

Das Oxydationsferment des Kartoffelgewebes.

von

W. F. H. M. Mommaerts.*

Die Oxydationssysteme der höheren Pflanzen sind nur noch sehr unvollkommen bekannt. Es gibt Systeme die durch Vorherrschen von Peroxydase, Ascorbinsäureoxydase, oder Phenoloxydase gekennzeichnet sind (1), während neuere Arbeiten auf die Bedeutung der Cytochrome und der Cytochromoxydase hinweisen (2, 3; vergl. auch schon Keilin 4). Keines dieser Systeme ist eingehend erforscht. Es wurde daher das Studium der Kartoffelatmung, als Beispiel einer Pflanzenatmung, vorgenommen

Kartoffeln enthalten bekanntlich eine hochaktive Phenoloxydase, die von Kubowitz (5) als ein Kupferprotein erkannt wurde. Die Deutung der physiologischen Rolle des Ferments ist schwer: im zerkleinerten Gewebe findet die Sauerstoffaufnahme 15 bis 20 mal schneller statt wie in Gewebeschnitten (6); (in diesen Versuchen mit Gewebeprei wurde das bei der Oxydation des Katechinderivats gebildete Chinon mittels Ascorbinsäure reduziert.) Dieser Befund zeigt dasz die Oxydase, dem reduzierenden System gegenüber, in Überschuß anwesend ist; man würde also erwarten dasz in der Zelle das gesamte Katechinderivat als Chinon vorliegen würde; dies trifft aber nicht zu, weil dann das Gewebe sich braunfärben würde, und die Oxydase gehemmt sein sollte. (Vergl. 7, 8) Zur Erklärung dieser Diskrepanz hat man angenommen dasz das Ferment in der Zelle in inaktiver Form vorliege, oder dasz in vivo Ferment und Substrat getrennt seien.

Um zwischen diese beide Möglichkeiten eine Entscheidung zu treffen habe ich zuerst versucht das Ferment in in-

* Stipendiat des „De Groot — Fonds“, den Haag.

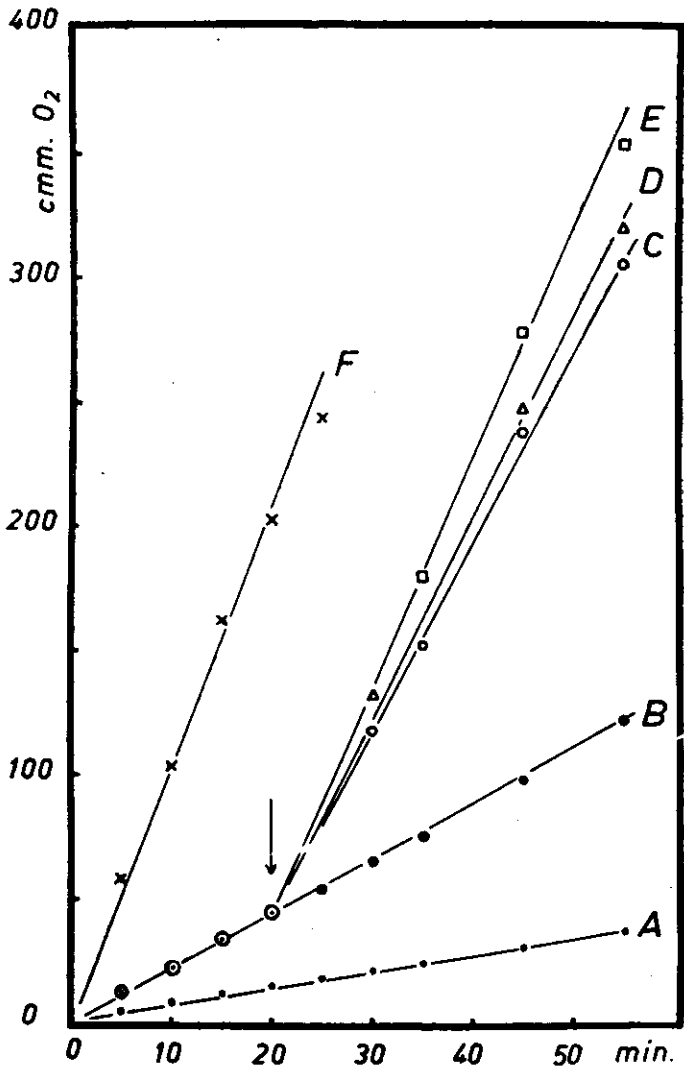


Fig. 1.

A. bis E.: Atmung von 400 mgr. Kartoffelgewebeschnitte in 2.5 cm.³

$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer p_H 6.4 bei 26°.

