

**Prom. Nr. 2679**

**On the Growth of Some Wine Yeasts  
in Synthetic Media with Special Reference  
to Vitamin Requirements and  
Amino Acid Utilization**

**THESIS**

presented to the  
Swiss Federal Institute of Technology  
Zurich

for the Degree of  
Doctor of Technical Science

by

**JOHN MATTHEWS**

Citizen of Canada

Accepted on the recommendation of  
Prof. T. O. Wikén and Prof. Dr. H. Deuel

Juris-Verlag Zürich  
1957

## Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von (+)-Biotin, Ca-Pantothenat und meso-Inosit auf das Wachstum der Weinhefen "Chianti Classico", "Entre Deux Mers" und "Saint Emilion" in einem synthetischen Substrat, das als N-Quelle Ammoniumsulfat enthält, dargestellt. Ferner wird eine eingehende Untersuchung des Einflusses der gleichen Vitamine (einzeln oder in Kombinationen) auf das Wachstum von "Saccharomyces ellipsoideus Sicilia" in synthetischer Nährlösung mit Ammoniumsulfat oder Caseinhydrolysat als N-Quelle beschrieben.

Fries (1938), Schopfer (1949) und Rippel-Baldes (1952) behaupteten, dass sich wilde Hefen in synthetischen Substraten ohne Vitamine vermehren, während Kulturhefen für normales Wachstum eine vielfältige Mischung von Wachstumsfaktoren benötigen.

Wikén und Richard (1951a) andererseits haben klar gezeigt, dass die schweizerische Kulturhefe "Fendant" imstande ist, in einem synthetischen Medium zu wachsen, das nur Glucose, Mineralsalze und Ammoniumsulfat enthält. Sie folgerten daraus, dass "die Theorie der auxo-heterotrophen Natur der Kulturhefen eine unzulässige Verallgemeinerung in sich schliesst" (Wikén und Richard 1951a und b).

Weitere Versuche von Wikén und Richard (1951b und 1952a) haben gezeigt, dass die Hefen "Salenegg" und "Herrliberg" in bezug auf Wachstumsfaktoren ebenfalls autotroph sind.

Es geht aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit klar hervor, dass "Saccharomyces ellipsoideus Sicilia" je nach der Natur des dargebotenen Mediums und speziell der N-Quelle auxo-autotroph oder auxo-heterotroph ist. Wenn diese Hefe in einem synthetischen vitaminfreien Substrat gezüchtet wurde, das Glucose, Mineralsalze und Ammoniumsulfat (Substrat B) enthielt, ergab sich langsames, stetiges Wachstum ohne eine logarithmische Phase. Wenn jedoch die Hefe in einem synthetischen vitaminfreien Substrat mit Caseinhydrolysat (Substrat C) als N-Quelle gezüchtet wurde, war das Wachstum praktisch gleich Null.

Mit Zugabe von Ca-Pantothenat allein, (+)-Biotin allein oder meso-Inosit allein zum Substrat B (Ammoniumsulfat als N-Quelle) war das Wachstum der vier untersuchten Hefen grösser als mit Substrat B allein. Bei gleichzeitiger Zugabe der drei Vitamine wurde ein ausgezeichnetes Wachstum und eine maximale Zellausbeute erzielt. Die Kombinationen von zwei der drei Vitamine ergaben mit der Hefe "Saint Emilion" ähnliches, aber nicht so gutes Wachstum, wie

bei Anwesenheit aller 3 Faktoren. Es ergaben sich grosse Zellausbeuten und Kurven vom "S-Typ".

Grosse Wachstumsunterschiede wurden von Ca-Pantothenat, (+)-Biotin und meso-Inosit hervorgerufen, wenn diese einzeln oder in Kombination dem Medium C (Caseinhydrolysat als N-Quelle) zugefügt und das Medium sodann mit "Saccharomyces ellipsoideus Sicilia" beimpft wurde. Die Zugabe von (+)-Biotin und meso-Inosit, einzeln oder zusammen, erzielte in den ersten 200 Stunden entweder kein oder nur kleines Wachstum. Immerhin, wenn Substrat C mit Ca-Pantothenat zusammen mit (+)-Biotin und/oder meso-Inosit geboten wurde, konnte bedeutend grösseres Wachstum gefunden werden als ohne Ca-Pantothenat. Auch bewirkte Ca-Pantothenat allein nur ein langsames, aber stetiges Wachstum.

Dem Substrat B zugesetztes  $\beta$ -Alanin konnte im Falle von "Saccharomyces ellipsoideus Sicilia" Ca-Pantothenat ersetzen, während Pantoinensäure (der Laktonteil des Pantothensäuremoleküls) dies nicht vermochte. Dies deutet darauf hin, dass die Hefe  $\beta$ -Alanin nicht synthetisieren kann.

