

Zur Kenntnis des Fett- und Lipidstoffwechsels der Hefen

(5. Mitteilung)

Quantitative Beziehungen bei der biologischen Ergosterin-Bildung

Von

F. BILGER, W. HALDEN, E. MAYER-PITSCH UND M. PESTEMER

Mit 2 Figuren im Text

Aus dem medizinisch-chemischen Institut und dem Institut für theoretische und physikalische Chemie der Universität Graz.

(Eingegangen am 10. 3. 1937. Vorgelegt in der Sitzung am 11. 3. 1937)

Einleitung.

In früheren Arbeiten¹ wurde gezeigt, daß die Fett- und Lipoidbildung in Hefezellen durch die Wahl geeigneter Bedingungen zur Hauptreaktion gestaltet werden kann. Hierdurch sind auch die Grundlagen für eine quantitative Beurteilung dieses Vorganges geschaffen, bei dem die Steigerung des Gesamtfettgehaltes im Maximum den etwa 20fachen Wert, die Erhöhung des Steringehaltes den rund 60fachen Betrag der ursprünglichen Lipoidwerte erreicht. Derartige Anreicherungen erzielten wir mit wässerigen Suspensionen untergäriger Brauereihefe, die auf porösen Unterlagen durch Entwässerung auf den optimalen Feuchtigkeitsgehalt gebracht und mit Luft-Alkoholgemischen behandelt wurden. Durch den Wasserentzug erfolgt unter den angegebenen Bedingungen die Auslösung und Steuerung des Vorganges der Lipoidbildung, bei dem das Stickstoffgleichgewicht in den Hefezellen keine Störung erfährt, wenn der Wassergehalt der Kulturen nicht unter 73% absinkt. Aus unseren Versuchen geht hervor, daß Äthylalkohol als Baustein für die biologische Synthese der Hefelipoide anzusehen ist und daß gültige Beziehungen zwischen der Trockengewichts- und der Lipoidzunahme sowie zwischen Gesamtlipoid- und Sterinanreicherung bestehen.

¹ W. HALDEN, F. BILGER und R. KUNZE, *Naturwiss.* **21** (1933) 660. — W. HALDEN, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch.* **225** (1934) 249. — M. SOBOTKA, W. HALDEN und F. BILGER, *ebenda* **234** (1935) 1. — W. HALDEN, *Fettchem. Umschau* **42** (1935) 29 (Zusammenfassendes Referat).

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die quantitativen Zusammenhänge zwischen Gesamtsterin- und Ergosterin-gehalt verschiedener Hefen. Im Laufe des Anreicherungs Vorganges verringert sich der prozentuelle Anteil des Ergosterins im Gesamtsteringemisch; lipoidreiche Hefen enthalten im Maximum 4—5% Ergosterin.

Zur Bestimmungsmethodik

Nach den bisherigen Erfahrungen über die Bestimmung des Ergosterins in Hefen gelangten wir zu dem Schluß, daß von allen hierfür in Betracht gezogenen Verfahren nur die absorptionsphotometrische Messung einwandfreie Ergebnisse in bezug auf den tatsächlichen Ergosterin-gehalt von Hefe-Sterin-Gemischen zu geben vermag.

Wie M. CASTILLE und E. RUPPOL² festgestellt haben und durch eigene Versuche (siehe unten!) bestätigt wurde, verhält sich der Komplex Ergosterin-Digitonid bei der Ultraviolett-Absorptionsmessung in gleicher Weise wie das reine Ergosterin. Da durch Digitonidfällung der Sterine eine weitgehende Trennung von Ballaststoffen erzielt wird, kann die spektrographische Messung ohne weitere komplizierte Reinigungsverfahren durchgeführt werden.

Hinsichtlich der praktischen Durchführung der Bestimmung arbeiteten wir in Anlehnung an die Angaben von M. CASTILLE und E. RUPPOL^{2a} in der folgenden Weise: Die frisch abgenommenen feuchten Hefeproben werden in kleinen dünnwandigen Porzellanreißschalen mit einem Gewichtsteil Natriumsulfat (siccum) vermennt und so lange über einem schwach siedenden Wasserbad unter Rühren behandelt, bis sich der gesamte Schaleninhalt verflüssigt hat. Während der darauffolgenden Abkühlung und Erstarrung der hefehaltigen Kristallmasse wird mittels eines Pistills zerrieben und dadurch ein trockenes homogenes Pulver erzielt. Die Probe bleibt zwecks vollständiger Entwässerung 6—12 Stunden im Vakuumexsiccator und wird vor der Verseifung nochmals zerrieben. Die hierbei verwendete Hefemenge richtet sich nach dem Gesamtsterin-gehalt, der, bezogen auf Trockenhefe, zirka 5—10 mg betragen soll. Gleichzeitig ermittelten wir den Wassergehalt jeder Probe durch Mikro-Trockenbestimmung³. Getrocknete Hefen⁴ wurden unter Zufügen von einem Gewichtsteil Seesand und einem Teil Natriumsulfat (siccum) möglichst fein zerrieben und die Proben bis zur Verseifung im Vakuumexsiccator belassen.

