

Wenn auch die hier vorgetragenen Ergebnisse noch durch weitere Metabolituntersuchungen ergänzt werden müssen, so lassen sie sich jetzt schon unter einem einheitlichen Gesichtspunkt interpretieren. Die Beeinträchtigung des Pentosephosphatweges durch Xylose beeinflußt den KH-Stoffwechsel in Form einer Glykolyseaktivierung. Die Ausschaltung eines Stoff-

wechselteiles führt also nicht zur Verminderung des Gesamtumsatzes, sondern zur vermehrten Verstoffwechslung des freiwerdenden Substrates. Damit werden die Vorstellungen über die regulatorische Funktion des HMPs im intakten Betriebsstoffwechsel weiter experimentell belegt.

Gärungs- und Atmungswärme bei anaerober und aerober Vermehrung von Hefen

P. OHLMEYER und U. FRITZ *

Leibniz Kolleg der Universität Tübingen

(Z. Naturforschg. 21 b, 175—180 [1966]; eingegangen am 13. August 1965)

Im exponentiellen Verlauf der Vermehrung von Zellen wurde die Wärmetönung gemessen. Es fanden sich: anaerob mit Bäckerhefe $\Delta H = -19,7$ kcal pro Mol vergorener Glucose, aerob mit *Rhodotorula* -128 kcal pro Mol veratmeter Glucose. Der Wärmebetrag, bezogen auf die Masse gebildeter Zellen, war in beiden Fällen von ähnlicher Größe.

Die Wärmetönung ruhender Zellen betrug anaerob 16,9 kcal, aerob -662 kcal pro Mol Glucose.

Für die Vermehrung von lebendiger Substanz aus Nährstoff sind alle thermodynamischen Größen bei der Vielheit der Vorgänge höchstens abzuschätzen, nicht berechenbar. Aber meßbar ist ihre Wärmetönung, und deren Größe bei Hefen haben wir in dieser Untersuchung bestimmt.

Mit Hefekochsaff und Glucose als Nährmedium ließen wir Bäckerhefe ohne Sauerstoff und *Rhodotorula* mit Luft im Calorimeter sich vermehren. Zum Vergleich bestimmten wir die Wärme der Gärung und Atmung ruhender Zellen in Zuckerlösung.

Wir beschreiben zunächst die Hefen mit den Eigenschaften, die für die Wärmemessung interessieren, sodann die Messungen bei Vermehrung und in der Ruhe.

Eigenschaften der Hefen

Alle folgenden Angaben beziehen sich auf Bestimmungen bei 28° ; einige von ihnen hatten wir in anderen Arbeiten ^{1, 2} bereits gewonnen.

a) *Bäckerhefe* (K. Sinner, Karlsruhe). Die Gärung von 10^6 (= 0,10 mg) Zellen in 3-proz. Glucose unter Stickstoff wurde zu $5,1 \mu\text{l CO}_2/\text{h}$ (9) (Mittel aus 9 Ansätzen) bestimmt; 3 Std. nach Beginn lag sie etwas tiefer, nämlich bei $4,6 \mu\text{l}/\text{h}$ (11).

Die Vermehrung der Hefe unter Stickstoff in einem Gemisch von 3 Vol. Kochsaff aus Bäckerhefe und 2 Vol. 10-proz. Glucose führten wir in mehreren Std. auf das 5 bis 7-fache der Ausgangsmenge und maßen dabei die ansteigende Gärgeschwindigkeit. Unmittelbar nach Abbruch dieser Messung wurden die Zellen gezählt und/oder im Hämatokriten mit der Ausgangsmenge verglichen.

Das Gärvermögen während der Vermehrung läßt sich aus den manometrischen Daten und der anschließend bestimmten Zellenzahl errechnen. Die Rechnung hat wegen dieses Verzugs einen geringen Fehler, der durch graphisches Extrapolieren verkleinert werden kann. Er wird vermieden bei der Methode, die wir unter „Berechnungen“ beschreiben. Wir fanden während exponentieller Vermehrung für 10^6 Zellen $16,8 \mu\text{l CO}_2/\text{h}$ (9).

Die Atmung von 5,0 mg Preßhefe in 3-proz. Glucose betrug $-90 \mu\text{l O}_2/\text{h}$ (13); die aerobe Gärung $42 \mu\text{l CO}_2/\text{h}$ (8); unter Luft wurde also mehr Glucose vergoren, als veratmet wurde.

