

Teilhydrolysate an Carboraffin-Celite-Säulen mit Wasser, 5%igem und 15%igem Alkohol chromatographiert und die Eluate mittels eines stündlich transportierenden Fraktionsschneiders aufgefangen. Das Trennungsergebnis zeigt Abb. 1. Die mit 15%igem Alkohol erhältlichen Fraktionen werden derzeit untersucht.

Reinigung der Fraktionen und Isolierung der Saccharose: Die mit 5%igem Alkohol erhaltenen positiv drehenden Fraktionen von 11 Ansätzen (330 g lufttrockenes Inulin) wurden ebenso wie die die Inulobiose enthaltenden Fraktionen noch einmal an einer Kohle-Celite-Säule chromatographiert. Abb. 2 zeigt, daß in der positiven Fraktion nur Spuren von Fruktose, jedoch noch relativ viel Inulobiose vorhanden war. Die vereinigten, stark positiv drehenden Fraktionen wurden im Vak. bei 20 bis 30° schonend zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wog 7,6 g; er wurde in zirka 50 ml Alkohol heiß gelöst und filtriert. Beim Erkalten kristallisierten 3,6 g Saccharose aus, was einer Ausbeute von 1,2% des eingesetzten Inulins entspricht. Die Identitätsprüfung wurde bereits im theoretischen Teil beschrieben. Aus der alkohol. Mutterlauge konnten keine weiteren Kristallivate erhalten werden und ihre papierchromatographische Prüfung ergab, daß sie ein Gemisch von 6 verschiedenen Kohlehydraten enthält, das wir noch weiter untersuchen wollen.

Der *Laevasan-Gesellschaft Linz* (*Franck* und *Dr. Freudl*) sagen wir für die Bereitstellung der Ausgangsmaterialien und die fördernde Unterstützung herzlichen Dank.

Veränderungen des Glucosestoffwechsels bei einem durch Einwirkung von Acetat sporulierenden Stamm von Bäckerhefe

(Kurze Mitteilung)

Von

J. J. Miller, Eszter Scheiber, O. Gabriel und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus dem Department of Biology, Hamilton College, McMaster University, Hamilton, Ontario, und dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 12. März 1957)

Nach den Untersuchungen von *Winge*¹ stellt die Sporulierung der Hefe die Bildung von haploiden Sporen aus diploiden vegetativen Zellen dar, das heißt, der Kern einer sporulierenden Zelle ist der Meiose unterworfen, während der Kern wachsender Zellen sich durch Mitose teilt. Beim Übergang aus dem Zustand des Wachstums in denjenigen der Sporulierung erfolgen demnach Veränderungen von großer biologischer Bedeutung. Obwohl sonst die Biochemie der Hefe schon sehr intensiv

¹ Ö. *Winge*, C. r. trav. lab. Carlsberg, sér. physiol. 21, 71 (1935).

bearbeitet wurde, scheint dem Vorgang der Sporulierung von dieser Seite aus noch wenig Beachtung geschenkt worden zu sein².

Mit der Absicht, biochemische Veränderungen, die den Vorgang der Sporulierung begleiten, aufzudecken, untersuchten wir zuerst das Verhalten des Kohlehydratstoffwechsels der Hefe beim Übergang vom Zustand des Wachstums zu dem der Sporulierung. Die Prüfung dieser Verhältnisse erschien uns auch deshalb von Interesse, weil nach früheren Untersuchungen³ einige Zwischenprodukte des Kohlehydratstoffwechsels, und zwar Glucose, Brenztraubensäure, Acetaldehyd, Äthanol und Essigsäure, wenn sie in geringen Konzentrationen als einzige Nährstoffe im Medium vorliegen, unter aeroben Bedingungen die Sporulierung verursachen.

Zu einer derartigen Untersuchung erschien uns die manometrische Technik nach *Warburg* am geeignetsten.

Wir arbeiteten mit einem Stamm von Bäckerhefe, welcher bereits bei früheren Untersuchungen⁴ verwendet worden war; die Zellen wurden mit Hilfe der dort beschriebenen Technik gezüchtet. Als Sporulierungsmedium diente m/30 Phthalatpuffer von pH 5, der 0,3% Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) enthielt. Aus einer 2 Tage alten wachsenden Hefekultur wurden nach Abzentrifugieren des Nährmediums so viele Zellen dem Sporulierungsmedium zugesetzt, daß dieses 4 Millionen Zellen/ml enthielt. Die so erhaltene Suspension wurde in 100-ml-Anteilen in 1-l-Kulturflaschen eingefüllt; diese wurden auf ihre flache Seite gestellt im Brutschrank bei 27° sanft geschüttelt, wodurch das Absetzen der Zellen vermieden und eine ausreichende Belüftung gewährleistet wurde.

