

BEITRÄGE
ZUR
MORPHOLOGIE UND BIOLOGIE
DER
ALKOHOL-HEFE.



INAUGURAL-ABHANDLUNG
DER PHILOSOPHISCHEN FACULTÄT IN ZÜRICH.

VORGELEGT VON

EMIL SCHUMACHER.

WIEN, 1874.
SELBSTVERLAG DES VERFASSERS.



BEITRÄGE
ZUR
MORPHOLOGIE UND BIOLOGIE
DER
ALKOHOL-HEFE.

INAUGURAL-ABHANDLUNG
DER PHILOSOPHISCHEN FACULTÄT IN ZÜRICH.

VORGELEGT VON

EMIL SCHUMACHER.

WIEN, 1874.
SELBSTVERLAG DES VERFASSERS.

SEINEM THEUREN VATER

WIDMET

DIESEN ERSTEN ERFOLG WISSENSCHAFTLICHEN
STREBENS

DER VERFASSEN.

Vorliegende Arbeit wurde im pflanzen-physiologischen Institute der k. k. Universität zu Wien ausgeführt.

Ich erfülle gleich die angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, dem Vorstande des genannten Institutes, Herrn Prof. Dr. J. Wiesner, der mich hiebei mit grösster Bereitwilligkeit und ununterbrochen unterstützte, hiemit meinen tiefgefühlten Dank auszusprechen.

Die Resultate dieser Arbeit wurden der k. Akademie der Wissenschaften zu Wien in der Sitzung der mathematisch-naturwissenschaftlichen Classe, abgehalten den 11. Juni 1874, vom Herrn Prof. Dr. J. Wiesner mitgetheilt.

(Siehe Sitzungsanzeiger der k. Akademie der Wissenschaften Nr. 15.)

I.

Ueber die Vermehrung der Hefe durch endogen entstehende Zellen. (Reess's Ascosporen).

Bekanntlich hat Reess¹⁾ unsere Kenntniss über die Morphologie der Hefe durch eine wichtige Entdeckung erweitert, indem er eine neue Vermehrungsweise der Hefe auffand. — Er beobachtete nämlich, dass Hefezellen, wenn sie auf bestimmten Substraten im feuchten Raume oder unter andern, später näher zu bezeichnenden Verhältnissen, gezogen werden, in ihrem Innern 2—4 neue Zellen bilden, aus welchen in gährungsfähigen Flüssigkeiten durch Sprossung wieder ganz normale Hefezellen hervorgehen. Reess findet, dass diese endogen entstehenden Zellen Producte freier Zellbildung sind, deutet dieselben als Ascosporen und stellt in Consequenz dieser Annahme den Alkoholgährungspilz, nämlich *Saccharomyces cerevisiae* Meyen, zu den Ascomyceten.

An der Richtigkeit der Beobachtung, dass unter bestimmten Bedingungen in den Zellen der Alkoholhefe endogen neue Zellen entstehen, sofern diese Wahrnehmung sich auf Bierhefe bezieht, ist wohl nicht mehr zu zweifeln, nachdem Brefeld²⁾ und noch andere Beobachter dasselbe Factum constatirten. Die Zweifel, welche von Eidam³⁾ in dieser Beziehung erhoben wurden, belehren uns wohl nur darüber, dass es nicht so einfach und

1) Bot. Zeitung 1869, p. 104. — Ausführlicher in: Reess, Botan. Untersuch. üb. die Alkoholgährungspilze. Leipzig, 1870.

2) Brefeld, Flora 1873, Nr. 25. — A. Meyer, theilt in seiner neuesten Gährungschemie die Reess'sche Ansicht. p. 83.

3) Eidam, Der gegenwärtige Standpunkt der Mykologie mit Rücksicht auf die Lehre von den Infectiouskrankheiten. Berlin, 1871. p. 30.

leicht ist, die Bildung der sogenannten „Ascosporen“ hervorzurufen.

Die Auffassung, dass die endogen entstehenden Zellen Ascosporen seien, und mithin *Saccharomyces cerevisiae* zu den Ascomyceten zu stellen wäre, blieb nicht ohne Widerspruch.¹⁾ Allein die Beantwortung dieser, die systematische Stellung des Hefepilzes betreffende Frage, lag nicht im Plane vorliegender Arbeit, und wenn ich, der Bequemlichkeit des Ausdruckes halber, im Nachfolgenden von Ascosporen des Hefepilzes spreche, so soll damit nicht gesagt sein, dass ich die Reess'sche Auffassung über die systematische Stellung des *Saccharomyces cerevisiae* theile.

Die Aufgabe, welche ich mir stellte, bestand vielmehr darin, nachzusehen, ob der die Branntweinhefe (Presshefe) zusammensetzende Gährungspilz, mit welchem Reess keine eingehenden Untersuchungen anstellte, überhaupt Ascosporen zu bilden fähig ist oder nicht, und im ersteren Falle, unter welchen Verhältnissen dies stattfindet.

Ehe ich aber in die Details meiner Untersuchungen eingehe, scheint es mir an dieser Stelle nicht überflüssig zu sein, darauf hinzudeuten, was denn eigentlich Presshefe ist, zumal selbst Reess im Irrthume über das Wesen dieser Hefeform sich befindet.

Es lässt sich gegen die Aussage von Reess²⁾, dass die Presshefe eine Obergährungsvarietät von *Saccharomyces cerevisiae* sei, allerdings nichts einwenden; dass aber diese Hefeform als ein relativ wasserarmes, durch ein Conservirungsverfahren erzeugtes Product ist, wie Reess³⁾ angibt, beruht auf einem Irrthum. Denn die Presshefe ist, wie technologischerseits hinlänglich bekannt, nichts anderes als eine Branntweinhefe, bei deren Fabrication nur darauf Rücksicht genommen wurde, möglichst viel Hefe zu erzielen; der Bräuntwein hat bei der Presshefefabrication nur die Bedeutung eines Nebenproductes. Die Hefezellen der Presshefe besitzen den reellen Wassergehalt, den sie in Gährflüssigkeit hatten, denn bei der Abscheidung der Presshefe wird nur die mechanisch adhärende Flüs-

¹⁾ Brefeld l. c.

²⁾ Reess, Alkoholgährungspilze. p. 21.

³⁾ Reess, Alkoholgährungspilze. p. 5, Anmerk.

sigkeit möglichst beseitigt und nichts von dem den Hefezellen eigenen Wasser entfernt.

Es schien mir der Vollständigkeit halber nothwendig, neben den Kulturversuchen, die ich mit Presshefe anstellte, auch solche mit Bierhefe vorzunehmen, um die etwaigen Unterschiede dieser beiden Hefeformen in Betreff ihrer endogenen Zellbildung kennen zu lernen.

Zu den Versuchen nahm ich nicht nur aus zuverlässigen Händen bezogene und von allen Verfälschungen freie Bier- und Presshefe, sondern benützte auch für einzelne Versuche Hefe, die ich aus den beiden genannten Materialien in Pasteur'scher Flüssigkeit¹⁾ gezogen hatte, und ferner vorsichtig an der Luft getrocknete Bier- und Branntweinhefe (Presshefe).

Lufttrockene Hefe zog ich darum in den Versuch hinein, da dieselbe nach den Untersuchungen von Hoffmann²⁾ und Wiesner³⁾ lange Zeit nach dem Trocknen noch aus lebenden Zellen besteht, und es desshalb wünschenswerth schien, zu erproben, ob nicht vielleicht die lufttrocken gewordenen Hefezellen leichter in die Ascusform umgewandelt werden können als die wasserhaltigen.

Es dienten somit als Untersuchungsmaterialien:

1. Frische Bierhefe.
2. Lufttrockene Bierhefe.
3. Frische Presshefe.
4. Lufttrockene Presshefe.

1. Versuche mit frischer Bierhefe.

Zur Untersuchung diente frische, direct aus der Brauerei gekommene Unterhefe, welche ich dem Herrn Kuffner, Brauhausbesitzer in Ottakring und Währing bei Wien, und Herrn Meichel, Brauhausbesitzer in Simmering bei Wien, verdankte.

¹⁾ Auf 1000 Gr. Wasser 100 Gr. Kandiszucker, 1 Gr. rechtsweinsaures Ammoniak und die Asche von 10 Gr. Hefe.

²⁾ Hoffmann, „Zur Naturgeschichte der Hefe“, in den bot. Untersuch. aus d. physiol. Laborat. der landwirthsch. Lehranstalt in Berlin. 1867. Herausgegeben von H. Karsten. Bd. I. p. 359.

³⁾ Wiesner, Mikroskopische Untersuch. Ausgeführt im Laborat. für Mikroskopie u. tech. Waarenkunde. Stuttgart, 1872. p. 114. Oder: Sitzungsberichte der k. Akad. d. Wissensch. Math.-naturw. Classe. II. Abth. Märzheft 1869, Wien.

