

Die Bildung von Killertoxin und die Beeinflussung der Gärung durch Apiculatus-Hefen

von

F. RADLER und CORNELIA KNOLL

Formation of killer toxin by apiculate yeasts and interference with fermentation

S u m m a r y : Several strains of the frequently occurring apiculate yeast (*Hanseniaspora uvarum*) form a killer toxin (a protein) which inhibits a sensitive wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). This toxin was partially concentrated by lyophilization and precipitation with ethanol. The toxin activity was determined with the agar diffusion method. The optimum of activity was observed at pH 4, but the killer toxin is also active at pH 3.5, the pH of grape must. The presence of apiculate killer yeasts slowed the fermentation of a sensitive wine yeast (*S. cerevisiae* 381). In mixed cultures of the killer strain *H. uvarum* 470 with *S. cerevisiae* the maximum inhibition of the latter was at 20 °C and at pH 3.5. Within 2 d about 95 % of the sensitive yeast cells were killed. Several days later the wine yeast resumed fermentation. The killer toxin delayed the normal fermentation by 10—20 d. Depending on the ratio of cell numbers between the sensitive wine yeast and the apiculate killer yeast, the fermentation was suppressed for up to 15 d. When the cell number of wine yeasts was less than 0.01 % of the killer yeast cells (*H. uvarum* 470) all sensitive cells were killed. Even at an inoculum of 10⁶ cells/ml of *S. cerevisiae* a delay in the normal fermentation was observed when the sensitive yeast was added 2 d after the apiculate killer strain. By adding bentonite at a concentration of 0.01 % the interference of killer toxin with fermentation was prevented. The delay of normal fermentation which was caused by killer strains of *H. uvarum* was not only observed in laboratory media but also in experiments with grape must.

K e y w o r d s : yeast, toxicity, fermentation, growth, acidity, temperature, bentonite.

Einleitung

Killerhefen, die nicht nur bei Hefen der Gattung *Saccharomyces*, sondern auch bei mehreren Gattungen von Wildhefen vorkommen, vermögen durch die Ausscheidung von Killertoxin andere Hefen abzutöten (STUMM *et al.* 1977; YOUNG 1987). Falls es bei Spontangärungen zunächst zur massiven Entwicklung von Killerhefen kommt, könnten die Weinhefen (*Saccharomyces*) abgetötet werden, die zu Beginn der Gärung häufig nur ein geringer Anteil der Spontanflora sind, so daß es zu Gärstörungen kommen kann.

Den größten Anteil der Spontanflora nehmen die „wilden“ Hefen der Gattungen *Hansenula*, *Candida* und *Hanseniaspora* ein (AMERINE und KUNKEE 1968). Angehörige der gärschwachen Gattung *Hanseniaspora* (Trivialname: Apiculatus-Hefen) können zu 90—99 % vertreten sein (DITTRICH 1977). Ihr Anteil schwankt je nach Weinbaugebiet und klimatischen Bedingungen. Bei der Spontangärung übernimmt *Hanseniaspora* die Angärphase, wird dann schnell von *Saccharomyces* überwachsen und ist nach der Gärung meist nicht mehr nachzuweisen. Über Gärstörungen, die auf einer verstärkten Entwicklung von *Hanseniaspora* während der Gärung beruhen, wurde von MÜLLER-THURGAU (1897) und SCHULLE (1953) berichtet. SCHANDERL (1959) vermutete, daß die beobachteten Fehlentwicklungen durch Stoffwechselprodukte von *Hanseniaspora* verursacht werden. Da inzwischen mehrere Killerhefen der Art *Hanseniaspora uvarum*

aus natürlichen Substraten isoliert wurden (RADLER *et al.* 1985 b), liegt die Vermutung nahe, daß Killertoxin produzierende Apiculatus-Hefen Ursache von Gärstörungen sein könnten.

Der Antagonismus zwischen Killerhefen der Art *Hanseniaspora uvarum* und sensitiven Hefen der Art *Saccharomyces cerevisiae* sollte im Gärverlauf quantitativ untersucht werden. Insbesondere sollte ermittelt werden, ob und unter welchen Bedingungen der normale Gärverlauf von *Saccharomyces* durch *Hanseniaspora* beeinträchtigt wird. Dazu wurden die Lebendkeimzahlen beider Stämme sowie Glucoseverbrauch, Ethanol- und CO₂-Produktion im Gärverlauf bestimmt. Die Gärstörung durch Killerhefen der Gattung *Hanseniaspora* sollte durch Zusatz von Bentonit verhindert werden, das die aus Proteinen bestehenden Killertoxine bindet. Die zunächst in einem Modellmedium durchgeführten Versuche sollen auf die Situation in Traubenmost übertragen werden.

Material und Methoden

1. Hefestämme

Die Hefestämme entstammen der Sammlung des Instituts sowie handelsüblichen Trockenhefepräparaten. Der Stamm *H. uvarum* 11-22 wurde uns von Prof. DITTRICH, Geisenheim, überlassen. Alle Stammkulturen wurden auf YEP-Schrägröhrchen bei 4 °C aufbewahrt.

2. Nährmedien

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Sterilisation 20 min bei 121 °C.

YEP-Medium: Glucose 2 %, Pepton 2 %, Hefeextrakt 1 %.

YEP-Agar: Glucose 2 %, Pepton 2 %, Hefeextrakt 1 %, Agar 1,2 %

Glycerin-Agar: Glycerin 2 %, Pepton 2 %, Hefeextrakt 1 %, Agar 1,2 %.

Lysin-Agar: entsprechend MORRIS und EDDY (1957). Die Lösung wurde kurz aufgekocht.

Methylenblau-Agar (MBA): Glucose 2 %, Pepton 2 %, Hefeextrakt 1 %, Citrat 1,92 %, Methylenblau 0,003 %, Agar 2 %. Der pH-Wert wurde mit K₂HPO₄ eingestellt.

B-Medium: Synthetisches B-Medium entsprechend PFEIFFER und RADLER (1982) mit einem Glucosegehalt von 20 %. Der pH-Wert wurde, falls nicht anders vermerkt, mit konzentrierter KOH auf pH 3,5 eingestellt. Die Sterilisation erfolgte 15–30 min (je nach Gefäßvolumen) bei 100 °C im strömenden Dampf.

Traubensaft: Traubensaft der Fa. Rabenhorst „Roter Rabenhorster“. Die Sterilisation erfolgte 10 min bei 100 °C im strömenden Dampf.

3. Bestimmung von Zellzahl und Zelldichte

Die Zellzahl wurde mit der Neubaur-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) und die Zelldichte durch Trübungs-messung bei 610 nm bestimmt.

4. Nachweis der Hefekilleraktivität

a) Mit dem Strichtest nach SOMERS und BEVAN (1969) auf MBA-Platten wird festgestellt, ob sich ein Hefestamm gegen das Toxin einer Killerhefe sensitiv oder resistent verhält. Der zu prüfende Hefestamm wurde in 5 ml YEP-Medium 20–22 h auf der Schüttelmaschine bei 25 °C vorkultiviert. Mit sterilem Aqua dest. wurde eine Zellzahl von 10⁶/ml eingestellt. Je 0,1 ml dieser Suspension wurden auf 2 MBA-Platten mit den

pH-Werten 4,0 und 4,5 ausgespatelt. Nach kurzem Antrocknen wurde die Killerhefe mit einer Impföse strichförmig aufgetragen. Bildete sich nach 4 d Bebrütungszeit bei 20 °C um die Killerhefe eine blaue Abtötungszone oder eine Hemmzone, so verhielt sich die zu prüfende Hefe sensitiv. Blieben Blaufärbung oder Hemmzone aus, war die zu prüfende Hefe resistent.

b) Der Agardiffusionstest nach WOODS und BEVAN (1968) dient zur quantitativen Bestimmung der Toxinaktivität. Die sensitive Hefe wurde wie beim Strichtest auf MBA-Platten (15 ml) ausgespatelt. Mit einem sterilen Korkbohrer (Ø10 mm) wurden Löcher in den Agar gestanzt, in die jeweils 0,1 ml des zu untersuchenden Toxinpräparates einpipettiert wurde. Nach 4 d Bebrütungszeit bei 20 °C wurden die toxinbedingten Wachstumshemmzonen ausgemessen.

5. Killertoxinproduktion von *Hanseniaspora uvarum* in Flüssigmedium

Die Killerhefe wurde von YEP-Schrägröhrchen in 5 ml B-Medium überführt und 18 h bei 25 °C auf einer Schüttelmaschine bebrütet. Das Inokulum wurde so gewählt, daß in der Hauptkultur (250 oder 500 ml) 3×10^6 Zellen/ml vorlagen. Wenn nicht anders vermerkt, wurde das Hauptkulturgefäß (500 oder 1000 ml Erlenmeyerkolben) mit einem Wattestopfen verschlossen. Nach 3tägiger Bebrütung bei 20 °C auf der Schüttelmaschine (90 U/min) wurden die Zellen bei 4 °C abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde im Agardiffusionstest auf Killertoxinaktivität geprüft.

6. Anreicherung von Killertoxin

a) Lyophilisation: Der killertoxinhaltige Kulturüberstand (250 ml) wurde gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 50 ml sterilem McIlvaine-Puffer (0,01 M) aufgenommen und im Agardiffusionstest auf Toxinaktivität geprüft.

b) Ethanol-fällung: Der toxinhaltige Kulturüberstand (500 ml) wurde über eine PSU-Membran (0,45 µm Porengröße) der Fa. Seitz in Stickstoffatmosphäre (2 bar) steriltriftriert. Dann wurde dem Kulturfiltrat unter langsamem Rühren solange eiskaltes Ethanol (-20 °C) zugegeben (30 ml/min), bis eine Ethanolkonzentration von 40 % erreicht war. Die Lösung wurde noch 2 h langsam gerührt und bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der weiße Niederschlag wurde in möglichst wenig sterilem McIlvaine-Puffer (0,01 M) gelöst. Der 40%igen Ethanol-lösung wurde wie zuvor beschrieben Ethanol zugefügt, bis eine 70%ige Lösung vorlag. Nach 1 h langsamem Rühren wurde das Präzipitat (40—70 %) in Puffer gelöst.

7. Gärversuche und Untersuchung des Gärverlaufs

Die Hefestämme wurden von YEP-Schrägröhrchen in 5 ml Medium übertragen. Jede Vorkultur wurde auf der Schüttelmaschine bei 25 °C inkubiert (16—20 h). Die Zellzahl wurde bestimmt und mit sterilem Aqua dest. eingestellt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde das Inokulum für Stämme von *Hanseniaspora* so gewählt, daß 3×10^6 Zellen/ml und für Stämme von *Saccharomyces* 3×10^4 Zellen/ml in der Hauptkultur vorlagen. Diese Konzentrationen wurden sowohl bei Misch- als auch bei Reinkulturgärungen eingesetzt. Die Gärungen wurden in Erlenmeyerkolben mit Gäraufsatz bei 20 °C auf einer Schüttelmaschine (90 U/min) durchgeführt.

Der Gärverlauf wurde anhand der CO₂-Produktion durch Wägung der Gäransätze und Errechnung der Gäraktivitäten verfolgt. Während der Gärung wurden Proben zu je 2 ml entnommen. 0,5 ml der Probe diente zur Bestimmung von Gesamtzellzahl und Koloniezahl (KBE). Bei Mischkultur wurde die Koloniezahl durch Ausspateln auf YEP-Agar und Selektivnährböden (Lysin- und Glycerin-Agar) bestimmt. Bei Reinkul-

turen genügte Ausspateln auf YEP-Platten. Der Rest der Probe wurde zentrifugiert. Der Überstand diente zur Analyse des Glucose- und Ethanolgehaltes nach SOMOGYI (1952) bzw. BERNT und GUTMANN (1974).

