

Dingen die Einwirkung verschiedener Concentrationen zu studiren und das Verhalten der Pflanze bei lang andauernder Wirkung der Säure kennen zu lernen. Dann aber sollen die Untersuchungen auch auf die anderen in Rauchgasen vorkommenden Säuren ausgedehnt werden, welche sich nach unseren allerdings beschränkten Erfahrungen mit der schwefligen Säure vielleicht mit graduellen Unterschieden ebenso verhalten werden.

Botanisches Institut der Technischen Hochschule zu Aachen
im October 1900.

45. Wl. Butkewitsch: Ueber das Vorkommen proteolytischer Enzyme in gekeimten Samen und über ihre Wirkung.

II. Vorläufige Mittheilung.

Eingegangen am 16. October 1900.

In meiner ersten Mittheilung¹⁾ habe ich Versuche beschrieben, welche zu der Schlussfolgerung führen, dass in den Keimpflanzen der Lupinen und einiger anderer Gewächse ein eiweisslösendes und eiweisspaltendes Enzym sich vorfindet. Bei Ausführung dieser Versuche wurden Keimpflanzen von geringem Alter bei 35—40° getrocknet, dann fein zerrieben und mit Aether extrahirt; abgewogene Proben des Pulvers wurden mit Wasser und Thymol in Glaskölbchen gebracht und eine Woche oder auch länger im Thermostaten auf 35—40° erhitzt. Durch analytische Bestimmungen liess sich nachweisen, dass unter diesen Umständen — gewissermassen in Folge einer „Selbstverdauung“ der Keimpflanzensubstanz — die Eiweissstoffe an Menge abnahmen, unter Bildung von Spaltungsproducten, von denen nur ein Theil durch Phosphorwolframsäure fällbar war. Diese Erscheinung trat bei im Uebrigen gauz gleicher Behandlung nicht ein, wenn der Inhalt der Kölbchen kurze Zeit zum Kochen erhitzt worden war.

Es war nun zu untersuchen, ob dieses Enzym aus den Keimpflanzen zur Abscheidung gebracht werden konnte. Ich extrahirte zu diesem Zweck die bei 35—40° getrockneten und dann fein zerriebenen Cotyledonen sechstägiger Keimpflanzen von *Lupinus luteus* mit Glycerin und versetzte den Extract mit Weingeist. Es entstand eine starke Fällung, welche auf einem Filter gesammelt, mit Weingeist

1) Diese Berichte. Bd. XVIII, 1900, S. 185.

gewaschen und sodann über concentrirter Schwefelsäure getrocknet wurde. Bei Behandlung dieses Productes mit Wasser entstand eine Flüssigkeit, welche bei 35—40° Eiweissstoffe zu lösen und zu spalten vermochte.

Für die bezüglichen Versuche verwendete ich vorzugsweise ein aus Lupinensamen nach RITTHAUSEN's Methode dargestelltes Präparat von Conglutin. In zwei Versuchen liess ich auf das Conglutin die in der vorher beschriebenen Weise erhaltene Enzymlösung einwirken, nachdem letztere durch Dialyse unter Chloroformzusatz von den diffusiblen Stoffen befreit worden war. In beiden Versuchen wurde als antiseptisches Mittel Chloroform, im zweiten Versuch auch noch Blausäure zugesetzt¹⁾. Die Dauer der Einwirkung des Enzyms betrug 7 Tage. Es zeigte sich, dass ein beträchtlicher Theil des Conglutins aufgelöst worden war²⁾; den Beweis dafür geben folgende Zahlen:

In die Kölbchen wurden gebracht, je 3,5 g Conglutin = 3,16 g wasserfrei.

Nach 7 Tagen fanden sich ungelöst vor:

| | |
|------------------------|--------|
| im Versuch I | 2,11 g |
| „ „ II | 1,71 „ |

Also waren in Lösung gegangen:

| | |
|------------------------|--------|
| im Versuch I | 1,05 g |
| „ „ II | 1,45 „ |

Eine Abnahme der Conglutinmenge war dagegen nicht zu constatiren in einem Controllversuch, in welchem bei im Uebrigen ganz gleichem Verfahren die Enzymlösung vor ihrer Anwendung zum Kochen erhitzt worden war.

Die in Versuch I und II erhaltenen Lösungen wurden durch Versetzen mit Tannin und Bleiessig gereinigt, sodann durch Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei befreit, mit Ammoniak neutralisirt und zum Syrup eingedunstet. Aus letzterem schied sich in geringer Menge eine dem unreinen Leucin gleichende Substanz aus. Sie löste sich in heissem Weingeist nach Zusatz von Ammoniakflüssigkeit. Die Lösung lieferte beim Verdunsten eine weisse Substanz, welche beim Erhitzen im Glasröhrchen das Verhalten des Leucins zeigte. Beim Erhitzen mit MILLON'schem Reagens gab sie eine röthlich gefärbte

1) Aus Versuchen, welche hier nicht mitgetheilt werden sollen, geht hervor, dass geringer Blausäurezusatz die Wirkung des Enzyms unterstützt.

