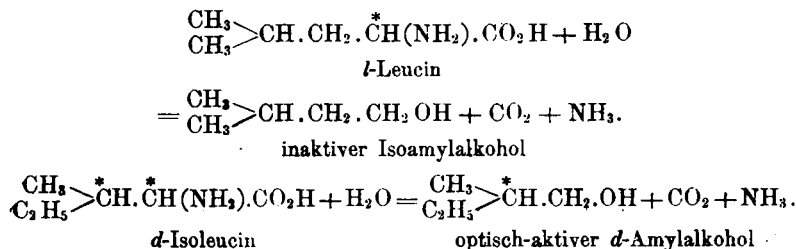


147. Felix Ehrlich: Über die Bedingungen der Fuselöl- bildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe.

(Eingegangen am 2. März 1907; vorgetragen in der Sitzung am 26. November 1906 vom Verfasser.)

In früheren Mitteilungen über die Entstehung des Fuselöls bei der Hefegärung ¹⁾ habe ich bereits mehrfach auf den nahen Zusammenhang zwischen der Fuselölbildung und dem Eiweißaufbau der Hefe aus Aminosäuren hingewiesen. Die Umwandlung der hauptsächlichsten Fuselölbildner, des Leucins und Isoleucins, in die entsprechenden Amylalkohole ist offenbar nur in dem Sinne verständlich, daß die beiden Leucine, die ausgezeichnete Stickstoffnährmittel für die Hefe sind, nicht als solche von der Hefe aufgenommen und ihrem Körper-eiweiß einverleibt werden, sondern während der Gärung vermutlich durch ein hydratisierendes Enzym der Hefe zuvor eine Spaltung in den um ein Kohlenstoffatom ärmeren Alkohol, sowie in Ammoniak und Kohlensäure erleiden, zufolge der beiden Gleichungen:



Während der bei dieser Reaktion entstandene Amylalkohol oder, allgemein gesprochen, das Fuselöl weiterhin unangegriffen in der Gärflüssigkeit zurückbleibt, wird das gleichzeitig gebildete Ammoniak unmittelbar nach seiner Abspaltung von der Hefe auf unlöslichen Stickstoff, d. h. also auf Körper-eiweiß, verarbeitet, was allein schon daraus hervorzugehen scheint, daß bei der Vergärung von reinem Zucker und reinem Leucin mit Reinzuchthefe weder im Verlauf des Gärprozesses, noch nach Beendigung desselben Ammoniak in der Lösung nachzuweisen ist, obwohl deutliche Mengen Fuselöl entstanden und ungefähr entsprechende Quantitäten Leucin aus der Lösung verschwunden sind. Als ein weiterer indirekter Beweis der Abhängigkeit der Fuselölbildung von dem Eiweißaufbau der lebenden Hefe kann gelten, daß Acetondauerhefe, also abgetötete Hefe, die eiweiß-

¹⁾ F. Ehrlich, Ztschr. d. Ver. d. Deutsch. Zuckerind. **55**, 539 [1905]; Biochem. Ztschr. **1**, 8 und **2**, 52 [1906].

aufbauende Enzyme sicher nicht enthält, unter sonst gleichen Versuchsbedingungen kein Fuselöl aus Leucin bildet und dieses überhaupt nicht angreift¹⁾).

Die Resultate der im folgenden mitgeteilten quantitativen Gärversuche²⁾ zeigen noch deutlicher, daß die Fuselölbildung im wesentlichen eine Folge der eiweißaufbauenden Tätigkeit der lebenden Hefezelle ist, indem sie über die Grenzen der Anreicherung an Fuselöl bei der Gärung und über die Mengenverhältnisse des vergorenen Leucins bezw. des aus der Gärflüssigkeit verschwundenen Stickstoffs zum entstandenen Amylalkohol genaueren Aufschluß geben und die starke Beeinflussung der Fuselölbildung aus Leucin bei Zusatz anderer von der Hefe leicht assimilierbarer Stickstoffverbindungen erweisen. Insofern hierdurch zum erstenmal die Mittel angezeigt sind, bei der Gärung ein Maximum oder Minimum an Fuselöl zu erhalten, können die Versuche wenigstens im Prinzip als Lösung des alten Problems der Gärungstechniker gelten, direkt durch Vergärung fuselreichen oder fuselarmen Spiritus zu erzeugen.

Um Leucin bei der Gärung in Amylalkohol überzuführen, kann man im wesentlichen zwei Wege einschlagen. Das eine Verfahren besteht darin, daß man eine Spur Hefe in eine mit den üblichen anorganischen Nährsalzen und Leucin als alleiniger Stickstoffquelle versetzte Zuckerslösung einimpft und unter Bedingungen, die der Rasse der Hefe angepaßt sind, zur Entwicklung kommen läßt. Hierbei wird in dem Maße, wie die Hefe bei gleichzeitiger Vergärung des Zuckers sich vermehrt und dem Leucin den Stickstoff zum Aufbau ihres Körpereißes entzieht, aus Leucin Amylalkohol gebildet. Dieses Verfahren ähnelt dem in der Gärungspraxis geübten insoweit, als auch hier durch einen relativ sehr kleinen Ansatz Hefe die Vergärung großer Zuckermengen bewirkt werden kann. Seine Durchführung im kleinen bietet indes mannigfache Schwierigkeiten, die besonders darin bestehen, daß infolge der leichten Infektionsgefahr so winziger Hefemengen die Lösungen sehr peinlich sterilisiert werden müssen, und daß schon aus diesem Grunde nur sehr geringe Mengen Leucin und in sehr großer Verdünnung auf einmal verarbeitet werden können, zu deren vollständiger Umwandlung in Fuselöl noch dazu recht lange Zeit erforderlich ist, da die Vermehrung der Hefezellen meist sehr langsam erfolgt.

¹⁾ F. Ehrlich, diese Berichte **89**, 4072 [1906].

²⁾ Nach Abfassung dieser Arbeit erschien eine Abhandlung von H. Pringsheim (Biochem. Ztschr. **3**, 121), deren Inhalt im wesentlichen eine Bestätigung meiner hier näher mitgeteilten, zum Teil schon früher (Biochem. Ztschr. **2**, 52 u. a. a. O.) vorläufig publizierten Versuchsergebnisse bildet.

Für die chemische Untersuchung der Frage wesentlich günstiger gestaltet sich ein anderes Gärverfahren, das ich der Hauptsache nach schon zur Spaltung racemischer Aminosäuren angegeben habe¹⁾. Läßt man nämlich fertig gebildete, möglichst stickstoffarme Hefe in großem Überschuß eine genügende Menge Kohlehydrate bei Gegenwart von Leucin vergären, so findet außer der Vergärung des Zuckers in der schnell mit Kohlensäure übersättigten, sauerstoffreien Lösung eine Anreicherung der Hefe, mit dem Stickstoff des Leucins statt unter gleichzeitiger Bildung von Amylalkohol. Dieses Verfahren, bei dem die große Anzahl lebenskräftiger Hefezellen jede Sterilisation der Lösungen überflüssig macht, bietet außer seiner bequemen Handhabung vor allem den Vorteil, daß man mit seiner Hilfe in sehr kurzer Zeit, nämlich in 1—3 Tagen, je nach der Menge der angewandten Hefe, eine verhältnismäßig große Quantität Fuselöl aus Leucin gewinnen kann, und ist gerade durch seine möglichste Anpassung an die Gärungsbedingungen in technischen Maischen sehr geeignet, ein deutliches Bild der Entstehung des Fuselöls im Betriebe der Spiritusbrennereien zu geben.

Als Hefe diente für die folgenden Versuche fast ausschließlich eine mir vom Berliner Institut für Gärungsgewerbe in liberalster Weise überlassene obergärige Reinzuchtheffe, Rasse XII, die zusammen mit der ebenfalls angewandten Rasse II die Mutterheffe fast sämtlicher deutscher Brennereien und Preßhefefabriken bildet²⁾ und schon aus diesem Grunde für das Studium der vorliegenden Frage besonders brauchbar erschien. Doch habe ich mich mehrfach davon überzeugt, daß auch andere Heferasen, namentlich auch untergärige Bierhefen, bei der Gärung aus Leucin Amylalkohol erzeugen.

Trägt man derartige Hefen in 5—10-prozentige, mit Leucin versetzte Zuckerlösungen ein, so fällt gegenüber der Vergärung von Zucker für sich bereits von vornherein auf, daß die Gärung meist schon einige Minuten nach dem Einrühren der Hefe sehr intensiv einsetzt, äußerst stürmisch verläuft und in verhältnismäßig kurzer Zeit beendet ist. Während zur totalen Vergärung von Zucker durch

¹⁾ Biochem. Ztschr. I. c. Dort und an den außerdem angegebenen Stellen findet sich auch eine eingehende Besprechung der bisherigen Literatur über die Fuselölfrage, auf die ich deswegen hier nicht weiter eingehe.

