

Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades

## VIII. Untersuchungen zum Kohlenstoff-Stoffwechsel unbestrahlter Zellen

W. POHLIT, W. LASKOWSKI und E.-R. LOCHMANN

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main,  
und Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforschg. 21 b, 1089—1096 [1966]; eingegangen am 6. April 1966)

Some quantitative data about the carbon-metabolism in *Saccharomyces*-cells of different ploidy were determined. The amount of carbon, necessary for the formation of a cell, proved to be proportional to the degree of ploidy of the cells. For the duplication of a diploid cell  $6,7 \cdot 10^{-11}$  g glucose were used. In comparison with respiratory deficient cells the simultaneous utilization of fermentation and respiration metabolism in respiration sufficient cells leads to a decrease of the cell cycle duration, however, the energy needed for the formation of a cell is not decreased. The rate of cell multiplication has a maximum at about  $30^\circ\text{C}$  for all classes of ploidy. Certain assumptions about the utilization of the carbon source were confirmed by experiments with  $^{14}\text{C}$  marked glucose.

Die Strahlenwirkung auf lebende Zellen stellt einen komplizierten Eingriff in ein kompliziertes System dar, bei dem eine Vielzahl verschiedener Parameter beachtet werden muß. Darunter stehen an erster Stelle der Ploidiegrad der Zelle<sup>1,2</sup> und die Stoffwechsellage während und nach der Bestrahlung<sup>3,4</sup>. Um gezielte Versuche in dieser Richtung unternehmen zu können, ist es nötig, zunächst die Stoffwechselfvorgänge der normalen, d. h. unbestrahlten Zellen verschiedenen Ploidiegrades quantitativ zu untersuchen. Hefezellen sind dafür besonders gut geeignet, da in einfacher Weise weitestgehend homozygote, isogene Stämme mit verschiedenem Ploidiegrad hergestellt und auch Stoffwechselfmutanten weiter gezüchtet werden können<sup>1</sup>. Im folgenden werden einige quantitative Untersuchungen über den Kohlenstoff-Stoffwechsel von Hefezellen verschiedenen Ploidiegrades bei verschiedenen Temperaturen angeführt, wobei die Hefezellen in flüssigem Nährmedium gehalten wurden. Diese Kulturen eignen sich besonders für die Beobachtung schnell ablaufender Reaktionen nach der Bestrahlung und zur Herstellung ideal homogener und ideal synchronisierter Zellpopulationen<sup>5</sup>. Weitere Messungen über den Stickstoff-Stoffwechsel der Hefezellen und das Verhalten von Hefezellen in stationären Populationen über längere Zeiträume werden in einer späteren Arbeit mitgeteilt.

### I. Material und Methode

#### 1. Herkunft und Anzucht der Stämme

Für die Versuche wurden die weitestgehend homozygoten und isogenen *Saccharomyces*-Stämme 211-1a (haploid), 211 (diploid), 312 (triploid) und 415 (tetraploid) verwendet, deren Aufbau in l. c.<sup>1</sup> beschrieben ist. Außerdem wurde von Stamm 211 eine atmungsdefekte plasmatische Mutante (211p) isoliert. Die Stämme wurden auf Schrägagar im Kühlschrank bei ca.  $+6^\circ\text{C}$  gehalten; zu den Versuchen wurde dann jeweils eine kleine Zellmenge (einige  $\text{mm}^3$ ) mit einer Platinöse in ein flüssiges Vorkulturmedium überimpft (VKM:  $0,5 \cdot 10^{-2}$  g/cm<sup>3</sup> Difco-Yeast-Extract;  $0,25 \cdot 10^{-2}$  g/cm<sup>3</sup> Glucose) und die Zellen ca. 24 Stdn. bei  $30^\circ\text{C}$  unter Schütteln vermehrt. Die so hergestellte Zellpopulation ist nach ca. 24 Stdn. gerade einige Stdn. stationär mit einer Zellkonzentration von  $2 \cdot 10^8$  Zellen/cm<sup>3</sup> beim diploiden Stamm. Es sind praktisch nur Einzelzellen vorhanden — alle in einem definierten Zustand des Kohlenstoffmangels — die gut reproduzierbare Versuchsergebnisse ergeben.

Die Nährlösungen für die Vermehrungsversuche bestanden aus  $0,5 \cdot 10^{-2}$  g/cm<sup>3</sup> Difco-Yeast-Extract mit unterschiedlichem Glucose- bzw. Alkoholzusatz (Glucose:  $0 - 2 \cdot 10^{-2}$  g/cm<sup>3</sup>). Sie wurden in Reagenzglasern steril abgefüllt (je 8 cm<sup>3</sup>). Bei Versuchsbeginn überimpfte man 0,2; 0,25 oder 0,30 cm<sup>3</sup> von der vorbereiteten Zellsuspension, so daß beim diploiden Stamm eine Ausgangskonzentration  $N_0$  der Zellen von  $5 \cdot 10^6$ ,  $6 \cdot 10^6$  bzw.  $7,5 \cdot 10^6$  entstand. Alle Arbeiten wurden bei  $30^\circ\text{C}$  durchgeführt, so daß die Zellen keinerlei Tem-

<sup>1</sup> W. LASKOWSKI, Z. Naturforschg. 17 b, 93 [1962].

<sup>2</sup> W. LASKOWSKI u. W. STEIN, Z. Naturforschg. 15 b, 604 [1960].

<sup>3</sup> W. POHLIT, Cybernetic problems in radiation effect in living cells. Coll. sui rapporti tra Fisica e Medicina. Levico-Roncegno, 1964, 573—588 [1964].

<sup>4</sup> W. POHLIT, Biophysik 3 [1966], im Druck.

