

# Über die Atmung lebender Tabakblätter

Autor(en): **Eichenberger, Elie**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **62 (1952)**

PDF erstellt am: **28.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-43609>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Über die Atmung lebender Tabakblätter

Von *Elie Eichenberger*

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der ETH in Zürich)

Eingegangen am 14. November 1951

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung . . . . .	123
I. Problemstellung . . . . .	123
II. Die verschiedenen Blatttypen . . . . .	124
III. Methodik . . . . .	125
B. Allgemeine Charakterisierung der Atmung . . . . .	126
I. Sauerstoffaufnahme und respiratorischer Quotient . . . . .	126
1. Die Sauerstoffaufnahme . . . . .	126
2. pH-Abhängigkeit der O <sub>2</sub> -Aufnahme . . . . .	126
3. Temperaturabhängigkeit der O <sub>2</sub> -Aufnahme . . . . .	127
4. Der respiratorische Quotient (CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> ) . . . . .	127
5. pH-Abhängigkeit des respiratorischen Quotienten . . . . .	128
6. R. Q.-Werte während der Nacht . . . . .	129
II. Die Hemmung der Schwermetallfermente . . . . .	130
III. Der Trikarboxylsäurezyklus . . . . .	132
1. Die Veratmung von Glukose und organischen Säuren . . . . .	132
2. Die Hemmung der Atmung mit Natriumfluorid . . . . .	133
3. Die Vergiftung mit Malonsäure . . . . .	135
C. Die Terminaloxydasen . . . . .	136
I. Übersicht . . . . .	136
II. Die Peroxydase . . . . .	139
III. Die Polyphenoloxydase . . . . .	141
1. Nachweis der Polyphenoloxydase . . . . .	141
2. Die Verteilung der Polyphenoloxydase auf die verschiedenen Blatttypen . . . . .	141
3. Die Wirkung der spezifischen Polyphenoloxydasengifte . . . . .	146
4. Die Bedeutung der Polyphenoloxydase . . . . .	150
IV. Cytochromoxydase . . . . .	152
V. Die Ascorbinsäureoxydase . . . . .	154
VI. Die Milchsäure- und Glykolsäureoxydase . . . . .	156
D. Diskussion . . . . .	158
E. Zusammenfassung . . . . .	161
F. Literaturnachweis . . . . .	162

## A. Einleitung

### I. Problemstellung

Im Laufe der letzten Jahre ist eine bedeutende Zahl von Arbeiten über Atmung und Abbau der Kohlenhydrate in höheren Pflanzen veröffentlicht worden. Unsere Kenntnisse über Substrat und Enzyme, die

in den Dissimilationsvorgang einbezogen werden, sind so weit fortgeschritten, daß wir uns heute ein allgemeines Schema über den Atmungs-  
vorgang in höheren Pflanzen zurechtlegen können (James, 1946; Sumner und Somers, 1947; Lardy, 1950; Bonner, 1950).

Eine Untersuchung des Stoffwechsels der Kohlenhydrate und der Terminaloxydasen des Tabakblattes bietet insofern ein besonderes Interesse, als der Tabak eine an organischen Säuren besonders reiche Pflanze ist und ein Verständnis des Stoffwechsels im lebenden Blatt den Ausgangspunkt gibt für eine Untersuchung der Tabakfermentation.

## II. Die verschiedenen Blattyphen

*Material:* Als Untersuchungspflanze wurde die Sorte *Nicotiana Tabacum* Mt-Calme brun verwendet, die genetisch einheitliches Material liefert. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus oder im Freiland gezogen.

Morphologisch durchlaufen die Tabakblätter verschiedene Entwicklungsstadien. Der Vergleich der verschiedenen Blattyphen zeigt, daß parallel zur morphologischen Veränderung verschiedene physiologische Zustandsänderungen ablaufen.

Blätter junger Tabakpflanzen fallen durch ihre ausgesprochene Zartheit auf. Sie sind dünn, hellgrün und unbehaart; sie werden durch mechanische Einwirkung sehr leicht geschädigt. Sie sind hier — im Gegensatz zu den später ausgebildeten Blättern — als *Jugendblätter* bezeichnet. Wachsen die Pflanzen unter günstigen Bedingungen, so werden die neu entstehenden Blätter — im Gegensatz zu den ersten Blättern — dunkelgrün, dicker und stark behaart. Sezernierende Drüsenhaare verleihen der Pflanze eine klebrige Oberfläche. Im Gegensatz zu den Jugendblättern besitzen sie ein ausgesprochenes Wachstumsvermögen und liefern die großen Tabakblätter. Durch das Auswachsen verändert sich der ursprüngliche Charakter der Blätter. Sie werden dünner, meistens heller als die jungen Blätter; die Behaarung tritt durch das starke Flächenwachstum bedingt zurück, die Haardrüsen stellen ihre Tätigkeit ein. Wir bezeichnen diese beiden Blattyphen, die mehr oder weniger fließend ineinander übergehen, als *junge und ausgewachsene Altersblätter*. Hat das Blatt ein gewisses Alter erreicht, so setzt der Chlorophyllabbau ein, das Blatt vergilbt. Den Übergang zwischen den ausgewachsenen und vergilbten Blättern bilden die reifen Blätter.

Wir können somit in der Entwicklung der Tabakpflanze vier voneinander morphologisch verschiedene Blattyphen unterscheiden: die Jugendblätter (bei ganz jungen Pflanzen), die jungen und die ausgewachsenen Altersblätter und die vergilbenden Blätter (und als Übergangsstadium die reifen Blätter).

Diese Stadien lassen sich an Freilandtabak besonders schön beobachten; sie sind auch an Gewächshaubtabak sichtbar, erscheinen



jedoch bei solchen Pflanzen weniger scharf ausgeprägt. Besonders im Winter, wenn das Wachstum stagniert, verharren die Blätter von Gewächshauspflanzen im Jugendblattstadium, und es kommt nicht zur Bildung von typischen Altersblättern; erst gegen das Frühjahr hin wurde die Bildung von Altersblättern beobachtet.

Die Beziehung zwischen Polyphenoloxydaseaktivität und Blatttypus wurde einer besonderen Untersuchung unterzogen. Es ergab sich, daß die Aktivität des Fermentes eng an den Entwicklungszustand des Blattes gebunden ist. Sehr wahrscheinlich besteht auch für andere Fermente eine Beziehung zwischen Fermentaktivität und Blattzustand. Verschiedene Beobachtungen weisen in dieser Richtung, besonders die Veränderung des R. Q. unter verschiedenen pH-Bedingungen.

### III. Methodik

Die Untersuchung beschränkt sich auf die manometrische Messung des Gasstoffwechsels von Geweben und Homogenaten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Die Messungen wurden mit einer Warburgapparatur nach dem Prinzip des konstanten Volumens durchgeführt. Die Versuchstemperatur war 25° oder 30° C. Die Messungen wurden nach Erreichung des Temperaturgleichgewichtes nach 15 Minuten Vorlauf begonnen. Die Reaktionsgefäße besaßen ein Volumen von 20 bis 30 cm<sup>3</sup>. In die Einsätze wurde 0,5 cm<sup>3</sup> 20prozentige KOH gegeben und bei Blausäurevergiftung 0,5 cm<sup>3</sup> 3*n* KCN sowie Filterpapier zur Erhöhung der Kohlensäureabsorption. Bei der eingehaltenen Schüttelfrequenz von 180 Umdrehungen pro Minute (1 cm Weg) wirkte sich die Sauerstoffdiffusion nicht als begrenzender Faktor aus. Die Bestimmungen des R. Q. wurden bei pH 4,5 nach der direkten Methode (Umbreit et al., 1950) ohne KOH durchgeführt. Bei größeren pH-Werten als 4,5 wurde für die Kohlensäureretention durch den Puffer eine Korrektur angebracht (nach M. J. Johnson, siehe Umbreit et al., 1950), oder die CO<sub>2</sub>-Werte wurden nach der Zugabe von Salzsäure bestimmt. Die Abweichungen zwischen zwei Parallelmessungen lagen im allgemeinen unter 5 % der umgesetzten Gasmengen. Bei Hemmversuchen, die sehr kleine Werte ergaben, waren die Fehler zum Teil etwas größer. Die angegebenen Werte geben das Mittel von zwei Parallelmessungen wieder. Wo die gleichzeitige Durchführung von zwei Messungen nicht möglich war, wurden die Ergebnisse durch weitere Versuche gesichert.

Als Aufschlämmedium wurden Phosphatpuffer M 5 verwendet. Die Homogenate wurden im Blendor mit Phosphatpuffern zubereitet (meistens 30 g Blätter auf 60 cm<sup>3</sup> Puffer und je nach Bedürfnis verdünnt). Außer den Homogenaten wurden auch Saftzentrifugate verwendet, die mit einer Saftzentrifuge hergestellt wurden, womit die Möglichkeit



gegeben war, unverdünnten Pflanzensaft zu verwenden. In einzelnen Fällen wurden Preßsäfte von gefrorenen und wieder aufgetauten Blättern untersucht (siehe unter Ascorbinsäureoxydase).

Für die Versuche wurden Blattstreiflein von zirka 1 mm Breite und 5 mm Länge verwendet unter Ausschluß der Hauptrippe. Wie Vorversuche ergeben haben, beeinflußt die Blattgröße wohl die Atmungsintensität ziemlich stark, aber der Charakter der Atmung bleibt bei kleinen oder größeren Blattstücklein derselbe, da die respiratorischen Quotienten bei verschiedener Blattgröße nicht wesentlich voneinander abweichen. Die Blattschnitzel wurden im Puffer unter Vakuum infiltriert, um das Eindringen der zugegebenen Stoffe zu erleichtern. Die Atmung wurde durch diese Behandlung nicht beeinflußt. Wie sich später zeigen wird, spielt der physiologische Zustand der Blätter für Intensität und Art der Atmung eine wichtige Rolle, so daß Vergleiche nur unter gleichwertigen Geweben durchgeführt werden können. Soweit möglich, wurden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Blatttypen berücksichtigt. (Siehe speziell die Kapitel über die Atmung und die Polyphenoloxydase.)

Die Messungen wurden alle im Dunkeln durchgeführt.

## **B. Allgemeine Charakterisierung der Atmung**

### **I. Sauerstoffaufnahme und respiratorischer Quotient**

#### **1. Die Sauerstoffaufnahme**

Die Atmungsintensität verschiedener Blatttypen ist, auf das Frischgewicht bezogen, verschieden groß. Während sie bei ganz jungen Pflanzen recht gering ist, erreicht sie bei jungen Altersblättern ein Maximum. Mit zunehmendem Blattalter klingen die Werte ab (siehe Tabelle 5 mit den Zusammenstellungen der R. Q.-Werte von verschiedenen Blatttypen).

Im allgemeinen ist die Atmung der Blattstreifen über mehrere Stunden konstant, besonders bei ausgewachsenen Altersblättern und Gewächshauspflanzen. Hingegen klingt die  $O_2$ -Aufnahme von jungen Altersblättern innerhalb von zwei bis drei Stunden meistens mehr oder weniger stark ab. Mit zunehmendem Alter der Blätter wird die Atmung stabiler. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Abnahme der Atmungsintensität mit einem Verbrauch des normalen Atmungssubstrates zusammenhängt, da gleichzeitig der R. Q. mehr oder weniger stark sinkt.

#### **2. pH-Abhängigkeit der $O_2$ -Aufnahme**

Bei der Verwendung von Phosphatpuffern wird die  $O_2$ -Aufnahme vom pH nur wenig beeinflußt (Tabelle 1). In einzelnen Fällen kann zwar eine gewisse Steigerung der  $O_2$ -Aufnahme im neutralen Bereich

beobachtet werden, die aber nicht sehr ausgeprägt ist und 10 % gegenüber den Werten um pH 4,5 kaum überschreitet.

Tabelle 1  
Beziehung pH-O<sub>2</sub>-Aufnahme  
O<sub>2</sub>-Aufnahme pro mm<sup>3</sup> in 1 Std. 200 mg Frischgewicht, junge Altersblätter  
Phosphatpuffer. 25°

pH-Werte	Phosphatpuffer					
	aq. dest.	4,4	5,5	6,4	7,0	8,0
O <sub>2</sub> -Aufnahme ...	79,6	73,7	75,0	74,3	74,1	75,5

### 3. Temperaturabhängigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme

Wird die Atmungsintensität junger Altersblätter bei steigenden Temperaturen gemessen, so ergibt eine Steigerung um 5° im Bereich von 25° bis 35° eine Förderung der O<sub>2</sub>-Aufnahme um rund 10 %. Zwischen 35° und 40° wird die O<sub>2</sub>-Aufnahme sprunghaft um rund 60 % erhöht. Eine weitere Erhöhung der Temperatur um 5° auf 45° fördert die Aufnahme des Sauerstoffes gegenüber dem Werte bei 40° um 15,8 %. Wenn auch die Atmung über 40° nicht weiter untersucht worden ist, so ist doch anzunehmen, daß der Sprung im Bereich von 40° durch wesentliche Veränderungen des Stoffwechsels hervorgerufen wird, die nicht durch eine allgemeine Steigerung der chemischen Reaktionen zufolge der Temperaturerhöhung erklärt werden können. Wahrscheinlich setzen Vorgänge ein, die für die Tabakfermentation charakteristisch sind und möglicherweise auf einer Veränderung der Aktivität der verschiedenen Fermentgruppen beruhen, so daß sich das Bild der Atmungsvorgänge grundlegend verändert (Tabelle 2).

Tabelle 2  
Temperaturabhängigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme  
O<sub>2</sub>-Aufnahme in 1/2 Std. 200 mg Blattstreifen von jungen Altersblättern  
Phosphatpuffer pH 6,5

Temperatur	25°	30°	35°	40°	45°
mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> in der ersten 1/4 Std.	27,4	29,6	31,3	52,4	59,7
in der zweiten 1/4 Std. ....	23,8	28,0	31,5	48,3	58,0
Total in 1/2 Std.	51,2	57,6	62,8	100,7	117,7

### 4. Der respiratorische Quotient (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>)

Bilden die Kohlenhydrate das hauptsächlichste Atmungssubstrat, so liegt der R. Q. nahe bei 1 (z. B. Klee [Steinmann, 1950], Rübenwurzeln [Weeks and Robertson, 1950], Spinatblätter [Bonner und Wildman, 1946], Gerstenwurzeln [Laties, 1949]).



Die Messungen des R. Q. von Tabakblattstreifen wurden in Phosphatpuffer mit pH 4,5 durchgeführt, um die CO<sub>2</sub>-Retention zu verhindern. In einzelnen Fällen wurde, um eventuell gebundenes CO<sub>2</sub> freizusetzen, Salzsäure zugesetzt.

Bei einem pH von 4,5 liegt der R. Q. von frischen Tabakblättern, ob es sich um junge wachsende oder schon ausgewachsene Blätter handelt, über 1, meistens zwischen 1,15 und 1,35 (Tabelle 3).

In einzelnen Fällen wurden Werte bestimmt, die bedeutend höher lagen, so zum Beispiel an jungen im Freiland gezogenen Pflanzen (im Rosettenstadium, pro Pflanze 5—7 Blätter, die nicht über 8 cm groß sind), wo der R. Q. 1,67 erreichte (drei Parallelmessungen, Dauer 1/2 Stunde).