Die *Warburg*-Kölbchen enthielten ein Totalvolumen von 3 ml Flüssigkeit, davon 1 ml Hefesuspension (12 Millionen Zellen) in Pufferlösung von pH 5, weitere 1,9 ml der gleichen Pufferlösung und 0,1 ml m/10 Glucose (im Seitenarm). Die Versuche unter aeroben und anaeroben Bedingungen wurden bei 27° mit der üblichen Technik⁵ durchgeführt.

Aus den in Tabelle 1 zusammengestellten Daten ist ersichtlich, daß die Fähigkeit der Hefe zur Veratmung von Glucose während der Sporulierung in 0,3%iger Acetatlösung abnimmt. Nach 2 Tagen im Sporulierungsmedium ist die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme in Anwesenheit von Glucose auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes reduziert, während die Abgabe von CO_2 unter aeroben Bedingungen auf ein Drittel absinkt. Unter anaeroben Bedingungen wird nur etwa ein Viertel der ursprünglichen Menge an CO_2 entwickelt. Die aerobe Glykolyse und damit auch der respiratorische Quotient sinken in signifikanter Weise ab.

² Vgl. dazu aber: *B. Pazonyi*, Acta microbiol. acad. sci. Hung. 1, 49 (1954).

³ *J. J. Miller* und *C. Halpern*, Canad. J. Microbiol. 2, 519 (1956).

⁴ *J. J. Miller*, Canad. J. Microbiol., im Druck.

⁵ *W. W. Umbreit, R. H. Burris* und *J. F. Stauffer*, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, 2. Aufl. Minneapolis. 1949.

Tabelle 1. Einfluß von Wachstum, Sporulierung und Nährstoffverarmung auf den Glucosestoffwechsel eines Stammes von Bäckerhefe; Dauer der Versuche 120 Min.

Vorbehandlung der Hefezellen	O ₂ -Aufnahme μl	CO ₂ -Abgabe aerob μl	CO ₂ -Abgabe anaerob μl	Aerobe Glykolyse μl CO ₂	Respiratorischer Quotient O ₂ /CO ₂	Prozent der Zellen, die Sporen enthalten
Zellen aus dem Wachstumsmedium.	72,4	157,4	86,6	85,0	2,18	0
Zellen nach 1 Tag in 0,3% Acetat-lösung	52,1	71,3	26,0	19,2	1,37	8,5
Zellen nach 2 Tagen in 0,3% Acetat-lösung	36,9	54,1	24,5	17,8	1,48	35,0
Zellen nach 3 Tagen in 0,3% Acetat-lösung	29,8	41,8	7,2	12,0	1,40	47,0
Zellen aus dem Wachstumsmedium.	83,6	166,2	93,5	82,6	2,04	0
Zellen nach 1 Tag in Pufferlösung ohne Acetat	57,8	133,0	87,5	75,2	2,30	0
Zellen nach 2 Tagen in Pufferlösung ohne Acetat	53,0	110,3	69,5	57,3	2,13	0

Da es vorstellbar wäre, daß die beobachteten Effekte bei den sporulierenden Zellen, die ja nur Acetat als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung haben, eine Folge einer Verarmung an Nährstoffen ist, unternahmen wir Kontrollversuche mit Zellen, die aus dem Wachstumsmedium in die gleiche Pufferlösung, die aber kein Acetat enthielt, übertragen worden waren. Wohl zeigten auch diese Zellen, wenn sie auf Glucose gebracht wurden, eine verringerte Sauerstoffaufnahme, doch waren damit proportionale Veränderung der aeroben und anaeroben CO₂-Abgabe verbunden, so daß der respiratorische Quotient keine wesentliche Veränderung erfuhr. Unter diesen Bedingungen fand, wie zu erwarten war, auch keine Sporulierung statt. Somit scheint es, daß die Veränderungen im Kohlehydratstoffwechsel nicht als Folge einer Substratverarmung aufzufassen sind, sondern durch die Anwesenheit von Acetat im Sporulationsmedium bedingt werden.

Es ist bemerkenswert, daß die Stoffwechselveränderungen unter dem Einfluß von Acetat bereits beobachtet werden können, bevor eine größere Menge von Sporen gebildet wurden. Dies deutet darauf hin, daß die biochemischen Veränderungen zeitlich den morphologischen Veränderungen vorausgehen.

Eine ausführliche Beschreibung und Diskussion unserer Versuche wird zu gegebener Zeit im Canadian Journal of Microbiology erscheinen.

J. J. Miller dankt der Ontario Research Foundation und dem National Research Council of Canada, *E. Scheiber* der Ungarn-Flüchtlingshilfe der Rockefeller Foundation und *O. Gabriel* dem Theodor-Körner-Stiftungsfond für die ihnen gewährte großzügige Hilfe.