

645. Hans Pringsheim:

Der Einfluss der chemischen Constitution der Stickstoffnahrung auf die Gährfähigkeit der Hefe.

[Aus dem landwirthschaftlich-bacteriolog. Institut der Universität Göttingen.]

(Eingegangen am 23. October 1906.)

Während die Hefe unter normalen Umständen in Gegenwart von Zucker zur Entwicklung kommt und dabei ihre mit Energiegewinn verbundene Gährthätigkeit entfaltet, gelang es Laurent¹⁾, sie auch mit anderen Kohlenstoffquellen, wie Acetaten, Lactaten, Aepfelsäure, Rechtsweinsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure und deren Salzen, der Milchsäure, Linksweinsäure, Schleimsäure, Fumarsäure, dem Asparagin, der Glutaminsäure, dem Calciumsalz der Glycerinsäure und Glycerinphosphorsäure u. a. m. zum Wachsthum zu bringen. Durch die Abwesenheit von Zucker wird bei diesen Kohlenstoffquellen bedingt, dass keine Gährung einsetzen kann. Dagegen gestatten diese Resultate nicht den Rückschluss, dass die so vorcultivirte Hefe, wenn mit Zucker zusammengebracht, keine Spaltung in Alkohol und Kohlenensäure gegeben hätte, d. h. also keine Zymase enthielt.

Zwei in Bezug auf diesen Punkt von mir unternommene Versuche deuten darauf hin, dass auch in Abwesenheit von Zucker gewachsene Hefe bei geeigneter Stickstoffnahrung gährkräftig ist. Wurde nämlich nach drei Monate langem Wachsthum auf einem Liter Aepfel- resp. Bernstein-Säure mit Leucin als Stickstoffquelle die überstehende Flüssigkeit durch Abhebern vom Hefesatz getrennt und die geringe, mit der Hefe zurückbleibende Flüssigkeitsmenge von etwa 20 ccm mit Zucker versetzt, so fand nach 24 Stunden unter deutlich wahrnehmbarer Gasentwicklung wägbarer Kohlensäureverlust von 0.22 g Kohlensäure bei der Aepfelsäure- und 0.20 g Kohlensäure bei der Bernstein-säure-Ernährung statt. Wie durch mikroskopische Prüfung festgestellt wurde, hatte zu der Zeit noch keine Sprossung der so alten Hefe stattgefunden. Dass die Intensität der Zuckerspaltung gering war, kann bei den ungünstigen Ernährungsbedingungen nicht Wunder nehmen.

Immerhin geht aus den Versuchen mit genügender Klarheit das theoretisch wichtige Resultat hervor, dass auch eine in Abwesenheit von Zucker mit einer anderen Kohlenstoffquelle ernährte Hefe ein gährkräftiges Plasma enthalten kann.

Die Beobachtung, dass Hefe aber auch in Gegenwart von Zucker und mit Ausnutzung dieses als Kohlenstoffquelle zur Vermehrung

¹⁾ Laurent, Ann. Soc. belge de Microscopie 14, 29 [1890].

kommt, ohne dabei den Zucker zu vergären, ist bis jetzt noch nicht gemacht worden.

Es ist mir jetzt gelungen, Hefe so zu ernähren, dass sie unter den erwähnten Bedingungen in Gegenwart von Zucker und mit diesem als Kohlenstoffquelle doch nicht gährt, d. h. also entweder keine Zymase besitzt oder zu keiner Ausnutzung ihrer Zymase kommt, wobei die erste Annahme die wahrscheinlichere ist. Ich fand den Weg zu dieser Ernährungsart der Hefe in der Form der gebotenen Stickstoffquelle, in einem Einfluss der chemischen Constitution der Stickstoffnahrung, den ich, um es der Klarheit wegen vorwegzunehmen, in einem kurzen Satze zusammenfassen kann: »Die Hefe ist im Stande, ihre Leibessubstanz mit Hilfe recht verschieden constituirter stickstoffhaltiger Substanzen aufzubauen. Zu einer Vergärung des ihr gebotenen Zuckers kommt die Hefe jedoch nur dann, wenn ihr eine Stickstoffquelle geboten wird, die die Gruppe .NH.CH.CO. enthält.«