Die mikroskopische¹⁾ Untersuchung ergab, dass alle verwendeten Proben frei von fremden Zusätzen waren. Die Hefe wurde vor jedem Versuche, wie es die von Reess gegebene Vorschrift forderte, mit destillirtem Wasser gewaschen, dann absitzen gelassen. Die so gereinigte Hefe wurde nun auf folgende feste Substrate gesät: auf frische und gekochte Kartoffel, auf frische und gekochte gelbe Rübe (Möhre, *Daucus Carota*).

Die Aussaaten wurden unter den von Reess angegebenen Vorsichten im feuchten Raume stehen gelassen und Tag für Tag die vor sich gegangenen Veränderungen mikroskopisch festgestellt.

Die sämtlichen Versuche wurden in einem Raume des pflanz. physiol. Institutes der k. k. Universität in Wien innerhalb der Monate November 1873 bis Ende April 1874 ausgeführt, dessen Temperatur innerhalb der Versuchszeit nicht unter 14° C. fiel und nicht über 18° C. sich erhob.

Reess²⁾ schildert die Entstehung der Ascosporen in folgender Weise:

„Bei dieser Cultur (auf den Substraten nämlich) verhält sich Bierunterhefe während den ersten 2—3 Tagen ebenso, wie in einer gährungsfähigen Lösung schwacher Concentration. Die wasserreichen, grosse Vacuolen bergenden Zellen des *Saccharomyces cerevisiae* sprossen — wie zu Ende einer Hauptgährung — langsam, doch ohne Unterbrechung weiter, so dass binnen 24 Stunden der Rand der Hefeschicht ringsum um $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Millimeter mit welligen Ausbuchtungen durch Zuwachs vorrückt. Die einzelnen Zellen sind meist von rundlicher, ovaler, seltener von elliptischer und kurz fadenförmiger Gestalt. Ein Auswachsen der *Saccharomyces*-Zellen zu Myceliumfäden irgend welcher Art findet niemals statt, auch wenn alle Bedingungen für derartige Pilzvegetation gegeben sind.

Mit dem dritten Tage nimmt die Vegetation des Biergährungspilzes allmähig ab; am vierten liegen weitaus die meisten Zellen isolirt neben einander, ohne neue Sprossungen

¹⁾ Sämtliche Beobachtungen wurden gemacht mit einem Mikroskop von Seubert und Kraft Obj. V, Oc. 3 (Vergrösserung 610).

²⁾ Reess, Alkoholgährungspilze p. 9.

anzusetzen. Viele Zellen — die älteren, protoplasmaarmen — sterben ab und collabieren.

Andere schwellen sichtlich an, von 8—9 Mik.¹⁾ grössten Durchmessers auf 11—14 Mik. Die grossen Vacuolen in ihnen sind geschwunden, dafür erscheint ihr gesamtes Protoplasma durch viele kleine Vacuolen und Fetttröpfchen (?) gleichförmig feinschaumig. Durchschnittlich mit dem fünften und sechsten Tage differenzieren sich im schaumigen Plasma gleichzeitig zwei drei oder vier dichtere Kerne (als Zellkerne sind sie nicht sicher zu bezeichnen), um welche fast alles übrige Plasma feinkörnig sich sammelt. So entstehen im Pratoplasma 2—4 individualisierte Inseln mit je einem dichten Kerne, welche nach wenigen (12—24) Stunden mit je einer zarten Membran sich umgeben.

Die ursprüngliche *Saccharomyces*-zelle umschliesst dann, ausser ganz spärlichem, zur Tochterzellenbildung nicht verbrauchtem Mutterzellenplasma und wässerigem Zellsaft, zwei, drei oder vier rundliche, durch freie Zellbildung entstandene Tochterzellen von 4—5 Mik. Durchmesser.“

Ich kann nicht allen eben aufgeführten Angaben zustimmen, denn vielfach wurde von mir ein abweichendes Verhalten beobachtet.

Dass z. B. am vierten Tage nach der Aussaat die meisten Zellen isoliert neben einander liegen sollen, ohne neue Sprossungen zu bilden, habe ich kein einziges Mal gefunden (es wurden über 30 diesbezügliche Versuche gemacht), vielmehr beobachtete ich auf einigen Substraten nach drei Wochen noch sehr häufige, auf gekochter Rübe einmal sogar nach sieben Wochen, dann freilich seltenere, Sprossungen und Zellen mit grossen Vacuolen.

Auch eine Individualisierung um dichte vorgebildete Kerne habe ich nie beobachtet und vielmehr gefunden, dass die sich differenzierenden Plasmaportionen gleichmässig feinkörnig waren.

Als Substrate für die Hefezellen, zur Erzielung endogener Zellen, erwiesen sich am günstigsten frische Kartoffel und frische Rübe. Die Culturen auf gekochter Kartoffel gingen stets am raschesten durch *Penicillium glaucum* und *Oidium lactis* zu Grunde; auch entwickelte sich auf diesem Substrate

¹⁾ 1 Mik. = 1 Mikromillimeter = 0.001 Millimeter.

oft schon nach drei Tagen ein starker Geruch (demjenigen des Trimethylamins sehr ähnlich) unter gleichzeitig massenhaftem Auftreten von Bacterien. — Kein anderes Substrat zeigte diese Erscheinung.

Die Ascosporen erschienen auf frischer Kartoffel einmal am 9. Tage, auf frischer Rübe am 13. nach der Aussaat.

Versuche, die Sporenbildung bei mehrfach ausgewaschener Hefe in destillirtem Wasser oder in täglich abgeschwächten Zuckerlösungen hervorzurufen ¹⁾, gaben stets ein negatives Resultat. — Viele solche Culturen gingen, trotz den Vorsichten, welche gebraucht werden mussten, um atmosphärische Verunreinigungen auszuschliessen, nach 2—3 Wochen zu Grunde, ohne dass auch nur eine Andeutung von Ascosporenbildung beobachtet werden konnte; andere hielten sich unverdorben fünf und sechs Wochen unter steter Sprossung. Die einzige Veränderung, die die Hefezellen durch solche Behandlung erlitten, war, dass das Protoplasma regelmässig grobkörnig wurde, auch das Protoplasma solcher Zellen, die noch je eine grosse Vacuole enthielten.

Die Möglichkeit der Sporenbildung bei solchen Culturen sei durch diese negativen Resultate meiner Untersuchungen durchaus nicht bestritten, sondern es soll dadurch nur von Neuem auch das Unzuverlässige derartiger Züchtungsversuche hingedeutet werden.

2. Versuche mit lufttrockener Bierhefe.

Zu diesen Versuchen wurde frische Bierhefe sorgfältig ausgewaschen, dann auf Löschpapier gestrichen und unter einer schützenden Glocke das Wasser der Hefe bei gewöhnlicher Zimmertemperatur (16° C) zur Verdunstung gebracht. Nach einigen Tagen wurde sie trocken, krustenförmig und hatte eine dunkelbraune Farbe angenommen. — In 10 pCt. Zuckerlösung präparirt, zeigte sich das Protoplasma körnig, vacuolenlos; erst nach längerem Liegen in der Zuckerlösung entstanden im Innern einzelner Zellen wieder normale Vacuolen.

Solche Hefe wurde nun auf die Substrate ausgesät und zwar: auf frische und gekochte Kartoffel, auf frische und gekochte Rübe.

¹⁾ Reess, Alkoholgährungspilze. p. 13.

Nach zwei Tagen war die aufgestreute Hefe vollständig erweicht, ja auf den frischen Substraten ganz zerflossen; Vacuolen traten wieder auf, ebenso Sprossungen, das körnige Wesen des Protoplasma aber blieb constant.

Obwohl ich mehrere Versuche in dieser Richtung machte, gelangte ich doch stets zu negativen Resultaten.

Es ist demnach die lufttrockene Bierhefe, obgleich sie aus lebenden Zellen¹⁾ besteht, doch zur Ueberführung in die Ascusform nicht geeignet.

¹⁾ Hoffmann (Bot. Unters. I. c. p. 359) spricht sich in Betreff der Dauer der Gährkraft getrockneter Hefe folgendermassen aus: „In diesem Zustande kann man die Hefe (wie es scheint, beliebig lange) aufbewahren, ohne dass sie dabei merklich von ihrer Gährkraft einbüsst.“

Wiesner gibt in seinen Untersuchungen über den Einfluss, welcher Zufluss und Entziehung von Wasser auf die Lebensthätigkeit der Zellen äussert (Mikroskop. Untersuch. I. c.) an, dass lufttrockene Hefe, deren Wassergehalt 13 pCt. beträgt, durch acht Monate hindurch sich lebend erhält, indem die Zellen einer so lange in diesem Zustande aufbewahrten Hefe in verdünnter Zuckerlösung sprossen und intensive Gährung hervorrufen.

Auf längere Zeiträume hinaus hatte Herr Prof. Wiesner seine Versuche nicht ausgedehnt.

