Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 61 (1951)

Artikel: Über die Zuckeraufnahme von Hefezellen

Autor: Rieder, Hans Peter

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-43022

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Über die Zuckeraufnahme von Hefezellen

Von *Hans Peter Rieder*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Eingegangen am 22. Juli 1951

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 540
Methodisches 540
I. Das Versuchsobjekt 540
II. Ausführung der Messungen 541
1. Bestimmung des Zuckerverbrauchs (ZV) 542
2. Bestimmung der Zuckeraufnahme (ZA) 542
a) Prinzip der Methode 542
b) Das Refraktometer, seine Vorteile und Genauigkeit 543
c) Fehlermöglichkeiten und Bedingungen zu ihrer Vermeidung . . . 544
d) Die Besonderheit der angewendeten Methode 546
e) Tabellen zum Refraktometer und ihre Verwendung 547
3. Arbeitsgang 549
4. Bestimmung der Zellenzahl und der Zelldimensionen 550
Vorversuche 554
I. Vergleich mit andern Zuckerbestimmungsmethoden 554
II. Einfluß der Versuchsdauer 555
III. Einfluß des Schüttelns 557
IV. Besteht ein Unterschied in der Aufnahme von α- und β-Glucose? 558
V. Wird die Mutarotation durch Hefen beeinflußt? 559
VI. *p*H der Versuchsflüssigkeit, Änderung im Laufe des Versuches 559
Zur Physiologie der Zuckeraufnahme 560
I. Übersicht über die bisherigen Forschungsergebnisse 560
II. Eigene Untersuchungen 568
1. Beispiel einer refraktometrischen Meßreihe 568
2. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration 574
3. Einfluß der Glucosekonzentration 576
4. Einfluß der Temperatur 580
5. Einfluß von Benetzungsmittel, Salzen und Licht 587
6. Einfluß von Zellgiften auf Aufnahme und Verbrauch von Zuckern . . . 588
7. Zuckeraufnahme unter anaeroben Bedingungen 596
8. Aufnahme verschiedener Zucker und höherer Alkohole 597
III. Allgemeine Betrachtungen 607
Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse 610
Zitierte Literatur 613
Anhang: Tabellen zum Eintauch-Refraktometer (20° C) 617
Arabinose — Xylose — Mannit
Glucose — Fructose — Mannose
Galactose — Maltose — Lactose
Raffinose

Einleitung

Die Frage nach der Art und Weise der Zuckeraufnahme durch die Zelle ist von hoher physiologischer Bedeutung, weil Zucker bei den meisten Organismen den bevorzugten Betriebsstoff und bei Pflanzen zudem auch den wichtigsten Baustoff darstellt. Soviel man auch auf Grund zahlreicher Untersuchungen über die Eigenschaften und die Struktur der Grenzschichten des Protoplasmas weiß, sowenig ist noch bekannt über die Art und Weise, wie Zucker durch diese Schichten in die Zelle hineingelangt. Indizien deuten allerdings darauf hin, daß vor allem Zellen, bei denen die Zuckeraufnahme auffallend groß ist, sich aktiv, also unter Arbeitsaufwand, an der Aufnahme beteiligen.

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit ist es daher, Zusammenhänge zwischen dem Energiehaushalt und der Zuckeraufnahme der Pflanzenzelle aufzudecken.

Wie auch Osterhout (1933) betont, kommt dem Studium einzelliger Organismen besonders hohes Interesse zu; in ihnen findet man sowohl alle Lebensvorgänge vereinigt als auch den Vorteil, daß ihre ganze Zelloberfläche jederzeit vom einwirkenden Substrat umspült wird. Deshalb wurden bereits früher im hiesigen Institut Hefezellen zum Studium des Stoffwechsels benützt (Geiger-Huber, 1930, 1934; Musfeld, 1942; Althaus, 1950); die vorliegende Arbeit setzt die Reihe dieser Untersuchungen fort.

Methodisches

I. Das Versuchsobjekt

Bei allen Versuchen wurde käufliche *Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae)* verwendet. Da ihre Zelloberfläche vollständig von der Substratlösung bespült wird und sie sich außerdem durch einen sehr hohen Kohlenhydrat-Stoffwechsel auszeichnet, eignet sie sich besonders gut für die hier beschriebenen, relativ kurzfristigen Versuche.

Es wurde stets nur frisch gekaufte Hefe verwendet. Aus dem Innern des Hefeklumpens wurden 2 g herausgelöst, in zirka 25 cm^3 destilliertem Wasser gut durchgeschüttelt, abzentrifugiert und in 250 cm^3 destilliertem Wasser suspendiert. Medwedew und Chomitsch (1937) teilen Versuche mit, bei denen infolge längeren Auswaschens die Hefen ihre physiologischen Eigenschaften vollständig verändert haben (Verlust des «Bios»). Diese Gefahr wurde umgangen durch Verzicht auf mehrmaliges Auswaschen. Anderseits soll aber die Zelle vor Versuchsbeginn glykogenfrei sein; auch diese Forderung wird trotz des schwachen Auswaschens erfüllt, wenn man die Suspension mehrere Stunden bei einer Zimmertemperatur von mindestens 20° C stehen läßt (siehe auch Althaus, 1950). Weichsel (1937) macht

darauf aufmerksam, daß die Aktivität der Hefen stark abhängig ist von Herkunft, Alter und Aufbewahrung (Gehalt an Reservestoffen). Reinhard (1923) erwähnt, daß Licht die Vermehrung der Hefen begünstigt, und Osterhout und Hill (1933) zeigen in Versuchen an *Nitella,* daß durch längeres Aufbewahren in destilliertem Wasser (drei Tage und länger) die Zellen in ihrer Aktivität zusehends gelähmt werden.

Um all diesen möglichen Einflüssen aus dem Wege zu gehen, wurde bei der Behandlung der Hefen auf folgende Punkte speziell geachtet:

a) Die Hefen wurden immer vom selben Ort und frisch nach Ankunft aus der Fabrik bezogen (siehe auch Warburg, 1927 *a*).

b) Sie wurden nach dem Suspendieren mit Methylenblau 1 : 10 000 jeweils auf tote Zellen geprüft (1 bis höchstens 5 ‰) und dann über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die vor Versuchsbeginn angestellten Proben auf Glykogen (JKJ: siehe Althaus, 1950) fielen stets negativ aus.

c) Die Hefen waren durch einen Kartonzylinder vor dem Einfluß des Tageslichtes geschützt.

d) Es wurden immer nur ein- und zweitägige Suspensionen untersucht, obwohl auch fünf- bis sechstägige erst eine geringe Abnahme ihrer Aktivität zeigten.

Die Suspension glykogenfreier Hefen wurde vor Beginn jeder Versuchsserie photometrisch (siehe Musfeld, 1942) auf ihre Dichte resp. Zellenzahl geprüft und nötigenfalls so verdünnt, daß immer derselbe Lichtwert erhalten wurde; dies bedeutet, daß bei jedem Versuch annähernd dieselbe Zellenzahl pro Reaktionsvolumen vorhanden war und daß somit alle Resultate direkt miteinander vergleichbar sind.

Auf Puffer als Suspensionsmilieu wurde absichtlich verzichtet, da dies die refraktometrische Messung kompliziert hätte (ausgenommen die Versuche über *p*H-Abhängigkeit). Es sei nur nebenbei bemerkt, daß nach der oben geschilderten Behandlung der Hefen sicher noch Spuren von Salzen, wenn auch refraktometrisch nicht mehr feststellbar, in der Suspensionsflüssigkeit sind, so daß die Giftwirkung von ganz reinem destilliertem Wasser, wie sie von Osterhout beschrieben wurde, nicht unmittelbar zu befürchten ist.

Angesetzt und aufbewahrt wurde die Hefe als achtpromillige Suspension, während der Versuch selbst stets an vierpromilliger Suspension ausgeführt wurde.

II. Ausführung der Messungen

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit besteht darin, Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch (Energiehaushalt) unter den verschiedensten äußern Bedingungen zu untersuchen sowie die Resultate in Bezie-

hung zu setzen zu der am Versuch beteiligten Zellenzahl resp. ihrer Oberfläche oder ihrem Volumen. Es gilt darum, für jede der geforderten Größen die geeignete Meßmethode zu finden.

1. Bestimmung des Zuckerverbrauchs

Zur Bestimmung des Zuckerverbrauchs (abgekürzt: ZV) wurde die bewährte manometrische Messung von Atmung und Gärung in der Warburg-Apparatur herangezogen. Daß unter den gegebenen Bedingungen [1] und innerhalb der kurzen Versuchszeit von weniger als einer Stunde Atmung und Gärung tatsächlich den Hauptanteil des ZV darstellen, wurde schon von Musfeld (1942) an Hand der Wahrnehmungen von Warburg (1927) und Geiger-Huber (1934) festgestellt. Bei den eben erwähnten Autoren sowie bei Warburg (1926) und Dixon (1943) finden sich ausführliche Beschreibungen der Methode.

Es sei nur bemerkt, daß bei Warburg-Versuchen natürlich ganz andere Verdünnungen angewendet werden mußten als bei Refraktometerversuchen, um zu denselben Verhältnissen pro Reaktionsvolumen zu gelangen. Das Reaktionsvolumen betrug 2 oder 3 cm^3, davon 1,8 resp. 2,7 cm^3 als Hefesuspension und 0,2 resp. 0,3 cm^3 als Zuckerlösung eingefüllt. Bei Vergiftungsversuchen wurden nur 2,4 cm^3 (entsprechend dichtere) Hefesuspension, 0,3 cm^3 Zellgift und 0,3 cm^3 Zucker eingefüllt. Prinzipiell wurden die Verdünnungen immer so gewählt, daß erst nach dem Zusammengießen *aller* Reaktionsteile die gewünschte Konzentration an Hefe, Zucker, Zellgiften usw. erreicht ist.

Die gemessenen mm^3 O_2-Verbrauch resp. CO_2-Bildung wurden auf folgender Grundlage (siehe auch Musfeld) umgerechnet:

1 mm^3 O_2-Verbrauch entspricht 1,33 γ ZV
1 mm^3 gebildetes Gärung-CO_2 entspricht 4 γ ZV

2. Bestimmung der Zuckeraufnahme (= ZA)

Nach einer Reihe von Vorversuchen hat sich die *refraktometrische Messung* der Zuckerkonzentrationen unter den gegebenen Bedingungen als durchaus geeignet und in ihrer Einfachheit andern Methoden (gravimetrische, titrimetrische) gegenüber als weit überlegen erwiesen.

a) Prinzip der Methode

Mit dem Refraktometer wurde in bestimmten Zeitabständen die Konzentration der Außenlösung an Zucker in geschüttelten Hefesuspensionen gemessen. Die Zuckerabnahme der Außenlösung wurde gleich der Aufnahme in die Zelle gesetzt. Diese Annahme setzt allerdings voraus, daß wir wirklich nur Refraktionswerte messen, die durch Unterschiede in der Zuckerkonzentration bedingt sind, daß also Salze und

[1] Zellen wachsen und vermehren sich nicht in meßbarem Maße.

andere Nährstoffe höchstens in einem der Zuckermenge gegenüber verschwindend kleinen Ausmaße vorhanden sind. Es ist dies der Grund, warum die Hefen in destilliertem Wasser und nicht in einer gepufferten Lösung suspendiert wurden.

Komplizierter gestaltet sich die Messung bei Anwesenheit von mehreren Lösungsteilnehmern wie zum Beispiel bei den Versuchen mit Zellgiften oder bei den Untersuchungen über *p*H-Abhängigkeit, wo Puffer unumgänglich sind. In diesem Falle ist es nötig, jeweils in einem Parallelversuch festzustellen, wie weit der Refraktionswert (abgekürzt = RW) innerhalb einer bestimmten Zeit durch diese zusätzlichen Substanzen allein verändert wird, und eine eventuelle Differenz bei der Berechnung des Zuckerwertes zu berücksichtigen. Das Refraktometer mißt lediglich die Summe aller Lösungsteilnehmer. Einen Einzelvorgang zu messen, sind wir in diesem Falle nur dann imstande, wenn wir — sei es durch «Blindversuche», sei es durch andere Methoden — die Größe der übrigen Vorgänge feststellen können. Über eine ähnliche Verwendung des Refraktometers siehe auch Schopfer (1933).

b) Das Refraktometer, seine Vorteile und Genauigkeit

Verwendet wurde ein Zeiß-Eintauch-Refraktometer mit Hilfsprisma, wie es zum Beispiel beschrieben ist in Wagner (1928), Klein (1931), Bamann und Myrbaeck (1941), Löwe (1943).

Die Verwendung des Hilfsprismas bringt zwei Vorteile mit sich:

1. Die Hefen müssen zur Messung *nicht* aus der Flüssigkeit herauszentrifugiert werden. Wenn ihre Dichte 6 bis 8 ‰ nicht übersteigt, so kann die Ablesung des RW ohne wesentliche Einbuße an Helligkeit und Schärfe vorgenommen werden. Dies bedeutet eine ganz gewaltige Vereinfachung der Messungen und gestattet außerdem, diese in relativ kurzen Zeitabständen auszuführen.
2. Zu jeder Messung wird nur ein Tropfen von rund 0,1 cm^3 Versuchsflüssigkeit benötigt. Die Menge der letzteren betrug stets *40 cm^3*, und pro Versuch wurden normalerweise fünf (in einigen wenigen Fällen neun) Tropfen entnommen. Wir dürfen also mit Sicherheit annehmen, daß durch eine so geringe (rund 1,5 %) Verkleinerung des Gesamtvolumens an Flüssigkeit die Versuchsbedingungen nur unwesentlich verändert werden, so daß von dieser Seite keine Störung der Methode zu erwarten ist.

Wagner (1928) gibt die Genauigkeitsgrenze des hier verwendeten Refraktometers zu 0,1 Skt.[1] an. Für unsere Zwecke wäre es aller-

[1] Skt. = Skalenteil im Blickfeld des Refraktometers. mSkt. = $^1/_{1000}$ Skt.: kann nicht mehr direkt abgelesen werden an der Skala ($^1/_{10}$ Skt.) der Mikrometerschraube, sondern wird erst erhalten durch Mittelwertbildung aus mehreren auf $^1/_{100}$ Skt. genau abgelesenen Werten. Die Zehntel-Skt. der Mikrometerschraube lassen sich von Auge noch bequem in $^1/_{100}$ Skt. unterteilen (Abstand von Strich zu Strich zirka 2 mm).

dings wünschenswert gewesen, mit größerer Genauigkeit arbeiten zu können. Daher wurde die Temperaturregulierung mittels gasgeheizten Warmwassers, wie sie in den obenerwähnten Werken allgemein noch beschrieben wird, durch eine elektrische Heizvorrichtung (blaue 25-Watt-Lampe) mit Thermoregulator (Toluol/Quecksilber) ersetzt. Wir erreichten damit Temperaturschwankungen des Meßbades von nur noch durchschnittlich $\pm 0{,}03^{\circ}$ C und somit, unter Innehaltung einer Reihe noch zu besprechender Bedingungen, für jeden gemessenen Tropfen eine Standardabweichung von $\sigma = \pm 0{,}023$ *Skt.*, was einer Abweichung von rund 62 mg Zucker pro Liter oder 6,2 γ pro verwendeten Tropfen entspricht. Das σ wurde berechnet aus einer Versuchsreihe von 21 Messungen einzelner Tropfen aus ein und derselben Glucoselösung. Über statistische Behandlung von Zahlenmaterial siehe zum Beispiel Pütter (1929), Koller (1940), Fisher (1946), Fisher und Yates (1948).

Um die Genauigkeit noch weiter zu steigern, wurde als Ergebnis erst das Mittel mehrerer (meist 8 bis 12) gleichartiger Versuche betrachtet; die mittlere Abweichung σ_m ist dann gleich $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ (wobei $n =$ Anzahl Versuche). Wir erhalten so für:

4 Versuche: $\sigma_m = \pm 11{,}5$ mSkt.
8 Versuche: $\sigma_m = \pm 8{,}1$ mSkt.
12 Versuche: $\sigma_m = \pm 6{,}6$ mSkt.

c) Fehlermöglichkeiten und Bedingungen zu ihrer Vermeidung

aa) Hefedichte und subjektiver Ablesefehler:

Bei einer genügend starken Lichtquelle (200-Watt-Lampe durch Kupfersulfatfilter) sehen wir im Blickfeld des Refraktometers ein ganz helles und ein ganz dunkles Feld, welche durch eine scharfe Trennungslinie ausgezeichnet sind, solange wir reine Lösungen und diese nicht in zu hoher Konzentration (z. B. über 10 % Zucker) messen. Bei Anwesenheit von Hefe wird das Dunkelfeld nur ganz minim aufgehellt, wenn wir Suspensionsdichten von nicht mehr als *4—5* ‰ verwenden. Die Trennungslinie verliert dadurch noch nichts an Schärfe. Gehen wir aber zu höhern Suspensionsdichten über, so wird das Dunkelfeld zusehends grauer, die Trennungslinie damit schummeriger und undeutlicher. Wir haben uns darum bei der vorliegenden Arbeit für eine Dichte von *4* ‰ entschieden.

Eine Verschiebung des RW durch die bloße Anwesenheit von Hefezellen in der zu messenden Flüssigkeit konnte weder bei glykogenfreier noch bei glykogenhaltiger Hefe in einem Ausmaß festgestellt werden, das die Genauigkeitsgrenzen der Methode überschritten hätte.

Um den subjektiven Fehler möglichst klein zu halten, wurde bei jeder Ablesung der RW dreimal unmittelbar nacheinander eingestellt und abgelesen und der so erhaltene Mittelwert erst zu weitern Berechnungen verwendet, z. B.:

	Ablesungen in Skt.			
	1.	2.	3.	Mittel
1. Messung:	27,00	27,00	26,99	26,997
2. Messung:	26,94	26,95	26,98	26,957
3. Messung:	18,07	18,08	18,06	18,070

bb) Temperaturkonstanz des Schüttelbades und Verdunstung im Versuchskolben:

Auch das Schüttelbad wurde elektrisch geheizt. Der Thermoregulator arbeitete auf ± 0,05° C genau. Es ist nicht zu erwarten, daß so minime Temperaturunterschiede auf den Stoffwechsel einen meßbaren Einfluß haben. Die Versuchsgefäße, Erlenmeyerkolben à 200 cm³, wurden bis fast zum Hals ins Wasser getaucht und mit 90 bis 100 Schwingungen pro Minute geschüttelt. Es wurde dabei festgestellt, daß auch bei höhern Temperaturen erst nach 4—5 Stunden eine Zunahme der Konzentration (an reiner Zuckerlösung untersucht) gemessen werden konnte, sofern die Kolben mit Wattepfropfen verschlossen waren. Ein normaler Versuch dauerte aber nur etwa 3/4 Stunden, so daß die Verdunstung zu vernachlässigen ist.

cc) Verdunstung des Tropfens auf der offenen Prismafläche des Refraktometers:

Mit Hilfe eines unten abgeplatteten Glasstabes, der ständig im Versuchskolben bleibt, wird der zu messende Tropfen so rasch wie möglich auf das bereitgestellte Prisma des Refraktometers gebracht, mit dem Hilfsprisma zugedeckt, durch eine wasserdichte Hülse mit Glasfenster verschlossen und ins Meßbad eingestellt. Untersuchen wir nun die Abhängigkeit des RW von der Zeit, während welcher der Tropfen offen der Verdunstung ausgesetzt ist, so stellen wir, wie zu erwarten, fest, daß der RW proportional der Verdunstungszeit zunimmt. Nach zirka 12 s Verdunstung ist die Grenze der methodischen Abweichung bereits überschritten. Nach einiger Übung ist man jedoch in der Lage, das Refraktometer bereits in 3—5 s zu verschließen.

dd) Temperatur:

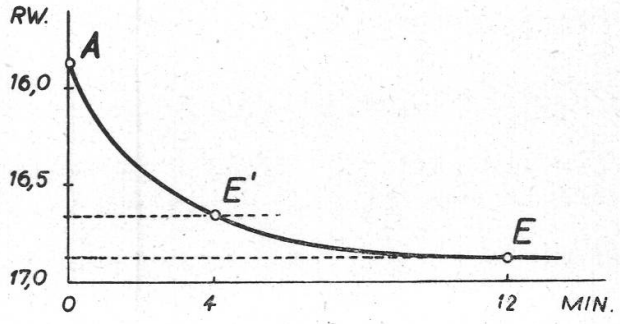
Der RW ist sehr stark von der Temperatur abhängig. Wir können also nur dann erwarten, einen konstanten Wert vorzufinden, wenn die Prismen, der eingeschlossene Tropfen sowie das ganze Gehäuse des Refraktometers schon beim ersten Einstellen genau die gleiche Temperatur besitzen wie das Meßbad. Dies ist meistens *nicht* der Fall, vor allem dann nicht, wenn wir die Temperaturabhängigkeit der ZA bestimmen wollen und ganz generell, wenn die Versuchstemperatur eine andere ist als diejenige des Meßbades. Ist das Refraktometer (inkl. eingeschlossene Flüssigkeit) wärmer als das Meßbad, so nimmt der RW bis zu einem konstanten Endwert *zu,* umgekehrt nimmt er bis zu einem konstanten Endwert *ab.* Je größer der Temperaturunterschied, desto länger ist die benötigte Anwärmzeit. Bei Unterschieden von zum Beispiel 5° C beträgt die Wartezeit, wie einige Versuche ergeben haben, zwischen 25 und 30 Minuten. So große Temperaturdifferenzen erhält man allerdings auch dann nicht, wenn der aufgelegte Tropfen zum Beispiel 40° C oder 45° C besaß, da er im Verhältnis zur Masse des etwa auf Zimmertemperatur befindlichen Refraktometers sehr klein und rasch in die Nähe der Refraktometertemperatur abgekühlt ist. Zur Konstanthaltung des Endwertes darf allerdings das Meßbad selbst keine großen Temperaturschwankungen aufweisen.

ee) Temperaturkonstanz des Meßbades:

Die Schwankungen des Meßbades wurden bereits weiter oben zu ± 0,03° C angegeben; 1° Temperaturunterschied entspricht bei Zuckern rund einer Differenz von 0,3 Skt., 0,03° würden damit einer Abweichung von rund 10 mSkt. entsprechen. Dies soll uns lediglich als grobes Maß für die Zuverlässigkeit der Temperaturschaltung dienen. Als Größe sind die hier erwähnten Schwankungen ja bereits in der unter Abschnitt *b)* mitgeteilten Standardabweichung von $\sigma = \pm 23$ mSkt. enthalten.

d) Die Besonderheit der angewendeten Methode

Wir haben gesehen, daß bei größeren Temperaturdifferenzen zwischen Refraktometer und Meßbad lange auf die Konstanz des RW gewartet werden muß. Das würde aber bedeuten, daß wir entweder nur bei Versuchstemperaturen arbeiten können, die derjenigen des Meßbades entsprechen, wenn wir die Tätigkeit der Hefen nach *kurzen* Intervallen messen wollen, oder aber, daß wir bei andern Versuchstemperaturen nur ganz wenige, weit auseinander liegende Messungen vornehmen könnten. Da wir aber unabhängig sein müssen von der angewendeten Temperatur und die Messungen immer in gleichen, relativ kurzen Intervallen ausführen, wurde die Methode in folgendem



Figur 1
Beispiel einer Anwärmkurve

A = Refraktionswert, den die Lösung im Moment des Einstellens (Refraktometer und Tropfen z. B. auf 22° C) besitzt.
E = Konstanter Endwert nach entsprechend langer Wartezeit im Meßbad v. z. B. 20° C.
E' = Wert nach 4 Minuten; gegenüber dem Endwert immer um bestimmte Anzahl mSkt. zu tief (resp. zu hoch).

Sinne abgeändert: Wir warten nicht bis zur Konstanz des RW, sondern lesen den RW immer *nach genau derselben Zeit* ab, gerechnet von der Entnahme des Tropfens aus dem Versuchskolben an, in unserm Falle immer nach 4 Minuten. Unter der Bedingung, daß wir alle äußern Einflüsse, wie Zimmertemperatur, Temperatur des Spülwassers (beim Reinigen der Prismen zwischen zwei Messungen), Dauer des Stehenlassens des geöffneten Refraktometers, im Laufe eines Versuches möglichst konstant halten, bekommen wir Werte, die zwar gegenüber dem Endwert zum Beispiel zu hoch, aber *immer gleichviel* zu hoch sind. Wir dürfen nur nicht vergessen, daß unter diesen Voraussetzungen das Refraktometer den ganzen Anwärm- und Reinigungsvorgang bereits einmal «blind» durchgemacht haben muß, wenn auch der erste Meßwert dieselbe Verschiebung aufweisen soll.

Wir messen also immer nur *relative* Werte. Da aber *alle* Werte um den gleichen Betrag zu hoch sind (resp. zu tief), so erhalten wir bei der Differenzenbildung aus zwei benachbarten Messungen trotzdem den wirklichen Unterschied, da sich diese sog. «Anwärmfehler» gegenseitig aufheben.

Wie etliche Proben gezeigt haben, wird dadurch die methodische Abweichung kaum größer als eingangs berechnet, wenn man sich ein gleichmäßiges Manipulieren angewöhnt und sich sehr genau, d. h. auf mindestens 15 s genau, an die einmal festgesetzte Anwärmzeit hält.

Es soll allerdings hier nicht verschwiegen werden, daß gelegentlich «individuelle» Unterschiede bei einzelnen Versuchskolben auftreten, die um einiges über die Streuung der Methode hinausgehen. So wurde einige Male beobachtet, daß zum Beispiel von zwei gleichzeitig geschüttelten und alternierend gemessenen Versuchskolben, deren Inhalt zur gleichen Zeit und unter genau gleichen Bedingungen (dieselbe Stammsuspension) angesetzt wurde, der eine Kolben um 30—40 % niedrigere Werte ergab als der andere. Solche Fälle sind allerdings in der Minderheit, doch konnte ihre Ursache nie ermittelt werden. Da jedoch immer Durchschnittswerte aus mehreren bis vielen Messungen interpretiert werden, wirken sich solche Unregelmäßigkeiten nicht stark aus.

Die mittlere Abweichung σ_m, die den meisten nun folgenden Tabellen- und Kurvenwerten beigefügt ist, wurde jeweils aus der Anzahl der Einzelversuche und ihrer tatsächlichen Streuung berechnet, so daß alle Differenzen von der eben erwähnten Art bereits darin enthalten sind, was gelegentlich größere Werte ergibt, als die rein methodische Streuung erwarten ließe. Immerhin sind auch die allergrößten in dieser Arbeit vorkommenden Abweichungen der σ_m nicht größer als 23 mSkt. (entsprechend 0,0062 % Zucker).

e) Tabellen zum Refraktometer und ihre Verwendung

Es gibt spezielle Zuckerrefraktometer, bei denen der RW direkt in Prozenten abgelesen werden kann. Bei dem hier verwendeten Typ lesen wir aber Skt. ab und können dann die entsprechenden Prozente mit Hilfe einer Tabelle finden. Eine große Reihe von Tabellen der verschiedensten Substanzen wurde von Wagner und seinen Mitarbeitern aufgestellt und in einem speziellen Werke (Wagner, 1928) herausgegeben. Aber gerade die uns interessierenden biologisch interessanten Zucker sind darin zum größten Teil nicht enthalten. Zwar findet sich eine ausführliche Tabelle, mit welcher Glucose, Fructose, Maltose usw. via Fehling-Bestimmung, also indirekt, auf Grund des abgeschiedenen Kupfers bestimmt werden kann. Unsern Anforderungen kann aber nur eine direkte refraktometrische Bestimmung dienen. Ich sah mich deshalb genötigt, für alle untersuchten Zucker selbst Tabellen aufzustellen.

Von zwei bis drei Einwägungen jedes Zuckers auf der Analysenwaage wurden exakte Verdünnungsreihen hergestellt von (20)—(15)—10—5—2,5—(1) und 0 (=Aqua dest.) Prozent Zucker, die entsprechenden RW jeder Konzentration mehrmals gemessen und die dazwischen

liegenden Punkte der ganz schwach gebogenen Kurve entsprechend interpoliert. Die eingeklammerten Konzentrationen wurden nicht bei allen Zuckern gemessen. Bei der Aufstellung der Tabellen wurde wie bei Wagner verfahren, indem den ganzen Skalenteilen die entsprechenden Zuckerprozent in %g (= Gramm in 100 cm³) gegenübergestellt wurden. Bei der Besprechung seiner Tabellen sagt Wagner, daß es sinnlos sei, die Prozente auf drei Dezimalen genau anzugeben. Dies stimmt, wenn wir der Methode eine Genauigkeit von 0,1 Skt. zugrunde legen. Bei wissenschaftlichen Arbeiten aber, bei denen wir durch Verfeinerung der Methode Abweichungen von nur noch 0,023 Skt. (= 0,0062 %g) — und durch Mittelwertbildung evtl. noch kleinere — bekommen, wäre es ebenso sinnlos, die mühsam erreichte Genauigkeit durch ungenauere Tabellen wieder zu vergröbern. Da die Abweichung der Methode, in %g ausgedrückt, nicht mehr als rund sechs Einheiten der 3. Dezimale beträgt, habe ich mich entschlossen, die berechneten Prozente in den Tabellen auf fünf Einheiten der 3. Dezimale auf- oder abzurunden.

Eine weitere strittige Frage bildet die Normaltemperatur, d. h. die Temperatur, bei welcher alle Tabellen aufgestellt sind und auf welche sich zum Beispiel beigefügte Umrechnungstabellen für Ablesungen bei höhern oder niedrigeren Temperaturen des Meßbades beziehen. Wagner hat sich auf 17,5° C festgelegt. Bei 17,5° C zu arbeiten, gelingt normalerweise schon gar nicht im Sommer und in einem anständig geheizten Laboratorium auch nicht im Winter. Das heißt aber nichts anderes, als daß wir ständig auf Umrechnungstabellen angewiesen sind (sofern solche überhaupt vorhanden) und daß so die «Normaltabelle» praktisch nie ohne Hilfsmittel benutzt werden kann. Um dieser Sinnwidrigkeit zu entgehen, wurden alle Zuckertabellen für eine Temperatur von 20° C aufgestellt. Überdies schlage ich vor, inskünftig für *alle Tabellen* zum Refraktometer aus zweckdienlichen Gründen eine *Normaltemperatur von 20° C* einzuführen, so gut wie zum Beispiel auch die Normaltemperatur geeichter Pipetten im Laufe der vergangenen Jahre von 15° auf 20° umgestellt wurde.

Zur Verwendung der Tabellen ist zu bemerken, daß wir nur dann die %g direkt der Tabelle entnehmen können, wenn der abgelesene RW den konstanten Endwert darstellt und solange wir reine Lösungen (mit oder ohne Hefen) messen. Sobald wir nach unserer vorhin beschriebenen Methode nur *relative* Werte ablesen oder wenn sich in der Versuchsflüssigkeit noch Zutaten wie zum Beispiel Zellgifte oder Puffer befinden, müssen wir zur Bestimmung des Zuckers einen andern Weg beschreiten. Den absoluten Prozentwert der Zuckerlösung können wir nicht mehr ermitteln. Wir ersehen aber aus der Tabelle, daß zum Beispiel einer Differenz von 1 mSkt. eine solche von x %g entspricht. Wir brauchen also nur die durch den Zuckerverlust bedingte Differenz

zweier benachbarter Messungen mit einem bestimmten Faktor f [1] zu multiplizieren, um zu erfahren, wie viele mg/Reaktionsvolumen in der Zeit zwischen den beiden Messungen aus der Außenlösung verschwunden sind. Auf dieser Basis wurden alle Kurven- und Tabellenwerte der vorliegenden Arbeit berechnet.

3. Arbeitsgang

a) Zuckerverbrauch: Nachdem die Warburg-Apparatur die gewünschte Temperatur erreicht hat, werden in entsprechender Verdünnung Hefesuspension, frisch bereitete Zuckerlösung (und eventuell Zellgifte) in die Manometergefäße eingefüllt, diese sofort an den Manometern befestigt und dann ins Temperaturbad verbracht. Zum Vorwärmen der Lösungen wird nun die ganze Einrichtung während zirka 25 Minuten mit rund 90 Schwingungen pro Minute geschüttelt (Amplitude zirka 5 cm). Bei Vergiftungsversuchen wird dann die erste Ablesung gemacht und sofort anschließend das Zellgift in den Hauptraum übergekippt. Nach rund 60 Minuten wird der 2. Wert abgelesen und dann der Zucker eingekippt. Bei Versuchen ohne Zellgift wird der 2. Wert schon nach 10—15 Minuten genommen und dann sofort der Zucker zugegeben. Alle 12 Minuten, vom Moment der Zuckerzugabe an gerechnet, werden die weitern Ablesungen gemacht bis meistens zur 48. Minute, gelegentlich auch länger. Während des ganzen Versuches wird geschüttelt.