2) Das verwendete Conglutin war nach der Ausfällung aus alkalischer Lösung mit Alkohol und Aether behandelt und über Schwefelsäure getrocknet worden. Es ist vielleicht nicht unmöglich, dass es durch diese Behandlungsweise schwieriger angreifbar durch Enzyme geworden war.

Lösung, was darauf hindeutet, dass ihr ein wenig Tyrosin beigemischt war. (Bestimmt nachgewiesen ist die Bildung von Leucin und Tyrosin in dem später beschriebenen Versuch III). Auch bei wochenlangem Stehen lieferte der in der beschriebenen Weise erhaltene Syrup keine Krystalle von Asparagin.

Für den dritten Versuch verwendete ich 6 g Conglutin = 5,42 g wasserfrei. Das in Anwendung gebrachte Enzym war nicht durch Dialyse gereinigt worden, doch war ihm weder Leucin noch Tyrosin beigemischt. Die Einwirkung des Enzyms auf das Conglutin erfolgte wieder bei 35—40°, und zwar unter Zusatz von Thymol und Chloroform und dauerte 3 Wochen. Ungelöst blieben 2,66 g Conglutin, also waren 2,76 g aufgelöst worden. Die vom Rückstand abfiltrirte Lösung wurde zunächst unter Zusatz von etwas Essigsäure aufgeköcht, dann noch einmal filtrirt, im Wasserbade stark concentrirt und hierauf mit dem mehrfachen Volumen Weingeist versetzt, wobei eine starke Ausscheidung entstand. Die nach 24 Stunden von dieser Ausscheidung abgegossene klare weingeistige Lösung wurde bis zum Syrup eingedunstet. Aus letzterem schied sich eine dem unreinen Leucin gleichende Substanz aus, die ich mit Hilfe eines Zeugfilters von der Mutterlauge trennte und dann noch, zur Entfernung der letzten Antheile der Mutterlauge, auf eine Thonplatte aufstrich. Aus der Mutterlauge liess sich eine Substanz gleicher Art noch in folgender Weise gewinnen: die mit Wasser verdünnte Mutterlauge wurde mit Bleiessig versetzt, der durch dieses Reagens erzeugte Niederschlag abfiltrirt, dem Filtrat Ammoniak und noch mehr Bleiessig zugefügt. Es entstand ein neuer Niederschlag, welcher abfiltrirt, ausgewaschen, dann in Wasser vertheilt und mit Schwefelwasserstoff behandelt wurde. Die vom Schwefelblei abfiltrirte Lösung lieferte beim Verdunsten eine leucinartige Substanz, die mit der zuerst erhaltenen vereinigt wurde. Nach dem Trocknen über Schwefelsäure wurde dieses Product zerrieben, mit Weingeist übergossen und im Wasserbade erhitzt; dann wurde concentrirte Ammoniakflüssigkeit in kleinen Portionen zugefügt. Der grösste Theil jenes Productes löste sich auf; zurück blieb in kleiner Menge eine Substanz, die sich als Tyrosin erwies. Sie war schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Ammoniakflüssigkeit und gab sowohl die HOFFMANN'sche als die PIRIA'sche Reaction. Die vom Tyrosin abfiltrirte weingeistig-ammoniakalische Lösung lieferte beim Verdunsten über Schwefelsäure eine Substanz, welche nach mehrmaligem Umkrystallisiren aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit das Aussehen und Verhalten des Leucin zeigte. Sie bildete weisse, glänzende Krystallblättchen, die sich ziemlich schwer in kaltem Wasser, sehr schwer in Weingeist, leicht in einem Gemisch von heissem Weingeist und Ammoniakflüssigkeit lösten. Beim Erhitzen im Glasröhrchen verflüchtigten sie sich fast

ohne Rückstand unter Bildung eines weissen Sublimats; gleichzeitig trat der Geruch nach Amylamin auf. Ihre heisse wässerige Lösung gab auf Zusatz von Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Sie lösten sich nicht in einer gesättigten wässerigen Leucinlösung¹⁾.

Die im Vorigen mitgetheilten Versuchsergebnisse beweisen, dass bei Einwirkung der enzymhaltigen Flüssigkeit auf Conglutin Leucin und Tyrosin gebildet worden waren. Dass neben diesen Producten Asparagin entstanden war, konnte nicht nachgewiesen werden.

