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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 60 (1950)

Artikel: Über die Oxydationsvorgänge im lebenden und getrockneten Kleeblatt

Autor: Steinmann, Erwin

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-42138

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 24.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Über die Oxydationsvorgänge im lebenden und getrockneten Kleeblatt

Von *Erwin Steinmann*

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich

Eingegangen am 26. Juni 1950

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 434
II. Experimenteller Teil 434
A. Material 434
B. Methodisches 435
C. Über die Atmung des lebenden Kleeblattes 437
1. Die Behandlung des Blattmaterials 437
2. Das Aufschlämmedium 437
3. Der Atmungskoeffizient 438
4. Vergiftungen 439
5. Der Zusatz künstlicher Substrate 441
D. Versuche mit Kleehomogenat 442
E. Über Versuche mit getrockneten Blättern 443
1. Das Aufschlämmedium 444
2. Der Verlauf der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxydabgabe bei aufgeschlämmtem Trockenklee 445
3. Vergiftungen 446
4. Der Zusatz neuer Substrate zu aufgeschlämmtem Trockenklee . . 448
a) Künstliche Substrate 448
b) Natürliches Substrat 450
5. Über die enzymatischen Oxydationen in Blattmaterial von verschiedenem Wassergehalt 451
a) Methodisches 451
b) Resultate 452
6. Die gesamte Sauerstoffaufnahme von Trockenklee 454
7. Über den Einfluß verschiedener Temperaturen auf den Trockenklee 455
a) Enzymatische Oxydationen 455
b) Autoxydationen 457
c) Der Atmungskoeffizient (RQ) 458
8. Der Einfluß der Blattbehandlung vor der Trocknung auf die Sauerstoffaufnahme des getrockneten Materials 458
a) Hohe Temperatur 458
b) Kälte 459
c) Lagerung 459
III. Diskussion 460
IV. Zusammenfassung 464
V. Literaturverzeichnis 465

I. Einleitung

Die folgenden Untersuchungen hatten anfänglich das Ziel, mit Hilfe der manometrischen Technik einige Probleme der autolytischen Prozesse in aufgestapeltem Heu zu bearbeiten (12). Es schien dies um so berechtigter, als diese Methode bei der Erforschung der Tee- und Tabakfermentation zu bedeutenden Resultaten geführt hatte (34, 16). Die Vorgänge im getrockneten Blattmaterial lassen sich aber ohne Kenntnis der im lebenden Blatt ablaufenden Prozesse kaum verstehen. Es war deshalb von vornherein gegeben, daß auch versucht werden mußte, die Oxydationsmechanismen des lebenden Blattes zu bearbeiten.

Die Versuche beschränken sich auf die Erfassung des durch zelleigene Enzyme bewirkten Gasstoffwechsels lebender und trockener Blätter. Ob Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) einen Einfluß haben auf die oxydativen Abbauprozesse in lagernden Pflanzenmassen, wird hier nicht diskutiert.

Allen Versuchen haftet Modellcharakter an, und es wird nicht ohne weiteres erlaubt sein, daraus Schlüsse über die tatsächlichen Vorgänge in großen Pflanzenmassen zu ziehen.

II. Experimenteller Teil

A. Material

Aus der Praxis ist bekannt, daß aufgestapeltes Kleeheu die größte Neigung zur Überhitzung besitzt (20, 31). Es ist aus diesem Grunde zu erwarten, daß in derartigem Blattmaterial die exothermen Oxydationsprozesse besonders ausgeprägt ablaufen.

Orientierende Versuche mit Blättern verschiedener Heupflanzen (Französisches Raygras, Knaulgras, Gerste, Luzerne und Rotklee), die unter denselben Bedingungen aufgezogen worden waren, haben gezeigt, daß die Sauerstoff verbrauchenden Reaktionen in getrockneten Rotkleeblättern stets am intensivsten vor sich gehen.

Als Unterschungsobjekt wählten wir daher den Rotklee *(Trifolium pratense* L.). Das meiste Material haben wir selber im Garten gezogen (Sorte Luxemburg von der Eidg. Versuchsanstalt in Oerlikon). Einige Proben wurden auch auf einem bestimmten Acker in der Gemeinde Suhr (Aargau) gesammelt.

Da die Enzymaktivität und der Enzymgehalt des Blattgewebes sich im Laufe einer Vegetationsperiode oder durch verschiedene Standortsbedingungen stark ändern können (18, 28, 38), mußten Versuche, die miteinander vergleichbar sein sollten, immer mit Material von demselben Standort gemacht werden. Obwohl sich die Atmungsmechanismen im Kleeblatt mit dem Alter der Pflanze nicht prinzipiell verändern, darf

man den experimentell bestimmten Gasmengen keine absolute Bedeutung beimessen. Kleine ökologische Variationen während der Aufzucht haben sofort eine Beeinflussung der verbrauchten Sauerstoffmenge zur Folge.

Für alle Untersuchungen wurde der Blattstiel weggeschnitten, so daß nur die drei Blättchen des Kleeblattes für die Messungen Verwendung fanden.

B. Methodisches

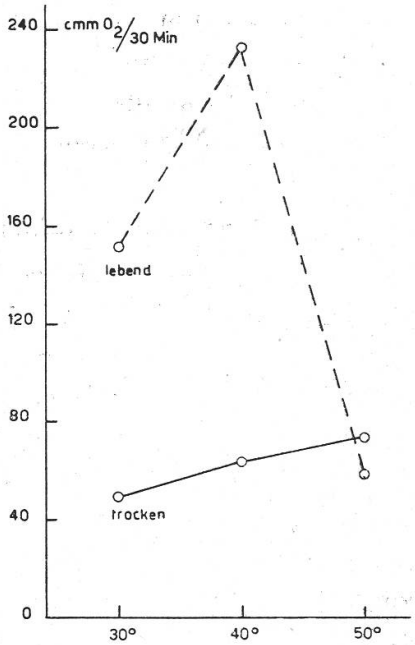
Da heute die manometrische Technik sehr weit verbreitet ist, bestehen sehr gute Lehrbücher über ihren Anwendungsbereich und das dabei erforderliche experimentelle Vorgehen (10, 40). Trotz der durch den komplexen Bau der Gewebe bedingten Schwierigkeiten ist diese Methode wiederholt zur Untersuchung der Assimilation (41) und der Atmung (4) von Blättern gebraucht worden. Weniger bekannt sind die Arbeiten mit welken und trockenen Blattstücken von Tee (34) und Tabak (16). Dabei ist vor allem eine kritische Beurteilung der Resultate notwendig, da unerwünschte Störungen durch Nebenreaktionen häufig sind.

Der Gasumsatz des lebenden und des trockenen Materials wurde in unseren Versuchen immer in Aufschlämmung bestimmt. Es wurden dazu Manometer nach dem Konstant-Volumen-Typus verwendet. Die konischen Reaktionsgefäße hatten ein Volumen von zirka 30 ccm. Die genaue Volumenbestimmung erfolgte mit Hilfe von Quecksilber. Als Manometerflüssigkeit wurde Brodie-Lösung gebraucht. Der von den Blattgeweben aufgenommene Sauerstoff wurde direkt gemessen durch Absorption der produzierten Kohlensäure mit 0,5 ccm *n* KOH, die in den mit einem Filterpapier versehenen Einsatz zugesetzt wurde. Bei Blausäurevergiftung wurde die Kalilauge durch eine KOH-KCN-Mischung oder durch eine 3*n* KCN-Lösung ersetzt (26). Da bei einer Mediummenge von 7 ccm die Sauerstoffaufnahme von 300 mg trockenem und lebendem Blattmaterial noch unabhängig von der Schüttelfrequenz der Kölbchen war, wurde für die meisten Versuche 200 mg Blattgewebe in 7 ccm Medium bei einer Schüttelfrequenz von 180 Drehungen pro Minute (Weg 1 cm) aufgeschlämmt. Wurde das Verhältnis Medium zu Blattmenge streng konstant gehalten, stieg die Abweichung zwischen zwei Parallelmengen nicht über 5 % der aufgenommenen oder abgegebenen Gasmenge.

Die Messungen wurden bei einer Wasserbadtemperatur von 40° C ausgeführt. Zur Einstellung des Temperaturgleichgewichtes wurden vor Beginn der eigentlichen Messung die Reaktionsgefäße 20 Minuten mit offenen Hahnen geschüttelt. Es wird sich später zeigen, warum diese Vorlaufzeit bei Versuchen mit Trockenklee von entscheidender Bedeutung für die Sauerstoffaufnahme des Materials ist. Es versteht sich unter

diesen Umständen von selbst, daß sie peinlich genau konstant gehalten werden mußte. Die Versuchstemperatur scheint für lebendes Material an der oberen zulässigen Grenze zu liegen. Steigert man die Temperatur auf 50°, werden die Atmungsfermente des lebenden Blattes schon stark geschädigt (Figur 1), während die Sauerstoffaufnahme des aufgeschlämmten Trockenklees weiter ansteigt. Für diese getrockneten Gewebe ist das Temperaturoptimum, wo Enzyminaktivierung und Reaktionsbeschleunigung einander die Waage halten, bei 50° noch nicht erreicht.

Da der Löslichkeitskoeffizient von Sauerstoff in Wasser von 40° ziemlich klein ist, wurde durch Ersetzung der Luftatmosphäre in den Kölbchen mit reinem Sauerstoff geprüft, ob damit eine Steigerung der Oxydationsprozesse bewirkt werden konnte. Es war keine Intensivierung



Figur 1
Der Einfluß der Versuchstemperatur auf die Sauerstoffaufnahme lebenden und getrockneten Klees. (Die aufgetragenen QO_2-Werte beziehen sich beim trockenen Material auf 200 mg Trokkenklee, beim lebenden Material auf 200 mg Frischgewicht. Würde man daher die Sauerstoffaufnahme auf die gleiche Trockengewichtsmenge berechnen, müßten die QO_2-Werte des lebenden Klees fünfmal größer sein)

der Sauerstoffaufnahme zu beobachten, so daß alle weiteren Versuche in Luft ausgeführt worden sind.

Alle Messungen sind im Dunkeln erfolgt. Eine schwache Lichtquelle diente zur Ablesung der Manometer.

Besonderes Interesse kommt der mikrobiellen Verunreinigung des Aufschlämmediums zu. Da unsere Versuche in der Regel nie länger als zwei Stunden dauerten, ist nicht anzunehmen, daß in dieser kurzen Zeitspanne die Meßresultate durch Mikroben gestört werden (27). Nie konnte ein für Bakterientätigkeit charakteristischer Anstieg des Sauerstoffverbrauches im Laufe eines Versuches beobachtet werden. Der Zusatz von Antiseptica zum Aufschlämmedium wurde aus diesem Grunde unterlassen, da dadurch auch die blatteigenen Enzyme beeinflußt werden.

Weitere technische Einzelheiten findet man in der Arbeit von Grob (16).

Wir bezeichnen in dieser Arbeit die aufgenommenen, resp. abgegebenen Gasmengen mit dem bei manometrischen Untersuchungen üblichen Quotienten « Q » (40). Unter $^{Q}O_2$, resp. $^{Q}CO_2$, versteht man daher die aufgenommene Sauerstoffmenge, resp. die abgegebene Kohlendioxydmenge, unter den jeweils angegebenen Bedingungen.

C. Über die Atmung des lebenden Kleeblattes

Die Atmung lebender pflanzlicher Gewebestücke ist schon wiederholt untersucht worden (zum Beispiel 3, 4, 6, 7, 14, 21, 28, 38). Wendet man dabei die manometrische Technik an, hat man zwei Möglichkeiten, um Einblick in den Reaktionsverlauf zu erhalten :

a) Man kann mit spezifischen Enzymgiften Reaktionen zu hemmen versuchen. Je spezifischer der Giftstoff, um so besser läßt sich das die Reaktion katalysierende Ferment charakterisieren.

b) Man kann verschiedene Substrate zum Gewebe zusetzen und ihren Abbau quantitativ zu erfassen versuchen.

Damit sind auch die Schwierigkeiten, die sich bei solchen Experimenten ergeben, umrissen. Es läßt sich nämlich nicht sagen, ob zugesetzte Giftstoffe und Substrate ohne weiteres und genügend rasch in die Zellen eindringen.

