

ben über die Identität solcher Produkte insofern als von heuristischem Wert, als deren Applikation bei andern Pilzen sowohl gleiche als auch bisher unbekannte physiologische Effekte hervorrufen kann. Schliesslich erfordern die chemische Charakterisierung der verschiedenen Entwicklungsstadien ein und desselben Pilzes sowie eine chemotaxonomische Unterscheidung von Mycelien verschiedener Stämme und Arten ebenfalls Kenntnisse über die qualitative Zusammensetzung der betreffenden Stofffraktion, und zwar selbst dann, wenn solche gaschromatographischen Studien vorwiegend durch «fingerprinting» erfolgen sollen.

Wie Figur 1 zeigt, enthalten Champignonsporen neben als Myzelprodukte von *A. bisporus* bereits beschriebenen Stoffen (Äthanol, Aceton, Acetaldehyd, Äthylacetat) auch Essigsäure, Isobutanol, Butanol, Isoamyl- und Amylalkohol sowie Äthylmethylketon. Analyse gleicher Extrakte bei höherer Temperatur analog der Figur 2 ergab ferner das Vorhandensein von Isobutter-, Butter- und Isovaleriansäure. Die Identität einzelner der durch Co-Chromatographie bestimmten Substanzen wurde nach Abfängen des betreffenden Stoffes durch IR-Spektroskopie (Perkin-Elmer 157, Mikrozele) bestätigt. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die Existenz von lediglich sehr geringen Mengen niederer Fettsäuren in den ja auch in geruchlicher Hinsicht deutlich von Mycelium und Fruchtkörperplectenchym verschiedenen Sporen. Alle genannten Stoffe werden auch vom Mycelium gebildet, wobei jedoch der im Verhältnis zu Material aus den beiden andern untersuchten Entwicklungsstadien bedeutend höhere Gehalt an Isobuttersäure und Isobutanol auffällt. Die Stofffraktion nach saurer Wasserdampfdestillation von Fruchtkörperextrakten zeigt qualitativ ebenfalls dieselbe Zusammensetzung.

Nach diesen vorläufigen Untersuchungen erweist sich der Kulturchampignon als versatiler Gärungsorganismus, stellen doch die meisten der hier nachgewiesenen Substanzen auch Komponenten des bei der Bier- und Weingärung gebildeten Fuselöls dar<sup>8</sup>. Äthanol dürfte, da ja auch Acetaldehyd vorkommt, in gleicher Weise wie bei Bäckerhefe gebildet werden. Im speziellen ist darauf hinzuweisen, dass eine Aceton-Butanol-Gärung in *A. bisporus* im Gegensatz

zu einer anderswo geäusserten Meinung<sup>9</sup> als durchaus möglich erscheint. Durch den Nachweis von Aceton auch im Fruchtkörperplectenchym ist zudem ein bisher als charakteristisch betrachteter Unterschied zwischen diesem und vegetativem Mycelium<sup>9</sup> hinfällig geworden. Über die Bildung von Isovaleriansäure und Isoamylalkohol in sämtlichen Entwicklungsstadien des Kulturchampignons ist schon früher berichtet worden; die Identifikation dieser Produkte erlaubte es, die keimungsstimulierende Wirkung der Gesamtheit der leichtflüchtigen Metabolite von *A. bisporus* bei Sporen der eigenen Art stofflich zu lokalisieren und bildete die Grundlage zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der beiden «Triggers»<sup>10</sup>. Schliesslich stellen einige der in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen – ebenso wie in Früchten<sup>11</sup> – Aromakomponenten des Kulturchampignons dar. Tatsächlich entspricht der Geruch der sauren Wasserdampfdestillate sowohl von Sporokarpen als auch von Myzelkulturen demjenigen frischer Pilze<sup>12</sup>.

**Summary.** The composition of the volatile fractions (isolated by acidic steam distillation) of the spores, substrate mycelium and fruiting body of the common mushroom is investigated. The physiological and/or biochemical functions of some of the identified substances are discussed.

E. J. STÄUBLE und DORA RAST

*Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich, Künstlergasse 16, CH-8006 Zürich (Schweiz), 1. März 1971.*

<sup>8</sup> R. STEVENS, J. Inst. Brew. 66, 453 (1960).

<sup>9</sup> H. J. TSCHIERPE, Arch. Mikrobiol. 52, 231 (1965).

<sup>10</sup> D. RAST und E. J. STÄUBLE, New Phytol. 69, 557 (1970).

<sup>11</sup> H. E. NURSTEN, in *The Biochemistry of Fruits and their Products* (Ed. A. C. HULME; Academic Press, New York 1970), vol. 1, p. 239.

