

c) „Dipantothenal“ zeigt keine Wachstumswirkung auf *Lactobacillus Casei*. Dagegen erhielt Dr. J. S. D. Bacon<sup>14)</sup> die folgenden Resultate, wenn er das Produkt an Ratten, die an Pantothensäuremangel litten, verfütterte: Durchschnitts Gewichtszunahme am Ende der dritten Woche, ber. g/Woche, Kontrolle 8.4; mit 100 µg tägl. Pantothensäure 20.1; mit 200 µg tägl. „Dipantothenal“ 19.2; mit 100 µg tägl. Pantothensäure + 200 µg tägl. „Dipantothenal“ 21.1.

## 120. Fritz Reindel und Walther Hoppe: Über die stickstoffhaltigen Ausscheidungsprodukte der Hefe\*)

[Aus dem Institut für landwirtschaftliche Technologie Weihenstephan der Technischen Hochschule München]

(Eingegangen am 14. März 1952)

Auf Grund von Versuchsreihen wurde ein Stickstoff-Stoffwechsel bei der Hefe nachgewiesen, der im besonderen Falle einen rein exkretorischen Charakter hat. Ferner wurde ein biologischer Zusammenhang zwischen Stickstoffausscheidung, Stickstoffaufnahme und Zuckerverbrauch beim Hefewachstum festgestellt.

Die analytische Untersuchung der stickstoffhaltigen Hefeausscheidungsprodukte hat das Vorhandensein von Aminosäuren und niedrigen Peptiden (Oligopeptiden) neben anderen stickstoffhaltigen Stoffen noch unbekannter Natur ergeben. Mit Hilfe der Papierchromatographie und der Elektrophorese konnte das Aminosäuregemisch in 11 Komponenten zerlegt werden, wovon einige basischen und sauren, die Mehrzahl jedoch neutralen Charakter haben.

Neben dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel hat die Hefe einen gesteigerten Stoffwechsel stickstoffhaltiger Verbindungen, worauf schon ihr hoher Gehalt an Eiweiß hinweist, der 50% und darüber in der Trockensubstanz betragen kann. Weniger bekannt ist die schon früh vermutete, später auch experimentell festgestellte Tatsache, daß die Hefe sowohl unter Bedingungen der anaeroben alkoholischen Gärung, wie auch unter den Bedingungen starker Lüftung N-haltige organische Verbindungen an das Substrat zurückgibt.

L. J. Thenard<sup>1)</sup> spricht als erster von einem Stickstoffverlust, den die Hefe bei der Gärung erleiden soll, ohne daß er mit den damaligen Mitteln seine Ansicht stützen konnte. Auch L. Pasteur<sup>2)</sup> hat sich mit dieser Frage befaßt; ein exakter Beweis für die Ausscheidung der stickstoffhaltigen organischen Stoffe gelang ihm aber nicht. Um das Problem der experimentellen Bearbeitung zugänglich zu machen, bedurfte es einer zusätzlichen Erkenntnis, die der Schüler L. Pasteurs, J. Ducleaux<sup>3)</sup>, (soviel wir sehen können, zuerst) gemacht hat. Er zeigte, daß die Hefe auch einen Zucker vergären kann, wenn ihr der Stickstoff in Form von Ammoniumtartrat zugeführt wird. Es war Ducleaux unter diesen Bedingungen möglich, experimentell zu zeigen, daß die Hefe organische Stickstoffverbindungen in das Substrat ausscheidet.

<sup>14)</sup> Gegenwärtig Department of Biochemistry, University, Sheffield.

\*) Die vorliegende Arbeit widme ich meinem verehrten Lehrer, Geheimrat Professor Dr. Heinrich Wieland zu seinem 75. Geburtstag in Dankbarkeit für die mir während meiner Studien- und Assistentenzeit in so reichem Maße erwiesene Förderung.

F. Reindel.

<sup>1)</sup> A. 46, 29 [1803].      <sup>2)</sup> Ann. Chim. analyt. appl. [3] 58, 388 [1860].

<sup>3)</sup> Doktor-Dissertat., Paris 1865.

Seit dieser Zeit ist die Erscheinung von vielen Forschern studiert worden. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben, seien genannt: F. Ehrlich<sup>4)</sup>, H. Pringsheim<sup>5)</sup>, M. Rubner<sup>6)</sup>, H. Nielsen<sup>7)</sup>, H. Lampitt<sup>8)</sup>, H. Claassen<sup>9)</sup> bis herauf zu H. Fink<sup>10)</sup>, der zuletzt 1939 eine kurze Arbeit hierüber veröffentlicht hat. Sie befaßt sich mit dem Verhalten einer speziellen Wuchshefe der *Torulopsis utilis*. Von den meisten Bearbeitern wird dabei zunächst die Höhe der N-Ausscheidung in Beziehung gesetzt zu dem N-Gehalt der am Schluß des Versuches vorhandenen Hefe. Bei den Kulturhefen (*Saccharomyces*) schwankt nach den Angaben die Ausscheidung zwischen 7 und 15,5% des in der Erntehefe enthaltenen Stickstoffs, während bei ausgesprochenen Wuchshefen die Menge des ausgeschiedenen organischen Stickstoffs auf 0,75 bis 3,2% zurückgeht<sup>10)</sup>.

Dabei ist immer wieder die Frage aufgeworfen worden, ob es sich bei den Ausscheidungsprodukten um physiologische Stoffwechselprodukte oder um Produkte beginnender Autolyse der Hefezelle handelt. Die übereinstimmende Auffassung geht jedoch dahin, daß die N-Ausscheidung eine notwendige Folge der Gärung bzw. des Wachstums der Hefezelle darstellt, also rein physiologischen Charakter besitzt. Manche Bearbeiter ziehen direkte Parallelen mit dem Eiweißstoffwechsel im Säugetierorganismus und sprechen demgemäß von einer „Abnützungquote“<sup>11)</sup>.

Weniger einheitlich sind die Auffassungen darüber, ob die ausgeschiedenen Produkte von einer neuen Hefe wieder verwertet werden können. Die meisten Forscher sind der Ansicht, daß dies nicht der Fall ist, doch finden sich auch gegenteilige Auffassungen, z. B. bei H. Claassen<sup>12)</sup> und H. Lampitt<sup>8)</sup>.

Bezüglich der chemischen Natur der Ausscheidungsprodukte liegt es von vornherein nahe, dieselben als Eiweißkörper, Oligopeptide oder Aminosäuren zu betrachten. H. Fink<sup>10)</sup> bestätigt in dieser Hinsicht eine Angabe von N. Nielsen, daß ein Teil des Stickstoffs formoltitrierbar ist. Betrachtet man die Ausscheidungsprodukte als Aminosäuren, so ergibt sich die wichtige Frage: Warum scheidet die Hefe Aminosäuren aus und wieso sind sie nicht mehr von der Hefe verwertbar, nachdem doch eine Mischung von Aminosäuren eine ausgezeichnete Stickstoffquelle für Hefe darstellt, wie wir das hauptsächlich aus den Arbeiten von R. S. W. Thorne<sup>13)</sup>, N. Nielsen<sup>14)</sup>, V. Hartelius<sup>15)</sup> wissen<sup>16)</sup>.

