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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 71 (1961)

Artikel: Atmungsmechanismen des Kulturchampignons (Agaricus campester L. s. l.)

Autor: Rast, Dora

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-50190

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: 02.10.2025

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

Atmungsmechanismen des Kulturchampignons (Agaricus campester L. s. l.)

Von *Dora Rast*

Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich

Eingegangen am 13. Juni 1961

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 210
II. Material und Methoden 211
III. Experimentelle Ergebnisse 217
1. Gaswechselgrößen 217
a) Aerobe Atmung 217
b) Anaerobe Atmung 220
2. Potentielle Atmungssubstrate 221
a) Zucker und Glucosamin 221
b) Phosphorsäureester 224
c) Organische Säuren 225
d) Alkohole 227
3. Das natürliche Atmungssubstrat (Arsenatvergiftung) 228
4. Embden-Meyerhof-Parnas-Schema 232
a) Jodacetatvergiftung 232
b) Fluoridvergiftung 237
c) Fütterung von Diphosphopyridinnucleotid und Cocarboxylase 239
d) Wirkung von Bisulfit 240
5. Citronensäurecyclus 240
a) Fluoracetatvergiftung 241
b) Versuche mit Malonat 244
6. Phosphorylierungsvorgänge 246
a) Versuche mit Phloridzin und Phloretin 246
b) Entkoppelung durch 2,4-Dinitrophenol 252
c) Versuche mit *p*-Nitrophenol 258
d) Fütterung von Adenosinphosphaten, anorganischem Phosphat und Magnesiumsulfat 263
7. Begrenzende Faktoren der aeroben Atmung 265
a) Fütterung von Pyridinnucleotiden 266
b) Wirkung von Hefeextrakt 268
c) Die durch Hefeextrakt hervorgerufene Veränderung des Atmungstypus. 270

8. Zur Terminaloxydase der Atmung 271
a) Azidvergiftung 271
b) Aufhebung der Pasteurreaktion durch Stilboestrol 274
c) Fütterung von Brenzkatechin und DOPA 279
d) Wirkung von *p*-Nitrophenol 284
e) Versuche mit Diäthyldithiocarbamat 285
IV. Schlußfolgerungen und Diskussion 292
V. Zusammenfassung 294
Literaturverzeichnis 297

I. Einleitung

Kostytschew (1907, 1908, 1910) untersuchte als erster die Atmung von *Agaricus campester*, deren anaerobe Form «einen vollkommen eigenartigen Prozeß» darstelle, welcher von der alkoholischen Gärung durchaus verschieden und ebensowenig wie die CO_2-Abgabe des Pilzes unter aeroben Bedingungen auf eine Zuckerveratmung zurückzuführen sei. Erst vierzig Jahre später erfuhren die den respiratorischen Vorgängen des Kulturchampignons zugrunde liegenden Stoffumwandlungen weitere Beachtung (Quillet et Legrand, 1952a, 1952b, 1952c), wonach die Biosynthese von Mannit, der möglicherweise mit dem Atmungsstoffwechsel in direkter Beziehung steht, aus Glycogen über eine Reihe von Zwischenprodukten als wahrscheinlich betrachtet und das schon von Kostytschew (1908) erwähnte vollständige Fehlen reduzierender Zucker im Fruchtkörper ebenfalls festgestellt wird. Das Material der endogenen Atmung ist bei Pilzen ganz allgemein nicht bekannt, und Messungen des respiratorischen Quotienten weisen auf Oxydation von Lipiden hin (Cochrane, 1958).

Im Gegensatz zu den spärlichen Kenntnissen über eigentliche Atmungsvorgänge von *Agaricus campester* sind die Phenoloxydasen des Pilzes, deren wichtigste physiologische Bedeutung in ihrer Funktion als Terminaloxydase der normalen Atmung liegen soll (vgl. Leuthardt, 1959; hingegen James, 1953b; Mason, 1955), genauer untersucht (Keilin and Mann, 1938; Mallette et al., 1948; Voinovitch, 1951; Legrand, 1954).

Kostytschews eigenartige Beobachtungen, der tiefe RQ der Grundatmung von Pilzen im allgemeinen, das Fehlen einer entsprechenden Atmungsstudie über Fruchtkörper von Basidiomyceten überhaupt und die ungeklärte respiratorische Rolle der Phenoloxydasen ließen es als wünschenswert erscheinen, die den Abbau endogenen und exogenen Substrates bewirkenden Atmungsmechanismen des Kulturchampignons nach dem bekannten Hefe-Muskel-Schema zu untersuchen, um so die An- oder

Abwesenheit gleicher oder ähnlicher Vorgänge zu verifizieren und die begrenzenden Faktoren der Atmungsintensität zu eruieren; schließlich ist auch zu entscheiden, inwiefern die Tyrosinase des Pilzes im intakten Plectenchym als Terminaloxydase funktioniert.

Um die strukturelle Integrität des Versuchsmaterials möglichst zu gewährleisten, werden in der vorliegenden Arbeit sämtliche Experimente nach der Gewebeschnittmethode durchgeführt. Diese ist zwar nicht bei allen Problemstellungen respiratorischer Vorgänge anwendbar, liefert aber gegebenenfalls Resultate, die dem Verhalten des ganzen Organismus adäquater als solche von Untersuchungen mit Gewebebrei sind, da bei der Herstellung von Homogenaten normalerweise in situ getrennte Zellbestandteile miteinander in Berührung kommen, das terminale Atmungssystem oft zerstört wird, was die Zugabe eines entsprechenden Wasserstoffakzeptors bedingt, und da auch andere irreversible Alterationen auftreten können. Im Gegensatz zu Untersuchungen mit Partikelfraktionen verlangt die Interpretation von Versuchsresultaten, welche mit der Gewebeschnittmethode ermittelt werden, besondere Berücksichtigung der Permeabilitätsfrage, wobei es schwierig ist, zwischen der Unfähigkeit der Zelle, ein exogenes Substrat zu veratmen, und der Möglichkeit, daß dieses infolge besonderer Grenzflächenstrukturen gar nicht in die Zellen eindringt, zu entscheiden. Experimente, in welchen auf Zugabe von Substraten, Antimetaboliten usw. ins Suspensionsmedium keine am Gasstoffwechsel feststellbare Reaktion erfolgt, sind dann nicht als Beweis für oder gegen die Richtigkeit einer Hypothese zu betrachten, falls nicht auf anderem Wege festzustellen ist, daß die Zellen die betreffende Substanz auch wirklich aufzunehmen vermögen.

II. Material und Methoden

Versuchsobjekt. Für sämtliche Experimente wurden solche Fruchtkörper ausgewählt, die eine totale Höhe von zirka 4 cm aufwiesen und sich im Stadium der Zerreißens des Velum partiale befanden. Nachdem ein Vorversuch ergab, daß zwischen der Atmungsintensität von Stiellängs- und Hutquerschnitten kein wesentlicher Unterschied besteht, gelangte stets Mycelium der Hutregion, jedoch ohne Lamellen, zur Messung. Die mit dem Mikrotom hergestellten kreisförmigen Plectenchymschnitte hatten eine Dicke von 0,65 mm und eine Fläche von 25 mm^2.

Gaswechselmessungen. Sie erfolgten manometrisch nach der «direkten Methode» von Warburg, wie sie Umbreit, Burris und Stauffer (1949) beschreiben. Bei einem Gesamtflüssigkeitsvolumen der Reaktionsgefäße von 3,2 ml, wobei dasjenige von 20 Plectenchymschnitten eingerechnet ist, enthielt der zentrale Einsatz 0,2 ml KOH (20 %) beziehungsweise H_2O in den Rezipienten zur CO_2-Bestimmung. Die Q_{O_2} - und Q_{CO_2} - Werte beziehen sich auf das Trockengewicht (in mg), und bei Zahlenangaben wird auf das Minuszeichen von Q_{O_2} und des RQ verzichtet.

Die Temperatur der Thermostatenflüssigkeit betrug, sofern im experimentellen Teil nicht besonders erwähnt, 30 °C.

Trotzdem ein Vorversuch gezeigt hatte, daß sich keine Steigerung der Sauerstoffaufnahme durch Erhöhung der Schüttelfrequenz von 70 auf 120 ergab, wurde diese stets auf $n = 120$/Minute eingestellt, um gegebenenfalls auch bei höherer Atmungsintensität eine von der Schüttelgeschwindigkeit unabhängige Größe der Sauerstoffaufnahme zu garantieren.

Die Experimente, je mindestens im Doppel durchgeführt, erstreckten sich meistens über einen Zeitraum von 3 Stunden; die ersten Messungen erfolgten nach einer Äquilibrierungszeit von 15 Minuten, während der die Manometer mit den Warburggefäßen in der Thermostatenwanne bei offenem Hahnen geschüttelt wurden.

Applikation der Inhibitoren. Als Lösungsmittel für die Hemmstoffe diente meistens Puffer, dessen Zusammensetzung und wenn möglich auch Konzentration mit dem Suspensionsmedium im Reaktionsgefäß übereinstimmten. Abgesehen von einigen Ausnahmen wurde stets 0,3 ml der Inhibitorlösung in die Ansatzbirne des Warburggefäßes pipettiert und dann während des Versuches, nach Erreichen eines linearen Atmungsverlaufes der Schnitte, in den Hauptraum, welcher 2,7 ml Flüssigkeit enthielt, gekippt, so daß die Endkonzentration im Warburggefäß, auf welche sich sämtliche Zahlenangaben bei Versuchen mit Hemmstoffen beziehen, ein Zehntel der verwendeten Ausgangslösung betrug. Die Kontrollen enthielten im Seitenarm nur Puffer.

Substratkonzentrationen. Alle zu prüfenden Atmungssubstrate waren 10^{-2} m (Endkonzentration im Reaktionsgefäß).

Prozentuale Berechnung der Veränderungen von Gaswechselgrößen. Sofern im experimentellen Teil nicht besonders erwähnt, werden die nach Fütterung von Substraten oder Einwirkung von Hemmstoffen auftretenden Zu- oder Abnahmen der betrachteten Gaswechselgrößen stets auf die entsprechenden Werte vor Applikation des zu prüfenden Stoffes bezogen, wobei das Pluszeichen vor der Prozentzahl Steigerung und das Minuszeichen Hemmung oder Abnahme bedeutet.

Im Zeitpunkt des Zukippens von Lösungen aus der Ansatzbirne ins Suspensionsmedium, welcher in den Kurven durch einen senkrechten Pfeil angezeigt wird und eine Stunde nach Versuchsbeginn eintritt, ist immer schon während 30 bis 40 Minuten linearer Atmungsverlauf erreicht.

Suspensionsmedium. 1. Konzentration: Die Zellsaftkonzentration von Agaricaceen ist, wie Lapicque (1927) feststellte, gering im Verhältnis zu andern Landpflanzen und etwa derjenigen von Süßwasseralgen gleich. Insbesondere erhielt dieser Autor mit Zellsaft des Hutmyceliums junger Exemplare von *Agaricus campester*, die sich genau in dem Entwicklungszustand befanden, welchen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pilze aufwiesen, eine Gefrierpunktserniedrigung von 0,76 °C, was einer Teilchenkonzentration aller im Zellsaft gelösten Substanzen von etwa 0,4 «m» entsprechen würde.

Um durch eventuelles Auftreten von Plasmolyse hervorgerufene Änderungen der Atmungsintensität zu verhindern, muß man eine möglichst geringe Konzentration des Suspensionsmediums wählen, wobei zur Beurteilung des osmotischen Effektes die Totalkonzentration aller gelösten Partikel maßgebend ist. Berechnet man die Teilchenkonzentration von 0,1 m Phosphatpuffer, pH 6,0, so ergibt sich ein entsprechender Wert von zirka 0,2 «m». Da sich im Hauptraum der Gefäße aber oft noch Substrate, Hemmstoffe usw. befinden, erweist sich obige Phosphatlösung als zu konzentriert, wenn man osmotische Wirkungen der Salze von vornherein völlig ausschalten will, weshalb die Pufferkonzentration des Standardsuspensionsmediums schließlich mit m/30 festgelegt wurde.

2. Zusammensetzung: Eine Reihe von Vorversuchen, deren Dauer 60 Minuten betrug, zeigte, daß die Sauerstoffaufnahme der Pilzschnitte in Phosphat- beziehungsweise Phthalatpuffer sowohl bei Grund- als auch bei Glucoseatmung je gleich groß war. So ergab sich

zum Beispiel mit Glucose als Substrat in den beiden geprüften Suspensionsmedien bei pH 6,0 je ein Q_{O_2}-Wert von 3,87. Auch unter anaeroben Bedingungen konnte man keine am Gasstoffwechsel feststellbare verschiedene Wirkung von Phosphat- und Phthalationen bemerken. Da sich aber bei längerer Versuchsdauer in Phthalatpuffer ein eher etwas stärkeres Absinken der endogenen Atmung als im Phosphatpuffer ergibt, wurde dieser als Standardsuspensionsmedium gewählt. Sofern bei bestimmten Problemstellungen ein anderer Puffer Anwendung fand, ist dies im experimentellen Teil besonders vermerkt.

3. Azidität: Messungen der Atmungsrate in der pH-Reihe 4,8—6,0—7,0 ergaben mit und ohne Glucosefütterung keine Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme von der Azidität des Mediums. Ein Ergänzungsversuch bei pH 4,8, 5,7 und 6,6 ließ überdies ebenfalls keinen Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Mannoseaufnahme erkennen (kolorimetrische Bestimmung des Zuckers mit dem Anthronreagens).

Vergleicht man jedoch die Sauerstoffaufnahme mit Glucose gefütterter Schnitte (Tab. 1) bei den pH-Werten 6,0, 4,8, 4,0, 3,5 (mit K-Hydrogenphthalat und NaOH bzw. HCl eingestellt), so ist mit höherer Wasserstoffionenkonzentration eine deutliche Abnahme von Q_{O_2} festzustellen, wobei noch zu erwähnen wäre, daß bei pH 4,0 und 3,5 die Atmungsintensitäten in der dritten Versuchsstunde noch um rund 30 % beziehungsweise 60 % geringer sind als in den ersten 60 Minuten, auf welche sich die Zahlenangaben der Tabelle 1 beziehen; die Sauerstoffaufnahme bei pH 4,8 und 6,0 aber bleibt während der ganzen Versuchsdauer konstant.

Tabelle 1

Abhängigkeit der O_2-Aufnahme von der Azidität des Suspensionsmediums

pH	Q_{O_2}	%
6,0	3,60	100
4,8	3,56	99
4,0	2,29	64
3,5	2,09	58

Diese Versuchsergebnisse bestätigen die bei einer großen Zahl von pflanzlichen Objekten gemachte Beobachtung, wonach die Atmungsintensisät im Bereiche von pH 5–7 (James, 1953a) von der Azidität des Suspensionsmediums, welche im übrigen nichts über die in der Zelle tatsächlich herrschenden pH-Verhältnisse, unter denen die einzelnen Teilreaktionen der Atmung verlaufen, aussagt, unabhängig sein soll.

Im Unterschied zur Sauerstoffaufnahme erweist sich der Q_{CO_2}-Wert sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen trotz Berücksichtigung der durch Erhöhung des pH hervorgerufenen Retention von CO_2 als stark von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Während die durchschnittlichen RQ-Werte der Grund- und Glucoseatmung bei pH 4,8 etwa 0,7 beziehungsweise 0,9 betragen, sinken sie bei pH 6,0 auf etwa 0,6 beziehungsweise 0,7. Auf das gleiche Phänomen wird von Bonner und Wildman (1946) hingewiesen, und eine Erklärung dafür steht noch aus.

Die Unabhängigkeit der Sauerstoffaufnahme von der äußern Wasserstoffionenkonzentration im obenerwähnten Aziditätsbereich, die unerwünschte Erniedrigung des RQ bei höheren pH-Werten sowie die Tatsache, daß viele Hemmstoffe der Atmung Säuren sind, bei deren Anwendung aus Gründen der Permeationsgeschwindigkeit ein möglichst großer Anteil der wegen Verhinderung osmotischer Effekte stets niedrig zu

wählenden Gesamtinhibitorkonzentration als undissoziierte Molekel vorliegen soll, legen es nahe, das pH des Standardsuspensionsmediums auf 4,8 einzustellen. Ausnahmen werden im experimentellen Teil besonders erwähnt.

Vorbehandlung des Versuchsmaterials. Da uninfiltrierte Schnitte frischer Fruchtkörper bei einem RQ von 0,88 kaum oder schlecht auf Zugabe verschiedener Zucker reagierten, was auf Diffusionsschwierigkeiten und dem Vorhandensein großer Mengen endogenen Substrates beruhen konnte, mußte eine passende Vorbehandlung gefunden werden. Ihr Ziel besteht darin, einen solchen physiologischen Zustand der Zellen hervorzurufen, in welchem sie auf Zugabe von Substraten oder Antimetaboliten mit maximaler Steigerung oder Hemmung des Gaswechsels reagieren. Dazu werden drei Maßnahmen in Betracht gezogen:

a) Infiltration der Schnitte vor Versuchsbeginn (I).

b) Aufbewahren der intakten Fruchtkörper im Kühlschrank bei etwa 5 °C während 18 Stunden, was einem einfachen Starvation gleichkommt (K).

c) Suspension der Schnitte in Phosphatpuffer (pH 6,0; m/30) bei 10 bis 15 °C während 18 Stunden, unter gleichzeitiger Durchlüftung (S).

Durch die letztgenannte Maßnahme soll wie bei b eine Verringerung der inneren Reserven an Atmungsmaterial erreicht werden, bevor die Zellen zur Messung gelangen.

Wollte man die Wirkungen dieser verschiedenen Möglichkeiten der Vorbehandlung auf die Atmung streng quantitativ beurteilen, so müßten theoretisch $2^3 = 8$ Kombinationen, wobei 2 davon, Nrn. 1 und 5, jedoch praktisch undurchführbar sind, gegeneinander abgewogen werden (Tab. 2). Ein Vergleich der entsprechenden Versuchsresultate würde es erlauben, die für maximale Reaktionsbereitschaft zur Veratmung exogenen Substrates günstigste Vorbehandlung zu bestimmen.

Tabelle 2

Versuchsschema zur Ermittlung der geeigneten Vorbehandlung

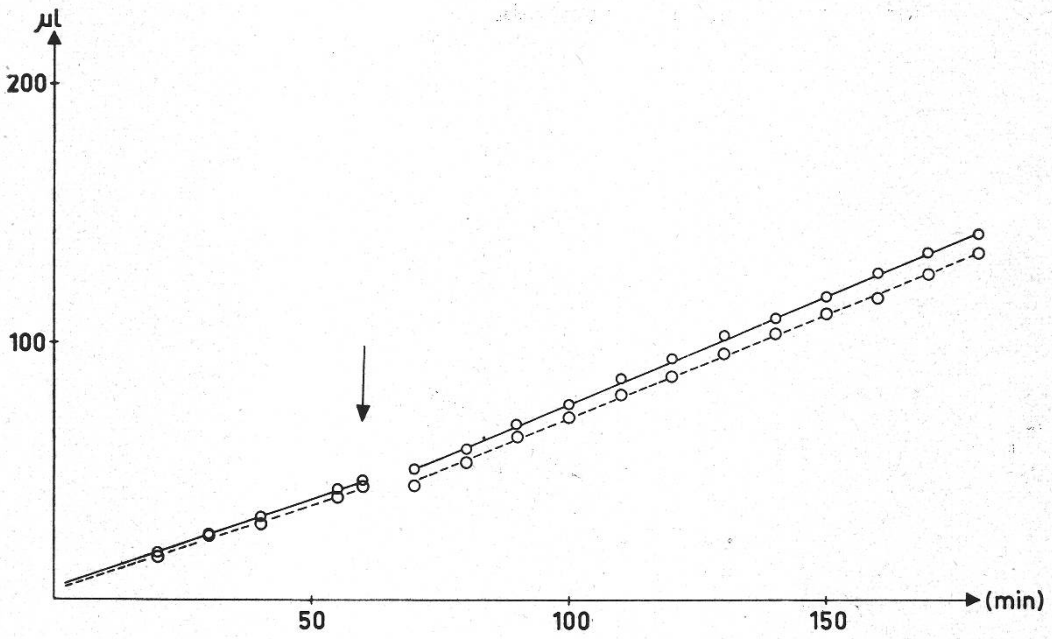
Nr.	I	K	S
(1)	(+)	(+)	(+)
2	+	+	—
3	+	—	+
4	+	—	—
(5)	(—)	(+)	(+)
6	—	+	—
7	—	—	+
8	—	—	—

Da das Hauptinteresse hier aber den bei *Agaricus campester* funktionierenden Atmungsvorgängen und nicht rein quantitativen Veränderungen der Gaswechselgrößen nach Einwirkung bestimmter Außenfaktoren, deren Angriffspunkte im Schema der Abbaumechanismen schwierig zu lokalisieren sind, gilt, wurde die für den gewünschten Zweck beste Vorbehandlung auf folgende Weise ermittelt:

Versuche entsprechend Nrn. 4 und 8 fallen weg, weil sie eine bloße Infiltration beziehungsweise keine Eingriffe von außen verlangen, deren Notwendigkeit aber durch das obenerwähnte Experiment dargelegt wird.

Untersuchungen gemäß Nrn. 6 und 7 geben Auskunft über die Wirksamkeit der in Betracht gezogenen Methoden, vor Beginn der Messungen eine möglichst geringe Konzentration des endogenen Substrates zu bewirken. Da die in Phosphatpuffer suspendierten Schnitte nach 18 Stunden aber etwas infiltriert sind, nicht aber die von im Kühlschrank aufbewahrten Pilzen hergestellten, ließe sich der Einfluß der beiden Starvationmethoden auf die Bereitschaft des Hutmyceliums, später zugegebenes Substrat rasch zu veratmen, wegen des verschiedenen Infiltrierungszustandes bei diesen Kombinationen der Vorbehandlungsmethoden nicht eindeutig ermitteln.

Versuche schließlich, welche Nrn. 2 und 3 entsprechen, ergaben folgende Resultate (Fig. 1a, Fig. 1b): Bei gleicher Anzahl während 5 Minuten infiltrierter Plectenchymschnitte, die von gleichzeitig gepflückten Pilzen stammten und deren Trockengewichte trotz der verschiedenen Vorbehandlung völlig übereinstimmten, ist die Sauerstoffaufnahme nach Vorbehandlungsmethode S um rund 35 % höher als bei K, und die prozentuale Atmungssteigerung nach Zugabe von Glucose ist im ersten Fall auch deutlich größer. Hingegen ergibt sich bei der Behandlungsart Nr. 2 ein höherer RQ.



Figur 1a

Einfluß der Vorbehandlung auf die Gaswechselgrößen

○——○ O_2-Aufnahme
○---○ CO_2-Abgabe
} Kombination Nr. 2

Diese Versuchsergebnisse, die oben gemachten Erwägungen, die Tatsache, daß der RQ auch ganz frischer, uninfiltrierter Schnitte nicht 1 beträgt, wenngleich er höher als bei Methode Nr. 3 ist, und die Feststellung, daß Glucose die Atmung stärker steigert, wenn man länger infiltriert, führten zu folgender Standardmethode der Vorbehandlung:

Suspension der gewaschenen Schnitte in m/30 Phosphatpuffer von pH 6,0 während 18 Stunden unter Durchlüftung. Unmittelbar vor Einfüllen in die Reaktionsgefäße erfolgt Vakuuminfiltration des Versuchsmaterials mit frischem Puffer während 10 Minuten bei einem Druck von zirka $^1/_{40}$ Atm.

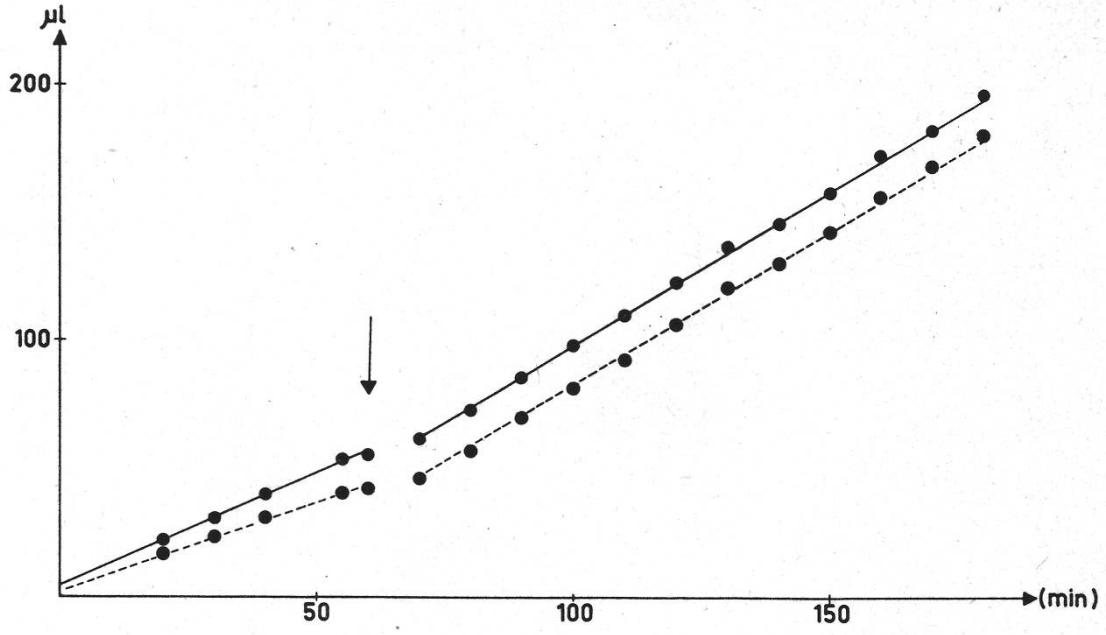
Es stellte sich später heraus, daß auch destilliertes Wasser zur Suspension der Schnitte verwendet werden kann, ohne daß sich ein am Gaswechsel gemessener Unterschied feststellen ließe.

N_2-*Atmosphäre.* Sie wurde durch Desoxygenisieren der Reaktionsgefäße mittels technisch reinen Stickstoffs (99,5 %) während einer Dauer von 5 Minuten hergestellt.

Da bei einem Gärungsversuch, in welchem das Zentralgefäß Kalilauge enthielt, nach einer Durchgasungszeit von 5 Minuten während der ersten Versuchsstunde keine Gasaufnahme mehr erfolgte und in der zweiten und dritten am Manometer eine Druckabnahme von je einem Teilstrich festzustellen war, sich jedoch auch nach Verdoppelung der Desoxygenisierungsdauer dasselbe Resultat ergab, darf man annehmen, daß unter den gegebenen Bedingungen keine reinere Stickstoffatmosphäre herzustellen ist. Die geringe Druckveränderung könnte auf Aufnahme von in technisch reinem Stickstoff noch vorhandenem Sauerstoff beruhen, ist aber so gering, daß praktisch nur noch Gärung vorliegt.

Chromatogramme. Es wurde in allen Fällen mit dem Mixer zerkleinertes Material ausgezogen und nach Angaben von Cramer (1958) chromatographiert.

Zucker: Extraktion mit 50 % Alkohol. Filtrat zur Entfernung der braunen Farbe mit Anionenaustauscher (Dowex 1) behandelt, im Vakuum auf ein kleines Volumen eingedampft und absteigend mit Äthylacetat – Eisessig – Wasser (3:1:3) als Fließmittel chromatographiert. Entwickler: Anilinphthalat.



Figur 1b

Einfluß der Vorbehandlung auf die Gaswechselgrößem

●——● O_2-Aufnahme
●---● CO_2-Abgabe
} Kombination Nr. 3

Phosphorsäureester: Extraktion mit kalter TCA (4 %). Filtrat mit Kationenaustauscher (Dowex 50) behandelt, auf ein kleines Volumen eingedampft und absteigend auf gewaschenem Papier mit *n*-Propanol – konzentriertem Ammoniak – Wasser (6:3:1) chromatographiert. Entwickler: Perchlorsäure-Ammonmolybdat und UV.

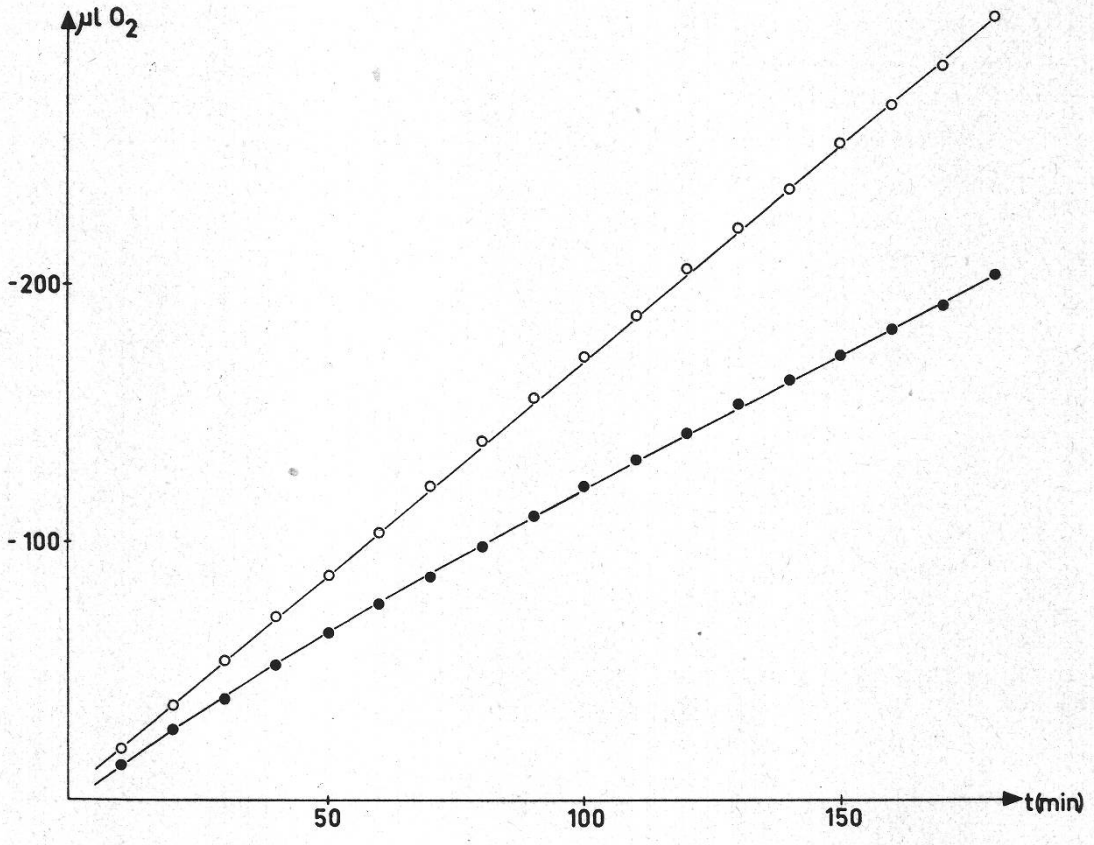
Mannit: Nach der Extraktion Filtrat zweimal mit konzentriertem Alkohol behandelt, so daß Kristalle (Mannit) ausfallen. Diese in Wasser gelöst und mit Butanol – Essigsäure – Wasser – konz. HCl (20:5:25:1) chromatographiert. Entwickler: Vanillin.

III. Experimentelle Ergebnisse

1. Gaswechselgrößen

a) Aerobe Atmung

Der zeitliche Verlauf der endogenen Atmung, definiert als der Gasaustausch der Zelle in Abwesenheit äußeren Substrates, und der Glucoseatmung, worunter hier die bei Fütterung von Glucose auftretende totale Sauerstoffaufnahme, das heißt unter Berücksichtigung einer eventuell noch gleichzeitig vorhandenen Veratmung inneren Substrates, verstanden sein soll, ist in Figur 2 dargestellt. Während bei Glucosefütterung innerhalb eines Zeitintervalls von 3 Stunden nie eine Abnahme der Größe der Sauerstoffaufnahme bemerkt werden konnte, läßt die Grundatmung bei gleicher Versuchsdauer stets ein langsames Absinken ihrer Intensität erkennen. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die durchschnittliche Abnahme etwa 15 % beträgt, ein Wert, der mit demjenigen von Schüttelkulturen des Myceliums von *Scopulariopsis brevicaulis* (Macmillan, 1956) übereinstimmt.



Figur 2

Zeitlicher Verlauf von Grund- und Glucoseatmung

●——● kein exogenes Substrat

○——○ Glucosefütterung

Tabelle 3

Prozentuale Abnahme der Intensität der endogenen Atmung bei längerer Versuchsdauer

Nr.	O_2-Aufnahme (μl)		Abnahme
	1. Stunde	3. Stunde	%
1	71,5	62,0	13
2	57,0	46,0	19
3	43,0	38,0	12

34 Experimente (Tab. 4), deren Material immer je von einer verschiedenen Pilzsendung herstammte und daher, trotz gleicher Auswahl und Behandlung im Laboratorium, in bezug auf das Alter nicht ganz homogen war, zeigten einen in der ersten Versuchsstunde gemessenen mittleren Q_{O_2}-Wert der endogenen Atmung von 2,48. Die aus 30 andern Untersuchungen (Tab. 5) berechnete Größe von Q_{O_2} bei Glucosefütterung ergab einen Durchschnitt von 3,83; die atmungssteigernde Wirkung von Glucose ist unverkennbar und beträgt mehr als 50%.

Tabelle 4

RQ-Werte der endogenen Atmung

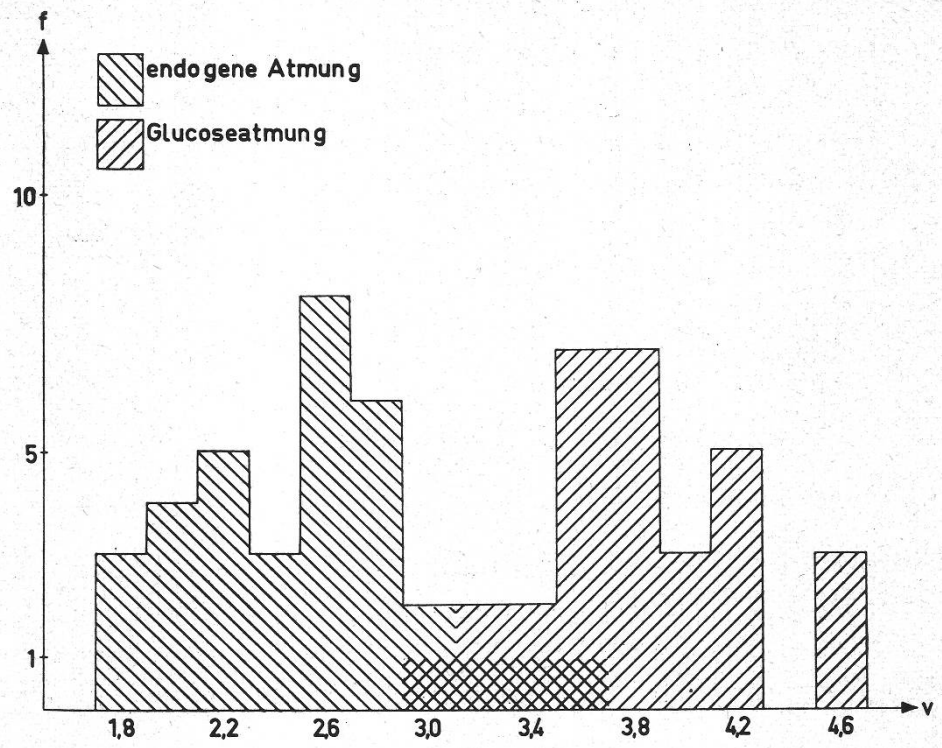
Nr.	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	RQ
1	1,89	1,26	0,67
2	1,86	1,38	0,74
3	2,06	1,44	0,70
4	3,38	2,54	0,75
5	2,16	1,58	0,73
6	1,96	1,59	0,81
7	2,25	1,52	0,68
8	2,69	2,12	0,79
9	2,83	2,07	0,73
10	3,03	2,20	0,73
11	2,53	1,75	0,69
12	2,52	2,03	0,81
13	2,89	2,17	0,75
14	2,11	1,55	0,74
15	2,82	2,06	0,73
16	2,39	1,74	0,73
17	2,69	2,18	0,81
18	2,87	2,30	0,80
19	2,78	2,10	0,76

Tabelle 5

RQ-Werte der Glucoseatmung

Nr.	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	RQ
1	4,13	3,74	0,90
2	3,86	3,64	0,94
3	3,93	3,73	0,95
4	2,92	2,76	0,95
5	4,69	4,23	0,90
6	3,86	3,63	0,94
7	3,70	3,60	0,98
8	3,63	3,34	0,92
9	3,84	3,58	0,93
10	4,58	4,32	0,94
11	4,16	3,95	0,95
12	3,56	3,16	0,89
13	3,42	3,19	0,94
14	3,82	3,52	0,92
15	4,57	4,11	0,90
16	3,90	3,55	0,91
17	4,08	3,89	0,95

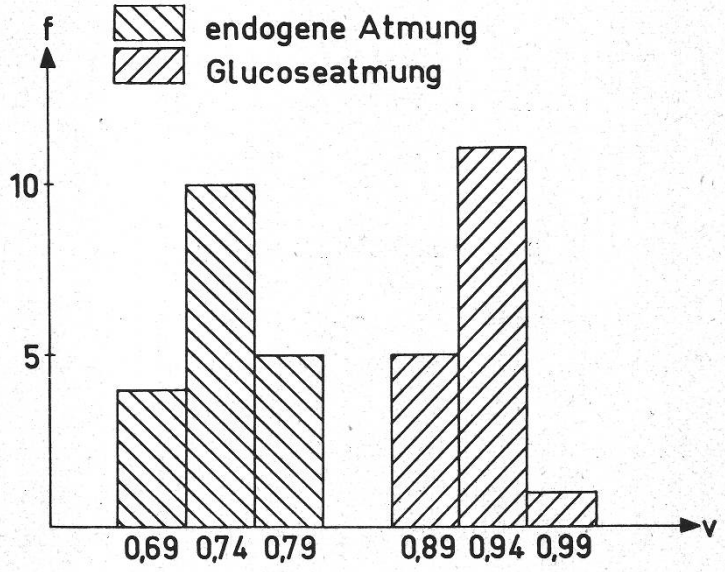
Figur 3 stellt die Resultate graphisch dar, wobei die Einzelwerte hiefür in Klassen zusammengefaßt worden sind (f = Frequenz; v = Klassenwert).