²⁾ Über ihre Bereitung und Beschaffenheit siehe P. Lindner in Lafars Handbuch der Technischen Mykologie, 2. Aufl., 5. Bd., 266.

Ich möchte nicht verfehlen, auch an dieser Stelle dem Direktor des Instituts für Gärungsgewerbe, Hrn. Geh. Reg. Rat Prof. Delbrück, für sein freundliches Entgegenkommen und für die wesentliche Unterstützung, die er meinen Arbeiten durch die Überlassung des wertvollen Hefematerials angedeihen ließ, meinen verbindlichsten Dank zu sagen.

den fünften Teil seines Gewichts an Hefe, je nachdem der Stickstoffgehalt der Hefe höher oder niedriger ist, eine Zeit von 5—14 Tagen erforderlich ist, genügt ein Zusatz von wenigen Grammen Leucin zu der Gärflüssigkeit, um schon in 2—3 Tagen vollständige Vergärung zu erzielen. Dabei tritt bereits einige Stunden nach Beginn der Kohlensäureentwicklung deutlicher Geruch nach Fruchtäther auf, der dann immer mehr zunimmt. Die fertig vergorene Flüssigkeit riecht meist schon an sich intensiv nach Amylester. Der abdestillierte und mit Kaliumcarbonat entwässerte Alkohol besitzt den äußerst charakteristischen Fuselgeruch, der besonders beim Verdunsten stark hervortritt, und liefert beim Fraktionieren stets deutliche Mengen von inaktivem Amylalkohol. Ähnliche Erscheinungen beobachtet man, wenn vorher in der Zuckerlösung statt Leucin Isoleucin gelöst war, mit dem Unterschiede, daß der ebenso isolierte Alkohol dann linksdrehenden Amylalkohol enthält.

Was die näheren Bedingungen der nachstehend aufgeführten Gärversuche anbetrifft, so wurde meist in der Weise verfahren, daß in einem mit Schwefelsäuregärverschluß versehenen 3- oder 4-L-Stehkolben 200 g Zucker zusammen mit 3—10 g der betreffenden Stickstoffsubstanz in 2—2½ L Leitungswasser, wenn nötig, unter Erwärmen gelöst und mit 40—60 g gewöhnlich frisch bezogener Hefe bei Zimmertemperatur vergoren wurden. Um den Einfluß der einzelnen Faktoren auf die Fuselölbildung zu studieren, wurden jedoch in mehreren Fällen die Mengenverhältnisse von Zucker, Hefe und Leucin oder anderer Stickstoffkörper verschiedentlich variiert. Anfangs geschah die Sterilisierung der Lösungen vor der Gärung besonders sorgfältig, indem die Flüssigkeit jedesmal unter Aufsetzen eines Wattebausches mehrere Stunden auf dem Dampfbade oder über freier Flamme erhitzt wurde, doch erwies sich späterhin diese Vorsicht als unnötig, da man ohne vorheriges Kochen der Lösungen stets die gleichen Resultate wie bei den sterilisierten Proben erhielt. Des besseren Vergleiches wegen wurden die einzelnen Vergärungen bis zum vollständigen Verschwinden des Zuckers durchgeführt, d. h. bis zu dem Zeitpunkte, wo eine mit Tonerdebrei versetzte, von der Hefe abfiltrierte Probe der betreffenden Lösung auf Zusatz von α -Naphthol und Schwefelsäure die Zuckerreaktion nicht mehr gab. Für die Weiterbehandlung der fertig vergorenen Flüssigkeiten erwies es sich als zweckmäßig, die Hefe zuvor durch Papier- oder Tonfilter abzufiltrieren, um beim Aufkochen die Bildung von Zersetzungsprodukten der Hefe zu vermeiden, die namentlich störend wirken, wenn es sich darum handelt, die Menge der nach der Gärung zurückbleibenden, unangegriffenen Aminosäure möglichst quantitativ zu bestimmen. Aus

diesem Grunde wurden auch den Zuckerlösungen keine anorganischen Nährsalze für die Hefe zugesetzt, bei deren Gegenwart im übrigen, wie nicht besonders betont zu werden braucht, der Prozeß der Fuselölbildung genau so verläuft wie in reinen Lösungen von Zucker und Aminosäuren. Zur Isolierung des entstandenen Fuselöls war bei den früher beschriebenen Versuchen¹⁾ so verfahren worden, daß die von der Hefe abfiltrierten Lösungen destilliert, aus dem Destillat der Alkohol mit Pottasche abgeschieden und fraktioniert wurde. Entsprechend der zugesetzten Menge Leucin oder Isoleucin ließ sich dabei stets eine bestimmte Quantität Amylalkohol isolieren, der durch seinen Geruch, event. durch die Drehung, ferner durch die Überführung in die entsprechende Valeriansäure mittels Oxydation und Bestimmung des Silbersalzes näher zu charakterisieren war. Ein solches Verfahren ist natürlich wenig geeignet, über die genaue Menge des entstandenen Fuselöls Aufschluß zu geben, da selbst bei der Fraktionierung mit einem Siedeaufsatz viel Amylalkohol unter seinem Siedepunkt mit den Alkoholdämpfen mitgerissen wird und der Abtrennung einer relativ geringen Menge Fuselöl von einem großen Überschuß Äthylalkohol noch viele anderen Schwierigkeiten entgegenstehen. Für die folgenden Versuche wurde daher ausschließlich die bisher in der Gärungspraxis am meisten angewandte Fuselölbestimmungsmethode nach Röse-Herzfeld benutzt²⁾, die bekanntlich in der volumetrischen Messung der Zunahme einer Chloroformschicht beim Ausschütteln von Fuselöl aus einem bestimmt verdünnten Alkohol besteht. Auch diese Methode bietet manche Übelstände, da mitunter auch andere flüchtige Substanzen als der Amylalkohol und seine Homologen eine Volumvermehrung des Chloroforms herbeiführen können. So fand ich z. B., daß gewisse terpenartige, vielleicht aus der Vergärung des Asparagins herstammende Verbindungen, wenn auch geringe, so doch immerhin deutliche Vermehrung des Chloroform-Volumens bewirken. Einen ähnlichen Einfluß scheinen andere, bisher nicht näher untersuchte, flüchtige, basisch riechende Zersetzungsprodukte bei der Melassegärung zu haben. Da bei der Ausarbeitung der Methode indes ursprünglich der Amylalkohol oder wenigstens ein Gemisch von Iso- und *d*-Amylalkohol die Grundlage gebildet hat, und da es sich bei den folgenden Untersuchungen, die von reinen Substanzen ausgehen, im wesentlichen nur um die Bestimmung dieser beiden Alkohole handeln konnte, so dürften die damit gewonnenen Resultate für die vorliegenden Zwecke genügende Genauigkeit besitzen, um so

¹⁾ F. Ehrlich, Ztschr. d. Vereins der Deutsch. Zuckerind. 55, 557.

²⁾ Nach der Beschreibung in G. Lunges Chemisch-technische Untersuchungsmethoden, 5. Aufl., Berlin 1905.

mehr, als es in diesem Falle weniger auf absolute Werte als auf Vergleichszahlen der einzelnen Resultate unter einander und mit denen der Gärungspraxis ankam, in der die Fuselölfrage gerade an der Hand der Röschen Methode bisher am eingehendsten studiert ist. Zur Ausführung der Fuselölbestimmung wurde jedesmal die hefefreie Lösung über freier Flamme so lange destilliert, bis aller Alkohol übergegangen war. Aus dem zur Verseifung des nebenher entstandenen Amyl- oder anderer Ester und zur Zersetzung von Aldehyden mit Natronlauge alkalisch gemachten Destillat wurde der Alkohol direkt oder nach Abheben mit Pottasche und Verdünnen mit Wasser nochmals abgetrieben. Der so vollständig gewonnene, wasserhaltige Spiritus wurde dann nach der Bestimmung des spezifischen Gewichts auf genau 30 Volumenprocente gebracht und im Herzfeldschen Apparat, der zuvor mit reinem Äthylalkohol eingestellt war, in der üblichen Weise mit Chloroform unter Zusatz von Schwefelsäure ausgeschüttelt. Die Fuselölbestimmungen ließen sich nach dieser Methode mit einer hinreichenden Genauigkeit von ca. 0.05 Gewichtsprozenten Fuselöl, berechnet auf wasserfreien Alkohol, ausführen. Alle im folgenden mitgetheilten Resultate geben den Fuselölgehalt in Prozenten, bezogen auf den bei der Gärung gewonnenen absoluten Alkohol, an.