<sup>5</sup> W. POHLIT u. A. DOMKE, Biophysik 3, 44 [1966].

peratureschock erhielten, der zu einer unerwünschten Synchronisation der Population führen konnte.

Die Zellkonzentration in der Suspension wurde durch eine Extinktionsmessung ermittelt, bei der das ganze Reagenzglas in das Photometer (ebenfalls auf 30° erwärmt) gebracht wurde. Dadurch wurden Temperaturänderungen und Infektionsgefahren bei einer Probenentnahme ausgeschaltet. Selbst wenn bis zu 100 Röhrchenkulturen in einer Versuchsreihe quantitativ verfolgt wurden, war eine halbstündige Bestimmung der Zellkonzentration auf diese Weise in allen Proben möglich. Zur Kalibrierung des benutzten Photometers wurde die Extinktion von Kulturen gemessen, deren Zellkonzentration durch Auszählen in einer Zählkammer bekannt war (s. Abb. 1 in l. c.<sup>5</sup>).

### 2. Analyse der Vermehrungskurven

Werden  $N_0$  Zellen aus der stationären Population des Vorkulturmediums in eine Nährlösung überführt, so setzt nach einer lag-Zeit  $t_{lag}$  eine Vermehrung der Zellen ein, die über einen großen Bereich exponentiell verläuft<sup>5</sup>.

Dann ist die Zellkonzentration zur Zeit  $t$ :

$$N = N_0 \cdot 2^{t/t_C} \quad \text{oder} \quad N = N_0 \cdot e^{ft}$$

mit  $f = \ln 2/t_C$ .

Dabei ist  $t_C$  die Zellzyklusdauer, d. h. die Zeit, in der im Mittel von einer Hefezelle eine neue Zelle hergestellt wird.

Ist  $F_i$  der Nährstoffumsatz der Molekülsorte  $i$  einer Zelle ( $F_i$  in g/h·Zelle), so ist der gesamte Nährstoffverbrauch zur Bildung einer neuen Zelle  $F_i \cdot t_C$ . Dieser Nährstoffverbrauch kann aus der zugesetzten und am Versuchsende völlig verbrauchten Nährstoffkonzentration  $C_i$  (in g/cm<sup>3</sup>) und der Konzentration der dabei insgesamt neugebildeten Zellen  $N_\infty - N_0$  bestimmt werden:

$$F_i \cdot t_C = C_i / (N_\infty - N_0)$$

Aus dem Nährstoffverbrauch einer Zelle  $F_i \cdot t_C$  der Molekülsorte  $i$  kann der Energieverbrauch der Zelle berechnet werden:

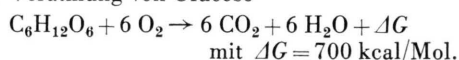
$$E_i = F_i \cdot t_C \cdot n_i \cdot \Delta G_i / A$$

Dabei ist  $\Delta G_i$  die freie Enthalpie der durchgeführten Reaktion (in cal/Mol),  $A$  das Atom- bzw. Mol.-Gew. und  $n_i$  der Anteil der zur Energiegewinnung benutzten Moleküle der Sorte  $i$ .

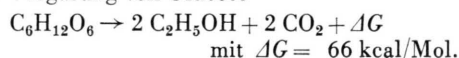
Die einzelnen Schritte im Abbau der Glucose durch das Fermentensystem der Hefezellen sind in vitro sehr gut bekannt, hier sollen aber nur die Gesamtreaktionen und deren freie Enthalpie angeführt werden.

Bei Angebot von Glucose können die Hefezellen folgende Reaktionen ausführen:

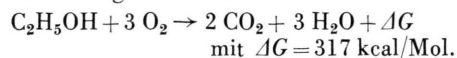
#### 1. Veratmung von Glucose



#### 2. Vergärung von Glucose



#### 3. Veratmung von Alkohol



Atmungsdefekte Stämme können nur die Reaktion „2“ durchführen; Normalstämme führen alle drei Reaktionen durch, wobei das Nacheinander von „2“ und „3“ energetisch äquivalent zu Reaktion „1“ ist.

### 3. Untersuchungen mit radioaktiver Glucose

In besonderen Versuchen wurden zu je 8 cm<sup>3</sup> des Kulturmediums ( $0,5 \cdot 10^{-2}$  g/cm<sup>3</sup> YE +  $0,25 \cdot 10^{-2}$  g/cm<sup>3</sup> Glucose) 0,1 cm<sup>3</sup> einer Glucose-<sup>14</sup>C-Lösung (2,9 mCi/mMol, Glucose-Konzentration  $1,24 \cdot 10^{-4}$  g/cm<sup>3</sup>) zugesetzt.

Bestimmte Zeiten nach Inkubation wurde ein Teil der Suspension dem Kulturröhrchen entnommen; die Zellen wurden in der entnommenen Menge völlig abzentrifugiert, 4-mal mit Puffer gewaschen, in 0,5 cm<sup>3</sup> dest. H<sub>2</sub>O wieder aufgenommen und auf Alu-Schälchen ( $\phi$  3 cm) eingetrocknet.

Anschließend wurde die Radioaktivität mit einem Glockenzählrohr (Friesecke u. Hoepfner, Glimmerfenster) bestimmt. Von der überstehenden, von Zellen befreiten Lösung wurden ebenfalls definierte Mengen auf Alu-Schälchen eingetrocknet und die Restaktivität des Nährmediums geprüft. Aus Kontrolleexperimenten ist die Zählbeute unter diesen speziellen Bedingungen bekannt.