Die Verdoppelungsgeschwindigkeit (t_v) von Zellen bestimmten wir durch Zählung, im Hämatokriten oder durch manometrische Messung. Konstante Sproßzahl muß erreicht sein, sonst ist die Bestimmung nach keiner Methode genau. — Wir fanden für Bäckerhefe unter Stickstoff $t_v = 104$ Min. (31).

* Unter experimenteller Mitarbeit von G. BALG und A. STRUNK.

² P. OHLMEYER, G. MÜLLER u. U. HEUN, Z. Naturforschg. 20 b, 157 [1965].

¹ P. OHLMEYER, Z. Naturforschg. 20 b, 58 [1965].

Am Ende solcher Vermehrung gelten für die Zellgewichte andere Zahlen als bei Preßhefe, die kaum sprossende Zellen enthält. Wir fanden für 10^6 Zellen 0,14 mg (5) mit 27% Trockensubstanz.

b) *Rhodotorula* (Reinzucht¹). Für die Atmung von 10^6 Zellen in 3-proz. Glucose fanden wir $-0,43 \mu\text{l O}_2/\text{h}$ (20). Während der exponentiellen Vermehrung in Kochsaft/Glucose unter Luft betrug die Atmung von 10^6 Zellen $-1,4 \mu\text{l O}_2/\text{h}$ (7).

Die Gärung von 5 mg (= $1,7 \cdot 10^8$ Zellen) in 3-proz. Glucose unter Stickstoff betrug $1,3 \mu\text{l CO}_2/\text{h}$ (16); unter Luft war sie bemerkenswerterweise größer, nämlich $6,9 \mu\text{l CO}_2/\text{h}$ (6). — Während der Vermehrung in Kochsaft/Glucose unter Luft sahen wir keine meßbare Gärung. Ohne Sauerstoff vermehrt *Rhodotorula* sich nicht.

	NAD		Kochsaft (1:10)	
	1,6 γ	3,2 γ	0,1 ml	0,2 ml
$\mu\text{l CO}_2/10 \text{ Min.}$	8	18	41	90

Tab. 1. NAD in roter Hefe. — Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Bierhefe enthält ca. 0,5% NAD³; rote Hefe enthält beträchtlich mehr. ZILLES fand in unserem Gärttest⁴ mit Kochsaft aus roter Hefe die Werte der Tab. 1.

Aus Tab. 1 folgt: $(1,6 + 3,2) \cdot \frac{41+90}{8+18} = 24 \gamma$ NAD in 0,3 ml Kochsaft (1:10). Da 138 ml Kochsaft (1:1) aus 31,5 g feuchter Hefe gewonnen waren, enthält diese 3,5% NAD.

Die Verdoppelungsgeschwindigkeit (t_v) der roten Hefe in Kochsaft/Glucose unter Luft betrug 119 Min. (8). t_v wurde weder hier noch bei Bäckerhefe beeinflusst von Streptomycin (0,1%) in der Nährlösung und Siliconfett an der Gefäßwand.

Zellen am Ende der Zucht (nach Erschöpfung des Nährstoffs) besitzen sehr wenig Sprosse; $1,7 \cdot 10^8$ Zellen = 5,0 mg (30). Im Zuge der Vermehrung wogen $1,7 \cdot 10^8$ Zellen 7,0 mg (5) mit 37% Trockensubstanz.

c) *Glucose-Assimilation*⁵. Wenn rote Hefe unter Stickstoff in Glucoselösung geschüttelt wird, entspricht die CO_2 -Gärung dem Glucoseschwund: Mit

15 mg Hefe in 2,0 ml Wasser, die $18,9 \mu\text{Mol}$ Glucose enthielten, sahen wir in 1049 Min. einen Verbrauch von $0,6 \mu\text{Mol}$ (2) im optischen Test⁶, von ebenfalls $0,6 \mu\text{Mol}$ ($26,5 \mu\text{l CO}_2$) (2) manometrisch.

Bei Atmung aber und mit Bäckerhefe tritt Assimilation ein, und sie ist so groß, daß Glucosebestimmung der Wärmeberechnung ohne weiteres nicht zugrunde gelegt werden kann (Tab. 2). Wir legen daher Zellzahl und Gasstoffwechsel zugrunde.

