

Über Wachstum, Atmung und Gärung der Kulturweihefe Polymorphus II

Autor(en): **Fiechter, Armin**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **65 (1955)**

PDF erstellt am: **18.04.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-45978>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Über Wachstum, Atmung und Gärung der Kulturweinhafe Polymorphus II

Von Armin Fiechter

(Aus dem Institut für landw. Bakteriologie und Gärungsbiologie der
Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich)

Eingegangen am 10. September 1954

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung	6
II. Morphologie	6
1. Systematisches	6
2. Abhängigkeit der Morphologie von Substratzusammensetzung und Kulturalter	7
III. Physiologische Untersuchungen	8
A. Wuchsstoffbedarf	8
1. Allgemeines	8
a) Wuchsstoffansprüche bei den Hefen	8
b) Über die Bedeutung des Biotins im Stoffwechsel der Mikro- organismen	10
2. Experimentelles	12
a) Substrate	12
b) Bestimmung des Wachstums	13
c) Versuchsanordnung	14
3. Versuchsergebnisse	14
a) Einfluß der Vitamine Biotin, Aneurin, m-Inosit und Ca-Pantothe- nat einzeln und in Kombination	14
b) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration	17
4. Diskussion	17
B. Die Verwertbarkeit der wichtigsten Kohlehydrate	21
1. Versuchsanordnung	21
2. Die Abhängigkeit des Wachstums von der Entkeimungsmethode	22
3. Ergebnisse	23
C. Wachstumsversuche mit organischen Säuren	25
D. Atmungs- und Gärversuche mit ruhenden Zellen	26
1. Methodisches	26
a) Experimentelles	26
b) Beispiel für die Berechnung von Q	31
2. Resultate der Respirationsversuche	31
a) Einfluß des unterschiedlichen Alters von Kulturen auf den Gas- austausch	31
b) Einfluß der Lüftung während der Züchtung des Zellmaterials	34
c) Bestimmung von vergär- und veratembaren Kohlehydraten	34
d) Die mit den verwertbaren Kohlehydraten erreichten Atmungs- und Gärgeschwindigkeiten	35

	Seite
E. Versuche mit ruhenden Zellen über die Kohlenstoffbilanz	37
1. Chemische Analysenmethoden	37
2. Kohlenstoffbilanz	40
IV. Zusammenfassung	43
V. Literaturverzeichnis	44

I. Einleitung

Ähnlich wie in der Brauerei werden heutzutage bei der Wein- und Gärmostbereitung in zunehmendem Maße Reinkulturen der Hefen verwendet, um diesen Prozessen einen höheren Grad der Betriebssicherheit zu verleihen. Zu diesem Zwecke sind in den verschiedenen Weinbaugebieten des In- und Auslandes viele Hefestämme nach den Anforderungen der Praxis isoliert worden: Bildung bestimmter Bukettstoffe, Vergärung bei tiefen Temperaturen («Kaltgärhefen»), Unempfindlichkeit bei überschwefelten Säften («Sulfithefen») oder Vergärung von Säften extrem hohen Zuckergehaltes u. a. Die eigentliche Physiologie dieser Kulturhefen ist aber im Gegensatz zu derjenigen der Brauerei- und Bäckereihefen recht wenig untersucht worden. Durch Wikén und Mitarbeiter wurde bei mehreren Stämmen schweizerischer Herkunft der Bedarf an Wuchsstoffen abgeklärt, wobei eine unerwartet große Verschiedenheit in den diesbezüglichen Ansprüchen zutage trat. Es war deshalb von Interesse, festzustellen, wie die physiologischen Verhältnisse bei einer Hefe gestaltet sind, welche zur Vergärung von Säften hoher Zuckerkonzentration selektiert worden war. Obschon eine Anzahl solcher Stämme aus der Literatur bekannt sind, fehlen doch eingehende experimentelle Unterlagen, so daß unsere Kenntnis der Hefephysiologie hauptsächlich von der Untersuchung anderer Kulturhefen stammt. Die nachfolgende Arbeit über die Rasse Polymorphus II enthält deshalb einige grundlegende Versuche über den Gasstoffwechsel, den Wuchsstoffbedarf und die Vergärbarkeit der wichtigsten Kohlehydrate. Dabei kamen synthetische Nährlösungen zur Verwendung, um ein unter genau definierten Bedingungen gezüchtetes Zellmaterial zur Verfügung zu haben. Die Aufklärung der dabei auftretenden Stoffwechselmechanismen bedarf weiterer, vertiefter Arbeit und mußte späteren Versuchen vorbehalten bleiben.

II. Morphologie

1. Systematisches

Über den vorliegenden Stamm der Kulturweinhafe Polymorphus II fanden sich weder in der Literatur Angaben, noch konnte durch persönliche Nachfragen näheres über Herkunft, Eigenschaften oder Verwendung in Erfahrung gebracht werden. Der Stamm soll zur Vergärung von Traubensäften hohen Zuckergehaltes (Spätlesen, Trockenbeerenauslesen)

Verwendung gefunden und dort eine sehr langsam verlaufende Gärung erzeugt haben. Wie aus der Literatur hervorgeht, sind Organismen, welche in Naturprodukten von hoher Zuckerkonzentration, wie Honig, Fruchtkonzentraten, Trockenbeerenauslesen oder ungenügend getrockneten, Früchten, erwünschte oder unerwünschte Veränderungen hervorrufen, in zahlreichen Fällen aufgefunden worden. Von diesen sogenannten osmophilen Mikroorganismen wurden einzelne Hefestämme isoliert und beschrieben (Literaturübersicht bei von Schelhorn [57]). Aus diesen Untersuchungen geht allgemein hervor, daß unter den erwähnten extremen Umweltsbedingungen in erster Linie Vertreter der *Zygosaccharomyceten* zur Vermehrung imstande sind. Die Beschreibung der von Kroemer und Krumholz (25, 26) aus Spätlesen isolierten Stämme wurde mit den Merkmalen der Hefe Polymorphus II verglichen. Am besten schienen auf den vorliegenden Stamm die Angaben über die Rasse Oestrich 1920 A zu passen, weshalb diese in vergleichende Untersuchungen miteinbezogen wurde. Ein gleichzeitig mitgelieferter Stamm Lieser 76 wurde nicht mehr weitergeprüft, da er in Substrat B¹ nach Zusatz von Biotin nicht zu wachsen vermochte, was eine Identität zum vorneherein ausschloß. Aber auch Oestrich 1920 A zeigte etwas andere Eigenschaften, so vor allem ein bedeutend rascheres Wachstum auf allen Nährböden. Immerhin deckten sich einige Merkmale recht gut, besonders was die ungefähren Größenverhältnisse der Zellen und das Assimilationsvermögen für einzelne Kohlehydrate anbetrifft. Im Material eingetrockneter Bierwürzegelatinekulturen konnten häufig Zellkopulationen festgestellt werden, doch ließen sich im Gegensatz zum Stamm Oestrich 1920 A bei der Rasse Polymorphus II Sporen nur sehr unsicher beobachten (Figuren 1, 2). Die erstgenannte Hefe ging sogar auf Gipsblöcken rasch zur Sporenbildung über. Die von Krumholz (26) beschriebenen Stämme von *Zygosaccharomyces polymorphus*, zu denen auch die der Hefe Polymorphus II gleichende Rasse Oestrich 1920 A gehört, werden in der Hefesystematik von Loder und Kregger-van Rij ([35], Seite 142) als Varietät der Spezies *Saccharomyces rouxii* *Boutroux* aufgeführt. Die in dieser Arbeit untersuchte Weinhefe dürfte wahrscheinlich auch dort einzuordnen sein.

2. Abhängigkeit der Morphologie von Substratzusammensetzung und Kulturalter

Die Rasse Polymorphus II verfügt über die morphologische Eigenschaft, neben rundlichen und elliptischen Zellen auch solche von gestreckter, teilweise wurstförmiger Gestalt auszubilden (Pastorianus-Form), was offenbar Anlaß zu der bestehenden Benennung gegeben hat (Figuren 3 bis 7). Diese Eigenschaft ist genetisch fixiert und in natürlichen Substraten sehr ausgeprägt. Das Verhältnis von elliptischen zu länglichen Zellen ist aber je nach der Zusammensetzung der Nährlösung

und dem Beobachtungszeitpunkt erheblichen Schwankungen unterworfen. So enthalten besonders alte Kulturen vorwiegend lange, sparrige Formen (Figur 7), ohne daß die rundlichen ganz verschwinden. Die Verteilung in jüngeren Kulturen hängt ziemlich stark von der Substratzusammensetzung ab; jedenfalls tritt die Ausbildung der länglichen Formen ungleich schnell ein. Zur morphologischen Charakterisierung kann deshalb nur diese Fähigkeit der Ausbildung verschiedener Zellformen herangezogen werden; das gegenseitige Verhältnis ihres Auftretens ist für eine allgemeine Aussage zu labil. Weitere Untersuchungen über den Einfluß der Umweltsbedingungen auf die Morphologie wurden nicht durchgeführt.

III. Physiologische Untersuchungen

A. Wuchsstoffbedarf

1. Allgemeines

a) Wuchsstoffansprüche bei den Hefen

Die Hefen, vor allem Kulturhefen (Brauerei-, Brennerei- und Bäckerhefen), haben als Testorganismen bei der Entdeckung und Untersuchung von Vitaminen eine bedeutende Rolle gespielt. So sind besonders die Wuchsstoffe der Biosgruppe hauptsächlich in Experimenten mit Hefen entdeckt oder genauer untersucht worden. Der Name «Bios» wurde von Wildiers (80) 1901 geprägt, nachdem er bewiesen hatte, daß

1. ein Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen) in mineralischer Nährsalzlösung mit Saccharose nicht wächst, wenn die Impfmenge hinreichend klein gehalten wird, und

Tafel 1

Figur 1

Zellkopulation in einer Kultur auf eingetrockneter Bierwürzege latine. Bebrütung während 36 Tagen bei 20° C. Vergrößerung zirka 1500fach

Figur 2

Kopulation zwischen Zellen von verschiedener Form und Größe in einer eingetrockneten Würzege latine kultur. Bebrütung während 25 Tagen bei 20° C. Vergrößerung zirka 1500fach

Figur 3

Zellen aus Substrat C ohne Vitaminzusatz. Kultur 2 Tage alt. Vergrößerung 700—800fach

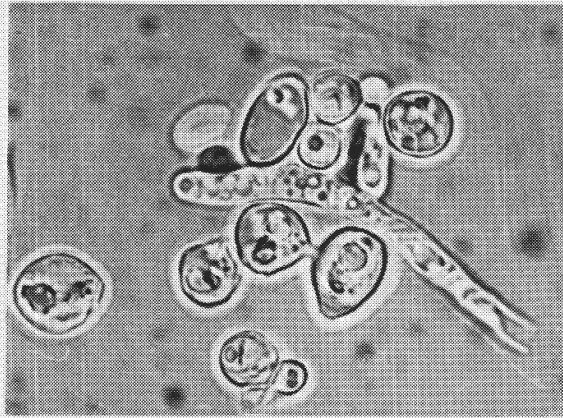
Figur 4

Zellen aus Bierwürze. Kultur 3 Tage alt. Vergrößerung 700—800fach

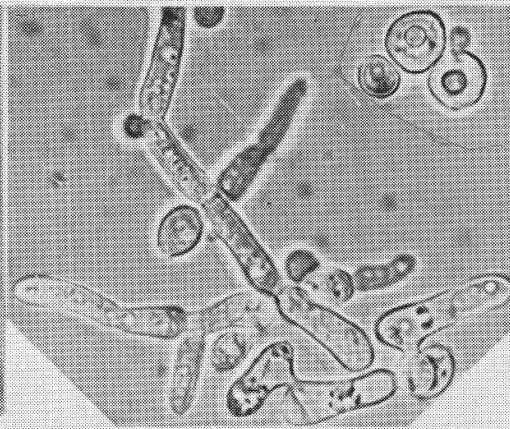
Figur 5

Zellen aus Substrat A. Kultur 10 Tage alt. Vergrößerung 700—800fach

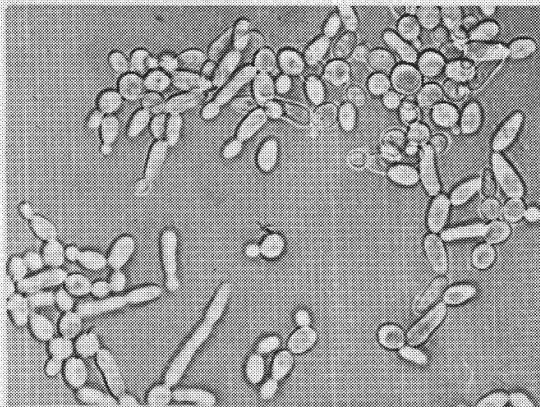
Tafel 1



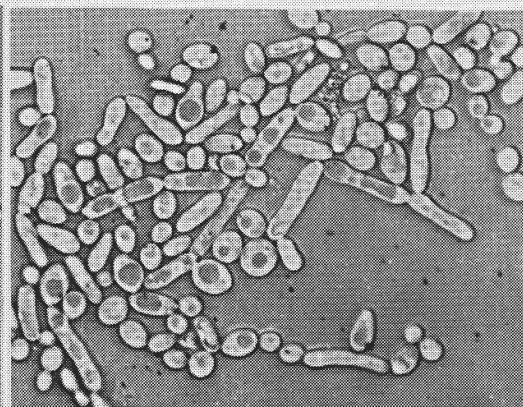
1



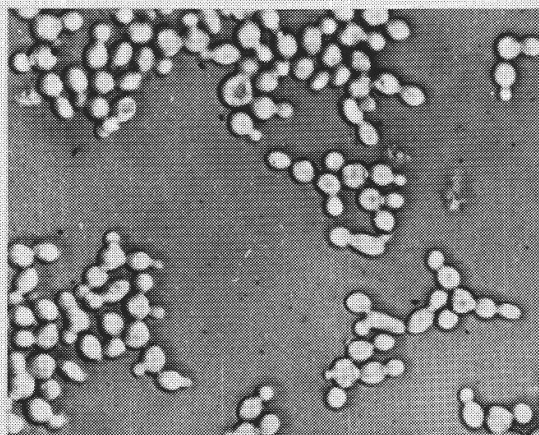
2



3

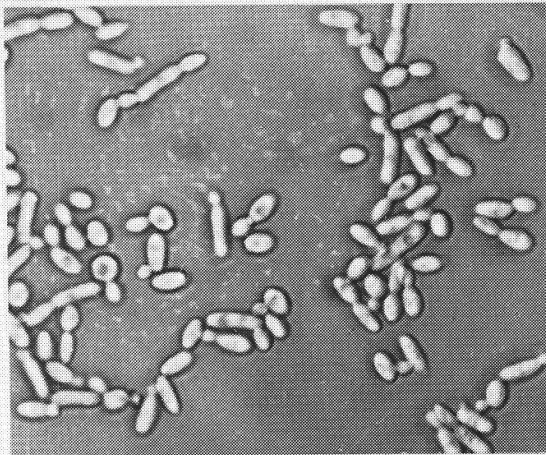


4

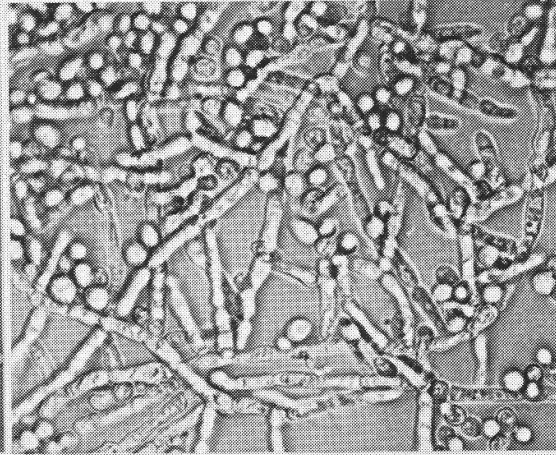


5

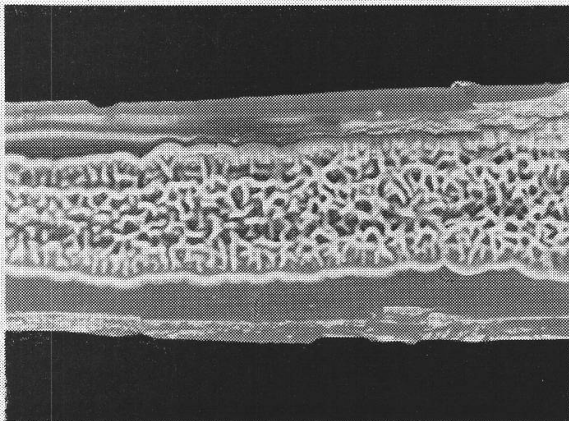
Tafel 2



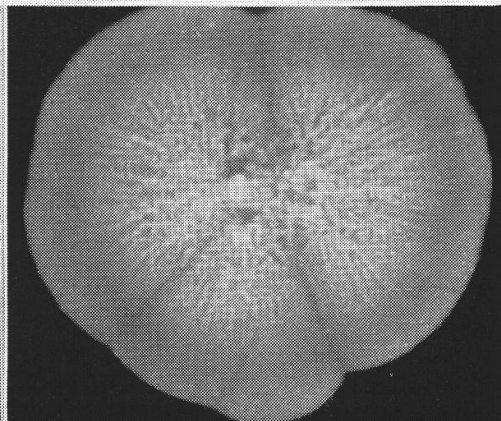
6



7



8



9

2. maximales Wachstum nur in Anwesenheit eines Stoffes eintritt, der von den Zellen selbst nicht synthetisiert werden kann und dessen Konstitution organischer Natur sein muß.