Aus Atmung und Gärung wird der entsprechende Zuckerverbrauch zum Vergleich mit den Refraktometerwerten in mg/40 cm^3 umgerechnet.

b) Zuckeraufnahme: Schüttelbad und Meßbad werden auf die gewünschte Temperatur gebracht. Unterdessen stellen wir, vor jedem Versuch frisch wegen allfälliger Infektionsgefahr durch Bakterien oder Pilze, die Zuckerlösungen her, und zwar in doppelt so hoher Konzentration, als im Versuch gewünscht wird. Sämtliche Zucker werden, teils zum raschern Auflösen, teils zur beschleunigten Einstellung des innern Gleichgewichtes (α- und β-Glucose usw.), bis zum Sieden erhitzt und erst dann auf die entsprechende Verdünnung eingestellt. Von der über Nacht gestandenen und glykogenfreien, 8promilligen Hefesuspension werden nach gutem Durchschütteln 20 cm^3 in den Versuchskolben pipettiert. In einem geeichten Reagenzröhrchen werden 20 cm^3 der frisch bereiteten Zuckerlösung gleichzeitig mit dem Versuchskolben im Schüttelbad während rund 15 Minuten vorgewärmt (90—100 Schwingungen, Amplitude zirka 5 cm). Während dieser Zeit wird das Refraktometer im Meßbad «blind» angewärmt, dann wie nach jeder Messung mit Aqua destillata von Zimmertemperatur abgespült mit einem Hirschlederlappen getrocknet und zur Aufnahme des Tropfens bereitgestellt. Bei Versuchsbeginn werden nun genau auf Zeit die aliquoten Teile von Zuckerlösung und Hefesuspension in den Versuchskolben zusammengegossen, dieser ganz kurz und kräftig durchgeschüttelt und mit dem vor dem Schütteln eingeführten Glasstab der erste Tropfen auf die Prismafläche gebracht. Der Glasstab wird sofort in den Kolben zurückgeführt, dieser mit einem Wattepfropfen verschlossen und fast gleichzeitig der Tropfen mit dem Hilfsprisma zugedeckt und die Metallhülse aufgesetzt. Die ganze Manipulation darf nur 3—5 s dauern. Das Refraktometer wird nun ins Meßbad eingestellt und nach genau 4 Minuten seit der Tropfenentnahme die Ablesung des RW vorgenommen. Die drei unmittelbar hintereinander abgelesenen Werte werden sofort aufnotiert, das Refraktometer wieder geöffnet, die Prismen abgespült, getrocknet und für die nächste Messung bereitgestellt. Auf diese Weise sind wir imstande, alle 6 Minuten einen neuen Tropfen zu messen. Während der ganzen Versuchszeit wurde geschüttelt.

Bei weitaus den meisten Untersuchungen wurde so vorgegangen, daß mit einer zeitlichen Verschiebung von 6 Minuten zwei Versuchskolben gleichzeitig geschüttelt

[1] In unserm Falle Reaktionsvolumen = 40 cm^3; $f = \frac{x \cdot 40 \cdot 1000}{100}$ mg/Rv.

und alternierend gemessen wurden. Pro Versuchskolben konnte also auf diese Art alle *12 Minuten* ein Wert genommen werden.

Der pro Zeiteinheit aus der Außenlösung verschwundene Zucker wurde gleich der Aufnahme in die Zelle (oder in die Zelloberfläche) gesetzt.

4. Bestimmung der Zellenzahl und der Zelldimensionen

a) Zellenzahl

Die von Musfeld (1942) ausgearbeitete Methode zur Feststellung der Zellenzahl aus dem Lichtwert einer photometrischen Messung der Suspensionsdichte schien für unsere Zwecke sehr geeignet. Die Einzelheiten des Vorgehens sind in der erwähnten Arbeit ausführlich beschrieben, so daß wir uns hier auf die Wiederholung des Prinzips beschränken können: Von einer Reihe von Suspensionen verschiedener Dichten werden die zugehörigen Lichtwerte bestimmt. Einige Proben mit bestimmtem Lichtwert werden nun in der Thoma-Kammer auf ihre Zellenzahl hin ausgezählt. Trägt man sowohl Lichtwert als auch zugehörige Zellenzahl logarithmisch auf, so liegen die Werte ziemlich gut auf einer Geraden, solange wir innerhalb 0,5 bis 8 ‰ Suspensionsdichte bleiben. An den beiden Enden beginnt die Kurve S-förmig abzubiegen. Auf Grund dieser Gesetzmäßigkeit im Gebiete zwischen 0,5 und 8 ‰ sind wir aber in der Lage, für jeden beliebigen Lichtwert die zugehörige Zellenzahl angeben zu können. Wir werden zudem frei von der etwas labilen Größe der «Suspensionsdichte» (= Gewicht/Volumen).

Es stimmt mit den eigenen Beobachtungen durchaus überein, wenn Musfeld (1942, S. 585) schreibt: «Die Trockengewichtsschwankungen hängen hauptsächlich vom Grad der Abpressung ab. Das festgestellte Wasser ist sowohl adhärierendes als auch zelluläres Wasser, wobei die Schwankungen in der Menge des adhärierenden nach meiner Beobachtung größer sind als die des zellulären.»

Gerade auf Grund dieser Feststellung ist es aber falsch, wenn Musfeld das Trockengewicht in seine Lichtwertformel[1] einführt. Die Menge des adhärierenden Wassers beeinflußt die Größe des Trockengewichts, nicht aber den Photometerwert. Dieser hängt allein von der *Anzahl* Hefezellen, die in einem bestimmten Volumen Wasser suspendiert sind, ab und nicht davon, ob diese Zellen *vor* dem Suspendiertwerden von viel oder wenig Wasser begleitet waren. Der Ausdruck G/G′ wurde deshalb bei der Bestimmung der eigenen Lichtwerte weggelassen.

Es konnte nicht erwartet werden, daß die Hefen, obwohl vom selben Orte bezogen, genau die gleiche Beschaffenheit aufweisen würden, wie sie vor bald einem Jahrzehnt von Musfeld festgestellt wurde. Es war deshalb nötig, die Abhängigkeit

---

[1] $L = \frac{H \cdot G}{W \cdot G'} \cdot 100$

wobei: L = Lichtwert in %
H = Photometerwert der mit Hefesuspension gefüllten Küvette
W = Photometerwert der mit Aqua dest. gefüllten Küvette
G = mittleres Trockengewicht aller Hefeproben in % (= 28)
G' = Trockengewicht der jeweiligen Einzelprobe in %.

von Lichtwert und Zellenzahl auf Grund eigener Versuche erneut festzustellen. Dabei wurde folgender Arbeitsgang gewählt:

Von mehreren Einwägungen achtpromilliger Hefesuspension (2 g/250 cm³) wurden exakte Verdünnungsreihen von je 4—2—1 und 0,5 ‰ hergestellt und von diesen alle auf ihren Lichtwert geprüft. Bei mehrmaliger Messung derselben Suspension traten folgende Schwankungen der Lichtwerte auf:

Tabelle 1

Verdünnung	Lichtwerte	$\Sigma (x - \bar{x})^2$
‰		
8	27,6–27,9–27,4	0,1267
4	33,2–33,5	0,0450
2	43,2–42,7	0,1250
1	57,4–56,7	0,2450
1	58,2–57,9–58,5	0,1800
1	57,9–57,2	0,2450
	$n = 14$	Total 0,9667

$\Sigma (x - \bar{x})^2$ gibt an: die Quadratsumme der Abweichungen von dem Mittelwert der betreffenden Suspensionsdichte. Aus dem Total dieser Quadratsummen berechnet sich die Standardabweichung σ des Einzelwertes zu $\sigma = \pm 0{,}27$ Lichtwerteinheiten (%). Da wir aber den Lichtwert in weitaus den meisten Fällen als Mittelwert aus drei aufeinanderfolgenden Ablesungen aufnotierten, können wir als Genauigkeitsgrenze der photometrischen Methode eine Abweichung von $\frac{0{,}27}{\sqrt{3}} = \pm 0{,}16\ L\%$ angeben.

An fast 50 Proben photometrisch bestimmter Hefesuspensionen wurde die Zellenzahl ausgezählt. Um sich ein Bild von der Genauigkeit der Auszählung machen zu können, wurden einige Suspensionen, je an einem frischen Tropfen, mehrmals hintereinander ausgezählt. Sie lieferten dabei folgendes Ergebnis:

Tabelle 2

Verdünnung	Zellen pro mm³	$\Sigma (x - \bar{x})^2$
‰		
2	25 100–24 020–24 680	592 800
1	14 250–13 450	320 000
1	13 580–12 900	231 200
1	12 940–12 930	50
1	12 370–12 590	24 200
1	13 930–14 450–14 190	135 200
1	12 910–13 380	110 450
	$n = 16$	Total 1 413 900

Daraus berechnet sich die mittlere Abweichung unserer Auszählungen zu $\sigma_m = \pm 77$ *Zellen* einer ein- bis zweipromilligen Suspension. Das sind rund 0,5 % der jeweils anwesenden Zellenzahl.

Zum bessern Verständnis sei noch bemerkt, daß die Auszählungen jeweils nur an ein- oder zweipromilligen Suspensionen ausgeführt wurden, um nicht zu viele Zellen in einem Quadrat der Thoma-Kammer vorzufinden, was das Zählen wesentlich erschwert hätte. Da wir aber immer nur exakte Verdünnungsreihen untersuchten, gilt der gefundene Wert natürlich, mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert, auch für alle andern Verdünnungen resp. ihre Lichtwerte.

Aus den für eine bestimmte Suspensionsdichte ermittelten Zellzahlen und Lichtwerten wurde nun wie bei M u s f e l d der Mittelwert gebildet und so die folgende Tabelle erhalten:

Tabelle 3

Verdünnung ‰ Hefen	Lichtwert L	log L	Zellenzahl Z/mm^3	log Z
8	27,46	1,439	104 640	5,020
4	33,95	1,531	52 320	4,719
2	43,78	1,641	26 160	4,418
1	58,55	1,768	13 080	4,116
0,5	74,51	1,872	6 540	3,816

Aus diesen Werten können wir nun ohne Mühe eine weitere Tabelle zusammenstellen, die uns erlaubt, die Zellenzahl jeder beliebigen Suspensionsdichte an Hand des Lichtwertes festzustellen. Wir brauchen dazu nur, analog zu den Refraktometertabellen, den ganzen Lichtwerten die zugehörigen Zellenzahlen gegenüberzustellen:

Tabelle 4

Lichtwert L%	Zellen/mm^3	pro 40 cm^3 Zellen · 10^6
27	111 300	4450
28	98 600	3950
29	87 200	3490
30	78 600	3150
31	70 200	2810
	usw.	

Für unsere Zwecke benötigen wir diese Tabelle allerdings nicht. Es wurde in einem frühern Abschnitt gesagt, daß alle Versuche mit genau derselben Suspensionsdichte durchgeführt wurden. Diese Forderung wurde in der Weise erfüllt, daß jede frisch (und eher etwas zu konzentriert) bereitete Suspension von rund 8 ‰ vor Beginn des ersten Versuches, d. h. in *glykogenfreiem* Zustande, wo nötig durch Verdünnen auf einen Lichtwert von 27,50 ± 0,16 % eingestellt und im Verlaufe der folgenden Versuche gelegentlich nachgeprüft wurde. Aus der Tabelle 4 ersehen wir, daß 0,16 Lichtwertprozent bei Lichtwert 27,50 einer Abweichung von rund ± 2000 Zellen entsprechen oder, anders ausgedrückt, ± 1,9 % der vorhandenen Zellenzahl. Diese 8-‰-Suspension wird, wie bekannt, bei Versuchsbeginn durch dieselbe Menge Zuckerlösung auf genau die Hälfte verdünnt. Wenn also in dieser Arbeit die Versuchsdichte der Hefen mit *4 ‰* angegeben ist, so will das immer heißen, daß sich *im Reaktionsvolumen von 40 cm^3 2083 ± 40 · 10^6 Zellen* befanden.

b) Zelldimensionen

Mit Hilfe eines Mikrometerokulars wurden in zwei verschiedenen Hefeproben zirka 500 Zellen auf ihre Länge und Breite (D und d) ausgemessen. Die erhaltenen Werte wurden graphisch aufgetragen und auf ihre Verteilung geprüft. Bei einer Klassenbreite von 0,53 μ erhielten wir eingipflige Frequenzkurven mit ordentlich regelmäßigem Verlauf, so daß wir die größenmäßige Verteilung der Hefepopulation als genügend erfaßt betrachten können.

Als Mittel beider Proben ergab sich ein mittlerer Durchmesser $D_m = 5{,}85\ \mu$ mit einem σ_D^2 von 1,85 und ein entsprechender Kleindurchmesser $d_m = 4{,}57\ \mu$ mit einem σ_d^2 von 1,36. Das Achsenverhältnis D/d finden wir dann gleich 1,28, entsprechend den Messungen von Musfeld, der bei seinen Beobachtungen ebenfalls Achsenverhältnisse zwischen 1,27 und 1,3 fand. Wenn auch die Größen der Zellen von Beobachtung zu Beobachtung etwas ändern, so scheinen doch ihre Proportionen ziemlich konstant zu bleiben.

Zur Berechnung von Volumen und Oberfläche brauchen wir mittleres Kubik $\overline{d^3}$ und mittleres Quadrat $\overline{d^2}$ des Durchmessers. Nun ist aber das mittlere Quadrat (resp. Kubik) des Durchmessers nicht gleich dem mittleren Durchmesser (d_m) im Quadrat (resp. Kubik). Es ist abhängig von der Größe der Streuung und läßt sich in folgenden einfachen Formeln festhalten [1]:

$$\overline{d^2} = d_m^2 + \sigma^2 \qquad \overline{d^3} \cong d_m^3 + 3\ (d_m)\ \sigma^2 .$$

Auf Grund dieser Beziehungen ist es möglich, von der mittleren Länge und Breite zur mittleren Oberfläche resp. zum mittleren Volumen zu gelangen. Der weitaus größte Teil der Hefezellen präsentiert sich dem beobachtenden Auge als Eiform. Eine generelle Formel zur Berechnung der beiden Größen aus einer Eiform mit beliebigem Achsenverhältnis läßt sich nicht aufstellen. Legen wir aber das Achsenverhältnis fest, in unserem Fall zu $D/d = 1{,}293$, so erhalten wir die Möglichkeit, Oberfläche und Volumen formelmäßig zu bestimmen [2]:

Formeln für Oberfläche und Volumen einer Eiform mit dem Achsenverhältnis $D/d = 1{,}293$

$$O = 4{,}7163 \cdot \pi\, \overline{R^2} \qquad V = 1{,}6688 \cdot \pi\, \overline{R^3}$$

$$\text{wobei } R = d/2$$

Auf diese Art gelangen wir für eine Zelle zu einer *mittleren Oberfläche von 83,3 μ^2* und zu einem *mittleren Volumen von 77,0 μ^3*.

---

[1] Die Abhängigkeit von σ^2 wurde mir freundlicherweise von Dr. H. Huber, I. Assistenten am hiesigen Institut, berechnet.

[2] Die Berechnungen der Formeln für Oberfläche und Volumen einer Eiform verdanke ich meinem Vater, Dr. K. Rieder, Riehen.

Vorversuche

Wir haben uns im bisherigen Teil der Arbeit hauptsächlich befaßt mit den rein methodischen Erfordernissen der Refraktometrie, mit den Bedingungen meist physikalischer Natur, die zur Erreichung einer genügenden Genauigkeit beachtet werden müssen, und mit den Bezugsgrößen, auf die wir unsere Aussagen beziehen wollen. Wir müssen nun dazu übergehen, die Richtigkeit unserer Bestimmungen womöglich mit Hilfe anderer Methoden zu überprüfen und die Einflüsse zu untersuchen, denen unsere Methode durch die physiologischen Äußerungen des Organismus, d. h. durch den Stoffwechsel der Hefe, unterworfen ist.

I. Vergleich mit andern Methoden der Zuckerbestimmung

a) *Polarographie:* Zucker eignen sich im allgemeinen sehr schlecht zum Polarographieren, viele davon, zum Beispiel Glucose, überhaupt nicht. Zwei Parallelversuche mit Fructose gaben zwar im Durchschnitt eine annähernde Übereinstimmung der polarographischen und refraktometrischen Zuckerkurven, doch wiesen die polarographischen Einzelwerte so enorme Schwankungen auf, daß praktisch kein Wert auf die Ergebnisse gelegt werden kann.

b) *Polarimetrie:* Das im Institut vorhandene Handpolarimeter wies fast ebenso große Streuungen auf, wie der im Laufe eines Versuchs verschwundenen Zuckermenge entsprach. Es hatte deshalb keinen Sinn, mit einem ungenauern Instrument eine genauere Methode prüfen zu wollen.

c) *Reduktionsmethoden:* Als zuverlässig kamen deshalb nur noch die Methoden nach Fehling, Bertrand (in Beckurts, 1913) und Neuweiler (1933) in Frage oder die elektrolytische Methode nach Treadwell (1940).

Für unsere Zwecke (reine Zuckerlösungen) eignet sich die *Fehlingsche Methode* nach den Vorschriften von Soxhlet und den Tabellen von Allihn (in Beckurts, 1913) sehr gut, wonach das abgeschiedene Kupfer als Oxydul oder Oxyd bestimmt wird. Zuerst wurde jedoch die Genauigkeit der RW an einer Reihe exakter Einwägungen geprüft. Wir sehen aus der Tabelle 5, daß für reine Zuckerlösungen, sofern man bis zur Konstanz des RW wartet, die Abweichungen der Einzelwerte noch viel kleiner sind, als wir sie für unsere normale Versuchsanordnung (mit Hefen) berechnet haben. Die RW dürfen daher als durchwegs zuverlässig und genau betrachtet werden.

Wichtig ist ferner, zu wissen, wie weit die Stoffwechselprodukte der Hefezellen die RW beeinflussen. Nachdem eine genügende Übereinstimmung von RW und Fehling-Werten an reiner Glucose festgestellt worden war (Tabelle 6, erste vier Werte), wurden deshalb eine Reihe

Tabelle 5

Vergleich von Einwägung und Refraktionswert (%g = Gramm in 100 cm³)
20° C, Glucose

Einwägung %g	Refraktometer Tropfen	Refraktometer gemessene %g	Abweichung %g
0,7934	1.	0,7888	— 0,0046
	2.	0,7953	+ 0,0019
0,8030	1.	0,8083	+ 0,0053
	2.	0,8083	+ 0,0053
1,0004	1.	1,0042	+ 0,0038
	2.	1,0050	+ 0,0046
1,0007		1,0037	+ 0,0030
1,0011	1.	1,0007	— 0,0004
	2.	1,0029	+ 0,0018
2,0013	1.	2,0030	+ 0,0017
	2.	2,0009	— 0,0004

von RW- und Fehling-Bestimmungen an Zuckerlösungen miteinander verglichen, die verschieden lang mit Hefe versetzt waren. Die Messungen wurden wie folgt ausgeführt:

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde die Hefe sofort abfiltriert mit einem Glasfilter 1 G 4. Der erlittene Wasserverlust durch Verdunstung muß dabei berücksichtigt werden, indem nach dem Filtrieren nochmals der RW abgelesen wird als Bezugswert für den nachherigen Vergleich mit der Fehling-Bestimmung. Zu je 30 cm³ Fehling I und II, welche zum Sieden erhitzt wurden, gibt man 25 cm³ der Zuckerlösung und erhält 2 Minuten am Kochen. Das weinrote Kupferoxydul wurde dann in einen Goochtiegel G 2 abfiltriert, anschließend mit etwas warmem Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen, zirka 1 Stunde bei 103° C im Heizschrank getrocknet und nach dem Abkühlen gewogen. Zur Kontrolle, ob die Wägung als Oxydul brauchbar ist oder ob eventuell organische Verunreinigungen aus der Hefesuspension die Wägung fälschten, wurde bei zwei der Proben der Goochtiegel (in einem zweiten Porzellantiegel) während zirka 1½ Stunden ausgeglüht, gewogen, nochmals geglüht und nachgewogen. Die so ausgeführte Wägung als Kupferoxyd zeigte, bezogen auf reines Kupfer, genau den gleichen Wert an wie das Oxydul. Alle weitern Proben wurden deshalb nur noch als Oxydul bestimmt.

Diese Messungen wurden als Stichproben auch bei spätern Versuchen wiederholt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sowie die Folgerungen, die sich daraus ergeben, werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

II. Einfluß der Versuchsdauer

Der RW von Hefesuspensionen ohne Zucker verändert sich durch eventuelle Abgabe irgendwelcher Substanzen auch nach Stunden nicht. Als die Messung direkt störend kommen deshalb nur noch die Ausscheidungsprodukte des Zuckerstoffwechsels in Betracht.

Tabelle 6

Vergleich von Refraktionswert und Fehling-Bestimmung nach verschieden langer Versuchsdauer (4 ‰ Hefe in Glucose)

Versuchs-temperatur °C	Versuchs-dauer Std.	Bestimmung als RW %g	Bestimmung als Fehling %g	Differenz absolut %g	Differenz in % der vorh. Konz.[2]	
—	—[1]	0,828	0,824	— 0,004	0,49	0,61
—	—	0,813	0,818	+ 0,005	0,61	
—	—	0,808	0,805	— 0,003	0,35	
—	—	0,792	0,800	+ 0,008	1,00	
25	¾	0,765	0,770	+ 0,005	0,65	0,69
25	¾	0,985	0,978	— 0,007	0,72	
25	1	0,749	0,739	— 0,010	1,35	1,33
25	1	0,858	0,842	— 0,016	1,90	
25	1	0,971	0,964	— 0,007	0,73	
30	1	0,806	0,790	— 0,016	2,03	
25	2	0,748	0,726	— 0,022	3,03	3,05
25	2	0,944	0,916	— 0,028	3,06	
35	2	0,810	0,770	— 0,040	5,20	
25	6	0,762	0,657	— 0,105	16,0	14,3
25	6	1,061	0,942	— 0,119	12,6	
25	20	0,684	0,422	— 0,262	62,0	62,0

[1] Die ersten vier Messungen wurden zum Vergleich der beiden verwendeten Methoden an *reiner Glucose,* d. h. ohne daß diese je mit Hefen in Berührung kam, ausgeführt.

[2] % der vorh. Konz. heißt: die Differenz der beiden Messungen wurde bezogen auf die nach Versuchsabbruch tatsächlich noch vorhandene und mit der Fehling-Reaktion bestimmte Zuckermenge.

An Hand der Tabelle 6 erkennen wir, daß bis zu einer Versuchsdauer von etwa dreiviertel Stunden die Werte der beiden Methoden nicht stärker differieren, als ungefähr der methodischen Abweichung des Refraktometers entspricht. Von diesem Zeitpunkt an macht sich aber eine immer deutlicher werdende Divergenz der beiden Methoden bemerkbar, indem der RW stets höher ausfällt, als der in diesem Zeitpunkt noch vorhandene Zucker (Fehling) erwarten ließe (siehe auch Schopfer, 1933). Diese Differenz wurde der *alkoholischen Gärung* zugeschrieben. In der Tat können wir Alkohol, zum Beispiel nach ein bis zwei Stunden, schon mit der Jodoformprobe nachweisen. Eine genauere Messung des gebildeten Alkohols (4 ‰ Hefe in 1 % Glucose, geschüttelt bei 30° C, Hefen nach 50 Minuten abzentrifugiert, Alkohol sauer und basisch abdestilliert und nachher refraktometrisch gemessen) ergab nach Wagners Tabellen einen Gehalt von 0,014 %g[1], das sind rund 0,025 Skt. In Zuckerprozenten ausgedrückt, entsprechen

[1] Theoretisch berechnet aus Gärungs-CO_2 bei 30° C: 0,010 % g.

0,025 Skt. einer Differenz von nicht ganz 0,007 %g. Das heißt: bei einer Versuchstemperatur von 30° C würde infolge der Alkoholbildung nach 50 Minuten der gemessene Zuckerwert um 0,007 %g zu hoch ausfallen. Das Ergebnis stimmt nicht schlecht mit den Werten der Tabelle 6 überein. Von 30° C bis zum Temperaturoptimum der Gärung (35°) nimmt diese nicht mehr bedeutend zu. Wir können also aussagen, daß auch im Gebiete optimaler Zelltätigkeit der «Alkoholfehler» innerhalb 50 Minuten unter *aeroben* Bedingungen nicht mehr als rund 0,008 %g ausmacht, bei tieferen Temperaturen (25° und 30°), bei denen die meisten Versuche ausgeführt wurden, sogar noch bedeutend weniger.

Wenn wir also unsere Versuchsdauer nicht über 50 Minuten ausdehnen, so wird das Resultat durch den Stoffwechsel der Hefe nicht um einen größeren Betrag gefälscht, als etwa der Abweichung der Methode entspricht. Aus diesem Grund habe ich mich entschlossen, die *Versuchsdauer* auf *48 Minuten* (vier Intervalle à 12 Minuten) festzusetzen. Zudem haben Versuche von so kurzer Dauer mehrfache Vorteile:

1. Wie sich gezeigt hat, ist die Zuckeraufnahme anfangs hoch.
2. Die Alkoholproduktion ist anfangs klein, da die Gärung eine gewisse Anlaufzeit benötigt.
3. Die Zellvermehrung ist praktisch gleich Null.
4. Die Infektionsgefahr resp. die Vermehrung eventuell vorhandener Bakterien ist unbedeutend.

Bei den vielen mikroskopischen Proben auf tote Zellen oder auf Glykogen wurde übrigens nie Anwesenheit von Bakterien beobachtet.

III. Einfluß des Schüttelns

Bereits früher wurde mitgeteilt, daß alle Suspensionen während der ganzen Dauer eines Versuches geschüttelt wurden. Wie schon Geiger-Huber (1934) und Reimesch (1934) hervorheben, ist eine homogene Verteilung der Versuchsorganismen im Nährmilieu unerläßlich für die Erlangung gleichmäßiger Resultate. Wir können auch hier feststellen, daß im ungeschüttelten Gefäß die O_2-Sättigung der Lösung rasch abnimmt, wodurch das Verhältnis von Atmung/Gärung gestört wird, indem die Atmung gehemmt und die Gärung stark gefördert wird (Giltay und Aberson, 1894; Meyerhof, 1925). Dies hat zwar erhöhten Zuckerverbrauch und, dadurch bedingt, erhöhte Zuckeraufnahme zur Folge, gleichzeitig aber auch erhöhte Alkoholbildung, so daß sich der sog. «Alkoholfehler» schon früher auswirken würde.

Die gesteigerte Zuckeraufnahme unter O_2-Mangel beweist, daß unter den gegebenen Bedingungen auch im ungeschüttelten Gefäß genügend Zuckermoleküle an die Zelloberfläche gelangen. Es handelt sich folglich in unserm Falle um eine Frage des Gasaustausches. Das

Schütteln hat also lediglich den Zweck, einen maximalen Gasaustausch und damit Konstanz des Verhältnisses Atmung/Gärung zu gewährleisten.

IV. Besteht ein Unterschied in der Aufnahme von α- und β-Glucose?

Frisch gelöste Glucose liegt in der α-Form vor und verwandelt sich in der Hitze sehr rasch, bei Zimmertemperaturen in einigen Stunden (Lippmann, 1904; Karrer, 1943), in ein Gemisch von rund ein Drittel α- und zwei Drittel β-Glucose, mit einem Drehwinkel von 52,3°. Trotzdem bei allen Hauptversuchen nur gekochte Zuckerlösungen verwendet wurden, können wir uns fragen, ob wir refraktometrisch eine Bevorzugung in der Aufnahme der einen oder andern Form feststellen können. Es wurde dabei folgende Überlegung gemacht: Geben wir der Hefe als Substrat eine Glucose, die erst bei Versuchsbeginn gelöst wurde, so ist sie anfangs ganz und auch später zum größern Teil auf α-Glucose angewiesen (der Drehwert sinkt im Laufe von 50 Minuten von etwas über 100° erst bis gegen 70°). Fügen wir aber den Zucker als aufgekochte Lösung bei, so steht der Hefe während des ganzen Versuches ein Überschuß an β-Glucose zur Verfügung. Wird die eine oder andere Form bevorzugt, so muß dies in der Größe des Resultats zum Ausdruck kommen.

Nach diesem Prinzip wurde an 21 Parallelversuchen mit gekochter und ungekochter Glucoselösung die Größe der Zuckeraufnahme bestimmt, ohne daß ein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte (Tabelle 7). Wir sind daher wohl berechtigt, alle 42 Versuche in einen einzigen Mittelwert zusammenzufassen. Wir werden später bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit auf diesen Wert zurückgreifen.

Tabelle 7

Glucoseaufnahme

25° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose

Mittel aus je 21 Versuchen mit gekochter und ungekochter Glucose

in mg/40 cm³	Intervall à 12 min I	II	III	IV	Total	σ_m [1]
gekocht	8,64	4,01	3,10	2,97	18,70	± 1,00
ungekocht	8,75	4,25	2,89	2,40	18,25	± 1,02
Mittel aus allen 42 Versuchen						
mg/40 cm³	8,70	4,13	2,99	2,69	18,50	± 0,70

[1] Die σ_m für die Werte der einzelnen Intervalle entsprechen im allgemeinen den σ_m der Totalwerte.

Die Tatsache, daß beide Glucoseformen von der Hefezelle gleich gut aufgenommen werden, legt uns den Schluß nahe, daß wohl auch in der *Permeabilität von α- und β-Glucose kein Unterschied* besteht.

Unter einer Bedingung allerdings wären diese Aussagen sehr fraglich: es ist zum Beispiel denkbar, daß die Hefe ein Ferment besäße, das imstande ist, die α-Glucose innert kurzer Zeit in β-Glucose zu verwandeln, d. h. die Mutarotation so stark zu beschleunigen, daß keine signifikanten Unterschiede mehr erhalten werden. Der Beantwortung dieser Frage galten die folgenden Untersuchungen.

V. Wird die Mutarotation durch Hefen beeinflußt?

Mit einem Polarimeter wurde die Änderung der Drehung frisch gelöster, hefefreier und anderseits frisch gelöster, mit Hefe versetzter Zuckerlösung verfolgt. Es wurde dabei festgestellt (Tabelle 8), daß die beiden Kurven sich fast vollständig decken, daß also nicht die geringste Beeinflussung durch die Anwesenheit von Hefe herausgelesen werden kann. Die Änderung der Zuckerkonzentration im Hefeversuch wurde natürlich mitberücksichtigt. Daraus folgt, daß unsere vorherige Aussage betr. Gleichwertigkeit von α- und β-Glucose ihre Gültigkeit behält (siehe auch Neuberg, 1946).

Tabelle 8

Mutarotation mit und ohne Hefen

20° C — 2 % Glucose — abgelesen: α in Grad

Blindversuch:	α-Werte nach min				
	12	24	36	50	65
Grad	—	181,6	162,2	147,8	139,0
	196,6	177,7	161,8	146,5	133,4
Mittel	197	180	162	147	136

in 4 ‰ Hefen:	α-Werte nach min		
	20	40	60
Grad:	191,0	156,8	137,4
	189,2	157,4	140,6
Mittel	190	157	139

VI. *p*H der Versuchsflüssigkeit, Änderung im Laufe des Versuchs

Obwohl die Suspensionen nicht gepuffert waren, fand sich bei wiederholten Proben fast regelmäßig ein *p*H *um 5 herum* vor. Im Laufe des Versuchs zeigte sich eine leichte Tendenz zur Ansäuerung (CO_2-Bildung), doch wurden innerhalb von 48 Minuten nie Werte gefunden, die ein *p*H von 4,5 unterschritten hätten.

Zur Physiologie der Zuckeraufnahme

I. Übersicht über die bisherigen Forschungsergebnisse

"The earlier idea that the yeast-cell, by its mere presence, is able to exert an extraneous transforming influence on certain substances dissolved in the surrounding medium have proved to be erroneous. All known facts point consistently to these changes taking place exclusively *within* the cell, and they therefore connote a constant centripetal flux of material through the cell-wall, and a counter-flux of the metabolites of equal or nearly equal amount in the opposite direction . . ." Diese Feststellung Browns (1914) legt nicht nur Zeugnis ab für die zu Beginn des 20. Jahrhunderts sich allgemein durchsetzende Erkenntnis, sie läßt zugleich die Frage nach der Art, wie denn das Nährsubstrat der Hefe — der Zucker — in die Zelle hineingelangt, unausweichlich werden. Die intensiv betriebene Forschung auf dem Gebiete der Zellpermeabilität brachte zuerst zwei grundlegende, aber sich widerstreitende Theorien hervor, die Lipoidtheorie von Overton (1895) und die Ultrafiltertheorie von Ruhland (z. B. W. Ruhland und C. Hoffmann, 1926). Ihre erfolgreiche Vereinigung (Lipoidfiltertheorie) durch Collander (1937) setzte zwar dem Gegensatz ein Ende und lieferte eine Erklärung für die Aufnahme vieler Stoffe, wie Alkohole, Amine, verschiedene organische Säuren und Farbstoffe usw., doch ist auch sie nicht imstande, die enorm hohe Zuckeraufnahme durch Hefezellen zu erklären (siehe auch Fleischmann, 1928, S. 449).