## II. Experimentelle Ergebnisse und Diskussion

### 1. Zellvermehrung bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen als Kohlenstoffquelle

Zur Untersuchung des Glucosestoffwechsels wurden Nährlösungen mit verschiedener Glucosekonzentration  $C_G$  angesetzt und die Stämme 211p und 211 aus einem Vorkulturmedium überpipettiert. Das Vermehren der Zellen unter ständigem Schütteln ist in den Abb. 1 und 2 dargestellt.

Der atmungsdefekte diploide Stamm 211p kann in einem Medium, das nur Yeast-Extract enthält, überhaupt nicht aufwachsen (s. Abb. 1), da keine vergärbare Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Bei Anwesenheit von Glucose ergibt sich nach einer lag-Zeit von etwa 1,5 h eine exponentielle Vermehrung mit einer Zellzyklusdauer von  $t_C = 1,8$  h, die von der Glucosekonzentration unabhängig ist. Der Gärungsstoffwechsel wird also in der atmungsdefekten Zelle durch innerzelluläre Vorgänge und nicht durch die Glucosekonzentration gesteuert. Ist die Glucose verbraucht, so stellt sich eine Endkonzentration der Zellen  $N_\infty$  ein und man kann aus der Konzentration der insgesamt hergestellten Zellen  $N_\infty - N_0$  den

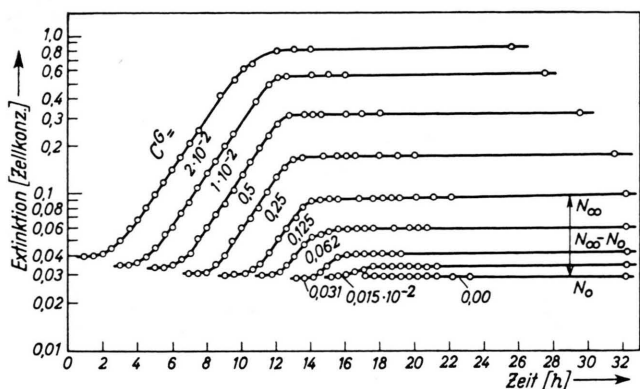


Abb. 1. Zellvermehrung des Stammes 211 p bei verschiedenen Glucosekonzentrationen.

Nährstoffverbrauch zur Herstellung einer neuen Zelle berechnen. Wie man aus den in Tab. 1 angegebenen Werten sieht, ist dieser Verbrauch ebenfalls vom Angebot der Glucose unabhängig<sup>6</sup>:

Aus  $N_{\infty} - N_0 / C_G = 1,5 \cdot 10^{10} \text{ Z/g}$  folgt:

$$F \cdot t_C = C_G / N_{\infty} - N_0 = 6,7 \cdot 10^{-11} \text{ g/Zelle.}$$

(Zur Veranschaulichung dieses Wertes sei erwähnt, daß die Masse einer lebenden diploiden Zelle etwa  $m = 7 \cdot 10^{-11} \text{ g}$  beträgt, die Zelle benötigt also zu ihrer Verdopplung eine etwa ebenso große Masse an Glucose.)

Bei kleineren Glucosekonzentrationen machen sich in den Werten für  $N_{\infty} - N_0 / C_G$  systematische Abweichungen bemerkbar (s. Tab. 1); es werden hier effektiv zu wenig Zellen hergestellt. In Tab. 2 sind die Erwartungswerte und die bei kleinen Konzentrationen tatsächlich gemessenen Werte zusammengestellt und man erkennt, daß im Mittel  $0,7 \cdot 10^6$  Zellen/cm<sup>3</sup> zu wenig hergestellt werden, bzw. daß

$C_G$	$t_G$	$N_0$	$N_{\infty}$	$(N_{\infty} - N_0) / C_G$
[g/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>-2</sup>	[h]	[Z/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>6</sup>	[Z/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>6</sup>	[Z/g] · 10 <sup>10</sup>
2	1,8	10,5	300	1,45
1	1,8	9,2	165	1,56
0,5	1,8	8,8	87	1,56
0,25	1,8	8,2	47	1,55
0,125	1,9	7,8	26	1,45
0,062	2,1	7,8	16,8	1,44
0,031	2,1	7,5	11,5	1,28
0,015	—	7,8	9,3	0,96
0,000	—	7,8	7,8	—
M. W.:				1,5 · 10 <sup>10</sup>

Tab. 1. Zellvermehrung von Stamm 211 p im Medium:  $0,5 \cdot 10^{-2} \text{ g/cm}^3 \text{ YE} + x \text{ Glucose}$ . Anmerkung: Der systematische Gang der Werte  $N_0$  ist durch die verschiedene Glucosekonzentration hervorgerufen, da alle Proben der Einfachheit halber gegen eine Kontrolle ohne Glucose gemessen wurden; die Extinktion der Nährlösung mit  $C_G = 1 \cdot 10^{-2} \text{ g/cm}^3$  beträgt aber schon ohne Zellen  $\epsilon = 0,01$ . Auf eine Korrektur dieser Werte wurde aber verzichtet, da der Einfluß auf das Endergebnis gering ist und um den Vergleich mit den Abbildungen zu erleichtern.

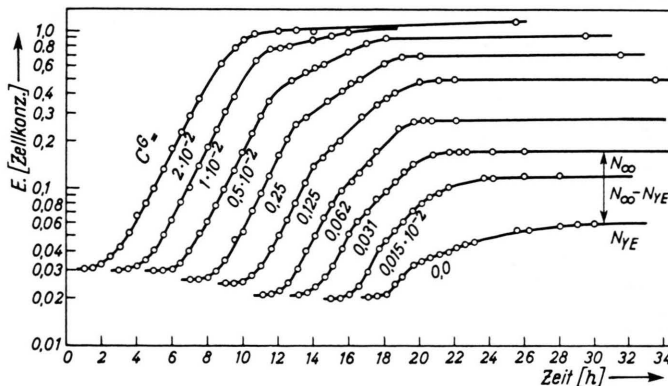


Abb. 2. Zellvermehrung des Stammes 211 bei verschiedenen Glucosekonzentrationen.

