

Auch wenn also die intramolekulare Atmung nicht allein auf einer alkoholischen Gärung beruhen sollte, nehmen die in der Pflanze vorhandene aktive Karboxylase und das „Protein“ bei der Keimung erst zu und vor der Vollendung der Bildung des ersten Blattes ab.

Die Kokarboxylase bleibt in jedem Falle während dieser Zeit praktisch konstant.

Am Schlusse dieser Abhandlung möchte ich Herrn Dr. A. W. H. VAN HERK meinen Dank für sein förderndes Interesse an diesen Untersuchungen aussprechen.

Zusammenfassung.

1. Die Gesamtmenge Kokarboxylase bleibt während der Keimung von *Avena* gleich.
2. Das „Protein“ der Karboxylase nimmt anfangs zu, sinkt aber stark mit der Entwicklung des ersten Blattes.
3. Die Wirkung der aktiven Karboxylase in der Pflanze nimmt auch erst zu, aber später wieder ab¹⁾.
4. Wurzel und Blätter enthalten ungefähr gleiche Mengen aktive Karboxylase.
5. Die intramolekulare Atmung wird beschränkt durch Brenztraubensäure und auch durch Kokarboxylase.

Amsterdam, Pflanzenphysiologisches Laboratorium
der Universität.

¹⁾ Erst nach Beendigung unserer Untersuchung nahmen wir Kenntnis von der Arbeit von W. O. JAMES und I. P. NORVAL: The respiratory decomposition of pyruvic acid by Barley. *New Phytologist*, **37**, 455 (1938).

Botany. — Ueber die Enzyme, die bei der Verwandlung von Alanin und von Asparaginsäure durch *Aspergillus niger* beteiligt sind. Von J. C. MOOI. (Communicated by Prof. J. C. SCHOUTE.)

(Communicated at the meeting of January 28, 1939.)

Einleitung.

Aspergillus niger besitzt die Fähigkeit, sowohl Asparaginsäure als Alanin zu verwandeln. Es wird dann NH_3 abgespalten, das an die Aussenflüssigkeit abgegeben wird. Es kann die Frage gestellt werden, ob die Desaminierung dieser zwei Aminosäuren durch dasselbe Enzym oder durch verschiedene Enzyme geschieht.

Gesetzt, jeder dieser beiden Stoffe werde durch ein spezifisch wirkendes Enzym verwandelt, sodass beide Fermente unabhängig von einander sind. In diesem Falle wird die Desaminierung der einen Aminosäure nicht durch die Desaminierung der anderen Aminosäure beeinflusst werden. Fügt man zu einer *Aspergillus*-Kultur ein Gemisch beider Aminosäuren hinzu, dann wird die Desaminierungsgeschwindigkeit dieses Gemisches gleich der Summe der Desaminierungsgeschwindigkeiten jeder der beiden Aminosäuren sein. Letzteres geschieht unabhängig von dem Sättigungsgrade jedes der beiden Fermente.

Nehmen wir dagegen an, dass Asparaginsäure und Alanin durch dasselbe Enzym verwandelt werden, wenn auch mit verschiedenen Geschwindigkeiten, dann wird die Desaminierung der einen Aminosäure wohl durch diejenige der anderen Aminosäure beeinflusst werden, was von dem Sättigungsgrade des Fermentes abhängig ist.

Ist die Konzentration der einen Aminosäure so gering, dass das Ferment nicht gesättigt ist, dann wird nach Hinzufügung der Aminosäure die Desaminierungsgeschwindigkeit dieses Gemisches grösser werden. Anders wird die Sachlage aber, wenn man die Konzentration so stark wählt, dass das Ferment gesättigt ist. Dann wird Hinzufügung der zweiten Aminosäure (die weniger schnell desaminiert wird) die Verwandlungsgeschwindigkeit verkleinern, und zwar in dem Masse, in welchem beide Stoffe über die Enzymoberfläche verteilt werden.

Unter diesen Umständen wird die Desaminierungsgeschwindigkeit eines Gemisches zwischen den Desaminierungsgeschwindigkeiten beider Komponenten liegen und also geringer sein als diejenige der am schnellsten verwandelten Aminosäure.