Tabelle 3  
R. Q. von Tabakblättern

Material	Temperatur	Respiratorischer Quotient
Größere Gewächshauspflanzen .	30°	1,23; 1,22; 1,22
Junge Gewächshauspflanzen ..	30°	1,28; 1,35; 1,34
Freilandpflanzen .....		siehe Tabelle 5
<i>Zum Vergleich:</i>		
Spinatblätter .....	30°	1,01; 1,00; 0,98
Kleeblätter .....	25°	0,92; 0,96

### 5. pH-Abhängigkeit des respiratorischen Quotienten

Werden Messungen des R. Q. von Gewächshausstabakblättern bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, so kann beobachtet werden, daß der R. Q. pH-abhängig ist. Die Werte wurden durch HCl-Zugaben und nach der Methode von Johnson bestimmt. Bei der Methode von Johnson (siehe L a r d y , 1950) wird die CO<sub>2</sub>-Retention in die Gefäßkonstanten miteinbezogen. Wenn die Werte, die auf diese Weise bestimmt werden, von den Bestimmungen mit HCl abweichen, so hängt dies mit der Veränderung des pH während des Versuches zusammen, die in den hier angeführten Versuchen nicht direkt gemessen wurde. Die Messungen nach J o h n s o n werden mehr zur qualitativen Bestätigung der Veränderungen angeführt, die mit der Säuremethode bestimmt werden (Tabelle 4).

Tabelle 4

pH-Abhängigkeit des R. Q. von Blättern von Gewächshausstabak  
Zwei weitere Bestimmungen bei pH 7,0 ergeben nach der Säuremethode einen R. Q. 0,65 und nach J o h n s o n 0,75. Versuchsdauer 2 1/2 Std. 30°

4,4			7,2 nach Johnson			7,2 HCl-Zusatz		
R Q	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
1,33	123,0	164,0	0,84	142,3	120,0	0,68	142,3	97,0



Ein Vergleich der verschiedenen Blattyphen zeigt aber, daß diese pH-Abhängigkeit des R. Q. nur für Jugendblätter gilt, d. h. also für Blätter ganz junger Pflanzen oder von solchen, die im Winter im Gewächshaus gezogen werden. Die R. Q. von jungen und ausgewachsenen Altersblättern liefern die gleichen Werte für die beiden geprüften pH-Bereiche (Tabelle 5).

Tabelle 5

Vergleich der R. Q. verschiedener Blattyphen

Gasstoffwechsel in 1 Stunde bei 25°. Altersblätter 200 mg, Jugendblätter 400 mg

	pH 4,5			pH 7,0 HCl			pH 7,0 Johnson		
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.
<i>Jugendblätter</i>									
Ca. 1 Monat alte Pflänzchen, 400 mg	39,2	50,7	1,30	34,4	29,1	0,84	34,0	25,7	0,76
<i>Altersblätter</i>									
Junge A.-Bl., 200 mg .....	132,8	164,0	1,24	136,0	172,7	1,27	119,0	141,0	1,19
Ausgewachsene A.-Bl., 200 mg .....	76,0	97,5	1,28	97,9	126,6	1,29	91,0	121,9	1,34

Eine ähnliche Abhängigkeit des R. Q. vom pH wurde auch an anderen Pflanzen beobachtet (Avenakoleoptilen [B o n n e r , 1936] und Spinatblätter [B o n n e r und W i l d m a n , 1946]).

Wenn auch die Erscheinung vorderhand nicht gedeutet werden kann, so ist sie doch dadurch bemerkenswert, daß sie auf eine Verschiedenheit im Stoffwechsel von Jugend- und Altersblättern hinweist und vermuten läßt, daß die verschiedenen Blattyphen durch verschiedene enzymatische Vorgänge charakterisiert sind. Tatsächlich läßt sich eine solche Verschiedenheit am Beispiel der Polyphenoloxydase nachweisen, wie aus den späteren Darlegungen hervorgehen wird, allerdings ohne daß sie mit dem hier beschriebenen Phänomen in Zusammenhang gebracht werden könnte.

#### 6. R. Q.-Werte während der Nacht

Die relativ großen Werte für den R. Q. während des Tages lassen die Frage aufwerfen, ob vielleicht im Tabakblatt ein Tagesrhythmus im Säurestoffwechsel besteht, in ähnlicher Weise, wie er von den Sukkulenteu bekannt ist (T h i m a n n und B o n n e r , 1950). Tagesschwankungen im Säuregehalt der Tabakblätter sind unseres Wissens bisher nicht beschrieben worden, ebensowenig konnte bei den Messungen des R. Q. während des Tages ein wesentlicher Unterschied zwischen den Messungen am Vormittag und Nachmittag nachgewiesen werden. In

einer einzelnen Nachtmessung (fünf Parallelversuche) wurde ein R. Q. von 1,13 festgestellt (Tabelle 6).

Tabelle 6

R. Q. bei Nacht (Blätter um 0.00 Uhr gepflückt, Messung von 2.15—4.15 Uhr)

Altersblätter: O <sub>2</sub> -Aufnahme in 2 Std. pH 4,5 Säuremethode					
Junge (3 Messungen)			Ausgewachsene (2 Messungen)		
O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.
190,1	214,8	1,13	101,3	114,8	1,13

Vergleiche mit Tabelle 5.

Eine kleine Senkung gegenüber den Tageswerten kann also beobachtet werden, doch ist sie nur gering (vgl. Tabellen 3 und 5). Es ist daher anzunehmen, daß der Tabak trotz seines großen Gehaltes an organischen Säuren physiologisch nicht in die Gruppe der Sukkulente eingereiht werden kann.

## II. Die Hemmung der Schwermetallfermente

Der Hauptteil der Atmung von Tieren und Pflanzen wird durch Schwermetallfermente katalysiert, die HCN-, azid- und im Dunkeln CO-hemmbar sind. Die Atmung kann daher durch diese Gifte mehr oder weniger blockiert werden.

Zwischen 70 und 90 % der Atmung der Tabakblätter lassen sich durch NaN<sub>3</sub> und HCN 10<sup>-2</sup> M hemmen (Tabellen 7 und 8).

Tabelle 7

Hemmung verschiedener Tabakblatttypen durch NaN<sub>3</sub> 10<sup>-2</sup> M. pH 4,5. O<sub>2</sub>-Aufnahme in 1 Std.

	Ganz junge Jugendblätter		Junge Altersblätter		Ausgewachsene Altersblätter	
	400 mg		200 mg		200 mg	
Kontrolle .....	25,2	100 %	76,1	100 %	60,7	100 %
Na-Azid .....	3,3	13,1 %	22,3	29,1 %	9,6	15,8 %

Tabelle 8

Hemmung verschiedener Tabakblatttypen durch HCN 10<sup>-2</sup> M. pH 6,7. O<sub>2</sub>-Aufnahme in 2 Std.

	Ganz junge Jugendblätter		Junge Altersblätter		Ausgewachsene Altersblätter	
	400 mg		200 mg		200 mg	
Kontrolle .....	41,4	100 %	202,0	100 %	130,7	100 %
HCN .....	8,2	19,8 %	25,9	11,8 %	25,7	19,7 %



Wichtig ist die Feststellung, daß zwar gewisse Unterschiede in der Hemmbarkeit der verschiedenen Blattstadien gegenüber HCN und Natriumazid vorhanden sind, daß sie aber innerhalb enger Grenzen liegen. Daraus kann geschlossen werden, daß wohl gewisse Differenzen im Atmungsmechanismus verschieden alter Tabakblätter bestehen, daß sie aber bei weitem nicht so tiefgreifender Art sind, wie dies zum Beispiel bei Rübenblättern beobachtet worden ist, wo die Atmung ausgewachsener Blätter im Gegensatz zu den jungen mit Schwermetallfermentgiften nicht gehemmt werden konnte (Marsh und Goddard, 1939).

Aus den Versuchen geht hervor, daß HCN und Natriumazid sich in ihrer Wirkung nicht decken. Werden junge Altersblätter mit Natriumazid vergiftet, so wird das Aufschlammmedium gebräunt, und die Blattstreifen bekommen einen mehr oder weniger dunklen Saum. Dieselbe Reaktion, nur stärker, zeigen die Gewebe bei der Zugabe von Katechol. Bei Geweben, die keine Reaktion auf Polyphenoloxydase ergeben, kann diese Erscheinung nicht beobachtet werden. Bei der Vergiftung mit Blausäure treten keine Pigmentbildungen auf.

Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß durch das Natriumazid die Tätigkeit der Polyphenoloxydase nicht ganz gehemmt wird, so daß die Pigmentbildung, eine für dieses Ferment so charakteristische Reaktion, ablaufen kann. Wird zu Na-Azid-vergifteten Blättern Katechol zugegeben, so ist die Atmungssteigerung im Gegensatz zu HCN-vergifteten tatsächlich nicht unterbunden.

Es ist sehr wohl möglich, daß diese Erscheinung für die unterschiedliche Hemmbarkeit der Atmung von jungen und ausgewachsenen Altersblättern einerseits und für die Differenz der Natriumazid- und HCN-Wirkung auf die Gewebe junger Altersblätter andererseits verantwortlich ist.

Der Unterschied zwischen HCN- und Natriumazidwirkung wird durch die Werte des R. Q. bei der Hemmung mit diesen Giften bestätigt (Tabelle 9). Der R. Q. bei HCN-Vergiftung liegt im Bereich der Kontrollwerte. Da bei den beobachteten Hemmwerten die Ablesungsfehler größer sind als bei anderen Messungen, kann nicht sicher entschieden werden, ob sich der R. Q. mit den Kontrollwerten deckt oder davon abweicht und eher um 1 liegt.

Tabelle 9

Bestimmung des R. Q. der Restatmung von mit Na-Azid und HCN  $10^{-2}$  M vergifteten jungen Altersblättern. pH 5,1. O<sub>2</sub>-Aufnahme in 90 Min.

	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.
Kontrolle ..	119,0	138,5	1,17
Na-Azid ...	35,5	16,1	0,45
HCN .....	19,4	21,2	1,09

Weitere Messungen: Kontrolle 1,18, HCN  $10^{-2}$  M 1,20, Natriumazid  $10^{-2}$  M 0,68 (Dauer 3 Std.).



### III. Der Trikarboxylsäurezyklus

Die Tabakblätter sind sehr reich an organischen Pflanzensäuren. Nach P u c h e r und V i c k e r y (1949) sind bei der Sorte Rosenberg von *Nicotiana Tabaccum* 23,3 % des organischen Trockengewichtes organische Säuren (16,2 % Äpfelsäure, 2,2 % Zitronensäure, 1,4 % Oxalsäure und 3,5 % unbekannte Säuren. Daneben sollen noch geringe Mengen Bernstein- und Fumarsäure vorhanden sein. Ob Brenztrauben-, Oxalessig-, Ketoglutar-, Aconit- und andere verwandte Säuren in nachweisbaren Mengen vorhanden sind, ist bisher nicht abgeklärt worden [siehe P u c h e r und V i c k e r y für die Literaturangaben]).

Wie aus Untersuchungen an isolierten Tabakblättern (P u c h e r und V i c k e r y, 1949) hervorgeht, werden die Säuren, die am Trikarboxylsäurezyklus teilnehmen, von den Blättern aufgenommen und im Stoffwechsel weiter verarbeitet. Es wurde daher untersucht, ob die für den Trikarboxylsäurezyklus charakteristischen Reaktionen bei Tabakblättern erhalten werden.

Nach der Theorie über den Trikarboxylsäurezyklus von K r e b s und J o h n s o n (1937) nimmt die Brenztraubensäure im Abbau der Kohlenhydrate in der Zelle eine zentrale Stellung ein.

#### 1. Die Veratmung von Glukose und organischen Säuren

Frische Tabakblätter zeigen bei einer Zugabe von Glukose und Brenztraubensäure nur eine geringe Steigerung der Atmung, die unter 10 % liegt. Werden die Blätter einige Zeit ausgehungert, so ist die Förderung der Atmung deutlicher (Tabelle 10).

Tabelle 10  
Abgeschnittene Tabakpflanzen 8 Tage im Dunkeln in Wasser eingestellt

Kontrolle .....	61,8	100 %	pH 7,0. O <sub>2</sub> -Aufnahme in 45 Min.
Glukose 10 <sup>-2</sup> .....	82,1	133 %	
Kontrolle .....	46,6	100 %	pH 4,5. O <sub>2</sub> -Aufnahme in 45 Min. 25°
Na-Pyruvat .....			
0,025 M .....	58,7	126 %	
0,05 M .....	63,6	137 %	

Der Zusatz von organischen Säuren zu jungen, frischen Tabakblättern führt im Gegensatz zu Glukose und Pyruvat z. T. zu stärkerer Steigerung der Atmung (Tabelle 11).

Sowohl Zitronensäure als auch Bernsteinsäure wirken auf die O<sub>2</sub>-Aufnahme stimulierend, während Fumarsäure und Äpfelsäure ohne Wirkung sind. Der Ausfall einer Steigerung der Atmung bei Äpfelsäurezusatz ist überraschend, besonders da abgeschnittene Blätter Malat aufnehmen und z. T. in Zitronensäure überführen (P u c h e r und

Tabelle 11

Kontrolle .....		165,0	100 %
Zitronensäure ...	$\frac{1}{100}$ M	196,5	119 %
Äpfelsäure .....	$\frac{1}{100}$ M	165,5	100 %
Kontrolle .....		132,0	100 %
Bernsteinsäure ..	$\frac{1}{100}$ M	189,0	143 %
	$\frac{1}{50}$ M	193,0	146 %
Fumarsäure .....	$\frac{1}{100}$ M	132,5	100 %
	$\frac{1}{50}$ M	128,0	97 %

O<sub>2</sub>-Aufnahme in 2 Std. pH 5,5. Jugendblätter von Gewächshauspflanzen

Vickery 1949). Es mag sein, daß bei der hohen Malatkonzentration in den Geweben (Äpfelsäure ist die wichtigste organische Säure in Tabakblättern) sich die Konzentrationsänderung durch das eingedrungene Malat nicht auf den Stoffwechsel auswirken kann. (Tatsächlich vermag Äpfelsäure die Atmung ausgehungelter Blätter zu fördern.)

Daß die blatteigenen Reserven eine bedeutende Rolle spielen, beweist das Verhalten der jungen Altersblätter von Freilandtabak. In frischen Blättern vermag die Zugabe von organischen Säuren die Atmung nicht zu steigern. In ausgehungerten Blättern hingegen werden die zugegebenen Säuren in den Stoffwechsel aufgenommen (Tabelle 12).

Tabelle 12

Zugabe von organischen Säuren zu jungen Altersblättern  
Blätter 5 Tage im Dunkeln ausgehungert. pH 6,0. O<sub>2</sub>-Aufnahme in 60 Min.

Kontrolle .....		73,4	100 %
Bernsteinsäure ..	$\frac{1}{100}$ M	93,9	128 %
Bernsteinsäure ..	$\frac{1}{50}$ M	91,5	125 %
Zitronensäure ...	$\frac{1}{100}$ M	84,5	115 %
Zitronensäure ...	$\frac{1}{50}$ M	86,2	117 %
Äpfelsäure .....	$\frac{1}{50}$ M	87,5	119 %

## 2. Die Hemmung der Atmung mit Natriumfluorid

Fluoride hemmen die Enolase wie auch die Phosphatasen von Tieren, Hefen und höheren Pflanzen (Latics, 1949). Da die Blockierung der Enolase die Neubildung von Brenztraubensäure verhindert, ist es möglich, die Bedeutung der Brenztraubensäure durch NaF-Vergiftung abzuklären.

Die Atmung der Tabakblätter wird durch NaF stark gehemmt. Die Hemmung ist abhängig von der Einwirkungsdauer des Giftes und erreicht nach drei Stunden bei einer Konzentration von  $\frac{1}{400}$  M NaF 80 bis 90 % (Tabelle 13).

