

## Lumineszenz von Hefe

A. ESSER und J. STAUFF

Institut für physikalische Biochemie und Kolloidchemie,  
Frankfurt/Main

(Z. Naturforschg. **23b**, 1554—1555 [1968]; eingeg. am 18. Januar 1968)

KONIEV und Mitarbb.<sup>1</sup> berichten über eine schwache Strahlung bei *Torula utilis*, deren Maximum im Bereich von 320 bis 330 nm liegen soll, angeregtem Tryptophan zugeschrieben wird und deren Intensität etwa 1 Stde. vor der Zellteilung ein Maximum erreichen soll. Die Hefe wurde in READERScher Lösung<sup>2</sup> durch abwechselnde Verarmung und Zugabe von Ammoniumsulfat synchronisiert. Da von VLADIMIROV<sup>3</sup> und von uns in einer früheren Mitteilung<sup>4</sup> nur eine Strahlung im sichtbaren Bereich gefunden wurde, sollten diese Ergebnisse überprüft werden.

Eine bereits früher<sup>5</sup> beschriebene Apparatur wurde benutzt, jedoch besaß die Küvette (50 ml) ein Quarzfenster und einen Doppelmantel für den Durchfluß von Thermostatwasser. Die Durchlässigkeit des Quarzfensters betrug bei: 264–700 nm 93%, 240 nm 83%, 220 nm 85%, 205 nm 72 Prozent. Photomultiplier: EMI 6255 SA mit Quarzfenster Empfindlichkeitsbereich 200–600 nm, Eichung erfolgte mit einem radioaktiven Standard nach HASTINGS<sup>6,7</sup>. Einem Signal-Rausch-Verhältnis von 1 entsprechend können noch  $1 \cdot 10^4$  Quanten/sec·cm<sup>3</sup> gemessen werden. Zwischen Küvette und Multiplier konnten Filter eingeschoben werden, die die Geometrie des Strahlengangs nicht veränderten.

2 Hefepreparate wurden untersucht: 1. Bäckerhefe (WULF-Hefe der Deutschen Hefewerke GmbH); 2. *Sacch. cerevisiae* 24-2 c (Mikrobiologisches Institut der Universität Frankfurt).

Methodik: 1. 24 Stdn. alte Preßhefe wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/ml im Nährmedium suspendiert, was einer Konzentration der Zellen von  $10^6$  Zellen/ml entspricht. Sie wurde in der Meßküvette unter Begasung mit gefilterter Luft inkubiert. Als Nährmedium wurden sowohl Readersche Lösung als auch solche nach WICKERHAM<sup>8</sup> und HILZ<sup>9</sup> verwendet. Bei allen Präparationen konnte während des Wachstums und der anschließenden Ruhepause keine Lichtemission festgestellt werden, obwohl bis zu 72 Stdn. beobachtet wurde und nun die Zelldichte  $10^9$  Zellen/ml betrug.

2. Bäckerhefe – *Sacch. cerevisiae* 24-2 c wurde nach der Methode von HILZ und ECKSTEIN<sup>9</sup> synchronisiert. Die Konzentration der Ausgangssuspension betrug  $10^6$ ,  $5 \cdot 10^6$  und  $10^7$  Zellen/ml. Die Wachstumsstufen wurden durch Trübungsmessung und Zählung kontrolliert. Obwohl das Wachstum der Hefe über 4 Generationen verfolgt wurde, konnte auch in diesem Fall nicht

die geringste Strahlung festgestellt werden, die größer als  $10^4$  Photonen/sec·cm<sup>3</sup> war.

Wird die Hefe jedoch nach der früher angegebenen Methode<sup>4</sup> bei 40–45 °C mit Luft heftig begast und nach Einfüllen in die Meßküvette mit reinem Sauerstoff behandelt, läßt sich sofort eine Lichtemission feststellen. Die Intensität und ihre Zeitabhängigkeit ist von der Dauer der Vorbehandlung abhängig; in Abb. 1 sind diese Verhältnisse dargestellt. Der Kurvenverlauf ist unabhängig von der Hefesorte und der Art der Inkubation; synchronisierte Hefe zeigt den gleichen Effekt.