<sup>12</sup> Die Autoren danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für finanzielle Beiträge und der Firma E. Hauser-Champignonkulturen AG, Gossau (ZH), für Pilzlieferungen.

## The Effect of NADH and NAD<sup>+</sup> on the Proteolysis of Lactate Dehydrogenase Isozymes by Trypsin

It has been demonstrated<sup>1</sup> that the susceptibility of LDH isozymes to proteolysis varies. A bacterial peptidase, subtilisin has been found to digest LDH 5 (M<sub>4</sub>) only, while the activity of LDH 1 (H<sub>4</sub>) is left unaltered<sup>2</sup>. Conformational changes induced by coenzyme, substrates and ions have also been reported to cause modified susceptibility of additional enzymes to proteolysis<sup>3-10</sup>. The present study was undertaken to investigate the effect of NADH and NAD<sup>+</sup> on the proteolysis of LDH 1 and LDH 5 by trypsin. NADH (Kyowa Makko Kogyo, Japan), NAD<sup>+</sup> (Reanal, Hungary), trypsin (Carl Roth, Western Germany) 3 times crystallized were used. LDH 1 (H<sub>4</sub>) crystallized from swine heart containing 98% H<sub>4</sub> (Figure 1) was purchased from Serva. A LDH preparation crystallized from swine skeletal muscle (Reanal) abundant in LDH 5 was dialyzed against Tris-HCl buffer and purified further by DEAE-cellulose (Macherey Nagel 2100) chromatography<sup>11</sup> to obtain LDH 5 (M<sub>4</sub>), the purity of which was checked by agar gel electrophoresis (Figure 1). Protein content was measured at 280 nm. All materials were dis-

solved in 0.05 M Tris-HCl buffer containing 6.10<sup>-4</sup> M CaCl<sub>2</sub> adjusted to pH 7.6. Proteolysis was started by adding trypsin (50 µg) to the samples. 1.0 ml was the final volume of each sample. Temperature was kept con-

<sup>1</sup> J. CLAUSEN and B. ØVLISEN, Biochem. J. 97, 513 (1965).

<sup>2</sup> E. S. VESSEL and K. L. YIELDING, Ann. N. Y. Acad. Sci. 151, 678 (1968).

<sup>3</sup> G. SZABOLCSI, Acta physiol. hung. 13, 213 (1958).

<sup>4</sup> P. ELŐDI and G. SZABOLCSI, Nature, Lond. 184, 56 (1959).

<sup>5</sup> R. T. SCHIMKE, E. W. SWEENEY and C. M. BERLIN, J. biol. Chem. 240, 4609 (1965).

<sup>6</sup> P. S. FITT and E. A. FITT, Biochem. J. 105, 25 (1967).

<sup>7</sup> D. K. MCCLINTOCK and G. MARKUS, J. biol. Chem. 243, 2855 (1968).

<sup>8</sup> F. CHATAGNER, Y. GICQUEL, C. PORTER and M. TIXIER, Experientia 26, 602 (1970).

<sup>9</sup> L. MUSZBEK and J. SÜMEGI, Experientia 26, 25 (1970).

<sup>10</sup> J. SOMOGYI, Biochim. biophys. Acta 157, 421 (1967).

<sup>11</sup> J. SÜDI, Biochim. biophys. Acta 212, 213 (1970).

stant (38°C) in an ultrathermostat. At different intervals aliquots of 0.05 ml were removed and after appropriate dilution LDH activities assayed in duplicate by UV-spectrophotometric method, using pyruvate as substrate. Values measured at zero time are given as 100% activities.

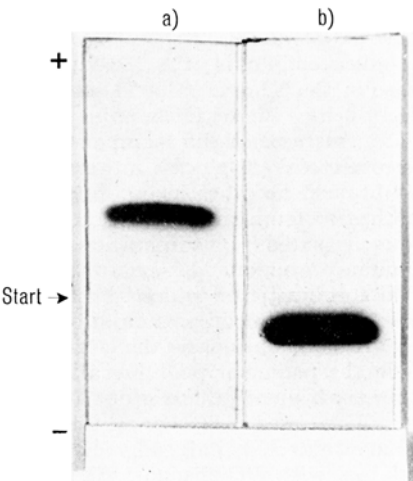


Fig. 1. Demonstration of LDH isozymes used in this study. a) LDH1 (H<sub>4</sub>); b) LDH5 (M<sub>4</sub>). Electrophoresis was carried out in agar gel at 10 V/cm for 50 min using sodium barbital buffer (pH 8.6, ionic strength 0.05).