Nach quantitativer Einbringung in den Verseifungskolben wird mit 25 cm³

² Bull. de l'académie royale de médecine de Belgique, Sitzungsbericht vom 28. I. 1933, S. 48—60. — ^{2a} Ebenda, S. 52.

³ F. BILGER, W. HALDEN und M. K. ZACHERL, Mikrochemie 15 (1934) 132.

⁴ Hefedauerpräparate erhielten wir durch dünnschichtiges Aufstreichen von Feuchthefer auf Glasschalen und darauffolgendes scharfes Trocknen im Vakuumexsiccator.

5%iger alkoholischer Kalilauge während 30 Minuten unter ständigem Umschütteln des Kolbeninhaltes am Wasserbade behandelt. Die mit Wasser auf das 4fache Volumen verdünnte Lösung schüttelt man 5mal mit Petroläther (Fraktion unter 45°) aus. Für die erste Ausschüttelung werden 175 cm³, für die darauffolgenden 50 cm³ des Extraktionsmittels verwendet. Allenfalls auftretende Emulsionen werden nach der ersten Ausschüttelung durch Zufügen von 1 bis 2 g Kochsalz zerstört. Man wäscht den Petrolätherextrakt 3mal mit Wasser, trocknet mit Natriumsulfat und dampft das Lösungsmittel bei 80—90° ab. Die letzten Petrolätherreste werden durch Abblasen im CO₂-Strom entfernt.

Der vom Petroläther befreite Rückstand wird in 5—10 cm³ absolutem Alkohol, entsprechend zirka 5—10 mg Gesamtsterin, aufgenommen und mit der gleichen Menge einer 1%igen Digitoninlösung (in absolutem Alkohol) versetzt. Durch Zusatz von Wasser, dessen Menge (1—2 cm³) dem zehnten Teil des Gesamtvolumens entspricht, erfolgt die Fällung der Sterin-Digitonide, die nach 24stündigem Stehen in einem Glasfritten-Filter Nr. 1 G 3/7 (SCHOTT und GEN. Jena) gesammelt werden. Der Niederschlag wird mittels einer CAMINADESCHEN-Lösung (73 Teile Aceton, 18 Teile Wasser und 9 Teile absoluter Alkohol) gewaschen und im Vakuumexsiccator über Chlorcalcium bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die auf diesem Wege erhaltenen Sterin-Digitonide werden in 25 cm³ absolutem Alkohol aufgenommen und zur Ermittlung des prozentuellen Ergosterinanteiles spektrographisch untersucht.

Die absorptionsphotometrischen Bestimmungen wurden photographisch nach einer Methode mit Vergleichsspektren und rotierendem Sektor durchgeführt. Es wurden zuerst Absorptionskurven von reinem Ergosterin und reinem Digitonin in Äthanol aufgenommen und festgestellt, daß das Digitonin, dessen Grenzabsorption erst bei $\nu' = 3900 \text{ mm}^{-1}$ merklich zu werden beginnt, im Gebiet der beiden hohen Maxima von Ergosterin bei $\nu' = 3550$ und 3690 mm^{-1} keine nennenswerte Absorption besitzt. Da sich eine Kurve von reinem Ergosterin-Digtonid, das nach oben angeführter Fällung erhalten worden war, im Gebiet der beiden Maxima vollkommen mit der reinen Ergosterinkurve deckte, war die Gewähr für eine richtige Konzentrationsbestimmung durch Messung der Höhe dieser Maxima gegeben. Wir bestimmten stets den spezifischen Extinktionskoeffizienten k im ersten Bandenmaximum bei $\nu' = 3550 \text{ mm}^{-1}$, dessen maximaler molarer Extinktionskoeffizient für reines Ergosterin bzw. Ergosterin-digtonid zu $\epsilon = 10250$ bzw. $\log \epsilon = 4,01$ gemessen worden war. Fallweise zogen wir zu diesen Messungen bei der Auswertung der Spektren das Polarisations-Photometer-Okular, wie es in seiner Anwendung von M. PESTEMER und G. SCHMIDT⁵ beschrieben wurde, heran.

⁵ M. PESTEMER und G. SCHMIDT, Monatsh. Chem. 69 (1936) 399, bzw. S.-B. Akad. Wiss. Wien (IIb) 145 (1936) 1069.