<sup>6</sup> Gleichartige Werte lassen sich aus den Messungen von P. OHLMEYER u. U. FRITZ, Z. Naturforsch. 21 b, 175 [1966] ableiten.

$C_G$	$(\overline{N_\infty - N_0}) - (N_\infty - N_0)$
$[g/cm^3] \cdot 10^{-2}$	$[Z/cm^3] \cdot 10^6$
0,062	0,4
0,031	0,7
0,015	0,8

Tab. 2. Abweichungen von  $N_\infty - N_0$  vom Mittelwert  $\overline{N_\infty - N_0}$  bei kleinen Konzentrationen  $C_G$ .

$0,7 \cdot 10^6$  Zellen/cm<sup>3</sup> ·  $6,7 \cdot 10^{-11}$  g/Zelle =  $4,7 \cdot 10^{-5}$  g/cm<sup>3</sup> Glucose zu anderen Zwecken verbraucht werden. Es wäre naheliegend, daß dieser Verbrauch während der lag-Zeit zum Auffüllen der Zellen benutzt wird. Da  $N_0 = 7,8 \cdot 10^6$  Zellen/cm<sup>3</sup> beträgt, ist der Anteil pro Zelle  $0,6 \cdot 10^{-11}$  g, d. h. etwa 10% des Verbrauchs zur Herstellung einer neuen Zelle. Diese Vermutung wird bestätigt durch die Beobachtung, daß Hefezellen auch in einer stationären Population einen geringen Nahrungsverbrauch haben. Die zu diesem Versuch benutzte Zellpopulation war etwa zwei Tage stationär bei 30 °C; genauere Versuche über das Verhalten von Hefezellen in stationären Populationen werden in einer späteren Arbeit angegeben.

In Abb. 2 ist die Vermehrung der Zellen des diploiden Stammes 211 mit normalem Atmungsvermögen aufgezeichnet. Es zeigt sich zunächst, daß im Yeast-Extract eine Kohlenstoffquelle vorhanden ist, die im Atmungsstoffwechsel benutzt werden kann. („Carbon free yeast extract base“ von Difco zeigt diesen Effekt nicht, wie andere Versuche gezeigt haben.) Aus diesem Grunde wird hier von der entstandenen Zellkonzentration  $N_\infty$  jeweils die durch den Yeast Extract entstandene Zellkonzentration  $N_{YE}$  abgezogen. Die Zellen des Stammes 211, die sowohl einen Atmungs- wie auch einen Gärungsstoffwechsel besitzen, teilen sich rascher als der Stamm

211p mit einer von der Glucosekonzentration unabhängigen Zellzyklusdauer  $t_C = 1,35$  Stunden. Weiterhin zeigt sich im Verlauf der Vermehrungskurve ein deutlicher Knick, der, wie weiter unten genauer gezeigt wird, anzeigt, daß die Glucose aufgebraucht ist. Anschließend daran veratmen die Zellen den bei der Gärung entstandenen und ins Nährmedium abgegebenen Alkohol, wobei die Zyklusdauer auf  $t_C = 2,6$  h heraufgeht und bei hoher Zellkonzentration ständig zunimmt. Die quantitativen Daten, die bei der späteren Diskussion benutzt werden, sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Die Kohlenstoffquelle vom Yeast-Extract wird praktisch erst nach dem Verbrauch der Glucose angegriffen. Würde man sie schon bis zum Erreichen von  $N_1$  am Knickpunkt voll berücksichtigen, so ergäben sich für  $(N_1 - N_{YE} + N_0)/C_G$  bei kleinen Glucosekonzentrationen negative Werte. Wird diese Kohlenstoffquelle dagegen bis  $N_1$  überhaupt nicht berücksichtigt, so steigen die Werte für  $(N_1 - N_0)/C_G$  bei kleinen Glucosekonzentrationen entsprechend an, sie werden deshalb zur Mittelwertbildung nicht berücksichtigt. Wird der Kohlenstoff-Anteil vom Yeast-Extract oberhalb von  $N_1$  voll berücksichtigt, dann ergeben sich praktisch konstante Werte für  $(N_\infty - N_1 - N_{YE} + N_0)/C_G$ . Wird dieser Anteil  $N_{YE}$  oberhalb  $N_1$  nicht berücksichtigt, dann steigen die Werte  $(N_\infty - N_1)/C_G$  bei kleinen Konzentrationen um mehr als einen Faktor zwei an (s. Tab. 3). Es ist also daher sehr naheliegend, den Yeast-Extract-Anteil nur oberhalb von  $N_1$  also im Bereich des Alkoholstoffwechsels der Zellen zu berücksichtigen.

## 2. Zellvermehrung bei unterschiedlichen Alkohol-Konzentrationen als Kohlenstoffquelle

Da sich beim Glucose-Stoffwechsel gezeigt hatte, daß der durch Gärung hergestellte Alkohol einen