Anaerobe Gärung		Atmung und aerobe Gärung			
Bäckerhefe		Bäckerhefe		rote Hefe	
m	p	m	p	m	p
9,7 (4)	12,7 (4)	1,6 (6)	4,2 (6)	0,6 (12)	1,8 (12)

Tab. 2. Assimilation von Glucose. — Die Angaben gelten für 10 mg Zellen in 2,0 ml mit 30 oder $50 \mu\text{Mol}$ Glucose über die 2. oder 3. Stde. nach Versuchsbeginn. m = manometrische, p = photometrische Glucosebestimmung. Die Zahlen bedeuten Glucoseschwund in Mikromol. p-m ist ein Maß für die Assimilation.

Wurden Zellen in $8,3 \cdot 10^{-2}$ -m. Glucose unter Luft mit Zucker angereichert und unter Stickstoff in $2,5 \cdot 10^{-2}$ -m. Glucose übertragen, dann vergoren $m = 2,1 \mu\text{Mol}$, während nur $p = 0,5 \mu\text{Mol}$ Glucose aus dem Medium schwanden. In Verbindung mit Tab. 2 ($p > m$) lehrt dieser Versuch ($m > p$), daß das Maß der Assimilation von der Glucosekonzentration im Medium und vom Stoffwechsel abhängt und vermutlich ein Gleichgewicht anstrebt.

Da Assimilation einen thermischen Effekt bedeutet, warten wir einige Stdn. nach dem Einführen von Zellen in Zuckerlösung ab, ehe wir mit Wärmemessungen beginnen.

Berechnungen

Bei Versuchen mit ruhender Hefe wurden für calorimetrische Ansätze 25 mg, für manometrische Parallelansätze meist 5 mg eingesetzt. Wir rechnen CO_2 -Bildung bzw. O_2 -Verbrauch dann auf Glucoseschwund um und drücken das Ergebnis in Kilocalorien pro Mol verbrauchter Glucose (kcal/Mol) aus.

Bei Versuchen mit Hefe in der Vermehrung dagegen stellen wir die Beziehung zwischen Wärme und Glucoseverbrauch über die Zahl der Zellen her. Diese

³ P. OHLMEYER, *Biochem. Z.* **297**, 66 [1938].

⁴ P. OHLMEYER, R. GRILL u. W. RÜSSMANN, *Z. physiol. Chem.* **320**, 173 [1960].

⁵ Vgl. O. MEYERHOF u. W. SCHULZ, *Biochem. Z.* **287**, 206 [1936]; F. LYNEN, in: *Neuere Ergebnisse aus Chemie und*

Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958, S. 155.

⁶ *Biochemica Boehringer*. Der Test war bei Benutzung einer Eichkurve auf <5% genau. Die Küvetten wurden nach Gebrauch mit Äthanol von anhaftendem Farbstoff gereinigt.

betrug zu Beginn meistens weniger als 250 000. Exponentieller Anstieg war jeweils gesichert. Die Zellen wurden dann einige Zeit nach Abbruch der Messung gezählt, und der Glucoseverbrauch ergab sich aus der Ableitung der Exponentialfunktion, also nach der folgenden Rechnung:

Gegeben seien folgende Größen: Im Zeitpunkt t_2 die Zellenzahl m_2 (in Millionen); die Zeitstrecke t_1 bis $t_2 = \tau$ (in Sek.); die Verdoppelungszeit der Zellen t_v (in Sek.); V , das Volumen CO_2 bzw. O_2 (in Mikrolitern), das im Falle $\tau = t_v$ entwickelt bzw. verbraucht wurde.

Wir errechnen m_1 nach

$$m_2 = m_1 \cdot e^{\ln 2 \cdot \frac{\tau}{t_v}} \quad (1)$$

und finden bei anaerober Vermehrung von Bäckerhefe in einem Versuchsbeispiel $m_1 = 6,17$. Während diese Zahl sich in $t_v = 6180$ Sek. verdoppelte, wurden $V = 263 \mu\text{l}$ CO_2 entwickelt.