Ergebnisse

1. Killerstämme von Apiculatus-Hefen (*Hanseniaspora uvarum*) wirken auf sensitive Weinhefen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Aus natürlichen Substraten isolierte Apiculatus-Hefen (RADLER *et al.* 1985 b) wurden in ihrer Wirkung gegen Weinhefen (*S. cerevisiae*) untersucht, indem drei Killerstämme der Art *H. uvarum* gegen verschiedene Weinhefen auf Sensitivität bzw. Resistenz getestet wurden. Dazu wurden Weinhefen, für die sensitives Verhalten gegen zwei *Saccharomyces*-Killerstämme bekannt war, sowie Stämme aus Trockenhefepräparaten im Strichtest nach SOMERS und BEVAN (1969) geprüft. Die Weinhefe 381 war gegen die Killerstämme von *H. uvarum* 470, 471 und 472 sensitiv. Die andern *Saccharomyces*-Stämme waren gegen die *Hanseniaspora*-Stämme resistent.

2. Apiculatus-Hefen bilden Killertoxin unter Gärbedingungen

Um die Beeinflussung eines sensitiven *Saccharomyces*-Stammes während der alkoholischen Gärung durch das Killertoxin von *Hanseniaspora* nachzuweisen, war zu prüfen, ob die *Hanseniaspora*-Stämme unter Gärbedingungen Killertoxin produzieren. Produktion und Stabilität von Killertoxin sind abhängig von der Mediumzusammensetzung und dem pH-Wert. Als Gärmedium für die folgenden Versuche wurde synthetisches B-Medium nach PFEIFFER und RADLER (1982) verwendet, mit einem Zusatz von 20 % Glucose und einem pH-Wert von 3,5. Um den Einfluß von Sauerstoff auf die Bildung von Killertoxin durch *Hanseniaspora* zu untersuchen, wurden die Kulturen mit Gäraufsatz oder Wattestopfen versehen und entweder geschüttelt (90 U/min) oder nur langsam gerührt. Nach 3 d Bebrütung wurden die Kulturlösungen zentrifugiert und der Überstand auf Toxinaktivität im Agardiffusionstest (pH 4,5) geprüft. Für die beiden Stämme *H. uvarum* 470 und 472 wurde unter den variierten Gärbedingungen eine Toxinproduktion durch blaue Abtötungszonen von 4—5 mm nachgewiesen. Da aber keine Wachstumshemmzonen auftraten, war ein quantitativer Vergleich nicht möglich.

Zur genaueren Analyse wurden die Kulturlösungen durch Lyophilisation konzentriert. Im Agardiffusionstest (pH 4,5) bewirkten die 5fach angereicherten Konzentrate Wachstumshemmzonen, womit ein quantitativer Vergleich möglich war. Weder Sauerstoffzutritt bei Verwendung von Wattestopfen noch Schütteln der Gärkulturen zeigten einen signifikanten Einfluß auf die Aktivität des *Hanseniaspora*-Killertoxins. Es wurden Hemmzonen von 7,5 bis 9,0 mm für das Killertoxin aus *H. uvarum* 470 und von 4,5 bis 5,5 mm für das Killertoxin aus *H. uvarum* 472 gemessen.

3. Anreicherung von Killertoxin

Zur Anreicherung von Killertoxin wurde der Kulturüberstand (500 ml) einer 3 d alten Kultur (B-Medium) von *H. uvarum* 470 sterilfiltriert. Das Filtrat enthielt 3,5 mg Protein und bewirkte im Aktivitätstest lediglich blaue Abtötungszonen. Nach Ethanolzugabe bis zu einer 40%igen Sättigung wurde 0,5 ml Konzentrat (10³fache Konzentrierung) erhalten. Die Killertoxinaktivität dieses Konzentrats wurde nach Verdünnung

mit McIlvaine-Puffer (0,01 M) mit dem Agardiffusionstest (pH 4,5) gemessen. Zwischen Hemmzondurchmesser und Logarithmus der Toxinkonzentration besteht ebenso wie für Toxine von *Saccharomyces* (WOODS und BEVAN 1968; PFEIFFER und RADLER 1982) eine lineare Beziehung. Das unverdünnte Toxinkonzentrat (0,01 ml) ergab einen Hemmzondurchmesser von 14,5 mm, dem willkürlich 10^2 Einheiten zugeordnet wurden. Eine Eichgerade zeigt Abb. 1.

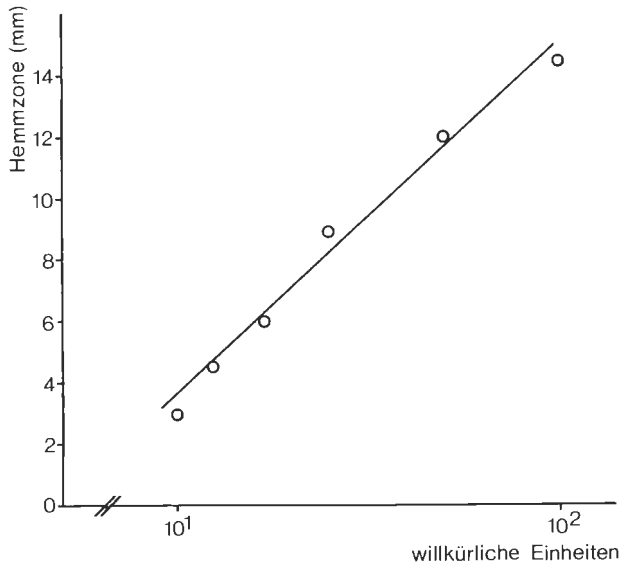


Abb. 1: Eichdiagramm für die Killertoxinaktivität von *Hanseniaspora uvarum* 470.

Calibration curve for the activity of the killer toxin of *H. uvarum* 470.

4. Einfluß des pH-Wertes auf die Killertoxinaktivität von Apiculatus-Hefen

Um den Einfluß des pH-Wertes auf die Killertoxinaktivität von *Hanseniaspora* in Festmedium zu untersuchen, wurden lyophilisierte Toxinkonzentrate im Agardiffusionstest bei pH-Werten im Bereich von pH 3,3 bis 5,1 geprüft. Die Killertoxine von *H. uvarum* 470 und 471 haben ein pH-Optimum von pH 4,5, während das Optimum für das Killertoxin von Stamm 472 bei pH 4,3 liegt. Das Killertoxin von Stamm 470 zeigte mit 240 Einheiten/ml im Vergleich zu Stamm 471 (130 Einheiten/ml) und Stamm 472 (190 Einheiten/ml) die stärkste Aktivität. Die Toxine von Stamm 470 und 472 bewirkten Hemmzonen in einem weiten Bereich von pH 3,5 bis 5,1, das Toxin von Stamm 471 lediglich von pH 4,3 bis 4,7 (Abb. 2).

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Killertoxinaktivität von *H. uvarum* 470 wurde in Flüssigmedium untersucht, indem je 3×10^4 Zellen/ml des sensitiven Stammes 381 unter Zugabe von 0,1 bzw. 0,5 ml Toxin (240 Einheiten/ml) in 5 ml B-Medium inokuliert wurden, das auf pH 3,5, 4,0, 4,5 oder 5,0 eingestellt worden war. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Killertoxinzugabe. Alle Ansätze wurden auf der Schüttelmaschine (90 U/min) bei 20 °C inkubiert, und das Wachstum der Hefe wurde durch Trübungsmessung bei 610 nm verfolgt. Ein Teil der Ergebnisse ist in Abb. 3 dargestellt.

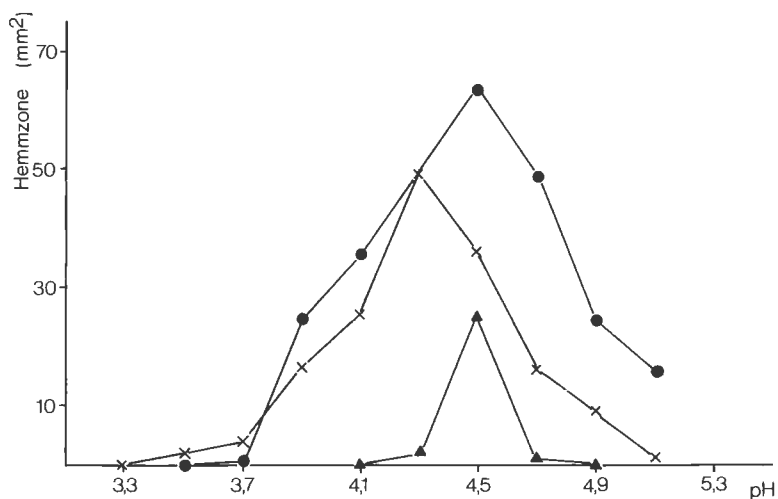


Abb. 2: Einfluß des pH-Wertes des Testmediums auf die Aktivität der Killertoxine von *Hanseniaspora uvarum* (● 470, ▲ 471, × 472) gegen *Saccharomyces cerevisiae* 381.

Influence of the pH value of the medium on the activity of the killer toxins of different strains of *H. uvarum* against *S. cerevisiae*.

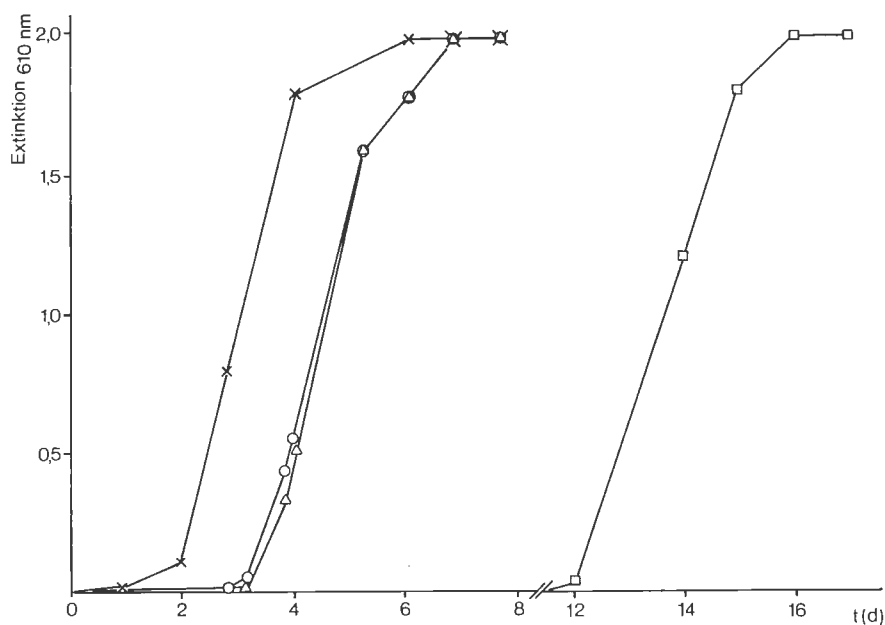


Abb. 3: Beeinflussung des Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae* 381 durch Killertoxin von *Hanseniaspora uvarum* 470 bei verschiedenen pH-Werten in Flüssigmedium. Einsaat 30 000 Zellen/ml; 24 Einheiten Killertoxin; B-Medium; 20 °C. — Δ pH 3,5, □ pH 4,0, ○ pH 4,5, × pH 5,0.

The effect of the killer toxin of *H. uvarum* on the growth of *S. cerevisiae* in liquid media of different pH values. Inoculum 30 000 cells/ml; 24 units killer toxin; B-medium; 20 °C.