Wir überblicken heute ein reiches Feld von Arbeiten, in denen an den verschiedensten Objekten Fragen der Permeabilität für Anelektrolyte untersucht wurden, sei es nun der Permeabilität des Protoplasten (Collander, 1921, 1937, 1949, 1950; Höfler, 1926, 1934, 1940; Schönfelder, 1930; Schmidt, 1933; Zehetner, 1934; Wartiovaara, 1942; Rottenburg, 1943; Wiersum, 1947; Arisz, 1948; Malm, 1948; Äyräpää, 1950) resp. ihrer Beeinflußbarkeit durch gewisse Reagenzien (Czapek, 1914; Heilbronn, 1914; Seifriz, 1923; Anselmino, 1928; Runnstroem und Sperber, 1938), sei es derjenigen der Zellwand und ihrer Einflüsse (Czaja, 1935; Skene, 1943). Alle diese Arbeiten bestätigen nicht nur weitgehend die Forderungen der Lipoidfiltertheorie, sie lassen auch klar erkennen, daß es hinsichtlich Permeabilität nicht einen universellen Protoplasmatypus gibt, sondern deren mehrere. So kommt Höfler (1942) dazu, fünf «spezifische Permeabilitätsreihen» zu unterscheiden, die für bestimmte Pflanzen ganz charakteristisch sind und denen sich, wie er selbst sagt, «alle andern bisher untersuchten Pflanzen mehr oder weniger zuordnen lassen». Aber gerade diese letzte Feststellung scheint nur sehr bedingt zu gelten. Im allgemeinen dringt

Tabelle 9

Vergleich von Permeabilitätsreihen an verschiedenen Objekten
(P' = Permeabilitätskonstante, $P = P'/cm^2\ 10^4$)

1 = P 2—6 = P'	1	2	3	4	5	6
	Chara (Collander, Bärlund)		*Majanthemum* (Höfler)	*Beggiatoa* (Ruhland, Hoffmann)	*Licmophora* (Elo)	*Melosira* (Marklund)
Glycerin	7,4	0,024	0,066	0,009	0,018	0,039
Erythrit	0,46	0,002	0,005	0,001	0,016	0,015
Arabinose	—	—	—	0,0008	—	—
Fructose	< 0,3	< 0,001	0,006	0,00050	—	—
Glucose	< 0,3	< 0,001	0,0045	0,00055	—	—
Maltose	< 0,3	< 0,001	0,006	0,00020	—	—
Saccharose	< 0,3	< 0,001	0,002	0,00020	0,010	0,007

Zucker nicht oder nur äußerst langsam in die pflanzliche Zelle ein (Höfler, 1926; Collander und Bärlund, 1933, u. a.) und wird deshalb auch gerne als Plasmolytikum gebraucht. Dasselbe stellt übrigens Fleischmann (1928) für viele Arten von roten Blutkörperchen fest, mit Ausnahme von zum Beispiel *Mensch* und *Pferd*. Selbst wenn wir die Beobachtungen von Marklund (1936), Elo (1937) und Höfler (1940; daselbst zusammengefaßt), daß nämlich «das Protoplasma der *Diatomeen* durch eine ungewöhnlich hohe Zuckerpermeabilität ausgezeichnet» ist, zu einem Vergleich heranziehen (Tabelle 9), so stellen wir vor allem zwei Dinge fest:

1. Die Permeabilitätsunterschiede der einzelnen Protoplasten für Zucker können sehr groß sein, jedoch sind sie nur gradueller Natur.
2. Sie folgen fast ausnahmslos der Lipoidfiltertheorie, wobei das Filterprinzip offensichtlich die größere Rolle spielt.

Wir finden also hierin gar keine Anhaltspunkte zur Erklärung der Tatsache, daß der Hefeprotoplast verschiedene Zucker in weit stärkerem Maße aufnimmt als zum Beispiel das relativ kleine Glycerinmolekül, daß Glucose über einen weiten Bereich unabhängig von der Konzentration aufgenommen wird oder daß von allen etwa gleich wenig lipoidlöslichen Zuckern (Fleischmann, 1928) einzelne stark bevorzugt, andere von derselben Molekülgröße praktisch überhaupt nicht aufgenommen werden.

Es scheint mir allerdings darin ein ganz wesentlicher Unterschied zu liegen, daß alle untersuchten Objekte *(Majanthemum, Lamium, Gentiana, Rhoeo, Tradescantia, Chara, Nitella, Diatomeen, Cyanophyceen, Beggiatoa)* autotrophe Pflanzen sind, welche ihre Energie aus der Sonnenstrahlung oder allenfalls *(Beggiatoa)* durch Chemosynthese beziehen, während die *Hefe*zelle ein heterotropher Pilz ist, für den die von außen herbeigeschafften Kohlenhydrate selbst die eigentliche Energiequelle darstellen. Es ist denk-

bar, daß aus diesem Grunde anders geartete und engere Beziehungen zwischen Hefezelle und Nährsubstrat bestehen mögen als bei C-autotrophen Organismen.

Äyräpää (1950) macht allerdings die interessante Feststellung, daß sich der *Hefeprotoplast* völlig normal verhält und für organische Basen keine größere Durchlässigkeit besitzt als andere, vielgeprüfte Objekte, wie zum Beispiel *Chara*. Die große Zuckeraufnahme kann also nicht in einer generell größern Durchlässigkeit des Hefeprotoplasten gesucht werden. In diesem Zusammenhang mögen auch die Anschauungen von Arisz (1948) und Wiersum (1947) erwähnt sein. Sie unterscheiden eine «Transmeabilität» (Eindringen der Substanz durch Plasmalemma, Mesoplasma und Tonoplast bis in die Vakuole) und eine «Permeabilität» (= Intrabilität nach Höfler, 1931) (Eindringen durch Plasmalemma in den Raum des Mesoplasmas). Mit Versuchen an *Vallisneria* stellen sie fest, daß zum Beispiel Cl-Ionen (aber auch andere organische Substanzen) praktisch nicht in den Zellsaft eindringen, aber trotzdem in meßbarer Menge aufgenommen werden und sogar, wie sie annehmen, durch Vermittlung der Plasmodesmen im Plasma von Zellen angereichert werden, die selbst nicht mit der Substratlösung in Berührung stehen. Diesen Beobachtungen können wir zwar die Tatsache entnehmen, daß die mit den üblichen mikrochemischen oder plasmometrischen Methoden festgestellte «*Transmeabilität*» der meisten Literaturangaben durchaus nicht identisch sein muß mit der «*Permeabilität*» in den Plasmaraum im Sinne von Arisz, doch vermag auch diese Theorie die verschieden große Aufnahme gleich großer Zuckermoleküle nicht zu erklären.

So weisen denn Collander und Holmstroem (1937) mit Recht darauf hin, daß die reine Permeabilitätsforschung nicht fähig sei, das Problem der Stoffaufnahme und -abgabe zu lösen. Ihre Versuche ergeben, daß die Aufnahme von Sulfosäurefarbstoffen in *Tulpen-* und *Hyacinthenblüten* direkt von der Größe der Zellatmung abhängig ist, und sie schließen daraus, daß der Protoplast *aktiv* an der Aufnahme von Stoffen beteiligt sei. Auch für die Ionen- und Salzaufnahme gilt Ähnliches (siehe Collander, 1936; Osterhout, 1934, 1936 und 1947). Als sehr bedeutsam müssen wir ferner die Untersuchungen von Steward (1936) an *Kartoffelzellen* ansehen. Sie lassen erkennen, daß die Semipermeabilität der Zelle in direktem Zusammenhang steht mit dem Eiweißstoffwechsel und somit einen aktiven Lebensprozeß vorstellt: "Ability to synthesize protein thus emerges as that metabolic property of potato discs which, above all others, distinguishes cells which are able to accumulate and to retain solutes in the cell sap."

Wir wollen nicht vergessen, daß schon Overton (1895) von solchen Erscheinungen wußte und klar unterschied zwischen einer Aufnahme auf Grund osmotischer Eigenschaften und einer solchen durch aktive, wie er sie nannte, *adenoide* Tätigkeit des Plasmas. Höber

(1926 resp. 1947) mit seiner Schule war lange Zeit der einzige, der diesen Unterschied weiter verfocht, indem er die beiden Vorgänge, die praktisch nur sehr schwer trennbar sind, wenigstens gedanklich immer als *physikalische* und *physiologische* Permeabilität auseinanderhielt. Heute dürfen wir wohl sagen, daß die Erkenntnis der adenoiden Tätigkeit bei der Stoffaufnahme sich allgemein durchzusetzen beginnt. "The active participation of protoplasm in permeability is being recognized. At long last, there are indications that the shackles hitherto held securely by the plasma-membrane concept have become unloosened." (Kopac, 1950.)

Über die Art und Weise der Zuckeraufnahme besteht allerdings noch Unklarheit. Schon Pfeffer (1895) war es vertraut, daß spezifische Unterschiede bei der Aufnahme sonst gleichwertiger Zucker vorkommen, wenn er schreibt: «Für die natürlich vorkommenden Zucker ist u. a. bekannt, daß bei Darbietung von Invertzucker die d-Glucose relativ ansehnlicher vergoren wird als die d-Fructose. Gayon und Duborg, welche dieses für die gewöhnliche *Hefe* bestätigen, fanden aber auch Hefearten, die sich gerade umgekehrt verhielten.» Auch Galli (1946) macht die Feststellung, daß *Aspergillus niger* aus einer Lösung von Invertzucker die Glucose in weit stärkerem Maße verbraucht als die Fructose und daß letztere erst dann vermehrt aufgenommen wird, wenn praktisch alle Glucose verbraucht ist.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß einzelne Zucker gut, andere überhaupt nicht vergoren werden. Man kann sich hier die Frage stellen, ob ein solcher nicht vergärbarer Zucker überhaupt in die Zelle hineingelangt, ob es sich also um eine Permeabilitätsfrage oder eine solche enzym-chemischer Natur handelt. Fleischmann (1928) hat die Permeierfähigkeit einer Anzahl Kohlenhydrate untersucht, vor allem an *Erythrocyten,* aber auch an einigen Pflanzenzellen; er macht dabei die wichtige Feststellung (siehe auch bei Musfeld, 1942), daß Zucker in allen Fällen rascher eindringen als die entsprechenden Alkohole. Er erwähnt ferner die Ansicht von Ege, daß Traubenzucker zuerst an der Zelloberfläche adsorbiert werde und erst allmählich ins Innere der Zelle eindringe. In eigenen Versuchen bemüht er sich, in dieser Richtung weiterzukommen: «Da anzunehmen ist, daß als Vorstufe des Permeierens einer Substanz eine Adsorption an die Zellmembran stattfinden muß, daß das Maß dieser Adsorption für die Anreicherung der eindringenden Substanz von Bedeutung ist, also die Bedingungen für das Eindringen mit größerer Adsorbierbarkeit günstiger werden, erscheint eine Untersuchung der Adsorbierbarkeit der Kohlenhydrate (an Kohle) für unser Problem von Bedeutung... Stoffe, die die Oberflächenspannung stark erniedrigen, haben daher bessere Aufnahmebedingungen als oberflächeninaktive. Hierbei kommt es nicht auf die meist untersuchte Oberflächenspannung wässeriger Lösungen gegen Luft an, son-

dern auf die Adsorbierbarkeit an die Protoplasmagrenzfläche, also eine Grenzfläche *fest/flüssig.*» Die Ergebnisse sind insofern interessant, als auch an Tierkohle die Zucker eine bedeutend höhere Adsorbierbarkeit zeigen als Alkohole, die individuellen Unterschiede der Zucker sind dabei aber nicht derart, daß sie sich mit den biologisch festgestellten Unterschieden ohne weiteres zur Deckung bringen ließen (wir werden später auf diese Frage zurückkommen, S. 597 ff.). Fleischmann meint dann weiter: «Doch bliebe es bei der Annahme, daß die Aufnahme der Zucker lediglich durch Diffusion durch starre Poren vor sich gehe, nicht verständlich, daß die Glucose mit ihrem weit größern Molekularvolumen (Mol.refrakt. 37,53) viel rascher eindringt als der Arabit (Mol.-Refrakt. 32,91).» Mit der Tatsache, daß es ihm gelingt, Zucker in Öl-Anilin-Gemischen zu lösen, will er zum mindesten die Möglichkeit hervorheben, Zucker im gleichen Lösungsmittel zu lösen, in dem auch die Lipoide der Zellmembran wie das Cholesterin löslich sind.

Wertheimer (1934) betrachtet die Adsorption nicht nur als Vorstufe des Eindringens — an Versuchen mit gelähmten Hefezellen findet er eine sehr rasche, in allen Fällen temperaturunabhängige Restaufnahme, die er nur als Adsorption deuten kann — er geht in seinen Schlußfolgerungen viel weiter, indem er behauptet, daß der Zucker an der Oberfläche sofort verändert und erst das leichter permeierende Reaktionsprodukt (C_3-Körper) in die Zelle aufgenommen werde. «Es gibt kein Beispiel dafür, daß das große Zuckermolekül in wenigen Sekunden durch die Zellmembran einzudringen vermag und daß dabei zwischen ganz verwandten Zuckern ganz scharf unterschieden wird.» Die Unterschiede in der Verwertbarkeit der Zucker erklärt Wertheimer damit, daß er für alle Zucker eine streng spezifische Bindung an der Plasmagrenzschicht annimmt, « während die unspezifischen, da sie nicht gebunden werden, an der Zelle einfach vorbeifließen»; denn «es wäre unökonomisch für die Zelle, wenn auch alle für den Stoffwechsel unspezifischen Kohlenhydrate in die Zelle eindringen würden und ... wenn sie keine Verwendung finden, von der Zelle wieder ausgeschieden werden müßten». Ähnliche Vorstellungen muß Kopaczewski (1934) haben, wenn er von der «Orientation moléculaire» sagt: «son importance commence à se dessiner. Elle semble jouer un rôle dans le processus de mouillement des parois (Devaux) et dans l'adsorption (Langmuir), lesquels interviennent dans le degré de la perméabilité.»

Die Arbeit von Musfeld (1942) ist eine der wenigen, die überhaupt Zahlenmaterial zur Frage nach dem Verhältnis von Zuckeraufnahme/Zuckerverbrauch, vor allem in Abhängigkeit vom relativen Reaktionsvolumen einer Zelle, liefert. Wir entnehmen daraus die wichtige Tatsache, daß die Zuckeraufnahme sehr stark, die energieliefernden Prozesse (Atmung und Gärung) jedoch *nicht* abhängig sind von der Suspensionsdichte, welch letztere Feststellung sich übrigens deckt

mit Befunden von Slator (in Brown [1914]) und Geiger-Huber (1934). Über die Art und Weise der Zuckeraufnahme vermag sie allerdings nichts auszusagen, da sie nicht in dieser Richtung geführt wurde. Durchgehen wir die neuere Literatur auf solche Hinweise, so springen uns einige Eigentümlichkeiten besonders ins Auge. Einmal die immer wieder beobachtete Geschwindigkeit, mit der Zucker schon in den ersten paar Minuten aus der Außenlösung verschwindet: "In fact, recent work shows that glucose penetrates *yeast* cells almost competely before carbon dioxide appears..." (Brooks, 1947). Dann aber auch der Einfluß von Zuckerlösungen auf den Protoplasten: "The effect of sugar on the structural viscosity of protoplasm is interesting and somewhat surprising. Sucrose, like potassium chloride, when plasmolysing an *Elodea* cell, induces a striking *decrease* in viscosity of the protoplasm." (Seifriz, 1947.) Gleichzeitig weist Seifriz zwar auch darauf hin, daß wir eine solche Feststellung ohne Nachprüfung am einzelnen Objekt nicht einfach verallgemeinern dürfen: "...there is always the question: Do all forms of protoplasm react in the same way?" Als drittes muß uns auffallen, daß von den verschiedensten Autoren wiederholt die Vermutung ausgesprochen wird, es sei der Zuckertransport mit Phosphorylierungsvorgängen verbunden. So meint zum Beispiel Brooks (1947) bei der Diskussion einiger Kurven von Nord: "... they seem to result from phosphorylated processes occuring when glucose penetrates the *yeast* cell." Peat (1946) berichtet von den Versuchen Hartts: "... the last author showed that pure glucose was absorbed from solution by the roots of *sugar-cane plant* and transformed into sucrose. He also showed that phosphate ion was vitally necessary in this transformation and was of the opinion that fructose-diphosphate was formed as intermediate." In Sumner und Myrbaeck (1950) finden wir die interessante Feststellung: "... a cell cannot metabolize phosphorylated sugars added to the medium, but nevertheless must phosphorylate sugars in the cell surface in the first step of absorbing and metabolizing them..." Die Energie, welche Hefen und andere Pilze zu Synthese und Stofftransport brauchen, stammt nach Hawker (1950) zum größten Teil von energiereichen Phosphorverbindungen. Noch weiter geht in seinen Aussagen Johnson (in Lardy, 1950): "... Unless existing concepts of the mechanism of alcoholic fermentation are erroneous, the yeast has available from its energy source (glucose) only *one* type of energy, phosphate bond energy. It is apparently able to carry on all of the chemical and physical activities associated with growth by the utilization of this one form of chemical energy..." In diesem Zusammenhang mag auch die Feststellung von James (1946) interessieren: "Their phosphorylation (furanosides, as sucrose, raffinose, etc.) is reversible and therefore occurs with little change of free energy, and no linkage with an exergonic reaction is

essential. This is in marked contrast with the requirements of the hexosis", oder dann die Beobachtung von Brooks (1945): "...that radioactive ions, here phosphate, do not penetrate isolated cells smoothly, but are taken in and lost repeatedly." Nach Beobachtungen von De Hevesy und Mitarbeitern (in Malm, 1948, S. 34 ff.) stimmt das eben erwähnte Zitat zwar für Wurzeln und Blätter höherer Pflanzen, nicht aber für Hefen. Sie stellen mittels chemischer und radioaktiver Analysen fest, daß Phosphor nur dann aufgenommen wird, wenn gleichzeitig Glucose aufgenommen wird. Ein Austausch von Hefephosphor gegen radioaktiven Phosphor findet nicht statt. In der gleichen Richtung deuten die Angaben von Mullins (in Malm, 1948): «...die Aufnahme von P^{32} war stark vom Zuckergehalt des Mediums und von der Temperatur abhängig...» «Der hohe Temperaturkoeffizient zeigt, daß die P^{32}-Penetration... einer chemischen Reaktion zuzuschreiben ist...» «Der nahe Zusammenhang zwischen P-Aufnahme und Zuckergehalt läßt das Vorliegen einer Phosphorylierung vermuten...»

Wie Kopac (1950) zu berichten weiß, kommt Lefèvre am zoologischen Objekt zu ähnlichen Vorstellungen: "Lefèvre suggested, with justification, that the intermediation of sulfhydryl groups at the cell surface, probably by enzymic phosphorylation, is an essential step in the transfer of glycerol, glucose and similar substances across *human red cell* membranes."

Daß Phosphorverbindungen eine bedeutsame Rolle im Stoffwechsel der Hefen spielen mögen und diesen auch dann noch lange ungestört aufrechterhalten können, wenn — wie in unsern Versuchen — kein Phosphor von außen zugegeben wird, darauf deuten die beträchtlichen Mengen von Phosphor hin, die in der Hefezelle gebunden sind. Malm (1948) ermittelt den Gehalt an P_2O_5 in käuflicher Bäckerhefe (Hefefabrik Stockholm) zu rund 3,5 % des Trockengewichtes, Althaus (1950) zu 2,5 %. Für Pilze allgemein finden wir in Foster (1949) folgende Angaben (S. 140): "The high P content of mold mycelium ranges in Schnüches (1924) experiments from 1 to 3 % of dry mycelium, expressed as P_2O_5..." (S. 322): "In the mycelium the bulk of the P is in organic-bound form, although considerable ordinary orthophosphate occurs free in the mycelium..." Nach Nyman und Chargaff (1949) ist nur ein Drittel des in der Hefezelle vorkommenden P an die Kernsubstanz gebunden, während die übrigen zwei Drittel in anderer Weise für die Zelle verfügbar sind.

Vielleicht können auch die Versuche von Rothstein (1948) und Mitarbeitern einiges Licht auf dieses Problem werfen. Sie stellen nämlich fest, daß aus Lösungen von Uranylnitrat Hefezellen innerhalb von 2 Minuten Uranium in einer fünfzigmal höhern Konzentration aufneh-

men, als derjenigen der Außenlösung entsprechen würde. Bei gesteigerter Uraniumkonzentration stellt sich unabhängig von der Außenkonzentration ein Maximum der Aufnahme ein. Die Glucoseaufnahme wird durch Uranium gehemmt, die Hemmung kann aber rückgängig gemacht werden durch Zugabe von nur einem Fünfzigstel des im Hefecytoplasma chemisch festgestellten anorganischen Phosphatgehaltes. Aus all diesen Indizien schließt Rothstein, daß es sich nur um eine Adsorption an der äußern Oberfläche der Hefezelle handeln könne, und stellt weiter fest: "The percentage inhibition of glucose metabolism by uranium is equal to the percentage of active "groups" that are complexed by uranium. This indicates that the active groups are necessary for glucose metabolism and that the rate of metabolism is first order relative to the concentration of active groups . . ." Was also die Adsorption anbelangt, geht Rothstein einig mit der Auffassung von Wertheimer, doch hält er die weitern Folgerungen Wertheimers, daß der Zucker direkt an der Oberfläche verarbeitet werde und erst dann ins Zellinnere eindringe, für gar nicht zwingend. Ich möchte allerdings zu den Versuchen von Rothstein zu bedenken geben, daß auch durch die Adsorption des großen Uranium-Ions möglicherweise die rein physikalisch bedingte Permeabilität schon verändert werden kann (siehe z. B. Anselmino, 1928).

Wenn wir die bisherigen Forschungsergebnisse überblicken, so stellen wir fest, daß sich in der Erklärung des Problems der Zuckeraufnahme allmählich eine bestimmte Richtung abzuzeichnen beginnt, daß aber noch reichlich wenig experimentell gewonnenes Zahlenmaterial vorhanden ist über die Bedingungen, denen Zuckerverbrauch und vor allem Zuckeraufnahme unterworfen sind und über die Beziehungen der beiden Phänomene zueinander. Es ist deshalb das Ziel der vorliegenden Arbeit, einige Schritte vorwärtszukommen in der Beantwortung

a) der Frage nach dem Einfluß äußerer Faktoren wie Temperatur, Zuckerkonzentration, *p*H usw. auf die Zuckeraufnahme;

b) der Frage nach dem Zusammenhang der Zuckeraufnahme mit innern Faktoren wie Glykogenbildung und besonders Atmung und Gärung, d. h. dem Energiehaushalt der Zelle;

c) der Frage nach dem Verhalten der Hefe gegenüber *verschiedenen* Zuckern.

Dabei haben wir den Vorteil, unsere Ergebnisse mit der am hiesigen Institut fast gleichzeitig ausgeführten Arbeit von Althaus (1950) vergleichen zu können, der unter ganz ähnlichen Bedingungen die Bildung von Glykogen an derselben Rasse von Hefezellen untersuchte.

II. Eigene Untersuchungen

1. Beispiel einer refraktometrischen Meßreihe

Als Beispiel wählen wir eine Gruppe von Versuchen, die den genauen Verlauf der Zuckeraufnahme, gemessen in kurzen Intervallen von nur 6 Minuten, wiedergibt, während sonst alle übrigen Werte in Abständen von 12 Minuten abgelesen wurden (Grund siehe methodischer Teil). Aus Tabelle 10 ist ersichtlich, wie ein Einzelversuch aus-

Tabelle 10

Beispiel eines Einzelversuchs (123)

25° C — 4 ‰ Hefe in zirka 1 % Glucose — 6 min — *p*H zirka 5

10.30 Lösung und Refraktometer vorgewärmt — Beginn: 10.46

Zeit Trpf.entn.	Ablesungen (nach 4 ') 1.	2.	3.	M (Skt.)	△t (min)	—△ Skt. (in mSkt.)
10.46	18,19	18,17	18,17	18,177	—	—
10.52	18,10	18,09	18,12	18,103	6	74
10.58	18,05	18,07	18,07	18,063	6	40
11.04	18,03	18,03	18,02	18,027	6	36
11.10	18,01	17,99	18,00	18,000	6	27
11.16	17,99	18,01	17,99	17,997	6	3
11.22	17,98	17,98	18,00	17,987	6	10
11.28	17,99	17,98	17,99	17,987	6	0
11.34	17,96	17,99	17,98	17,977	6	10
	Glykogen: ++			Total	48	200

gewertet wird. Die so festgestellten Differenzen pro Meßintervall aller Einzelversuche werden dann zusammengestellt, wie in Tabelle 11 veranschaulicht, und daraus die Mittelwerte pro Intervall berechnet. Nun ersehen wir aus der Refraktometertabelle für Glucose, daß zwischen den Skalenteilen 14 bis 23 einer Differenz von 1 mSkt. (= 0,001 Skt.) eine solche von 0,00027 %g, das sind 0,27 mg/100 cm³, entspricht. Wir müssen also die in mSkt. festgestellten Werte nur noch mit dem Faktor 0,108 multiplizieren, um die entsprechenden Intervallswerte, ausgedrückt in *mg/Reaktionsvolumen von 40 cm³*, zu erhalten, welche uns angeben, wieviel Zucker während einer bestimmten Zeit von den Hefezellen aufgenommen worden resp. aus der Außenlösung verschwunden ist. Wünscht man Zuckeraufnahme oder Zuckerverbrauch auf die Zelloberfläche oder die Zahl der Zellen zu beziehen, so gilt folgende Umrechnung:

$$\text{mg/40 cm}^3 \text{ und } 48 \text{ min} \cdot 0{,}2 \cdot 10^{-9} = g/cm^2 \cdot s, \quad \text{oder}$$

$$\text{mg/40 cm}^3 \text{ und } 48 \text{ min} \cdot \frac{1{,}01 \cdot 10^8}{M} = Moleküle/Zelle \cdot s$$

Tabelle 11

Mittelwerte der Glucoseaufnahme

25° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — *p*H zirka 5,0

Versuch	Intervall à 6 min (mSkt.) I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Total $\pm \sigma m$
123	74	40	36	27	3	10	0	10	200
125	84	36	6	10	16	13	10	6	181
127	87	30	10	0	7	14	3	10	161
129	73	50	30	27	27	0	6	24	237
146	74	40	10	0	3	20	7	0	154
154	27	16	44	43	33	0	24	3	190
157	37	37	13	0	10	10	17	13	137
158	67	30	23	24	13	23	24	30	234
159	44	16	7	30	7	23	10	23	160
160	10	27	10	20	7	20	10	7	111
Mittel	57,7	32,2	18,9	18,1	12,5	13,3	11,1	12,6	176 ± 12,5
mg/40 cm³	6,24	3,48	2,04	1,95	1,35	1,44	1,20	1,36	19,0 ± 1,35

Von allen folgenden Versuchen sind nur noch die nach vorstehendem Beispiel berechneten Mittelwerte (*M*) jeder Versuchsreihe angegeben.

Es ist nun aber wichtig, festzuhalten, daß die erste Ablesung (= Nullwert der Messung) erst nach einer bestimmten Anwärmzeit, in diesem Falle nach 4 Minuten, ausgeführt wird. Die Zuckermenge, die in der Zeit von 0 bis 4 Minuten aufgenommen wird, können wir also nach dieser Methode nicht erfassen. Wir erhalten folglich nie den absoluten Betrag der Zuckeraufnahme, sondern immer nur relative Werte. Wenn dies auch das Gesamtbild resp. die Interpretation der Ergebnisse kaum ändert, so wäre es doch interessant, die Größenordnung dieser «Anfangsaufnahme» wenigstens für den wichtigsten hier untersuchten Zucker, die Glucose, zu kennen. Aber gerade die Beantwortung dieser Frage war eines der heikelsten Probleme, wie wir an Hand der folgenden Überlegungen sofort sehen werden:

Wir müßten zur Ermittlung der ZA zwischen 0 und 4 Minuten die genaue Anfangskonzentration des Zuckers sowie deren absoluter Wert nach 4 Minuten kennen. Beide Werte sind aber nur indirekt und sehr umständlich zu erhalten.

1. Hefesuspension und Zuckerlösung werden in aliquoten Teilen zusammengegossen; der Zucker wird dabei aber nicht auf genau die Hälfte verdünnt, da in der Hefesuspension das von den Zellen selbst beanspruchte Volumen (3 bis 4 ‰) nicht als verdünnender Raum wirkt. Wir müßten also die Verdünnung jedesmal an Hand der festgestellten Zellenzahl resp. ihres Volumens berechnen.

2. Der so erhaltene Anfangswert wäre aber nicht direkt vergleichbar mit dem RW (umgerechnet in Konz.) nach 4 Minuten, da wir zu jener Zeit in weitaus den meisten

Fällen noch nicht den konstanten Endwert, sondern relative Werte (zu hoch oder zu tief gegenüber dem wahren Wert) messen.

3. Es wäre noch an eine chemische Zuckerbestimmung zu denken. Wir müßten dann genau 4 Minuten nach dem Zusammengießen von Zucker und Hefe diese sofort durch scharfes Abnutschen wieder voneinander trennen. Dadurch verdunstet aber eine beträchtliche Menge Wasser, so daß wir wiederum nur einen relativen und mit dem Anfangswert nicht vergleichbaren Zuckerwert erhalten.

4. Abzentrifugieren kommt ebenfalls nicht in Frage, da wir Zuckerlösung und Hefe auf diese Weise nur relativ langsam und zu einem nicht genau definierten Zeitpunkt voneinander trennen können.

Nach Prüfung all dieser Aspekte sah ich nur noch eine Möglichkeit zur Lösung dieser Frage:

Wenn wir Schüttelbad und Meßbad auf Zimmertemperatur — und auch diese so konstant wie möglich — halten, so haben Tropfen und Refraktometer schon beim Einstellen ins Meßbad nahezu die Temperatur, die dem konstanten Endwert entspricht; vor allem ist dann die Trennungslinie im Refraktometer schon nach *kurzer* Zeit scharf genug, daß ihr Wert mit einiger Sicherheit abgelesen werden kann. Führen wir nun in der üblichen Weise (getrenntes Vorwärmen von Zuckerlösung und Hefesuspension, Zusammengießen und sofortige Entnahme eines Tropfens) eine Reihe von Versuchen durch, und zwar alternierend je eine Probe mit Hefen, die nächste ohne usw., lesen die RW je 1, 2, 3, 4, 5 usw. Minuten nach der Tropfenentnahme ab und bilden die Mittelwerte, so erhalten wir zwei verschiedene Kurven. Die eine (ohne Hefen) gibt uns die lediglich durch Verschiebung der Temperatur von Minute zu Minute bedingte Änderung des RW wieder; die andere (mit Hefen) liefert zusätzlich die Größe der RW-Verschiebung infolge Abnahme der Zuckerkonzentration in der Suspensionslösung. Wir brauchen also nur die Werte der ersten Kurve von der zweiten abzuziehen, um die durch die Zuckeraufnahme allein bedingte Änderung des RW zu erhalten (die Werte für den Zeitpunkt 0 Minuten wurden dem Kurvenverlauf entsprechend extrapoliert). So gelingt es, wenigstens *annäherungsweise* die Größe der ZA zwischen 0 und 4 Minuten zu berechnen (Tabelle 12 und Figur 2 *a*).

Zum bessern Verständnis dessen, *was* wir mit dieser Operation eigentlich gemessen haben, müssen wir eine weitere Überlegung anschließen: Bei den eben besprochenen Messungen stellte ich durchwegs fest, daß nach einer gewissen Zeit (10 bis 15 Minuten) gleich wie bei den Blindproben so auch bei den Proben mit Hefen sich ein konstanter Endwert im Refraktometer einstellte. Dies ist nur möglich, wenn der Hefestoffwechsel unterdrückt wird. Wir müssen folglich annehmen, daß in der sehr dünnen Flüssigkeitslamelle zwischen den beiden Prismen, mit einer nur geringen Oberfläche gegenüber der ebenfalls geringen in der Refraktometerhülse eingeschlossenen Luftmenge, bei einsetzender Atmung und Gärung sehr bald ein Manko an Sauerstoff,

Tabelle 12

Glucoseaufnahme im geschlossenen Refraktometer zwischen 0 und 4 min
(M aus 10 Versuchen)
ZT (20° C) — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — mSkt.