1. Die Behandlung des Blattmaterials

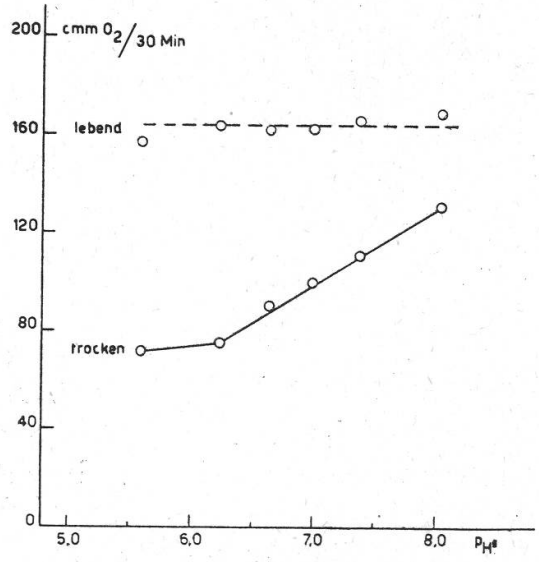
Die lebenden Blätter mußten vor der Messung zerkleinert werden. Mit einer scharfen Schere wurden Blattstücke von zirka 16 mm² Fläche hergestellt. Die Hauptrippe des Blättchens wurde stets verworfen. Durch die Verwundung eines Teils der Blattzellen ist eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme zu erwarten (2). Es zeigt sich aber, daß die Größe der Blattstücke und damit die Zahl der Schnittflächen ohne Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme ist.

Um das Eindringen blattfremder Stoffe zu erleichtern, wurden die Blattstücke unter dem Vakuum einer Wasserstrahlpumpe mit der entsprechenden Lösung infiltriert. Durch dieses Vorgehen wird der Sauerstoffverbrauch des Blattmaterials ganz unbedeutend herabgesetzt.

2. Das Aufschlämmedium

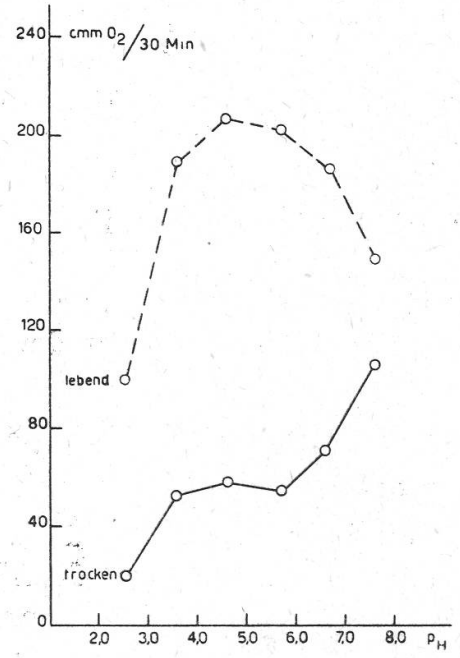
Häufig wurden Atmungsmessungen nur in Wasser ausgeführt. Ein Unterschied zwischen Aufschlämmung in Brunnenwasser und destilliertem Wasser ist nicht festzustellen. Wird als Medium Sörensenscher Phosphatpuffer (37) verwendet, kann keine Änderung gegenüber den Messungen in Brunnenwasser beobachtet werden. Die verschiedenen *p*H-Werte der Pufferlösungen haben keinen Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme der Blattschnitzel (Figur 2). Ganz anders ist der Verlauf der Atmung in Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (37). Wir stellen ein Maximum des Sauerstoffverbrauches bei einem *p*H von 4,6

fest (Figur 3). Dies muß in Zusammenhang stehen mit der Veratmung der Zitronensäure.



Figur 2
Die Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme lebenden und getrockneten Klees vom *p*H-Wert des Aufschlämmediums bei der Verwendung von Sörensenschem Phosphatpuffer. (Die aufgetragenen Q_{O_2}-Werte beziehen sich beim trockenen Material auf 200 mg Trokkenklee, beim lebenden Material auf 200 mg Frischgewicht. Würde man daher die Sauerstoffaufnahme für den lebenden und trockenen Klee auf die gleiche Trockengewichtsmenge berechnen, müßten die Q_{O_2}-Werte des lebenden Klees fünfmal größer sein)

Besonders bei der Anwendung von Giftstoffen muß streng auf das *p*H der Lösung geachtet werden. Vor jedem derartigen Versuch mußte das *p*H des Mediums bestimmt werden.



Figur 3
Die Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme lebenden und getrockneten Klees vom *p*H-Wert des Aufschlämmediums bei der Verwendung von Zitronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine. (Die aufgetragenen Q_{O_2}-Werte beziehen sich beim trockenen Material auf 200 mg Trockenklee, beim lebenden Material auf 200 mg Frischgewicht. Würde man daher die Sauerstoffaufnahme für den lebenden und getrockneten Klee auf die gleiche Trockengewichtsmenge berechnen, müßten die Q_{O_2}-Werte des lebenden Klees fünfmal größer sein)

3. Der Atmungskoeffizient

An lebenden Blattschnitzeln wurde in verschiedenen Jahreszeiten der Atmungskoeffizient (RQ) nach der direkten Methode (10, 40) bestimmt. Alle Werte liegen sehr nahe bei 1,0 (Tabelle 1).

Tabelle 1

Datum	Medium	RQ
15.4.48	Brunnenwasser	1,01
16.4.48	Brunnenwasser	1,02
1.6.48	Brunnenwasser	1,04
7.9.48	Brunnenwasser	0,97
21.4.49	Dest. Wasser	0,98
24.6.49	Dest. Wasser	1,00
17.4.50	Dest. Wasser	1,00
19.4.50	Dest. Wasser	1,00
20.4.50	Dest. Wasser	1,00
29.4.50	Phosphatpuffer *p*H 5,7	1,00

4. Vergiftungen

Die Zahl der streng spezifischen Enzymhemmstoffe ist klein, so daß es schwierig ist, die an der Sauerstoffaufnahme beteiligten Katalysatoren genau zu charakterisieren. Mit Hilfe dieser Giftstoffe läßt sich vor allem die sogenannte Terminaloxydase (4), die sich direkt mit dem Luftsauerstoff verbindet, erfassen.

In der Regel war die Konzentration der Giftlösungen 10^{-2}molar. Sie wurde durch Zusatz von Lauge oder Säure auf den gewünschten *p*H-Wert eingestellt.

Mit den bekannten auf schwermetallhaltige Enzyme wirkenden Giften Blausäure und Natriumazid (22) gelingt es leicht, die Sauerstoffaufnahme lebender Blattschnitzel auf weniger als 10 % zu reduzieren (Tabelle 2).

Tabelle 2

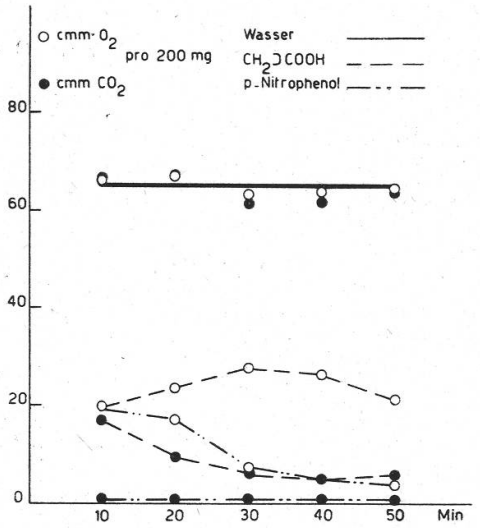
Medium	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Frischgewicht
Dest. Wasser	158,5
10^{-2}m HCN (*p*H 6,1) . .	12,1
10^{-2}m HN_3 (*p*H 4,4) . .	11,2

Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, daß ein schwermetallhaltiges Enzym die Sauerstoffaufnahme des Kleeblattes kontrolliert. Ob es sich dabei um ein Eisen- oder ein Kupferferment handelt, kann nicht entschieden werden. Da wir es mit einem photosynthetisch aktiven Gewebe zu tun haben, läßt sich die Reversibilität der CO-Vergiftung nicht ohne weiteres prüfen. Dies wäre jedoch notwendig, um zu entscheiden, ob die Cu-haltige Phenoloxydase oder die Fe-haltige Cytochromoxydase als Terminaloxydase wirksam ist (15).

Kupferhaltige Enzyme sollten sich indessen auch mit Diäthyldithiocarbamat und Salicylaldoxim hemmen lassen (1, 24, 29). Leider kann

trotz Infiltrierung des Blattgewebes mit diesen Kupfer ausfällenden Giftstoffen, selbst bei verschiedenen *p*H-Werten der Lösungen, keine eindeutige Hemmung der Sauerstoffaufnahme nachgewiesen werden.

Der auf dehydrierende Enzyme (Dehydrogenasen) wirkende Giftstoff Monojodazetat hemmt die Kohlendioxydabgabe mehr als die Sauerstoffaufnahme (Figur 4). Wir haben dadurch einen Hinweis auf die Bedeutung der Dehydrogenasen für den ganzen Atmungsmechanismus. Besondere Wichtigkeit müssen sie bei der Kohlendioxydbildung haben. Wenn daher in einer 10^{-2}molaren *p*-Nitrophenollösung überhaupt kein Kohlendioxyd mehr gebildet wird, ist anzunehmen, daß diese Substanz besonders auf Dehydrogenasen hemmend wirkt, obschon sie als spezifischer Phenoloxydasehemmstoff betrachtet wurde (4). Später wird sich zeigen, daß damit die Diphenoloxydation durch das Blattgewebe nicht



Figur 4
Die Vergiftung lebender Kleeblattschnitzel mit Dehydrogenasegiften. (Die aufgenommene und abgegebene Gasmenge bezieht sich auf 200 mg Frischgewicht)

beeinflußt werden kann. Die Tatsache, daß sich die Sauerstoffaufnahme des lebenden Klees mit diesem Giftstoff fast total hemmen läßt, ist daher kein schlüssiger Beweis für die Anwesenheit von Phenoloxydase (Figur 4). Eine ähnliche Wirkung wie *p*-Nitrophenol hat 4-Nitrobrenzkatechin. Malonsäure (Hemmstoff für Bernsteinsäuredehydrogenase) und Natriumfluorid (4, 39) haben eine kaum meßbare Herabsetzung der Kleeatmung zur Folge. Chloroformdämpfe, die ebenfalls die Wirkung von Dehydrogenasen unterbinden, hemmen die Atmung des lebenden Kleeblattes sehr stark (33). Dabei ist eine rasche Dunkelfärbung des Blattgewebes zu erkennen, die sich auch mit den anderen Dehydrogenasegiften (Monojodazetat, *p*-Nitrophenol) erzeugen läßt. Durch die Inaktivierung der Dehydrogenasen wird die Reduktion wahrscheinlich als Wasserstoffüberträger wirkender, phenolischer Stoffe verunmöglicht. Da sich oxydierte Phenole (Chinone) zu schwarzen Farbstoffen zusammenlagern, färbt sich das Blattgewebe dunkel.

5. Der Zusatz künstlicher Substrate

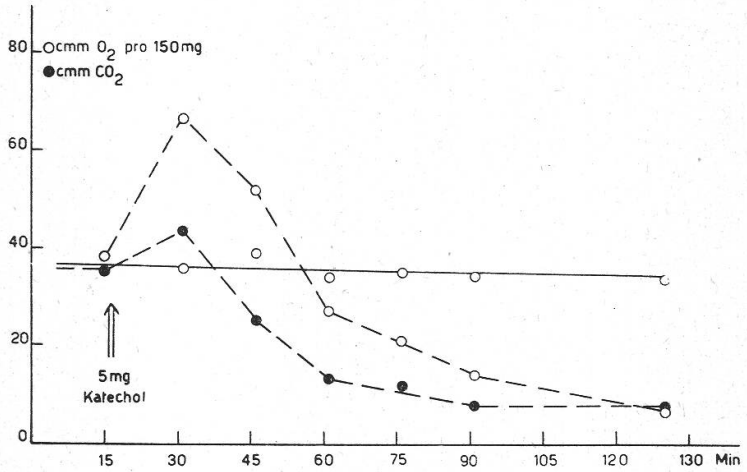
Durch Aufschlämmung von Kleeblattschnitzeln in 10^{-2}molarer Glukoselösung kann man ihre Sauerstoffaufnahme um mehr als einen Drittel steigern. Der Atmungskoeffizient bleibt dabei 1,0 (Tabelle 3).

Tabelle 3

	Dest. Wasser	10^{-2}molare Glukoselösung
QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Frischgewicht	98,3	137,0
QCO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Frischgewicht	97,3	139,0

Auf Grund von Farbreaktionen (Schwärzungen), die an Kleeblättern zu beobachten sind, wurde vermutet, Phenoloxydase könnte im Atmungsmechanismus dieser Blätter eine ähnliche Rolle spielen, wie sie für andere Gewebe schon nachgewiesen worden ist (3, 4, 6, 7).

