

# **Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.**

## **VII. Mitteilung.**

### **Über die Entwicklung einiger Hefen in verschiedenen Nährlösungen.**

Von

**Hans Euler und Björn Palm.**

Mit sechs Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. August 1912.)

Die Entwicklung der Hefen und anderer Mikroorganismen in Nährlösungen muß mit ihrem Enzymgehalt eng verknüpft sein. Man kann ja von vornherein annehmen, daß in erster Linie diejenigen Stoffe die Entwicklung der Zellen bedingen, welche von den Enzymen derselben chemisch zerlegt und umgewandelt werden können. Andererseits ist aber daran zu erinnern, daß wenigstens qualitativ Fälle festgestellt sind, in welchen Hefen Kohlenhydrate assimilieren, welche sie nicht vergären können.<sup>1)</sup> Es entsteht also die Frage:

Wie verwendet die Hefe solche Kohlenhydrate und wie entwickelt sich die Hefe auf einer Nährlösung, deren Kohlenhydrat sie nicht zu vergären vermag?

In früheren, im hiesigen Laboratorium ausgeführten Versuchen wurde der Zuwachs des Enzymgehaltes bzw. die Zunahme des Enzymsystems in einer bestimmten Hefenmenge gemessen. In der vorliegenden Untersuchung haben wir den Verlauf der Zellenvermehrung verfolgt, um hieraus Anhaltspunkte über die Enzymbildung zu gewinnen, und zwar sind wir dabei von folgender Überlegung ausgegangen:

<sup>1)</sup> Vgl. z. B. P. Lindner, Wochenschr. f. Brauerei, Bd. 27, Nr. 41, 1910, und Bd. 28, Nr. 47, 1911.

Unter normalen Verhältnissen wird die Vermehrung der Anzahl Hefezellen in jedem Zeiteil der Anzahl  $x$  der vorhandenen Hefezellen — in einem gewissen Gebiet wenigstens — proportional sein. Die Hefemenge  $x$  wird exponentiell wachsen,<sup>1)</sup> es wird also

$$\frac{dx}{dt} = kx.$$

Erfolgt nun aber die Zellvermehrung auf einem Nährboden, an welchen die Hefe sich erst gewöhnen muß, so könnten die Bedingungen des Zuwachses mit wachsender Zeit immer günstiger werden und man kann unter Umständen eine schnellere Vermehrung der Zellen erwarten, als der einfachen logarithmischen Formel entspricht.

#### Experimentelles.

Der Verlauf des Wachstums der Hefen in den Nährlösungen wurde verfolgt, indem in der gebräuchlichen Weise in einem Thoma-Zeißschen Zählapparat von Zeit zu Zeit die Anzahl der Zellen in der Lösung festgestellt wurde. Jedesmal wurden

<sup>1)</sup> Eine logarithmische Formel für die Zellvermehrung von Bakterien hat zuerst Fr. Basenau aufgestellt (Archiv f. Hygiene, Bd. 23, S. 57, 1895). Er berechnet die Generationsdauer  $x$  in folgender Weise:

Bezeichnet man die Wachstumszeit mit  $t$ , die Anzahl der zu Beginn der Wachstumszeit anwesenden Bakterien mit  $a$ , die Anzahl der zur Zeit  $t$  anwesenden Bakterien mit  $b$ , den Generationswechsel mit  $y$ , so ist

$$x = \frac{t}{y} \text{ und } 2 \cdot 2^y = \frac{b}{a}$$

Nun ist

$$y \log 2 = \log \frac{b}{a}$$

$$y = \frac{\log \frac{b}{a}}{\log 2}$$

$$x = \frac{t \cdot \log 2}{\log \frac{b}{a}}$$

Vgl. hierzu A. G. M'Kendrick und M. Kesava, The rate of multiplication of Micro-Organisms. Pasteur-Institute of Southern India. Proceed. Roy. Soc. of Edinburgh, 1910—1911, p. 649. — Ferner die Formel, welche S. Arrhenius für die Sauerstoffzehrung durch Bakterien aufgestellt hat. (T. Carlson, Über die Zersetzung von Asparagin durch Bakterien in Gegenwart von freiem Sauerstoff. Medd. fr. K. Vet. Akad. Nobel-Inst., Bd. 2, Nr. 10.)

mindestens zwei Kontrollfüllungen der Zählkammer vorgenommen und bei jeder Füllung 60 Quadrate gerechnet. Im Folgenden ist stets nur das Totalmittel der Messung angegeben. Die Hefezellen wurden aus Kulturen<sup>1)</sup> übergeimpft in 200 bzw. 500 ccm Nährlösung, welche sich in 500 bzw. 750 ccm-Kolben befanden. Die Nährlösungen waren fast durchweg nach Lindner zusammengesetzt; sie enthielten außer Zucker pro Liter:

0,25 g Magnesiumsulfat,  
 5,0 » Orthomonokaliumsulfat,  
 4,0 » Asparagin.