Im Laufe der seit Jahren am Institut für landwirtschaftliche Technologie über Preßhefe durchgeführten Arbeiten, die entweder dem Rhythmus der Aufnahme der einzelnen Nährstoffe durch die Hefezelle gewidmet waren, oder die synthetischen Fähigkeiten der Hefezelle (Sterinsynthese) im Verlauf ihrer Züchtung zum Ziele hatten, mußten wir uns auch mit der Frage der N-haltigen Ausscheidungsprodukte der Hefe befassen. Dabei konnten wir nicht nur gewisse Widersprüche in den bisherigen Ansichten klären, sondern durch Aufstellung genauer N-Bilanzen und Anwendung inzwischen bekanntgewordener verbesserter Verfahren (Papierchromatographie, Ionophorese) einen weiteren Einblick in die Zahl und die Natur der Ausscheidungsprodukte gewinnen.

Das Prinzip unserer Arbeitsweise besteht im folgenden: Frische abgepreßte Hefe (wir verwendeten die Brennerihefe Rasse W4 und eine Bäckerhefe der

<sup>4)</sup> Jahrb. d. Versuchs- u. Lehrbrennerei in Berlin, Bd. X, S. 515.

<sup>5)</sup> Biochem. Ztschr. **3**, 121 [1907].

<sup>6)</sup> Die Ernährungsphysiologie der Hefezelle bei alkohol. Gärung, Verlag Veit & Co., Leipzig [1913].

<sup>7)</sup> Wschr. Brauerei **54**, 173 [1937], **53**, 217 [1936]; C. 1934 II, 3131; Biochem. Ztschr. **299**, 1 [1938], **300**, 59 [1938]. <sup>8)</sup> Biochem. Journ. **13**, 459 [1919].

<sup>9)</sup> Ztschr. Spiritusindustrie **53**, 440 [1936]. <sup>10)</sup> Biochem. Ztschr. **301**, 13 [1939].

<sup>11)</sup> M. Rubner, s. Fußnote <sup>6)</sup>, S. 289. <sup>12)</sup> Ztschr. angew. Chem. **39**, 443 [1936].

<sup>13)</sup> Journ. Ind. Brewing **39**, 597 [1933]; C. 1934 I, 1254, 1937 II, 2022.

<sup>14)</sup> C. 1934 II, 3131. <sup>15)</sup> Biochem. Ztschr. **299**, 317 [1938].

<sup>16)</sup> Vergl. a. die Zusammenfassung von R. Illies, Wschr. Brauerei **55**, 414 [1938].

Fa. Wieninger, Rittsteig bei Passau) wurde als Stellhefe in einer reinen Saccharose-Lösung, die nur die N-freien Nährsalze nach R. S. W. Thorne<sup>17)</sup> enthielt, durch Vorgabe oder Zulauf genau bekannter Mengen anorganisch gebundenen Stickstoffs (Ammoniumsulfat bzw. Ammoniakwasser) unter Durchlüftung mit feinverteilter Luft in einem Belüftungsgefäß<sup>18)</sup> herangezüchtet und nach Verbrauch des Zuckers und Ausreifung der Hefe (Dauer etwa 10 Stdn.) durch ein Entkeimungsfilter (Seitz, Kreuznach) von dem Substrat quantitativ getrennt. Das  $p_H$  wurde bei 5 bis 5.2 gehalten und durch Zugabe von Natronlauge, in späteren Versuchen durch wäßriges Ammoniak reguliert; die Temperatur betrug 28–30°.

Es ist bekannt die Menge Stickstoff, die mit der Stellhefe in den Versuch eingebracht wurde (Kjeldahl-Bestimmung), ferner die Menge des während des Versuchs zugegebenen anorganischen Stickstoffs. Diese Stickstoffmengen finden sich am Ende des Versuchs vor:

1. in der Erntehefe (Kjeldahl),
2. im Substrat als Gesamtstickstoff (Kjeldahl); dieser unterteilt sich in nicht-verbrauchten anorganischen Stickstoff (Bestimmung durch Destillation mit einem Überschuß von  $n/_{10}$  NaOH i. Vak.) und in den organischen, von der Hefe ausgeschiedenen Stickstoff, als Differenz zum Gesamtstickstoff im Substrat bestimmt.

Die für den Versuch verwendete Stellhefe muß vor Einsatz in den Versuch viermal mit der fünffachen Menge dest. Wassers vom  $p_H$  5.1 aufgeschlämmt und jedesmal scharf abgesaugt werden. Sie gibt nach dieser Behandlung keinen Stickstoff mehr an das Wasser ab, auch dann nicht, wenn sie belüftet wird. Diese in zahlreichen Vorversuchen festgestellte Tatsache ist übrigens ein erster Hinweis darauf, daß die Stickstoffabgabe an das Substrat nur im Zusammenhang mit der Gärung oder dem Wachstum der Hefe stattfindet, also eine rein physiologische Reaktion darstellt.

Wir haben zuerst mit einer kleinen, nur 1 l fassenden Versuchsanordnung gearbeitet, die hauptsächlich der Einarbeitung auf die Methodik der Versuche diente. Die unter verschiedensten Versuchsbedingungen mit verschiedenen Heferassen durchgeführten Versuche zeigten, daß der ausgeschiedene organische Stickstoff, bezogen auf den in der Erntehefe vorhandenen Stickstoff, 2.1 bis 10% betrug. Vor allem aber zeigten diese Vorversuche, daß der eingesetzte Stickstoff analytisch nahezu restlos wiedergefunden wurde.

Im weiteren Verlauf ergab sich die Notwendigkeit, zu Versuchen im größeren Maßstab überzugehen, und zwar nicht nur, um die analytische Sicherheit zu erhöhen, sondern vor allem um durch zeitweise Entnahme von Proben die Stickstoffausscheidung in Beziehung zu bringen zum Zuckerverbrauch, zur Stickstoffaufnahme, zum mikroskopischen Bild und anderen Faktoren. Daneben bot sich auch die Möglichkeit, durch Vakuumverdampfung des filtrierten Substrats die ausgeschiedenen Stickstoffsubstanzen zu konzentrieren und so in den Bereich der chemischen Charakterisierung, ja vielleicht der Identifizierung zu bringen.

Wir verwendeten eine Belüftungsapparatur mit einem Fassungsraum von 20 l, die es uns ermöglichte, mindestens 500 g Saccharose und 100 g Preßhefe zum Einsatz zu bringen, die außerdem mit einer elektrischen Innenheizung, einer Kühlmöglichkeit, einer Vorrichtung zur Entnahme von Proben versehen war und überdies mit einem  $p_H$ -Schreib-

<sup>17)</sup> Wschr. Brauerei 51, 3 [1934].    <sup>18)</sup> W. Hoppe, Doktor-Dissertat., München 1950.

gerät zur automatischen Registrierung des  $p_{\text{H}}$ -Verlaufs in Verbindung gebracht werden konnte. Die für die Durchführung dieser Versuche im großen Maßstab benötigte Saccharose wurde aus käuflichem Rübenzucker durch Reinigung mit Aktivkohle vollkommen von kleinen Stickstoffmengen befreit. Es genügt hierzu, einen Liter einer 10-proz. Rübenzucker-Lösung mit 10 g Aktivkohle 1 Stde. zu rühren und abzufiltrieren, um eine N-freie Saccharose zu erhalten. Ebenso wurden größere Mengen einer Preßhefe (Wieninger) nach der oben bereits angegebenen Vorschrift gereinigt, um auf alle Fälle für eine längere Versuchsreihe vollkommen gleichartige Hefe einsetzen zu können. Es hat sich bei den Versuchen im kleinen Maßstab gezeigt, daß für die Reproduzierbarkeit der Versuche die Verwendung einer einheitlichen Hefe der gleichen Rasse die Grundvoraussetzung ist. Eine nach unserer Vorschrift gereinigte Hefe hält sich im Eisschrank 3 bis 4 Wochen unverändert.