Nach der LAMBERTSchen Formel ergibt sich der spezifische Extinktionskoeffizient k aus der gemessenen Extinktion E und Schichtdecke d zu:

$$k = \frac{E}{d},$$

nach der LAMBERT-BEERSchen Formel der spezifische molekulare Extinktionskoeffizient ε zu:

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}.$$

Die molekulare Konzentration c ergibt sich also aus beiden Formeln zu

$$c = \frac{k}{\varepsilon}.$$

Die Fehlergrenze beträgt entsprechend der Genauigkeit der Extinktionsmessung ± 2 bis $\pm 5\%$. Aus der so erhaltenen Konzentration c (Mole im Liter) von Ergosterin läßt sich bei Kenntnis der Sterin-Digitonid-Einwaage, die meist von der Größenordnung von $1g$ im Liter war, der Prozentgehalt Ergosterin in den Sterin-Digitoniden und weiterhin bei Kenntnis des Gehaltes der getrockneten Hefe an mit Digitonin fällbaren Sterinen der Prozentgehalt an Ergosterin der Trockenhefe errechnen. Die Haltbarkeit der untersuchten Lösungen bei Aufbewahrung im Dunkeln ist sehr gut, eine Kontrollösung von Ergosterin-Digitonid zeigte für den maximalen Extinktionskoeffizienten nach vier Monaten den gleichen Wert.

Wie aus obiger Darstellung hervorgeht, haben wir entgegen den ursprünglichen Angaben von M. CASTILLE und E. RUPPOL² die Extraktion der Gesamtsterine aus dem alkoholischen Verseifungsgemisch nicht mit Äther, sondern mit niedrig siedendem Petroläther durchgeführt, wobei nach F. BILGER, W. HALDEN und M. K. ZACHERL eine bessere Trennung der Schichten erzielt wird. Weiters haben wir auch festgestellt, daß bei Anwendung von Äther als Extraktionsmittel und nachfolgendem dreimaligem Waschen des Sterinextraktes mit Wasser in der Regel keine vollkommen reinen Sterin-Digitonid-Produkte erhalten werden können. Der nachfolgend beschriebene Versuch diente zum Vergleich von Petroläther- und Ätherextraktion; hierbei wurde der Ätherextrakt einer besonderen Reinigung unterzogen.

Nach Verseifung einer Hefeprobe mittels 20 cm^3 5% iger alkoholischer Kalilauge verdünnte man mit Wasser auf ein Volumen von 120 cm^3 und extrahierte die eine Hälfte mit Äther, die andere mit Petroläther. Die Ausschüttelung mit Petroläther wurde, wie oben angegeben, in normaler Weise vorgenommen. Zwecks Durchführung der Ätherextraktion behandelten wir die Seifenlösung

einmal mit 50 cm^3 und zweimal mit je 25 cm^3 Extraktionsmittel. Die vereinigten Ätherauszüge wurden nach FAHRION⁶ mit 10 cm^3 verdünnter Salzsäure gewaschen und hierauf mit einem Gemisch von 7 cm^3 Wasser, 2 cm^3 Alkohol und 1 cm^3 Normal-Kalilauge ausgeschüttelt. Der so gereinigte Extrakt wurde zwecks vollkommener Entfernung des Alkali ein- bis zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach der Digitonin-Fällung erhielt man ein völlig farbloses Sterin-Digitonid-Produkt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Eine weitere Prüfung der Leistungsfähigkeit der Methodik erfolgte durch Zusätze von reinem Ergosterin zu einer Hefe bekannten Ergosteringehaltes. Es wurden dabei statt der zugegebenen 4.65 mg Ergosterin 4.70 als Überschuß gefunden, ein Hinweis darauf, daß Fällung und absorptionsphotometrischer Nach-

Tabelle 1.

Die Gesamteinwaage für beide Extraktionsverfahren betrug $0,4964\text{ g}$ Trockenhefe.

Extraktionsmittel	Einwaage Trocken- hefe mg	Sterin- digito- nide mg	Gesamt- sterine ⁷ mg	Gesamt- sterine ⁷ %	Ergosterin %
				bez. auf Trockenhefe	
Äther	496.4 2	35.0	8.75	3.52	1.396
Petroläther	496.4 2	36.2	9.05	3.64	1.360

weis zu einem Wert führte, der unterhalb der Fehlergrenze lag, wie aus der Tabelle 2 hervorgeht.

Tabelle 2.

Nr.	Hefein- waagen Trockenhefe mg	Ergosterin- zusatz mg	Gesamt- sterine ⁷ mg	% Ergosterin bez. auf Ge- samtsterine %	Ergosterin mg
1	145.7	—	5.175	38.0	1.96
2	152.1	+ 4.65	9.500	70.1	6.75
Gesamtergosteringehalt der Probe Nr. 2 vermehrt um 4.65 mg Ergosterin					6.75 mg
Ergosteringehalt der Probe Nr. 2 berechnet aus dem Ergosteringehalt der Probe Nr. 1					2.05 mg
Differenz Ergosterin					4.70 mg

⁶ FAHRION, Chem. Umschau 27 (1920) 147.