Durch Zusatz von Brenzkatechin (Katechol) zu lebendem Blattmaterial gelingt es, die Sauerstoffaufnahme vorübergehend zu steigern. Bekanntlich haben aber die durch die Wirkung der Phenoloxydase ent-



Figur 5

Der Einfluß des Zusatzes von Brenzkatechin auf die Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe lebender Kleeblattschnitzel. Die aufgetragenen Werte beziehen sich auf 150 mg Frischgewicht. (Ausgezogene Linie: Sauerstoffaufnahme lebenden Klees ohne Brenzkatechinzusatz)

stehenden Reaktionsprodukte einen hemmenden Einfluß auf dieses Enzym (29). Die Hemmung des Sauerstoffverbrauches nach Zusatz von Brenzkatechin (Figur 5) soll ein Maß für den Anteil der Phenoloxydase am ganzen Atmungsmechanismus geben (3, 7). Demnach würde im Kleeblatt ungefähr 80 % der Sauerstoffaufnahme durch die Phenoloxydase bewirkt. Befindet sich das Blattmaterial in 10^{-2}molarer Blausäure-

lösung (*p*H 6,1), hat Brenzkatechinzusatz keinen Einfluß auf die stark gehemmte Sauerstoffaufnahme.

Zusatz von Dioxyphenylalanin (Dopa) ergibt keine Veränderung des Sauerstoffverbrauches. Es scheint, daß diese Substanz nicht ins Gewebe einzudringen vermag (Tabelle 4).

Tabelle 4

Zusatz von dl-3,4-Dioxyphenylalanin zu lebendem Klee. Die Blattschnitzel wurden mit der 10^{-2}molaren Lösung infiltriert

Medium	QO_2	QCO_2
	in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Frischgewicht	
Dest. Wasser	236,0	234,0
10^{-2}molare Dopalösung (*p*H 5,5)	231,0	226,0

D. Versuche mit Kleehomogenat

Bei der Zertrümmerung des Gewebes mit einem Blendor (40) ist zu erwarten, daß die Enzyme des Blattes ungeschädigt bleiben. Die rasche Dunkelfärbung des Homogenates weist aber auf eine Störung des Zusammenspiels der enzymatischen Reaktionen und auf eine Einwirkung von Fermenten auf Substrate hin, die im lebenden Gewebe voneinander getrennt sind.

Eine bestimmte Menge von mit der Schere zerschnittenen Blättern wurde zweimal zwei Minuten in Wasser oder in Giftlösung mit dem Blendor behandelt. Hierauf wurde das Homogenat durch eine vierfache Schicht Gaze gepreßt, um die gröbsten Zellwandtrümmer zu entfernen.

Homogenisierte Kleeblätter nehmen praktisch keinen Sauerstoff mehr auf (Tabelle 5). Die Atmungsprozesse sind an intakte Zellen gebunden.

Tabelle 5

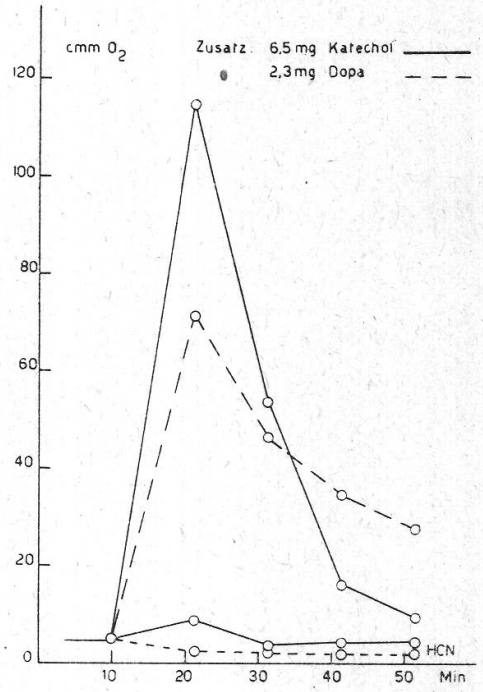
Medium	Material	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Frischgewicht
Dest. Wasser	Kleeschnitzel	249,0
Dest. Wasser	Kleehomogenat	7,9

Der Zusatz von Diphenolen

Der Zusatz von Brenzkatechin (Katechol) und dl-3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa) zu Kleehomogenat von einem *p*H-Wert von 6,2 hat einen raschen Anstieg des Sauerstoffverbrauches zur Folge. Mit 10^{-2}molarer Blausäure ist diese Phenoloxydation total hemmbar (Figur 6). Diphenol-

zusatz zu Homogenat aus Luzerneblättern (*Medicago sativa* L.) bleibt ohne Wirkung. Nicht alle Blätter besitzen demnach die Fähigkeit, solche phenolische Stoffe zu oxydieren.

p-Nitrophenol bleibt ohne Einfluß auf die starke Steigerung der Sauerstoffaufnahme. Mit Diäthyldithiocarbamat kann die Oxydation von Dopa etwas gehemmt werden.



Figur 6
Der Einfluß des Zusatzes von Diphenolen auf die Sauerstoffaufnahme von Kleehomogenat. Mit 10^{-2}molarer Blausäure läßt sich die Diphenoloxydation vollständig hemmen. (Die Homogenatmenge pro Kölbchen entspricht 200 mg frischem Klee)

Zusatz von Askorbinsäure zum Homogenat, wie er für die Aktivitätsbestimmung der Phenoloxydase vorgeschrieben wird (1, 29), bleibt auf die Oxydation der nachher zugesetzten Phenole ohne Wirkung. Die Sauerstoffaufnahme klingt ebenso rasch ab wie ohne dieses Reduktionsmittel.

E. Über Versuche mit getrockneten Blättern

Daß auch im vorsichtig getrockneten Blatt unter gewissen Bedingungen enzymatische Reaktionen ablaufen können, ist heute wohl eine allgemein anerkannte Tatsache, trotzdem die experimentellen Beweise dafür spärlich sind.

Unser Blattmaterial wurde eine Nacht im Thermostaten bei 45° getrocknet. Dadurch wird der Wassergehalt des Blattes auf 10 % (bezogen auf Trockengewicht) herabgesetzt. Das trockene Gewebe wurde mit Hilfe von zwei Sieben in Stücke von zirka 1 mm² Fläche aufgeteilt (16), die nur in Ausnahmefällen noch mehr zerkleinert wurden. Mit derartig präpariertem Material wurden alle folgenden Versuche ausgeführt.

Die Zwischenstufen, die beim Trocknungsprozeß bis zur Erreichung eines Wassergehaltes von 10 % auftreten, wurden nicht untersucht.

1. Das Aufschlämmedium

Durch die Trocknung verlieren die Zellen ihre Semipermeabilität. Zellinhaltsstoffe können leichter aus der Zelle herausgelöst werden und Giftstoffe und künstliche Substrate dringen rascher ins Zellinnere (30). Die Art des Mediums wird daher wegen der Beseitigung des Permeabilitätswiderstandes von besonderer Bedeutung sein.

Von großer Wichtigkeit ist die Tatsache, daß die Sauerstoffaufnahme des Trockenklees vom Kohlendioxydgehalt des Mediums und der Gasatmosphäre abhängig ist. Da bei der Bestimmung der Sauerstoffaufnahme nach der direkten Methode das Kohlendioxyd quantitativ von der Lauge des Einsatzes absorbiert wird, ist der CO_2-Druck im Kölbchen gleich null. Läßt man aber bei einer Messung über eine Zeitspanne von einer Stunde die Lauge nach der Methode von Dixon und Keilin (10) erst 30 Minuten nach Versuchsbeginn in das Einsatzröhrchen einfließen, stellt man, verglichen mit dem Material, dem von Anfang an Lauge zugesetzt war, eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches um beinahe das Doppelte fest (Tabelle 6).

Tabelle 6

	Medium	QO_2 in cmm pro Stunde pro 150 mg trockener Klee
Lauge von Anfang an zugesetzt	Dest. Wasser	166,0
Lauge erst 30 Min. nach Versuchsbeginn zugesetzt	Dest. Wasser	312,0

Sättigt man das destillierte Wasser mit $Ca(HCO_3)_2$, stellt man eine vermehrte Sauerstoffaufnahme fest. Man mißt dabei dieselbe Sauerstoffmenge wie in Brunnenwasser-Aufschlämmung (Tabelle 7).

Tabelle 7

Medium	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Trockenklee
Dest. Wasser	110,3
Brunnenwasser	171,1
Bikarbonat in dest. Wasser gelöst	168,0

Die Kalziumionen haben dabei keinen Einfluß. Setzt man eine entsprechende Menge $CaCl_2$ zu destilliertem Wasser, bleibt der Sauerstoffverbrauch des Trockenklees unverändert.

Bei der Verwendung verschiedener Pufferlösungen als Aufschlämmmedium ist immer ein Anstieg des Sauerstoffverbrauches zu beobachten, wenn das *p*H des Puffers über 6,0 steigt (Figuren 2 und 3). Das Optimum der Phenoloxydaseaktivität soll zwischen den *p*H-Werten 6,0 und 8,0 liegen (32). Die gefundene Zunahme der Oxydationsvorgänge bei einem *p*H-Wert über 6,0 kann aber ebensogut auf die CO_2-Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches zurückzuführen sein. Beim Gebrauch von Zitronensäurepuffer ist das beim lebenden Blatt stark betonte Maximum bei einem *p*H von zirka 4,5 fast verschwunden. In der Tat bleibt Zitronensäurezusatz zu Trockenklee ohne Einfluß.

Beim Aufschlämmen von Trockenklee in Wasser werden Stoffe aus den Zellen herausgelöst, die als Puffersubstanzen wirken und einen *p*H-Wert des Mediums von 6,1 bis 6,6 zur Folge haben, der auch bei einer Versuchsdauer von mehr als einer Stunde konstant bleibt. Aus diesem Grunde wurde meistens ohne Puffer gearbeitet.

Mit Antiseptica gesättigtes Wasser hat keinen hemmenden Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme des Trockenklees. Besonders in Chloroformwasser kann eine ausgeprägte Steigerung der Oxydationen festgestellt werden. Es könnte das mit der durch Chloroformdämpfe vergrößerten Phenolaseaktivität in Zusammenhang gebracht werden (32).

10^{-4}molare $FeSO_4$- und $CuSO_4$-Lösungen als Medium sind ohne Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme des Trockenklees. Dies ist von Bedeutung, da besonders Zucker in schwermetallhaltigen Lösungen leicht autoxydiert werden (23).

Da eine Aufschlämmung des Trockenklees in Kleehomogenat die Sauerstoffaufnahme, verglichen mit der Messung in Wasser, nicht verändert, ist nicht anzunehmen, daß aus dem trockenen Material Stoffe herausgelöst werden, die noch durch blatteigene Enzyme oxydierbar sind.

2. Der Verlauf der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxydabgabe bei aufgeschlämmtem Trockenklee

Beim Vergleich zwischen der Sauerstoffaufnahme lebender und getrockneter aufgeschlämmter Blattstücke stellt man fest, daß die Oxydationen im getrockneten Material sehr rasch abklingen (Figuren 10 und 11). Diese Tatsache kann zwei Gründe haben :

a) das oxydierbare Substrat wird sehr rasch verbraucht;

b) die für den oxydativen Abbau verantwortlichen Oxydasen werden durch die entstandenen Oxydationsprodukte oder durch den Einfluß der Versuchstemperatur inaktiviert.

Die beiden Möglichkeiten müssen experimentell geprüft werden.

Die Bestimmung des produzierten Kohlendioxyds stößt wegen der CO_2-Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme auf Schwierigkeiten. Der

Atmungskoeffizient wurde deshalb nach der zweiten Methode von Dickens und Simer (9) mit Kölbchen, wie sie von Dixon und Keilin vorgeschlagen wurden (10), zu bestimmen versucht. Bei dieser Methode wird am Ende des Versuches durch Zusatz von Säure die am Gewebe festgehaltene Kohlensäure befreit und nachher durch die zugefügte Lauge quantitativ absorbiert. Bei Aufschlämmung in Brunnenwasser erhielten wir Atmungskoeffizienten von 0,57 und 0,58, trotzdem es dabei nicht gelingt, durch Zusatz von Säure die Sauerstoffaufnahme des Blattmaterials vollständig zu stoppen. Häufiger wurde aus diesem Grund der Atmungskoeffizient zur Orientierung nach der direkten Methode (10) bestimmt, obwohl diesen Werten keine absolute Bedeutung zukommt (Tabelle 8).