A: ohne Zusatz; B bis E mit Ascorbinsäure in Überschuss; in C, D. und E nach 20 Min. Zugabe von resp. $4 \cdot 10^{-7}$, $2 \cdot 10^{-6}$ und 10^{-5} gr. mol. Brenzkatechin.

F.: Atmung von 400 mgr. Kartoffelbrei in Phosphatpuffer mit Ascorbinsäure in Überschuss.

aktiver Form zu extrahieren; dies blieb aber ohne Erfolg. Hingegen sprechen folgende Befunde zugunsten der zweiten Deutung:

Askorbinsäure steigert die Sauerstoffaufnahme von Kartoffelschnitten um mehrere hundert Prozente; wird jetzt überdies noch Brenzkatechin zugegeben, so wird der Sauerstoffverbrauch aufs neue erheblich gesteigert, und zwar bis zu einem Betrag der dem der Gewebebreatmung (mit Askorbinsäure!) ungefähr gleich ist (Fig. 1.)

Dies spricht für die Annahme dasz in der Zelle das natürliche Brenzkatechinderivat, wenigstens zum grössten Teil, vom Ferment getrennt, und für die Atmung ohne Bedeutung ist. Damit wird natürlich auch die Bedeutung der Phenoloxydase für die Atmung zweifelhaft. Um zu entscheiden ob sich die Phenoloxydase überhaupt an der Atmung beteiligt, habe ich untersucht ob die Atmung und die Phenoloxydase sich in Hemmungsversuchen übereinstimmend verhalten. Um die Aktivität der Phenoloxydase in der Zelle zu messen, kann man nicht einfach die Oxydationsgeschwindigkeit zugegebenen Brenzkatechins bestimmen; das Ferment wird dann n. schnell inaktiviert, und bei Anwesenheit von Giften werden die Verhältnisse recht undurchsichtig; es wurde daher den Sauerstoffverbrauch nach Zusatz von p-Phenylendiamin mit wenig Brenzkatechin gemessen; das Diamin reduziert das gebildete o-Dichinon, wird aber ohne Katechinzusatz vom Ferment nicht angegriffen.

Es wurde gefunden dasz die Atmung, wie die Phenoloxydase, von Schwermetallantikatalysatoren wie Kohlenmonoxyd, Cyanid, Sulfid, Hydroxylamin, Fluorid, und Azid kräftig bis fast vollständig gehemmt wird. Als Beispiel sei ein Hemmungsversuch mit Hydroxylamin angeführt (Fig. 2.) Hier besteht eine vollständige Übereinstimmung zwischen Atmungshemmung und Hemmung der Phenoloxydase. Nicht immer ist die Übereinstimmung so gut; Abweichungen können von verschiedenen Faktoren verursacht werden n. 1. Meistens ist das Atmungsferment ungesättigt, weil ein anderes Glied der Fermentkette die Atmungsintensität beschränkt. 2. Es kann zwischen Katechin und Hemmungssubstanz Konkurrenz um das Fermentkupfer auftreten 3. Besonders bei höheren Konzentrationen von z. B. Cyanid, Azid und Fluorid kön-

nen auch andere Glieder der Katalysator-kette gehemmt werden.

Die Elausäurehemmung wird durch Kupferionen aufgehoben; Fe, Mn, Zn, Co, und Mg reaktivieren nicht;¹ dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Kubowitz über die Phenoloxydase. Die Kohlenmonoxydhemmung der Atmung ist

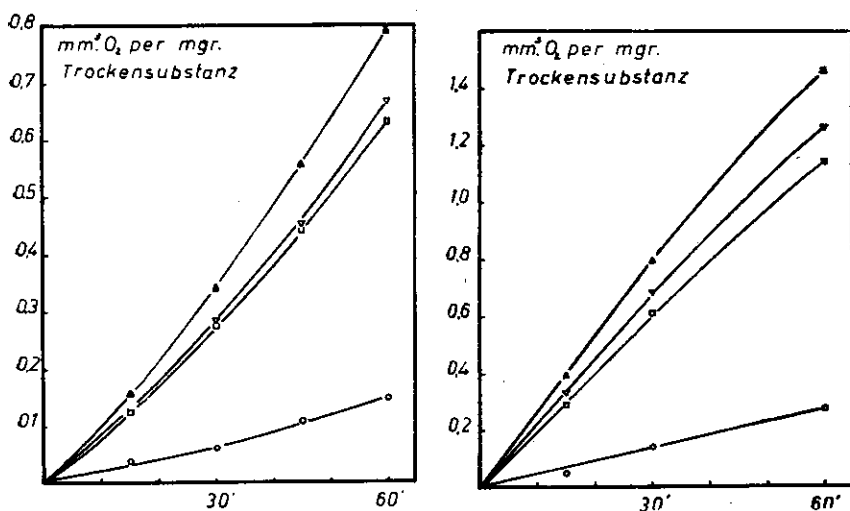


Fig. 2a. Atmung, und Fig. 2b. Phenoloxydaseaktivität unter Einfluss von Hydroxylamin.