Wohl aber bewahrte er in Gefässen, welche gegen den Zutritt atmosphärischer Keime völlig abgesperrt waren, lufttrockene Hefe seit Jahren auf, welche er mir zu weiteren Versuchen gefälligst überliess.

Ich erhielt zwei Proben; die eine wurde in frisch getrocknetem Zustande im August 1869, die andere in ebendemselben Zustande im November 1870 eingeschlossen. Die Versuche wurden mit beiden im März 1874 angestellt, selbstverständlich unter Berücksichtigung der nöthigen Vorsichtsmassregeln zum Ausschluss atmosphärischer Keime. Erstere, welche also durch 4 Jahre und 7 Monate aufbewahrt wurde, brachte weder Gährung hervor, noch liess sich in Zuckerlösung Sprossung constatiren. In Wasser präparirt zeigten die Zellen dieser Hefe meist elliptische Form, immer körniges Protoplasma, arretirte Sprossungen und lebende Bacterien.

Auch die zweite Hefe, welche also ein Alter von 3 Jahren und 4 Monaten aufwies, liess keine Sprossbildung der Hefezellen erkennen und zeigte in Wasser präparirt das nämliche Bild wie die Hefe von 1869.

Wohl trat bei der zweiten Hefe nach einiger Zeit Gährung ein, da aber gleichzeitig die Bildung eines Mucormyceliums stattfand, so liess sich nicht mit Sicherheit entscheiden, ob die Gährung von der gewöhnlichen Hefe, oder von Mucorhefe herrühre.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass Hefezellen nach vierjähriger Aufbewahrung sich als völlig getödtet und überhaupt als unfähig zur Einleitung von Gährung erweisen, dass hingegen Mucorsporen (und Bacterien) diese mehrjährige Aufbewahrung lebend überdauern. Ob gewöhnliche Hefe nach

3. Versuche mit frischer Presshefe.

Ueber eine etwaige Ueberführung der Zellen der Presshefe in die Ascusform hat Reess, wie schon oben angeführt wurde, keine eingehenden ¹⁾ Versuche angestellt.

Die einzige hierüber bekannt gewordene Beobachtung wurde gelegentlich von Wiesner²⁾ gemacht. Er gibt an, dass bei Culturen der Presshefe, nach den von Reess für Bierhefe gegebenen Vorschriften behufs Einleitung der Ascosporenbildung, unter Hunderten von Hefezellen nur einzelne Asci zur Entwicklung kamen. Er hält auf Grund dieser Versuche die Frage über die Identität der Bier- und Branntweinhefe noch für unerledigt, indem er das bloß sporadische Auftreten der Asci nicht für genügend beweiskräftig erachtet. Diese Auffassung ist um so berechtigter, als erwiesenermaßen käufliche Presshefe manchmal mit Bierhefe verfälscht ist.

Die nachfolgenden von mir angestellten Versuche werden lehren, dass die Presshefe allerdings mit der Bierhefe als sehr naheverwandt aufgefasst werden müsse, da auch die erstere Ascosporenbildung zeigt, wesshalb die von Reess ausgesprochene Vermuthung: „Die Branntweinhefe sei eine Culturvartät von *Saccharomyces cerevisiae*“ berechtigt erscheint.

Freilich wird sich aber auch herausstellen, dass die Bedingungen für die Erziehung des Asci aus Presshefe etwas verschiedene sind von denjenigen, unter welchen die Bierhefe zur Ascosporenbildung gelangt.

Zum Versuche wurde theils frische, völlig reine unverfälschte Hefe, die ich aus zuverlässigen Händen bezog, theils eine Hefe verwendet, die ich mir aus den eben genannten Materialien in Pasteur'scher Flüssigkeit-gezogen hatte.

Beiderlei Materialien waren so rein, dass ein Auswaschen sich nicht als nöthig erwies. Ich unterliess auch diese Opera-

dreijährigem Aufbewahren noch als lebend anzusehen ist, bleibt hingegen noch zweifelhaft. Es ist noch zu bemerken, dass auch aus der erstgenannten Hefe bei Abschluss atmosphärischer Keime in Zuckerlösung sich ein Mycelium entwickelte, dessen Auftreten jedoch von Gährung nicht begleitet war.

¹⁾ Reess, Alkoholgährungspilze I. c. p. 20.

²⁾ Wiesner, Rohstoffe des Pflanzenreiches. Leipzig, 1873. p. 822. Oder in: Arch. d. Pharm. I. Bd. 5. Heft. p. 420. 1874. H. Hoffmann, „Neues über Fermentpilze“.

tion um so lieber, als ja die Untersuchungen Wiesners¹⁾ lehrten, welch schädigenden Einfluss rasche Wasserzufuhr auf die Lebensfähigkeit der Presshefe übt.

Die Hefe wurde dann in dünner Schicht direct auf die Substrate gebracht und in den feuchten Raum gegeben.

Als Substrate dienten: frische und gekochte Kartoffel, frische und gekochte Möhre, Schwarzbrot, Citrone.

Das Verhalten der Culturen auf diesen verschiedenen Substraten war nicht ganz gleich und es zeigte sich, dass auf frischen Substraten die Schimmelpilze stets später auftraten als auf den gekochten. — Im Allgemeinen verliefen die Culturen wie folgt:

Auf den gekochten Substraten zeigte nach 24 Stunden die Hefeschicht schon ersichtliches Wachsthum (auf frischen Substraten war sie nach dieser Zeit meist etwas eingetrocknet). Nach 2—3 Tagen erschienen zahlreiche, oft fünf- und sechsgliedrige Sprossungen. Die neuen Zellen waren meist oval (0.005 Millimeter Längsdurchmesser und 0.00375 Millimeter Querdurchmesser), führten bald eine grosse Vacuole, bald nur feinschaumiges Protoplasma. Am 5. oder 6. Tage nach der Aussaat wurde das Protoplasma in fast allen Zellen körnig (oft sehr grobkörnig), ohne dass dadurch, wie es schien, die Sprossung beeinträchtigt worden wäre.

Auf frischen Substraten, wo das Körnigwerden des Protoplasma auch immer etwas früher eintrat, erfolgte nun die Differenzirung des Protoplasma und am 13. Tage zeigten sich gewöhnlich die Asci (durchschnittlich von 0.00375 Millimeter Durchmesser).

Bei gekochten Substraten blieb die Bildung der Ascosporen oft 3—4 Wochen aus, während welcher Zeit die Saat ruhig weiter sprossete²⁾.

¹⁾ Mikroskop. Untersuch. I. c. p. 115.

²⁾ Die Durchschnittsziffern des Erscheinens der Asci für die verschiedenen Substrate waren folgende:

Für frische Kartoffel nach 13 Tagen,			
"	gekochte	"	33 "
"	frische Möhre	"	13 "
"	gekochte	"	24 "
"	Citrone	"	22 "
"	Schwarzbrot	"	13 "

Auch nach dem Auftreten der Asci fand ich oft noch zahlreiche Sprossungen.

Dieses letztere Ergebniss steht somit im Widerspruch mit dem, was Reess von dem Biergährungspilz sagt, dass nämlich am 4. Tage der Cultur die meisten Zellen isolirt neben einander liegen.

Die Ascosporen traten selten zu zwei, sondern meistens als Tri- und Tetraden auf. Bei den Triaden lagen die Sporen entweder mit ihrem grössten Querschnitte in der Ebene des grössten Querschnittes der Mutterzelle, oder aber lagen in der Axe der letzteren.

Bei den Tetraden war die Anordnung entweder kreuzweise oder tetraëdisch. — Die Tochterzellen behielten meistens ihr gleichförmiges Protoplasma, selten bildeten sich in ihnen kleine Vacuolen.

Die Muttermembran verschwand nach 2—3 Tagen (gezählt vom Auftreten der Ascosporen), ohne dass die Sporencomplexe sich aufgelöst oder die Sporen in ihrer gegenseitigen Lage sich geändert hätten. — In gährungsfähige Medien gebracht, begann schon nach 24 Stunden eine lebhafte Sprossung der Sporen.

Die Culturen mit selbstgezogener Hefe führten zu den nämlichen Resultaten; doch gestehe ich offen, dass ich bei Anwendung käuflicher Presshefe stets sicherer auf Ascosporen rechnen konnte. Der Grund hievon ist mir nicht bekannt.

Betreffs der Keimung der Ascosporen erlaube ich mir noch folgende Bemerkung:

Reess ¹⁾ sagt hierüber wörtlich Folgendes: „Nie sah ich die Sporen am Orte ihrer Entstehung keimen, auch nicht bei genügender Wasserzufuhr. Sie keimen aber überhaupt nicht gerne, wo sie in Menge oder mit Massen anderer Pilze zusammenliegen.“

Ich habe hingegen bei einigen Culturen, bei denen gewöhnliche Sprossungen sehr selten mehr vorkamen, die Beobachtung gemacht, dass bei fast allen Sporencomplexen je eine noch mit den Schwesterzellen zusammenhängende Ascospore mit einer anderen Zelle in Verbindung stand. — Nach Reess würde also diese letztere primärer und die Ascosporen

¹⁾ Reess, Alkoholgährungspilze I. c. p. 15.

secundärer Natur sein. Auf das häufige Vorkommen solcher Complexe aber bei fast vollständiger Abwesenheit gewöhnlicher Sprossungen gestützt, glaube ich eher die Ascosporen als primäre und die an der einen Spore haftende Zelle als secundär ansprechen zu dürfen.