Die Hauptschwierigkeit lag in der sterilen Entnahme von Zählproben aus den Lösungen. Jeder Kolben, in welchem das Wachstum der Hefen verfolgt wurde, enthielt eine als Pipette fungierende Glasröhre, welche durch den mit Watte verschlossenen Flaschenhals ging; in der Glasröhre selbst befand sich ein Baumwollstopfen. Vor der Probeentnahme wurde der Kolbeninhalt stark umgeschüttelt, und die Pipette ausgeblasen; sie füllte sich mit der homogenen Emulsion der Hefezellen und wurde zum Füllen der Zählkammer mit dem sie umgebenden Wattepropfen aus der Kulturflasche gehoben. Das Überführen der Emulsion in die Zählkammer und das Wiedereinsetzen der Pipette geschah so schnell als möglich, trotzdem ließ sich in sehr vielen Fällen Infektion nicht ausschließen, so daß mehr als die Hälfte aller Versuche verworfen werden mußte. Trotzdem haben wir diese Versuchsanordnung beibehalten, da bei derselben die konstanten methodischen Fehler geringer sind als bei anderer, einfacherer Methodik.

Die Mittelwerte der Parallelversuche stimmten meist innerhalb 1—5% miteinander überein. In manchen Fällen wurde die Zählung dadurch erschwert, daß die Hefezellen sich zu Kolonien zusammenschlossen. Versuche, bei welchen die Ergebnisse der einzelnen Reihen um mehr als 5% voneinander abwichen, sind hier nicht aufgenommen worden.

<sup>1)</sup> Die Kulturen der Bierhefe stammten aus dem Reinzuchtsapparat der hiesigen St. Eriksbrauerei. Herrn Ingenieur F. Hildebrandt und Herrn Disponent Sven Hydén sind wir für die Überlassung der Hefe sehr zu Dank verpflichtet.

## Versuche.

## I.

Die ersten Versuche sind mit Rohrzucker und Glukose und mit einer Reinkultur von Stockholmer Bierhefe angestellt worden, um den Verlauf des normalen Wachstums zu ermitteln.

5 g Rohrzucker in 100 ccm Lindners Nährlösung.

Reihe A.

Stunden	Zellen- zahl	Logarith- mus	$10^5 \cdot k$
0	4,5	0,651	—
24	11,6	1,064	172
48	38,7	1,588	195
72	116,9	2,045	193

Reihe B.

Stunden	Zellen- zahl	Logarith- mus	$10^5 \cdot k$
0	5	0,699	—
32	20	1,301	188
48	42	1,623	193
72	125	2,100	194

Reihe C.

Stunden	Zellen- zahl	Logarith- mus	$10^5 \cdot k$
0	4,7	0,673	—
30	18	1,255	194
48	41	1,613	196

Reihe D.

Stunden	Zellen- zahl	Logarith- mus	$10^5 \cdot k$
0	11,2	1,049	—
24	31,8	1,502	190
48	70,7	1,849	167
72	158,7	2,200	160

Reihe E.

Stunden	Zellen- zahl	Logarith- mus	$10^5 \cdot k$
0	2,5	0,398	—
54	39	1,591	221
72	90	1,954	216

Reihe F.