Ohne Vorbehandlung lassen sich in Hefesuspensionen immer dann Lichtemissionen beobachten, wenn in die Suspension reiner Sauerstoff eingeleitet wird. Verfolgt man die Emission über eine längere Zeit als 150 Min. bei synchronisierter Hefe, so wird bekanntlich nach HILZ bei etwa 80–90 Min. die erste „Stufe“ durchschritten. Die Lichtemission zeigt wie in Abb. 2

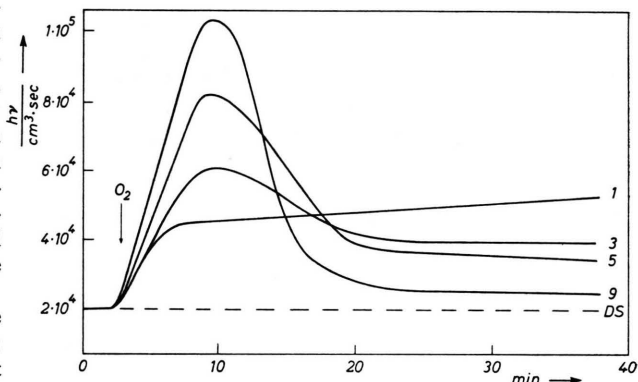


Abb. 1. Nach STAUFF u. RESKE<sup>6</sup> vorbehandelte Hefe, 1, 3, 5, 9: Stdn. Vorbehandlung. DS: Dunkelstrom.

dargestellt keinerlei Andeutung einer solchen Stufe, sondern steigt nach Durchlaufen eines steilen Stücks zu Beginn praktisch linear mit der Zeit an. Abstellen des Sauerstoffstroms läßt die Lichtemission sofort auf Dunkelniveau absinken. Einleiten von Luft ruft eine geringe, nur wenig über dem Niveau des reinen Nährmediums liegende Strahlung hervor.

Der Wellenlängenbereich der emittierten Strahlung wurde durch Einschieben von Kantenfiltern abgetastet. Die Ergebnisse zeigt Tab. 1. Unterhalb 450 nm ist keine Strahlung feststellbar, oberhalb 530 nm sinkt ihre Intensität um mehr als die Hälfte ab, so daß ihr Maximum in der Nähe von 500 nm liegen dürfte.

Um festzustellen, ob die von der Hefe emittierte Strahlung überhaupt etwas mit Stoffwechselvorgängen

<sup>1</sup> S. W. KONIEV et al., *Biofizika* **9**, 361 [1966].

<sup>2</sup> V. READER, *Biochem. Z.* **21**, 901 [1927].

<sup>3</sup> J. A. VLADIMIROV et al., *Biofizika* **7**, 675 [1962].

<sup>4</sup> J. STAUFF u. G. RESKE, *Naturwissenschaften* **51**, 39 [1964].

<sup>5</sup> J. STAUFF u. H. SCHMIDKUNZ, *Z. physik. Chem.* **33**, 273 [1962].

<sup>6</sup> J. W. HASTINGS u. G. WEBER, *J. opt. Soc. America* **53**, 1410 [1963].

<sup>7</sup> J. STAUFF, *Z. physik. Chem. N. F.* **49**, 58 [1966].

<sup>8</sup> L. J. WICKERHAM, *Techn. Bull.* **1951**, 1029, U.S. Dep. Agric. Washington.

<sup>9</sup> H. HILZ et al., *Biochem. Z.* **340**, 351 [1964]; **344**, 435 [1966].

Filter	Absorptionskante	Durchlässigkeit bei 600 nm [%]	Relative Intensität
Ohne	—	—	1
Schott GG 18	375 nm	0,92	0,92
Schott GG 3	435 nm	0,91	0,91
Schott GG 14	500 nm	0,91	0,72
Schott OG 1	530 nm	0,88	0,40

Tab. 1. Ergebnisse der Abtastung des Wellenlängenbereichs der emittierten Strahlung.

der lebenden Zellen zu tun hat, wurde eine Hefesuspension ( $10^7$  Zellen/ml)  $1\frac{1}{2}$  Std. gekocht, danach abzentrifugiert und der Rückstand in Nährmedium (Hilz) suspendiert. In der Meßküvette mit Sauerstoff behandelt, entwickelt sich sofort eine Lichtemission, die nach etwa 20 Min. ihr Maximum erreicht (vgl. Abb. 2), danach etwas absinkt und auch beim Abschalten des Sauerstoffstroms ihre Intensität über lange Zeit beibehält. Die Intensität der von diesen toten Zellen emittierten Strahlung ist etwa doppelt so groß wie die der lebenden Zellen unter gleichen Bedingungen.