Nachdem wir zunächst nach dem sogenannten Zulaufverfahren gearbeitet hatten, einer Arbeitsmethodik, die der Technik der Preßhefegewinnung entstammt, sind wir davon bald wieder abgekommen, da das dabei sich ständig verändernde Substratvolumen die Durchführung einer Stickstoffbilanzierung allzusehr erschwerte. Die den Versuchen der Tafel 1 (S. 720) zugrunde liegende Arbeitsweise gestaltet sich daher wie folgt:

5 l einer Nährlösung nach R. S. W. Thorne<sup>17</sup>), enthaltend 500 g gereinigte Saccharose und 5 l dest. Wasser, wurden mit der in der Tafel 1 angegebenen, vorgereinigten Stellhefemenge und der in Zeile 2 angegebenen Menge Ammoniumsulfat in das Hefegefäß gebracht. Die durch einen Rotamesser bestimmte Luftmenge betrug anfangs je Stde. 200 l, zur Zeit der Hauptvermehrung der Hefe 600 l, am Schluß wieder 200 l. Die im Zulauf gegebene Menge wäbr. Ammoniak-Lösung diente zur Aufrechterhaltung des  $p_{\text{H}}$ , das konstant bei 5.1 gehalten wurde; Temperatur 28–30°. Der Versuch wurde dann abgebrochen, wenn der Zucker verbraucht war. Durch das Hindurchleiten größerer Mengen feinverteilter Luft bei 28–30° treten naturgemäß Verdunstungsverluste auf, die, wie sich in der Praxis der Versuchsdurchführung zeigte, durch den für die  $p_{\text{H}}$ -Regulierung notwendigen Zufluß von wäbr. Ammoniak ausgeglichen wurde, so daß die Konstanthaltung des Substratvolumens bei 10 l bis auf kleine Beträge gewährleistet war. Nach Abschluß jeden Versuchs wurde die Hefe zuerst durch eine Hefezentrifuge vom Substrat abgetrennt und hierauf auf einer Porzellannutsche scharf abgessaugt und analysiert (Trockensubstanz, N-Gehalt). Das Substrat wurde durch Filtration durch ein Seitz-Entkeimungsfilter von jeder Hefezelle befreit und durch Vakuumverdampfung ( $t=20-25^{\circ}$ ) auf ein Volumen von 100 ccm gebracht.

Die Tafel 1 zeigt das Ansprechen der Stickstoffausscheidung auf gleiche und verschiedene Versuchsbedingungen.

Der Versuch Nr. 1 ließ erkennen, daß die eingesetzte Stellhefemenge zu klein war, da der Zucker erst nach 48 Stdn. verbraucht war, während wir anstrebten, die Versuche in einer Zeit von 10 Stdn. durchzuführen. Bei den Versuchen Nr. 2 und 3, mit größerer Stellhefemenge durchgeführt, ist dieses Ziel im großen und ganzen erreicht worden. Sie wurden im übrigen unter genau gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt und zeigen in ihrem Ergebnis, insbesondere in bezug auf die Stickstoffausscheidung, wie scharf die Versuche reproduzierbar sind, wenn man von biologisch einheitlicher Stellhefe ausgeht. Beim Versuch Nr. 4 wurde die Hefe ohne jeden anorganischen Stickstoff ernährt ( $p_{\text{H}}$  Regulierung mit  $n\text{NaOH}$ ). Der Zucker war erst nach 72 Stdn. verbraucht, die Ertehefe hat nur um 80% an Gewicht zugenommen, ist im prozentualen Stickstoffgehalt erheblich ärmer geworden (1.09% gegen 1.75%; bzw. von 6.2% auf 3.16% in Hefe-Trockensubstanz) und hat in Bestätigung der schon in den Vorversuchen gemachten Feststellungen trotzdem 6.18% Stickstoff an das Substrat abgegeben. Interessant und in gewisser Hinsicht überraschend sind die Ergebnisse des Versuchs Nr. 5. Hier wurde die Hefe zwar mit Ammoniakstickstoff ernährt (nach den Bedürfnissen der  $p_{\text{H}}$ -Regulierung), aber ohne die sonstigen Nährsalze nach R. S. W. Thorne<sup>17</sup>). Die Hefe vermehrt ihr Gewicht nur

Tafel I. Versuchsbilanz von Verhefungsversuchen unter verschiedenen Bedingungen. Wienerer Preßhefe, konstantes Substrat-Vol.; bei 500 g Zucker 10 l, bei 300 g Zucker 6 l, pH 5.1, Temp. 28–30°

	Versuch Nr.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	500	500	500	500	500	300	300	300	300	300
2	0.606	0.542	0.542	—	—	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
3	6.146	8.38	8.44	—	—	4.487	4.708	4.485	4.182	4.061
4	50	120	120	120	120	70	70	70	70	70
5	(57.5)	(130.5)	(130.5)	(135)	(135)	(77.3)	(77.3)	(77.3)	(77.3)	(77.3)
6	28.9	27.3	27.3	28.3	28.2	27.6	27.6	27.6	27.6	27.6
7	1.96	1.70	1.70	1.77	1.77	1.97	1.97	1.97	1.97	1.97
	0.979	2.04	2.04	2.10	2.12	1.379	1.379	1.379	1.379	1.379
8	182	340	340	180	162	150	165	146	150	158
9	(262)	(416)	(393)	(248)	(198.5)	(190)	(195)	(185)	(192)	(185.5)
10	36.1	30.6	29.0	34.5	30.75	31.7	29.7	31.7	32.1	29.4
11	2.95	2.55	2.53	1.09	1.94	2.62	2.66	2.79	2.64	2.71
	5.347	8.67	8.60	1.96	3.14	3.93	4.39	4.02	3.96	4.27
12	204.5	285.5	262.5	113	63.5	112.7	117.7	107.7	114.7	108.2
13	4.366	6.63	6.56	—	1.02	2.552	3.011	2.641	2.581	2.891
14	2.186	2.395	2.390	0.121	3.59	0.857	1.922	2.048	1.923	1.401
15	1.730	2.081	2.090	—	2.83	0.488	1.729	1.823	1.764	1.006
16	0.456	0.314	0.300	0.121	0.76	0.369	0.193	0.225	0.189	0.395
17	8.52	3.62	3.49	6.18	24.2	9.39	4.40	5.6	4.02	9.26
18	2.56	0.03	0.29	0.91	1.80	1.09	1.63	2.04	0.14	1.71

\*) EK-Filtrat = durch Seitz-Filter entkeimtes Filtrat.

mehr um 50% und gibt den höchsten von uns festgestellten Wert von 24.2% N in organischer Form an das Substrat ab. Man könnte geneigt sein, diese hohe Ausscheidungsquote als Zeichen beginnender Autolyse zu betrachten. Das mikroskopische Bild und sonstige, physiologische Eigenschaften geben aber nicht den mindesten Anhaltspunkt für diese Auffassung. Die Hefe reagiert vielmehr auf die erwähnten Bedingungen mit einem sehr gesteigerten Stickstoffumsatz. Der Versuch Nr. 6 ist in seinen Bedingungen mit Nr. 2 und 3 zu vergleichen, jedoch wurde eine neue Stellhefe der gleichen Firma (Wieninger) eingesetzt. Die Versuche Nr. 7, 8, 9 und 10 hatten zum Ziel, das Verhalten der Hefe und vor allem der Stickstoffausscheidung auf Zusatz von 1 mg bzw. 5 mg krist. Biotins (Vers. 7 und 8), das Fehlen von Eisen in den Nährsalzen (Vers. 9) bzw. die Wirkung eines Überschusses von Eisen zu studieren. Ob den hierbei festgestellten Unterschieden vor allem in der Stickstoffausscheidung physiologische Zusammenhänge zugrunde liegen, könnte erst bei öfterer Wiederholung der gleichen Versuche entschieden werden.