⁷ Die Werte der Gesamtsterine sind nach einigen Beobachtungen stärkeren Schwankungen ausgesetzt als die ihnen zugehörigen Ergosterinwerte.

Ergosteringehalte verschiedener Hefen im Verlaufe der Lipoidanreicherung.

Der Ergosteringehalt einiger Hefearten und der Einfluß von Lagerung und Gärung auf den Hefesterin-Komplex.

Die Art der Vorbehandlung beeinflußt den Sterin- und Ergosteringehalt der für die Lipoidanreicherung benötigten Reinzuchten nicht unerheblich. Die Reinzuchtstämme wurden

Tabelle 3.

Ergosteringehalte von Brauereihefen verschiedener Gärvorbehandlung (Nr. 1—6) bzw. verschiedenartiger Sprithefen (Nr. 8—10).

Nr.	Art der Hefe und Vorbehandlung	Hefe-Menge bez. auf Trockensubstanz mg	Sterin-digitonide mg	Gesamt-Sterine bez. auf Hefe-Trockensubstanz %	Ergosterin bez. auf Gesamt-Sterine %	Ergosterin bez. auf Hefe-Trockensubstanz %
1	Reinzuchthefer ⁸ frischgelieferter Stamm	1633	28'32	0'43	54'8	0'24
2	Reinzuchthefer A nach mehrwöchigem Lagern unter Würze	273'4	12'14	1'11	56'2	0'62
3	Reinzuchthefer B dgl.	401'0	18'20	1'13	48'0	0'54
4	Reinzuchthefer, gelagert	427'0	15'86	0'938	49'0	0'46
5	dgl. nach Angären mit Würze	1710	50'60	0'73	50'0	0'46
6	Reinzuchthefer, gelagert, nach wiederholten Angärungen	1720	45'90	0'67	47'9	0'32
8	Sprithefer, getrocknet	2071	48'09	0'58	49'0	0'28
9	Sprithefer, abgepreßt	2106	73'50	0'87	45'7	0'40
10	Sprithefer-Reinzucht	1480	37'40	0'63	50'5	0'32

⁸ Reinzuchthefer ohne nähere Bezeichnung ihrer Herkunft sind untergärtige Brauereihefen vom Typus FROBERG.

zwecks Weiterzüchtung verschiedentlich mit gehopfter und ungehopfter Würze behandelt, wobei die Zeitabstände der Würzeerneuerung von 24 Stunden bis zu mehreren Wochen schwankten. Nach mehrwöchigem Lagern der Hefe unter Würze nimmt der Gehalt an Gesamt-Sterinen (bezogen auf Hefe-Trockensubstanz) bis auf das Doppelte oder Dreifache der ursprünglich festgestellten Werte zu. Beispiele hierfür sind die Versuche Nr. 1, 2 und 3 der Tabelle 3.

Mit diesem Vorgang war eine Herabsetzung der biologischen Aktivität der Hefezellen verbunden, wie sich aus Anreicherungsversuchen mit derartigem Material ergab (vgl. S. 269).

Die Abnahme des Steringehaltes von gelagerten Hefekulturen, die einer kurzen Gärung unterworfen wurden, ergibt sich aus den Versuchen Nr. 4 und 5 der Tabelle 3.

Erst nach wiederholten, zeitlich rasch aufeinander folgenden Angärungen gelang es, den Ergosteringehalt wieder nahezu auf den anfänglich festgestellten Wert herabzudrücken (vgl. Nr. 6 in Tabelle 3). Hierdurch wurde gleichzeitig die volle biologische Wirksamkeit der gelagerten Hefe zurückerhalten. Bei diesen Vorgängen war jedoch keine gesetzmäßige Beziehung des Ergosterin-Anteils zu den Gesamtsterinen erkennbar.

Zum Vergleiche mit den obigen für Bierhefen erhaltenen Werten wurden drei Sprithefen auf ihren Ergosteringehalt untersucht (Nr. 8, 9 und 10 der Tabelle 3).

Ergosteringehalte lipoid-angereicherter Hefen.

Bezüglich der Technik der Fett- und Sterinanreicherung in Hefen muß auf die vorhergehenden Mitteilungen⁹ hingewiesen werden, so daß wir uns hier auf eine gedrängte Wiedergabe der wichtigsten Verfahrenselemente beschränken können.

Die Hefen werden nach geeigneter Vorbehandlung mittels Würze-Nährlösung in 0,15%iger Agarlösung suspendiert und auf entsprechend vorbereitete sterile Tonplatten oder Agarböden aufgebracht.

