandlung unterworfen wurden, nicht so schnell vergären, wie man auf Grund der vorstehenden Ausführungen erwarten müßte. Erfolgt Neuinfektion mit osmophilen Hefen, so dauert es bei hohen Konzentrationen doch immerhin geraume Zeit, bis sich einzelne Hefezellen soweit vermehrt haben, daß die Gärung deutlich wird. Nach INGRAM¹ ist nämlich mindestens 1 Million osmophile Hefen pro Kubikzentimeter notwendig, um stärkere Gärungserscheinungen hervorzurufen.

Zusammenfassung.

Diejenigen Mikroorganismen, die in Lebensmitteln die höchsten osmotischen Drucke zu ertragen vermögen, sind osmophile Hefen. Es wurde für eine extrem osmophile Form, *Zygosaccharomyces Barkeri*, festgestellt, daß sie sich unter optimalen p_H -Verhältnissen (p_H 4—5) und bei 30° C Lagertemperatur noch in Sirupen bis zu einer Konzentration, die im Gleichgewicht mit rund 62 % relativer Luftfeuchtigkeit steht, zu vermehren vermag. Lebensmittel, die auf Grund ihrer Konzentration von Schimmelpilzen nicht mehr befallen werden können, z. B. hochkonzentrierte Fruchtkonzentrate, sind noch durch osmophile Hefen gefährdet.

Neuartige Süßstoffe.

II. Mitteilung*:

Nachweis und Bestimmung des l-n-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzols.

Von

KLEMENT MÖHLER.

Mitteilung aus der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München, und dem Laboratorium Dr. MÖHLER, Tutzing.

(Eingegangen am 23. Juni 1949.)

Von den neuen Süßstoffen auf Nitranilinbasis hat das n-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzol einen 4000fachen Süßungsgrad gegenüber Rohrucker und ist zeitweise unter dem Namen „Ultrasüß“ in den Handel gebracht worden. Da für Nachweis und Bestimmung noch keine Vorschriften vorhanden sind, andererseits aber im Hinblick auf pharmakologische und physiologische Prüfungen Interesse hierfür besteht, erschien die Durchführung entsprechender Versuche angezeigt.

Die empfindlichste Reaktion zum Nachweis des n-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzols ist nach bisherigen Ergebnissen die Diazotierung der Aminogruppe und nachfolgende Kupplung des Diazoniumsalzes mit α -Naphthol in alkalischer Lösung zu einem blautichig-roten Farbstoff. Mit β -Naphthol entstehen mehr orangefarbene Töne. Unter den im Versuchsteil beschriebenen Bedingungen lassen sich Mengen von 10—50 γ der Substanz in einigen Kubikzentimetern Lösung noch gut nachweisen. Die Konzentrationen mußten so niedrig gewählt werden, da die Dosierung an wirksamer Substanz in Lebensmitteln naturgemäß sehr gering ist.

Die Nitrogruppe läßt sich bei diesen Konzentrationen mit den üblichen Reaktionen nicht unmittelbar erfassen. Dagegen gelingt die Reduktion zur Aminogruppe mit Eisen und starker Salzsäure in der Siedehitze. Hierbei entsteht ein Alkoxy-2,4-

¹ INGRAM, M.: Zit. S. 118, Anm. 7.

* I. Mitteilung: Diese Z. 90, 431 (1950).