Wir haben diese weiteren Versuche jedoch nicht ausgeführt, weil uns an einem Einblick in den zeitlichen Verlauf der Stickstoffausscheidung während des Versuchs mehr gelegen war. Wir hofften, durch das Festhalten des zeitlichen Verlaufs der Stickstoffausscheidung, der Stickstoffaufnahme und des Zuckerverbrauchs einen biologischen Zusammenhang dieser Größen zu erkennen. Zur Verwirklichung dieser neuen Arbeitsrichtung wurde aus den im vorstehenden beschriebenen Versuchen Nr. 2 bis 5 (Tafel 1) in Zeitabständen Proben entnommen, diese analysiert und ihr Ergebnis auf das Gesamtsubstrat von 10 l umgerechnet. In der Tafel 2 ist als Beispiel der zeitliche Verlauf des Versuchs Nr. 2 der Tafel 1 wiedergegeben. Übersichtlicher sind die sich aus der Tafel ergebenden Kurven (siehe Abbild. 1-4). Dabei sind die den Kurven zugrunde liegenden Zahlen der Tafel 2 in Schrägdruck eingefügt. Ferner sind im Schaubild angeführt die Gesamtstickstoffverteilung im Anfang und Endzustand und die Hefevermehrung. Der zeitliche Verlauf der Versuche 3 bis 5 wird nur mehr in Kurvenbildern wiedergegeben (Abbild. 2-4). Sie sind genau so entstanden, wie bei Versuch 2 angegeben.

Zunächst zeigt insbesondere eine Betrachtung der Kurven, daß die beiden mit gleicher Hefe unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuche (Nr. 2 und 3) nicht nur in ihrem Endergebnis (Tafel 1), sondern auch in ihrem zeitlichen Verlauf vollkommen parallel gehen. Dabei ist zu beobachten, daß unter normalen Ernährungsbedingungen für die Hefe die Abgabe von organischem Stickstoff an das Substrat nach der 2. Stunde regelmäßig absinkt, um von der 6. Stunde ab wieder anzusteigen. Interessanterweise fallen diese beiden Zeitpunkte zusammen mit dem Beginn der Sproßtätigkeit, also der Hefevermehrung und dem Aufhören der Sprossung beim Übergang in den Ausreifeszustand der Hefe. Auf Grund weiterer Versuche, die wir in dieser Richtung ausgeführt haben, glauben wir hier einen ersten Zusammenhang zwischen Lebenstätigkeit der Hefe und Stickstoffausscheidung experimentell gezeigt zu haben. Starke Hefevermehrung scheint verbunden zu sein mit verringertem Stickstoffabgabe an das Substrat<sup>19)</sup>, daher scheiden auch ausgesprochene Wuchshefen, z.B. *Torulopsis utilis*, nur verhältnismäßig wenig aus (s. H. Fink<sup>10)</sup>). Die Kurvenbilder (Abbild. 3 u. 4) geben den zeitlichen Ver-

<sup>19)</sup> Über eine weitere Stütze dieses Zusammenhangs vergl. eine Versuchsreihe: W. Hoppe, Dissertat., Techn. Hochschule München 1950, S. 74-79.

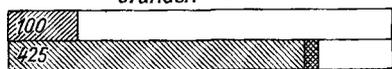
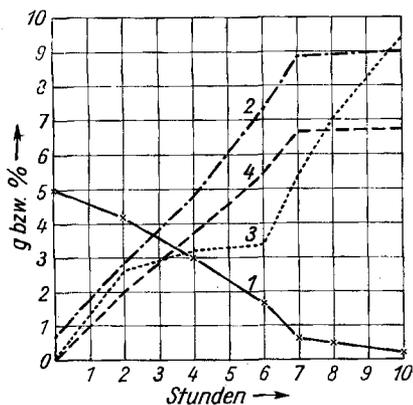
Tafel 2. Zeitlicher Verlauf des Verhefungsversuches Nr. 2 (s. Tafel 1) mit Stickstoffbilanz zu verschiedenen Zeiten

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	0	2	4	6	7	8	10	24
2	5.00	4.25	3.08	1.59	0.64	0.53	0.14	0.00
3	0	2.33	4.23	6.68	8.29	8.35	8.38	8.38
4	0.54	2.87	4.77	7.32	8.83	8.89	8.92	8.92
5	2.58	4.91	6.81	9.26	10.87	10.93	10.96	10.96
6	6.45	12.30	17.00	23.10	27.20	27.30	27.40	27.40
7	6.53	12.23	17.19	22.98	27.35	27.58	27.65	27.71
8	1.32	1.70	2.71	4.42	5.72	5.81	5.87	5.90
9	1.30	1.48	2.45	4.14	5.28	5.23	5.09	5.08
10	0.02	0.22	0.26	0.28	0.44	0.58	0.78	0.82
11	5.21	10.53	14.48	18.56	21.63	21.77	21.78	21.81
12	0.044	2.16	3.74	5.37	6.60	6.65	6.67	6.68
13	0.008	0.088	0.104	0.112	0.176	0.232	0.312	0.328
14	0.39	2.09	1.80	1.51	2.04	2.66	3.58	3.76
15	+1.1	-0.53	+1.12	+0.08	+0.03	+1.02	+0.91	+1.13

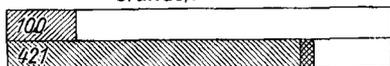
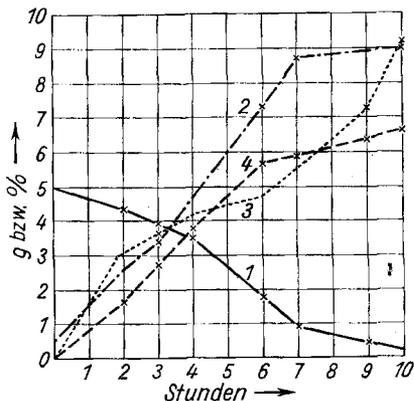
\*) 100 cem NH<sub>3</sub> = 1.167 g N.

\*\*) EKF = durch Seitz-Filter entkeimtes Filtrat.

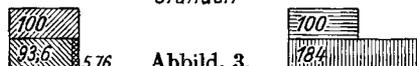
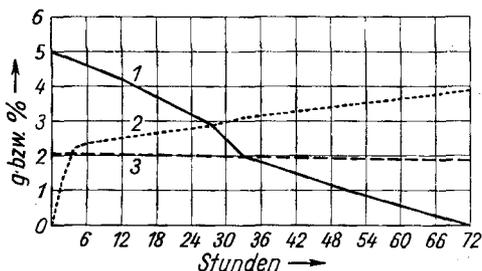
\*\*\*) Der mit der Stillehefe in den Versuch eingebrachte N beträgt für 10 l 2.04 g (s. Vers. Nr. 2, Tafel 1).