Figur 3

Q_{O_2}-Werte der Grund- und Glucoseatmung

Die Größe der Grundatmung von *Agaricus campester* entspricht somit, wie Versuche mit andern Objekten unter gleichen Bedingungen und bei gleicher Bezugsgröße erkennen lassen, etwa derjenigen von *Boletus edulis*,



Figur 4

RQ-Werte der Grund- und Glucoseatmung

ist doppelt so groß wie diejenige von Blättern von *Coffea arabica* und dem dreifachen Wert von Kartoffelgewebe gleich.

Die in verschiedenen Versuchen ermittelten respiratorischen Quotienten der Grund- und Glucoseatmung sind in den Tabellen 4 und 5 zu finden und in Figur 4 unter Zusammenfassung einzelner Werte in Gruppen dargestellt; zur Berechnung der Standardabweichung σ hingegen wird von einer solchen Klassenbildung Abstand genommen.

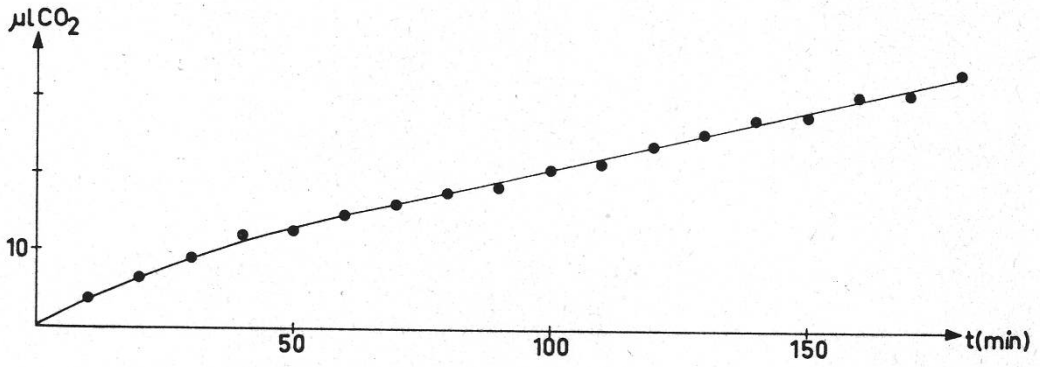
Für die endogene Atmung gilt:

RQ $=$ 0,74, wobei $\sigma = \pm$ 0,04;

und für die Glucoseatmung erhält man:

RQ $=$ 0,93; $\sigma = \pm$ 0,02.

Der Unterschied ist hoch signifikant, und es muß deshalb angenommen werden, daß der Grund- und Glucoseatmung sicher nicht in allen Teilen identische Abbaumechanismen und eventuell auch nicht übereinstimmende andere den Gasstoffwechsel beeinflussende Vorgänge zugrunde liegen.



Figur 5

Zeitlicher Verlauf der Gärung

(Mannosefütterung)

b) Anaerobe Atmung

Die Gärungsgröße ist noch weit mehr, als dies für die Intensität der aeroben Atmung zutrifft, vom Alter des Plectenchyms abhängig, weil Pilze, welche erst 3 Tage nach dem Pflücken zur Messung gelangen, in Stickstoffatmosphäre nur noch minimale Mengen von Kohlendioxyd abgeben. Der Gärungsverlauf (vgl. Fig. 5) läßt sich mit und ohne exogenes Substrat erst nach etwa 60 Minuten, dann also, wenn unter aeroben Bedingungen schon längst Linearität der Atmung erreicht ist, durch eine Gerade darstellen, so daß es fraglich ist, ob die anfänglich gekrümmte Kurve lediglich auf einer verspäteten Einstellung des Temperaturgleich-

gewichtes zwischen Thermostatenflüssigkeit und Objekt beruht. Es scheint viel eher angezeigt, hiefür zum mindesten auch teilweise die Tatsache des Austritts zelleigener Substanzen ins Suspensionsmedium, welcher durch das nach Aufenthalt in Stickstoffatmosphäre im Vergleich zu Kontrollen in Luft stets um mehr als 15% geringere Trockengewicht der Schnitte festgestellt wurde, verantwortlich zu machen, um so mehr als die Gärungsgröße nicht einmal einen Drittel der CO_2-Abgabe unter aeroben Bedingungen erreicht, wie dies bei gleichen Mengen metabolisierten Substrates zu erwarten wäre. Der aus dem linearen Kurventeil von 6 beziehungsweise 10 Versuchen berechnete $Q_{CO_2}^{N_2}$-Wert beträgt 0,28 ohne exogenes Substrat beziehungsweise 0,53 bei Glucosefütterung. Dextrose läßt sich ohne Veränderung der Gärungsgröße durch Mannose ersetzen.

2. Potentielle Atmungssubstrate

a) Zucker und Glucosamin

Über die Fähigkeit verschiedener Zucker und des Glucosamins, die Sauerstoffaufnahme des Plectenchyms zu steigern, gibt Tabelle 6 Auskunft, wobei die Einzelwerte auf die nächste Fünferzahl auf- oder abgerundet sind. In Kolonne 3 ist die Eignung einiger dieser Zucker, als C-Quelle für Myceliumwachstum zu dienen, nach Untersuchungen von Treschow (1944) und Umrechnung der Resultate (Cochrane, 1958)

Tabelle 6

Fähigkeit verschiedener Zucker und des Glucosamins, als Atmungssubstrat zu dienen

Substrat	Steigerung von Q_{O_2} %	Mycelwachstum
Glucose	+70	100
Mannose	+80	—
Galactose	0	73
Fructose	+80	95
Glucosamin	+50	—
Xylose	+55	132
D-Ribose	0	—
L-Arabinose	0	109
D-Arabinose	+ 5	—
Maltose	0	73
Saccharose	−20	68

unter Festsetzung des Wachstumsertrages auf Glucose durch die Zahl 100 dargestellt. Ein Vergleich dieser Werte mit den durch die betreffenden Substanzen im Hutplectenchym hervorgerufenen Atmungssteigerungen

zeigt, daß keineswegs immer Proportionalität zwischen der das Myceliumwachstum steigernden Fähigkeit bestimmter Zucker und den durch sie hervorgerufenen Erhöhungen der Atmungsintensität besteht, wie dies im großen ganzen zu erwarten wäre, indem ein Pilz, falls er auf einem bestimmten Substrat wächst, dieses auch zu oxydieren vermag (Tamiya, 1942). Dies gilt besonders für L-Arabinose, welche die Atmung nicht oder kaum steigert, jedoch eine ausgezeichnete Quelle für Myceliumwachstum darstellt. Ein Grund für diese fehlende Übereinstimmung kann darin liegen, daß die aus Versuchen mit Mycelium ermittelten Resultate, die stets von Nährmedien herstammten, auf welchen nie eine Fruktifizierung festgestellt werden konnte, nicht ohne weiteres auch für das Fruchtkörperwachstum und die daraus zu postulierenden Atmungsvorgänge repräsentativ sein müssen. Außerdem ist ein unterschiedliches Fermentsortiment oder doch eine verschiedene quantitative Verteilung der Enzyme im eigentlichen Mycelium und im Fruchtkörper sehr wohl möglich, wie dies zum Beispiel für Phenoloxydasen zutrifft, wobei unterschiedliche Aktivitäten sogar in einzelnen Teilen des Fruchtkörpers nachgewiesen wurden (Legrand, 1954). – Hingegen ist zu beachten, daß umgekehrt diejenigen Zucker, welche im Fruchtkörperplectenchym erhebliche Atmungssteigerungen verursachen, nach den Angaben in Tabelle 6 immer auch gutes Myceliumwachstum zeitigen.

In allen Fällen, in denen nach Fütterung potentieller Atmungssubstrate eine Steigerung von Q_{O_2} erfolgt, zeigen die Kurven für die Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe schon nach spätestens 15 Minuten wieder linearen Verlauf, und die Atmungsrate bleibt dann bis zum Versuchsende, also während mindestens zweier Stunden, auf dem höhern Niveau. Diese Substanzen werden demnach rasch in den Stoffwechsel aufgenommen, und die Annahme, daß Galactose, Ribose und Arabinose bloß aus Gründen mangelnder Zellpermeabilität nicht zu Steigerungen der Sauerstoffaufnahme führen, ist zum mindesten nicht wahrscheinlich, da für Glucose, Mannose und Fructose sowie Xylose eine solche «Permeabilitätsbarriere» nicht vorliegt.

Auf die gegenüber der Grundatmung um etwa 55% erhöhte Sauerstoffaufnahme nach Glucosefütterung ist schon in Kapitel 1 hingewiesen worden. Wenn die Steigerung der Atmungsintensität jetzt 70% beträgt, so ließe sich dies vielleicht auf die nicht ganz identischen Versuchsbedingungen zurückführen, da die Fütterung hier erst 60 Minuten nach Versuchsbeginn und nicht schon anfänglich erfolgte, wie dies bei den in Kapitel 1 besprochenen Experimenten der Fall war, weshalb die später gefütterten Schnitte ihre Reserven an innerem Substrat auch stärker abgebaut hatten. Daß diese Erhöhung der Sauerstoffaufnahme nach Glucosefütterung tatsächlich auf einer Atmungssteigerung beruht, läßt sich gut durch die sofort erfolgende Erhöhung des RQ von 0,69 auf 0,94 nach-

weisen. Der Wert 1,0 wird wie bei der früher erwähnten Versuchsreihe zur RQ-Bestimmung bei Glucosefütterung selten erreicht.

Interessant ist die Tatsache, daß Mannose für den Pilz sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen (vgl. Kap. 1) ein mindestens so gutes Atmungssubstrat wie Glucose darstellt, während sie bei höhern Pflanzen oft toxisch wirkt (James, 1953c). So setzt Mannose zum Beispiel die endogene Atmung von Tomatenwurzeln stark herunter und hemmt die Veratmung von Saccharose, welche, für sich allein gefüttert, eine starke Erhöhung der Sauerstoffaufnahme zeitigt und die einzige brauchbare C-Quelle für das Wachstum der abgeschnittenen Wurzelspitzen darstellt (Morgan and Street, 1959). Im Hutplectenchym von *Agaricus campester* hingegen führt Fütterung von Saccharose nicht zur geringsten Erhöhung der Sauerstoffaufnahme und wirkt eventuell sogar eher hemmend.

Galactose scheint im Gegensatz zu Fructose als Atmungssubstrat für das Fruchtkörpermycelium nicht in Frage zu kommen, wenngleich nicht ausgeschlossen ist, daß jener Zucker in geringen Mengen oxydiert wird, weil er wenigstens das oft festgestellte Absinken der Grundatmung im Laufe der Versuchsdauer (ca. 15%) verhindert und der RQ nach Fütterung von 0,78 auf 0,84 stieg, so daß man eine der endogenen Atmung superponierte Oxydation von Galactose annehmen könnte.

Da Chitin «als eine Art Inkrustation» an der Zellwandbildung von *Agaricus campester* teilnimmt (Proskuriakow, 1926) und ein lineares Polymeres von N-acetylierten Glucosaminresten darstellt, war es interessant, zu untersuchen, ob D-Glucosamin, als Glucosaminhydrochlorid gefüttert, ein mögliches Atmungssubstrat des Pilzes sei. Dies trifft, wie Tabelle 6 zeigt, zu, wodurch eine Bedeutung dieses Aminozuckers auch im normalen Stoffwechsel des Champignons zwar nicht bewiesen, aber doch wahrscheinlich gemacht wird.

Bemerkenswert ist die gut ausgebildete Fähigkeit des Pilzes, Xylose unter Erhöhung des respiratorischen Quotienten gegen den Wert 1 zu veratmen. Der genaue Abbauweg dieses Zuckers ist noch nicht untersucht, man nimmt jedoch an, daß er als Pentosephosphat in den Pentoseshunt eintritt (Cochrane, 1958). Die Frage, wieso hingegen Ribose, bei deren Fütterung der RQ genau auf 0,67 verblieb, sowie D- und L-Arabinose den Gasstoffwechsel praktisch nicht beeinflussen, läßt sich ohne weitere Untersuchungen nicht befriedigend beantworten.

Eine nicht aus Permeabilitätsgründen fehlende Fähigkeit von Maltose und Saccharose, die Atmungsintensität zu steigern, vorausgesetzt, ergeben sich aus dem Verhalten dieser Disaccharide bei Fütterung folgende Interpretationsmöglichkeiten:

Da das Hutmycelium Maltose im Gegensatz zu Glucose bei nur unwesentlich erhöhtem RQ (Steigerung von 0,75 auf 0,79) kaum veratmet,

kann man ein Fehlen von Maltase zum mindesten in dieser Region des Pilzfruchtkörpers annehmen. Nicht uninteressant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß *Agaricus campester* im Unterschied zu vielen andern Basidiomyceten weder Trehalose (Kostytschew, 1910) noch Trehalase (Willstaedt et Borggård, 1946) enthält und auch nicht fähig ist, lösliche Stärke als C-Quelle für Myceliumswachstum zu gebrauchen (Treschow, 1944).

Das Fehlen einer atmungssteigernden Wirkung von Saccharose, während Fütterung von Glucose und Fructose je zu beträchtlicher Erhöhung der Sauerstoffaufnahme führt, spricht wie der Versuch mit Maltose für das Nichtvorhandensein sowohl von α-Glucosidase als auch speziell von Saccharase im Hutplectenchym.

Diese Folgerungen und Erwägungen werfen sogleich die Frage nach der Art der Translokation von Kohlehydraten beim Champignon auf, nachdem bekannt ist, daß bei höhern Pflanzen Saccharose die Transportform der Zucker darstellt. Da bei *Agaricus campester* nie freie Zucker, wohl aber Zuckerphosphate (siehe Kap. 3) festgestellt werden konnten und die Aufnahme von Glucose in die Zellen wahrscheinlich nicht einfach auf Diffusion beruht, sondern einen aktiven Vorgang, an dem eine Phosphorylierung beteiligt ist, darstellt (Paech, 1953), kann die Möglichkeit, daß Translokation von Kohlehydraten aus dem eigentlichen Mycelium in den Fruchtkörper in Form von Phosphorsäureestern stattfindet, nicht von vorneherein ausgeschlossen werden, und es ließe sich denken, daß zum Beispiel Glucose von der Aufnahme durch das Mycelium bis zur Bildung von Glycogen im Fruchtkörper, welche ja durch Abspaltung von Phosphat aus Glucose-1-phosphat erfolgt, normalerweise überhaupt nie frei auftritt.

Tabelle 7

Steigerung der Sauerstoffaufnahme nach Fütterung von Phosphorsäureestern

Substrat	Steigerung von Q_{O_2} %
Glucose-1-phospat	+10
Glucose-6-phosphat.....	—10
Fructose-6-phosphat	+55
Fructose-1,6-diphosphat ..	+20
Ribose-5-phosphat	—20
3-Phosphoglycerat	—15

b) Phosphorsäureester

Wie Tabelle 7 zeigt, konnten deutliche Atmungssteigerungen lediglich mit Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-diphosphat erzielt werden,

während Glucose-1-phosphat nur schwache Wirkung ergab. Es ist demnach wahrscheinlich, daß die beiden ersten Zuckerphosphate Intermediärprodukte des normalen Atmungsstoffwechsels des Hutplectenchyms darstellen, eine Annahme, die auch dadurch gestützt wird, daß Fütterung von Fructose-6-phosphat den RQ von 0,76 auf 1,01 erhöhte.

Die negativen Resultate mit den andern geprüften Phosphorsäureestern sind für irgendwelche Beweisführung unbrauchbar, da die Durchlässigkeit des Plasmas für phosphorylierte Substanzen, welche vielleicht auch mehr oder weniger selektiv sein könnte, ganz allgemein schlecht ist, und wie bei allen Fütterungsversuchen, die kein positives Ergebnis zeigen, muß man auch hier die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß in den Zellen bereits Sättigung mit dem betreffenden Substrat vorliegt, weshalb Zugabe der gleichen Substanz die Atmungsgeschwindigkeit dann kaum zu beschleunigen vermag.

c) Organische Säuren

Die obigen Bemerkungen über schlechte Permeation gewisser Testsubstrate, deren Zugabe ins Suspensionsmedium den Gaswechsel nicht beeinflußt, und mögliche Sättigung des Plectenchyms mit Verbindungen, welche schon vor der Fütterung nicht atmungsbegrenzend waren, gelten speziell auch für Säuren. Mit Ausnahme von cis-Aconitsäure ist bei allen in Tabelle 8 verzeichneten Substraten spätestens 20 Minuten nach Fütterung wieder Linearität der Sauerstoffaufnahme festzustellen, die dann bis zum Versuchsende gleiche Intensität beibehält.

Tabelle 8

Fähigkeit von Säuren, die Sauerstoffaufnahme zu steigern

Substrat	Steigerung von Q_{O_2} %
Acetat	+50
cis-Aconitat	+20
Malat	+20
Oxalacetat	+15
α-Ketoglutarat	+10
Fumarat	+10
Succinat	+ 5
Oxalat	+ 5
Pyruvat	— 5
Citrat	— 5

Acetat, welches als C-Quelle für das Myceliumwachstum von *Agaricus campester* nicht in Frage kommt und sogar hemmend wirkt (Treschow,

1944), steigert die am Sauerstoffverbrauch feststellbare Atmungsintensität um 50%, und es scheint deshalb möglich, daß lediglich Sekundäreffekte, wie zum Beispiel Erhöhung des pH über das im schwach sauren Gebiet liegende Wachstumsoptimum hinaus, die toxische Wirkung von Acetat im Kulturmedium des Champignons verursachen.

Die nach Zukippen von cis-Aconitsäure (sowohl in Form der Säure als auch als Na-Salz gefüttert) festzustellende Atmungskurve weist konkave Krümmung auf, und erhöhte Sauerstoffaufnahme erfolgt nur während maximal einer Stunde, wobei zur Berechnung der in Tabelle 8 angegebenen Steigerung von Q_{O_2} der entsprechende Kurvenbogen durch die dazugehörige Sekante ersetzt wurde. Die Atmungsintensität fällt dann aber stetig ab und erreicht schließlich einen Wert, der etwa 25% unter demjenigen der Grundatmung liegt, so daß jetzt eventuell sogar eine Hemmung der endogenen Atmung durch diese Säure vorliegt. Wessels (1959) erhielt mit einer Partikelfraktion des Myceliums von *Schizophyllum commune* eine ähnliche Kurve, jedoch ohne Hemmung, während gleichzeitig die Sauerstoffaufnahme bei Fütterung von andern Säuren des Krebscyclus mehr oder weniger linear war. Die anfänglich gute, später aber immer schwächer werdende Atmungssteigerung durch cis-Aconitat könnte vielleicht auf einer spezifischen Wirkung dieser Verbindung im Mechanismus des Stoffabbaus beruhen.

Von den Säuren des Krebscyclus führen außer cis-Aconitat nur Malat, welches auch einen guten C-Lieferanten im Kulturmedium des Pilzes darstellt und Glucose darin an Wirksamkeit übertrifft (Treschow, 1944), und Oxalessigsäure zu nennenswerten Steigerungen von Q_{O_2}, während α-Ketoglutarat, Fumarat und Succinat diesen Wert wenig beeinflussen. Fütterung von Citrat schließlich hat keine Wirkung auf die Atmungsgröße, was eine allgemeine Erscheinung darstellt, da diese Säure nur selten durch lebende Zellen, wohl aber durch Extrakte oxydiert wird (Wiame and Bourgeois, 1953).

Vielleicht ließen sich durch Kombination von Pyruvat und je einem Intermediärprodukt des Tricarbonsäurecyclus größere Steigerungen der Sauerstoffaufnahme hervorrufen; da aber Oxydation von Säuren des Krebscyclus durch Gewebeschnitte wohl in Übereinstimmung mit der Funktion dieses Atmungsmechanismus steht, sein Vorhandensein jedoch nicht beweist, wurde auf Durchführung weiterer solcher Versuche verzichtet.

Oxalsäure, deren biochemischen Ursprung wahrscheinlich Oxalacetat darstellt (Cochrane. 1958), kommt als Atmungssubstrat des Fruchtkörpers kaum in Frage, obschon sie im Kulturmedium bei Testversuchen zur Ermittlung von Myceliumwachstum Glucose gleichwertig zu ersetzen vermag (Treschow, 1944), und es ist deshalb möglich, daß Oxalat im Fruchtkörper von *Agaricus campester* ein Stoffwechselendprodukt dar-

stellt, wie dies auch für Mycelium von *Botrytis cinerea* (Gentile, 1954) angenommen wird, eine Meinung, die um so mehr an Wahrscheinlichkeit gewinnt, wenn man berücksichtigt, daß im Hymenium reifer Champignons oft starke Inkrustationen von Oxalat festzustellen sind.

d) Alkohole

Mannit, welcher bei *Agaricus campester* im Gegensatz zu vielen Pilzen kein Wachstum des Myceliums zeitigt (Treschow, 1944), ist, wie Tabelle 9 zeigt, bei Fütterung nach Standardbehandlung der Schnitte auch in bezug auf den Gasstoffwechsel inaktiv. Erhöhung des pH von 4,8 auf 7,0 vermochte an dieser Tatsache nichts zu ändern, weil sich dann sogar ein Absinken der Intensität der Grundatmung um 20 % ergab, ein Wert, welcher noch unter der durchschnittlichen Abnahme der endogenen Atmung ohne Fütterung von Substrat im Laufe der Versuchsdauer liegt. Da 0,5 % Hefeextraktlösung (siehe Kap. 7) sowohl die Grund- als auch die Glucoseatmung sehr stark steigert, wurde auch versucht, Mannit in Anwesenheit dieses Extraktes im Suspensionsmedium der Schnitte zu füttern, in der Meinung, dieser enthalte vielleicht entsprechende Wirkstoffe. Auch diese Applikationsmethode für den Alkohol war erfolglos, da die durch Mannit hervorgerufene Steigerung von Q_{O_2} —10 % betrug. Schließlich erfolgte vorgängig der Messungen im üblichen Medium Suspension der Schnitte in 0,006 m Mannitol während 18 Stunden, worauf das Substrat dann während des Versuches zugekippt wurde. Das so «adaptierte» Plectenchym zeigte nun eine Steigerung von Q_{O_2} um +10 %.

Tabelle 9

Steigerung von Q_{O_2} nach Fütterung von Alkoholen

Substrat	Steigerung von Q_{O_2} %
Mannit	— 5
Sorbit	+10
Äthanol.....	+15

Die Biosynthese von Mannit, dessen Vorhandensein im Fruchtkörper chromatographisch nachgewiesen wurde und dessen Anteil am Trockengewicht bis zu 20 % beträgt (Quillet et Legrand, 1952b), ist nicht untersucht. Man nimmt jedoch an, daß dieser Zuckeralkohol im Kulturchampignon ein Abbauprodukt des Glycogens darstellt, da eine starke Bildung von Mannit erfolgt, wenn man die Pilze in Stickstoffatmosphäre aufbewahrt, wobei die Abnahme der Glycogenmenge dem zusätzlich akkumulierten Mannitol entspricht (Quillet et Legrand, 1952b). Nach gut fun-

dierter Hypothese soll Fructose oder Fructosephosphat direkte Vorstufe sein, durch deren Reduktion, zum Beispiel durch DPNH+H^+, dann dieser Alkohol entstünde, wobei die Tatsache, daß Verminderung des Sauerstoffangebots die Mannitbildung erhöht, mit dem reduktiven Ursprung dieses Stoffes in Übereinstimmung steht (Cochrane, 1958).

Ob Mannit wirklich, wie dies Obaton (1932) annimmt, eine Reservesubstanz der Pilze darstellt, ist nach vorliegenden Versuchen zum mindesten für *Agaricus campester* eher fraglich, da er unter Bedingungen, welche vollständige Metabolisierung von Zuckern gestatten, die Atmungsintensität des Plectenchyms nicht zu erhöhen vermag, weshalb die Möglichkeit in Betracht gezogen werden müßte, ob Mannit nicht eher ein Produkt der Atmung als natürliches Atmungssubstrat ist und vielleicht unter normalen Umständen überhaupt nicht wieder in den Stoffwechsel eintritt.

Sorbit erhöhte den Q_{O_2}-Wert um 10%, jedoch nur während einer Stunde, und nachher war die Sauerstoffaufnahme genau gleich groß wie vor der Fütterung.

Interessant ist das Ergebnis, daß Äthanol selbst in äußerst geringer Konzentration ($5 \cdot 10^{-2}$ Vol.-%) zu einer deutlichen Steigerung der Atmungsintensität führt, ohne daß Schädigung des Plectenchyms hätte festgestellt werden können. Da *Agaricus campester* diesen Alkohol offenbar veratmet, liegt die Annahme einer Alkoholdehydrogenase nahe, und die Möglichkeit, daß dieser Pilz unter bestimmten Bedingungen Äthylalkohol zu bilden vermag, stünde damit in Einklang, im Gegensatz zu den Beobachtungen von Kostytschew (1907, 1910), der angibt, daß die anaerobe Atmung ganzer Fruchtkörper sowie von Preßsaft des Kulturchampignons mit der alkoholischen Gärung nichts zu tun habe (vgl. auch Abschnitt IV).

Die Fähigkeit zur Veratmung von Äthylalkohol scheint zwar nicht allgemein verbreitet (James, 1953c), aber doch auch nicht außergewöhnlich zu sein, da ein solcher Äthanolabbau unter anderem auch in meristematischem Wurzelgewebe stattfindet (Betz, 1958).

3. Das natürliche Atmungssubstrat (Arsenatvergiftung)

Der tiefe RQ der Grundatmung, welcher mit demjenigen von Fetten oder Proteinen übereinstimmt, und das Fehlen von Zuckern in den Fruchtkörpern einerseits, die experimentelle Tatsache, daß gewisse Zucker, besonders Glucose, die Atmungsintensität unter Erhöhung des RQ gegen 1 steigern, andererseits, ließen es als wünschenswert erscheinen, die Natur des Substrates der endogenen Atmung, das bei Pilzen ganz allgemein nicht bekannt ist, näher zu untersuchen. Schließt man Fette und Proteine als natürliche Atmungssubstrate aus, da außer dem respiratorischen Quotienten keine Anhaltspunkte für deren Teilnahme an der endogenen

Atmung vorliegen (Macmillan, 1956), so muß man sich sagen, daß ein unter 1 liegender RQ bei Kohlehydratveratmung prinzipiell durch erniedrigte CO_2-Abgabe, zum Beispiel bei CO_2-Fixierung im Gewebe, oder durch erhöhten Sauerstoffverbrauch, wie etwa bei oxydativer Assimilation, oder ganz allgemein bei Vorhandensein von den Gaswechsel beeinflussenden Stoffumwandlungen, die mit der Atmung direkt aber nichts zu tun haben müssen, zustande kommen könnte. Die besondere biochemische Wirkungsweise von Arsenat, das mit Erfolg auch in Versuchen nach der Gewebeschnittmethode angewendet wird (James, 1953a), erlaubt es, diese Möglichkeit zu prüfen.

Arsenat ist ein Entkoppler sowohl der Substrat- als auch der Atmungskettenphosphorylierung, da es Phosphat kompetitiv zu ersetzen vermag (Warburg und Christian, 1939; Needham and Pillai, 1937), wobei die dabei gebildeten Ester wegen ihrer großen Labilität aber spontan zerfallen. Während in den sich unter Teilnahme von Phosphat abspielenden Vorgängen reversible Gleichgewichte auftreten, ist dies jedoch nach Zugabe von Arsenat nicht mehr der Fall, da die so entstehenden Verbindungen sofort hydrolysiert werden und die Reaktionen deshalb vollständig nur in einer Richtung, in derjenigen des Abbaus, verlaufen (Katz and Hassid, 1951). Man erhält so eine vollständige Oxydation des Atmungssubstrates. Ebenso ist bekannt, daß Arsenat in solchen phosphorolytischen Reaktionen, bei denen normalerweise Glucose-1-phosphat entsteht, zur Bildung von freier Glucose führt (Katz and Hassid, 1951).

Tabelle 10

Einfluß von Na-Arsenat auf die Gaswechselgrößen

Inhibitorkonzentration	Veränderung von Q_{O_2} %	Veränderung von Q_{CO_2} %	RQ
10^{-4} m:			
Grundatmung	—10	+ 1	0,75 → 0,85
Glucoseatmung	+ 7	—	—
10^{-3} m:			
Grundatmung	—23	—14	0,82 → 0,91
Glucoseatmung	—16	—13	0,97 → 1,01

Die Veränderungen der Gaswechselgrößen bei Arsenatvergiftung mit Phthalatpuffer als Suspensionsmedium sind in Tabelle 10 dargestellt. Eine Inhibitorkonzentration von 10^{-4} m beeinträchtigt die am Sauerstoffverbrauch gemessene Intensität der endogenen Atmung nicht, da die prozentuale Abnahme von Q_{O_2} etwa derjenigen unvergifteter Pilze gleichkommt. Hingegen ist eine deutliche Zunahme des respiratorischen Quotienten festzustellen. Die Glucoseatmung erfährt durch die gleiche Kon-

zentration des Hemmstoffes sogar eher eine Steigerung, was vielleicht darauf beruht, daß Arsenat anorganisches Phosphat, dessen intrazelluläre Konzentration bei Verwendung von Phthalatpuffer im Laufe der Versuchsdauer atmungsbegrenzend werden könnte, ersetzt.

Hingegen ergibt sich mit 10^{-3} m Arsenatlösung sowohl bei Grund- als auch bei Glucoseatmung eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme, die wahrscheinlich nicht durch direkte Wirkung des Inhibitors, sondern durch die zu starke ionale Konzentration nach Zukippen des Giftes zustande kommt, weil das Na-Arsenat (Na_2HAsO_4) mit ziemlich großen Mengen von festem K-Biphthalat auf das gewünschte pH (4,8) heruntergepuffert werden mußte, damit bei Zugabe des Inhibitors in den Hauptraum der Reaktionsgefäße keine wesentliche Veränderung der Azidität eintritt, was für eine exakte RQ-Bestimmung Voraussetzung ist. Zugabe von Phthalatpuffer in der als Lösungsmittel für Na-Arsenat gewählten Konzentration hemmt die Atmung ebenfalls (um etwa 15%).

Wie 10^{-4} m Arsenat ergab auch die zehnmal größere Konzentration des Hemmstoffes eine deutliche Erhöhung des RQ der endogenen Atmung, und bei Glucosefütterung wurde dabei der Wert 1 erreicht.

Man versuchte nun auch, durch Infiltration der Schnitte mit 10^{-3} m Arsenat (in Phthalatpuffer gelöst) ein besseres Eindringen des Hemmstoffes in die Zellen und damit eventuell auch eine größere Erhöhung des RQ der endogenen Atmung hervorzurufen, wobei in Parallelversuchen lediglich eine Infiltration von Phthalatpuffer erfolgte. Die Resultate dieses Versuches sind aus Tabelle 11 ersichtlich.

Tabelle 11

Gaswechselgrößen der endogenen Atmung nach Infiltration der Schnitte mit 10^{-3} m Na-Arsenat beziehungsweise Phthalatpuffer bei der Kontrolle

	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	RQ
Kontrolle	2,52	2,03	0,81
10^{-3} m Na-Arsenat	2,51	2,51	1,00

Unter Berücksichtigung der obenerwähnten Wirkungsweisen von Arsenat lassen sich diese RQ-Veränderungen folgendermaßen interpretieren:

Auch Schnitte mit lediglich endogenem Substrat metabolisieren Kohlehydrate, das heißt, das natürliche Atmungssubstrat ist ein Kohlehydrat.

Trotz dem tiefen RQ, dem Fehlen freier Zucker (ein Extrakt aus 16g Plectenchym enthielt nach chromatographischer Prüfung keine Spur von

Zucker) und dem offensichtlichen Unvermögen des Pilzgewebes, Disaccharide wie Maltose und Saccharose zu veratmen, sind also nicht Proteine als natürliches Atmungssubstrat zu betrachten. *Agaricus campester* enthält aber Glycogen, Hemicellulosen und Chitin (Randoin et Billaud, 1956), und die Annahme, daß einer dieser Stoffe als natürliches Atmungssubstrat des Fruchtkörpers in Frage kommt, scheint naheliegend. Der Glycogengehalt des Pilzes nimmt während einer Lagerungszeit von 48 Stunden in Luft um die Hälfte ab (Quillet et Legrand, 1952b), ohne daß sich etwa eine Zunahme der Menge von Mannit, welcher ja aus Glycogen gebildet werden kann, ergäbe, weshalb Veratmung des Glycogens wahrscheinlich ist.

In diesem Zusammenhang muß man auch berücksichtigen, daß bei höhern Pflanzen Zuckerphosphate oft nur schwer zu fassen sind, beim Champignon hingegen größere Mengen von Phosphorsäureestern, von welcher einer als Fructose-6-phosphat identifiziert wurde, auftreten. Diese könnten sowohl als Zuckerphosphate aus dem eigentlichen Mycelium in den Fruchtkörper gelangen (vgl. Kap. 2a) als auch Abbauprodukte polymerer Kohlehydrate darstellen.

In überspitzer Kritik ließe sich gegen die Folgerung, daß der endogenen Atmung der Fruchtkörper in dem hier betrachteten Entwicklungszustand ein Kohlehydratabbau zugrunde liege – wahrscheinlich mit Glycogen und/oder Zuckerphosphaten als Substrat –, folgender Einwand erheben: «Die endogenen Kohlehydratreserven sind nicht Atmungssubstrat; sie werden es erst im Zeitpunkt der Vergiftung», oder anders ausgedrückt: «Na-Arsenat induziert die Kohlehydratveratmung.» Als Gründe für die sehr geringe Wahrscheinlichkeit dieser Annahme, für welche jegliche Beweise fehlen, sind etwa folgende zwei Punkte zu nennen:

1. Wenn die Hypothese einer Induktion der Kohlehydratatmung durch Arsenat stimmte, so würde dies heißen, daß die endogene Atmung normalerweise den Abbau der Kohlehydratreserven unterdrückt, was an sich schon höchst unwahrscheinlich ist. Durch Arsenat würde dann dieser kontrollierende Einfluß ausgeschaltet, weil die Grundatmung selbst oder die Suppressorreaktion verunmöglicht wäre.

2. Füttert man frische Pilze mit Zuckern, so zeigen sie geringere Atmungssteigerungen, als wenn man sie zuvor hungern läßt. Es liegt also natürlicherweise ein Überschuß an Atmungssubstrat vor, von welchem zunächst nur ein Teil durch die entsprechenden Fermentsysteme verarbeitet werden kann. Nach einer Starvationperiode aber, während welcher dem Champignon lediglich endogenes Substrat zur Verfügung steht, sind die Plectenchymschnitte fähig, exogene Zucker rasch zu veratmen, wonach man annehmen muß, daß sie vor der Fütterung ebenfalls Kohlehydrate abgebaut haben und nach teilweiser Erschöpfung des inneren Substrates jetzt auch äußeres oxydieren, wobei nur mit der Tracermethode zu

entscheiden wäre, ob und in welchem Ausmaß die Veratmung exogenen und endogenen Substrates gleichzeitig erfolgt.

Die den tiefen RQ der Grundatmung bedingenden Reaktionen sind offenbar mit der respiratorischen Substratkette irgendwie verknüpft. Daß mit der Atmung nicht in Verbindung stehende Vorgänge, wie zum Beispiel Oxydation von Phenolen, einen zusätzlichen Sauerstoffverbrauch und dadurch eine Erniedrigung des RQ hervorriefen, ist aus zwei Gründen nicht anzunehmen:

1. Bei Inaktivierung der Tyrosinase des Pilzes (siehe Kap. 8d, 8e) kann man keine Verminderung von Q_{O_2} feststellen. Die im unbeeinflußten Plectenchym auf die Tätigkeit der Phenoloxydasen zurückführbare Sauerstoffaufnahme ist im Verhältnis zur Atmungsintensität demnach so gering, daß sie im Laufe der Versuchsdauer nicht in Erscheinung tritt.

2. Der RQ erreicht nach Arsenatvergiftung auch bei der Glucoseatmung den Wert 1, übersteigt ihn aber nicht.

Schließlich kann man sich noch die Frage nach der Art dieses gleichzeitig mit der Atmung ablaufenden, den Gaswechsel beeinflussenden Vorganges stellen. Die Versuchsergebnisse lassen zunächst keinen weitergehenden Schluß zu, als daß sich die zu postulierende Reaktion unter Beteiligung anorganischen oder organischen Phosphates abspielt, da alle bei Arsenatvergiftung auftretenden Stoffwechselveränderungen letztlich bloß eine Folge der Verdrängung von Phosphat durch diesen Antimetaboliten und der sehr großen Labilität der Arsenatester darstellen. Dabei würde auch Sauerstoff aufgenommen oder aus der Atmung stammendes CO_2 fixiert, was einer scheinbar zu geringen CO_2-Abgabe gleichkommt. Letzteres ist nach den in Tabelle 11 verzeichneten Resultaten wahrscheinlicher.

4. Embden-Meyerhof-Parnas-Schema

a) Jodacetatvergiftung

Monojodessigsäure wurde durch Lundsgaard (1930) als Hemmstoff der Glycolyse von Muskelbrei in die Biochemie eingeführt. Turner (1937, 1938) zeigte dann die Möglichkeit der Anwendung dieses Stoffwechselgiftes auch bei pflanzlichem Gewebe. Jodacetat ist ein Reagens auf bestimmte SH-Enzyme (Barron and Singer, 1945), zeigt aber genügend Spezifität, um zur Aufklärung von Atmungsmechanismen dienen zu können. Von den Fermenten des EMP-Schemas werden dabei die Triosephosphatdehydrogenase und eventuell noch die Alkoholdehydrogenase betroffen, während unter aeroben Bedingungen unter anderem zusätzlich auch eine Beeinträchtigung der Funktion der Succinodehydrogenase auftreten kann, allerdings durch eine viel höhere Konzentration von Mono-

jodessigsäure, als sie zur Hemmung der Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase notwendig ist (James, 1953a).