- ▲ Kontrollversuch.
- △ Hydroxylamin, 4×10^{-7} gr. mol. per gram Gewebe. (mol/100.)
- " 4×10^{-6} " " (mol/1000.)
- " 4×10^{-5} " " (mol/10000.)

nicht lichtreversibel, was nach den bisherigen Kenntnissen ebenfalls für Kupferproteide bezeichnend ist.

Starke Atmungshemmungen wurden mit Salicylaldoxim, α -Benzoinoxim, und Natriumdiäthylthiocarbaminat erhalten. Diese Substanzen reagieren mit Kupfer, z. T. spezifisch, unter Komplexbildung.

¹ Auch Ni erhöht die Cyanidgehemmte Atmung, aber nach einem anderen Mechanismus. Während der Kupfereffekt, als eine echte Reaktivierung, bei höheren Konzentrationen des Cyanids und des Metalls immer schwächer ist, nimmt der Nickeffekt bei höheren Dosierungen zu; offenbar wird durch den Nickel-Cyanidkomplex irgend eine Autoxydation katalysiert.

Die Versuche zeigen also dasz ein Kupferprotein, allem Anschein nach mit der Phenoloxydase identisch, als Atmungsferment des Kartoffelgewebes dient; die Frage welches Substrat dabei primär oxydiert wird, und aus welchen Komponenten das desmolytische System noch besteht, ist der Gegenstand weiterer Arbeit.

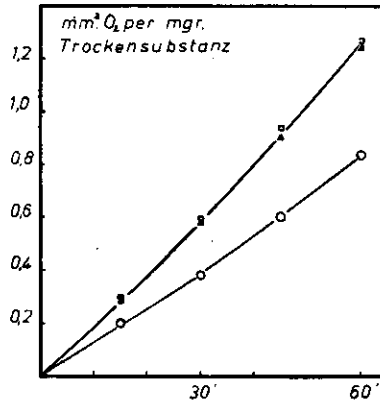


Fig. 3. Hemmung der Atmung durch Cyanid, und Reaktivierung durch Kupfer.

▲ Kontrolversuch.

□ Kaliencyanid 8×10^{-7} gr. mol. per Gram Gewebe (mol/5000) und CuCl_2 8×10^{-7} gr. mol. per Gram Gewebe.

○ Kaliencyanid 8×10^{-7} gr. mol. per Gram Gewebe, mit FeCl_3 , MnSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ und ohne Metallzusatz.

Methodisches. Die Versuche wurden in Warburg-Manometer bei $28,5^\circ \text{C}$ ausgeführt. Es wurde die Atmung von etwa 500 mgr. Kartoffelschnitte (Dicke ungefähr 0,4 mm.) in mol/15 Phosphatpuffer pH 6,4 gemessen. Die Schnitte wurden aus gekühlten Kartoffeln hergestellt und vor dem Versuch 6 Stunden in stehenden Leitungswasser belassen; derartig vorbehandelte Schnitte geben, wie in einer ausführlichen Mitteilung gezeigt werden wird, ein zuverlässiges Bild der Atmung des intakten Gewebes.

Der Hauptraum der Gefässe enthielt die Schnitte in 2 cm.³ Pufferlösung mit etwaige Zusätze; der Einsatz enthielt 0,1 cm.³ KOH 20% (bei Cyanidversuche 2%), die Birne 0,2 cm.³ mol/25 p-Phenylendiamin, mol/250 Brenzkatechin, das nach 60 minuten zugegeben wurde.

Literatur.

1. A. v. *Szent-Györgyi*, Studies on Biological Oxydation and some of its Catalysts. Leipzig 1937.
2. R. *Hill & Bhagvat*, Nature 143, (1939) 726.
3. P. B. *Marsh & D. R. Goddard*, Am. Journ. Bot. 26, (1939) 724—728.
4. D. *Keilin*, Proc. Roy. Soc. B 98, (1925) 312.
5. F. *Kubowitz*, Biochem. Z. 292, (1937) 221—227, 299, (1939) 32—47.
6. A. v. *Szent-Györgyi & K. Vietorisz*, Biochem. Z. 233, (1931) 236—239.
7. D. *Richter*, Biochemic. J. 28, (1934) 901—907.
8. J. G. *Boswell & G. C. Whiting*, Annals of Bot. 2, (1938) 846—863.