Wildiers bewies auch, daß dieser Stoff nicht mit bestimmten andern Verbindungen (Aminosäuren, Nucleinsäuren, Harnstoff u. a.) identisch ist. Die Unterschiede zwischen den Befunden von Pasteur und Liebig ([58], S. 125) sind demnach auf die Menge des Impfmateri- als oder auf Unterschiede in den Wuchsstoffansprüchen (Auxo-Auto- trophie bei Kulturhefen) zurückzuführen. Daß Bios mehrere Vitamine enthielt, wurde erst später erkannt und durch deren Isolierung bewiesen (Miller, Kögl, Williams). Mit der Untersuchung des Wuchs- stoffbedarfes der *Saccharomyceten*, vor allem der Brauerei-, Brennerei- und Bäckerhefen, beschäftigten sich in der Folge viele Forscher (7, 11, 12, 20, 30, 49, 59, 70, 75, 76, 77, 78, 79, 82 u. a.). So fand Burkholder (7) bei 38 Stämmen verschiedener Hefearten Biotin- und bei 4 Stämmen Pantothensäure-Heterotrophie. Einzelne Stämme waren auf den Zusatz von Aneurin, Inosit, Niacin oder Lactoflavin angewiesen. Schultz und Atkin (59) prüften zahlreiche Stämme von *Saccharomyces*- und *Torula*- Arten mit einem Gemisch von sieben verschiedenen Wuchsstoffen. Zur maximalen Vermehrung benötigten 40 von 60 dieser Stämme Biotin und 34 Pantothensäure; nur 6 Stämme waren auxo-autotroph. Craig und Snell (12) stellten eine wachstumsfördernde Wirkung der freien Pan- tothensäure bei 6 Stämmen, darunter *Saccharomyces carlsbergensis* und *Zygosaccharomyces marxianus*, fest. Williams und Mitarb. (82) fanden bei drei Preßhefen, daß Biotin und Pantothensäure zum Erreichen maximalen Wachstums notwendig sind. Über den Vitaminbedarf der Kulturweinhaefen war bis zu den Arbeiten von Wikén und Mitarbeiter (75—79) recht wenig bekannt. Unter den Stämmen von Schultz und Atkin (59) befand sich eine französische Weinhefe, welche in Gegen-

Tafel 2

Figur 6

Zellen aus Traubensaft. Kultur 3 Tage alt. Vergrößerung 700—800fach

Figur 7

Zellen aus Traubensaft. Kultur 72 Tage alt. Vergrößerung 700—800fach

Bezüglich der Substrate A und C siehe S. 12 und 13

Bei Figuren 1 bis 7 handelt es sich um Phasenkontrastaufnahmen

Figur 8

Strichkolonie nach 67 Tagen, gezüchtet auf Würzeagar. Vergrößerung zirka zweifach

Figur 9

Riesenzolonie nach 42 Tagen, gezüchtet auf Würzegelatine.

Vergrößerung zirka zweifach

wart einer Kombination des Inosits mit Ca-Pantothemat, Biotin und Adermin das beste Wachstum aufwies. Im allgemeinen dürften Biotin, Aneurin, Pantothensäure, Inosit und Adermin zu den wichtigsten Hefewachsstoffen gehören (vgl. Williams [84]), so daß für die Versuche mit der Rasse Polymorphus II diese fünf Vitamine ausgewählt wurden. Daß sie auch auf Atmung und Gärung einen direkten Einfluß haben können, geht aus mehreren andern Arbeiten hervor (20, 89, 81 u. a.). Winzler und Mitarb. (89) fanden, daß Biotinzusatz zu Zellen einer Preßhefe (Fleischmann-Stamm 139) in Anwesenheit von Ammonsalzen eine beträchtliche Steigerung der aeroben und anaeroben Gärung, weniger der O₂-Aufnahme zur Folge hat. Nach Hopkins und Pennington (20) beeinflußt Biotin die Gärung auch bei *Saccharomyces carlsbergensis*. Die orientierenden Respirationsversuche mit normalen Zellen der Hefe Polymorphus II ergaben allerdings keine Änderung des Gasaustauschs in Anwesenheit von Biotin im Bernsteinsäurepuffer mit 1 % Glucose. Falls Biotin auch hier an den Atmungs- und Gärvorgängen direkt beteiligt ist, genügt offenbar der mitgeführte Vitaminvorrat, um einen Effekt nicht zum Vorschein kommen zu lassen. In den Wachstumsversuchen war der Stamm dagegen deutlich biotin-heterotroph (vgl. Tabelle 1), weshalb im folgenden Abschnitt über die bereits bekannten Funktionen des Biotins kurz eingegangen werden soll.

b) Über die Bedeutung des Biotins im Stoffwechsel der Mikroorganismen

Mit der Entdeckung der Vitamine tauchte auch die Frage nach deren Funktion im Stoffwechsel auf, und es konnte in der Folge in zahlreichen Fällen gezeigt werden, daß sie als Cofermente beim Ablauf enzymatischer Vorgänge beteiligt sind. Im Falle von Biotin steht fest, daß dieses bei mehreren, unter sich sehr verschiedenartigen Reaktionsstufen eine Rolle spielt, so:

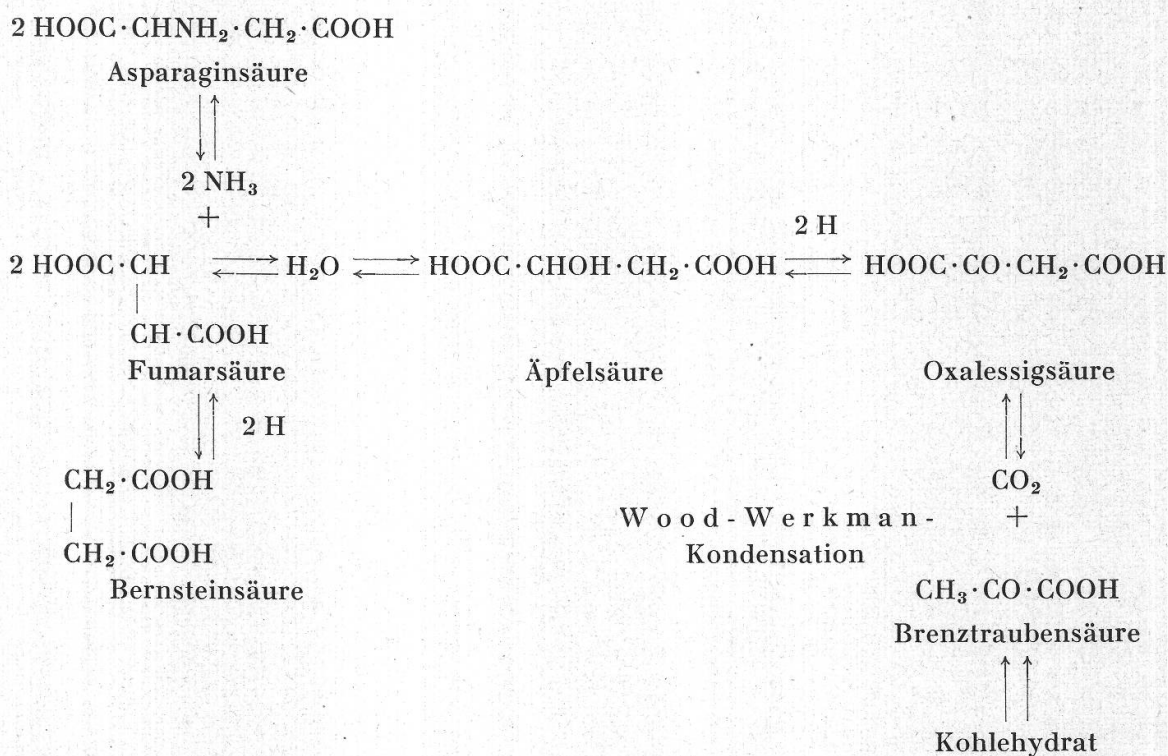
- a) bei der Synthese resp. beim Abbau von Aminosäuren, zum Beispiel Asparaginsäure (2, 24, 28, 33, 69) sowie Serin und Threonin (17, 18);
- b) bei der Wood-Werkman-Reaktion (CO₂-Fixierung durch sogenannte heterotrophe Organismen) (28, 51, 73);
- c) bei Decarboxylierungen von beispielsweise Oxalessigsäure (27, 31, 48, 62) und Bernsteinsäure (2, 13, 52).

Darüber hinaus sind weitere Beziehungen entdeckt worden, so zur Oleinsäure und zu anderen Fettsäuren (Williams und Fieger [85]), zum Avidin und zur Citrullinsynthese (Feldott und Lardy [15]). Über die eigentliche Wirkungsweise des Biotins ist trotz großen Anstrengungen recht wenig bekannt geworden. Nach Lichstein und Christman (32, 10) soll beim Aufbau des Coenzym des bei der Desaminierung von Asparaginsäure, Serin und Threonin wirksamen Enzyms Adenylsäure (Adenosin-5-Phosphorsäure) beteiligt sein (Gale

[17]). Nach Wright und Mitarbeiter (91) ist diese Coenzymform mit Biocytin, welches Biotin bei vielen Organismen zu ersetzen vermag, nicht identisch. (Biotin ist beispielsweise bei *Lactobacillus casei*, nicht aber bei *Lactobacillus arabinosus* durch Biocytin ersetzbar (Wright und Mitarbeiter [90]).

Bis jetzt sind zahlreiche Biotinderivate synthetisiert und biologisch geprüft worden, ohne Aufschluß über ihre Wirkungsweise zu erhalten. Melville und Mitarb. (37) konnten bei Verwendung von markiertem Biotin (C^{14}) das Kohlenstoffisotop ausschließlich im Biotinmolekül, nicht aber in der neu entstandenen Asparaginsäure nachweisen. Aus diesem Grunde wird dem Vitaminmolekül die Beteiligung am Wasserstofftransport zugeschrieben.

Von direkter Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist das Schema der Asparaginsäuresynthese, welches auf Grund der bisherigen Ergebnisse von Lichstein und Umbreit (31) aufgestellt und seither auch auf die Synthese anderer Aminosäuren ausgedehnt worden ist (Lichstein [34]).



Mit Hilfe dieses Mechanismus werden — wie später dargestellt (Seite 15) — die mit der Hefe Polymorphus II erhaltenen Resultate erklärbar, falls Asparaginsäure von der Zelle nur in Anwesenheit von Biotin synthetisiert werden kann und im Caseinhydrolysat des Substrates C Asparaginsäure vorhanden ist. Das Schema enthält gleichzeitig auch eine mögliche Verbindung des C- und N-Stoffwechsels.

2. Experimentelles

a) Substrate

Als Nährboden zur Aufbewahrung des Stammes und zur Gewinnung des Impfmateri als für die ersten orientierenden Versuche diente Bierwürzeagar bzw. -gelatine. In den Figuren 8 und 9 (s. Tafel 2) sind eine Strich- und eine Riesenkolonie, gezüchtet auf diesen Nährböden, wiedergegeben. Zur ersten Orientierung über den Wuchsstoffbedarf wurden drei Substrate bereitgestellt (40 ml Substrat in 100 ml fassenden Erlenmeyer-Kolben), von denen Substrat A Glucose, mineralische Nährsalze und Malzextrakt, Substrat B¹ Glucose und anorganische Salze sowie Substrat C neben Glucose und Mineralsalzen eine organische Stickstoffquelle enthielten. Mehrere Passagen in diesen Medien ergaben bereits die ersten Anhaltspunkte über Wuchsstoffansprüche, indem

Substrat A: sehr gutes Wachstum

Substrat C: mittleres—schwaches Wachstum

Substrat B¹: schwaches, mit zunehmender Passagenzahl verschwindendes Wachstum ermöglichten.

Nach ungefähr 50 Passagen war somit ersichtlich geworden, daß der Stamm Polymorphus II in mineralischer Nährsalzlösung ohne Zusatz eines Wuchsstoffes nicht zu wachsen imstande war. Die drei folgenden Substrate sind in Zusammensetzung und Herstellung von Wikén und Richard (75) übernommen worden:

Nährlösung A (vgl. Modess [42], S. 16):

Glucose	20,0 g
Malzextrakt «Biomalz»	5,0 g
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃ -Lösung, 1 mg FeCl ₃ /ml	1,0 ml
Dest. Wasser	ad 1000,0 ml

Nach ihrer Herstellung wurde die Lösung 20 Min. im strömenden Dampf erwärmt, zweimal durch dasselbe Faltenfilter filtriert und auf ein pH von 4,8—5,0 (NaOH) eingestellt. Anschließend erfolgte die Sterilisation der abgefüllten Kulturgefäße im Autoklav bei 120° C während 15 Minuten.

Nährlösung B¹ (vgl. Williams und Mitarb. [83]):

Glucose	50,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂	0,25 g

H ₃ BO ₃ -Lösung,	1 mg H ₃ BO ₃ /ml	1,0 ml
ZnSO ₄ -Lösung,	1 mg ZnSO ₄ /ml	1,0 ml
MnCl ₂ -Lösung,	1 mg MnCl ₂ /ml	1,0 ml
Tl ₂ SO ₄ -Lösung,	1 mg Tl ₂ SO ₄ /ml	1,0 ml
FeCl ₃ -Lösung,	0,5 mg FeCl ₃ /ml	1,0 ml
CuSO ₄ -Lösung,	0,1 mg CuSO ₄ /ml	1,0 ml
KJ-Lösung,	0,1 mg KJ/ml	1,0 ml
Dest. Wasser	ad 1000,0 ml	

Die Lösung der Mineralsalze (600 ml) und die Glucoselösung (400 ml) wurden separat im Autoklav erhitzt (15 Min. bei 120° C), hierauf gemischt und mit Natronlauge auf ein pH von 4,8—5,0 gebracht. Zur abschließenden Entkeimung genügte eine 20 Min. dauernde Behandlung im strömenden Dampf. Die separate Sterilisation von Mineralsalzen und Glucose im Autoklav war notwendig, weil sonst eine Verfärbung, herührend von der teilweisen Veränderung der Glucose während der Hitzebehandlung in Anwesenheit von gewissen Mineralsalzen, eintritt. Solche Substrate sind zum Beispiel für die Vermehrung der Kulturhefe Fendant weniger geeignet (W i k é n und R i c h a r d [75]). Nährlösung C (vgl. A t k i n und Mitarb. [3], S. 98):

Glucose	50,0 g
KH ₂ PO ₄	0,55 g
KCl	0,425 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,125 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,125 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2,5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,5 mg
Kaliumcitrat-Puffer, 0,4 M, pH 4,5—5,0	50,0 ml
Caseinhydrolysat, vitaminfrei, 10 0/0, pH = 4,8—5,0	40,0 ml
Destilliertes Wasser	ad 1000,0 ml

Wurden bei den späteren Wachstumsversuchen Wuchsstoffzusätze notwendig, erfolgten diese unmittelbar vor der letzten Sterilisation. Es steht fest, daß ihre Wirkung durch die einmalige Erhitzung im strömenden Dampf nicht beeinträchtigt wird.

b) Bestimmung des Wachstums

Zur Bestimmung des Wachstums von Mikroorganismen sind sehr unterschiedliche Methoden vorgeschlagen und angewendet worden (vgl. S c h o p f e r [58], S. 30), wie Volumen- oder Gewichtsbestimmungen, Zellzählungen oder Erfassung von (End-) Produkten (z. B. des produzierten Kohlendioxydes) des Stoffwechsels.