Da Jodacetat schlecht in die Zellen eindringt (Turner, 1938), wurde der Hemmstoff nicht wie üblich während des Versuches nach Erreichen einer linearen Atmungsrate zugegeben, sondern es erfolgte vorgängig der Messungen eine Suspension der Schnitte in Phosphatpuffer und Monojodacetat während 18 Stunden, und die Reaktionsgefäße enthielten den Inhibitor schon von Versuchsbeginn an. Die durch diesen hervorgerufenen Gaswechselveränderungen sind auf die Kontrollen ohne Jodessigsäure bezogen.

Die mit dem Antimetaboliten behandelten Schnitte hatten bei einer Konzentration des Hemmstoffes von 10^{-3} m beziehungsweise 10^{-2} m stets ein geringeres Trockengewicht (etwa 5% bzw. 25%) als die Kontrollen, so daß man an den Austritt zelleigener Substanzen (Exosmose?) unter Einfluß von Jodacetat denken könnte, wobei das Gewebe wahrscheinlich nicht abgestorben ist, da es noch eine schwache Atmung zeigt und der Trockengewichtsverlust nicht so viel wie bei solchen Schnitten, die während des Versuches abgetötet wurden (z. B. mit 10^{-2} m *p*-Nitrophenol), beträgt. Interessant ist dabei, daß der in Stickstoffatmosphäre stets feststellbare Trockengewichtsverlust (vgl. Kap. 1) sich additiv zu dem durch Monojodacetat hervorgerufenen verhält, das heißt, die unvergifteten Kontrollen in Luft wiesen, nach Versuchsende getrocknet, das größte, die unvergifteten Schnitte in Stickstoffatmosphäre ein mittleres und die durch Jodessigsäure unter Anaerobie vergifteten das kleinste Gewicht auf. Um die Atmung solchermaßen geschädigten Plectenchyms mit derjenigen der Schnitte ohne Inhibitor vergleichen zu können, wurden alle Gaswechselgrößen mit Hilfe des Trockengewichtes der Kontrollen berechnet, ein Vorgehen, welches sich praktisch aber nur bei der höchsten verwendeten Konzentration des Hemmstoffes auswirkt.

Tabelle 12

Einfluß von Na-Monojodacetat auf die anaerobe Atmung

(prozentuale Veränderung der $Q_{CO_2}^{N_2}$-Werte)

Inhibitor-konzentration	«Endogene Gärung» %	«Glucose-gärung» %
10^{-4} m	—45	—
10^{-3} m	—50	—70
10^{-2} m	—55	—80

Wie Tabelle 12 zeigt, wird die anaerobe Atmung des Kulturchampignons mit und ohne Glucose als Substrat durch Monojodessigsäure stark

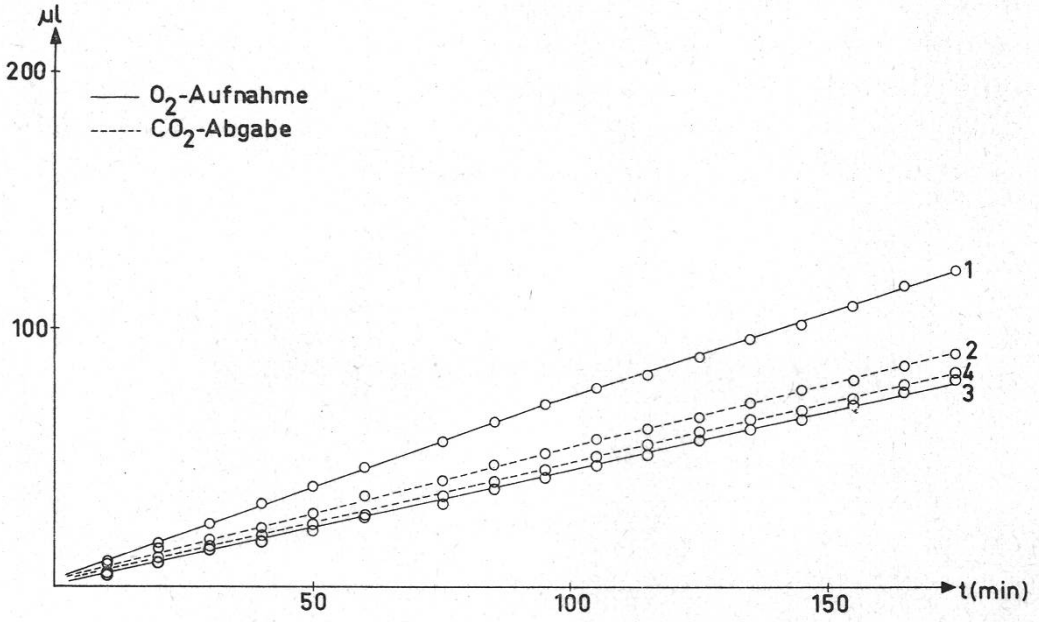
gehemmt. Annahme der Funktion von Triosephosphatdehydrogenase in beiden Fällen stimmt mit diesen Versuchsergebnissen überein. Es muß dabei nicht postuliert werden, daß der in Gegenwart des Jodacetates noch vorhandenen «Restgärung», deren Zustandekommen Turner (1938) erläutert, ein besonderer Abbauweg zugrunde liege.

Tabelle 13

Veränderung der Gaswechselgrößen nach Jodacetatvergiftung

Nr.	Konzentration des Hemmstoffes	Grundatmung			Glucoseatmung		
		Q_{O_2} %	Q_{CO_2} %	RQ	Q_{O_2} %	Q_{CO_2} %	RQ
1	0	100	100	0,73	100	100	0,94
	10^{-4} m	94	97	0,76	75	85	1,06
2	0	100	100	0,81	100	100	0,95
	10^{-3} m	72	93	1,06	39	50	1,24
3	0	100	100	0,73	100	100	0,94
	10^{-2} m	11	16	1,00	8	10	1,15

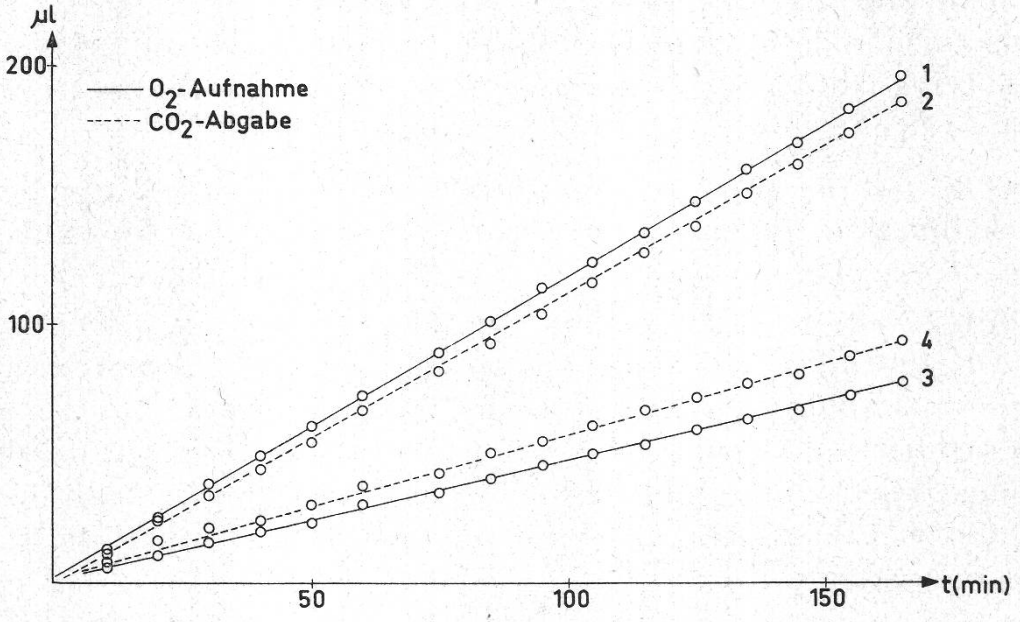
In Tabelle 13 sind die Resultate dreier Versuchsreihen von Atmungsmessungen bei verschiedenen Konzentrationen von Jodessigsäure zu sehen, und die Figuren 6a und 6b zeigen eine graphische Darstellung der



Figur 6a

Kurven der Grundatmung ohne Hemmstoff und in 10^{-3} m Jodacetat
1, 2: Endogene Atmung ohne Hemmstoff (Kontrolle)
3, 4: Endogene Atmung in 10^{-3} m Jodacetat

experimentellen Ergebnisse von Nr. 2. Daß in allen Fällen auch nach Vergiftung Glucose noch immer eine Rolle im Stoffwechsel spielt, ist nach dem stets höhern RQ bei Fütterung dieses Zuckers, die ja erst 18 Stunden nach Beginn der Applikation von Jodessigsäure erfolgt, anzunehmen.



Figur 6b

Kurven der Glucoseatmung ohne Hemmstoff und in 10^{-3} m Jodacetat

1, 2: Glucoseatmung ohne Hemmstoff (Kontrolle)

3, 4: Glucoseatmung in 10^{-3} m Jodacetat

Da die endogene Atmung im Gegensatz zur Glucoseatmung durch 10^{-4} m Monojodacetat nur ganz schwach gehemmt wird, wobei der für die Grundatmung charakteristische Wert auftritt, die «endogene Gärung» durch die gleiche Inhibitorkonzentration aber eine Erniedrigung um 45 % erfährt, folgt, daß für endogenes Substrat bei aerober Atmung vornehmlich ein anderer Abbauweg, möglicherweise direkte Oxydation, als bei Glucosefütterung vorliegt, eine Hypothese, die übrigens mit dem Schluß, welcher aus der Fluoridvergiftung (siehe dort) zu ziehen ist, übereinstimmt.

Hingegen ist der Einfluß des verwendeten Antimetaboliten selbst in einer Konzentration von 10^{-4} m auf die Glucoseatmung unverkennbar, weshalb ein Funktionieren des EMP-Weges für Glucoseabbau naheliegend ist, ohne daß deshalb die Möglichkeit eines teilweisen Abbaus gefütterter Glucose im Pentoseshunt auszuschließen wäre. Die Erhöhung des RQ auf 1,06 kann nach der Wirkungsweise von Jodessigsäure nicht etwa durch aerobe Gärung verursacht sein, sondern ist wahrscheinlich auf gleichzeitige Oxydation von Stoffwechselintermediärprodukten, welche in der Substratkette nach den Triosephosphaten folgen, möglicherweise Säuren, und von Glucose, deren Abbau allerdings teilweise gehemmt wäre, zurückzuführen, so wie Turner (1937) bei Hefe eine Veratmung von Al-

kohol, der noch vor der Vergiftung mit Jodacetat gebildet wurde, unter Auftreten des entsprechenden respiratorischen Quotienten zeigte.

Durch 10^{-3} m Jodacetat erfolgt eine deutliche Hemmung der endogenen Atmung, wobei der respiratorische Quotient den Wert 1 übersteigt. Es scheint nun der über den EMP-Weg verlaufende Anteil der Grundatmung zum mindesten teilweise blockiert zu sein, wobei die Erhöhung des RQ wie bei der durch 10^{-4} m Jodessigsäure vergifteten Glucoseatmung auf Oxydation von Säuren zurückgeführt werden könnte.

Daß die mit der gleichen Inhibitorkonzentration behandelten Schnitte in Stickstoff eine Hemmung der Gärungsgröße von nur 50% aufweisen, sagt nichts darüber aus, daß in Luft die Blockierung nicht praktisch vollständig sein könnte, da $Q^{N_2}_{CO_2}$ schon normalerweise nur 10% der Atmungsgröße (in Luft) beträgt, so daß eine sehr geringe «Restaktivität» der Triosephosphatdehydrogenase wohl genügte, um den Ablauf der auf die Hälfte reduzierten Gärung zu ermöglichen, was sich jedoch bei der Berechnung der Atmungsgröße (aerob) kaum auswirkte, da dann nur noch ein minimer Prozentsatz des total oxydierten Substrates diesen Weg durchlaufen könnte.

Die Intensität der Glucoseatmung beträgt nach Applikation einer 10^{-3} m Lösung des Hemmstoffes nur noch 40% der Kontrolle und übersteigt den Wert der gleicherweise vergifteten Grundatmung, wie die Figuren 6a und 6b zeigen, nur unwesentlich. Der Glucoseabbau über den EMP-Weg ist offenbar völlig gehemmt und erfolgt auf andere Weise, vielleicht im Pentoseshunt, welcher auf dem Hexosephosphat und dem Triosephosphatniveau normalerweise mit der Glycolyse in Konkurrenz um das Substrat steht (James, 1957), oder es wird überhaupt nur noch endogenes Substrat oxydiert. Daß aber exogene Glucose immer noch in den Atmungsstoffwechsel eintritt, muß man nach dem im Vergleich zur endogenen Atmung bei gleicher Inhibitorkonzentration deutlich höhern RQ und der Tatsache, daß Hexokinase, obschon sie wahrscheinlich eine SH-Gruppe enthält, gegen die Wirkung von Jodessigsäure geschützt ist (Bruchmann, 1959), annehmen.

Die durch 10^{-2} m Jodacetat hervorgerufenen Beeinträchtigungen der respiratorischen Vorgänge sowohl bei Grund- als auch bei Glucoseatmung sind sicher vielfacher Art und deshalb nicht in klarer Weise interpretierbar, was um so mehr zutrifft, als auch, wie oben erwähnt, Austritt zelleigener Substanzen ins Suspensionsmedium in großem Ausmaße erfolgt.

Vergleicht man die Wirkung von Monojodessigsäure auf die Mechanismen, welche der Grund- und Glucoseatmung zugrunde liegen, so ergibt sich zusammenfassend folgende Hypothese: Glucoseabbau erfolgt vornehmlich über den EMP-Weg, während endogenes Substrat zum größeren Teil auf nichtglycolytische Weise metabolisiert wird.

b) Fluoridvergiftung

Lohmann und Meyerhof (1934) zeigten, daß die Überführung von Phosphoglycerinsäure in Phosphoenolbrenztraubensäure durch $5 \cdot 10^{-3}$ m Fluorid völlig gehemmt wurde, wobei zur Erzielung dieses Effektes gleichzeitige Anwesenheit von Magnesium sich als notwendig erwies. Warburg und Christian (1941) isolierten Enolase, die sich als ein «konjugiertes dissoziierendes Metallprotein» mit Mg, hin und wieder auch mit Zn oder Mn, erwies, und klärten die Wirkungsweise von Fluorid auf dieses Ferment durch Nachweis der Bildung eines Mg-Fluorophosphates, das Mg vom Protein verdrängt, auf.

Durch höhere Konzentrationen des Hemmstoffes erfolgt auch eine Erniedrigung der Aktivitäten von Adenosintriphosphatase (Potter, 1945) und Succinodehydrogenase (Slater and Bonner, 1951), während die Reaktionen des Pentoseshunt durch Fluorid ebensowenig wie durch Jodessigsäureamid gehemmt werden (Dickens and Glock, 1951).

Tabelle 14

Einfluß von $5 \cdot 10^{-2}$ m Na-Fluorid auf die Gärungsgröße

Substrat	$Q_{CO_2}^{N_2}$		Hemmung
	Kontrolle	mit Fluorid	%
Endogen	0,25	0,17	32
Mannose	0,57	0,19	67
Glucose	0,54	0,18	67

In Tabelle 14 sind die nach Einwirkung von $5 \cdot 10^{-2}$ m Na-Fluorid auf die anaerobe Atmung hervorgerufenen Veränderungen der Gärungsintensität verzeichnet. Da $Q_{CO_2}^{N_2}$ sowohl mit als auch ohne Substrat durch den Hemmstoff eine Erniedrigung erfährt, liegt Annahme des EMP-Weges in beiden Fällen nahe. Umgekehrt ergibt sich hieraus aber auch die Folgerung, daß das endogene Substrat ein Kohlehydrat oder ein daraus entstehendes Abbauprodukt ist, was den entsprechenden aus den Versuchen mit Arsenat gezogenen Schluß bestätigt und mit den experimentellen Ergebnissen nach Vergiftung der anaeroben Atmung mittels Jodacetates übereinstimmt.

Es mag auffallen, daß die Gärung bei Mannose- beziehungsweise Glucosefütterung nach Behandlung mit Fluorid eine prozentual viel stärkere Hemmung aufweist als die anaerobe Atmung mit lediglich endogenem Substrat, eine Erscheinung, die auch mit Jodessigsäure festgestellt werden konnte. Daß dabei die absolute Größe der nach Applikation von

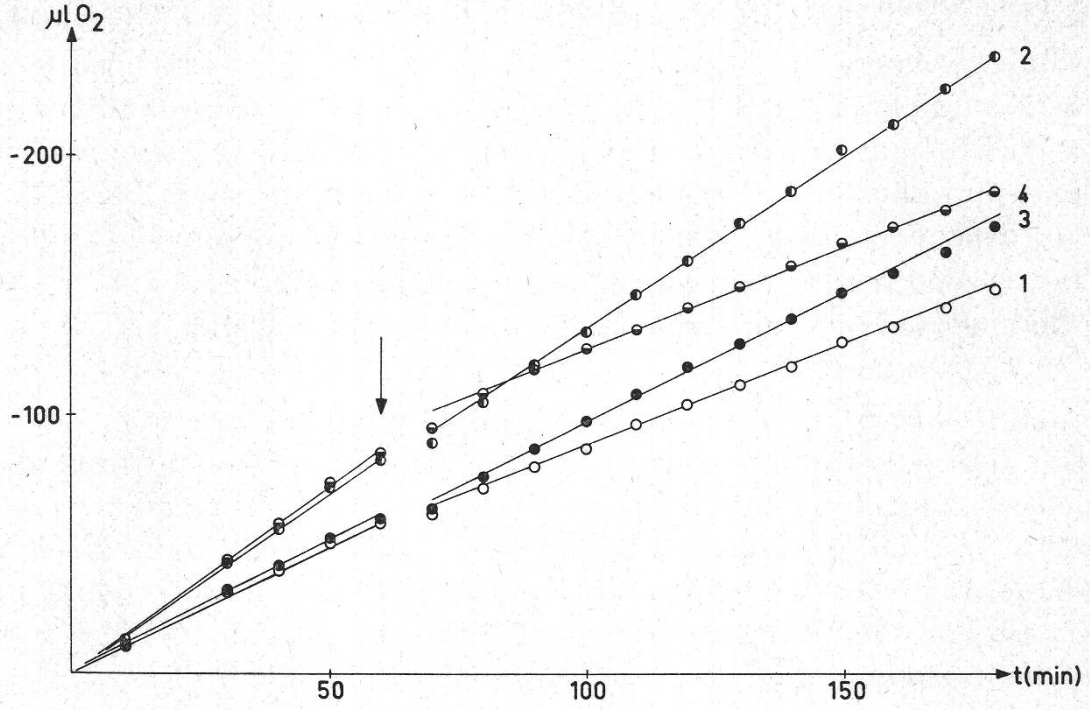
Fluorid noch vorhandenen Gärung unabhängig von exogenem Zucker in allen drei Fällen (siehe Tab. 14) übereinstimmt, läßt zwei Deutungen, von denen die erste wahrscheinlicher ist, zu.

1. Sowohl mit als auch ohne Substrat liegen zahlenmäßig übereinstimmende, durch die gewählte Inhibitorkonzentration nicht beeinflußte Anteile der Gärung vor. Dabei bestimmt die «Restaktivität» des Fermentes die Gärungsgeschwindigkeit, so daß auch ein Überschuß an Substrat in Form von Glucose oder Mannose mehr oder weniger wirkungslos bleiben muß.

2. Wenn Fluorid die Fähigkeit der Zuckeraufnahme aus dem Medium verunmöglichte, so wie man zum Beispiel auch eine Beeinflussung der Aufnahme von Na- und K-Ionen nach Einwirkung dieses Antimetaboliten kennt (Harris, 1956), die prozentualen Änderungen von $Q_{CO_2}^{N_2}$ jedoch wie immer auf die unvergifteten Kontrollen mit dem entsprechenden Substrat bezogen sind, könnte diese stärkere Beeinträchtigung der «Glucose- beziehungsweise Mannosegärung» durch den Inhibitor lediglich eine Täuschung darstellen, indem der Atmungsstoffwechsel sich überhaupt nur noch unter Teilnahme endogenen Substrates, dessen Abbau durch Fluorid in gleicher Weise wie bei Abwesenheit von Zucker im Medium gehemmt würde, abspielte.

Da man nichts Genaues über die bei Applikation einer $5 \cdot 10^{-2}$ m Na-Fluoridlösung im Zellinnern herrschenden F^--Konzentration weiß, kann das Fehlen einer totalen Hemmung der Gärung lediglich auf einer zu geringen Innenkonzentration des Hemmstoffes beruhen und stellt jedenfalls keinen Beweis für die Existenz eines alternativen, nichtglycolytischen Weges dar. Dies ließe sich durch Erhöhung der Außenkonzentration des Inhibitors nachprüfen, wobei die Gärungsgröße abnehmen müßte, was durch In-vivo-Versuche aber nicht einfach nachzuweisen ist, weil die dazu notwendige große Konzentration von Na-Fluorid dann zusätzlich auch unspezifische Hemmungen hervorrufen könnte.

Sowohl Grund- als auch Glucoseatmung werden weder durch 10^{-3} m noch durch 10^{-2} m NaF gehemmt, was offensichtlich auf mangelnder Permeabilität des Plasmalemmas für den Inhibitor beruht, da wahrscheinlich nur die undissoziierte Molekel der Säure diffundiert, deren effektive Konzentration bei Anwesenheit einer 10^{-2} m Na-Fluoridlösung im Suspensionsmedium bei pH 4,8 jedoch nur $6 \cdot 10^{-4}$ m beträgt. Erhöht man die Außenkonzentration des Na-Fluorides auf $5 \cdot 10^{-2}$ m, so wird, wie aus Figur 7 zu ersehen ist, die endogene Atmung nicht betroffen und die Veratmung exogener Glucose um 45% gehemmt. Aus dieser verschiedenen Empfindlichkeit von Grund- und Glucoseatmung gegenüber Fluorid folgt, daß letztere vornehmlich über den EMP-Weg verläuft, endogenes Substrat aber auf andere Weise, vielleicht im Pentoseshunt, abgebaut wird.



Figur 7

Einfluß von $5 \cdot 10^{-2}$ m Na-Fluorid auf die Atmungsintensität
1, 3: Grundatmung ohne beziehungsweise mit Hemmstoff
2, 4: Glucoseatmung ohne beziehungsweise mit Hemmstoff

Dieser Schluß stimmt mit den sich aus der Jodacetatvergiftung ergebenden Folgerungen überein.

c) Fütterung von Diphosphopyridinnucleotid und Cocarboxylase

Nachdem sich bis jetzt keine Phänomene zeigten, welche der Annahme, daß *Agaricus campester* alkoholische Gärung zu zeigen vermöchte, auch wenn diese außerordentlich gering ist, widersprechen würde, interessierte es, die nach Einwirkung zweier Cofaktoren des EMP-Schemas auftretenden Veränderungen von $Q_{CO_2}^{N_2}$ zu beobachten. Die Resultate dieser Experimente sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15

Einfluß von Coenzymen auf die Gärungsgröße

Coferment	Substrat	Veränderung von $Q_{CO_2}^{N_2}$ %
DPN^+	endogen	+90
DPN^+	Glucose	+65
Cocarboxylase	Glucose	+25

10^{-3} m DPN^+, Coenzym der Triosephosphat- und der Alkoholdehydrogenase, steigert die «endogene Gärung» um 90%. Danach kann man einerseits annehmen, daß DPN^+ aus dem Medium in die Zellen aufgenommen wird und der Effekt nicht bloß durch Abspaltung von Phosphat zustande kommt, da Fütterung von lediglich anorganischem Phosphat im Standardsuspensionsmedium $Q_{CO_2}^{N_2}$ nicht steigert. Andererseits folgt daraus mit großer Wahrscheinlichkeit, daß endogenes Substrat unter anaeroben Bedingungen entsprechend der alkoholischen Gärung von Hefe abgebaut werden kann.

Bemerkenswert ist auch die starke Erhöhung der gegenüber der unbeeinflußten «endogenen Gärung» schon um rund 100% gesteigerten «Glucosegärung» um nochmals 65%. Sowohl endogenes als auch exogenes Substrat werden demnach anaerob offensichtlich über den EMP-Weg abgebaut, da das gefütterte Diphosphopyridinnucleotid allein keine gärungssteigernde Wirkung ausüben könnte, wenn sich im Plectenchym nicht die dazugehörigen Fermentproteine vorfänden.

Weniger eindeutig läßt sich die relativ schwache Wirkung von 10^{-3} m Cocarboxylase unter Zusatz von 10^{-3} m Magnesiumsulfat erklären. Entweder ist die Aktivität der Brenztraubensäure-Decarboxylase nicht der begrenzende Faktor der Geschwindigkeit, mit welcher das Substrat vergoren wird, oder der Cofaktor tritt nur sehr schlecht in das Plectenchym ein. Es fehlt auch der Beweis, daß die Zelle diese exogene Cocarboxylase und das Mg wirklich zum Aufbau von Carboxylase verwendet. Das Versuchsergebnis widerspricht jedoch der Annahme des Reaktionsschrittes Brenztraubensäure→Acetaldehyd beim Glucoseabbau unter anaeroben Bedingungen nicht, sondern steht damit in Übereinstimmung.

d) Wirkung von Bisulfit

Da 10^{-2} m Na-Bisulfit als Fixativ von Triosephosphaten und Acetaldehyd (James, 1953c) die Vergärung von Glucose um etwa 70% hemmt, kann man wohl annehmen, daß der Weg des anaeroben Abbaus der Glucose auch bei *Agaricus campester* wie bei Hefe über Phosphoglycerin- und Acetaldehyd verläuft.

5. Citronensäurecyclus

Für die experimentelle Tatsache, daß Säuren des Krebscyclus nur zu geringen Atmungssteigerungen führten, können drei Gründe maßgebend sein:

1. Mangelnde Permeabilität im weitern Sinn, das heißt die Unmöglichkeit der exogenen Substrate, ihren stoffwechselphysiologischen Platz in der Zelle einzunehmen (Wiame, 1957), unabhängig davon, ob diese Er-

scheinung nun durch die äußere Plasmamembran, die Grenzfläche der Mitochondrien, welch letztere ja die Enzyme des Krebscyclus enthalten, oder durch irgendeinen andern Effekt verursacht wird.

2. Das Plectenchym ist mit dem betreffenden Substrat schon vor der Fütterung gesättigt.

3. Die physiologische Bedeutung des Tricarbonsäurecyclus liegt beim geprüften Objekt nicht so sehr in der durch totalen Substratabbau bewirkten energetischen, sondern im wesentlichen in der synthetischen Funktion (Wiame, 1957).

Da selbst starke Atmungssteigerungen durch entsprechende Säuren für das Vorhandensein des Citronensäurecyclus nicht beweisend sind, indem der Abbau der gefütterten Substrate eventuell auch auf andere Art erfolgen könnte, vermag Anwendung von spezifischen Inhibitoren überzeugendere Schlüsse zu liefern.

a) Fluoracetatvergiftung

Die toxische Wirkung der Fluoressigsäure liegt nicht in direkter Beeinträchtigung irgendeines Enzyms, sondern wird durch eine in Anwesenheit dieser Verbindung ablaufende enzymatische «letale Synthese» (Leuthardt, 1959) verursacht, indem aktiviertes Fluoracetat anstelle von Acetyl-Coenzym A mit Oxalessigsäure unter Bildung einer Fluorotricarbonsäure, wahrscheinlich Fluorocitronensäure, kondensiert (Buffa, Peters and Wakelin, 1951), die so entstandene Verbindung jedoch die Aconitase in außerordentlich wirksamer Weise kompetitiv hemmt (Morrison and Peters, 1954), was zur Akkumulierung sowohl von Citronen- als auch Essigsäure führt (James, 1953a).

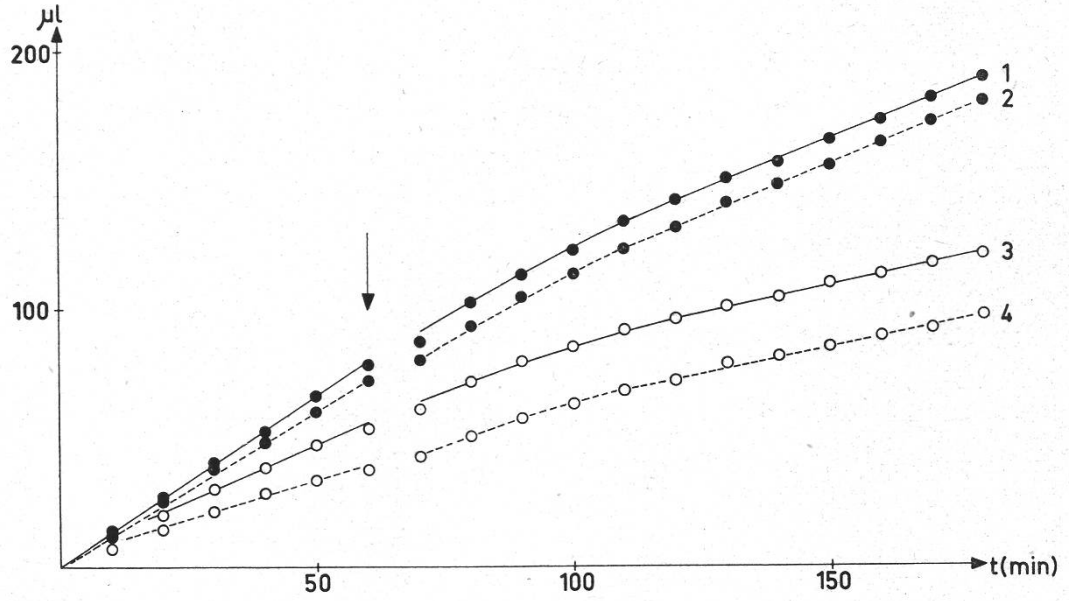
In Tabelle 16 sind die nach Fluoracetatbehandlung des Plectenchyms auftretenden Veränderungen von Q_{O_2} nach Wiedereintreten linearen Kurvenverlaufes zu sehen. Da bei Grund- und Glucoseatmung deutliche Hemmung der Sauerstoffaufnahme schon bei niedrigen Konzentrationen erfolgt, liegt die Annahme nahe, daß in unvergifteten Zellen sowohl endo-

Tabelle 16

Veränderung der Atmungsintensität unter Einfluß von Fluoracetat

Inhibitor-konzentration	Änderung von Q_{O_2}	
	Grundatmung %	Glucoseatmung %
10^{-4} m	—30	—10
10^{-3} m	—40	—35
10^{-2} m	—45	—40

genes als auch exogenes Substrat den durch Fluoressigsäure beeinträchtigten Reaktionsschritt durchlaufen. Daneben scheint aber in beiden Fällen das Maximum möglicher Hemmung erreicht, weil eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration von 10^{-3} m auf 10^{-2} m nur noch geringe zusätzliche Wirkung zeitigt, so daß möglicherweise sowohl bei Grund- als auch bei Glucoseatmung etwa die Hälfte des respiratorischen Materials den Krebscyclus nicht durchläuft und wohl auf andere Weise, vielleicht durch direkte Oxydation, abgebaut wird.



Figur 8

Zeitlicher Verlauf von Grund- und Glucoseatmung vor und nach Behandlung der Schnitte mit 10^{-2} m Fluoracetat

1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe bei Glucoseatmung
3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe bei endogener Atmung

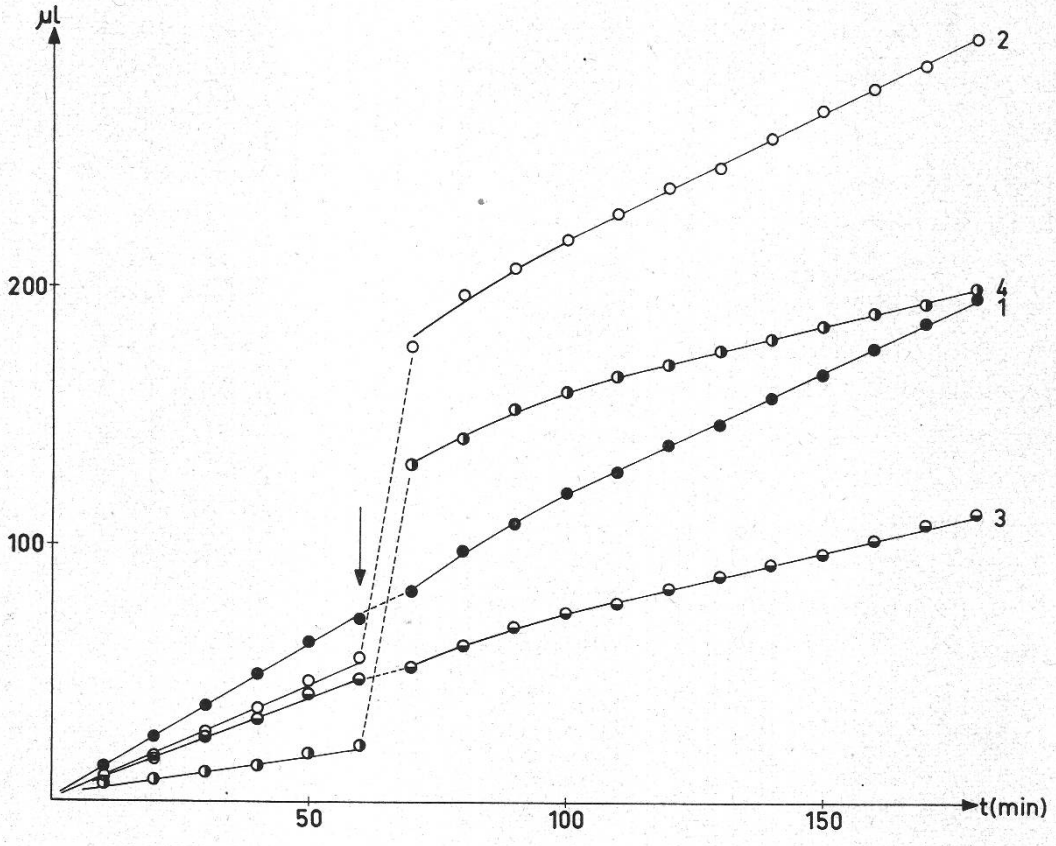
Figur 8 zeigt die nach Fluoracetatvergiftung auftretenden Veränderungen des RQ, wobei jedoch lediglich dessen Erhöhung nach Applikation des Hemmstoffes als erwiesen zu betrachten ist.

Exakte, fortlaufende Messungen des respiratorischen Quotienten sind mit 10^{-2} m Na-Fluoracetat und der gewählten Versuchsanordnung nicht möglich, da der in m/30 KH_2PO_4 aufgelöste Hemmstoff (10^{-1} m) alkalisch wirkt, so daß er den RQ schon vor dem Zukippen beeinflußt, wohl dadurch, daß in den Gefäßen ohne Kalilauge ein Teil des Atmungskohlendioxydes jetzt in der in der Ansatzbirne enthaltenen, alkalisch reagierenden Inhibitorlösung retiniert wird, während im Hauptraum das pH wie üblich auf 4,8 eingestellt ist.

Gibt man nun den Hemmstoff ins Medium, dessen pH so auf zirka 5,5 steigt, erreicht der RQ einen Wert von 1, welcher aber infolge der dann immer noch herrschenden Retention von CO_2 effektiv höher sein dürfte.

Daß diese Steigerung des respiratorischen Quotienten lediglich durch teilweise Freisetzung des vorher bei höherem pH in der Ansatzbirne gebundenen Kohlendioxydes zustande käme, ist nicht anzunehmen; übrigens müßte eine solche bloß durch pH-Änderung erfolgende CO_2-Abgabe plötzlich erfolgen und sich nicht über zwei Stunden erstrecken.

Annahme aerober Gärung zusätzlich zu der nach totaler Hemmung der Aconitase ablaufenden aeroben Atmung steht mit der Biochemie der Fluoracetatvergiftung und den Versuchsergebnissen in Übereinstimmung, da sich Acetat anhäuft (Buffa, Peters and Wakelin, 1951), was auch eine Verminderung der Geschwindigkeit, mit welcher Essigsäure aus Brenztraubensäure gebildet wird, hervorrufen könnte, so daß letztere der Vergärung anheimfiele, eine ähnliche Erscheinung, wie sie bei einer Mutante von *Neurospora crassa*, bei der durch einen Block der Brenztraubensäureumsatz aufgehalten ist, auftritt, wobei der Ablauf der vorgeschalteten Glycose eine Verzögerung erfährt und das Substrat in die unter normalen Verhältnissen «benachteiligten Kanäle der direkten Oxydation» gelangt (Paech, 1955).



Figur 9

Zeitlicher Verlauf des Gaswechsels vor und nach Behandlung der Schnitte mit $5 \cdot 10^{-2}$ m Na-Fluoracetat

1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe (Glucosefütterung)

3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe (endogenes Substrat)

Es wurde nun auch versucht, durch eine fünfmal stärkere Konzentration von Fluoressigsäure einen noch höhern Grad von aerober Gärung zu erzielen. Die Resultate dieser Untersuchung sind in Figur 9 dargestellt.

Es ergibt sich auch hier schon vor dem Zukippen des Inhibitors eine scheinbare Verminderung der Kohlendioxydabgabe, und zwar bei Grund- und Glucoseatmung, wobei der obenerwähnte Effekt der CO_2-Bindung durch die alkalisch wirkende Lösung des Inhibitors bei der höhern Fluoracetatkonzentration (Hemmstoff wieder in m/30 KH_2PO_4 gelöst) noch ausgeprägter ist.

Es überrascht aber, daß nach Zukippen des Inhibitors, wobei das pH des Mediums von 4,8 auf 6,0 steigt, eine Gasabgabe großen Ausmaßes erfolgt, welche etwa das Zehnfache derjenigen Menge an Atmungskohlendioxyd beträgt, welche durch die Inhibitorlösung in der Ansatzbirne hätte retiniert werden können.