Die zur Anreicherung der Lipoide führende Behandlung erfolgt unter dicht verschließbaren Glasglocken und besteht hauptsächlich aus folgenden Teilmaßnahmen:

1. Herabsetzung des Wassergehaltes der Hefekulturen durch Evakuieren, verbunden mit der Einwirkung eines im Reaktionsraum befindlichen Trockenmittels.
2. Belüftung der auf porösen Unterlagen ruhenden Hefezellschichten durch wiederholtes Evakuieren (oder Durchsaugen von Luft-Alkohol-Gemischen).

⁹ S. insbes. W. HALDEN, Sterin- und Fettanreicherung in untergäriger Brauerei-Hefe, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 225 (1934) 249.

3. Sättigung der auf diese Weise vorbereiteten Kulturen mit der lipoidbildenden Atmosphäre durch Einströmenlassen steriler Alkohol-Luftgemische in das evakuierte System.

Die Lipoidanreicherung erfolgte meist durch ausschließliche Alkohol-Luft-Einwirkung bei Verwendung nährstoffloser Unterlagen, in manchen Fällen aber auch durch Zuckerzusätze zu den Agarböden, in denen durch die Gärungsenzyme der Hefe Alkohol entsteht. Besondere Maßnahmen und Behandlungsweisen werden bei Erörterung der jeweiligen Versuche bekanntgegeben.

In der Tabelle 4 sind die Analysenwerte einiger Hefereinzuchten zusammengestellt, deren Anreicherung durch Alkoholbehandlung auf nährstoffloser Unterlage erfolgte.

Tabelle 4.
Hefeunterlage ohne Nährstoff. Bierhefe-Reinzucht. Alkoholbehandlung.

Nr.	Tage	Bemerkung	Hefemenge bezogen a. Trockensubstanz mg	Sterin-Digitonide mg	Gesamt-Sterine bez. auf Hefetrockensubstanz %	Ergosterin bez. auf Gesamtsterine %	Ergosterin bez. auf Hefetrockensubstanz %
1	4	—	205·0	16·9	2·06	38·0	0·78
2	14	—	138·0	37·8	6·80	37·0	2·50
3	14	—	69·0	28·0	10·21	29·0	3·00
4	18	—	96·3	45·8	11·90	40·0	4·76
5	25	—	107·0	40·8	9·90	30·0	3·96
6	29	Doppelbestimmung kontinuierliche Belüftung Sauerstoff	131·8	80·6	15·28	33·9	5·18
7	29		79·7	48·4	15·19	34·7	5·27
8	7		202·0	56·7	7·00	40·0	2·80
9	16	—	172·0	88·6	12·88	40·8	5·23
10	14	—	101·6	25·8	6·34	26·0	1·69

Die Werte von Nr. 1—9 lassen erkennen, daß bei unseren lipoidangereicherten Bierhefen der Anteil des Ergosterins zirka 30—40 % des Gesamtsteringemisches beträgt. Im Gegensatz dazu fanden wir bei nicht vorbehandelten Hefen (siehe den vorhergehenden Abschnitt) einen entsprechenden Prozentgehalt von 45—56 %. Hieraus ergibt sich, daß bei der Sterinbildung während des Anreicherungsvorganges die Zunahme des Ergosterins hinter derjenigen der übrigen Sterine etwas zurückbleibt.

Nr. 6 und 7 sind Doppelbestimmungen des gleichen Hefemusters. Bei den Versuchen Nr. 8 und 9 wurde an Stelle des intermittierenden Evakuierens dauernd ein entsprechendes Alkohol-Luftgemisch durchgesaugt. Bei Versuchsansatz Nr. 10 leiteten wir Sauerstoff anstatt Luft in den Reaktionsraum. Durch diese Maßnahme ergab sich ein niedrigerer Ergosterinwert, der seine

Erklärung durch die stärkere Säurebildung unter dem Einfluß des Sauerstoffs findet.

Um den Einfluß anderer Nährstoffe auf die Ergosterinbildung zu ermitteln, wurden den Agarböden verschiedene Zuckerarten (Würze) zugesetzt. Zur Verwendung kamen Bierhefe-Reinzuchten, die durch Aufstellen von Paranitrotoluol im Reaktionsraum keimfrei gehalten wurden (Versuche s. Tabelle 5), während die Behandlung mit Alkoholdämpfen unterblieb. Eine Ausnahme hiervon bildet Versuch Nr. 6, der bei gleichzeitiger Alkoholbehandlung auffallend geringe Ergosterinbildung zeigt (Ergosterinanteil vom Gesamtsteringemisch 27·5 %).

Tabelle 5.

Hefeunterlage nährstoffhaltig. Bierhefe-Reinzucht. Keimfreihaltung durch Paranitrotoluol.