I. Fuselöl bei der Hefegärung des Zuckers ohne und mit Zusatz von Leucin.

Während nach den bisherigen Beobachtungen der Rohspiritus der Brennerien einen Fuselölgehalt von durchschnittlich 0.4 % und im Maximum von 0.6 % besitzt, kann man, wie aus den nachstehenden Untersuchungen hervorgeht, bei der Vergärung von reinem Zucker mit Reinzuchtheffe durch vorherigen Zusatz von Leucin den Fuselölgehalt des Alkohols bis auf 3 % steigern.

Dabei zeigen Parallelversuche, daß auch bei der Vergärung des Zuckers mit Hefe für sich wahrnehmbare Mengen Fuselöl entstehen, die je nach den Mengenverhältnissen von Zucker und Hefe und je nach dem Stickstoffgehalt der Hefe 0.4—0.7 % betragen können. Diese Erscheinung steht mit der Annahme der Entstehung des Amylalkohols aus Leucin nicht im Widerspruch, sondern ist im Gegenteil ebenso wie die Bildung höherer Alkohole bei der Selbstgärung der Hefe sehr leicht dadurch zu erklären, daß die Hefe, wenn ihr jede Stickstoffnahrung fehlt, zunächst ihr eigenes Körpereiweiß durch eine Art Autolyse teilweise abbaut. Hierbei spalten sich, wie das aus anderen enzymatischen Eiweißhydrolysen ¹⁾ zu folgern ist, zuerst neben

¹⁾ E. Fischer und Bergell, diese Berichte **36**, 2593 [1903].

Tyrosin Leucin und wohl auch Isoleucin¹⁾ und Valin ab. Aus diesen Aminosäuren, die besonders günstige Stickstoffquellen für die Hefe sind, bilden dann unmittelbar nach ihrer Abspaltung während der Zuckergärung die noch frischen lebensfähigen Hefezellen Fuselöl, indem sie ihnen in ähnlicher Weise den Stickstoff zum Aufbau ihres Körperproteins entziehen, wie etwa von vornherein der Lösung zugesetztem Leucin. Mit dieser Auffassung steht auch im Einklang, daß eine stickstoffärmere Hefe längere Zeit zur Vergärung einer bestimmten Menge Zucker braucht und dabei mehr Fuselöl bildet als dieselbe Quantität einer stickstoffreichen und deshalb gärkräftigeren Hefe.

1. 200 g Zucker (ungeblaute Raffinade des Handels) wurden in 2 Liter Leitungswasser gelöst und die Lösung durch 3-stündiges Erhitzen sterilisiert. In die abgekühlte Lösung wurden 40 g frische obergärige Preßhefe, Rasse XII, eingetragen. Die Hefe besaß ungefähr 9% Stickstoff in der Trockensubstanz. Die Gärung wurde bei Zimmertemperatur bis zum Verschwinden der Zuckerreaktion fortgeführt und war in 5 Tagen beendet. Der abdestillierte Alkohol roch beim Verdunsten schwach nach Fusel. Entstanden 97.32 g Alkohol (nach der Methode der spezifischen Gewichtsbestimmung):

0.40% Fuselöl.

2. Eine Lösung von 200 g Zucker in 2 L Leitungswasser wurde nach 4-stündigem Erhitzen zwecks Sterilisierung abgekühlt und mit 40 g frischer Preßhefe derselben Rasse versetzt. Ihr Stickstoffgehalt betrug nur etwas über 6%. Die Gärung bei Zimmertemperatur war in ungefähr 14 Tagen beendet. Der abdestillierte Alkohol zeigte beim Verdunsten deutlichen Fuselgeruch.

0.72% Fuselöl.

3. 100 g Zucker in 2½ L Leitungswasser gelöst, wurden mit 200 g frisch bezogener Preßhefe derselben Rasse vergoren. Die Gärung ist in 20 Stunden vollständig beendet. Die Lösung wurde von der Hefe durch Tonfilter unter starker Kühlung und Vorlegen einer Waschflasche zum Auffangen etwa mitgerissenen Alkohols abgesaugt.

0.44% Fuselöl.

4. 200 g Zucker und 6 g synthetisches γ -Leucin wurden in 2 L Leitungswasser gelöst, die Lösung durch 3-stündiges Erhitzen sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 40 g derselben frischen Preßhefe wie in Versuch 1. versetzt. Die Gärung bei Zimmertemperatur war in 4 Tagen beendet. Die vergorene Flüssigkeit roch stark nach Amylester, der daraus nach dem Abfiltrieren der Hefe isolierte Alkohol zeigte besonders beim Verdunsten intensiven hustenerregenden Fuselgeruch. Entstanden 97.26 g Alkohol.

2.11% Fuselöl.

Der Chloroform-Auszug zeigt, im 2-dm-Rohr beobachtet, keine Drehung. Aus der vom Alkohol befreiten Lösung lassen sich beim Eindampfen 2.5 g

¹⁾ Bei der Autolyse der hier verwandten obergärigen Brennerhefe, Rasse XII, erhält man, worüber ich an anderer Stelle gemeinsam mit Hrn. cand. chem. Wendel berichten werde, außer Leucin Isoleucin und Valin.

Leucin zurückgewinnen, das umkrystallisiert eine spezifische Drehung in 20-prozentiger Salzsäure von $[\alpha]_D^{20} = -15.2^\circ$ besitzt.

Nach der Fuselölbestimmung sind im ganzen 2.04 g Fuselöl resp. Amylalkohol entstanden, die 3.04 g vergorenem Leucin entsprechen würden, da sich aus Leucin eine theoretische Ausbeute von 67% seines Gewichts an Amylalkohol berechnet. Es sind also in diesem Falle auf ursprünglich vorhandenes *l*-Leucin berechnet 101%, auf Leucin, das aus der Lösung verschwunden ist, bezogen 87% der theoretischen Ausbeute an Amylalkohol gebildet worden.

5. 250 g Zucker und 10 g *r*-Leucin wurden in 2½ L Leitungswasser unter Erwärmen gelöst. In die sofort abgekühlte Lösung wurden 100 g frische obergärige Preßhefe, Rasse XII, eingetragen. Die Gärung ist in 2 Tagen beendet. Entstanden 122.76 g Alkohol.
2.33% Fuselöl.

Aus der Lösung wurden 4.75 g rohes, auf Ton getrocknetes Leucin zurückgewonnen, das nach dem Umkrystallisieren in 20-prozentiger Salzsäure $[\alpha]_D^{20} = -15.4^\circ$ zeigte. Die Fuselölausbeute weist 2.86 g Amylalkohol entspr. 4.27 g vergorenem Leucin aus.

6. In einer Lösung von 250 g Zucker und 10 g *r*-Leucin in 2½ L Wasser wurden 100 g frische obergärige Preßhefe, Rasse II, mit einem Stickstoffgehalt von 7.98% in der Trockensubstanz eingetragen. Die Gärung verlief unter starker Schaumbildung und war in 2 Tagen beendet.
2.40% Fuselöl.

Zurückgewonnen wurden 5.2 g rohes Leucin, aus dem umkrystallisiert 3.6 g reine Substanz von $[\alpha]_D^{20} = -15.5^\circ$ in 20-prozentiger Salzsäure zu erhalten waren.

7. Eine Lösung von 200 g Zucker und 8 g *r*-Leucin, in 2 L Wasser, wurde 4 Stunden auf dem Dampfbad sterilisiert, abgekühlt und mit 40 g frischer obergäriger Preßhefe, Rasse XII, versetzt. Gärung in 3 Tagen beendet.
2.98% Fuselöl.

8. In eine Lösung von 250 g Zucker und 10 g *r*-Leucin in 2½ L Wasser wurden 100 g frische untergärige Bierpreßhefe eingetragen. Die Hefe besaß 27% Trockensubstanz und 2.14% Asche, der Stickstoffgehalt der Trockensubstanz betrug 9.78%. Die Gärung war in 2 Tagen vollständig beendet. Die vergorene, gelbbraungefärbte Lösung zeigte wie bei den vorigen Versuchen deutlichen Amylestergeruch.

1.55% Fuselöl.

Aus der Lösung wurden 7.8 g rohes, graubraun gefärbtes Leucin zurückgewonnen, das nach der Reinigung 5.8 g Substanz von $[\alpha]_D^{20} = -5.6^\circ$ in 20-prozentiger Salzsäure lieferte.