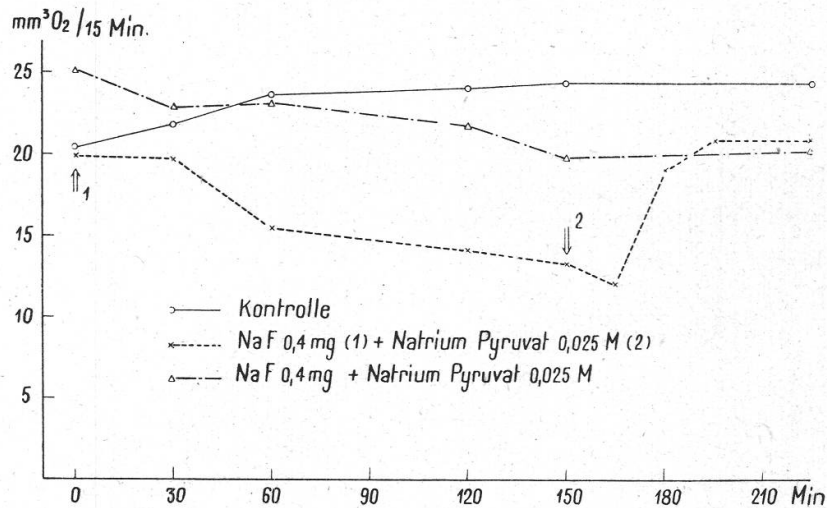


Tabelle 13

Hemmung der O<sub>2</sub>-Aufnahme durch Natriumfluorid. O<sub>2</sub>-Aufnahme während 3 Stunden. pH 4,6. 300 mg Blattstreifen. 30°

Kontrolle	NaF 1/40 M	NaF 1/400 M
158,3 100 %	6,3 4 %	23,3 14,7 %

Bei schwächeren Fluoridkonzentrationen ist die NaF-Vergiftung durch Brenztraubensäurezusatz reversibel. Sowohl die gleichzeitige Zugabe von NaF und Pyruvat wie die Zugabe von Pyruvat nach der Vergiftung führen zu einer Steigerung der Atmung zur Größenordnung der Kontrollwerte. Die Vergiftung beruht in diesem Falle offensichtlich auf einer Blockierung der Enolase (Figur 1).



Figur 1

Wirkung des Natriumpyruvates auf natriumfluoridvergiftete Tabakblattstreifen. Natriumfluorid 1/400 M (0,4 mg/Gefäß). 30°. 300 mg Blattstreifen. Gewächshauspflanzen

Bei höheren Konzentrationen ist die Vergiftung durch eine Natriumpyruvatzugabe nicht mehr reversibel. In diesem Falle wird nicht nur die Enolase, sondern es werden auch die Phosphatasen blockiert (Figur 2).

Tabelle 14

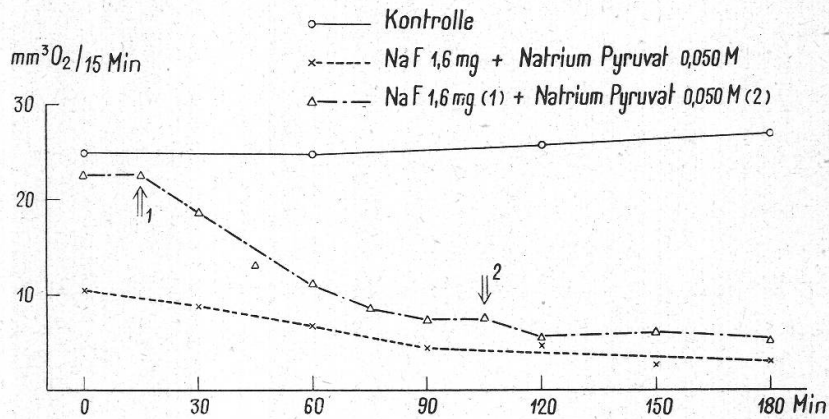
R. Q. bei NaF-Vergiftung und Brenztraubensäurezusatz. pH 4,5

	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.
Kontrolle .....	408,0	507,0	1,24
NaF 0,1 mg/cm <sup>3</sup> .....	220,0	279,0	1,26
NaF 0,1 mg/cm <sup>3</sup> + Brenztraubensäure 0,025 M .	369,0	480,0	1,27

(Eine Diskussion der R. Q.-Veränderungen läßt sich hier nicht durchführen, da zu wenig Messungen vorliegen.)



Daß bei den hier angeführten Versuchen die Atmung als Ganzes blockiert, wieder hergestellt und die zugegebene Brenztraubensäure regelrecht veratmet wird, ergibt sich aus der Messung der respiratorischen Quotienten (Tabelle 14).



Figur 2

Wirkung des Natriumpyruvates auf natriumfluoridvergiftete Tabakblattstreifen. Natriumfluorid  $\frac{1}{100}$  M (1,6 mg/Gefäß). 30°. 300 mg Blattstreifen. Gewächshauspflanzen

### 3. Die Vergiftung mit Malonsäure

Die Malonsäure hemmt die Bernsteinsäuredehydrase kompetitiv, d. h. die Hemmung ist durch Bernsteinsäurezusatz wieder aufhebbar, was auf die strukturelle Verwandtschaft der beiden Verbindungen zurückgeführt wird. Nach P a r d e e und P o t t e r (1949) wird außerdem auch die Oxalessigsäureoxydation blockiert.

Die Malonsäurehemmung ist stark pH-abhängig und gelingt nur im sauren pH-Bereich, während bei neutraler Reaktion keine Hemmung beobachtet werden kann (Tabelle 15).

Tabelle 15

pH-Werte	4,4	5,5	6,8
Kontrolle .....	77,5	71,8	69,5
Malonsäure $\frac{1}{100}$ M ..	36,0	46,2	72,4

O<sub>2</sub>-Aufnahme während einer Stunde. 30°.

Durch Bernsteinsäure wird die Hemmung aufgehoben. Auch Äpfelsäure und Fumarsäure vermindern die Hemmung, es werden aber die Kontrollwerte nicht erreicht (Tabelle 16).





geweben sich aber  $H_2O_2$  im allgemeinen nicht in nachweisbaren Mengen vorfindet, ist nicht eindeutig, ob die Peroxydase unter normalen Bedingungen als Terminaloxydase funktionieren kann. Boswell und Whiting (1940) nehmen an, daß das Enzym mit andern Fermentensystemen gekoppelt ist, die bei den Oxydationsvorgängen  $H_2O_2$  produzieren, wie Ascorbinsäure- und Polyphenoloxydase. Altschul et al. (1948) konnten feststellen, daß während der Keimung von Baumwollsamensamen der Gehalt an Peroxydase stark zunimmt, während der Katalasegehalt abnimmt, so daß dem Ferment wohl eine biologische Bedeutung zukommen muß.

*Die Polyphenoloxydase:* Fermente, die phenolische Substrate zu oxydieren vermögen, sind in höheren Pflanzen weit verbreitet. Das wichtigste Enzym dieser Gruppe ist die Polyphenoloxydase, die auch als Tyrosinase, Kartoffeloxydase, Phenolase oder Katecholoxydase bezeichnet wird. Im angelsächsischen Schrifttum wird im allgemeinen die Bezeichnung Tyrosinase auf Grund von Prioritätserwägungen vorgezogen (Nelson und Dawson, 1944) und weil durch die Bezeichnung als Polyphenoloxydase die Monophenolaseaktivität des Fermentes nicht berücksichtigt wird.

Während im allgemeinen ein Ferment eine relativ hohe Spezifität zeigt, vermag die Tyrosinase eine große Anzahl von verschiedenen Substraten anzugreifen, was sich in der Namengebung des Fermentes auswirkte. (Eine Zusammenstellung der oxydierbaren Substrate findet sich bei Lardy: Respiratory Enzymes, S. 161, 1951.) Neben der Tyrosinase gibt es andere verwandte Fermente, die phenolische Derivate zu oxydieren vermögen. Ihre Verschiedenheit von der Tyrosinase ist jedoch noch nicht in allen Fällen sichergestellt worden.

Da in den vorliegenden Versuchen nur mit Polyphenolen als Substrat gearbeitet wurde, wird die Bezeichnung Polyphenoloxydase beibehalten.

Eine große Zahl von Versuchen im Laufe der letzten Jahre hat die Bedeutung der Polyphenoloxydase stark hervorgehoben. Es wurde angenommen, daß in verschiedenen Pflanzen bis 80 % der Terminaloxydasentätigkeit von der Polyphenoloxydase übernommen werden. Diese Annahme stützt sich auf folgende Argumente:

1. Wird einem Pflanzengewebe, das Polyphenoloxydase enthält (z. B. Kartoffelknollengewebe), Katechol zugegeben, so sinkt die Atmungsintensität nach einer kurzfristigen Förderung unter die Kontrollwerte ab. Boswell und Whiting (1938) beobachteten, daß eine zweite Zugabe von Katechol keine weitere Atmungssteigerung auslöst. Sie nahmen daher an, die Polyphenoloxydase sei vergiftet worden und die restliche Atmung entspreche demjenigen Teil der Atmung, der nicht durch Polyphenoloxydase katalysiert werde. Für Kartoffelknollengewebe ergibt sich eine Hemmung von rund 70 %.



2. Nelson und Baker (1943) lehnten die Interpretation, die Boswell und Whiting ihren Versuchen gaben, ab. Werden zu Kartoffelknollenscheibchen steigende Mengen Katechol zugegeben, so wird nach einer Förderung in allen Fällen eine gleich große Hemmung der Atmung festgestellt, unabhängig von der zugegebenen Katecholmenge. Eine zweite Zugabe von Katechol zeigt aber, daß bei den Geweben mit schwächeren Katecholgaben die Polyphenoloxydase nicht zerstört worden ist. Es besteht somit keine direkte Beziehung zwischen Atmungshemmung und Enzyminaktivierung. Die Autoren kommen aber dennoch zum Schluß, daß ungefähr 70—80 % der Kartoffelterminaloxydasen Polyphenoloxydase sein muß. Die Knollenatmung ist zu 85 % hemmbar mit 4-Nitrokatechol, das als spezifisches Polyphenoloxydasengift angesehen wird. Da die Hemmung mit 4-Nitrokatechol derjenigen mit HCN entspricht, wird angenommen, die Hauptterminaloxydase der Kartoffel sei Polyphenoloxydase.

3. Ein weiteres Argument bringen Bonner und Wildman (1946) vor. *p*-Nitrophenol vermag die Atmung von Spinatblättern zu 80 % zu hemmen. *p*-Nitrophenol soll spezifisch die Polyphenoloxydase hemmen, *o*-Nitrophenol wirkt bedeutend weniger stark. Die Versuche werden in der Weise gedeutet, daß die Polyphenoloxydase in den Spinatblättern die Hauptterminaloxydase darstellt.

4. Bei der Zugabe von Katechol wurde in allen Fällen eine starke Hemmung der Atmung beobachtet und ein Absinken des R. Q., was damit erklärt wird, daß die Oxydationsprodukte des Katechols toxisch sind. Werden natürliche Phenole, wie z. B. Dopa, zugegeben, so ist die hemmende Wirkung viel geringer. Protokatechusäure vermag die Atmung zu fördern unter Beibehaltung des R. Q. von 1 (Baker und Nelson, 1943). Da diese Substanz als H-Überträger wirkt, d. h. die Atmung mehr fördert, als ihrer vollständigen Oxydation entspricht, ist die Möglichkeit der Eingliederung von Polyphenolen in ein biologisches System gegeben; dies ist ein wesentliches Argument zugunsten der Bedeutung der Polyphenoloxydase als Terminaloxydase.

Fassen wir diese Punkte zusammen, so stimmen die verschiedenen Autoren darin überein, daß die Polyphenoloxydase als Terminaloxydase in Frage kommen kann und in einer Anzahl von Pflanzen die Hauptterminaloxydase darstellt.

*Die Cytochromoxydase:* Ausführliche Arbeiten über das Cytochromsystem in Pflanzen sind jungen Datums. Keilin und Hartree (1938) zeigten, daß die Cytochromoxydase mit der Indophenoloxydase identisch ist. Das Cytochrom c wurde zuerst spektroskopisch in Pollen, Zwiebschalen, verschiedenen Samen und Embryonen nachgewiesen (siehe Zusammenstellung bei Goddard, 1944, und Bhagvat und Hill, 1951). Ähnlich wie in tierischen Geweben ist auch in Pflanzen Cytochromoxydase und Bernsteinsäuredehydrase zum Cytochromsystem

vereinigt. (Das System läßt sich sowohl in Blättern, die daran besonders reich sind — wahrscheinlich in den Chloroplasten lokalisiert — wie in andern Pflanzengeweben nachweisen [B h a g v a t und H i l l, 1951].) In den Wurzeln ist das System eng mit der Ionenaufnahme gekoppelt (Diskussion der bisherigen Veröffentlichungen über dieses Problem siehe R o b e r t s o n, 1950).

*Die Ascorbinsäureoxydation:* Ascorbinsäure kann durch verschiedene Oxydasen oxydiert werden. Daneben besteht aber eine spezifische Ascorbinsäureoxydase, ein Kupferprotein. Die Oxydase wurde in einer großen Zahl von Pflanzen nachgewiesen (unter anderem Gersten, Kartoffeln, Rüben, Spinat. Eine ausführliche Liste findet sich in L a r d y, 1950). Die oxydierte Ascorbinsäure kann durch Glutathion reduziert werden, so daß ein Redoxsystem entsteht, welches die Voraussetzung für die Tätigkeit der Terminaloxydase bildet (N e w c o m b, 1951). J a m e s und C r a g g (1943) stellten fest, daß in etiolierten Gerstenkeimlingen Milch-, Glykol- und Weinsäure in Gegenwart von Ascorbinsäure oxydiert werden. Sie nehmen an, daß diese Säuren die Rolle von Wasserstoffdonatoren für das Ascorbinsäuresystem übernehmen. Eine Beziehung zwischen dem Stoffwechsel organischer Säuren und der Ascorbinsäureoxydase wurde bisher nicht an weiteren Pflanzen nachgewiesen, aber N e w c o m b (1951) schreibt der Ascorbinsäureoxydase eine Beteiligung an den Wachstumsprozessen zu. In intensiv wachsenden Geweben kann die Ascorbinsäureoxydase in größeren Konzentrationen nachgewiesen werden als in ruhenden. Bei einer Förderung der Zellstreckung mit Indolylessigsäure nimmt auch der Ascorbinsäureoxydasengehalt zu. Interessant ist die Feststellung, daß die Oxydase vor allem an der Zellperipherie lokalisiert ist. (Diese Tatsache wird in jener Arbeit ausführlich auf ihre mögliche Bedeutung hin diskutiert.)

*Die nicht schwermetallhaltigen Enzyme:* In den meisten Fällen läßt sich die Atmung von Pflanzengeweben durch Natriumazid oder HCN nicht vollkommen hemmen. Es bleibt ein nicht hemmbarer Rest übrig, der verschieden groß sein kann. In einzelnen Fällen ist der nicht hemmbare Betrag sehr groß, oder die Atmung wird durch Natriumazid sogar gefördert (M a r s h und G o d d a r d, 1939; S t e n l i d, 1949).