Nun würde das Volumen V ebenfalls entwickelt, wenn $m_1 \cdot \frac{1}{\ln 2}$ Zellen mit demselben Gärvermögen wie in der Vermehrung, jedoch ruhend, über die Zeitstrecke t_v gären würden. Setzen wir nämlich das Integral V des Stoffwechsels in der Verdoppelung $t_v = \Delta x = \ln 2$ gleich 1, dann ist V auch durch das Rechteck $\ln 2 \cdot \frac{1}{\ln 2}$ darzustellen, also mit einem zeitlich konstanten Stoffwechsel, dessen Geschwindigkeit um den Faktor $\frac{1}{\ln 2}$ größer ist als zu Beginn der Verdoppelung. Da der Stoffwechsel aber der Zellmenge proportional ist, gilt der Faktor auch für diese. Wir nennen v das Gasvolumen, das Zellen mit dieser Eigenschaft in der Anzahl $m \cdot \frac{1}{\ln 2} = 1$ (Million) über die Zeitstrecke $\tau = 3600$ Sek. entwickeln, und können für den allgemeinen Fall schreiben

$$V = v \cdot m_1 \cdot \frac{1}{\ln 2} \cdot \frac{t_v}{3600} \quad (2)$$

Die Werte für V , m_1 und t_v sind bekannt (s. o.). Für v errechnen wir nach Gl. (2) den Wert $17,2 \mu\text{l}$ CO_2/h . Nach dieser und nach anderen Methoden (vgl. S. 175) fanden wir den Mittelwert $16,8 \mu\text{l}/\text{h}$ (9) für das Gärvermögen von 1 Million Zellen in der Vermehrung.

Im Wärmeversuch benutzen wir v für die Errechnung von V . Ist die Wärme über τ Sek. gemessen, dann vergehen einige Min. bis zum Zeitpunkt t_3 , zu dem die während der Messung und über sie hinaus vermehrten Zellen (m_3) gezählt werden. Wiederum folgen m_1 und ebenso m_2 , die Zellenzahl am Ende von τ , aus sinnvoller Anwendung von Gl. (1). V gewinnen wir aus Gl. (2), und das Gasvolumen über die Zeit der Wärmemessung (V_τ) ergibt sich aus

$$V_\tau = V (e^{\ln 2 \cdot \frac{\tau}{t_v}} - 1) \quad (3)$$

V_τ liefert über stöchiometrische Rechnung den Glucoseverbrauch bei Gärung oder Atmung.

Drücken wir die Wärme in der Zellvermehrung in kcal/Mol Glucose aus, dann geben wir, streng genommen, einen „Glucosewert“ an; denn in der Berechnung berücksichtigen wir nicht, daß auch andere Substrate aus der Nährlösung veratmet werden könnten.

Wärmemessungen

Unser Calorimeter⁷ arbeitet nach dem Prinzip des Thermostaten mit relaisgesteuerter elektrischer Heizung. Den Quotienten aus der Summe der Heizzeiten und der Laufzeit im Falle des thermischen Gleichgewichts nennen wir Q_H . Wird nun im Calorimeter Wärme gebildet, dann kommt Temperaturkonstanz bereits mit geringerer Heizung zustande, die Heizzeiten werden kürzer. Gebildete Wärme (A) errechnet sich in Wattsekunden nach

$$A = i^2 \cdot W (Q_H \cdot \tau - \Sigma t) \quad (4)$$

In Gl. (4) bedeutet i die Stromstärke in der Heizspirale (in Milliampère); W deren Widerstand (in Ohm); τ die Laufzeit (in Sekunden); Σt die Summe der Heizzeiten während der Laufzeit (in Sekunden). $A \cdot 0,239$ ergibt die Wärmemenge in Grammcaldorien.

Das Calorimetergefäß ist mit 20 bis 22 ml Flüssigkeit gefüllt. Gas wird durch einen Schlauch bis dicht an den Boden geführt; seine Blasen bewirken Durchmischung. Vor dem Eintritt in das Gefäß strömt das Gas bei der Temperatur des äußeren Thermostaten durch ein 25 cm langes, 1,5 cm weites Glasrohr mit feuchter Wollkordel und Wasservorrat. Seine Geschwindigkeit wird mit einem einfachen Überdruckventil eingestellt und mit einem Blasenähler kontrolliert. Schäumen wird durch einen Ring von Silicofett dicht über dem Flüssigkeitsspiegel verhindert.