Stunden	Zellen- zahl	Logarith- mus	$10^5 \cdot k$
0	42,6	1,629	—
9,5	61,8	1,791	171
24	98,5	1,993	152
33,5	134,7	2,129	150
48	232,4	2,365	153

Die aus diesen Zahlen sich ergebenden Wachstumskurven sind in der nebenstehenden Fig. 1 zusammengestellt. Wie man sieht, sind diese Kurven mit großer Annäherung gerade Linien, d. h. der Zuwachs folgt der oben angegebenen einfachen logarithmischen Formel. Um die Geschwindigkeit des Zuwachses

anzugeben, kann man entweder die «Generationsdauer» einführen, d. h. diejenige Zeit, innerhalb welcher sich die Zellenzahl verdoppelt, oder aber die Vermehrungskonstante

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{a_t}{a_0},$$

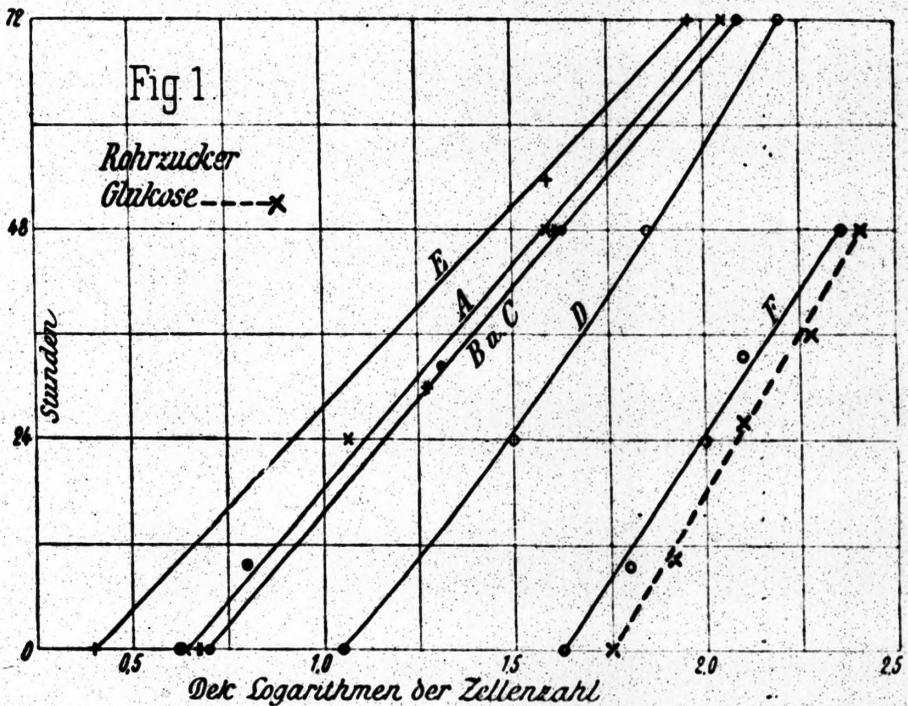
wo t die Zeit in Stunden,  $a_t$  die Zellenzahl zur Zeit t und  $a_0$  die Zellenzahl zur Zeit 0 bedeuten.

Gleichzeitig mit der Versuchsreihe F wurde ein Parallelversuch mit der gleichen Hefe mit Glukose angestellt. Die Resultate findet man in folgender Tabelle und in der Fig. 1.

Hefe H. Glukose.

5 g Glukose in 100 ccm Lindners Nährlösung.

Stunden	Zellenzahl	Logarithmus	$10^5 \cdot k$
0	56,5	1,752	—
11	81,5	1,911	144
26	126,2	2,101	135
36	188,4	2,275	145
48	279,5	2,446	144
96	585,3	2,767	106



Bei längerer Versuchsdauer als 2 Tage tritt eine Verminderung der Zuwachsgeschwindigkeit ein, welche jedenfalls zum Teil auf dem Verbrauch des Nährsubstrates und dem Auftreten der Reaktionsprodukte beruht. Diese allmählich zunehmende Verzögerung zeigt sich auch in folgender Versuchsreihe, welche sich über 10 Tage erstreckt.

### Hefe H.

#### 4 g Glukose in 100 ccm Lindners Nährlösung.

Stunden	Zellenzahl	Logarithmus	$10^5 \cdot k$
0	9,7	0,987	—
48	46,3	1,666	142
96	142,9	2,155	122
144	329,1	2,517	106
192	665,2	2,823	95
240	1339,8	3,127	89

Zwei weitere Versuchsreihen mit Glukose, welche wir hier nicht anführen, haben innerhalb der Zeiten 0—46 Stunden ebenfalls die Konstante  $k = 145$  geliefert, so daß unsere Hefe sich in Glukoselösung etwas langsamer zu vermehren schien<sup>1)</sup> als in Rohrzuckerlösung.