Ausgehend von diesem Gedankengang ist es wenigstens in Theorie möglich, eine Antwort auf die gestellte Frage zu geben. *

§ 1. Methode.

Aspergillus niger wird auf RAULINS Lösung gezüchtet (auf 1 Liter Aqua dest. 46,4 g Zucker; 2,64 g Weinsteinsäure; 2,64 g NH_4NO_3 ; 0,24 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,16 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,28 g MgCO_3 ; 0,40 g K_2CO_3 ; 0,05 g FeSO_4 ; 0,05 g ZnSO_4). Diese wird mit einer Sporensuspension geimpft und verbleibt während 2 Tage in einem Thermostat bei 30°C . Dann hat sich eine geschlossene Pilzdecke entwickelt. VAN WAESBERGHE¹⁾ hat gefunden, dass die Anwesenheit von Stoffen wie Glukose die Desaminierung hemmt. Er verarmte die Pilzdeckchen auf Aqua dest. und erhielt dann die grösste Desaminierungsgeschwindigkeit nach einer Verarmung von ungefähr 16 Stunden. Diese Verarmung wurde auch hier angewandt. Sodann wird das Wasser abgegossen und durch die Probeflüssigkeit ersetzt (30 ccm biphosphathaltige Aminosäure, p_H ungefähr 4). Die Ammoniakbildung verändert den p_H zwar; aber dieser steigt höchstens bis auf 6,5.

Das Ammoniak wird dadurch bestimmt, dass die Flüssigkeit alkalisch gemacht wird, das Ammoniak durch Luft vertrieben und in saures Milieu aufgefangen und dieses titriert.

§ 2. Einfluss der Zeit auf die Desaminierungsgeschwindigkeit.

Es wird untersucht, ob die Kulturen von Aspergillus niger gleich nach Zusatz von Aminosäure die Höchst-Desaminierungsgeschwindigkeit aufweisen, oder ob diese sich im Laufe der Zeit verändert; siehe die graphischen Darstellungen 1 und 2 bezw. für Asparaginsäure und Alanin.

Aus diesen graphischen Darstellungen ist ersichtlich, dass diese Geschwindigkeit sowohl bei Asparaginsäure als bei Alanin anfänglich zunimmt, 3—20 Stunden nach dem Anfang des Versuches nahezu konstant bleibt und dann wieder zuzunehmen scheint.

Der Umstand, dass während der ersten drei Stunden die Geschwindigkeit (wenigstens die Ammoniakbildung in der Aussenflüssigkeit) geringer ist, könnte den folgenden Ursachen zugeschrieben werden: 1. Zeitweilig kann eine Verminderung durch eine Bindung des Ammoniaks durch den Pilz auftreten. 2. Möglich ist auch, dass die Permeabilität der Pilzdecke in bezug auf die Aminosäure zunimmt.

Bei der weiteren Untersuchung stehen die Pilzdecken erst etwa 3 Stunden auf der Probeflüssigkeit. Die folgenden 3—4 Stunden dienen dann zur Bestimmung der Desaminierungsgeschwindigkeit.

§ 3. Einfluss der Konzentration auf die Desaminierungsgeschwindigkeit.

Nun wird, nach der in § 2 beschriebenen Methode der Einfluss der verschiedenen Konzentrationen auf die beiden Aminosäuren verfolgt. Das Ergebnis ist in den graphischen Darstellungen 3 und 4 niedergelegt.

¹⁾ H. P. J. M. VAN WAESBERGHE, S. J. Recherches sur le métabolisme d'acides aminés par des moisissures. Rec. trav. bot. néerl., 34, 650 (1937).