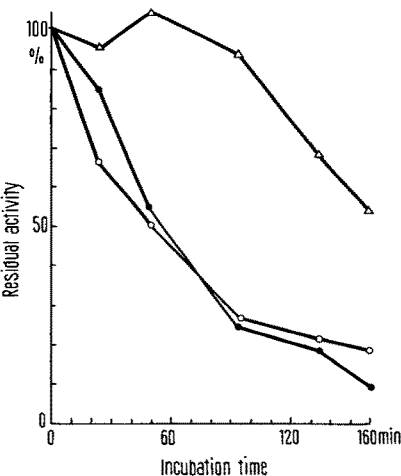


Fig. 2. Time course of proteolysis of LDH1 incubated at 38°C. a) ○—○, with trypsin (50 μg/ml); b) ×—×, with NADH (1.75 × 10<sup>-3</sup> M) + trypsin, and c) △—△, with NAD<sup>+</sup> (1.75 × 10<sup>-3</sup> M) + trypsin. The concentration of LDH1 was 9 × 10<sup>-7</sup> M.

Proteolysis of LDH 5 at 25°C for 150 min

| Treatment                  | Residual activity (%) |
|----------------------------|-----------------------|
| Trypsin                    | 51.5                  |
| NADH + trypsin             | 64.3                  |
| NAD <sup>+</sup> + trypsin | 70.6                  |

Conditions as in Fig. 3., except the concentration of trypsin which was increased to achieve similar rate of digestion as at 38°C.

The addition of NAD<sup>+</sup> in a concentration of 1.75 × 10<sup>-3</sup> M was found to protect markedly LDH 1 against proteolysis, while NADH failed to afford protection (Figure 2). No protective effect could be observed either by NADH or NAD<sup>+</sup> when LDH 5 was submitted to proteolysis by trypsin (Figure 3). Since LDH 5 has been reported much more

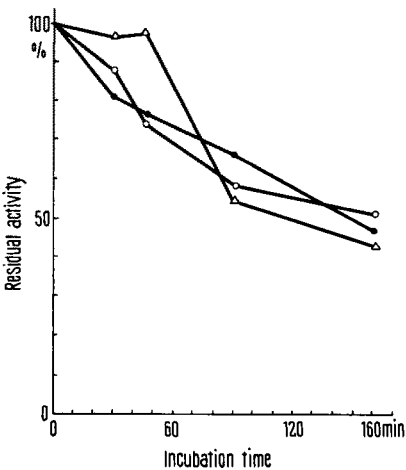


Fig. 3. Time course of proteolysis of LDH5 incubated at 38°C. a) ○—○, with trypsin (50 μg/ml); b) ×—×, with NADH (1.75 × 10<sup>-3</sup> M) + trypsin, and c) △—△, with NAD<sup>+</sup> (1.75 × 10<sup>-3</sup> M) + trypsin. The concentration of LDH 5 was 12 × 10<sup>-7</sup> M.

thermolabile than LDH 1 at 39°C in Tris buffer<sup>12</sup>, proteolysis was also performed at 25°C, but essentially the same results were obtained as at 38°C (Table).

It is of interest that NADH, which is known to protect LDH against heat inactivation<sup>2,11</sup>, failed to protect even LDH 1 against proteolysis, according to the data presented. Similar phenomenon was observed by SCHIMKE et al.<sup>8</sup>, investigating the heat stability and proteolytic susceptibility of rat liver tryptophan pyrrolase using some tryptophan analogues.

Very little is known about the fate of individual LDH isozymes within the cell. Several authors<sup>2,13</sup> have recently raised the possibility of selective destruction. Altered conformational flexibility may also cause a shift in protein resistance by influencing degradation rate<sup>14</sup>.

**Résumé.** L'effet de la NADH et NAD<sup>+</sup> sur la protéolyse de la lactico-déhydrogénase isoenzyme 1 (LDH 1) et isoenzyme 5 (LDH 5) par la trypsine fut étudié. Les résultats montrent que la NAD<sup>+</sup> exerce une protection contre la protéolyse de la LDH 1. Mais ni la NADH ni la NAD<sup>+</sup> ne protègent contre la protéolyse de la LDH 5.

L. SELMECI and E. PÓSCH

*Institute of Pathophysiology,  
Semelweis University Medical School,  
Budapest IX (Hungary), 8 March 1971.*

<sup>12</sup> E. S. VESSEL, P. J. FRITZ and E. L. WHITE, *Biochim. biophys. Acta* 159, 236 (1968).  
<sup>13</sup> C. L. MARKERT and G. S. WHITT, *Experientia* 24, 977 (1968).  
<sup>14</sup> V. YA. ALEXANDROV, *Curr. mod. Biol.* 3, 9 (1969).