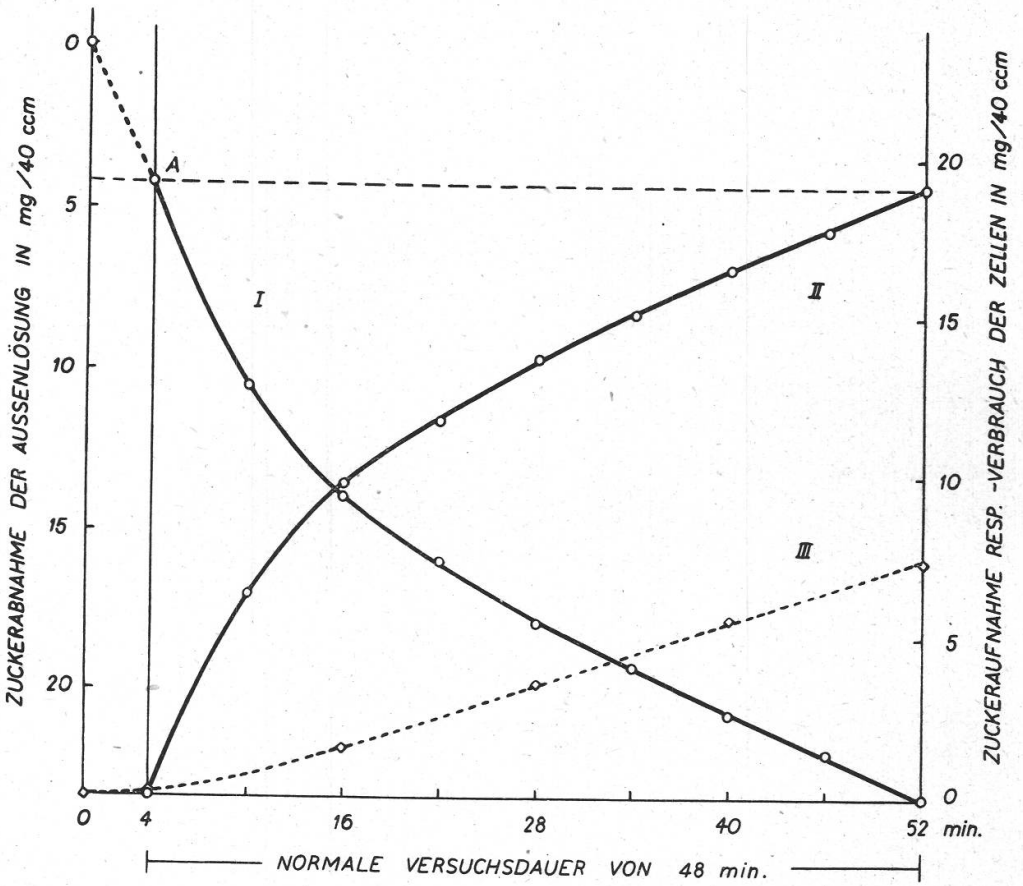
min	0	1	2	3	4	σ_m
mit Hefe	0	42	65	77	86	
ohne Hefe	0	25	41	45	47	
ZA in mSkt	0	17	24	32	39	± 7,3
mg/40 cm³	0	1,85	2,60	3,50	4,20	± 0,80
(g/cm²s) 10^{-9}					0,84	± 0,16
(Mol./Zelle · s) 10^6 ..					2,33	± 0,45

dafür aber ein rapid anwachsender (gesteigerte Gärung) Überdruck an CO_2 entsteht, der nach einiger Zeit die Zelle in ihrer Tätigkeit völlig lähmt. Da nun außerdem — wie aus spätern Versuchen (Atmung, Gärung) ersichtlich — die energieliefernden Prozesse der Zelle in den ersten paar Minuten erst im Anlaufen begriffen, also noch sehr klein sind, machen wir sicher keinen großen Fehler, wenn wir die adenoide Tätigkeit der Zelle hier unberücksichtigt lassen und die Anfangsaufnahme zwischen der 0. und 4. Minute im *geschlossenen* Refraktometer zur Hauptsache als reine *Adsorption an die Zelloberfläche* auffassen.

In Figur 2 *a* ist der Versuch gewagt, die Glucoseaufnahme der ersten paar Minuten, entsprechend der S-förmig gekrümmten Kurve, die wir aus Tabelle 12 erhalten, theoretisch zu deuten durch Zerlegung des Gesamtvorganges in seine Teilvorgänge: adenoide Tätigkeit und Adsorption, wobei wir die zwar vorhandene (siehe S. 605), in ihrem Ausmaß aber nur geringe Diffusion unberücksichtigt lassen. In dieser Figur kommt ferner die Ansicht sehr deutlich zum Ausdruck, daß die nach 4 Minuten gemessene «Anfangsaufnahme» (A) der Größe der reinen Adsorption (I *a*) etwa gleichgesetzt werden darf.

Wertheimer (1934) hat mit seinen Versuchen bewiesen, daß von einer bestimmten Zuckerkonzentration an (zirka 0,25 % Glucose) die Adsorption eine konstante, *temperaturunabhängige* Größe ist. Wenn die ganze Zelloberfläche mit Zuckermolekülen abgesättigt ist, so vermag weder eine Steigerung der Zuckerkonzentration noch eine Erhöhung der Temperatur diese Größe zu verändern, sofern nicht die Oberflächenstruktur selbst durch eine solche Einwirkung verändert wird. Nehmen wir nun an, daß nach 4 Minuten bereits der größte Teil der Zelloberfläche besetzt ist (nach 5 Minuten: ZA = 42 mSkt.; nach 10 Minuten: 51 mSkt.; nach 15 Minuten: 53 mSkt., davon zirka 40 mSkt. schon nach 4 Minuten aufgenommen [vgl. Tabelle 12]), so wird zum

mindesten bei der meist verwendeten Glucosekonzentration von 1 % [1] eine Erhöhung der Temperatur resp. der Konzentration (über 1 %) keine erhebliche Veränderung des hier bei Zimmertemperatur von 20° C ermittelten Wertes von rund 4,2 mg/40 cm³ bewirken. Wir können also



Figur 2

Glucoseaufnahme in kurzen Intervallen von 6 Minuten

25° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — 48 min

A = erste refraktometrische Ablesung der Konzentration nach 4 Minuten Anwärmen = Nullwert der üblichen Messungen (X_m-Werte)

I = die gemessene Konzentrationsabnahme der Außenlösung (Maßstab *links)*

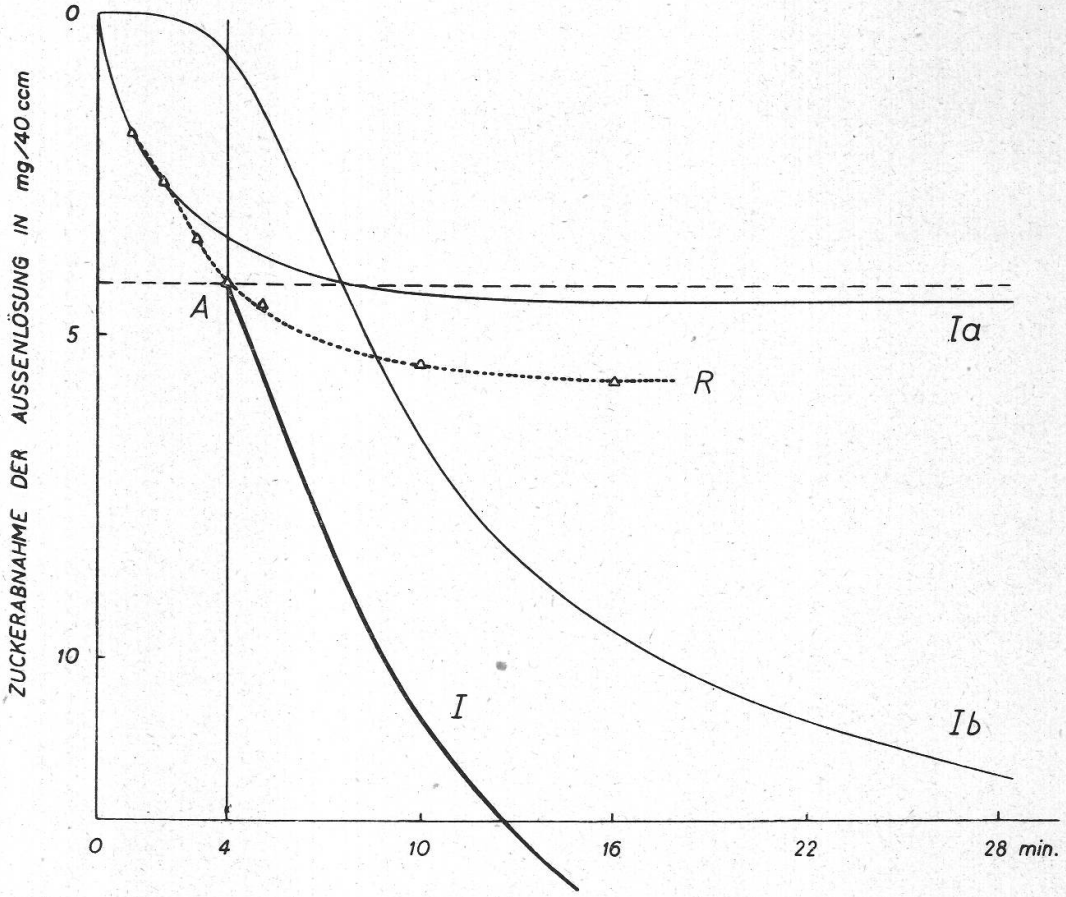
II = dieselben Werte wie *I*, aber aufgetragen als Zuckeraufnahme der Zellen (Maßstab *rechts*)

III = zum Vergleich: der entsprechende Zuckerverbrauch durch Atmung und Gärung (Maßstab *rechts*).

mit einer *gewissen Wahrscheinlichkeit* bei allen Versuchen, außer vielleicht bei den kleinsten Zuckerkonzentrationen, unverändert den Wert von *4,2 mg/40 cm³* hinzuzählen, um die Gesamtmenge des aus der Außenlösung verschwundenen Zuckers zu erhalten.

[1] Den Versuchen von Wertheimer (1934) kann entnommen werden, daß auch bei einer Glucosekonz. von zirka 0,06 % immer noch rund 80 % des Maximalwertes adsorbiert werden.

Die in der üblichen Weise gemessenen Werte der ZA, also *ohne* Berücksichtigung der als wahrscheinlich ermittelten «Anfangsaufnahme», sind in dieser Arbeit mit X_m bezeichnet.



Figur 2 *a*

Theoretische Figur zur Erklärung der Zuckeraufnahme (resp. -abnahme in der Außenlösung) in den ersten paar Versuchsminuten (linke, obere Bildhälfte der Fig. 2)

Ia = wahrscheinliche Kurve der reinen Adsorption (die offenbar auch vorhandene, in ihrem Ausmaß aber sehr geringe freie Diffusion ist in diesem Schema nicht berücksichtigt)

Ib = wahrscheinliche Kurve der adenoiden Zuckeraufnahme

I = Summe der beiden Kurven *Ia* und *Ib* = Typus einer Refraktometerkurve wie in Fig. 2, *I*

R = Kurve der tatsächlich gemessenen Werte im *geschlossenen* Refraktometer, wo adenoide Tätigkeit mit der Zeit unterdrückt wird

A = wie in Fig. 2.

Da im Verlaufe eines Versuches immer nur einige Prozente des zugesetzten Zuckers verschwinden, wird die Zelloberfläche *dauernd* mit Zuckermolekülen gesättigt sein, welche der Zelle noch nicht zu weiterer Verfügung stehen, solange sie nicht durch Diffusion oder adenoide Tätigkeit an die Reaktionsorte geschafft worden sind. Für

jedes aus seiner Oberflächenbindung entfernte Molekül wird aber sofort wieder ein neues Zuckermolekül adsorbiert werden. Es soll darum hervorgehoben werden, daß die X_m-Werte sicher eher der tatsächlich «eingedrungenen»[1] Zuckermenge entsprechen, während die Gesamtmenge (X_{tot}) auch noch die im Laufe eines Versuches von 48 Minuten immer gleichbleibende, vorderhand erst an der Zelloberfläche adsorbierte und deshalb noch nicht verwertbare Zuckermenge mit einschließt. Ich habe es deshalb vorgezogen, in allen weiteren Tabellen und Figuren nur die wirklich gemessenen X_m-Werte anzugeben, wobei es dem Leser überlassen bleibt, die wahrscheinliche Größe der adsorptiv festgehaltenen Glucose von ungefähr 4,2 mg/40 cm³ von Fall zu Fall selbst hinzuzuzählen, wo dies für die Interpretation der Ergebnisse als wünschenswert erscheint.

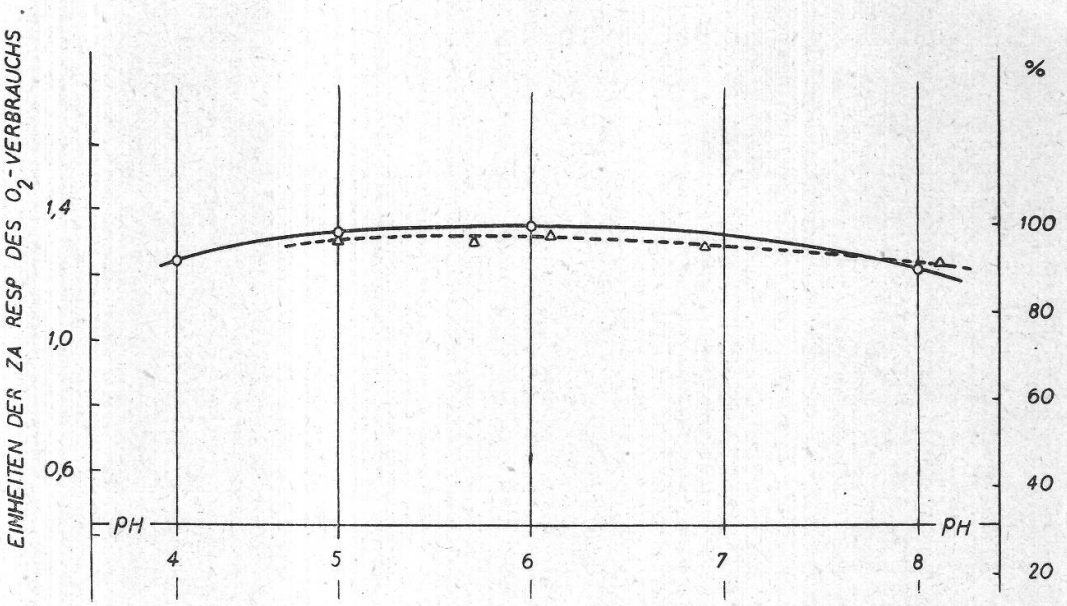
Betrachtet man nun eine solche Glucoseaufnahmekurve (Figur 2), so fällt auf, daß bereits nach den ersten 12 Minuten mindestens ebensoviel Zucker aus der Lösung verschwunden ist, wie im Laufe des ganzen übrigen Versuches noch aufgenommen wird, eine Erscheinung, die wir in allen späteren Versuchen immer wieder bestätigt finden.

Wenn wir das Verhältnis von Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch untersuchen wollen, so interessiert uns an und für sich nur der «eingedrungene» Zucker und nicht der an der äußern Oberfläche adsorbierte. In den graphischen Darstellungen und Tabellen wurde, wie erwähnt, die wahrscheinliche Größe der reinen Adsorption *nicht* berücksichtigt, so daß also der Nullpunkt der Messungen und Koordinaten von ZA und ZV in Wirklichkeit einem Zustand, wie er etwa zur 4. Minute herrschen mag, entspricht.

2. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Zuckeraufnahme

Zur Prüfung der *pH-Abhängigkeit* mußte unsere «normale» Arbeitsweise insofern etwas abgeändert werden, als ein Pufferzusatz nötig war. Es wurden deshalb schon vor Versuchsbeginn sowohl Hefen (mindestens 30 Minuten vorher) als Zucker in der Art mit Phosphatpuffer versetzt, daß sich nach Zusammengießen der aliquoten Teile ein Gemisch von 4 ‰ Hefen in 1 % Zucker und *m*/30 Puffer ergab. Das Ergebnis ist zusammengestellt in der Tabelle 13. Zur Kontrolle, ob die Verschiebung der Skalenteile auch tatsächlich nur von der Abnahme der Zuckerkonzentration herrührt, wurden nebenbei einige Proben von Hefe und Puffer allein geprüft. Es konnte jedoch keine eindeutige Ver-

[1] Der Begriff « eingedrungen » ist mit einer gewissen Vorsicht aufzufassen: Zucker, der in Form von Glykogen in der Zelle wieder sichtbar wird, ist sicher eingedrungen. Es soll aber nicht zum vornherein die Möglichkeit ausgeschlossen sein, daß der Zuckerverbrauch durch Atmung und Gärung schon in den äußersten Schichten der Oberflächenstruktur stattfinden kann, obwohl meine eigenen Versuche keinen Grund zu einer solchen Annahme liefern.



Figur 3
*p*H-Abhängigkeit von Zuckeraufnahme und Atmung
30° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — 36 *min*
○——○ Zuckeraufnahme (ZA)
△– – –△ Atmung nach Geiger-Huber (1930)

schiebung des RW während der Versuchsdauer festgestellt werden (die Hefe befand sich ja schon vor Versuchsbeginn längere Zeit in der Pufferlösung, so daß ein weitgehender Ausgleich zwischen Innen- und Außenmilieu der Zelle bereits vollzogen sein mag).

Tabelle 13
*p*H-Abhängigkeit der Zuckeraufnahme
30° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — 36 min

*p*H	Intervall à 12 min (mSkt.)				mg/40 cm³	
	I	II	III	Total	X_m	σ_m
8	82,5	56,0	47,2	186	20,10	± 1,05
6	97,5	60,5	49,6	208	22,50	± 1,24
~ 5 [1]	98,0	55,4	51,1	205	22,15	± 1,13
4	85,4	62,9	43,4	192	20,75	± 2,10

Die *p*H-Abhängigkeit der Atmung ist von Geiger-Huber (1930) geprüft worden. Er kam zur Feststellung, daß diese innerhalb *p*H 5—8 praktisch unabhängig ist vom *p*H. Entnehmen wir seiner Tabelle (Seite 3) die Werte für 2, 6 und 7 Tage alte Suspensionen, die innerhalb der methodischen Streuung alle noch mehr oder weniger gleichwertig und vom Alter der Suspension unbeeinflußt sind und bil-

[1] Die Werte bei *p*H ~ 5 stammen von den normalen, ungepufferten Versuchen.

den aus den Prozentzahlen der drei Suspensionen (höchster Wert einer *p*H-Reihe = 100 %) die Mittelwerte, so erhalten wir folgendes Bild:

bei *p*H	5,0	5,7	6,1	6,9	8,1
Atmung	97 %	97 %	98 %	95 %	91 %

Wenn wir mit unsern Werten der Zuckeraufnahme in gleicher Weise verfahren, so kommen wir praktisch zu demselben Ergebnis (Figur 3).

Wir können folglich aussagen:

1. daß Zuckeraufnahme und Atmung in einem weiten Bereich fast unabhängig sind von Änderungen in der Konzentration der H-Ionen;
2. daß selbst wenn wir die schwache Abhängigkeit berücksichtigen, alle Versuche der vorliegenden Arbeit (*p*H ~ 5) im Gebiete des Optimums liegen.

3. Einfluß der Glucosekonzentration auf Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch

Aus früheren Publikationen (Geiger-Huber, 1934) wissen wir, daß die Atmung von Hefen im Gebiete zwischen 0 bis $^1/_{600}$ mol Glucose genau proportional der Konzentration des Atmungssubstrates ansteigt, daß die Kurve dann umzubiegen beginnt und zwischen $^1/_{100}$ bis $^1/_{10}$ mol in ein flaches, von der Konzentration praktisch unabhängiges Optimum übergeht, während höhere Konzentrationen eher wieder hemmend auf den erwähnten Prozeß wirken. Wie unter denselben Bedingungen die Verhältnisse für die Zuckeraufnahme und den aus Atmung und Gärung berechneten Zuckerverbrauch liegen, geben die folgenden Tabellen und Kurven wieder.

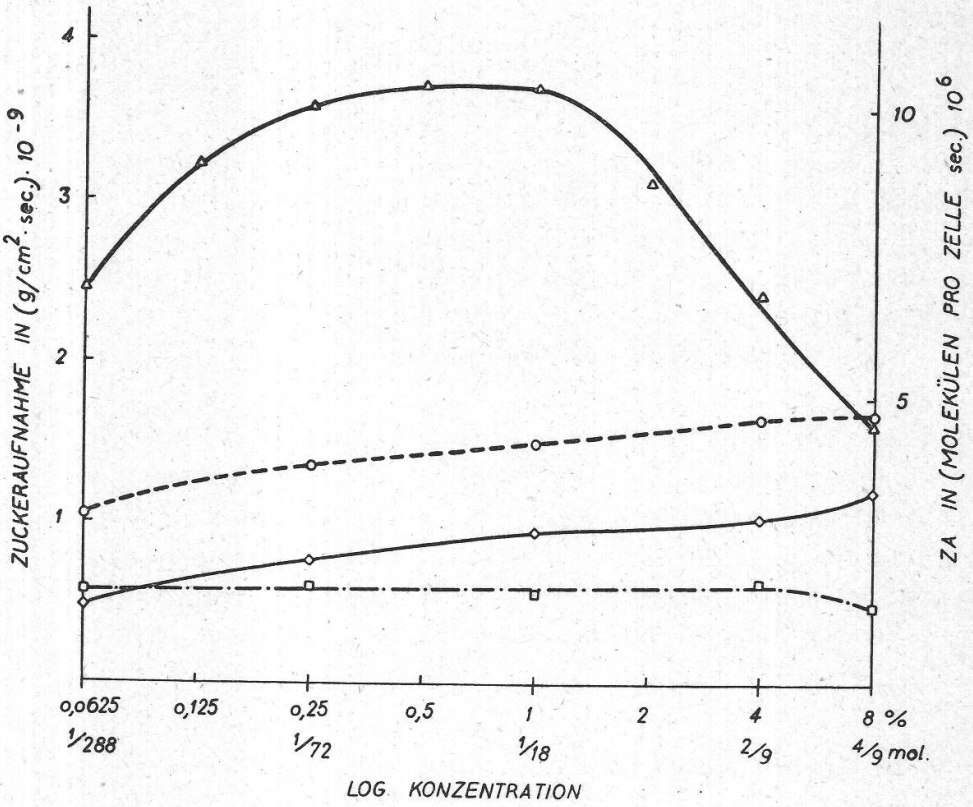
Die Messungen wurden ausgeführt mit 4 ‰ Hefe bei 25° C an einer Konzentrationsreihe von 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 und 8 % Glucose (Tabelle 14).

Tabelle 14

Glucoseaufnahme in Abhängigkeit von der Konzentration (25° C)

Konz. %	Intervall à 12 min (mSkt.) I	II	III	IV	Total	mg/40 cm³ X_m	σ_m
0,0625	56,0	24,8	16,8	15,7	113	12,20	± 1,09
0,125	66,8	33,3	28,3	18,7	149	16,10	± 0,31
0,25	71,4	39,5	27,8	26,2	165	17,82	± 1,14
0,5	71,0	39,5	37,2	24,2	172	18,55	± 1,50
1	80,5	38,2	27,7	24,9	171	18,45	± 0,73
2	58,4	32,6	27,1	25,9	144	15,57	± 1,45
4	46,1	28,7	16,7	21,1	113	12,10	± 1,24
8	27,1	18,8	15,1	14,8	76	8,05	± 1,35

Wir konstatieren, daß die ZA bis gegen 0,25 % Glucose (= $^1/_{72}$-molar) zunimmt, etwa entsprechend den Atmungswerten von Geiger-Huber (1934), daß sie zwischen 0,25 und 1 % praktisch gleich bleibt (Unterschiede *nicht* signifikant!) und durch höhere Konzentrationen *stark* gehemmt wird (siehe auch Kurve Figur 4).



Figur 4
Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch in Abhängigkeit von der Konzentration (logarithmisch)
25° C — 4 ‰ Hefe — 0,0625—8 % Glucose — 48 min
△——△ Zuckeraufnahme (ZA) □—·—□ Atmung
○— — —○ Zuckerverbrauch (ZV) (Atmung + Gärung) ◇——◇ Gärung

Zum Vergleich wurde für einige Punkte dieser Konzentrationsreihe der entsprechende Zuckerverbrauch manometrisch gemessen (Tabelle 15).

Die Atmung bleibt über einen weiten Konzentrationsbereich (0,0625 bis 4 %, entsprechend zirka $^1/_{288}$- bis $^2/_9$molar) mehr oder weniger konstant, erst bei 8 % (= 0,444molar) tritt ein deutlicher Abfall ein. Die Gärung hingegen nimmt mit steigender Konzentration fortlaufend zu (siehe auch Versuche von Nord in Brooks, 1947), so daß sich auch für das Total des Zuckerverbrauchs ein sukzessiver schwacher Anstieg der Werte ergibt.

Tabelle 15

Glucoseverbrauch in Abhängigkeit von der Konzentration (25° C)

Konz. %	Atmung		Gärung		Total ZV mg/40 cm³	cal $\triangle A_0$[1]
	mm³ O_2	mg/40 cm³	Gär-CO_2	mg/40 cm³		
0,0625	161	2,88	45	2,40	5,28	11,7
0,25	167	2,98	71	3,78	6,76	12,5
1	156	2,79	88	4,69	7,48	12,0
4	176	3,14	96	5,12	8,26	13,5
8	134	2,39	113	6,00	8,39	11,0

Betrachten wir das Verhältnis von Aufnahme und Verbrauch, wie es in Tabelle 16 dargestellt ist, so sehen wir, daß das Maximum der Aufnahme, bezogen auf den gleichzeitigen Verbrauch (*Q*-Werte), zwischen 0,25 und 1 % Glucose erreicht ist und daß mit steigender Konzentration die Werte zusehends kleiner werden, bis sie bei 8 % ZA und ZV praktisch gleich groß sind. Es konnte denn auch tatsächlich bei dieser Konzentration nur noch eine minimale Glykogenbildung, und erst nach längerer Zeit (30 bis 50 Minuten), nachgewiesen werden. Zudem schienen die meisten Zellen plasmolysiert, was sich zwar bei Hefen nicht leicht nachweisen läßt, da sich der Protoplast nur schwer von der Zellwand löst und deshalb oft Einbuchtungen der ganzen Zelle zu beobachten sind (siehe auch Althaus, 1950).

Tabelle 16

Verhältnis von Aufnahme und Verbrauch bei zunehmender Glucosekonzentration (25° C)

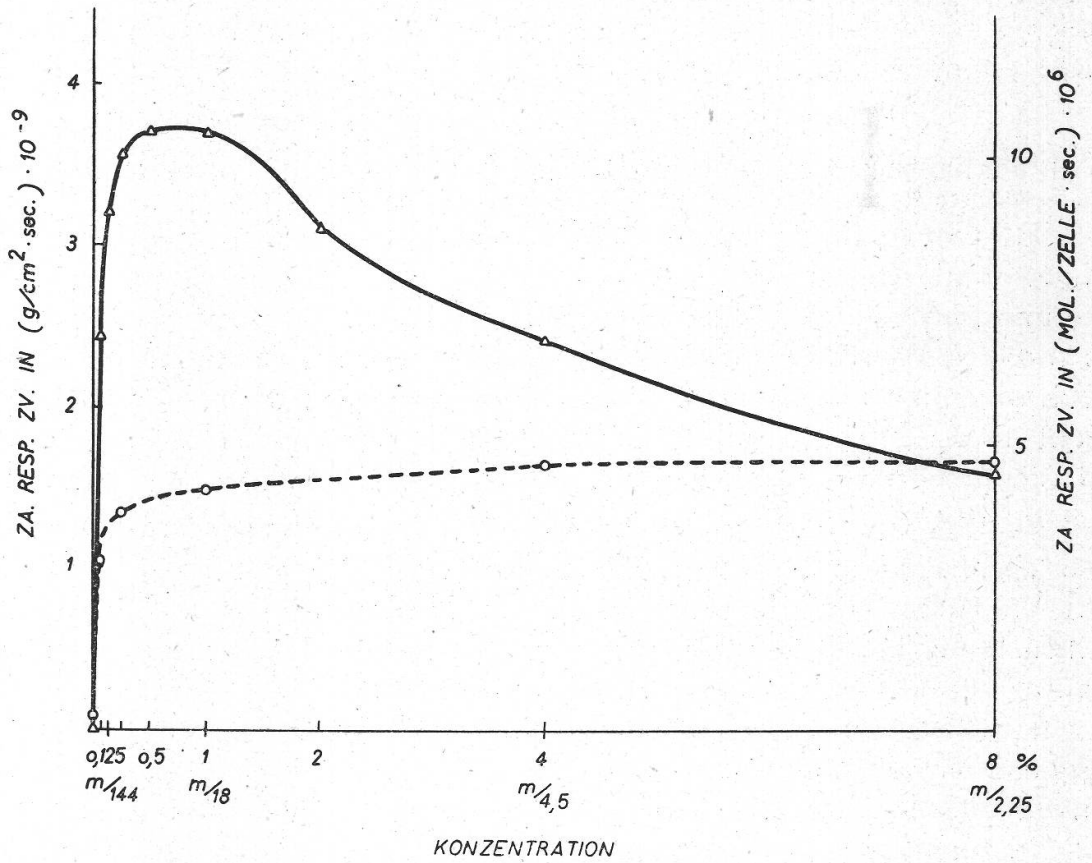
Konzentration %	ZA : ZV (mg/40 cm³)	*Q*
0,0625	12,20 : 5,28	2,31
0,25	17,82 : 6,76	2,64
1	18,45 : 7,48	2,47
4	12,10 : 8,26	1,46
8	8,05 : 8,39	0,96 ≈ 1

In Figur 4 sind die beiden Kurven ZA und ZV einander gegenübergestellt. Wir machen dabei die interessante Feststellung, daß sie in keiner Weise gleichsinnig verlaufen. Wenn wir uns an die biologisch sehr bedeutsame Feststellung von Musfeld (1942) erinnern, daß die Zuckeraufnahme sehr stark, die energieliefernden Prozesse Atmung und Gärung jedoch *nicht* von der *Suspensionsdichte,* d. h. dem Reaktionsvolumen abhängen, so wird es uns klar, daß wir hier genau die-

[1] Berechnung der aus beiden Reaktionen maximal gewinnbaren Energie $\triangle A_0$: siehe Seite 589!

selbe und nicht minder bedeutsame Feststellung in bezug auf die *Zuckerkonzentration* machen.

Der Abfall der Atmung bei 8 % Glucose scheint dadurch bedingt, daß in der schon relativ stark viscösen Zuckerlösung der Sauerstoffnachschub nicht mehr so leicht vonstatten geht. Gehemmte Atmung hat sofort gesteigerte Gärung zur Folge, was auch deutlich an der Gärungs-



Figur 5
Zuckeraufnahme u. Zuckerverbrauch in Abhängigkeit von der Konzentration (natürl. Maßstab)

25° C — 4 ‰ Hefe — 0—8 % Glucose — 48 min
△———△ Zuckeraufnahme (ZA) Mol./Zelle = Moleküle pro Zelle
○— — —○ Zuckerverbrauch (ZV)

kurve erkenntlich ist. Es handelt sich also offenbar um einen sekundären Effekt, nicht um eine direkte Konzentrationsabhängigkeit [1].

Wir sehen auch in Tabelle 14 die früher aufgestellte Behauptung bestätigt, daß im ersten Intervall immer weitaus am meisten Zucker aufgenommen wird, während vor allem die letzten beiden Intervalle

[1] Die Feststellung, daß bei 8 % Glucose mehr Zucker verbraucht als in derselben Zeit aufgenommen wird, ist nur eine scheinbare; die Differenz der beiden Werte liegt noch innerhalb der methodischen Abweichung. Außerdem sei in diesem Zusammenhang auf Abschnitt 1 der «Experimentellen Ergebnisse» verwiesen (S. 568).

keine großen Unterschiede mehr aufweisen. Figur 5 gibt die Kurve der Glucoseaufnahme im natürlichen Maßstab wieder.