Während bei Pilzen meist die Zunahme der Myceltrockensubstanz als Wachstumsmaß ermittelt wird, stehen der Anwendung dieser Methode bei Bakterien und Hefen nicht selten experimentelle Schwierigkeiten im

Wege. In neuerer Zeit werden vielfach Absorptionsmessungen an den beimpften und bebrüteten Substraten mit Licht definierter Wellenlänge vorgenommen, wenn eine gute Suspension, die wenigstens während der Meßzeit unverändert bleibt, hergestellt werden kann und nicht Klumpenbildung durch Schleim oder Zellverbände dies verhindert. Die erhaltenen Relativwerte sind aber nur für ein und denselben Organismus unter sich vergleichbar, auch wenn mit Hilfe einer Standardkurve Absolutwerte berechnet werden. Sogar beim gleichen Stamm können je nach den Züchtungsbedingungen Unterschiede in der Absorption auftreten. Bei den Versuchen mit der Weinhefe Polymorphus II wurde deshalb darauf geachtet, nach Möglichkeit Zellen mit gleicher Vorgeschichte zu verwenden.

Sämtliche Messungen erfolgten im Beckman-Spektrophotometer (Wellenlänge 600 m μ , Spaltweite 0,06 mm) mit «Corex»-Küvetten von 10 mm Schichtdicke. Als Vergleichslösung diente jeweils das entsprechende ungeimpfte, aber mitbebrütete Substrat, dessen Durchlässigkeit = 100 % gesetzt wurde. Die Zellsedimentierung fiel bei kurz gehaltener Meßzeit nicht ins Gewicht.

c) Versuchsanordnung

Je 8 ml Substrat wurden in sterile Reagenzröhrchen von 160 mm Länge und 16 mm innerem Durchmesser abgefüllt. Die Impfung erfolgte mit drei Tage alten, zweimal mit sterilem destilliertem Wasser gewaschenen Zellen, welche aus Substrat C ohne Vitaminzusatz stammten (mit Ausnahme des in Tabelle 1 aufgeführten Versuches). Eine Serie von 36 Röhrchen (6 Meßpunkte, 5 Parallelen, 6 ungeimpfte, mitbebrütete Vergleichsröhrchen) reichte zur Aufnahme einer Wachstumskurve aus. Normalerweise konnte zwei Tage nach der Impfung täglich gemessen werden, wobei die hierzu notwendigen Röhrchen der bei 20° C aufgestellten Serie wahllos entnommen und die übrigbleibenden einmal pro Tag kräftig geschüttelt wurden.

3. Versuchsergebnisse

a) Einfluß der Vitamine Biotin, Aneurin, meso-Inosit und Ca-Pantothenat einzeln und in Kombination

Die mehrfachen Passagen in den drei verwendeten Substraten zeigten bereits, daß die Kulturweinhefe Polymorphus II auxo-heterotroph ist und Substrat A die zur Entwicklung notwendigen Stoffe enthält. Der Wuchsstoffbedarf vor allem in qualitativer Beziehung war aber noch abzuklären. Deshalb wurden in erster Linie jene Vitamine ausprobiert, die hauptsächlich für die Wirksamkeit der Biospräparate auf Hefe verantwortlich und von dort isoliert worden sind. Sie gelangten in gleicher Konzentration zur Anwendung wie bei Wikén und Richard (75). Die Vitaminzusätze bei den zwei synthetischen Substraten B¹ und C hatten die aus Tabelle 1 ersichtliche Wirkung.

Tabelle 1

Zeit Stunden	Ohne Vitamine	(+)-Biotin 25 γ	meso-Inosit 25 mg	Aneurin 0,5 mg	Adermin 0,5 mg	Ca-Pantothenat 2,5 mg
Substrat B ¹						
24	86,8	81,7	84,0	86,6	87,6	86,1
48	77,3	60,7	77,2	78,1	76,9	77,7
72	69,7	43,9	66,9	70,2	72,2	69,9
96	66,8	35,6	64,7	65,6	68,5	65,1
120	60,8	28,5	59,9	61,7	62,7	60,6
144	59,7	22,1	58,9	58,8	62,1	58,9
Substrat C						
24	78,0	74,8	75,8	78,0	79,0	77,4
48	60,9	45,4	62,4	62,5	61,6	62,1
72	47,5	31,4	46,1	49,1	49,0	50,3
96	41,7	27,4	40,6	42,1	43,0	43,6
120	35,2	23,2	35,9	36,6	36,9	37,3
144	31,9	18,7	33,1	33,6	34,0	32,9

Impfung mit 3 Tage alten Zellen aus Substrat A.

Tabellenwerte = Durchlässigkeit in %.

Angaben der Konzentrationen pro 1000 ml Substrat.

Aus Tabelle 1 geht hervor:

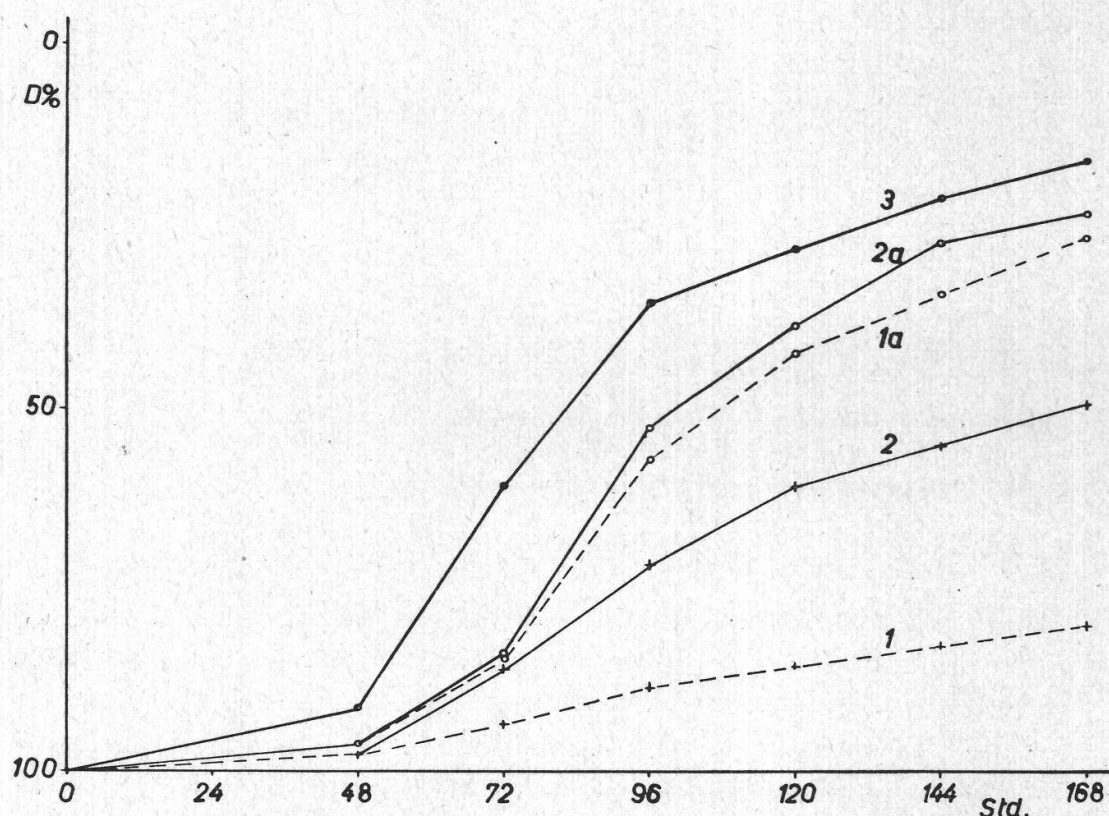
1. Von wachstumsförderndem Einfluß ist einzig (+)-Biotin. Die Durchlässigkeit der Biotinserien beider Substrate ist nach sechs Tagen von gleicher Größenordnung.
2. Ohne Vitaminzusatz findet deutliches Wachstum längs einer S-förmigen Wachstumskurve in Substrat C und B¹ statt, und wahrscheinlich deshalb, weil die Zellen aus Substrat A, welches ja Malzextrakt enthält, vitaminreich sind. Ihr Vitaminvorrat genügt jedoch nicht zur Erzeugung maximalen Wachstums.

Versuch 2, wo Zellen aus dem vitaminfreien Substrat C zur Impfung gelangten, verdeutlicht die Auxo-Heterotrophie der Hefe Polymorphus II. Die Zellen führen eine so geringe Wuchsstoffmenge mit sich (siehe Tabelle 2), daß selbst bei mittlerer Impfung in Nährlösung B¹ ohne Biotinzusatz kaum mehr eine Entwicklung eintritt (Figur 10).

Durch diese Ergebnisse war die *Biotin-Heterotrophie* der Heferasse Polymorphus II bewiesen. Das schwächere Wachstum in Nährlösung C ohne Biotinzusatz kann auf zwei Arten gedeutet werden. Die wahrscheinlichere Möglichkeit ist die, daß im Caseinhydrolysat eine oder mehrere für das Wachstum des Stammes notwendige Aminosäuren (in ungenügender Menge) bereits vorhanden sind (vgl. Seite 11); die weniger wahrscheinliche, daß das Hydrolysat einen Stoff enthält, welcher als Vorläufer («precursor») von Biotin funktioniert. Biotinzusatz zu Nähr-

lösung C vermag das Wachstum nicht über jenen Betrag hinaus zu fördern, wie er im Falle von Substrat B¹ mit Biotin ebenfalls beobachtet wurde.

Eine letzte Gruppe derartiger Versuche erbrachte den Beweis, daß auch Kombinationen der fünf einzeln untersuchten Vitamine im großen und ganzen keine andersartigen Wirkungen hervorbrachten. Enthielt



Figur 10

Wachstum der Hefe Polymorphus II in den synthetischen Substraten B¹ und C mit bzw. ohne Biotin und in Traubensaft

- 1 = Substrat B¹ ohne Biotin
- 1a = Substrat B¹ mit 25 γ/1000 ml (+)-Biotin
- 2 = Substrat C ohne Biotin
- 2a = Substrat C mit 25 γ/1000 ml (+)-Biotin
- 3 = Traubensaft

eine solche Kombination (+)-Biotin, war sie praktisch in gleichem Maße wirksam wie Biotin allein; entbehrte sie dieses Vitamins, war die Wachstumskurve identisch mit derjenigen ohne Wuchsstoffzusatz (siehe Tabelle 3).

Der gleichzeitige Zusatz von Biotin und meso-Inosit sowie von Biotin und Ca-Pantothenat vermag offenbar in Substrat C einen etwas größeren Effekt hervorzubringen. Da die Unterschiede jedoch recht klein sind, wurde auf eine weitere Untersuchung desselben verzichtet.

Tabelle 2

Zeit Stunden	Ohne Vitamine	(+)-Biotin 25 γ	meso-Inosit 25 mg	Aneurin 0,5 mg	Adermin 0,5 mg	Ca-Pantothenat 2,5 mg
Substrat B ¹						
48	91,8	84,6	90,7	91,8	91,7	91,1
72	87,1	60,8	85,6	84,0	87,4	87,0
96	83,1	46,3	81,9	79,5	83,9	82,4
120	80,3	34,4	80,3	79,5	80,2	80,2
144	77,0	27,4	75,7	77,3	77,4	76,7
168	76,9	22,1	71,3	77,9	76,5	74,9
Substrat C						
48	87,0	77,5	85,6	86,8	85,2	83,7
72	73,7	49,4	70,9	72,7	70,4	69,6
96	61,1	36,3	60,7	61,4	59,4	58,7
120	55,2	26,6	51,6	50,5	53,1	55,0
144	49,4	20,6	47,6	50,5	47,2	47,4
168	45,6	18,5	45,5	45,0	43,5	45,0

Impfung mit 3 Tage alten, gewaschenen Zellen aus Nährlösung C ohne Vitaminzusatz.
Durchlässigkeit unmittelbar nach der Impfung zirka 99 %.

Angaben der Konzentrationen pro 1000 ml Substrat.

Tabellenwerte = Durchlässigkeit in %.

b) Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration

Orientierende pH-Messungen in den Substraten B¹ und C zeigten, daß im letzteren Falle die Pufferwirkung des Zitratpuffers effektiv genug war, um auch bei starkem Wachstum eine pH-Verschiebung zu verhindern. Dagegen verschob sich dieser Wert in Nährlösung B¹ parallel mit auftretendem Wachstum nach der sauren Seite. Ein spezieller Versuch (siehe Tabelle 4) sollte darum über die Beziehung zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Wasserstoffionenkonzentration Auskunft geben. Innerhalb der untersuchten Grenzen ist das Wachstum der Weinhefe Polymorphus II mehr oder weniger pH-unabhängig, so daß die Wachstumskurven miteinander vergleichbar sind (Figur 11), gleichgültig ob die Wasserstoffionenkonzentration im Verlaufe ihrer Aufnahme ändert (Substrat B¹) oder nicht (Substrat C). Ähnliche Ergebnisse sind auch in Versuchen mit andern Hefen gefunden worden. So haben *S w a n s o n* und *C l i f t o n* (70) mit zwei Stämmen von Fleischmanns Hefe festgestellt, daß Atmung und Wachstum innerhalb gewisser Bereiche vom herrschenden pH unabhängig sind.

4. Diskussion

Es wurde gezeigt, daß die Kulturweinhefe Polymorphus II in einem synthetischen Substrat (Nährlösung B¹) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-Quelle ohne Wuchsstoffzusatz nicht zu wachsen vermag. Enthält ein Substrat den

Tabelle 3

Zeit Stunden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Substrat B ¹														
48	98,0	89,5	96,7	97,9	97,7	97,1	92,6	94,3	94,3	93,2	95,7	97,9	95,7	90,5
72	93,2	59,2	92,4	93,4	93,1	92,9	67,5	68,8	70,7	69,4	92,7	93,4	70,8	61,9
96	91,4	45,0	90,6	92,0	91,4	90,7	51,1	52,8	53,7	54,6	89,6	91,4	55,9	44,9
120	89,4	33,6	88,6	89,2	88,9	88,7	38,1	39,7	39,0	40,8	86,8	88,2	39,4	35,0
144	86,9	27,4	86,9	88,1	86,2	86,9	27,3	33,6	32,2	33,3	86,0	87,6	34,3	27,0
168	86,8	25,6	86,1	87,5	86,6	87,1	23,7	27,1	27,8	28,8	85,1	87,2	28,5	22,1
Substrat C														
48	88,1	82,4	86,0	87,5	86,8	86,3	82,5	81,9	81,9	90,0	84,8	85,8	80,2	75,0
72	75,4	59,1	73,7	73,7	73,3	72,9	48,1	55,0	60,3	45,4	71,5	73,1	51,9	40,5
96	68,3	35,0	68,3	62,3	66,1	63,3	32,0	37,7	41,8	27,4	64,7	63,6	36,2	25,2
120	62,7	27,4	58,9	57,3	60,1	58,1	23,0	29,2	29,0	23,8	57,8	58,2	30,1	19,8
144	58,5	25,1	56,1	55,7	55,8	56,8	20,3	25,9	25,2	18,9	55,8	56,5	24,5	16,6
168	55,8	20,5	53,1	52,1	53,8	52,9	16,2	23,4	20,9	17,1	52,6	52,9	21,9	14,1

Tabellenwerte = Durchlässigkeit in ‰. Impfung mit 3 Tage alten, gewaschenen Zellen aus Substrat C ohne Vitaminzusatz.