Ergebnisse mit wachsenden Zellen

Bei Vermehrungsversuchen erhält das Gefäß 20 ml einer Mischung von etwa 28° , die 7,5 ml Kochsaft aus Bäckerhefe, 2,5 ml 20-proz. Glucose, 10,0 ml Wasser, 20 mg Streptomycin und durchweg 240 000 rote bzw. 80 000 Bäckerhefezellen (= m_0) enthält. Das Gas wird eingelassen, die Stromstärke angepaßt, und ehe die Stoffwechselwärme erkennbar wird, sind alle Gleichgewichte eingestellt.

a) *Anaerobe Vermehrung.* Für diesen Vorgang benutzen wir Bäckerhefe unter Kohlendioxyd oder Argon. Der Beweis dafür, daß die Vermehrung im Calorimeter exponentiell verlief, liegt in folgenden Zahlen: $m_0 = 8 \cdot 10^4$ ($8 \cdot 10^4$); $\tau = 1046$ (1264) Min.; $m_3 = 9,1 \cdot 10^7$ ($36,8 \cdot 10^7$). Aus ihnen folgt nach Gl. (1) $t_v = 103$ (104) Min., die vielfach (s. o.) bestimmte Größe.

⁷ P. OHLMEYER, Z. Naturforschg. **1**, 30 [1946]; P. OHLMEYER u. R. SHATAS, Arch. Biochem. Biophysics **36**, 411 [1952].

Ver- such	i [mA]	W [Ω]	Q_H	τ [s]	Σt [s]	A [Ws]	[cal]	m_2 $\cdot 10^{-6}$	m_1 $\cdot 10^{-6}$	V [μ l CO ₂]	V_a [μ l CO ₂]	Glucose- Ver- brauch [μ Mol]	kcal pro Mol Glucose	
A	17,0	15,8	0,770	24 550	13 910	22,8	5,45	320	21,1	885	12 500	280	19,5	
B	8,5	15,2	0,803	17 100	10 420	3,65	0,87	64,5	9,65	405	2 300	51,5	17,0	
C	12,5	15,4	0,763	17 000	10 780	5,35	1,28	79,5	11,3	473	2 920	65,5	19,5	
D	17,3	15,2	0,800	21 800	15 680	7,9	1,89	95,2	8,55	361	3 710	83,0	22,8	
Σ : 9,49								559,2	50,6				480,0	Mittel: 19,7

Tab. 3 a. Anaerobe Vermehrung; Bäckerhefe. — Der Berechnung liegen die Gln. (1), (2), (3) und (4) zugrunde.

Ver- such	i [mA]	W [Ω]	Q_H	τ [s]	Σt [s]	A [Ws]	[cal]	m_2 $\cdot 10^{-6}$	m_1 $\cdot 10^{-6}$	V [μ l O ₂]	V_a [μ l O ₂]	Glucose- Ver- brauch [μ Mol]	kcal pro Mol Glucose	
A	15,0	16,0	0,786	28 940	13 790	32,3	7,72	2130	127	515	8150	60,7	127	
B	11,5	16,0	0,800	12 210	4 280	11,9	2,84	990	291	1175	2790	20,8	136	
C	19,6	16,0	0,612	21 200	10 650	14,35	3,43	1135	142	572	3960	29,5	116	
D	20,0	16,0	0,780	12 320	5 650	25,05	6,0	2250	677	2720	6320	47,2	127	
E	18,9	16,0	0,900	18 240	10 290	35,6	8,5	2610	435	1750	8640	64,4	132	
Σ : 28,49								9115	1672				222,6	Mittel: 128

Tab. 3 b. Aerobe Vermehrung: *Rhodotorula*.

b) *Aerobe Vermehrung*. Der Versuch wird mit roter Hefe unter Belüftung ausgeführt. Aus den Werten $m_0 = 2,4 \cdot 10^5$ ($4,8 \cdot 10^5$); $\tau = 1580$ (1433) Min.; $m_3 = 2,5 \cdot 10^9$ ($1,28 \cdot 10^9$) folgt $t_v = 118,5$ (126) Minuten.