Ist das abgegebene Gas lediglich Kohlendioxyd, so wäre es möglich, daß wegen der nun totalen Blockierung der Aconitase alles in den Zellen vorhandene CO_2, das eventuell zu Carboxylierungen (Synthesen) gedient hätte, abgegeben wird. Da der RQ selbst bei pH 6,0 den Wert 1,02 einnimmt, also effektiv noch höher ist, kann man die Möglichkeit des Auftretens von aerober Gärung nach Fluoracetatvergiftung nicht ausschließen.

Frägt man nach der physiologischen Bedeutung, die dem Krebscyclus bei *Agaricus campester* zukommen dürfte, so ist wohl anzunehmen, daß eine derartige Reaktionsfolge auch beim Kulturchampignon vorliegt, doch scheint sie nicht der bevorzugte Weg der terminalen Atmung darzustellen, und die Hauptfunktion dieses Säurecyclus, dessen Übereinstimmung mit dem Hefe-Muskel-Schema nach Auftreten der Fluoracetatvergiftung nur für die Kondensation von aktivierter Essig- mit Oxalessigsäure zu Citronensäure und Umwandlung derselben durch Aconitase wahrscheinlich gemacht wurde, mag eher in synthetischer Richtung liegen, da dem Pilz noch andere Abbauwege zur Verfügung stehen, indem maximal mögliche Hemmung der Sauerstoffaufnahme schon bei relativ geringen Inhibitorkonzentrationen auftritt, durch zusätzliche Mengen von Fluoracetat, wie Tabelle 16 zeigt, nicht mehr wesentlich gesteigert werden kann und nach Applikation von $5 \cdot 10^{-2}$ m Fluoressigsäure sogar wieder geringer ist.

b) Versuche mit Malonat

Außer Fluoracetat stellt auch Malonsäure einen Hemmstoff des Citronensäurecyclus dar, indem sie die Succinodehydrogenase kompetitiv hemmt (James, 1953a).

Sowohl mit als auch ohne Glucosefütterung war im Standardsuspensionsmedium bei *Agaricus campester* nicht die geringste Malonathemmung zu erzielen, während die Atmung von Gerstenwurzeln durch die gleiche Inhibitorkonzentration (10^{-2} m) bei pH 4,7–5,7 um 40% (James, 1953c) und diejenige von Spinatblättern (Bonner and Wildman, 1946) bei pH 4,5 um 47% gehemmt wurde.

Bei Erniedrigung des pH auf 4,0, wo die Sauerstoffaufnahme bei Glucosefütterung, wie Tabelle 1 zeigt, an sich schon um zirka 35% geringer als im Standardmedium ist, ergab sich ein vielleicht auch durch Beeinträchtigung der Zuckeraufnahme hervorgerufenes Abfallen der Intensität der Glucoseatmung nach Zukippen von Malonat um 15%; der entsprechende Wert der Kontrolle beträgt dagegen sogar 28%.

Es läßt sich also keine auf die Anwendung von Malonat zurückführbare Hemmung der Sauerstoffaufnahme erkennen. Laties (1949) erhielt bei gleichem pH eine Abnahme des Q_{O_2}-Wertes von Gerstenwurzeln um 65%.

Schließlich wurde noch ein Versuch bei pH 3,5 durchgeführt, welcher wiederum keine durch Einwirkung des geprüften Hemmstoffes erklärbare Beeinträchtigung des Gaswechsels zeitigte, da die auf die anfängliche Atmungsintensität bezogene Abnahme von Q_{O_2} nach Zukippen von Puffer 37% in der zweiten und 58% in der dritten Versuchsstunde betrug, während die entsprechenden Werte bei Malonatfütterung 17% und 30% lauten. Das Gewebe erleidet aber in beiden Fällen durch die Folgen des unphysiologischen pH Schädigungen, da es zelleigene Substanzen austreten läßt, festgestellt durch eine Erniedrigung des Trockengewichtes um 20%, bezogen auf in einem Medium von pH 4,8 suspendierte Kontrollschnitte.

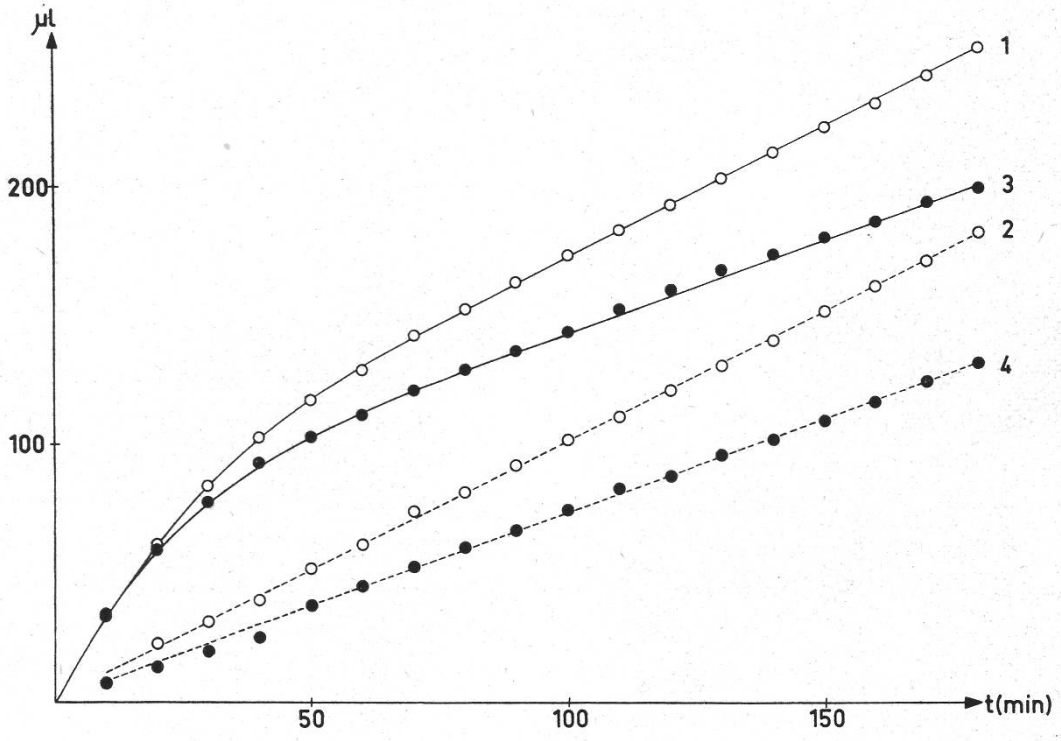
Das Fehlen einer Malonathemmung in der pH-Reihe 4,8–4,0–3,5 würde für ein dem Hefe-Muskel-Schema nicht genau entsprechendes Funktionieren des Säurecyclus sprechen, indem zum Beispiel Fumaratbildung nicht nur unter Teilnahme von Succinodehydrogenase aus Bernsteinsäure erfolgen könnte, wie Eny (1951) das Ausbleiben jeglicher Malonathemmung bei *Chlorella* zu erklären versucht. Man muß auch nicht annehmen, daß Malonsäure, die von einigen Pilzen als C-Quelle benutzt werden kann (Cochrane, 1958), vom Champignon in kleinen Mengen veratmet würde, was die geringere Abnahme von Q_{O_2} bei tiefern pH-Werten in Anwesenheit von Malonat vermuten ließe, sondern dies kann lediglich einen unspezifischen Effekt darstellen, weil die Wasserstoffionenkonzentration des Mediums in Anwesenheit von Malonat etwas geringer als bei der Kontrolle ist.

6. Phosphorylierungsvorgänge

a) Versuche mit Phloridzin und Phloretin

Die schon lange bekannte hemmende Wirkung von Phloridzin auf Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge bei der Glycolyse (Lungsgaard, 1933), insbesondere auf die Bildung von energiereichem Phosphat bei der Oxydation von Triosephosphat (Kalckar, 1933), wurde von Shapiro (1947) dahingehend verallgemeinert und aufgeklärt, daß dieses Glycosid schon in ganz geringen Konzentrationen primär gewisse Reaktionen, welche energiereiche Phosphatbindungen liefern, hemmt und so bei hohen Inhibitorkonzentrationen sekundär auch den Glucoseverbrauch heruntersetzt (um etwa 60% in 10^{-3} m Phloridzin), ohne daß jedoch die Art und Weise, wie der Hemmstoff diese Effekte hervorruft, bekannt wäre. Crane, Field und Cori (1957) schließlich zeigten, daß Phloridzin nicht in die Zellen (von Ascitestumor) einzudringen vermag, sich jedoch als ein kompetitiver Hemmstoff des Zuckereintritts erweist.

Gibt man zu den Plectenchymschnitten $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ m Phloridzin, so ist während rund einer halben Stunde eine leichte Erhöhung der Sauerstoff-



Figur 10

Gaswechselgrößen in $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ m Phloridzinlösung
(Beginn der Messungen 1 ½ Stunden nach Einwirkung des Glucosides)
1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe bei Glucosefütterung
3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe ohne exogenes Substrat

aufnahme festzustellen, wobei sich das Medium gelblich färbt. Nachher aber werden endogenes und exogenes Substrat wieder mit derselben Intensität oxydiert wie vor der Einwirkung des Hemmstoffes.

Man wiederholte deshalb den Versuch mit $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ m Phloridzin. Dieses hat eine Löslichkeit von 0,1 % in Wasser bei 22° C (Rauhen, 1956), was einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ m entspricht. Um nun nicht den fast zehnmal konzentrierteren Hemmstoff in Form einer trüben Lösung in die Ansatzbirne geben zu müssen, wurde das Glucosid im Normalsuspensionsmedium gelöst und dann direkt in den Hauptraum pipettiert. Die Gaswechselgrößen zu Beginn der Messungen, wie sie in Figur 10 gezeigt sind, entsprechen der Atmungsintensität nach zirka 1½stündiger Einwirkung des Hemmstoffes. Aus der Abbildung ersieht man, daß mit und ohne Glucosefütterung anfänglich eine starke Sauerstoffaufnahme erfolgt, welche aber immer mehr ausklingt, so daß sich die Kurven schließlich wie gewöhnlich durch Gerade darstellen lassen.

Ein Vergleich dieser Gaswechselgrößen mit denjenigen von unbeeinflußten Schnitten ergab, daß im nichtlinearen Teil der Kurven Q_{O_2} während der ersten dreißig Minuten um 200 % bei der Glucose- und um zirka 250 % bei der Grundatmung gesteigert war, wobei zur Berechnung die Bogen durch Sekanten ersetzt wurden. Der RQ beträgt dann in beiden Fällen 0,2. Die gegenüber unbehandelten Schnitten stark gesteigerte Sauerstoffaufnahme ist mit einer intensiven Gelbfärbung des Mediums verbunden, die etwa zu dem Zeitpunkt, in welchem die gekrümmten Kurven in Gerade übergehen, ihr Maximum der Intensität erreicht.

Im linearen Teil der Kurve erweist sich die Sauerstoffaufnahme als praktisch gleich groß, wie dies in Abwesenheit von Hemmstoff zu erwarten wäre, und der RQ beträgt mit oder ohne Glucosefütterung 1.

Diese Versuchsergebnisse zeigen, daß Phloridizin als phenolische Verbindung durch die Phenoloxydase des Pilzes unter Bildung eines Chinons oder eines Pigmentes mit Chinongruppierung, das dann offensichtlich nicht die erwähnten Wirkungen auf eigentliche Atmungsvorgänge zu zeigen vermag, oxydiert wird und in der gewählten Konzentration nur die Sauerstoffaufnahme, nicht jedoch die Atmung an sich steigert, wie dies aus dem Absinken des RQ auf 0,2 ohne gleichzeitige Erhöhung der CO_2-Abgabe zu ersehen ist.

Eine verminderte Sauerstoffaufnahme durch Hemmung von Atmungsvorgängen ließe sich so wegen der gleichzeitig ablaufenden Oxydation des Hemmstoffes kaum feststellen und würde gegebenenfalls überdeckt. Daß die hohe Sauerstoffaufnahme bei Grund- und Glucoseatmung lediglich durch Überlagerung der Oxydation eines Substrates der Phenoloxydase über die Atmung zustande kommt, folgt auch daraus, daß im linearen Teil der Kurve, nach vollständiger Oxydation des Phloridzins, der RQ

wieder 1 und die Atmung praktisch gleich wie bei Schnitten ohne Inhibitor ist.

Interessant mag es scheinen, daß nach vollständiger Oxydation des phenolischen Körpers der RQ auch bei Grundatmung genau 1 beträgt. Man könnte sich denken, daß Glucose, welche nicht nur in der üblicherweise verwendeten (10^{-2} m), sondern auch in $2 \cdot 10^{-3}$ m Konzentration die Atmung um mehr als 50 % zu steigern vermag, mindestens von einem Teil der Phloridzinmoleküle abgespalten und der Veratmung anheimfallen würde.

Die trotz gleichem RQ im Vergleich zur Grund- absolut höhere Glucoseatmung ist durch die auf jeden Fall größere Zuckerkonzentration zu erklären. Auch wenn Abspaltung von Glucose aus Phloridzin erfolgte, würde sich dies wegen des bei Glucosefütterung herrschenden Überschusses an Substrat nur bei endogener Atmung, welche somit zum mindesten jetzt auch teilweise «exogenen» Zucker metabolisierte, auswirken. Aus der höhern Atmungsintensität bei Glucosefütterung folgt auch, daß oxydiertes Phloridzin in bezug auf Atmungsvorgänge wirkungslos ist und überhaupt keinen hemmenden Einfluß auf die Zuckeraufnahme auszuüben vermag.

Um den Einfluß eventuell abgespaltenen Zuckers auf die endogene Atmung auszuschalten, führte man auch entsprechende Versuche mit dem Aglucon Phloretin durch, dessen biochemische Wirkungen generell mit denjenigen von Phloridzin übereinstimmen, da in erster Linie Phosphorylierungsvorgänge, wie die Aufnahme anorganischen Phosphates (MacDonald and Bishop, 1952), und sekundär auch eigentliche Atmungsreaktionen betroffen werden (Kalckar, 1937). Die durch das Aglucon hervorgerufene Hemmung des Zuckertransportes durch die Oberfläche menschlicher Erythrocyten ist noch ausgeprägter als die durch Phloridzin bewirkte Verlangsamung dieses Vorganges (Le Fevre, 1959).

Tabelle 17

Einfluß von $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ m Phloretin auf die Gaswechselgrößen

	Endogene Atmung			Glucoseatmung		
	1. Std.	2. Std.	3. Std.	1. Std.	2. Std.	3. Std.
Q_{O_2}	2,48 100 %	3,68 148 %	2,84 115 %	4,16 100 %	5,18 125 %	4,74 114 %
Q_{CO_2}	1,76 100 %	2,21 126 %	1,95 111 %	3,95 100 %	4,26 108 %	4,08 103 %
RQ	0,71	0,60	0,74	0,95	0,82	0,86

In Tabelle 17 sind die nach Fütterung von $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ m Phloretin auftretenden Veränderungen der Gaswechselgrößen zu sehen; die phenolische Substanz befand sich im ersten Drittel des Experimentes noch im Seitenraum. Bis zirka 60 Minuten nach Zukippen des Phloretins weisen die Kurven für O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe leicht konkave Krümmung auf, wobei zur Berechnung der in der Tabelle angegebenen Werte die Bogen durch die entsprechenden Sekanten ersetzt wurden; in der dritten Versuchsstunde tritt wieder völlig linearer Kurvenverlauf ein. Das Suspensionsmedium färbt sich wie bei Fütterung von Phloridzin gelb.

$2 \cdot 10^{-4}$ m Phloretin steigert den Q_{O_2}-Wert der Grundatmung anfänglich um rund 50% und Q_{CO_2} um 25% unter Senkung des RQ auf 0,60. Nach längerer Einwirkung des Phenols ist Q_{O_2} immer noch um 10% höher als vor dem Zukippen von Phloretin und der RQ ungefähr dem ursprünglichen Werte gleich.

Bei Glucosefütterung sind die prozentualen Steigerungen der Gaswechselgrößen zahlenmäßig weniger ausgeprägt als bei endogener Atmung, und am Schlusse des Versuches erreicht der RQ nicht wieder den Ausgangswert. Man beachte aber, daß bei Glucosefütterung die nach Zukippen von Phloretin auftretende Erhöhung der Sauerstoffaufnahme sich nur scheinbar als geringer erweist als mit lediglich endogenem Substrat, was durch die hier üblicherweise angewandte Art der Berechnung prozentualer Steigerungen, welche ja auf die entsprechende Atmungsgröße unmittelbar vor Behandlung mit dem zu prüfenden Stoff bezogen sind, verursacht wird. Bestimmt man nämlich die absolute Größe der nach Einwirkung des Phenols bis zum Versuchsende auftretenden Extra-Sauerstoffaufnahme, so ergibt sich mit und ohne Glucosefütterung praktisch derselbe Betrag.

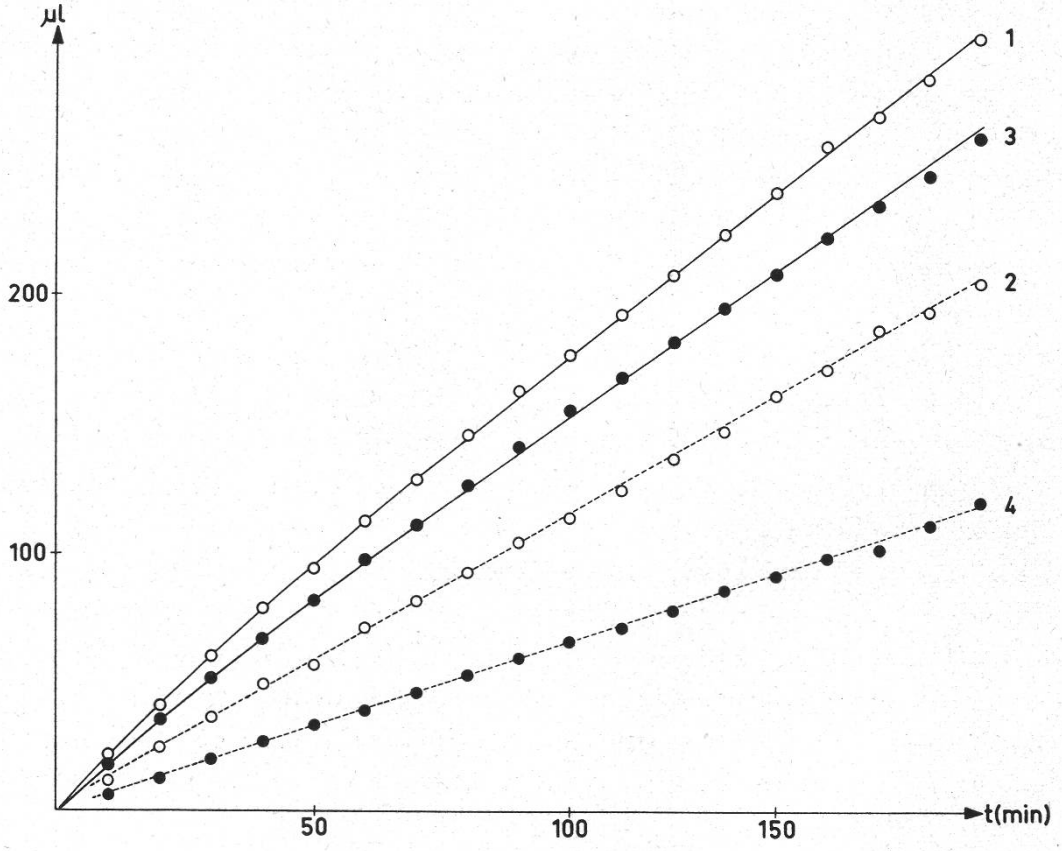
$1{,}8 \cdot 10^{-4}$ m Phloretin läßt also wie die entsprechende Konzentration des Glucosids wiederum keinen hemmenden Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme erkennen und steigert unerwarteterweise die CO_2-Abgabe, vor allem bei der Grundatmung während der Zeitdauer, da Oxydation der phenolischen Verbindung durch die Phenoloxydase des Pilzes erfolgt. Wäre Phloretin in der gewählten Konzentration lediglich Substrat der Tyrosinase des Pilzes und im übrigen auf die Atmung wirkungslos, so müßte der RQ sinken, und die CO_2-Abgabe dürfte dabei keine Steigerung erfahren. Nun ergibt sich zwar eine Erniedrigung des Atmungsquotienten nach Zukippen des Phenols, die durch eine Erhöhung der Sauerstoffaufnahme um 50% verursacht ist; gleichzeitig nimmt aber auch die CO_2-Abgabe um 25% zu.

Daß die biochemische Funktion der Phenoloxydase in der Umwandlung von Phenolen in Chinone und Pigmente bestehen kann, weiß man, doch existiert daneben auch die Möglichkeit, daß Tyrosinase mit aus der Oxydation katalytischer Mengen Brenzkatechins hervorgegangenem

Chinon eine dem Atmungsferment-Cytochrom-System ähnliche «Oxydase» bildete, indem das Chinon durch hydrierte Pyridinnucleotide, welche ihrerseits den Wasserstoff von Atmungssubstraten erhalten, reduziert und dann durch die Phenolase immer wieder oxydiert würde (Leuthardt, 1959).

Ein solcher Fall scheint nun hier verwirklicht zu sein, weil Phloretin einerseits als Substrat der Phenoloxydase des Pilzes wirkt, was bei Grund- und Glucoseatmung zu zahlenmäßig übereinstimmenden Steigerungen der Sauerstoffaufnahme führt, andererseits zum mindesten während der Zeit, da es der Oxydation anheimfällt, die CO_2-Abgabe, das heißt respiratorische Vorgänge zu steigern vermag. Ein Teil des aus Dehydrierungen der Atmung stammenden Wasserstoffes könnte jetzt über das Phenoloxydasensystem geleitet werden.

Diese Annahme steht auch damit in Übereinstimmung, daß zwar nach maximaler Färbung des Suspensionsmediums wieder Linearität der Gaswechselkurven eintritt und der RQ wieder den ursprünglichen Wert erreicht, daß aber Q_{O_2} und Q_{CO_2} immer noch um mehr als 10 % höher sind als vor der Applikation von Phloretin. Aus dessen Oxydation entstandenes Chinon (oder Pigment mit Chinongruppierung) hat also wahrscheinlich mit der Phenoloxydase zusammen eine «Atmungskette» gebildet. Dies



Figur 11

Gaswechselgrößen in $1.8 \cdot 10^{-3}$ «m» Phloretin
1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe bei Glucosefütterung
3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe ohne exogenes Substrat

kann lediglich ein künstlich aufgebautes Oxydasensystem sein und sagt nichts darüber aus, ob der Phenoloxydase im intakten Gewebe diese Bedeutung ebenfalls zukommt (weiteres vgl. Kap. 8c).

Daß der RQ bei Glucoseatmung nach Behandlung mit $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ m Phloretin und nachfolgender Oxydation dieser Verbindung nicht wieder ganz auf den anfänglichen Wert steigt, wohl aber höher ist als derjenige der endogenen Atmung, ließe sich vielleicht durch Hemmung der Glucoseaufnahme durch Phloretin, wie dies bei andern Objekten festgestellt wurde (Crane, Field and Cori, 1957; Le Fevre, 1959), erklären. Außerdem ist nicht untersucht, inwiefern die durch Phloretin hervorgerufene Verlangsamung des Transportes von Monosacchariden durch lebende Membranen sich als vollständig reversibel erweist.

Tabelle 18

Gaswechselgrößen in $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ «m» Phloretin

	Q_{O_2}		Q_{CO_2}		RQ	
	1. Std.	3. Std.	1. Std.	3. Std.	1. Std.	3. Std.
Endogene Atmung	4,55	3,79	1,83	1,83	0,41	0,48
in Phloretin	(186 %)	(155 %)				
Glucoseatmung	5,14	4,32	3,13	3,13	0,61	0,73
in Phloretin	(148 %)	(125 %)				
Kontrolle	2,44		—		—	
(endogene Atmung)	(100 %)					
Kontrolle	3,47		—		—	
(Glucoseatmung)	(100 %)					

In Figur 11 sind die in $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ m Phloretin, das bei dieser Konzentration allerdings nicht vollständig gelöst ist, sich ergebenden Gaswechselgrößen graphisch und in Tabelle 18 auch zahlenmäßig dargestellt. Die Versuchsanordnung stimmt im übrigen genau mit der für das Experiment, welches Figur 9 zugrunde liegt, beschriebenen überein, und die ersten Messungen erfolgen auch hier zirka 1½ Stunden nach Einwirkung der phenolischen Verbindung. Trotz der durch ungelöste Substanz hervorgerufenen Trübung, die am Ende des Versuches aber nicht mehr besteht, läßt sich schon 10 Minuten nach Beginn der Protokollierung eine intensive Gelbfärbung des Mediums feststellen. Die Hauptfolgerung, welche sich aus dem Versuch über die Wirkung von $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ m Phloretin auf den Gaswechsel ergibt, stimmt allgemein mit derjenigen aus den Untersuchungen mit der zehnmal geringeren Konzentration überein: Phloretin erweist

sich als ein Substrat der Phenoloxydase. Daß Fütterung dieses Phenols aber auch die Atmung als Ganzes stimulieren würde, ist aus vorliegendem Experiment nicht zu ersehen, weil man aus technischen Gründen nicht gleichzeitig Kontrollen der CO_2-Abgabe in unbeeinflußtem Gewebe durchführen konnte. Die Wirkung von $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ m Phloretin auf die Sauerstoffaufnahme ist sehr viel ausgeprägter als diejenige einer $1{,}8 \cdot 10^{-4}$ m Lösung. Auch sind die RQ-Werte bei der höhern Konzentration erwartungsgemäß geringer, da jetzt pro Zeiteinheit mehr Phloretin oxydiert wird; die Menge der gebildeten Chinone ist demnach in erster Linie durch Substrat- und nicht durch Fermentkonzentration limitiert. Nach Oxydation eines gewissen Anteils des Phloretins steigt der RQ bei Grund- und Glucoseatmung langsam an, ohne jedoch den Ausgangswert bis Versuchsende wieder zu erreichen, weil offenbar im Gegensatz zur gleichen Konzentration von Phloridzin (siehe Fig. 10) hier noch nicht alles Phloretin oxydiert ist, das infolge seiner stärkern Schwerlöslichkeit erst in dem Maße, wie es als Chinon für das Löslichkeitsprodukt bedeutungslos wird, in Lösung geht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Anwendung von Phloridzin und Phloretin zur Untersuchung von Atmungsvorgängen beim Champignon keine oder nur mit ungenügender Sicherheit interpretierbare Resultate liefert, weil bei beiden Verbindungen eine durch die Tyrosinase verursachte Überführung in ein Chinon oder Pigment mit Chinongruppierung erfolgt, so daß man es mit einer Superposition der Oxydation dieser beiden phenolischen Verbindungen und der eventuell durch diese Stoffe beeinflußten Atmung zu tun hat.

b) Entkoppelung durch 2,4-Dinitrophenol

Clifton (1946) zeigte, daß 2,4-Dinitrophenol (DNP) in geringen Konzentrationen synthetische Reaktionen ohne direkte Beeinträchtigung der Atmung vollständig blockieren kann, ein Ergebnis, welches durch Loomis und Lipmann (1948) eine Erklärung erfuhr, weil diese Substanz oxydative Phosphorylierung und Atmung entkoppelt, so daß Überführung anorganischen Phosphates in ATP unterbleibt und die Oxydation, deren Geschwindigkeit (und damit auch diejenige des Substratabbaus) in vielen Fällen durch den Phosphatcyclus begrenzt wird (Eberhardt, 1957), unabhängig von Phosphat und dem Phosphatakzeptor ADP verläuft. Man stellt auch erhöhte ATP-ase-Aktivität fest (Simon, 1953). Ist die Atmungsrate durch die Kapazität des Phosphorylierungssystems limitiert, so vermag demnach DNP die Sauerstoffaufnahme zu steigern, eine Korrelation, die es erlaubt, kontrollierende Faktoren der Atmungsintensität zu analysieren, was Millerd, Bonner und Biale (1953) sowie Pearson und Robertson (1954) mit Geweben von Früchten durchführten.

Die entkoppelte und dadurch energetisch nicht mehr wirksame Zellatmung verliert die Möglichkeit kontrollierenden Einflusses auf die Glycose, so daß unter Aufhebung des Pasteureffektes aerobe Gärung eintritt (Judah and Williams-Ashman, 1951; Beevers, 1953; Hess und Chance, 1959).

Tabelle 19

Prozentuale Steigerungen der Sauerstoffaufnahme mit und ohne exogenes Substrat unter Einfluß verschiedener Konzentrationen von DNP

DNP-Konzentration	Prozentuale Steigerung von Q_{O_2}	
	Grundatmung	Glucoseatmung
$2{,}7 \cdot 10^{-6}$ m	—	+ 6
$5{,}4 \cdot 10^{-6}$ m	—	+30
$1{,}6 \cdot 10^{-5}$ m	—	+52
$2{,}7 \cdot 10^{-5}$ m	+85	+46
$5{,}4 \cdot 10^{-5}$ m	—	+37
$1{,}0 \cdot 10^{-4}$ m	+40	+38
$5{,}0 \cdot 10^{-4}$ m	+46 (+10)	+30 (—17)
$1{,}0 \cdot 10^{-3}$ m	+49 (+ 9)	+23 (—18)

In Tabelle 19 sind die durch DNP hervorgerufenen Steigerungen der Sauerstoffaufnahme des Plectenchyms aufgezeichnet. Während man bis zu einer Inhibitorkonzentration von 10^{-4} m zehn Minuten nach Zukippen des Antimetaboliten schon wieder Linearität der Atmungsrate feststellen kann, werden die durch größere Mengen des Hemmstoffes bewirkten Zunahmen von Q_{O_2}, wie zum Beispiel Figur 12 zeigt, nur während zirka dreißig Minuten aufrechterhalten, und erst nachher geht die Sauerstoffkurve ebenfalls in eine Gerade über, deren auf die ursprüngliche Atmungsrate bezogene prozentuale Zunahme der Neigung durch die Zahl in Klammer angegeben ist.

Wie die Tabelle zeigt, stimuliert DNP die Atmung sowohl mit als auch ohne Glucose als Substrat, ein Ergebnis, welches mit demjenigen von analogen Experimenten mit Weizenwurzelspitzen übereinstimmt (Eliasson, 1959a). Die Aussage der vorliegenden Versuchsresultate lautet: Die Atmungsintensität des Plectenchyms von *Agaricus campester* wird durch die Kapazität des Phosphorylierungssystem und nicht durch das Substratangebot limitiert.

Da Glucose in unbeeinflußtem Gewebe die Sauerstoffaufnahme um mehr als 50% zu steigern vermag, muß diese Stimulierung auf einem erhöhten Angebot von entsprechenden Phosphatakzeptoren, wahrscheinlich ADP, beruhen, hervorgerufen offensichtlich durch die Hexokinasereaktion oder synthetische Vorgänge, in welchen Glucose unter Teilnahme

energiereicher Phosphatdonatoren verbraucht wird, wobei das entstandene ADP die Atmung aktiviert (Chance and Hess, 1959).

Die Steigerung der Oxydationsgeschwindigkeit bei Glucosefütterung beruht also eigentlich nicht auf einer erhöhten Substratkonzentration, sondern auf einer durch die Fütterung hervorgerufenen Zunahme der intrazellulären Konzentration von ADP. Es ist dabei nicht uninteressant, sich in Erinnerung zu rufen (siehe Kap. 2), daß die größten Atmungssteigerungen im Fruchtkörpermycelium des Champignons durch Zucker, wie Fructose, Mannose und Glucose, von denen man annehmen kann, daß sie durch eine Kinasereaktion in den Stoffwechsel eintreten, hervorgerufen werden. Ist aber Glycogen endogenes Substrat, eine Annahme, welche nach den Ausführungen von Kapitel 3 großen Wahrscheinlichkeitswert besitzt, so bildet sich Glucose-6-phosphat ja unter Einwirkung von Phosphoglucomutase aus dem Cori-Ester und dieser aus Glycogen durch Phosphorolyse, also ohne direkte Beteiligung von ATP, weshalb beim Abbau des endogenen Atmungsmaterials weniger ADP zur Aktivierung der Oxydation entstünde als bei Fütterung freier Zucker.

Die durch DNP bewirkten prozentualen Steigerungen von Q_{O_2} erweisen sich bei endogener Atmung deshalb als deutlich größer, weil sie auf eine geringere anfängliche Atmungsintensität bezogen sind, als dies bei Glucosefütterung zutrifft. Es ist aber zu beachten, daß die absolute Atmungsgröße mit endogenem Substrat in Gegenwart des Entkopplers stets immer noch kleiner als bei Glucosefütterung unter denselben Bedingungen ist.

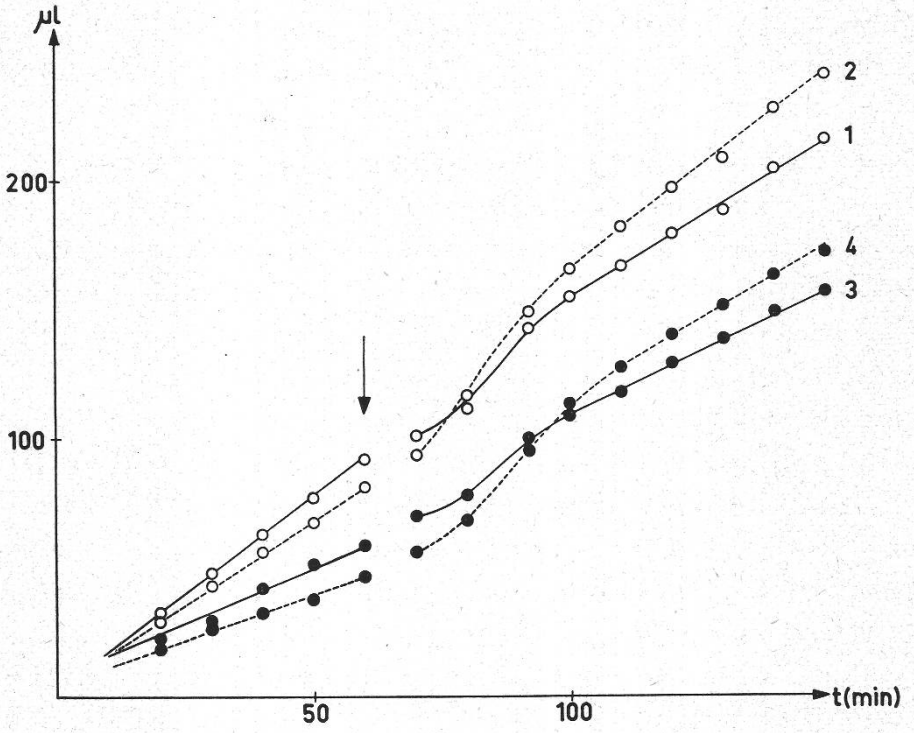
Setzt man die Intensität der endogenen Atmung gleich 100, so erhält die unbeeinflußte Glucoseatmung ungefähr den Wert 150; und da DNP letztere noch um 50% zu steigern vermag, beträgt die Oxydationsgeschwindigkeit bei Glucosefütterung und Entkoppelung 225, das heißt, die Intensität des Substratabbaus kann maximal um 125% gesteigert werden, bis ein anderer Faktor außer der Konzentration geeigneter Phosphatakzeptoren für die Atmungskettenphosphorylierung begrenzend wirkt.

Tabelle 20

RQ-Werte von Grund- und Glucoseatmung bei verschiedenen DNP-Konzentrationen

DNP-Konzentration	RQ	
	Grundatmung	Glucoseatmung
$2{,}7 \cdot 10^{-5}$ m	—	0,97
$5{,}4 \cdot 10^{-5}$ m	—	1,05
$1 \cdot 10^{-4}$ m	1,03	1,12
$5 \cdot 10^{-4}$ m	1,30 (1,34)	1,40 (1,25)
$1 \cdot 10^{-3}$ m	1,29 (1,19)	1,34 (1,24)

Besondern Aufschluß über Atmungsmechanismen gibt aber nicht nur die Tatsache der Steigerung von Q_{O_2} unter Einfluß von DNP, sondern auch die Betrachtung der durch den Entkoppler hervorgerufenen RQ-Veränderungen, welche in Tabelle 20 zahlenmäßig und in Figur 12 für die stärkste Inhibitorkonzentration auch graphisch dargestellt sind. In $5 \cdot 10^{-4}$ m und in 10^{-3} m DNP verläuft die Kurve der CO_2-Abgabe nach Zukippen des Inhibitors anfänglich ebensowenig linear wie diejenige der O_2-Aufnahme, worauf schon oben hingewiesen ist. Die in der Tabelle angegebenen Werte des respiratorischen Quotienten beziehen sich auf das durch die siebzigste und neunzigste Versuchsminute begrenzte Intervall, wobei die Kurvenbogen zur Berechnung durch die zugehörigen Sekanten ersetzt wurden. Die Zahlenangaben in Klammern entsprechen der Größe des Atmungsquotienten nach Wiedererreichen linearen Gaswechselverlaufes.



Figur 12

Veränderungen der Gaswechselgrößen durch 10^{-3} m DNP

1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe bei Glucosefütterung

3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe mit endogenem Substrat

Die der DNP-Konzentration mehr oder weniger proportionale Erhöhung des RQ über den Wert der unbeeinflußten Glucoseatmung führt zum Schluß, daß der Inhibitor nach vollständiger Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung Aufhebung des Pasteureffektes hervorruft, wobei dies in der $2 \cdot 10^{-5}$ m Lösung des Hemmstoffes gerade noch knapp verhindert wird. Beevers (1953) gibt für viele Objekte 10^{-5} m DNP als

kritische Konzentration an, wo die gesteigerte Atmung noch ohne simultanes Auftreten einer aeroben Gärung besteht, und oberhalb derselben hat man es gleichzeitig mit zwei respiratorischen Komponenten, derjenigen von Atmung und aerober Gärung, zu tun.