2. In einem zweiten Abschnitt wird der Einfluss von 18 Aminosäuren, einzeln oder in Kombination, sowie in Verbindung mit Ammonsulfat auf das Wachstum von "Saccharomyces ellipsoideus Sicilia" beschrieben. Abgesehen von L-Cysteinhydrochlorid, L-Oxyprolin und DL-Histidin war die Hefe imstande, in verschiedenem Ausmass alle einzeln gebotenen Aminosäuren auszunützen. Die Kombinationen von DL-Glycin, DL-Prolin, DL-Oxyprolin, DL-Histidin und L-Lysindihydrochlorid, welche einzeln nur schwaches Wachstum zeitigten, mit Ammonsulfat ergaben ein wesentlich grösseres Wachstum als die Aminosäuren allein. L-Cysteinhydrochlorid andererseits hemmt das Hefewachstum bis zu 200 Stunden in Gegenwart von Ammonsulfat. Nach dieser Zeit folgt ein rasches Wachstum. Aufgehoben wurde diese Wachstumshemmung durch die Zugabe von L-Asparaginsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarensäure oder L-Glutaminsäure zum Substrat.

Die Aufhebung der Wachstumshemmung durch L-Asparaginsäure war kompetitiv.

Die sechs Aminosäuren, von denen oben gesagt wurde, dass sie wenig Wachstum bewirken, wenn sie einzeln zum Substrat gegeben werden, riefen einen Antagonismus verschiedener Stärke gegenüber L-Citrullin hervor. Mit Ausnahme von L-Lysindihydrochlorid und DL-Histidin zeigten sie Antagonismus auch gegenüber DL-Methionin.

L-Citrullin bewirkte ein Wachstum, das grösser war als das mit Ammonsulfat. DL-Alanin, DL-Leucin, DL-Isoleucin und DL-Methionin hatten die Tendenz, den Stimulationseffekt des L-Citrullins auf das Hefewachstum zu unter-

drücken, wenn sie einzeln dem Substrat C mit L-Citrullin zugegeben wurden. Die Wachstumswerte waren niedriger als die mit Ammonsulfat allein.

Wie schon erwähnt ist "*Saccharomyces ellipsoideus Sicilia*" wachstumsfähig in Abwesenheit von Pantothensäure, wenn (+)-Biotin und meso-Inosit anwesend sind. Unter diesen Bedingungen und in Gegenwart von Ammonsulfat wurde eine starke Hemmung festgestellt, wenn L-Cysteinsäure zum pantothen-säurefreien Medium gegeben wurde. In Gegenwart von Pantothensäure war keine Hemmung sichtbar. Die Hemmung, hervorgerufen durch L-Cysteinsäure in Abwesenheit von Pantothensäure, deutet auf eine Blockierung der  $\beta$ -Alanin-Synthese hin.

3. In Kulturen von "*Saccharomyces ellipsoideus Sicilia*" wurde die Aufnahme von L-Lysindihydrochlorid gemessen. Amino-N wurde mit einer modifizierten Methode papierchromatographisch bestimmt, die kurz in folgendem besteht: Auf Whatman-Papier No. 1 wurden die Testlösung und Standardlösung, welche die zu bestimmende Aminosäure enthielt, doppelt aufgetragen. Das Chromatogramm wurde dann ca. 30 Stunden in einem passenden Laufmittel laufen gelassen. Nach 3 Stunden Trocknen bei Zimmertemperatur wurden die Flecken durch Besprühen mit 0,05%iger Ninhydrinlösung in wassergesättigtem Butanol sichtbar gemacht. Dann erfolgte eine Erwärmung auf 60°C für 10 Min. Die Flecken wurden als Rechtecke von gleicher Grösse ausgeschnitten und in braune Glasstöpselflaschen von 5 ml Inhalt gebracht. Jeder Flasche wurden 3 ml des Ninhydrinreagens (2 % Ninhydrin in Glykolmonomethyläther ("*Methylcellosolve*") mit Citratpuffer und Zinnchlorür als Reduktionsmittel nach Moore und Stein 1948) zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei 60°C erhitzt, und die Flaschen wurden öfters geschüttelt. Aus jeder Flasche wurde 1 ml weggenommen und auf 20 ml mit Aethanol-Wasser (1:1) ergänzt. Die Farbe wurde bei 570 m $\mu$  gegen eine Nullprobe des Chromatogramms gemessen, die gleich behandelt wurde wie die Probeflecken.

Ammonium-N wurde von "*Saccharomyces ellipsoideus Sicilia*" rasch assimiliert. Dabei konnte kein Verlust des Substrates an Amino-N festgestellt werden, wenn gleichzeitig mit dem Ammoniumsalz eine Mischung von L-Lysin und L-Citrullin geboten wurde. Eine leichte Erhöhung der Ammonium-N-Assimilation ist beobachtet worden, wenn Ammonsulfat als einzige N-Quelle geboten wurde.

Die Aufnahme von N aus einem Substrat, das L-Citrullin allein enthielt, war grösser als wenn das Substrat nur Ammoniumsulfat enthielt.