Das Wachstum der sensitiven Weinhefe verlief in den Kontrollansätzen unabhängig vom pH-Wert. Nach 2tägiger Lag-Phase begann die exponentielle Phase, und nach 5 d trat die Kultur in die stationäre Phase ein. Eine Zugabe von 0,1 ml Killertoxinkonzentrat hatte bei pH 5,0 keinen Einfluß auf den Wachstumsverlauf, während die gleiche Menge bei den übrigen pH-Werten deutliche Effekte hervorrief. Das Killertoxin hemmte das Wachstum von Stamm 381 bei pH 3,5 und 4,5 gleichermaßen 3 d und bei pH 4,0 12 d lang, bevor der normale Wachstumsverlauf mit 3tägiger logarithmischer Phase eintrat. Das *Hanseniaspora*-Toxin bewirkt demnach eine Verlängerung der Lag-Phase. Bei pH 4 war die Wirkung des Killertoxins besonders deutlich (Abb. 3).

Eine Killertoxinzugabe von 0,5 ml Konzentrat bewirkte bei pH 5,0 eine verlängerte Lag-Phase von 3 d, bei 3,5, 4,0 und 4,5 konnte kein Wachstum mehr verzeichnet werden. Bei Lebendkeimzahlbestimmung der drei Ansätze nach 8 d Versuchsdauer konnten keine koloniebildenden Einheiten festgestellt werden.

Die Killertoxinkonzentration von 120 Einheiten im Ansatz genügte offensichtlich, um die eingesetzten sensitiven Zellen ($1,5 \times 10^8$) abzutöten. Bei dieser Toxinkonzentration konnte auch bei pH 5,0 eine Hemmwirkung nachgewiesen werden.

5. Einfluß des pH-Wertes auf die Killertoxinaktivität von Apiculatus-Hefen in Mischkultur mit einer Weinhefe

Konzentrate von Killertoxin aus *Hanseniaspora*-Stämmen hatten sich gegen eine Weinhefe als wirksam erwiesen. Es war nun zu klären, welchen Einfluß der pH-Wert auf die Toxinwirkung hat, wenn nicht das isolierte Toxin, sondern der toxinproduzierende Stamm in Mischkultur mit dem sensitiven Stamm eingesetzt wird.

Um den Einfluß des pH-Wertes auf die Killertoxinaktivität von *H. uvarum* 470 in Mischkultur zu untersuchen, wurden jeweils 100 ml B-Medium (Schliffkolben mit Gäraufsatz) mit pH-Werten von 3,5, 4,0, 4,5 oder 5,0 mit je $2-6 \times 10^8$ logarithmisch wachsenden Zellen des Killerstammes angeimpft. Das Inokulum des sensitiven *S. cerevisiae* 381 betrug 0,1—0,2 % der Killerzellzahl. Die Ansätze wurden bei 20 °C auf der Schüttelmaschine (90 U/min) inkubiert. Die Killertoxinwirkung und deren Beeinflussung durch den pH-Wert wurde durch tägliche Bestimmung der Koloniezahlen (KBE) beider Stämme während der Versuchsdauer verfolgt.

Vorversuche zur Bestimmung der Koloniezahl der beiden Hefen in Mischkultur hatten ergeben, daß sie auf YEP-Platten (pH 6,5) deutlich unterschiedliche Kolonieförmigkeiten zeigen. Dieser Unterschied war ausreichend, wenn beide Stämme in ungefähr gleicher Anzahl vorlagen. Differierte die Zellzahl um mehr als 10^1-10^2 , wurden als Selektivnährböden Lysin-Agar für *Hanseniaspora* und Glycerin-Agar für *Saccharomyces* verwendet.

Die Koloniezahl von *H. uvarum* 470 stieg, unabhängig vom pH-Wert, in der Mischkultur nach 1 d auf durchschnittlich 10^8 Zellen/ml und blieb bis zum Abbruch der Versuche konstant. Eine Killertoxinwirkung auf die sensitive Weinhefe konnte bei pH 3,5 und 4,0 festgestellt werden (Abb. 4). Bei pH 4,0 wurde die Vermehrung der sensitiven Zellen 3 d lang gehemmt, die Koloniezahlen (KBE) änderten sich kaum. Dann setzte Zellteilung ein, und die Zahl der KBE nahm bis Versuchsabbruch zu. Bei pH 3,5 bewirkte das Toxin sogar eine Abtötung der inokulierten sensitiven Zellen. Die Zahl der KBE von Stamm 381 fiel innerhalb von 5 d um 81 % von $2,5 \times 10^3$ auf $4,7 \times 10^2$ Zellen/ml. Dann setzte auch hier logarithmisches Wachstum ein. Bei pH 4,5 und 5,0 konnte keine Hemmung oder Abtötung der inokulierten sensitiven Zellen in Mischkultur mit der Weinhefe festgestellt werden. Die größte Wirkung der Killertoxinaktivität der Apiculatus-Hefe auf die sensitive Weinhefe 381 in Mischkultur wurde somit bei pH 3,5 beobachtet.

6. Einfluß der Temperatur

Wie im vorangegangenen Versuch wurden der Killerstamm *H. uvarum* 470 und die sensitive Weinhefe in B-Medium (pH 3,5) inokuliert, bei 20, 25 oder 30 °C inkubiert und die Koloniezahlen beider Hefestämme bestimmt.

Es zeigte sich, daß eine Toxinwirkung in Mischkultur in dem Temperaturbereich von 20 — 30 °C nachweisbar war. Die Toxinwirkung beruhte auf einer unterschiedlich starken Abtötung der sensitiven Zellen bei den verschiedenen Temperaturen. Bei 30 °C sank die Anzahl der KBE innerhalb von 3 d um 47 % von $3,4 \times 10^3$ auf $1,8 \times 10^3$ Zellen/ml, bei 25 °C wurde sie innerhalb von 4 d um 41 % von $3,4 \times 10^3$ auf $2,3 \times 10^3$ Zellen/ml dezimiert, und bei 20 °C nahm die Anzahl der KBE innerhalb von 5 d um 81 % ab. Nach den angegebenen Zeiträumen setzte in allen Ansätzen logarithmisches Wachstum des sensitiven Stammes ein (Abb. 5).

Die stärkste Hemmwirkung der Apiculatus-Hefe auf die Weinhefe in Mischkultur liegt somit im untersuchten Temperaturbereich bei 20 °C.

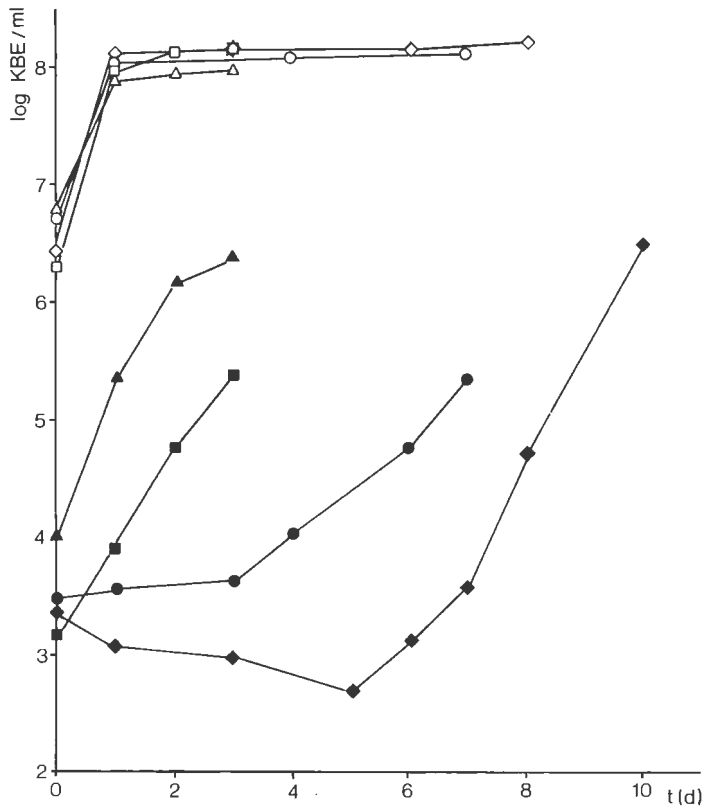


Abb. 4: Killertoxinwirkung von *Hanseniaspora uvarum* 470 auf *Saccharomyces cerevisiae* 381 in Mischkultur bei verschiedenen pH-Werten. Koloniebildende Einheiten (KBE/ml) von *H. uvarum* (konturierte Symbole) und *S. cerevisiae* (ausgefüllte Symbole); B-Medium; 20 °C. — ◇/◆ pH 3,5, ○/● pH 4,0, □/■ pH 4,5, △/▲ pH 5,0.

The effect of the killer toxin of *H. uvarum* 470 on *S. cerevisiae* 381 when jointly cultivated at different pH values. Colony forming units of *H. uvarum*: open symbols, and *S. cerevisiae*: black symbols; B-medium; 20 °C.

7. Antagonismus zwischen einer Apiculatus-Hefe und einer Weinhefe während der alkoholischen Gärung

In den vorangegangenen Versuchen konnten Produktion und Abtötungswirkung des *Hanseniaspora*-Killertoxins unter Gärbedingungen in B-Medium nachgewiesen werden. Das ließ auf einen negativen Einfluß der *Hanseniaspora*-Killerstämme auf sensitive Hefen während der alkoholischen Gärung schließen. Im folgenden sollte im Gärverlauf der Antagonismus zwischen *H. uvarum* 470 und der sensitiven Weinhefe *S. cerevisiae* 381 untersucht werden.

Um zu beurteilen, ob noch andere Faktoren als das Killertoxin die Gärung des sensitiven Stammes beeinflussen können, wurden Kontrollgärungen mit *H. uvarum* 11-22 durchgeführt. Dieser Stamm war im Strichtest gegen die *Hanseniaspora*-Stämme 470, 471 und 472 neutral und demnach als Kontrolle geeignet. Es wurden Reinkulturgärungen mit Mischkulturgärungen mit der neutralen und einer

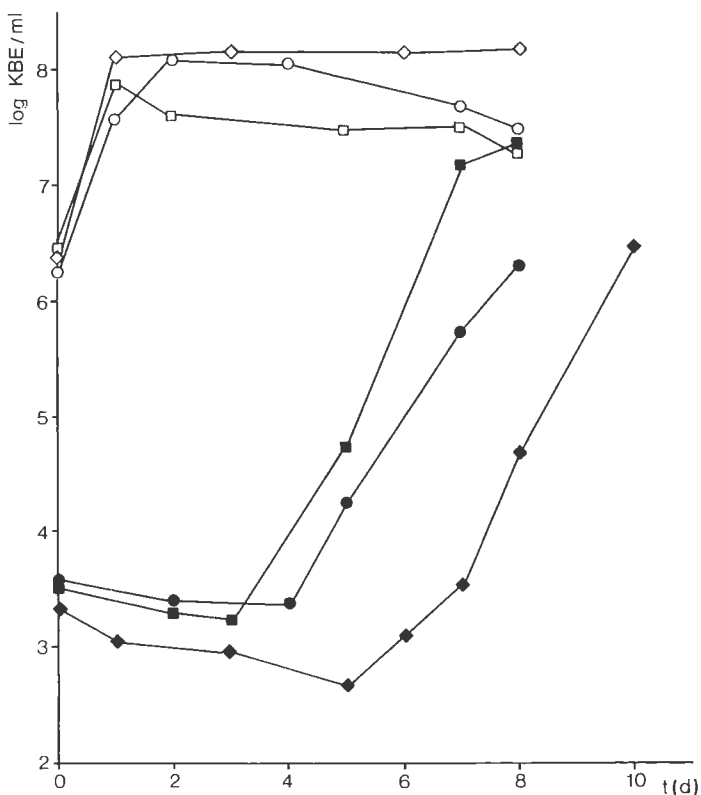


Abb. 5: Killertoxinwirkung von *Hanseniaspora uvarum* 470 auf *Saccharomyces cerevisiae* 381 in Mischkultur bei verschiedenen Temperaturen. Koloniebildende Einheiten (KBE/ml) von *H. uvarum* (konturierte Symbole) und *S. cerevisiae* (ausgefüllte Symbole); B-Medium, pH 3,5. — ◇/◆ 20 °C, ○/● 25 °C, □/■ 30 °C.