Für die Beurteilung der weitern Untersuchungen ist noch die Feststellung wichtig, daß alle Versuche unter normalen Bedingungen (4 ‰ Hefe in 1 % Glucose) im Gebiet des Konzentrations*optimums* liegen und daß *3/4 des Zuckers* verbraucht werden könnten, bevor sich der Zuckerverlust auf die Größe der Aufnahme auswirken würde. In den meisten Fällen wird aber bis zum Versuchsabbruch nach 48 Minuten nicht einmal 1/4 davon verbraucht.

4. Einfluß der Temperatur auf Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch

Es wurde unter den üblichen Bedingungen (4 ‰ Hefe in 1 % Glucose) die Größe der Zuckeraufnahme bei folgenden Temperaturen bestimmt: 12,8°, 20,4°, 25,6°, 30,7°, 35,6°, 40,5°, 45,5° und 50,3°. Auf Grund der Ergebnisse wurden dann als kritische Temperaturen auch noch diejenige von 38° C (Gebiet des Optimums) und von 43° C (Gebiet nicht mehr nachweisbarer Glykogenbildung) (Althaus, 1950) in die Versuche einbezogen.

Zu den Untersuchungen bei höheren Temperaturen ist zu bemerken, daß bei 45° in geringem, bei 50° in etwas stärkerem Grad im Laufe des Versuches abgestorbene Zellen vorgefunden wurden. Auf Grund mikroskopischer Beobachtungen wurden deshalb die Prozente der im Laufe jedes Intervalls abgestorbenen Zellen geschätzt und die gemessenen Werte mit einem entsprechenden Faktor multipliziert, um als vergleichbaren Bezugswert immer die Ausgangsdichte von genau 4 ‰ lebender Hefezellen zu haben und nicht eine unvergleichbare, im Laufe des Versuches stetig abnehmende Zellenzahl. In allen mitgeteilten Ergebnissen sind diese Korrekturen berücksichtigt.

Die Messungen bei 50° C sind insofern etwas problematisch, als wir gelegentlich Kurven der abnehmenden Außenkonzentration erhalten, die in ihrem letzten Teil wieder zunehmen. Dies kann nur so gedeutet werden, daß die hitzegeschädigten und dadurch in ihren Permeabilitätseigenschaften beeinflußten Zellen (siehe Belehradek, 1935) ihren Zucker langsam wieder verlieren. Es ist in einem solchen Falle schwer zu beurteilen, ob die Schwankungen der Messungen dann durch solche sekundäre Effekte bedingt sind oder lediglich durch methodische Abweichungen. In Fällen, wo die Zunahme der RW die methodische Abweichung überstieg, wurde überhaupt kein Wert in Rechnung gesetzt, da es keinen Sinn hat, den Zuckerverlust toter Zellen in die Zuckeraufnahme der lebenden Zellen einzubeziehen. Durch diese Erscheinungen werden natürlich vor allem die Werte der *zweiten* Versuchshälfte bei 45° und 50° C relativ unsicher.

Tabelle 17

Glucoseaufnahme in Abhängigkeit von der Temperatur [1]

4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — pH ~ 5

Temperatur °C	Intervall à 12 min (mg/40 cm³) I	II	III	IV	Total X_m	σ_m
0	1,59	1,81	1,08	1,02	5,49	± 1,10
12,8	5,36	2,10	1,63	1,08	10,00	± 0,99
20,4	7,37	2,46	1,91	1,49	13,30	± 1,04
25,6	8,75	4,11	3,02	2,70	18,50	± 0,73
30,7	10,58	5,94	5,51	4,64	26,70	± 1,50
35,6	11,12	6,91	5,83	4,75	28,70	± 1,92
38,0	11,44	7,34	5,18	4,75	28,70	± 0,78
40,5	11,00	6,48	5,69	5,53	28,70	± 1,50
43,0	10,50	4,82	3,78	2,80	21,90	± 2,54
45,5	9,92	4,05	0,88	0,75	15,60	± 2,07
50,3	4,64	1,62	0,64	0,70	7,60	± 0,83

Tragen wir die Werte der einzelnen Intervalle auf, so erkennen wir auch hier deutlich, daß alle Maxima zwischen den Temperaturen von 35° und 40° C liegen, wenn auch nicht alle im gleichen Punkt (was durch die Streuung der Methode bedingt sein dürfte, siehe σ_m). Die wichtigste Feststellung ist aber diese: Das Vorhandensein eines so ausgesprochenen Temperaturoptimums für die Glucoseaufnahme durch Hefezellen deutet auf eine enge Verknüpfung dieses Vorganges mit enzymatischen Prozessen hin (Atmung, Gärung) und macht eine rein physikalische Permeabilität als Hauptursache unwahrscheinlich.

Die manometrisch bestimmten Werte für die Temperaturabhängigkeit von *Atmung* und *Gärung* finden sich in Tabelle 18. Sie sind nach der im methodischen Teil angegebenen Art im mg/40 cm³ umgerechnet. Die während der Versuchsdauer absterbenden Zellen wurden in gleicher Weise berücksichtigt wie bei der Zuckeraufnahme. Ein σ wurde nicht berechnet, da pro Temperatur nicht mehr als zwei Versuche gemacht wurden. Die Werte bei 12,5° C (*) wurden erst nachträglich dem Verlauf der Kurve entnommen.

Wenn wir die Atmungs- und Gärungswerte der Intervalle (Tabelle 18) im einzelnen betrachten, so machen wir eine interessante Beobachtung: Beide Reaktionen benötigen eine gewisse Anlaufzeit, bis sie in vollen Schwung kommen (siehe auch Geiger-Huber, 1934), diejenige der Gärung ist jedoch kürzer als die der Atmung. Das hat zur Folge, daß die Gärungswerte am Anfang (II. Intervall) größer werden, als dem Gleichgewicht entspricht und erst durch die allmählicher anwachsende Atmung in den Gleichgewichtszustand (IV. Intervall) zurückgedrängt werden. Es ist dies ein schönes Beispiel für das Funktionieren

[1] Siehe Bemerkungen des Abschnittes 1 der «Experimentellen Ergebnisse» (S. 568).

des *Pasteur-Effektes,* dessen Vorhandensein lange Zeit (Brown, 1914) heftig bestritten wurde.

Tabelle 18

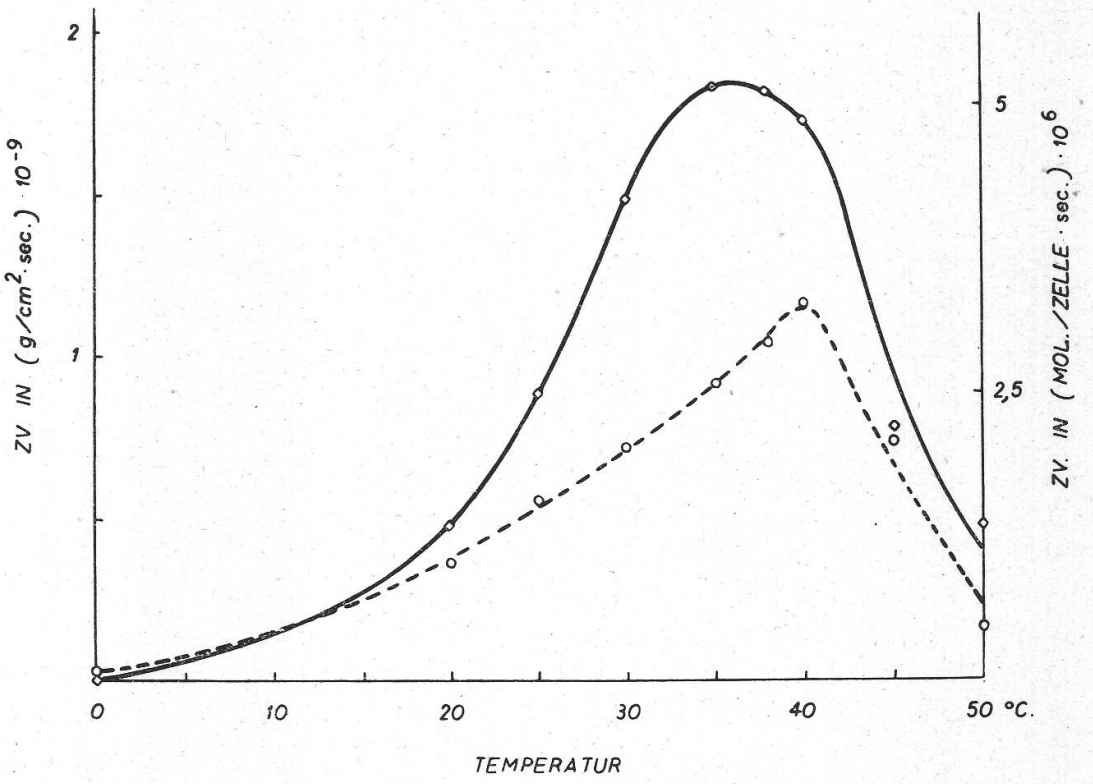
Glucoseverbrauch in Abhängigkeit von der Temperatur
4 ‰ Hefe — 1% Glucose — $pH \sim 5$ — mg/40 cm³

Temperatur °C	Intervall à 12 min I	II	III	IV	Total X_m
		A. Verbrauch durch Atmung			
0	0	0,03	0,04	0,05	0,12
20,4	0,24	0,48	0,53	0,55	1,81
25,6	0,37	0,73	0,80	0,85	2,76
30,7	0,53	0,93	1,07	1,09	3,58
35,6	0,65	1,19	1,39	1,34	4,56
38,0	0,80	1,26	1,52	1,61	5,18
40,5	0,82	1,59	1,69	1,68	5,80
45,5	0,35	1,11	1,14	1,13	3,73
50,3	0,13	0,22	0,16	0,30	0,82
		B. Verbrauch durch Gärung			
0	0	0	0	0	0
20,4	0,71	0,79	0,56	0,37	2,36
25,6	1,15	1,38	1,08	0,79	4,40
30,7	1,48	2,30	1,82	1,66	7,40
35,6	1,74	2,88	2,50	2,04	9,12
38,0	1,71	2,76	2,38	2,16	9,08
40,5	1,97	2,58	2,14	1,96	8,60
45,5	0,66	0,64	0,90	1,70	3,90
50,3	0,32	0,41	0,68	0,99	2,40
		C. Totalverbrauch			
0	0	0,03	0,04	0,05	0,12
12,5*	0,40	0,59	0,51	0,40	1,90
20,4	0,96	1,26	1,09	0,92	4,17
25,6	1,52	2,11	1,88	1,64	7,16
30,7	2,01	3,23	2,89	2,74	11,00
35,6	2,40	4,07	3,88	3,38	13,70
38,0	2,61	4,02	3,90	3,77	14,26
40,5	2,79	4,18	3,83	3,64	14,40
45,5	1,01	1,75	2,04	2,83	7,63
50,3	0,46	0,63	0,84	1,29	3,22

Der Kurvenverlauf von Atmung und Gärung ist in Figur 6 eingezeichnet. Wir stellen an Hand unserer Resultate fest, daß die Gärung ein viel flacheres und etwas tiefer liegendes Optimum besitzt als die Atmung. Überhaupt scheint die Atmung die unempfindlichere Reaktion zu sein, in dem Sinne nämlich, als sie sowohl ein höheres Optimum besitzt als auch bei 0° C noch funktioniert, also über einen weitern

Temperaturbereich abläuft. Daß bei 0° C noch ein Stoffwechsel stattfindet, ist nicht weiter erstaunlich. Es gibt nach Belehradek (1935) Pflanzen, wie zum Beispiel *Lupinus* oder *Triticum,* die sogar bei —2° C — andere noch tiefer — eine feststellbare CO_2-Produktion zeigen (siehe auch Glykogenbildung bei Althaus, 1950).

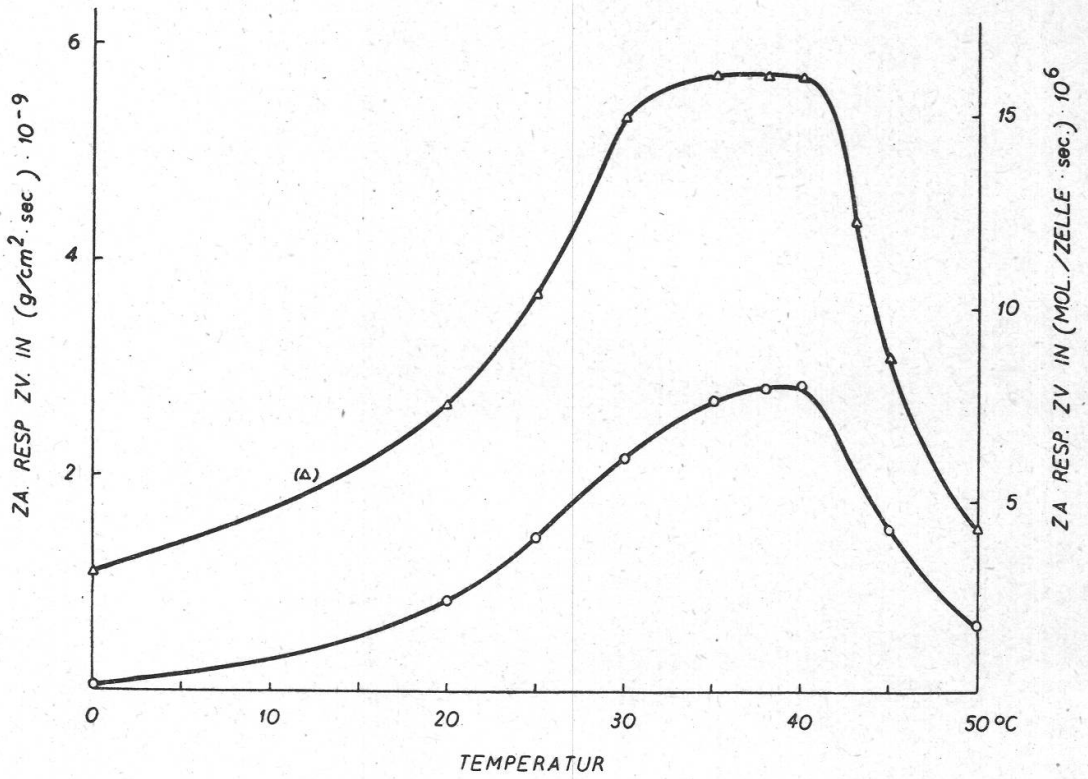
Auch wenn wir die Werte des Total-Zuckerverbrauchs der einzelnen Intervalle, absolut oder in Prozent des höchsten Wertes ausgedrückt, auftragen, so erhalten wir wiederum sehr ausgeprägte Opti-



Figur 6
Zuckerverbrauch von Atmung u. Gärung in Abhängigkeit von der Temperatur
0—50° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — 48 min
○— — —○ Atmung ◇———◇ Gärung

mumskurven, die in ihrer Temperaturabhängigkeit denjenigen der Zuckeraufnahme praktisch vollkommen entsprechen. Noch deutlicher geht dies aus Figur 7 hervor, wo die Kurven des Zuckerverbrauchs und der Zuckeraufnahme einander gegenübergestellt sind. Eine solche Übereinstimmung legt den Schluß nahe, daß *die Größe der Zuckeraufnahme in direkter Abhängigkeit von der Größe des Energiegewinnes* aus Atmung und Gärung steht, daß also die Zuckeraufnahme eine Folge der Arbeitsleistung, also *adenoider Tätigkeit* des Plasmas ist. Vergleichen wir nun die Kurve der Glykogenbildung von Althaus (1950) (S. 121 und Tabelle 8, S. 123) mit denjenigen der Figur 7, so muß uns folgendes

auffallen: Die Kurve der Glykogenbildung zeigt ihr Optimum bei 34° C, während sie bei 40°, wo ZA und ZV noch im Optimum sind, bereits wieder im Abstieg begriffen ist und schon bei 43° die Nullinie erreicht hat, wo ZA und ZV immerhin noch beträchtliche Größen aufweisen. Wohl ist sie, was Energie und Zuckernachschub anbelangt, von ZA und ZV mitabhängig (Aufnahmeüberschuß Tabelle 19), doch kann sie auf Grund ihrer anders gearteten Temperaturabhängigkeit *nicht* als *direkte* Folge des einen oder andern Vorganges angesehen werden.



Figur 7
Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch in Abhängigkeit von der Temperatur
0—50° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — 48 min
△———△ Zuckeraufnahme (ZA) ○———○ Zuckerverbrauch (ZV)

Zwar deckt sich das *Maximum des Aufnahmeüberschusses* (Tabelle 19) (zwischen 30 und 35°) auffallend gut mit dem *Optimum der Glykogenbildung* und ist insofern sicher auch *mitbestimmend;* der zweite, abfallende Kurventeil zeigt diese Übereinstimmung aber nicht mehr und muß deshalb durch die zunehmende Inaktivierung des glykogenbildenden Enzyms bedingt sein (Althaus, 1950). Am selben Beispiel können wir aber auch erkennen, daß umgekehrt die *Glykogenbildung nicht als treibende Kraft der ZA* betrachtet werden kann; es wäre sonst ganz unerklärlich, wieso bei 43°, wo nach Althaus sicher kein Glykogen mehr gebildet wird, ein so großer Zuckerüberschuß (siehe Figur 7) von der Hefezelle aufgenommen wird.

Tabelle 19

Vergleich der Aufnahme- und Verbrauchswerte (mg/40 cm³)[1]

Temperatur °C	Aufnahme	Verbrauch	Aufnahme-überschuß	ZA/ZV	Glykogen
0	5,49	0,12	5,37	(~ 46,0)	(+)[2]
12,5	9,20	1,90	7,30	4,84	+
20,4	13,50	4,17	9,33	3,24	+
25,6	18,50	7,16	11,34	2,58	+
30,7	26,70	11,00	15,70	2,37	+
35,6	28,70	13,70	15,00	2,09	+
38,0	28,70	14,26	14,44	2,01	+
40,5	28,70	14,40	14,30	1,99	±
45,5	15,60	7,63	7,97	2,05	—
50,3	7,60	3,22	4,38	2,37	—

Orientierende Proben mit Sudan III (Brauner, 1929) haben übrigens unsere Vermutung bestätigt, daß bei Temperaturen, die eine Glykogenbildung verunmöglichen, überschüssiger Zucker in Form von Fett oder Öl gespeichert wird (wenigstens in Spuren nachweisbar nach zirka 30 Minuten). Wir wissen auch von andern Autoren (Lundegardh, 1914; MacLean und Hoffert, 1923; Höfler, 1940; Halden, 1935, zitiert in Bernhauer, 1939), daß Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel eng miteinander verbunden sind. Als wesentlichste Bedingung für die Bildung von Fett nennen die erwähnten Autoren den Entzug von Wasser. Nun wissen wir aus Kurven von Belehradek (1935), daß über dem Temperaturoptimum eine starke Zunahme der Viskosität des Protoplasmas erfolgt, was gleichviel bedeuten will wie Wasserentzug. Es scheint deshalb nicht erstaunlich, daß wir auch hier bei überoptimalen Temperaturen Fettbildung vorfinden.

Wir haben vorhin festgestellt, daß die Glykogenbildung nicht die Hauptursache der Zuckeraufnahme sei (sondern eher eine Folge davon). Das will aber nicht heißen, daß die Glykogenbildung unter Umständen nicht auch bestimmend auf die ZA wirken könnte, nämlich dann, wenn die Hefezellen schon reichlich Glykogen enthalten und nicht mehr unbeschränkt solches aufnehmen können. Es wurden etliche Versuche angestellt mit glykogenhaltigen Zellen und diese mit parallel untersuchten glykogenfreien verglichen.

Dabei wurde folgender Arbeitsgang beschritten: 20 cm³ einer achtpromilligen Suspension wurden mit 0,2 g Glucose (= 1 %) versetzt und während zirka 3/4 Std. geschüttelt. Die nun stark *glykogenhaltigen* Zellen wurden sofort abzentrifugiert, mit Aqua dest. nachgewaschen und nach dem zweiten Zentrifugieren sofort wieder in 20 cm³ Aqua dest. suspendiert. Die weitere Behandlung (Vorwärmen, Zugabe eines aliquoten Teiles Zuckerlösung) ist von den bisherigen Versuchen her bekannt. Stichproben unmittelbar vor Versuchsbeginn zeigten, daß die Zellen immer noch reichlich glykogenhaltig waren.

Die Ergebnisse sind zusammengestellt in Tabelle 20. Wie zu erwarten war, ist die Aufnahme vor allem im ersten Intervall beträchtlich

[1] Zur Umrechnung der mg/40 cm³ in $g/cm^2 \cdot s$ oder *Mol./Zelle · s* siehe S. 568!

[2] Nach 48 Minuten: kein Glykogen; nach 100 Minuten: Andeutungen (siehe auch Althaus!).

geringer (30 bis 35 %), weil auch der Zuckerbedarf zu Speicherzwecken geringer ist als in der glykogenfreien Zelle. Es handelt sich aber hier eindeutig um eine Frage der Speicherungskapazität für Glykogen und nicht um innere, energetische Zusammenhänge der beiden Vorgänge. Unsere Aussage wird also dadurch in keiner Weise berührt.

Tabelle 20

Vergleich der Glucoseaufnahme glykogenfreier und glykogenhaltiger Hefezellen

25 °C	Intervall à 12 min (mSkt.) I	II	III	IV	Total	σ_m
glykogenfrei	85	38	27	28	178	± 8,4
glykogenhaltig	58	40	23	20	141	± 8,5

Als wichtige Ergebnisse der Untersuchung des Temperatureinflusses (Tabelle 18) wollen wir schließlich noch festhalten:

1. Die *Zuckeraufnahme* ist bei jeder Temperatur größer, und zwar *zwei- bis fünfmal größer* als der entsprechende Zuckerverbrauch.
2. Die relative Menge des *gespeicherten Zuckers*[1] *nimmt mit steigender Temperatur fortlaufend ab* (Tabelle 19), bis bei 45° C der Punkt erreicht ist, wo der Zuckerverbrauch so klein wird, daß die entsprechende Zuckeraufnahme wieder stärker ins Gewicht fällt. Wir können das so verstehen, daß bei diesen hohen Temperaturen, bei denen die Aufnahme relativ gering, aber auch die Viscosität des Zuckers sehr gering ist, der Anteil des durch reine Diffusion eindringenden Zuckers zusehends überwiegt.
3. Die Q_{10}-Werte von Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch (in Tabelle 21 wiedergegeben) zeigen einen ganz verschiedenen Ver-

Tabelle 21

Q_{10} von Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch

Die Werte der nichtgemessenen Temperaturen sind dem Verlauf der Kurven in Figur 7 entnommen

t °C	ZA	ZV
0–10	1,44	11,70
5–15	1,55	3,57
10–20	1,75	2,98
15–25	1,83	2,86
20–30	1,94	2,64
25–35	1,55	1,91
30–40	1,08	1,31
35–45	0,54	0,56
40–50	0,26	0,22

[1] Bezogen auf den entspr. ZV.

lauf. Während beim ZV die Werte der tiefen Temperaturen enorm hoch sind und nach der wärmern Seite hin ständig abnehmen, zeigen diejenigen der ZA ein Maximum zwischen 20 und 30° C.

5. Einfluß von Benetzungsmittel, Salzen und Licht auf die Zuckeraufnahme

Versuche mit *Tween 80,* zugesetzt in Verdünnungen von 0,1 und 0,05 % zirka 1/4 Stunde vor Versuchsbeginn, ergaben eine unbedeutende Förderung gegenüber den Blindwerten von nur 9 % (18,55 : 20,10 mg/40 cm³), was wir kaum als signifikant ansehen können, da die methodische Abweichung etwa von derselben Größenordnung ist.

Im methodischen Teil wurde erklärt, warum für unsere refraktometrischen Messungen reines Aqua dest. als Suspensionsmittel gewählt wurde, mit dem Hinweis allerdings, daß die Hefen mit Absicht nur schwach ausgewaschen wurden, um sie nicht aller Nährionen durch Auslaugen zu entblößen. Immerhin ist es interessant, festzustellen, ob ein Zusatz von Nährsalzen imstande ist, die Zuckeraufnahme wesentlich zu fördern. Die Versuche wurden ausgeführt mit 0,46-‰-*Pfeffer-Robbins Nährlösung* (Zugabe zirka 1/4 Stunde vor Versuchsbeginn). Sowohl Atmung und Gärung und damit der gesamte ZV als auch die ZA wurden je um zirka 8 % gegenüber den Blindversuchen gefördert (Tabelle 22). Auch dies würde darauf hindeuten, daß energieliefernde

Tabelle 22

Einfluß von Pfeffer-Robbins Nährlösung auf Glucoseaufnahme und -verbrauch
30° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — (mg/40 cm³)

	Intervall à 12 min				Total	
	I	II	III	IV	X_m	σ_m
ZA ohne	10,60	5,98	5,52	4,62	26,65	± 1,50
mit	11,1	7,07	5,47	5,13	28,78	± 0,88
ZV ohne	1,88	2,96	3,16	2,99	10,97	—
mit	2,42	3,37	3,20	2,99	11,91	—

Prozesse und ZA eng miteinander verknüpft sind, doch sind auch hier die Differenzen kaum größer als das berechnete σ_m der Versuchsreihe. Wir wollen deshalb die Ergebnisse mit Vorbehalt aufnehmen und sie nur insofern auswerten, als wir mit Sicherheit behaupten können, daß durch unsere Versuchsbedingungen die Zellen in keiner Weise geschädigt werden. Dies natürlich nur unter der Voraussetzung, daß wir nicht ältere als zweitägige Suspensionen, wie sie hier untersucht wurden, verwenden.

Zur Untersuchung des Lichteinflusses wurde die eine Hälfte des Schüttelbades verdunkelt, die andere mit einer 100-Watt-Lampe belichtet. Die nach dieser Anordnung ausgeführten Parallelversuche (Ta-

belle 23) lassen keinen Unterschied in der Glucoseaufnahme erkennen, eine Tatsache, die nicht so erstaunlich ist, wenn wir bedenken, daß die dissimilatorischen Vorgänge, aus denen die Hefezelle ihre Energie gewinnt, keine Lichtreaktionen sind.

Tabelle 23

Einfluß des Lichtes auf die Glucoseaufnahme
30° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — (mg/40 cm³)

	Intervall à 12 min				Total	
	I	II	III	IV	X_m	σ_m
Licht	6,25	4,05	4,25	2,94	17,50	± 1,00
Dunkel	7,05	4,59	3,76	2,36	17,75	± 1,15

6. Beeinflussung der energieliefernden Prozesse durch Zellgifte und ihre Auswirkung auf die Zuckeraufnahme

Die Absicht der nun folgenden Versuche ist, den Energiehaushalt der Hefen so zu beeinflussen, daß wir womöglich nähere Schlüsse auf seinen innern Zusammenhang mit der Zuckeraufnahme ziehen können. Als Zellgift wurde neben Monojodessigsäure hauptsächlich HCN verwendet; beide wurden zirka 1/2 Stunde vor Versuchsbeginn zugegeben (siehe auch Warburg, 1928, und Euler, 1934).

Bei der Monojodessigsäure (MJE) haben wir lediglich in Parallelversuchen zu kontrollieren, ob diese während der Dauer der Versuche in meßbarer Menge aus der Außenlösung verschwindet. Es war dies jedoch nie der Fall, da die größte Adsorption schon *vor* Versuchsbeginn stattgefunden hat. Bei der HCN stoßen wir auf größere Schwierigkeiten. Einerseits ist es nicht möglich, die HCN-Konzentration über längere Zeit konstant zu halten, eine Beobachtung, die auch von Warburg (1948) mitgeteilt wird: «... HCN-Bestimmungen ergaben, daß durch Bildung des Cyanhydrins der Fructose nach einigen Stunden die HCN aus den Lösungen herausgenommen worden war.» Innerhalb von 48 Minuten dürften wir allerdings von dieser Seite noch keinen großen Fehler erwarten. Anderseits aber hat erhöhte Gärung, durch gehemmte Atmung, eine rapide Steigerung des «Alkoholfehlers» zur Folge. Das heißt, bei starker Gärung können wir die durch die Alkoholproduktion bedingte Verfälschung des Refraktionswertes nicht mehr unberücksichtigt lassen. Zur Ermittlung dieser Größe wurde folgender Weg beschritten: Es wurde aus der für jede HCN-Konz. mitbestimmten Gärung berechnet, wieviel Alkohol im Laufe der 48 Minuten gebildet wurde. x % Alkohol entsprechen y Skt. (nach Tabelle von Wagner, 1928), y Skt. wiederum entsprechen z % Zucker. Für x % gebildeten Alkohol messen wir also z % verschwundenen Zucker zu wenig. Auf dieser Grundlage wurde ausgerechnet, daß wir z. B. bei *m*/2500 HCN (Tabelle 24) nach 48 Minuten zirka 10 % zu wenig ZA messen würden. Um in dieser Richtung eine gewisse Sicherheit zu erlangen, wurden an zwei Proben derselben Konz. Fehling-Bestimmungen ausgeführt und diese mit dem RW verglichen. Dabei ergaben sich Differenzen (RW zu hoch) von zirka 12 und 15 %, was nicht schlecht mit den berechneten übereinstimmt (ausgedrückt in % des nach jeder Methode als verschwunden festgestellten Zuckers). Wir können also unsere Berechnungen als grobes Maß für den zu wenig bestimmten Zucker bei der refraktometrischen Messung einsetzen. In den nachfolgenden Tabellen sind solche Korrekturen bereits berücksichtigt.

Aus den Versuchen von Collander und Holmstroem (1937) ist ersichtlich, daß die adenoide Tätigkeit bei höhern Pflanzen ziemlich eng mit der Atmung (die Gärung ist hier praktisch unbedeutend) verknüpft ist. Die Hefe ist aber ein Organismus, bei dem sowohl Atmung als auch Gärung, und zwar je nach Versuchsbedingung verschieden stark, zur Energiegewinnung der Zelle beitragen. Man kann sich nun die Frage stellen, ob auch hier die Größe der Zuckeraufnahme an den einen Prozeß, die Atmung, gebunden ist oder ob es gleichgültig ist, von welcher Seite die gelieferte Energie stammt. Wir finden die Ergebnisse zusammengefaßt in der Tabelle 24. Als erste Reaktion erkennen wir

Tabelle 24

Zuckeraufnahme bei verändertem Energiehaushalt (HCN)
30° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — (mg/40 cm³)

Konz. HCN	Atmung	Gärung	Total ZV	Total ZA		
				X_m	σ_m	ZA/ZV
0	3,59	9,16	12,75	26,70	± 1,5	2,09
m/50 000	2,51	18,95	21,46	33,30	± 1,0	1,55
m/10 000	1,45	25,20	26,65	—	—	—
m/5000	0,95	26,25	27,20	40,10	± 2,4	1,47
m/2500	0,49	28,64	29,15	38,90	± 1,6	1,33
m/1000	0,21	22,85	23,06	26,60	± 1,4	1,15
m/100	~ 0,03	0,98	1,01	3,00	± 1,1	~ 3

sofort, daß der Pasteursche Effekt durch HCN vergiftet wird (Warburg, 1928; Euler, 1934), mit abnehmender Atmung nimmt die Gärung zu. Als direkte Folge davon wird der ZV mächtig gesteigert, was gleichzeitig eine vermehrte ZA nach sich zieht. Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Hefezelle durch Atmung aus einem Mol Zucker mehr als den zehnfachen Energiebetrag der Gärung gewinnt. Nun wäre es aber interessant, zu prüfen, ob durch die stark gesteigerte Gärung der Energieausfall bei der Atmung einigermaßen wettgemacht werden kann. Als Unterlage für die nachfolgenden Berechnungen wurden die von Euler (1934, S. 156) als maximal gewinnbare Energie für Atmung und Gärung gegebenen Werte benutzt. $\triangle Ao$ ist dabei die *maximale Arbeit* für einen *reversibel* geführten Kreisprozeß.

	$\triangle Ao$
$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$:	685,3 kcal
$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,CH_3CH_2OH + 2\,CO_2$:	55,3 kcal

Nun werden aber in einer Zelle, wie Euler selbst bemerkt, viele, aber nie alle Prozesse reversibel geführt. Die wirklichen Werte müssen also etwas kleiner sein. Mit dieser Einschränkung sollen die mitgeteilten Werte aufgefaßt werden.

