

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Über die Bestimmung stationärer Konzentrationen von Brenztraubensäure und α -Ketoglutarsäure in Laminarien¹⁾

VON GÜNTER JACOBI

(Botanisches Institut der Technischen Hochschule Hannover)

Aus unseren Untersuchungen über den Intermediärstoffwechsel mariner Algen haben wir bislang nur über den Nachweis von Enzymen in Grün- und Rotalgen berichtet (JACOBI 1957a, b, c). Der Versuch, auch für Braunalgen mit den dort angeführten Extraktionsverfahren durch Aktivitätsbestimmungen von Fermenten Hinweise über den Stoffumsatz im Bereich der Kohlenhydrate zu erfahren, stieß auf präparative Schwierigkeiten.

Es wurden *Laminaria saccharina* und *L. digitata* sowie *Fucus vesiculosus* verwandt, deren Extrakte stets störende Begleitstoffe, in erster Linie Schleimssubstanzen enthielten. Mit keinem Extraktionsverfahren — Homogenisieren in Wasser und verschiedenen Puffern, Acetontrockenpulver und fraktioniertes Aussalzen mit Ammonsulfat — ließen sich Eiweißlösungen herstellen, in denen Enzyme nachgewiesen werden konnten. Durch Zusatz von kristallisierten oder angereicherten Enzympräparaten zur Meßküvette mit Extrakt (Triosephosphat-Dehydrogenase, Aldolase, Glutaminsäure-Dehydrogenase, Äpfelsäure-Dehydrogenase) ließ sich feststellen, daß die Extrakte der oben angeführten Braunalgen eine Inhibitorwirkung ausüben. Eine schwache Aktivität von Äpfelsäure-Dehydrogenase und vom „malic enzyme“ ließ sich nur nachweisen, wenn die Algen in 70%iger Ammonsulfatlösung homogenisiert wurden und der Niederschlag in Wasser aufgenommen wurde. Auch in diesen Extrakten waren aber noch störende Schleimstoffe enthalten, die eine Hemmwirkung ausüben, was durch Zusatz von reinen Fermentpräparaten oder von Hefemazerationsaft, deren Aktivitäten vorher ausgetestet waren, gezeigt werden konnte.

Um einen Einblick in den Stoffumsatz der Braunalgen zu gewinnen, sind wir zu einem anderen Verfahren übergegangen, nämlich der Bestimmung stationärer Substratkonzentrationen mit dem optischen Test. In den Extrakten waren nach Ausfällung der Eiweiße keine Schleimstoffe enthalten, die einen störenden Einfluß ausüben. Als Objekte wurden nur Laminarien verwandt.

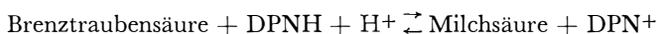
Zur Methodik

Thallusstücke von Laminarien wurden mit der 5fachen Menge (ein Gramm Thallus und 5ml) 6%iger HClO_4 im Homogenisator nach Potter-Elvehjem der Fa. Braun, Melsungen, homogenisiert und die Extrakte bei 30000 x g bei -5°C abzentrifugiert (Epirouette der Fa. Phywe, Linde). Der Überstand wurde mit 2 n KOH bis zum Neutralpunkt versetzt und der ausfallende Niederschlag von KClO_4 abzentrifugiert. Die so erhaltene grüne klare Lösung, die frei von Fällungsmitteln ist, wurde direkt zur Substratbestimmung verwandt.

Die Substratbestimmung erfolgte im optischen Testverfahren unter Zusatz von reinen Fermentpräparaten im Photometer „Eppendorf“. Brenztraubensäure wurde mit Milchsäure-Dehydrogenase und α -Ketoglutarsäure mit Glutaminsäure-Dehydrogenase bestimmt. Beide Fermentpräparate wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen.

¹⁾ Meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. Curt HOFFMANN zu seinem 60. Geburtstag gewidmet.