#### Mittelwerte für $10^5 \cdot k$

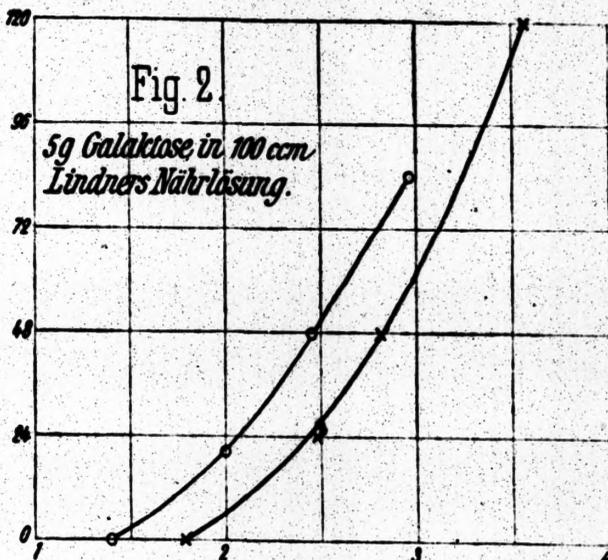
Rohrzucker	190
Glukose	140

## II.

Galaktose wird von der Hefe H anfangs nur langsam vergoren, erst nach einiger Zeit erreicht die Vergärungsgeschwindigkeit der Hefe diesem Zucker gegenüber etwa die gleiche Größe wie in bezug auf Glukose. Es wurde nun untersucht, ob die Anpassung der Hefe an Galaktose sich hinsichtlich der Zuwachsgeschwindigkeit bemerklich macht.

<sup>1)</sup> Es ist allerdings zu bemerken, daß die angewandten Rohrzuckerlösungen 5%ig waren, die Glukoselösungen aber 4%ig.

Man hätte erwarten können, daß der Zuwachs der Hefe in Galaktoselösungen anfangs, wenn die Hefe noch über geringe Mengen des diesen Zucker angreifenden Enzyms verfügt, geringer sein und dann mit zunehmender «Galaktase»-Menge anwachsen würde. Ein derartiger Verlauf der Kurve wurde aber nie beobachtet, im Gegenteil sind, wie Fig. 2 zeigt, die Kurven gegen die Zeitachse gebogen, es tritt also mit zunehmender Zellenzahl Verzögerung ein. Daß ein Effekt, wie der erwartete, sich nicht geltend macht, dürfte darauf beruhen, daß die Assimilation so langsam fortschreitet, daß von Anfang an genügend bzw. ein Überschuß von gespaltenem, vergärungsfähigem Zucker vorhanden ist.



### III.

Einen etwas anderen Verlauf nimmt die Zellenvermehrung der Hefe H bei der Kultur in Lactose.

5 g Lactose in 100 ccm Lindners Nährlösung.

Reihe A.

Stunden	Zellenzahl	Logarithmus
0	4,0	0,602
24	4,6	0,663
72	22,8	1,358
120	97,2	1,988
188	443,0	2,646
216	1625,7	3,211
264	2234,7	3,368

Reihe B.

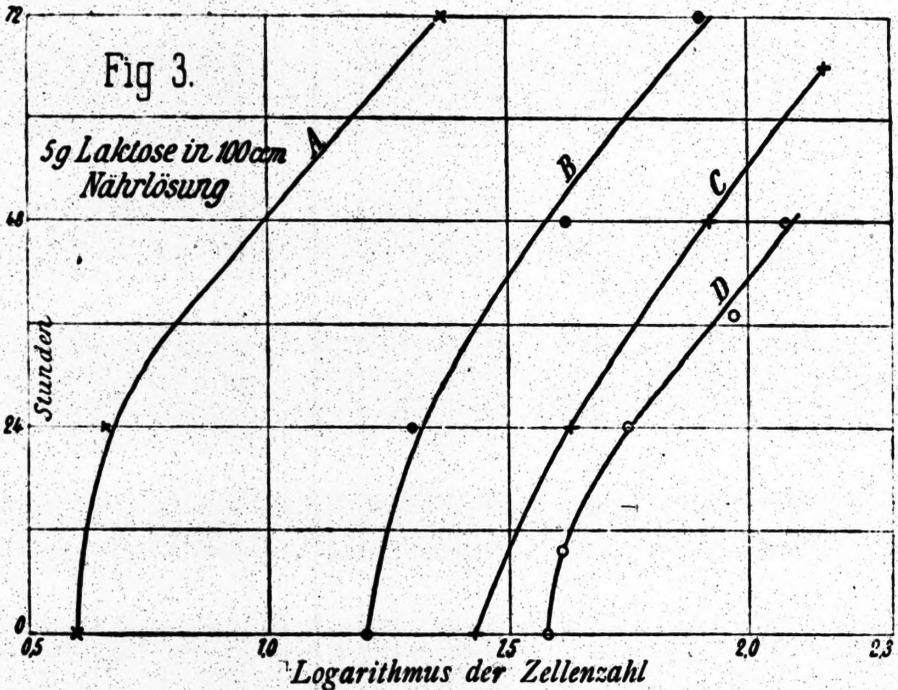
Stunden	Zellenzahl	Logarithmus
0	16,2	1,209
24	19,8	1,297
48	42,0	1,623
72	80,3	1,905