Auch calorimetrisch kann gezeigt werden, daß die Wärme exponentiell ansteigt: Bei zunehmenden Werten für τ wächst die Differenz ($Q_H \cdot \tau - \Sigma t$) und proportional die Wärme (A_t). Wir behandeln A_t formal nach Gl. (3), schreiben also A_t und A statt V_t und V und berechnen A . Bei exponentiellem Anstieg ist A konstant. Wir fanden für $\tau = 265$; 313; 422; 526; 626 Min die Werte $A = 0,88$; 0,97; 1,04; 0,98; 0,86 Ws.

Die Ergebnisse sind in Tab. 3 a und 3 b zusammengestellt.

Der Tab. 3 a ist mit $m_2 - m_1$ die Zahl der Zellen von Bäckerhefe zu entnehmen, die in der Zeit der Wärmemessung gebildet wurden. Es sind $1,06 \cdot 10^{12}$ Zellen pro Mol vergorener Glucose, und ihr Gewicht beträgt (s. o.)

$$0,14 \cdot \frac{1,06 \cdot 10^{12} \cdot 10^{-3}}{10^6} = 148 \text{ g}$$

mit 42,7 g Trockensubstanz.

Der Tab. 3 b ist die Zahl der roten Zellen zu entnehmen, die in der Zeit der Wärmemessung gebil-

det wurden. Es sind $33,3 \cdot 10^{12}$ Zellen pro Mol veratmeter Glucose, und ihr Gewicht beträgt

$$7 \cdot \frac{33,3 \cdot 10^{12} \cdot 10^{-3}}{1,7 \cdot 10^8} = 1370 \text{ g}$$

mit 507 g Trockensubstanz.

Ergebnisse mit ruhenden Zellen

Das Calorimetergefäß enthält 20 mg 3-proz. Glucose und ist in das thermische Gleichgewicht gebracht. Dann wird 1 ml Hefesuspension in Wasser von 28° eingblasen, und mit 0,7 ml Wasser wird nachgespült. Wenn das Verhältnis von Heizzeit und Laufzeit konstant geworden ist, beginnt die Meßperiode.

Der Glucoseverbrauch folgt aus der Einwaage von Hefe und aus den oben angegebenen Daten für den Stoffwechsel. Bei der Atmung von Bäckerhefe (Versuche E und F in Tab. 4) ist die aerobe Gärung zu berücksichtigen. Wir nehmen an, daß die Gärung aerob ebensoviel Wärme bildet wie anaerob (in den Versuchen A und B), korrigieren also um den calorischen Wert der aerob vergorenen Glucose. Beispiel zu Versuch F: Die Atmung von 5 mg Bäckerhefe betrug -485μ l O₂ in 16 900 Sekunden. 25 mg haben in $\tau = 15 600$ Sek., also $\frac{25}{5} \cdot \frac{15600}{16900} \cdot \frac{485}{134,4} = 16,7 \mu$ Mol

Ver-such	Hefe	Menge [mg]	Gas	i [mA]	W [Ω]	Q_H	τ	Σt	A [Ws]	[cal]	cal korr.	Glucose-Verbrauch [μ Mol]	kcal pro Mol Glucose
A	Bäckerhefe	25	AR	9,2	16,0	0,730	7 002	2480	3,58	0,85	—	49,6	17,3
B	Bäckerhefe	25	CO ₂	17,4	16,0	0,724	7 860	5030	3,85	0,92	—	55,5	16,6
C	<i>Rhodotorula</i>	25	N ₂	11,0	16,0	0,630	4 433	2964	-0,34	—	—	—	—
D	<i>Rhodotorula</i>	25	N ₂	10,0	16,0	0,457	5 652	2750	-0,29	—	—	—	—
E	Bäckerhefe	20	Luft	17,5	16,0	0,639	8 280	1070	20,8	4,97	4,85	7,4	655
F	Bäckerhefe	25	Luft	17,4	16,0	0,631	15 600	31	47,7	11,42	11,15	16,7	668

Tab. 4. Gärungs- und Atmungswärme ruhender Hefe. — Wegen „cal korr.“ vgl. Text.

Glucose veratmet. 5 mg von derselben Hefe bildeten aerob 155 μ l CO₂; im Calorimeter wurden also $\frac{25}{5} \cdot \frac{15600}{16900} \cdot \frac{155}{44,8} = 16,0 \mu$ Mol Glucose vergoren. Da 1 μ Mol bei der Vergärung im Mittel 0,017 cal bildet, folgt für die Atmungswärme über τ $11,42 - 16 \cdot 0,017 = 11,15$ cal und daraus $\frac{11,15}{16,7} \cdot 10^3 = 668$ kcal/Mol Glucose.