Nach der Theorie des Pasteureffektes (Leuthardt, 1959) kann man aus dessen Nichtfunktionieren nach Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung folgern, daß auch beim Champignon normalerweise eine dem Verhalten von Hefe analoge Kontrolle der Gärung durch die Atmung ausgeübt wird. Da jene unter aeroben Bedingungen eintritt, ist Annahme der Möglichkeit eines entsprechenden Substratabbaus auch unter Anaerobie angezeigt, in Übereinstimmung mit dem Satze, wonach der Entkoppler in bezug auf Gärung wie Einführung von Stickstoff wirkt (Hess und Chance, 1959), und es besteht demnach auch kein Grund, anzunehmen, daß die anaerobe Atmung bei *Agaricus campester* «von der alkoholischen Gärung durchaus verschieden» wäre, wie dies Kostytschew (1907, 1908) angibt. Diese den anaeroben Zuckerabbau betreffende Folgerung stimmt mit den aus den Resultaten anderer Versuchsanordnungen gezogenen Schlüssen vollständig überein (vgl. Abschnitt IV).

Berechnet man die Größe der aeroben Gärung mit Glucose als exogenes Substrat durch Subtraktion der auf die eigentliche Atmung entfallenden CO_2-Abgabe von der total emittierten Kohlendioxydmenge unter Festsetzung des RQ auf den Wert 1 (weil es sich um einen Kohlehydratabbau handelt und die Vorgänge, welche den respiratorischen Quotienten normalerweise unter 1 halten, in Gegenwart von DNP kaum mehr funktionieren, besonders, wenn es sich um Synthesen handelte [Clifton, 1946]), so erhält man einen durchschnittlichen Q_{CO_2}-Wert von 0,47 in 10^{-4} m, 0,98 in $5 \cdot 10^{-4}$ m und 0,90 in 10^{-3} m DNP, wobei in den beiden letztgenannten Fällen sich diese Zahl lediglich auf den linearen Teil der Kurve nach Behandlung mit dem Entkoppler bezieht, da keineswegs erwiesen ist, daß alles unmittelbar nach Behandlung des Plectenchyms mit sehr starken Inhibitorkonzentrationen zusätzlich zur Atmung abgegebene CO_2 auf die aerobe Gärung entfällt, indem durch DNP vielleicht auch synthetische Reaktionen, an denen Kohlensäure teilnimmt, betroffen werden.

Während die Größe der auf die oben beschriebene Weise ermittelten aeroben Gärung in 10^{-4} m DNP etwa dem durchschnittlichen $Q_{CO_2}^{N_2}$-Wert bei Glucosefütterung (0,53) entspricht (vgl. Kap. 1), übersteigt die Extra-CO_2-Abgabe in den beiden stärksten Inhibitorlösungen die Intensität der anaeroben Gärung, was nicht leicht erklärbar ist. Vielleicht stammt auch im linearen Kurventeil nicht alles zusätzlich zum Atmungskohlendioxyd auftretende CO_2 aus aerober Gärung, oder unter Anaerobie wird nicht die gesamte Brenztraubensäuremenge dekarboxyliert und der durch Triosephosphatdehydrogenase abgespaltene Wasserstoff nicht allein auf Acetaldehyd übertragen (vgl. Abschnitt IV).

Als bedeutsam erweist sich auch das Ergebnis, daß bei der DNP-vergifteten endogenen Atmung die Pasteurreaktion ebenfalls nicht mehr funktioniert, wobei der Grad der aeroben Gärung ($Q_{CO_2} = 0{,}19$ in 10^{-4} m, 1,27 in $5 \cdot 10^{-4}$ m und 0,57 in 10^{-3} m DNP) ähnlich demjenigen bei Glucosefütterung ist. Daraus folgt aber umgekehrt: Starvationschnitte enthalten und metabolisieren über den Glycolyseweg vergärbares Substrat, das demnach eine Substanz des Kohlehydratstoffwechsels sein muß. Dieser Schluß stimmt mit der aus den Ergebnissen der Arsenatvergiftung aufgestellten Hypothese, wonach das natürliche Atmungssubstrat nicht aus Proteinen, sondern aus Kohlehydraten bestehe, überein.

In 10^{-4} m DNP ist die auf die «endogene aerobe Gärung» entfallende CO_2-Abgabe genauso wie bei Glucosefütterung etwas geringer als $Q_{CO_2}^{N_2}$ (vgl. Kap. 1), übersteigt in der $5 \cdot 10^{-4}$ m Lösung des Hemmstoffes den Wert der anaeroben Gärung beträchtlich und fällt unter Einfluß der stärksten Inhibitorkonzentration wieder ab. DNP scheint also in hohen Konzentrationen auch bei Metabolisierung endogenen Substrates multiple Wirkungen auf Atmungsvorgänge auszuüben. Die Beantwortung der Frage, weshalb auch hier die Größe der aeroben Gärung diejenige der anaeroben übersteige, bedürfte weiterer Untersuchungen (vgl. Abschnitt IV).

Zu erwähnen wäre schließlich noch das in Tabelle 19 angegebene, nach längerer Einwirkung sehr großer DNP-Mengen auftretende Absinken von Q_{O_2} unter den Kontrollwert. Die Ursache für die Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch hohe Inhibitorkonzentrationen ist noch nicht eindeutig geklärt, doch soll dies auf die durch DNP hervorgerufene zu starke Erniedrigung der Konzentration von ATP, welches man für normales Funktionieren der Mitochondrien in Oxydationsprozessen als notwendig erachtet (Eliasson, 1959b), zurückzuführen sein. Im Unterschied zu andern Objekten (Beevers, 1953) findet aber beim Champignon eine Hemmung von Q_{O_2} nur bei der höchsten DNP-Konzentration und auch dann lediglich bei Glucoseatmung und in geringem Umfange statt.

Da Dinitrophenol die Zuckeraufnahme hemmt (Stenlid, 1949; Simon, 1953) und bei *Avena*-Koleoptilen (Bonner, 1949a) in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ m sogar verunmöglicht, hätte man rein theoretisch anzunehmen, daß Intensität und RQ der DNP-vergifteten Glucoseatmung nach einer gewissen Zeit auf die entsprechenden Werte der Grundatmung bei gleicher Inhibitorkonzentration fallen würden, was das Experiment teilweise bestätigt, indem in den beiden höchsten Konzentrationen des Hemmstoffes eine Annäherung der Größen von Grund- und Glucoseatmung erfolgt (vgl. Fig. 12). Es scheint jedoch noch ein Teil des zugegebenen Zuckers aufgenommen zu werden, denn die Schnitte im Glucosemedium weisen selbst in 10^{-3} m DNP-Lösung noch etwas höhere Q_{O_2}- und Q_{CO_2}-Werte als bei endogener Atmung unter gleichen Bedingungen auf,

weshalb zu folgern ist, daß exogene Glucose offenbar auch bei höhern Inhibitorkonzentrationen im Stoffwechsel noch eine Rolle spielt.

Abschließend soll noch die Frage diskutiert werden, ob DNP eventuell als Substrat der Phenoloxydase in Frage kommt, so daß die durch diesen Stoff hervorgerufenen Gaswechseleffekte anders als in der oben durchgeführten Weise erklärt werden müßten.

Träfe die Annahme einer Oxydation des Inhibitors durch die Phenolase des Pilzes zu, so müßte man die Erhöhung von Q_{O_2} nach Zugabe dieses Stoffes nicht als eine Zunahme der Atmungsintensität, sondern als eine der Atmung superponierte, auf Oxydation des Dinitrophenols zurückführbare Sauerstoffaufnahme interpretieren. Da aber 10^{-3} m DNP Q_{O_2} bereits um 20% hemmt, während die bei Polyphenoloxydasenuntersuchungen normalerweise verwendeten Substratkonzentrationen etwa zehnmal größer sind (Legrand, 1954) und 10^{-2} m DOPA (vgl. Kap. 8c) auch nach längerer Versuchsdauer keine Hemmung der Sauerstoffaufnahme erkennen läßt, drängt sich die Annahme einer Oxydation des Dinitrophenols durch die Tyrosinase des Pilzes nicht auf.

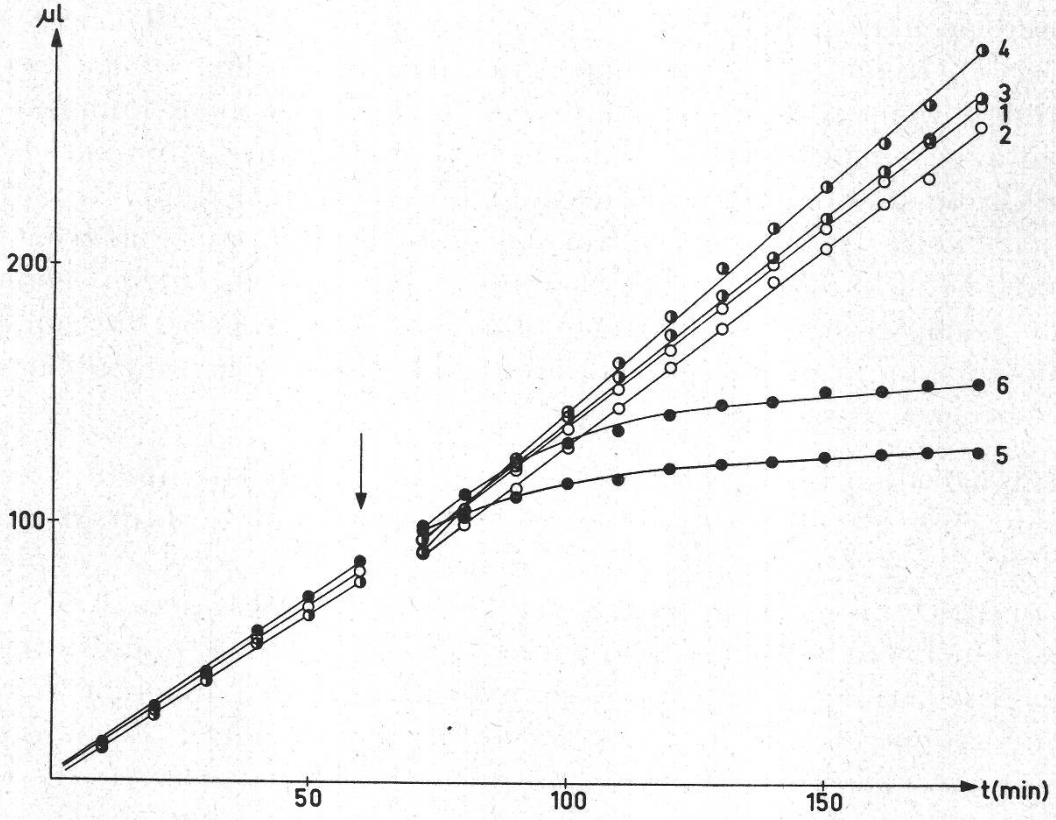
Außerdem oxydiert nach Dawson und Tarpley (1951) Polyphenoloxydase die 4-Nitroderivate von Catechol und Phenol nicht, und diese verhalten sich als kompetitive Hemmstoffe des betrachteten Fermentes. Nachdem das verwendete DNP (2,4-Dinitrophenol) aber eine solche Verbindung darstellt, liegen keine Gründe vor, die gegen eine Verwendbarkeit dieses bekannten Hemmstoffes für Atmungsuntersuchungen bei Objekten mit großer Phenolaseaktivität sprechen, wie dies nach den Ausführungen von Kapitel 6a für Phloridzin und Phloretin zutrifft.

Daß die nach längerer Einwirkungszeit auftretende Hemmung der Glucoseatmung in Lösungen sehr hoher DNP-Konzentration etwa durch Blockierung der Tyrosinase des Champignons hervorgerufen würde, fällt nach den Ergebnissen von Kapitel 8e, wonach selbst bei totaler Inaktivierung dieses Enzyms keine verminderte Atmungsintensität feststellbar ist, außer Betracht.

c) Versuche mit *p*-Nitrophenol

Cross, Taggart, Covo und Green (1949) fanden keine Hemmung der Atmungskettenphosphorylierung durch *p*-Nitrophenol (PNP), während Slater und Hülsmann (1959) diesen Stoff in gleicher Weise wie DNP als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung verwenden. Die Spezifität jener Nitroverbindung in bezug auf respiratorische Vorgänge ist aber im Gegensatz zu DNP nicht untersucht (James, 1953a), und es interessierte daher, festzustellen, inwiefern diese beiden Inhibitoren übereinstimmende Effekte im Gaswechsel des Plectenchyms hervorrufen.

Für die sich aus der experimentellen Tatsache der kompetitiven Hemmung von Phenoloxydase durch PNP (Bonner and Wildman, 1946) ergebenden Folgerungen siehe Kapitel 8d.



Figur 13

Gaswechselgrößen nach Behandlung des Plectenchyms mit verschiedenen Konzentrationen von *p*-Nitrophenol (Glucosefütterung)

1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe in 10^{-4} m PNP
3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe in 10^{-3} m PNP
5, 6: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe in 10^{-2} m PNP

Behandelt man glucosegefütterte Schnitte mit verschiedenen PNP-Konzentrationen, so erhält man die in Figur 13 dargestellten Gaswechselveränderungen. (Zur Erzielung genügender Übersichtlichkeit der Zeichnung wird auf die CO_2-Kurven vor Zukippen des Antimetaboliten verzichtet; der RQ betrug 0,90 für [5, 6], 0,94 für [3, 4] und 0,95 für [1, 2].) Danach steigert 10^{-4} m *p*-Nitrophenol Q_{O_2} um 20% (von 3,93 auf 4,73), ohne wesentliche Veränderung des Atmungsquotienten. 10^{-3} m PNP führt anfänglich zu einer Erhöhung der Sauerstoffaufnahme um etwa 50%, und nach Wiedererreichen linearen Kurvenverlaufes beträgt diese Zunahme bei einem RQ von 1,19 noch 20%. Die 10^{-2}molare Lösung des Hemmstoffes schließlich schädigt die Zellen außerordentlich stark, da sowohl Sauerstoffaufnahme als auch CO_2-Abgabe auf ein sehr geringes Niveau sinken und ein großer, offenbar durch Austritt zelleigener Substanzen ins Suspensionsmedium verursachter Trockengewichtsverlust auftritt.

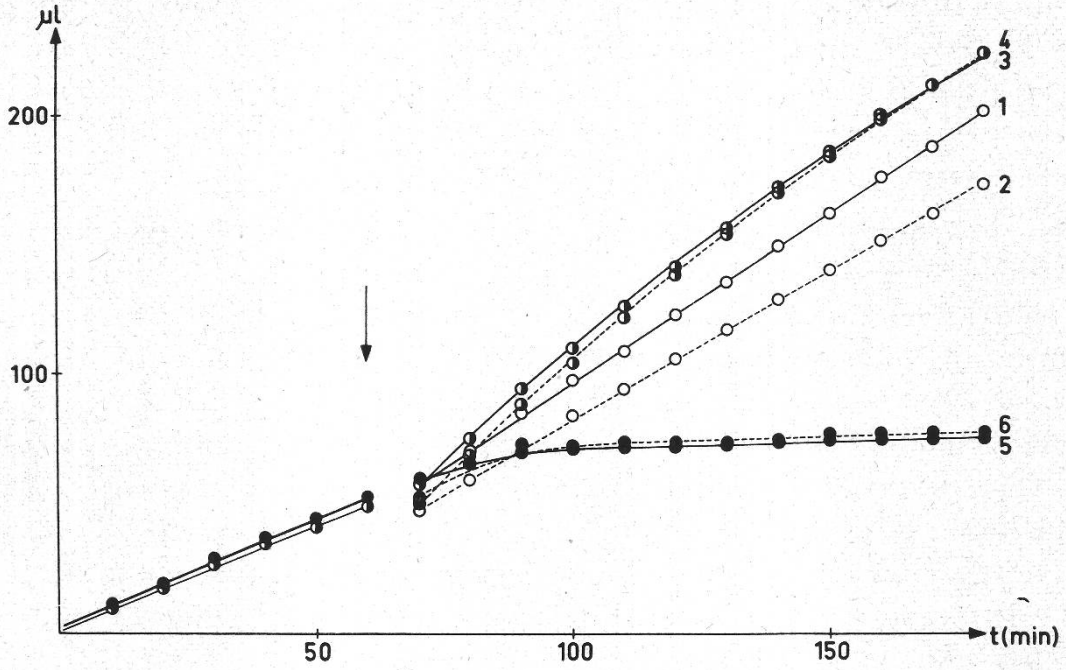
Die CO_2-Abgabe während der ersten Stunde nach Applikation von 10^{-2} m PNP ist durch diesen Hemmstoff viel weniger beeinträchtigt als die Sauerstoffaufnahme, wobei der RQ von der 73.–100. Versuchsminute sogar auf zirka 1,9 steigt. Dies mag darauf beruhen, daß alles im Gewebe vorhandene und nicht nur das aus Atmung und aerober Gärung stammende CO_2 freigesetzt wird, eine Annahme, welche sich auch deswegen aufdrängt, weil die während dieser Zeit zusätzlich zum Atmungskohlendioxyd abgegebene CO_2-Menge einem Q_{CO_2}-Wert von 1,77 entspricht und so die Größe der anaeroben «Glucosegärung» weit übersteigt. Es tritt also möglicherweise auch noch CO_2 aus dem Plectenchym aus, das weder von Atmung noch aerober Gärung herrührt. Die in der dritten Versuchsstunde noch feststellbare O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe dürften keine normale Atmung mehr repräsentieren und stellen wahrscheinlich einen nekrotischen Gaswechsel dar.

Entgegen den Beobachtungen von Cross et al. (1949) und in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Slater und Hülsmann (1959) wirkt PNP bei *Agaricus campester* offenbar wie DNP als Entkoppler der Atmungskettenphosphorylierung, da die 10^{-3} molare Lösung des Hemmstoffes den Pasteureffekt aufhebt und gleichzeitig die Atmungsintensität zu steigern vermag. Exakt beweisen ließe sich die entkoppelnde Wirkung von *p*-Nitrophenol allerdings nur durch Bestimmung des P/O-Quotienten, was mit Gewebeschnitten aber nicht durchführbar ist. Der auf die durch diese Konzentration hervorgerufene aerobe Gärung entfallende Q_{CO_2}-Wert beträgt 0,90. Die dabei auftretende Steigerung von Q_{O_2} um 50% entspricht der maximalen, mit 10^{-5} m DNP erzielten Erhöhung der Sauerstoffaufnahme bei Glucosefütterung. Diese erhöhte Atmungsintensität wird aber im Gegensatz zum offenbar spezifischer wirkenden und weniger toxischen Dinitrophenol nicht während der ganzen Versuchsdauer in der gleichen Größe und bei dementsprechend linearem Kurvenverlauf aufrechterhalten.

Die mehr oder weniger übereinstimmende Wirkung der beiden betrachteten Hemmstoffe in bezug auf maximal mögliche Steigerung von Q_{O_2} der Glucoseatmung spricht ebenfalls dafür, daß deren Intensität durch die intrazelluläre Konzentration geeigneter Phosphatakzeptoren für die oxydative Phosphorylierung limitiert ist.

Nachdem 10^{-4} m PNP die Sauerstoffaufnahme ohne gleichzeitig erfolgende deutlich feststellbare Erhöhung des RQ stimuliert, entspricht die verwendete Menge des Hemmstoffes der kritischen Konzentration, bei welcher der Pasteureffekt gerade noch funktioniert und die für DNP etwa 10^{-5} m beträgt (vgl. Kap. 6b).

In Figur 14 sind die durch 10^{-2} m, 10^{-3} m und 10^{-4} m PNP bewirkten Gaswechselveränderungen bei Fehlen exogenen Substrates dargestellt,



Figur 14

Gaswechselverlauf in *p*-Nitrophenol bei Metabolisierung endogenen Substrates

1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe in 10^{-4} m PNP
3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe in 10^{-3} m PNP
5, 6: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe in 10^{-2} m PNP

wobei das im allgemeinen Kurvenverlauf übereinstimmende Verhalten von Grund- und Glucoseatmung (Fig. 13) bei den verschiedenen Inhibitorkonzentrationen sofort auffallen muß:

a) In 10^{-2} molarer PNP-Lösung hört dreißig Minuten nach Behandlung der Gaswechsel fast völlig auf, weshalb die Möglichkeit des Absterbens der Zellen naheliegt, da ja auch eine durch Trockengewichtsverlust (40 % der unbeeinflußten Kontrollen) festgestellte «Exosmose» zelleigener Substanzen auftritt. Aus der Tatsache, daß der RQ von der 70.–90. Versuchsminute zirka 2,0 beträgt, darf man nicht schließen, daß ein außerordentlich hoher Grad von aerober Gärung erreicht worden wäre, sondern es tritt jetzt offenbar wegen Schädigung verschiedener Fermentsysteme durch die hohe Hemmstoffkonzentration alles im Plectenchym vorhandene CO_2 aus.

b) 10^{-3} m PNP hebt die Pasteurreaktion auf.

c) In 10^{-4} m *p*-Nitrophenol findet bei einer um 61 % stimulierten Atmungsintensität ($Q_{O_2} = 4{,}73$) wie bei Glucosefütterung noch keine deutlich feststellbare aerobe Gärung statt.

Betrachtet man die absolute Größe der durch den Inhibitor hervorgerufenen Steigerungen von Q_{O_2} und Q_{CO_2}, so ist zu bemerken, daß diese bei der kleinsten verwendeten PNP-Konzentration praktisch gleich sind,

weshalb man annehmen kann, daß die zusätzlich auftretende Atmung auf einem Kohlehydratverbrauch ohne Fermentation beruht. Die Extra-CO_2-Abgabe nach Behandlung mit 10^{-3} m PNP hingegen übersteigt deutlich die gleichzeitig erfolgende zusätzliche O_2-Aufnahme, was den Zustand aerober Gärung anzeigt.

Der mehr oder weniger übereinstimmende Kurvenverlauf von Grund- und Glucoseatmung in PNP-Lösungen verschiedener Konzentration läßt zwei Deutungen zu: Entweder wird in beiden Fällen nach Vergiftung der Atmung nur noch endogenes Substrat metabolisiert, oder der Abbau inneren Substrates erfolgt im wesentlichen in gleicher Weise wie derjenige exogener Glucose, und dieses ist demnach als ein Kohlehydrat anzusprechen. Die erste Annahme besitzt wenig Wahrscheinlichkeitswert, da PNP die Zuckeraufnahme zum mindesten nicht ganz verunmöglicht, was sich an den bei Glucosefütterung höhern RQ-Werten zu erkennen gibt. Die zweite Interpretationsmöglichkeit, wonach der endogenen Atmung ein Kohlehydrat oder eventuell ein daraus entstehender Phosphorsäureester, jedoch kein freier Zucker zugrunde liegt, ist nicht neu und bestätigt frühere mit andern Hemmstoffen gewonnene Erkenntnisse über die Art des natürlichen respiratorischen Substrates des Champignonfruchtkörpers.

Ein zusammenfassender Vergleich der Wirkungen von PNP auf Grund- und Glucoseatmung zeigt folgende Resultate:

1. *p*-Nitrophenol führt bei Grundatmung zu schnellerem Absterben als bei Glucoseatmung.

2. Die 10^{-3} molare Inhibitorkonzentration ergibt stärkere Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei endogener Atmung.

3. Durch 10^{-4} m PNP tritt in beiden Fällen keine aerobe Gärung auf; aber die Zunahme von Q_{O_2} beträgt bei Grundatmung etwa 60 % gegenüber 20 % bei Glucosefütterung.

Aus 2. und 3. folgt wiederum der schon aus der Ähnlichkeit der durch PNP und DNP hervorgerufenen Gaswechselveränderungen gezogene Schluß, wonach die Atmungsintensität des Plectenchyms primär durch die Menge geeigneter Phosphatakzeptoren begrenzt wird. Wegen der Hexokinasereaktion ist bei Glucoseatmung mehr ADP vorhanden, was einen schnelleren Substratabbau erlaubt. Nach Entkoppelung von Oxydation und Atmungskettenphosphorylierung spielt die ADP-Menge aber keine atmungsbegrenzende Rolle mehr, und die Größe der PNP-vergifteten endogenen Atmung kann, wenn genügend Substrat vorhanden ist, theoretisch maximal auf den Wert der entkoppelten Glucoseatmung ansteigen, was für Schnitte in 10^{-4} m *p*-Nitrophenol sogar numerisch zutrifft, da in beiden Fällen in der Lösung des Hemmstoffes ein Q_{O_2}-Wert von 4,73 erreicht wurde. Eine so genaue Übereinstimmung ist aber im allgemeinen nicht zu erwarten und hier wahrscheinlich zufällig.

d) Fütterung von Adenosinphosphaten, anorganischem Phosphat und Magnesiumsulfat

Bonner (1949b) konnte die Sauerstoffaufnahme von *Avena*-Koleoptilen durch DNP stark steigern, woraus er den bekannten Schluß zog, daß die Atmungsintensität durch das intrazelluläre Niveau geeigneter Phosphatakzeptoren begrenzt sei, und prüfte diese Annahme durch Fütterung von Adenosinphosphaten und Arginin, welches als Phosphoarginin (Leuthardt, 1959) ebenfalls eine energiereiche Bindung aufweist.

Stimmt diese Hypothese, so sollten ADP und AMP, welch letzteres gemäß der Gleichung $2\,ADP \rightleftarrows AMP + ATP$ auch ADP liefert, unter der Voraussetzung, daß bereits etwas ATP zur Verfügung steht (Leuthardt, 1959), die Oxydationsgeschwindigkeit ebenfalls steigern, falls die Nucleotide in die Zelle aufgenommen werden können.

Tabelle 21

Steigerungen der Atmungsintensität durch Adenosinphosphate in Suspensionsmedien verschiedener Zusammensetzung (Konzentrationen: Adenosinphosphate und $MgSO_4$: 10^{-3} m, Glucose: 10^{-2} m, Phosphat: $3 \cdot 10^{-2}$ m)

Nr.	pH	Zusammensetzung des Mediums			Zugekipptes Substrat			Steigerung von Q_{O_2} %
		Glucose	Phosphat	$MgSO_4$	AMP	ADP	ATP	
1	4,8	+	+	—	+	—	—	— 9
	4,8	+	—	—	+	—	—	+ 3
2	4,8	+	+	+	+	—	—	+13
	4,8	+	—	+	+	—	—	+ 5
3	4,8	—	+	+	+	—	—	+ 5
	4,8	+	+	+	+	—	—	+15
4	6,0	+	+	+	+	—	—	+20
	6,0	+	—	+	+	—	—	+17
5	4,8	—	+	—	—	—	+	+28
	4,8	+	+	—	—	—	+	+19
6	4,8	—	+	+	—	—	+	+ 6
	4,8	+	+	+	—	—	+	+20
7	4,8	—	+	—	—	+	—	+11
	6,0	—	+	—	—	+	—	+ 4
8	4,8	+	+	+	—	+	—	+ 1
	6,0	+	+	+	—	+	—	— 4

Leider gelang es weder durch Variation des pH noch durch verschiedene Zusammensetzung des Suspensionsmediums (siehe Tab. 21), durch

exogenes AMP oder ADP mehr als nur mäßige Steigerungen der Atmungsrate hervorzurufen. In allen Fällen aber verhindert Zukippen dieser Adenosinphosphate nach Erreichen linearer Atmungsrate zum mindesten das Absinken der Intensität der Grundatmung im Laufe der Versuchsdauer (vgl. Kap. 1).

Adenosintriphosphat, welches bei solchen Untersuchungen genau gleich wie die beiden andern Nucleotide wirken soll, was indirekt auf die ATP-ase-Aktivität zurückgeführt wird (Bonner, 1949b), ergab, wie die Zusammenfassung zeigt, bei den Plectenchymschnitten das beste Ergebnis von den geprüften Adenosinphosphaten. Dies stellt nur scheinbar einen Widerspruch zur «Phosphatakzeptorentheorie», wonach ein hoher Gehalt der Mitochondrien an bei der oxydativen Phosphorylierung entstandenem ATP eine Verlangsamung der Oxydationsgeschwindigkeit hervorruft, falls dieses nicht genügend rasch für Synthesen und andere energieverbrauchende Vorgänge weggeschafft oder durch ATP-ase abgebaut wird, dar, da exogenes Adenosintriphosphat, falls es wegen der Permeabilitätsbarriere überhaupt in die Zellen einzudringen vermag, im Gegensatz zu dem bei der Atmungskettenphosphorylierung entstandenen und in gleicher Weise wie das bei der glycolytischen Phosphorylierung gebildete ATP nicht mitochondrialen Ursprungs ist und so wahrscheinlich in einen andern, möglicherweise in der Zellmembran lokalisierten ATP-Speicher (Hess und Chance, 1959) eintreten dürfte, wo eventuell auch ein schnellerer Abbau oder Verbrauch von Adenosintriphosphat als in den Mitochondrien stattfindet.

Durch Fütterung von Arginin erreichte Bonner (1949b) ähnliche Atmungssteigerungen wie mit den erwähnten Nucleotiden (zirka 25%). Bei *Agaricus* konnte durch Experimente mit dieser Aminosäure kein eindeutiges Resultat gewonnen werden, da in einer Versuchsreihe die Steigerung von Q_{O_2} etwa 10%, in der andern 0% betrug, und zwar sowohl mit als auch ohne Glucose.

Die vorliegenden, nach Fütterung von Adenosinphosphaten gewonnenen Versuchsresultate widerlegen die Annahme, wonach die ADP-Konzentration beim Champignon begrenzender Faktor der Oxydationsgeschwindigkeit sei, nicht, sondern sie liegen eher in Richtung dieser Hypothese, auch wenn sich nach Behandlung des Plectenchyms mit den verwendeten Nucleotiden nur geringe Atmungssteigerungen ergeben, was sicherlich auf mangelnder Permeabilität nicht nur im engern, sondern auch im weitern Sinn (Unmöglichkeit einer Substanz, den Ort ihrer biochemischen Wirksamkeit in der Topographie der Zelle einzunehmen [Wiame, 1957]) beruht.

Es interessierte in diesem Zusammenhang auch noch, inwiefern die Schnitte exogenen anorganischen Phosphates bedürfen, womit sich die Möglichkeit prüfen ließe, ob die bei Fütterung von Adenosinphosphaten

auftretenden Atmungssteigerungen lediglich von aus dem Molekül abgespaltenem Phosphat herrühren könnten. Daß sich in Untersuchungen von einstündiger Dauer keine unterschiedliche Sauerstoffaufnahme in Phosphat- und Phthalatpuffer ergibt, ist schon erwähnt worden (Abschnitt II). In der vorliegenden Versuchsreihe erfolgte nun die Fütterung von KH_2PO_4/Na_2HPO_4 erst sechzig Minuten nach Versuchsbeginn, ohne daß sich jedoch eine atmungssteigernde Wirkung exogenen anorganischen Phosphates gezeigt hätte, da die Veränderungen von Q_{O_2} nach der Fütterung in vier verschiedenen Experimenten bei Glucoseatmung 0%, +1%, —6% und +2%, bei endogener Atmung —11%, —15%, —18% und —2% betrugen, lauter Werte, wie sie auch ohne zusätzliche Phosphatgabe auftreten. Man kann demnach annehmen, daß das Plectenchym genügend solche Ionen enthält und die durch die obenerwähnten Nucleotide hervorgerufenen Steigerungen der Sauerstoffaufnahme nicht lediglich durch abgespaltenes Phosphat zustande gekommen sind.

Nach Erreichen linearer Atmungsrate zugekipptes $MgSO_4$ (10^{-3} m) vermochte die Intensität der Glucoseatmung um 13% zu steigern. Mg^{++}-Ionen funktionieren unter anderem als Aktivatoren für viele mit dem Phosphatstoffwechsel in Zusammenhang stehende Enzyme, so daß eine genaue Lokalisation des Angriffspunktes des zugegebenen Magnesiumsulfates im Atmungsschema nicht möglich ist. Offenbar weist das Plectenchym aber einen suboptimalen Gehalt an Mg^{++} auf, was vielleicht durch das Auswaschen der Schnitte während der Vorbehandlung verursacht wird.

7. Begrenzende Faktoren der aeroben Atmung

Nach den Ergebnissen von Kapitel 6 kontrolliert die Menge intrazellulärer Phosphatakzeptoren und nicht das Substratangebot die Atmungsintensität. Demnach dürfte Fütterung nur solcher Stoffe, welche primär zu einer Erhöhung der ADP-Konzentration führen, wie dies für Zucker zutrifft, zu großen Steigerungen der Sauerstoffaufnahme führen, während Erhöhung der Kapazität anderer Fermente oder Enzymgruppen dabei keine solche Wirkung ergeben sollte, wobei natürlich noch zu zeigen sein wird, ob die gefütterten Cofaktoren überhaupt die Möglichkeit haben, in die Zellen einzudringen. Erhöht nun aber umgekehrt eine bestimmte Substanz die Atmung erheblich, so folgt daraus, daß sie im System der oxydativen Phosphorylierung angreift. Diese beiden letztgenannten Punkte erfahren im folgenden eine Prüfung, während die besondere Eignung freier Zucker, den Q_{O_2}-Wert zu steigern, schon in Kapitel 2 erwähnt wird.

a) Fütterung von Pyridinnucleotiden

Obschon sehr verdünnte wässerige Lösungen von DPN^+ unbeständig und selbst konzentrierte nur einige Tage in der Kälte haltbar sind (Rauhen, 1956), kann man doch annehmen, daß etwa 1½ Stunden nach Herstellung der Lösung, im Zeitpunkt der Fütterung, noch genügend katalytisch wirksame Codehydrase I existierte, da die anfänglich in die Ansatzbirne eingefüllte Lösung 10^{-2} molar war, was einer Endkonzentration im Hauptraum von maximal 10^{-3} m entspricht.

Tabelle 22

Veränderung der Gaswechselgrößen nach Fütterung von DPN^+

	Endogene Atmung	Glucoseatmung
Steigerung von Q_{O_2}	0 %	+ 4 %
Steigerung von Q_{CO_2}	+19 %	+12 %
RQ	0,69→0,82	0,89→0,98

Die sich dabei ergebenden Veränderungen der Gaswechselgrößen von Schnitten im Standardsuspensionsmedium sind in Tabelle 22 dargestellt. Die gemäß diesen Zahlen variierten Atmungsgrößen werden während der ganzen Versuchsdauer bei vollständig linearem Kurvenverlauf aufrechterhalten.

DPN^+ vermag weder die Sauerstoffaufnahme der Grund- noch diejenige der Glucoseatmung deutlich zu steigern, was man gemäß obigen Darstellungen erwartet, doch ist eine Stimulierung der CO_2-Abgabe und damit eine RQ-Erhöhung mit oder ohne Glucose als Substrat unverkennbar. Obschon also Fütterung von Coenzym I die Intensität des Abbaus in der respiratorischen Substratkette nicht zu steigern vermag, bleibt DPN^+ in den Zellen doch nicht wirkungslos, da es, wohl mit dem (den) entsprechenden Apoferment(en) zusammen, direkt oder indirekt Reaktionen begünstigt, welche vorher nicht oder nicht in gleicher Geschwindigkeit ablaufen konnten. Es scheint, als ob durch DPN^+ ein größerer Teil des Substrates totalem Abbau anheimfiele, vielleicht auf Kosten derjenigen Vorgänge, welche normalerweise den RQ sehr tief halten, und man hätte es demnach hier mit einer Art intrazellulärer Regulation von alternativen Stoffwechselvorgängen durch die Konzentration eines bestimmten Fermentes zu tun.

Die Frage nach der Möglichkeit des Eindringens von DPN^+ in das Plectenchym zu stellen, dürfte jetzt überflüssig sein, nachdem Zugabe dieses Nucleotides ins Suspensionsmedium die CO_2-Abgabe steigern kann und außerdem unter anaeroben Bedingungen die Gärungsgröße um etwa

80 % erhöht (vgl. Kap. 4). Ist aber die Zelle für DPN^+ wohl wegen Funktionierens aktiven Stofftransportes nicht völlig impermeabel, so trifft dies wahrscheinlich auch für TPN^+ zu, das, wie unten gezeigt wird, genau wie Coenzym I in bezug auf Gaswechselvorgänge nicht ohne Effekt bleibt.

Tabelle 23

Veränderungen der Atmungsgrößen nach Fütterung von TPN^+

	Endogene Atmung	Glucoseatmung
Steigerung von Q_{O_2}		
prozentual	+15 %	+11 %
absolut	0,39	0,41
Steigerung von Q_{CO_2}		
prozentual	+36 %	+17 %
absolut	0,76	0,57
Veränderung des RQ	0,79→0,93	0,92→0,97

Die durch exogenes TPN^+ hervorgerufenen Gaswechselveränderungen sind in Tabelle 23 zu sehen, welche zeigt, daß dieses Nucleotid die Sauerstoffaufnahme etwas zu steigern vermag, aber doch nicht so, wie dies zu erwarten wäre, falls die Menge dieses Cofaktors atmungsbegrenzend wirkte.

Aus der experimentellen Tatsache, daß die Grundatmung einen durchschnittlichen RQ von 0,74 besitzt, sowie der Möglichkeit, mit Arsenat diesen Wert auf 1 zu erhöhen, wurde schon früher gefolgert, daß gleichzeitig mit der Atmung noch andere den Gaswechsel beeinflussende Vorgänge ablaufen, wobei die zu postulierenden Nebenreaktionen mit der respiratorischen Substratkette irgendwie verknüpft sein müssen (vgl. Kap. 3). Da TPN^+ gleichzeitig mit der schwachen Steigerung der endogenen Atmung eine deutliche RQ-Erhöhung bewirkt, erfolgt durch die Codehydrase II offenbar ebenfalls wie mit DPN^+ eine Begünstigung des vollständigen Substratabbaus. Die absolute Zunahme von Q_{CO_2} beträgt 0,76 (ungefähr 100 % mehr als die absolute Steigerung von Q_{O_2}); die Erhöhung des RQ rührt also nicht einfach davon her, daß durch TPN^+ nun zusätzlich die Veratmung eines Kohlehydrates (mit RQ = 1) ermöglicht würde, was den Gesamt-RQ erhöhte, sondern es ist nun eine zusätzliche CO_2-Abgabe vom Abbau des endogenen Substrates festzustellen, die ohne TPN^+-Fütterung nicht stattfindet.