The effect of killer toxin of *H. uvarum* 470 on *S. cerevisiae* 381 when jointly cultivated at different temperatures. Colony forming units of *H. uvarum*: open symbols, and *S. cerevisiae*: black symbols; B-medium, pH 3.5.

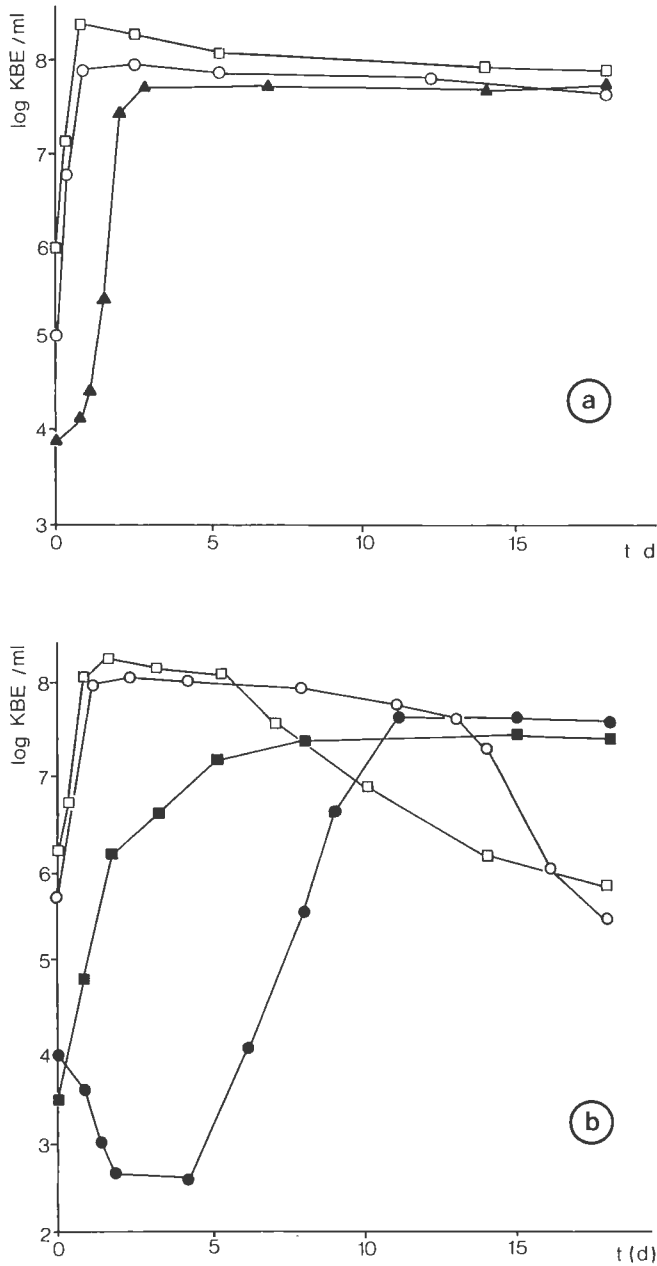


Abb. 6: Wachstumsverlauf während Rein- und Mischkulturgärungen von *Saccharomyces cerevisiae* 381 (sensitiv) und *Hanseniaspora uvarum* 470 (Killer) und 11-22 (neutral). Koloniezahlen (KBE/ml) der Stämme 470 und 11-22 (konturierte Symbole) und von 381 (ausgefüllte Symbole); B-Medium, pH 3,5; 20 °C. — a) Reinkulturgärungen der Stämme 381 (▲), 470 (○) und 11-22 (□). b) Mischkulturgärungen der Stämme 470 + 381 (○ + ●) und 11-22 + 381 (□ + ■).

Killer-Apiculatus-Hefe mit einer Weinhefe verglichen. Den Verhältnissen bei Spontangärungen entsprechend betrug die Zellzahl der Weinhefe 2 % der Gesamtzellzahl im Mischansatz mit *H. uvarum*.

In den Reinkulturansätzen von *H. uvarum* 470 und 11-22 setzte sofort logarithmisches Wachstum mit Generationszeiten von 2,2 bzw. 2,1 h ein, während die Weinhefe erst nach 1,5 d eine Generationszeit von 2,3 h erreichte. Die stationäre Phase wurde von den *Hanseniaspora*-Stämmen nach 1 d und von *S. cerevisiae* nach 3 d erreicht (Abb. 6 a). In der Mischkulturgärung konnte innerhalb von 2 d eine deutliche Abtötung der sensitiven Weinhefe (deren Anteil bei der Einsaat 2 % betrug) um 95 % der Ausgangszellzahl beobachtet werden (Abb. 6 b). Nach 4 d Kulturdauer begann logarithmisches Wachstum der Weinhefe mit einer Generationszeit von 6,8 h, das nach 11 d mit dem Erreichen der stationären Phase beendet war. Bis zu diesem Zeitpunkt verlief das Wachstum von *H. uvarum* wie in der Reinkulturgärung. Nachdem die Weinhefe zur Entwicklung kam, nahm die Anzahl der KBE von *H. uvarum* nach dem 13. d deutlich ab.

In der Mischkulturgärung der neutralen Apiculatus-Hefe 11-22 mit der Weinhefe (Anteil 0,2 %) wurde diese nicht abgetötet, sondern vermehrte sich sofort mit einer Generationszeit von 5 h. Nach 2 d verlängerte sich die Generationszeit auf 20 h, und die stationäre Phase wurde nach 6 d erreicht (Abb. 6 b). Das Wachstum von *H. uvarum* 11-22 verlief bis zum 5. d wie in der Reinkulturgärung, dann starben die Zellen ab. Am 18. d war die Anzahl der KBE um 99,7 % vermindert.

Demnach wirkt das Killertoxin von *Hanseniaspora* einige Zeit abtötend auf sensitive Zellen von *S. cerevisiae*.

In den Reinkulturgärungen von *H. uvarum* 470 und 11-22 verlief der Glucoseabbau ähnlich. Da beide Stämme der gärschwachen Gattung *Hanseniaspora* angehören, waren die Gärungen nach 5 d mit einem Restzuckergehalt von 15 % weitgehend abgeschlossen. Die Weinhefe verringerte hingegen den Glucosegehalt innerhalb von 5 d bereits auf 4 %, und nach 8 d war kein Restzucker mehr nachweisbar. In der Mischkultur des Killerstammes 470 mit dem sensitiven Stamm 381 erfolgte der Glucoseabbau bis zum 7. d offensichtlich nur durch den Killerstamm, da der Abbau der Reinkulturgärung von *H. uvarum* entsprach. Die Restglucose (14,4 %) wurde dann innerhalb von 11 d vollständig vergoren, wahrscheinlich von dem inzwischen herangewachsenen *Saccharomyces*-Stamm. In der Gärung der neutralen Apiculatus-Hefe mit der Weinhefe entsprach der Glucoseabbau keiner der beiden Reinkulturgärungen. Die Glucose wurde innerhalb von 17 d vollständig metabolisiert (Abb. 7 a). Die Ethanolproduktion verlief bei den Gärversuchen parallel zum Glucoseabbau (Abb. 7 b).

Wie Abb. 8 zeigt, kann die Hemmung der Gärung durch die Apiculatus-Killerhefe auch an der CO₂-Produktion verfolgt werden. In der Reinkulturgärung der Weinhefe begann die CO₂-Produktion nach 1,5 d und stieg dann stetig bis zum 13. d auf 81 mg/ml. Die höchste Gäraktivität wurde am 3. d mit 0,65 mg CO₂/ml h verzeichnet. In den Reinkulturgärungen der gärschwachen *Hanseniaspora*-Stämme war die Gäraktivität am 2. d mit 0,3 bzw. 0,42 mg CO₂/ml h am höchsten, dann fiel sie sofort rasch ab. In der Mischkulturgärung des Killerstammes von *H. uvarum* mit der Weinhefe verliefen CO₂-Produktion und Gäraktivität bis zum 11. d nahezu identisch wie in der Reinkultur des Killerstammes. Dann stieg die Gäraktivität bis zum 14. d erneut auf 0,21 mg/ml h an und verringerte sich danach langsam auf 0,04 mg/ml h. Entsprechend erhöhte sich

Growth of *S. cerevisiae* 381 (sensitive) and *H. uvarum* strain 470 (killer) and strain 11-22 (neutral) in pure or joint cultures. Colony forming units of strains 470 and 11-22 (open symbols) and strain 381 (black symbols); B-medium, pH 3.5; 20 °C. — a) Pure cultures of strains 381 ▲, 470 ○ and 11-22 □. b) Joint cultures of strains 470 + 381 (○ + ●) and 11-22 + 381 (□ + ■).

die CO_2 -Bildung ab dem 11. d von 26,9 auf 82,6 mg/ml h. Die Gäraktivität der sensitiven Weinhefe wurde offensichtlich bis zum 11. d vollständig durch den Killerstamm von *H. uvarum* unterdrückt. Die danach einsetzende Gärtätigkeit kann auf die dann nicht mehr gehemmte Weinhefe zurückgeführt werden. In der Mischkultur der neutralen Apiculatus-Hefe und der Weinhefe verlief die CO_2 -Produktion wesentlich rascher als in der Reinkultur des *Hanseniaspora*-Stammes, aber im Vergleich zur Reinkultur von *Saccharomyces* deutlich verzögert. Vom 3. d an wurden mit nahezu konstanter Gäraktivität von durchschnittlich 0,15 mg CO_2 /ml h bis zum 20. d 81,3 mg/ml CO_2 gebildet.