Durchlässigkeit unmittelbar nach der Impfung = 99 ‰

1: Ohne Vitamine

2: 25 γ/1000 ml (+)-Biotin

3: 25 mg/1000 ml meso-Inosit

4: 0,5 mg/1000 ml Aneurin

5: 0,5 mg/1000 ml Adermin

6: 2,5 mg/1000 ml Ca-Pantothenat

7: 25 γ/1000 ml (+)-Biotin + 25 mg/1000 ml meso-Inosit

8: 25 γ/1000 ml (+)-Biotin + 0,5 mg/1000 ml Aneurin

9: 25 γ/1000 ml (+)-Biotin + 0,5 mg/1000 ml Adermin

10: 25 γ/1000 ml (+)-Biotin + 2,5 mg/1000 ml Ca-Pantothenat

11: 25 mg/1000 ml meso-Inosit + 2,5 mg/1000 ml Ca-Pantothenat

12: 0,5 mg/1000 ml Aneurin + 0,5 mg/1000 ml Adermin

13: 25 γ/1000 ml (+)-Biotin + 0,5 mg/1000 ml Aneurin

+ 0,5 mg/1000 ml Adermin

14: 25 γ/1000 ml (+)-Biotin + 25 mg/1000 ml meso-Inosit

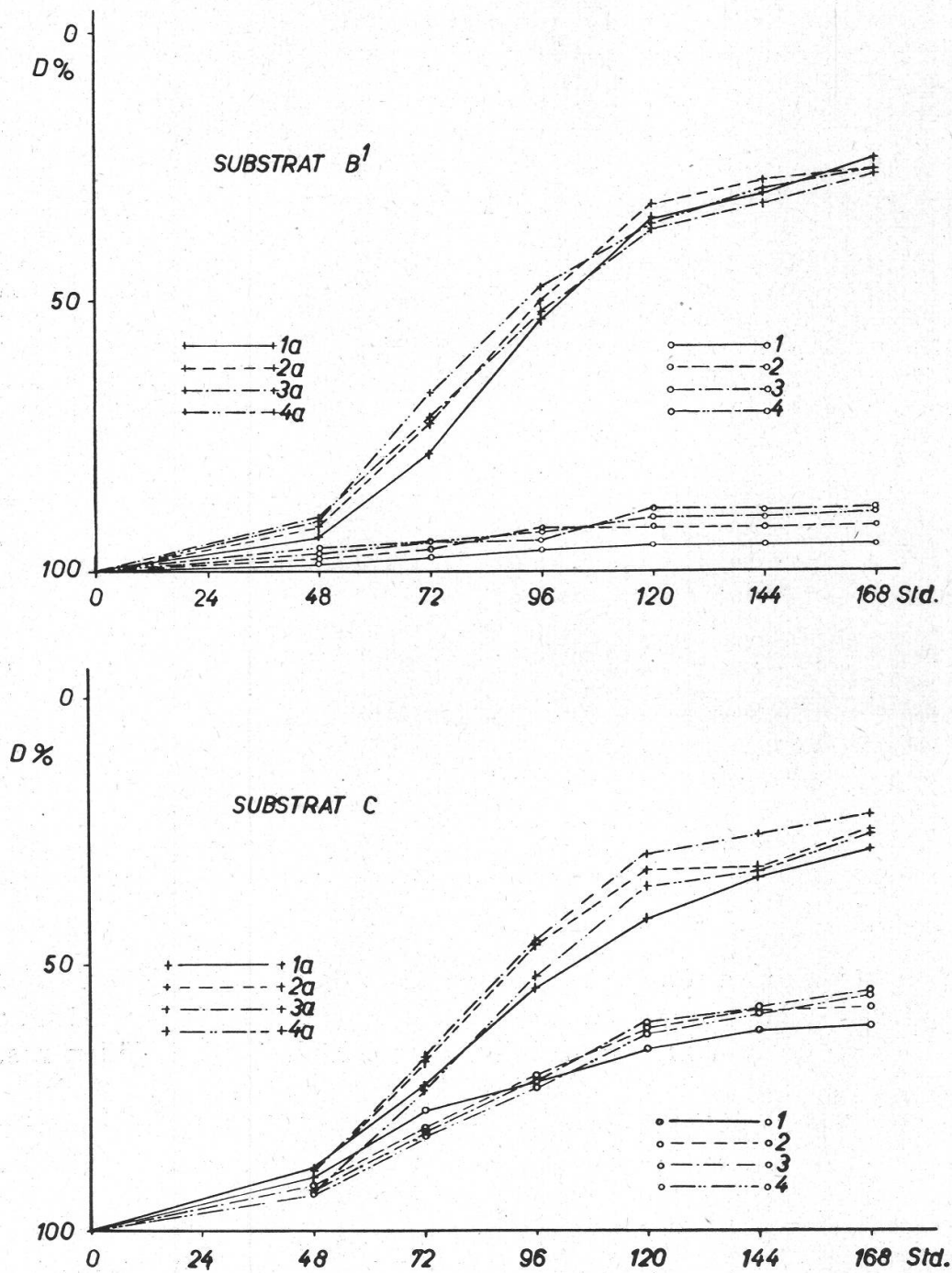
+ 2,5 mg/1000 ml Ca-Pantothenat

Tabelle 4

Zeit Stunden	Substrat B ¹ mit Ausgangs-pH							
	mit 3,05 Biotin	ohne	mit 4,00 Biotin	ohne	mit 5,00 Biotin	ohne	mit 5,98 Biotin	ohne
48	94,4	99,1	92,1	98,3	90,5	97,0	90,7	96,8
72	77,8	97,8	71,7	96,2	72,7	94,6	67,3	94,6
96	53,5	96,4	49,9	92,3	52,3	94,4	47,3	92,8
120	35,4	93,9	31,9	91,7	36,5	88,7	35,7	90,3
144	29,3	94,3	27,5	92,0	31,9	89,1	30,4	90,5
168	23,3	93,9	25,8	91,6	25,7	88,7	25,8	89,4
Zeit Stunden	Substrat C mit Ausgangs-pH							
	mit 3,00 Biotin	ohne	mit 4,00 Biotin	ohne	mit 4,95 Biotin	ohne	mit 5,98 Biotin	ohne
48	88,2	89,7	88,7	91,5	91,3	93,1	93,0	93,4
72	72,4	77,2	68,0	80,5	67,8	81,7	73,2	82,6
96	54,4	72,6	46,1	70,8	45,7	71,4	52,1	72,9
120	41,2	65,5	32,0	61,5	29,3	60,8	35,2	63,0
144	33,6	62,0	31,7	59,0	25,8	58,1	32,7	58,3
168	28,2	61,0	24,7	58,4	21,3	55,7	24,8	54,9

Tabellenwerte = Durchlässigkeit in %. 3 Tage altes, gewaschenes Impfmateriale aus Substrat C ohne Biotin. Durchlässigkeit unmittelbar nach der Impfung zirka 99 %

Stickstoff in Form von Caseinhydrolysat (Nährlösung C), tritt bei Abwesenheit jeglicher Wachstumsstoffe schwaches bis mittleres Wachstum ein. Zusatz von 25 γ /1000 ml (+)-Biotin verursacht in beiden Fällen rasche Entwicklung längs einer S-förmigen Wachstumskurve. Damit ist eine ausgesprochene Biotin-Heterotrophie festgestellt. Wie bereits erwähnt, haben Wikén und Mitarb. das Wachstumsstoffbedürfnis bei schweizerischen Kulturweihen untersucht und noch zwei andere Typen entdeckt. Die Stämme Fendant (75), Herrliberg und Salenegg (77) erwiesen sich als auxo-autotroph, während die Hefen Dézaley (76, 78), Maienfeld Ia und Spanien II (79) zur optimalen Entwicklung m-Inosit, (+)-Biotin und Pantothen säure verlangten. Vom gleichen biotin-heterotrophen Typ wie Polymorphus II war Ungarn I (79). Durch die auxo-autotrophen Eigenschaften der drei erstgenannten Stämme wird bewiesen, daß die fortwährende Weiterzüchtung unter künstlichen Bedingungen nicht notgedrungen zum Verlust des Synthesevermögens führen muß. Andererseits zeigt der übrige Teil der untersuchten Rassen in der Auxo-Heterotrophie eine derartige Vielgestaltigkeit, daß weitere Aussagen allgemeiner Natur zurzeit kaum möglich sein dürften.



Figur 11

Wachstum der Hefe Polymorphus II in den synthetischen Substraten B¹ und C mit bzw. ohne Biotin bei unterschiedlichem Ausgangs-pH

Ausgangs-pH in Substrat B¹:

- 1, 1a = 3,05
- 2, 2a = 4,00
- 3, 3a = 5,00
- 4, 4a = 5,98

1 —4: ohne Biotin
1a—4a: mit Biotin

Ausgangs-pH in Substrat C:

- 1, 1a = 3,00
- 2, 2a = 4,00
- 3, 3a = 4,95
- 4, 4a = 5,98

1 —4: ohne Biotin
1a—4a: mit Biotin

B. Die Verwertbarkeit der wichtigsten Kohlehydrate

1. Versuchsanordnung

Anlässlich der Arbeiten über die Wuchsstoffansprüche konnte beobachtet werden, daß die Sauerstoffversorgung Wachstumsgeschwindigkeit, den Zeitpunkt des Einsetzens der Phase rascher Vermehrung sowie Höchstwerte der Durchlässigkeitsabnahme beeinflusst. Die in Abschnitt 3 mitgeteilten Resultate werden diese Abhängigkeit in qualitativer und quantitativer Beziehung bestätigen. Bei geeigneter Wahl der Kulturgefäße läßt sich zeigen, daß die Verwertbarkeit eines Kohlehydrates als C-Quelle unter Umständen an das Vorhandensein von Sauerstoff gebunden ist.

O ₂ -Versorgung	Kulturgefäß	Substratmenge	Bemerkungen
gut	Fernbach-Kölbchen von ca. 500 ml Inhalt	30 ml	1mal pro Tag geschüttelt
mittel	Reagenzröhrchen Länge 160 ml innerer Durchmesser ca. 16 mm	8 ml	1mal pro Tag geschüttelt
0	Kugelverschluß- Röhrchen nach <i>Barker</i>	30–35 ml	während der ganzen Versuchsdauer ruhig stehen gelassen

Tabelle 5 orientiert über die auftretenden Veränderungen des Wachstums von Kulturen, welche in diesen drei Gefäßtypen gezüchtet wurden. Das stark verlangsamte Wachstum in Abwesenheit von Sauerstoff ist auffallend und bei der Aufstellung von Tabelle 8 angemessen berücksichtigt worden. So hat beispielsweise die Bezeichnung der ersten Kolonne

Tabelle 5

Zeit Stunden	5% Glucose in Substrat C mit 25 γ /1000 ml Biotin			Traubensaft		
	FK	RR	BR	FK	RR	BR
48	61,3	82,1	—	20,4	53,0	91,9
72	12,4	57,4	92,5	7,3	32,9	—
96	5,3	41,8	—	5,1	23,0	—
120	—	28,1	81,1	—	15,4	67,4
144	—	24,0	—	—	11,3	—
168	—	17,4	—	—	11,6	—
312	—	—	55,6	—	—	51,8

Tabellenwerte = Durchlässigkeit in %. 3 Tage altes, gewaschenes Zellmaterial aus Substrat C ohne Biotin

FK = Fernbach-Kölbchen

RR = Reagenzröhrchen

BR = Barker-Röhrchen

«Wachstum kräftig» unter anaeroben Bedingungen lediglich relative Bedeutung, und die Placierung von Raffinose und Dioxyaceton in die hinterste Kolonne müßte bei genügender Verlängerung der Versuchsdauer möglicherweise geändert werden.

2. Die Abhängigkeit des Wachstums von der Entkeimungsmethode

Die Prüfung der Kohlehydrate auf ihre Eignung als C-Quelle erfolgte mit der gleichen Methodik wie die Feststellung des Wuchsstoffbedarfes, wobei in den Substraten B¹ und C mit Biotinzusatz von 25 γ /1000 ml Glucose durch die zu prüfenden Zucker unter Einhaltung gleicher Konzentrationen ersetzt wurde. Die Sterilisation der zubereiteten Nährlösungen geschah teils in der früher angegebenen Weise, teils durch Seitz-Filter, unter nachheriger steriler Verteilung auf die Kulturgefäße. Wie Tabelle 6 zeigt, konnten auf diese Weise einige Anhaltspunkte über die allfällig eintretenden Substratveränderungen bei Hitzebehandlung gewonnen werden.

Tabelle 6

Zeit Stunden	Saccharose		Galactose		Lactose
	Behandlung im		Behandlung im		Behandlung im
	Autoklav	Seitz-Filter	Autoklav	Seitz-Filter	Autoklav
48	79,8	—	79,2	71,7	96,1
72	63,1	96,5	66,6	67,5	94,9
96	57,3	—	65,2	64,1	94,9
120	54,2	94,9	62,2	61,9	92,7
144	51,9	—	59,2	60,7	90,4
168	—	93,6	61,4	—	—
216	—	89,5			
264	—	85,5			
312	—	78,7			

Wachstum der Weinhefe Polymorphus II in Substrat C mit 25 γ /1000 ml (+)-Biotin und Ersatz der Glucose mit Saccharose resp. Galactose oder Lactose unter Vergleich von zwei verschiedenen Entkeimungsarten. Mittlere Impfung (98,5—99 %).

Tabellenwerte = Durchlässigkeit in %.

Die als C-Quelle ungeeignete Lactose ist in der Tabelle 6 vergleichshalber angeführt. Saccharose wird sicher bei dem herrschenden pH von 4,8—5,0 in der Hitze teilweise hydrolysiert. Die dabei entstehenden Glucose- und Fructoseanteile sind beide gut verwertbar und bedingen das rasche Wachstum (Durchlässigkeit nach drei bis vier Tagen zirka 60 %).

Die identischen Wachstumsgeschwindigkeiten im Falle der Galactose beweisen, daß Hitzesterilisation bei den Monosacchariden unbedenklich angewendet werden darf. Auf die interessante Erscheinung der nur langsamen und teilweisen Verwertung von Galactose ist auf Seite 24 näher eingegangen.

3. Ergebnisse

Aus den Versuchen mit Hilfe der Warburg-Technik (siehe S. 35) war bekannt, daß Dioxyaceton veratmet, Glucose, Fructose und Mannose veratmet und vergoren werden können. Von den 24 dort geprüften und in Tabelle 7 zusammengestellten Kohlehydraten wurde eine Anzahl der für die Hefephysiologie wichtigsten Mono- und Disaccharide nebst Raffinose und Dioxyaceton ausgelesen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 7

l(+)-Arabinose d(+)-Xylose l(—)-Xylose l(+)-Sorbose d-Ribose l(+)-Rhamnose	d(+)-Glucose d(—)-Fructose d(+)-Mannose d(+)-Galactose	d(+)-Cellobiose Lactose Maltose Saccharose Melibiose Trehalose	meso-Inosit Dulcit Sorbit	Glycogen Inulin Stärke
Dioxyaceton		Raffinose		

Zusammenstellung der in Wachstums- resp. Atmungs- und Gärversuchen geprüften Kohlehydrate.

Tabelle 8

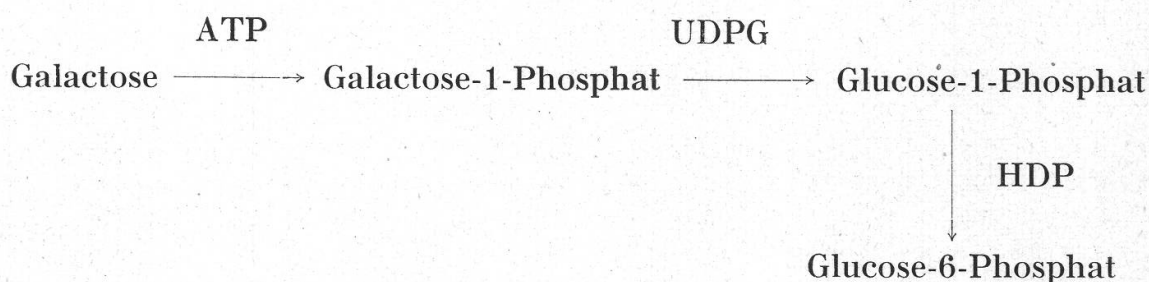
	Wachstum kräftig, sofort einsetzend	Wachstum langsam nach gewisser Zeit einsetzend	Kein Wachstum
Fernbach- Kölbchen	Glucose Fructose Mannose	Saccharose Galactose Maltose Dioxyaceton Raffinose	Lactose
Reagenz- röhrchen	Glucose Fructose Mannose	Saccharose Galactose Maltose (Raffinose) (Dioxyaceton)	Lactose
Barker- Röhrchen	Glucose Fructose Mannose	Saccharose Galactose Maltose	Raffinose Dioxyaceton Lactose

Zusammenstellung einiger wichtiger Kohlehydrate nach ihrer Eignung als C-Quellen bei Wachstumsversuchen in Substrat B¹ oder C mit Biotin (25 γ/1000 ml).

Ein Vergleich der Ergebnisse in Tabelle 8 mit der Zusammenstellung auf Seite 35 zeigt, daß die Weinhefe Polymorphus II besonders in Anwesenheit von O₂ imstande ist, beim Wachstum Kohlehydrate auszunützen, die von «ruhenden Zellen» weder veratmet noch vergoren werden. Die Wachstumskurve, welche sich für Galactose aus Tabelle 6 ableitet, läßt

vermuten, daß es sich hier offenbar um ein Beispiel der «langsamen Anpassung» handelt, die in den letzten Jahren intensiv untersucht worden ist.