Reihe C.

Stunden	Zellenzahl	Logarithmus
0	27,2	1,434
24	43,3	1,636
48	83,6	1,922
66	143,9	2,158
96	376,3	2,575

Reihe D.

Stunden	Zellenzahl	Logarithmus
0	34,9	1,543
9,4	40,6	1,608
24	55,4	1,747
37	93,4	1,970
48	122,7	2,088



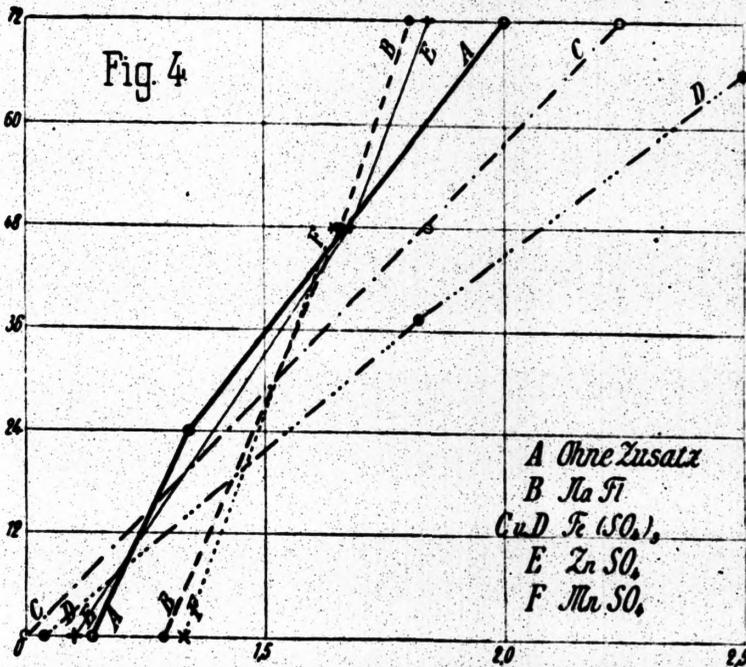
Wie die obenstehende Figur 3 zeigt, trat in unseren Lactoselösungen mit fortschreitender Zellenvermehrung eine Beschleunigung der Zuwachsgeschwindigkeit ein. Aus Lactose werden bekanntlich durch Bierhefe keine mit den gebräuchlichen Methoden meßbare Mengen Alkohol und Kohlensäure gebildet. Im hiesigen Laboratorium angestellte Versuche, die Hefe H an diese Zuckerart zu gewöhnen, sind bis jetzt ohne Erfolg geblieben. Da man nun nicht wohl annehmen wird, daß die Lactose als solche der Assimilation unterliegt, so scheint es, daß die Bierhefe doch imstande ist, die zu ihrer Ernährung und Fortpflanzung ausreichenden Mengen Lactose zu spalten und die geringen Mengen Enzym, welche hierzu erforderlich sind, zu entwickeln oder einen Aktivator (etwa eine Säure) zu bilden, welche die Spaltung begünstigt.

Es sei noch hervorgehoben, daß bei derartigen Arbeiten wie die mitgeteilten in Gegenwart von Lactose die allergrößten Vorsichtsmaßregeln gegen Infektion, besonders von Milchsäurebakterien, geboten sind. Eine große Anzahl von Versuchen sind uns wegen dieser Infektion mißglückt.

