

Vor der Übertragung in das Wachstumsmedium enthielten die Kulturen etwa 70% Sporen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zeit von 4 Stdn. im Wachstumsmedium einen sehr deutlichen Anstieg des RQ bewirkt. Im gleichen Zeitraum ist der Übergang der Sporen in den vegetativen Zustand noch recht geringfügig; eine mikroskopische Untersuchung ergab, daß unter diesen Bedingungen in etwa 5 bis 10% der Sporen enthaltenden Zellen ein oder zwei Sporen zu keimen begannen. Auch hier sehen wir wieder, daß der biochemische Effekt vor den morphologischen Veränderungen zu beobachten ist.

In einer Arbeit von *Slonimski*<sup>3</sup> wird berichtet, daß der RQ von Hefezellen, welche im *Warburg*-Apparat eine Glucoselösung veratmeten, innerhalb von 3 Stdn. von Werten zwischen 1,5 und 2 auf etwa 1 absank. Es scheint sich hier um dasselbe Phänomen zu handeln, das wir beobachten. *Slonimski* hat offenbar die Sporulierung der Hefe nicht in seine Betrachtungen einbezogen; er gibt auch keine Erklärung für den Effekt. Auch wir sind zur Zeit noch nicht in der Lage, etwas über den zugrunde liegenden Mechanismus auszusagen; wir glauben aber, zur Annahme eines Zusammenhanges zwischen den Veränderungen des RQ in Acetat- und Glucoselösungen und der Sporulierung der Hefe unter dem Einfluß derselben Substanzen berechtigt zu sein.

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

<sup>3</sup> *P. Slonimski*, *Actualités biochimiques* No. 17, Liège 1953.

## Über die Bedeutung des Sauerstoffs für die Sporulierung der Hefe

(Kurze Mitteilung)

Von

**J. J. Miller, O. Gabriel, Eszter Scheiber 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 20. Mai 1957)

Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, daß aerobe Bedingungen für die Sporulierung der Hefe erforderlich sind. *Lindegren* und *Hamilton*<sup>1</sup> fanden sporulierende Zellen nur in den äußeren Schichten von zerschnittenen Hefekolonien und *Maneval*<sup>2</sup> konnte Ascosporen ausschließlich an den Außenseiten von Hefeziegeln beobachten. Der Erfolg der klassischen Gipsblocktechnik zur Induktion der Hefesporulierung könnte zumindest

<sup>1</sup> *C. C. Lindegren* und *E. Hamilton*, *Botan. Gaz.* **105**, 316 (1944).

<sup>2</sup> *W. E. Maneval*, *Botan. Gaz.* **78**, 122 (1924).

zum Teil der guten Belüftung der Zellen unter diesen Bedingungen zu verdanken sein. Beim Studium der cytologischen Effekte des Nadi-Reagens fand *Bautz*<sup>3</sup> eine starke oxydierende Aktivität sporulierender Hefezellen. *Miller* und *Halpern*<sup>4</sup> beobachteten eine sehr deutliche Hemmung der Sporulierung durch Cyanid. *Slator*<sup>5</sup> erhielt wohl Hefesporen in Anwesenheit sehr geringer Mengen von Sauerstoff, nicht aber in Anaerobiose. Es ist bekannt, daß die Hefezelle auch noch bei einem Sauerstoff-Partialdruck von 1 mm Hg imstande ist, aktiv Sauerstoff aufzunehmen<sup>6</sup>. Zu allen diesen Befunden steht allerdings ein Bericht von *Adams* und *Miller*<sup>7</sup> in einem gewissen Gegensatz. Danach nahm die Anzahl von Sporen, welche von dünn auf 0,14% wasserfreies Natriumacetat und 0,04% Glucose enthaltenden Schrägagar ausgestrichenen Hefezellen gebildet wurden, wohl deutlich mit der Verringerung des Sauerstoff-Partialdruckes ab; bei einem Sauerstoff-Partialdruck von Null war aber immerhin noch eine beträchtliche Anzahl von Sporen (17%) zu finden. Die hier berichteten Versuche wurden zur Klärung der Frage, ob Sauerstoff für die Sporulierung notwendig ist, angestellt.