Genauso bemerkt man auch bei Glucoseatmung eine absolut höhere Zunahme von Q_{CO_2} als von Q_{O_2}, das heißt, es wird auch hier unter Einfluß des Nucleotides nicht lediglich mehr Kohlehydrat veratmet, sondern es erfolgt darüber hinaus noch eine Extra-CO_2-Abgabe, so daß der RQ prak-

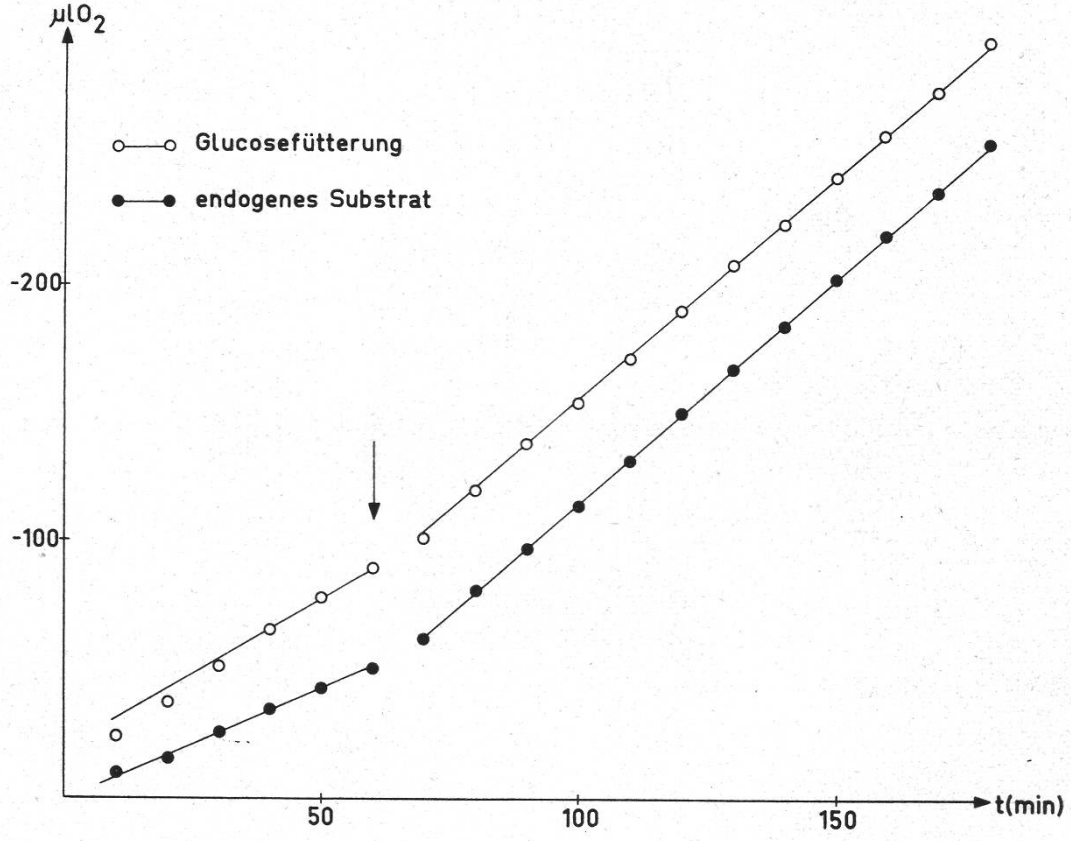
tisch den nach der Art des metabolisierten Substrates zu erwartenden Wert erreicht.

Obigen Darlegungen könnte etwa noch folgende Bemerkung hinzugefügt werden: Die Veränderungen der Gaswechselgrößen sind lediglich deswegen aufgetreten, weil der Cofaktor in einzelne Teile, zum Beispiel auch Phosphat und Ribose, gespalten wurde, die dann ihrerseits die Atmung beeinflussen.

Dieser Einwand ist jedoch kaum stichhaltig; denn weder Zugabe von Phosphat (vgl. Kap. 6d) noch von Ribose erhöht die Sauerstoffaufnahme, und der RQ bleibt in allen Fällen unverändert; auch wäre dann bei TPN^+- und bei DPN^+-Fütterung die gleiche Steigerung von Q_{O_2} zu erwarten, was aber ebenfalls nicht zutrifft.

b) Wirkung von Hefeextrakt

Füttert man Plectenchymschnitte mit 0,5% Difco-Hefeextrakt, so läßt sich unter anaeroben Bedingungen keine Wirkung dieses Substanzgemisches in bezug auf die CO_2-Abgabe feststellen, während Grund- und Glucoseatmung dadurch beträchtliche Steigerungen erfahren. Die Sauerstoffaufnahme unmittelbar vor Gebrauch hergestellter Hefeextraktlösung allein ist vernachlässigbar klein.



Figur 15

Einfluß von Difco-Hefeextrakt (0,5%) auf die Größe der Sauerstoffaufnahme

Nach Figur 15, welche die Ergebnisse eines solchen Versuches zeigt, wird die Intensität der endogenen Atmung durch frische Hefeextraktlösung um 100% und die Glucoseatmung um 43% erhöht. Setzt man die Größe der Grundatmung gleich 100, so ergibt sich bei Glucosefütterung anfänglich der Wert 142, und mit Hefeextrakt lauten diese Zahlen auf 200 beziehungsweise 203. Nun stimmen die beiden Atmungsintensitäten praktisch überein, und Hefeextrakt erlaubt somit der endogenen Atmung, auf die Größe der Glucoseatmung unter gleichen Bedingungen anzusteigen.

In diesem Zusammenhang wird man sich sofort des nach Vergiftung der Atmung mit zirka 10^{-5} m DNP erhaltenen Ergebnisses erinnern, wonach die Atmung mit oder ohne exogenes Substrat nach Entkoppelung und bei dadurch hervorgerufener Unabhängigkeit vom System der oxydativen Phosphorylierung maximal auf etwa 225% der unbeeinflußten Grundatmung ansteigen kann, bevor ein anderer Faktor atmungsbegrenzend wirkt (vgl. Kap. 6b). Durch die genannte Konzentration der Entkopplersubstanz wurden ähnliche respektive Veränderungen der Q_{O_2}-Werte von Grund- und Glucoseatmung wie nach Fütterung von Hefeextrakt festgestellt (stärkere Steigerung der endogenen Atmung, so daß die Intensität der Grund- sich derjenigen der Glucoseatmung nähert).

Wegen der geringen Konzentration der Hefeextraktlösung ist nicht anzunehmen, daß die bei deren Fütterung hervorgerufenen Steigerungen von Q_{O_2} direkt durch Veratmung in diesem Extrakt enthaltener Substrate zustande kommen. Es scheint sich dabei vielmehr um ein Agens zu handeln, welches seine Wirksamkeit schon in katalytischer Menge ausübt.

Da beim Champignon die Atmungsintensität durch die intrazelluläre Konzentration von ADP limitiert ist, Hefeextrakt unter anaeroben Bedingungen die CO_2-Abgabe nicht beeinflußt, die Größe von Grund- und Glucoseatmung hingegen je auf das nach Entkoppelung durch DNP erreichbare Niveau erhöht, besteht die Möglichkeit, daß Hefeextrakt im System der Atmungskettenphosphorylierung angreift.

Bei Fütterung dieses Gemisches verschiedener Substanzen ist bei Glucoseatmung keine nennenswerte Erhöhung des RQ feststellbar, wohl aber bei endogener Atmung, deren respiratorischer Quotient in einer Versuchsreihe von 0,73 auf 0,83 stieg, wobei die absoluten Zunahmen von Q_{O_2} und Q_{CO_2} 1,77 beziehungsweise 1,70 betrugen; in einer andern Serie erhöhte sich der RQ von 0,70 auf 0,86, und die Beträge der Veränderungen von Q_{O_2} und Q_{CO_2} lauteten auf 2,06 beziehungsweise 2,12. Auch bei Glucoseatmung sind die absoluten Steigerungen der O_2-Aufnahme und der CO_2-Abgabe größenmäßig übereinstimmend. Daraus ergeben sich zwei Folgerungen:

1. Hefeextrakt ruft seine atmungssteigernde Wirkung offenbar nicht wie DNP durch Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung hervor, sondern scheint die Leistungsfähigkeit dieses Systems direkt zu erhöhen.

2. Weil die nach Hefeextraktfütterung zusätzlich auftretende Grundatmung einen RQ von 1 aufweist, muß der Champignonfruchtkörper Kohlehydratreserven besitzen, deren Metabolisierung durch Hefeextrakt induziert wird, was mit andern Versuchsanordnungen gewonnene Ergebnisse über die Natur des endogenen Substrates bestätigt.

Die aus vorliegenden Experimenten gezogene Schlußfolgerung, wonach die durch Hefeextrakt bewirkte Veränderung des Atmungstypus wahrscheinlich durch Eingreifen eines in diesem Substanzgemisch enthaltenen Stoffes im Kontrollmechanismus der Atmungsrate zustande kommt, wird im folgenden geprüft. Gemäß den Ausführungen von Kapitel 6b soll, nachdem die Atmungsgröße mit oder ohne exogenes Substrat auf maximal 225% der unbeeinflußten endogenen Atmung angestiegen ist, ein anderer Faktor als die ADP-Konzentration die Oxydationsgeschwindigkeit begrenzen. Trifft dies zu, so wäre zu erwarten, daß die durch Hefeextrakt stimulierte Atmung durch DNP keine große Steigerung mehr erfährt.

c) Die durch Hefeextrakt hervorgerufene Veränderung des Atmungstypus

Gibt man zu den Schnitten mit durch Hefeextrakt stimulierter Grundatmung 10^{-3} m $MgSO_4$, $3 \cdot 10^{-2}$ m KH_2PO_4 oder $2{,}7 \cdot 10^{-5}$ m DNP, so ergeben sich folgende Zunahmen von Q_{O_2}: 20% beziehungsweise 15% beziehungsweise 20%. Vergleicht man diese Zahlen mit den entsprechenden in Abwesenheit von Hefeextrakt sich ergebenden Steigerungen der Sauerstoffaufnahme (15% mit $MgSO_4$, 0% mit anorganischem Phosphat und 50% mit Dinitrophenol), so muß man feststellen, daß jetzt ein etwas veränderter Atmungstypus vorliegt.

Da Mg^{++}-Ionen keine wesentlich andere Wirkung als in Abwesenheit von Hefeextrakt zeigen, anorganisches Phosphat nun den O_2-Verbrauch deutlich stimuliert und DNP nicht einmal mehr halb so wirksam wie bei normaler Glucoseatmung ist, scheint die Oxydationsgeschwindigkeit in Gegenwart von Hefeextrakt vorwiegend durch andere Faktoren als ADP, vielleicht durch die Konzentration eines Cofermentes und von anorganischem Phosphat, welches nach den oben erwähnten Versuchen jetzt in suboptimaler Menge zur Verfügung steht, kontrolliert zu sein.

Auch 10^{-4} m PNP, das die normale Glucoseatmung nach Entkoppelung und dadurch hervorgerufener Unabhängigkeit der Größe der Sauerstoffaufnahme vom Niveau der betreffenden Phosphatakzeptoren um 20% erhöht, bleibt auf die durch Hefeextrakt gesteigerte Glucoseatmung fast

wirkungslos (Erhöhung von Q_{O_2} um nur 5%). Demnach erfolgt die Kontrolle der Geschwindigkeit des respiratorischen Substratabbaus in Gegenwart von Hefeextrakt nicht durch die ADP-Menge.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Hefeextrakt den Typus der Atmung von *Agaricus campester* durch Eingreifen in deren oxydativen Teil, möglicherweise durch direkte Wirkung auf die Atmungskettenphosphorylierung, verändert.

8. Zur Terminaloxydase der Atmung

Als Terminaloxydasen werden solche Enzyme bezeichnet, die Elektronen von Produkten des Intermediärstoffwechsels auf Sauerstoff übertragen können (z. B. Cytochromoxydase, Flavoproteine, Phenolasekomplex u. a. [Mason, 1955]).

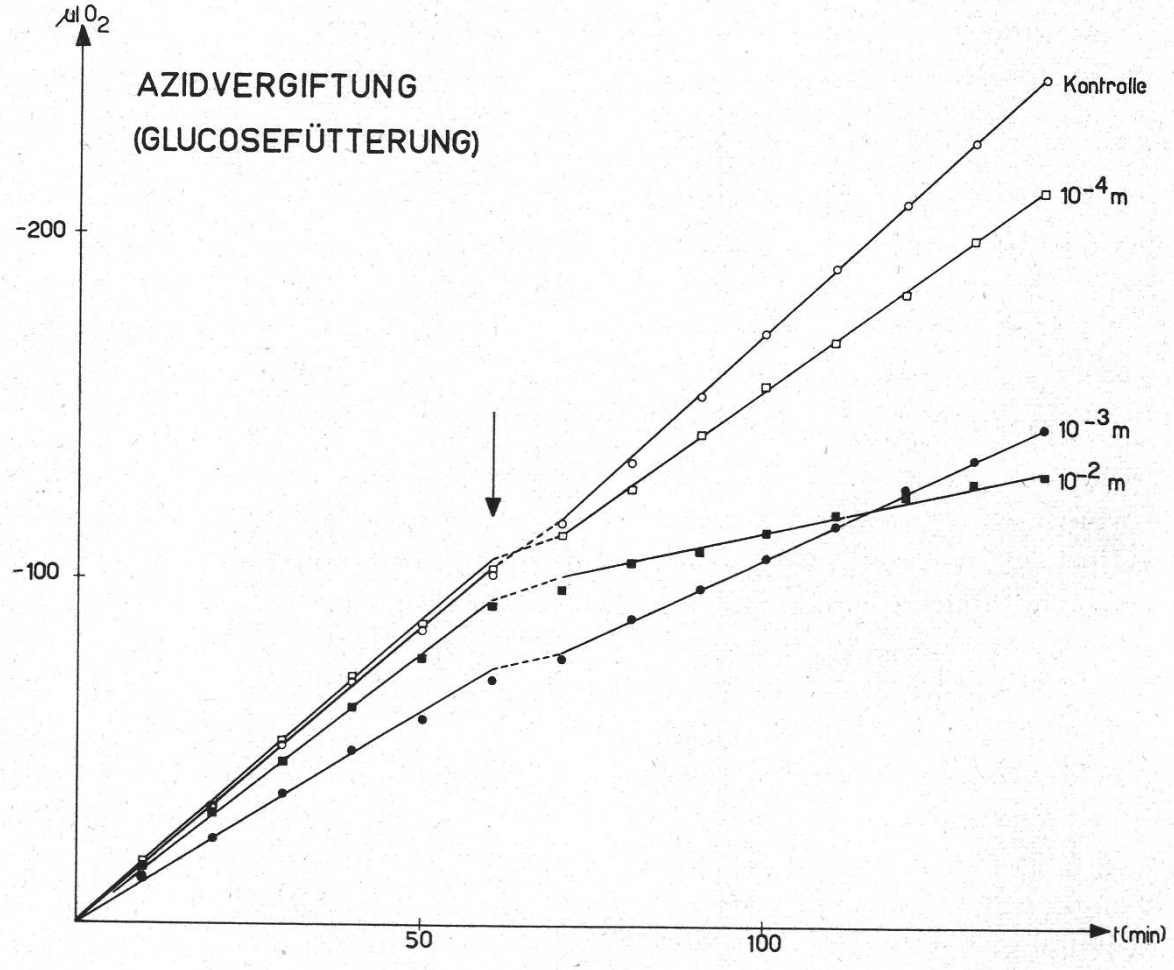
a) Azidvergiftung

Na-Azid ist bekannt sowohl als ein Entkoppler der glycolytischen (Spiegelmann, Kamen and Sussman, 1948) als auch der oxydativen Phosphorylierung (Lehninger et al., 1959) und vermag so in bestimmten Fällen die Sauerstoffaufnahme und die CO_2-Abgabe beträchtlich zu steigern (Tissières, 1950; Jennings, 1959). Andererseits hat Azid wie Cyanid auch die Fähigkeit, mit Schwermetallen Komplexe zu bilden, und die etwa 10^{-3} molare Inhibitorlösung hemmt auf diese Weise die Cytochromoxydase von Weizenembryonen total (James, 1953a) und die Polyphenoloxydase von *Agaricus campester* bei pH 5,9 um rund 70%, bei pH 7,3 gar nicht (Keilin, 1937).

Berücksichtigt man die längst bekannte Regel, wonach das pH bei Verwendung schwacher Säuren als Hemmstoffe bei In-vivo-Versuchen etwa so tief wie der pK-Wert der Säure gewählt werden soll, da wahrscheinlich nur die undissoziierte Partikel permeiert (James, 1953a), so ergibt sich bei pH 4,8 (pK von $HN_3 = 4{,}7$), eingestellt mit Phthalatpuffer, eine totale Hemmung der Glucoseatmung sowohl durch 10^{-2} m als auch durch 10^{-3} m Na-Azid (Endkonzentration in den Warburggefäßen), und zwar schon dann, wenn der Hemmstoff sich noch im Seitenraum befindet. Die geringe Menge von gasförmigem HN_3, welche sich im Gleichgewicht mit dem gelösten Azid in der Ansatzbirne befindet und sich offenbar in der Flüssigkeit im Hauptraum löst, soweit nicht eine Absorption durch die Kalilauge im zentralen Einsatz erfolgt, was zu einer dauernden Nachlieferung des Gases aus dem Seitengefäß führt, genügt also, um die Sauerstoffaufnahme des Plectenchyms total zu sistieren. 10^{-4} m NaN_3 ergibt nach dem Zukippen eine auf die Kontrolle bezogene Hemmung von Q_{O_2} um

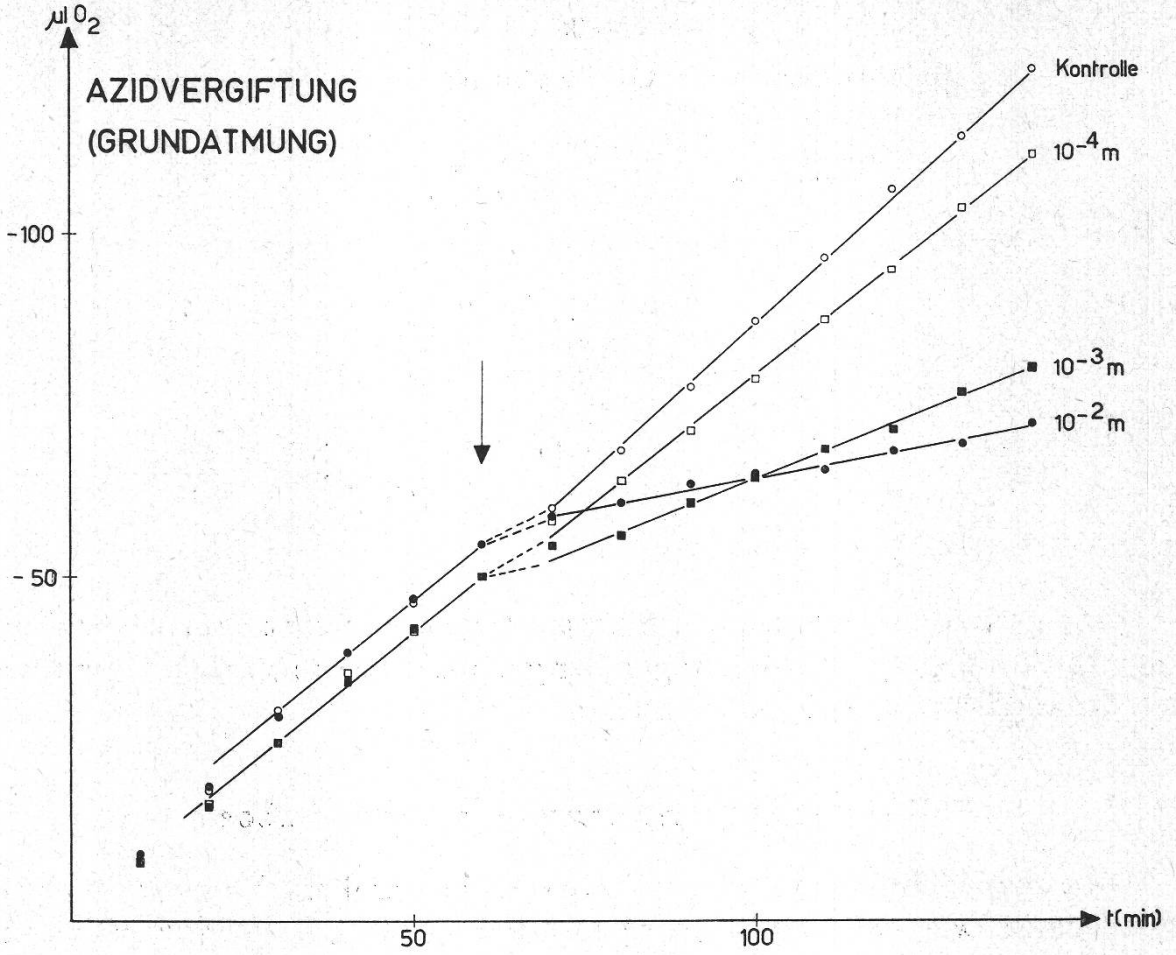
50 %, wobei selbst bei dieser geringen Konzentration die Sauerstoffaufnahme schon vor dem Zukippen durch aus dem Seitenraum diffundierendes HN_3 um 25 % vermindert ist. Da sich die Glucoseatmung durch Azid total hemmen läßt, wäre damit bereits gezeigt, daß die Terminaloxydase von *Agaricus campester* ein Schwermetall enthält und daß darüber hinaus bei Glucosefütterung keine alternativen Wege des Elektronentransportes der Atmungskette vorliegen.

Sind die bei pH 4,8 beobachteten Einflüsse von Na-Azid auf die Größe der Sauerstoffaufnahme richtig interpretiert worden, so könnte man bei pH 7,0, wo die effektiv wirksame HN_3-Konzentration nur noch $^1/_{100}$ der verwendeten NaN_3-Lösung beträgt, eine Konzentrationsabhängigkeit der Atmungshemmung erwarten. Auch sollte sich der Effekt der Beeinflussung der Atmung durch aus dem Seitenraum stammendes HN_3 schon vor dem Zukippen kaum mehr feststellen lassen. Die diese Ausführungen bestätigenden Versuchsergebnisse sind in den Figuren 16 und 17 für Grund- beziehungsweise Glucoseatmung dargestellt.



Figur 16

Azidvergiftung der Glucoseatmung
(Phosphatpuffer, pH 7,0)



Figur 17

Azidvergiftung der Grundatmung
(Phosphatpuffer, pH 7,0)

Noch besser zeigt sich die direkte Beziehung zwischen Azidkonzentration und der durch den Inhibitor hervorgerufenen partiellen oder totalen Inaktivierung der betroffenen Fermente, wenn man die Hemmung in Abhängigkeit von HN_3, der Partikel, welche wirklich in die Zellen einzudringen vermag, und nicht von der Konzentration des eingewogenen Na-Azides, in Puffer der gewünschten Azidität aufgelöst, betrachtet (vgl. Tab. 24).

Danach kommt die oft genannte pH-Abhängigkeit der Azidvergiftung von Geweben wohl lediglich dadurch zustande, daß einfach die Menge des verwendeten NaN_3 und nicht die effektiv wirksame HN_3-Konzentration berücksichtigt wurde.

Nachdem gemäß den Figuren 16 und 17 Grund- und Glucoseatmung in ihrem Verhalten gegenüber Azid übereinstimmen und bei Glucosefütterung kein HN_3-resistenter Anteil der die Sauerstoffaufnahme katalysierenden Fermente existiert, kann man zusammenfassend folgern, daß die Terminaloxydase(n) des Champignons schwermetallhaltig ist (sind) und deren Funktion keiner Flavoproteinoxydase vom *Arum* spadix-Typ (James, 1953c) zufällt.

Tabelle 24

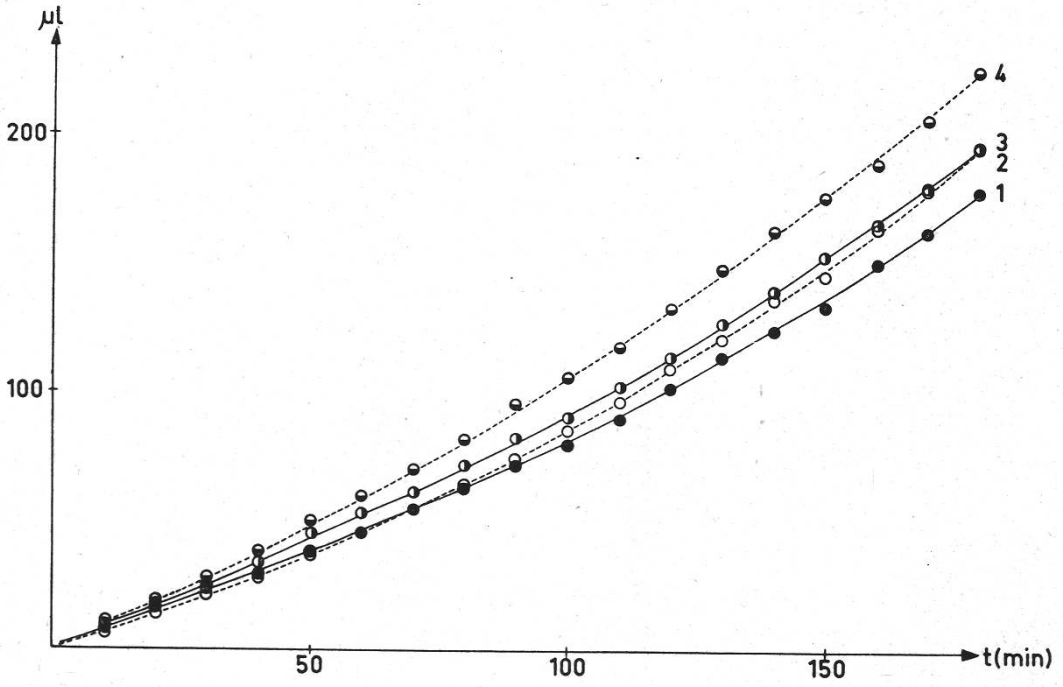
pH-Abhängigkeit der Azidvergiftung (Glucosefütterung)

pH	Konzentration des eingewogenen NaN_3 (m)	Konzentration von HN_3 (m)	Hemmung von Q_{O_2} %
7,0	10^{-4} m	$0{,}01 \cdot 10^{-4} = 10^{-6}$	15
7,0	10^{-3} m	$0{,}01 . 10^{-3} = 10^{-5}$	20
4,8	10^{-4} m	$0{,}45 \cdot 10^{-4} = 4{,}5 \cdot 10^{-5}$	50
7,0	10^{-2}	$0{,}01 \cdot 10^{-2} = 10^{-4}$	70
4,8	10^{-3}	$0{,}45 \cdot 10^{-3} = 4{,}5 \cdot 10^{-4}$	100
4,8	10^{-2}	$0{,}45 \cdot 10^{-2} = 4{,}5 \cdot 10^{-3}$	100

Eine prinzipiell mögliche atmungssteigernde Wirkung von Azid infolge Entkoppelung läßt sich wegen der gleichzeitig erfolgenden Hemmung der Terminaloxydase nicht feststellen.

b) Aufhebung der Pasteurreaktion durch Stilboestrol

Gibt man Schnitte in $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ «m» Stilboestrol im Standardmedium (Suspension, weil das Oestrogen sehr schwer löslich ist), so ergeben sich die in Figur 18 dargestellten Gaswechselkurven. In Tabelle 25 sind die Ver-



Figur 18

Zeitlicher Verlauf des Gaswechsels in Stilboestrol
1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe (endogenes Substrat)
3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe (Glucosefütterung)

Tabelle 25

Zeitliche Veränderungen der Gaswechselgrößen unter Einfluß von Stilboestrol

	Kein exogenes Substrat	Glucose-fütterung
Steigerung von Q_{O_2} (bezogen auf unvergiftete Grundatmung)		
1. Stunde	— 3 %	+11 %
2. Stunde	+20 %	+31 %
3. Stunde	+64 %	+76 %
Steigerung von Q_{CO_2} (bezogen auf unvergiftete Grundatmung)		
1. Stunde	+ 22 %	+ 56 %
2. Stunde	+ 72 %	+ 96 %
3. Stunde	+137 %	+153 %
RQ		
1. Stunde	0,99	1,11
2. Stunde	1,12	1,18
3. Stunde	1,14	1,13

suchsresultate auch zahlenmäßig zusammengefaßt, wobei es sich um Mittelwerte handelt, da die Parabelbogen zur Berechnung durch die entsprechenden Sekanten ersetzt wurden. Im vorliegenden Fall beziehen sich die prozentualen Steigerungen der Gaswechselgrößen auch bei Glucosefütterung auf die unvergiftete Grund- und nicht wie üblich auf die unbeeinflußte Glucoseatmung, da, wie unten erläutert, durch Stilboestrol (4,4′-Dioxy-α,β-Diäthylstilben) möglicherweise die Zuckeraufnahme aus dem Medium beeinträchtigt ist.

Glucosefütterung äußert sich im unvergifteten Plectenchym durch eine auf die endogene Atmung bezogene Erhöhung der Sauerstoffaufnahme um etwa 50 %. Unter der Wirkung von Stilboestrol ist jedoch der Unterschied zwischen der Größe von Grund- und Glucoseatmung, wie Figur 18 zeigt, sehr viel kleiner, was darauf beruhen kann, daß entweder unter den gegebenen Versuchsbedingungen auch bei ungehindertem Glucoseaustritt in die Zellen keine höhere Atmungsintensität möglich wäre oder daß das Oestrogen den Zuckertransport aus dem Medium in die Zellen hemmt, welch letzteres um so wahrscheinlicher ist, als der RQ in der dritten Stunde des Experimentes mit und ohne Glucosefütterung den gleichen Wert aufweist, die absoluten Größen von Q_{O_2} und Q_{CO_2} gegen Versuchsende unabhängig vom Vorhandensein exogenen Substrates immer mehr übereinstimmenden Werten zustreben und in einer später beschriebenen, zweiten Versuchsreihe mit Stilboestrol die Sauerstoffaufnahme bei Glucosefütterung sogar noch geringer als mit lediglich endogenem Substrat war. Dies stellt eine der durch Le Fevre (1959) gemachten Erkennt-

nis, wonach das betrachtete Oestrogen den Durchtritt von Monosacchariden durch die Oberfläche menschlicher Erythrocyten hemmt, analoge Erscheinung in bezug auf den Zuckertransport durch eine pflanzliche Membran dar, ist primär wohl eine Frage der Grenzflächenstruktur (Permeabilität) und eventuell sekundär auch durch vergiftete Atmung bedingt.

Da die durch Stilboestrol verursachte Zunahme von Q_{O_2} in der dritten Versuchsstunde zirka 70 % beträgt, wobei das Medium am Ende des Experimentes ganz schwach rosa gefärbt ist, könnte man Oxydation des Oestrogens durch die Phenoloxydasen des Pilzes vermuten. Monophenole werden im allgemeinen erst nach einer gewissen Induktionsperiode angegriffen (Leuthardt, 1959), weshalb man versuchte, diese durch katalytische Mengen von Brenzkatechin, dessen Oxydationsprodukte in so geringer Konzentration das Suspensionsmedium nicht färben, zu verkürzen. Dazu diente folgender Versuch:

Je 5 g Plectenchym (geschnitten) in verschiedene Suspensionsmedia (20 ml, pH 4,8) gegeben:

1. KH_2PO_4/Na_2HPO_4
2. $KH_2PO_4/Na_2HPO_4 + 10^{-5}$ m Brenzkatechin
3. KH_2PO_4/Na_2HPO_4 $+1{,}8 \cdot 10^{-3}$«m» Stilboestrol
4. $KH_2PO_4/Na_2HPO_4 + 10^{-5}$ m Brenzkatechin $+1{,}8 \cdot 10^{-3}$«m» Stilboestrol

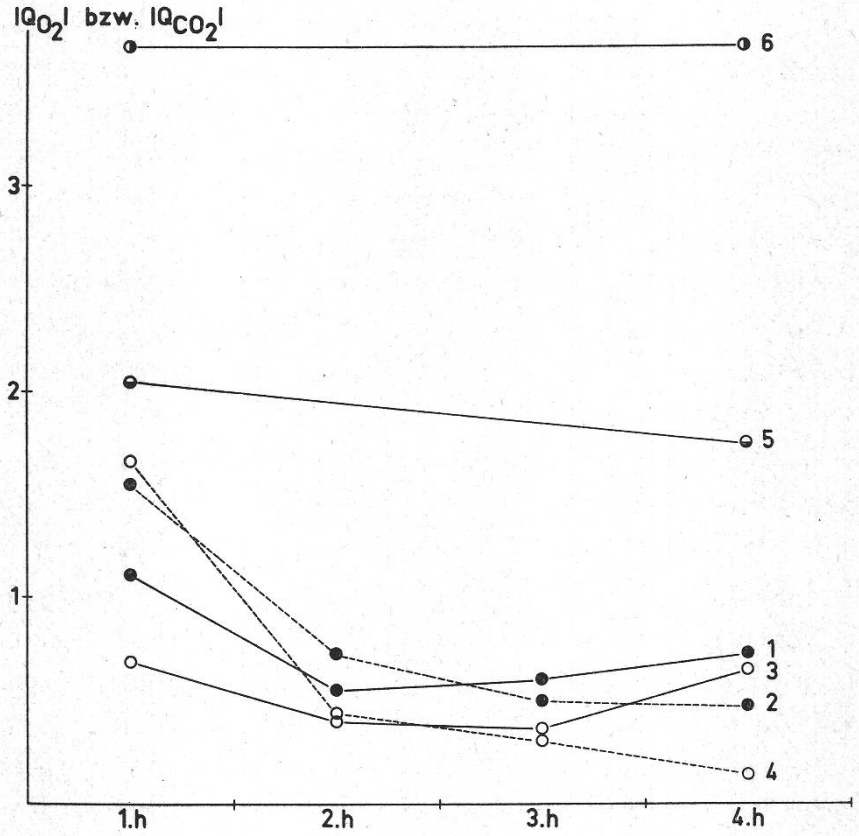
Resultat: Nach 4 Stunden war im ersten und zweiten Fall keine Färbung erkennbar, das dritte Medium zeigte schwache und das vierte starke Rosafärbung. Demnach wird Stilboestrol, wie die manometrischen Messungen vermuten ließen, durch Phenoloxydasen des Pilzes oxydiert.

Daneben dürfte das Oestrogen primär aber eine andere Wirkung hervorrufen als lediglich seine Oxydation durch die Tyrosinase; denn durch Stilboestrol wird die CO_2-Abgabe viel stärker gesteigert als die O_2-Aufnahme, so daß wir den Zustand der aeroben Gärung und somit eine Aufhebung des Pasteureffektes erhalten, was auf eine Vergiftung der Atmung durch das Oestrogen hinweist (siehe unten).

Nichtfunktionieren der Pasteurreaktion und damit verbundenes Auftreten aerober Gärung setzt aber umgekehrt die Anwesenheit vergärbaren Substrates voraus, was wieder einmal mehr dafür spricht, daß der Champignon bei der Atmung Kohlehydrate metabolisiert.

Besonders deutlich zeigt sich die zweifache Wirkung von Stilboestrol auf den Gaswechsel von *Agaricus campester*, wenn man die anfängliche Konzentration des Oestrogens erhöht, was in der zweiten mit diesem Stilbenderivat durchgeführten Versuchsreihe dadurch geschah, daß die Suspension von Stilboestrol in Phosphatpuffer, welche 0,536 g des Oestrogens in 100 ml enthielt, zuerst auf 50° erwärmt (ungelöstes Stilboestrol schwimmt an der Oberfläche der Flüssigkeit und scheint kaum benetzt zu sein, während einmal gelöstes und dann wieder ausgefallenes Oestrogen sich teilweise am Boden des Gefäßes befindet und sich so nach Aufrühren

leichter mit der Pipette aufziehen läßt), dann auf 30° abgekühlt und so pipettiert wurde, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Experimenten, wo die bei 15° hergestellte Suspension direkt in die Reaktionsgefäße gelangte und erst im Laufe der Äquilibrierungszeit 30° erreichte. Die anfängliche Konzentration gelösten Oestrogens ist nun größer, weshalb man zum mindesten eine teilweise Differentiation der Wirkung von Stilboestrol auf Atmungsvorgänge, welche sofort nach dessen Eindringen in die Zelle beeinflußt sein können, und der Oxydation dieses Phenols durch die Tyrosinase, die ja erst nach einer Induktionszeit, welche wohl nicht im gleichen Maße von der Konzentration des Stilboestrols abhängig ist (Dawson and Tarpley, 1951) wie die durch diesen Stoff hervorgerufenen Inaktivierungen von respiratorischen Fermenten, zu erreichen vermag.



Figur 19

Gaswechselgrößen in gesättigter Stilboestrollösung

1, 2: Q_{O_2} beziehungsweise Q_{CO_2} mit endogenem Substrat
3, 4: Q_{O_2} beziehungsweise Q_{CO_2} bei Glucosefütterung
5: Q_{O_2} der endogenen Atmung ohne Stilboestrol (Kontrolle)
6: Q_{O_2} der Glucoseatmung ohne Stilboestrol (Kontrolle)

Diese Überlegungen werden durch die in Figur 19 aufgezeichneten Gaswechselgrößen solchermaßen behandelter Schnitte bestätigt. Danach erkennt man sehr gut, daß es sich hier um eine Superposition zweier den Gaswechsel beeinflussender Vorgänge, nämlich des durch das Oestrogen

bewirkten Effektes auf die Atmung und der Oxydation des Stilboestrols durch den Phenolasekomplex des Pilzes, handelt. Da dieses als Monophenol durch die Phenoloxydase nicht so rasch angegriffen wird, zeigt die Größe von Q_{O_2} während der Induktionsphase vorwiegend die atmungshemmende Wirkung des Stilboestrols und später mehr die durch dessen Oxydation hervorgerufene Sauerstoffaufnahme. Ganz schwache Rosafärbung des Mediums trat schon in der zweiten Versuchsstunde auf, weshalb die mögliche Wirkungsweise des Oestrogens auf respiratorische Vorgänge hauptsächlich während der ersten 60 Minuten zu betrachten ist. Die Sauerstoffaufnahme in Gegenwart von Stilboestrol darf vor allem nach der Induktionsphase nicht mehr als Maß der Atmungsgrößen gelten. Als Ersatz dafür soll der Q_{CO_2}-Wert gewählt werden, welcher aber die Summe von Atmungs- und Gärungsintensität darstellt.