## II. Die Peroxydase

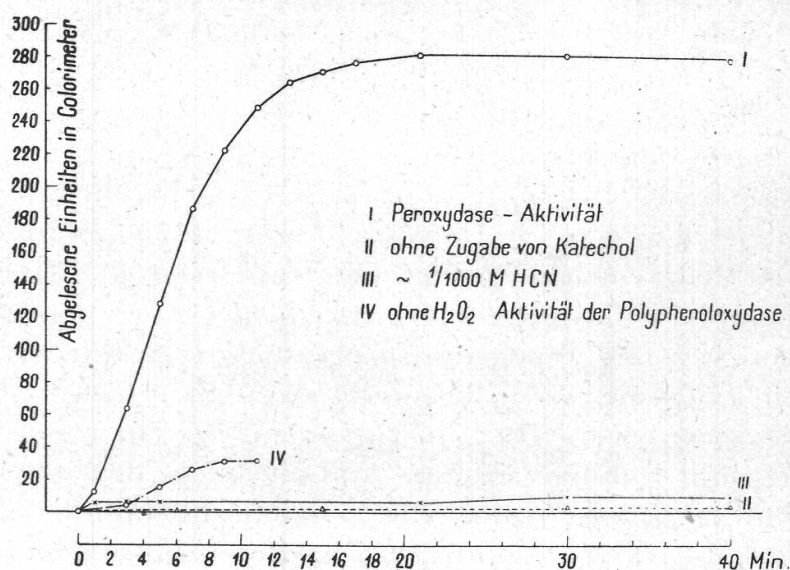
Da die Peroxydase ziemlich temperaturunempfindlich ist und auch durch Kochen nur wenig oder nicht geschädigt wird (S u m n e r und S o m e r s, 1947), wurde vermutet, daß diesem Ferment bei der Fermentation des Tabaks eine große Bedeutung zukommen könnte, da anzunehmen ist, daß die meisten andern Fermente durch den Trocknungsvorgang mehr oder weniger stark geschädigt werden. Tatsächlich wurde auch nachgewiesen, daß bei der Teefermentation die Peroxydase eine ganz wesentliche Rolle spielt (R o b e r t s und S a r m a, 1938).



Im Blatthomogenat läßt sich die Peroxydase mit Hilfe der Benzidinprobe (gesättigte wässrige Benzidinlösung und wenig  $H_2O_2$ ) sehr leicht nachweisen. Die Farbbildung ist natriumazid- und HCN-hemmbar.

Die Peroxydase vermag unter Zugabe von wenig  $H_2O_2$  Ascorbinsäure und Katechol zu oxydieren.

Wird mit einem Homogenat die Benzidinprobe durchgeführt, so tritt die Bildung des blauen Farbstoffes momentan ein. Werden aber dem Homogenat einige Tropfen Ascorbinsäure zugegeben, so verstreicht eine gewisse Zeitspanne bis zur Pigmentbildung. Die Länge dieser Zeitspanne ist abhängig von der zugegebenen Ascorbinsäure. Diese Reaktion läßt sich dadurch erklären, daß zuerst alle Ascorbinsäure oxydiert wird, worauf dann erst die Pigmentbildung stattfinden kann.



Figur 3

Peroxydasenaktivität von Saftzentrifugat von Gewächshauspflanzen. Verdünnung 1 : 60. Katechol 5,5 mg.  $H_2O_2$  zirka 18 mg. 22°. I, III und IV mit Katechol

Die Oxydation des Katechols durch die Peroxydase läßt sich sehr schön kolorimetrisch nachweisen (siehe Figur 3). Im vorliegenden Falle wurde das Homogenat stark verdünnt (1 : 60). Die Aktivität der Polyphenoloxydase wurde dadurch stark vermindert, die Peroxydaseaktivität ist aber sehr intensiv. Durch  $HCN 10^{-3} M$  wird die Peroxydase vollständig blockiert.

Wenn auch in den Tabakblättern eine kräftige Peroxydase vorhanden ist, so scheint ihre biologische Bedeutung sehr fraglich. Eine Funktion als Terminaloxydase im lebenden Tabakblatt wäre nur vorstellbar unter der Voraussetzung, daß genügend  $H_2O_2$  in den Geweben vorhanden ist. Es gelingt aber nicht, im Homogenat auch nur Spuren von  $H_2O_2$  mit der  $KJ + Stärke + FeSO_4$ -Methode, die sehr empfindlich ist, nach-

zuweisen. Dabei wird das negative Resultat der Probe nicht durch irgendwelche Störung durch das Homogenat verursacht, da eine Zugabe von rund 0,05 mg  $H_2O_2$  auf 10 cm<sup>3</sup> Homogenat noch zu einer sehr intensiven Reaktion führt.

Es ist daher recht unwahrscheinlich, daß unter normalen Bedingungen die Peroxydase im lebenden Tabakblatt als Terminaloxydase funktioniert.

### III. Die Polyphenoloxydase

#### 1. Nachweis der Polyphenoloxydase

Wird zu einem Homogenat oder Preßsaft von Tabakblättern Katechol oder Dopa (3,4-dioxy-phenylen-Alanin) zugegeben, so wird das Substrat rasch oxydiert. Nach einer intensiven Steigerung sinkt die  $O_2$ -Aufnahme, bevor alles Substrat oxydiert worden ist. Die entstehenden Chinone werden weiter oxydiert und lagern sich zu schwarzbraunen Pigmenten zusammen. Falls keine Polyphenoloxydase vorhanden ist oder das Enzym vergiftet wurde, unterbleibt die Pigmentbildung. Diese gibt uns daher wie die  $O_2$ -Aufnahme bei der Zugabe des Substrates ein Maß für die Aktivität des Fermentes. Außer bei Jugendblättern tritt die Pigmentbildung in Homogenaten und in gefrorenen Blättern spontan auf.

Durch Kochen von 2 Minuten wird die Aktivität des Fermentes vollständig zerstört. Die Oxydation des Katechols wird durch  $HCN$   $\frac{1}{80}$  M völlig und durch Diäthylthiocarbamat  $\frac{1}{100}$  M weitgehend gehemmt. Die zugegebenen Phenole werden also vorwiegend durch ein Kupferprotein, die Polyphenoloxydase, oxydiert.

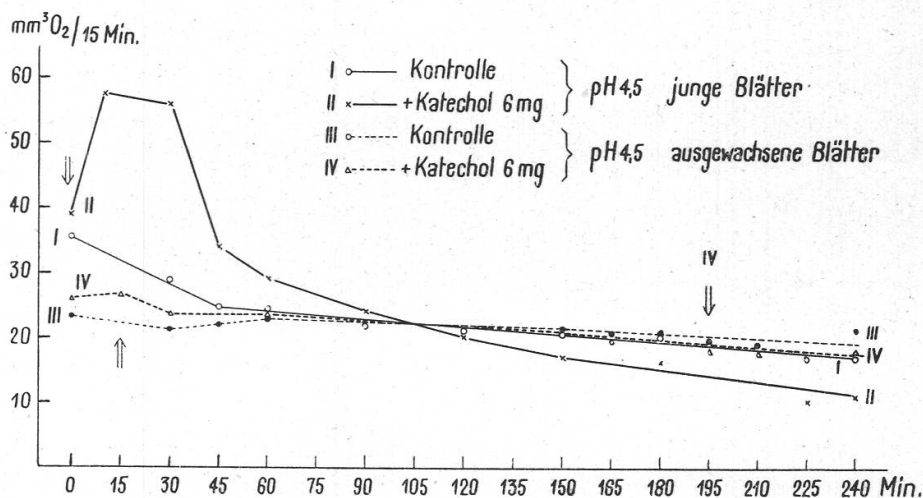
Katechol kann auch als Wasserstoffüberträger wirksam sein und die Oxydation von Substraten katalysieren, die nicht direkt von der Polyphenoloxydase oxydiert werden, wie Hydrochinon und Ascorbinsäure. Dies beweist, daß die Oxydation der zugegebenen Substrate im Tabakhomogenat tatsächlich über die Polyphenoloxydase verläuft und nicht über ein anderes Fermentsystem, das auf indirektem Wege phenolische Körper zu oxydieren vermag.

#### 2. Die Verteilung der Polyphenoloxydase auf die verschiedenen Blattyphen

Die Reaktion von Tabakblattstreifen, d. h. intakten Blattgewebes, ist abhängig vom Entwicklungszustand des Blattes. Um sein Verhalten verstehen zu können, ist es notwendig, sich der eingangs durchgeführten Einteilung der Blätter in verschiedene Entwicklungsstufen zu erinnern. Wir unterscheiden Jugendblätter, junge und ausgewachsene Altersblätter sowie vergilbende Blätter. Morphologisch und physiologisch sind die Blätter von Gewächshauspflanzen im Winter den Jugendblättern zuzuzählen. (Über die Charakterisierung der verschiedenen Blattyphen siehe Einleitung.)



Eng mit diesen verschiedenen Blattkategorien verbunden ist die Reaktion des intakten Gewebes auf Polyphenole. Jugendblatt und ausgewachsenes Altersblatt im Frühsommer, d. h. Juli, reagieren nur schwach oder gar nicht auf zugesetzte Polyphenole. Hingegen wird die Sauerstoffaufnahme von jungen, rasch wachsenden Altersblättern durch Polyphenole mehr oder weniger stark gesteigert. Ähnlich reagieren die vergilbenden Blätter. Diese Parallelität zwischen Blattentwicklung und Reaktion auf Polyphenole ist sowohl bei Freiland- wie Gewächshauspflanzen im Sommer zu beobachten, nur sind die Verhältnisse bei den Gewächshauspflanzen schwieriger zu erkennen, da die verschiedenen Blattstadien nicht immer durchlaufen werden und weniger ausgeprägt



Figur 4

Zusatz von Katechol zu jungen und ausgewachsenen Altersblättern (Frühsommer). Katechol 6 mg. 300 mg Blattstreifen. 25°. Pfeile geben die Zugabe des Substrates an

sind. Da die Gewächshauspflanzen im Winter im Jugendblattstadium verharren, reagieren sie dann kaum auf Katechol.

Die Wirkung von Katechol auf junge und ausgewachsene Blätter von Freilandtabak, d. h. auf junge und ausgewachsene Altersblätter, wie sie im Frühsommer beobachtet wurde, soll Figur 4 veranschaulichen (vgl. die Polyphenolasenreaktion des Homogenates der gleichen Blattpen in Figur 5). Der Gegensatz zwischen jungen und ausgewachsenen Altersblättern ist scharf ausgeprägt. Bei den ausgewachsenen Blättern kann praktisch keine Wirkung des Katechols festgestellt werden.

Im Spätsommer (in unseren Versuchen Ende August, Anfang September) verwischte sich der Unterschied zwischen jungen und älteren Altersblättern. Die Reaktion auf Polyphenoloxydase konnte auch bei größeren Blättern beobachtet werden. Es ist anzunehmen, daß dieser Unterschied zwischen großen Blättern von Freilandpflanzen im Früh-

sommer und solchen im Spätsommer mit den Vorgängen zusammenhängt, die von den Tabakfachleuten als Reifung bezeichnet werden.

Bei den jungen Blättern steigert der Katecholzusatz die O<sub>2</sub>-Aufnahme, der eine Senkung von verschiedener Stärke folgen kann. Eine direkte Beziehung zwischen der Steigerung der Sauerstoffaufnahme und den Hemmwerten scheint nicht zu bestehen. In den meisten Fällen konnte nur eine geringe Senkung der Atmung festgestellt werden, und auch in Maximalfällen übertraf diese nach einer eintägigen Einwirkung des Katechols nie 50 % der Kontrollwerte.

Durch die Katecholzugabe wird die CO<sub>2</sub>-Produktion anfänglich schwach gesteigert, sinkt aber nach kurzer Zeit rasch unter die Kontrollwerte ab. Da die CO<sub>2</sub>-Produktion bedeutend weniger gefördert wird als die O<sub>2</sub>-Aufnahme, sinkt der R. Q. bei Katecholzugabe rasch unter die Einheit und kann Werte erreichen, die um 0,2 oder in einzelnen Fällen noch tiefer liegen (Tabelle 17).

Tabelle 17  
Veränderung des R. Q. bei Katecholzugabe

	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	R. Q.
Vor der Katecholzugabe .....	14,9	19,5	1,31
Unmittelbar nach der Katecholzugabe	81,3	24,6	0,33
130 Minuten nach der Katecholzugabe	21,8	3,2	0,15

O<sub>2</sub>-Aufnahme pro 1/4 Std. 300 mg Blattstreifen. Alternde Blätter von Topftabak.

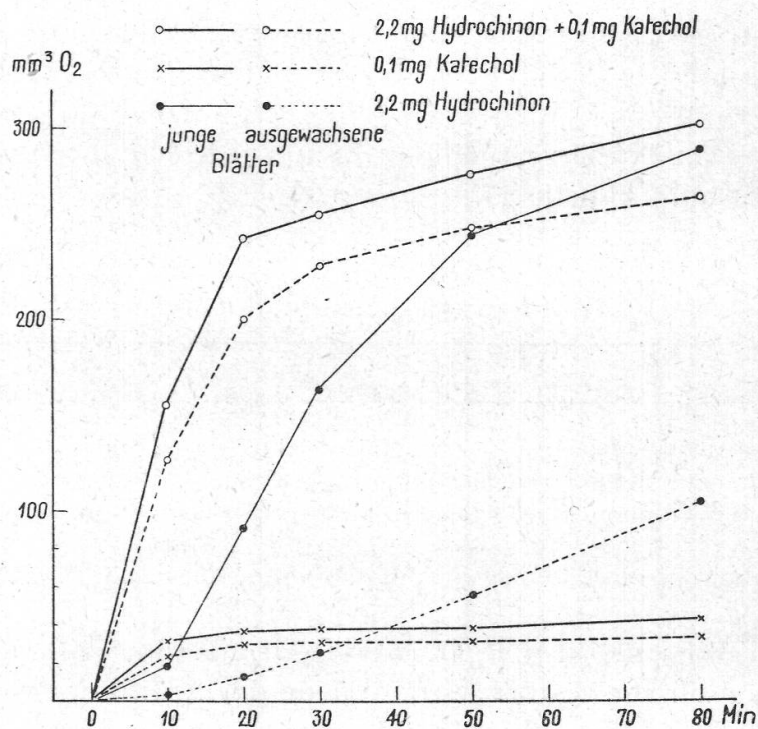
Die Veränderung des R. Q. weist darauf hin, daß der Atmungsmechanismus schwer gestört wird. Würde der Abfall der Atmung einzig auf einer Hemmung der Polyphenoloxydase beruhen, so wäre zu erwarten, daß die Restatmung einen R. Q. von ungefähr 1 aufweist.

Die Wirkung von Dopa (3,4-dioxy-phenylen-Alanin) auf junge Blätter unterscheidet sich darin von derjenigen des Katechols, daß der Abfall der O<sub>2</sub>-Aufnahme nach der Zugabe des Substrates etwas langsamer eintritt und die CO<sub>2</sub>-Produktion weniger stark absinkt. Aber auch Dopa wirkt auf die Fermentsysteme hemmend, da bei Homogenaten durch eine erste Dopazugabe die Reaktion auf eine zweite verhindert werden kann. Es ist daher anzunehmen, daß der Unterschied von Dopa und Katechol auf die Blattfermente mehr quantitativer Natur ist und nicht auf einer prinzipiellen Verschiedenheit der Wirkung der beiden Substanzen beruht.