Nr.	Tage	Nährstoff im Agarboden	Hefemenge bez. auf Trockensubstanz mg	Sterin-Digitonide mg	Gesamtsterine bez. auf Hefetrockensubstanz	Ergosterin bez. auf Gesamtsterine %	Ergosterin bez. auf Hefetrockensubstanz %
1	32	Würze	129·1	26·1	5·10	38·0	1·94
2	19	Würze, Raffinose	223·0	58·5	6·55	37·2	2·44
3	19	Raffinose	164·8	51·0	7·71	39·8	3·07
4	17	Maltose	117·6	54·7	11·62	42·6	4·94
5	21	Maltose	48·9	24·9	12·72	43·6	5·55
6	26	Maltose (Alkoholatmosphäre)	106·0	34·1	8·03	27·5	2·21

Auch die Würzezusätze von Nr. 1 und 2 lassen erkennen, daß die Ergosterinanreicherung hinter den entsprechenden Durchschnittswerten anderer zuckerartiger Bodenzusätze zurückbleibt.

Bei Maltosezusatz zeigten die Kulturen die höchste Anreicherung (Versuche Nr. 4 und 5), hingegen vermag Raffinose (Versuche Nr. 2 und 3), die nach CH. E. BILLS und Mitarbeitern¹⁰ in flüssigen Zuchtmedien das günstigste Resultat liefert, auf festen Unterlagen nur eine verhältnismäßig geringe Ergosterinanreicherung zu bewirken. Für diese Versuche lag der prozentuelle Ergosterinanteil an den Gesamtsterinen im Mittel höher als bei der Alkoholdampfbehandlung auf nährstofflosen Böden.

¹⁰ CH. E. BILLS, O. N. MASSENGALE und P. S. PRICKETT, J. biol. Chem. 87 (1930) 259; 94 (1931) 213.

Bei der Prüfung des Anreicherungsvermögens einiger technischer Sprithefen fanden wir die in Tabelle 6 wiedergegebenen Werte. Sowohl die Handels-Preßhefe (Nr. 1) als auch die „enzymreichen“ Sprithefen (Nr. 2 bis 5) ergaben durchwegs geringere Ergosterinwerte als die Bierhefereinzuchten, obwohl der Ergosterinanteil an den Gesamtsterinen größer war als der Mittelwert bei Hefereinzuchten.

Tabelle 6.
Hefeunterlage ohne Nährstoff. Technische Sprithefen. Alkoholbehandlung.

Nr.	Tage	Hefeart	Hefemenge bez. auf Trocken- substanz mg	Sterin- Digitonide mg	Gesamt- sterine bez. auf Hefe- trocken- substanz ‰	Ergosterin bez. auf Gesamt- sterine ‰	Ergosterin bez. auf Hefe- trocken- substanz ‰
1	7	Preßhefe (Ottakring)	101·0	12·7	3·13	48·0	1·50
2	4	Enzymreiche Sprithefe	330·0	43·9	3·30	41·3	1·36
3	6	dgl.	162·4	20·5	3·16	40·0	1·26
4	11	dgl.	311·0	46·8	3·88	34·4	1·33
5	14	dgl.	141·0	17·0	3·01	36·9	1·11

Zunahme der Ergosterinwerte in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf der Anreicherung.

Um Klarheit darüber zu gewinnen, welche Veränderung der Anteil des Ergosterins an dem Gemisch der Gesamtsterine während des Anreicherungsverfahrens erfährt, wurden Zeitversuche zur Untersuchung des Hefesterinkomplexes nach bestimmten Zeitintervallen angestellt. Zu diesem Zweck erfolgte die Behandlung von reingezüchteten Bierhefen und Sprithefen

Tabelle 7.
Hefeunterlage ohne Nährstoff. Bierhefe-Reinzucht. Alkoholbehandlung.

Ein- wirkungs- dauer in Tagen	Hefemenge bez. auf Trocken- substanz mg	Sterin- Digitonide mg	Gesamt- sterine bez. auf Hefetrocken- substanz ‰	Ergosterin bez. auf Gesamt- sterine ‰	Ergosterin bez. auf Hefetrocken- substanz ‰
0	273·4	12·1	1·11	56·2	0·62
1	162·4	15·0	2·30	49·0	1·13
5	225·9	34·9	3·86	32·0	1·24
9	211·4	42·2	5·00	30·0	1·50
14	138·2	47·6	8·61	30·0	2·58

auf nährstofflosen Agarböden mittels eines Alkohol-Luftgemisches. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Ergosterin- und Gesamtsterinzunahme einer Bierhefereinzucht, die längere Zeit unter Würze gelagert hatte, zusammengefaßt und im Diagramm (Fig. 1) kurvenmäßig dargestellt.