Die folgenden Versuche wurden angestellt, um geeignete Aktivatoren für die Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe zu finden. Daß schon geringe Zusätze von anorganischen Stoffen zu Nährlösungen einen sehr erheblichen Einfluß auf die Entwicklung von Mikroorganismen haben können, ist kürzlich wieder von G. Bertrand betont worden.

Die folgenden Versuche beziehen sich nur auf minimale Mengen von zugesetzten Salzen  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  und  $\text{NaFl}$ . Sämtliche Lösungen waren mit Lindners Nährlösung hergestellt, welche 8 g Lactose auf 200 ccm enthielt. Zu je 200 ccm dieser Lösung wurden 5 ccm von  $\frac{1}{10}$  normalen Lösungen der angegebenen Salze gesetzt. Die Lösungen C und D wurden dadurch übersättigt in bezug auf Eisenphosphat.

Die Ergebnisse sind in Fig. 4 enthalten.



Der Vergleich der nebenstehenden Kurven zeigt, daß die allmähliche Vergrößerung der Zuwachsgeschwindigkeit in Anwesenheit der zugesetzten Salze nicht eintritt.

NaFl verzögert die Entwicklung der Hefe schon in  $\frac{1}{400}$  normaler Lösung. Auch Zinksulfat hat offenbar gehemmt. Dagegen hat Ferrisulfat eine erhebliche Beschleunigung bewirkt. Dieselbe wird, wie spätere Versuche ergeben haben, bei Zusatz größerer Mengen von Eisensalz noch bedeutender. Bei Gegenwart von organischen Stoffen, welche das Eisen komplex binden, erträgt die Hefe außerordentlich große Mengen Eisensalze. Sie färbt sich dabei dunkel und nimmt selbst etwas Eisen in organischer Bindung auf.

In dieser Hinsicht verhalten sich indessen offenbar verschiedene Hefearten ganz ungleich. So haben Versuche über den Zusatz von  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  zu einer Lactoselösung, in welcher sich *Saccharomyces thermantitonum* entwickelte, folgendes Resultat ergeben:

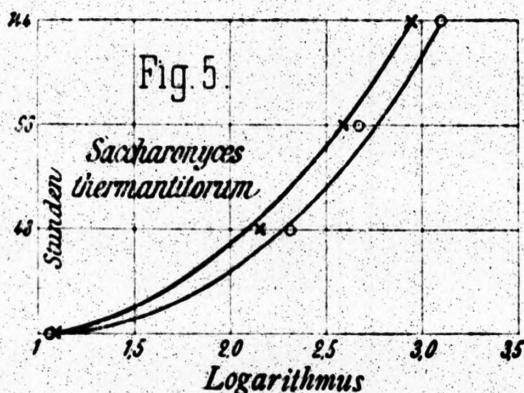
## IV.

5 g Lactose in 100 ccm Lindners Nährlösung.

*Saccharomyces thermantitonum*.

Ohne Zusatz			5 ccm 0,1-norm.- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ auf 200 ccm Lösung		
Stunden	Zellenzahl	Logarithmus	Stunden	Zellenzahl	Logarithmus
0	12,1	1,083	0	11,8	1,072
48	139,0	2,143	48	206,9	2,314
96	378,7	2,578	96	466,0	2,668
144	903,3	2,956	144	1288,6	3,110

Der Verlauf der Kurve ist aus Fig. 5 ersichtlich.



Man könnte daran denken, daß die anfängliche relativ große Assimilationsgeschwindigkeit dadurch hervorgerufen ist, daß die Lactose geringe Mengen von Glukose und Galaktose enthielt. Dies war aber nicht der Fall.

Es wurde nämlich eine Lactoselösung mit einer größeren Menge von *Saccharomyces thermantitonum* versetzt nach 20 Stunden

abfiltriert, gekocht und wieder filtriert. Der Zellenzuwachs in dieser Lösung unterschied sich nur innerhalb der Versuchsfehler von dem obigen.

## V.

Endlich wurde noch ein weiteres Beispiel für den Zuwachs in einem Fall studiert, in welchem die betreffende Hefe den Zucker, in welchem sie sich entwickelt, nicht vergärt.

*Saccharomyces apiculatus* greift bekanntlich Disaccharide z. B. Rohrzucker nicht an und enthält nach Hansen<sup>1)</sup> kein Invertin. Es wurde deswegen die Entwicklung dieser Hefe in Rohrzuckerlösungen untersucht und mit derjenigen in Galaktoselösungen verglichen. Der Pilz stammt aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin.