Hefezellen (Stamm F 49), die nach einer von *Miller*<sup>8</sup> beschriebenen Methode kultiviert worden waren, wurden in Lösungen übertragen, von denen bekannt ist, daß sie unter aeroben Bedingungen immer eine sehr starke Sporulierung der Hefe induzieren. Diese bestanden aus je 50 ml m/30 Phthalatpuffer von pH 5, der geringe Konzentrationen von Glucose oder Acetat enthielt. In sie wurden 4 Mill. Hefezellen pro Milliliter eingebracht und die so erhaltene Mischung in 1-l-Kulturflaschen überführt. Die Flaschen wurden mit einer Einleitungsvorrichtung versehen, durch welche vorgereinigter, sauerstofffreier Stickstoff etwa 20 Min. lang unter häufigem Schütteln eingeleitet wurde. Danach wurden die Kulturflaschen auf ihre flache Seite in den Brutschrank (27°) gestellt. Am zweiten Tag des Experimentes wurde neuerlich Stickstoff eingeleitet, um etwa entstandenes CO<sub>2</sub> zu entfernen, das nach *Adams* und *Miller*<sup>7</sup> die Sporulierung hemmen kann.

Tabelle 1. Versuche über die Sporulierung der Hefe unter anaeroben Bedingungen in verschiedenen Medien

Sporulierungsmedium (Zusatz zu m/30 Phthalatpuffer, pH 5)	Prozent der Zellen, die Sporen enthalten
0,1% CH <sub>3</sub> COONa · 3 H <sub>2</sub> O . . . . .	0
0,05% Glucose . . . . .	0
0,1% Glucose . . . . .	0
0,1% CH <sub>3</sub> COONa · 3 H <sub>2</sub> O + 0,1% Glucose	0,5
0,2% CH <sub>3</sub> COONa · 3 H <sub>2</sub> O + 0,05% Glucose	0

<sup>3</sup> *E. Bautz*, Z. Naturforsch. **10** b, 312 (1955).

<sup>4</sup> *J. J. Miller* und *C. Halpern*, Canad. J. Microbiol. **2**, 519 (1956).

<sup>5</sup> *A. Slator*, J. Chem. Soc. London **119**, 115 (1921).

<sup>6</sup> *R. J. Winzler*, J. Cell. Comp. Physiol. **17**, 263 (1941).

<sup>7</sup> *A. M. Adams* und *J. J. Miller*, Canad. J. Botany **32**, 320 (1954).

<sup>8</sup> *J. J. Miller*, Canad. J. Microbiol. **3**, 81 (1957).

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieser Versuche, die 7 Tage dauerten, zusammengestellt. Es zeigte sich, daß unter den anaeroben Bedingungen, wie sie durch die beschriebene Versuchsanordnung hergestellt wurden, die Sporulierungsfähigkeit der Hefe, wenn überhaupt vorhanden, extrem gering ist.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den erwähnten Befunden von *Adams* und *Miller*<sup>7</sup>. Wir glauben, den Ausfall dieser Experimente, an denen ja einer von uns beteiligt war, damit erklären zu können, daß die damals gewählte Versuchsanordnung nicht dazu geeignet war, wirklich anaerobe Bedingungen zu gewährleisten. Vor allem dürfte in der ziemlich dicken Agarschicht Luft in gelöster Form enthalten gewesen sein.

Unsere jetzt gewonnenen Ergebnisse erlauben auch eine Erklärung einer früheren Beobachtung<sup>9</sup>, daß bei der Erhöhung der Zelldichte von 4 Mill. auf 8 Mill. pro Milliliter im Acetat-Sporulierungsmedium die Anzahl der entstehenden Sporen abnimmt. Durch die Erhöhung der Zelldichte wird offenbar im Verlauf der Inkubation der zur Verfügung stehende Sauerstoff so weitgehend verbraucht, daß die Sporulierung gehemmt wird. Um diese Vorstellung experimentell zu prüfen, wurden 1-l-Kulturflaschen, die 50 ml Phthalatpuffer mit 0,3% Acetat enthielten, mit verschiedenen Mengen von Hefezellen beschickt und ohne Schütteln bei 27° inkubiert. Einige dieser Flaschen enthielten Luft als Gasphase, während die anderen mit Sauerstoff gefüllt waren. Bei höherer Zelldichte sollte, wenn Sauerstoff der begrenzende Faktor wäre, das Ausmaß der Sporulierung in denjenigen Flaschen größer sein, die mit Sauerstoff gefüllt waren. Die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse beweisen die Richtigkeit dieser Vorstellung. Es ist bemerkenswert, daß in den Kulturflaschen, die mit geringeren Zelldichten (4 Mill. pro Milliliter) beschickt waren, in Anwesenheit von reinem Sauerstoff weniger Sporen gebildet wurden als mit Luft. Dies stimmt mit Resultaten von *Adams* und *Miller*<sup>7</sup> überein; damals wurde mit 1 Mill. Zellen pro Milliliter in einem Glucose und Acetat enthaltenden Medium eine stärkere Sporulierung in Luft gefunden als in Sauerstoff.