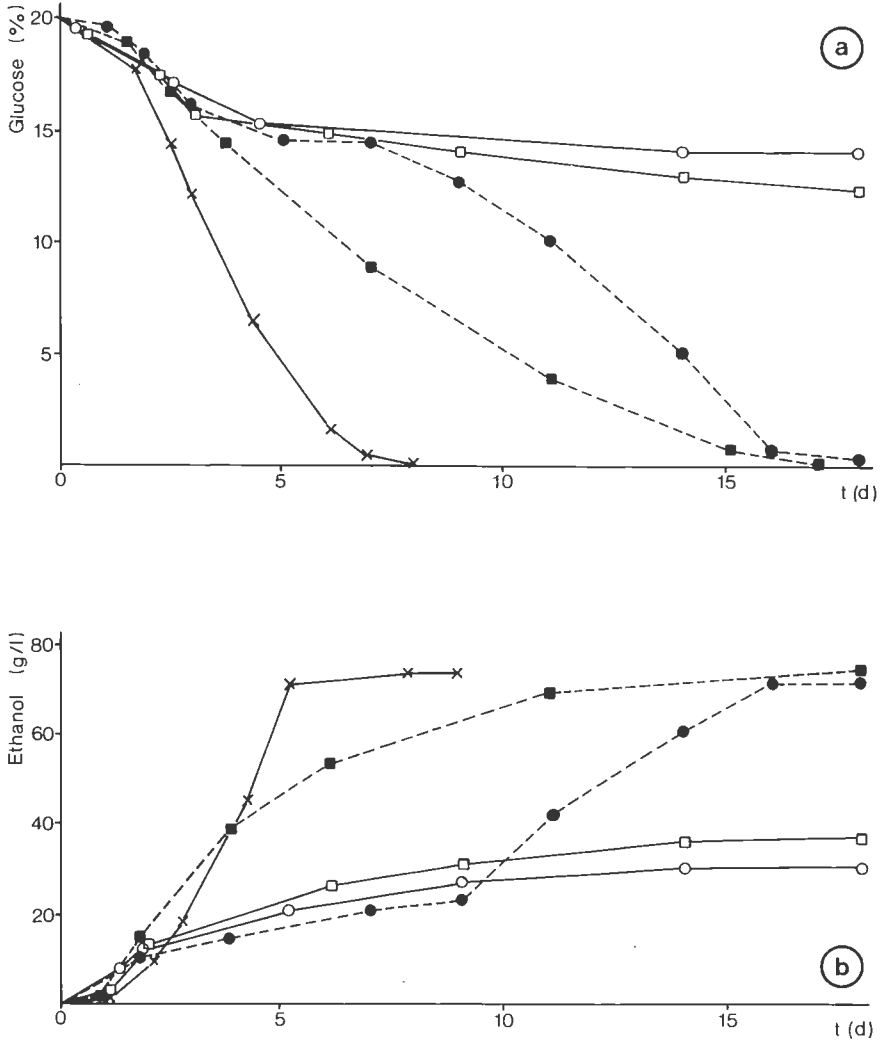


Abb. 7: Glucoseabbau (a) und Ethanolproduktion (b) während Rein- und Mischkulturvergärungen von *Saccharomyces cerevisiae* 381 (sensitiv) und *Hanseniaspora uvarum* 470 (Killer) und Stamm 11-22 (neutral). B-Medium, pH 3,5; 20 °C. — × 381, ○ 470, □ 11-22, ● 470 + 381, ■ 11-22 + 381.

Fermentation of glucose (a) and formation of ethanol (b) by pure cultures and joint cultures of *S. cerevisiae* 381 (sensitive) and *H. uvarum* 470 (killer) or 11-22 (neutral). B-medium, pH 3.5; 20 °C.

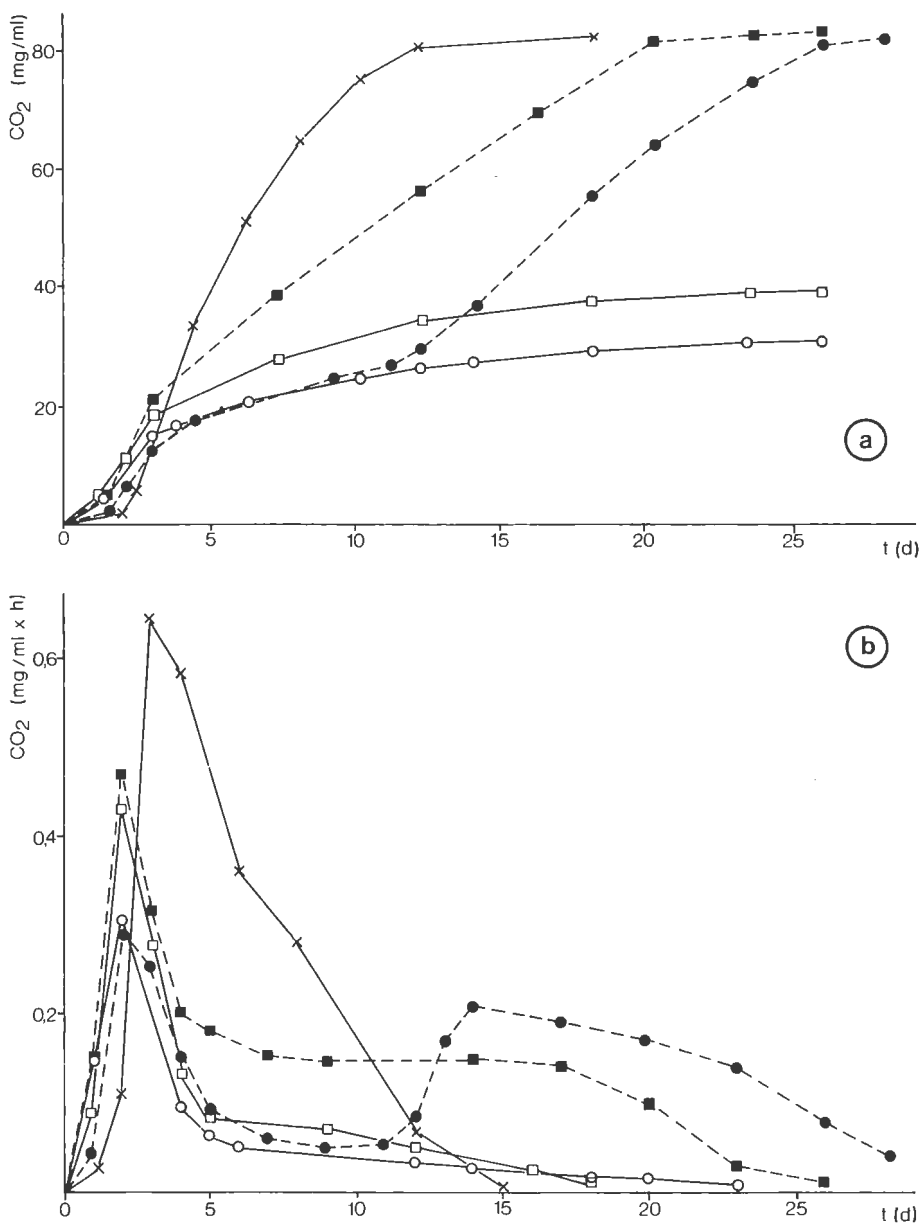


Abb. 8: CO₂-Produktion (a) und Gäraktivität (b) während Rein- und Mischkulturgärungen von *Saccharomyces cerevisiae* 381 (sensitiv) und *Hanseniaspora uvarum* 470 (Killer) und 11-22 (neutral). B-Medium, pH 3,5; 20 °C. Einsaat je ml: 3×10^6 Zellen bei *Hanseniaspora*, 3×10^4 Zellen bei *Saccharomyces*. — x 381, o 470, □ 11-22, ■ 11-22 + 381, ● 470 + 381.

Formation of CO₂ (a) and activity of fermentation (b) of pure and joint cultures of *S. cerevisiae* 381 (sensitive) and *H. uvarum* 470 (killer) or 11-22 (neutral). B-medium, pH 3.5; 20 °C. Inoculum: 3×10^6 cells/ml of *Hanseniaspora*, 3×10^4 cells/ml of *Saccharomyces*.

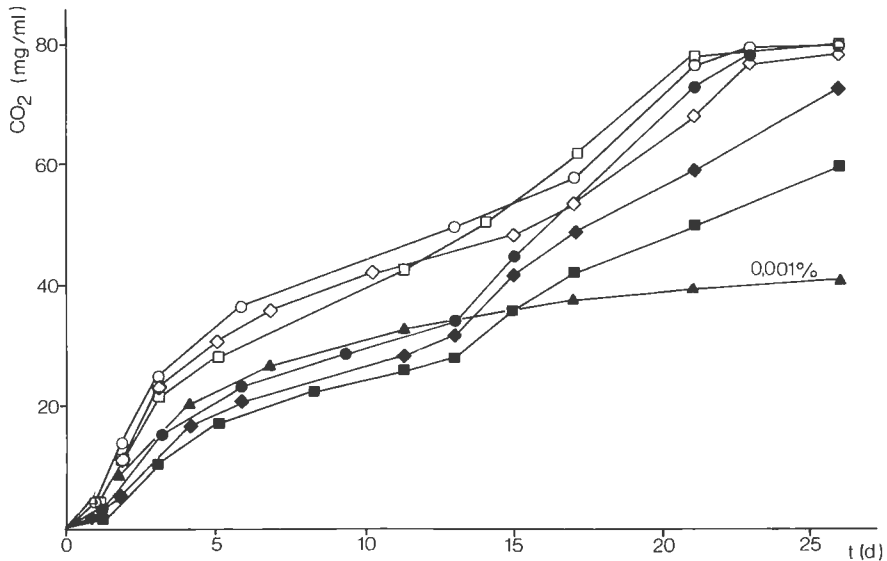


Abb. 9: CO₂-Produktion während Mischkulturgärungen von *Saccharomyces cerevisiae* 381 (sensitiv) mit *Hanseniaspora uvarum* 470 (Killer) bei verschiedenen Inokulationsverhältnissen. Stamm 470 (3×10^6 Zellen/ml), Stamm 381 (0,001—20 % der Killerzellzahl). B-Medium, pH 3,5. — ▲ 0,001 %, ● 0,01 %, ■ 0,1 %, ◆ 1 %, ◇ 5 %, ○ 20 %.

Formation of CO₂ by joint cultures of *S. cerevisiae* 381 (sensitive) and *H. uvarum* 470 (killer) at various ratios of the inoculum. Strain 470: 3×10^6 cells/ml, the percentage of the sensitive strain 381 as indicated.

In den bisherigen Versuchen waren der Killerstamm der Apiculatus-Hefe und die Weinhefe in einem Verhältnis von etwa 50 : 1 bis 500 : 1 eingesetzt worden. Im Folgenden sollte festgestellt werden, ob die Gärhemmung von dem Inokulationsverhältnis beider Organismen abhängig ist. Dazu wurden je 3×10^6 Killerzellen/ml mit verschiedenen Konzentrationen des sensitiven Stammes zur Einsaat verwendet. Die Gärverläufe der Mischkulturen wurden durch Bestimmung der CO₂-Bildung verfolgt und werden in Abb. 9 dargestellt. Bei Inokulation von 0,001 % Weinhefezellen wurde deren Gäraktivität während der gesamten Versuchsdauer von 26 d vollständig gehemmt. Der Verlauf der CO₂-Bildung entsprach demjenigen der Reinkultur des Killerstammes. Bei größeren Einsaaten der Weinhefe wurde deren Gärung bis etwa zum 12.—15. d gehemmt, und der Gärverlauf entsprach etwa dem der Apiculatus-Hefe. Danach setzte in diesen Mischansätzen eine erneute Zunahme der CO₂-Produktion ein.

Um zu klären, ob die Aufhebung der Gärhemmung ab dem 12. bzw. 15. d möglicherweise auf einer erworbenen Resistenz von Zellen der Weinhefe gegen das *Hanseniaspora*-Toxin beruhte, wurden 8 Einzelkolonien aus den vergorenen Ansätzen mit 0,1, 5 und 10 % im Agardiffusionstest gegen Killertoxinkonzentrat von *H. uvarum* 470 geprüft. Die getesteten Kolonien waren alle sensitiv.