4. Versuche mit lufttrockener Presshefe.

Von jener Presshefe, welche im frischen Zustande zu den früher angeführten Versuchen diente, wurden etwa 12 Gramm in fein zerbröckeltem Zustande auf Löschpapier unter schützender Glocke liegen gelassen. — Schon nach wenigen Stunden erwies sich diese Hefe als merklich spröder; nach 24 Stunden war sie ganz hart; nach achttägigem Trocknen an der Luft enthielt sie nur noch 10 Procent Wasser. Solche Hefe ist schmutziggelblich, „am besten trockener Brodkrume vergleichbar“¹⁾, sehr hygroskopisch, vacuolenfrei und mit körnigem Protoplasma erfüllt.

Die Culturen wurden angelegt auf frischer und gekochter Kartoffel, frischer und gekochter Möhre.

Da zeigte sich vorerst, dass die lufttrockene Presshefe aus den Substraten viel begieriger das Wasser aufnahm, als die trockene Bierhefe, denn schon nach 24 Stunden waren auf allen Substraten die ausgestreuten Hefebröckelchen vollständig zerflossen. Die kurz nach der Aussaat lichtgrau-gelb gewordene Hefe wurde in den nämlichen 24 Stunden dunkler, es traten an den Zellen Sprossungen auf, Vacuolen hatten sich in den Zellen wieder gebildet, und nach 48 Stunden zeigten sich auch fünf- und sechsgliedrige Sprossverbände. — Am 10. Tage nahm diese lebhafte Vegetation bedeutend ab; die mehrgliedrigen, durch Sprossung entstandenen Zellgruppen zerlegten sich in ihre Elemente, und auch die paarigen Sprossungen wurden seltener. Pilze verdarben dann die Culturen, und nur diejenige auf gekochter Möhre gestattete noch während 47 Tagen tägliche Untersuchung. Bei dieser Cultur waren unter den meist collabirten Zellen doch noch einzelne mit Vacuolen versehene Zellen und selbst Sprossungen erkennbar.

Das Auftreten von Ascosporen konnte ich in keinem der angestellten Versuche beobachten.

¹⁾ Wiesner, Mikroskop. Unters. I. c. 99.

So zeigten sich denn auch die Zellen der lufttrockenen Presshefe, wie die der schon erwähnten lufttrockenen Bierhefe, nach meinen Versuchen nicht geeignet, in die Ascusform überzugehen.

Aus nachstehenden Versuchen ergibt sich denn Folgendes:

1. Die Branntweinhefe (Presshefe) bildet unter bestimmten äusseren Bedingungen, gleich der Bierhefe, für welche dies von Reess aufgefunden wurde, sogenannte Ascosporen.

2. Die Ascosporenbildung tritt bei der Branntweinhefe später ein, als unter ähnlichen Bedingungen bei der Bierhefe.

3. Als geeignetste Substrate erweisen sich für die Cultur der Branntweinhefe behufs Hervorbringung der Ascosporen: frische Kartoffel und Schwarzbrod.

4. Es ist nach diesem Verhalten wohl berechtigt, die Branntweinhefe als eine Culturform von *Saccharomyces cerevisiae* aufzufassen, wie es von Reess bereits vermuthungsweise ausgesprochen wurde.

II.

Ueber den Einfluss niederer Temperaturen auf die Lebensfähigkeit der Hefezellen.

Vor längerer Zeit hat Lüdersdorff¹⁾ angegeben, dass es ihm gelungen sei, durch Reiben auf einer Reibplatte Hefe mechanisch zu zertrümmern. — Diesem Versuche steht ein anderer der Marie Manassein²⁾ entgegen, die lufttrockene Hefe in einem Falle sechs, in einem anderen fünfzehn Stunden lang von einem kräftigen Manne mit gepulvertem Bergkrystall in einem Glasmörser reiben liess.

Durch diese Procedur wurden freilich die meisten Zellen gänzlich zerstört; einzelne behielten dennoch die Fähigkeit zur Weiterentwicklung; denn wenn solche Hefe unter den

¹⁾ Bot. Zeitung. 1846. p. 31, oder Hoffmann, Bot. Untersuch. I. c. p. 353.

²⁾ Wiesner, Mikroskop. Unters. I. c. p. 126.

nöthigen Vorsichtsmassregeln zum Ausschluss atmosphärischer Keime in Gährflüssigkeit versenkt wurde, so zeigte sich schon nach einigen Tagen lebhafte Gährung und auch reichliche Sprossung der Hefezellen.

Aus letzterem Versuche ist wohl zu ersehen, dass die Hefezellen mechanischen Angriffen ausserordentlich grosse Widerstandskraft entgegenstellen.

Nach den Versuchen von Melsens¹⁾ sollen die Hefezellen einen Druck von 8000 Atmosphären lebend überdauern.

Der Einfluss hoher Temperaturen auf Hefe war Gegenstand eingehender Untersuchungen von H. Hoffmann²⁾, Wiesner³⁾ und Marie Manassein⁴⁾.

Die Resultate der beiden Letzteren stimmen mit denen von Hoffmann nicht ganz überein, und M. Manassein schreibt dieses zum Theil dem Umstande zu, dass Hoffmann mit Bierhefe, Wiesner und sie aber mit Branntweinhefe (Presshefe) experimentirten.

Nach Hoffmann sollen die Hefezellen beim Erwärmen in Gährflüssigkeit bei 84° C.⁵⁾ vollkommen zu Grunde gehen, beim Erwärmen in trockenem Zustande hingegen eine Temperatur von 215° C.⁶⁾ noch ertragen.

Wiesner⁷⁾ hat gefunden, dass trockene Hefe ohne Gährflüssigkeit auf 100° C. stundenlang belassen werden kann, ohne dass eine völlige Tödtung derselben eintritt.

M. Manassein operirte mit frischer und lufttrockener Presshefe, die sie im Luftbad, und zwar für sich, d. h. ohne Gährflüssigkeit erhitzte. Bei langsamem und anhaltendem Erwärmen wurden die Hefezellen der lufttrockenen Hefe erst bei 115—120° C. getödtet (im Widerspruch mit Hoffmann). Bei rascher, vorübergehender Wirkung der Wärme hielten solche Hefezellen noch 130° (in 7 Minuten auf 130° erwärmt

1) Melsens, Note sur la vitalité de la levûre de bière. Comptes-rendus. Tom. 70. 1870. p. 629, oder Mykologische Berichte von Hoffmann. 1870—71. p. 55.

2) Hoffmann l. c. p. 351.

3) Wiesner, Mikrosk. Unters. l. c. p. 99.

4) M. Manassein in Wiesner's Mikrosk. Unters. l. c. p. 116.

5) Hoffmann, l. c. p. 352.

6) Hoffmann l. c. p. 360.

7) Wiesner, Mikrosk. Unters. l. c. p. 101.

und 20 Minuten auf dieser Temperatur gehalten) aus und blieben noch sprossungsfähig ¹⁾).

Frische Presshefe, 15—45 Minuten lang auf 60° C. gehalten, zeigte, in Gährflüssigkeit gebracht, noch lebhaftes Sprossung; bei 15 Minuten langem Einwirken von 70—72° waren alle Hefezellen entschieden todt.

Die höchste Temperatur, die M. Manassein auf lufttrockene Hefe einwirken liess, betrug 308° C., wobei das Erwärmen 3 Stunden 5 Minuten dauerte und die Hefe einer Temperatur von 300—308° durch 15 Minuten ausgesetzt war. — Auch solche Hefe gährte noch.

Es dürfte nicht überflüssig sein, hier die Resultate der Manassein'schen Arbeit anzuführen: Todte Hefezellen haben noch die Fähigkeit, Gährung einzuleiten und eine begrenzte Zuckermenge zur Vergährung zu bringen. Lebende Hefezellen können hingegen, wenn nur die Bedingungen für ihre Entwicklung vorhanden sind, eine unbegrenzte Zuckermenge in Alkohol, Kohlensäure und die übrigen Gährungsproducte überführen. — Es ist nach M. Manassein mehr als wahrscheinlich, dass in den Hefezellen ein specifisches Ferment vorkömmt, welches die Spaltung des Zuckers in die Gährproducte bedingt, ganz unabhängig davon, ob die Hefezelle lebt oder todt ist ²⁾).