Versuche mit Saftzentrifugaten von ausgewachsenen Altersblättern, die als intakte Gewebe keine Reaktion auf Polyphenoloxydase geben, zeigen, daß das Ferment trotzdem in ansehnlichen Mengen vorhanden ist (Figur 5). Die Versuche wurden so durchgeführt, daß Katechol in



ganz geringen Mengen als Überträger mit Hydrochinon als Wasserstoffdonator zugegeben wurde. Bei der Beurteilung der Versuche ist aber darauf zu achten, daß die Beziehung zwischen Sauerstoffaufnahme und Saftkonzentration auch unter optimalen Versuchsbedingungen (d. h. weder Katechol noch Sauerstoff als begrenzende Faktoren) nicht linear ist. Das wird damit zusammenhängen, daß auch bei geringen Katecholmengen die entstehenden Oxydationsprodukte in genügender Konzentration gebildet werden, um toxisch zu wirken. Der Test gibt daher mehr ein qualitatives Maß für die vorhandene Polyphenoloxydase als eine



Figur 5  
Polyphenoloxydaseaktivität von Saftzentrifugaten von jungen und ausgewachsenen Altersblättern. (Die Blätter entsprechen denjenigen von Figur 4.) 25°

genaue quantitative Messung, ist aber trotzdem für Vergleichszwecke recht gut geeignet.

Beim Saftzentrifugat von jungen Blättern wird Hydrochinon auch ohne Zugabe von Katechol sehr kräftig oxydiert, bei den ausgewachsenen Blättern ist die Oxydation schwächer. Diese Erscheinung ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß die jungen Blätter reicher sind an Stoffen, die als Überträger wirken können.

In Tabelle 18 ist die Polyphenolaseaktivität von Jugend- und Altersblättern verglichen. Die Aktivität der Zentrifugate von jungen und ausgewachsenen Altersblättern unterscheidet sich nicht sehr wesentlich, hingegen ist die Aktivität von älteren Primärblättern bedeutend gerin-

ger. Auf Grund von Verdünnungsversuchen läßt sich abschätzen, daß die Fermentkonzentration in den Jugendblättern des hier angeführten Versuches mindestens zehnmal geringer sein muß als in den jungen Altersblättern, in den ausgewachsenen Altersblättern rund die Hälfte oder etwas mehr als in den jungen. In Jugendblättern von Gewächshaus-  
tabak, der im Winter gezogen wurde, ist der Polyphenoloxidasengehalt besonders gering.

Tabelle 18

Vergleich der Polyphenoloxidasenaktivität verschiedener Blattsäfte  
Saftzentrifugat, 1 : 6 verdünnt. H. Q. = Hydrochinon

Jugendblätter Gewächshauspflanzen Blätter bis 5 cm lang		Altersblätter, Freilandpflanzen		
		junge Blätter	30-35 cm	35-40 cm lang
H. Q. 1,1 mg + Kat. 0,1 mg ..	38,9	72,5	60,2	65,4
Kat. 0,1 mg .....	10,4	22,9	17,0	20,6
H. Q. 1,1 mg .....	1,0	4,4	3,9	4,1

Sauerstoffaufnahme in 10 Min. 25°.

Daß ausgewachsene Blätter von Freilandtabak mit geringer Reaktion auf Katechol wirklich Polyphenoloxydase besitzen, wird außer durch das Verhalten der Homogenate auch durch Versuche mit gefrorenen Blättern erhärtet. Werden solche Blätter gefroren und nach dem Auftauen untersucht, so steigert die Katecholzugabe die Sauerstoffaufnahme ganz beträchtlich.

Daß dem pH in dieser Frage keine ausschlaggebende Bedeutung zukommen kann, beweisen Versuche mit Katecholzugaben im pH-Bereich von 4,5 bis 7,5, wobei im neutralen Bereich nur eine geringe Steigerung der Reaktion stattfand.

Die Versuche zeigen deutlich, daß die Reaktion von intaktem Blattmaterial und von Homogenaten auf Polyphenoloxydase nicht unbedingt parallel geht. Bei ganz jungen Jugendblättern kann das Fehlen der Reaktion durch die geringe Enzymkonzentration erklärt werden, doch ist diese Erklärung nicht auf ausgewachsene Altersblätter anwendbar.

Die nächstliegende Deutung für das unterschiedliche Verhalten von Homogenat sowie von gefrorenen Blättern gegenüber den intakten Geweben von ausgewachsenen Altersblättern lag in der Annahme, daß die Polyphenole im allgemeinen nur schwer in die Blätter einzudringen vermögen. Die Erscheinung, daß nach einer Zugabe von Katechol oder Dopa zu reagierenden Geweben nur die Schnittränder geschwärzt werden und erst viel später sich auch die übrige Blattfläche bräunt, scheint diese Annahme zu bestätigen. Die Permeabilität von ausgewachsenen Altersblättern für Katechol wäre noch geringer als diejenige von jungen Blättern, so daß die Reaktion ausfallen würde.



Gegen diese Vorstellung spricht aber die Tatsache, daß sich die Blattatmung im sauren *pH*-Bereich durch *p*-Nitrophenol vergiften läßt, daß also diese dem Katechol ähnliche Verbindung im undissoziierten Zustand in die Blätter einzudringen vermag. Auch wurde in einzelnen Fällen beobachtet, daß Katechol auf die Tabakblattatmung hemmend einwirken kann, ohne eine Atmungssteigerung zu bewirken, so daß anzunehmen ist, daß Katechol wohl in die Zellen einzudringen vermag, aber nicht mit der vorhandenen Polyphenoloxydase reagieren kann. Die Vermutung liegt daher nahe, daß die Enzymsysteme vor dem Katechol abgeschirmt sein können. Das Enzym ist eventuell durch seine besondere Lagerung in einem Komplex geschützt, oder die eindringenden Phenole können durch irgendwelche Vorgänge abgefangen werden. Das Katechol kann entweder an die Polyphenoloxydase herantreten und wird dann oxydiert, wobei es durch seine Oxydationsprodukte auch auf andere Systeme einzuwirken vermag (z. B. Hemmung der CO<sub>2</sub>-Produktion); oder es kann nicht an die Polyphenoloxydase herantreten und wirkt hemmend auf andere Fermentsysteme, oder es kann letztlich an keines der Systeme herankommen, die es schädigen könnte, und wirkt daher indifferent.

Durch das Einfrieren wird wahrscheinlich nicht nur die Permeabilität der Zellen vergrößert, sondern es besteht die Möglichkeit, daß durch die Zerstörung der Zellfeinstruktur die bestehende Abschirmung des Fermentes aufgehoben wird.

Es bestehen zwar keine Anhaltspunkte dafür, auf welche Weise Fermente vor den eindringenden Polyphenolen abgeschirmt sein können. Eine ähnliche Diskrepanz im Verhalten von intaktem Gewebe und Homogenat, die sich auf einen Schutz eines Fermentes zurückführen läßt, beobachteten *D a r b y* und *G o d d a r d* (1950) bei der Vergiftung von Pilzmycelien mit CO und HCN.

### 3. Die Wirkung der spezifischen Polyphenoloxydasengifte

Wie in der Einleitung hervorgehoben wurde, spielen die Polyphenoloxydasengifte bei der Bestimmung der quantitativen Bedeutung der Polyphenoloxydase eine wichtige Rolle. Da die Untersuchungen, die eine Funktion der Polyphenoloxydase als Terminaloxydase in verschiedenen Pflanzen ablehnen, sich mehren, schien es von großem Interesse, die Wirkung dieser Gifte näher zu untersuchen. Als spezifische Gifte werden *p*-Nitrophenol (*B o n n e r*, 1946), 4-Nitrokatechol (*B a k e r* und *N e l s o n*, 1943), die Oxydationsprodukte des Katechols (*B o s w e l l* und *W h i t i n g*, 1938) und als Kupferproteidgeift DDC (Diäthylthiocarbamat) angegeben.

Versuche mit DDC an intakten Geweben stoßen auf Schwierigkeiten. DDC ist in saurem *pH*-Bereich instabil, dringt sehr schlecht in die

Zellen ein und vermag die Atmung nur wenig zu hemmen. Die Verfärbung der Gewebe nach Katecholzusatz wird zwar verhindert. Ob die Steigerung der Atmung aber gehemmt wird, konnte nicht eindeutig entschieden werden. Die Hemmung der Atmung mit DDC vermag aber kein Bild über die quantitative Bedeutung der Polyphenoloxydase zu geben, da gleichzeitig vorhandene Ascorbinsäureoxydase ebenfalls gehemmt wird.

Steinmann (1950) äußerte auf Grund von Versuchen an Kleeblättern Zweifel an der Spezifität von *p*-Nitrophenol. Stenlid (1950) weist darauf hin, daß bei einer spezifischen Vergiftung der Polyphenoloxydase zu erwarten wäre, daß *o*-Nitrophenol giftiger wirkt als *p*-Nitrophenol, da die Polyphenoloxydase *o*-Diphenole oxydiert. Doch ist gerade das Umgekehrte beobachtet worden (Bonner und Wildman, 1946). Ebenso lassen sich durch *p*-Nitrophenol Gewebe stark vergiften, die keine Polyphenoloxydase enthalten, wie Rübenwurzeln (Stenlid, 1950). Aus diesem Grunde wurde die Wirkung dieser Nitrohomologen der Polyphenoloxidasensubstrate geprüft.

Die Gifteinwirkung des *p*-Nitrophenols auf die Tabakblätter ist stark pH-abhängig und erreicht ein Maximum bei pH 4,5. Nach längerer Einwirkungsdauer kann das Gift die Blattatmung vollständig hemmen. Die 4-Nitrokatechol-Wirkung scheint trotz der nahen Verwandtschaft mit dem *p*-Nitrophenol nicht identisch mit diesem zu sein. Bei Freilandtabak wurde die Atmung im sauren pH-Bereich anfänglich mehr oder weniger gesteigert. Allmählich trat dann eine Hemmung ein, doch blieben die Hemmwerte geringer als beim *p*-Nitrophenol. Nach einer eintägigen Einwirkung des Giftes wurde eine rund 90prozentige Senkung der O<sub>2</sub>-Aufnahmen erzielt (Tabelle 19).

Tabelle 19

Hemmung der Atmung mit *p*-Nitrophenol und 4-Nitrokatechol. O<sub>2</sub>-Aufnahme pro 1/2 Std. 200 mg Blattstreifen, Altersblätter. pH 4,5. 25°

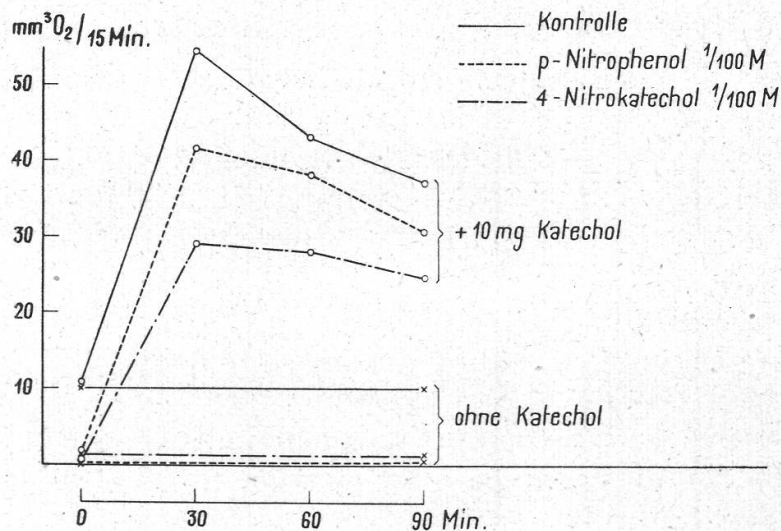
Einwirkungsdauer des Giftes	Kontrolle		<i>p</i> -Nitrophenol		4-Nitrokatechol	
1 1/2 Stunden ...	27,9	100 %	23,2	83 %	55,2	198 %
5 1/2 Stunden ...	26,2	100 %	0	0 %	11,6	44 %
30 Stunden * ....	21,1	100 %	0	0 %	3,1	5 %

\* Material in der Zwischenzeit im Eiskasten aufbewahrt.

Es scheint, daß die 4-Nitrokatechol-Wirkung vom Blattalter beeinflusst wird. Bei Jugendblättern konnte keine Förderung der Atmung beobachtet werden.

Die beiden Substanzen vermögen nicht die Polyphenoloxydase in intakten Blättern zu hemmen. Wird zu vergifteten Blättern Katechol zugegeben, so wird es oxydiert (Figur 6).

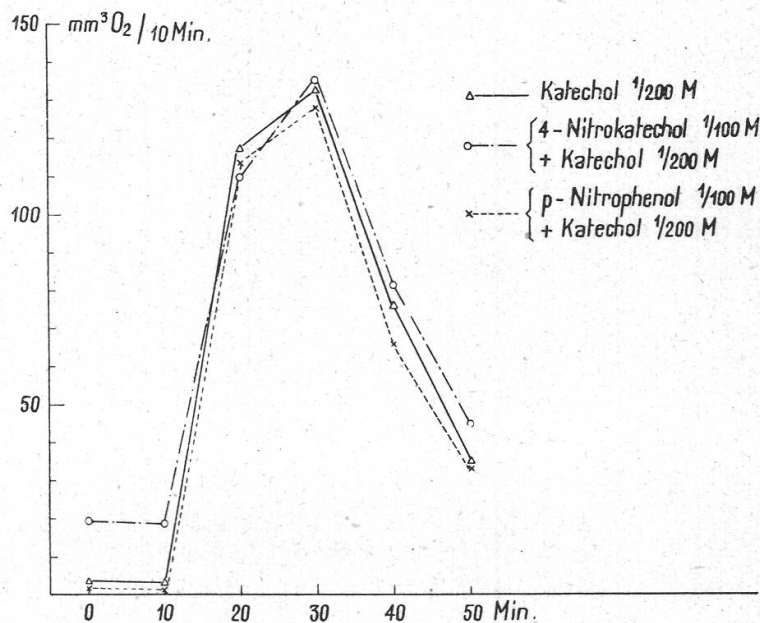




Figur 6

Die Wirkung von *p*-Nitrophenol und 4-Nitrokathechol auf die Polyphenoloxydase in intaktem Blattgewebe. Gift zirka 30 Std. vor dem Versuch zugegeben (siehe Tabelle 19).  
200 mg Blattstreifen von Altersblättern. 25°

Ebenso kann auch in Saftzentrifugaten keine Beeinträchtigung der Polyphenolasenaktivität beobachtet werden (Figur 7).



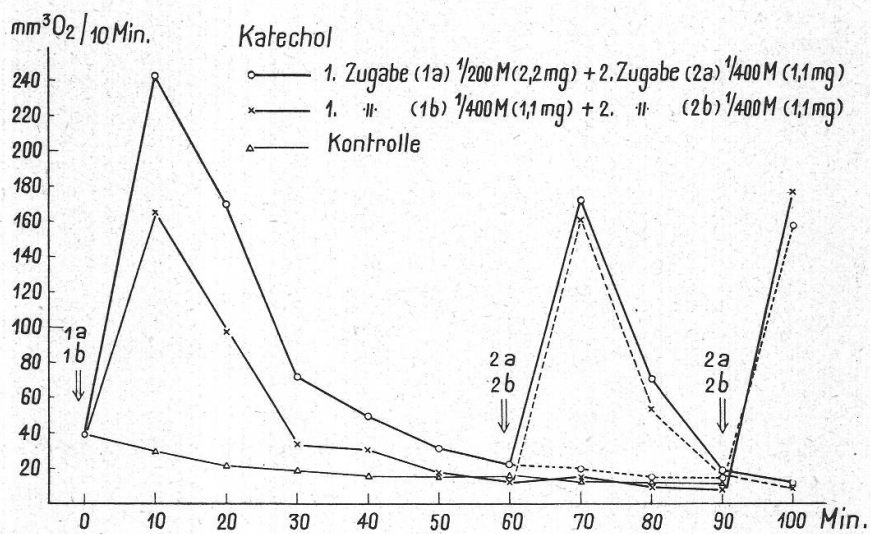
Figur 7

Wirkung von *p*-Nitrophenol und 4-Nitrokathechol auf die Polyphenoloxydase von Saftzentrifugaten von Altersblättern.  
Verdünnung 1 : 8. 25°

4-Nitrokathechol steigert auch in Homogenaten von jungen Altersblättern die O<sub>2</sub>-Aufnahme bis zu einem gewissen Grade (Figuren 7 u. 9). Der Vorgang ist durch die Oxydationsprodukte des Katechols hemmbar.