Infolge des hohen Stickstoffgehalts der Hefe und des anhaftenden Würzebestandteils ist hier nur ein Teil des *l*-Leucins angegriffen worden und daher auch der Fuselölgehalt des Alkohols ein niedrigerer.

9. Eine Lösung von 100 g Zucker und 20 g *r*-Leucin in 2½ L Wasser wurde mit 200 g derselben frischen obergärigen Preßhefe (Rasse XII wie in

Versuch 3) zur Vergärung angesetzt. Der Zucker ist in ca. 15 Stunden vergoren. Die Weiterbehandlung geschah wie in Versuch 3.

2.11 % Fuselöl.

Zurückgewonnen ungefähr 18 g Rohprodukt, das beim Umkrystallisieren 15.3 g reines unangegriffenes γ -Leucin liefert. Aus den Mutterlaugen hiervon wurden noch etwa 2 g schwach linksdrehendes Leucin (in Salzsäure) erhalten.

10. 200 g Zucker und 2.5 g d -Isoleucin aus Strontianmelasseschlempe wurden in 2 L Wasser gelöst, die Lösung durch 3-stündiges Erhitzen sterilisiert und mit 60 g frischer obergäriger Preßhefe, Rasse XII, versetzt. Die Gärung war in 4 Tagen beendet. Die vergorene Flüssigkeit roch nach Fruchtäther und zeigte beim Aufkochen Fuselgeruch. Entstanden 93.99 g Alkohol.

1.44 % Fuselöl.

Der Chloroform-Auszug, 22.5 ccm, dreht deutlich links, und zwar beträgt für $l=2$, $\alpha_D = -0.09^\circ$ (siehe dagegen Versuch 4). 100 ccm des auf 30 Volumenprocente verdünnten Alkohols wurden mit Pottasche entwässert. Es wurden auf diese Weise 22.3 g Alkohol von 0.15° Linksdrehung im 2-dm-Rohr isoliert.

Die Fuselölbestimmung läßt auf eine Ausbeute von 1.35 g d -Amylalkohol schließen, entspr. 2.01 g vergorenen d -Isoleucins. Aus der vom Alkohol befreiten vergorenen Lösung ließen sich nur Spuren der Aminosäure zurückgewinnen.

Die Resultate der mitgetheilten Versuche zeigen also deutlich, daß man bei der Hefegärung des Zuckers durch Zusatz von Leucin oder Isoleucin den Fuselölgehalt des Spiritus bis auf das 7—8-fache der gewöhnlich bei der Vergärung von Zucker und Hefe für sich erhaltenen Menge steigern kann. Da es sich hier um eine Stickstoffanreicherung der Hefe zum Zwecke der Zymasebildung und der Vergärung des vorgelegten Zuckers handelt, so wird man, wie aus den mehrfach varierten Versuchen folgt, bei Anwendung überschüssigen Leucins die größte Menge Fuselöl in dem Rohspiritus dann erhalten, wenn man eine relativ geringe Quantität Hefe auf viel Zucker wirken läßt, am besten ungefähr im Verhältnis von 1:5, während bei Vergärung von wenig Zucker mit sehr viel Hefe fuselärmerer Alkohol entsteht, da infolge des großen Zymasevorrates die Hefe dann nur ein geringes Stickstoffbedürfnis zeigt und bei der sehr schnell verlaufenden Gärung des minimalen Vorrats an Zucker viel weniger Leucin angreifen kann. Im übrigen hängt die Anreicherung des Alkohols an Fuselöl nach dem hier beschriebenen Verfahren sehr wesentlich von dem Stickstoffgehalt der Hefe ab. Die bei diesen Versuchen benutzten Hefen enthielten 6—10 % Stickstoff in der Trockensubstanz, durchschnittlich 8 % und in den meisten Fällen noch etwas mehr. Da der Stickstoffgehalt der Hefen zwischen 5—12 % in der Trockensubstanz schwanken

kann¹⁾, so steht zu erwarten, daß man durch Anwendung einer sehr stickstoffarmen Hefe, die der Lösung viel mehr Leucin-Stickstoff entzieht als eine stickstoffreiche, etwa einer solchen, die nach dem Hayduck'schen Lüftungsverfahren hergestellt ist, noch höherprozentigen, fuselhaltigen Alkohol wird gewinnen können²⁾. Auch läßt sich voraussichtlich eine noch viel beträchtlichere Anreicherung des Spiritus an Amylalkohol bei der Gärung dadurch erzielen, daß man der Hefe durch Zufügen von Nährsalzen gleichzeitig Gelegenheit gibt, in den Zucker-Leucin-Lösungen weiter zu wachsen und dabei ihr gesamtes Körpereiß aus dem Stickstoff des Leucins aufzubauen. Im übrigen dürfte diese allein für die Gärungspraxis wichtige Frage der möglichsten Steigerung des Fuselölgehaltes im Rohspiritus, nachdem man erkannt hat, daß das Fuselöl nicht aus dem Zucker entsteht, wesentlich an Bedeutung verlieren, da es ja, wie die vorstehenden Versuche zeigen, bei richtiger Wahl der Mengenverhältnisse so reichlich zur Verfügung stehender Materialien, wie des Zuckers und der Hefe, ein leichtes ist, jede beliebige Quantität Leucin durch die Gärung in Amylalkohol überzuführen.

II. Stickstoffbilanz bei der Hefegärung von Zucker und Leucin.

Bei den oben beschriebenen Gärversuchen wurde in den meisten Fällen außer der Bestimmung des Fuselöls und Alkohols auch eine möglichst vollständige Isolierung des unangegriffenen Leucins aus der vergorenen Lösung durchgeführt. War auf Zusatz von inaktivem Leucin Fuselöl bei der Gärung entstanden, so erwies sich das zurückgewonnene Leucin stets als optisch aktiv und zwar entsprechend der Drehungsrichtung des *d*-Leucins, da die natürlich vorkommende *l*-Komponente von der Hefe zur Deckung ihres Stickstoffbedarfs bevorzugt wird³⁾. Die Menge des aus der gärenden Lösung verschwundenen Leucins entsprach im allgemeinen ungefähr der des entstandenen Amylalkohols. Daß die Fuselölausbeute meist niedriger war, als sich aus

¹⁾ Maercker-Delbrück, Handbuch der Spiritusfabrikation, Berlin, 8. Aufl., 1908.

²⁾ Effront (Bullet. de l'assoc. de chim. de sucrerie et de distillerie **23**, 393; Chem. Zentralbl. **1905**, II, 1811) gibt nach Kenntnis meiner ersten Fuselölarbeiten an, daß er durch Zusatz von peptonisierten Brauerei- und Brennereitreibern zur Maische Amylalkohol bis zu 5—6% von der Menge des erzielten Äthylalkohols habe gewinnen können. Seine Angaben stehen allerdings zu den weiterhin von mir erhaltenen, oben mitgeteilten Resultaten im Widerspruch.

³⁾ F. Ehrlich, Biochem. Ztschr. **1**, 25 [1906].

der Quantität des nicht wiedergefundenen Leucins berechnete, erklärt sich daraus, daß die quantitative Isolierung der Aminosäure aus dem Sirup der eingedampften Gärflüssigkeit nicht möglich ist, und daß auch beim Reinigen des Rohproduktes Verluste nicht zu vermeiden sind.

Um eine genauere Bilanz der Leucingärung und gleichzeitig ein ungefähres Bild von dem Schicksal des abgespaltenen Stickstoffs zu erhalten, über das die Methode der Rückgewinnung des unangegriffenen Leucins nichts aussagt, habe ich den folgenden Gärversuch angestellt, bei dem eine genau abgewogene Menge Leucin zusammen mit einer genügenden Quantität Zucker mit Hefe vergoren und in der vergorenen Lösung nach dem Abfiltrieren der Hefe der Fuselöl- und der Stickstoffgehalt bestimmt wurde. Auch ein solches Verfahren kann natürlich auf absolute Genauigkeit keinen Anspruch erheben. Denn einmal erhält man, wie schon oben erwähnt, mit der Röse-Herzfeldschen Fuselölbestimmung nur Annäherungswerte, und andererseits ist auch der nach der Gärung von Leucin in der Lösung noch nachweisbare Stickstoff nicht ausschließlich als Leucinstickstoff anzusprechen. Wie ich nämlich bei allen hier beschriebenen Versuchen beobachtet habe, findet während der Hefegärung außer der Fuselölbildung eine Reihe anderer Stoffwechselprozesse der Hefe statt, die u. a. zur Folge haben, daß sich besonders aus dem Nuclein des Hefeeiweißes eine Reihe Stickstoffverbindungen abspalten, ähnlich denen, die bei der Autolyse der Hefe beobachtet sind¹⁾. So gaben sämtliche vergorenen Zuckerslösungen, am stärksten diejenigen, denen ursprünglich keine Stickstoffnahrung zugesetzt war, auch nach sofortigem Abfiltrieren der Hefe bei beendeter Gärung deutlich die für Purin- und Hexoubasen typischen Reaktionen²⁾. Es war daher von vorn herein zu erwarten, daß bei der Aufstellung einer Bilanz lediglich auf Grund von Stickstoffbestimmungen eine geringere Menge Leucin aus der Lösung verschwunden und umgesetzt erschien, als sich aus der tatsächlich erhaltenen Ausbeute an Fuselöl berechnete. Sieht man von diesem

¹⁾ E. Salkowski, Ztschr. für physiol. Chem. **13**, 506; Ztschr. für klin. Med. **17**, Suppl.; Zentralbl. für die medicin. Wissensch. **1889**, Nr. 13. — Kutscher, Ztschr. für physiol. Chem. **32**, 59. — Schenk, Wochenschr. für Brauerei **22**, 221.