Ueber den Einfluss niederer Temperaturen auf Hefe liegen weniger zahlreiche Versuche vor und genaue Angaben über das morphologische und biologische Verhalten von Hefe, die tiefen Temperaturen ausgesetzt wurde, sind bis heute nicht zur Oeffentlichkeit gelangt.

Als Resultat der bis jetzt gemachten Beobachtungen ist der Satz zu betrachten:

¹⁾ Manassein l. c. p. 123.

²⁾ Der entstandene Alkohol wurde von M. Manassein immer auf doppelte Art nachgewiesen: Zu einem Theil der filtrirten und dann destillirten Gährflüssigkeit wurde Schwefelsäure und chromsaures Kali gesetzt und aus dem entstandenen Aldehyd auf die Gegenwart des Alkohols geschlossen; in einem anderen Theile der Flüssigkeit wurde die Lieben'sche Jodoformreaction vorgenommen. (Annal. d. Chem. u. Pharm. VII. Supplementband. 1870. p. 219.)

Durch Gefrieren wird das Leben der Hefe nicht vernichtet, sondern höchstens die Energie des Fermentes verringert¹⁾).

Ich hatte mir nun zur Aufgabe gestellt, Hefe, die niederen Temperaturen ausgesetzt war, einer genauen mikroskopischen Untersuchung zu unterziehen, zu sehen, ob solche Hefe nicht nur Gährung erregt, sondern wirklich auch sprosst, also die den niedrigen Temperaturen ausgesetzten Hefezellen noch lebend geblieben sind (was in den Versuchen von Cagniard-Latour und Melsens noch nicht constatirt wurde), und endlich das Gährvermögen dieser Hefe mit dem solcher, die in normalem Zustande in Gährflüssigkeit gelangte, in genauen Vergleich zu stellen.

Die angewandte Hefe war frische und lufttrockene Presshefe. Die erstere enthielt 73 Procent, die letztere 10 Procent Wasser²⁾, und es wurden von ersterer zu jedem Versuche 2 Gramm, von letzterer die der Trockensubstanz dieser 2 Gramm entsprechende Menge genommen. — Die Hefe wurde immer vor und nach den Versuchen einer sorgfältigen mikroskopischen Untersuchung unterworfen und stets für sich, nicht in einer Gährflüssigkeit suspendirt, den niederen Temperaturen ausgesetzt.

Zu diesem Zwecke wurde die fein zertheilte abgewogene Hefe in dünnwandige Reagensröhrchen gegeben, die ich vorher ausgeglüht und bis zum Gebrauche mit auf 160° C. erhitzter Watte verschlossen hatte. Die Röhrchen mit der Hefe, mit einem neuen, direct aus dem Luftbad kommenden Wattepfropf versehen, gelangten dann in die Kältemischung. — Da aus Vorversuchen sich ergab, dass die Thermometer, in die Hefe selbst eingesenkt, nach kurzer Zeit genau dieselbe Temperatur anzeigten, wie die Thermometer, die direct in die Kältemischung gegeben wurden, so durfte ich vollkommen beruhigt sein, dass die Angabe der in die Kältemischung eingebrachten Thermometer auch für die Hefe galt, welche, in Eprouvetten verschlossen, in der Kältemischung standen.

¹⁾ Hoffmann l. c. p. 351. — Cagniard-Latour: Mémoire sur la fermentation vineuse. 12 Juin 1837. Ann. Chim. et Phys. II. sér. Bd. 68. p. 206. — Melsens l. c.

²⁾ Der Wassergehalt wurde bei 120° C. bestimmt.

Ich unterliess daher das Einsenken von Thermometern in die Hefe selbst um so lieber, da nach dem Aufthauen diese sich stets verflüssigt und am Thermometer haften bleibt. In Folge dessen hätte ich die Eprouvetten öffnen und bei den Gährversuchen die Hefe vom Thermometer mit Gährflüssigkeit in die Gährgefässe herunterwaschen müssen. Bei dieser Manipulation aber hätten entschieden atmosphärische Keime mit in die Gährflüssigkeit gelangen und so die Genauigkeit der Versuche beeinträchtigen können. — Wir werden später sehen, wie ich mich vor atmosphärischen Keimen beim Einbringen der Hefe in die Gährflüssigkeit sicher stellte.

Da rasches Aufthauen die gefrorene Hefe gefährden soll ¹⁾, so habe ich, um allen Einwendungen von vorneherein zu begegnen, dieses stets in der Kältemischung selbst eintreten lassen.

Die Versuche mit der Hefe wurden bei folgenden Temperaturen gemacht:

- bei + 16° C. (Zimmertemperatur);
- bei + 1° C. (langsam aufthauendes Eis);
- bei — 5° C. (grobgestossenes Eis und Schwefelsäure);
- bei — 18° C. (Eis und Kochsalz);
- bei — 24° C. (Eis und krystallisirtes Chlorcacium);
- bei — 87·5° C. (feste Kohlensäure allein oder feste Kohlensäure und Aether);
- bei — 113·75° C. (feste Kohlensäure, Aether und luft-leerer Raum).

¹⁾ Hoffmann l. c. p. 351.

Ein einziger Versuch, den ich in Bezug auf das Gährvermögen verschieden schnell aufgethaueter Hefe ausführte, ergab Folgendes:

Frische Presshefe, einer Temperatur von — 20° ausgesetzt und in der Kältemischung selbst aufthauen gelassen, wozu ein Zeitraum von etwas mehr wie 6 Stunden nöthig war, verflüssigte sich nach und nach bei + 2° der aufgethaueten Kältemischung. Dieselbe Hefe, in Zimmertemperatur (16° C.) gebracht, verflüssigte sich nach einigen Minuten. Dieselbe Hefe in der Eprouvette in Wasser von 25° C. gebracht, verflüssigt sich fast augenblicklich.

Diese drei Hefeproben zur nämlichen Zeit mit gekochter 10 pCt. Zuckerlösung versetzt und gegen Zutritt atmosphärischer Keime geschützt, zeigten nach 24 Stunden verschiedene Gährungsintensität und zwar war letztere am grössten bei jener Hefe, die in der Kältemischung aufthaute, am geringsten bei der Hefe, die von — 20° direct auf + 25° gebracht wurde.

Es soll nur der Manipulationen bei den Versuchen mit fester Kohlensäure hier des Näheren gedacht werden, da die Anwendung des thauenden Eises und der übrigen Kältemischungen keiner nähern Erläuterung bedarf.

Die Versuche mit fester Kohlensäure wurden im chemischen Laboratorium des Herrn Prof. Dr. Ernst Ludwig angestellt. Ich erachte es für meine Pflicht, dem genannten Herrn hier meinen verbindlichsten Dank auszusprechen für die Unterstützung, die er meiner Arbeit angedeihen liess, indem er mir nicht nur die zur Herstellung der festen Kohlensäure nöthigen Apparate zur Verfügung stellte, sondern mich auch bei den umständlichen Operationen auf das thatkräftigste unterstützte.

So viel mir bekannt, haben Versuche mit so niedriger Temperatur, wie sie durch feste Kohlensäure erzeugt werden kann, nur Cagniard-Latour und Melsens ausgeführt ¹⁾.

Cagniard-Latour mischte feingepulverte trockene Hefe direct mit fester Kohlensäure und liess letztere verdunsten. So glaubte er, wäre die Hefe einer Temperatur von -60^0 und vielleicht noch darunter ausgesetzt gewesen.

Für genaue Versuche ist diese Manipulation entschieden unzulässig, denn abgesehen davon, dass auf diese Weise atmosphärische Keime nicht ausgeschlossen sind, fällt noch ein anderer Umstand in Betracht, vorausgesetzt, dass man mit dem Natterer'schen Apparat die feste Kohlensäure erzeugte.

Es ist diese Kohlensäure nämlich stets durch mechanisch beigemengtes Fett verunreinigt.

Der Grund hievon liegt darin, dass von den Schmierölen der Kolbenstange etc. stets etwas beim Pumpen durch das Ventil in den Compressionskolben gelangt. Man kann sich von dieser Verunreinigung auch jeder Zeit überzeugen, indem man z. B. feste Kohlensäure in einem Becherglase verdunsten lässt. Deutlicher Fettgeruch tritt auf und die Stellen des Glases, mit denen die feste Kohlensäure in Berührung kam, fühlen sich fettig an.

Hefe, in solche Kohlensäure eingestreut, kommt mit dem darin fein zertheilten Fett in Berührung, wird selbst fettig, und in Gährflüssigkeit versenkt, schützt die fettige Hülle vor directer Berührung mit der ersteren.

¹⁾ l. c.

Die Folge davon ist mindestens eine Gährverzögerung.

Melsens hat mit frischer Presshefe experimentirt. Bald mischte er ein Quantum derselben mit fester Kohlensäure — da gelten natürlich die bei Cagniard-Latour's Verfahren gemachten Einwendungen — oder aber er umgab die Kugel eines Thermometers mit der Hefe, schmolz dieses in eine Glasröhre, die er in ein Gemisch von fester Kohlensäure und Aether einsenkte und brachte nun diesen Apparat unter den Recipienten der Luftpumpe.