Besprechung der Ergebnisse

Mit *Rhodotorula* unter Sauerstoffausschluß wurde keine Wärme gefunden. Dieser Befund steht in Einklang mit der minimalen Gärung und der fehlenden Glucose-Assimilation in Stickstoff.

Für die anaerobe Gärung der Bäckerhefe fanden wir im Mittel $\Delta H = -17,0$ kcal pro Mol verbrauchter Glucose. Aus den für Standardbedingungen geltenden Bildungswärmen der Reaktionspartner errechnet sich $\Delta H^0 = -16,94$ kcal⁸. Wieweit unser Wert wegen der Abweichung von den Standardbedingungen zu kristallisieren ist, wäre zu prüfen. 1933 gaben COON und DANIELS $-23,5$ kcal/Mol für die Gärung an⁹.

Für die Atmung ruhender Bäckerhefe fanden wir im Mittel $\Delta H = -662$ kcal pro Mol verbrauchter Glucose. Die Verbrennungswärme des Zuckers ist mit $\Delta H = -673$ kcal/Mol bekannt.

Für die anaerobe Vermehrung von Bäckerhefe fanden wir im Mittel $\Delta H = -19,7$ kcal pro Mol vergorener Glucose, einen etwas höheren Wert als für die anaerobe Gärung ruhender Zellen.

Nun geht die anaerobe Vermehrung in Hefekochsaft nach WHITE und MUNNS¹⁰ quantitativ auf ein „oxidized pigment or enzyme system“ zurück, das

durch Ergosterol und ungesättigte Fettsäuren ergänzt werden kann¹¹. Wenn dieses System chemisch bekannt ist, kann sein Beitrag zur Gesamtwärme neben dem energetischen Anteil von Gärung und Assimilation in Betracht gezogen werden.

Aus Tab. 3 a errechnet sich, daß mit der Vergärung von 1 Mol Glucose (19,7 kcal) während exponentieller Vermehrung Zellen mit 42,7 g Trockensubstanz gebildet werden. 1 g Substanz entspricht also 461 Kalorien.

Dieser Wert kann mit der Ausbeute an *Streptococcus lactis* verglichen werden, die BOIVINET¹² anaerob in Nährlösung mit begrenzender Menge Glucose erhielt: 1 g Trockensubstanz entsprach 1410 Kalorien. Man darf vermuten, daß dieser calorische Wert kleiner wäre, wenn der Autor über eine Strecke streng exponentiellen Verlaufs gemessen hätte.

Für die aerobe Vermehrung von roter Hefe fanden wir Wärme im Betrag von -128 kcal pro Mol veratmeter Glucose. Dieser Wert ermöglicht eine Schätzung nach

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0. \quad (5)$$

Man setzt $\Delta H \approx \Delta H^0 \approx -128$ kcal und nimmt an, daß die Entropie-Änderung des Vorgangs nahe bei Null liegt oder doch vernachlässigt werden darf. Dann ist $\Delta G^0 \approx \Delta H^0$.

Da der Vorgang mit der exergonischen Glucoseverbrennung ($\Delta G^0 = -690$ kcal) zusammenhängt, könnte er formal als deren Koppelung mit einer einzigen endergonischen Reaktion behandelt werden. Die Änderung der freien Energie in dieser Reaktion wäre dann $\Delta G = 690 - 128 = +562$ Kilogrammkalorien.

⁸ H. NETTER, Theoretische Biochemie, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959, S. 435.

⁹ E. D. COON and F. DANIELS, J. physic. Chem. **37**, 1 [1933].

¹⁰ J. WHITE and D. J. MUNNS, Wallerstein Lab. Comm. **14**, 199 [1951].

¹¹ A. A. ANDREASEN and T. J. B. STIER, J. cellular an comparat. Physiol. **41**, 23 [1953].

¹² P. BOIVINET, Diss. Aix-Marseille, 1964.