Tabelle 8

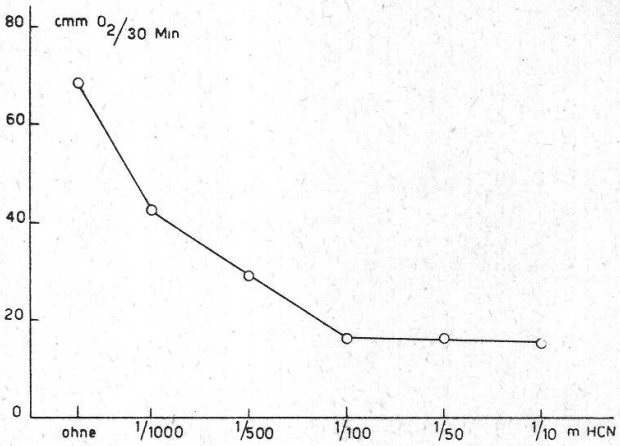
Datum	Medium	Atmungs-koeffizient
7. 9.48	Phosphatpuffer *p*H 5,5	0,54
6.12.48	Dest. Wasser	0,55
8. 4.49	Dest. Wasser	0,53
16. 5.49	Dest. Wasser	0,55
2. 8.49	Dest. Wasser	0,58
14. 2.50	Dest. Wasser	0,51
23. 2.50	Dest. Wasser	0,59
28. 2.50	Dest. Wasser	0,55
28. 4.50	Phosphatpuffer *p*H 5,7	0,53

3. Vergiftungen

Wegen des Verlustes der Permeabilitätswiderstände ist auch hier zu erwarten, daß Giftstoffe rascher zu den entsprechenden Fermenten gelangen. Es kamen die gleichen Enzymgifte zur Anwendung, die bereits bei lebenden Blattstücken gebraucht wurden. Die Resultate mußten mit Vorsicht beurteilt werden, da an Trockenklee leicht Autoxydationen auftreten.

a) Giftstoffe für schwermetallhaltige Enzyme

Auch mit hohen Blausäurekonzentrationen gelingt es nicht, die Sauerstoffaufnahme aufgeschlämmten Trockenklees vollständig zu hemmen (Figur 7). Nur in wenigen Fällen ist es geglückt, den Sauerstoffverbrauch um mehr als 80 % zu vermindern, obwohl die an inaktivem Blattmaterial bestimmte Autoxydation der Blausäure ganz gering ist. Mit welchen Oxydationsvorgängen die restliche, mit Blausäure nicht vergiftbare Sauerstoffaufnahme zusammenhängt, können wir nicht sagen. Bekanntlich sind pflanzliche Oxydasen gegen Blausäure weniger empfindlich als tierische (34).



Figur 7
Die Vergiftung der Sauerstoffaufnahme von Trockenklee mit verschieden konzentrierter Blausäurelösung. (Die QO_2-Werte verstehen sich für 200 mg Trockenklee.)

Die Hemmung mit Natriumazid ist stark *p*H-empfindlich. Bei einem *p*H-Wert der Giftlösung, der kleiner ist als 5,0, können die Oxydationen mit diesem Stoff im getrockneten Blatt ganz unterdrückt werden (Tabelle 9).

Tabelle 9

Medium	*p*H-Wert	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Trockenklee	
		Ohne Gift	10^{-2}m HN_3
Dest. Wasser	Giftlösung *p*H 4,4	65,0	0,0
Zitronensäurephosphat-puffer	4,4	70,0	0,0

Mehrmals wurde versucht, die Sauerstoffaufnahme des Trockenklees mit Kupferproteidhemmstoffen zu beeinflussen. Trotz Veränderung der *p*H-Werte der Giftlösungen lassen sich die Oxydationen im Blattmaterial nicht hemmen (Tabelle 10).

Tabelle 10

Medium	*p*H-Wert	QO_2 in cmm pro Min. pro 200 mg Trockenklee
Zitronensäurephosphatpuffer	3,9	55,7
+0,5.10^{-2}m Diäthyldithiocarbamat . .	3,9	57,8
Zitronensäurephosphatpuffer	5,6	65,1
+10^{-2}m Diäthyldithiocarbamat . . .	5,4	77,8
+10^{-2}m Salicylaldoxim	5,9	68,5
Zitronensäurephosphatpuffer	6,7	66,7
+0,5.10^{-2}m Diäthyldithiocarbamat . .	6,7	74,0

Mit Diäthyldithiocarbamat kann eine schwache Steigerung der Sauerstoffaufnahme festgestellt werden, da diese unbeständige Substanz leicht oxydativ zersetzt wird.

b) Dehydrogenasengifte

Monojodessigsäure gibt zwischen den *p*H-Werten 4,0 bis 7,0 bei einer Konzentration von 10^{-2} Mol nie eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme des Trockenklees (Tabelle 11). Eine 10^{-2}molare *p*-Nitrophenollösung erweist sich trotz verschiedenen *p*H-Werten ungiftig. Malonsäure und Natriumfluorid, die auch auf das lebende Blatt ohne Einfluß sind, haben auch die Oxydationen im trockenen Material nicht verändert.

Tabelle 11

Datum	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Trockenklee		
	Ohne Gift	10^{-2}molare CH_2JCOOH-Lösung	*p*H-Wert
23. 6.49	65,0	64,7	4,1
2. 7.49	79,5	82,2	4,1
17.11.49	68,7	71,7	6,4
15. 4.50	84,5	94,0	5,3
17. 4.50	60,1	64,3 (2.10^{-2}molar!)	6,2

4. Der Zusatz neuer Substrate zu aufgeschlämmtem Trockenklee

a) Künstliche Substrate

Zusatz von Glukose bleibt, im Gegensatz zu lebenden Kleeblattschnitzeln, ohne Einfluß auf die Oxydationsvorgänge im trockenen Material (Tabelle 12).

Tabelle 12

Medium	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Trockenklee	
Dest. Wasser	60,1	61,8
10^{-2}molare Glukoselösung	60,9	58,0

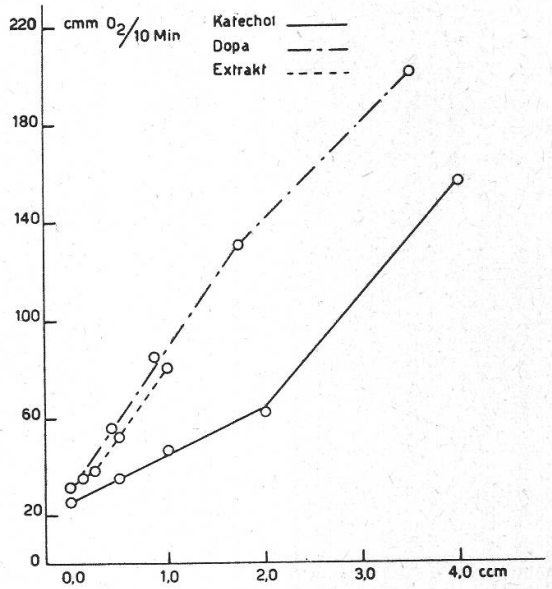
Erwartungsgemäß bewirkt die Zugabe verschiedener Phenole zu Trockenklee einen starken Anstieg des Sauerstoffverbrauches. Dieser Anstieg der Sauerstoffaufnahme kann zwei Ursachen haben, wenn man die Autoxydation, die an Gewebeoberflächen ablaufen kann, ausschließt:

α. Die zugesetzte Substanz kann direkt von einem bestimmten Enzym oxydiert werden, ohne daß das entstehende Oxydationsprodukt weiter verändert wird.

β. Die zugesetzte Substanz wirkt als Katalysator (zum Beispiel Wasserstoffüberträger). Sie wird nach ihrer Oxydation sofort wieder reduziert und kann dadurch erneut oxydiert werden. Die Sauerstoff-

aufnahme ist in diesem Falle nicht von der Menge des zugesetzten Stoffes abhängig.

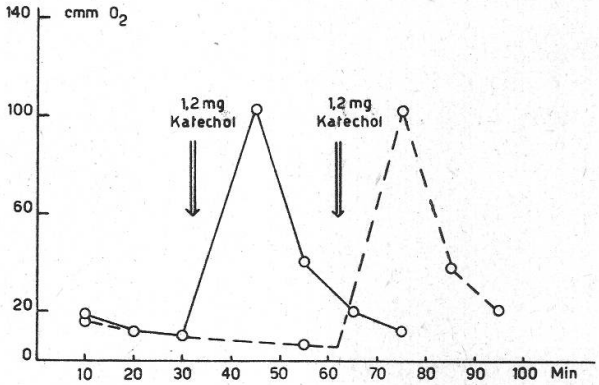
Die Tatsache, daß die Sauerstoffaufnahme proportional der zugesetzten Menge Diphenol ist, zeigt, daß die erste Möglichkeit verwirklicht ist (Figur 8).



Figur 8
Die Steigerung der Sauerstoffaufnahme von Trockenklee durch Diphenol- und Klee-Extraktzusatz ist abhängig von der zugesetzten Substratmenge. (Auf der Abszisse ist die Menge 10^{-2}molarer Diphenollösung in ccm pro 7 ccm Medium aufgetragen. Die QO_2-Werte beziehen sich auf 200 mg Trockenklee.)

Der Einfluß von Brenzkatechin (Katechol) und dl-3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa) auf getrockneten Klee wurde etwas genauer untersucht, denn wir glaubten, durch Zusatz dieser Substanzen die enzymatische Aktivität der getrockneten Blätter einigermaßen charakterisieren zu können. Bei diesen Versuchen hat sich folgendes ergeben:

a_1) Es läßt sich während der Dauer des Versuches keine Inaktivierung der phenoloxydierenden Enzyme feststellen, da auch Diphenol-

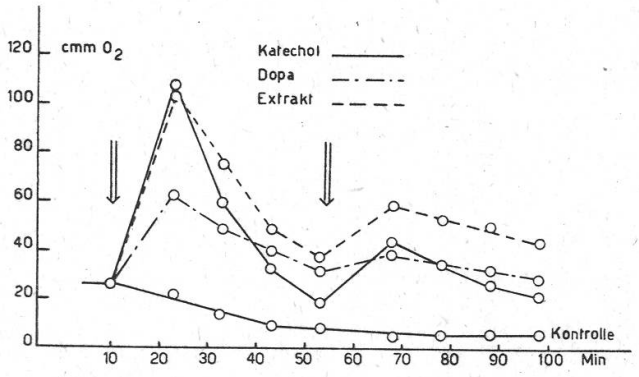


Figur 9
Der Zeitpunkt des Brenzkatechinzusatzes ist ohne Einfluß auf den Anstieg des Sauerstoffverbrauches von Trockenklee. Die Oxydasen werden während der Dauer des Versuches nicht inaktiviert. (Die QO_2-Werte beziehen sich auf 150 mg Trockenklee.)

zusatz zu einem späteren Zeitpunkt denselben Anstieg der Sauerstoffaufnahme zur Folge hat (Figur 9).

a_2) Wie bereits auf Seite 441 erwähnt, wird die Phenoloxydase durch die Reaktionsprodukte der durch sie katalysierten Reaktion inaktiviert

(3, 7, 29, 32). Nach einem zweiten Zusatz von Diphenolen kann daher nicht mehr dieselbe Steigerung der Sauerstoffaufnahme gemessen werden wie nach dem ersten. Auch an Trockenklee ist diese Erscheinung zu beobachten (Figur 10), die besonders eingehend an Kartoffelknollengewebe untersucht worden ist (3).



Figur 10
Durch die Wirkung der Phenoloxydase entstehen Reaktionsprodukte, die die weitere Oxydation von Diphenolen und Klee-Extrakt hemmen. Bei einem zweiten Zusatz derselben Mengen Diphenol und Extrakt ist der Anstieg des Sauerstoffverbrauches nur noch unbedeutend. (Die langsam abfallende, ausgezogene Linie entspricht den QO_2-Werten, die in Wasseraufschlämmung ohne Substratzusatz gemessen werden können. Die QO_2-Werte beziehen sich auf 115 mg Trockenklee.)

a_3) Genau wie bei Kleehomogenat kann die Oxydation der zugesetzten Diphenole mit 10^{-2}molarer Blausäure und 10^{-2}molarem Azid total gehemmt werden. Diäthyldithiocarbamat, *p*-Nitrophenol, Askorbinsäure und Monojodessigsäure sind ohne Einfluß auf den Verlauf der Sauerstoffaufnahme bei Diphenolzusatz.

a_4) Durch mehrstündiges Auswaschen des getrockneten Klees läßt sich das natürliche Substrat aus dem Blattmaterial beseitigen. Nach der Trocknung im Vakuum über Silikagel weisen so behandelte Blattstücke in Wasseraufschlämmung keinen Sauerstoffverbrauch mehr auf. Gibt man aber Diphenole zu diesem Material, ist eine starke Steigerung der Sauerstoffaufnahme zu beobachten, die sich gleich charakterisieren läßt wie bei nicht ausgewaschenem Trockenklee. Die wirksame Oxydase läßt sich also nicht durch Auswaschung aus den zuvor getrockneten Zellen beseitigen.