Das Thermometer zeigte — 91° C.

So war natürlich, wie in meinen Versuchen, die Unreinheit der Kohlensäure gleichgiltig; aus schon erwähnten Gründen aber vermied ich stets das Einsenken des Thermometers in die Hefe.

Die flüssige Kohlensäure wurde auf bekannte Weise im Natterer'schen Apparat erzeugt und dann in die Solidificationsbüchse ausströmen gelassen.

Die feste Kohlensäure gelangte hierauf (bei den Versuchen, bei welchen ausschliesslich feste Kohlensäure genommen wurde) in ein Becherglas, das innen mit Watte ausgekleidet war, und ebenso auch von aussen mit Watte umgeben wurde, um auf diese Weise ein möglichst langsames Verdunsten zu erzielen.

Die dünnwandigen, wohlverschlossenen, die Hefe bergenden Eprovetten wurden nun eingesenkt, so dass die ganze Hefesäule von fester Kohlensäure bedeckt war; zwischen die Eprovetten (es waren deren stets drei, wovon die eine zu den Gährversuchen, die anderen zu der mikroskopischen Beobachtung dienten) wurde ein Schwefelkohlenstoff-Thermometer von Kapeller, das bis — 200° R. getheilt war, gegeben.

Der Gang der Verdunstung war folgender: In etwa fünf Minuten sank das Thermometer von gewöhnlicher Zimmertemperatur auf — 70° R., schwankte während 30 Minuten zwischen — 68° und — 71° , stieg dann in weiteren 30 Minuten auf — 50° und nach wieder weiteren 40 Minuten hatte es die Zimmertemperatur 12.8° (= 16° C.) angenommen.

Bei den Versuchen mit fester Kohlensäure und Aether wurde erstere in ein Becherglas gebracht, das diesmal natürlich nur von aussen mit Watte bekleidet war, die Eprovetten und Thermometer eingesenkt und nun eine kleine Quantität Aether dazugegeben, worauf sogleich heftiges Aufbrausen erfolgte. —

Der Schwefelkohlenstoff im Thermometer sank etwas weniger rasch als bei der festen Kohlensäure allein, blieb 20 Minuten auf -71° stehen und stieg dann in 40 Minuten auf die Zimmertemperatur ($+10^{\circ}$ C.).

Bei Benützung des luftleeren Raumes wurde das Becherglas mit fester Kohlensäure und Aether gefüllt, in das Gemenge der beiden letzteren Thermometer und Eprouvetten eingesenkt, und das Ganze ohne Umhüllung unter den engen Recipienten der Luftpumpe gestellt. Das Manometer sank bei raschem Evacuiren auf $1-1\frac{1}{2}$ Zoll. Das Thermometer fiel schnell auf -91° ($=113.75^{\circ}$ C.) und zeigte diese Temperatur während 15 Minuten; als das Aufbrausen nachgelassen, wurde der Recipient weggenommen und das Becherglas auf eine poröse Porzellanplatte gestellt.

In etwa 50 Minuten hatte auch hier die Annahme der Zimmertemperatur stattgefunden.

Wie wir sehen, war also die Dauer der Einwirkung der Minima dieser Temperaturen in den einzelnen Versuchen eine verschiedene, und muss ich hier bemerken, dass dies auch bei den übrigen Versuchen mit weniger niederen Temperaturen der Fall war.

Ueber den Einfluss, den die Zeitdauer des Gefrorenseins auf die Hefe ausübt, habe ich keine directen Versuche angestellt, doch glaube ich annehmen zu dürfen, dass ein solcher Einfluss mindestens innerhalb enger Zeitgrenzen, nicht existirt ¹⁾).

Ueber die morphologischen Veränderungen, welche Hefezellen beim Gefrieren und Aufthauen erleiden.

Bemerken wir gleich, dass die lufttrockene Presshefe auch durch die intensivsten Kältegrade nicht die geringste bemerkbare Veränderung zeigte.

¹⁾ Siehe hierüber: Sachs, „Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen“, Landwirthsch. Versuchsstation von Nobbe. 1860. 2. Bd. Hier heisst es unter anderem p. 181:

„Theoretisch ist es im Allgemeinen unwahrscheinlich, dass die Dauer der Erstarrung (der Pflanzentheile) von Einfluss (auf die Erscheinung des Erfrierens) sein könne, da ja die Aenderungen nur im Acte des Erstarrens und Aufthauens eintreten können, während des erstarrten Zustandes aber wesentliche Aenderungen kaum möglich sind.“

Frische Presshefe liess hingegen, von -5° C. angefangen, zunächst die Veränderung erkennen, dass sie steinhart wurde. Auch beim sorgfältigsten Aufthauen (in der Kältemischung selbst) zerfloss dann diese Hefe stets und meist begann dieses Zerfliessen bei $+2^{\circ}$ C.

Jene Hefe, die einer Temperatur von -5° ausgesetzt war, zerfloss nicht in dem Grade, wie die übrigen. Das Aufthauen bewirkte mehr ein starkes Erweichen.

Die gefrorenen Hefezellen direct, d. h. ohne Präparirflüssigkeit, beobachtet, enthielten äusserst selten noch Vacuolen. Dimensionsmessungen konnten an solchen Präparaten nicht leicht gemacht werden. Ich präparirte deshalb diese Hefe in 10 procentiger Zuckerlösung, und verglich sie mit normaler Hefe, die ich gleichfalls in 10 procentiger Zuckerlösung vertheilte.

Es ergab sich: dass das Volumen der gefrorenen und dann aufgethauten Hefezellen sich im Ganzen verringert hatte.

Von der Hefe, die einer Temperatur von -18° ausgesetzt war, zeigten die elliptischen Zellen im Durchschnitt eine Verkleinerung der beiden Durchmesser von 0.0025 Millimeter, von der Hefe, die den Temperaturen von -87.5° und -113.75° ausgesetzt waren, betrug die Verkleinerung für den Längsdurchmesser 0.00233 Millimeter, und für den Querdurchmesser 0.00176 Millimeter.

Auch zeigten sich bei diesen gefroren gewesenen Hefeproben immer relativ mehr Zellen mit contrahirtem Protoplasma.

In gefrorenen, vacuolenfreien Hefezellen, auch wenn sie in 10 pCt. Zuckerlösung gebracht wurden, traten nicht immer wieder Vacuolen auf.

Ueber die Fähigkeit gefrorener und wieder aufgethauter Hefe zu sprossen, werde ich im nächsten Abschnitte sprechen, und bemerke hier nur noch, dass auch bei den tiefsten Temperaturen, die ich auf Hefe einwirken liess, nämlich -113.75° C.¹⁾ die fast immer in der Hefe befindlichen Bacterien nicht getödtet wurden.

¹⁾ Es ist dies meines Wissens die niedrigste Temperatur, die man bis jetzt auf Hefe einwirken liess.

Die Erscheinung des Zusammenfrierens der Hefe zu harten, eisigen Klumpen, und des beim Aufthauen sich einstellenden Breiigwerdens der Hefe scheint auf folgende Weise stattzufinden:

Die Zellen ziehen sich, wie oben zahlengemäss erwiesen wurde, in Folge der niederen Temperaturen zusammen. Gleichzeitig erfolgt eine Desorganisation des Protoplasmas sowohl als der Zellwand; beide verlieren ihre hohe Imbibitionsfähigkeit, die Zellwand auch ihren hohen Filtrationswiderstand.

Dass die Imbibitionsfähigkeit des Protoplasma und der Zellwand gefroren gewesener Hefezellen wirklich eine geringere geworden, geht wohl daraus hervor, dass die Zellen, welche in Folge der niederen Temperatur sich zusammengezogen hatten, beim Aufthauen in Wasser oder Zuckerlösung selbst nach Tagen und Wochen nicht mehr ihre normale Grösse annehmen.

Beim Aufthauen dehnt sich nun der Zellinhalt mehr als die Zellwand aus, in Folge welchen Umstandes ein Theil der Zellflüssigkeit durch die Membran hindurchtritt, und das Breiigwerden der im normalen Zustand teigigen Hefe bedingt.

Es ist auch nicht undenkbar, dass die molecularen Veränderungen, welche Protoplasma und Zellmembran erleiden, erst während des Aufthauens stattfinden.

Dass das Heraustreten der Zellflüssigkeit nicht etwa blos durch Volumenveränderung, unabhängig vom Gefrieren, hervorgebracht wird, geht daraus hervor, dass das Breiigwerden der Hefe nur eintritt, wenn die Hefe früher durch Eisbildung hart geworden war.

Versuche über die Fähigkeit gefroren gewesener Hefezellen zu sprossen und Gährung einzuleiten.