Diese Gruppe hat durch die Anschauung Emil Fischer's¹⁾ eine besondere Bedeutung gewonnen, da nach dieser die Amidosäuren im Eiweiss sich mit Hilfe solcher Gruppen in amidartiger Verkettung vorfinden. Durch Verkuppelung von Körpern der Amidosäureklasse, die alle diese Gruppe enthalten, gelangte Fischer dann zu der Klasse der Peptide, den amidartigen Anhydriden der Amidosäuren, welche in naher Beziehung zu den Peptonen und Albumosen stehen und ein neues Licht in den Aufbau des Eiweissmoleküls geworfen haben.

Czapek²⁾ hat in einer ausführlichen Untersuchung über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung bei Pflanzen eine grosse Zahl von Stickstoffverbindungen in Bezug auf ihren Nährwerth für *Aspergillus niger* geprüft und besonders auf die Bedeutung der Amidosäuren aufmerksam gemacht. Er kam jedoch nur zu einem Vergleich verschieden constituirter Stickstoffquellen durch das Gewicht der Pilzernte, während in meinem Befund ein viel schärfer charakterisirter Unterschied zwischen Stickstoffquellen, die eine gärende und solchen, die eine nicht gärende Hefe geben, hervortritt.

Bei dem heutigen Stand der Eiweisschemie ist jede Beobachtung, die ein neues Licht auf die Bedeutung der amidartigen Verkettung durch die .NH.CH.CO- Gruppe wirft, von Wichtigkeit; gestattet doch meine Methode, Körper noch unbekannter Constitution auf die Anwesenheit dieser Gruppe zu prüfen und die Prüfung auf Eiweissabbauproducte wie synthetische Bausteine des Eiweisses auszudehnen.

¹⁾ Diese Berichte 39, 530 [1906].

²⁾ F. Czapek, Hofmeister's Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 1, 538; 2, 557; 3, 47 [1902/03].

Stickstoffquellen,
welche eine gährungsfähige Hefe geben.

Die in der Gährungs-technik verwendeten Maischen und Würzen enthalten das Eiweiss in einem durch den Process des Mälzens und Vermaischens vorbereiteten Zustande. Dass sich schon beim Keimen der Samen Amidosäuren bilden, hat E. Schulze¹⁾ nachgewiesen. Ausserdem werden durch ein im Malz vorhandenes, Eiweiss abbauendes, Enzym sowohl die ungelösten Eiweisskörper der Gerste oder eines anderen Malzes, wie auch die Eiweissproducte des zu vermaischenden Materials, wie Kartoffeln, Mais etc., in wasserlösliche Spaltungsproducte und weiterhin in Amidosäuren abgebaut¹⁾. Wenn wir nun in Betracht ziehen, dass die Hefe bei der Gährung nach Lintner²⁾ und Wahl und Hantke³⁾ immer mehr Amidostickstoff als Proteïdstickstoff aufnimmt, so können wir den Schluss ziehen, dass sie reichlich Gelegenheit hatte, sich bei der Ernährung in solchen Fällen mit der für den Aufbau eines gährungskräftigen Plasmas wichtigen Gruppe .NH.CH.CO. zu versorgen.

Im Zusammenhang mit diesen Beobachtungen ist von Interesse, dass nach Pasteur das Albumin und nach Mayer⁴⁾ das Caseïn und Fibrin nicht von der Hefe assimiliert werden, während nach Thenard und Cholin⁵⁾ beim Stehen einer gezuckerten Albuminlösung nach drei Wochen Gährung eintrat. Durch die Anwesenheit von Bacterien fand hier eine allmähliche Spaltung des Eiweisses statt, das dadurch für die Hefe assimilirbar wurde. In welcher Weise im Albumin, Caseïn und Fibrin die für die Hefe wichtige Gruppe gedeckt ist, so dass sie nicht als Stickstoffquelle Verwendung finden kann, lässt sich noch nicht entscheiden.

Im Gegensatz dazu kann die Diastase als Stickstoffquelle dienen⁶⁾, wenn sie der einzige stickstoffhaltige Bestandtheil des Nährbodens ist. Dagegen schwanken die Angaben für das Pepsin je nach seiner Darstellung, während Ptyalin und Pankreatin sich als wirkungslos erwiesen⁷⁾.