Die graphische Darstellung 3 von Alanin lehrt, dass bei Zunahme der Konzentration die Desaminierungsgeschwindigkeit erst zunimmt. Aus

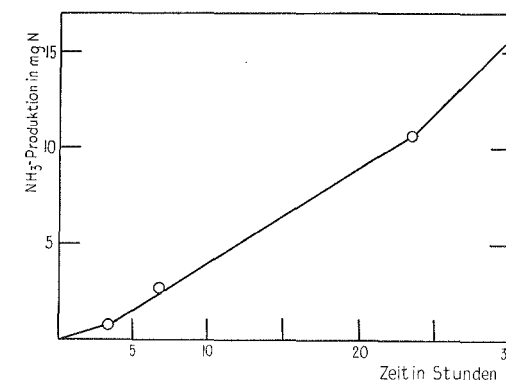


Fig. 1. NH_3 -Produktion von Aspergillus. 5 Pilzdeckchen, gezüchtet auf RAULIN-Lösung, 12 Stunden verarmt, dann auf 0,04 Mol. Asparaginsäure-Lösung, 30 ccm pro Deckchen, NH_3 -Produktion pro 30 ccm in mg $\text{NH}_3\text{-N}$.

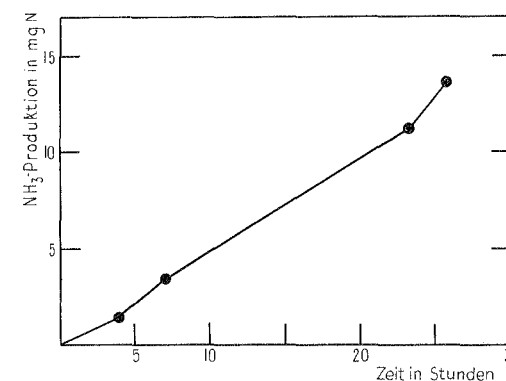


Fig. 2. NH_3 -Produktion von Aspergillus; wie in Fig. 1, aber auf 30 ccm Alaninlösung; 0,04 Mol.; NH_3 -Produktion pro 30 ccm in mg $\text{NH}_3\text{-N}$.

Kurve I folgt, dass die Höchstgeschwindigkeit bei einer Konzentration von 0,40 Mol. Alanin erreicht wird. Ein zweiter Versuch (siehe Kurve II), bei dem auch die Konzentration 0,60 Mol. Alanin angewandt wurde, lehrt, dass bei höherer Konzentrierung eine Abnahme stattfindet. Man könnte dies dem Umstande zuschreiben, dass die Konzentration (etwa 5%) dann zu hoch wird.

Die graphische Darstellung 4 von Asparaginsäure lässt eine Zunahme der Desaminierungsgeschwindigkeit bei steigender Konzentrierung erkennen. Aber hier wird kein Maximum erhalten, da die Löslichkeit dieser Säure nicht grösser ist als 0,16 Mol. Bei dieser Konzentration steigt die Kurve noch immer.

Da diese Versuche mit Pilzdeckchen verschiedener Herkunft ausgeführt sind, lässt sich aus diesen Kurven nicht entscheiden, welche der beiden Aminosäuren die grösste Verwandlungsgeschwindigkeit hat. Daher wur-

den die beiden Stoffe einer Reihe Pilzdeckchen, die unter völlig gleichen Verhältnissen gewachsen waren, hinzugefügt. Das Resultat dieses Versuches erhellt aus der graphischen Darstellung 5. Aus dem Verlaufe der

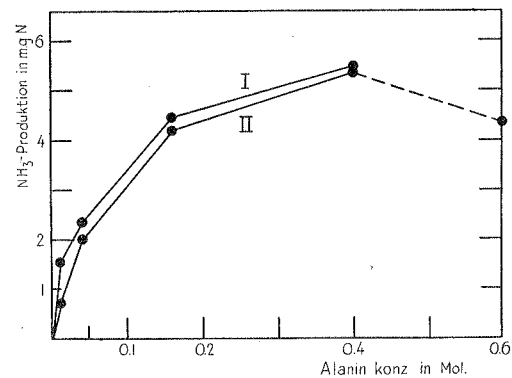


Fig. 3. Einfluß der Alaninkonzentration auf die Desaminierungsgeschwindigkeit. Verarmter Aspergillus während 4 Stunden auf 30 ccm Probelösung; dann NH_3 -Produktion bestimmt während 3 Stunden, ausgedrückt in mg NH_3 -Stickstoff pro 30 ccm. Doppelbestimmung.