$C_G$ [g/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>-2</sup>	$t_{C1}$ [h]	$t_{C2}$ [h]	$N_0$ [Z/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>6</sup>	$N_1$ [Z/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>6</sup>	$N_\infty$ [Z/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>6</sup>	$(N_1 - N_0)/C_G$ [Z/g] 10 <sup>10</sup>	$(N_\infty - N_1 - N_{YE} + N_0)/C_G$ [Z/g] · 10 <sup>10</sup>	$(N_\infty - N_1)/C_G$ [Z/g] · 10 <sup>10</sup>
1	1,30	12	7,8	235	800	2,27	5,54	5,56
0,5	1,30	5,5	7,8	110	390	2,04	5,38	5,00
0,25	1,35	3,7	7,0	65	210	2,31	5,36	5,80
0,125	1,35	2,7	6,5	37	135	2,52	6,95	7,84
0,062	1,40	2,6	5,5	23,5	73	2,88	6,20	7,92
0,031	1,40	2,5	5,5	14,9	45	3,01	6,20	9,60
0,015	—	2,6	5,3	11,5	31,5	3,33	5,95	12,80
0,000	—	—	5,3	—	16,0	—	—	—
$N_{YE}$ :		$M. W.$ :		$M. W.$ :				
16 · 10 <sup>6</sup>		2,2 · 10 <sup>10</sup>		5,84 · 10 <sup>10</sup>				

Tab. 3. Vermehrung von Stamm 211 im Medium:  $0,5 \cdot 10^{-2}$  g/cm<sup>3</sup> Yeast-Extract + x Glucose.

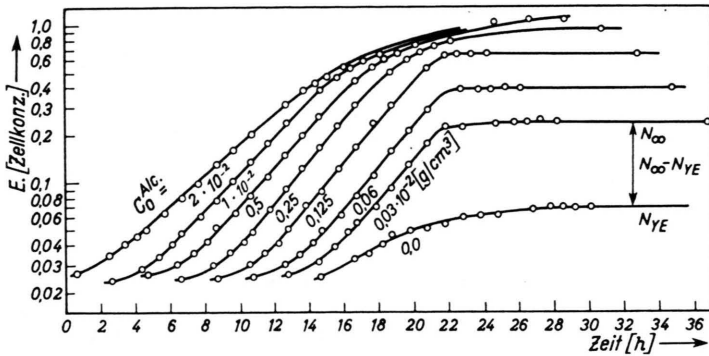


Abb. 3. Zellvermehrung des Stammes 211 bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen.

wesentlichen Anteil am Kohlenstoff-Stoffwechsel hat, wurden einige Versuchsreihen auch mit reinstem Aethanol als einziger Kohlenstoffquelle (abgesehen von der im Yeast-Extract enthaltenen) durchgeführt. Die Meßergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt. Auch hier zeigt sich die Abhängigkeit der Zellzyklusdauer  $t_C$  von der Zellkonzentration, darüber hinaus bei sehr hoher Alkoholkonzentration – die aber prak-

tisch bei der Glucosevergärung nicht vorkommt – auch eine Abhängigkeit vom Alkoholgehalt. Die quantitativen Werte dieses Versuches, die bei der späteren Diskussion benutzt werden, sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Für die Mittelwerte aus den drei angegebenen Versuchsreihen sind in Tab. 5 die Werte für den Kohlenstoff-Verbrauch zur Bildung einer neuen Hefezelle im Fall der Vergärung von Glucose, der gleichzeitigen Vergärung und Veratmung von Glucose sowie der Veratmung von Alkohol aufgeführt. Man erkennt, wie durch den gleichzeitigen Einsatz des Gärungs- und Atmungsstoffwechsels die Zellzyklusdauer  $t_C$  wie auch der Kohlenstoffbedarf herabgesetzt wird.

Die Versuche über die Zellvermehrung in Alkohol und Glucose als Kohlenstoffquelle wurden ebenfalls mit haploiden, triploiden und tetraploiden isogenen Zellen durchgeführt. Es zeigte sich dabei, daß die Zyklusdauer  $t_C$  nur wenig vom Ploidiegrad abhängig ist, wobei der diploide Stamm den kleinsten Wert aufweist<sup>7</sup>. Die Unterschiede bei den anderen

$C_{Alc}$ [g/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>-2</sup>	$t_C$ [h]	$N_0$ [Z/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>6</sup>	$N_\infty$ [Z/cm <sup>3</sup> ] · 10 <sup>6</sup>	$(N_\infty - N_{YE})/C_{Alc}$ [Z/g] · 10 <sup>10</sup>
2	3,1	7,6	700	—
1	2,6	6,0	700	6,80
0,5	2,5	6,5	700	13,64
0,25	2,3	6,3	340	12,88
0,125	2,3	6,3	195	14,16
0,062	2,3	6,5	104	11,36
0,031	2,3	6,5	62,5	14,24
0,000	—	6,3	18,0	—
M. W.: 13,3 · 10 <sup>10</sup>				

Tab. 4. Zellvermehrung von Stamm 211 bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen.  $N_{YE}$  ist gleich  $N_\infty$  bei  $C_{Alc}=0,0$ .

	$t_C$ [h]		$F \cdot t_C \cdot L/A$	$F \cdot t_C \cdot \Delta G/A$
Vergärung von Glucose Stamm: 211p	1,8	$(N_\infty - N_0)/C_G$ $= 1,5 \cdot 10^{10}$ Z/g	$20,0 \cdot 10^{10}$ Mol./Zelle	$2,2 \cdot 10^{-11}$ kcal/Zelle
Vergärung und Veratmung von Glucose Stamm: 211	1,35	$(N_\infty - N_1 - N_{YE} + N_0)/C_G$ $= 5,8 \cdot 10^{10}$ Z/g		
		$(N_1 - N_0)/C_G$ $= 2,2 \cdot 10^{10}$ Z/g	$13,7 \cdot 10$ Mol./Zelle	$2,2 \cdot 10^{-11}$ kcal/Zelle
Veratmung von Alkohol Stamm 211	2,3	$(N_\infty - N_{YE})/C_{Alc}$ $= 13,3 \cdot 10^{10}$ Z/g	$9,8 \cdot 10^{10}$ Mol./Zelle	$5,2 \cdot 10^{-11}$ kcal/Zelle

Tab. 5. Zusammenstellung der Mittelwerte aus den Tabn. 1, 3 und 4 sowie Energieverbrauch der Zellen zur Herstellung einer neuen Zelle bei alleiniger Gärung, Vergärung und gleichzeitiger Veratmung von Glucose sowie Veratmung von Alkohol.