8. Verlauf der Gärung in der Mischkultur einer Apiculatus-Killerhefe mit einer Weinhefe bei Einsaat nach Gärbeginn

Bei einem hohen Anteil der sensitiven Weinhefe in einer Mischkultur mit der Apiculatus-Killerhefe war keine Gärhemmung beobachtet worden. Es ist aber vorstellbar,

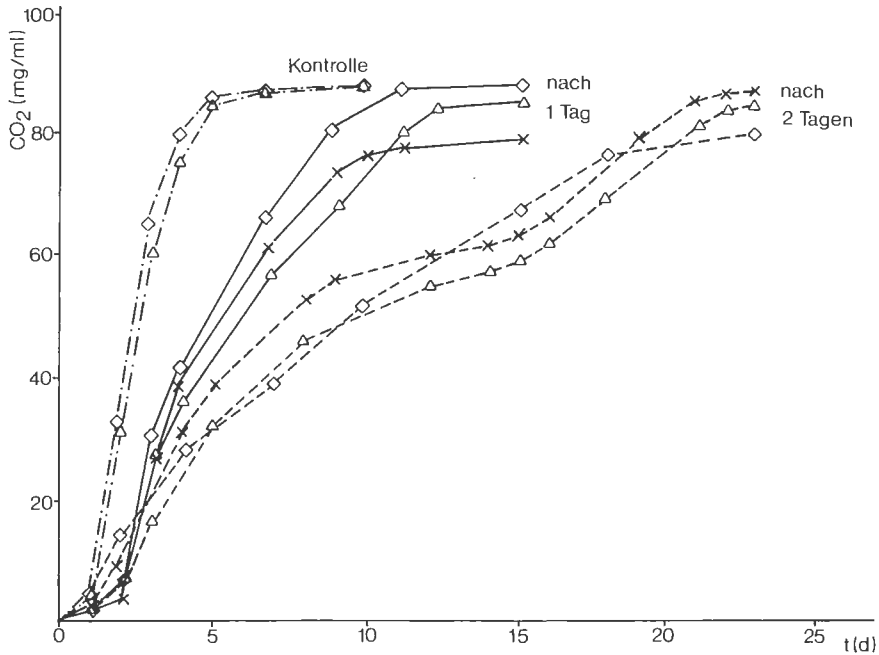


Abb. 10: CO₂-Produktion während Mischkulturgärungen von *Saccharomyces cerevisiae* 381 (sensitiv) mit *Hanseniaspora uvarum* 470 (Killer) bei verschiedenen Inokulationsverhältnissen und späterem Zusatz der sensitiven Hefe. B-Medium (pH 3,5; 20 °C) wurde mit Stamm 470 (10⁶ Zellen/ml) beimpft: Stamm 381 wurde gleichzeitig (Kontrolle) nach 1 d oder nach 2 d in folgenden Mengen inokuliert: × 0,4 × 10⁶ Zellen/ml, Δ 10⁶ Zellen/ml, ◇ 2,3 × 10⁶ Zellen/ml.

Formation of CO₂ by joint cultures of *S. cerevisiae* 381 (sensitive) and *H. uvarum* 470 (killer) at various ratios of the inocula and a delayed addition of the sensitive yeast. B-Medium was inoculated with 10⁶ cells/ml of strain 470, the sensitive yeast (0.4—2.3 × 10⁶ cells/ml) was added immediately (control) or after a delay of 1 or 2 d.

daß bei einer zeitlich verzögerten Inokulation der Weinhefe der Killerstamm zwischenzeitlich soviel Killertoxin gebildet hat, daß auch bei größeren Konzentrationen des sensitiven Stammes die Gärung gehemmt werden kann. Dies könnte eine praktische Bedeutung in der Weinbereitung haben, wenn bei Gärungen eine sensitive *Saccharomyces*-Reinzuchtheefe verspätet dem bereits angegorenen und mit Killertoxin angereicherten Most zugesetzt wird.

Zur Prüfung dieser Frage wurde das Medium je ml mit 10⁶ Zellen der Apiculatus-Hefe angestellt, und sofort oder nach 1—2 d wurden 0,4—2,3 × 10⁶ Zellen der Weinhefe zugesetzt. Die in Abb. 10 dargestellten Gärverläufe zeigen, daß es bei einer um 1—2 d verspäteten Zugabe der Weinhefe zu Gärverzögerungen kommt. So wird bei Zugabe der Weinhefe 2 d nach Gärbeginn die maximale CO₂-Bildung und damit das Ende der Gärung etwa 15 d später erreicht als bei sofortiger Einsaat der Weinhefe.

9. Einfluß verschiedener Killerstämme von *Hanseniaspora uvarum* auf eine sensitive Weinhefe

Nachdem eine Gärhemmung der Weinhefe durch die Killerhefe *H. uvarum* 470 gezeigt werden konnte, sollte geklärt werden, ob auch andere Killerstämme gärhemmend wirken.

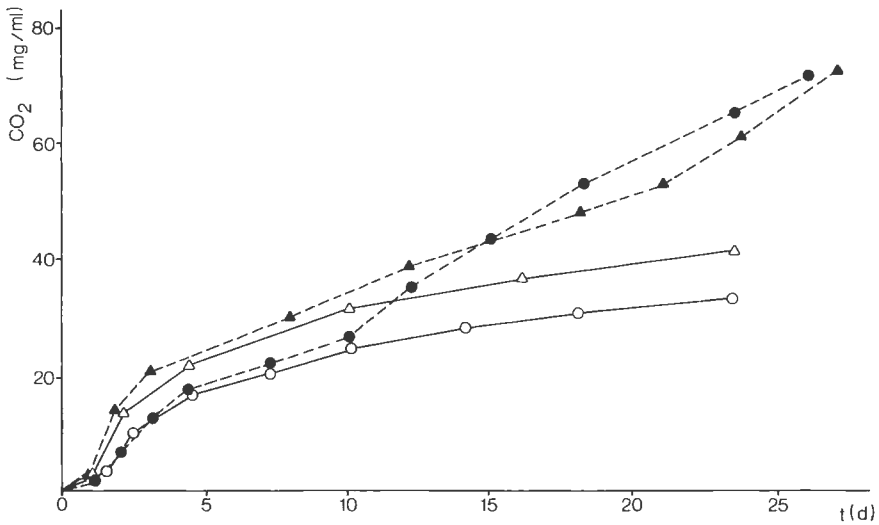


Abb. 11: CO₂-Produktion während Rein- und Mischkulturgärungen von *Saccharomyces cerevisiae* 381 (sensitiv) und *Hanseniaspora uvarum* 471 und 472 (Killer). B-Medium, pH 3,5; 20 °C. — Δ 471, ○ 472, ▲ 471 + 381, ● 472 + 381.

Formation of CO₂ by pure or joint cultures of *S. cerevisiae* 381 (sensitive) and *H. uvarum* 471 and 472 (killer). B-medium, pH 3.5; 20 °C.

Es wurden Reinkulturgärungen der *H. uvarum*-Stämme 471 und 472 sowie Mischkulturgärungen mit dem sensitiven *S. cerevisiae*-Stamm 381 in B-Medium untersucht. Die Gärungen wurden mit jeweils 3×10^6 Zellen/ml der *Hanseniaspora*-Stämme und 3×10^4 Zellen/ml der sensitiven Hefe gestartet. Die Gärverläufe wurden anhand der CO₂-Produktion verfolgt und sind in Abb. 11 dargestellt.

Die Reinkulturgärungen der gärschwachen Stämme 471 und 472 entsprachen in ihrem Verlauf denjenigen der *Hanseniaspora*-Stämme 470 und 11-22. Der größte Teil an CO₂ wurde mit 24,5 bzw. 19,1 mg/ml bis zum 6. d gebildet. In 23 d wurden insgesamt 40,1 bzw. 32,7 mg/ml CO₂ produziert. In beiden Mischkulturgärungen von *S. cerevisiae* 381 mit den Killerstämmen *H. uvarum* 471 bzw. 472 war eine Gärhemmung des sensitiven Stammes zu beobachten, die der Gärhemmung in Mischkultur mit dem Killerstamm 470 entsprach und daher auf das jeweils ausgeschiedene Killertoxin zurückgeführt werden kann. *H. uvarum* 471 unterdrückte die Gärung der Weinhefe 21 d lang, dann stieg die Gäraktivität innerhalb von 5 d auf 0,15 mg CO₂/ml h. Die andere Killerhefe hemmte die Gäraktivität des sensitiven Stammes bis zum 10. d. Dann stieg auch hier die Gäraktivität in 3 d erneut auf einen Maximalwert von 0,16 mg CO₂/ml h. Bis Versuchsabbruch nach 27 bzw. 26 d waren beide Mischgärungen noch nicht abgeschlossen. Somit bewirken auch die *Hanseniaspora*-Killerstämmen 471 und 472 toxinbedingte Gärstockungen der sensitiven Weinhefe.

10. Wirkung von Bentonit auf die Gärhemmung durch *Hanseniaspora-uvarum*-Killerhefen

RADLER UND SCHMITT (1987) haben nachgewiesen, daß Ca-Bentonit das Killertoxin eines *Saccharomyces*-Stammes adsorbiert und dadurch inaktiviert. Es sollte untersucht werden, ob die durch Killertoxin von Apiculatus-Hefen bewirkte Gärhemmung durch Bentonitzugabe verhindert werden kann.

Ca-Bentonit wurde zur Aktivierung über Nacht in der 5fachen Menge an McIlvaine-Puffer vorgequollen und anschließend mit B-Medium (pH 3,5) versetzt, so daß in den Ansätzen Bentonitkonzentrationen von 0,001, 0,01, 0,02, 0,2, 0,5 und 2 % vorlagen. Alle Ansätze wurden autoklaviert (20 min). Die Gärungen wurden mit logarithmisch wachsenden Zellen von *H. uvarum* und *S. cerevisiae* gestartet und auf der Schüttelmaschine (90 U/min) inkubiert. Der Gärverlauf wurde anhand der CO₂-Bildung verfolgt. Die Mischkulturvergärungen mit Bentonitkonzentrationen von 0,001, 0,01, 0,2 und 2 % sowie die Reinkulturvergärung des Weinhefestammes 381 (Kontrolle 3) sind in Abb. 12 dargestellt.

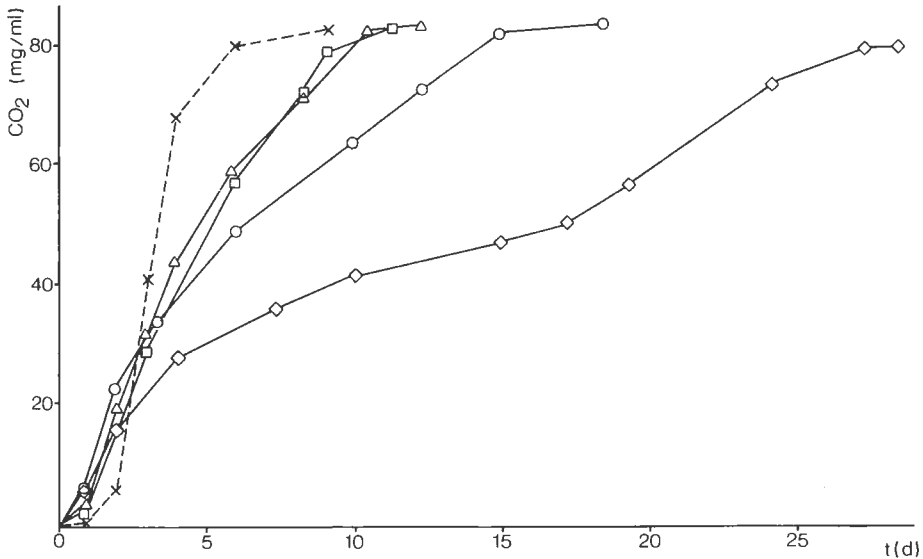


Abb. 12: Mischkulturvergärungen von *Saccharomyces cerevisiae* (sensitiv) mit *Hanseniaspora uvarum* (Killer) bei verschiedenen Bentonitkonzentrationen. B-Medium, pH 3,5; 20 °C. *H. uvarum* 470 (3×10^6 Zellen/ml), *S. cerevisiae* (3×10^4 Zellen/ml). Kontrolle: Stamm 381 mit 2 % Bentonit. — ◇ 0,001 %, ○ 0,01 %, Δ 0,2 %, □ 2 % Bentonit, × Kontrolle.

Fermentation of joint cultures of *S. cerevisiae* 381 (sensitive) and *H. uvarum* 470 (killer) in the presence of bentonite.