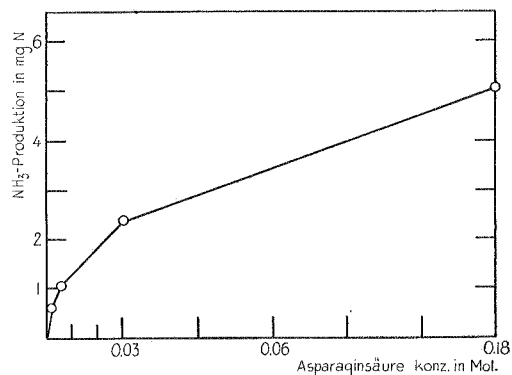


Fig. 4. Einfluß der Asparaginsäurekonzentration auf die Desaminierungsgeschwindigkeit. Wie in Fig. 3.

beiden Kurven geht hervor, dass die Verwandlungsgeschwindigkeiten beider Aminosäuren praktisch gleich sind.

§ 4. Die Desaminierung von Gemischen beider Aminosäuren.

Es wurden 20 Pilzdeckchen gezüchtet. Vier Portionen von je 5 Stück wurden beziehungsweise mit folgenden Lösungen versehen: a) Lösung von 0,08 Mol. Asparaginsäure; b) Lösung von 0,40 Mol. Alanin; c) Lösung von 0,08 Mol. Asparaginsäure + 0,40 Mol. Alanin; d) reines Wasser (als blanco-Versuch). Ebenso wie in den vorigen Versuchen standen die Deckchen erst etwa 3 Stunden auf den Lösungen, und erst danach wurde mit dem Versuch begonnen. Nach 3—4. Stunden wurde das Ammoniak bestimmt.

Dieser Versuch wurde in duplo angestellt, und auch wurde noch ein dritter Versuch ausgeführt, wobei die Konzentration 0,48 Mol. Alanin

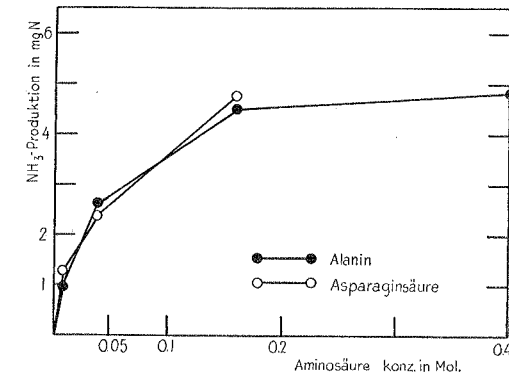


Fig. 5. Vergleichung der Desaminierungsgeschwindigkeit von Aspergillus auf Asparaginsäure- und Alanin-Lösung. Verarmte Deckchen, wie gezüchtet, während 4 Stunden auf 30 ccm Aminosäurelösung, danach während 3 Stunden NH_3 -Produktion bestimmt, ausgedrückt in mg NH_3 -N je 30 ccm.

benutzt wurde. Die Ergebnisse dieser Versuche findet man in nachstehender Tabelle, in welcher die Ammoniakproduktion angegeben ist als Mass für die Desaminierungsgeschwindigkeit.

TABELLE I.

Ammoniakproduktion verarmter *Aspergillus niger*-Decken während 3 Stunden auf 30 ccm Probelösung bei 30° C, ausgedrückt in mg N pro 30 ccm Flüssigkeit.

Probelösung	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
0,08 Mol. Asparaginsäure	3,00	2,78	1,65
0,40 Mol. Alanin	4,33	3,52	2,61
0,40 Mol. Alanin + 0,08 Mol. Asparaginsäure	5,52	4,53	3,43
0,48 Mol. Alanin	—	—	2,31

Die Konzentration von Alanin (0,40 Mol.) ist gleich derjenigen, bei welcher die höchste Verwandlungsgeschwindigkeit auftritt. Aus der Tabelle folgt, dass unter diesen Verhältnissen die Desaminierungsgeschwindigkeit eines Gemisches von Alanin und Asparaginsäure (mit einer Gesamtkonzentration von 0,48 Mol.) grösser als diejenige der beiden Bestandteile des Gemisches ist.