²⁾ Vielleicht erleiden hierbei einzelne der aus dem Hefenuclein abgespaltenen Substanzen eine ähnliche Desamidierung wie das Leucin. In dieser Hinsicht sei daran erinnert, daß bei der Autolyse der Hefe neben Guanin Xanthin und neben Adenin Hypoxanthin beobachtet ist. Ich beabsichtige, das Verhalten dieser und ähnlicher Substanzen bei der Gärung noch eingehend zu untersuchen.

Fehlbetrag ab, so zeigt der folgende einfache Versuch immerhin deutlich genug, daß bei der Leucingärung eine dem verbrauchten Leucin und der erhaltenen Menge Amylalkohol ungefähr entsprechende Menge Stickstoff aus der gärenden Lösung verschwindet. Da nach allen bisherigen Erfahrungen eine Abspaltung von elementarem Stickstoff bei der Gärung nicht stattfindet und etwa entstandenes Ammoniak oder flüchtige Basen aus den stets essig- und milchsäuren Gärflüssigkeiten nicht entweichen können und tatsächlich in der vorgelegten Schwefelsäure auch nie beobachtet wurden, so bleibt nur die Annahme übrig, daß der aus dem Leucin abgespaltene Stickstoff sofort von der Hefe aufgenommen und von ihr zu in Wasser unlöslichem Körpereiweiß umgewandelt wird. Im Zusammenhang mit den früher erläuterten Tatsachen, daß bei der Gärung des Zuckers mit lebender Hefe zugesetztes Leucin verschwindet, inaktives Leucin asymmetrisch gespalten wird, daß aber abgetötete Hefe aus Leucin keinen Amylalkohol zu erzeugen vermag, kann der folgende Versuch mit als Beweis dafür gelten, daß die Fuselölbildung eine Folge der eiweißaufbauenden Tätigkeit der lebenden Hefe ist und in dem Maße erfolgt, wie die Hefe dem Leucin, Isoleucin, Valin oder anderen Aminosäuren den Stickstoff zum Aufbau ihres Körperproteins entzieht.

200 g chemisch reiner Zucker wurden zusammen mit genau 6.5 g reinem γ -Leucin in einem 3 L-Kolben in 2 L Leitungswasser unter Erwärmen gelöst und die Lösung ungefähr 1 Stunde in schwachem Sieden erhalten. In die abgekühlte Flüssigkeit wurden sofort 40 g ganz frisch bezogene obergärige Preßhefe Rasse XII unter Nachspülung mit destilliertem Wasser eingetragen und unter starkem Schütteln emulsionsartig verteilt. Der Stickstoffgehalt der Hefetrockensubstanz betrug ungefähr 9 %, war also ein verhältnismäßig hoher. Nach Aufsetzen eines Gärverschlusses mit konzentrierter Schwefelsäure wurde der verschlossene Kolben auf einer Wage tariert und dann bei Zimmertemperatur zur Gärung hingestellt. Zur schnellen Entwicklung der Kohlensäure wurde der Kolben häufig geschüttelt. Durch Wägungen ließ sich feststellen, daß die Gärung am 3. Tage im wesentlichen beendet war. Unter häufigem Schütteln wurde der Kolben noch 2 Tage aufbewahrt und dann gewogen. Gewichtsabnahme infolge entwickelter Kohlensäure 91.4 g. Darauf wurde in einem kühlen Raume die Hefe über ein doppeltes Filter vollständig abfiltriert und wiederholt gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Das absolut klare, hefefreie Filtrat wurde gesammelt, mit 20 cm verdünnter Schwefelsäure versetzt und so lange destilliert, bis ungefähr 1½ L Flüssigkeit übergegangen waren.

Verarbeitung des Destillates. Das Destillat wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht und dann nochmals destilliert, bis der gesamte Alkohol übergegangen war, und darauf eine spezifische Gewichtsbestimmung der schließlich erhaltenen und gewogenen Flüssigkeit ausgeführt. Danach berechnet sich die entstandene Alkoholmenge zu 99.22 g. Eine besonders sorgfältig ausgeführte Fuselölbestimmung ergab 2.11 % Fuselöl. Es sind also

bei der Gärung 2.09 g Amylalkohol entstanden, die theoretisch 3.12 g verbrauchtem Leucin entsprechen würden.

Verarbeitung der zurückbleibenden alkoholfreien Flüssigkeit. Die nach dem Abdestillieren des Alkohols zurückbleibende saure Flüssigkeit wurde vorsichtig auf ungefähr 100 ccm eingedampft, in einen Meßkolben übergespült und auf 500 ccm genau aufgefüllt. 100 ccm davon verbrauchten, eingeengt und nach Kjeldahl verbrannt, im Mittel von 2 Bestimmungen 32.2 ccm $\frac{1}{5}$ -H₂SO₄, woraus sich für das gesamte Filtrat von der Hefe ein Stickstoffgehalt von 0.4508 g Stickstoff berechnet. Es ergibt sich also folgende Bilanz:

Vor der Gärung in der Lösung	6.5 g Leucin	=	0.6949 g N,
Nach der Gärung im Filtrat von der Hefe			0.4508 » »,
Gesamtstickstoff während der Gärung aus der			
Lösung verschwunden			0.2441 g N.

Die im Filtrat von der Hefe verbleibenden 0.4508 g Stickstoff sind nicht allein auf Rechnung des unangegriffenen Leucins zu setzen, sondern es sind aus der Hefe Stickstoffsubstanzen in Lösung gegangen, was daraus hervorgeht, daß die Lösung Niederschläge mit Bleiessig (nach Entfernung der Schwefelsäure), Phosphormolybdän- und Phosphorwolframsäure, ammoniakalischer Silberlösung, Quecksilberoxydulnitrat etc. gibt. Mit Neblers Reagens wurde eine schwach gelbliche Fällung erhalten.

Um den Anteil wenigstens eines Teiles der aus der Hefe in Lösung gegangenen Stickstoffkörper an der nach der Gärung in der Flüssigkeit zurückbleibenden Gesamtstickstoffmenge zu ermitteln, wurden 150 ccm des wie oben beschrieben behandelten Filtrats mit Phosphorwolframsäure gefällt, das Filtrat des gut ausgewaschenen Niederschlages eingedampft und nach Kjeldahl verbrannt. Verbraucht 44.4 ccm $\frac{1}{5}$ -Schwefelsäure, entsprechend 0.4144 g Stickstoff in der gesamten, von der Hefe abfiltrierten Flüssigkeit. Es sind also durch Phosphorwolframsäure noch 0.0864 g Stickstoff gefällt worden, d. h. 8 % vom Gesamtstickstoff, der nach der Gärung in Lösung vorhanden war.

Rechnet man die nach Fällung mit Phosphorwolframsäure noch im Gesamtfiltrat verbleibenden 0.4144 g Stickstoff auf Leucin um, so ergibt sich folgende Bilanz der Leucingärung:

Vor der Gärung in Lösung	0.6949 g N	=	6.50 g Leucin,
Nach » » » »	0.4144 » »	=	3.88 » » (?),
Während der Gärung aus der Lösung			
verschwunden	0.2805 g N	=	2.62 g Leucin.