<sup>7</sup> Gleichartige Ergebnisse erhielten: V. BURNS, J. cell. comparat. Physiol. 47, 357 [1956]; W. LASKOWSKI u. W. STEIN, Z. Naturforsch. 13b, 305 [1958] und I. MÜLLER, Z. Ver-

erbungslehre 97, 111 [1965] mit Serien genetisch nah verwandter Saccharomyces-Stämme verschiedenen Ploidiegrades.

Stämmen liegen innerhalb der Meßgenauigkeit. Der Kohlenstoffbedarf zur Bildung einer neuen Zelle ist praktisch dem Ploidiegrad proportional. Das ist verständlich, da das Zellvolumen praktisch proportional mit dem Ploidiegrad anwächst<sup>1</sup>. (Die gemessenen Werte für den Glucose- und Alkoholstoffwechsel sind in Tab. 6 zusammengestellt.)

a) Atmung und Gärung von Glucose			
Ploidiegrad $p$	$(N_1 - N_0)/C_G$ [Zellen/g] · 10 <sup>10</sup>	$t_{C1}$ [h]	$p \cdot (N_1 - N_0)/C_G$ [Zellen/g] · 10 <sup>10</sup>
1 (haploid)	3,2	1,5 ± 0,1	3,2
2 (diploid)	2,2	1,35 ± 0,1	4,4
3 (triploid)	1,5	1,6 ± 0,1	4,5
4 (tetraploid)	1,1	1,5 ± 0,1	4,4
b) Atmung von Alkohol			
Ploidiegrad $p$	$(N_\infty - N_1 - N_{YE} + N_0)/C_G$ [Zellen/g] · 10 <sup>10</sup>	$t_{C2}$ [h]	$p \cdot (N_\infty - N_1 - N_{YE} + N_0)/C_G$ [Zellen/g] · 10 <sup>10</sup>
1 (haploid)	9,5	4,0 ± 0,2	9,5
2 (diploid)	5,8	3,7 ± 0,2	11,6
3 (triploid)	3,8	3,6 ± 0,2	11,4
4 (tetraploid)	2,2	3,5 ± 0,2	8,8

Tab. 6. Zellvermehrung isogener Hefestämme verschiedenen Ploidiegrades im Medium: 0,25 · 10<sup>-2</sup> g/cm Glucose + 0,5 · 10<sup>-2</sup> g/cm<sup>3</sup> Yeast-Extract.

### 3. Energieverbrauch zur Bildung einer neuen Hefezelle

Vergleichbar in allen drei Stoffwechsellagen ist der Energieverbrauch zur Herstellung einer neuen Zelle (vgl. Tab. 5). Um diesen auch für die gleichzeitig ablaufende Gärung und Atmung (bis  $N_1$ ) abschätzen zu können, muß man wissen, zu welchen Anteilen die Glucose nur vergoren wurde ( $\Delta G = 66$  kcal/Mol) bzw. welcher Anteil des entstandenen Alkohols bereits bis  $N_1$  gleichzeitig veratmet wurde ( $\Delta G = 700$  kcal/Mol). Diese Information kann man auf zwei verschiedenen Wegen aus den angegebenen Messungen entnehmen: a) Auf Grund der Vergärung eines Glucosemoleküls sollen jeweils zwei Alkoholmoleküle entstehen. Man kann also die Zahl der Alkoholmoleküle ausrechnen, die bis  $N_1$  auf diese Weise entstanden sind. Die Zahl der tatsächlich bei  $N_1$  vorhandenen Alkoholmoleküle erhält man aber aus der Zahl der nach  $N_1$  noch hergestellten Hefezellen, denn der Alkoholverbrauch zur Herstellung einer Zelle ist aus den Versuchen mit Alkohol als Kohlenstoffquelle bekannt.

Quantitativ ergibt sich die nach  $N_1$  durch Alkoholveratmung noch entstehende Zellkonzentration (pro Glucosekonzentration) aus Tabelle 3:

$$\frac{N_{Alc}^{At}}{C_G} = \frac{N_\infty - N_1 - N_{YE} + N_0}{C_G} = 5,84 \cdot 10^{10} \text{ Zellen/g.}$$

Aus dieser Zellkonzentration kann die entsprechende, bei  $N_1$  relativ zu  $C_G$  vorhandene Alkoholkonzentration  $C_{Alc}$  bestimmt werden.

Aus Tab. 4 entnimmt man:

$$\frac{N_{Alc}^{At}}{C_{Alc}} = \frac{N_\infty - N_{YE}}{C_{Alc}} = 13,3 \cdot 10^{10} \text{ Zellen/g.}$$

Somit ist:

$$\frac{N_{Alc}^{At}}{C_G} \cdot \frac{C_{Alc}}{N_{Alc}} = \frac{C_{Alc}}{C_G} = \frac{5,84 \cdot 10^{10}}{13,3 \cdot 10^{10}} = 0,439.$$

Aus diesem Konzentrationsverhältnis  $C_{Alc}/C_G$  soll nun das Molekülverhältnis bestimmt werden.

Es ist:

$$\frac{C_{Alc}}{C_G} = \frac{m_{Alc}}{m_G} = \frac{n_{Alc} \cdot M_{Alc}}{n_G \cdot M_G},$$

dabei ist  $m_i$  die Gesamtmasse der vorhandenen Mole.  $i$  (Alkohol bzw. Glucose),  $n_i$  die Anzahl und  $M_i$  deren Molekulargewicht.