Es ist kaum möglich, daß es sich bei dieser Phenoloxydation nur um durch Schwermetalle katalysierte Autoxydationen an den Gewebeoberflächen handelt, da der Zusatz derselben Stoffe zu Luzerneblättern, Blättern von *Tropaeolum majus* und Trockenhefe keine Veränderung der Sauerstoffaufnahme zur Folge hat.

b) Natürliches Substrat

Mit Blausäure läßt sich der oxydative Abbau der im trockenen Blatt vorhandenen oxydierbaren Substanzen hemmen. Das nicht oxydierte Substrat kann mit Blausäurewasser aus den Zellen extrahiert werden.

Fein gemahlenes Blattmaterial wird während einer Stunde in einer 10^{-2}molaren Blausäurelösung gründlich gerührt. Nach der Beseitigung der Blattreste setzt man zum Filtrat die gleiche Menge 95prozentigen Alkohol. Die dabei ausfallenden Eiweißstoffe werden wegfiltriert, und die restliche Lösung wird auf dem Wasserbad eingedampft, wobei noch allfällig vorhandene Blausäure entweichen kann.

Der Zusatz so hergestellten Extraktes zu Trockenklee ergibt einen starken Anstieg der Sauerstoffaufnahme (Figuren 8 und 10), der sich genau gleich charakterisieren läßt wie der durch die Oxydation von Diphenolen erzeugte gesteigerte Sauerstoffverbrauch (Hemmung mit HCN und HN_3, Inaktivierung der Oxydase).

Mit Wasser ohne Blausäure nach derselben Vorschrift hergestellter Extrakt ist völlig unwirksam. In ihm sind keine Stoffe mehr vorhanden, die durch die Oxydasen des Trockenklees noch oxydiert werden könnten.

Durch diese Versuche mit natürlichen und künstlichen Substraten läßt sich der Beweis erbringen, daß das unter E2 beschriebene rasche Abklingen der Sauerstoffaufnahme von aufgeschlämmtem Trockenklee mit dem raschen Verbrauch der oxydierbaren Stoffe des Blattes in Zusammenhang steht, da ja eine Reduktion des einmal oxydierten Substrates wegen der Inaktivierung der Dehydrogenasen durch die Trocknung nicht mehr möglich ist. Der Zusatz neuer oxydierbarer Substanzen zum aufgeschlämmten Material hat wieder einen Anstieg der Sauerstoffaufnahme zur Folge, da die blatteigenen Oxydasen noch aktiv sind.

5. Über die enzymatischen Oxydationen in Blattmaterial von verschiedenem Wassergehalt

Der Verlauf des Temperaturanstieges in gestapelten Pflanzenmassen ist abhängig vom Wassergehalt des Blattmaterials (20, 31). Es muß deshalb von besonderem Interesse sein, wie sich die Oxydationsprozesse in Trockenklee von verschiedenem Wassergehalt abspielen.

a) Methodisches

Um dieses Problem in Angriff zu nehmen, konnten wir eine von Grob (16) ausgedachte Methode verwenden, bei der eine mit Dekalin (Dekahydronaphthalin von einem Siedepunkt von 188°) oder *Paraffinum perliquidum* als Dispersionsmittel und *Adeps lanae* als Emulgator hergestellte Wasseremulsion vorgeschlagen wurde. Bei diesem Vorgehen sind durch Ionen katalysierte Nebenreaktionen in wässeriger Lösung ausgeschlossen, so daß streng nur die Oxydationen im Blatt selber erfaßt werden.

Die Versuche, die bei einer Schüttelfrequenz von 180 Umdrehungen pro Minute ausgeführt wurden, erfüllten alle Bedingungen, die bei manometrischen Arbeiten gefordert werden (lineare Abhängigkeit der Sauer-

stoffaufnahme von der Trockenkleemenge, keine Veränderung oder eher eine Verminderung des Sauerstoffverbrauches bei Messungen in reiner Sauerstoffatmosphäre). Voraussetzung bei den Messungen ist allerdings, daß die Ablesungen ohne Unterbrechung des Schüttelmechanismus ausgeführt werden, da sonst aus unbekannten Gründen ein rascher Druckanstieg zu beobachten ist.

Auf 100 cm³ Dekalin oder *Paraffinum perliquidum* mit 0,5 g *Adeps lanae* gibt man die berechnete Menge Wasser und erhält mit Hilfe eines Blendors eine beständige Emulsion.

Die Atmung lebender Kleeschnitzel wird durch Aufschlämmung in Dekalin auf 3 % des Wertes in Wasser herabgesetzt (Tabelle 13). Langes Auswaschen von Trockenklee mit wasserfreiem Dekalin und nachfolgende Trocknung bleibt ohne hemmenden Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme des später in Wasser aufgeschlämmten Materials (Tabelle 13). Dasselbe kann man bei der Behandlung des Trockenklees mit absolutem Alkohol beobachten. Die Fähigkeit des Trockenklees, Brenzkatechin zu oxydieren, wird durch die Behandlungen mit diesen organischen Flüssigkeiten ebenfalls nicht gehemmt (Tabelle 13).

Tabelle 13

Material	Medium	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Trockenklee		
		Behandlung mit		Ohne Behandlung
		Dekalin	absol. Alkohol	
Trockenklee	Dest. Wasser	138,0	102,0	90,8
Trockenklee	$0{,}5.10^{-2}$m Katechol	393,6	336,0	327,0
Lebende Kleeschnitzel	Dest. Wasser	20,0	—	600,0

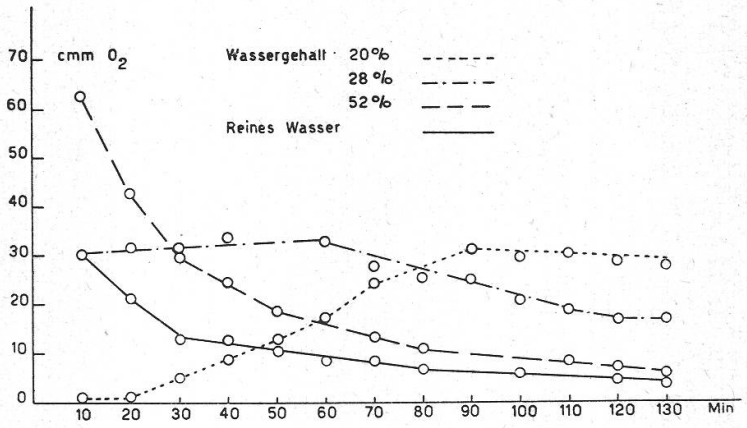
Dekalin hat demnach keine hemmende Wirkung auf die sich im Trockenklee abspielenden Oxydationen. Da seiner geringen Viskosität wegen das Wasser von den Kleeblattstückchen rascher aufgenommen wird als im ebenfalls äußerst indifferenten Paraffinöl, wurde Dekalin für die Messungen gebraucht.

b) Resultate

Messen wir die Sauerstoffaufnahme von Trockenklee verschiedenen Wassergehaltes, stellen wir am Anfang des Versuches ein Maximum des Gasverbrauches bei Material mit 40 bis 45 % Feuchtigkeit fest (versteht sich immer bezogen auf Trockengewicht) (Figur 12). Bei hohem Wassergehalt klingt aber der Sauerstoffverbrauch sehr rasch ab, und je länger der Versuch dauert, um so mehr verschiebt sich die maximale Gasaufnahme pro Zeiteinheit gegen Blattmaterial mit geringerem Feuchtigkeits-

gehalt (Figur 11). 30 % Wassergehalt ergibt während langer Zeit eine fast konstante Sauerstoffaufnahme, während bei Klee mit einem Wassergehalt von nur 20 % der Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit mit der Dauer des Versuches langsam ansteigt (Figur 11). *Die enzymatische Oxydation des Substrates im trockenen Kleeblatt verläuft um so rascher, je größer der Wassergehalt des Blattmaterials ist.*

Bei in reinem Dekalin aufgeschlämmtem Trockenklee stellt man keinen Sauerstoffverbrauch fest. Die oxydierbaren Stoffe sind darin noch unversehrt erhalten. Durch Zusatz von Wasser im Überschuß werden sie sofort oxydiert. Setzt man dieselbe Wassermenge zu Blattmaterial mit größerem Wassergehalt, bei dem also bereits ein teilweiser oxydativer Abbau des Substrates stattgefunden hat, kann nicht mehr die



Figur 11
Der Verlauf der Sauerstoffaufnahme von Trockenklee ist abhängig vom Wassergehalt des Materials. (Die QO_2-Werte beziehen sich auf 200 mg Trockenklee.)

gleiche Steigerung der Sauerstoffaufnahme durch den Wasserzusatz beobachtet werden (Figur 12). Je mehr vom Substrat bereits oxydiert worden ist, d. h. mit andern Worten, je größer der Wassergehalt des Trockenklees ist, um so geringer ist der Einfluß nachträglich zugesetzten Wassers. Wir schließen daraus, daß das oxydierbare Substrat im getrockneten Blatt einer ganz bestimmten Menge entspricht.

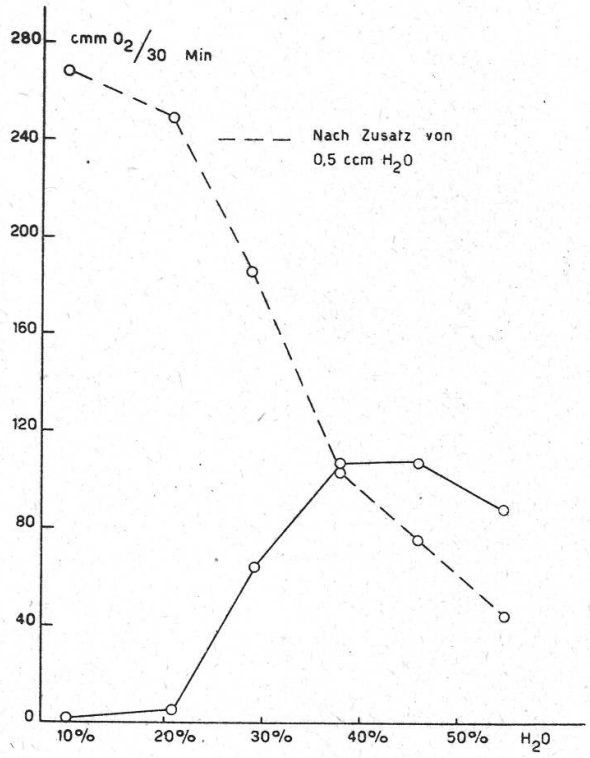
Es ist aus diesem Grunde begreiflich, daß bei der Aufschlämmung in reinem Wasser der Hauptteil der Oxydationsprozesse im Blatt während der Zeit abläuft, die zur Einstellung des Temperaturgleichgewichtes gebraucht wird und daher nicht erfaßt werden kann. Damit erklärt sich die Tatsache, daß fein gemahlenes Material bei gleicher Behandlung weniger durch die Messung erfaßbaren Sauerstoff aufnimmt als große Blattstücke. Bei jenem findet die Benetzung und damit auch der oxydative Abbau rascher statt als bei diesem. Ähnlich sind die Verhältnisse bei der Verwendung von *Paraffinum perliquidum* als Dispersionsmittel,

bei dem wegen seiner hohen Viskosität die Wassertröpfchen langsamer zum Trockenklee gelangen als im viel dünnflüssigeren Dekalin. Bei gleichem Wassergehalt der Emulsionen ist daher die Sauerstoffaufnahme in Dekalin scheinbar geringer als in Paraffinöl.

6. Die gesamte Sauerstoffaufnahme von Trockenklee

Die im getrockneten Kleeblatt vorhandene oxydierbare Substratmenge besitzt eine bestimmte Größe. Man hat drei Möglichkeiten, um den gesamten Sauerstoff zu erfassen, der zur Oxydation dieser Stoffe aufgenommen werden muß:

a) Man kann zu trockenem Klee während des Versuches Wasser zusetzen. Da aber die Menge des zugegebenen Wassers wegen der



Figur 12
Die Sauerstoffaufnahme ist abhängig vom Wassergehalt des Trockenklees. Bei späterem Zusatz von Wasser erkennt man an der Zunahme des Sauerstoffverbrauches die Menge des noch vorhanden gewesenen oxydierbaren Substrates. (Die QO_2-Werte beziehen sich auf 150 mg Trockenklee.)