Nach den Angaben von Euler stellen wir so fest, daß die Hefezelle aus 1 mg Glucose durch Atmung *3,81 cal,* durch Gärung *0,307 cal* gewinnt oder höchstens gewinnen kann. Auf dieser Basis gelangen wir zur Tabelle 25. Sie zeigt uns, daß der Energieabfall nicht ein plötzlicher

Tabelle 25

Die energetischen Verhältnisse bei Veränderung von Atmung und Gärung durch HCN

Konz. HCN	Atmung		Gärung		Total
	ZV mg	$\triangle A_o$	ZV mg	$\triangle A_o$	$\triangle A_o$ in cal
0	3,59	13,68	9,16	2,81	16,49
m/50 000	2,51	9,52	18,95	5,81	15,33
m/10 000	1,45	5,53	25,20	7,74	13,27
m/5000	0,95	3,62	26,25	8,06	11,68
m/2500	0,49	1,87	28,64	8,80	10,67
m/1000	0,21	0,80	23,06	7,08	7,88
m/100	0,03	0,11	0,98	0,30	0,41

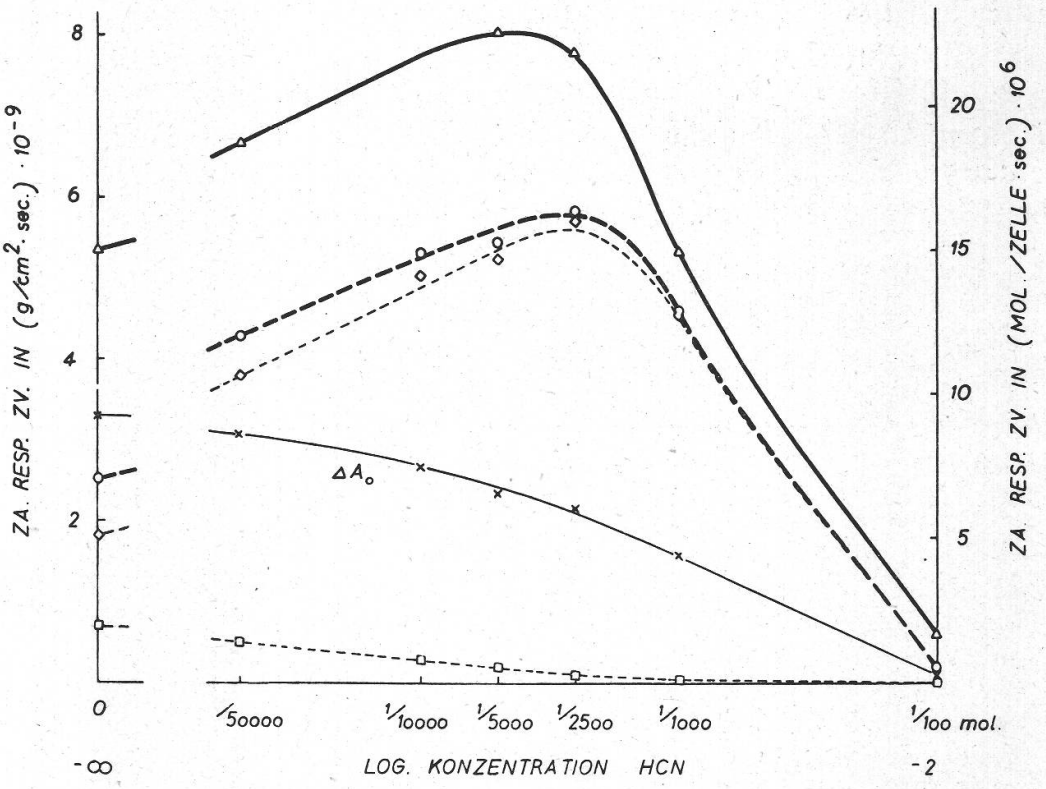
ist, sondern daß er nur allmählich bis gegen Null abnimmt (letzte Kolonne, $\triangle A_o$ total). Wenn wir die Tabelle 24 oder die Kurve der Figur 8 zu einem Vergleich heranziehen, so erkennen wir außerdem, daß trotz abnehmendem Energiegewinn die ZA bis zu einem Maximum zwischen *m*/5000 und *m*/2500 HCN zunimmt, dann aber rapid absinkt auf Beträge, die nicht mehr viel größer sind als der gleichzeitige Zuckerverbrauch. So stellen wir denn tatsächlich fest, daß bei Proben aus *m*/1000 und höherer HCN-Konzentration nur noch sehr spärlich Glykogen gebildet wird, obwohl wir solches auch noch bei *m*/100 HCN nachweisen können (siehe Althaus, 1950).

Überblicken wir die Ergebnisse nochmals im gesamten, so müssen wir unsere Beobachtungen wie folgt deuten: Im ungestörten Zustand speichert die Hefezelle *mehr Zucker,* als sie gleichzeitig verbraucht (Figur 8). Sowohl ZA als Glykogenbildung verbrauchen Energie (Meyer, 1943, S. 131).

Althaus (1950) ist zwar der Ansicht, die Glykogenbildung benötige praktisch keine Energie. Die Versuche bei 0° C und mit *m*/100 HCN bei 30° C liefern tatsächlich nur sehr geringe Mengen Energie, dafür ist aber auch die Glykogenbildung stark verzögert. Nach der Methode von Althaus wird außerdem nur der *Beginn* der Glykogenbildung in der Zelle gemessen, während sie nichts darüber aussagt, wie rasch und wie stark die Menge des Glykogens in der einzelnen Zelle vermehrt wird. Deshalb erscheint seine Folgerung zu kategorisch; ich würde es vorziehen, zu sagen, daß die Hefezelle schon mit *wenig* Energie imstande ist, Glykogen zu bilden. Zu dieser Aussage gelange ich vor allem auf Grund einiger Untersuchungen über die Energieproduktion gelähmter Zellen (s. a. Tabelle 28), die Althaus beim Abschluß seiner Dissertation allerdings noch nicht bekannt waren.

Wird nun die Hefe gezwungen, ihre Energie aus dem Gärungsprozeß zu beziehen, so wird der ZV gewaltig erhöht. Vermehrter Ver-

brauch verlangt vermehrte Aufnahme. Mit vermindertem Energiegewinn (siehe Tabelle 25) mehr Zucker als unter normalen Bedingungen aufzunehmen, kann die Zelle nur dadurch bewerkstelligen, daß sie der Glykogenbildung zusehends mehr Energie entzieht, bis schließlich (bei *m*/1000) nur noch ein letztes, nicht mehr unterschreitbares Minimum für diesen Vorgang übrigbleibt. Wir finden übrigens in unsern



Figur 8

Verhältnis von Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch bei verschieden starker Einwirkung von HCN

30° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — 48 min

0—1/100 molar HCN

△——△ Zuckeraufnahme (ZA) □— — —□ Atmung

○— — —○ Zuckerverbrauch (ZV) ◇— — —◇ Gärung

×——× Max. Energiegewinn △ A_0 aus Atmung und Gärung in cal (Zahlenwerte siehe Tab. 25)

Versuchen eine Bestätigung der Beobachtung von Althaus (1950), daß das glykogenbildende Enzym durch HCN-Konzentrationen von *m*/100 nicht oder zum mindesten noch nicht blockiert wird. Als wichtiges Ergebnis müssen wir ferner festhalten, daß es für die Zuckeraufnahme nicht von Bedeutung ist, *von welchem der beiden energieliefernden Prozesse die benötigte Energie stammt.*

Es sei nun noch der Versuch gewagt, die gespeicherte Energie zu berechnen, um einen Vergleich von gespeicherter und verbrauchter

Energie in Abhängigkeit von der Beeinflussung des Energiehaushaltes durch HCN zu ermöglichen. Die Größe der gewinnbaren Energie aus einer bestimmten Menge Zucker ist festgelegt durch das bei einer bestimmten HCN-Konzentration gültige Verhältnis von Atmung/Gärung, wie es zum Beispiel aus Tabelle 25 ersichtlich ist. Eine solche Berechnung finden wir in Tabelle 26. Wir erkennen, daß sowohl infolge der Verschiebung des Verhältnisses Atmung/Gärung als auch infolge der immer geringer werdenden Speicherung der Energiegewinn aus den Reservestoffen von 100 % bei ungestörter Tätigkeit auf nur noch 4,6 % bei *m*/100 HCN herabsinkt. Dabei ist der ZA-Wert, *m*/10 000 HCN, der refraktometrisch nicht bestimmt wurde, der Kurve (Figur 8) entnommen und der ZV-Wert *m*/5000, der offensichtlich etwas zu tief liegt, dem Kurvenverlauf entsprechend etwas heraufgesetzt worden.

Tabelle 26

Vergleich von verbrauchter und gespeicherter Energie in Abhängigkeit vom Verhältnis Atmung/Gärung

Konz. HCN	Zuckerverbrauch		gespeicherter Zucker		$\Delta Ao'/\Delta Ao$
	mg/40 cm³	ΔAo	mg/40 cm³	$\Delta Ao'$	
0	12,75	16,49	14,00	18,12	1,10
m/50 000	21,46	15,33	11,85	8,47	0,56
m/10 000	26,65	13,27	11,55	5,75	0,44
m/5000	28,00	12,00	12,10	5,20	0,43
m/2500	29,15	10,67	9,75	3,57	0,34
m/1000	23,06	7,88	3,54	1,21	0,15
m/100	1,00	0,41	2,00	0,82	(2,0)

Aus der letzten Kolonne der Tabelle 26 erhellt der bereits angetönte Umstand noch besser, daß mit zunehmender Umstellung des Energiegewinns von der Atmung auf die Gärung — also je mehr der Luftsauerstoff vom Reaktionsgeschehen ferngehalten wird — die ökonomischen Verhältnisse der Hefezelle sich zusehends verschlechtern (vgl. auch Fidler, 1948).

Die Versuche mit *Monojodessigsäure* wurden nur bei einer Konzentration, *m*/1000, durchgeführt, von welcher wir wissen, daß die energieliefernden Prozesse praktisch gleich Null sind. Ein Unterschied gegenüber *m*/100 HCN, wo, nach den manometrischen Messungen zu schließen, dieselben Energieverhältnisse vorliegen (vgl. die diesbezüglichen Kurven bei Althaus, 1950), besteht aber darin, daß Althaus bei *m*/100 HCN noch deutlich Glykogenbildung nachweisen konnte, während eine solche bei *m*/1000 MJE auch nach stundenlanger Beobachtung nicht gefunden werden konnte. Die Frage ist nun, ob auch in der Zuckeraufnahme ein Unterschied festzustellen ist. Der

Tabelle 27

Glucoseaufnahme völlig gelähmter und abgetöteter Zellen
30° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — mg/40 cm³

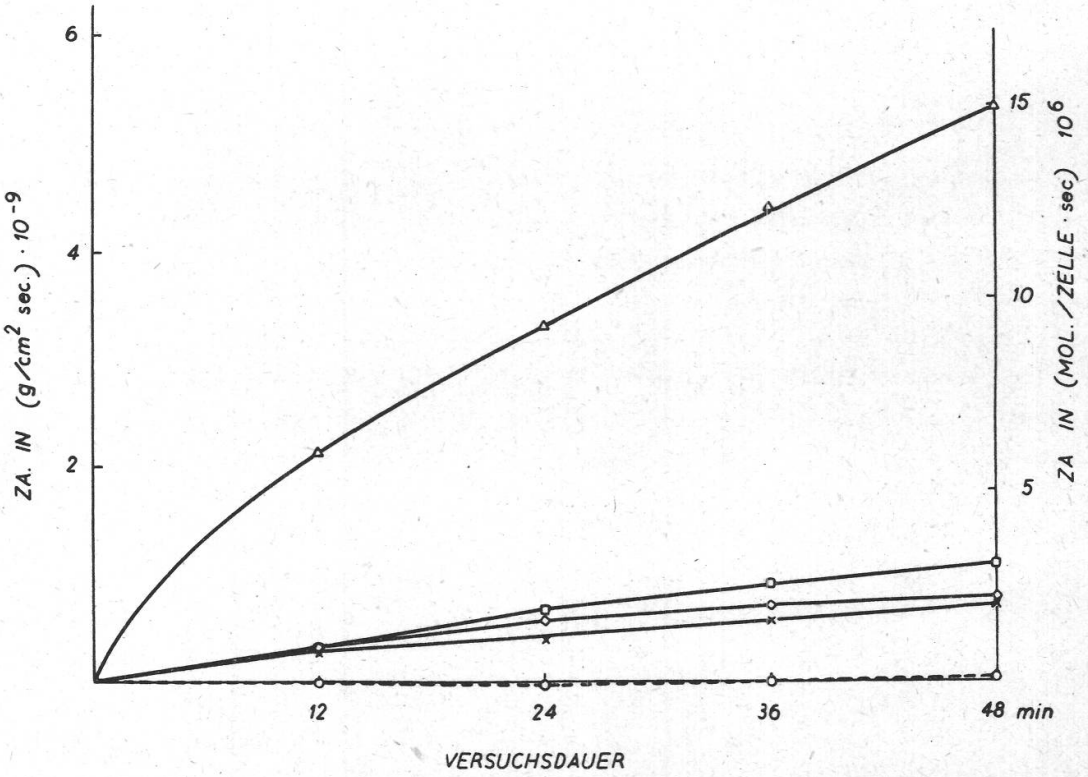
	Intervall à 12 min				Total	
	I	II	III	IV	X_m	σ_m
MJE m/1000	1,59	1,26	0,72	0,37	3,94	± 1,49
abgetötet durch Erhitzen	1,40	0,54	0,92	0,81	3,68	± 1,60

entsprechende Zuckerverbrauch ist dabei so gering, daß er der methodischen Streuung entsprechend gerade so gut gleich Null sein könnte. Trotzdem finden wir in unsern Versuchen (Tabelle 27) eine noch meßbare Zuckeraufnahme und diese etwa von derselben Größenordnung wie bei m/100 HCN (Tabelle 24). Als erstes stellen wir daher fest, daß Unterschiede in der Aufnahme von Zucker nicht maßgebend sein können für Unterschiede in der Glykogenbildung bei HCN- resp. MJE-Vergiftung [1]. Des weitern legt uns aber die Tatsache, daß trotz «Energielosigkeit» der Hefezelle Zucker in diese eindringt, den Schluß nahe, daß wir in der hier festgestellten Aufnahmegröße den Betrag der rein «physikalisch bedingten Aufnahme» vor uns haben. Wenn wir versuchsweise unsere Hefesuspension zur Vermeidung einer plötzlichen Hitzekoagulation ganz langsam auf über 60° C erwärmen, bis alle Zellen sich mit Methylenblau anfärben lassen, also tot sind, und diese dann wie bei einem normalen Versuch mit 1 % Glucose versetzen, so stellen wir fest (Tabelle 27), daß innerhalb von 48 Minuten etwa gleichviel Zucker aus der Außenlösung verschwindet wie bei den völlig gelähmten Zellen (Figur 9). Eine aktive Beteiligung des Plasmas ist hier ohnehin ausgeschlossen. Wir wollen zwar diese Beobachtung nur als Hinweis aufnehmen und nicht zuviel Gewicht auf sie legen, da wir nicht wissen können, ob und wie weit durch eine solche Behandlung die Struktur des lebenden Protoplasten bereits zerstört worden ist.

Greifen wir nochmals auf die Vermutung zurück, daß bei der völlig gelähmten Zelle nur noch die «*physikalisch bedingte Aufnahme*» übrigbleibt, dann können wir auch verstehen, wieso wir bei m/100 HCN immer noch Glykogenbildung vorfinden, obwohl die Energieleistung der Zelle kaum mehr ausreicht, um noch aktiv Zucker aufzunehmen. Es muß dann offenbar so sein, daß die Hefezelle auf die adenoide Tätigkeit ganz verzichtet und das letzte noch erreichbare Restchen von Energie für die Bildung von Glykogen aus dem lediglich auf Grund eines Konzentrationsgefälles hereindiffundierenden Zucker verwendet.

[1] Die Vergiftung tötet die Zellen nicht ab, wie durch Kontrollen mit Methylenblau nach zirka einer Stunde festgestellt werden kann.

Eine andere Frage ist die nach der relativen Größe der der Zelle noch verbleibenden Energie unter verschiedenen Vergiftungsbedingungen. Obwohl wir vorher sagten, die Größe des Zuckerverbrauchs, d. h. des Energiegewinnes (innerhalb 48 Minuten), sei bei *m*/100 HCN und *m*/1000 MJE so gering, daß er auf Grund der methodischen Streuung



Figur 9

Versuche über « aktive » und « passive » Zuckeraufnahme (30° C) — 4 ‰ Hefe — 1 % Glucose — 48 min

△——△ Zuckeraufnahme normaler Versuchshefe bei 30° C

□——□ Zuckeraufnahme normaler Versuchshefe bei 0° C (Energieproduktion äußerst gering)

◇——◇ Zuckeraufnahme von Hefe in *m*/1000 MJE bei 30° C (Energieproduktion praktisch = Null)

○— — —○ Atmung und Gärung (Energieprod.) der MJE-Hefe bei 30° C

×——× Zuckeraufnahme bei 30° C von schonend abgetöteter Hefe (durch langsames Erhitzen auf über 60° C)

auch Null sein könnte, dürfen wir nicht annehmen, daß er bei den erwähnten Konzentrationen tatsächlich gleich Null ist. Bei der Besprechung von HCN-Vergiftungen sagt zum Beispiel Warburg (1948): «... Hundertprozentige Hemmung würde man erst bei unendlich großer Blausäurekonzentration erhalten.» Um aber doch eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, wollen wir die gefundenen Werte für HCN und MJE der «Restatmung» der Hefezelle gegenüberstellen, welche wir finden,

wenn die Tätigkeit einer glykogenfreien Hefesuspension ohne Zugabe von Zucker über längere Zeit manometrisch verfolgt wird. Um aber jetzt Werte zu erhalten, die über der methodischen Abweichung liegen, wurden die Versuche mit einem großen Hefevolumen (zirka zehnfache Hefedichte, Zellzahl jeweils photometrisch bestimmt) ausgeführt und die Werte erst nachträglich auf unsere normale Zellenzahl von 4 ‰ Hefe reduziert. Dabei wurde berücksichtigt, daß eine größere Zellenzahl pro Flüssigkeitsvolumen weit mehr Giftmolekeln aus der umgebenden Lösung adsorbiert. Um dennoch etwa dieselben Verhältnisse zu schaffen, d. h. eine Giftwirkung zu erreichen, die sicher nicht unter *m*/100 HCN und *m*/1000 MJE liegt, wurden die rund 4 % Hefen in *m*/50 HCN und *m*/500 MJE suspendiert, und zwar zirka 45 Minuten vor Versuchsbeginn. Die Resultate dieser Untersuchung finden wir in Tabelle 28.

Tabelle 28

Vergleich des Energiegewinns aus Restatmung mit demjenigen gelähmter Zellen
30° C — 1 % Glucose — mg/40 cm³ — 1 Std. — reduziert auf 4 ‰ Hefe

		X_m	ΔAo	Total Energiegewinn	Glykogen
Restatmung (ohne Zucker)	Atmung	0,60	2,28	2,28	—
	Gärung	0	0		
< *m*/500 MJE	Atmung	0,08	0,31	0,33	—
	Gärung	0,06	0,02		
< *m*/50 HCN	Atmung	0,03	0,11	0,64	+
	Gärung	1,73	0,53		

Sie geben die gemessenen Werte für Atmung und Gärung an, reduziert auf 4 ‰ Hefe und ausgedrückt in mg/40 cm³. Wir können der zweitletzten Kolonne folgende Feststellungen entnehmen:

1. Der Energiegewinn der vergifteten Zellen ist unter den gegebenen Bedingungen in beiden Fällen bedeutend *kleiner als der Betrag der zuckerfreien Restatmung*. Er ist aber *nicht = Null*.
2. Eine «totale Energielosigkeit» als Grund für die mangelnde Glykogenbildung bei MJE kommt deshalb nicht in Frage.
3. Wenn trotzdem auch nach mehreren Stunden (in unserm Fall nach 2 Stunden, bei Althaus nach 4 Stunden) kein Glykogen gefunden wurde, so stützt dies die Anschauung von Althaus, daß die ausbleibende Glykogenbildung auf eine *Vergiftung der Glykogenase* durch MJE zurückzuführen ist, es sei denn, der absolute Energiebetrag der MJE-vergifteten Zelle reiche nicht mehr aus zu einer erkennbaren Glykogenbildung.
4. Die «Restatmung» besteht *nur* aus Atmung; Gärung = Null (vgl. Cori und Cori, 1946).

Die vorherigen Versuche haben uns den Schluß nahegelegt, daß es neben der *aktiven* Aufnahme eine *passive* gibt. Diese wird natürlich an *jeder* bisher gemessenen Aufnahmegröße mitbeteiligt sein und je nach Konzentration, Temperatur usw. etwas variieren. Doch ist sie im Verhältnis zur adenoiden Aufnahme gering (Figur 9) und deshalb nicht geeignet, die bisher festgestellten Erscheinungen und Gesetzmäßigkeiten auf rein physikalischer Grundlage, d. h. ohne Mitwirkung des Protoplasmas, zu erklären.

7. Zuckeraufnahme unter anaeroben Bedingungen

Wir haben im vorherigen Abschnitt gesehen, daß mit abnehmender Atmung, bedingt durch den erhöhten Zuckerverbrauch der Gärung, auch die Zuckeraufnahme gesteigert wird. Über das Verhältnis Atmung/Gärung schreibt Warburg (1948): «... wenn man die Hefeatmung hemmt, so steigt die Gärung vom aeroben auf den *anaeroben* Wert.» Wenn wir nochmals auf unsere HCN-Versuche zurückgreifen (Figur 8), so dürfen wir wohl annehmen, daß die Verhältnisse, wie sie bei *m*/2500 HCN mit einer nur noch unbedeutenden Atmung und einem Maximum der Zuckeraufnahme von rund 40 mg herrschen, schon sehr weitgehend den Zustand unter anaeroben Bedingungen verkörpern. Die ZA ist in diesem Falle 1,5mal so groß als bei ungestörtem Sauerstoffzutritt (26,7 mg), die Gärung anderseits (28,64) ist 3,1mal so groß als diejenige unter aeroben Bedingungen (9,16). Diese Feststellung belegt übrigens auch die früher gemachte Aussage, daß die ZA nicht direkt vom einen oder andern der energieliefernden Prozesse abhängig ist, sondern nur von der Summe der beiden.

Trifft nun die Annahme zu, daß wir bei HCN-gelähmter Atmung, aber noch intakter Gärung die Verhältnisse des anaeroben Stoffumsatzes vor uns haben, so müßten wir auch bei anaeroben Versuchen eine Zuckeraufnahme finden, die etwa 1,5mal so groß ist als die aerobe, vielleicht eher eine Kleinigkeit mehr, da die Atmungshemmung bei *m*/2500 HCN nicht vollkommen ist. Zur Prüfung dieser Überlegung ziehen wir eine Reihe von Versuchen heran, die zwar nicht direkt in diesem Zusammenhang und deshalb auch bei einer andern Temperatur (25° C) ausgeführt wurden, die sich aber trotzdem und ohne Einschränkung zu einem solchen Vergleich eignen.

Hefesuspension und Zuckerlösung wurden je getrennt zirka 1/4 Std. lang mit gewaschenem Stickstoff (siehe Althaus) durchspült, dann im N_2-Strom zusammengegossen, sofort der erste Tropfen entnommen und der Versuchskolben mit einem Gummistopfen verschlossen, während 48 Minuten im Temperaturbad geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde geöffnet und der zweite Tropfen als Endwert gemessen. Auf eine Messung der Intervallswerte mußte verzichtet werden. Zur Abschätzung des «Alkoholfehlers» wurde in ähnlicher Weise verfahren wie bei den HCN-Versuchen. Eine Berechnung konnte nicht vorgenommen werden, da wir die Größe der Gärung nicht genau kennen (sie muß offensichtlich um ein weniges größer sein als die bei

m/2500 HCN). Hingegen wurde durch eine Fehling-Bestimmung ermittelt, daß die gemessene Abnahme des Zuckergehaltes innerhalb 50 Minuten um zirka 11 % zu tief liegen müsse. Dieser Differenzwert scheint jedoch etwas zu niedrig ausgefallen zu sein, haben wir doch schon vorhin bei den HCN-Versuchen Differenzen von 12 und 15 % gefunden. Wir dürften deshalb nicht weit fehlgehen, wenn wir als Durchschnitt alle ZA-Werte um 12 % vergrößern.

Tabelle 29

Vergleich der Glucoseaufnahme unter anaeroben und aeroben Bedingungen
25° C — 4 ‰ Hefe — 1 % Glukose — in N_2-Atmosphäre
«Alkoholfehler» mitberücksichtigt

	Versuchsreihen I	Versuchsreihen II	Mittel mSkt.	mg/40 ccm X_m	mg/40 ccm σ_m	anaerob / aerob
anaerob	274	266	270	29,20	± 2,11	1,58
aerob	—	—	171	18,45	± 0,73	

Auf dieser Grundlage erhalten wir die Zahlen der Tabelle 29, in welcher wir unsere Erwartungen sehr schön erfüllt sehen. Die Warburgsche Aussage findet hierin ihre volle Bestätigung. Wir können es deshalb auch wagen, wenigstens angenähert die relative Größe der Gärung zu berechnen, indem wir die Zahlenverhältnisse der HCN-Versuche zu Hilfe nehmen und dabei berücksichtigen, daß die Gärung (Tabelle 24) eher noch etwas größer sein muß, falls auch der letzte Rest von Atmung wegfällt. Wir finden so einen Zuckerverbrauch durch Gärung, der um 19 mg/40 cm³ liegt und einen Energiebetrag $\triangle Ao$ von rund 5,9 cal zu liefern imstande ist. Unter aeroben Bedingungen gewinnt aber die Hefezelle bei 25° C aus etwa 8 mg Zucker einen Energiebetrag von rund 13 cal. Ziehen wir nun einen Vergleich, so können wir (immer für 25° C) ganz generell aussagen, daß die Hefezelle unter anaeroben Bedingungen aus doppelt soviel verbrauchtem Zucker nur halb soviel Energie gewinnt als unter aeroben Bedingungen. Oder anders formuliert: Aus einem bestimmten Quantum Zucker gewinnt die Hefezelle *anaerob höchstens ein Viertel des Energiebetrages,* den sie unter *aeroben* Verhältnissen zu gewinnen vermag.

8. Aufnahme verschiedener Zucker und höherer Alkohole

Sowohl Fleischmann (1928) als auch Wertheimer (1934) haben auf dem Umweg über plasmometrische oder analytische Bestimmungsmethoden ganz unterschiedliches Verhalten der einzelnen Zucker und Alkohole in bezug auf Permeabilität festgestellt. In der Refraktometrie besitzen wir eine Methode, die ein direktes Verfolgen der Zuckerabnahme in der Außenlösung erlaubt. Es wurden alle Versuche bei 25° C mit 4 ‰ Hefe in $^1/_{18}$*molarer* Zucker- resp. Alkohollösung ausgeführt. Die entsprechenden Tabellen zur Umrechnung der gemessenen Skalenteile in mg finden sich im Anhang dieser Arbeit.

Untersucht wurde die Aufnahmefähigkeit für folgende Substanzen: Glycerin, l(+)-Arabinose, d(+)-Xylose, d(+)-Glucose, d(+)-Mannose, d(+)-Galactose, d(—)-Fructose·H_2O, d(—)-Mannit, Invertzucker, Maltose, Lactose · H_2O, Raffinose · $5H_2O$.

Saccharose kann refraktometrisch nicht gemessen werden, da sie durch die Hefen noch außerhalb der Zelle (Barfoed-Reaktion positiv, siehe auch Althaus, 1950) invertiert wird; ihre Konzentration wird dadurch zu einer unfaßbaren Größe. Aus diesem Grunde wurde die Saccharose *vor* jedem Versuch mit einem Tropfen HCl durch Kochen invertiert, mit einem Tropfen NaOH wieder neutralisiert und dann erst als Invertzucker der Hefe zugesetzt.

Bei der Raffinose scheint das Invertin nicht oder nur so langsam zu wirken [1], daß unsere Messungen nicht merklich beeinflußt werden. Mit Barfoed-Proben konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Einzelne Proben zeigten etwa 30 Minuten nach der Vereinigung mit Hefe positive Reaktion, andere jedoch blieben bis zu einer Stunde negativ, so daß ein Entscheid, von welchem Zeitpunkt an tatsächlich eine Hexose vorhanden ist, sehr schwer fällt. Jedoch müssen wir annehmen, daß zum mindesten im ersten Teil des Versuches, also gerade zur Zeit der größten Aufnahme, noch kein freies Monosaccharid vorliegt und der Zucker folglich als *Trisaccharid* an die Zelloberfläche gebunden wird.

An Proben jeder Versuchsreihe wurde jeweils am Ende eines Versuches, d. h. nach 48 Minuten, nachgeprüft, ob Glykogen vorhanden war oder nicht. Die allerdings rein qualitativen Beobachtungen sind deshalb vergleichbar mit den von Althaus (1950) in Tabelle 10, Kolonne «Glykogen nach 50 Minuten» dargestellten Ergebnissen. Wir erkennen eine gute Übereinstimmung (Tabelle 30). Lediglich bei der Maltose [2] stoßen wir auf einen auffallenden Unterschied im Verhältnis Aufnahmegeschwindigkeit des Zuckers : Bildungsgeschwindigkeit des Glykogens, verglichen zum Beispiel mit der Mannose, die eine Aufnahme von derselben Größenordnung zeigt. Wir können dies offenbar nur so deuten, daß sie, bevor sie als Glykogen gespeichert werden kann, einem Umwandlungsprozeß unterworfen ist, der scheinbar mehr Energie verbraucht als die entsprechenden Umwandlungen von Glucose, Fructose, Raffinose usw. In diesem Zusammenhang mag auch eine Feststellung von James (1946) ein gewisses Interesse haben: "... Nothing is yet known about the phosphorylation of maltose. But its greater resistance to hydrolysis suggests that it may also be less readily phosphorylised." Noch bedeutend energiebedürftiger muß dieser Prozeß bei der Galactose sein, wo immerhin noch eine ganz ansehnliche Aufnahme vorhanden ist, wo aber Althaus erst nach 85 Minuten bei etwas mehr als der Hälfte aller Zellen Glykogen nachweisen kann.

---

[1] Siehe die widerstreitenden Ansichten in Sumner und Myrbäck (1950), S. 542 ff.

[2] Vgl. Althaus (1950), S. 132!