In Experimenten mit *Saccharomyces fragilis* und *Saccharomyces marxianus* sowie andern Organismen konnte gezeigt werden, daß Galactose unter Phosphorylierung und Inversion am C-Atom 4 über Glucose nach dem Embden-Meyerhof-Schema abgebaut wird:



Coenzyme:

ATP = Adenosintriphosphat
 UDPG = Uridin-5'-Diphosphat-Glucose
 HDP = Hexosediphosphorsäure
 (Dixon in Werkman und Wilson
 [72 a], S. 292)

Alle drei Reaktionsstufen sind bewiesen, unsicher ist einzig der Inversionsmechanismus am vierten C-Atom (vgl. Leloir [29]). Die Galactozymase von Spiegelman und Mitarb. (65) besteht demnach aus zwei Enzymen, der Adenosintriphosphorsäure (Trucco und Mitarb. [71], Wilkinson [87]) und der Uridin-Diphosphoglucose (Caputto [8, 9]). Aus den Arbeiten über den Galactoseabbau geht nun hervor, daß diese beiden Enzyme induzierbar sind (Monod [44]). Solche induzierbare Enzyme werden also vom Organismus erst in Anwesenheit eines geeigneten Induktors (Enzymsubstrat) gebildet, ohne daß dieser selbst angegriffen oder vom Organismus zum Wachstum verwendet zu werden braucht. So haben Monod und Mitarb. (43) gefunden, daß Melibiose (6- α -D-Galatosyl-Glucose) die Bildung von β -Galactosidase in Kulturen von *Escherichia coli* induziert, ohne dabei verbraucht zu werden. Dagegen ist *Phenyl- β -D-Thiogalactosid* als Anpassungsindikator inaktiv, besitzt jedoch große Affinität zum Enzym. Die Induktion ist spezifisch. In den meisten Fällen dient allerdings der Induktor zugleich als Enzymsubstrat.

Aus diesem Grunde schlagen Monod und Cohn (44, 45) vor, an Stelle des von Karström (22) 1930 geschaffenen Begriffs der «adaptiven» Enzyme genauer von induzierten Enzymen zu sprechen. Die β -Galactosidase wird übrigens von *Escherichia coli* total synthetisiert, wie Monod und Cohn mit aktivem S und Spiegelman mit C¹⁴ bewiesen haben (46). Diese induzierte Biosynthese ist bei den betreffenden

Organismen genetisch fixiert (S p i e g e l m a n und Mitarb. [53, 66], M o n o d [45]). S p i e g e l m a n und Mitarb. (53, 66) haben nun gefunden, daß unter anaeroben Bedingungen Galactose von unadaptierten Hefezellen nicht als Enzymsubstrat verwendet werden kann, dagegen erfolgt eine Oxydation in Anwesenheit von Sauerstoff, wobei die freiwerdende Energie zur Enzymsynthese dient. Die Induktion erfolgt leichter in Anwesenheit von Ammonsalz im Substrat (S p i e g e l m a n [64]). (Vgl. auch M o n o d und C o h n [44].)

Diese Tatsachen erklären alle beobachteten Erscheinungen bei der Hefe Polymorphus II (Abbau nach gewisser Zeit nur in Anwesenheit von exogenem N, d. h. in den synthetischen Substraten B¹ und C, vor allem bei guter O₂-Versorgung, und die Nichtverwertung durch ruhende Zellen). Diese Erklärung ließe sich auch auf die fraglichen Disaccharide (Saccharose, Maltose) übertragen, gleichgültig, ob der Abbau direkt oder über die Spaltung in die entsprechenden Monosaccharide verläuft. Wie weit die Ergebnisse mit andern Organismen auch für die Kulturhefe Polymorphus II Gültigkeit haben, kann erst durch weitere Experimente entschieden werden.

C. Wachstumsversuche mit organischen Säuren

In den Versuchen zur Feststellung des Wuchsstoffbedarfes ist in jeder Serie Traubensaft mitgeprüft worden, um eine Kontrolle der Impfmenge und physiologischen Beschaffenheit der Zellen zu ermöglichen. Tabelle 9 enthält die Werte, welche in einem typischen Versuch mit Traubensaft und den synthetischen Substraten B¹ und C mit resp. ohne Biotinzusatz als Nährmedien gemessen wurden. Weder Lösung B¹ mit Biotin noch C mit Biotin gestatten eine maximale Vermehrung des Stammes. Da von den übrigen geprüften Vitaminen keines — weder einzeln noch in Kombination — einen fördernden Effekt auszuüben vermochte, war anzunehmen, daß die synthetischen Substrate in bezug auf andere Komponenten nicht optimal zusammengesetzt sind.

Tabelle 9

Zeit Stunden	Substrat B ¹		Substrat C		Traubensaft
	mit Biotin	ohne	mit Biotin	ohne	
48	97,1	97,5	96,3	96,8	91,4
72	84,7	93,8	83,8	86,0	60,5
96	56,9	88,5	52,4	71,6	36,4
120	42,2	85,7	38,5	60,9	28,1
144	34,2	82,7	27,1	55,0	21,1
168	26,1	79,7	23,2	49,4	16,5

Impfmateriel aus Substrat C ohne Biotin. Durchlässigkeit unmittelbar nach der Impfung 99,0—99,5 %. Werte = Durchlässigkeit in %.

In einer Versuchsfolge wurde im Substrat C + Biotin die zur Pufferung verwendete Citronensäure durch verschiedene andere organische Säuren unter Beibehaltung der bisherigen Versuchsanordnung ersetzt (Tabellen 10 und 11).

Tabelle 10

Zeit Stunden	Trauben- saft	Citronen- säure ¹ 0,02 M	Weinsäure 0,02 M	Bernstein- säure 0,02 M	dl-Äpfel- säure 0,02 M	Fumar- säure 0,02 M	Ohne Säure
24	90,1	—	—	—	—	—	—
48	52,3	92,0	96,1	89,5	83,9	96,1	93,9
72	33,9	71,7	79,7	69,3	57,2	79,7	73,6
96	25,1	58,2	68,2	53,2	37,4	68,2	63,3
120	17,7	54,6	61,4	47,1	29,6	61,4	56,6
144	14,0	46,0	53,0	42,5	23,5	53,0	51,4
168	—	42,9	49,6	37,2	20,7	49,6	47,9

¹ Ursprüngliches C-Substrat.

Wachstum der Hefe Polymorphus II im veränderten Substrat C + 25 γ /1000 ml Biotin: Citronensäure ersetzt durch die angegebenen organischen Säuren. Durchlässigkeit unmittelbar nach der Impfung 98,5—99 %. Wie in den Versuchen über den Wuchsstoffbedarf wurden hier je 5 Parallelröhrchen gemessen. Impfmateriel: 3 Tage alt, aus Substrat C ohne Biotin.

Aus den Tabellen 10 und 11 geht hervor, daß der wachstumsfördernde Effekt der Äpfelsäure wiederholt, und zwar in unabhängig voneinander angesetzten Versuchen, festgestellt werden konnte. Er trat aber nicht in allen Fällen in Erscheinung, so daß bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Vorbehalt zu berücksichtigen ist. Ein spezieller Versuch, einesteils schwach, andernteils kräftig geimpft, ergab keine gesicherten Unterschiede in bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit oder Endwerte der Substratrübung. Offenbar spielen hier Einflüsse eine Rolle, die durch die angewandte Methodik nicht kontrollierbar sind. Aus Tabelle 11 geht ferner hervor, daß innerhalb der untersuchten Grenzen die Konzentration der verwendeten Äpfel-, Wein- und Bernsteinsäure von geringem Einfluß ist. Hemmende Wirkung war bei größeren Mengen Citronensäure (0,1molar und mehr) und Fumarsäure (0,02molar und mehr) feststellbar.

D. Atmungs- und Gärversuche mit ruhenden Zellen

1. Methodisches

a) Experimentelles

aa) Apparaturen

Die Respirations- und Gärversuche wurden in einer Apparatur nach Warburg mit 14 Manometern durchgeführt. Es sei kurz in Erinnerung gerufen, daß das Meßprinzip auf der Bestimmung von Druckunter-

Tabelle 11

Versuch A																			
Zeit Stunden	Trauben- saft	Weinsäure ¹					Citronensäure					dl-Äpfelsäure					Ohne Säure		
		0,005 M	0,01 M	0,02 M	0,05 M	0,005 M	0,01 M	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M	0,005 M	0,01 M	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M		
48	60,1	68,0	85,4	82,6	84,2	98,5	83,6	83,2	88,5	99,7	98,2	78,3	79,8	83,0	80,2	83,0	87,9	87,9	
72	37,6	55,7	54,2	51,2	50,6	64,0	54,1	55,9	65,8	98,6	98,0	44,9	44,0	48,4	43,5	45,4	54,5	63,8	
96	31,9	46,5	45,3	44,5	43,0	45,3	38,1	42,0	52,9	—	—	33,7	36,5	36,6	34,3	37,2	40,9	56,7	
120	22,4	39,3	37,8	36,5	36,0	36,4	30,9	36,4	42,0	—	—	29,5	28,6	27,2	25,8	25,8	29,1	45,1	
144	13,8	35,9	37,8	35,6	31,6	33,8	27,0	32,9	35,3	—	—	22,2	23,3	22,1	24,5	20,8	22,7	40,4	
168	13,1	32,8	30,1	31,1	27,1	29,3	22,1	26,2	31,2	97,5	99,7	19,9	12,4	20,0	19,7	19,5	20,7	36,9	

Versuch B																			
Zeit Stunden	Trauben- saft	Fumarsäure ¹					Bernsteinsäure					dl-Äpfelsäure							
		0,005 M	0,01 M	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,005 M	0,01 M	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M	0,005 M	0,01 M	0,02 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M	
48	46,7	79,0	78,0	77,2	81,4	79,6	77,2	81,4	77,9	81,1	80,7	83,3	60,7	61,8	62,9	61,2	68,6	71,6	
72	31,5	64,4	65,3	69,5	71,6	73,4	68,4	70,0	68,9	73,4	73,5	74,2	42,2	44,0	42,1	40,5	46,8	52,8	
96	25,1	54,7	54,3	61,3	69,0	66,9	58,8	67,2	61,3	66,8	66,1	66,9	31,6	31,7	32,8	29,0	34,9	41,0	
120	16,6	46,7	48,1	52,1	60,2	59,7	50,0	58,5	55,8	59,4	58,4	60,9	26,0	27,7	24,9	26,3	26,7	31,8	
144	14,9	41,1	45,7	47,0	51,7	56,1	48,7	50,2	49,8	50,4	51,5	52,9	20,4	20,5	21,8	21,1	21,8	24,9	
168	10,2	38,4	39,3	52,5	52,6	55,8	40,6	45,3	44,2	46,7	44,0	43,3	18,0	17,7	16,2	16,8	17,1	22,9	

¹ Größere Mengen dieser zwei Säuren sind im Substrat nicht mehr vollständig löslich.

Wachstum von Polymorphus II in Substrat C mit (+) - Biotin; Ersatz der Citronensäure durch andere organische Säuren in verschiedenen Konzentrationen. Konzentrationsangaben pro 1000 ml Substrat. Die Versuche A und B sind nicht gleichzeitig angesetzt worden. Gleiche Methodik wie in den Wachstumsversuchen mit Vitaminen (pro Meßpunkt 5 Parallelröhrchen).

schieden unter nachheriger Umrechnung auf Gasvolumina beruht. Die am Manometer abgelesenen Druckdifferenzen werden kumulativ notiert, durch die Werte der Thermobarometer (Ausgleich der Schwankungen von Außendruck und Wasserbadtemperatur) korrigiert und aus der so erhaltenen «Druckkurve» mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors eine «Volumenkurve» unter Bezug auf Normalbedingungen berechnet (U m - b r e i t und Mitarb. [72]). Die Gefäßkalibrierung erfolgte mit Quecksilber. Die konischen Gefäße hatten ein Volumen von zirka 16 bis 19 ml und waren mit zwei angeschmolzenen Anhängen versehen, welche auf ihrer Oberseite je einen drehbaren Glasstopfen mit geeigneter Bohrung und Schliff trugen. Auf diese Weise konnte das ganze Gefäß zur Herstellung einer O₂-freien Atmosphäre mit Stickstoff durchblasen werden. In der Mitte des Hauptraumes befand sich ein eingeschmolzener Glaszylinder zur Aufnahme von Kalilauge (0,2 ml einer 20prozentigen Kalilauge-lösung), in welchen zur Vergrößerung der Absorptionsoberfläche ein gefaltetes Stück Filtrierpapier tauchte. Diese Anordnung gewährleistete bei den Atmungsversuchen die quantitative Aufnahme des gebildeten Kohlendioxydes. Das Zentralgefäß war am oberen Rand mit Wollfett versehen, um ein allfälliges Überkriechen von Lauge zu verhindern. Die Apparatur zur Herstellung von sauerstofffreiem Stickstoff bestand aus einem Quarzglasrohr mit Kupferdrahtnetz, das elektrisch auf 400 bis 450° C erhitzt wurde. Dem Ofen waren eine Batterie von vier Gaswaschflaschen mit total 3800 ml alkalischer Pyrogallollösung (6 Volumina 60 % KOH + 1 Volumen 25 % Pyrogallol) und je eine Einzelflasche mit konzentrierter Schwefelsäure resp. konzentrierter Kalilauge vorgeschaltet. Schließlich wurde das aus dem Quarzrohr austretende Gas noch mit 20prozentiger Kalilauge von CO₂ gereinigt. Die Reduktion des Kupfers erfolgte durch Überleiten von Bombenwasserstoff. Gummischlauchverbindungen wurden auf ein Minimum beschränkt und sämtliche Glasschliffe mit Wollfett gedichtet. 30 Minuten dauerndes Durchblasen der Warburg-Gefäße mit gereinigtem Stickstoff genügte, um einwandfrei anaerobe Bedingungen zu schaffen. Alle Versuche wurden bei 28° C und einer Schüttelfrequenz von 120 Schwingungen pro Minute durchgeführt.

bb) Pufferlösung und Beschickung der Kölbchen

R u n n s t r ö m und S p e r b e r (55) sowie R u n n s t r ö m und Mitarb. (56) haben bei Stoffwechseluntersuchungen mit Preßhefe Bernsteinsäurepuffer verwendet, ohne dabei störende Einflüsse der Bernsteinsäure festzustellen. In ähnlicher Weise hat auch B r a n d t (6) solche Pufferlösungen bei Untersuchungen über den Einfluß von Kohlendioxyd auf den Stoffwechsel von Preßhefe verwendet. Unsere Versuche mit der Rasse Polymorphus II — wie auf Seite 26 erwähnt — ergaben, daß die Anwesenheit von Bernsteinsäure in einem synthetischen Substrat weder fördernden noch hemmenden Einfluß auf das Wachstum dieser Wein-

hefe ausübt. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte die Säure bei den Respirationsversuchen verwendet werden (siehe Tabelle 11).

Bei B r a n d t (6) finden sich detaillierte Angaben über Herstellung und Eigenschaften von Na-Succinatpuffern. Es wurde in der Folge bei allen Respirationsversuchen eine 0,16 M Na-Bernsteinsäurelösung von pH 4,90 verwendet (200 ml 0,5 M Bernsteinsäurelösung + 235,6 ml 0,5 M Natronlauge + 189,4 ml dest. Wasser). In diesem Puffer wurden die gewaschenen Hefezellen suspendiert, und zwar so viel, daß 1 ml Suspension 25 mg Naßhefe enthielt. Bei einem durchschnittlichen Trockensubstanzgehalt von 21 % betrug das Trockengewicht von 2 ml suspendierter Hefe somit zirka 10,5 mg. Die Kölbchen wurden schließlich nach folgendem Schema beschickt:

Hauptraum: 2 ml Hefesuspension (enthaltend 50 mg Naßhefe)
Zentralgefäß: 0,2 ml KOH (20 %)
Seitenanhänge: je 0,25 ml einer 5prozentigen Kohlehydratlösung (gelöst in Puffer)

Im Kölbchen befanden sich demnach total 2,7 ml Flüssigkeit. Dieses Volumen wurde konsequent eingehalten, wenn notwendig unter Ergänzung mit Pufferlösung. Die so vorbereiteten Gefäße wurden in die Apparatur eingesetzt und während 15 bis 20 Minuten bei offenen Manometerhahnen geschüttelt. Erst dann erfolgte das Einkippen der Kohlehydratlösungen. Im Falle von anaerober CO₂-Bestimmung wurde, wie bereits erwähnt, statt dessen während 30 Minuten Stickstoff durchgeleitet.

cc) Gewinnung und Vorbereitung des Zellmaterials

Die ersten orientierenden Versuche ergaben, daß bei der Züchtung des zu untersuchenden Zellmaterials besonders sorgfältig vorzugehen ist. Wie aus den später dargestellten Ergebnissen hervorgeht, spielen nicht nur die Sauerstoffverhältnisse während der Züchtung eine große Rolle, sondern ebenso das für die Impfung dieser Kulturen verwendete Ausgangsmaterial. Um eine Selektion (A t w o o d [4]) durch die fortwährenden Passagen in den synthetischen Substraten zu vermeiden, wurden jene in regelmäßigen Abständen unterbrochen und von Bierwürzeagarstrichen ausgehend wieder neu begonnen. Welcher Art die eintretenden Veränderungen bei fortgesetzter Kultivierung in den synthetischen Substraten sind, wurde nicht festgestellt.