¹⁾ Vergl. hierzu: F. Ehrlich, Zeitschr. des Vereins der deutschen Zuckerindustrie 55, 551 [1905].

²⁾ Lintner, Wochenschrift für Brauerei 1, 3 [1884].

³⁾ Wahl und Hantke, American Brewers Review 7, 32.

⁴⁾ Nach Duclaux, Traité de Microbiologie 3, 203.

⁵⁾ Ebenfalls nach Duclaux S. 203.

⁶⁾ Heintelmann, Zeitschr. für Spiritus-Industrie 20, 296 [1897]; 21, 357 [1898].

⁷⁾ Nach Duclaux, loc. cit., S. 204.

Von den organischen Stickstoffquellen mit bekannter Constitution wurde das Asparagin zuerst von Hayduck¹⁾ als vortrefflich für die Erzeugung einer gährkräftigen Hefe erkannt. Die Beobachtung wurde von anderen Autoren bestätigt²⁾. Weiterhin wirkt in demselben Sinne sehr günstig das Leucin³⁾, entgegen den früheren Angaben von Mayer in Bezug auf diesen Punkt⁴⁾. Dazu kommen nach Laurent (loc. cit.) das Glutamin.

Bokorny⁵⁾ fand schon nach zwei Tagen eine Vermehrung des Trockengewichtes eines Gramms Hefe von 0.33 g auf 0.40 g mit Glykocoll, 0.52 g mit Tyrosin, 0.61 g mit Leucin und 0.52 g mit Asparaginsäure. Angaben über die Vergärung des Zuckers macht er nicht. Bemerkenswerth ist, dass bei Albumose ein Rückgang im Gewicht der Trockensubstanz auf 0.30 g beobachtet wurde.

Von mir wurden nun noch das Glykocoll, Alanin, Leucin und Tyrosin als Stickstoffnahrung für die Zuckervergärung der Hefe geeignet gefunden. Dazu fügte ich noch die Vergärung einer Zuckerpflanzung mit Phenylamidoessigsäure, Phenylalanin und Hippursäure als Stickstoffquellen, um zu beweisen, dass die Anheftung einer Phenyl- oder Benzoyl-Gruppe keine Hinderung für die Eignung zum Aufbau eines gährkräftigen Plasmas ist, wenn nur die $\text{NH}\cdot\text{CH}\cdot\text{CO}$ -Gruppe erhalten bleibt.

Bei der Prüfung mit diesen Substanzen muss man durch Zusatz von Alkali dafür sorgen, dass die Nährlösung eine nur schwach saure Reaction zeigt. Man findet dann, dass sich die eine amidartige Verkettungsgruppe enthaltenden Körper mit Verlängerung der Kette im allgemeinen besser zum Aufbau des gährkräftigen Plasmas eignen, was sich bei gleicher Impfmenge gleicher Temperatur und Zuckerconcentration durch ein schnelleres Einsetzen der Gärung kund giebt. Dabei spielt aber die Anfügung einer Gruppe, wie Phenyl oder Benzoyl, an den Stickstoff an Stelle des Wasserstoffatoms keine Rolle. So gährt eine Leucin- oder Tyrosin-Lösung schon nach ein paar Tagen, während beim Glykocoll, der Hippursäure und der Phenylamidoessigsäure fast zwei Wochen bis zum Einsetzen der Gärung vergangen waren. Alanin und Phenylalanin lagen in ihrer Wirkung in der Mitte. Genauere Zeitangaben sind hier nicht am Platze, da die Gährwirkung einer Hefe, wie ich an anderer Stelle zeigen werde, auch innerhalb geringerer Grenzen sehr von der Concentration der Stickstoffquelle abhängig ist.

¹⁾ M. Hayduck, Zeitschr. für Spiritus-Industrie, 4, 173 [1881].

²⁾ Literatur bei La far, Handbuch der Technischen Mykologie 4, 103 [1905].

³⁾ Nach F. Ehrlich, loc. cit.

⁴⁾ A. d. Mayer, Untersuchungen über die alkoholische Gärung 1869.