Wir haben also gesehen, dass die einzige morphologische, makroskopisch bemerkbare Veränderung, die die Presshefe durch Aussetzen von Temperaturen unter -5° C. erleidet, in einer Verflüssigung derselben beim Aufthauen besteht, und dass mikroskopisch eine Verkleinerung der Hefezellen und Verschwinden der Vacoulen nachweisbar ist, ebenso ein relativ zahlreicheres Vorhandensein von Zellen mit contrahirtem Protoplasma.

Ein Zerreißen der Membran der Hefezellen habe ich niemals beobachtet.

Cagniard-Latour und Melsens haben nachgewiesen, dass auch bei sehr niedriger Temperatur gefroren gewesene Hefe Gährung einzuleiten im Stande ist. — Da nun die Versuche von M. Manassein gelehrt haben, dass todte Hefe eine begrenzte Menge von Zucker in die Gährungsproducte umzuwandeln vermag, so ist durch die Versuche der beiden erstgenannten Forscher noch nicht bewiesen, dass die Hefe das Gefrieren lebend überdauert.

Man wird nur dann berechtigt sein, die Hefezellen als lebend anzusehen, wenn sie in Zuckerlösung, unter ihren gewöhnlichen Vegetationsbedingungen, sprosst.

Um die Sprossung einzuleiten, wurde die Hefe unter den oben genannten Vorsichten zum Ausschluss atmosphärischer Keime zum Gefrieren gebracht, unter den gleichen Vorsichten in eine 10procentige Zuckerlösung versenkt und unter Watteverschluss 24 Stunden stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Gefässe geöffnet und die Hefezellen mikroskopisch untersucht.

Es zeigte sich, dass die Mehrzahl der gefroren gewesenen Hefezellen sich gar nicht verändert hatte (d. h. seit der mikroskopischen Untersuchung, die mit den Hefezellen vorgenommen wurde, bevor sie in die Gährflüssigkeit gebracht wurde), während der Rest der Zellen sprosste und häufig sogar reich gegliederte Zellcolonien bildete.

Die einer Temperatur von -113.75° ausgesetzte Hefe verhielt sich anscheinend in Bezug auf Sprossbildung so wie die auf -87.5° abgekühlte.

Was nun die Bestimmung des Gährvermögens der gefroren gewesenen Hefe betrifft, so wurden, wie schon erwähnt, für frische Presshefe, die 73 Procent Wasser enthielt, stets zwei Gramm genommen. Da nicht alle Versuche zugleich gemacht werden konnten, mithin nicht immer mit der nämlichen Hefe, wenn auch immer mit Hefe aus der nämlichen Fabrik, experimentirt wurde, so wurde bei jeder neuen Versuchsreihe erst der Wassergehalt der anzuwendenden Hefe bestimmt und nach diesem die typischen zwei Gramm corrigirt.

Wurde trockene Presshefe auch in Betracht gezogen, so wurde, wie schon bemerkt, eine der Trockensubstanz der an-

gewandten frischen Hefemenge entsprechende Quantität genommen. Dadurch sollte mehr Gleichförmigkeit in die Versuche gebracht werden.

Da aber die Gährkraft der Presshefe nicht allein von ihrem Wassergehalt, sondern von vielen uns meist noch unbekannten Factoren abhängig ist, so lassen sich aus meinen weiter unten folgenden Versuchsreihen wohl allgemeine Schlüsse ziehen, genaue Vergleiche der Wirkung niederer Temperaturen auf Hefe betreffs des Gährungsvermögens sind dagegen nur zwischen Gliedern ein und derselben Reihe zulässig.

Die Gährungsintensität der auf verschiedene Temperaturen gebrachten Hefeproben wurde dann durch die Menge der entwickelten Kohlensäure bestimmt und zwar durch directe Wägung der mit den Gährapparaten in Verbindung gesetzten Kaliapparate.

Die angewandten Apparate waren alle folgendermassen zusammengestellt:

Ein etwa 200 Kubikcentimeter fassendes Kölbchen wurde mit einem doppelt durchbohrten Kautschukpfropf wohl verschlossen. Eine Bohrung diente zur Aufnahme des Choralciumrohres, so dass also nur trockene Kohlensäure in den durch einen Kautschukschlauch mit ihm verbundenen Kaliapparat gelangen konnte. Die letztere war seinerseits durch ein Choralciumrohr und einen Kolben mit Kalilauge vor atmosphärischer Feuchtigkeit und Kohlensäure isolirt.

In die zweite Bohrung wurde ein knieförmiges Röhrchen eingepasst, das während dem Versuche selbst geschlossen, vor jeder Wägung des Kaliapparates aber mit einer Choralciumröhre und einem Kolben mit Kalilauge im Verbindung gebracht wurde, um durch den am andern Ende des Apparates (am Kalikolben) angebrachten Aspirator nur trockene und kohlen säurefreie Luft durchziehen zu lassen.

Das Kölbchen diente zur Aufnahme der Gährflüssigkeit, und als letztere benützte ich in allen Versuchen 10 procentige Zuckerlösung.

Reine Krystalle von weissem Kandiszucker wurden zu diesem Zwecke in der Hälfte des zur 10procentigen Lösung nöthigen Wassers aufgelöst, die Lösung filtrirt und das Filter mit der andern Hälfte ausgewaschen; dann wurde die Lösung während zwei Stunden gekocht, die verdampfte Menge des Wassers

durch eine entsprechende Quantität siedenden destillirten Wassers ersetzt, und der Kolben mit bis auf 160° C. erhitztem Wattepfropf verschlossen.

Das Gährkölbchen selbst wurde vor dem Versuche stets durchgeglüht, bis zum Erkalten mit besagter Watte verschlossen, dann mit 75 Kubikcentimeter der 10procentigen Zuckerlösung versetzt, letztere für kurze Zeit zum Sieden gebracht, die Kölbchen wieder mit einem frischen Wattepfropf versehen, und nachdem die Flüssigkeit die Zimmertemperatur angenommen hatte, wurde die Hefe eingegeben.

Dies letztere geschah nun in der Weise, dass ich das direct aus der Kältemischung kommende und sorgfältig gereinigte, die Hefe enthaltende Reagensröhrchen durch den Wattepfropf durchsteckte, dann mit einer Zange die obere Hälfte abklemmte, so zwar, dass die untere Hälfte in die Gährflüssigkeit fiel.

Der Wattepfropf wurde schnell durch den obengenannten Kautschukpfropf ersetzt, die Verbindung des Gährkölbchens mit dem Kaliapparat hergestellt, und dann das Kölbchen sorgfältig geschwenkt, damit die Hefe aus dem Glasröhrchen durch die Flüssigkeit herausgespült würde.

Es gelang dies auch stets vollständig.

Alle 24 Stunden wurde dann auf der einen Seite der Aspirator angesetzt, auf der andern das Chlorecalciumrohr und der Kalikolben, etwa 10 Minuten aspirirt und dann wurden die Kaliapparate gewogen.

Ich bin mir wohl bewusst, dass ein absolut sicherer Abschluss der atmosphärischen Keime bei den mit diesen Apparaten vorgenommenen Gährungsversuchen nicht statt hatte. Um aber den etwaigen Einfluss eingedrungener atmosphärischer Keime auf die Gährflüssigkeit kennen zu lernen, benützte ich einen eben so adjustirten Apparat, der wohl mit Zuckerlösung, aber nicht mit Hefe versetzt, allen jenen Manipulationen, wie die eigentlichen Gährapparate, unterworfen wurde. Da sich nach Schluss der Gährversuche zeigte, dass in diesem Apparat keine wägbare Menge von Kohlensäure sich gebildet hatte, so war ich berechtigt anzunehmen, dass meine Gährversuche durch Eindringen atmosphärischer Keime nicht gestört wurden.

Um den Gang der Gährung besser zur Anschauung zu bringen, will ich hier einige Versuchsreihen folgen lassen.

Das theoretische Maximum für die Kohlensäuremenge, welche die zur Vergährung genommene Quantität Zucker (75 Kubikcentimeter 10procentiger Zuckerlösung = 6.81 Gramm Zucker) liefert, beträgt 3.5 Gramm.

Nach Tagen	Frische Presshefe bei + 16° C.	Frische Presshefe abge- kühlt auf - 5° C.	Frische Presshefe abge- kühlt auf - 24° C.
1	0.435 Gr.	0.105 Gr.	0.011 Gr.
2	0.749 „ ¹⁾	0.319 „	0.134 „
3	1.168 „	0.743 „	0.316 „
4	1.438 „	1.182 „	0.494 „
5	1.685 „	1.564 „	0.659 „
6	1.884 „	1.884 „	0.903 „
7	2.020 „	2.040 „	1.119 „
8	2.100 „	2.191 „	1.340 „
9	2.157 „	2.452 „	1.506 „
10	2.180 „	Keine weitere Gas- entwicklung.	1.719 „
11	2.205 „		1.867 „
12	2.328 „		1.882 „
13	2.343 „		2.009 „
14	2.353 „		2.104 „
15	2.358 „		2.190 „
16	2.365 „		2.250 „
17	2.365 „		2.304 „
18	Von nun ab war keine weitere Gasentwicklung bemerkbar.		2.355 „
19			2.392 „
20			2.407 „
21			2.423 „
22			2.438 „
23			2.449 „
24			2.457 „
25			2.461 „
26			2.464 „
27			Keine weitere Gas- entwicklung.