Für die Untersuchung über den Einfluß der Lüftung bei wachsenden Kulturen wurde als Gefäß ein Glaszylinder von zirka 100 cm Länge und 18 cm innerem Durchmesser verwendet. Die untere Verjüngung war mit einer Sinterplatte abgeschlossen, durch welche sterile Luft eingepreßt werden konnte. Es handelt sich somit im Prinzip um eine Art von vergrößertem Kluver-Kolben. Die obere Verjüngung des Rohres trug als Abschluß eine Hebervorrichtung zur täglichen sterilen Entnahme der

Zellen nebst einer mit Watte verschlossenen Öffnung zur Impfung der eingefüllten 15 Liter Substrat und als Auslaß der unten eingepreßten Luft. Für alle andern Bestimmungen stammten die Zellen aus Fernbach-Kolben von 1800 ml Inhalt, welche 300 ml Substrat enthielten und täglich einmal geschüttelt wurden. Zur Vorbereitung für die Respirationsversuche mußten die Zellen durch Zentrifugieren vom Substrat abgetrennt und zweimal in destilliertem Wasser gewaschen werden. Ein drittes Abschleudern entfernte nochmals einige Tropfen Wasser, worauf das sog. Naßgewicht ermittelt wurde.

dd) Bestimmung des unter aeroben Bedingungen entwickelten Kohlendioxyds (« Atmungs- CO_2 »)

Während Sauerstoffaufnahme und anaerobe CO_2 -Abgabe ohne weiteres aus den abgelesenen Druckdifferenzen berechnet werden können,

$$x_{\text{O}_2} = h \cdot k_{\text{O}_2}$$

$$x_{\text{CO}_2} (\text{anaerob}) = h \cdot k_{\text{CO}_2}$$

muß für die Messung des Atmungs- CO_2 eine Anordnung getroffen werden, welche gestattet, die Entwicklung resp. Aufnahme zweier Gase nebeneinander zu bestimmen. Dies ist beispielsweise mit Hilfe der «direkten Methode» möglich (Umbreit [72], S. 16). Sie beruht auf der Annahme, daß in zwei Parallelmanometern, von denen nur das eine Kalilauge zur Absorption des entwickelten CO_2 enthält, der Gasstoffwechsel der Zellen tatsächlich identisch bleibt und durch die verschiedenartige Zusammensetzung der Gasphase nicht beeinflußt wird.

Die Ermittlung der aeroben CO_2 -Abgabe berechnet sich aus den abgelesenen Druckdifferenzen der beiden Parallelmanometer wie folgt:

$$x_{\text{CO}_2} (\text{aerob}) = (h'' - \frac{h' \cdot k_{\text{O}_2}}{k''_{\text{O}_2}}) k''_{\text{CO}_2}$$

- h' = abgelesene Druckdifferenz am Manometer 1 (mit Kalilauge)
- h'' = abgelesene Druckdifferenz am Manometer 2 (ohne Kalilauge)
- k = Gefäßkonstanten
- k'_{O_2} = Umrechnungsfaktor für Manometer 1 bei O_2 -Aufnahme
- k''_{O_2} = Umrechnungsfaktor für Manometer 2 bei O_2 -Aufnahme
- k''_{CO_2} = Umrechnungsfaktor für Manometer 2 bei CO_2 -Abgabe
- x_{CO_2} = $\mu\text{l CO}_2$ pro Ablesung bezogen auf Normalbedingungen

Im folgenden bedeutet Q die durchschnittliche Atmungs- resp. Gärgeschwindigkeit während der approximativ geradlinigen Phase unter Berücksichtigung der verwendeten Hefemenge: $Q = \mu\text{l Gas/Std.} \times 10 \text{ mg Hefetrockensubstanz.}$

b) Beispiel für die Berechnung von Q

Tabelle 12

Zeit Min.	Gasumsatz von 30 mg Naßhefe in Anwesenheit von 1% Glucose (μ l)			Endogener Gasumsatz von 30 mg Naßhefe in μ l		
	O ₂	CO ₂ aerob	CO ₂ anaerob	O ₂	CO ₂ aerob	CO ₂ anaerob
30	108	575	569	—	—	—
60	221	1080	1222	52	53	4
90	363	1586	1769	—	—	—
120	500	2031	2299	75	84	9
150	647	2474	2798	—	—	—
180	801	2885	3269	96	108	10
210	937	3292	3689	—	—	—
240	1119	3698	3975	111	129	14
270	1290	4103	4112	—	—	—
300	1448	4551	4149	124	144	18
330	1585	4967	—	—	—	—
360	1736	5223	4158	138	165	24

Aus Tabelle 12 läßt sich Q berechnen:

Mit Glucose	approximativ lineare Phase		μ l/Std.	$\frac{Q}{\mu$ l/Std. $\times$ 10 mg TS
	von	bis		
O ₂	60	360 Min.	303	481
CO ₂ aerob	0	330 Min.	903	1433
CO ₂ anaerob	0	210 Min.	1054	1673
Ohne Glucose				
O ₂	60	360 Min.	17	27
CO ₂ aerob	60	360 Min.	22	35
CO ₂ anaerob	0	360 Min.	4	7

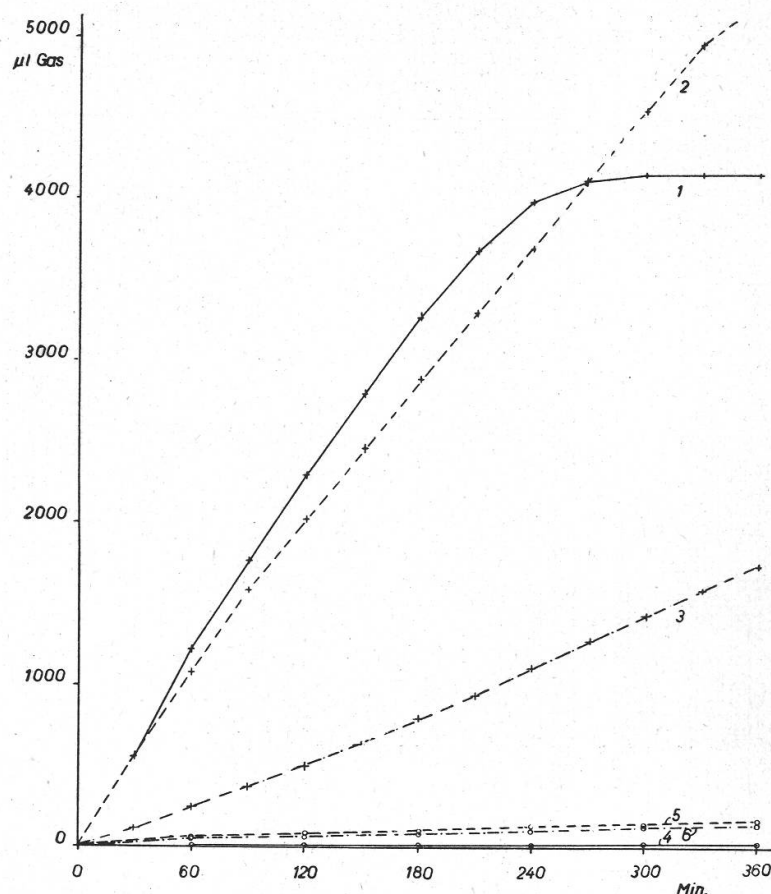
Wie aus Tabelle 12 hervorgeht, ist der endogene Gasumsatz der Hefe Polymorphus II so klein, daß er in den Berechnungen der Atmungs- und Gärgeschwindigkeiten vernachlässigt werden darf (siehe Figur 12).

2. Resultate der Respirationsversuche

a) Einfluß des unterschiedlichen Alters von Kulturen auf den Gasaustausch

aa) Einfluß auf die Atmung

Die Sauerstoffaufnahme wurde von Zellen aus den synthetischen Substraten B¹ und C unter Vergleich mit solchen aus Traubensaft bestimmt. Die Durchschnittswerte mehrerer Versuche in Tabelle 13 sind aus dem approximativ geradlinigen Teil der Atmungskurve pro 10 mg Trockensubstanz und Stunde berechnet.



Figur 12

Gasumsatz der Hefe Polymorphus II in Anwesenheit von 1 % Glucose bzw. in Abwesenheit von Glucose. Pro Kölbchen 30 mg Hefe (Naßgewicht)

- 1 = CO₂-Abgabe unter anaeroben Bedingungen. 1 % Glucose
- 2 = CO₂-Abgabe unter aeroben Bedingungen. 1 % Glucose
- 3 = O₂-Aufnahme. 1 % Glucose
- 4 = CO₂-Abgabe unter anaeroben Bedingungen. Ohne Glucose
- 5 = CO₂-Abgabe unter aeroben Bedingungen. Ohne Glucose
- 6 = O₂-Aufnahme. Ohne Glucose

Tabelle 13

Alter der Kulturen in Tagen	Substrat B ¹ unbelüftet	Substrat C		Traubensaft unbelüftet
		unbelüftet	belüftet	
1	462	—	—	448
2	448	—	—	447
3	474	—	555	460
4	418	478	238	455
5	424	444	247	462
6	404	446	130	454
7	418	362	—	388

$Q_{O_2}^{Luft}$ von Zellen aus Kulturen verschiedenen Alters bei Züchtung in drei verschiedenen Substraten. Werte in $\mu l O_2/Std. \times 10 mg$ Hefetrockensubstanz, berechnet aus dem approximativ geradlinigen Teil der Atmungskurven.

Die Atmungsgeschwindigkeiten von Zellmaterial aus den drei unbelüfteten Substraten sind ungefähr von gleicher Größe, die bei Zellen zunehmenden Alters verhältnismäßig wenig abnimmt. Dagegen weist vier bis sechs Tage altes Material aus belüftetem C-Substrat eine deutlich herabgesetzte Respiration auf (Tabelle 13). Die durchschnittliche Geschwindigkeit bei der Veratmung von Glucose durch drei Tage altes Material aus unbelüftetem C-Substrat beträgt $439 \mu\text{l/Std.} \times 10 \text{ mg Hefetrockensubstanz}$.

bb) Einfluß auf die anaerobe Gärung

In parallelen Experimenten wurde auch die CO_2 -Abgabe unter anaeroben Bedingungen bestimmt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14

Alter der Kulturen in Tagen	Substrat B ¹ + Biotin	Substrat C + Biotin	Traubensaft
1	568	—	270
2	1822	1648	—
3	1462	1750	310
4	1316	1444	628
5	954	1136	720
6	942	806	604
7	790	570	472

$Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ von Zellen aus Kulturen verschiedenen Alters bei Züchtung in drei verschiedenen Substraten. Werte in $\mu\text{l CO}_2/\text{Std.} \times 10 \text{ mg Hefetrockensubstanz}$, berechnet aus dem approximativ geradlinigen Teil der Gärkurve.

Aus Tabelle 14 ist ersichtlich, daß zwei bis drei Tage altes Zellmaterial aus den verwendeten synthetischen Nährlösungen die größte «Gärkraft» aufweist. Wird dagegen Traubensaft zur Züchtung der Zellen verwendet, erreichen die anaeroben Gärgeschwindigkeiten erst am fünften Tag ihr Maximum, doch bleiben die hier bestimmten Werte weit hinter den in den beiden andern Fällen gemessenen zurück. Analog dürften die Verhältnisse unter aeroben Bedingungen gestaltet sein, wenigstens ergab, wie Tabelle 15 zeigt, ein orientierender Versuch mit Zellmaterial aus biotinhaltigem C-Substrat im Prinzip ähnliche Ergebnisse.

Tabelle 15

	Alter der Kultur in Tagen				
	3	4	5	6	7
$\mu\text{l CO}_2 \dots$	1426	1144	1136	806	570

$Q_{\text{CO}_2}^{\text{Luft}}$ von Zellen aus Kulturen verschiedenen Alters bei Züchtung in C-Substrat mit Biotin. Werte in $\mu\text{l CO}_2/\text{Std.} \times 10 \text{ mg Hefetrockensubstanz}$, berechnet aus dem approximativ geradlinigen Teil der Gärkurve.

Aus einer Anzahl von Warburg-Versuchen mit solchen Zellen [Fernbach-Kolben, Substrat C mit (+)-Biotin] konnten für Glucose folgende Gärgeschwindigkeiten berechnet werden:

unter anaeroben Bedingungen: $1708 \mu\text{l CO}_2/\text{Std.} \times 10 \text{ mg Hefetrockensubstanz}$

unter aeroben Bedingungen: $1596 \mu\text{l CO}_2/\text{Std.} \times 10 \text{ mg Hefetrockensubstanz}$

b) Einfluß der Lüftung während der Züchtung des Zellmaterials

In gleicher Weise wie mit den unbelüfteten Zellen wurden auch einige Versuche mit belüftetem Material aus dem früher beschriebenen Kluyver-Kolben angestellt. Die dabei ermittelten Gärgeschwindigkeiten in Luft resp. N_2 -Atmosphäre sind in Tabelle 16 unter Vergleich mit den analogen Werten von unbelüftetem Material aus Fernbach-Kolben zusammengefaßt.

Tabelle 16

Alter der Kulturen in Tagen	Zellen aus Fernbach-Kolben		Zellen aus Kluyver-Kolben	
	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{Luft}}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{Luft}}$	$Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$
3	—	—	600	822
4	1144	1754	309	329
5	1136	1346	301	301
6	806	834	137	116
7	570	788	—	—

CO_2 -Produktion von Zellen aus Kulturen verschiedenen Alters unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Substrat C + 25 γ pro 1000 ml Biotin. Werte in $\mu\text{l CO}_2/\text{Std.} \times 10 \text{ mg Hefetrockensubstanz}$.

Wie aus Tabelle 16 hervorgeht, tritt bei den belüfteten Zellen eine ähnliche Abnahme der Gärtätigkeit ein wie bei den unbelüfteten. Das Maximum der Gärgeschwindigkeit dürfte dort bereits am ersten oder zweiten Tag nach der Impfung erreicht werden, doch liegen für eine zuverlässig Berechnung der quantitativen Unterschiede mit diesem Material zu wenig Versuche vor.

c) Bestimmung von vergär- und veratembaren Kohlehydraten

24 Kohlehydrate (vgl. Tabelle 7, S. 23) wurden mit Hilfe der Warburg-Technik auf ihre Verwertbarkeit durch ruhende Zellen geprüft. Jeder Ansatz enthielt in der Pufferlösung 50 mg Naßhefe und 25 mg Zucker (1 %).

Nicht verwertbar sind:

l(+)-Arabinose	d(+)-Cellobiose	Glycogen	meso-Inosit
d(+)-Xylose	Lactose	Inulin	Dulcit
l(—)-Xylose	Maltose	Stärke	Sorbit
l(+)-Sorbose	Saccharose		
d-Ribose	Melibiose		
l(+)-Rhamnose	Trehalose		
d(+)-Galactose		Raffinose	

und verwertet werden:

aerob und anaerob

d(+)-Glucose

d(—)-Fructose

d(+)-Mannose

aerob

Dioxyaceton

Innerhalb einer Versuchszeit von vier bis fünf Stunden werden Saccharose, Galactose und Maltose von *ruhenden Zellen* nicht angegriffen, wie dies bei den *wachsenden Kulturen* der Fall war (vgl. Tabelle 8, (S. 23)).