⁵⁾ Th. Bokorny, Koeh's Jahresbericht 13, 238 [1904].

Zur Prüfung mit kleinen Substanzmengen dürfte sich die von Lindner¹⁾ für die Gährprüfung verschiedener Zucker angegebene Methode im hohlen Objectträger eignen.

Schliesslich entnehme ich den Angaben von Duclaux (loc. cit. S. 205), dass auch Allantoïn, Guanin und Harnsäure zur Vergährung von Zucker verwendbare Stickstoffquellen sind. Auch dem Allantoïn kommt die angeführte Gruppe zu, während Guanin und Harnsäure die ihr naheverwandte NH.C.CO. enthalten. Harnsäure erwies sich bei meiner Nachprüfung als geeignet.

Fassen wir die angeführten Resultate zusammen, so kommen wir zu dem Schluss, dass alle, bisher zur Erzeugung einer gährkräftigen Hefe tauglich befundenen Stickstoffquellen die Gruppe .NH.CH.CO. , oder die ihr naheverwandte nur mit doppelter Bindung am mittleren Kohlenstoffatom besitzen.

Nur der Harnstoff soll nach den Angaben einiger Autoren eine Ausnahme machen. Doch fand ihn Beijering²⁾ nicht verwendbar. So kann man die älteren Angaben von Mayer und die neueren von Thomas³⁾ wohl darauf zurückführen, dass beim Sterilisiren der verwandten Nährlösungen durch Erhitzen in Gegenwart der z. Th. sauren Nährsalze eine theilweise Abspaltung von Ammoniak stattgefunden hatte. Als ich eine Nährlösung, die durch Vereinigung getrennt sterilisirter Zucker-Nährsalz- und Harnstoff-Auflösung erhalten worden war, mit Hefe impfte, trat auch Gährung ein. Die so vorbereitete Harnstoffauflösung zeigte aber schon allein alkalische Reaction, während eine nicht erhitze neutral war. Ich stehe daher nicht an, auch hier eine Abspaltung von kohlensaurem Ammonium anzunehmen, wie sie nach den Angaben der Literatur beim Erhitzen von Harnstoff mit Wasser über 100° beobachtet worden ist, zumal die Hefe den Thioharnstoff, der nur schwer hydrolysiert wird, als Stickstoffquelle nicht ausnutzt⁴⁾. Hier wird also das Ammoniak zum Aufbau der gährkräftigen Hefezellen gedient haben; denn das Ammoniak nimmt unter den Stickstoffquellen der Hefe eine Sonderstellung ein. Das Ammoniumion vermag die Hefe zum Aufbau eines gährkräftigen Plasmas zu verwenden. Doch ist diese Ausnahmestellung mit einer Erschwerung für das Assimilationsvermögen der Hefe verbunden, die sich nach meinen Untersuchungen⁵⁾ erst durch die Gewöhnung an die Ammoniakaufnahme anpasst.

¹⁾ P. Lindner, Wochenschrift für Brauerei 17, 336 [1900].

²⁾ Beijering, Centralbl. für Bact. 11, 68 [1892].

³⁾ Thomas, Compt. rend. 133, 312 [1901].

⁴⁾ Kastle und Elvove, American Chemical Journal 31, 550 [1904].

⁵⁾ H. Pringsheim, Centralbl. für Bact. (Abth. II) 16, 111 [1906].

Stickstoffquellen, welche eine gährungsunfähige Hefe geben.

Die Beobachtung, dass die Hefe, durch die Stickstoffernährung beeinflusst, in Gegenwart von Zucker, ohne diesen zu vergähren, zum Wachstum kommt, machte ich zuerst an der Sulfanilsäure.

Ich verwandte für die Prüfung in diesem und allen folgenden Fällen immer eine zehnpcentige Zuckerlösung, die einen Zusatz von Salzen (0.75 g K_2HPO_4 , 0.1 g $MgSO_4$, Spuren von Chlornatrium und $FeSO_4$ pro L) und $\frac{1}{2}$ pCt. der zu prüfenden Stickstoffquelle erhalten hatte, sofern letztere bis zu einem solchen Grade löslich waren. War das nicht der Fall, so wurden Säuren durch Zusatz von Natronlauge in ihr Natriumsalz verwandelt, jedoch immer noch die für die Hefe günstige schwach saure Reaction bestehen gelassen. Anilin verwandte ich als gesättigte wässrige Lösung und als phosphorsaures Salz. In einem Falle, dem des Diphenylaminsulfates, konnte Hefewachstum erst beobachtet werden, nachdem die Schwefelsäure durch Ausfällen mit Baryumhydroxyd fast ganz beseitigt worden war.