Damit ergibt sich das Molekülverhältnis zu:

$$\frac{n_{Alc}}{n_G} = \frac{C_{Alc} \cdot M_G}{C_G \cdot M_{Alc}} = 0,439 \cdot \frac{198,2}{46} = 1,90.$$

Es sollte, wenn alle Alkoholmoleküle bei  $N_1$  noch vorhanden wären,  $n_{Alc}/n_G = 2,00$  sein. Es zeigt sich also aus dieser Abschätzung, daß 5% der erzeugten Alkoholmoleküle veratmet wurden.

b) Man kann auch die Mehrproduktion von Zellen durch die zusätzliche Alkoholveratmung durch einen Vergleich der Zellkonzentrationen bei reiner Gärung (Stamm 211p),  $N^{Gär}$ , und bei gleichzeitiger Gärung und Atmung,  $N^{Gär+At}$ , bestimmen. Da die mehrproduzierten Zellen Alkohol veratmet haben müssen und man den Verbrauch pro Zelle kennt (aus Tab. 4), kann man die Menge des verbrauchten Alkohols bis  $N_1$  ermitteln.

Aus Tab. 1 ergibt sich:

$$\frac{N^{Gär}}{C_G} = 1,5 \cdot 10^{10} \text{ Zellen/g;}$$

aus Tab. 3:

$$\frac{N^{Gär+At}}{C_G} = 2,2 \cdot 10^{10} \text{ Zellen/g.}$$

Somit ist die relative Zellkonzentration, die durch gleichzeitige Alkoholatmung zusätzlich entstanden ist:

$$\frac{N_{Alc}^{At}}{C_G} = 0,7 \cdot 10^{10} \text{ Zellen/g.}$$

Der Alkoholverbrauch  $C_{\text{Alc}}^+$  (pro  $C_G$ ) ist:

$$\frac{C_{\text{Alc}}^+}{C_G} = \frac{N_{\text{Alc}}^{\text{At}} \cdot C_{\text{Alc}}}{C_G \cdot N_{\text{Alc}}^{\text{At}}} = \frac{0,7 \cdot 10^{10}}{13,3 \cdot 10^{10}} = 0,053.$$

Dabei wurde wieder  $N_{\text{Alc}}^{\text{At}}/C_{\text{Alc}} = 13,3 \cdot 10^{10}$  Zellen/g aus Tab. 4 entnommen.

Die Alkoholproduktion  $C_{\text{Alc}}^*$  durch Gärung ist:

$$C_{\text{Alc}}^* = 2 \frac{M_{\text{Alc}}}{M_G} \cdot C_G = 0,46 \cdot C_G.$$

Also ist:

$$\frac{C_{\text{Alc}}^+}{C_{\text{Alc}}^*} = \frac{C_{\text{Alc}}^+ \cdot C_G}{C_{\text{Alc}}^* \cdot C_G} = \frac{0,053}{0,46} = 0,11.$$

Nach dieser zweiten Abschätzung werden also ca. 11% des hergestellten Alkohols bis  $N_1$  veratmet.

Das Modell b liefert aber auch:

$$\left( \frac{A_G/L}{F \cdot t_C} \right)^{\text{Gär}} + 2 \frac{C_{\text{Alc}}^+}{C_{\text{Alc}}^*} \cdot \left( \frac{A_{\text{Alc}}/L}{F \cdot t_C} \right)^{\text{At}} = \left( \frac{A_G/L}{F \cdot t_C} \right)^{\text{At} + \text{Gär}},$$

dabei sind  $A_G$  und  $A_{\text{Alc}}$  die Mol.-Gew. von Glucose und Alkohol;  $L$  ist die Loschmidt-Zahl. Es ergibt sich das Verhältnis  $C_{\text{Alc}}^+/C_{\text{Alc}}^* = 0,11$ , wie man sich durch Einsetzen der Werte aus Tab. 5 überzeugen kann.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse für den Stamm 211 und für die atmungsdefekte Mutante 211p folgt also ein ganz ähnlicher Anteil des vom Stamm 211 bei der Glucosegärung verbrauchten Alkohols. Für die Berechnung der effektiven freien Enthalpie soll aber der nach der ersten Abschätzung gewonnene Wert von  $C_{\text{Alc}}^+/C_{\text{Alc}}^* = 0,05$  benutzt werden, da er sich nur aus Messungen mit dem Stamm 211 allein ergibt. Damit wird

$$\Delta G^{\text{At} + \text{Gär}} = 66 \text{ kcal/Mol} + 0,05 \cdot 634 \text{ kcal/Mol} = 97,7 \text{ kcal/Mol}.$$

Aus Tab. 3 ist

$$\frac{N_1 - N_0}{C_G} = 2,2 \cdot 10^{10} \text{ Zellen/g}$$

und damit

$$F \cdot t_C \frac{\Delta G^{\text{eff}}}{A} = 2,2 \cdot 10^{-11} \text{ kcal/Zelle}.$$

Dieser Wert ist gleichgroß wie der für die reine Gärung aus Tab. 1 ermittelte Energieverbrauch, und man erkennt, daß die Hefezelle durch die gleichzeitige Veratmung des entstandenen Alkohols bzw. der direkten Veratmung der Glucose sich praktisch nicht rationeller, d. h. mit kleinerem Energieaufwand vermehrt. Durch diese Ausnutzung des in der Zelle befindlichen Alkohols wird aber die Geschwindigkeit der Energieproduktion heraufgesetzt, so daß

die Zellzyklusdauer geringer ist als bei reiner Gärung. Dieses scheint ein von der Zelle ausgenützter Selektionsvorteil zu sein.