Da unter Zugrundelegung der Fuselölbestimmung im ganzen 2.03 g Amylalkohol, entsprechend 3.12 g Leucin, bei der Gärung entstanden sind, so hätte sich also eine 0.5 g Leucin entsprechende Menge Amylalkohol mehr gebildet, als sich aus der Quantität des verschwundenen Leucins berechnet. Indes ist diese Mehrausbeute an Fuselöl nur eine scheinbare, da, wie aus dem Vorstehenden folgt, sicher auch eine größere Quantität Leucin, als die Stickstoffzahlen erweisen, umgesetzt ist, dessen genaue Ermittlung bisher aber daran

scheiterte, daß es keine exakte analytische Bestimmung dieser Aminosäure neben den andern, in Lösung gegangenen, stickstoffhaltigen Hefesubstanzen gibt.

III. Der Einfluß anderer Stickstoffsubstanzen auf die Fuselölbildung der Hefe.

War die Entstehung höherer Alkohole bei der Gärung wirklich eine Folge der Stickstoffassimilation der lebenden Hefe aus den entsprechenden Aminosäuren, so mußte offenbar eine sehr merkbare Beeinflussung der Fuselölbildung dann stattfinden, wenn der Hefe bei der Gärung außer Leucin und seinen Homologen noch andere leichter assimilierbare Stickstoffverbindungen vorgelegt werden. Von solchen Stickstoffkörpern kamen vor allem diejenigen mit leicht verseifbarem Stickstoff in Betracht, wie das Asparagin, das schon seit langer Zeit als vorzügliches Nährmittel für die Hefe bekannt ist, und dann alle anorganischen Ammoniakverbindungen, bei denen die Hefe eine Spaltung nicht erst auszuführen braucht, unter diesen besonders das Ammoniumcarbonat, dessen Komponenten als solche oder in Form von Carbaminsäure vermutlich intermediär bei dem Abbau des Leucins zu Amylalkohol entstehen. Diese Erwartung traf in der Tat zu. Setzt man nämlich bei der Hefegärung des Zuckers außer Leucin eine gleiche Menge Asparagin zu, so erhält man nur ungefähr die Hälfte der Fuselölausbeute, wie bei der Vergärung von Zucker und Leucin allein. Noch weniger Fuselöl entsteht, wenn man statt Asparagin die auf Stickstoff bezogene gleiche Menge Ammoniumcarbonat dem Leucin vor der Gärung beimengt. Man kann auf diese Weise die Fuselölbildung fast vollkommen unterdrücken und selbst bei Gegenwart einer großen Menge Leucin einen ebenso fuselarmen Alkohol gewinnen, wie bei der Vergärung von Zucker allein, ohne daß es also nötig ist, die fuselölbildende Aminosäure vorher aus der Lösung zu entfernen. Ähnlich läßt sich auch bei der reinen Zuckergärung die Entstehung von Fuselöl aus dem Stickstoffvorrat der Hefe selbst durch Zusatz von Asparagin, Ammoniumcarbonat oder anderer, leicht assimilierbarer Stickstoffverbindungen sehr wesentlich einschränken. So wurde in einem Falle aus der Gärung von Zucker allein mit Hefe ein Alkohol von 0.7 % Fuselöl, unter sonst gleichen Bedingungen aber auf Zufügen von Asparagin ein Spiritus von 0.5 % und bei Gegenwart von Ammoniumcarbonat von nur 0.3 % erhalten. Es ist indes sehr fraglich, ob die bei der Asparaginvergärung mit der Röse-Herzfeldschen Methode gefundenen 0.5 % Fuselöl wirklich aus Amylalkohol bestehen, da der abdestillierte Alkohol beim Verdunsten auch nicht spurenweise nach Fuselöl riecht, vielmehr beim Verdunsten einen eigentümlichen terpenartigen Geruch besitzt. Vielleicht ist bei der Gärung eine Kondensation der zuerst durch Desamidierung aus dem Asparagin entstehenden

Substanzen zu höher molekularen, den Terpenen nahestehenden Verbindungen, wie solche K. Windisch¹⁾ im Kornfuselöl beobachtet hat, erfolgt, worüber weitere Untersuchungen geplant sind.

Die Resultate der im folgenden mitgeteilten Versuche bilden jedenfalls einen weiteren Beweis für den Zusammenhang zwischen Fuselölbildung und Eiweißaufbau der Hefe, da es sich hiernach ohne weiteres erklärt, daß die Hefe, wenn ihr außer Leucin andere leichter angreifbare Stickstoffquellen dargeboten werden, ihren Stickstoffbedarf diesen vorwiegend entnimmt und das Leucin oder seine Homologen weniger angreift, deshalb auch weniger Fuselöl bilden kann, als wenn ihr Leucin allein als Stickstoffnahrung zur Verfügung steht.

Die folgenden Versuche wurden, soweit sie vergleichende sind, alle zu derselben Zeit und mit der am selben Tage bezogenen frischen obergärigen Preßhefe, Rasse XII, bei Zimmertemperatur angesetzt.

1. 200 g Zucker in 2 L Wasser mit 40 g Preßhefe vergoren. Dauer der Gärung 12 Tage.

0.70 % Fuselöl.

2. 200 g Zucker und 3 g Asparagin in 2 Liter Wasser gelöst mit 40 g Preßhefe vergoren. In 9 Tagen vollständig vergoren.

0.50 % Fuselöl.

Der auf Zusatz von Natronlauge nochmals destillierte Alkohol zeigt eine schwach grüngelbe Farbe, die auch in die Chloroformschicht übergeht. Er riecht beim Verdunsten eigentümlich aromatisch nach Terpenen, ähnlich dem Kornbranntwein, und läßt nicht die Spur eines Amylalkoholgeruchs erkennen.

3. 200 g Zucker und 3 g Ammoniumcarbonat in 2 L Wasser gelöst mit 40 g Preßhefe vergoren. Gärung in 4 Tagen beendet.

0.33 % Fuselöl.

4. 200 g Zucker und 7 g σ -Leucin in 2 L Wasser mit 40 g Preßhefe zur Gärung angesetzt. In 3 Tagen vollständig vergoren.

2.78 % Fuselöl.

5. 200 g Zucker, 7 g σ -Leucin und 3 g Asparagin zusammen in 2 L Wasser gelöst mit 40 g Preßhefe vergoren. In 7 Tagen Gärung beendet.

1.33 % Fuselöl.

Auch dieser Alkohol besitzt eine schwach gelbgrüne Farbe (siehe Versuch 2) und riecht ähnlich dem Kornsprit, beim Verdunsten aber deutlich nach Fuselöl. Aus der vergorenen Lösung ließen sich ungefähr 4.5 g in Salzsäure schwach linksdrehendes Leucin und gegen 1 g Asparagin, beide indes nicht ganz rein, isolieren.

6. 200 g Zucker, 7 g σ -Leucin und 4 g Ammoniumcarbonat in 2 L Wasser mit 40 g Preßhefe vergoren. In 3 Tagen Gärung beendet.

0.78 % Fuselöl.

¹⁾ Über die Zusammensetzung der Trinkbranntweine, Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt VIII, Berlin 1892.

Aus der rückständigen Lösung wurden 5 g rohes Leucin wiedergewonnen, das umkrystallisiert 4.3 g reine Substanz von $[\alpha]_D^{20} = -2.6^\circ$ lieferte.

Daß auch bei der Gärung zugesetzte, selbstverdaute Hefe trotz ihres relativ großen Leucingehalts infolge der Anwesenheit vieler anderer, leicht assimilierbarer Stickstoffverbindungen, die sich aus ihrem Eiweiß abgespalten haben, keine merkbare Erhöhung der Fuselölausbeute bewirkt, mögen hier im Anschluß an die vorigen Untersuchungen noch folgende Gärversuche zeigen.

7. 300 g Preßhefe wurden für sich in einem Kolben im Wasserbad $4\frac{1}{2}$ Stunde auf 60° erhitzt. Die verflüssigte Hefe wurde in eine Lösung von 200 g Zucker in 2 L Wasser eingetragen und das ganze Gemisch mit 50 g frischer Preßhefe vergoren. Die Gärung war scheinbar am 3. Tage beendet.

0.61 % Fuselöl.

8. 100 g Preßhefe wurden mit 50 cem Wasser verrührt und 24 Stunden im Wasserbad auf 50° erwärmt. Dieses Gemisch wurde dann in eine Lösung von 200 g Zucker in 2 L Wasser eingetragen und mit 40 g frischer Preßhefe vergoren. In 2 Tagen Gärung beendet.

0.67 % Fuselöl.