Wenn auch strukturelle Überlegungen eine Beziehung von *p*-Nitrophenol und 4-Nitrokatechol-Hemmung zur Polyphenoloxydase erwarten lassen, so muß auf Grund der Versuche die Wirkung dieser Substanzen bei den Tabakblättern in einem andern Mechanismus als in der Hemmung der Polyphenoloxydase gesucht werden. Eine kompetitive Hemmung der Polyphenoloxydase, die durch Katechol aufgehoben werden könnte (ähnlich wie bei der Malonsäurevergiftung der Bernsteinsäuredehydrase), kommt kaum in Frage, da die Polyphenoloxydase *o*-Diphenole oxydiert.

Bei verschiedenen Pflanzengeweben wird nach der Katecholzugabe eine Hemmung der Atmung beobachtet, die bis zu 80 % der Grundatmung betragen kann, beim Tabak aber bedeutend geringer ist. Es



Figur 8

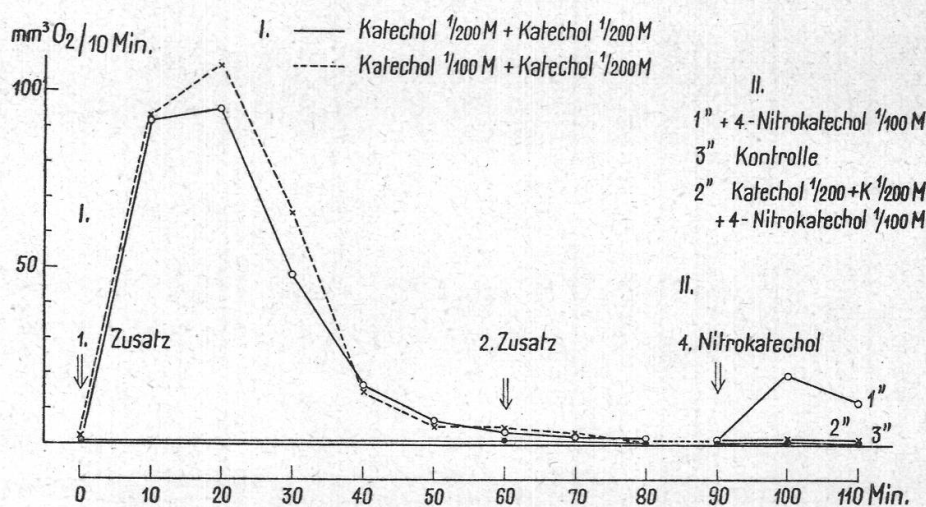
Zweimalige Zugabe von Katechol zu Saftzentrifugaten von Altersblättern. Verdünnung 1 : 1. 25°

wurde angenommen (Boswell und Whiting, 1938), daß die Erscheinung darauf beruht, daß die Polyphenoloxydase durch die entstehenden Oxydationsprodukte zerstört wird und daß der Atmungsrest den nicht durch die Polyphenoloxydase katalysierten Teil der Atmung darstellt. Durch die Untersuchungen von Nelson und Baker (1943) und Levy und Schade (1950) wird diese Deutung sehr unwahrscheinlich gemacht.

Wird die Natur der Hemmung mit Saftzentrifugaten untersucht, so ergibt sich, daß bei einer geringen Konzentration von Katechol ( $1/200$  M) bei einer halben Verdünnung des Saftes ein Abklingen der O<sub>2</sub>-Aufnahme auftritt, bevor alles Substrat veratmet worden ist, daß aber bei einer zweiten Zugabe von Katechol eine nochmalige Steigerung der Atmung ausgelöst wird (Figur 8). Wird das Homogenat etwas stärker verdünnt (1 : 8), so ist eine zweite Zugabe bei gleichen Katecholmengen wie im



ersten Versuch wirkungslos. Es ist daher anzunehmen, daß bei schwacher Konzentration der Katecholoxydationsprodukte das Enzym gehemmt wird, die Hemmung aber reversibel ist, wobei das Mengenverhältnis von Katechol und seinen Oxydationsprodukten für den Reaktionsablauf eine gewisse Rolle spielt. Erst bei größeren Giftkonzentrationen, bezogen auf die Enzymmenge, ist die Vergiftung endgültig (Figur 9). Da eine ähnliche Beziehung zwischen endgültiger Hemmung der Katecholoxydation und der zugegebenen Katecholdmenge auch bei intakten Geweben nachgewiesen worden ist (Nelson und Baker, 1943) (wobei bei den verschiedenen Katecholdmengen die Gesamthemmung der Grundatmung dieselbe ist, ob die Polyphenoloxydase endgültig gehemmt ist oder nicht), muß angenommen werden, daß das



Figur 9

Zweimalige Zugabe von Katechol zu Saftzentrifugaten von Altersblättern. Verdünnung 1 : 8. 25°

Katechol und seine Oxydationsprodukte ganz allgemein auf die Fermentsysteme giftig wirken, die Polyphenoloxydase aber eine relativ große Resistenz gegenüber einer Vergiftung zeigt.

#### 4. Die Bedeutung der Polyphenoloxydase

Wenn auch eine große Zahl von Arbeiten seit 1937 die Auffassung zu festigen schienen, die Polyphenoloxydase funktioniere als Terminaloxydase, und die weite Verbreitung des Fermentes mit seiner zentralen Funktion in Zusammenhang brachten, so lassen sich heute gewichtige Gründe gegen eine solche Vorstellung vorbringen.

Levy und Schade (1948) stellten fest, daß die Vergiftung in allen Fällen lichtreversibel ist. Die CO-Vergiftung von Polyphenoloxydasepräparaten wird jedoch im Kontrollversuch durch Licht nicht aufgehoben. Die Versuche führen zum Ergebnis, daß in der Kartoffel-

knolle zwei Systeme als Terminaloxydase in Frage kommen: die Cytochromoxydase und ein nicht CO-hemmbares schwermetallhaltiges Enzym. Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da bisher angenommen wurde, die Atmung der Kartoffelknolle werde vorwiegend durch die Polyphenoloxydase katalysiert. Doch wird durch diese Versuche die Polyphenoloxydase als Terminaloxydase ausgeschlossen. Da auch in Rübenwurzeln die CO-Vergiftung lichtreversibel ist, kann die Atmung in diesem Gewebe nicht durch Polyphenoloxydase katalysiert werden (M a r s h und G o d d a r d , 1939). Diese Ergebnisse mit CO-Vergiftungen haben die Hypothese von der Funktion der Polyphenoloxydase als Terminaloxydase in Frage gestellt.

Wenn es gelingt, auch für andere Pflanzen nachzuweisen, daß *p*-Nitrophenol und 4-Nitrokatechol keine spezifischen Polyphenoloxidasengifte sind, so werden die Versuche, welche die Polyphenoloxydase auf Grund dieser Vergiftung als zentrale Terminaloxydase ansehen, anders gedeutet werden müssen.

Die hier angeführten Versuche bringen den Nachweis der Polyphenoloxydase in gewissen Stadien der Blattentwicklung; doch läßt sich nicht eindeutig entscheiden, ob und in welchem Maße das Ferment als Terminaloxydase funktioniert. Ein gangbarer Weg, diese Frage zu entscheiden, ist die Prüfung der Lichtreversibilität der CO-Vergiftung der Gewebe. Doch läßt sich eine solche Arbeit an Blättern nur schwer durchführen.

Für die Annahme, daß die Polyphenoloxydase in den Tabakblättern nur eine geringe Rolle als Terminaloxydase spielen kann, falls sie überhaupt dafür in Frage kommt, spricht das Verhalten von mit Natriumazid vergifteten Blättern.

Durch HCN wird die Polyphenoloxydase junger Altersblätter gehemmt, hingegen nicht durch Natriumazid (siehe Seite 131). Die für die Polyphenoloxydase charakteristische Bräunung tritt sogar spontan auf. Wird zu natriumazidvergifteten Blättern Katechol zugegeben, so kann keine Hemmung der O<sub>2</sub>-Aufnahme beobachtet werden. Es ist daher anzunehmen, daß die durch die Polyphenoloxydase katalysierte Atmung maximal den Wert der Differenz zwischen HCN- und Natriumazidvergiftung ausmachen kann. Wie die Bestimmung des R. Q. bei der Natriumazidvergiftung ergibt (Tabelle 9), liegt der R. Q. derjenigen Atmung, die von der Polyphenoloxydase katalysiert werden könnte, unter 1. So erscheint eine Beteiligung der Polyphenoloxydase als Terminaloxydase in den natriumazidvergifteten Geweben, in denen die Polyphenoloxydase nicht gehemmt wird, sehr unwahrscheinlich. Wenn die Voraussetzung zutrifft, daß Natriumazid außer den Schwermetallfermenten keine anderen Systeme blockiert, so ist anzunehmen, daß die Polyphenoloxydase in den unvergifteten Tabakblättern nicht als Terminaloxydase funktioniert.



Das Verhalten der Tabakblätter gegenüber zugegebenen Polyphenolen legt eine andere Funktion des Enzyms nahe. Sowohl junge Altersblätter wie reife Blätter und überreife, d. h. mit beginnender Vergilbung, zeichnen sich durch einen intensiven Eiweißstoffwechsel aus: In den jungen, stark wachsenden Blättern werden Eiweiße aufgebaut, in den reifen und überreifen abgebaut. Die Primärblätter hingegen zeigen nur ein beschränktes Wachstum, die ausgewachsenen Altersblätter im Frühsommer gar keines, was sich in einem beschränkten Eiweißstoffwechsel äußern wird. Es dürfte daher die Tätigkeit der Polyphenoloxydase mit dem Eiweißstoffwechsel in Zusammenhang stehen.

Diese Vermutung wird durch Arbeiten von B o s w e l l (1945) und J a m e s et al. (1948) wesentlich gestützt. Diese wiesen nach, daß Aminosäuren Wasserstoffdonatoren für die im Polyphenoloxidasensystem auftretenden Chinone sein können. Es scheint sich daher auch von diesen Beobachtungen aus zu ergeben, daß die biologische Bedeutung der Polyphenoloxydase auf dem Gebiet des Eiweißstoffwechsels liegt. Diese Deutung würde den tiefen R. Q. bei Natriumazidvergiftung erklären. Da die Polyphenoloxydase durch Natriumazid nicht blockiert wird, können Aminosäuren weiter oxydiert werden.

#### IV. Die Cytochromoxydase

Die Gegenwart dieses Systems kann auf Grund der enzymatischen Tätigkeit der Cytochromoxydase oder durch den Nachweis von Cytochrom *c* festgestellt werden.

Daß wir relativ schlecht unterrichtet sind über das Vorkommen von Cytochromoxydase in grünen Pflanzenteilen, liegt weitgehend an der Schwierigkeit des Nachweises. Der direkte spektroskopische Nachweis von Cytochrom *c* in grünen Pflanzengewebe ist wegen dessen geringer Konzentration und der Anwesenheit anderer Pigmente mit zum Teil ähnlichen Absorptionskurven sehr erschwert. Ebenso stößt die spektroskopische Messung der Cytochrom-*c*-Reduktion zum Nachweis der Cytochromoxydase in Homogenaten grüner Pflanzen auf Schwierigkeiten.

Da die Cytochromoxydase CO-hemmbar ist, die Hemmung aber zum Unterschied anderer Schwermetallfermente lichtreversibel ist, eignet sich die CO-Vergiftung zum Nachweis der Cytochromoxydase in nichtassimilierenden Geweben. Doch scheitert diese Methode bei grünen Pflanzen. Auch kann dieses Verfahren an pigmentlosen Zellen in einzelnen Fällen zu Fehlschlüssen führen. D a r b y und G o d d a r d (1950) haben gezeigt, daß sich die intakten Mycelien des zelluloselösenden Pilzes *Myrothecium verrucaria* nicht mit CO vergiften lassen, trotzdem in Homogenaten Cytochromoxydase vorhanden ist.

Um zu prüfen, ob Cytochromoxydase im Tabakblatt anwesend ist, wurde Saftzentrifugaten Cytochrom *c* und gleichzeitig ein Reduktions-

mittel zugegeben. Da im Saft Ascorbinsäureoxydase und Polyphenol-  
oxydase vorhanden waren, eigneten sich Ascorbinsäure und besonders  
Hydrochinon schlecht als Reduktionsmittel, da durch die starke Oxyda-  
tion der Kontrollen das Resultat nicht sehr deutlich ausfiel. Zwar war  
die Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei Zugabe von Cytochrom *c*  
mit Ascorbinsäure als Reduktionsmittel eindeutig, aber eine sichere Ab-  
klärung, ob es sich um eine Steigerung der Tätigkeit der Cytochrom-  
oxydase handelt, konnte durch die Vergiftungsversuche nicht erbracht  
werden.

Als geeignetes Reduktionsmittel für das Cytochrom *c* erwies sich  
das *p*-Phenylendiamin (Tabelle 20).

Tabelle 20

Oxydation von *p*-Phenylendiamin (*p*-Phen), 5 mg *p*-Phenylendiamin, 5 mg Cytochrom,  
0,2 mg Katechol (wirkt auf Hydrochinon stark katalytisch). 1,5 cm<sup>3</sup> Saftzentrifugat  
von ausgewachsenen Altersblättern von Freilandpflanzen, Phosphatpuffer 7,0  
O<sub>2</sub>-Aufnahme in 40 Min. 25°

Kontrolle	<i>p</i> -Phen	<i>p</i> -Phen + Cyt. <i>c</i>	Kat.	Kat. <i>p</i> -Phen
10	61,1	106,4	47,0	85,9
Abzug der Kontrolle				
—	51,1	96,4	37,0	75,9

Gegenüber *p*-Phenylendiamin ist Katechol ohne katalytische Wir-  
kung. Wie ein weiterer Versuch zeigt, wird durch das Cytochrom *c* die  
Oxydation von *p*-Phenylendiamin ganz wesentlich gesteigert (Tabelle 21).

Tabelle 21

Dieselben Bedingungen wie im letzten Versuch. Ausgewachsene Altersblätter  
von Freilandpflanzen. Versuchsdauer 40 Min.

Kontrolle	<i>p</i> -Phen	<i>p</i> -Phen + Cyt. <i>c</i>	<i>p</i> -Phen + HCN 10 <sup>-2</sup> M	<i>p</i> -Phen + Cyt. <i>c</i> + HCN 10 <sup>-2</sup> M	Cyt. <i>c</i>
I. 11.3 .....	56,8	103,5	40,7	40,7	13,6
II. Abzug der Kontrolle .	45,5	92,2	29,4	29,4	2,3
III. HCN 10 <sup>-2</sup> M-hemmbar	16,1	62,8			2,3

Die katalytische Wirkung von Cytochrom *c* geht aus der Tabelle  
eindeutig hervor. Die Hemmung mit HCN 10<sup>-2</sup> M zeigt, daß ein Teil der  
*p*-Phenylendiamin-Oxydation, die nicht hemmbar ist, wahrscheinlich  
auf Autoxydation beruht. Die durch Cytochrom bedingte Steigerung der  
O<sub>2</sub>-Aufnahme wird vollständig durch HCN 10<sup>-2</sup> M gehemmt. Es ist an-  
zunehmen, daß der durch HCN hemmbare Teil der *p*-Phenylendiamin-  
Oxydation ebenfalls über die Cytochromoxydase katalysiert wird.