Kleinheit der Ansatzbirnen beschränkt ist, ist die Benetzung und damit auch die meßbare Sauerstoffaufnahme unregelmäßig.

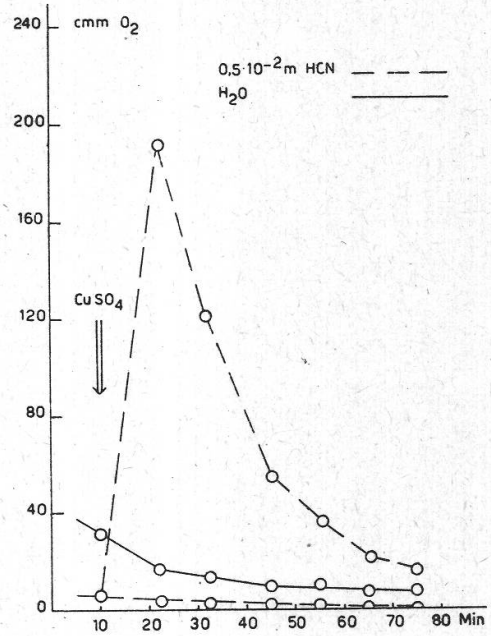
b) Man kann den Klee in reinem Dekalin aufschlämmen, Wasser zusetzen und dann die Gesamtheit der Oxydationsprozesse quantitativ erfassen (Figur 12).

c) Mit Blausäure lassen sich die oxydativen Vorgänge im getrockneten Blatt fast vollständig hemmen. Durch den Zusatz von $CuSO_4$ kann die Blausäurehemmung rückgängig gemacht werden (24). Die Oxydation des vorhandenen Substrates läuft dann ungehindert und quantitativ erfaßbar ab. Wir stellen nach der Zugabe von $CuSO_4$ einen starken Anstieg der Sauerstoffaufnahme fest

(Figur 13). Verwendet man Klee, dessen oxydierbare Stoffe vor dem Versuch ausgewaschen wurden, fällt bei den gleichen angegebenen Bedingungen erwartungsgemäß der Anstieg des Sauerstoffverbrauches weg. $CuSO_4$ zu in Wasser aufgeschlämmtem Trockenklee zugesetzt, hat keine meßbare Erhöhung der Oxydationen im Blatt zur Folge (Figur 13). Die beobachtete Erscheinung läßt sich vollständig durch die Reversibilität der Blausäurehemmung der Oxydationsfermente erklären.

7. Über den Einfluß verschiedener Temperaturen auf den Trockenklee

Die Erhitzung des Trockenklees erfolgte in zugeschmolzenen Ampullen, um den Wassergehalt des Materials konstant zu halten (16). Die



Figur 13
Die Blausäurehemmung kann durch $CuSO_4$ rückgängig gemacht werden. Die gesamte Sauerstoffaufnahme von Trockenklee läßt sich auf diese Art und Weise erfassen. (Die Q_{O_2}-Werte beziehen sich auf 150 mg Trockenklee)

Ampullen waren mit Luft gefüllt. Die Erhitzungsdauer kann zwischen einer Stunde und drei Stunden variieren, ohne daß sich die Sauerstoffaufnahme verändert. Die Proben wurden jeweils zwei Stunden der angegebenen Temperatur ausgesetzt.

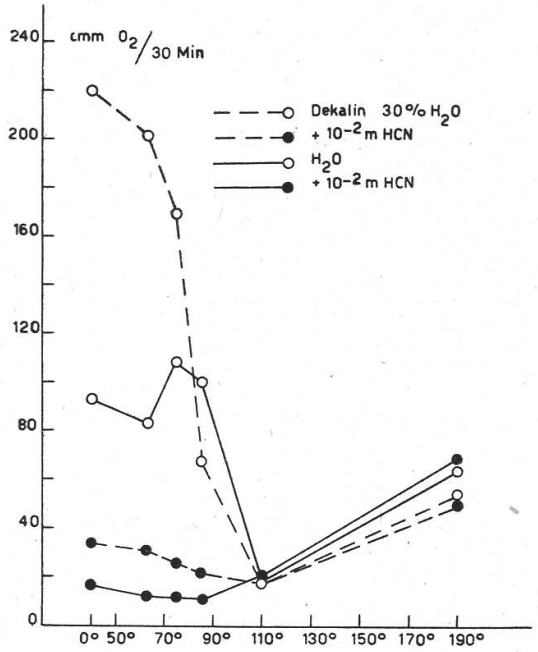
Erhitzt man 200 mg Trockenklee mit einem Wassergehalt von 10 % in Ampullen in einem Temperaturbereich zwischen 50° und 180° und bestimmt nachher die Sauerstoffaufnahme in Wasseraufschlämmung, erhält man eine auch für Tabak nachgewiesene Minimumkurve (16) (Figur 14).

a) Die enzymatischen Oxydationen

Um die Hitzeinaktivierung der Oxydasen des Trockenklees zur Darstellung zu bringen, bestimmt man die Sauerstoffaufnahme nach der

Erhitzung, am besten in Dekalinaufschlämmung. Es zeigt sich dabei, daß Vorerwärmung auf 80° eine Herabsetzung der Oxydationsprozesse auf die Hälfte bedingt (Figur 14). Da nur Enzymreaktionen mit Blausäure hemmbar sind, kann man aus Figur 14 herauslesen, daß bei einer Temperatur von 110° alle Fermente zerstört werden.

Bei der wässerigen Aufschlämmung von auf zirka 80° vorerwärmtem Trockenklee bestimmt man einen größeren Sauerstoffverbrauch als bei unbehandeltem Material. Getrocknete Blätter anderer Pflanzen (Luzerne, Gerste) zeigen diese Erscheinung nicht. Da dieses Maximum bei Blausäurevergiftung verschwindet, haben wir es dabei nicht mit dem Auftreten von Autoxydationen zu tun. Eine Vermehrung der Substratmenge durch die Wärmevorbehandlung ist ebenfalls nicht möglich, da



Figur 14
Durch Vorerhitzung des Trockenklees können die Enzyme der Blattstücke inaktiviert werden. Weitere Steigerung der Temperatur hat das Auftreten von Autoxydationen zur Folge. Enzymatische Oxydationen lassen sich im Gegensatz zu Autoxydationen mit Blausäure hemmen. (Die QO_2-Werte verstehen sich für 200 mg Trockenklee.)

die Bestimmung der total aufnehmbaren Sauerstoffmenge (siehe Abschnitt 6) keinen Unterschied gegenüber dem nicht erhitzten Klee zeigt. Wir vermuten daher, daß durch die Erwärmung des trockenen Materials Veränderungen in der Benetzbarkeit auftreten, die eine Verzögerung der Oxydationen nach sich ziehen.

An Trockenklee, bei dem man das natürliche Substrat ausgewaschen hat, kann die Fermentinaktivierung in Wasseraufschlämmung mangels oxydierbarer Stoffe nicht erkannt werden (Figur 15). Sie wird erst meßbar bei Zusatz eines künstlichen Substrates, zum Beispiel Brenzkatechin (Figur 15).

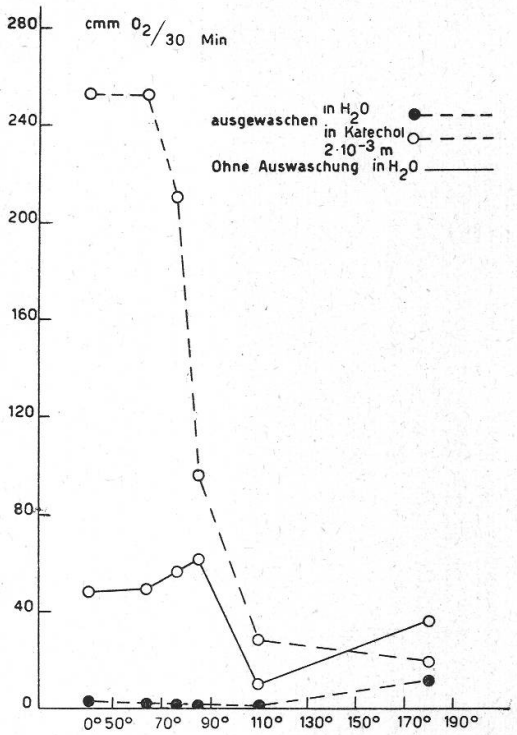
Erhöht man den Wassergehalt des Klees in den Ampullen, werden die Enzyme schon bei sehr niederen Temperaturen inaktiviert (Tab. 14).

Tabelle 14

Wassergehalt des Klees in den Ampullen	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Trockenklee		
	Erhitzung während 2 Stunden auf		
	60°	70°	80°
10 %	80,6	87,0	98,3
17,5 %	96,1	63,6	33,0
25 %	71,8	21,4	10,7
33 %	15,2	13,6	8,0

b) Autoxydation

Unter Autoxydation verstehen wir die Fähigkeit gewisser Substanzen, ohne Mitwirkung von organischen Katalysatoren mit molekularem Sauerstoff eine Verbindung einzugehen. Ein bekanntes Beispiel einer solchen Reaktion stellt die Peroxydbildung bei ungesättigten Fettsäuren dar.



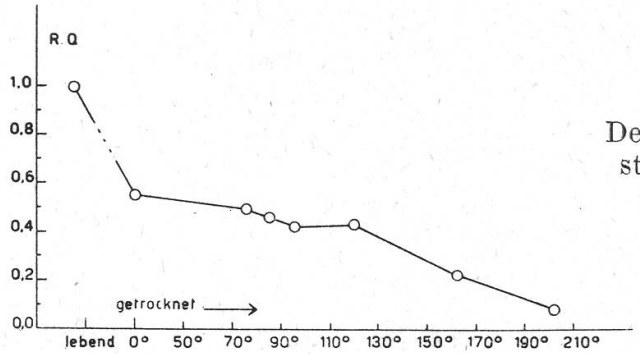
Figur 15
Ausgewaschener Trockenklee nimmt keinen Sauerstoff mehr auf. Erst durch den Zusatz eines künstlichen Substrates (Brenzkatechin) wird die durch die Vorerhitzung bewirkte Fermentinaktivierung meßbar. Die ausgezogene Linie zeigt die Sauerstoffaufnahme nicht ausgewaschenen Trockenklees. (Die QO_2-Werte beziehen sich auf 150 mg Trockenklee)

Erhitzt man Trockenklee auf Temperaturen von über 120°, stellt man eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme in Wasseraufschlämmung fest (Figur 14). Die in diesem Falle auftretenden Oxydationen sind, wie beim Tabak (16), nicht mit Blausäure hemmbar. Sie treten auch auf, wenn vor der hohen Erhitzung die Fermente durch Behandlung des Trockenklees mit dem Autoklav bei 1,5 Atm. zerstört werden. Dagegen sind sie nur äußerst schwach oder gar nicht zu beobachten, wenn man den Erhitzungsversuch mit gründlich ausgewaschenem Material ausführt (Figur 15). Man ist deshalb wohl auch beim Klee berechtigt, anzu-

nehmen, daß bei Temperaturen von über 120° wasserlösliche Stoffe so verändert werden, daß sie eventuell unter katalytischer Mitwirkung der stark verkohlten Gerüstsubstanzen in Wasseraufschlämmung autoxydabel werden.

c) Der Atmungskoeffizient (RQ)

Autoxydationen lassen sich mit dem Atmungskoeffizienten gut charakterisieren, da die Kohlendioxydbildung dabei nur ganz gering ist (19). Trotzdem die Bestimmung des Atmungskoeffizienten nach der direkten Methode beim Trockenklee mit großen Mängeln behaftet ist, wurde sie zur Orientierung an verschieden vorerhitztem Material angewandt. Es zeigt sich dabei, daß hoch erhitzter Klee fast kein Kohlendioxyd mehr produziert. Der Atmungskoeffizient ist in diesem Falle sehr gering (Figur 16). Auch bei Anwendung der Methode von Dickens und Simer (9) zur Bestimmung des Atmungskoeffizienten



Figur 16
Der Atmungskoeffizient sinkt mit steigender Vorerhitzungstemperatur

konnte an hocherhitztem Trockenklee nie eine Kohlendioxydbildung gemessen werden.