Abbild. 1.



Abbild. 2.



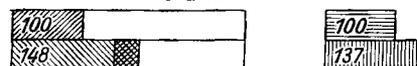
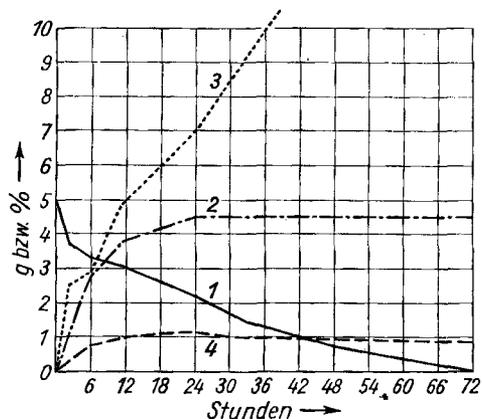
Abbild. 3.

- Anorganischer Stickstoff,
- Stellhefestickstoff,
- Erntehefestickstoff,
- Organischer, ausgeschiedener Stickstoff,
- Stellhefege wicht;
- Erntehefegewicht

Die ersten Blöcke der Abbildungen bedeuten die Stickstoffbilanz der Versuche, wobei der Stellhefestickstoff gleich 100 gesetzt wurde. Die zweiten Blöcke zeigen die unter den angegebenen Versuchsbedingungen erreichte Hefevermehrung (Stellhefege wicht ist gleich 100).

- 1.) ——— Zucker, % in der Lösung
- 2.) - - - - gebotener N (100 % anorganisch) in g
- 3.) ····· organischer, von der Hefe ausgeschiedener N in g × 30
- 4.) - - - - Stickstoffzuwachs der Hefe

Abbild. 1-4.



Abbild. 4.

Kurvenmäßige Darstellung des zeitlichen Verlaufs von Verhefungsversuchen unter verschiedenen Versuchsbedingungen

lauf der Versuche 4 und 5 (Tafel 1) wieder, wobei die Hefe einmal in Abwesenheit von Stickstoff (Abbild. 3), das andere Mal in Abwesenheit von Nährsalzen herangeführt wurde (Abbild. 4). Besonders das Bild 4 zeigt anschaulich, daß die unter diesen Bedingungen stark verminderte Sproßtätigkeit zu einer wesentlich vermehrten Ausscheidung von Stickstoff führt. Es sei noch darauf hingewiesen, daß bei diesem Versuch die Probenahme in wesentlich größeren Abständen erfolgte.

Sowohl bei den (im einzelnen nicht angeführten) Vorversuchen im 1-*l*-Maßstab wie bei den in größerem Maßstab durchgeführten Versuchen der Tafel 1 (Vers. Nr. 4) wurde eine Verhefung ausgeführt, bei welcher die Hefe ohne jeden anorganischen Stickstoff ernährt wurde; diese Ernährungsbedingungen sind als anormal zu bezeichnen. Daß die Hefe darauf mit einer geringeren Vermehrung reagiert, ist eine langbekannte Tatsache, die auch in der Praxis der Hefefabrikation ihre Bestätigung findet. Weniger beachtet wurde bisher, daß die Hefe, wie unsere vorstehend beschriebenen Versuche zeigen, auch unter diesen Bedingungen organischen Stickstoff an die Nährlösung abgibt, und zwar im gleichen Betrag, wie eine normal ernährte Hefe.

Aber nicht nur Stickstoffausscheidung, sondern auch Stickstoffaufnahme stehen im Zusammenhang mit der Zuckerkonzentration. Sehr deutlich ist aus den Kurven (Abbild. 1 u. 2) zu ersehen, daß die Stickstoffaufnahme zum Erliegen kommt, wenn die Zuckerkonzentration unter 1% sinkt. Hiermit ist gleichzeitig ein Aufhören der Sproßtätigkeit der Hefe verbunden, doch muß für diese Umstellung auch dem inzwischen gebildeten Alkohol ein maßgebender Einfluß zugebilligt werden, der durch die Lüftung nur geringfügig entfernt wird. Auf das Fehlen der übrigen Nährsalze überhaupt ist es zurückzuführen, wenn im Versuch Nr. 5 (Abbild. 4) die Stickstoffaufnahme schon bei einer Zuckerkonzentration von 2.5% zum Stillstand kommt.

Wir haben nun eine Versuchsreihe angesetzt, die den Zweck hatte, festzustellen, wie oft eine Hefe in stickstoffreier Nährlösung wieder verwendet werden kann, bis die Stickstoffausscheidung zum Erliegen kommt oder sonst eine entscheidende Änderung im Stoffwechsel (vielleicht eine Autolyse) eintritt. Das Wesen dieser neuen Versuchsreihe geht am besten aus der Versuchsanstellung hervor:

20 g einer vorgereinigten Wienerer Preßhefe wurden zusammen mit 1000 ccm Nährlösung nach R. S. W. Thorne<sup>17)</sup> in einen 2 l fassenden Erlenmeyer-Kolben gegeben, der mit einem mit konz. Schwefelsäure gefüllten Gärschluß versehen war. Die Gärung wurde bei 30° im Thermostaten durchgeführt und der Fortgang des Zuckerverbrauchs sowie der Endpunkt durch Wägung bestimmt. Nach Beendigung der Gärung wurde die Hefe unter Verwendung eines Seitzschen EK-Filters vom Substrat getrennt und ein kleiner Teil der Hefe sowie 25 ccm des hefefreien Substrats zur Analyse entnommen. Das Restsubstrat wurde zur Entfernung des Alkohols i. Vak. auf die Hälfte eingeeengt, mit stickstofffreiem Rohrzucker versetzt, auf 1000 ccm aufgefüllt und mit 20 g der Erntehefe aus dem vorhergegangenen Versuch unter gleichen Bedingungen vergoren. Da die Hefe mit zunehmender Stickstoffverarmung sich nur mehr schwach vermehrt, stand für die folgenden Versuche nur eine Stellhefemenge zur Verfügung, die unter 20 g lag. Um vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde dem dadurch Rechnung getragen, daß das Substratvolumen und die Zuckermenge in gleichem Verhältnis herabgesetzt wurden. Die Versuchsreihe mußte nach der 6. Wiederverwendung abgebrochen werden, da die letzte gebildete Erntehefemenge gerade zur Durchführung der analytischen Bestimmungen ausreichte.

Das Ergebnis einer solchen Versuchsreihe ist in der Tafel 3 zusammengestellt.