Tabelle 2. Einfluß der Zelldichte auf die Sporenbildung der Hefe in Gegenwart von reinem Sauerstoff oder Luft

Zelldichte (in Millionen pro ml)	Gasphase über der Kulturlösung	Prozent der Zellen, die Sporen enthalten
4	Luft	18,5
4	Sauerstoff	6,3
10	Luft	8,8 ]
10	Sauerstoff	42,8
20	Luft	4,5 ]
20	Sauerstoff	12,5

<sup>9</sup> *J. J. Miller, J. Calvin und J. H. Tremaine, Canad. J. Microbiol. 1, 560 (1955).*

Ein Grund für die verringerte Sporulierung bei höheren Zelldichten könnte allerdings auch darin bestehen, daß die Zellen selbst während der Inkubation Hemmstoffe der Sporulierung ausscheiden, deren Konzentration bei höheren Zelldichten so groß würde, daß eine meßbare Hemmung der Sporenbildung zustande kommt. Zur Prüfung dieser Hypothese stellten wir folgenden Versuch an: In Acetat-Sporulierungsmedium der beschriebenen Art wurden 20 Mill. Zellen pro Milliliter eingebracht. In einer Versuchsserie wurde das Medium jeden Tag abzentrifugiert und durch frische Lösung ersetzt, während es in der anderen über die gesamte Versuchsdauer belassen wurde. Der tägliche Ersatz des Mediums müßte die Konzentration etwa gebildeter Hemmstoffe stark herabsetzen; es zeigte sich aber, daß die Anzahl an Sporen in beiden Versuchsserien fast gleich war, was die oben angeführte Hypothese widerlegt.

Vor kurzem berichteten wir, daß der respiratorische Quotient (R.Q.) von Hefezellen, die aus einem Wachstumsmedium in ein Acetat- oder in ein Glucose-Sporulierungsmedium übertragen werden, in kurzer Zeit deutlich absinkt<sup>10, 11</sup>. Es interessierte uns, ob auch für diesen Effekt die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich ist. Entsprechende Versuche, die mit Hilfe der bereits beschriebenen Technik<sup>10</sup> durchgeführt wurden,

Tabelle 3. Die Veränderungen des respiratorischen Quotienten durch Behandlung der Hefe in verschiedenen Medien unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Art der Vorbehandlung	Bedingungen der Vorbehandlung	respiratorischer Quotient
Wachstumsmedium . . . . .	aerob	1,88
1 Tag in 0,23%igem Acetat-Sporulierungsmedium . . . . .	aerob	1,41
1 Tag in 0,23%igem Acetat-Sporulierungsmedium . . . . .	anaerob	2,27
1 Tag in 0,1%igem Glucose-Sporulierungsmedium . . . . .	aerob	1,08
1 Tag in 0,1%igem Glucose-Sporulierungsmedium . . . . .	anaerob	2,10

sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß ein Absinken des R.Q. nur unter aeroben Bedingungen erfolgt. Daraus und auch aus anderen Resultaten<sup>11</sup> schließen wir, daß zwischen der Sporulierung und dem Absinken des R.Q. in diesen Substraten ein Zusammenhang besteht.

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

<sup>10</sup> *J. J. Miller, E. Scheiber, O. Gabriel* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Mh. Chem. 88, 271 (1957).

<sup>11</sup> *E. Scheiber, O. Gabriel, O. Hoffmann-Ostenhof* und *J. J. Miller*, Mh. Chem. 88, 414 (1957).