8. Der Einfluß der Blattbehandlung vor der Trocknung auf die Sauerstoffaufnahme des getrockneten Materials

a) Hohe Temperatur

Aufbewahrung frischen, lebenden Klees in geschlossenem Raum bei 80° oder direkt im Autoklav bei 1,5 Atm. Druck hat eine Inaktivierung der Blattfermente zur Folge. Nach einer solchen Behandlung getrocknetes Blattmaterial zeigt erwartungsgemäß keine Sauerstoffaufnahme mehr (Tabelle 15).

Tabelle 15

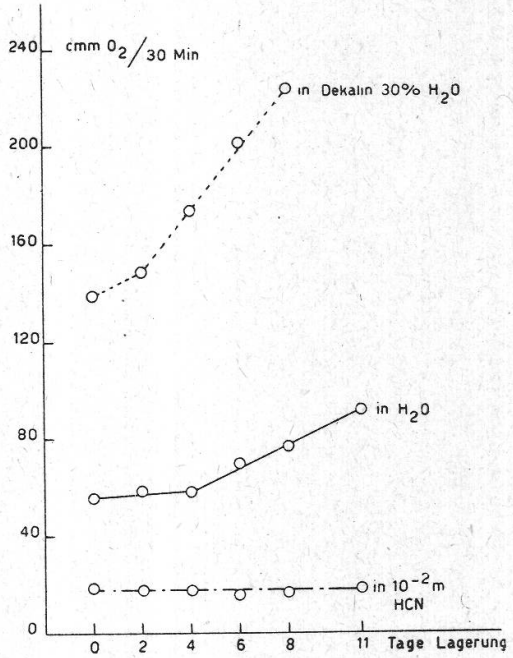
Vorbehandlung	Medium	QO_2 in cmm pro 30 Min. pro 200 mg Trockengewicht
Keine	Dest. H_2O	85,5
3 h bei 80° (geschlossener Raum) . .	Dest. H_2O	5,1
15 Min. im Autoklav (1,5 Atm. Druck)	Dest. H_2O	6,7

b) *Kälte*

Im Tiefkühlhaus gelagerter Klee wird beim Trocknen schwarz. Dies ist ein Zeichen dafür, daß sich im Blatt Oxydationsvorgänge abgespielt haben. Bestimmt man die Sauerstoffaufnahme dieses getrockneten Materials, beträgt sie nur ungefähr einen Fünftel von Trockenklee, der zur gleichen Zeit gesammelt, dann aber sofort getrocknet wurde, trotzdem in beiden Proben die Fähigkeit, Brenzkatechin zu oxydieren, etwa gleich geblieben ist. Es scheint wahrscheinlich, daß beim Auftauen des Gefrierklees Enzyme und Substrate miteinander in Berührung kommen, die im lebenden Blatt getrennt vorliegen. Dadurch werden schon vor der Trocknung Stoffe oxydativ abgebaut, die sonst erst im aufgeschlämmten, getrockneten Material durch die entsprechenden Oxydasen angegriffen werden.

c) *Lagerung*

Es sollte möglich sein, die Menge des natürlichen oxydierbaren Substrates im Trockenklee zu vergrößern.



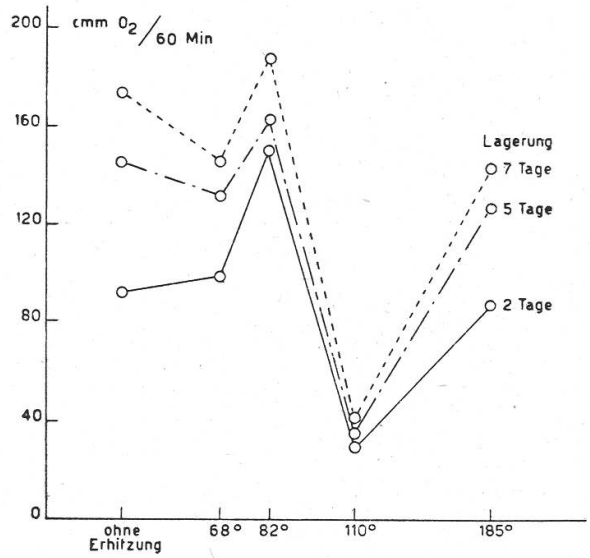
Figur 17
Durch die Lagerung der lebenden Kleeblätter läßt sich die Menge der oxydierbaren Stoffe im Trockenklee vergrößern. (Die QO_2-Werte beziehen sich auf 200 mg Trockenklee.)

Im abgetrennten Blatt finden Abbauprozesse statt, die nach Veratmung der Reservekohlehydrate auch die Eiweißstoffe erfassen und zu einer Anhäufung von Aminosäuren (vor allem Asparagin) im Blattgewebe führen (8, 42, 43).

Lagert man von der Mutterpflanze abgeschnittene Kleeblätter in dunklem, feuchtem Raum bei Zimmertemperatur und trocknet das Material nachher auf die gewohnte Art, beobachtet man mit zunehmender Lagerungsdauer eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme des aufgeschlämmten Trockenklees (Figur 17). Der Anstieg des Sauerstoffver-

brauches läßt sich auch in Dekalinaufschlämmung messen (Figur 17). Es handelt sich dabei also nicht um Nebenreaktionen, die sich in der wässerigen Lösung abspielen. Bei Vergiftung mit Blausäure bleibt der unvergiftbare Rest konstant (Figur 17). Es ist deshalb kaum anzunehmen, daß durch die Lagerung neue Reaktionstypen (zum Beispiel Autoxydationen) auftreten. Die Steigerung der Sauerstoffaufnahme kann nur in der Vermehrung des oxydierbaren Substrates ihre Ursache haben. Dies kommt auch bei der Bestimmung der total aufnehmbaren Sauerstoffmenge durch die Aufhebung der Blausäurehemmung mit $CuSO_4$ schön zur Geltung.

Unterzieht man das gelagerte Blattmaterial Vorbehandlungen bei verschiedenen Temperaturen, werden die erwähnten Minimumkurven mit zunehmender Lagerung parallel zu sich selbst gegen höhere Q_{O_2}-



Figur 18
Der Einfluß der Vorerhitzung auf vor der Trocknung gelagerten Klee. (Die Q_{O_2}-Werte beziehen sich auf 200 mg Trockenklee)

Werte verschoben (Figur 18). Dabei ist vor allem interessant, daß die Intensität der Autoxydation in hoch erhitztem Trockenklee mit der Zahl der Lagerungstage zunimmt. Es ist dadurch vielleicht auch erklärlich, warum beim Tabak solche Autoxydationen so ausgeprägt in Erscheinung treten (16).

Länger als elf Tage läßt sich der Klee unter den angegebenen Bedingungen nicht lagern, da Entfärbung und Mikroorganismenbildung auftritt.

III. Diskussion

Es hat sich durch die beschriebenen Experimente gezeigt, daß auch in trockenem Blattmaterial die blatteigenen Enzyme eine entscheidende Bedeutung für die exotherm verlaufenden Oxydationsprozesse haben.

Bereits frühere Untersuchungen an Tee- und Tabakblättern haben zu gleichen Resultaten geführt (16, 34).

Die Frage nach der Art der im Blatt wirksamen Oxydationsfermente muß sich vor allem auf die Charakterisierung der Terminaloxydase beschränken. Man stößt dabei wegen des komplexen Baus des Blattes auf Schwierigkeiten. Ist es doch nicht ausgeschlossen, daß zwei oder drei der in Frage kommenden Enzyme (Cytochromoxydase, Phenoloxydase und Askorbinsäureoxydase) gleichzeitig bei der Sauerstoffaufnahme wirksam sein können.

Durch Experimente mit Kleehomogenat und getrocknetem Blattmaterial wurde versucht, die Schwierigkeiten, die durch den Permeabilitätswiderstand des Plasmas der lebenden Zellen auftreten, zu beheben.

Die Terminaloxydase des Kleeblattes muß auf Grund der Vergiftungsversuche ein Kupfer- oder Eisenferment sein.

Das auffallend rasche Dunkelwerden mechanisch oder durch hohe Temperatur geschädigter Stellen des lebenden Kleeblattes und des in Wasser aufgeschlämmten getrockneten Materials weist auf die Anwesenheit von Phenoloxydase hin. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bekräftigt, daß Diphenole vom Blattgewebe oxydiert werden können. Dabei zeigt sich die für die Phenoloxydase charakteristische Erscheinung, daß die im Laufe der Reaktion entstehenden Oxydationsprodukte hemmend auf die Fermentaktivität wirken. Leider gelingt es mit den spezifischen Kupferproteidhemmstoffen weder die Sauerstoffaufnahme des lebenden und getrockneten Blattmaterials noch die durch diese Gewebe bewirkte Diphenoloxydation zu hemmen. Da wir die Oxydation der erwähnten Diphenole durch Kartoffelknollengewebe mit Diäthyldithiocarbamat ohne Schwierigkeiten unterdrücken konnten, bleibt fraglich, ob wirklich der Phenoloxydase die Schlüsselstellung bei der Sauerstoffaufnahme des Kleeblattes zukommt. Phenole lassen sich auch durch andere Enzymsysteme (zum Beispiel durch Cytochrom-Cytochromoxydase) oxydieren (39). Sie können auch indirekt enzymatische Oxydationen aktivieren, da sie als starke Reduktionsmittel ihren Wasserstoff leicht an oxydierte Verbindungen abgeben, die dann erneut durch die entsprechenden Oxydasen oxydiert werden können. Phenole haben also Eigenschaften, wie sie von einem Wasserstoffüberträger (« carrier ») verlangt werden.

Trotzdem kann angenommen werden, daß die Phenoloxydase wenigstens teilweise für die Sauerstoffaufnahme des Kleeblattes verantwortlich ist, da Eingriffe, die auf Klee ohne Einfluß sind, wie Erhitzung auf über 56°, Trocknung und Behandlung mit einem Überschuß von Alkohol oder Azeton, die Cytochromoxydase zerstören. Cytochromoxydase müßte in reinem Sauerstoff eine erhöhte Aktivität zeigen (34).

Messungen in reiner Sauerstoffatmosphäre bleiben indessen beim Klee ohne Einfluß. Da die Sauerstoffaufnahme des Kleeblattes mit NaN_3 fast total gehemmt wird, Askorbinsäureoxydase aber durch dieses Gift nicht beeinflußt werden kann (39), ist es ausgeschlossen, daß dieses Enzym im Klee als Terminaloxydase wirkt.

Durch bestimmte phenolische Substanzen läßt sich sowohl die Sauerstoffaufnahme wie die Kohlendioxydabgabe steigern. Man hat daraus den Schluß gezogen, daß diese Stoffe (zum Beispiel Dopa, Protocatechusäure, 4-Tertiärbutyl-Brenzkatechin) als Wasserstoffüberträger zwischen der Terminaloxydase und den Dehydrogenasen wirksam sind (4, 6, 7). Werden daher die Dehydrogenasen des Gewebes gehemmt, stoppt indirekt auch die Sauerstoffaufnahme, da die oxydierten Wasserstoffüberträger nicht mehr reduziert werden können. Aus diesem Grunde läßt sich die Sauerstoffaufnahme des lebenden Kleeblattes mit Dehydrogenasegiften hemmen. Dehydrogenasen sind auch an den Reaktionszyklen beteiligt, die mit der Kohlendioxydbildung in Verbindung stehen. Da die Kohlendioxydproduktion des Trockenklees verglichen mit der Sauerstoffaufnahme stark vermindert ist (RQ 0,55) und Dehydrogenasegifte absolut keinen Einfluß mehr auf den Sauerstoffverbrauch haben, müssen die Wasserstoff übertragenden Enzyme durch die Trocknung zerstört worden sein. Das äußert sich übrigens auch im raschen Abklingen aller Oxydationsprozesse, die sich in aufgeschlämmtem Trockenklee abspielen. Da mit dem Abbau von Glukose und Zitronensäure stets auch Dehydrierungen verbunden sind, ist es begreiflich, daß diese beiden Stoffe von Trockenklee nicht mehr oxydiert werden können. Die für das lebende Blatt charakteristischen Kreisprozesse, ein Gleichgewicht zwischen Oxydationen und Reduktionen, werden durch die Trocknung geschädigt (11).