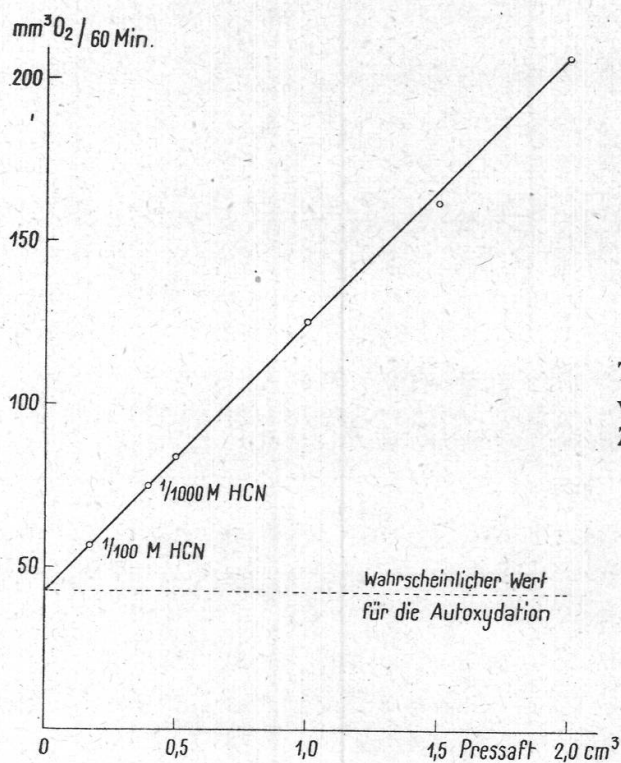
Werden die Werte für die HCN-nichthemmbare *p*-Phenylendiamin-Oxydation von den entsprechenden ungehemmten Werten abgezogen, so erhalten wir die Werte für die HCN-hemmbarere *p*-Phenylendiamin-Oxydation (Tabelle 21, III).

Aus diesen Versuchen geht die Anwesenheit von Cytochromoxydase in grünen Tabakblättern eindeutig hervor.

Die Verwendung von natürlichen Substraten, wie zum Beispiel Bernsteinsäure, für den Nachweis der Cytochromoxydase wird dadurch erschwert, daß die Bernsteindehydrase der Pflanzen sehr labil ist und bei der Zubereitung der Homogenate geschädigt wird. Der Versuch mit einem derartigen natürlichen Substrat könnte nur durchgeführt werden, wenn gleichzeitig das begrenzende Enzym zugegeben würde, in diesem Falle die Bernsteinsäuredehydrase.

### V. Die Ascorbinsäureoxydase

Wird einem Homogenat oder Preßsaft von Tabakblättern Ascorbinsäure zugegeben, so wird sie oxydiert. Die Sauerstoffaufnahme ist pro-



Figur 10  
Ascorbinsäureoxydation von  
Tabakpreßsaft. Blätter gefroren,  
wieder aufgetaut und ausgepreßt.  
Zugabe von 8 mg Ascorbinsäure.  
30°

portional zur Homogenatkonzentration, solange die noch vorhandene Ascorbinsäure nicht begrenzend wirkt (Figur 10). Bei einer Anzahl von Messungen zeigte sich, daß bei einer Rückwärtsinterpolation auf die Homogenatkonzentration 0 die Ascorbinsäure auch bei der Verwendung von glasdestilliertem Wasser autoxydiert wird. Diese Autoxydation wird in den meisten mit Tabakblättern durchgeführten Versuchen beob-

achtet. Sie kann verschieden große Werte annehmen und betrug maximal ein Fünftel der unter Standardbedingungen gemessenen Werte.

Da die Ascorbinsäure sehr leicht oxydiert wird, mußte abgeklärt werden, ob sie über eine spezifische Ascorbinsäureoxydase dehydriert wird. Durch  $\text{HCN } 10^{-2} \text{ M}$ , durch zweiminütiges Kochen und durch  $\text{DDC } 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  wird die  $\text{O}_2$ -Aufnahme bei Zugabe von Ascorbinsäure um rund 80 bis 90 % gehemmt (Tabelle 22). Daraus kann auf ein Enzym von Kupferproteidnatur geschlossen werden.

Tabelle 22

1. Homogenat (30 mg Blätter auf 60  $\text{cm}^3$  Puffer).  $\text{pH } 6,2$ . Natriumdiäthylthiocarbamat (DDC)  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ .  $25^\circ$ .  $\text{O}_2$ -Aufnahme in 135 Min.
2. Preßsaft 1 : 10 verdünnt.  $\text{pH } 6,5$ .  $\text{HCN } 10^{-2} \text{ M}$ .  $30^\circ$ .  $\text{O}_2$ -Aufnahme in 50 Min. Ascorbinsäurezugabe: 8 mg

	$\text{O}_2$ -Aufnahme in $\text{mm}^3$	Hemmung in %
1. Ascorbinsäure .....	208	0
Ascorbinsäure + DDC $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ .....	15,6	92,5
Homogenat 2 Min. gekocht + Ascorbinsäure	37,4	82,0
2. Ascorbinsäure .....	138,5	0
Ascorbinsäure + $\text{HCN } 10^{-2} \text{ M}$ .....	25,5	81,5

Es stellt sich nun die Frage, ob die Ascorbinsäureoxydation über eine spezifische Ascorbinsäureoxydase katalysiert wird oder über die Polyphenoloxydase, die in den Homogenaten vorhanden ist.

Würde die Ascorbinsäure einzig über die Polyphenoloxydase oxydiert, so müßte die Sauerstoffaufnahme bei einer Zugabe von Ascorbinsäure gleich derjenigen sein, die bei einer Hydrochinonzugabe gemessen wird, da Hydrochinon über einen phenolischen Überträger von der Polyphenoloxydase oxydiert wird, d. h. dieselben Verhältnisse vorliegen würden wie bei der Ascorbinsäureoxydation. Da die Ascorbinsäure aber bedeutend stärker oxydiert wird als das Hydrochinon, ist anzunehmen, daß bei den vorliegenden Versuchen wenigstens ein Teil der Ascorbinsäure durch eine spezifische Oxydase veratmet wird (Tabelle 23).

Tabelle 23

Vergleich von Ascorbinsäure und Hydrochinonoxydation.  $\text{O}_2$ -Aufnahme des Homogenates in 60 Min.  $\text{pH } 6,0$ .  $25^\circ$

5 mg Hydrochinon .....	62,2
4 mg Ascorbinsäure .....	224,0
entspricht ungefähr der halben Molarität des Hydrochinons	

Zum gleichen Schlusse führen Versuche mit verdünnten Homogenaten und Preßsäften. Wird ein Preßsaft ungefähr zehnfach ver-



dünnt, so geht die Fähigkeit, ein Polyphenol zu oxydieren, verloren, während die Ascorbinsäure noch oxydiert werden kann. Diese Versuche führen zur Annahme einer spezifischen Ascorbinsäureoxydase in den Tabakblättern.

Wird dem Homogenat Ascorbinsäure zugegeben, so entspricht die gemessene Sauerstoffaufnahme rund 80 bis 90 % des Wertes, der theoretisch zur Bildung von Dehydroascorbinsäure verbraucht werden sollte. Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen wird also die Ascorbinsäure nicht in ein Redoxsystem eingebaut, sondern direkt oxydiert (Tabelle 24).

Tabelle 24  
Oxydation von 2 mg Ascorbinsäure. Temperatur 25°

Theoretisch zu erwartender Wert.	138 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>
Gemessener Wert .....	121 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>

Die Abklärung der Frage, ob die Ascorbinsäure auch in Tabakblättern mit der Oxydation verschiedener organischer Säuren gekoppelt ist, erscheint von großem Interesse (J a m e s und C r a g g , 1943).

Versuche an Preßsäften von gefrorenen und danach wieder aufgetauten Tabakblättern haben gezeigt, daß die Frage sich durch reine Atmungsmessungen nicht eindeutig abklären läßt, sondern gleichzeitig der Ascorbinsäureverbrauch gemessen werden muß. Verschiedene Säuren, wie Glykolsäure, Weinsäure, Zitronensäure und Äpfelsäure, können zwar zu einer Steigerung der O<sub>2</sub>-Aufnahme, die aber 20 % nicht übersteigt, führen. Eine endgültige Abklärung der Frage kann erst durch weitere Untersuchungen gebracht werden.

Weder Dopa noch Hydrochinon vermögen die Dehydroascorbinsäure zu reduzieren.

## VI. Milchsäure- und Glykolsäureoxydase

Bei Versuchen über die Oxydation der Glykolsäure durch die Ascorbinsäureoxydase in Tabakpflanzen, die über den Winter im Gewächshaus gezogen worden waren, konnte beobachtet werden, daß nur eine schwache Ascorbinsäureoxydase in den Geweben vorhanden war, daß aber die Glykolsäure vom Homogenat kräftig oxydiert wurde. Weitere Versuche zeigten, daß es sich um ein Enzymsystem handelt, das Glykolsäure und Milchsäure zu oxydieren vermag.

Wie aus den Zusammenstellungen der Tabelle hervorgeht, ist die Oxydation der beiden Säuren thermolabil: Sie wird durch HCN 10<sup>-2</sup> M nicht gehemmt, sondern gefördert, durch Monojodessigsäure jedoch teilweise gehemmt (Tabelle 25).

Tabelle 25

Oxydation der Milchsäure. Milchsäure (M. S.) 12 mg. HCN und Monojodessigsäure  $10^{-2}$  M. pH 6,0. 30°

	Hom.	M.S.	M.S. + CH <sub>2</sub> JCOOH	M.S. + HCN	Hom. gekocht + M.S.	Puffer + M.S.
O <sub>2</sub> -Aufnahme in 55 Min. . .	2,7	49,5	23,6	89,5	0,4	3,4
% der Kontrolle mit M. S. .		100	49	181		

Ähnlich verhält sich die Oxydierbarkeit der Glykolsäure. Durch kurzes Kochen des Homogenates wird die O<sub>2</sub>-Aufnahme unterbunden, durch HCN  $10^{-2}$  M stimuliert und durch Monojodessigsäure teilweise gehemmt.

Wie aus den Versuchen hervorgeht, werden die beiden Säuren durch ein nicht schwermetallhaltiges Ferment oxydiert.

Sowohl die Milchsäure- wie die Glykolsäureoxydation sind stark pH-abhängig und erreichen im alkalischen Bereich ein Maximum.

Claggett et al. (1949) beschrieben ein Enzym, das in grünen Blättern, unter anderem auch bei Tabak, vorkommt und Milchsäure und Glykolsäure oxydiert. Das System wurde als  $\alpha$ -Hydroxysäureoxydase bezeichnet (es sind eventuell mehrere verschiedene Enzyme) und seine Eigenschaften ausführlich untersucht (Tolbert et al., 1949; Tolbert und Burris, 1950). Die  $\alpha$ -Hydroxysäureoxydase wird mit der Photosynthese in Zusammenhang gebracht, da sie nur in grünen Geweben auftritt, hingegen nicht in Wurzeln, Keimlingen und etiolierten Blättern. Auf Grund der Übereinstimmung einiger wesentlicher Eigenschaften (Substrat nicht HCN, hingegen teilweise monojodessigsäurehemmbar, Optimum im neutralen bis alkalischen pH-Bereich), ist anzunehmen, daß der hier erwähnte Katalysator mit dem von Claggett, Tolbert und Burris beschriebenen Enzym identisch ist.

Als ein wichtiges Charakteristikum der Enzymtätigkeit wird die Entfärbung des Chlorophylls erwähnt. Sie konnte aber an den für die Versuche verwendeten Saftzentrifugaten nicht beobachtet werden. Dieses Verhalten ist vielleicht auf eine teilweise Schädigung des Enzyms bei der Herstellung der Saftzentrifugate oder auf im Saft anwesende Stoffe zurückzuführen.

Da angenommen wird, daß das Enzym bei der Photosynthese eine Rolle spielt, war es wichtig, zu erfahren, ob das Ferment in den Chloroplasten lokalisiert sei.

Es wurde daher versucht, die Chloroplasten zu isolieren und deren Aktivität mit dem von Chloroplasten befreiten Saft zu vergleichen. Durch kurzes Zentrifugieren des Homogenates (mit der Winkelzentrifuge bei 3000 U/Min.) wurden die Chloroplasten und die größeren Partikel abgesetzt, die überstehende Flüssigkeit, die noch Chlorophyll in kleineren Mengen enthielt (wahrscheinlich Chloroplastenbruchteile) ab-



geschüttet und beide Fraktionen weiter untersucht. Die Chloroplasten wurden in einem Volumen glasdestilliertem Wasser aufgeschwemmt, das der überstehenden Flüssigkeitsmenge entsprach. Homogenat, überstehender Saft und Chloroplastenfraktion wurden in der gleichen Weise mit Phosphatpuffer verdünnt. Tabelle 26 gibt die Werte für die Sauerstoffaufnahme der verschiedenen Fraktionen bei Säurezugabe wieder.

Tabelle 26

	Homogenat	Chloroplastenfraktion	Überstehende Flüssigkeit
Milchsäure 12 mg 60 Min. .	130,0	16,5	123,0
End-pH .....	7,0	6,7	7,0

Aus den Versuchen geht deutlich hervor, daß die Oxydase nicht in den Chloroplasten lokalisiert ist. Ob sie auf nichtsedimentierbaren Partikeln oder im Grundplasma sitzt, konnte nicht weiter untersucht werden.

Die Versuche mit Glykolsäure ergaben ein ähnliches Resultat.

#### D. Diskussion

Die Tabakpflanzen fallen durch ihren hohen Gehalt an organischen Säuren auf. Diese dienen z. T. als Atmungssubstrat, was sich in einem respiratorischen Quotienten äußert, der über 1 liegt. Im Gegensatz zu den Sukkulenten kann aber bei Freilandpflanzen keine größere Senkung des R. Q. während der Nacht beobachtet werden. Daher läßt sich der Tabak trotz seines hohen Gehaltes an organischen Säuren nicht in die Gruppe der Sukkulenten einreihen. Da die Messungen des R. Q. mit zerschnittenen Blattstücken durchgeführt wurden, stellt sich die Frage, ob auch unter normalen Bedingungen die Pflanze auf ihre Reserven an organischen Säuren zurückgreift oder ob diese Werte durch die experimentellen Bedingungen erklärt werden, die eine Art Hungerstoffwechsel auslösen. Neben den organischen Säuren dienen auch Kohlenhydrate als Atmungssubstrat, wie aus den Hemmungen der Atmung bei der Blockierung der Enolase hervorgeht.

Der oxydative Abbau der Triosen scheint über den Trikarboxylsäure- oder einen ähnlichen Zyklus zu gehen. Am Ausgangspunkt steht die Brenztraubensäure oder eines ihrer Derivate. Dies wird sowohl durch die Bedeutung der Enolase wie durch die Tatsache, daß ausgehungerte Blätter Pyruvat in den Stoffwechsel aufnehmen, gestützt.

Durch Versuche an isolierten Blättern konnten P u c h e r und V i c k e r y (1949) zeigen, daß die Zwischenstoffe des Trikarboxylsäurezyklus, die das Blatt zu speichern vermag, in den Stoffwechsel aufge-

nommen werden können, und daß daher die für den Trikarboxylsäurezyklus typischen Enzyme im Blatt vorhanden sein müssen. Diese Auffassung erhält eine weitere Stütze dadurch, daß Bernstein-, Zitronen- und Äpfelsäure die Atmungsintensität von Geweben steigern (sofern deren Stoffreserven nicht zu groß sind), wie auch dadurch, daß die Malonsäurehemmung durch C<sub>4</sub>-Säuren wenigstens teilweise aufgehoben werden kann.