#### 4. Temperaturabhängigkeit

Vermehrungskurven mit Zellen verschiedenen Ploidiegrades wurden auch bei anderen Temperaturen aufgenommen, wobei die Kulturen in entsprechend temperierten Wasserbädern geschüttelt wurden. In Abb. 4 sind die erhaltenen Werte für die Zellzyklusdauer  $t_C$  für die untersuchten Stämme eingetragen und man erkennt, daß nur sehr geringe Unterschiede auftreten. Die Temperaturabhängigkeit von  $t_C$  hat ein ausgeprägtes Minimum um  $30^\circ\text{C}$ . Kleine Temperaturänderungen um  $30^\circ\text{C}$  haben daher keinen wesentlichen Einfluß auf die Vermehrung von Zellen verschiedenen Ploidiegrades.

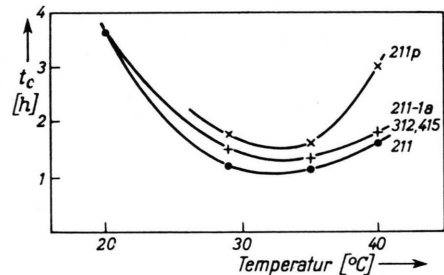


Abb. 4. Zellzyklusdauer  $t_C$  in Abhängigkeit von der Züchtungstemperatur bei Stämmen mit verschiedenem Ploidiegrad.

#### 5. Kontrolluntersuchungen mit $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose

Um die hier aufgestellten Modelle des Kohlenstoff-Stoffwechsels zu kontrollieren, wurden einige Experimente mit  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose durchgeführt, die dem Nährmedium quantitativ zugesetzt wurde. Die Zellvermehrung und die jeweilige Aktivität im Nährmedium  $A_N$  sind in Abb. 5 dargestellt. Zieht man die im Nährmedium verbleibende Restaktivität  $A_0$  von den Meßwerten ab, so ergibt sich der gezeichnete Verlauf für  $A_N - A_0$ , der anzeigt, daß am Knickpunkt der Vermehrungskurve die zugesetzte Glucose weitgehend verbraucht ist.

Die Aktivität der entstandenen Zellen  $A_Z$  ist in Abb. 6 a dargestellt. Sie ist der jeweiligen Zellkonzentration proportional. In Abb. 6 b ist die Gesamtaktivität des Nährmediums und der Zellen in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit aufgetragen. (In Abb. 5 war  $A_N$  die Aktivität von  $1/20$  der Nährlösung.) Man erkennt hier, daß etwa 80% der

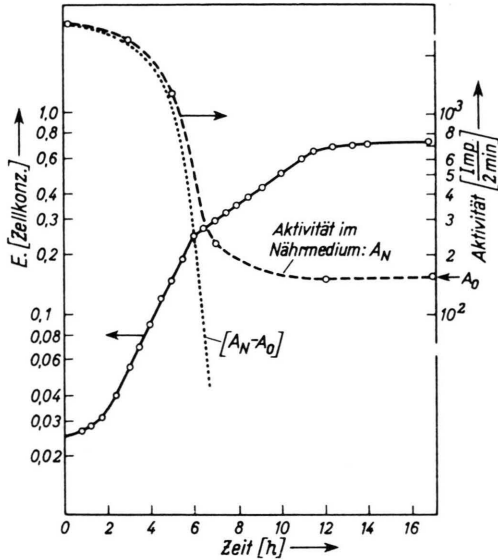


Abb. 5. Aktivitätsabnahme des Nährmediums nach Zusatz von <sup>14</sup>C-markierter Glucose in Abhängigkeit von der Zellzunahme (Stamm 211).

Aktivität nach Verbrauch der Glucose mit dem erzeugten CO<sub>2</sub> verschwunden sind. Auch das in der Lösung gelöste CO<sub>2</sub> kommt hier nicht zur Messung, da die Meßproben vorher eingedampft wurden. Durch diese Technik ist auch zu erklären, daß bei allen Untersuchungen im Bereich der Alkoholatmung

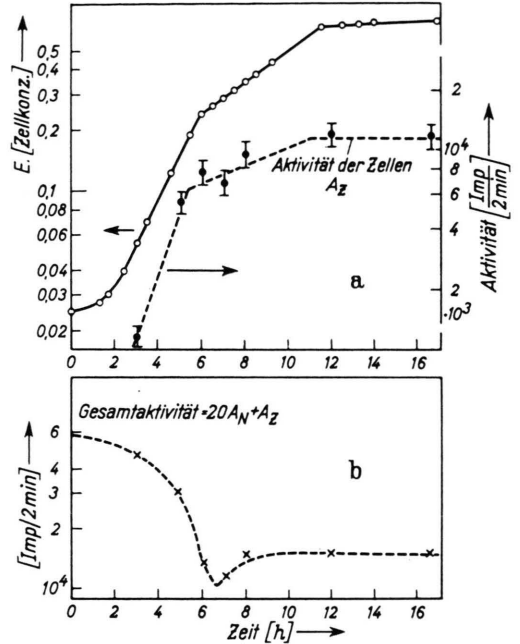


Abb. 6. Aktivität der Hefezellen (Stamm 211) bei Aufzucht mit <sup>14</sup>C-markierter Glucose im Nährmedium (a) und Gesamtaktivität von Nährmedium und Hefezellen (b) in Abhängigkeit von der Züchtungszeit.

stets ein deutliches Minimum der Gesamtaktivität auftritt, denn der in der Nährlösung dann vorhandene Alkohol verdampft ebenfalls.

Zu einem späteren Zeitpunkt befindet sich der markierte Kohlenstoff entweder als Abfallprodukt in der Nährlösung oder ist in die Zellen eingebaut.