Tafel 3. Verlauf von Verhefungsversuchen in stickstoffreier Nährlösung (Sechsmalige Wiederverwendung der gleichen Hefe)

		Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6
1	Substrat	Volumen der Nährlösung in ccm	1000	1000	800	500	375	150
2	Stellhefe	Gewicht der Stellhefe in g	20.0	20.0	16.0	10.0	7.5	3.0
3		Trockensubstanz der Stellhefe in % .....	25.0	26.2	25.5	28.6	25.7	22.9
4		% N in Stellhefe-Trockensubstanz ....	7.63	5.31	4.94	4.48	4.58	5.82
5		N der Stellhefe in g ....	0.382	0.278	0.201	0.128	0.0885	0.0399
6	Erntehefe	Gewicht der Erntehefe in g .....	26.3	20.8	14.8	10.3	5.0	2.3
7		Trockensubstanz der Erntehefe in % ...	26.2	25.5	28.6	25.7	22.9	29.6
8		% N in Erntehefe-Trockensubstanz .....	5.31	4.94	44.8	4.58	5.82	4.67
9		Ausgeschiedener, organ. N in g .....	0.017	0.0166	0.0111	0.0059	0.0205	0.0084
10	Endsubstrat	Ausgeschiedener, organ. N in % des Stellhefe-N (10:5) · 100 .....	4.45	5.96	5.52	4.60	23.1	21.05
11		Abweichung der N-Bilanz in % (9+10-5): 5 · 100	+0.26	+0.22	-0.25	-0.47	-1.7	-0.5

Betrachtet man die Zahlen der Tafel 3, so ist aus der Zeile 6, die das Gewicht der Erntehefe enthält, ersichtlich, daß die Hefe mit einem Ausgangstickstoff in der Trockensubstanz von 7.63% sich auf Kosten ihres eigenen Stickstoffvorrates vermehrt, wobei der Stickstoffgehalt in der Trockensubstanz der Erntehefe auf 5.31% absinkt. Dies läßt sich unter Absinken des Erntehefegewichts noch einige Male wiederholen. Die entscheidende Umstellung scheint dann einzutreten, wenn der Stickstoffgehalt auf etwa 4.5% in der Trockensubstanz abgenommen hat. Die nachfolgende Hefe ist prozentual wieder reicher an Stickstoff (5.8%). In diesem Versuchsstadium geht ein Teil der Hefezellen in Autolyse über, um ihren Stickstoff den noch verbliebenen lebensfähigen Hefezellen zur Verfügung zu stellen.

Anschaulicher noch als die Prozentgehalte an Stickstoff der Erntehefe zeigen die Veränderungen in der Ausscheidung organischen Stickstoffs die wesentliche Umstellung, die im Stoffwechsel der Hefe eintritt, wenn derselbe unter einen gewissen Wert herabsinkt. Dieser Vorgang wird jedoch besser verfolgt an Hand der Tafel 4. Ihr liegen die Werte der Tafel 3 zugrunde, jedoch sind hier nicht die Stellhefemengen eingetragen, die sich aus dem Zufall des Versuchsverlaufs ergeben, sondern jeder Versuch ist auf dieselbe Stellhefemenge (20 g) von einheitlicher Trockensubstanz (25%) umgerechnet, so daß alle Versuche auf gleiche Gewichtsmengen Ausgangshefe abnehmender Qualität bezogen und daher vergleichbar sind. Der ausgeschiedene organische Stickstoff hält sich unter den Bedingungen der Gärung bei den ersten 4

Tafel 4. Werte der Tafel 3 umgerechnet für gleiche Stellhefemenge

	Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6
1	Stellhefe (25% Tr.-Sbst.) in g	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
2	Erntehefe (25% Tr.-Sbst.) in g	27.5	20.2	20.7	18.5	11.9	19.9
3	N der Stellhefe in g . . . . .	0.382	0.265	0.246	0.224	0.230	0.291
4	N der Erntehefe in g . . . . .	0.366	0.250	0.231	0.213	0.172	0.231
5	Ausgeschiedener, organ. N in g	0.017	0.0158	0.0137	0.0104	0.0532	0.0612
6	Ausgeschiedener, organ. N in % des Stellhefe-N . . . .	4.45	5.96	5.52	4.60	23.10	21.05

Versuchen innerhalb der auch sonst festgestellten Werte, um dann plötzlich bei der 5. Wiederverwendung der Hefe auf das 5fache anzusteigen und sich beim nächsten Versuch etwa auf dieser Höhe zu halten. Wir glauben, daß es sich hier um die eintretende Autolyse der Hefezellen handelt, die sich besonders deutlich in einer wesentlich gesteigerten Stickstoffausscheidung kundgibt. Setzt man den im ersten Versuch ausgeschiedenen organischen Stickstoff (0.017 g) = 100, so verhalten sich die nachfolgenden Ausscheidungen wie 100 : 93 : 80 : 61 : 313 : 360.

Widersprechend waren die Auffassungen über die Frage, ob die Ausscheidungsprodukte von einer neuen Hefe bei Gegenwart von vergärbarem Zucker wiederverwertet werden können. M. Rubner<sup>20)</sup> und A. Mayer<sup>21)</sup> halten die Ausscheidungsprodukte für nicht wiederverwertbar, während H. Claassen<sup>22)</sup> auf Grund von Versuchen zu dem Ergebnis kommt, daß die Ausscheidungsprodukte von einer frischen Hefe wieder verwertet werden können. Da H. Claassen keine genauen Stickstoffbilanzen durchführt, haben wir der Frage eine Versuchsserie gewidmet. Mit Rücksicht auf die einfachere Versuchsdurchführung haben wir die Versuchsreihe unter reinen Gärungsbedingungen (ohne Lüftung) durchgeführt, und zwar in folgender Anordnung:

Von einem größeren Vorrat biologisch einheitlicher Hefe, die nach der früher bereits angegebenen Vorschrift von Resten der Nährlösung befreit war, wurden 20 g zu 1000 ccm einer Nährlösung nach R. S. W. Thorne gegeben, die alle Nährsalze mit Ausnahme von Stickstoff enthielt und in einem 2-l-Erlenmeyer-Kolben mit Gäraufsatz im Thermostaten bei 28–30° vergoren. Der Fortgang der Gärung wurde durch Wägung verfolgt. Nach Beendigung der Gärung wurde durch ein EK-Filter die Hefe vom Substrat quantitativ abgetrennt, gewogen und analysiert (Trockensubstanz, Stickstoffbestimmung). In einer entnommenen Probe des Filtrats wurde ebenso der ausgeschiedene Stickstoff bestimmt und auf das Gesamtvolumen umgerechnet. Zur Entfernung des Alkohols wurde der Rest des klaren Substrates i. Vak. auf die Hälfte eingedampft, mit neuem stickstofffreiem Rohrzucker versetzt und mit frischer Hefe wieder vergoren. Mit Rücksicht auf die aus dem Substrat entnommenen Proben konnte diese Arbeitsweise 6mal wiederholt werden; und ebenso wurde die Stellhefemenge dem verminderten Substratvolumen, wie bei der vorhergehenden Versuchsreihe, angepaßt. Die Tafel 5 gibt das Ergebnis dieser Versuchsreihe wieder.

<sup>20)</sup> Siehe Fußn. 6), S. 289.

<sup>21)</sup> Lehrbuch d. Gärungschemie, Technologie der Gärungsgewerbe (Carl Winter, Heidelberg 1874), S. 116.

<sup>22)</sup> Ztschr. Spiritusindustrie 64, 56 [1941].

Tafel 5. Verlauf von Verhefungsversuchen mit frischer Stellhefe bei Wiederverwendung des im vorhergehenden Versuch ausgeschiedenen Stickstoffs (verwendet biologisch einheitliche Stellhefe (Wieninger): Trocken-Sbst. 25%, N 1.91% bzw. 7.63% N in Trocken-Sbst.)

		Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6
1	Ausg.- Substrat	Volumen der Nährlösung in cem .....	1000	800	700	550	400	250
2		Organischer N der Nährlösung in g .....	—	0.0136	0.0231	0.0262	0.0209	0.0141
3	Stell- hefe	Gewicht der Stellhefe in g	20.0	16.0	14.0	11.0	8.0	5.0
4		N der Stellhefe in g ....	0.382	0.305	0.267	0.210	0.153	0.0953
5	Erntehefe	Gewicht der Erntehefe in g .....	26.3	19.74	18.0	12.65	9.76	6.18
6		Trockensubstanz der Erntehefe in % ..	26.2	27.9	26.9	29.1	28.6	24.9
7		% N in der Erntehefe ..	1.39	1.48	1.425	1.63	1.54	1.52
8		% N in Erntehefe- Trockensubstanz ....	5.31	5.32	5.50	5.60	5.39	6.12
9		N der Erntehefe in g ...	0.366	0.292	0.256	0.207	0.151	0.0939
10	Endsubstrat	Organischer N in der vergorenen Lösung in g	0.017	0.0264	0.0334	0.0288	0.0225	0.0151
11		Neuausgeschiedener, organ. N in g .....	0.017	0.0128	0.0103	0.0026	0.0016	0.0010
12		Neuausgeschiedener, organ. N in % des Erntehefe-N .....	4.64	4.38	4.02	1.2	1.06	1.06
13		Abweichung der N-Bilanz in % [(9+10-2-4): (2+4)] · 100 .....	+0.26	-0.06	-0.02	-0.02	-0.02	-0.04

In der folgenden Tafel 6 sind die Werte der Versuchsreihe auf gleiche Stellhefemengen von 20 g umgerechnet, so daß die erhaltenen Ausscheidungswerte unmittelbar miteinander verglichen werden können.

Tafel 6. Werte der Tafel 5 umgerechnet für gleiche Stellhefemenge

		Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6
1	Stellhefe (25% Tr.-Sbst.) in g	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
2	Erntehefe (25% Tr.-Sbst.) in g	27.5	27.4	27.6	26.7	27.8	24.5	
3	N der Stellhefe in g .....	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382	0.382
4	N der Erntehefe in g .....	0.366	0.365	0.366	0.377	0.378	0.376	
5	Organ. N in der vergor. Lösg. in g .....	0.017	0.033	0.0477	0.0523	0.0562	0.0604	
6	Gegenüber vorangehendem Versuch neuausgeschiede- ner organ. N in g .....	0.017	0.016	0.0147	0.0046	0.004	0.004	
7	Neuausgeschiedener, organ. N in % des Stellhefe-N ....	4.45	4.19	3.85	1.20	1.05	1.05	

Betrachtet man die Zahlen der Tafel, so erkennt man, daß die Hefevermehrung ziemlich konstant bleibt: Erntehefe/Stellhefe = 1.3 bis 1.4. Die Ausscheidung organischen Stickstoffs nimmt in den ersten drei Versuchen im Durchschnitt um 0.015 g N zu, um in den letzten 3 Versuchen auf 0.005 g

abzusinken. Bemerkenswert ist die geringe Abweichung in der Stickstoffbilanz, so daß die Zahlen als experimentell gesichert gelten können. Da die Menge des ausgeschiedenen organischen Stickstoffs sich mit jedem neuen Gäransatz vermehrt, kommen wir zu dem Ergebnis, daß die Ausscheidungsprodukte einer Hefe, wenn ihr kein Stickstoff in der Nährlösung zur Verfügung steht, rein exkretorischen Charakter haben und auch von einer neuen Hefe nicht mehr verwertet werden können<sup>23)</sup>. Wir befinden uns mit diesem Versuchsergebnis in Übereinstimmung mit A. Meyer<sup>21)</sup>, der, ohne Aufstellung einer genauen Stickstoffbilanz, nur auf Grund der Bestimmung des erzeugten Alkohols ebenfalls zu der Ansicht kommt, daß die Ausscheidungsprodukte von der von ihm wieder verwendeten Hefe nicht als Stickstoffnahrung ausgenützt werden können. Im übrigen lassen die im vorhergehenden wiedergegebenen Resultate die Deutung zu, daß die weitere Ausscheidung gehemmt wird, wenn der Wert des ausgeschiedenen organischen Stickstoffs im Substrat eine gewisse Schwelle überschreitet.

Im weiteren Verlauf unserer Arbeit haben wir uns mit der chemischen Natur der Ausscheidungsprodukte befaßt, um einen exakten Beweis für die bisher in der Literatur vertretene Auffassung zu erbringen, daß Aminosäuren, Oligopeptide, u. U. Eiweißkörper vorliegen. Wie im vorhergehenden gezeigt, fallen die Ausscheidungsprodukte, auf den Stickstoff der Erntehefe berechnet, unter den beschriebenen Versuchsbedingungen in einer Ausbeute von durchschnittlich 5%, auf das filtrierte Substrat berechnet, nur in 0.003 bis 0.006% an. Da bei unseren der Tafel I zugrunde liegenden Versuchen am Schluß bis zu 10 l EK-filtriertes N-Substrat anfielen, haben wir diese in einem Vakuum-Umlaufverdampfer bei 20–25° auf 100 ccm eingengt, in welchen rund 0.5 g organischer Stickstoff vorhanden waren, neben einem Vielfachen dieser Menge an überschüssigem Ammonium-Salz und sonstigen anorganischen Salzen (Nährsalze, nach R. S. W. Thorne für die Hefe).

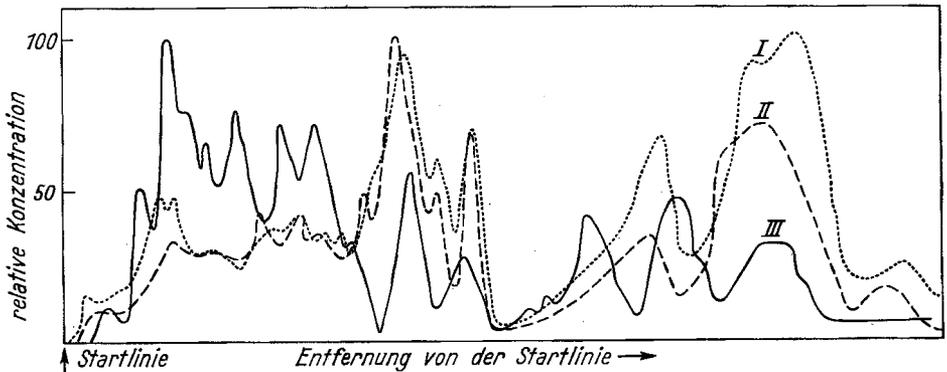
Zur Beseitigung der restlichen Ammonium-Salze bewährte sich die Destillation mit Natronlauge im Vakuum. Dagegen gelang die Beseitigung der störenden anorganischen Salze nicht, da Dialyse, Elektrodialyse, Verwendung von Kunstharzaustauschern nach unseren Feststellungen immer mit einem gleichzeitigen Verlust organischen Stickstoffs verbunden waren.

Trichloressigsäure und Sulfosalicylsäure ergeben in dem Konzentrat keine, Phosphorwolframsäure eine starke Fällung. Ninhydrin, Diazobenzolsulfonsäure, Nitroprussidnatrium, Probe nach Folin-Denis<sup>24)</sup> ergaben in allen Fällen eine stark positive Reaktion, dagegen zeigte sich mit Millon-Reagens keine Färbung; nach diesen Ergebnissen war an dem Vorliegen von Aminosäuren, u. U. von Oligopeptiden nicht zu zweifeln. Diese Erkenntnis gab die Möglichkeit, den ausgeschiedenen organischen Stickstoff zu unterteilen in Aminosäurestickstoff auf Grund der Bestimmung von van Slyke bzw. der Formoltitration und anderweitigen Stickstoff. Eine Formoltitration der von der Hefe

<sup>23)</sup> Nach von uns durchgeführten neueren Versuchen sind die Ausscheidungsprodukte einer Hefe, die mit Stickstoff normal ernährt wurde, etwas anders zu bewerten. Hier ist ein kleiner Teil (etwa 20–30%) wieder verwertbar.