Die Leichtigkeit, mit der sich Wasserstoff übertragende Fermente inaktivieren lassen, kommt sichtbar zum Ausdruck, wenn ein lebendes Kleeblättchen an einer bestimmten Stelle hohen Temperaturen ausgesetzt wird. Die Inaktivierung der Dehydrogenasen erfolgt in einem größeren Umkreis um die Erhitzungsstelle als die Inaktivierung des Phenole oxydierenden Fermentes. In der Zone, in der nur noch die Phenoloxydase aktiv bleibt, werden Phenole oxydiert, aber nicht mehr reduziert. Die entstandenen Chinone lagern sich zu braunschwarzen Farbstoffmolekeln zusammen. Die bezeichnete Zone färbt sich daher mehr oder weniger rasch braunschwarz (13). Ob die dabei oxydierten Phenole im lebenden Blatt die Funktion von Wasserstoffüberträgern haben oder ob es sich dabei um Aminosäuren (zum Beispiel Tyrosin) der durch die hohe Temperatur denaturierten Proteine handelt, kann nicht gesagt werden. Bezeichnenderweise tritt dieses Phänomen an Blättern nicht auf, die keine Möglichkeit haben, zugesetzte Diphenole zu oxydieren (Luzerne, *Tro-*

paeolum majus). Dies ist vielleicht ein Hinweis dafür, daß diese Erscheinung an die Anwesenheit der Phenoloxydase gebunden ist.

Über die andern Fermentgruppen des Blattes läßt sich auf Grund manometrischer Messungen nichts aussagen, es sei denn, die durch ihre Wirksamkeit entstehenden Reaktionsprodukte bilden die Substrate für die Oxydasen. So kann nachgewiesen werden, daß sich durch die Lagerung das oxydierbare Substrat vergrößert, da die Tätigkeit der hydrolysierenden Enzyme beim langsamen Austrocknen der Blätter zunimmt (25).

Durch die Trocknung der Blattzellen gehen im Plasma irreversible Veränderungen vor sich. Es sollen zum Beispiel an durch Trocknung denaturierten Eiweißstoffen gewisse Bindungstypen zerstört und Ringbildungen aufgebrochen werden (17, 35). Darum ist es gut möglich, daß neben den bereits im Blatt vorhandenen niedermolekularen Verbindungen auch Proteine von den noch wirksamen Enzymen angegriffen werden können, falls die dazu nötige Wassermenge vorhanden ist.

Im gegen äußere Einflüsse wie Lagerung, Kälte, hohe Temperatur, Zerkleinerung, organische Lösungsmittel verglichen mit dem lebenden Blatt beständigeren Trockenklee beginnen die Oxydationsprozesse quantitativ erfaßbar zu werden, wenn der Feuchtigkeitsgehalt des Materials etwa 20 % beträgt. Je größer der Wassergehalt des getrockneten Klees, um so rascher läuft die Oxydation des vorhandenen Substrates ab. Das oxydierbare Substrat ist in einer ganz bestimmten Menge im getrockneten Blatt vorhanden. Sie kann durch Lagerung vergrößert, durch Kältevorbehandlung verkleinert werden. Nach dem Verbrauch der natürlichen Substratmenge hören die enzymatischen Oxydationen im getrockneten Material auf, trotzdem die Oxydasen noch aktiv sind. Durch Zusatz neuer oxydierbarer Substanzen, die sich aus Trockenklee extrahieren lassen, können wir einen erneuten Anstieg des Sauerstoffverbrauches bewirken. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem natürlichen Substrat um Stoffe mit phenolartigen Eigenschaften.

Mit Hilfe der manometrischen Technik lassen sich nur Reaktionen erfassen, bei denen Gase verbraucht oder gebildet werden. Über die reagierenden Stoffe und die nicht gasförmigen Reaktionsprodukte kann oft nur indirekt etwas ausgesagt werden. Wir haben aus diesem Grunde keine Möglichkeit, die durch die ablaufenden Oxydationen freiwerdende Energie zu berechnen.

Setzt man Trockenklee hohen Temperaturen aus, werden die Oxydasen erwartungsgemäß zerstört. Eine weitere Steigerung der Temperatur auf über 120° hat wieder eine Zunahme des Sauerstoffverbrauches zur Folge. Es treten die an Tabakblättern entdeckten, gegen Blausäure unempfindlichen Autoxydationen auf (16). Da die Sauerstoffaufnahme hoch erhitzten Klees proportional der Substratmenge ist, die enzymatisch abgebaut werden kann, ist anzunehmen, daß diese natürlichen Substrate

durch hohe Erhitzung in autoxydable Stoffe umgewandelt werden. Sicher sind diese Autoxydationen, die sich auch durch den niederen Atmungskoeffizienten auszeichnen, für die Selbstentzündung der Futterstöcke von Bedeutung, trotzdem sie nicht so stark hervortreten wie beim Tabak.

Die vorliegende Arbeit wurde im Pflanzenphysiologischen Institut der Eidg. Technischen Hochschule unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyßling ausgeführt. Ich danke meinem verehrten Lehrer für die mir dabei gewährte große Hilfe. Mein Dank gebührt auch Herrn Dr. K. Grob, dessen Untersuchungen an getrockneten Tabakblättern hier fortgesetzt worden sind.

IV. Zusammenfassung

1. Mit Hilfe der manometrischen Methode wurden die Oxydationsprozesse im lebenden und getrockneten Kleeblatt untersucht.
2. Da die Fähigkeit der Blattschnitzel, Homogenate und trockener Blattstücke Diphenole zu oxydieren, die Vergiftungsversuche, die Enzyminaktivierung durch die bei der Diphenoloxydation entstehenden Reaktionsprodukte und die Verfärbungen auf die Anwesenheit von Phenoloxydase hinweisen, ist es sehr wahrscheinlich, daß dieses Enzym im Kleeblatt die direkte Sauerstoffaufnahme bewirkt.
3. Die Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe lebender Blattstücke läßt sich, im Gegensatz zu getrocknetem Material, mit Dehydrogenasegiften stark hemmen. Durch die Trocknung müssen die dehydrierenden Fermente geschädigt werden. Im Trockenklee gehen nur Oxydationsprozesse vor sich. Die im lebenden Blatt damit gekoppelten Reduktionen durch Wasserstoff übertragende Enzyme sind zerstört.
4. Die im getrockneten Blatt vorhandene oxydierbare Substratmenge ist durch die Vorbehandlung des Blattmaterials genau festgelegt. Nach ihrem Abbau finden im Blatt keine enzymatischen Oxydationen mehr statt.
5. Es gelingt, aus Trockenklee oxydierbare Stoffe zu isolieren. Setzt man dieses natürliche Substrat zu aufgeschlämmtem Blattmaterial, ist ein starker Anstieg der Sauerstoffaufnahme festzustellen.
6. Der oxydative Abbau im getrockneten Blatt findet um so rascher statt, je größer der Wassergehalt des Materials ist.
7. Die blatteigenen Oxydasen werden durch Erhitzung inaktiviert. Erwärmung über 110° hat das Auftreten von Autoxydationen zur Folge.

V. Literaturverzeichnis

1. Arnon, D. J. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Plant Physiol., **24,** 1 (1949).
2. Audus, L. J. Mechanical stimulation and respiration rate in the green leaf. New Phytologist, **38,** 284 (1939).
3. Baker, D., and Nelson, J. M. Tyrosinase and plant respiration. J. Gen. Physiol., **26,** 269 (1942).
4. Bonner, J., and Wildman, S. G. Enzymatic mechanism in the respiration of spinach leaves. Arch. Biochem., **10,** 497 (1946).
5. — Biochemical mechanism in the respiration of the avena coleoptile. Arch. Biochem., **17,** 311 (1948).
6. Boswell, J. G., and Whiting, G. C. A study of the polyphenol oxidase system in potato tubers. Ann. Bot. N. S., **2,** 847 (1938).
7. — Oxidation systems in the potato tuber. Ann. Bot. N. S., **9,** 54 (1945).
8. Chibnall, A. Ch. Protein metabolism in the plant. New Haven (1939).
9. Dickens, F., und Simer, F. Bestimmung der respiratorischen Quotienten von überlebenden Geweben. In Abderhaldens Handb. biol. Arbeitsmeth. IV., Teil **13,** 430 (1926).
10. Dixon, M. Manometric methods. Cambridge (1943).
11. Frankenburg, W. G. Chemical changes in the harvested tobacco leaf, Part I: Adv. Enzymol., **6,** 309 (1946).
    Part II: Adv. Enzymol., **10,** 325 (1950).
12. Frey-Wyßling, A. Die Blattfermentation als Autolyse. Vierteljahresschrift Naturf. Ges. Zürich, **88,** 176 (1943).
13. Gicklhorn, J. machte uns in einem Kolloquium im W. S. 1949/50 an der ETH auf dieses Phänomen aufmerksam.
14. Goddard, D. R. Cytochrome c and Cytochrome oxidase from wheat germ. Am. J. Bot., **31,** 270 (1944).
15. — The respiration of cells and tissues. In Physical chemistry of cells and tissues by R. Höber. Philadelphia (1946).
16. Grob, K. Beitrag zur Kenntnis der Tabakfermentation. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **58,** 172 (1948).
17. Haurowitz, F. The internal structure of protein molecules. Experientia, **5,** 347 (1949).
18. Hellinga, J. J. A. Über den Einfluß von Substanzen, die von Pilzen gebildet werden, auf die Atmung des Kartoffelknollengewebes. Diss. Utrecht (1941).
19. Hoffmann, E. J. Oxidation and gas formation in the spontaneous heating of hay. J. Agr. Res., **51,** 527 (1935).
20. Hüni, K. Physikalische und chemische Untersuchungen an Dörrfutter verschiedenen Gärungszustandes. Diss. ETH (1944).
21. James, W. O., and Cragg, J. M. The ascorbic acid system as an agent in barley respiration. New Phytologist, **42,** 28 (1943).
22. Keilin, D. The action of sodium azide on cellular respiration and on some catalytic oxidation reactions. Proc. Roy. Soc. London B, **121,** 165 (1936).
23. Krebs, H. A. Über die Rolle von Schwermetallen bei der Autoxydation von Zuckerlösungen. Biochem. Z., **180,** 377 (1927).
24. Kubowitz, F. Über die chemische Zusammensetzung der Kartoffeloxydase. Biochem. Z., **292,** 221 (1937).

25. Kurssanov, A.L. Untersuchung enzymatischer Prozesse in der lebenden Pflanze. Adv. Enzymol., **1,** 329 (1941).
26. Laties, G.G. Limitation of the use of KOH-KCN mixtures in manometric studies. J. Biol. Chem., **177,** 969 (1949).
27. Machlis, L. The influence of some respiratory inhibitors and intermediates on respiration and salt accumulation of excised barley roots. Am. J. Bot., **31,** 183 (1944).
28. Marsh, P.B., and Goddard, D.R. Respiration and fermentation in the carrot, *Daucus Carota.* Am. J. Bot., **26,** 724, 767 (1939).
29. Nelson, J.M., and Dawson, C.R. Tyrosinase. Adv. Enzymol., **4,** 99 (1944).
30. Nilsson, R. Über die Organisierung der biochemischen Wirkstoffe in der Zelle. Naturw., **31,** 25 (1943).
31. Pallmann, H., Hüni, K., Dönz, O. Der Wärmehaushalt und die Kontrolle überhitzter Futterstöcke. Schweiz. Landw. Monatshefte, **23,** 3 (1945).
32. Raper, H.St. Chromooxydasen. In Myrbäck, Methoden der Fermentforschung, Bd. **3,** 2476 (1940).
33. Roberts, E.A.H. The fermentation process in tea manufacture. Biochem. J., **33,** 836 (1939).
34. — The chemistry of tea fermentation. Adv. Enzymol., **2,** 113 (1942).
35. Schmidt, C.L.A. The chemistry of the amino acids and proteins. Springfield (1945).
36. Sizer, J.W. Effects of temperature on enzym kinetics. Adv. Enzymol., **3,** 35 (1943).
37. Steiner, M. Herstellung und Prüfung geeigneter Reaktionsbedingungen. In Myrbäck, Methoden der Fermentforschung, Bd. **1,** 761 (1940).
38. Stenlid, G. Some notes on the effect of sodium azide, 2,4 dinitrophenol and o-phenanthrolin upon oxygen consumption in green leaves. Physiologia Plantarum, **2,** 61 (1949).
39. Sumner, J.B., and Somers, G.F. Chemistry and methods of enzymes. New York (1947).
40. Umbreit, W.W., Burris, R.H., and Stauffer, J.F. Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism. Minneapolis (1948).
41. Wassink, E.C. Experiments on photosynthesis of horticultural plants with the aid of the Warburg method. Enzymologia, **12,** 33 (1946).
42. Wood, J.G., and Cruickshank, D.H. The metabolism of starving leaves V. Austr. J. exp. Biol., **22,** 111 (1944).
43. Yemm, E.W. The respiration of barley plants. Proc. Roy. Soc. London B, **117,** 483 (1935).