Hieraus folgt, dass das Enzym, das die Desaminierung von Asparaginsäure herbeiführt, nicht dasselbe ist, wie das Enzym, das Alanin spaltet. Es zeigt sich also, dass die erste in der Einleitung geäußerte Annahme die richtige ist. Dies gilt jedoch allein für den Fall, dass die Permeabilität nicht als beschränkender Faktor auftritt, sodass die Aminosäuren frei an die aktive Oberfläche des Enzyms kommen können und nur die Konzentration als beschränkender Faktor für die Desaminierungsgeschwindigkeit anzusehen ist.

Man findet nicht, dass die Verwandlungsgeschwindigkeit die Summe der Verwandlungsgeschwindigkeiten der beiden Komponenten ist. Vielleicht liegt die Ursache dieser Erscheinung in einer teilweisen Besetzung der aktiven Fermentoberfläche durch die Aminosäure, die nicht durch dieses Ferment desaminiert wird, sodass die Desaminierungsgeschwindigkeit der anderen Aminosäure infolgedessen vermindert wird; (siehe WIELAND und MITCHELL) ¹⁾).

Am Schlusse dieses Artikels möchte ich Herrn Dr. A. W. H. VAN HERK meinen Dank für sein hilfebetätigtes Interesse an dieser Untersuchung aussprechen.

*Amsterdam, Pflanzenphysiologisches Laboratorium
der Universität.*

¹⁾ H. WIELAND und W. MITCHELL, Ueber den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. XXIX Ann. 492, 156 (1932).

Zoology. — *Ein Oestruszyklus bei Lebistes reticulatus (Petus).* Von C. J. JASKI. (Aus dem Laboratorium für experimentelle Histologie des Zoologischen Institutes, Utrecht, Leiter: G. C. HIRSCH.) (Communicated by Prof. H. J. JORDAN.)

(Communicated at the meeting of January 28, 1939.)

Lebistes reticulatus gehört zu den lebendgebärenden Cyprinodonten und wird wegen der schönen Farben des Männchens viel durch Aquariumliebhaber gehalten. Es ist bekannt, dass bei dieser Gruppe das Sperma übertragen wird durch ein Gonopodium des Männchens, welches aus einer umgebildeten Afterflosse entstanden ist. Es ergibt sich aus dem Bau und der Lage dieses Gonopodiums und der Genitalöffnung des Weibchens, dass das Gonopodium die Urogenitalpapille des Weibchens nicht erreichen kann, wenn das Weibchen in einer normalen Haltung sich befindet. Es ist vielmehr notwendig, dass das Weibchen zum Zwecke der Kopulation einen schrägen Stand einnimmt, mit dem Kopf nach oben. Ein solcher Stand kann als Ausnahme dadurch entstehen, dass bei dem stürmischen Andrang der Männchen ein Weibchen in eine Ecke gedrängt wird und bei dem Versuch zu entkommen eine Schräghaltung mit dem Kopf nach oben annimmt. Ich konnte jedoch bei meinen über 1000 Beobachtungen nur 1—2 mal wahrnehmen, dass es auf diese Weise zu einer Kopulation kam. Es kann also nur zufällig durch einen heftigen Andrang des Männchens eine solche für die Kopulation notwendige Schräghaltung entstehen.

Die normale Kopulation wird jedoch auf eine andere Weise vorbereitet, die man sich zunächst durch eine

Beobachtung des normalen Verhaltens

deutlich machen kann. Wenn man etwa 40 gutausgewachsene, isoliert aufgezogene und jungfräuliche Weibchen bei 27° C mit 80 Männchen vereinigt in etwa 200 Liter Wasser — dann sieht man, dass zunächst die Männchen die Weibchen hartnäckig verfolgen, ohne jedoch im Anfang eine Kopulation vollziehen zu können. Erst nach 3—4 Tagen tritt, innerhalb einiger weniger Stunden, eine Veränderung im Verhalten der Weibchen auf:

1. Alle Weibchen stehen in einer auffallend steilen Haltung, bei welcher die Wirbelsäule einen Winkel bis 30—70° bildet mit der Horizontallinie ¹⁾. Ich möchte diesen erhöhten Grad mit der Horizontalen von jetzt ab die *Elevation der Weibchen* nennen.

¹⁾ Vollreife Weibchen „stehen“ fast nie genau horizontal. Die Wirbelsäule steht immer etwas schräg und zwar selten weniger als 15°.