Infolge der herabgeminderten Aktivität der Hefekultur¹¹ tritt erst nach längerer Behandlung (zwischen 5. und 9. Tag) die notwendige Anpassung der Hefe an das Trockenmilieu und damit ein stärkerer Anstieg der Sterinkurven ein. Aus diesem Versuch geht hervor, daß das Verhältnis des Ergosterins zu den Gesamtsterinen sich in einer bestimmten Weise verändert, und zwar nimmt der prozentuelle Ergosterinanteil des Gesamtsteringemisches im Verlaufe der Lipoidanreicherung stetig ab, in unserem Fall von 56·2 bis auf 30 %.

Die Hefereinzucht, die für den folgenden Versuch (s. Tab. 8) bestimmt war, wurde einer mehrmaligen kräftigen Angärung unterworfen, wobei ihr Ergosterinwert auf 0·32 % herabgedrückt werden konnte. Dies entspricht etwa der Hälfte des Ergosteringehaltes, der bei obiger Versuchsreihe (Tab. 7) als Anfangswert der unvorbehandelten Hefe gefunden wurde. Aus dem Diagramm (Fig. 2) geht hervor, daß keine Richtungsänderung der Sterinkurven eintritt, somit bei Verwendung von Hefen mit hoher enzymatischer Aktivität der Anreicherungs Vorgang einen normalen Verlauf nimmt. Nach elf Tagen wird ein Ergosterinwert von 4 % (auf Trockenhefe bezogen) erreicht.

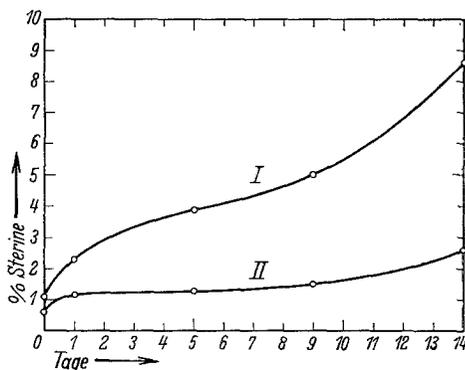


Fig. 1. I: % Gesamtsterine; II: % Ergosterin

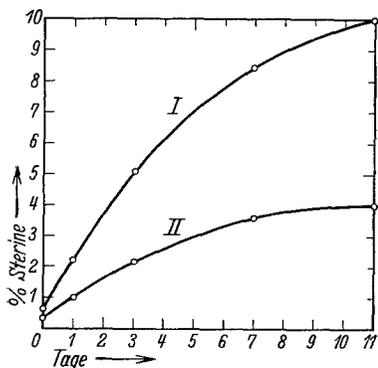


Fig. 2. I: % Gesamtsterine; II: % Ergosterin

¹¹ Wie aus den Angaben auf S. 265 hervorgeht, ist beim längeren Lagern der Hefe mit der Zunahme des Lipoid-(Gesamtsterin-)gehaltes eine Abnahme der biologischen Aktivität verbunden.

Auch bei dieser Versuchsreihe ließ sich eine stetige Abnahme des Ergosterinanteiles der Gesamtsterine feststellen, die aber geringer war als bei der vorhergehenden Reihe.

Tabelle 8.
Hefeunterlage ohne Nährstoff. Bierhefe-Reinzucht. Alkoholbehandlung.

Einwirkungsdauer in Tagen	Hefemenge bez. auf Trockensubstanz mg	Sterin-Digitonide mg	Gesamtsterine bez. auf Hefetrockensubstanz %	Ergosterin bez. auf Gesamtsterine %	Ergosterin bez. auf Hefetrockensubstanz %
0	1720	45.9	0.67	47.9	0.32
1	550	49.0	2.21	46.2	1.02
3	278	56.6	5.08	43.0	2.19
7	148	49.8	8.42	42.8	3.60
11	82.6	33.1	10.00	40.0	4.00

Bei Anreicherungsversuchen mit einer technischen Sprithefe wurden die in der Tab. 9 wiedergegebenen Werte erhalten.

Tabelle 9.
Hefeunterlage ohne Nährstoff. Sprithefe. Alkoholbehandlung.

Einwirkungsdauer in Tagen	Hefemenge bez. auf Trockensubstanz mg	Sterin-Digitonide mg	Gesamtsterine bez. auf Hefetrockensubstanz %	Ergosterin bez. auf Gesamtsterine %	Ergosterin bez. auf Hefetrockensubstanz %
0	1480	37.4	0.63	50.5	0.32
1	364	15.1	1.05	40.6	0.43
3	253	14.6	1.44	36.4	0.52
7	161	11.7	1.82	35.6	0.65

Beeinflussung der Ergosterinanreicherung
durch a) Stabilisierung der Wasserstoffionen-Konzentration,
b) Zusatz von Monojodessigsäure.

a) Zur Orientierung über den Einfluß der H⁺-Konzentration auf die Ergosterinanreicherung wurden einige Versuche mit Bierhefereinzuchten vorgenommen, die auf Agarböden mit Phosphatpuffer-Zusätzen vom p_H 6.8—7.0 während 7 Tagen in der gewohnten Weise mit einem Alkohol-Luft-Gemisch behandelt wurden. Wie aus den Werten der Tab. 10 hervorgeht, ergab sich beim Konstanthalten der H⁺-Konzentration, die ohne Pufferung regelmäßig nach kurzer Behandlungsdauer auf den $p_H=4$ absank¹², ein höherer Ergosterinanteil an den Gesamtsterinen. Die

¹² Vgl. 3. Mitteilung, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 225 (1934) 265.