Bei einer Bentonitkonzentration von 0,001 % konnte der Killereffekt nicht vermieden werden. In dieser Mischkultur wurde die Gäraktivität von Stamm 381 bis zum 16. d völlig gehemmt. Dann stieg diese innerhalb von 3 d auf 0,15 mg CO₂/ml h an, und nach 27 d war die Gärung abgeschlossen. Ab einer Konzentration von 0,01 % war das zugesetzte Bentonit offensichtlich in der Lage, das ausgeschiedene Killertoxin von *H. uvarum* 470 zu adsorbieren und damit zu inaktivieren. In keiner dieser Mischvergärungen (0,01—2 % Bentonit) konnte eine durch Killertoxin hervorgerufene Gärhemmung des sensitiven Stammes festgestellt werden. Es traten vielmehr leichte Gärhemmungen des sensitiven Stammes auf, die durch *Hanseniaspora*-Stämme unabhängig vom Killercharakter bewirkt werden können.

In einem Versuchsansatz mit dem Killerstamm *H. uvarum* 471 und der Weinhefe Stamm 381 wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten. Es war sogar bereits eine Konzentration von 0,001 % Bentonit ausreichend, um die durch Killertoxin bedingte Gärhemmung zu verhindern.

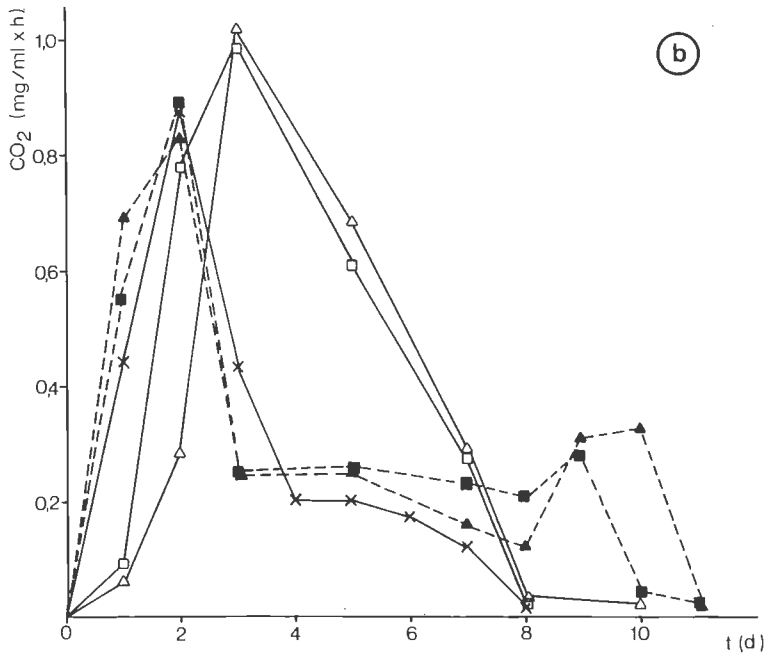
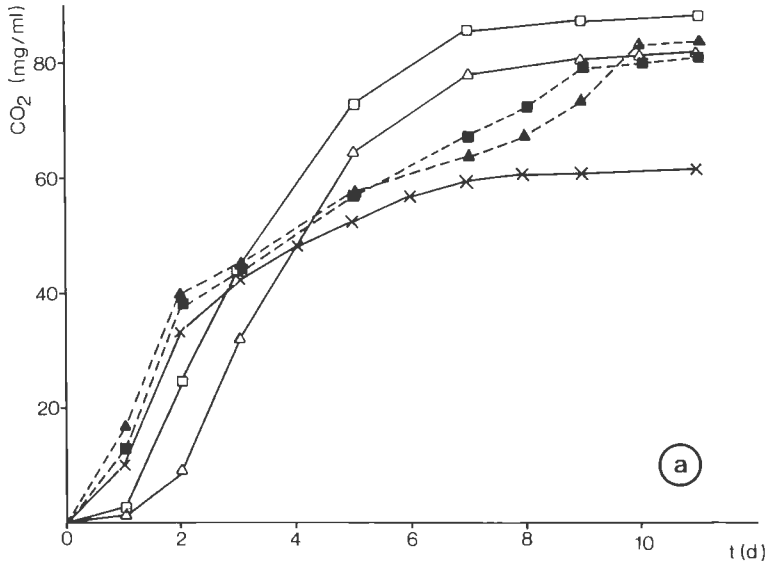


Abb. 13: CO₂-Produktion (a) und Gäraktivität (b) während Rein- und Mischkulturgärungen von *Saccharomyces cerevisiae* 381 (sensitiv) und *Hanseniaspora uvarum* 470 (Killer) bei verschiedenen Inokulationsverhältnissen in Traubensaft. Inokulum: 3×10^6 Zellen/ml von Stamm 470 und 3×10^3 (0,1%) oder 3×10^2 Zellen/ml von Stamm 381 (0,01%). — × 470, □ 381 (0,1%), △ 381 (0,01%), ■ 471 + 381 (0,1%), ▲ 470 + 381 (0,01%).

11. Gärbeeinflussung einer sensitiven Weinhefe durch *Hanseniaspora-uvarum*-Killerstämme in Traubensaft

In synthetischem B-Medium wurde eine Gärhemmung des sensitiven *Saccharomyces*-Stammes 381 durch die Killerstämme *H. uvarum* 470, 471 und 472 nachgewiesen, die auf das ausgeschiedene Toxin zurückgeführt werden konnte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch in Traubensaft auftritt und damit eine praktische Bedeutung in der Kellerwirtschaft haben könnte.

Während im B-Medium bei einer Einsaat von 3×10^6 Zellen/ml von *H. uvarum* und 3×10^4 Zellen/ml von *S. cerevisiae* 381 (entspricht 1 %) eine deutliche Gärhemmung zu beobachten war, unterblieb in einem roten Traubenmost bei diesem Einsaatverhältnis die Hemmung durch die Killerstämme 470, 471 oder 472. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob bei geringerer Einsaat der Weinhefe noch eine Gärbeeinflussung durch den Killerstamm bewirkt werden kann. Zu je 3×10^6 Killerzellen/ml wurden Zellen des sensitiven Stammes 381 in Konzentrationen von 0,1 oder 0,01 % der Killerzellzahl zugesetzt. Als Kontrollen dienten Reinkulturgärungen der Stämme 381 und 470 mit den entsprechenden Inokula. Die CO_2 -Bildung und die Gäraktivität aller Ansätze sind in Abb. 13 dargestellt.

In beiden Mischkulturgärungen verlief die CO_2 -Bildung bis zum 8. d wie in der Reinkultur des Killerstammes 470. Die Gäraktivität des sensitiven Stammes wurde offensichtlich bis zu diesem Zeitpunkt unterdrückt. Dann wurde in der Mischkultur mit 0,1 % Weinhefe ein erneuter Anstieg der Gäraktivität auf 0,28 mg CO_2 /ml h (9. d) und in der Mischkultur mit 0,01 % auf 0,33 mg CO_2 /ml h (10. d) beobachtet. Die Gärungen waren erst nach 10 bzw. 11 d mit einer CO_2 -Produktion von 78,8 bzw. 81,7 mg/ml abgeschlossen und somit im Vergleich zur Reinkultur der Weinhefe um etwa 4–5 d verzögert.

Diskussion

Die ökologische Bedeutung des Killerfaktors ist noch unbekannt. Während in Stammsammlungen Killerhefen selten auftreten (PHILLISKIRK und YOUNG 1975; ROSINI 1983), sind sie in der Natur weit verbreitet (STUMM *et al.* 1977; ROGERS und BEVAN 1978). Einen ökologischen Vorteil könnten Killerhefen bei der Weinbereitung haben. So beobachteten TYURINA und BURYAN (1975) in spontan vergärten Mosten ein verstärktes Auftreten von Killerhefen der Art *S. cerevisiae* (bis zu 62 %). BENDA (s. ANONYM 1985) wies bei Untersuchungen fränkischer Moste in 53 % der Proben Killerhefen nach. Diese gehörten vorwiegend der Gattung *Saccharomyces* an. Leider wird keine Angabe über die wenigen Nicht-*Saccharomyces*-Killerhefen gemacht. Denn bei Spontangärungen könnte sich auch eine Nicht-*Saccharomyces*-Killerhefe durchsetzen, welche die echten Weinhefen (*Saccharomyces*) abtötet und damit zu Gärstörungen führt. Angehörige der gärschwachen Gattung *Hanseniaspora* können 90–99 % der Spontanflora ausmachen (DITTRICH 1977). Killerhefen dieser Gattung stellen somit potentielle Kandidaten für Fehlgärungen dar.

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen bestärken diese Vermutung. In Mischkulturgärungen eines Killerstammes der Art *H. uvarum* mit einer sensitiven Weinhefe der Art *S. cerevisiae* setzt eine optimale Killerwirkung bei 20 °C und einem pH von 3,5 ein. Dabei wurden innerhalb von 2 d 95 % der sensitiven Hefezellen abgetötet. Die Toxinwirkung wurde offensichtlich nach 4 d aufgehoben, und der sensitive Stamm kam zur Entwicklung. In der Kontrollgärung eines neutralen *Hanseniaspora*-Stammes mit der Weinhefe wurde letztere nicht abgetötet, aber die Wachstumsge-

schwindigkeit etwas verlangsamt. Diese Wachstumshemmung muß demnach durch andere Stoffwechselprodukte der *Hanseniaspora*-Stämme hervorgerufen worden sein.

Neben der toxinbedingten Abtötung der sensitiven Weinhefe konnte eine toxinbedingte Gärstockung der sensitiven Hefe durch *Hanseniaspora*-Killerstämme nachgewiesen werden. Die Toxinwirkung in Mischkulturgärungen beider Hefen in synthetischem Medium beruhte auf einer zeitweisen völligen Unterdrückung der Gäraktivität der sensitiven Hefe. Die Aufhebung der Toxinwirkung war mit einem charakteristischen erneuten Anstieg der Gäraktivität verbunden, der auf die sensitive Weinhefe zurückgeführt werden muß. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Gärung von dem gärschwachen Killerstamm durchgeführt worden, wobei bis zu 14 % Restzucker verblieben und nur ca. 3 Vol.% Ethanol und ca. 30 g/l CO₂ produziert wurden. Die verspätet einsetzende Gärung der sensitiven Hefe verlief nicht so zügig wie in der Reinkulturgärung. Das läßt sich mit dem Auftreten von leichten Gärhemmungen unabhängig vom Killercharakter erklären, wie sie in Kontrollgärungen von *Hanseniaspora* mit einer resistenten Weinhefe beobachtet wurden.

Die toxinbedingte Gärstockung der sensitiven Weinhefe war abhängig vom Inokulationsverhältnis. Bei einer Einsaat von 0,001 % der sensitiven Hefe wurde die Gärung allein von dem *Hanseniaspora*-Killerstamm durchgeführt, da alle sensitiven Zellen abgetötet wurden. Betrug das Inokulum der sensitiven Weinhefe bis zu 20 % der Killerzellzahl, wurde eine vollständige Unterdrückung der Gärung der sensitiven Hefe bis zu 15 d beobachtet, bevor ein erneuter Anstieg der Gäraktivität eine Gärung durch den sensitiven Stamm anzeigte. Im Gegensatz dazu zeigen *Saccharomyces*-Killerstämme eine wesentlich stärkere Toxinwirkung als die *Hanseniaspora*-Killerstämme. YOUNG und PHILLISKIRK (1975) zeigten, daß bereits 1 % Killerzellen von *S. cerevisiae* Stamm 738 genügen, um alle sensitiven *Saccharomyces*-Zellen abzutöten. In Mischkulturgärungen in sterilem Most einer *Saccharomyces*-Killerhefe mit einer sensitiven Weinhefe wurde die Vermehrung der sensitiven Hefe bis zu einem Inokulationsverhältnis von 1 : 20 unterdrückt (TYURINA und BURYAN 1975). Trotz dieser im Vergleich schwachen Toxinwirkung der *Hanseniaspora*-Killerstämme könnten bei einer Spontangärung Gärstörungen auftreten, wenn Killerstämme von Apiculatus-Hefen und zufällig nur sensitive Weinhefen im Most vorkommen.