In einer so vorbereiteten Sulfanilsäurelösung entwickelte sich nach ein paar Wochen ein merklicher Hefesatz, wenn die sterile Lösung mit einer Oese Logos-Hefe geimpft wurde. Eine Abgabe von Gas war nicht zu beobachten. Beim Abimpfen dieser Hefe auf Most trat in der gewöhnlichen Zeit von zwei bis drei Tagen Gärung ein. Wurde der Sulfanilsäure-Zuckerlösung eine andere Stickstoffquelle in Gestalt von Pepton, Asparagin, schwefelsaurem Ammonium oder dem später für diese Prüfung von mir immer verwandten Ovos, einem Hefextract-product, das sich als Nährstoff im Handel findet, zugegeben, so trat Gärung in der zu erwartenden Zeit ein.

Genau diese Erscheinung trat auf, wenn statt Logos-Hefe andere vom Typus Froberg oder Saaz und eine Weinhefe, Oppenheimer Kreuz, verwandt wurden. Auch liess sich auf Traubenzuckerlösung bei alleiniger Anwesenheit von Sulfanilsäure als Stickstoffquelle gleichfalls keine Gärung beobachten, sodass also nicht der Mangel an Invertin die Ursache für das Ausbleiben der Vergärung des Rohrzuckers gewesen war.

Zuerst wurden nun Substanzen geprüft, welche eine der Sulfanilsäure analoge oder ähnliche Zusammensetzung haben, wie Metanilsäure (*m*-Amidobenzolsulfosäure) und Naphthionsäure (1.4-Amidonaphthalinsulfosäure). Dann ging ich zum unsubstituirten Anilin, frei und als Phosphat verwandt, über. Der Einfluss der Sulfogruppe war also nicht maassgebend. Darauf schaltete ich zwischen den Benzolring und die Amidogruppe eine -CO-Gruppe durch Verwendung von Benzamid und eine - CH_2 -Gruppe im Benzylamin. Weiterhin prüfte ich

die CO.NH_2 -Gruppe ohne Benzolanhang im Acetamid und die substituierte Phenylamingruppe im Acetanilid. Immer trat in Gegenwart von *Ovos* Gährung, ohne *Ovos* schwache Hefeentwicklung ohne sichtbare Gährung ein.

Weiterhin ging ich zum Methylanilin und Diphenylamin als secundären Aminen über, um schliesslich über das tertiäre Amin im Dimethylanilinchlorhydrat zum im Ring enthaltenen Pyridinstickstoff zu gelangen. Eine Aenderung wurde auf diese Weise nur in Bezug auf die Menge der gebildeten Hefe erlangt.

Das Resultat dieser Beobachtungen wurde dann noch genau geprüft, indem ich nach Wochen langem Stehen der Culturen eine geringe Menge aus der verwandten Lösung abdestillirte und nach Lieben auf Alkohol im Destillat prüfte. In keinem Falle erhielt ich eine scharfe Jodoformreaction, einige Male einen mehr oder minder scharfen Geruch nach Jodoform, der jedenfalls auf eine nur geringe Bildung von Alkohol hindeutete. Auch ist die Annahme gestattet, dass die Hefe aus ihren zahlreich anwesenden todtten Zellen im Laufe der Zeit Stickstoffsubstanzen abspaltete, die frisch wachsenden Zellen den Aufbau eines gahrungskraftigen Plasmas gestatten würden.