¹⁾ D. h. nach 2 Tagen war die Gesamtmenge der Kohlensäure, welche bei diesen Versuchen gebildet wurde, gleich 0.749 Gr.

Nach Tagen	Fr. Pressh. bei + 16° C.	Fr. Pressh. abgek. auf + 1° C.	Fr. Pressh. abgek. auf — 18° C.	Tr. Pressh. bei + 16° C.	Tr. Pressh. abg. auf — 18° C.
1	0·935 Gr.	0·988 Gr.	0·730 Gr.	0·350 Gr.	0·105 Gr.
2	1·810 "	1·998 "	1·485 "	1·112 "	1·135 "
3	2·780 "	2·985 "	2·498 "	2·397 "	2·415 "
4	3·105 "	3·300 "	3·000 "	3·019 "	3·037 "
5	3·520 "	3·470 "	3·247 "	3·227 "	3·272 "
6			3·360 "	3·295 "	3·362 "
7			3·495 "	3·355 "	3·442 "
8				3·404 "	3·491 "
9				3·413 "	
10				3·484 "	
11				3·502 "	

Nach Tagen	Fr. Pressh. bei + 16° C.	Fr. Pressh. abgek. auf — 87·5° C.	Fr. Pressh. abgek. auf — 113·75° C.	Tr. Pressh. bei + 16° C.	Tr. Pressh. abg. auf — 113·75° C.
1	0·558 Gr.	0·110 Gr.	0·099 Gr.	0·015 Gr.	0·081 Gr.
2	0·929 "	0·445 "	0·398 "	0·102 "	0·564 "
3	1·183 "	0·769 "	0·997 "	0·255 "	1·010 "
4	1·355 "	1·019 "	1·345 "	0·425 "	1·447 "
5	1·480 "	1·237 "	1·727 "	0·637 "	1·641 "
6	1·548 "	1·342 "	1·855 "	0·708 "	1·716 "
7	1·585 "	1·401 "	1·923 "	0·869 "	1·786 "
8	1·625 "	1·440 "	1·979 "	0·982 "	1·796 "
9	1·650 "	1·467 "	2·017 "	1·053 "	1·818 "
10	1·662 "	1·480 "	2·043 "	1·113 "	
11	1·671 "	1·488 "	2·056 "	1·147 "	
12	1·680 "	1·494 "	2·062 "	1·171 "	
13	1·689 "	1·498 "	2·069 "	1·185 "	
14	1·692 "	1·500 "	2·072 "	1·194 "	
15	1·696 "	1·503 "	2·075 "	1·197 "	
16	1·701 "	1·516 "	2·080 "	1·208 "	
17	1·706 "	1·529 "	2·090 "	1·213 "	
18	1·713 "	1·547 "	2·099 "	1·218 "	
19	1·730 "	1·563 "		1·222 "	
20	1·749 "	1·583 "		1·227 "	
21	1·757 "	1·599 "		1·233 "	
22	1·771 "	1·611 "		1·235 "	
23	1·789 "	1·632 "		1·236 "	
24	1·811 "	1·647 "			
25	1·857 "	1·653 "			

Nach Tagen	Fr. Pressh. bei + 16° C.	Fr. Pressh. abgek. auf — 87.5° C.	Fr. Pressh. abgek. auf — 113.75° C.	Tr. Pressh. bei + 16° C.	Tr. Pressh. abg. auf — 113.75° C.
26	1.883 Gr.	1.655 Gr.			
27		1.678	"		
28		1.696	"		
29		1.700	"		
30		1.718	"		

Aus diesen Tabellen geht auf das Bestimmteste hervor, dass die Gährkraft der frischen Presshefe durch das Gefrieren nicht vernichtet, sondern nur verringert wird, und dass die lufttrockene Hefe diese Einbusse an Gährvermögen nicht erleidet.

Nach dem Aufhören der Alkoholgährung liess sich in der Flüssigkeit stets noch Zucker nachweisen (durch das Trommer'sche Reagens), und bei der auf ihr Gährvermögen und auf ihre morphologischen Verhältnisse geprüften Hefe ergab sich, dass sie, in frische Gährflüssigkeit gebracht, die Fähigkeit Gährung einzuleiten verloren hatte.

Die Mehrzahl der Hefezellen war isolirt; nirgends zeigten sich mehr neu angelegte Sprossungen. Die Hefezellen hatten ihr normales Aussehen verloren, das Protoplasma war fast durchgehends vacuolenfrei, körnig und meist contrahirt. Neben der Alkoholhefe fanden sich fast immer Vibrionen und Bacterien.

Die Erscheinung der Gährverzögerung von Zuckerlösungen, welche mit gefroren gewesener frischer Presshefe versetzt wurden, kann folgendermassen ihre Erklärung finden: Ich habe schon früher bemerkt, dass bei den Hefeproben, die niederen Temperaturen ausgesetzt waren, fast immer viele collabirten Zellen mit contrahirtem Protoplasma zu finden waren. Durch das Gefrieren wurde also eine grosse Zahl der Hefezellen getödtet, denn alle Zellen mit von der Zellwand abgelöstem Protoplasma sind zweifellos todt¹⁾; nie gelingt es nämlich, dieselben zur Sprossung zu bringen, noch nehmen sie beim Liegen in Gährflüssigkeit das Aussehen normaler Hefezellen an.

Die jüngeren, mit kleinen Vacuolen versehenen oder noch vacuolenfreien Hefezellen bleiben hingegen sichtlich durch-

¹⁾ Wiesner, Mikrosk. Unters. I. c. p. 106.

gehends lebend und bilden den Ausgangspunkt für neue Generationen von Hefezellen.

Im Beginne der Gährung functioniren hauptsächlich die todtten Hefezellen, welche nur eine beschränkte und erwiesenermassen relativ geringe Zuckermenge zu vergähren vermögen; im Verlaufe der Gährung steigert sich die Menge lebender Hefezellen und es muss so eine Steigerung der Intensität in der Gährung eintreten.

Schliesslich holt die gefroren gewesene Hefe in ihrem Gährvermögen die frische Hefe ganz oder nahezu ein. In einzelnen Fällen vergährt merkwürdiger Weise die gefroren gewesene Hefe ein grösseres Zuckerquantum als die normale, was wohl nur so zu erklären sein dürfte, dass die relativ grössere Neubildung an Zellen eine verhältnissmässig stärkere Gährung zur Folge hat. (Vergleiche hierüber namentlich den Gährverlauf der einer Temperatur von -113.75° C. ausgesetzten frischen Presshefe, dritte Versuchsreihe.)

Interessant ist, dass auch die Versuche über den Einfluss sehr niederer Temperaturen auf Hefe dasselbe lehren, was die Versuche über den Einfluss sehr hoher Temperaturen und jene über rasche Zufuhr und Entziehung von Wasser uns zeigen: dass nämlich alle diese die Hefe im Ganzen schädigenden Einflüsse die älteren herangewachsenen Hefezellen viel rascher und intensiver angreifen als die jüngeren und unerwachsenen. Letztere widerstehen der Kältewirkung ganz oder zum grossen Theile und bilden den Ausgangspunkt für neue Hefegenerationen.

Aus vorstehenden Versuchen ergibt sich also Folgendes:

1. Die bis jetzt auf Hefe angewendeten niedrigen Temperaturen (bis -113.75° C.) haben eine vollständige Tödtung der Hefezellen nicht zu bewirken vermocht.
2. Das Gefrieren der Hefe vermindert die Gährkraft derselben.
3. Tiefer Kältegrade als -5° C. beeinträchtigen nur in geringem Grade das Gährvermögen der Hefe.

Ich bedaure, dass es mir nicht mehr vergönnt war, Temperaturen unter -113.75° C. auf Hefe einwirken zu lassen, wie dieses durch festes Stickstoffoxydul, das man mit Schwefelkohlenstoff betropft, hätte geschehen können.

Nachdem wir aber gesehen, von wie geringem Einfluss selbst eine Temperatur von -113.75°C. auf die frische Presshefe war, ja eine bei dieser Temperatur gefroren gewesene Hefe sich kaum anders als eine bei -5°C. gefroren gewesene Hefe verhielt, so ist von einer Temperatur von -140°C. wohl kaum eine Tödtung der Hefezellen zu erwarten und es dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach die untere Tödtungstemperatur der Hefe uns noch so lange unbekannt bleiben, als es der Wissenschaft nicht gelingt, Temperaturen zu erzielen, die diejenige von -140°C. noch bedeutend übertreffen.