In Wirklichkeit handelt es sich aber nicht um eine einzige Reaktion, vielmehr um einen komplexen Vorgang. Er besteht darin, daß während der Verbrennung (-128 kcal) von 180 g Glucose für die Bildung von 1370 g lebendiger Zellsubstanz (s. o.) aus Nährstoff chemische und physikalische Arbeit geleistet wird. Dies bedeutet, daß 1 g Trockensub-

stanz 252 cal entspricht. Dieser Wert ist mit 1 g pro 461 cal Gärungswärme bei anaerober Vermehrung von Bäckerhefe zu vergleichen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft haben wir für die Förderung dieser Arbeit sehr zu danken.

Preparation and Fungicidal Properties of Some Arylthioalkanoyl- and (Arylsulphonyl)-aceto-hydroxamic Acids

S. M. A. D. ZAYED, I. Y. MOSTAFA, and M. FARGHALY

National Research Centre, Dokki, Cairo, and Department of Biology, Atomic Energy Establishment, U.A.R.

(Z. Naturforschg. **21 b**, 180—182 [1966]; eingegangen am 18. Oktober 1965)

Some (phenylthio)- and (phenylsulphonyl)aceto-hydroxamic acids which are substituted in the *para*-position of the benzene ring, as well as α - and β -(phenylthio)propionyl hydroxamic acids have been synthesized. The compounds were tested for their fungicidal activity against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium sp.* The (phenylthio)aceto-hydroxamic acids investigated were found to possess fungicidal properties. Whereas the fungicidal activity of α -(phenylthio) propionyl hydroxamic acid was comparable with that of (phenylthio)aceto-hydroxamic acid, the β -(phenylthio) propionyl hydroxamic acid was found to be biologically inactive. On the other hand, the corresponding phenylsulphonyl compounds did not show any fungitoxic activity, and some of them, unexpectedly and strikingly, led to promotion of mycelial growth of the fungi tested.

The fungicidal activity of (phenylthio)aceto-hydroxamic acids has been recently demonstrated by ZAYED et al.¹ (4,5-Dimethoxy-2-nitrophenylthio)-(I_a) and (2,5-dimethoxy-4-nitrophenylthio)aceto-hydroxamic acid (I_b) were found to possess significant fungicidal properties against the phytopathogenic mould *Rhizoctonia solani*. The inhibition of the mycelial growth was obviously due to the hydroxamic acid group, as the corresponding carboxylic acids were inactive. It seemed, therefore, of interest to extend this work and investigate the effect of chemical structure on the biological activity of arylthioalkanoyl hydroxamic acids. These compounds would be expected to possess significant fungitoxic effects, since the parent arylthioalkanoic acids are known to inhibit the mycelial growth of several fungi^{2, 3}.

In the present work, a number of *p*-substituted (phenylthio)- (II_{a-e}) and (phenylsulphonyl)aceto-hydroxamic acids (II_{f-j}), as well as α -(III) and β -(phenylthio)propionyl hydroxamic acids (IV)

have been prepared. These compounds were investigated for their effect on the mycelial growth of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium sp.* The *p*-substituents in the benzene ring were chlorine, bromine, methyl and methoxyl groups.

Experimental

The hydroxamic acids were prepared from the corresponding methyl esters of (arylthio)acetic acids by the action of alkaline hydroxylamine in methanol at 40 °C¹. They are colourless crystalline substances, easily soluble in alcohol and in dilute sodium hydroxide solution. Their aqueous or alcoholic solutions give an intense violet colour with ferric chloride solution and a bright green ppt. with copper acetate solution in acetic acid. The properties and analytical data of the hydroxamic acids are listed in Table I. All compounds were tested in concentrations of 10⁻³, 10⁻⁴ and 10⁻⁵ M. The biological tests were carried out as described by ZAYED et al.¹. Compounds II_{a-e} and II_{g-h} were tested as their potassium salts, after, being recrystallised from 90% methanol. The other compounds were investigated as the free acids, which possessed considerable solubility in water.

¹ S. M. A. D. ZAYED, A. F. ABOULEZZ, A. M. SALAMA and W. S. EL-HAMOULY, J. Pharmacy Pharmacol. **17**, 809 [1965].

² C. H. FAWCETT, D. M. SPENCER and R. L. WAIN, Ann. appl. Biol. **45**, 158 [1957].

³ C. H. FAWCETT, D. M. SPENCER and R. L. WAIN, Ann. appl. Biol. **43**, 553 [1955].