Tabelle 30

Aufnahme verschiedener Zucker und höherer Alkohole
(geordnet nach zunehmender Molekülgröße)
25° C — 4 ‰ Hefe — Anfangskonzentration = $^1/_{18}$molar — 48 min

Substrat	MR_D [1]	Aufnahme				Glykogenbildung	
		mg/40 cm³	$\pm\sigma_m$ in %	(g/cm²·s) ·10⁻⁹	(Mol./Zelle·s) ·10⁶	eigene Beobachtg.[3]	nach Althaus[4]
							%
Glycerin ...	20,63	6,76	10,3	1,352	7,43	——	0
Arabinose ..	31,40	5,78	13,4	1,156	3,90	——	0
Xylose	31,40	5,94	12,1	1,188	4,00	——	0
Glucose	37,54	18,50	4,0	3,700	10,38	++	100
Fructose ...	37,54	20,08	7,2	4,016	11,27	++	100
Mannose ...	37,54	15,70	7,3	3,140	8,80	++	100
Galactose ..	37,54	9,93	7,9	1,986	5,57	——	0 [5]
Invertzucker	37,54	15,55	3,4	3,110	8,72	++	
Mannit.....	39,06	4,32	19,6	0,864	2,40	——	
Maltose	70,35	14,90	6,2	2,980	4,41	++	78
Lactose [2] ...	70,35	(0,32)	(228,0)	0	0	——	0
Raffinose ..	103,70	12,21	8,9	2,442	2,44	++	100

Wie zu erwarten war, erhalten wir bei der Aufnahme der verschiedenen Zucker ganz wesentliche Unterschiede (Tabelle 30), vergleichen wir jedoch die einzelnen Intervalle miteinander (Tabelle 31), so fällt uns auf, daß die Aufnahmekurven durchwegs gleichsinnig verlaufen. Das erste Intervall liefert immer den größten Wert, die übrigen fortlaufend abnehmende Werte. Dies ist zwar noch nicht dazu angetan, den Vorgang zu charakterisieren; er kann sowohl auf einem Konzentrationsgefälle als auch auf Adsorption beruhen. Was uns jedoch wesentlich näher an die Natur des Vorganges heranbringt, ist die Tatsache, daß weder die Molekülgröße (Figur 10) noch die Lipoidlöslichkeit zu seiner Erklärung herangezogen werden kann. Wenn wir schon von einer Lipoidlöslichkeit sprechen wollen, so können wir lediglich feststellen, daß, wie Fleischmann (1928) gezeigt hat, in heißen Gemischen von Öl/Anilin *alle* Zucker (Pentosen, Hexosen, Hexite usw.) praktisch etwa gleich löslich sind. Das will zwar noch nicht heißen, daß sie sich auch in den Protoplasmalipoiden lösen, es soll nur andeuten, daß wir auf diesem Wege keine Differenzierung feststellen können. Ebensowenig kann uns die Molekülgröße dienen, sehen wir doch, daß große Moleküle wie Fructose, Glucose, Maltose und selbst Raffinose

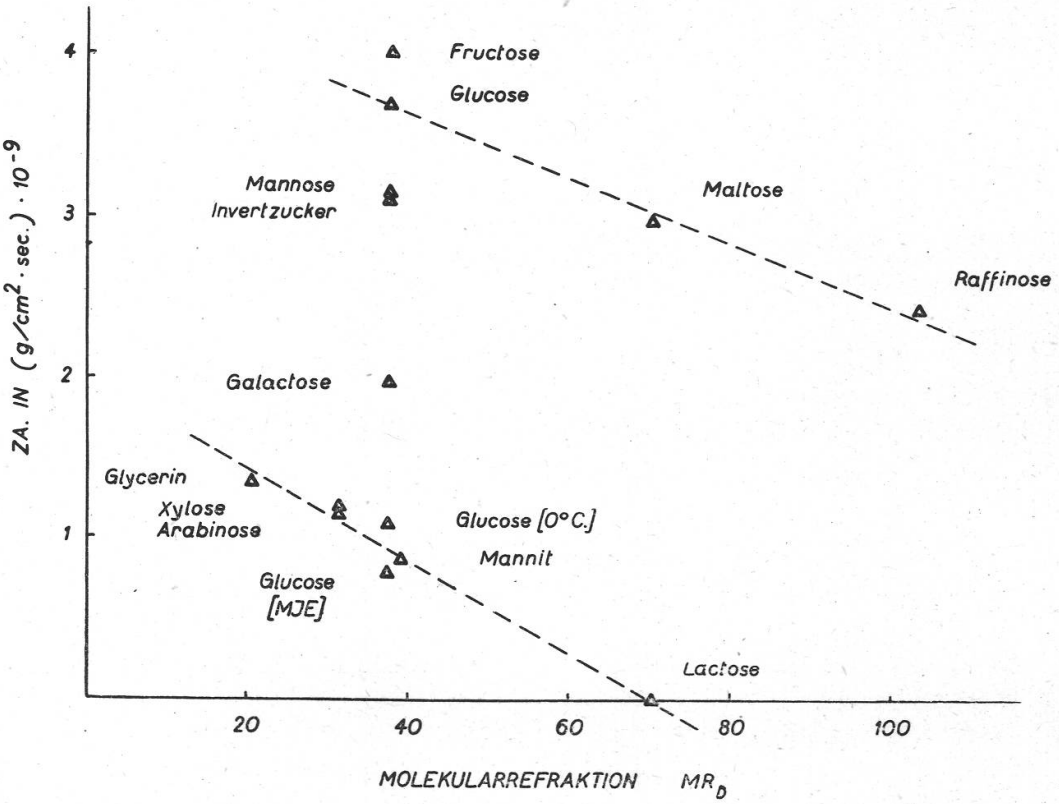
[1] Die Molekularrefraktionen sind der Arbeit von Schönfelder (1930) entnommen.
[2] Der gemessene Lactosewert liegt, wie aus σ_m ersichtlich, weit innerhalb der methodischen Abweichung. An spätern, zu diesem Zweck anders gestalteten Versuchen wurde festgestellt, daß die Aufnahme praktisch = Null ist. (s. S. 605 ff.).
[3] Eigene Prüfung auf Glykogen nach rund 50 min (positiv oder negativ).
[4] Althaus 1950: Tab. 10 und 11, S. 130/131, Kolonne: 50 min.
[5] Anfang der Glykogenbildung erst *nach* 50 min, Halbwert 85–100 min.

Tabelle 31

Aufnahme von Zuckern und Alkoholen in den einzelnen Intervallen

Substrat	Intervall à 12 min (mg/40 cm³) I	II	III	IV	Total
Glycerin	2,80	1,68	1,41	0,89	6,76
Arabinose ...	3,02	1,38	0,72	0,67	5,78
Xylose.....	2,68	1,65	0,97	0,64	5,94
Glucose	8,70	4,13	2,99	2,69	18,50
Fructose	8,03	4,73	3,77	3,58	20,08
Mannose	7,37	3,40	2,71	2,27	15,70
Galactose ...	5,39	2,50	1,08	0,97	9,98
Invertzucker.	6,47	3,30	3,13	2,62	15,55
Mannit	1,80	1,22	0,65	0,65	4,32
Maltose	5,87	3,58	3,15	2,41	14,90
Lactose	0,51	0,07	—0,12	—0,14	0,32
Raffinose ...	4,49	3,39	2,78	1,62	12,21

drei- und viermal so rasch aufgenommen werden wie zum Beispiel die viel kleineren Pentosen. Eine Erklärung durch rein physikalische Permeabilität auf Grund eines Konzentrationsgefälles fällt schon aus die-



Figur 10

Aufnahme verschiedener Zucker und höherer Alkohole

25° C — 4 ‰ Hefe — 48 min — Ausgangskonzentration überall = 1/18 molar

sem Grunde zum vorneherein weg. Bleibt noch zu untersuchen, ob die Adsorbierbarkeit der Kohlenhydrate an feste Oberflächen irgendwelche Hinweise zu geben vermag.

Tabelle 32

Adsorption von Zuckern und Alkoholen an Tierkohle [1]
(= % adsorbiert aus einer Lösung von 11 Millimol)

Dioxiaceton	39,0	Glucose	31,0
Glycerin	24,9	Dulzit	19,9
Erythrit	23,7	Mannit	17,0
Arabinose	36,9	Lactose	26,1
Arabit	21,9	Saccharose	29,0
Galactose	29,6	Raffinose	36,1

Die Adsorptionswerte von Fleischmann (1928) lassen, wie er selbst hervorhebt, einen deutlichen Unterschied zwischen Zuckern und Alkoholen erkennen. Es mag also dies mit ein sehr gewichtiger Grund sein, warum Alkohole relativ viel schlechter aufgenommen werden. Betrachten wir aber die Zucker unter sich, so sind wir wiederum nicht in der Lage, eine Gesetzmäßigkeit herauszulesen, die auch nur annähernd eine Ähnlichkeit mit den Resultaten der Figur 10 aufweisen würde. Dagegen muß aber auffallen, daß die Werte der Figur 10 annähernd auf zwei fast parallel verlaufenden Schrägen liegen [2]; daß eine solch frappante Gesetzmäßigkeit auf reinem Zufall beruhe, ist zwar möglich, jedoch nicht sehr wahrscheinlich. Wenn wir uns daher nach einer Erklärung dafür umsehen wollen, so ist es durchaus nicht abwegig, wenn wir uns etwa folgende Vorstellung machen: Die Größe der Aufnahme in der Reihe Glycerin—Lactose (untere Gerade) ist zur Hauptsache bedingt durch die *Größe der Adsorbierbarkeit* dieser Stoffe an feste Oberflächen und durch die *Größe des Moleküls*. Dividieren wir zum Beispiel die Adsorptionsgröße durch die Molekülgröße, so erhalten wir, allerdings mit größern Schwankungen, eine ähnliche absteigende Reihe wie in Figur 10 (siehe Tabelle 33).

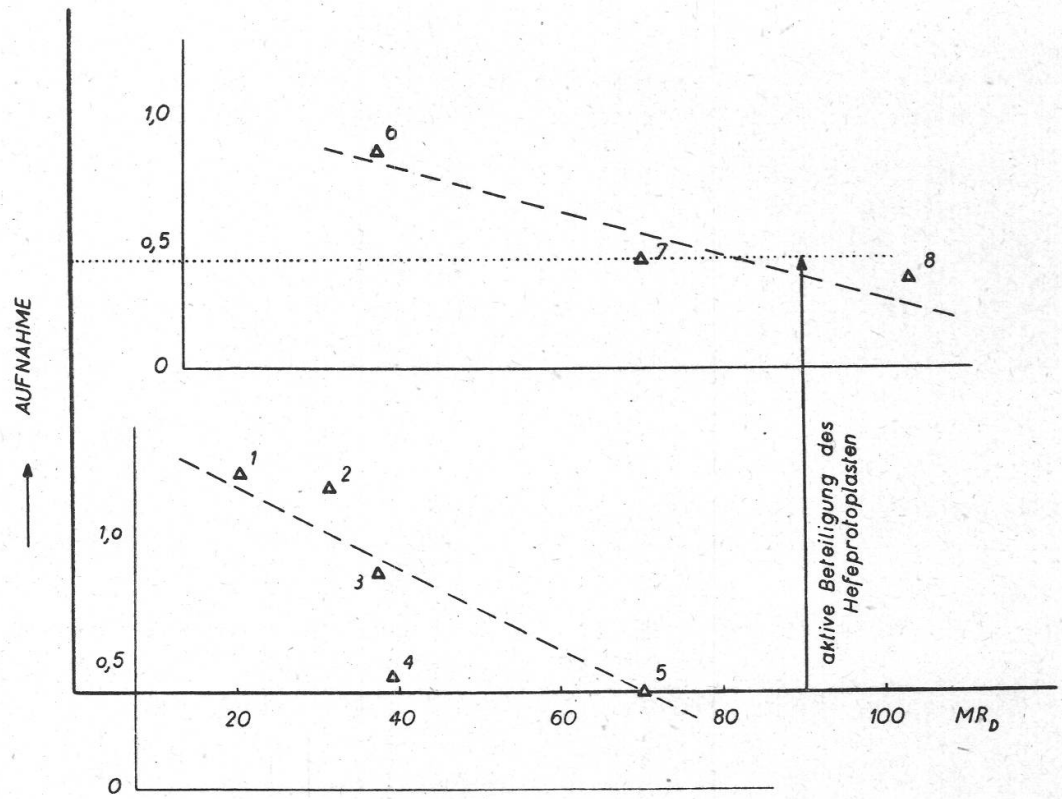
Tabelle 33

	Glycerin	Arabinose	Mannit	Lactose
Ads./Mol.-Refr.	1,21	1,17	0,44	0,37

[1] Nach Fleischmann, 1928.

[2] Wenn wir die Aufnahmewerte in Abhängigkeit von der Mol.-Refraktion anstatt in $g/cm^2 \cdot s$, in Molekülen/Zelle · s, aber nach beiden Richtungen logarithmisch auftragen oder wenn wir die Molekülgröße ausschalten, indem wir den Ausdruck Mol./Zelle·s mit MR_D multiplizieren und die so erhaltenen Aufnahmewerte analog zu Figur 10 auftragen, so erhalten wir in beiden Fällen etwa dasselbe Bild, wie in Figur 10 dargestellt.

Eine aktive Beteiligung der Hefezelle scheint nicht oder nur in sehr geringem Maße stattzufinden. Die Werte sind entsprechend der Anordnung der Figur 10 in Figur 11 eingetragen. Bei der Lactose haben wir offenbar den Punkt erreicht, wo das Molekül *zu groß* ist, als daß es *ohne* energetische Leistung der Zelle noch in diese eindringen könnte. Wir legen deshalb die Skala so, daß die Lactose auf den Nullpunkt der Aufnahme zu liegen kommt (vgl. Figur 10).



Figur 11
Versuch zur Deutung der verschieden großen Zuckeraufnahme
Legende siehe im Text
1 Glycerin; 2 Arabinose; 3 Glucose (bei völlig gelähmter Zelle); 4 Mannit; 5 Lactose; 6 Glucose (bei normaler Zelltätigkeit); 7 Saccharose; 8 Raffinose

Bei der Reihe Glucose—Raffinose haben wir prinzipiell die gleiche Abhängigkeit (Adsorbierbarkeit, Molekulargröße) (Tabelle 34). Den wesentlichen Unterschied in der Aufnahmegeschwindigkeit (s. Figur 10) erkläre ich mir aber so, daß für diese Zucker auch die Zell- resp. Protoplastenoberfläche ihrerseits eine ganz *spezifische Affinität* besitzt (im Sinne von Wertheimer, 1934, und Rothstein, 1948) und selbst an der Aufnahme der Zucker mitwirkt.

Auf Grund dieser Affinität werden die zweitgenannten Zucker *bevorzugt* an der Zelloberfläche festgehalten und blockieren dadurch zugleich den Weg für unspezifische oder weniger spezifische Zucker.

Tabelle 34

	Glucose	Saccharose	Raffinose
Ads./Mol.-Refr.	0,83	0,44	0,35

Die aktive Beteiligung der Zelle würde dann zum Beispiel darin bestehen, die Zucker durch geeignete chemische Umwandlung aus ihrer Oberflächenbindung zu lösen und ins Protoplasma eindringen zu lassen, resp. die zu diesem Prozeß benötigten Enzyme (zum Beispiel Adenosintriphosphorsäure [Hawker, 1950; Johnson in Lardy, 1950]) fortwährend neu aufzubauen. Der Adsorptionswert für Maltose fehlt leider; an seiner Stelle haben wir in Tabelle 34 denjenigen von Saccharose, einem Zucker, der nach Althaus (1950) ebenfalls sehr gut in die Zelle aufgenommen wird, benutzt. Das will nicht heißen, daß die Aufnahmegrößen der beiden Zucker übereinstimmen müssen, aber zur Illustration unseres Gedankens kann auch dieser Wert dienen. Die Werte der Tabelle 34 sind analog zu denen der Tabelle 33 in der Figur 11 eingetragen, mit dem Unterschied aber, daß wir einen beträchtlichen Teil der Aufnahme als Größe hinzugerechnet haben, die nicht durch die Beschaffenheit des Zuckers, sondern durch die Eigenschaften resp. die adenoide Tätigkeit der Zelle bedingt ist. Sowohl die spezifische Affinität der Zelle (Wertheimer, 1934) als auch die zum Transport eines bestimmten Zuckers benötigte Energie können verschieden groß sein. Es ließen sich daraus ungezwungen die Unterschiede in der Aufnahme sonst gleichwertiger Moleküle wie zum Beispiel der Hexosen Fructose, Glucose, Mannose, Galactose erklären.

Ich bin mir durchaus bewußt, daß die hier besprochenen Erscheinungen nicht die einzigen Einflüsse darstellen müssen, die die Größe der Zuckeraufnahme bedingen, zumal wir ja immer wieder durch die Vielfalt der Lebensäußerungen eines Organismus überrascht werden; doch scheint mir eine solche Deutung mit den allgemein biologischen Erkenntnissen nicht im Widerspruch zu stehen, finden wir doch in der untern Reihe (Glycerin—Lactose) tatsächlich diejenigen Kohlenhydrate, die von den meisten Organismen nicht oder nur schlecht verwertet werden können, während in der obern Reihe (Glucose—Raffinose) sich die auch in der Natur weitverbreiteten und vielbenützten Zucker befinden. Eine ganz ähnliche Feststellung macht Höber (1947, S. 586). Auch er interpretiert die Tatsache, daß Galactose, Glucose und in geringerem Maße Fructose weit rascher aufgenommen werden (Tabelle 35) als die kleineren Pentosen so, daß er zwei Vorgänge annimmt, die nebeneinander und sich überschneidend verlaufen: eine «aktive Selektion» und eine «passive Diffusion».

Zur Frage der *absoluten* Menge der ZA vergleiche wiederum Abschnitt 1 der «Experimentellen Ergebnisse» (S. 568). Die dort ermittelte, für Glucose gültige Größe

Tabelle 35

Relative Werte der Zuckeraufnahme an Darmschlingen von Ratten (nach Höber, 1947)

Galactose	115	Sorbose	30
Glucose	100	Xylose	30
Fructose	44	Arabinose	29
Mannose	33		

der «Anfangsaufnahme» der ersten 4 Minuten dürfen wir allerdings nicht einfach auf andere Zucker übertragen. Um wenigstens eine grobe Vorstellung von der wahrscheinlichen Größe dieser Adsorption zu erhalten, wurde in gleicher Weise wie bei der bevorzugt aufgenommenen Glucose die «Anfangsaufnahme» bei Mannit, einem Glied aus der Reihe der offenbar nicht aktiv aufgenommenen Zucker, festgestellt. Wir erhielten dabei eine Größe von *1,35 ± 0,92 mg* pro 40 cm³, einen Betrag, der zwar nahe an der Grenze der methodischen Abweichung liegt und deshalb relativ unsicher ist, der uns aber zum mindesten die Aussage erlaubt, daß *Mannit* auch in den ersten Minuten von der Zelloberfläche der Hefe *bedeutend schlechter adsorbiert wird als Glucose.* Wir finden hierin die Annahme von Wertheimer (1934) bestätigt, daß bereits die erste passive Bindung von Zucker an die Zelloberfläche eine *spezifische* ist. Allgemein dürfen wir auf Grund dieser Ergebnisse wohl annehmen, daß wir zu den X_m-Werten der obern Zuckerreihe der Figur 10 einen Betrag, der näher an den Glucosewert herankommt, hinzuzählen müssen, um die Gesamtmenge des aufgenommenen Zuckers zu erhalten, während bei der untern Reihe der Figur 10 eher ein Betrag in der Größenordnung des Mannit-Wertes zu addieren ist (s. a. Wertheimer, 1934).

Wir haben schon mehrmals behauptet, die Lactoseaufnahme sei gleich Null. In der Tabelle 30 finden wir einen Wert von 0,32 mg/40 cm³, der allerdings weit innerhalb der methodischen Abweichung liegt und deshalb keine reale Bedeutung zu haben braucht. Es gilt darum vorerst, diese Behauptung näher zu prüfen. Zu diesem Zweck greifen wir wieder, wie früher schon beschrieben (S. 595), auf ein großes Hefevolumen (zirka 4 %) zurück. Die Dichte der Hefesuspension wurde an verdünnten Suspensionen photometrisch bestimmt und auf Grund des mittleren Volumens einer Zelle das Gesamtvolumen der rund vierprozentigen Hefesuspension berechnet. Wir stellen so fest, daß in einer Suspension von 1 mm³ in dem hier betrachteten Falle 0,036 mm³ von den Hefen selbst beansprucht werden, das sind 3,6 %. Wenn wir nun zu einer solchen Suspension $^1/_{18}$ mol *Lactose,* zum Beispiel 0,76 g/40 cm³, geben und die Konzentration der Außenlösung refraktometrisch messen (wegen der hohen Suspensionsdichte müssen an jeder Meßprobe die Hefen zuerst herauszentrifugiert werden), so müßten wir nach einiger Zeit eine Abnahme der Konzentration finden, wenn Lactose in das Hefevolumen hineindiffundiert, und zwar eine Abnahme von 3,6 % der Ausgangskonzentration, wenn durch die Zellmembran hindurch ein Konzentrationsausgleich zwischen Außen- und Innenlösung stattgefunden hat. Nach einigen Stunden sollten wir also eine Verringerung der Außenkonzentration um *27,4 mg* (=3,6 % von 0,76 g) feststellen, wenn die letztere Annahme stimmen würde. Die Mittelwerte aus fünf der-

artigen Versuchen finden wir in Tabelle 36. Zur Kontrolle der Verdunstung wurde unter den gleichen Bedingungen ein Blindversuch (Lactose ohne Hefen) ausgeführt. In genau derselben Weise wurde außerdem das Eindringen von *Glucose* in total gelähmte Hefezellen untersucht ($< m/500$ MJE entsprechend den Warburg-Versuchen in Tabelle 28).

Tabelle 36

Aufnahme von Lactose durch ungehemmte und Aufnahme von Glucose durch total gelähmte Hefezellen

25° C — zirka 4 % Hefe — $^1/_{18}$ mol Lactose resp. Glucose

mg/40 cm³	nach 35′	nach 70′	nach 105′	nach 210′	Total [1]
Lactose	— 0,35	— 0,41	— 0,18	— 0,22	— 1,18
blind	+ 0,44	0	— 0,44	— 1,02	— 1,02
mg/40 cm³	nach 60′		nach 250′		Total
Glucose	+ 10,20		+ 3,40		+ 13,6
blind	+ 0,32		— 1,73		— 1,4

Das Gesamtvolumen der Hefen betrug hier 3,7 %, die Konzentration der Glucose ebenfalls $^1/_{18}$ mol) (= 0,4 g/40 cm³). Unter derselben Annahme wie oben würde das bedeuten, daß nach Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichtes der RW um *14,8 mg* (= 3,7 % von 0,4 g) niedriger gefunden werden müßte. Der Blindversuch wurde mit Glucose und MJE allein ausgeführt. Vergleichen wir nun die Werte der Tabelle 36 miteinander, so stellen wir in Übereinstimmung mit den Befunden von Wertheimer (1934) fest, *daß Lactose in meßbaren Mengen weder in die Zelle eingedrungen noch an ihre Oberfläche adsorbiert* worden sein kann. Die Lactoseversuche wurden bis zu zwei Tagen verschlossen stehen gelassen und der RW nachkontrolliert; es konnte auch in dieser Zeit keine Abnahme der Außenkonzentration festgestellt werden. Im Gegensatz dazu stellen wir aber fest, daß Glucose, wie wir dies schon früher an vierpromilliger Suspension fanden, in beträchtlichem Maße — rund 14 mg/40 cm³ — aufgenommen worden ist. Es scheint sich also hier tatsächlich um die «*physikalisch bedingte Aufnahme*» zu handeln, wohingegen das Lactosemolekül weder adsorbiert wird, noch — wohl seiner Größe wegen — zu einer freien Diffusion durch die Zellgrenzschicht geeignet ist. Wir gehen darum kaum stark fehl, wenn wir annehmen, daß in Figur 10 die Linie Glycerin—Lactose ungefähr die Größe der «physikalisch bedingten Aufnahme» wiedergibt, während die darüberliegenden Punkte als Maß für

[1] Negative Aufnahme bedeutet: Verdunsten von Wasser während der zirka 4 Versuchsstunden, dadurch Konzentrierung der Außenlösung.

die «*physiologische Permeabilität*» (Höber, 1947) zu betrachten sind. Wir können dann weiter aus der Figur 10 schließen, daß die energetische Leistung der Zelle für die Aufnahme von Glucose/Fructose—Maltose—Raffinose ungefähr gleich groß sein muß (mehr oder weniger gleiche Höhe über der «physikalischen Linie» [1].

Wie wir bei der Besprechung der «Anfangsaufnahme» (S. 568 ff.) gesehen haben, ist am Beispiel der Glucose die als Adsorption gedeutete Anfangsaufnahme nach 4 Minuten erst bis zu rund 80 % abgeschlossen. Wir müssen uns also vor Augen halten, daß auch noch ein kleiner Betrag der X_m-Werte die Folge reiner Adsorption sein kann. Dieser fällt allerdings nicht ins Gewicht, solange die X_m-Werte nicht sehr klein werden. Gerade hier aber, wo bei der passiven Aufnahme die gemessenen Werte nur wenige Male größer sind als die methodische Abweichung, durfte dieser Hinweis nicht übergangen werden. Möglicherweise werden auch die verschiedenen Zucker und Alkohole nicht gleich rasch adsorbiert, so daß auch dadurch Verschiebungen im Verhältnis von *vor* und *nach* der 4. Minute aufgenommenem Zucker eintreten können. Auf alle Fälle können wir auf Grund unserer refraktorisch gewonnenen Werte nicht aussagen, wieviel Zucker durch *reine* Diffusion in die Zelle hineingelangt ist. Der Begriff « physikalisch bedingte Aufnahme » darf hier folglich nur als *Summe* von Adsorption und Diffusion («physikalische Permeabilität» im Sinne Höbers) aufgefaßt werden.

Nach Tabelle 9 (auf S. 561) wird zwar Glycerin normalerweise doppelt (Diatomeen) bis zwanzig- und mehrmal (diverse Algen) so gut aufgenommen wie Glucose, während in unserm Falle die Glycerinaufnahme nur rund 1/2mal größer ist als die physikalische Glucoseaufnahme. Ich glaube nicht, daß wir deshalb berechtigt sind, eine größere Permeabilität des Hefeprotoplasten für Glucose oder Zucker allgemein anzunehmen. Diese Beobachtung scheint vielmehr die eben gemachte Vermutung zu bestärken, daß mit unserer Methode noch ein kleiner Teil reiner Adsorption mitgemessen wird. Zudem scheint es unwahrscheinlich, daß die gesamte Menge der eingedrungenen Glucose nachher in der Zell*vakuole* wiedergefunden wird (vgl. Wiersum, 1947, Arisz, 1948), weshalb die hier gefundenen Werte ohnehin nicht mit den «klassischen» Permeabilitätsbestimmungen direkt vergleichbar sind.

Die Feststellung dieser physikalischen Permeabilität widerlegt die Ansicht von Wertheimer (1934) nicht, daß nämlich der erste Schritt der Zuckeraufnahme eine Adsorption an die Oberfläche der Zelle sei. Im Gegenteil, die immer wieder gemachte Feststellung, daß in den ersten paar Minuten, wo die energieliefernden Prozesse noch klein und erst im Anlaufen begriffen sind, die Zuckeraufnahme aber durchwegs groß ist, legt eine solche Annahme sogar nahe. Die Folgerung Wertheimers aber, daß die Zucker an der Zelloberfläche gespalten werden und erst als Bruchstücke (C_3-Körper) in die Zelle hineindiffundieren, scheint der nötigen Beweise zu ermangeln. Es ist uns aus einer reichhaltigen Literatur (u. a. Euler, 1934) bekannt, daß die Spaltung der Zucker erst nach vorgängiger Phosphorylierung erfolgt. Phosphorylierungen verlangen aber vorerst beträchtliche Mengen von Energie (Aufbau von P übertragenden Enzymen, siehe auch James, 1946).

---

[1] Versuche zur Feststellung des Energiegewinns aus den verschiedenen untersuchten Zuckern und unter denselben Bedingungen wie hier können in dieser Richtung interessante Ergebnisse liefern; sie sind bereits in Angriff genommen.

Es wäre darum kaum erklärlich, woher unsere MJE-gelähmten und praktisch energiefreien Zellen die benötigte Energie hernehmen sollten, um auf diese Weise die in unserm Beispiel zum Konzentrationsausgleich festgestellten 14 mg Glucose pro 40 cm^3 ins Zellinnere zu befördern. Unsere Versuchsergebnisse sagen zwar in dieser Richtung nicht viel aus, doch möchte ich immerhin diesen Einwand zu bedenken geben.

Wenn wir nun die Versuche mit verschiedenen Zuckern nochmals überblicken, so können wir folgende Ergebnisse festhalten:

1. Die Größe der Zuckeraufnahme ist offenbar vor allem bedingt durch:
   a) die Größe des eindringenden Moleküls,
   b) die spezifische Affinität der Zelloberfläche zu den einzelnen *Zuckern,*
   c) den Energieaufwand der Hefezelle, wobei die Zelle sich nur bei bestimmten Zuckern *aktiv* an der Aufnahme zu beteiligen scheint (physiologische Permeabilität).
2. Lactose wird von den Zellen der Bäckerhefe nicht aufgenommen; ihre Verwertbarkeit ist also primär eine Frage der Permeabilität. Damit ist nichts ausgesagt über das Vorhandensein oder Fehlen eines lactoseabbauenden Enzyms.

III. Allgemeine Betrachtungen

Wir haben in dieser Arbeit versucht, die Zuckeraufnahme in Abhängigkeit von verschiedenen äußern und innern Bedingungen festzulegen und dabei womöglich Aufklärung zu erhalten über die Zusammenhänge zwischen Zuckeraufnahme und Energiehaushalt der Zelle. Wenn wir die Zuckeraufnahme in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration vergleichen mit den Atmungsversuchen von Geiger-Huber (1930), so stellen wir eine praktisch gleichsinnige Änderung in bezug auf die Größe der Werte bei beiden Vorgängen fest. Wir können daraus schließen, daß Aufnahme und Energieproduktion eng miteinander verknüpft sind, wir wissen aber noch nicht, wer wen bedingt. Dieselbe Erscheinung finden wir wieder bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Zuckeraufnahme und des Zuckerverbrauchs. Die Optima der beiden Vorgänge stimmen ausgezeichnet überein, während zum Beispiel die Kurve der Glykogenbildung (Althaus, 1950) sich nicht mit den andern beiden Kurven deckt. Die Annahme, daß durch sofortige Verwandlung des eventuell passiv hereindiffundierenden Zuckers in Glykogen ständig ein großes Konzentrationsgefälle aufrechterhalten werde, läßt sich also *nicht* oder nur sehr beschränkt zu einer Erklärung der Zuckeraufnahme heranziehen. Hingegen können wir aus der Übereinstimmung der Optimumskurven von Zuckeraufnahme und Zuckerverbrauch bereits deutlich heraus-

lesen, daß es sich um einen vitalen Vorgang handeln muß. Noch augenfälliger werden die Zusammenhänge, wenn wir die Konzentrationsabhängigkeit einer nähern Betrachtung unterziehen. Wir haben hier festgestellt, daß die Zuckeraufnahme ein flaches, aber sehr hohes Optimum zwischen 0,25 und 1 % Glucose besitzt und beidseits, d. h. gegen 0,0625 % und gegen 8 % Glucose, stark abfällt, während die Summe der energieliefernden Reaktionen (Atmung, Gärung) praktisch konstant bleibt. Dies läßt uns klar erkennen, daß die *Größe des Zuckerverbrauchs nicht von der Größe der Aufnahme* abhängt (vorausgesetzt, daß diese mindestens so groß ist wie der Verbrauch), sonst müßten wir bei 0,0625 und bei 4 % Glucose, wo die Aufnahme gleich groß ist, dasselbe Verhältnis von ZA : ZV vorfinden, was jedoch nicht der Fall ist. Wir müssen hieraus schließen, daß die zur *Verfügung gestellte Energie für die Größe der Zuckeraufnahme maßgebend* ist, und begreifen dann, warum die beiden Kurven nicht gleichsinnig verlaufen. Auf Grund seiner Untersuchungen stellt Geiger-Huber (1934) fest (S. 24): «... wenn die Zelle (d. h. ihr Fermentsystem) mit Zucker gesättigt ist, so bewirkt eine weitere Zuckerzugabe keine Steigerung (der Atmung) mehr. Nach der Lehre Blackmans (1905) würde bei höhern Zuckerkonzentrationen also das Atmungsferment ins Minimum kommen und als „begrenzender Faktor" wirken.» Dies scheint bei unserer kleinsten Zuckerkonzentration (0,0625 %) bereits der Fall zu sein, so daß nur noch die schwach ansteigende Gärung, die energetisch allerdings nicht sehr ins Gewicht fällt, eine leichte Erhöhung des Energiegewinns bewirken kann. Daß aber bei praktisch gleichbleibender Energieproduktion mit steigender Konzentration der Zuckerlösung eine *Abnahme* der Größe der Zuckeraufnahme eintreten *muß,* scheint wohl verständlich, wenn man bedenkt, daß mit zunehmender Zuckerkonzentration (das bedeutet Wasserentzug) sowohl die Viscosität des Plasmas als auch die Viscosität der Zuckerlösung selbst stetig zunehmen. (Über Viscosität des Protoplasmas vgl. auch Stålfelt, 1949.)

Im Gegensatz zu den eigentlichen Narkotica blockiert die Blausäure lediglich die Schwermetalle der Atmungs- und Gärungsenzyme, ohne einen großen Einfluß auf die Zelloberfläche auszuüben. Durch einen solchen Eingriff beeinflussen wir also zum weitaus größten Teil nur den Energiehaushalt der Zelle. Daß bei zunehmender HCN-Vergiftung die Zuckeraufnahme *nicht abnimmt* oder gleichbleibt, sondern infolge des stark gesteigerten Zuckerverbrauchs durch die erhöhte Gärung noch beträchtlich *zunimmt,* beweist einerseits die eben gemachte Aussage und anderseits wieder die Tatsache, daß der Zuckerverbrauch *nicht* abhängig ist von der Aufnahme, sondern umgekehrt. Eine vermehrte Aufnahme trotz kleinerer Energieausbeute haben wir darauf zurückgeführt, daß im «Normalzustand» die Hefe nur einen Teil der Energie für die Zuckeraufnahme verwendet, während der

andere Teil zur Glykogenbildung und zu andern Funktionen (vermutlich Proteinsynthese, Steward, 1936) zur Verfügung steht. Bei gehemmter Atmung und dadurch gesteigerter Gärung (*m*/1000 HCN) muß nun offenbar fast alle Energie für die Zuckeraufnahme verwendet werden. Wir können bei dieser Konzentration nur noch spärlich Glykogen nachweisen. Nach all diesen Beobachtungen scheint es außer Zweifel zu stehen, daß die Größe der Zuckeraufnahme zur Hauptsache durch die *adenoide Tätigkeit* der Zelle bedingt ist (Overton, 1895).