5 g Rohrzucker in 100 ccm Lindners Nährlösung.

*Sacch. apiculatus.*

A.			B.		
Stunden	Zellenzahl	Logarithmus	Stunden	Zellenzahl	Logarithmus
0	15,0	1,176	0	57,5	1,760
24	25,6	1,408	24	86,7	1,938
48	53,7	1,730	48	156,8	2,193
72	109,5	2,049	72	263,0	2,42
96	232,5	2,366			

5 g Galaktose in 100 ccm Lindners Nährlösung.

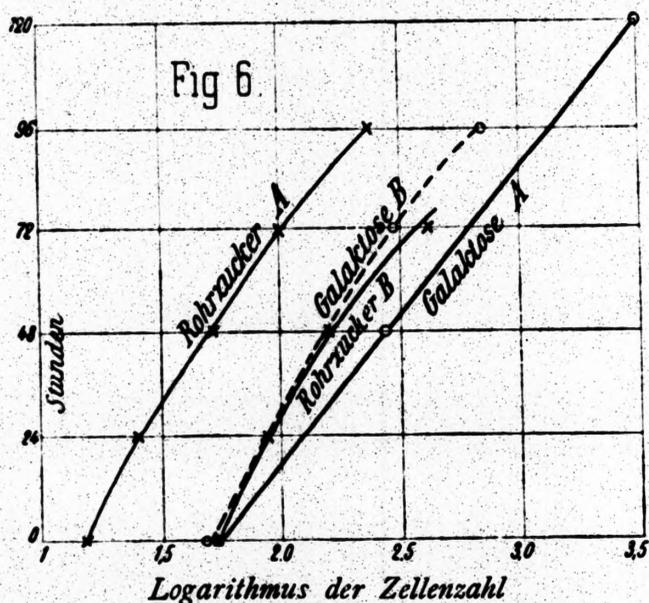
*Sacch. apiculatus.*

A.			B.		
Stunden	Zellenzahl	Logarithmus	Stunden	Zellenzahl	Logarithmus
0	57,5	1,760	0	48,7	1,687
48	290	2,462	72	318	2,502
128	3648	3,562	96	708	2,850

Die 4 mit *Saccharomyces apiculatus* erhaltenen Kurven

<sup>1)</sup> Compt. rend. de Carlsberg, 1881, Bd. 1, S. 159. — Neuerdings hat allerdings A. Klöcker bei einigen Formen von *S. apiculatus* Invertin nachgewiesen. Zentralbl. f. Bakt., II, Bd. 26, S. 513, 1910.

sind in Figur 6 zusammengestellt. Wie man sieht, unterscheidet



sich die Zuwachsgeschwindigkeit der untersuchten Hefe in den beiden Versuchsreihen nicht wesentlich. Ähnliche Ergebnisse werden mit *Saccharomyces Marxianus* erhalten. Wir ließen denselben einerseits in Rohrzucker und in Gal-

laktose, andererseits in Lactose (welche nicht vergoren wird) sich entwickeln. Die Entwicklungskurven erwiesen sich in allen 3 Fällen annähernd gleich.

Diese Untersuchung wurde im Herbst 1911 ausgeführt und durch die Abreise des einen von uns (B. P.) unterbrochen. Sie wird im hiesigen Laboratorium fortgesetzt.

### Zusammenfassung.

Als Resultat dieser einleitenden Untersuchung kann mitgeteilt werden, daß die quantitative Vermehrung der Zellenzahl einer Bierhefe sowie von *Saccharomyces apiculatus* und *Saccharomyces Marxianus* bei der Entwicklung in der Lösung eines «nicht vergärbaren» Disaccharids und einer vergärbaren Hexose im wesentlichen gleichartig verläuft.

Da kaum anzunehmen ist, daß die ungespaltenen Disaccharide assimiliert werden, so wird durch obiges Ergebnis wahrscheinlich gemacht, daß Hefezellen hydrolysierende Enzyme auch für solche Disaccharide besitzen, deren Vergärung durch die gebräuchlichen Methoden nicht erkannt wurde.

Diese Frage ist für das Problem der Enzyymbildung in Hefen von prinzipieller Bedeutung.

Die Mittel zu dieser Untersuchung verdanken wir einer Schenkung von Herrn Direktor Max Sievert.