Das Gleichgewicht der Reaktionen



liegt vollkommen auf Seiten der reduzierten Substanzen, so daß eine quantitative Bestimmung ermöglicht wird. Die Auswertung erfolgte nach dem von BÜCHER bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten von DPNH nach

$$\text{Mole DPNH} = \frac{\Delta E}{3,3} \times 10^{-6}$$

wobei ΔE die Extinktionsabnahme von DPNH bei 366 m μ bedeutet.

Ergebnisse

Es wurde zunächst die Verteilung der Substrate in der meristematischen Zone von *Laminaria saccharina* ausgetestet. Für Phosphor und Stickstoff wurde für beide Elemente eine identische Querverteilung in Laminarien beobachtet (HOFFMANN 1953, JACOBI 1954). Wir haben daher Thallusstücke oberhalb des Stiels von ca. 10 cm Länge halbiert und beide Teile getrennt analysiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 wiedergegeben, wo die vergleichbaren Thallusstücke mit a und b bezeichnet sind.

Tabelle 1

Substratbestimmung in *Laminaria saccharina*.

Angabe in 10^8 Mole/g Frischgewicht. Messungen an Pflanzen aus den Monaten Juni und Juli 1957.
(Abkürzungen: Brenztraubensäure = BTS, α -Ketoglutarinsäure = KGS).

a		b	
BTS	KGS	BTS	KGS
1,9	0,5	3,2	0,7
3,9	1,2	5,6	2,2
3,7	0,8	4,5	1,0
3,0	2,0	3,4	1,5
7,6	2,4	6,0	2,8
4,2	1,9	2,9	0,5

Abgesehen von der individuellen Fehlerbreite sind die analogen Thallusstücke einer Pflanze nicht miteinander vergleichbar, so daß hinsichtlich des Gehaltes an Brenztraubensäure und α -Ketoglutarinsäure kein Gradient aufgestellt werden kann, wie es für Phosphor und Stickstoff möglich ist. Die stationären Konzentrationen intermediärer Substrate sind auch wesentlich variabler, so daß lokale Stoffwechseländerungen in großflächigen Algen diese Unterschiede erklären. Verglichen mit den von HOLZER und Mitarb. (1955) gemachten Angaben ($3,4 \times 10^{-6}$ für Brenztraubensäure; $3,7 \times 10^{-6}$ für α -Ketoglutarinsäure) liegen die hier bestimmten Werte wesentlich niedriger als in Bäckerhefe. Zum Teil kann dieser Unterschied auf die große Menge an Gerüstsubstanz zurückgeführt werden, die in die Bezugsgröße des Frischgewichtes eingeht. Es ist jedoch weiterhin der Hinweis für eine sehr schwache Stoffwechselaktivität gegeben, die sich bei den Untersuchungen über den Bruttoumsatz der Meeresalgen mit den Methoden des Gasaustausches stets als erschwerend auswirkt.

Ein für die Betrachtung des Intermediärstoffwechsels interessanter Befund ist die größere Konzentration an Brenztraubensäure, verglichen mit der an α -Ketoglutarinsäure. HOLZER und Mitarb. fanden unter aeroben Bedingungen in Bäckerhefe ungefähr gleiche

Konzentrationen für beide Substrate; nur bei Zusatz von Ammoniumionen sinkt der Gehalt an α -Ketoglutar säure ab. Unter diesen Bedingungen wird das für *Laminaria* bestimmte Verhältnis angetroffen. HOLZER und Mitarb. diskutieren ihre Ergebnisse dahingehend, daß NH_4^+ die reduktive Aminierung von α -Ketoglutar säure zu Glutaminsäure fördert. Voraussetzung dafür wäre eine große Konzentration an Glutaminsäure-Dehydrogenase. Für das weitere Schicksal der Glutaminsäure wären Transaminasen verantwortlich. Beide Enzymsysteme konnten wir in der Grünalge *Ulva lactuca* (JACOBI 1957) nachweisen, wobei sich besonders eine hohe Aktivität an Glutamat-Aspartat-Transaminase abzeichnete. Es bleibt daher die Frage zu klären, ob in *Laminaria* die α -Ketoglutar säure umsetzenden Fermente — Ketoglutar säureoxydase, Glutaminsäure-Dehydrogenase und Transaminasen — in einer wesentlich höheren Konzentration vorliegen als die an der Brenztraubensäure ansetzenden. In keiner von uns untersuchten marinen Grün- und Rotalge konnte Pyruvat-Decarboxylase und Alkohol-Dehydrogenase nachgewiesen werden, so daß ein Umsatz von Brenztraubensäure in erster Linie über Pyruvat oxydase und Transaminasen gegeben ist. Liegen nun auch in *Laminaria* die gleichen Verhältnisse vor, so müßten die Konzentrationen dieser Enzyme relativ zur Glutaminsäure-Dehydrogenase oder Ketoglutaratoxydase sehr klein sein.