Bei Vorhandensein nur endogenen Substrates fällt Q_{CO_2} während der vier Versuchsstunden von 1,55 auf 0,47 ab, wobei die auf die aerobe Gärung entfallende CO_2-Abgabe in den ersten 60 Minuten des Versuches 0,44 beträgt (unter Annahme von RQ = 1). Es scheint also, als ob Stilboestrol nur die aerobe Atmung, nicht aber die Vergärung endogenen Substrates hemmte. Das Sinken des RQ bei längerer Versuchsdauer ist auf die nach etwa einer Stunde beginnende Oxydation des Stilboestrols zurückzuführen, und die Atmung selbst wird wohl zunehmend inaktiviert, so daß die CO_2-Abgabe am Ende des Versuches wahrscheinlich nur noch Gärungskohlendioxyd darstellt.

In ähnlicher Weise wie bei endogener Atmung ändern sich auch die Gaswechselgrößen bei Glucosefütterung, und in beiden Fällen ist Austritt zelleigener Substanzen (zirka 30 % des Trockengewichtes) zu beobachten.

Schließlich stellt sich noch die Frage nach dem Angriffspunkt des Stilboestrols im Atmungsschema. Da das Oestrogen aerobe Gärung bewirkt, die Pasteurreaktion also nicht mehr funktioniert, scheint es naheliegend, anzunehmen, daß entweder die oxydative Phosporylierung entkoppelt oder die Terminaloxydase betroffen ist. Weil jedoch Q_{O_2} und Q_{CO_2} durch kleine und mittlere Konzentration von DNP in bezug auf unvergiftete Schnitte deutliche Steigerungen erfahren, nach Stilboestrolbehandlung aber beide Atmungsgrößen geringer sind als diejenigen der Kontrolle, ist eine Beeinträchtigung der Terminaloxydase wahrscheinlicher.

McShan und Meyer (1946) zeigten, daß $2 \cdot 10^{-4}$ m Stilboestrol den Succinodehydrogenase-Komplex von Lebergewebe total hemmte, wobei vor allem die Funktion der Cytochromoxydase des Systems und nicht die Succinodehydrogenase betroffen war. Case und Dickens (1948) bestätigten diese Ergebnisse, ermittelten aber eine etwas stärkere Hemmung auch der Succinodehydrogenase selbst.

Da Stilboestrol bei sehr starker Atmungshemmung den Pasteureffekt aufhebt, was in den beiden Arbeiten, die Versuche mit Homogenaten be-

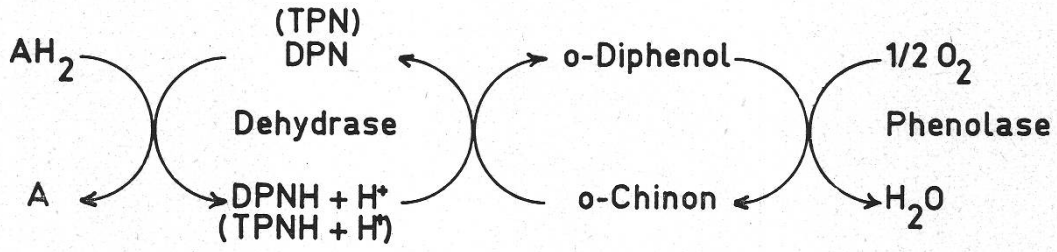
schreiben, nicht erwähnt wird, darf man wohl eine dem Succinodehydrogenase-Komplex der tierischen Zellen zum mindesten ähnliche Enzymgruppe auch bei *Agaricus campester* annehmen.

Sowohl McShan und Meyer als auch Case und Dickens vertreten die Meinung, daß die phenolischen Gruppen des Stilboestrols mit den hemmenden Wirkungen dieses Oestrogens in Beziehung stehen. Träfe dies zu, so müßte in einem Gewebe, welches Phenoloxydase enthält, der Einfluß des Stilboestrols auf die Gaswechselgrößen der Atmung schwächer werden, sobald dieses oxydiert ist, falls sich die Hemmung als reversibel erweist.

Die hier durchgeführten Versuche sind zur Prüfung dieser Zusammenhänge nicht geeignet, da das Plectenchym durch die gesättigte Stilboestrollösung starke Schädigung erfuhr («Exosmose» zelleigener Substanzen) und am Ende des Experimentes wohl ein Gaswechsel sich in Nekrose befindender Zellen vorliegt. Man müßte mit ganz geringen Konzentrationen arbeiten, nicht wie hier mit einer Suspension des Oestrogens, wo durch Oxydation aus dem Lösungsgleichgewicht verschwindendes Stilboestrol stets durch neues ersetzt wird, und so die Theorie zu beweisen versuchen.

c) Versuche mit Brenzkatechin und DOPA

Nachdem die Ergebnisse der in Kapitel 8a beschriebenen Versuche zeigten, daß die Terminaloxydase(n) von *Agaricus campester* schwermetallhaltig ist (sind), interessierte es, inwiefern der Phenolasekomplex, definiert als die beiden zusammen vorkommenden Enzymaktivitäten, welche Cu-Proteiden beigeordnet und verantwortlich sind sowohl für die *o*-Hydroxylierung von Phenolen als auch für die Dehydrierung von *o*-Diphenolen (Mason, 1955), hiefür in Frage kommt, wie man dies unter anderem für Kartoffeln (Kubowitz, 1937a), Süßkartoffeln (Walter and Nelson, 1945) und Teeblätter (Sreerangachar, 1943) annahm. In keinem Fall wurde jedoch die Phenoloxydase auf wirklich schlüssige Weise als Terminaloxydase der normalen Atmung identifiziert (James, 1953b). Die Möglichkeit einer solchen respiratorischen Funktion des Phenolasenkomplexes stützt sich vor allem auf in vitro durchführbare Reaktionsreihen folgender Art (nach James [1953c] und Mason [1955] zusammengestellt):



AH_2 bedeutet ein durch die Dehydrogenase oxydierbares Substrat (z.B. Glucose-6-phosphat [Kubowitz, 1937a], Äthylalkohol [Kubowitz, 1937b]). Das Chinon kann dabei sowohl auf nichtenzymatischem Wege als auch in bestimmten Fällen durch spezielle Chinonreductasen (Mason, 1955) in das entsprechende *o*-Diphenol übergeführt werden. Solche Versuche vermögen aber nur prinzipiell die Möglichkeit, daß Phenol und Phenoloxydase zusammen eine Terminaloxydase der Atmung darstellen, aufzuzeigen, sagen aber nichts darüber aus, ob dies in vivo wirklich geschieht.

Hätte ein chinonproduzierendes Ferment diese respiratorische Funktion, so müßten vor allem folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Isolierung eines solchen Enzyms aus dem betrachteten Gewebe und Untersuchung der Spezifität dieses Fermentes;

2. Erhöhung der Atmungsrate nach Zugabe passender Substrate unter geeigneten Bedingungen;

3. Atmungshemmung nach Anwendung spezifischer Inhibitoren der Phenolase.

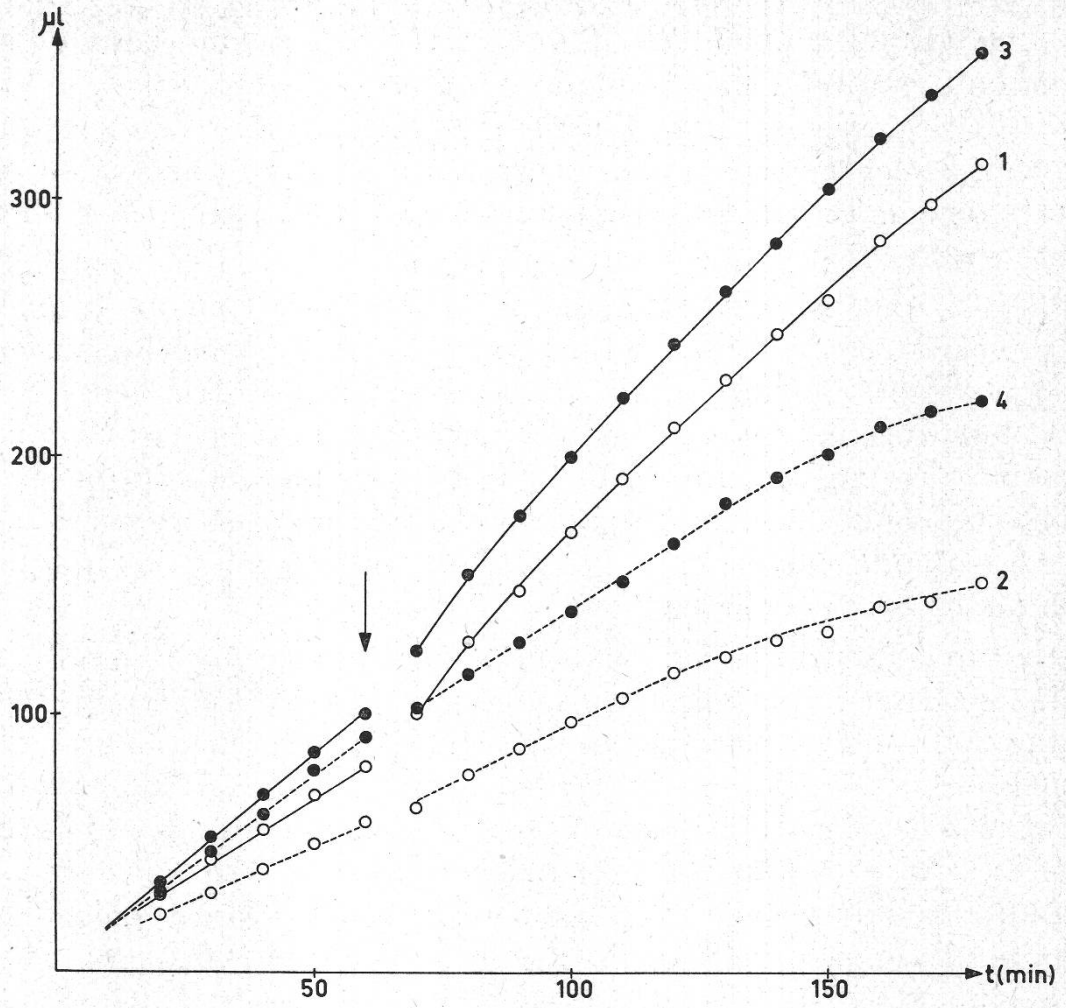
Keilin und Mann (1938) sowie Mallette et al. (1948) isolierten Tyrosinase (Polyphenoloxydase) von *Agaricus campester* und untersuchten deren Spezifität, wobei als Substrate unter anderem Catechol und 3,4-Dihydroxyphenylalanin sich als geeignet erwiesen. Wosileit, Nason und Terrell (1954) konnten im Champignon auch eine Chinonreductase nachweisen.

Versuche über die Wirkung von Brenzkatechin und DOPA, von welchen allerdings keineswegs gesagt ist, daß sie im Plectenchym die natürlichen Substrate der Phenolase darstellen, auf die Atmungsgröße sind

Tabelle 26

Veränderung der Gaswechselgrößen unter Einfluß von 10^{-2} m Catechol

	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	RQ	% Steigerung von Q_{O_2}	% Steigerung von Q_{CO_2}
Grundatmung					
30.– 60. Min.	3,38	2,54	0,75	—	—
70.–110. Min.	6,41	2,74	0,43	+94	+ 8
110.–160. Min.	5,23	2,02	0,39	+58	—20
160.–180. Min.	4,64	1,06	0,23	+37	—58
Glucoseatmung					
30.– 60. Min.	4,69	4,23	0,90	—	—
70.–110. Min.	6,83	3,59	0,53	+46	—15
110.–160. Min.	5,73	3,20	0,56	+22	—24
160.–180. Min.	4,72	1,55	0,33	+ 1	—63



Figur 20

Zeitlicher Verlauf des Gaswechsels vor und nach Zugabe von 10^{-2} m Brenzkatechin
1, 2: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe mit endogenem Substrat
3, 4: O_2-Aufnahme beziehungsweise CO_2-Abgabe mit Glucose als Substrat

im folgenden beschrieben, und Experimente mit Hemmstoffen des Phenolasekomplexes werden in Kapitel 8d und 8e besprochen.

Behandelt man Plectenchym mit Catechol, so ergeben sich die in Figur 20 dargestellten Gaswechselveränderungen; Tabelle 26 zeigt die entsprechenden Q_{O_2}-, Q_{CO_2}- und RQ-Werte (gekrümmte Kurvenabschnitte zur Berechnung durch die dazugehörigen Sekanten ersetzt). Das Suspensionsmedium färbt sich durch Chinone oder Pigmente mit Chinongruppierung sehr rasch intensiv gelb und ist am Ende des Experimentes dunkelbraun.

Eine eventuelle Atmungssteigerung nach Fütterung von Brenzkatechin am erhöhten O_2-Verbrauch dadurch feststellen zu wollen, daß man die zur bloßen Oxydation des zugekippten Diphenols notwendige O_2-Menge von der totalen nach Zugabe des Catechols zusätzlich auftretenden Sauerstoffaufnahme subtrahiert, ist deswegen nicht durchführbar, weil

dessen Oxydation nicht beim *o*-Chinon stehen bleibt und bei vollständigem Ablauf pro Mol 2–3 Grammatome Sauerstoff benötigt (Wright and Mason, 1946). Da so Q_{O_2} nach Zugabe von Catechol wegen der gleichzeitig erfolgenden, nichtrespiratorischen Oxydationsvorgänge nicht mehr repräsentativ für die Atmungsintensität sein kann, soll Q_{CO_2} als deren Maß betrachtet werden.

Die CO_2-Abgabe nach Behandlung des Plectenchyms mit Brenzkatechin ist bei Glucosefütterung in allen betrachteten Versuchsintervallen wie immer etwa 50% höher als mit nur endogenem Substrat. Die Aussage dieses Versuchsergebnisses lautet demnach: Catechol hemmt die Zuckeraufnahme aus dem Medium nicht, und die für unbeeinflußte Zellen festgestellte Größe des Geschwindigkeitsverhältnisses, nach welchem der totale Abbau endogenen und exogenen Substrates erfolgt, verändert sich durch diesen Stoff auch nicht.

Die durch Brenzkatechin hervorgerufenen Steigerungen von Q_{CO_2} sind bei längerer Dauer des Experimentes negativ und für Grund- und Glucoseatmung durchaus vergleichbar, weil die Hemmung im dritten und vierten Versuchsintervall zirka 20% beziehungsweise 60% beträgt, was dafür spricht, daß bei Metabolisierung exogener Glucose einerseits und des endogenen Substrates andererseits durch das Diphenol oder ein daraus entstehendes Produkt gleiche Vorgänge betroffen sind. Sollte es sich dabei um solche respiratorischer Art handeln, ergäbe sich somit umgekehrt folgender Schluß: Es existieren für Grund- und Glucoseatmung identische Reaktionsreihen.

Da bei Glucosefütterung nicht nur die prozentualen, sondern auch die absoluten Zunahmen von Q_{O_2} nach Zukippen von Brenzkatechin geringer sind als bei endogener Atmung, erfolgt offenbar die Oxydation des Diphenols langsamer, wenn die Atmungsintensität hoch ist. Vielleicht werden hier auch die Löslichkeit des Sauerstoffes im Medium und dessen Diffusionsgeschwindigkeit vom Wasser in die Zellen ein begrenzender Faktor des Q_{O_2}-Wertes, so daß bei Grundatmung mehr Sauerstoff zur Oxydation des Brenzkatechins zur Verfügung steht als bei einem durch Glucosefütterung vorhandenen erhöhten O_2-Bedarf der Atmung an sich.

Hemmung der CO_2-Abgabe nach Catecholfütterung und Sinken des RQ weit unter 1 sprechen für eine bloße Superposition von Oxydation des Diphenols und Atmung, während bei Efeublättern die großen Steigerungen der Sauerstoffaufnahme nach Zugabe von Brenzkatechin von ebensolchen Zunahmen der CO_2-Abgabe begleitet sind, so daß der respiratorische Quotient den Wert 1 beibehält (Lerner, 1954). Im Gegensatz zu den dort aus den experimentellen Ergebnissen gezogenen Schlüssen scheint bei *Agaricus campester* nach Brenzkatechinfütterung aus dem primär entstehenden Chinon und der Phenoloxydase keine dem oben angegebenen Schema entsprechende Terminaloxydase aufgebaut zu werden.

Nachdem Catechol beim Champignon sogar eine hemmende Wirkung auf die Atmung hervorruft, was man in stärkerem Maße auch für Kartoffelgewebe feststellte, wo Brenzkatechin durch Beeinflussung verschiedener Prozesse, von deren normaler Funktion die Lebensfähigkeit selbst abhängt (Schade, Bergmann and Byer, 1948), als allgemeines Zellgift wirkt, erfolgte eine Wiederholung des Versuches mit einem andern Diphenol, DOPA, welcher die in Tabelle 27 angegebenen Resultate zeitigte.

Tabelle 27

Steigerungen der Gaswechselgrößen nach Fütterung von 10^{-2} m DOPA

	Zunahme von	
	Q_{O_2} %	Q_{CO_2} %
Endogene Atmung	+236	+214
Glucoseatmung	+127	+ 93

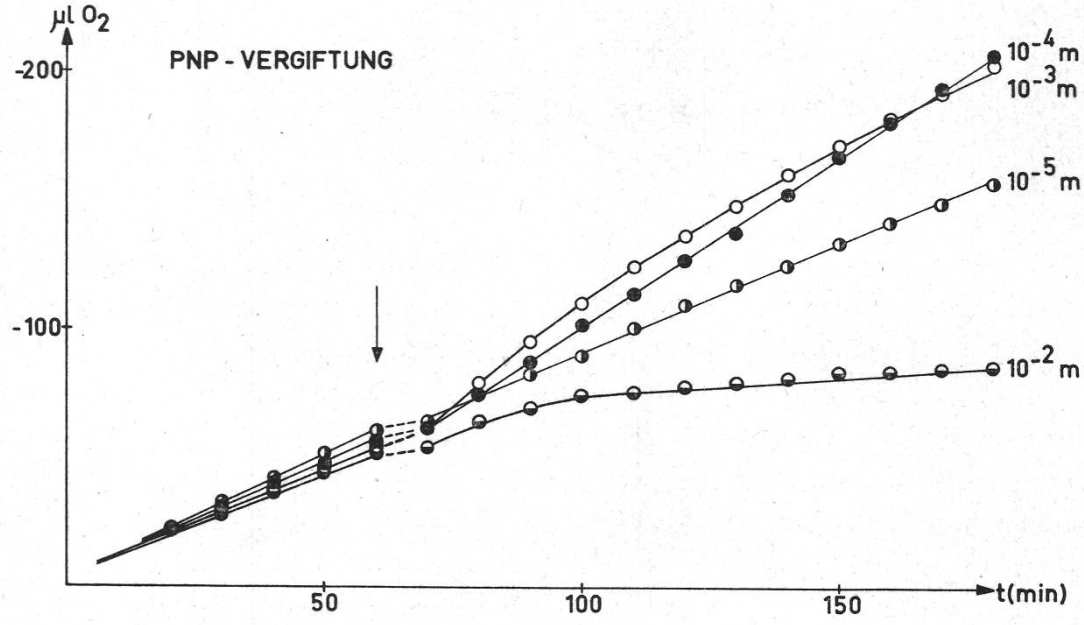
Das Suspensionsmedium färbt sich nach Zugabe des Diphenols zuerst rot, später intensiv braunrot; 3,4-Dihydroxyphenylalanin vermag sowohl die Grund- als auch die Glucoseatmung stark zu steigern. Die Kurven der Sauerstoffaufnahme sind im Gegensatz zu denjenigen der CO_2-Abgabe während rund einer Stunde nach Fütterung von DOPA nicht linear, sondern schwach konkav gekrümmt, und gehen erst dann in eine Gerade über; die Zahlenangaben der Tabelle beziehen sich auf diesen letzten Teil der Kurven.

Da ein Substrat der Phenoloxydase die Atmungsintensität sehr stark zu steigern vermag, ist es möglich, daß hier Phenolase mit DOPA zusammen eine Terminaloxydase der Atmung bildet und so ein Transport von aus Intermediärprodukten des Kohlehydratstoffwechsels stammendem Wasserstoff über eine solche, oben schematisch dargestellte «Atmungskette», von der nicht bekannt ist, inwiefern sie überhaupt mit oxydativer Phosphorylierung verknüpft sein könnte, erfolgt.

Diese Versuchsresultate sagen aber nur prinzipiell etwas über die Möglichkeit, ob Phenolase mit einem passenden Substrat zusammen Terminaloxydase der Atmung zu sein vermag, aus, beweisen aber nicht, daß dies vor der Fütterung des Diphenols auch zugetroffen hat, weil exogenes Dihydroxyphenylalanin die respiratorische Funktion der Phenoloxydase, welche normalerweise an der Atmung nicht notwendigerweise teilzunehmen braucht, induzieren könnte (Lerner, 1954), die in den Zellen vorkommenden *o*-Diphenole sich aber für dieses Enzym im allgemeinen als unzugänglich erweisen, wenn nicht eine Verwundung stattgefunden hat, und in andern Zellbestandteilen als der Phenolasekomplex lokalisiert sind (Mason, 1955).

d) Wirkung von *p*-Nitrophenol

Bonner und Wildman (1946) zeigten, daß 10^{-3} m *p*-Nitrophenol, welches keinen Effekt auf Cytochrome erkennen läßt (Dawson and Tarpley, 1951) und insbesondere den Succinodehydrasekomplex auch in sehr starker Konzentration kaum hemmt (Ames, Ziegenhagen and Elvehjem, 1946), die Polyphenoloxydase von Spinatblättern um mindestens 90 % inaktiviert und sich als kompetitiver Hemmstoff dieses Fermentes erweist. Funktioniert Phenolase als Terminaloxydase der Atmung, so sollte deren partielle oder totale Hemmung entsprechende Erniedrigungen des Sauerstoffkonsums des Plectenchyms bewirken.



Figur 21

Einfluß von *p*-Nitrophenol (PNP) auf die Größe der Sauerstoffaufnahme (kein exogenes Substrat)

In Figur 21 sind die durch verschiedene PNP-Konzentrationen hervorgerufenen Veränderungen der Atmungsgröße (kein exogenes Substrat) dargestellt: 10^{-5} m PNP ist auf den Sauerstoffverbrauch wirkungslos, 10^{-4} m *p*-Nitrophenol steigert Q_{O_2} bei linearem Kurvenverlauf um 50 %, und in der 10^{-3} m Inhibitorlösung wird die Atmung anfänglich um zirka 80 %, während der dritten Versuchsstunde noch um rund 30 % gesteigert. 10^{-2} m PNP schließlich führt bald zu einem fast vollständigen Aufhören des Sauerstoffkonsums und zu einem in großem Ausmaß erfolgenden Austritt zelleigener Substanzen ins Suspensionsmedium, so daß wahrscheinlich Nekrose vorliegt.

Das mit der stärksten verwendeten PNP-Konzentration erhaltene Versuchsresultat ist für die Interpretation in bezug auf mögliche Atmungs-

mechanismen unbrauchbar, da solch große Mengen eines Nitroderivates von Phenol zur Denaturierung von Proteinen führen (Simon, 1953).

Als aufschlußreich erweisen sich dagegen die ziemlich großen Steigerungen der Sauerstoffaufnahme durch 10^{-4} m und 10^{-3} m PNP, was, wie in Kapitel 6c gezeigt, auf Entkoppelung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung zurückgeführt werden kann. Da nun trotz totaler oder teilweiser Blockierung der Phenolase die Terminaloxydase der Atmung einen noch um etwa 50% erhöhten Sauerstoffbedarf zu vermitteln vermag, ist unwahrscheinlich, daß es sich dabei um die Phenoloxydase handelt.

e) Versuche mit Diäthyldithiocarbamat

Das Prinzip dieser Experimente besteht darin, die Polyphenoloxydase durch einen Hemmstoff, der mehr oder weniger spezifisch wirkt und so andere Fermente, besonders Cytochromoxydase, unbeeinflußt läßt, zu vergiften und den Sauerstoffkonsum solchermaßen behandelten Plectenchyms mit demjenigen unbeeinflußter Kontrollen zu vergleichen, was eine Entscheidung darüber erlaubt, ob der Phenolasekomplex am sauerstoffübertragenden System der Atmung normalerweise beteiligt ist.

Diesen Anforderungen entspricht Diäthyldithiocarbamat (DIECA), das Polyphenoloxydase durch Bildung eines Chelatokomplexes mit dem Kupfer des Fermentes zu inaktivieren vermag, Cytochromoxydase in bestimmten Konzentrationen jedoch nicht (Ducet et Rosenberg, 1951) oder kaum (James and Garton, 1952) hemmt, so daß Unterscheidung des durch Kupferenzyme einerseits und das Warburgsche Atmungsferment andererseits vermittelten Anteils der Gesamtsauerstoffaufnahme der Zellen in situ erfolgen kann (James, 1953a).

Anwendung von DIECA als Inhibitor bei manometrischen Messungen erfordert besondere Beachtung einiger Eigenschaften dieser Verbindung (James and Garton, 1952), die in schwach saurer Lösung nach der Gleichung $(C_2H_5)_2$ NCSSH $\rightarrow$ $(C_2H_5)_2NH+COS+H_2S$ zerfällt, wobei dieser Vorgang bei 30°, der Temperatur, bei welcher die meisten Warburgversuche durchgeführt werden, sehr rasch erfolgt und in biologischem Bereich nur bei pH 7,0 und 20 °C fast zu vernachlässigen ist, beides Bedingungen, die das Eindringen dieses Hemmstoffes in Gewebe aus Gründen der Permeabilität erschweren. Während die Anwesenheit eines sekundären Amins die Manometerablesungen nicht beeinflußt und Schwefelwasserstoff, das selbst einen unspezifischen Hemmstoff der Atmung darstellt, durch die Kalilauge im Zentralgefäß absorbiert wird, gibt die Bildung von COS beim Zerfall des Diäthyldithiocarbamates Anlaß zu einem stark positiven Druck, so daß scheinbar eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme erfolgt.

DIECA wird daher nicht während des Atmungsversuches zugegeben, sondern die Vergiftung erfolgt stets vor Beginn der Messungen, ein Vorgehen, welches Irreversibilität der durch den Inhibitor an Fermenten bewirkten Veränderungen voraussetzt, was nach James und Garton (1952) zutrifft. Daß Tenenbaum und Jensen (1943) nach 10 Minuten 93% Reaktivierung der Tyrosinase von *Agaricus campester* feststellen konnten, wenn dem Enzympräparat unmittelbar nach DIECA auch Cu-Salz hinzugefügt wurde, ist für die vorliegenden Experimente nicht von Bedeutung, da man stets nur den Inhibitor allein verwendete und diese Autoren auch darauf hinweisen, daß dessen längerer Kontakt mit Catecholase in Abwesenheit von Kupferionen irreversible Hemmung des Fermentes bewirkt.

Bei den hier zu beschreibenden Versuchen wurde diese nach Abschluß der Meßreihe oft durch den «optischen Test» (Zugabe von Brenzkatechin in den die Schnitte enthaltenden Hauptraum) oder auch manometrisch nachgewiesen.

Entsprechend Vorschlägen von James und Garton (1952) gelangten folgende drei Methoden der Applikation von Na-Diäthyldithiocarbamat zur Anwendung:

A: Infiltration der Schnitte mit dem in Phosphatpuffer (pH 5,0) gelösten Hemmstoff bei Zimmertemperatur während 10 Minuten und bei etwa $^1/_{40}$ atm. Übertragen des Plectenchyms in die Reaktionsgefäße, welche kein DIECA enthalten. Messung des Sauerstoffkonsums bei pH 5,0 und T = 30 °C.

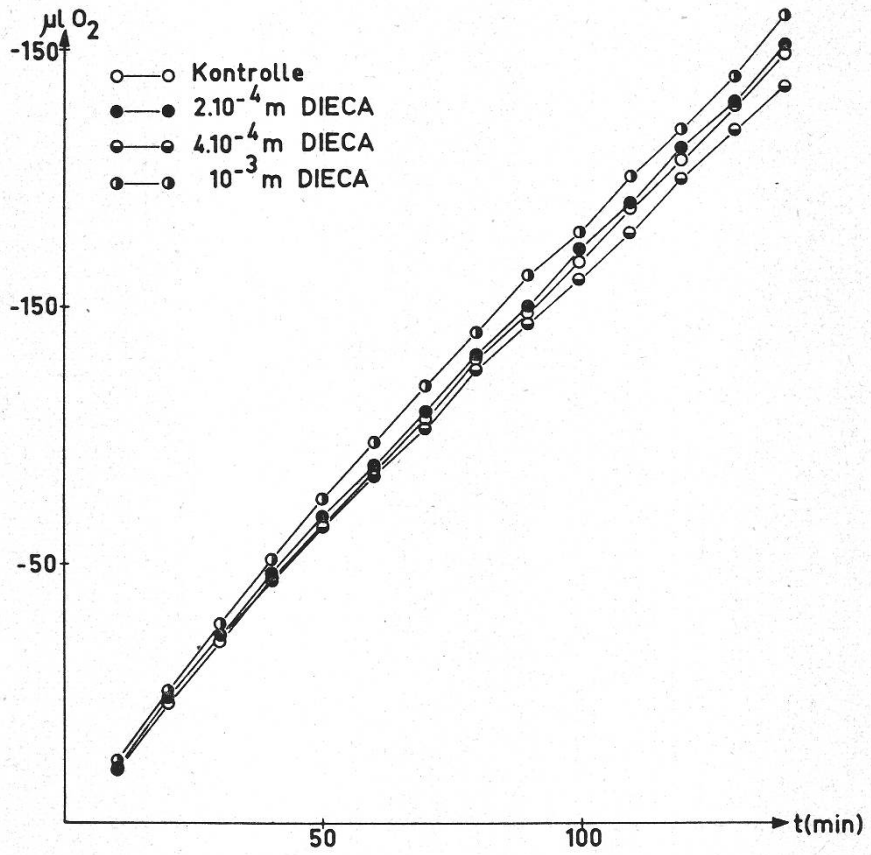
B: DIECA im Hauptraum, der die in Phosphatpuffer von pH 7,0 suspendierten Schnitte enthält (T = 20 °C). Schüttelnlassen der Warburggefäße in der Thermostatenwanne während einer Stunde bei offenem Hahnen, so daß COS entfernt wird.

C: Suspension der Schnitte bei Zimmertemperatur unter Durchlüftung in Diäthyldithiocarbamat, mit Phosphatpuffer (pH 5,0) als Lösungsmittel. Wiederholung des Verfahrens in Intervallen von 15 Minuten. Viermal frische DIECA-Lösungen verwendet. Plectenchym in die Reaktionsgefäße mit Phosphatpuffer von pH 7,0 übertragen. T = 30 °C.

Im folgenden werden die Resultate von 6 Reihen von Experimenten, verschiedenen Methoden der Anwendung des Hemmstoffes und Grund- und Glucoseatmung entsprechend, mitgeteilt und kommentiert. In allen Fällen ergibt sich nach Kontakt des Plectenchyms mit DIECA-Lösungen eine der Konzentration des Komplexbildners proportionale Gelblichfärbung der Schnitte, während jeweils in analoger Weise mit Phosphatpuffer behandeltes Pilzgewebe weiß bleibt.

1. Bei Versuchsanordnung A und Glucosefütterung erhält man die in Figur 22 angegebenen O_2-Kurven, welche zeigen, daß Hemmung der

Cu-Enzyme des Hutplectenchyms den Sauerstoffverbrauch nicht vermindert.



Figur 22

Sauerstoffaufnahme des Plectenchyms nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von DIECA (Glucosefütterung)

Tabelle 28

O_2-Aufnahme des Plectenchyms nach Hemmung des Phenolasekomplexes durch DIECA

(μl O_2/20 Schnitte.120 Min.: pH 7,0; Glucosefütterung; T = 20 °C)

Konzentration des Inhibitors	1. Gefäß	2. Gefäß	3. Gefäß	M
0.....	119,5	111,1	118,3	116,3
$2 \cdot 10^{-4}$ m.....	110,2	110,9	104,2	108,4
$4 \cdot 10^{-4}$ m.....	118,9	109,0	116,9	114,9
10^{-3} m.....	114,2	117,8	109,7	113,9

2. Ein Experiment nach Methode B ergab bei linearem Kurvenverlauf die in Tabelle 28 angegebenen Größen der Sauerstoffaufnahme, wonach sich wiederum keine Erniedrigung der Atmungsintensität nach Inaktivierung der Phenolase feststellen ließ. Um sicher zu sein, daß dieses Enzym unter den gegebenen Bedingungen auch wirklich blockiert war und

ein Fehlen der Hemmung nicht etwa auf Diffusionsschwierigkeiten des Diäthyldithiocarbamates beruhte, wurde bei den Gefäßen, welche mit 10^{-3} m DIECA behandeltes Plectenchym enthielten, der «optische Test» angewendet. Während sich bei der Kontrolle nach Zugabe von 0,2 ml einer 10^{-1} molaren Brenzkatechinlösung, was einer Endkonzentration im Hauptraum von $6 \cdot 10^{-3}$ m entspricht, nach zirka einer Minute starke Gelb- und später Braunfärbung einstellte, blieb eine solche bei den dem Hemmstoff ausgesetzt gewesenen Schnitten auch nach einer Stunde völlig aus. Somit ist anzunehmen, daß DIECA wirklich in die Zellen gelangte und dort die Funktionsfähigkeit des Phenolasekomplexes unterdrückte.

3. Entsprechend Methode C mit verschiedenen Konzentrationen von DIECA behandelte und mit Glucose gefütterte Schnitte ergaben bei in allen Fällen linearem Kurvenverlauf folgende Größen der Sauerstoffaufnahme (μl O_2/20 Schnitte.120 Min.): Kontrolle: 161 μl, $2 \cdot 10^{-4}$ m: 162μl, $4 \cdot 10^{-4}$ m: 174 μl, 10^{-3} m: 175 μl. Der «optische Test» verlief in allen Gefäßen mit Ausnahme der Kontrollen vollständig negativ.

James und Garton (1952) zeigten, daß die Polyphenoloxydase des Kulturchampignons durch $2 \cdot 10^{-4}$ m Diäthyldithiocarbamat um mindestens 85%, durch die $4 \cdot 10^{-4}$ molare Lösung um mehr als 90% und durch 10^{-3} m DIECA total gehemmt wird und daß Ascorbinsäureoxydase auf diesen Inhibitor noch empfindlicher reagiert.

Da man nach Behandlung der Schnitte mit diesem Komplexbildner selbst in Konzentrationen, welche totale Inaktivierung von Phenol- und Ascorbinsäureoxydasenextrakten bewirken, keine Verminderung des Sauerstoffkonsums feststellen kann, muß man annehmen, daß diese beiden Fermente nicht Terminaloxydasen der normalen Glucoseatmung sind. Außerdem scheint die im unverletzten und nicht mit Phenolen gefütterten Gewebe erfolgende Aufnahme von Sauerstoff für das normale Funktionieren des Phenolasekomplexes (Pigmentbildung usw.) so gering zu sein, daß sie während der Versuchsdauer nicht meßbar in Erscheinung tritt.

Nun wäre rein theoretisch noch die Möglichkeit zu prüfen, ob eventuell das beim Zerfall von DIECA entstehende Diäthylamin die Oxydation des Brenzkatechins verhindert und so zu negativem Ausgang des «optischen Testes» führt. Dies ist aus folgenden zwei Gründen nicht zu erwarten:

a) Gemäß Methode C befindet sich in den Warburggefäßen gar kein DIECA und somit auch kein sekundäres Amin; dieses kann höchstens in Spuren an der Oberfläche der Schnitte vorhanden sein.

b) Nach Beevers und James (1948) würde Diäthylamin die Oxydation von Catechol nicht nur nicht beeinflussen, sondern mit einem Oxy-

dationsprodukt des Brenzkatechins, wahrscheinlich *p*-Hydroxy-*o*-Benzochinon, eine dunkelrote Kondensationsverbindung bilden.

4. Bei Behandlungsmethode A und ohne Fütterung von Substrat ergeben sich folgende Gaswechselgrößen (μl O_2/20 Schnitte. Std.): Kontrolle: 33 μl, $2 \cdot 10^{-4}$ m DIECA: 37 μl, $4 \cdot 10^{-4}$ m DIECA: 38 μl, 10^{-3} m DIECA: 40 μl.

Um den Grad der Hemmung der Polyphenoloxydase nun auch manometrisch zu prüfen, wurde während des Experimentes bei einigen Gefäßen das allgemein zur Bestimmung von Phenolaseaktivitäten verwendete Testsubstrat, Brenzkatechin, aus der Ansatzbirne in den Hauptraum gegeben (Endkonzentration im Reaktionsgefäß 10^{-2} m) und die nun zusätzlich zum respiratorischen Sauerstoffverbrauch erfolgende O_2-Aufnahme, welche ein Maß für die Polyphenoloxydasenaktivität darstellt, während einer Stunde gemessen. In den Gefäßen ohne Catechol war weiterhin Linearität der Sauerstoffaufnahme festzustellen; mit Brenzkatechin gefütterte Schnitte hingegen zeigten folgende auf die Oxydation dieses Phenols zurückführbare Extra-O_2-Aufnahme (μl O_2/20 Schnitte. Std.): Kontrolle: 117 μl, DIECA-behandelte Schnitte: $2 \cdot 10^{-4}$ m: 16 μl, $4 \cdot 10^{-4}$m: 18 μl, 10^{-3} m: 11 μl.