Die Prüfung liesse sich natürlich noch auf eine unbeschränkte Anzahl von organischen Stickstoffverbindungen ausdehnen, die für die Hefe keine Gifte sind. Das Resultat würde dadurch jedoch schwerlich geändert; denn die wichtigsten Gruppen sind in den von mir gewählten Verbindungen enthalten. Complicirter zusammengesetzte organische Körper würden gewiss zum Aufbau eines gährkräftigen Hefeplasmas noch weniger geeignet sein, wenn sie für diesen Zweck wichtige Gruppierungen von Atomen nicht enthalten. Man muss hierbei besonders in Berücksichtigung ziehen, dass ich die der NH.CH.CO -Gruppe nachstehenden Atomencomplexe, wie CH.CO.NH ., $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO.NH}$., $\text{C}_6\text{H}_5\text{.NH.CO}$. und $\text{C}_6\text{H}_5\text{.CH}_2\text{.NH}$., geprüft habe.

Zieht man noch in Betracht, dass salpetersaure Salze für die Hefe auch keine geeignete Stickstoffquelle sind, so darf man berechtigtermaassen annehmen, dass die sich von ihm ableitenden Nitrokörper und weitere, diesen nahestehenden Verbindungen sich gleichfalls negativ verhalten. Doch bedarf dies noch einer Nachprüfung.

Zum Schluss gebe ich eine Tabelle, welche einen Vergleich zwischen der Zahl der in der Volumeneinheit gebildeten Hefezellen mit verschiedener Stickstoffernährung gestattet, um dadurch zu zeigen, dass das Ausbleiben der Zuckervergahrung nicht auf die geringe Zahl der gebildeten Hefezellen zurückzuführen ist. Die Vergleichsresultate mit Hefezahlen, die auf zur Gährung geeigneter Stickstoffquelle erhalten wurden, sind einer später von mir zu veröffentlichenden Arbeit

entnommen. Ich möchte aber besonders hervorheben, dass die angegebenen Zahlen nur wegen des besagten Grundes angeführt wurden. Sie haben keinen absoluten Werth; denn eine geringe Aenderung in der Zuckerconcentration, der Lüftung, dem Säuregrad oder der Concentration der Stickstoffquelle hätte sicher einen grossen Einfluss auf die Zahl der gewachsenen Hefezellen gehabt. Der relative Vergleich ist werthvoll, der absolute zweckwidrig!

Vergleich zwischen der Anzahl Zellen in Millionen pro ccm. Nährlösung mit Stickstoffquellen, die gährungsunfähiges und gährungsfähiges Plasma geben.

Acetamid	6.3	} Logos- Hefe	(NH ₄) ₂ SO ₄	16.4	} nach Ver- gäh- rung einer 15-pro- centigen Zucker- lösung
Pyridinchlorhydrat	2.0		0.047 pCt.		
Naphtbionsäure	9.0		(NH ₄) ₂ SO ₄	18.7	
Dimethylanilin- chlorhydrat	2.7		(NH ₄) ₂ SO ₄	14.8	
Metanilsäure	1.7		Leucin	23.7	
			0.044 pCt.	Logos- Hefe	
			Asparagin	21.5	Logos- Hefe
			0.429 pCt.		

Vergleicht man in der Tabelle die Zahlen der Hefezellen, welche auf verschieden wirkenden Stickstoffnährmedien erzielt wurden, z. B. die von 9 Millionen pro ccm bei Naphtionsäure mit 14.8 Millionen pro ccm mit 0.378 pCt. (NH₄)₂SO₄, so sieht man, dass diese nicht für das Ausbleiben einer wenigstens theilweisen Zuckervergähmung bei der Ernährung mit der Stickstoffquelle ohne .NH.CH.CO. Gruppe ausschlaggebend waren.

Das zusammenfassende Resultat aller Beobachtungen gipfelt daher in dem schon zuerst aufgestellten Satze, der besagt, dass alle gährkräftigen Hefen mit Stickstoffquellen ernährt wurden, die in ihrem Molekül die für den Eiweissaufbau so wichtige .NH.CH.CO. Gruppe enthalten, während alle anderen geprüften Stickstoffquellen, die keine solche Gruppe besitzen, zwar häufig der Hefe eine Vermehrung, nie aber den Aufbau eines gährkräftigen Plasma gestatten. Ich schlage daher zur Prüfung von Körpern, die dem Eiweiss nahe stehen, die angegebene biologische Analyse für die Anwesenheit der amidartigen Verkettungsgruppe vor.

Göttingen, den 21. October 1906.