Von Bedeutung ist die Tatsache, daß Dioxyaceton nur in Anwesenheit von Sauerstoff umgesetzt wird. Es soll in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß Iwasaki (21) mit *Saccharomyces Ludwigii* unter anaeroben Bedingungen folgende Gärgeschwindigkeiten ermittelt hat:

$Q_{\text{CO}_2}^{\text{N}_2}$ (bei 28° C in Phosphatpuffer)

Versuch	2 % Glucose	2 % Dioxyaceton
1	186	68,4
2	221	143

Das Verhältnis von $Q_{\text{Dioxyaceton}} : Q_{\text{Glucose}}$ ist abhängig von den Züch-
tungsbedingungen. Es beträgt etwa 0,7, wenn die Zellen in Glucose-
Bierwürze gezogen werden, und steigt auf 1 an, wenn das Substrat Hefe-
wasser + Dioxyaceton dient. Für die Weinhefe Polymorphus II ließen
sich in einem Versuch mit Zellmaterial aus Nährlösung C mit Biotin eine
Verhältniszahl von 0,66 aus folgenden Q-Werten bestimmen:

für Glucose	470 $\mu\text{l}/\text{Std.} \times 10 \text{ mg}$ Hefetrockensubstanz
für Dioxyaceton	300 $\mu\text{l}/\text{Std.} \times 10 \text{ mg}$ Hefetrockensubstanz

Das Fehlen der anaeroben Gärung läßt darauf schließen, daß das
allgemeine Schema von L o h m a n n (36) und M e y e r h o f (40) des
Dioxyaceton-Abbaues für unseren Stamm kaum gilt.

d) Die mit den verwertbaren Kohlehydraten erreichten Atmungs- und Gärgeschwindigkeiten

In mehreren voneinander unabhängigen Versuchen wurden die auf-
tretenden Unterschiede bei Veratmung und Vergärung quantitativ erfaßt.

Tabelle 17

C-Quelle	Atmung			Gärung (anaerob)		
	Q_{O_2}	mittlere Abweichung δ	Anzahl Versuche	$Q_{CO_2}^{N_2}$	mittlere Abweichung δ	Anzahl Versuche
Glucose	439	15,4	14	1708	120,7	6
Fructose	461	11,0	2	2495	35,0	2
Mannose	420	13,0	6	1374	62,7	3
Dioxyaceton	233	17,0	2	—	—	—

Vergleichshalber sind in Tabelle 18 einige Werte aus der Literatur zusammengestellt, wie sie in Versuchen mit andern Organismen erhalten wurden.

Tabelle 18

Organismus	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{O_2}$	$Q_{CO_2}^{N_2}$	Autor
Chlorella	30 000–50 000	—	—	Holzer und Holzer (19)
Streptomyces griseus	130*	—	—	Bartholomew und Mitarb. (5) Rolinson (54)
Penicillium chrysogenum	72	—	—	
Mycelium Radicis atrovirens	27	—	—	Somm (63)
Azotobacter chroococcum	2000	—	—	Meyerhof und Burk (38)
Saccharomyces cerevisiae Fleischmann-Stamm 139 ¹	90*	300*	425*	Winzler und Mitarb. (89)
Saccharomyces carlsbergensis ²	—	—	500–800	Hopkins und Pennington (20)
Kloeckera brevis ²	—	—	450–500	Hopkins und Pennington (20)
Saccharomyces Ludwigii	52,2	122,8	179	Meyerhof und Iwasaki (39)
Saccharomyces cerevisiae Stamm K ³	15*	52*	—	Sheffner und Lindegren (61)

Q_{O_2} = μ l aufgen. O_2 /Std. $\times$ mg TS.

$Q_{CO_2}^{O_2}$ = μ l abgeg. CO_2 unter aerob. Bed./Std. $\times$ mg TS.

$Q_{CO_2}^{N_2}$ = μ l abgeg. CO_2 unter anaeroben Bed./Std. $\times$ mg TS.

* Fußnoten siehe gegenüberliegende Seite.

Im Vergleich zu den Werten für verschiedene Organismen in Tabelle 18 erhielten wir für Polymorphus II:

$$Q_{O_2} = 43,9 \qquad Q_{CO_2}^{Luft} = 159,6 \qquad Q_{CO_2}^{N_2} = 170,8$$

E. Versuche mit ruhenden Zellen über die Kohlenstoffbilanz

1. Chemische Analysenmethoden

a) Glucose

Die Glucosebestimmung erfolgte nach der durch Stiles und Mitarb. (68) modifizierten Methode von Shaffer und Hartmann (60). Es wurde festgestellt, daß die Bestimmung durch andere Stoffe im Substrat nicht gestört wird, so daß sich eine Vorbehandlung erübrigte. Die praktische Durchführung erfolgte nach den Angaben von Aebi (1). Meßbereich 0,2—2,0 mg Glucose, Genauigkeit 0,01 mg/Probe.

b) Äthanol

Äthanol wurde zur Hauptsache nach Friedemann und Klaas (16) (Oxydation mit Kaliumpermanganat) und vergleichshalber auch nach Stahly und Mitarb. (67) (Oxydation mit Kaliumbichromat) bestimmt. Da bei der Friedemannschen Methode nicht nur die Permanganatoxydation, sondern auch die vorausgehende Abdestillation des Äthanol aus dem Substrat leicht zu fehlerhaften Resultaten führen kann, wurde, in Abänderung des beschriebenen Verfahrens, der Alkohol in dreifacher Paralleldestillation abgetrennt, nach der zweiten, alkalischen Destillation die Destillate vereinigt und von diesem Gemisch drei aliquote Teile oxydiert. Meßbereich: 0,1—1,0 mg Äthanol/Probe. Es wurde ferner mehrfach geprüft, ob außer Äthanol noch andere Alkohole in den Substraten auftreten. Diese wurden alkalisch destilliert, mit Kaliumbichromat oxydiert und das entstandene Oxydationsprodukt chromatographiert (Elsden [14], Aebi [1]) resp. mit Hilfe der Duclaux-Destillation (siehe Tabelle 19) identifiziert. Aus Tabelle 20 geht hervor, daß das Produkt der Bichromatoxydation praktisch nur Essigsäure enthält.

* Werte, welche aus Kurven oder durch Umrechnung erhalten wurden.

¹ In Anwesenheit von Biotin + NH₃.

² In Anwesenheit von (NH₄)₂SO₄ in KH₂PO₄-Puffer.

³ Mit 0,5 % Galactose. Q = abhängig von Galactosekonzentration.

Tabelle 19

	Überdestillierte Essigsäure in % der vorgelegten Menge in				
	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml	100 ml
	Destillat				
	11,38	23,80	37,76	54,50	77,19
	11,19	23,51	37,87	54,66	76,87
	11,42	23,60	37,45	54,31	76,78
	11,32	24,15	38,30	55,09	77,74
	11,58	24,39	38,60	55,44	76,84
	11,38	23,79	37,76	54,48	77,24
Durchschnitt	11,38	23,87	37,96	54,75	77,11
δ	0,08	0,25	0,39	0,39	0,28

Destillation einer 0,001*n*-Essigsäure-Lösung nach D u c l a u x .

Tabelle 20

	Überdestillierte Säuremenge in % der gesamten Säuremenge in				
	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml	100 ml
	Destillat				
Gärversuch <i>a</i>	11,43	24,46	38,75	55,71	78,57
Gärversuch <i>b</i>	11,51	24,13	38,70	55,48	77,53
Gärversuch <i>c</i>	11,39	24,17	37,92	55,28	77,50
Zeitversuch					
Gärdauer 5 Stunden aerob	10,93	22,95	36,79	52,82	74,86
anaerob	11,40	23,90	37,68	53,86	75,37
Gärdauer 10 Stunden aerob	11,36	23,12	37,12	53,96	76,67
anaerob	11,40	23,55	37,38	54,02	76,45
Gärdauer 15 Stunden aerob	11,32	23,40	37,55	54,16	75,85
anaerob	11,31	23,85	37,16	54,42	76,68
Gärdauer 20 Stunden aerob	11,36	23,12	37,12	53,96	76,67
anaerob	11,40	23,55	37,38	54,02	76,45

D u c l a u x - Destillation des oxydierten Alkohols aus Gärungen mit der Hefe Polymorphus II.

c) Ätherextrahierbare Säuren

Da die Wasserstoffionenkonzentration im Verlaufe der Gärung stets anstieg, wurden die Substrate außer auf wasserdampfflüchtige Säuren auch auf allfällig auftretende organische, nichtflüchtige Säuren wie folgt analysiert:

Kontinuierliche Extraktion von 15—20 ml Substrat in einer modifizierten Apparatur nach K u t s c h e r - S t e u d e l während 24 Stunden und drei- bis viermal wiederholtes Ausschütteln unter Zusatz von Am-

monsulfat. Titration mit 0,02n Natronlauge. Dieses Vorgehen ergab sich wegen der verhältnismäßig hohen Bernsteinsäurekonzentration (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21

	% zurückbestimmt				
	Kontinuierliche Extraktion	Ausschütteln			
		I	II	III	Total
0,5 mEq Zn-Lactat	—	62,20	22,69	0,00	84,89
0,5 mEq Zn-Lactat + 3,5 g Ammonsulfat	—	78,12	17,22	5,06	100,40
4,812 mEq Bernsteinsäure + 10,5 g Ammonsulfat	—	69,31	21,30	5,94	96,55
4,812 mEq Bernsteinsäure + 0,5 mEq Zn-Lactat + 13,5 g Ammonsulfat	—	67,40	17,09	12,87	97,36
Zn-Lactat + Puffer (4 Bestimmungen) ...	95,72	2,69	1,03	0,65	100,09
Zn-Lactat (2 Bestimmungen)	97,53	1,39	0,88	—	99,80

Angesäuert mit 10—12 Tropfen konz. H_2SO_4 , 3,5 g Ammonsulfat pro 5 ml Lösung. Ausgeschüttelt mit je 150 ml Äther.

d) Wasserdampf-flüchtige Säuren

Diese Bestimmung konnte unverändert von A e b i (1) übernommen werden (Destillation der 15fachen Menge des vorgelegten Substratvolumens in der von Wikén und Mitarb. [74] modifizierten Markham-Apparatur). Die vorgenommene Duclaux-Destillation ergab — wie aus Tabelle 22 ersichtlich —, daß es sich um Essigsäure handelte (Gesamtmenge höchstens 0,5 mEq/100 ml Substrat).

Tabelle 22

	Überdestillierte Säuremenge in % der gesamten Säure in				
	20 ml	40 ml	60 ml	80 ml	100 ml
	Destillat				
Aerob	11,77	24,60	39,00	55,42	77,78
Aerob	11,91	24,37	38,64	55,54	77,56
Anaerob	11,80	24,44	38,76	55,62	77,53
Anaerob	11,73	24,34	38,56	55,13	77,13
Standardwerte (Tabelle 19) ...	11,38	23,87	37,96	54,75	77,11

D u c l a u x - Destillation der nach aerober resp. anaerober Gärung erhaltenen Wasserdampfdestillate.

2. Kohlenstoffbilanz

a) Versuchsergebnisse

Die Bilanzversuche wurden teils in der Warburg-Apparatur, teils in Fernbach-Kolben mit aufgesetzten Gärverschlüssen durchgeführt und die Anordnung so getroffen, daß die erhaltenen Resultate vergleichbar sind. Lediglich in einem Fall trat an Stelle von Bernsteinsäurepuffer destilliertes Wasser. Die Fernbach-Kolben enthielten 400 ml, die Warburg-Gefäße 2,5 ml Substrat. Nach Versuchsabbruch wurde ein Teil der Lösung für die Trockensubstanzbestimmung abgetrennt und der Rest bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt. Die quantitative Überführung des Substrates aus den Warburg-Kölbchen konnte mit der achtfachen Menge von Spülwasser erreicht werden, wobei sie zur Vermeidung von Verlusten in Eis eingebettet blieben.

Zur Ermittlung des Trockengewichtes wurden die Zellen in G-4-Glasfiliertiegel abgesogen, zweimal mit je 20 ml Wasser gewaschen und bei 105° C während 16 Stunden getrocknet. Das fünf Tage alte Impfmaterial stammte aus Erlenmeyer-Kölbchen mit je 40 ml Nährlösung C mit Biotin. Die Resultate einiger Bilanzversuche sind in den Tabellen 23 bis 26 zusammengestellt.

1. Versuche im Warburg-Apparat

Tabelle 23

Versuch	Glucose- verbrauch m-C-Atom	Äthanol		CO ₂		TS m-C-Atom 2	Säure m-C-Atom 1	Total	
		m-C-Atom	%	m-C-Atom	%			m-C-Atom	%
1	26,382	11,975	45,5	7,144	27,0	—	3,201	22 320	84,60
2	26,124	13,410	51,5	7,500	19,1	0,969	?	21,898	83,82
3	23,742	10,573	44,6	6,608	15,6	0,559	?	17,739	74,67

Analyse nach Abschluß der anaeroben CO₂-Produktion. Angaben pro 100 ml Substrat.
¹ als Milchsäure, ² als Glucose. TS = Trockensubstanz.

II. Versuche in Fernbach-Kolben

Tabelle 24

Zeit Stunden	Glucose- verbrauch m-C-Atom	Äthanol		Trocken- substanz m-C-Atom ²	Säure m-C-Atom 1	Total	
		m-C-Atom	%			m-C-Atom	%
6	13,620	7,602	55,8	0,685	2,21	10,50	77,0
12	22,464	12,706	56,6	0,392	2,73	15,83	70,5
18	23,796	12,464	52,4	0	0,72	13,18	55,5
24	23,796	12,900	54,3	0,560	3,99	17,40	73,0

a) Zeitversuch ohne Bestimmung des CO₂. Je zwei Parallelkolben. Angaben pro 100 ml Substrat. 0,16 M Na-Bernsteinsäurepuffer als Suspensionsmittel. 1 % Glucose. Anaerob.
¹ als Milchsäure, ² als Glucose.

Tabelle 25

Zeit Stunden	Glucose- verbrauch m-C-Atom	Äthanol		Trocken- substanz m-C-Atom ²	Säure m-C-Atom ¹	Total	
		m-C-Atom	%			m-C-Atom	%
6	11,412	6,558	57,3	—0,26	0,99	7,29	63,9
12	18,354	11,084	60,5	—0,60	1,03	11,51	62,8
18	21,834	12,706	58,2	—0,76	0,96	12,91	59,1
24	23,124	13,820	60,0	—0,91	1,03	13,94	59,8

b) Parallelversuch zu a. Wasser als Suspensionsmittel (gleiche Hefesuspension). Anaerob. ¹ als Milchsäure, ² als Glucose.

Tabelle 26

Zeit Stunden	Glucose- verbrauch m-C-Atom	Äthanol		Trockensubstanz				Säure ¹ m-C-Atom	Total	
		m-C-Atom	%	mg	m-C-Atom				m-C-Atom	%
					2	3	Ø			
aerob 5	14,250	8,736	61,3	28,25	0,941	1,083	1,012	1,245	10,993	77,1
anaerob	13,572	8,604	63,5	18,52	0,671	0,710	0,664	1,359	10,627	77,5
aerob 10	20,844	12,282	58,7	29,65	0,998	1,137	1,062	1,791	15,135	72,6
anaerob	21,186	12,996	61,4	17,85	0,594	0,684	0,640	2,217	15,853	75,0
aerob 15	22,512	12,074	53,7	21,25	0,708	0,815	0,761	?	12,835	57,0
anaerob	22,794	13,320	58,5	11,85	0,395	0,454	0,425	1,224	14,969	65,8
aerob 20	22,926	13,388	58,5	8,65	0,288	0,332	0,310	?	13,696	59,3
anaerob	22,926	13,920	60,8	2,65	0,088	0,102	0,095	2,073	16,088	70,3

Zeitversuch. 0,16 M Na-Bernsteinsäurepuffer. 1% Glucose. Aerob: Luft. Anaerob: N₂
¹ als Milchsäure, ² als Glucose, ³ als Polysaccharid mit einem C-Gehalt von 46%.

b) Diskussion

Wie aus den Bilanztabellen 23 bis 26 hervorgeht, sind außer Äthanol und CO₂ — auch unter Verwendung von «ruhenden Zellen» — noch andere Stoffwechselprodukte anzutreffen. Diese Feststellung steht in Übereinstimmung mit den Angaben von Kleinzeller (23), der die Bildung von Bernsteinsäure bei verschiedenen Hefearten beobachtet und die dazu notwendigen Bedingungen untersucht hat. Wachsende Zellen produzierten keine Bernsteinsäure, dagegen ruhende in Anwesenheit von Glucose und Bikarbonatpuffer. Ferner konnte die Aufnahme von CO₂ nachgewiesen werden. Daß auch Polymorphus II zur Säurebildung schreiten kann, beweist die Zunahme der Wasserstoffkonzentration, wenn als Suspensionsmedium destilliertes Wasser verwendet wird (Zeitversuch II b, Tab. 25):

Dauer der Gärung in Std.	pH
0	6,54
6	3,92
12	3,85
18	3,85
24	3,91

Es ist aus den Zeitversuchen aber nicht ersichtlich, ob es sich bei der gebildeten Säure um ein Intermediär- oder um ein Endprodukt handelt. Die angewandte Methodik müßte zur Untersuchung dieser Frage verbessert werden, da die gebildete Säuremenge 1 mAeq/100 ml Substrat kaum übersteigt. Häufig enthielt der Ätherauszug auch keine neue Säure (in den Tabellen 23 und 26 mit ? vermerkt). Aus der Zunahme des Trockensubstanzgewichtes darf geschlossen werden, daß entweder der von den Zellen mitgeführte Stickstoff- und Vitaminvorrat genügt, um eine gewisse Zellvermehrung einzuleiten, oder daß eine Speicherung in den bereits vorhandenen Zellen ohne Erhöhung ihrer Zahl stattfindet. Nun haben S w a n s o n und C l i f t o n (70) in Experimenten mit wachsenden Zellen von «Fleischmann»-Preßhefe ähnliche Zahlen gefunden, wie dies in den vorliegenden Bilanzversuchen der Fall war. Die quantitative Wiederauffindung des vorgegebenen Kohlenstoffes gelang dort erst nach einer Versuchsdauer von 64 bis 72 Stunden; nach 16 Stunden wurden nur 58,8 % «Äthanol»-Kohlenstoff bestimmt, was mit den Werten in den Tabellen 25 und 26 übereinstimmt (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27

	Zeit in Stunden						
	16	23	27	40	52	64	72
%	80,1	86,8	90,8	81,3	85,1	97,7	101,7

Totalmenge wiedergefundenen Kohlenstoffes in wachsenden Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae*. Nach S w a n s o n und C l i f t o n (70).