Gesamtsterinwerte zeigten gegenüber dem Kontrollversuch entweder keine Veränderung (Nr. 2) oder sogar eine Erniedrigung (Nr. 3 und 4).

b) Monojodessigsäure¹³ bewirkte nicht nur eine starke Hemmung der biologischen Synthese der Gesamtsterine, sondern verminderte auch den Ergosterinanteil an den Gesamtsterinen erheblich (vgl. Tab. 10, Nr. 5)

Aus der Gegenüberstellung der Versuche 4 und 5 ergibt sich, daß die hemmende Wirkung der Jodessigsäure erst im deutlich sauren Gebiet zur vollen Geltung kommt. Bei Versuchsansatz Nr. 3 wurde einem phosphatgepufferten Agarboden Glycerophosphorsäure zugesetzt. Es zeigte sich bei einer Verminderung der Gesamtsterine eine Erhöhung des Ergosterinanteiles in der gleichen Größenordnung wie bei den Versuchen Nr. 2 und 4.

Tabelle 10.

Einfluß von pH und Monojodessigsäure auf die Ergosterinanreicherung. Bierhefe-reinzucht. Alkoholbehandlung. Versuchsdauer 7 Tage.

Nr.	Art der Bodenzusätze	Hefemenge bez. auf Trockensubstanz mg	Sterin-Digitonide mg	Gesamtsterine bez. auf Hefetrockensubstanz %	Ergosterin bez. auf Gesamtsterine %	Ergosterin bez. auf Hefetrockensubstanz %
1	keine	138·9	32·4	5·83	34·7	2·01
2	Phosphatpuffer	138·7	32·7	5·90	47·3	2·79
3	Phosphatpuffer, Glycerophosphorsäure	133·5	24·7	4·63	46·0	2·13
4	Phosphatpuffer, Jodessigsäure	263·9	10·6	4·01	44·3	1·78
5	Jodessigsäure	135·2	7·3	1·35	21·8	0·29

Auf je 50 cm^3 Agarunterlage kamen pro Schale zur Verwendung:

Phosphatpuffer: 5 cm^3 KH_2PO_4 , 5 cm^3 K_2HPO_4 .

Glycerophosphorsäure: 1 cm^3 (50% ige Lösung) neutralisiert durch 1·4 cm^3 3·8 n Natronlauge.

Monojodessigsäure: 0·01 g.

¹³ LUNDSGAARD, Über die Einwirkung der Monojodessigsäure auf den Spaltungs- und Oxydationsstoffwechsel. Biochem. Z. 220 (1930) 8.

Zusammenfassung.

1. Es wurde der Ergosteringehalt einiger Hefearten mit Hilfe der Ultraviolett-Absorptions-Analyse bestimmt.

2. Bei längerem Ruhezustand der unter Würze gelagerten Hefe wurden Ergosterin- und Gesamtsterinwerte gefunden, die gegenüber dem Ursprungswert auf das Doppelte bis Dreifache erhöht waren.

3. Lipoidangereicherte Bierhefen zeigten gegenüber unvorbehandelten Hefen durchwegs einen niedrigeren Ergosterinanteil an den Gesamtsterinen.

4. Bei Anwendung nährstoffhaltiger Hefeunterlagen wurden mittels Maltose die höchsten Ergosterinwerte erhalten.

5. Die relative Sterinanreicherung von Sprithefen ist unter den von uns gewählten Bedingungen bedeutend geringer als bei untergärigen Brauereihefen.

6. Im zeitlichen Verlaufe der Lipoidanreicherung erfolgt eine stetige Zunahme des Ergosteringehaltes. Die Steigerung des Ergosterinanteiles bleibt jedoch gegenüber derjenigen der übrigen Sterine zurück, und zwar beträgt der Ergosterinanteil unvorbehandelter Hefen etwa 50—60%, während er bei stark angereicherten Proben bis auf etwa 30% absinken kann.

7. Monojodessigsäure hemmt die biologische Synthese der Gesamtsterine und damit auch die des Ergosterins.

Für die tatkräftige Förderung unserer Arbeiten durch Gewährung einer Subvention aus den Erträgnissen der TREITL-Stiftung an den einen von uns (W. H.) sprechen wir der Akademie der Wissenschaften (mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse) in Wien unseren ergebensten Dank aus.