Darnach wird der Phenolasekomplex mit 10^{-3} molarem Hemmstoff infiltrierten Plectenchyms um mehr als 90 % inaktiviert, ohne daß deswegen eine Verminderung der Atmungsintensität einträte. Dabei ist es fraglich, ob die immerhin etwas erhöhte Sauerstoffaufnahme nach Catecholfütterung der mit DIECA behandelten Schnitte überhaupt auf eine Restaktivität der Phenoloxydase zurückzuführen ist, da die Möglichkeit besteht, daß Spuren des Diphenols beim Zukippen mit dem KOH-getränkten Filtrierpapier in Berührung kamen, was eine nichtenzymatische Oxydation des Brenzkatechins hervorrufen kann. Letzteres trifft auch dann zu, wenn während der Zugabe des Catechols etwas Kalilauge aus dem Zentralgefäß in den Hauptraum gelangt und das pH dann über 7 steigt.

Um solche Fälle auszuschließen, kontrollierte man in der folgenden Versuchsreihe in allen Gefäßen mit Brenzkatechinfütterung am Ende des Versuches die Azidität des Mediums und die Farbe des Filtrierpapierstreifens. Gefäße, in welchen eine Erhöhung des pH weit über 7 oder eine Braunfärbung des KOH-Streifens festzustellen ist, werden zur Bestimmung der Catecholaseaktivität nicht berücksichtigt, da dann wahrscheinlich eine nichtenzymatische Oxydation des Diphenols stattgefunden hat.

5. In dieser Versuchsserie (Applikation von DIECA nach Methode C; kein exogenes Substrat) ermittelte man die in Tabelle 29 aufgezeichneten Resultate. Während bei Nr. III und IV das pH nach Zukippen über 7 gestiegen war, traf dies für I und II nicht zu. Der Phenolasekomplex ist, wie man der Zusammenstellung entnehmen kann, bei Behandlungsart C

schon durch $2 \cdot 10^{-4}$ m DIECA total inaktiviert, da Catecholfütterung zu keiner zusätzlichen Sauerstoffaufnahme des Plectenchyms führt.

Tabelle 29

Sauerstoffaufnahme des Plectenchyms nach Inaktivierung der Phenoloxydase durch DIECA

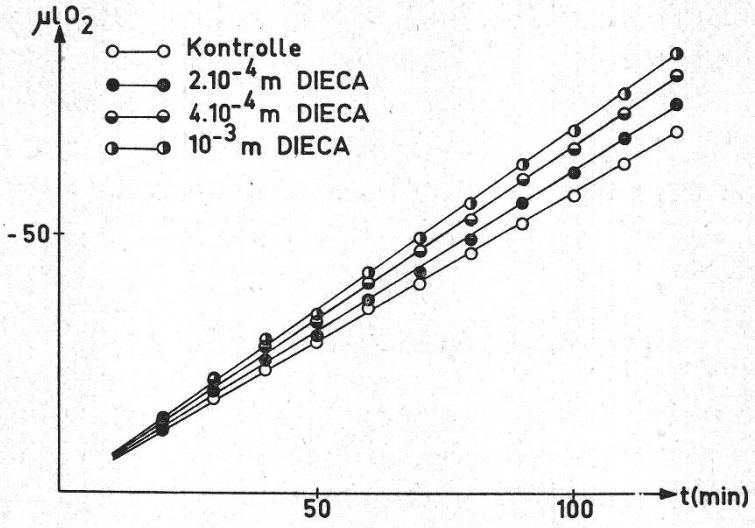
(Grundatmung; pH 7,0; T = 30 °C)

Nr.	DIECA-Konzentration	O_2-Aufnahme vor Fütterung von Brenzkatechin	Nach Fütterung von Catechol auftretende Extra-O_2-Aufnahme	«Opt. Test»
		(μl O_2/20 Schnitte. Std.)		
I	0 (Kontrolle)	58	96	+
II	$2 \cdot 10^{-4}$ m	60,5	0,5	neg.
III	$4 \cdot 10^{-4}$ m	67,5	—	neg.
IV	10^{-3} m	68,5	—	neg.

Ausbleiben einer Erniedrigung der Intensität der endogenen Atmung (Versuchsreihen 4 und 5) selbst nach totaler Inaktivierung der Phenoloxydase (in Experiment 5 außer durch den «optischen Test» auch manometrisch nachgewiesen), ist mit der Annahme, wonach dieses Ferment als respiratorische Terminaloxydase von *Agaricus campester* funktioniert, unvereinbar.

Sowohl bei Grund- als auch Glucoseatmung wird demnach das terminale Glied der Atmungskette durch ein anderes metallhaltiges Ferment als die Phenoloxydase repräsentiert, und es liegen keine Untersuchungen vor, die zeigten, daß es sich dabei nicht um das Warburgsche Atmungsferment handeln könnte, dessen Vorhandensein auch im Kulturchampignon um so wahrscheinlicher ist, als Boulter und Derbyshire (1957) bei einer Reihe von Basidiomyceten verschiedene Cytochrome, worunter auch a_3, nachgewiesen haben.

Es mag aufgefallen sein, daß mit Diäthyldithiocarbamat behandeltes Plectenchym im Vergleich zu den Kontrollen nicht nur keine Hemmung, sondern meistens eine Erhöhung des Sauerstoffkonsums aufwies, was man zunächst als zufällige Erscheinung oder noch eher als methodischen Fehler interpretieren zu müssen glaubte, da für die einer bestimmten Inhibitorkonzentration ausgesetzt gewesenen Schnitte stets die gleichen Gefäß-Manometer-Kombinationen Verwendung fanden. Nachdem letztere in der 6. Versuchsreihe (Methode B, kein exogenes Substrat), welche die in Figur 23 dargestellten Meßergebnisse zeitigte, vollständig ausgetauscht worden waren, ohne daß sich jedoch ein gegenüber den Experimenten 1–5 verschiedenes Verhalten des Plectenchyms gezeigt hätte, ist die leichte Erhöhung der Sauerstoffaufnahme des Pilzgewebes nach längerem Kontakt oder nach Infiltration mit DIECA als erwiesen zu betrach-



Figur 23

Sauerstoffaufnahme DIECA-behandelter Schnitte (kein exogenes Substrat; pH 7,0; T = 20 °C)

ten. Setzt man gemäß Figur 23 den Sauerstoffkonsum der Kontrolle gleich 100, so ergeben sich für die mit $2 \cdot 10^{-4}$ m beziehungsweise $4 \cdot 10^{-4}$ m beziehungsweise 10^{-3} m Diäthyldithiocarbamat behandelten Schnitte die Werte 108 beziehungsweise 116 beziehungsweise 123.

Es stellt sich nun noch die Frage nach der Ursache dieser leicht erhöhten O_2-Aufnahme von Plectenchym mit durch DIECA inaktivierter Phenolase. Nach Beevers und James (1948) kann die rote Kondensationsverbindung von sekundärem Amin und einem Oxydationsprodukt des Catechols, wahrscheinlich *p*-Hydroxy-*o*-Benzochinon, intensive, nichtenzymatische oxydative Desaminierung von Aminosäuren, insbesondere von Glycin, bewirken. Es ist nicht ausgeschlossen, daß beim Zerfall von DIECA entstehendes Diäthylamin mit dem entsprechenden Oxydationsprodukt von Brenzkatechin eine solche die Oxydation von Aminosäuren katalysierende Verbindung gebildet hat. Das passende Chinon ist in Geweben, welche normalerweise Phenolaseaktivität zeigen, sicherlich vorhanden, und dies kann auch noch der Fall sein, wenn die Phenoloxydase nachträglich gehemmt wird. Die gegenüber der Kontrolle erhöhte Sauerstoffaufnahme der mit DIECA behandelten Schnitte beruht deshalb möglicherweise auf Oxydation bestimmter Aminosäuren unter Einwirkung der aus $(C_2H_5)_2NH$ und einem passenden Oxydationsprodukt des Brenzkatechins gebildeten Kondensationsverbindung.

Daß Rotfärbung der Schnitte durch diesen Komplex nicht festzustellen war, stellt keinen Beweis für geringe Wahrscheinlichkeit der obigen Hypothese dar, da der Katalysator nur in geringen Mengen gebildet werden könnte, was dessen Erkennung bei Betrachtung des Pilzgewebes von bloßem Auge praktisch verunmöglichte.

Diese Erklärung für den leicht erhöhten Sauerstoffkonsum DIECA-behandelten Plectenchyms ließe sich durch Fütterung unvergifteter Schnitte mit 10^{-3} m bis 10^{-4} m Diäthylamin, mit Glycin sowie von $(C_2H_5)_2NH$ und Glycokoll gleichzeitig, welche beide durch Phenoloxydase direkt nicht angegriffen werden (Beevers and James, 1948; Mason, 1955), nachprüfen.

IV. Schlußfolgerungen und Diskussion

Obschon Kostytschew die anaerobe Atmung von *Agaricus campester* als einen «vollkommen eigenartigen Prozeß», der von der «Zymasegärung» durchaus verschieden und nicht auf Zuckerabbau zurückzuführen sei, bezeichnete, wurde hier nicht der geringste Beweis für das Nichtfunktionieren des EMP-Schemas gefunden, da Fütterung von Glucose oder Mannose die CO_2-Abgabe in Stickstoffatmosphäre verdoppelt, Jodacetat-, Fluorid- und Bisulfitvergiftung je zu beträchtlichen Hemmungen der anaeroben Atmung führen, DPN^+ die Gärungsgröße um zirka 80% erhöht, exogener Äthanol Q_{O_2} steigert, was für Existenz von Alkoholdehydrogenase spricht, und die Entkopplersubstanzen DNP und PNP, welche in bezug auf anaerobe Atmung wie Einführung von Stickstoff wirken (Hess und Chance, 1959), in kleineren und mittleren Konzentrationen größenmäßig etwa $Q_{CO_2}^{N_2}$ entsprechende aerobe Gärung hervorrufen.

Daß die CO_2-Abgabe in Stickstoffatmosphäre nur etwa einem Zehntel des Atmungskohlendioxydes (in Luft) gleichkommt, kann folgende Bedeutung haben: Der aerobe Substratabbau erfolgt auch über andere Wege als Glycolyse-Citronensäurecyclus (z.B. via Pentoseshunt), oder unter Anaerobie fallen nicht alle Brenztraubensäuremoleküle der Dekarboxylierung anheim, und es fungiert noch ein anderes Stoffwechselintermediärprodukt als Acetaldehyd als Wasserstoffakzeptor.

In diesem Zusammenhang ist möglicherweise das in N_2-Atmosphäre erfolgende Auftreten großer Mengen von Mannit durch Glycogenabbau im Fruchtkörper von *Agaricus campester* (Quillet et Legrand, 1952a, 1952b) von Bedeutung, indem dies eine dem Verhalten von *Aspergillus niger*, der intrazellulär auch Mannitol bildet, analoge Erscheinung darstellt. Dessen fermentative Akkumulation erklärt die Tatsache, daß dieser Pilz weniger Äthanol bildet, als dem theoretisch zu erwartenden Wert für eine Gärung vom Hefetypus entspräche (Rippel und Wiangke, 1941; Schmidt-Lorentz, 1956).

Bei hohen DNP- und PNP-Konzentrationen übersteigt die aerobe Fermentation größenmäßig die anaerobe Gärung und kann sogar mehr als einen Drittel der CO_2-Abgabe der normalen aeroben Atmung betragen, was vielleicht auf Abgabe von nicht nur dem EMP-Weg entstammendem

Kohlendioxyd oder auf Nichtfunktionieren der oben erwähnten fermentativen Assimilation in Gegenwart großer Mengen dieser Entkopplersubstanzen beruht.

Trotz dem Fehlen von Zuckern im Fruchtkörper und einem theoretisch der Oxydation von Fetten oder Proteinen entsprechenden RQ ist ein Kohlehydrat, wahrscheinlich Glycogen, oder ein Zuckerphosphat natürliches Atmungssubstrat des Hutmyceliums, da Arsenat den respiratorischen Quotienten auf 1 erhöht, größere Mengen von Phosphorsäureestern, worunter auch Fructose-6-phosphat, vorhanden sind, die «endogene Gärung» durch Jodacetat und Fluorid gehemmt wird, durch DNP- und PNP-Vergiftung aerobe Fermentation auftreten kann und gewisse Monosaccharide zu starken Steigerungen der Atmungsrate führen, was für das Vorhandensein des diesen Substratabbau bewirkenden Fermentsortimentes spricht.

Sowohl Grund- als auch Glucoseatmung bedienen sich zwar offensichtlich des Glycolyseweges, indem der Q_{O_2}-Wert nach Jodacetatvergiftung in beiden Fällen eine Verminderung erfährt, doch scheint bei endogener Atmung vorwiegend ein anderer Abbauweg, möglicherweise der Pentoseshunt, dessen Funktionieren auch mit der raschen Veratmung von Xylose in Einklang stünde, bevorzugt zu sein, da die Metabolisierung exogener Glucose stets eine stärkere Hemmung als die endogene Atmung bei gleicher Menge von Jodessigsäure aufweist und $5 \cdot 10^{-2}$ m Fluorid auf letztere wirkungslos bleibt, während dieselbe Konzentration dieses Inhibitors eine Erniedrigung der Größe der Sauerstoffaufnahme bei Glucosefütterung um 45 % hervorruft.

Durch Fluoracetat läßt sich die Atmungsgröße mit oder ohne exogenes Substrat nur um maximal 50 % hemmen, wobei der RQ über 1 steigt, so daß möglicherweise aerobe Gärung vorliegt. Die Hälfte des respiratorischen Materials scheint deshalb den Krebscyclus nicht zu durchlaufen und wird auf andere Weise, eventuell durch direkte Oxydation, abgebaut. Da es zudem nicht gelang, bei Glucosefütterung Malonathemmung hervorzurufen, mag die physiologische Bedeutung des Citronensäurecyclus bei *Agaricus campester* eher in seiner synthetischen als energetischen Funktion (Wiame, 1957) liegen, und Malonat würde vielleicht nur in dem Maße die Atmung beeinträchtigen, als das Plectenchym im Zeitpunkt der Vergiftung Säuren metabolisierte.

Phloridzin und Phloretin lassen sich für Gewebe, welche Phenolaseaktivität zeigen, wohl ganz allgemein nicht als respiratorische Hemmstoffe gebrauchen, weil sie durch die Tyrosinase unter Bildung von Chinonen oder Pigmenten mit Chinongruppierung oxydiert werden, wobei die atmungshemmende Wirkung jener Phenole verlorengeht.

2,4-Dinitrophenol vermag die Sauerstoffaufnahme mit oder ohne Glucosefütterung stark zu erhöhen, wonach man annehmen muß, daß

die Atmungsrate beim Champignon durch die Kapazität des Systems der oxydativen Phosphorylierung begrenzt wird.

Da Difco-Hefeextrakt die CO_2-Abgabe unter Anaerobie nicht beeinflußt, Glucose- und Grundatmung um 50 % beziehungsweise 100 % steigert und DNP nur noch geringe Erhöhung der Sauerstoffaufnahme zeitigt, scheint dieser seine atmungssteigernde Wirkung durch Eingreifen im System der oxydativen Phosphorylierung hervorzurufen.

Die respiratorische Terminaloxydase von *Agaricus campester* ist wegen der Möglichkeit vollständiger Sistierung der Sauerstoffaufnahme des Plectenchyms nach Azidvergiftung ein metallhaltiges Ferment, jedoch nicht, wie vielfach vermutet, Phenolase, da deren Hemmung durch *p*-Nitrophenol oder deren vollständige Blockierung durch DIECA die Atmungsgröße nicht vermindert. Beim terminalen Glied der Atmungskette könnte es sich wohl um Cytochromoxydase handeln, da in Basidiomyceten verschiedene Cytochrome festgestellt wurden (Boulter and Derbyshire, 1957) und Stilboestrol, das die Funktion des Succinodehydrogenasekomplexes beeinträchtigt (McShan and Meyer, 1946), die Atmung unter Aufhebung des Pasteureffektes hemmt, weshalb eine der Succinoxydase der tierischen Zellen zum mindesten ähnliche Enzymgruppe auch beim Champignon zu postulieren ist.

Interessant ist schließlich die Tatsache des Austrittes zelleigener Substanzen ins Suspensionsmedium unter Anaerobie, bei tiefem pH (3,5) und nach Jodacetatvergiftung, ohne daß die Zellen dabei abgestorben wären, da der so auftretende Trockengewichtsverlust selbst im Falle von Jodessigsäure denjenigen von im Reaktionsgefäß abgetöteten Zellen (z.B. nach Fütterung von 10^{-2} m PNP zirka 40 %), die praktisch keinen Gaswechsel mehr zeigten, nicht erreichte. Inwiefern hier Verknüpfung osmotischer Erscheinungen mit dem Atmungsstoffwechsel vorliegt, ist völlig ungeklärt.

V. Zusammenfassung

1. Die endogene Atmung der Fruchtkörper von *Agaricus campester* zeigt nach Vorbehandlung (Starvation usw.) des Plectenchyms einen mittleren Q_{O_2}-Wert von 2,48 und einen RQ von 0,74; bei Glucosefütterung lauten die entsprechenden Größen auf 3,83 beziehungsweise 0,93. Die Ursachen geringer Gärungsintensität sowohl mit exogener Glucose ($Q_{CO_2}^{N_2} = 0{,}53$) als auch bei Fehlen äußeren Substrates ($Q_{CO_2}^{N_2} = 0{,}28$) sind diskutiert.

2. Mannose, Fructose, Glucose, Xylose, Glucosamin, Fructose-6-phosphat und Acetat werden rasch metabolisiert, während Fütterung von Glucose-1-phosphat, Fructose-1,6-diphosphat, cis-Aconitat, Malat, Oxal-

acetat, α-Ketoglutarat oder Fumarat die Sauerstoffaufnahme nur mäßig steigert und Saccharose, Maltose, Ribose, Mannit und andere keine geeigneten respiratorischen Materialien darstellen.

3. Natürliches Atmungssubstrat ist trotz des auf Oxydation von Fetten oder Proteinen deutenden RQ-Wertes und des Fehlens freier Zucker im Fruchtkörper eine Substanz des Kohlehydratstoffwechsels, wahrscheinlich Glycogen oder ein Zuckerphosphat.

4. Beweise für eine besondere Art von alkoholischer Gärung beim Kulturchampignon fehlen, und die Versuchsresultate schließen die Möglichkeit dem Hefe-Muskel-Typ entsprechender Fermentation nicht aus.

5. Grund- und Glucoseatmung folgen beide dem EMP-Schema, wenngleich, speziell in Abwesenheit exogenen Zuckers, noch ein anderer Abbauweg, bei welchem es sich um den Pentoseshunt handeln könnte, zu postulieren ist.

6. Der Citronensäurecyclus scheint zwar zu funktionieren, ohne jedoch die einzige Möglichkeit terminalen Abbaus des Atmungssubstrates darzustellen.

7. Phloridzin und Phloretin lassen sich nicht als respiratorische Hemmstoffe gebrauchen, da sie durch die Tyrosinase des Pilzes oxydiert werden.

8. Die Atmungsintensität des Plectenchyms ist im wesentlichen weder durch Substrat noch Coenzyme oder anorganisches Phosphat, sondern durch die Kapazität des Systems der oxydativen Phosphorylierung limitiert.

9. Difco-Hefeextrakt vermag die Metabolisierung endogenen und exogenen Substrates stark zu stimulieren; dieser greift dabei wahrscheinlich im System der Atmungskettenphosphorylierung an.

10. Die respiratorische Terminaloxydase von *Agaricus campester* wird durch ein metallhaltiges Ferment repräsentiert, wobei aber der Phenolasekomplex auszuschließen ist, da dessen Hemmung oder totale Blockierung den Sauerstoffkonsum des Plectenchyms nicht vermindert.

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wanner. Meinem verehrten Professor bin ich für die Zuweisung des interessanten Themas und die stete Anteilnahme, mit welcher er die Fortschritte dieser Untersuchungen verfolgte, zu herzlichem Dank verpflichtet.

Ich danke auch der Firma Hauser, Champignonkulturen AG, Goßau, für die immer prompte Lieferung des Versuchsmaterials, das mir gerne und kostenlos zur Verfügung gestellt wurde.

Summary

1. The Q_{O_2} and RQ average respectively is 2.48 and 0.74 for the endogenous respiration of the fruiting bodies of *Agaricus campester* after pretreatment (starvation etc.). When glucose is fed, these values change to 3.83 and 0.93. A low rate of the fermentation was found when glucose was administered ($Q_{CO_2}^{N_2} = 0.53$) or when no external substrate was supplied ($Q_{CO_2} = 0.28$). The suggested reasons for this behaviour are discussed.

2. Mannose, fructose, glucose, xylose, glucosamine, fructose-6-phosphate, and acetate are quickly metabolized while glucose-1-phosphate, fructose-1,6-diphosphate, cis-aconitate, malate, oxalacetate, α-ketoglutarate, and fumarate increase only slightly the oxygen uptake. Sucrose, maltose, ribose, mannitol, and others do not represent suitable respiratory materials.

3. The natural respiratory substrate is a substance of the carbohydrate metabolism (probably glycogen or a sugar phosphate), in spite of the fact that the RQ values suggest an oxidation of lipids or proteins.

4. There is no evidence for the existence of any special type of alcoholic fermentation in the cultivated mushroom, and the experimental results do not exclude the possibility of a fermentation pathway according to the yeast-muscle schema.

5. The endogenous and the glucose respiration both follow the EMP-pathway. However, an alternative pathway must also be considered (probably the pentose phosphate cycle), especially if no glucose is fed.

6. The citric acid cycle appears to be functional, without being the only possibility of terminal degradation of the respiratory substrate.

7. Phloridzin and phloretine cannot be used as respiratory inhibitors, since they are oxidized by the phenolase of the mushroom.

8. The respiratory rate of the tissue is limited primarily by the capacity of the oxidative phosphorylation and not by substrate, coenzymes, or inorganic phosphate.

9. The endogenous and the glucose respiration are highly stimulated by Difco yeast extract. Probably it interfers with oxidative phosphorylation.

10. The respiratory terminal oxidase of *Agaricus campester* is a metalloprotein, but not the phenolase complex, since its inhibition or blocking by suitable substances does not decrease oxygen uptake.

Literaturverzeichnis

Ames S. R., Ziegenhagen A.J. and Elvehjem C.A. 1946. Studies on the inhibition of enzyme systems involving cytochrome c. J. Biol. Chem. **165,** 81–90.

Barron E.S.G., and Singer T.P. 1945. Studies on biological oxidations. XIX. Sulfhydryl enzymes in carbohydrate metabolism. J. Biol. Chem. **157,** 221–240.

Beevers H. 1953. 2,4-dinitrophenol and plant respiration. Am. J. Botany **40,** 91–96.

— and James W.O. 1948. The behaviour of secondary and tertiary amines in the presence of catechol and *Belladonna* catechol oxidase. Biochem. J. (London) **43,** 636–639.

Betz A. 1958. Aerobe Gärung und Äthanol-Umsatz. Naturwissenschaften **45,** 88–89.

Bonner J. 1949a. Limiting factors and growth inhibitors in the growth of the *Avena* coleoptile. Am. J. Botany **36,** 323–332.

— 1949b. Relations of respiration and growth in the *Avena* coleoptile. Am. J. Botany **36,** 429–436.

— and Wildman S.G. 1946. Enzymatic mechanisms in the respiration of spinach leaves. Arch. Biochem. **10,** 497–518.

Boulter D. and Derbyshire E. 1957. Cytochromes of fungi. J. Exp. Bot. **8,** 313–318.

Bruchmann E.E. 1959. Über die Wirkung von Jodazetat und p-Chlormercuribenzoat auf Hexokinase, Phosphoglyzerinaldehyd-dehydrogenase, α-Glycerophosphat-dehydrogenase und Brenztraubensäure-carboxylase bei Backhefe, *Endomycopsis vernalis, Candida reukanfii* und *Rhodotorula gracilis.* Zbl. Bakt., II. Abt. **112,** 421–428.

Buffa P., Peters R.A. and Wakelin R.W. 1951. Biochemistry of fluoracetate poisoning. Isolation of an active tricarboxylic acid fraction from poisoned kidney homogenates. Biochem. J. (London) **48,** 467–477.

Case E.M. and Dickens F. 1948. The influence of some synthetic oestrogens and related substances upon the succinoxydase system of rat liver. Biochem. J. (London) **43,** 481–487.

Chance B. and Hess B. 1959. Spectroscopic evidence of metabolic control. Rapid measurements of intracellular events afford new evidence on mechanisms for metabolic control. Science **129,** 700–708.

Clifton C.E. 1946. Microbial assimilations. Advances in Enzymol. **6,** 269–308.

Cochrane V.W. 1958. Physiology of fungi. John Wiley & Sons, Inc., New York, 524 S.

Cramer F. 1958. Papierchromatographie. Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 4. Aufl., 215 S.

Crane R.K., Field R.A. and Cori C.F. 1957. Studies of tissue permeability. I. The penetration of sugars into the Ehrlich ascites tumor cells. J. Biol. Chem. **224,** 649–662.

Cross R.J., Taggart J.V., Covo G.A. and Green D.E. 1949. Studies on the cyclophorase system. VI. The coupling of oxidation and phosphorylation. J. Biol. Chem. **177,** 655–678.

Dawson C.R. and Tarpley W.B. 1951. Copper oxidases. In: Sumner J.B. and Myrbäck K. The enzymes. Academic Press, New York, **2** (1), 454–498.

Dickens F. and Glock G.E. 1952. Direct oxidation of glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate and pentose-5-phosphates by enzymes of animal origin. Biochem. J. (London) **50,** 81–95.

Ducet G. et Rosenberg A.-J. 1951. Activité respiratoire chez les végétaux supérieurs. II. Activités cytochrome oxydasique et polyphénoloxydasique chez quelques végétaux supérieurs. Bull. Soc. chim. biol. **33,** 321–336.

Eberhardt F. 1958. Stoffwechsel organischer Verbindungen. II. Fortschritte d. Bot. **20**, 169–199.

Eliasson L. 1959a. Effect of dinitrophenol and glucose on oxygen uptake of wheat root tissue. Physiol. Plantarum **12**, 551–558.

— 1959b. The effect of glucose and dinitrophenol on the cyanide inhibition of oxygen uptake in wheat root tissue. Physiol. Plantarum **12**, 681–690.

Eny D.M. 1952. The effect of organic acids, inhibitors and enzymes on the respiration of *Chlorella*. Biochem. J. (London) **50**, 559–564.

Gentile A.C. 1954. Carbohydrate metabolism and oxalic acid synthesis by *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. **29**, 257–261.

Harris E.J. 1956. Transport and accumulation in biological systems. Butterworths Scientific Publications, London, 291 S.

Hess B. und Chance B. 1959. Über zelluläre Regulationsmechanismen und ihr mathematisches Modell. Naturwissenschaften **46**, 248–257.

James W.O. 1953a. The use of respiratory inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol. **4**, 59–90.

— 1953b. The terminal oxidases of plant respiration. Biol. Revs. **28**, 245–260.

— 1953c. Plant respiration. At the Clarendon Press, Oxford, 282 S.

— 1957. Reaction paths in the respiration of the higher plants. Advances in Enzymol. **18**, 281-318.

— and Garton N. 1952. The use of sodium diaethyldithiocarbamate as a respiratory inhibitor. J. Exp. Bot. **3**, 310–318.

Jennings D.H. 1958. Changes in the internal carbohydrates of beech mycorrhizas during treatment with azide. New Phytologist **57**, 254–255.

Judah J.D. and Williams-Ashman H.G. 1951. The inhibition of oxydative phosphorylation. Biochem. J. (London) **48**, 33–42.

Kalckar H. 1935. Inhibitory effect of phloridzin on an enzymatic dismutation. Nature **136**, 872–873.

— 1937/38. Phosphorylation in kidney tissue. Enzymologia **2**, 47–52.

Katz J. and Hassid W.Z. 1951. Arsenolysis of amylose and amylopectin. Arch. Biochem. **30**, 272–281.

Keilin D. 1937. The action of sodium azide on cellular respiration and on some catalytic oxidation reactions. Proc. Roy. Soc. (London) (B) **121**, 165–173.

— and Mann T. 1938. Polyphenol oxidase. Purification, nature and properties. Proc. Roy. Soc. (London) (B) **125**, 187–204.

Kostytschew S. 1907. Über anaerobe Atmung ohne Alkoholbildung. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **25**, 188–191.

— 1908. Zweite Mitteilung über anaerobe Atmung ohne Alkoholbildung. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **26a**, 167–177.

— 1910. Ein eigentümlicher Typus der Pflanzenatmung. Z. Physiol. Chem. **65**. 350–382.

Kubowitz F. 1937a. Über die chemische Zusammensetzung der Kartoffeloxydase. Biochem. Z. **292**, 221–229.

— 1937b. Schwermetallproteid und Pyridinproteid, die Komponenten blausäure- und kohlenoxydempfindlicher Alkoholdehydrasen. Biochem. Z. **293**, 308.

Lapicque. 1927. Concentration des sucs cellulaires chez les champignons supérieurs (Agaricinés). Compt. rend. (Paris) **184**, 398–401.

Laties G.G. 1949. The role of pyruvate in the aerobic respiration of barley roots. Arch. Biochem. **20**, 284–299.

Le Fevre P.G. 1959. Molecular structural factors in competitive inhibition of sugar transport. Science **130**, 104–105.

Legrand G. 1954. Répartition des activités oxydasiques dans le carpophore du champignon de couche. Compt. rend. (Paris) **238**, 373–375.

Lehninger A.L., Wadkins C.L. and Remmert L.F. 1959. Control points in phosphorylating respiration and the action of a mitochondrial respiration-releasing factor. In: Ciba Foundation Symp. on the Regulation of Cell Metabolism. Churchill Ltd., London, 130–145, 387 S.

Lerner N.H. 1954. Polyphenoloxydase and the respiration of ivy leaves. J. Exp. Bot. **5**, 79–90.

Leuthardt F. 1959. Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 14. Aufl., 917 S.

Lohmann K. und Meyerhof O. 1934. Über die enzymatische Umwandlung der Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure. Biochem. Z. **273**, 60–72.

Loomis W.F. and Lipmann F. 1948. Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxydation. J. Biol. Chem **173**, 807–808.

Lundsgaard E. 1930. Die Monojodessigsäurewirkung auf die enzymatische Kohlenhydratspaltung. Biochem. Z. **220**, 1–7.

— 1933. Hemmung von Esterifizierungsvorgängen als Ursache der Phlorrhizinwirkung. Biochem. Z. **264**, 209–220.

MacDonald R.E. and Bishop C.J. 1952. Phloretin: An antibacterial substance obtained from apple leaves. Can. J. Botany **30**, 486–489.

Macmillan A. 1956. The relation between nitrogen assimilation and respiration in *Scopulariopsis brevicaulis*. Physiol. Plantarum **9**, 533–545.

Mallette M.F., Lewis S., Ames S.R., Nelson J.M. and Dawson C.R. 1948. The preparation of mushroom tyrosinase. Arch. Biochem **16**, 283–289.

Mason H.S. 1955. Comparative biochemistry of the phenolase complex. Advances in Enzymol. **16**, 105–184.

McShan W.H. and Meyer R.K. 1946. The effect of estrogens on the succinoxydase system of liver and pituitary tissues. Arch. Biochem. **9**, 165–173.

Millerd A., Bonner J. and Biale J.B. 1953. The climacteric rise in fruit respiration as controlled by phosphorylative coupling. Plant Physiol. **28**, 521–531.

Morgan D.R. and Street H.E. 1959. The carbohydrate nutrition of tomato roots. VII. Sugars, sugar phosphates, and sugar alkohols as respiratory substrates for excised roots. Ann. Botany, N.S. **23**, 89–105.

Morrison J.F. and Peters R.A. 1954. Biochemistry of fluoracetate poisoning: The effect of fluorocitrate on purified aconitase. Biochem. J. (London) **58**, 473–479.

Needham D.M. and Pillai R.K. 1937. The coupling of oxydo-reductions and dismutations with esterification of phosphate in muscle. Biochem. J. (London) **31**, 1837–1851.

Obaton. 1932. Le mannitol, aliment de choix pour le *Sterigmatocystis nigra*. Compt. rend. (Paris) **194**, 302–304.

Paech K. 1953. Stoffwechsel organischer Verbindungen II. Fortschritte d. Bot. **14**, 334–364.

— 1955. Stoffwechsel organischer Verbindungen II. Fortschritte d. Bot. **17**, 578–620.

Pearson J.A. and Robertson R.N. 1954. The physiology of growth in apple fruits. VI. The control of respiration rate and synthesis. Australian J. Biol. Sci. **7**, 1–17.

Potter V.R. 1945. Coupling between phosphorylation and oxidation of the 4-carbon acids in rat kidney homogenates. Arch. Biochem. **6**, 439–453.

Proskuriakow N.J. 1926. Über die Beteiligung des Chitins am Aufbau der Pilzzellwand. Biochem. Z. **167**, 68–76.

Quillet M. et Legrand G. 1952a. Sur le métabolisme glucidique des champignons supérieurs. I. Relation du mannitol avec l'activité du système oxydo-réducteur. Compt. rend. (Paris) **234**, 876–878.

— — 1952b. Sur le métabolisme glucidique des champignons supérieurs. II. Relation entre le glycogène et le mannitol chez *Agaricus campester* (Fr.) variété bispora. Compt. rend. (Paris) **235**, 311–313.

— — 1952c. Sur le métabolisme glucidique des champignons supérieurs. III. Le fructose, glucide intermédiaire du métabolisme du mannitol chez *Agaricus campester* (Fr.) variété bispora. Compt. rend. (Paris) **235**, 628–629.

Randoin L. et Billaud S. 1956. Composition chimique et valeur nutritive du champignon de couche. Mushroom Science **3**, 59–79.

Rauhen H.M. 1956. Biochemisches Taschenbuch. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1332 S.

Rippel A. und Wiangke H. 1941. Über das Abfangen von Acetaldehyd bei *Aspergillus niger*. Arch. Mikrobiol. **12**, 124–127.

Schade A.L., Bergmann L. and Byer A. 1948. Studies on the respiration of the white potato. I. Preliminary investigation of the endogenous respiration of potato slices and catechol oxidase activity. Arch. Biochem. **18**, 85–96.

Schmidt-Lorentz W. 1956. Untersuchungen über den anaeroben Kohlehydratstoffwechsel von *Aspergillus niger* van Tieghem. Arch. Mikrobiol. **25**, 137–165.

Shapiro B. 1947. The mechanism of phloridzin glucosuria. Biochem. J. (London) **41**, 151–154.

Simon, E.W. 1953. Mechanisms of dinitrophenol toxicity. Biol. Revs. **28**, 453–479.

Slater E.C. and Bonner W.D. 1951. Inhibition of the succinic oxidase system by fluoride. Biochem. J. (London) **49**, Proceedings, 1.

— and Hülsmann W.C. 1959. Control of rate of intracellular respiration. In: Ciba Foundation Symp. on the Regulation of Cell Metabolism, Churchill Ltd., London, 58–90, 387 S.

Spiegelmann S., Kamen M.D. and Sussman M. 1948. Phosphate metabolism and the dissociation of anaerobic glycolysis from synthesis in the presence of sodium azide. Arch. Biochem. **18**, 409–436.

Sreerangachar H.B. 1943. Studies on the "fermentation" of Ceylon tea. 6. The nature of the tea-oxidase system. Biochem. J. (London) **37**, 661–667.

Stenlid G. 1949. The effect of 2,4-dinitrophenol upon oxygen consumption and glucose uptake in young wheat roots. Physiol. Plantarum **2**, 350–371.

Tamiya H. 1942. Atmung, Gärung und die sich daran beteiligenden Enzyme von *Aspergillus*. Advances in Enzymol., 183–238.

Tenenbaum L.E. and Jensen H. 1943. Catecholase (Tyrosinase): Reversible inactivation and reactivation. J. Biol. Chem. **147**, 27–31.

Tissières A. 1952. A study of the cytochrome system and some other aspects of the respiration of *Aerobacter aerogenes*. Biochem. J. (London) **50**, 279–288.

Treschow C. 1944. Nutrition of the cultivated mushroom. Dans Botan. Arkiv **11**, No. 6, 1–180.

Turner J.S. 1937. On the relation between respiration and fermentation in yeast and the higher plants. A review of our knowledge of the effect of iodoacetate on the metabolism of plants. New Phytologist **36**, 142–169.

— 1938. The respiratory metabolism of carrot tissue. II. The effect of sodium monoiodoacetate on the respiration and fermentation. New Phytologist **37**, 289–311.

Umbreit W.W., Burris R.H. and Stauffer J.F. 1949. Manometric techniques and tissue metabolism. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 2nd ed., 227 S.

Voinovitch I.A. 1951. Sur l'inhibition des oxydases de l'*Agaricus campestris*. Bull. Soc. chim. biol. **33**, 337–346.

Walter E.M. and Nelson J.M. 1945. Further studies on tyrosinase in aerobic plant respiration. Arch. Biochem. **6**, 131–138.

Warburg O. und Christian W. 1939. Isolierung und Kristallisation des Proteins des oxydierenden Gärungsfermentes. Biochem. Z. **303**, 40–68.

— — 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Z. **310**, 384–421.

Wessels J.G.H. 1959. The breakdown of carbohydate by *Schizophyllum commune* Fr. The operation of the TCA cycle. Acta Botanica Neerl. **8**, 497–505.

Wiame J.M. 1957. Le rôle biosynthétique du cycle des acides tricarboxyliques. Advances in Enzymol. **18**, 241–280.

— and Bourgeois S. 1953. Effect of citric acid on the growth of a variant of *Bacillus subtilis*. Nature **172**, 310–311.

Willstaedt H. et Borggård M. 1946. Sur la tréhalase. Arkiv Kemi, Mineral. Geol. **23B**, Nr. 1–8.

Wosileit W.D., Nason A. and Terrell A.J. 1954. Pyridine nucleotide-quinone reductase. II. Rôle in electron transport. J.Biol. Chem. **206**, 271–282.

Wright C.I. and Mason H.S. 1946. The oxidation of catechol by tyrosinase. J. Biol. Chem. **165**, 45–53.