Bei der Untersuchung der Aufnahmefähigkeit der Hefezellen für verschiedene Zucker und Alkohole haben wir eine weitgehende Übereinstimmung gefunden mit den Ergebnissen von Fleischmann (1928), daß nämlich Alkohole viel schlechter aufgenommen werden als die entsprechenden Zucker, und auch mit den Beobachtungen von Althaus (1950) betreffend Glykogenbildung. Wir haben ferner festgestellt, daß die verschieden große Aufnahme der einzelnen Zucker weder durch ihre Lipoidlöslichkeit, noch durch ihre Molekülgröße, noch auch durch ihre Adsorbierbarkeit an feste Oberflächen allein erklärt werden kann. Dabei sind wir zur Anschauung gelangt, daß die Hefeoberfläche eine *spezifische Affinität* zu gewissen Zuckern besitzt und daß solche unter Arbeitsleistung der Zelle aufgenommen werden, während die übrigen lediglich auf Grund der physikalischen Permeabilität durch die Plasmamembran eindringen; da Versuchsbedingungen gewählt wurden, bei denen die Hefe sich nicht teilt und nicht wächst, kann hier von einem Energieverbrauch für Wachstum abgesehen werden.

Auf Grund der Beobachtung, daß assimilierbare Zucker in allen Fällen in den ersten paar Minuten sehr rasch aus der Lösung aufgenommen werden, scheint eine Adsorption an die Zelloberfläche im Sinne Wertheimers (1934) wahrscheinlich, doch halte ich seine weiteren Behauptungen (Spaltung in C_3-Körper) schon aus energetischen Gründen (siehe Versuche mit gelähmten und energielosen Zellen) nicht für stichhaltig.

Über den Mechanismus der Zuckeraufnahme können wir nichts Bestimmtes aussagen. Nach Angaben der neueren Literatur scheinen Phosphorylierungsprozesse dabei eine Rolle zu spielen. Es wäre auch denkbar, daß die in dieser Arbeit als «Affinität» bezeichnete Größe ein Maß ist für die Willigkeit der einzelnen Zucker, sich phosphorylieren zu lassen, daß also in dem Maße, wie Zuckermoleküle an der Zelloberfläche phosphoryliert und dadurch permeierfähig gemacht werden, andere Moleküle an die freigewordenen Adsorptionsorte nachrücken würden. So wissen wir zum Beispiel, wie früher bereits zitiert (James, 1946), daß Furanosen, wie Saccharose oder Raffinose, viel leichter phosphoryliert werden als Pyranosen, was mit ein Grund sein

könnte, daß das große Raffinosemolekül noch relativ gut, das Lactosemolekül jedoch überhaupt nicht aufgenommen wird. Leider geben unsere Versuche in dieser Hinsicht kaum Aufschluß.

Berichtigung: Ich gestatte mir hier, den Leser darauf aufmerksam zu machen, daß in «Annual Review of Physiology» 7 (1945), S. 11, die Tabelle 9 von Musfeld (1942, S. 612) falsch abgedruckt ist. Es muß heißen:

in Kolonne "Concentration of Suspension"	Kolonne "Oxygen used":			Kolonne "Glucose used" (calculated):		
‰ anstatt %	0,63	anstatt	0,60	1,22	anstatt	12,2
	0,97		0,63	1,93		19,2
	0,60		0,60	0,93		9,1
	0,69		0,69	1,83		17,3

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Methodischer Teil

1. Die Zuckeraufnahme und der Zuckerverbrauch von nicht wachsenden Hefezellen (Bäckerhefe) wurden unter verschiedenen Bedingungen untersucht.
2. Atmung und Gärung als Maß für den Zuckerverbrauch wurden manometrisch gemessen; für die Erfassung der Zuckeraufnahme wurde eine refraktometrische Methode ausgearbeitet, die erlaubt, in kurzen Zeitintervallen (6 Minuten) und in kleinen Flüssigkeitsproben (1 Tropfen) den Zuckergehalt zu bestimmen.
3. Die Bestimmung der Zellenzahl der Hefesuspensionen (meistens 4 ‰) geschah photoelektrisch.
4. Oberfläche und Volumen der Hefezelle wurden berechnet, nachdem die Durchmesser D und d bestimmt waren. Es werden Formeln gegeben, die die Berechnung des mittleren d^2 resp. d^3 in Abhängigkeit von σ der Frequenzkurve gestatten, sowie der Oberfläche und des Volumens auf Grund einer Eiform mit dem Achsenverhältnis $D/d = 1{,}293$. Es wurden so bestimmt:

mittlere Länge einer Zelle . . .	$D = 5{,}85\ \mu$	$\sigma_D = \pm 1{,}36$
mittlere Breite	$d = 4{,}57\ \mu$	$\sigma_d = \pm 1{,}18$
mittlere Oberfläche	$O = 83{,}3\ \mu^2$	
mittleres Volumen	$V = 77{,}0\ \mu^3$	

Physiologischer Teil

5. Die *Zuckeraufnahme* wurde stets *größer* gefunden als der entsprechende *Zuckerverbrauch,* je nach Bedingungen zwei- bis fünfmal.

6. Es wurde festgestellt, daß kein Unterschied besteht in der Aufnahmegeschwindigkeit von α- und β-Glucose und daß die Hefen die Geschwindigkeit der Mutarotation nicht beeinflussen.
7. Die Abhängigkeit der Zuckeraufnahme von der Wasserstoffionenkonzentration ist zwischen *p*H 4—8 gering und entspricht derjenigen der Atmung bei Hefen (Geiger-Huber, 1930).
8. Die Kurve der Konzentrationsabhängigkeit der Zucker*aufnahme* zeigt ein breites, aber ausgesprochenes Optimum zwischen 0,25 % und 1 % Glucose (= $^1/_{72}$—$^1/_{18}$ mol). Nach beiden Seiten fallen die Werte stark ab, während über den ganzen Bereich (0,0625 bis 8 % Glucose) die *energieliefernden* Reaktionen (Atmung, Gärung) eine fast konstante Größe zeigen.
9. Aufnahme und Verbrauch des Zuckers zeigen ein ausgeprägtes Temperaturoptimum zwischen 35° und 40° C. Die Kurve der Glykogenbildung, an denselben Hefen von Althaus (1950) untersucht, zeigt ein Optimum bei zirka 34° C, läßt sich aber nur unvollständig mit der Kurve der Zuckeraufnahme zur Deckung bringen. Es wird daraus und aus andern Indizien geschlossen, daß die Glykogenbildung *nicht* als Hauptursache der Zuckeraufnahme zu betrachten ist.
10. Bei zunehmender HCN-Vergiftung sinkt die Atmung kontinuierlich, während die Gärung vorerst bis fast auf ihren anaeroben Wert zunimmt, die Zuckeraufnahme beträchtlich erhöht wird, und Glykogen immer langsamer und spärlicher auftritt. Erst hohe HCN-Konzentrationen vermögen Gärung und Zuckeraufnahme zu hemmen.
11. Diese Ergebnisse führen zur Anschauung, daß *Zuckeraufnahme* und *Energiehaushalt* der Zelle eng verknüpft sind und die Zelle für eine normale Zuckeraufnahme Arbeit leisten muß; es ist dabei gleichgültig, ob die benötigte Energie von der Atmung oder Gärung geliefert wird.
12. Der Energiegewinn aus Zucker (Glucose) ist unter aeroben Verhältnissen etwa viermal größer als unter anaeroben (25—30° C). Bei forcierter Zuckeraufnahme, wie sie dem erhöhten Zuckerumsatz bei Steigerung der Gärung durch geeignete Vergiftung entspricht, wird mehr Energie benötigt; da die zwar erhöhte, energetisch aber wenig ergiebige Gärung keinen genügenden Überschuß davon liefern kann, wird die Glykogenbildung entsprechend beeinträchtigt.
13. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen muß gefolgert werden, daß die normale Zuckeraufnahme aus einer *passiven* und einer *aktiven* Aufnahme (adenoiden nach Overton) besteht; geeignete Vergiftung der Zellen mit Monojodessigsäure erlaubt, beide Vorgänge einigermaßen zu trennen und ihre Größe

zu bestimmen. Es nahmen zum Beispiel $2083 \cdot 10^6$ Zellen bei 25° C aus einer Lösung von $^1/_{18}$ mol (= 1 %) Glucose in 48 Minuten 18,5 mg Zucker auf (= $10{,}38 \cdot 10^6$ Moleküle pro Zelle und s resp. $3{,}70 \cdot 10^{-9}$ g pro cm^2 Zellenoberfläche und s); etwa drei Viertel bis vier Fünftel davon entfallen auf die aktive Aufnahme, der Rest auf die passive.

14. Die ermittelten Werte für die Aufnahme *verschiedener Zucker* und höherer Alkohole durch Hefezellen bestätigen die Befunde Fleischmanns (1928), daß Alkohole viel schlechter aufgenommen werden als die entsprechenden Zucker. Die Geschwindigkeit der Aufnahme verschiedener Zucker deckt sich relativ gut mit jener der Glykogenbildung nach Althaus (1950), außer bei Maltose. Die erheblichen Unterschiede in der Aufnahme der Zucker können aber weder durch Unterschiede in der Molekülgröße, noch in der Lipoidlöslichkeit, noch in der unspezifischen Adsorption an Oberflächen allein erklärt werden.
15. Die unterschiedliche Aufnahme der verschiedenen Zucker deutet darauf hin, daß die Zelle eine *spezifische* «Affinität» zu gewissen Zuckern besitzt, die sie aktiv in die Zelle hinein befördert, während andere lediglich auf Grund der «physikalischen Permeabilität» in die Zelle eindringen. Es wird versucht, für gewisse Gesetzmäßigkeiten (siehe Figur 10) eine Erklärung zu finden.
16. Die speziellen Unterschiede in der Aufnahme von Glucose und Lactose wurden an geeigneten Hefesuspensionen (zirka 4 %) näher studiert. Lactose dringt überhaupt nicht, auch nicht nach mehreren Tagen, in die Zelle ein; die Nichtverwertbarkeit der Lactose durch Bäckerhefe ist also primär eine Frage der Permeabilität. Glucose hingegen vermag auch in Zellen mit total gehemmtem Energiehaushalt (*m*/1000 Monojodessigsäure oder Temperatur 0° C) einzudringen, und zwar nach einigen Stunden in einem Ausmaß, das ungefähr einem Konzentrationsausgleich zwischen Innen- und Außenlösung der Zelle entsprechen würde. Die Annahme einer rein physikalischen Permeabilität bei Zellen mit unterdrückter Energieproduktion wird dadurch offenkundig.
17. Die immer wieder gemachte Beobachtung, über die auch in der Literatur mehrfach berichtet wird, wonach Zucker in den ersten Minuten, wo die energieliefernden Reaktionen am kleinsten sind, am raschesten aus der Außenlösung verschwinden (siehe Figur 2), legt die Annahme nahe, daß der erste Schritt der Aufnahme eine spezifische Adsorption an die Zelloberfläche im Sinne Wertheimers (1934) darstellt; seine weitern Behauptungen jedoch (Spaltung der Zucker in C_3-Moleküle vor dem Eindringen) müssen auf Grund eigener Erfahrungen als unwahrscheinlich angesehen werden.

Vorliegende Arbeit wurde ausgeführt im Botanischen Institut der Universität Basel auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber. Es sei mir gestattet, ihm hier meinen herzlichen Dank auszusprechen für die wertvollen Anregungen während der Arbeit und die tatkräftige Unterstützung durch die Beschaffung aller nötigen Mittel.

Botanisches Institut der Universität Basel.

Zitierte Literatur

Althaus, H., 1950. Versuche über die Bildung von Glykogen in Hefezellen. Tätigkeitsber. Natf. Ges. Baselland **18** (99—155) und Diss. Basel.

Anselmino, K. J., 1928. Versuche über Permeabilität und Narkose. Pflügers Archiv **220** (524—538).

Arisz, W. H., 1948. Uptake and Transport of Chlorine by Parenchymatic Tissue of Leaves of *Vallisneria spiralis*. Reprinted from: Proc. Nederl. Akad. v. Wetensch. **50** (9 und 10), 1947, **51** (1), 1948.

Äyräpää, T., 1950. On the Base Permeability of Yeast. Physiologia Plantarum **3** (402—429).

Bamann und Myrbäck, 1941. Die Methoden der Fermentforschung. Leipzig.

Barron, E. S. G., 1943. Mechanisms of Carbohydrate Metabolism. Advances in Enzymology **3** (151 ff.).

Beckurts, H., 1913. Maßanalyse. Braunschweig.

Belehradek, J., 1935. Temperature and Living Matter. Protoplasma-Monographien (Bornträger). Berlin.

Bernhauer, K., 1939. Gärungschemisches Praktikum. Berlin.

Bersin, Th., 1938. Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig.

Brooks, S. C., 1945. Permeability. Ann. Rev. of Physiol. **7**, 1—33.

— 1947. Permeability and Enzyme Reactions. Advances in Enzymology **7** (1 ff.).

Brown, H. T., 1914. Some Studies on Yeast. Annals of Botany **28** (217).

Collander, R., 1921. Über die Permeabilität pflanzl. Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. Pringsheim, Jahrb. wiss. Bot. **60** (354).

— 1936. Der Zellsaft der Characeen. Protoplasma **25** (201—210).

— 1937. Einige neuere Ergebnisse und Probleme der bot. Permeabilitätsforschung. Schrift der Physiol. Ökon. Gesellschaft Königsberg **69**, Heft 2—4.

— 1949. The Permeability of Plant Protoplasts to Small Molecules. Physiologia Plantarum **2** (300—311).

— 1950. The Permeability of Nitella Cell's to Rapidly Penetrating Non-Electrolytes. Physiologia Plantarum **3** (45—57).

— und Bärlund, H., 1933. Permeabilitätsstudien an *Chara ceratophylla* II. Die Permeabilität für Nichtelektrolyte. Acta Bot. Fenn. **11** (1—114).

— und Holmström, A., 1937. Die Aufnahme von Sulfosäurefarbstoffen seitens der pflanzl. Zellen — ein Beispiel der adenoiden Tätigkeit der Protoplasten. Acta Soc. pro Fauna et Flora Fenn. **60** (129—135).

Cori, C. F., and Cori, G. T., 1946. Carbohydrate Metabolism. Ann. Rev. of Biochemistry **15**.

Czaja, Th. A., 1935. Der Membran- oder Poreneffekt des Absorptionsgewebes und seine physiologische Bedeutung. Planta **24** (527—529).

Czapek, K., 1914. Weitere Beiträge zur Physiologie der Stoffaufnahme in die lebende Pflanzenzelle. Int. Ztsch. f. phys.-chem. Biologie. Band I, 1. u. 2. Heft.

Delf, E. M., 1916. Studies of Protoplasmic Permeability by Measurement of Rate of Shrinkage of Turgid Tissue. I. The Influence of Temp. on the Permeability of Protoplasm to Water. Annals of Botany **30** (283).

Dixon, M., 1943. Manometric Methods. Cambridge University Press.

v. Euler, H., 1934. Chemie der Enzyme. Die Katalasen und die Enzyme der Oxydation und Reduktion (II. Teil). München.

Fidler, J. C., 1948. The Conserving Influence of Oxygen on Respirable Substrate. Annals of Bot. N. S. **12** (421—426).

Fisher, R. A., 1946. Statistical Methods for Research Workers. Edinburgh and London.

— and Yates, 1948. Statistical Tables for biological, agricultural and medical Research. Edinburgh and London.

Fleischmann, W., 1928. Untersuchungen der Permeabilität für Kohlenhydrate. Pflügers Archiv **220** (448—465).

Foster, J. W., 1949. Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York.

Galli, A., 1946. Über die Bildung von Ascorbinsäure und ihre Stellung im Stoffwechsel von *Aspergillus niger*. Diss. Basel und Ber. Schweiz. Bot. Ges. **56.**

Geiger-Huber, M., 1930. Über die Beeinflussung der Hefeatmung durch Neutralrot. Proc. Kon. Acad. v. Wetensch. **33** (1059).

— 1934. Über den Einfluß der Konzentration des Atmungsmaterials auf die Atmungsgeschwindigkeit von Pflanzen. Jahrb. wiss. Bot. **81** (Heft 1, 1—32).

Giltay und Aberson, 1894. Über den Einfluß des Sauerstoffzutritts auf Alkohol- und Kohlensäurebildung bei der alkoholischen Gärung. Jahrb. wiss. Bot. **26** (543—586).

Hawker, L. E., 1950. Physiology of Fungi. University of London Press.

Heilbronn, A., 1914. Narkose im Pflanzenreich. Die Naturwissenschaften **48,** Berlin.

Höber, R., 1947. Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. (Stämpfli) Bern.

Höfler, H., 1926. Über die Zuckerpermeabilität plasmolysierter Protoplasten. Planta **2** (454—475).

— 1931. Das Permeabilitätsproblem und seine anatomischen Grundlagen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **49** (79).

— 1934. Neuere Ergebnisse der vergleichenden Permeabilitätsforschung. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **52** (355).

— 1940. Aus der Protoplasmatik der Diatomeen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **58** (97).

— 1942. Unsere derzeitige Kenntnis von den spezifischen Permeabilitätsreihen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **60** (179).

James, W. O., 1946. Respiration of Plants. Ann. Rev. of Biochemistry **15.**

Karrer, P., 1943. Lehrbuch der organischen Chemie. Leizpig.

Klein, G., 1931. Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien.

Koller, S., 1940. Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. Dresden und Leipzig.

Kopac, M. J., 1950. Physical Properties of Protoplasm. Ann. Rev. of Physiology **12.**

Kopaczewski, W., 1934. Problème de la perméabilité cellulaire. Protoplasma **21** (433—468).

Lardy, H. A., 1950. Respiratory Enzymes. Burgess Publishing Company, Minneapolis.

Lippmann, E., 1904. Chemie der Zuckerarten. Braunschweig.

Löwe, F., 1943. Optische Messungen des Chemikers und des Mediziners. Dresden und Leipzig.

Lundegardh, H., 1914. Einige Bedingungen der Bildung und Auflösung der Stärke. Jahrb. wiss. Bot. **53** (421).

Maclean und Hoffert, 1923. Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel der Hefen. Biochem. Journ. **17** (720—741).

Malm, M., 1948. Die Permeabilität der Hefezellen. Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi **25** (1—187).

Medwedew und Chomitsch, 1937. Über die Veränderungen der biologischen Eigenschaften der Hefen beim Waschen. Planta **26** (303—310).

Meyer, K. H., 1943. The Chemistry of Glycogen. Advances in Enzymology **3** (131).

Meyerhof, O., 1925. Über den Einfluß des Sauerstoffs auf die alkoholische Gärung der Hefe. Biochem. Ztsch. **162** (43—86).

Musfeld, W., 1942. Versuche über die Aufnahme von Zucker durch Hefezellen. Diss. Basel und Ber. Schweiz. Bot. Ges. **52** (583—620).

Neuberg, C., 1946. The Biochemistry of Yeast. Ann. Rev. of Biochem. **15** (435—474).

Neuweiler, W., 1933. Quantitative Bestimmungen des Blutzuckers mittels des Stufenphotometers.

Nyman, M. A. und Chargaff, E., 1949. Journ. of Biol. Chem. **180** (2), zitiert in: Biological Abstracts 1950.

Osterhout, W. J. V., 1933. Some Aspects of Cell Physiology. Ann. of Internal Med. **7,** III (396).

— 1936 (1947). The Absorption of Electrolytes in large Plant Cells. Bot. Rev. **2** (283—315). Ergänzungen in: Bot. Rev. **13** (194—215).

— and Hill, 1933. Anesthesia produced by distilled Water. Journ. Gen. Physiol. **17,** I (87—98).

— Kamerling, S. E., und Stanley, W. M., 1934. The Kinetics of Penetration. Journ. Gen. Physiol. **17,** III (445—467).

Overton, E., 1895. Allgemeine osmotische Eigenschaften der Zelle. Vierteljahresschrift Naturf. Ges. Zürich **44** (88).

Peat, S., 1946. Plant Carbohydrates. Ann. Rev. of Biochem. **15.**

Pfeffer, W., 1895. Über Election organischer Nährstoffe. Jahrb. wiss. Bot. **28** (207).

Pütter, A., 1929. Auswertung zahlenmäßiger Beobachtungen in der Biologie. Berlin.

Reimesch, E., 1934. Die Bedeutung der Hefeverteilung im Nährmedium für den Gärungsverlauf. Zentralbl. f. Bakt. 1934, Abt. II (218—225).

Reinhard, A.-W., 1923. De l'influence de la lumière sur la multiplication de la levure. C. R. Soc. Biol. **89** (1080—1082).

Rothstein and Meier, 1948. The Relationship of the Cell Surface to Metabolism: I. Phosphatases in the Cell Surface of Living Yeast Cells. Journ. Cellular Comp. Physiol. **32** (77).

— and Larrabee, 1948. II. The Cell Surface of Yeast as the Cite of Inhibition of Glucose Metabolism by Uranium. Journ. Cellular Comp. Physiol. **32** (247—259).

Rothstein, Frenkel and Larrabee, 1948. III. Certain Characteristics of the Uranium Complex with Cell Surface Groups of Yeast. Journ. Cellular Comp. Physiol. **32** (261—274).

Rottenburg, W., 1943. Die Plasmapermeabilität für Harnstoff und Glycerin in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Flora N. F. **37** (230—267).

Ruhland, W., und Hoffmann, C., 1926. Die Permeabilität von *Beggiatoa mirabilis,* ein Beitrag zur Ultrafiltertheorie des Plasmas. Planta **1** (1—83).

Runnström und Sperber, 1938. Zur Kenntnis der Beziehungen zwischen Permeabilität und Stoffwechsel der Hefezellen. Biochem. Ztsch. **298** (340—367).

Schmidt, H., 1933. Plasmolyse und Permeabilität. Jahrb. wiss. Bot. **86** (470).

Schönfelder, S., 1930. Weitere Untersuchungen über die Permeabilität von *Beggiatoa mirab.* Planta **12** (414—504).

Schopfer, W.-H., 1933. Sur une application de la méthode réfractométrique à la mesure de la concentration des milieux de culture. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **42** (135).

Seifriz, W., 1923. Observations on the Reaction of Protoplasm to some Reagents. Annals of Bot. **37** (489).

— 1945. Physical Properties of Protoplasm. Ann. Rev. of Physiol. **7.**

— 1947. The Properties of Protoplasm. Advances in Enzymology **7** (35).

Skene, M., 1943. The Permeability of the Cell Wall. Annals of Bot. N. S. **7** (261—273).

Stålfelt, M. G., 1949. The Lability of the Protoplasmic Viscosity. Physiol. Plantarum **2,** 4 (341—349). Zitiert in: Biological Abstracts 1950.

Steward, F., 1936. The Absorption and Accumulation of Solutes by living Plant Cells. Ann. of Bot. **50** (345—366).

Sumner, J. B., und Myrbäck, K., 1950. The Enzymes. Vol. I, Part. I. Academic Press, New York.

Treadwell, F. P., 1940. Lehrbuch der analyt. Chemie, II. Wien.

Wagner, B., 1928. Tabellen zum Eintauch-Refraktometer. Sondershausen.

Warburg, O., 1926. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin.

— 1927 a. Über den Stoffwechsel der Hefe. Biochem. Ztsch. **189** (350—353).

— 1928. Über die katalytischen Wirkungen der lebenden Substanz. Berlin.

— 1948. Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin.

Wartiovaara, V., 1942. Über die Temperaturabhängigkeit der Protoplasmapermeabilität. Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. **16** (1).

Weichsel, G., 1937. Zuckerbestimmung durch Vergärung im Warburg-Apparat. Planta **26** (19—27).

Wertheimer, E., 1934. Über die ersten Anfänge der Zuckerassimilation. Protoplasma **21** (522—561).

Wiersum, L. K., 1947. Transfer of Solutes across the Young Root. Rec. Trav. bot. néerl. **41,** 1946/1947 (1—79).

Zehetner, H., 1934. Untersuchungen über die Alkoholpermeabilität des Protoplasten. Jahrb. wiss. Bot. **80** (505—566).

ANHANG

Tabellen zum Eintauch-Refraktometer

20° C

Arabinose
Xylose
Mannit
Mannose
Fructose + H_2O
Glucose
Galactose
Maltose
Lactose + H_2O
Raffinose + $5H_2O$

mit Hilfstabelle zum Interpolieren der Skalenteil-Dezimalen

Tabellen zur refraktometrischen Bestimmung von

Arabinose – Xylose – Mannit 20° C

Skt.	%g Arabinose	Xylose	Mannit
14,5	0,00	0,00	0,00
15	0,140	0,140	0,135
16	0,415	0,425	0,405
17	0,695	0,710	0,680
18	0,975	0,995	0,950
19	1,250	1,275	1,220
20	1,525	1,555	1,490
21	1,800	1,840	1,755
22	2,075	2,120	2,025
23	2,350	2,405	2,290
24	2,625	2,690	2,555
25	2,900	2,970	2,825
26	3,175	3,245	3,090
27	3,450	3,520	3,360
28	3,725	3,800	3,625
29	4,000	4,080	3,890
30	4,275	4,355	4,160
31	4,550	4,635	4,425
32	4,820	4,910	4,695
33	5,090	5,190	4,960
34	5,365	5,465	5,225
35	5,635	5,740	5,495
36	5,905	6,015	5,760
37	6,175	6,290	6,030
38	6,445	6,570	6,295
39	6,715	6,845	6,560
40	6,980	7,115	6,830
41	7,250	7,390	7,095
42	7,520	7,665	7,365
43	7,790	7,940	7,630
44	8,060	8,220	7,900
45	8,330	8,495	8,170
46	8,600	8,770	8,435
47	8,870	9,045	8,705
48	9,135	9,320	8,970
49	9,405	9,595	9,235
50	9,675	9,870	9,505
51	9,940	10,145	9,775
52	10,210	10,420	10,040
53	10,480	10,695	10,310
54	10,750	10,970	10,575

Zehntel-Skalenteile

$^0/_0$g zwischen den Skalenteilen

	14—24	24—33	33—54
Arabinose ..	0,0278	0,0273	0,0270
Xylose	0,0284	0,0280	0,0276
Mannit	0,0271	0,0267	0,0267

Tabellen zur refraktometrischen Bestimmung von

Mannose – *Fructose* – *Glucose* 20° C

$+H_2O$

Skt.	%g Mannose	Fructose	Glucose	Skt.	Glucose
14,5	0,00	0,00	0,00		
15	0,135	0,135	0,135	55	10,770
16	0,410	0,410	0,405	56	11,030
17	0,685	0,680	0,680	57	11,290
18	0,960	0,955	0,950	58	11,550
19	1,235	1,230	1,220	59	11,815
20	1,510	1,500	1,490	60	12,075
21	1,780	1,775	1,760	61	12,335
22	2,055	2,045	2,030	62	12,595
23	2,330	2,320	2,300	63	12,855
24	2,605	2,590	2,570	64	13,120
25	2,875	2,865	2,840	65	13,380
26	3,150	3,135	3,110	66	13,640
27	3,420	3,400	3,375	67	13,900
28	3,695	3,670	3,645	68	14,160
29	3,965	3,940	3,910	69	14,425
30	4,235	4,210	4,180	70	14,685
31	4,510	4,485	4,445	71	14,945
32	4,780	4,745	4,715	72	15,205
33	5,055	5,015	4,980	73	15,465
34	5,320	5,285	5,245	74	15,725
35	5,590	5,555	5,510	75	15,985
36	5,855	5,825	5,775	76	16,245
37	6,120	6,090	6,035	77	16,505
38	6,390	6,360	6,300	78	16,765
39	6,655	6,630	6,565	79	17,020
40	6,925	6,900	6,830	80	17,280
41	7,190	7,165	7,095	81	17,540
42	7,460	7,435	7,355	82	17,800
43	7,725	7,700	7,620	83	18,060
44	7,990	7,970	7,885	84	18,315
45	8,260	8,240	8,150	85	18,575
46	8,525	8,505	8,410	86	18,835
47	8,795	8,775	8,675	87	19,095
48	9,060	9,040	8,940	88	19,355
49	9,330	9,310	9,200	89	19,610
50	9,595	9,580	9,460	90	19,870
51	9,865	9,845	9,725	91	20,125
52	10,130	10,115	9,985	92	20,385
53	10,395	10,380	10,245	93	20,645
54	10,665	10,650	10,510	94	20,900

Zehntel-Skalenteile

$^0/_0$g zwischen den Skalenteilen

	14—24	24—33	33—54	54—94
Mannose	0,0274	0,0272	0,0268	
Fructose	0,0273	0,0269	0,0268	
Glucose	0,0271	0,0268	0,0264	0,0260

Tabellen zur refraktometrischen Bestimmung von

Galactose – *Maltose* – *Lactose* – *Raffinose* 20° C

$+H_2O$ $+5H_2O$

Skt.	%g Galactose	Maltose	Lactose	Raffinose
14,5	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,135	0,140	0,140	0,160
16	0,405	0,415	0,415	0,470
17	0,670	0,690	0,690	0,780
18	0,940	0,970	0,965	1,090
19	1,205	1,245	1,240	1,400
20	1,475	1,525	1,515	1,715
21	1,740	1,800	1,785	2,025
22	2,005	2,075	2,055	2,335
23	2,270	2,355	2,330	2,645
24	2,535	2,630	2,605	2,955
25	2,800	2,905	2,875	3,260
26	3,065	3,180	3,145	3,565
27	3,330	3,455	3,415	3,870
28	3,595	3,730	3,685	4,175
29	3,855	4,005	3,955	4,480
30	4,120	4,280	4,215	4,785
31	4,385	4,555	4,485	5,090
32	4,650	4,830	4,750	5,395
33	4,910	5,105	5,020	5,705
34	5,170	5,380	5,290	6,015
35	5,430	5,650	5,555	6,320
36	5,690	5,925	5,825	6,630
37	5,950	6,195	6,090	6,940
38	6,210	6,470	6,360	7,245
39	6,465	6,740	6,625	7,555
40	6,725	7,010	6,885	7,865
41	6,985	7,285	7,155	8,175
42	7,245	7,555	7,420	8,480
43	7,500	7,830	7,685	8,790
44	7,760	8,100	7,950	9,100
45	8,015	8,370	8,220	9,405
46	8,270	8,645	8,485	9,715
47	8,530	8,915	8,750	10,020
48	8,785	9,190	9,015	10,330
49	9,045	9,460	9,280	10,640
50	9,300	9,730	9,540	10,950
51	9,560	10,005	9,805	
52	9,815	10,275	10,070	
53	10,070	10,550	10,335	
54	10,330	10,820	10,600	

Zehntel-Skalenteile

$^0/_0$g zwischen den Skalenteilen

	14—24	24—32	32—54
Galactose ...	0,0268	0,0264	0,0259
Maltose	0,0277	0,0275	0,0272
Lactose	0,0274	0,0268	0,0266
Raffinose ...	0,0310	0,0308	0,0308

Hilfstabelle

zum Umrechnen der Skt.-Dezimalen in $^0/_0$g gemäß den Angaben am Fuße jeder Tabelle (Zehntel-Skalenteile)

Skt.	%g			
0,1	0,0259	0,0262	0,0264	0,0266
0,2	0,052	0,052	0,053	0,054
0,3	0,076	0,079	0,079	0,080
0,4	0,103	0,105	0,106	0,106
0,5	0,129	0,131	0,132	0,133
0,6	0,155	0,157	0,158	0,160
0,7	0,181	0,183	0,185	0,187
0,8	0,207	0,210	0,211	0,213
0,9	0,233	0,236	0,238	0,240
0,1	0,0268	0,0270	0,0272	0,0274
0,2	0,054	0,054	0,054	0,055
0,3	0,080	0,081	0,082	0,082
0,4	0,107	0,108	0,109	0,109
0,5	0,134	0,135	0,136	0,137
0,6	0,161	0,162	0,163	0,164
0,7	0,188	0,189	0,190	0,191
0,8	0,214	0,216	0,217	0,219
0,9	0,241	0,243	0,245	0,246
0,1	0,0276	0,0278	0,0280	0,0282
0,2	0,055	0,056	0,056	0,056
0,3	0,083	0,083	0,084	0,085
0,4	0,110	0,111	0,112	0,113
0,5	0,138	0,139	0,140	0,141
0,6	0,165	0,167	0,168	0,169
0,7	0,193	0,195	0,196	0,197
0,8	0,221	0,222	0,224	0,226
0,9	0,248	0,250	0,252	0,254
0,1	0,0284		0,0308	0,0310
0,2	0,057		0,061	0,062
0,3	0,085		0,092	0,093
0,4	0,113		0,123	0,124
0,5	0,142		0,154	0,155
0,6	0,170		0,185	0,186
0,7	0,199		0,216	0,217
0,8	0,227		0,246	0,248
0,9	0,256		0,277	0,279

Für Werte, die zwischen den hier angegebenen liegen, ist zum Interpolieren die nächsttiefere Zahl zu benützen (z. B. 0,0266 anstatt 0,0267).

$^0/_0$g (nach Wagner 1928) = Gramm in 100 cm³ Aqua dest.