Bei Reinzuchtgärungen hingegen werden dem Gäransatz Reinzuchthefen (*S. cerevisiae*) zugesetzt, wodurch eine zahlenmäßige Dominanz der *Saccharomyces*-Hefen erreicht wird. Dazu werden Trockenhefepräparate benutzt, wobei ein Zusatz von 50—100 mg Trockenhefe/l Most empfohlen wird (JAKOB 1984). Nach RADLER *et al.* (1985 a) sind in 1 g Trockenhefe $1,1—3,5 \times 10^{10}$ lebende Zellen enthalten, so daß im Most je ml $0,5—3,5 \times 10^6$ Zellen der Trockenhefe vorliegen. Mischkulturgärungen eines *Hanseniaspora*-Killerstammes mit einer sensitiven Weinhefe in ähnlichen Zellzahlverhältnissen in B-Medium zeigten, daß eine Gärstörung durch *Hanseniaspora*-Killerstämme unter den Bedingungen der Reinzuchtgärung ausgeschlossen werden kann. Würde allerdings die sensitive Weinhefe entsprechend den Trockenhefekonzentrationen (bis 10^6 Zellen/ml) mit 2tägiger Verspätung dem durch einen *Hanseniaspora*-Killerstamm angegorenen Medium zugesetzt, wurden 10- bis 12tägige toxinbedingte Gärhemmungen der Weinhefe und 3fach verlängerte Gärzeiten beobachtet. Verspätet zugesetzte Reinzuchtheferie, die sensitiv reagiert, könnte demnach in der Praxis zu Gärstörungen durch *Hanseniaspora*-Killerstämme führen. Eigene Untersuchungen von acht Weinhefen bezüglich ihres Verhaltens gegen das *Hanseniaspora*-Toxin zeigten aber, daß nur eine *Saccharomyces*-Hefe sensitiv reagierte. Die restlichen Weinhefen, von denen vier aus Trockenhefepräparaten stammten, verhielten sich resistent.

Killertoxine werden in äußerst geringen Konzentrationen ins Medium ausgeschieden. Eine Analyse von Kulturüberständen von sensitiven Stämmen und Killerstämmen

men ergab keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt (BUSSEY 1972). Zur Inaktivierung der Killertoxine bieten sich Belüftung, Hitze- oder Proteasebehandlung sowie Einsatz von Bentonit an. Bei der Weinbereitung wird Bentonit in einer Konzentration von maximal 0,2 % dem Most oder Wein als Schönungsmittel zum Entfernen von Proteinen zugesetzt.

In Mischkulturgärungen von *Hanseniaspora*-Killerstämmen mit einer sensitiven Weinhefe in B-Medium konnte die toxinbedingte Gärstörung bereits durch Zusatz von nur 0,001 bzw. 0,01 % Bentonit bei Gärstart eliminiert werden. Auch BENDA (s. ANONYM 1985) berichtet über eine erfolgreiche Entfernung eines *Saccharomyces*-Killertoxins durch Bentonitzusatz. Sie beobachtete, daß eine Bentonitbehandlung unwirksam ist, solange noch wenige *Saccharomyces*-Killerhefezellen vorhanden sind. In eigenen Untersuchungen mit *Hanseniaspora*-Killerhefezellen unterblieb die Killerwirkung bei Bentonitzusatz zum Gärmedium. Eine weitere praxisnahe Methode zur Eliminierung der Toxinwirkung bei der alkoholischen Gärung könnte der Zusatz von Hefezellwandpräparaten zum Most darstellen. Hefezellwände adsorbieren neben Fettsäuren und anderen toxischen Substanzen (RIBÉRAU-GAYON 1985) auch Killertoxin (RADLER und SCHMITT 1987).

Nachdem in synthetischem Medium Gärstörungen durch *Hanseniaspora*-Killerstämme nachgewiesen waren, wurden diese auch bei der Vergärung von Traubenmost erwartet, zumal LEIS (persönliche Mitteilung) für einen Killerstamm von *Pichia* gezeigt hatte, daß die Killertoxinaktivitäten nach Wachstum in Traubenmost bis zu 30fach höher waren als in synthetischem Medium. Die Mischkulturgärungen von *Hanseniaspora*-Killerstämmen mit einer sensitiven Weinhefe wurden in rotem Traubensaft (pH 3,4) durchgeführt. Eine toxinbedingte, 8tägige Gärstörung konnte nur bei einem Anteil der sensitiven Hefe bis zu 0,1 % der Killerzellzahl beobachtet werden; in synthetischem Medium war dies bei bis zu 20 % der Killerzellzahl der Fall. BARRE (1980) konnte zeigen, daß die Polyphenolfraction roter Trauben eine drastische Herabsetzung der Killeraktivität von *S. cerevisiae* bewirkt. Die Versuchsergebnisse mit Mischkulturgärungen von *Hanseniaspora* und *Saccharomyces* in rotem Traubensaft könnten in Bezug zu dieser Beobachtung stehen.

Zusammenfassung

Verschiedene Stämme der verbreiteten gärschwachen Apiculatus-Hefen (*Hanseniaspora uvarum*) bilden Killertoxin (ein Protein), das gegen eine sensitive Weinhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wirksam ist. Es wurde durch Lyophilisieren oder Ethanol-fällung angereichert. Die Aktivität wurde mit der Agardiffusionsmethode bestimmt. Das Killertoxin hat ein Aktivitätsoptimum im Bereich von pH 4, es ist aber auch bei pH 3,5 wirksam. In Gärversuchen mit der Weinhefe (*S. cerevisiae* 381) bei gleichzeitiger Anwesenheit von Apiculatus-Hefen mit Killeraktivität wurden Gärverzögerungen beobachtet. In Mischkulturgärungen von *H. uvarum* 470 mit *S. cerevisiae* lagen Temperatur- und pH-Optimum der Killertoxinwirkung bei 20 °C und pH 3,5, wobei innerhalb von 2 d 95 % der sensitiven Hefezellen abgetötet wurden. Nach mehreren Tagen kam die Weinhefe wieder zur Entwicklung. Die durch Killertoxin bedingten Gärstockungen dauerten etwa 10—20 d. Bei einem Anteil der sensitiven Weinhefe von 0,01—20 % der Zellzahl der Killerhefe (*H. uvarum* 470) wurde die Gärung bis zu 15 d unterdrückt, bei einem noch geringeren Anteil der Weinhefe wurden alle Zellen abgetötet. Auch bei einer Einsaat von 10⁶ Zellen/ml von *S. cerevisiae* wurden Gärverzögerungen beobachtet, wenn die Weinhefe 2 d nach der Apiculatus-Hefe zugegeben wurde. Durch Bentonit in Konzentrationen von 0,01 % wurde die Killertoxin-bedingte Gärhemmung aufgehoben. Gärverzögerungen durch Killerhefen von *Hanseniaspora* wurden auch in Versuchen mit Traubenmost beobachtet.

Diese Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe des Forschungsrings des Deutschen Weinbaues gefördert.

Literatur

- AMERINE, M. A.; KUNKEE, R. E.; 1968: Microbiology of winemaking. *Ann. Rev. Microbiol.* **22**, 323—358.
- ANONYM; 1985: Künftig Killerhefen gegen Gärstörungen. *Weinwirtsch. Tech.* **121**, 79—80.
- BARRE, P.; 1980: Rôle du facteur «killer». *Bull. O.I.V.* **53**, 560—567.
- BERNT, E.; GUTMANN, I.; 1974: Äthanol-Bestimmung mit Alkohol-Dehydrogase und NAD. In: BERGMAYER, H. U. (Hrsg.): *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bd. 2, 1545—1548. Verlag Chemie, Weinheim.
- BUSSEY, H.; 1972: Effects of yeast killer factor on sensitive cells. *Nature* **235**, 73—75.
- DIETRICH, H. H.; 1977: *Mikrobiologie des Weines*. S. 23, 219. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- JAKOB, L.; 1984: *Taschenbuch der Kellerwirtschaft*. 3. Aufl. S. 86—88, 223. Fachverlag Dr. Fraund GmbH, Wiesbaden.
- MORRIS, E. O.; EDDY, M. A.; 1957: Method for the measurement of wild yeast infection in pitching yeast. *J. Inst. Brew.* **63**, 34—35.
- MÜLLER-THURGAU, H.; 1897: *Ber. Schweiz. Versuchsanst. Wädenswil* **7**, 50. [Zitiert nach SCHULLE, H. (1953).]
- PFEIFFER, P.; RADLER, F.; 1982: Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2699—2706.
- PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W.; 1975: The occurrence of killer character in yeasts of various genera. *Antonie van Leeuwenhoek* **41**, 147—151.
- RADLER, F.; DIETRICH, K.; SCHÖNIG, I.; 1985 a: Mikrobiologische Prüfung von Trockenhefepräparaten für die Weinbereitung. *Dt. Lebensm. Rundsch.* **81**, 73—77.
- — ; PFEIFFER, P.; DENNERT, M.; 1985 b: Killer toxins in new isolates of the yeasts *Hansensiaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *FEMS Microbiol. Letters* **29**, 269—272.
- — ; SCHMITT, M.; 1987: Killer toxins of yeasts: inhibitors of fermentation and their adsorption. *J. Food Protect.* **50**, 234—238.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; 1985: New developments in wine microbiology. *Amer. J. Enol. Viticult.* **36**, 1—10.
- ROGERS, D.; BEVAN, E. A.; 1978: Group classification of killer yeasts based on cross-reactions between strains of different species and origin. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 199—202.
- ROSINI, G.; 1983: The occurrence of killer characters in yeasts. *Can. J. Microbiol.* **29**, 1462—1464.
- SCHANDERL, H.; 1959: *Mikrobiologie des Mostes und Weines*. 2. Aufl. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- SCHULLE, H.; 1953: Die Bedeutung der Apiculatus-Hefen für die Gärtätigkeit der echten Weinhefen in zuckerreichen Mosten. *Arch. Mikrobiol.* **18**, 342—348.
- SOMERS, J. M.; BEVAN, E. A.; 1969: The inheritance of the killer character in yeast. *Genet. Res.* **13**, 71—83.
- SOMOGYI, M.; 1952: Notes of sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19—23.
- STUMM, C.; HERMANS, J. M. H.; MIDDELBEEK, E. J.; CROES, A. F.; DE VRIES, G. J. M. L.; 1977: Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antonie van Leeuwenhoek* **43**, 125—128.
- TYURINA, L. V.; BURYAN, N. J.; 1975: Phenotypes (killer, neutral, sensitive) of yeast of genus *Saccharomyces* in viticulture and methods of their determination. *Microbiol.* **44**, 316—320.
- WOODS, D. R.; BEVAN, E. A.; 1968: Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **51**, 115—126.
- YOUNG, T. W.; 1987: Killer yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.): *The Yeasts*, Vol. 2, 131—164, 2nd Ed. Academic Press, London.
- — ; PHILLISKIRK, G.; 1975: Killer yeasts and fermentation — the effects of killer yeasts in mixed batch and continuous cultures in wort. *Proc. EBC. Congr.*, 333—346.

Eingegangen am 4. 8. 1987

Prof. Dr. F. RADLER
 Institut für Mikrobiologie
 und Weinforschung
 Johannes Gutenberg-Universität
 Postfach 3980
 D 6500 Mainz