IV. Fuselöl bei der Melassegärung nach Zusatz verschiedener Stickstoffverbindungen.

Es interessierte schließlich noch die Frage, ob die für reine Zuckerlösungen aufgefundenen Gesetzmäßigkeiten der Fuselölbildung auch für natürliche, in der Gärungspraxis angewandte Maischen gelten. Zu diesem Zwecke wurden parallel eine Reihe Gärversuche mit Melasse angesetzt, der vor der Vergärung verschiedene stickstoffhaltige Substanzen zugefügt waren. Es zeigte sich auch hier, daß auf Zusatz überschüssigen Leucins eine deutliche Steigerung der Fuselölausbeute eintritt. Eine solche ließ sich z. B. schon erreichen, wenn man der gärenden Melasse rohes, aus hydrolysiertem Blutalbumin durch Eindampfen erhaltenes, nicht weiter gereinigtes Leucin zusetzte. Dagegen ging der Ertrag an Fuselöl auf Zusatz des hydrolysierten Eiweißgemischs selbst wesentlich zurück, wie nach den obigen Auseinandersetzungen ohne weiteres verständlich ist. Analog mit den früheren Versuchsergebnissen wurde auch die geringste Ausbeute an Fuselöl im Rohspiritus erhalten, wenn vor der Gärung in der Melasse Ammoniumsalze, wie Ammoniumphosphat, -sulfat und -carbonat, im Überschuß gelöst waren. Ob der bei letzteren Versuchen gewonnene Spiritus mit 0.1—0.3 % Fuselöl wirklich noch höhere Alkohole enthalten hat, ließ sich nicht genau feststellen, erscheint aber sehr fraglich, da beim Verdunsten desselben nie ein typischer Fuselgeruch zu bemerken

war, vielmehr immer nur unbestimmte, offenbar aus basischen Zerstellungsprodukten der Melasse herrührende Gerüche auftraten.

Für die Versuche wurde gewöhnliche Melasse mit ungefähr 50 % Zuckergehalt verwandt. Zur Vergärung wurde dieselbe zuvor mit Wasser verdünnt, mit Schwefelsäure angesäuert und dann längere Zeit gekocht. Die schwach saure, abgekühlte Melasselösung wurde wie bei den früheren Versuchen mit obergäriger Preßhefe, Rasse XII, vergoren, die mit einem kleinen Teil der betreffenden Maische vorgestellt war.

1. 3 L Melasselösung, enthaltend ungefähr 350 g Zucker, wurden mit 75 g Preßhefe vergoren. Die Gärung verlief bei Zimmertemperatur innerhalb 5 Tagen. Nach der Gärung zeigte die Lösung eine Acidität entspr. 4.0 ccm $\frac{1}{10}$ -n. Natronlauge pro 100 ccm. Entstandener Alkohol 158.5 g.

0.56 % Fuselöl.

2. In 3 L Melasselösung wie vorher wurde ein Gemisch eingetragen, das durch 20-stündiges Kochen von 125 g Blutalbumin (Kahlbaum) von 12.13 % Stickstoffgehalt mit 33-proz. Schwefelsäure, Ausfällen der Schwefelsäure und Eindampfen erhalten war. Die Lösung wurde dann mit 75 g Preßhefe in 3 Tagen vergoren. Acidität der vergorenen Lösung pro Kubikzentimeter entspr. 4.5 ccm $\frac{1}{10}$ -n. Natronlauge. Alkohol 162.1 g.

0.33 % Fuselöl.

3. In 3 L Melasselösung (wie in 1.) wurden 5 g Ammoniumphosphat gelöst und dazu 75 g Preßhefe gesetzt. Gärung in 4 Tagen beendet. Acidität der vergorenen Lösung pro 100 ccm entspr. 5.0 ccm $\frac{1}{10}$ -n. Natronlauge. Alkohol 151.8 g.

0.39 % Fuselöl.

4. Eine wie oben beschriebene angesäuerte Lösung von 400 g Melasse in 2 L Wasser wurde mit 11.8 g Roh-Leucin versetzt, das aus Blutalbumin durch Hydrolyse mit Schwefelsäure, Eindampfen der hydrolysierten Lösung, Abscheiden des Tyrosins, Auskrystallisieren und Waschen mit verdünntem Alkohol erhalten war. Die so bereitete Lösung wurde mit 40 g Preßhefe erst bei Zimmertemperatur, dann bei ca. 30° in ungefähr 8 Tagen vergoren. Die fertig vergorene Maische riecht bierähnlich und nebenbei deutlich nach Amylester. Alkohol 95.1 g.

1.20 % Fuselöl.

5. Eine Lösung von 400 g Melasse (wie bei 4.) und 10 g Ammoniumcarbonat in 2 L Wasser wurde mit 40 g Preßhefe unter denselben Bedingungen wie bei Versuch 4. vergoren. Gärung in ungefähr 8 Tagen beendet. Acidität pro 100 ccm nach der Gärung 2.5 ccm $\frac{1}{10}$ -n. Natronlauge. Vor dem Abdestillieren des Alkohols Zusatz von Schwefelsäure. Alkohol 91.2 g

0.1 % Fuselöl.

Die folgenden Versuche wurden parallel angesetzt:

6. 2 L Melasselösung, enth. ca. 200 g Zucker, wurden mit 20 g Preßhefe bei ca. 30° vergoren. Gärung in 5 Tagen beendet. Acidität pro 100 ccm entspr. 7.0 ccm $\frac{1}{10}$ -n. Natronlauge. Alkohol 82.9 g.

0.56 % Fuselöl.

7. In 2 L. Melasselösung (wie 6.) wurden 5 g Ammoniumcarbonat eingetragen und das ganze mit 20 g Preßhefe vergoren. 5-tägige Gärung. Acidität pro 100 ccm entspr. 8.0 ccm $\frac{1}{4}$ -n. Natronlauge. Alkohol 79.1 g.
0.33 % Fuselöl.

8. 2 L. Melasselösung (wie 6.) mit 5 g Ammoniumsulfat und 20 g Preßhefe vergoren. 5-tägige Gärung. Acidität 6 ccm $\frac{1}{4}$ -n. Natronlauge. Alkohol 78.3 g.

0.28 % Fuselöl.

Faßt man die wesentlichsten Resultate der vorstehenden Untersuchungen zusammen, so ergibt sich folgendes:

Die Fuselölbildung bei der Hefegärung ist eine Folge der eiweißaufbauenden Tätigkeit der lebenden Hefezelle und geht in dem Maße vor sich, wie die Hefe bestimmten Aminosäuren, besonders dem Leucin, Isoleucin und Valin, während der Vergärung des Zuckers den Stickstoff zur Deckung ihres Stickstoffbedarfs und zur Zymaseproduktion entzieht und die entsprechenden höheren Alkohole als unverdauliche Stoffwechselprodukte zurückläßt. Dabei entsteht aus dem Leucin der inaktive Isoamylalkohol, aus dem *d*-Isoleucin der aktive *d*-Amylalkohol und aus dem Valin der Isobutylalkohol. Für mehrere, in viel geringerer Menge als diese Hauptbestandteile in den Fuselölen enthaltene Alkohole ist es ebenfalls sehr wahrscheinlich, daß sie ihren Ursprung bestimmten anderen Aminosäuren verdanken.

Die Hauptquellen für die Bildung des Fuselöls sind die in den natürlichen Maischen teils direkt vorhandenen, teils bei der Malzverzuckerung aus dem Eiweiß der Rohmaterialien abgespaltenen Aminosäuren, während das Eiweiß der Hefe dafür nicht wesentlich in Betracht kommt. Dies läßt sich vor allem aus der Tatsache folgern, daß bestimmte Beziehungen zwischen der Zusammensetzung der Fuselöle und der Maischen, aus denen sie hervorgegangen sind, bestehen. Besonders charakteristisch in dieser Hinsicht ist, daß das Melassefuselöl¹⁾ ungefähr gleiche Mengen Isoamylalkohol und *d*-Amylalkohol enthält, analog den Mengenverhältnissen, in denen ihre Muttersubstanzen, Leucin und Isoleucin, in unvergorener, entzuckerter Melasse aufgefunden wurden²⁾, während im Korn- und Kartoffelfuselöl weniger optisch aktiver Amylalkohol gegenüber dem inaktiven vorhanden ist, was wieder damit übereinstimmt, daß auch in allen bisher untersuchten pflanzlichen Eiweißstoffen weniger Isoleucin als Leucin zu isolieren war³⁾. Fuselöl aus dem Eiweiß der Hefe selbst entsteht bei der Gärung

1) W. Marckwald, diese Berichte **35**, 1596 [1902].

2) F. Ehrlich, diese Berichte **37**, 1839 [1904].

3) In ähnlicher Weise läßt sich auch die große Verschiedenheit der Weinbouquets und des Aromas der Trinkbranntweine, Kognak, Arrak, Rum etc. sehr einfach auf die verschiedene und wechselnde Zusammensetzung der Eiweißstoffe ihrer Rohmaterialien (Weintraube bzw. Reis, Zuckerrohr etc.) zurückführen.