W i n z l e r und B a u m b e r g e r (88) fanden in Äthanol und CO₂ 70,5 % Kohlenstoff, während im Zellmaterial 29,5 % eingebaut vorlagen. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch v a n N i e l und A n d e r s o n (47) mit mehreren *Torula*- und *Saccharomyces cerevisiae*-Arten. Die angewandte Methodik ist auch aus andern Gründen zu verbessern. So beruht die Bestimmung der verbrauchten Glucose auf der Berechnung der Differenzen zwischen der freien Zuckermenge unmittelbar nach Glucosezusatz und derjenigen in einem bestimmten Zeitpunkt. Die Reduktionswerte nehmen aber im Anfang viel schneller ab, als den neugebildeten Gärprodukten entsprechen würde. Diese Erscheinung ist schon lange

bekannt (Willstätter und Rohdewald [86], Mirski und Wertheimer [41]) und hat seinerzeit zu der Annahme geführt, daß Glucose in eine gebundene, nichtreduzierende Form übergeht. Es ist denkbar, daß diese Produkte bei der Trockensubstanzbestimmung nicht erfaßt werden, sondern durch Auswaschung der gravimetrischen Bestimmung entzogen werden. Andere Intermediärprodukte, wie Diacetyl, Acetoin und 2,3-Butylen-glycol, waren bei der qualitativen Prüfung nicht nachzuweisen.

IV. Zusammenfassung

1. Die vorliegende Arbeit befaßt sich zur Hauptsache mit methodischen Fragen der Stoffwechseluntersuchung der Weinhefe Polymorphus II. In erster Linie wurden zwei synthetische Substrate zur Züchtung des Stammes ausprobiert und damit Anhaltspunkte über den Wuchsstoffbedarf, den Einfluß organischer Säuren auf das Wachstum und die Eignung einiger Kohlehydrate als Kohlenstoffquelle gewonnen. Durch Anwendung der Warburg-Technik konnte auf die Bedeutung der bei der Gewinnung von Untersuchungsmaterial herrschenden Züchtungsbedingungen aufmerksam gemacht werden. Auch bei der Aufstellung von Kohlenstoffbilanzen kam mit aller Deutlichkeit zum Ausdruck, daß die anzuwendende Methodik einer kritischen Überprüfung bedarf. Die bei den einzelnen Untersuchungsgebieten gewonnenen Resultate sind unter den folgenden Punkten kurz zusammengefaßt.
2. In den synthetischen Nährlösungen B¹ und C mit Ammonsalz bzw. Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle wurde der Vitaminbedarf der Kulturweinhefe Polymorphus II durch Messen der Substrattrübung im Spektrophotometer bestimmt. Der genannte Stamm ist biotinheterotroph, und die Vitamine Aneurin, Adermin, meso-Inosit und Pantothen säure vermögen Wachstumsgeschwindigkeit und Endwert der Trübung weder einzeln noch in Kombination wesentlich zu steigern. Damit nimmt diese Hefe eine Mittelstellung innerhalb der von Wikén und Mitarb. beschriebenen auxo-autotrophen und für mehrere Vitamine heterotrophen Kulturweinhefen ein.
3. Es werden Versuchsergebnisse mitgeteilt, in welchen dl-Äpfelsäure als Ersatz der Citronensäure im synthetischen Substrat C einen wachstumsfördernden Einfluß ausübt. Weinsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Citronensäure sind ohne Einfluß auf das Wachstum oder wirken sogar hemmend. Die Abklärung der Rolle organischer Säuren im Stoffwechsel der Weinhefen bedarf aber weiterer Versuche.
4. Mit Hilfe der Warburg-Technik wurde der Gasstoffwechsel quantitativ erfaßt. Zur Untersuchung gelangte Zellmaterial verschiede-

nen Alters aus dem belüfteten oder unbelüfteten Substrat C mit Biotin. Die Geschwindigkeiten der aeroben und anaeroben Gärung sind vom Alter des verwendeten Materials abhängig, wogegen das Ausmaß der Atmung nur innerhalb kleiner Grenzen variiert. Für Zellen von drei Tage alten Kulturen aus unbelüftetem Substrat C ließen sich folgende für die Kulturhefe Polymorphus II charakteristische Atmungs- und Gärgeschwindigkeiten bestimmen:

Sauerstoffaufnahme	439 μ l/Std. $\times$ 10 mg Hefetrockensubstanz
aerobe Gärung	1596 μ l/Std. $\times$ 10 mg Hefetrockensubstanz
anaerobe Gärung	1708 μ l/Std. $\times$ 10 mg Hefetrockensubstanz

In der Literatur sind für den Gasumsatz verschiedener Brauerei- oder Bäckereihefen zum Teil wesentlich höhere Werte angegeben (siehe Tabelle 18, S. 36), so daß die Weinhefe Polymorphus II tatsächlich als eine langsam vergärende Rasse bezeichnet werden darf.

5. Abschließend wurde versucht, eine Kohlenstoffbilanz der Glucosevergärung durch «ruhende Zellen» in 0,16molarer Bernsteinsäurelösung aufzustellen. Es gelang aber nicht, den vorgegebenen Kohlenstoff in den Stoffwechselprodukten quantitativ wieder aufzufinden. Die bei der getroffenen Versuchsanordnung beobachtete Zunahme der Zelltrockensubstanz beweist, daß zur Erfassung der ablaufenden Vorgänge die Methodik einer Verfeinerung bedarf. Erst nach Erfüllung dieser Voraussetzung ist eine genauere Kenntnis der Weinhefephysiologie zu erwarten.

V. Literaturverzeichnis

1. Aebi, H.: Diss. Eidg. Techn. Hochschule Zürich, 1951.
2. Aji, S. J., Hart, W. R., und Werkman, C. H.: *Enzymologia* **14**, 1, 1950.
3. Atkin, L., Gray, P. P., Moses, W., und Feinstein, M.: *European Brew. Convention, Congr. Lucerne* **1**, 96, 1949.
4. Atwood, K. C., Schneider, L. K., und Ryan, F. J.: *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **16**, 345, 1951.
5. Bartholomew, W. H., Karow, E. O., Sfat, M. R., und Wilhelm, R. H.: *Industr. Engng. Chem.* **42**, 1801, 1950.
6. Brandt, K. M.: *Acta physiol. Scand.* **10**, Suppl. XXX, 1945.
7. Burkholder, P. R.: *Am. J. Bot.* **30**, 206, 1943.
8. Caputto, R., Leloir, L. F., Trucco, R. E., Cardini, C. E., und Paladini, A. C.: *J. biol. Chem.* **179**, 497, 1949.
9. — — Cardini, C. E., und Paladini, A. C.: *J. biol. Chem.* **184**, 333, 1950.
10. Christman, J. F., und Lichstein, H. C.: *J. Bact.* **60**, 107, 1950.
11. Copping, A. M.: *Biochem. J.* **23**, 1050, 1929.
12. Craig, A., und Snell, E.: *J. Bact.* **61**, 283, 1951.
13. Delwich, E. A.: *J. Bact.* **59**, 439, 1950.

14. Elsdén, S. R.: *Biochem. J.* **40**, 252, 1946.
15. Feldott, G., und Lardy, H. A.: *J. biol. Chem.* **192**, 447, 1951.
16. Friedemann, E. T., und Klaas, R.: *J. biol. Chem.* **115**, 471, 1936.
17. Gale, E. F.: *Biochem. J.* **32**, 1583, 1938.
18. — und Stephenson, M. J.: *Biochem. J.* **32**, 392, 1938.
19. Holzer, H., und Holzer, H.: *Chem. Ber.* **85**, 655, 1952.
20. Hopkins, R. H., und Pennington, R. J.: *J. gen. Microbiol.* **4**, 171, 1950.
21. Iwasaki, K.: *Biochem. Z.* **203**, 237, 1928.
22. Karström, H.: *Erg. Enzymforsch.* **7**, 350, 1930.
23. Kleinzeller, A.: *Biochem. J.* **35**, 495, 1941.
24. Koser, S. A., Wright, M. H., und Dorfmann, A.: *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **51**, 204, 1942.
25. Kroemer, K., und Krumholz, G.: *Arch. f. Mikrobiol.* **2**, 352, 1931.
26. Krumholz, G.: *Arch. f. Mikrobiol.* **2**, 411, 1931.
27. Lardy, H. A., Potter, R. L., und Elvehjem, C. A.: *J. biol. Chem.* **169**, 451, 1947.
28. — — *J. biol. Chem.* **179**, 721, 1949.
29. Leloir, L. F.: *Adv. Enzym.* **14**, 193, 1953.
30. Leonian, L. H., und Lilly, V. G.: *Am. J. Bot.* **29**, 459, 1942.
31. Lichstein, H. C., und Umbreit, W. W.: *J. biol. Chem.* **170**, 329, 1947.
32. — und Christman, J. F.: *J. Bact.* **58**, 565, 1949.
33. — *J. Bact.* **60**, 485, 1950.
34. — *Vitamins and Hormones* **9**, 27, 1951.
35. Lodder, J., und Kregger-van Rij, N. J. W.: *The Yeasts*. Amsterdam 1952.
36. Lohmann, K.: *Biochem. Z.* **277**, 261, 1935.
37. Melville, D. B., Pierce, J. G., und Partridge, C. W. H.: *J. biol. Chem.* **180**, 299, 1949.
38. Meyerhof, O., und Burk, D.: *Z. physik. Chem.* **139 A**, 117, 1928.
39. — und Iwasaki, K.: *Biochem. Z.* **226**, 16, 1930.
40. — und Kissling, W.: *Biochem. Z.* **281**, 266, 1935.
41. Mirski, A., und Wertheimer, E.: *Enzymologia* **7**, 58, 1939.
42. Modess, O.: *Symb. Bot. Upsal.* **V:1**, 1941.
43. Monod, J., Cohen-Bazire, B., und Cohn, M.: *Biochem. et Biophys. Acta* **7**, 585, 1951.
44. — und Cohn, M.: *Adv. Enzym* **13**, 67, 1952.
45. — *Schweiz. Z. Path. und Bakt.* **15**, 407, 1952.
46. — und Cohn, M.: *VI. Congr. int. Microbiol. Roma, 1953, Symp.* **2** (*Metabolisma microbica*).
47. Niel, C. B. van, und Anderson, E. H.: *J. cell. comp. Physiol.* **17**, 49, 1941.
48. Ochoa, S., Mehler, A., Blanchard, M. L., Jukes, T. H., Hoffmann, C. E., und Regan, M.: *J. biol. Chem.* **170**, 413, 1947.
49. Pennington, D., Sawyer, Ch., und Schmidt, J.: *J. Bact.* **62**, 677, 1951.
50. Pickett, M. J., und Clifton, C. E.: *J. cell. comp. Physiol.* **21**, 77, 1943.
51. Plaut, G. W. E., und Lardy, H. A.: *J. biol. Chem.* **186**, 705, 1950.
52. Potter, R. L., und Elvehjem, C. A.: *J. biol. Chem.* **172**, 531, 1948.
53. Reiner, J. M., und Spiegelman, S.: *J. gen. Physiol.* **31**, 51, 1947.
54. Rolinson, G. N.: *J. gen. Microbiol.* **6**, 336, 1952.
55. Runnström, J., und Sperber, E.: *Biochem. Z.* **298**, 340, 1938.
56. — Borei, H., und Sperber, E.: *Ark. Kemi, Min. Geol.* **13 A**, Nr. 22, 1939.
57. Schelhorn, M. von: *Z. f. Lebensm. Unters. u. -Forsch.* **91**, 117, 1950.
58. Schopfer, W. H.: *Plants and Vitamins*, Waltham, Mass. 1949.
59. Schultz, A. S., und Atkin, L.: *Arch. Biochem.* **14**, 369, 1947.
60. Shaffer, P. A., und Hartmann, A. F.: *J. biol. Chem.* **45**, 365, 1920—21.

61. Sheffner, A. L., und Lindegren, C. C.: J. Bact. **64**, 423, 1952.
62. Shive, W., und Rogers, L. L.: J. biol. Chem. **169**, 453, 1947.
63. Somm, H.: Schweiz. Z. Path. und Bakt. **15**, 478, 1952.
64. Spiegelman, S.: Ann. Missouri Bot. Garden **32**, 139, 1945.
65. — Reiner, J. M., und Morgan, I.: Arch. Biochem. **13**, 113, 1947.
66. — — und Cohnberg, R.: J. gen. Physiol. **31**, 27, 1947.
67. Stahly, G. L., Osburn, D. L., und Werkman, C. H.: Analyst **59**, 319, 1934.
68. Stiles, H. R., Peterson, W. H., und Fred, E. B.: J. Bact. **12**, 427, 1926.
69. Stokes, J. L., Larsen, A., und Gunness, M.: J. biol. Chem. **167**, 613, 1947.
J. Bact. **54**, 219, 1947.
70. Swanson, H., und Clifton, C. E.: J. Bact. **56**, 115, 1948.
71. Trucco, R. E., Caputto, R., Leloir, L. F., und Mittelmann, N.: Arch. Biochem. **18**, 137, 1948.
72. Umbreit, W. W., Burris, R. H., und Stauffer, J. F.: Manometric Techniques and related methods for the study of Tissue Metabolism. 3rd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Co. 1947.
- 72a. Werkman, C. H., und Wilson, P. W.: Bacterial Physiology. Academic Press Inc. New York 1951.
73. Wessmann, G. E., und Werkman, C. H.: Arch. Biochem. **26**, 214, 1950.
74. Wikén, T., Richard, O., und Aebi, H.: Experientia **6**, 114, 1950.
75. — — Antonie van Leeuwenhoek **17**, 209, 1951.
76. — — Schweiz. Z. Path. und Bakt. **14**, 560, 1951.
77. — — Antonie van Leeuwenhoek **18**, 31, 1952.
78. — — Antonie van Leeuwenhoek **18**, 294, 1952.
79. — — Somm, H., und Sulzer, F.: VI. Congr. int. Microbiol. Roma 1953.
80. Wildiers, E.: La Cellule **18**, 313, 1901.
81. Williams, R. J., Mosher, W. A., und Rohrman, E.: Biochem. J. **30**, 2036, 1936.
82. — Eakin, R. E., und Snell, E. E.: J. Am. chem. Soc. **62**, 1204, 1940.
83. — und Mitarb.: Univ. Texas Publ. Nr. 4137, 1941.
84. — Biol. Rev. **16**, 49, 1941.
85. — und Fieger, E. A.: J. biol. Chem. **166**, 335, 1946.
86. Willstätter, R., und Rohdewald, M.: Hoppe-Seyler Z. **247**, 269, 1937.
87. Wilkinson, J. F.: Biochem. J. **44**, 460, 1949.
88. Winzler, R. J., und Baumberger, J. P.: J. cell. comp. Physiol. **12**, 183, 1938.
89. — Burk, D., und Vigneaud, V. du: Arch. Biochem. **5**, 25, 1944.
90. Wright, L. D., Cresson, E. L., Skeggs, H. R., Peck, R. L., Wolf, D. E., Wood, T. R., Valiant, J., und Folkers, K.: Science **114**, 635, 1951.
91. — — — Wood, T. R., Peck, R. L., Wolf, D. E., und Folkers, K.: J. Am. chem. Soc. **74**, 1996, 1952.