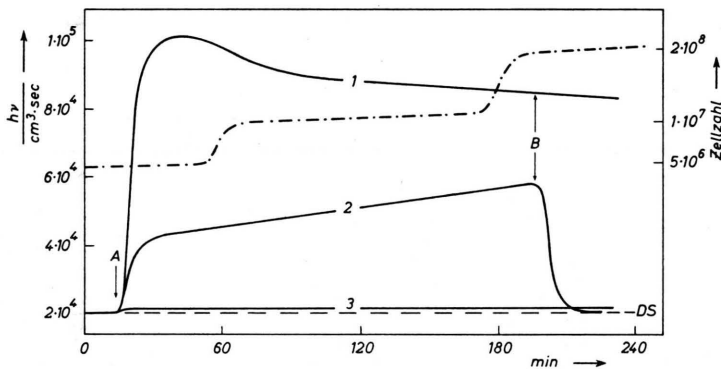


Abb. 2. 1: gekochte Hefezellen, 2+3: synchronisierte Hefezellen, - - - - : Zellzahl, - - - - : Dunkelstrom DS. Bei A für 1+2 Zugabe von  $O_2$ ; für 3 von Luft. Bei B Abstellen von  $O_2$ .

Da man Hefe nach WALLACE<sup>10</sup> bei  $O_2$ -freier Inkubation ohne Mitochondrien züchten kann, sollte es möglich sein, mit Hilfe derartiger Präparate zu prüfen, ob die Lichtemission etwas mit den Mitochondrien zu tun haben könnte, da diese selbst unter bestimmten Umständen in der Lage sind, Licht zu emittieren<sup>11</sup>. Unter reinem Stickstoff inkubierte und vermehrte Hefe zeigte jedoch bei Sauerstoffbehandlung das gleiche Verhalten wie an Luft inkubierte Hefe.

Da eine Zugabe von Katalase zu verschiedenen Zeit-

punkten der Sauerstoff-Begasung keinen Effekt hervorrief, kann die Strahlung nichts mit einer Bildung oder einem Zerfall von  $H_2O_2$  zu tun haben. Im Gegensatz dazu ruft Peroxidase (POD) wie Abb. 3 zeigt, als Zugabe zu einer bereits einige Zeit mit Sauerstoff behandelten Hefesuspension eine augenblickliche Verstärkung der Lumineszenz mit sehr schnellem Abfall auf kleine Werte hervor. Gibt man Peroxidase vor der Sauerstoffbegasung zu, so erhält man nach Einschalten des Sauerstoffs nur eine relativ geringe Strahlung.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Lichtemission bei der Sauerstoffbehandlung der Hefesuspension durch Lipidperoxide verursacht wird, deren Bildung durch den übernatürlich hohen Druck des reinen Sauerstoffs begünstigt und deren Zerfall auch durch im System vorhandene Schwermetallspuren katalysiert wird.

Die von uns beobachtete Emission muß etwas anderes sein als die vor geraumer Zeit von GURWITSCH<sup>12</sup> und KONIEV<sup>1</sup> festgestellte ultraviolette Strahlung. Mög-

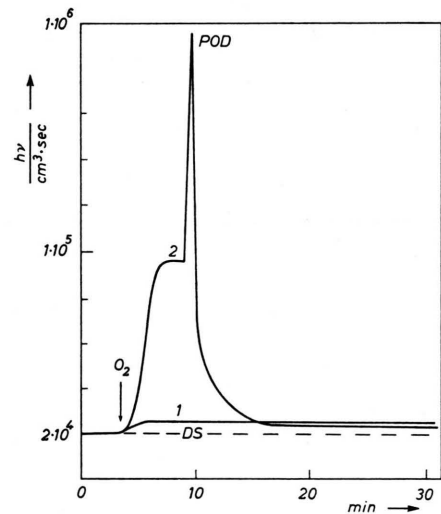


Abb. 3. 1: gekochte Hefezellen + Peroxidase, 2: gekochte Hefezellen, DS: Dunkelstrom, POD: Peroxidase.

licherweise liegt es an verschiedenen Empfindlichkeiten der Apparaturen und an der Beachtung des Sauerstoffeinflusses. Eine Klärung ist erst bei exakterer Angabe der experimentellen Bedingungen zu erhoffen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für finanzielle Unterstützung; Herrn Priv.Do. Dr. MENNIGMANN, Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt, für die Überlassung der *Sacch. cerevisiae* 24-2c Kulturen.

<sup>10</sup> P. G. WALLACE u. A. W. LINNANE, Nature [London] **201**, 1191 [1964].

<sup>11</sup> J. STAUFF u. J. OSTROWSKI, Z. Naturforschg. **22b**, 734 [1967].

<sup>12</sup> A. G. GURWITSCH u. L. D. GURWITSCH, Die mitogenetische Strahlung, Jena 1959.