Eine höhere Brenztraubensäurekonzentration wurde bei Vergleichen von Algen verschiedener Entwicklungsstadien in jungen Pflanzen erfaßt. Es wurden Thalli von Pflanzen untersucht, die erst in der laufenden Vegetationsperiode gekeimt waren und mit meristematischen Thallusstücken von Vorjahrspflanzen verglichen. In Tabelle 2 sind die Werte für Brenztraubensäure angeführt, die an *Laminaria saccharina* und *L. digitata* gewonnen wurden.

Tabelle 2

Brenztraubensäurekonzentrationen junger und alter Thalli von *Laminaria saccharina* und *L. digitata*
 Angabe in 10^8 Mole/Gramm Frischgewicht.

	alt	jung
<i>Laminaria saccharina</i>	2,7	15,0
	1,6	9,8
	7,5	14,7
	6,3	10,2
<i>Laminaria digitata</i>	4,0	11,6
	2,5	10,1
	4,3	12,4
	4,6	
	5,5	
	3,8	

Aus dieser Zusammenstellung wird ersichtlich, daß junge Pflanzen eine wesentlich höhere Stoffwechselaktivität, gemessen an der Brenztraubensäurekonzentration, aufweisen. Dieser Befund deckt sich mit den bereits früher (JACOBI 1954) gefundenen Ergebnissen über den Stickstoffumsatz in *Laminaria saccharina*, in denen das Verhältnis Eiweiß-N: löslichem N in jungen Pflanzen zugunsten der löslichen Fraktion verschoben ist.

Zusammenfassung

Es wurden die stationären Substratkonzentrationen von Brenztraubensäure und α -Ketoglutar säure in *Laminaria saccharina* mit dem optischen Test bestimmt. Die Thalli

zeigen in der meristematischen Zone keine identische Querverteilung. Die Konzentration an Brenztraubensäure ist größer als an α -Ketoglutarensäure. In jungen Pflanzen aus der laufenden Vegetationsperiode wird, verglichen mit meristematischen Thallusstücken von Vorjahrspflanzen, in *Laminaria saccharina* und *L. digitata* eine höhere Konzentration von Brenztraubensäure bestimmt.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literaturverzeichnis

HOFFMANN, C., 1953: Weitere Beiträge zur Remineralisierung des Phosphors bei Meeresalgen. *Planta* 42, 156. — HOLZER, H., E. HOLZER und G. SCHULTZ, 1955: Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung. I. Versuche mit Hefezellen. *Biochem. Z.* 326, 385. JACOBI, G., 1954: Die Verteilung des Stickstoffs in *Fucus vesiculosus* und *Laminaria saccharina* und deren Abhängigkeit vom Jahresrhythmus. *Kieler Meeresf.* X, 37. DERS., 1957a: Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in Extrakten von *Ulva lactuca*. *Planta* 49, 1. — DERS., 1957b: Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels in *Ulva lactuca*. Transaminasen und Aminosäure-Dehydrogenasen. *Planta* 49, 561. DERS., 1957c: Vergleichend enzymatische Untersuchungen an marinen Grün- und Rotalgen. *Kieler Meeresf.* XIII, 212.