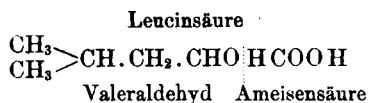
im wesentlichen nur dann, wenn die Hefe infolge mangelnder Stickstoffnahrung, zu hoher Erwärmung oder aus anderen Gründen einer teilweisen Autolyse unterliegt und den dabei anfangs abgespaltenen Aminosäuren, unter diesen besonders den Leucinen, sofort wieder den Stickstoff zur Regenerierung ihres Körpereiweißes entzieht.

Die Höhe der Fuselölausbeute hängt ebenso sehr von der Menge der vorhandenen Leucine wie von der Menge und der Natur der sonst noch anwesenden Stickstoffverbindungen ab. Die größten Quantitäten Amylalkohol erhält man, wenn man die Leucine mit reinem Zucker und reiner, möglichst stickstoffarmer Hefe in Abwesenheit jeder sonstigen Stickstoffsubstanz vergärt, wobei man durch zweckentsprechende Abmessung von Hefe und Zucker den Fuselölgehalt des Rohspiritus auf ein Maximum steigern kann. Sind dagegen außer den Leucinen und ihren Homologen noch andere Stickstoffsubstanzen vorhanden, wie in allen natürlichen Maischen, so wird stets weniger Fuselöl gebildet, als Leucine vorhanden sind, da die Hefe dann auch andere leicht diffusible Stickstoffkörper assimiliert und dabei einen Teil der Leucine unberührt läßt. Dies ist besonders der Fall, wenn Stickstoff in leicht abspaltbarer Form, wie im Asparagin oder in Form einfacher Ammoniumsalze, vorliegt. Durch Zugabe derartiger Stickstoffsubstanzen zu gärenden Maischen kann man selbst bei Gegenwart von größeren Leucinmengen die Entstehung von Fuselöl unterbinden, ohne daß es erforderlich ist, die Leucine aus der Lösung vorher zu entfernen.

Als praktisch wichtig ergibt sich also aus dem vorstehenden, daß man durch Zusatz von Leucinen und ihrer Homologen zu gärenden Maischen den Fuselölgehalt des Rohspiritus steigern kann, während sich andererseits durch Zusatz genügender Mengen anderer von der Hefe leicht assimilierbarer Stickstoffkörper die Bildung der höheren Alkohole bei der Gärung einschränken oder fast vollkommen verhindern läßt.

In theoretischer Hinsicht erscheint besonders bemerkenswert, daß durch die chemischen Vorgänge der Fuselölbildung zum erstenmal ein genauerer Einblick eröffnet ist, wie die Hefe und vielleicht auch andere Pilze und niedere Pflanzen aus Aminosäuren wieder Eiweiß aufbauen. Bisher nahm man wohl ziemlich allgemein an, daß dieser Aufbau im pflanzlichen und tierischen Organismus in der Weise erfolgt, daß die aus Eiweiß abgespaltenen Aminosäuren unter Wasseraustritt ähnlich wie jetzt bei den Polypeptidsynthesen Emil Fischers sich sukzessive wieder zu höhermolekularen eiweißartigen Komplexen zusammen-

schließen¹⁾. Doch hat schon E. Schulze²⁾ darauf hingewiesen, daß wahrscheinlich in den Keimpflanzen ein Abbau der primären Eiweißzer-
setzungsprodukte in der Weise erfolgt, daß sich Ammoniak abspaltet,
und daß dieses bald nach seiner Bildung für die Synthese organischer
Stickstoffverbindungen verwendet wird. Die Fuselölbildung gibt nun
den ersten direkten Beweis dafür, daß ein solcher mit einem Aufbau
von Eiweiß verknüpfter natürlicher Abbau der Aminosäuren in der Tat
nicht nur möglich, sondern im Leben der Hefe und vielleicht noch
vieler anderer niederer Organismen der gewöhnliche ist, da hierbei
über das Schicksal des abgespaltenen Ammoniaks ebenso wie der
zurückbleibenden, stickstofffreien Substanz kein Zweifel mehr bestehen
kann. Zu beachten ist ferner noch, daß diese Spaltung der Amino-
säuren sich nur während der Gärung des Zuckers vollzieht, mag dieser
nun in der Lösung bereits vorhanden oder wie bei der Selbstgärung
der Hefe aus ihrem Glykogen zuvor entstanden sein, so daß hier
vielleicht auch der Schluß berechtigt ist, daß außer dem aus den
Aminosäuren abgespaltenen Ammoniak und event. der gleichzeitig
daraus gebildeten Kohlensäure noch bestimmte, bei der Gärung auf-
tretende Zuckerreste am Aufbau des Hefeeiweißes beteiligt sind. Wie
indeß der Abbau des Leucins und seiner Homologen zu den ent-
sprechenden Alkoholen im einzelnen verläuft und welche Zwischenstufen
dabei auftreten, läßt sich zurzeit mit Sicherheit noch nicht angeben. Es
ist ebenso wohl möglich, daß aus Leucin durch direkte Abspaltung von
Carbaminsäure, die gleich weiter von der Hefe zu Eiweiß verarbeitet
wird, Amylalkohol entsteht, wie daß dieser auf dem Umwege über das
Amylamin sich bildet. Für sehr wahrscheinlich möchte ich es halten,
daß zuerst aus dem Leucin Ammoniak abgespalten wird und inter-
mediär Leucinsäure auftritt, daß diese aber sofort nach ihrer Ent-
stehung nach dem Schema



in Valeraldehyd und Ameisensäure zerfällt. Der Valeraldehyd, der
schon von Ordonneau³⁾ bei der Gärung beobachtet ist, würde dann

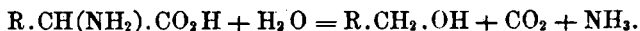
¹⁾ F. Czapek, Biochemie der Pflanzen, Jena 1905; E. Abderhalden,
Lehrbuch der Physiologie: Chemie, Berlin 1906; H. Pringsheim, diese Be-
richte **39**, 4048 [1906].

²⁾ Zusammenfassung der Resultate seiner Arbeiten in den Landwirtschaf-
tlichen Jahrbüchern, **35**, 621 [1906].

³⁾ Ztschr. f. Spiritusindustrie **11**, 183 [1888].

durch Reduktasen der Hefe in Amylalkohol und vielleicht zum Teil durch Oxydase in Valeriansäure übergeführt werden, wodurch auch für die Entstehung dieser und ähnlicher Säuren¹⁾ bei der Hefegärung eine Erklärung gegeben wäre.

Zum Schluß sei bemerkt, daß die Fuselölbildung, die einen neuen, bisher nicht bekannten Abbau der Aminosäuren darstellt, nicht allein auf das Leucin und seine Homologen beschränkt ist, sondern daß die alkoholische Gärung der Aminosäuren, wie ich diesen Vorgang der Desamidierung und Kohlensäureabspaltung der Aminosäuren benennen möchte, eine wichtige biologische Reaktion ist, die stets neben der alkoholischen Gärung des Zuckers in dem Maße verläuft, wie die Hefe den Stickstoff aus irgend einer Aminosäure für den Aufbau ihres Körperproteins verwendet. Die Spaltung der Aminosäuren erfolgt dabei nach der allgemeinen Gleichung:



So gelang es mir, Tyrosin mit Zucker und Hefe zu dem bisher unbekanntem, schön krystallisierenden *p*-Oxyphenyl-äthylalkohol vom Schmp. 92.5° zu vergären, der ein bei 111° schmelzendes Dibenzoat gibt. Ähnlich wurde aus Phenyl-alanin der Phenyl-äthylalkohol, der Hauptbestandteil²⁾ der Riechstoffe der Rose, und aus der Phenyl-amidoessigsäure der Benzylalkohol neben Benzaldehyd erhalten, und es läßt sich voraussehen, daß auf diesem Wege, von verschiedenen Aminosäuren ausgehend, noch eine ganze Reihe Alkohole und verwandter Verbindungen zu gewinnen sind. Hierüber, sowie über die Bedeutung der alkoholischen Gärung der Aminosäuren für verschiedene physiologische Prozesse, insbesondere für die Riechstoffbildung in der Pflanze, werde ich späterhin eingehender berichten.

Berlin N., Institut für Zuckerindustrie.

¹⁾ Windisch, l. c., Kruis und Rayman, Mitteilungen der Versuchstation für Spiritusindustrie in Prag, 1895, Heft II.

²⁾ v. Soden und Rojahn, diese Berichte 34, 2804 [1901].