<sup>24)</sup> O. Folin u. W. Denis, Journ. biol. Chem. 12, 2451 [1912].

*Torulopsis utilis* ausgeschiedenen Produkte hat schon H. Fink<sup>10)</sup> durchgeführt. Er gibt an, daß ein verhältnismäßig kleiner Teil (19 bis 34% des gesamten organischen Stickstoffs) formoltitrierbar ist. Unsere Versuche erstreckten sich auf die van Slyke-Methode und die Formoltitration, und zwar bestimmten wir die Werte im Konzentrat, wie es nach Beseitigung der Ammonium-Salze anfällt, sowie nach 10- bis 24stdg. Kochen mit etwa 20-proz. Salzsäure. Wenn wir von einigen extremen Versuchswerten absehen, so zeigt sich, daß von dem gesamten vorhandenen organischen Stickstoff rund 50% durch die van Slyke-Methode erfaßt werden und daß diese Werte nach der Salzsäurehydrolyse um  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{3}$  zunehmen. Beim Formolstickstoff liegen die Werte niedriger (30–35%); die Zunahme nach der Hydrolyse beträgt nur 10%. Diese Ergebnisse zeigen, daß etwa die Hälfte der organischen Ausscheidungsprodukte Aminosäuren und Peptide darstellt. Höher molekulare Eiweißkörper liegen nicht vor. Über die Natur der übrigen 50% können nur Vermutungen geäußert werden. Man könnte annehmen, daß Purine vorliegen oder vielleicht *N*-methylierte Aminosäuren; diese Auffassung würde eine Erklärung dafür abgeben, warum die Hefe die Ausscheidungsprodukte nicht mehr bzw. nach unseren neueren Versuchen nur zum kleinen Teil wieder verwerten kann.



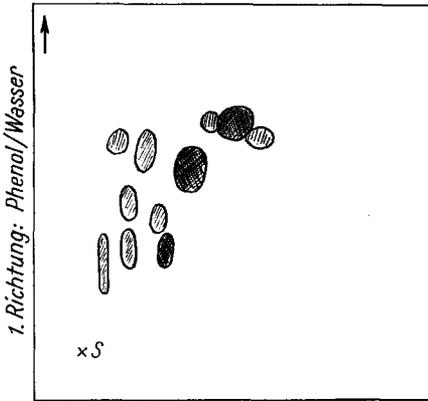
Abbild. 5. Ausgewertete Retentiogramme von Papierchromatogrammen der Hefeausscheidungsprodukte im Vergleich zu Hefeautolysat

I ..... u. II --- Hefeausscheidungsprodukte, III — Hefeautolysat

Zur weiteren Prüfung der Ausscheidungsprodukte haben wir vor allem wegen ihrer geringen Menge die papierchromatographische und elektrophoretische Methode verwendet, welche wir nach der quantitativen Seite hin nach Th. Wieland<sup>25)</sup> retentiometrisch ausgewertet haben. Durch diese Methode wurde erkannt, daß in den Hefeausscheidungsprodukten eine größere Anzahl von Aminosäuren enthalten ist und einigen von diesen saurer bzw. basischer Charakter auf Grund ihrer Lage im Elektropherogramm zugesprochen werden muß. Zahlen- und mengenmäßig überwiegen die neutralen durch Ninhydrin färbbaren Komponenten. In den im folgenden wiedergegebenen Kurven (Abbild. 5) eines nach der quantitativen Seite hin ausgewerteten Papierchromatogramms von 2 Konzentraten verschiedener Hefezüchtungsversuche kann man

<sup>25)</sup> Th. Wieland u. L. Wirth, *Angew. Chem.* **63**, 171 [1951].

deutlich erkennen, daß die Ausscheidungsprodukte in beiden Versuchen die gleichen sind (übereinanderliegende Kurvenspitzen). Zum Vergleich ist auch ein Hefeautolysat mit eingezeichnet, wodurch der Unterschied zwischen diesem



2. Richtung: sek. Butanol/ $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{H}_2\text{O}$

Abbild. 6. Zweidimensionales Papierchromatogramm der Hefeausscheidungsprodukte

Ninhydrin färbbare Flecken, von welchen 3 besonders intensiv hervortreten (Übereinstimmung mit den Kurvenspitzen des Retentiogramms).

und den Ausscheidungsprodukten gezeigt werden soll. Der von diesem Chromatogramm zuvor abgeschnittene und mit Ninhydrin entwickelte Streifen zeigt nicht diese feine Differenzierung wie das dazugehörige Retentiogramm, und es ist auf diesem überall dort, wo im Retentiogramm die Kurvenspitzen nahe beieinander liegen, meist nur jeweils 1 Fleck zu erkennen. Die beiden am Ende des Retentiogramms sichtbaren Substanzen sind mit Ninhydrin nicht färbbar gewesen.

Dagegen zeigt das zweidimensionale Chromatogramm (Abbild. 6) gut differenziert 11 diskrete, mit

### Beschreibung der Versuche

Die Nährlösung nach R. S. W. Thorne<sup>17)</sup> hatte folgende Zusammensetzung: Dest. Wasser 1000 ccm,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4$  1 g,  $\text{CaSO}_4$  0.2 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g, Zucker 50 g, Stickstoffquelle äquivalent 0.5 g N.

Zur papierchromatographischen Untersuchung wurden die im Vak.-Umlaufverdampfer konzentrierten und von Ammonium-Ionen mit NaOH i. Vak. befreiten Proben mit konz. Bariumhydroxyd-Lösung in Überschuß versetzt, vom Niederschlag abzentrifugiert, dieser einige Male mit Wasser gewaschen (Ninhydrin-Probe des Waschwassers negativ!) und dann mit verd. Schwefelsäure der Überschuß des Bariums ausgefällt, zentrifugiert, wiederum so lange gewaschen, bis keine positive Ninhydrin-Reaktion des Waschwassers erfolgte, und die mit der Probe vereinigten Waschwasser i. Vak. eingengt.

Darstellung des Hefeautolysats: 10 g der zu den Ausscheidungsprodukten zugehörigen Erntehefe wurden mit 0.5 ccm Äthylacetat angerührt, nach einiger Zeit 1 ccm Toluol zugegeben, die Mischung hierauf in einen Thermostaten von 30° gestellt und ab und zu gerührt. Nach 3 Tagen wurde auf 20 ccm mit Wasser verdünnt, von der Hefe scharf abzentrifugiert und der meist noch trübe Saft durch ein EK-Filter filtriert.

Für die papierchromatographischen Untersuchungen wurde das Papier von Schleicher und Schüll Nr. 2043 b verwendet und als Entwickler eine Mischung von sek. Butanol, Eisessig und Wasser im Verhältnis von 16:4:5, bei der zweidimensionalen Papierchromatographie in erster Richtung Phenol:Wasser im Verhältnis 4:1 und in der zweiten Richtung das obengenannte Lösungsmittelgemisch. Es wurde in beiden Fällen aufsteigend gearbeitet.

Wir konnten feststellen, daß mit Vorteil dem in zweiter Richtung wandernden Lösungsmittelgemisch das Ninhydrin bereits zugesetzt werden kann, wodurch nach dem