Wenn auch eine deutliche morphologische Differenzierung zwischen Tabakblättern verschiedener Entwicklungsstadien besteht, so ist es interessant, festzustellen, daß sich die Atmung aller Blätter zu 70 % bis 90 % durch Natriumazid und Blausäure hemmen läßt. Der bei Rüben und Weizen beobachtete Übergang von einer durch Schwermetallfermente katalysierten Atmung in jungen Blättern zu einer auf Schwermetallgifte unempfindlichen bei ausgewachsenen Blättern (M a r s h und G o d d a r d, 1939) wird vom Tabakblatt nicht durchgemacht. Innerhalb dieser großen einheitlichen Linie bestehen aber gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Blattstadien. Dies äußert sich u. a. darin, daß der R. Q. von Jugendblättern im Gegensatz zu jenem der Altersblätter pH-abhängig ist.

In den Tabakblättern lassen sich sowohl Schwermetallfermente wie Cytochrom-, Polyphenol-, Ascorbinsäureoxydase und Peroxydase und als nicht blausäurehemmbares Fermentsystem die Glykol- und Milchsäureoxydase nachweisen. Da sowohl Bernsteinsäuredehydrase wie Cytochromoxydase vorhanden sind, ist anzunehmen, daß dem Cytochromsystem eine wichtige Rolle als Terminaloxydase zukommt. Die gleichzeitige Anwesenheit verschiedener Oxydasen läßt es als nahe liegend erscheinen, daß mehrere Terminaloxydasen nebeneinander funktionieren.

Es besteht heute eine gewisse Tendenz, die verschiedenen Oxydasen mit speziellen, wohldefinierten Funktionen in Zusammenhang zu bringen. Die Gesamtatmung erscheint daher differenziert, aufgespalten in einzelne Reaktionsketten, die durch wichtige Zwischenprodukte miteinander verbunden sind. Diese mehr oder weniger umrissenen Stoffwechseleinheiten liefern die nötige Energie für einzelne physiologische Funktionen. Die Abklärung ist zwar heute noch nicht so weit fortgeschritten, daß eine eindeutige Zuordnung vom Terminaloxydasensystem zu den physiologischen Funktionen der Zelle möglich wäre.

N e w c o m b (1951) glaubt, der Ascorbinsäure eine spezielle Steuerung der Wachstumsvorgänge zuschreiben zu können. Die Ionenaufnahme durch die Wurzeln wird, soweit sie von Energieproduktion abhängig ist, durch die Cytochromoxydase kontrolliert (R o b e r t s o n, 1950). M a r s h und G o d d a r d (1939) deuten ihre Versuche an Rübenblättern in der Weise, daß allen Blättern eine ungefähr gleich



große Grundatmung gemeinsam ist, die nicht durch Schwermetallgifte gehemmt werden kann.

Bei den jungen Blättern überlagert sich dieser Grundatmung eine blausäure- und natriumazidhemmbare Atmung, die mit zunehmendem Alter verlorenght, so daß bei den älteren Blättern nur noch die Grundatmung bleibt. Wenn auch der Aufbau der Systeme bei den verschiedenen Pflanzen voneinander abweicht, so scheint auch beim Tabak eine Verschiebung in der Aktivität der Fermentsysteme im Lauf der Entwicklung stattzufinden. Bei der Ascorbinsäureoxydase fanden sich gewisse Anzeichen einer Veränderung im Laufe der Entwicklung, doch wurde sie nicht näher untersucht. Hingegen ist in dieser Beziehung das Verhalten der Polyphenoloxydase von einigem Interesse. Ihre Hauptaktivität geht mit intensivem Eiweißstoffwechsel parallel. Es ist somit naheliegend, die Tätigkeit dieses Fermentes mit dem Stickstoffmetabolismus in Zusammenhang zu bringen, wofür auch andere Versuche sprechen (B o s w e l l, 1945; J a m e s et al., 1948 [siehe Seite 152]). Es ist daher anzunehmen, daß die Polyphenoloxydase nicht als eigentliche Terminaloxydase funktioniert.

Sehr wahrscheinlich ist auch die  $\alpha$ -Hydroxysäureoxydase an eine ganz bestimmte Funktion gebunden. Inwiefern eine Koppelung mit der Photosynthese besteht, wie ihr ausschließliches Vorkommen in grünen Geweben nahelegt, ist nicht eindeutig, da sie auf isolierten Tabakchloroplasten nicht, jedoch wohl im chloroplastenfreien Homogenat nachgewiesen werden kann. Es läßt sich heute auch nicht beurteilen, ob der durch Blausäure nicht hemmbare Teil der Atmung durch dieses Fermentensystem katalysiert wird.

Durch *p*-Nitrophenol und 4-Nitrokatechol kann die Blattatmung zu 80—90 % gehemmt werden, ohne daß dabei die Polyphenoloxydase geschädigt würde. Wahrscheinlich beruht die Wirkung dieser beiden Gifte auf einer ähnlichen wie diejenige von 2,4-dinitro-Phenol. Dieses blockiert bei geringeren Konzentrationen die Verbindung zwischen Phosphorylierung und Oxydation, bei höheren durch die Hemmung der Dehydrogenasen und Flavoproteine auch die Atmung (Literatur siehe S t e n l i d, 1949). Die anfängliche Stimulierung der O<sub>2</sub>-Aufnahme bei 4-Nitrokatechol-Zugabe würde sich dadurch erklären, daß durch die Hemmung der synthetischen Prozesse eine Anhäufung von Atmungssubstrat stattfindet, was zu einer Steigerung der O<sub>2</sub>-Aufnahme führt. Wahrscheinlich dringt 4-Nitrokatechol in Jugendblätter und *p*-Nitrophenol in alle Blattyphen rascher ein, wobei Phosphorylierung und Sauerstoffaufnahme gleichzeitig ausgeschaltet werden, so daß nur eine Hemmung resultiert.

### E. Zusammenfassung

1. Der respiratorische Quotient von frischen Tabakblättern liegt während der Tageszeit zwischen 1,35 und 1,15. In einzelnen Fällen können auch höhere Werte gemessen werden. Der hohe respiratorische Quotient weist darauf hin, daß die organischen Säuren, an denen das Tabakblatt besonders reich ist, bis zu einem gewissen Grade als Atmungssubstrat dienen können. Morphologisch können wir die Blätter in Jugendblätter und Altersblätter scheiden. Junge und unter ungünstigen Gewächshausbedingungen wachsende Pflanzen produzieren Frühblätter, deren R. Q. pH-abhängig ist. Er sinkt im neutralen Bereich unter 1. Bei den Altersblättern, die von größeren Pflanzen unter günstigen Wachstumsbedingungen gebildet werden, liegt der R. Q. auch im neutralen Bereich über 1. Eine Erklärung für diesen Unterschied kann vorderhand nicht gegeben werden. Er weist aber auf gewisse Stoffwechseldifferenzen hin. (Über die morphologischen Unterschiede der verschiedenen Blattyten siehe Einleitung Seite 124.)
2. Die Atmung läßt sich durch Schwermetallfermentgifte zu 70 bis 90 % hemmen.
3. Die Hemmbarkeit der Atmung mit Natriumfluorid und die Reversibilität der Hemmung durch Brenztraubensäure, die Hemmbarkeit mit Malonsäure und ihre teilweise Enthemmung durch Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure sowie die Steigerung der Atmung durch Bernsteinsäure und Zitronensäure und Äpfelsäure weisen auf das Vorhandensein des Trikarboxylsäurezyklus oder eines ähnlichen intermediären Kreislaufes hin.
4. In Homogenaten von Blättern konnten folgende oxydierende Enzyme nachgewiesen werden: Peroxydase, Polyphenoloxydase, Ascorbinsäureoxydase, Cytochromoxydase und die HCN-unempfindliche Glykol- und Milchsäureoxydase. Es konnten keine Anhaltspunkte für die quantitative Bedeutung der einzelnen Fermente gefunden werden.
5. Die für die Polyphenoloxydase typische Oxydation von Katechol durch intakte Gewebe wird nur an intensiv wachsenden, reifen (ausgewachsene Altersblätter im Spätsommer) und überreifen Blättern beobachtet. Blattstreifen von ausgewachsenen Altersblättern (im Frühsommer) und Jugendblättern geben keine Reaktion. Hingegen reagieren die Homogenate von ausgewachsenen Blättern kräftig auf Katechol. Es wird daher angenommen, daß in diesem Falle im intakten Blatt die Oxydase auf irgendeine Weise inaktiviert wird. Auch das Homogenat von Jugendblättern vermag Katechol zu oxydieren, doch ist die Reaktion bedeutend geringer als in Altersblättern und kann bei ganz jungen Blättern fast ganz fehlen.



Die Parallelität zwischen intensivem Eiweißstoffwechsel und Polyphenoloxydaseaktivität intakter Gewebe legt eine Beziehung zwischen dem Enzym und dem Stickstoffmetabolismus nahe (siehe über die Bedeutung der Polyphenoloxydase S. 150).

6. 4-Nitrokatechol und p-Nitrophenol ( $1/100$  M) hemmen die Atmung zu 80—100 %. Die Polyphenoloxydase wird aber dadurch weder im intakten Gewebe noch im Homogenat blockiert. Bei Altersblättern wird die Atmung durch 4-Nitrokatechol anfänglich stimuliert.

Diese Arbeit wurde im Pflanzenphysiologischen Institut der ETH unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Frey-Wyssling ausgeführt. Meinem verehrten Lehrer bin ich für das große Interesse, das er der Arbeit entgegenbrachte, und für die stets wohlwollende Unterstützung zu herzlichem Dank verpflichtet.

Gleichzeitig danke ich Herrn Professor Dr. H. Wanner vom Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich für die freundliche Überlassung seines Warburgapparates, Herrn Professor Dr. F. Leuthardt vom Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Zürich sowie der Direktion der Robapharm, pharmazeutischen Fabrik in Basel, für die notwendigen Cytochrommengen, welche sie mir in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt haben.

#### F. Literaturnachweis

- Altschul, A. M., Karon, M. L., and Kyame, L. Catalase and Peroxidase in germinating cottonseed. *Arch. Biochem.*, **18**, 161 (1948).
- Baker, D., and Nelson, J. M. Tyrosinase and plant respiration. *Jour. Gen. Physiology*, **26**, 269 (1943).
- Bhagvat, K., and Hill, R. Cytochrome oxidase in higher plants. *New Phytologist*, **50**, 112 (1951).
- Bonner, J. The growth and respiration of *Avena* coleoptile. *Jour. Gen. Physiol.*, **20**, 1 (1936).
- Plant Biochemistry. Academic Press Inc., Publishers, New York, 1950.
- and Wildman, S. G. Enzymatic mechanisms in the respiration of spinach leaves. *Arch. Biochem.*, **10**, 497 (1946).
- Boswell, J. G. Oxidation systems in the potato tuber. *Ann. Bot. NS*, **9**, 54 (1945).
- and Whiting, G. C. A study of the polyphenol oxidase system in potato tubers. *Ann. Bot. NS*, **2**, 847 (1938).
- — Oxidase systems in the tissues of higher plants. *New Phytologist*, **39**, 241 (1940).
- Claggett, C. O., Tolbert, N. E., and Burris, R. H. Oxidation of  $\alpha$ -hydroxy acids by enzymes from plants. *J. Biol. Chem.*, **178**, 977 (1949).
- Darby, R. T., and Goddard, D. R. The effects of cytochrome oxidase inhibitors on the cytochrome oxidase respiration of the fungus *Myrothecium verrucaria*. *Physiologia Plantarum*, **3**, 435 (1950).
- Goddard, D. R. Cytochrome *c* and Cytochrome oxidase from wheat germ. *Am. J. Bot.*, **31**, 270 (1944).

- James, W. O. The respiration of plants. *Annual Rev. Biochem.*, **15**, 417 (1946).
- and Cragg, J. M. The ascorbic acid system as an agent in barley respiration. *New Phytologist*, **42**, 28 (1943).
- Roberts, A. H., Beever, H., and Kock, P. C.: The secondary oxidation of amino acids by catechol oxidase of Belladonna. *Biochem. J.*, **43**, 626 (1948).
- Keilin, D., and Hartree, E. F. Cytochrome oxidase. London. *Proc. Roy. Soc. B.*, **125**, 171 (1938).
- Lardy, H. A. Respiratory enzymes. Burgess publishing company. Minneapolis. (1950).
- Laties, G. G. The role of pyruvate in the aerobic respiration of barley roots. *Arch. Biochem.*, **20**, 284 (1949).
- Levy, H., and Schade, A. L. Studies in the respiration of white potato. II. Terminal oxidase system of potato tuber respiration. *Arch. Biochem.*, **19**, 273 (1948).
- Marsh, P. B., and Goddard, D. R. Respiration and fermentation in the carrot, *Daucus carota*, 1. *Am. Jour. Bot.*, **26**, 724 (1939).
- Nelson, J. M., and Dawson, C. R. Tyrosinase. *Advances in Enzymology*, **4**, 99 (1944).
- Newcomb, E. H. Effect of auxin on ascorbic oxidase activity in tobacco pith cells. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **76**, 504 (1951).
- Pardee, A. B., and Potter, V. R. Malonate inhibition of oxidation in the Krebs tricarboxylic acid cycle. *J. Biol. Chem.*, **178**, 241 (1949).
- Pucher, G. W., and Vickery, H. B. The metabolism of the organic acids of tobacco leaves. 1. Effect of culture of excised leaves in solutions of organic salts. *J. Biol. Chem.*, **178**, 557 (1949).
- Roberts, E. A. H., and Sarma, S. N. The fermentation process in tea manufacture. *Biochem. Jour.*, **32**, 1819 (1938).
- Robertson, R. N. The absorption of ions by plants. *The School Science Review*, **115** (1950).
- Schade, A. L., Bergman, L., and Byer, A. Studies on the respiration of the white potato. 1. Preliminary investigation of the endogenous respiration of potato slices and catechol oxidase activity. *Arch. Biochem.*, **18**, 85 (1948).
- Steinmann, E. Über die Oxydationsvorgänge im lebenden und getrockneten Kleeblatt. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **60**, 433 (1950).
- Stenlid, G. Some notes on the effect of sodium azide, 2,4-dinitrophenol and o-phenanthroline upon oxygen consumption in green leaves. *Physiologia Plantarum*, **2**, 61 (1949).
- Sumner, J. B., and Somers, G. F. *Chemistry and methods of enzymes*. New York (1947).
- Thimann, K. V., and Bonner, W. D., Jr. Organic acid metabolism. *Annual Rev. Plant Physiol.*, **1**, 75 (1950).
- Tolbert, N. E., Claggett, C. O., and Burris, R. H. Products of the oxidation of glycolic acid by enzymes from tobacco leaves. *J. Biol. Chem.*, **181**, 905 (1949).
- and Burris, R. H. Light activation of the plant enzyme which oxidises glycolic acid. *J. Biol. Chem.*, **186**, 791 (1950).
- Umbreit, W. W., Burris, R. H., and Stauffer, J. F. *Manometric techniques and related methods of the study of tissue metabolism*. Minneapolis (1950).
- Weeks, D. C., and Robertson, R. N. Studies in the metabolism of plant cells. VIII. Dependence of salt accumulation and salt respiration upon the cytochrome system. *Austral. Jour. Sci. Research. Series B*, **3**, 487 (1950).