In Uebereinstimmung mit diesem Befund stehen die Beobachtungen, die ich in Bezug auf die Qualität der bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz entstehenden Producte machte. Ich brachte je 50 g der in der früher beschriebenen Weise präparirten Keimpflanzenpulver (von 4tägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* stammend) unter Hinzufügen von Wasser und von Thymol in zwei Glaskolben. Der Kolben A wurde mit seinem Inhalt bis fast zum Siedepunkt erhitzt, der Kolben B dagegen nicht. Beide Kolben wurden sodann 7 Tage lang im Thermostaten auf 35—40° erwärmt. Dann brachte ich ihren Inhalt auf das Filter, versetzte die Filtrate mit Bleiessig, befreite die von den Bleiniederschlägen abfiltrirten Flüssigkeiten mit Hilfe von Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei und dunstete sie sodann im Wasserbade ein. Der Inhalt des Kolbens A, der bei Beginn des Versuches zum Kochen erhitzt worden war, lieferte bei solcher Behandlung eine Flüssigkeit, aus welcher eine Ausscheidung von Amidosäuren nicht erfolgte, auch dann nicht, als diese Flüssigkeit mit viel Weingeist versetzt, die dadurch gefällte Substanz beseitigt und das Filtrat zum Syrup eingedunstet wurde²⁾. Bei ganz gleicher Behandlung lieferte dagegen der nicht bis auf den Siedepunkt erhitzte Inhalt des Kolbens B ein dem unreinen Leucin gleichendes Product, welches ganz ebenso behandelt wurde wie die im dritten Conglutinversuch erhaltene gleichartige Substanz. Sein

1) Zur Darstellung dieser Leucinlösung diene ein durch Erhitzen von Conglutin mit Salzsäure dargestelltes Leucinpräparat.

2) Dieses Ergebniss steht nur scheinbar im Widerspruch mit E. SCHULZE'S Angaben (Zeitschrift für physiol. Chem., Bd. XXIV, 1898, S. 106 und Bd. XXX, 1900, S. 281) über das Vorkommen von Leucin und Tyrosin in 6—Stägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus*. Denn auch E. SCHULZE vermochte aus wässerigen Extracten aus solchen Keimpflanzen jene Amidosäuren nicht durch Krystallisation zur Abscheidung zu bringen. Dagegen erhielt er sie bei Verarbeitung weingeistiger Extracte aus den Cotyledonen unter Bedingungen, die offenbar für die Abscheidung jener Amidosäuren viel günstiger sind. Uebrigens ist E. SCHULZE bei Gewinnung dieser Stoffe stets auch von etwas älteren Keimpflanzen und von grösseren Quantitäten des Untersuchungsmaterials ausgegangen, und er hat trotzdem zwar Leucin aus drei Keimpflanzen-Culturen von *Lupinus luteus*, Tyrosin dagegen nur aus einer solchen Cultur abzuschneiden vermocht.

Gewicht betrug nach dem Trocknen im Exsiccator ca. 1,1 g. Beim Lösen in einem Gemisch von heissem Weingeist und Ammoniakflüssigkeit hinterliess dieses Product einen in diesem Lösungsmittel schwer löslichen Rückstand, der sich als Tyrosin erwies; die davon abfiltrirte Lösung lieferte beim Verdunsten über Schwefelsäure eine weisse Substanz, die noch mehrmals aus einem Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisirt wurde. Sie zeigte Aussehen und Verhalten des Leucins. Beide Amidosäuren, das Tyrosin wie das Leucin, wurden genau in der gleichen Weise identificirt, wie dies mit den im dritten Conglutinversuch erhaltenen Substanzen gleichen Namens geschah.

Aus dem Inhalt des Kolbens *B* liessen sich also Leucin und Tyrosin darstellen, aus dem Inhalt des Kolbens *A* dagegen nicht, obwohl auch letzterer wahrscheinlich diese beiden Amidosäuren in kleiner Menge enthalten hat. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz mit der Bildung von Leucin und Tyrosin verbunden war.

Um zu prüfen, ob während der Selbstverdauung das Asparagin an Menge zugenommen hatte, wurde eine Reihe von Versuchen angestellt. Von denselben beschreibe ich hier Versuche mit 4tägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus*. Von der in der früher beschriebenen Weise präparirten Keimpflanzensubstanz wurden je 20 g in drei Glaskolben gebracht. In zwei Kolben wurde Thymolwasser, im dritten 0,2procentige Blausäure zugesetzt. Von den mit Thymolwasser beschickten Kolben wurde der eine kurze Zeit auf nahezu 100° erhitzt. Alle drei Kolben wurden sodann 7 Tage lang im Thermostaten auf 35—40° erwärmt. Sodann wurden die Flüssigkeiten abfiltrirt, durch Versetzen mit Tannin und Bleizucker gereinigt und nun zur Ausfällung des Asparagins mit Mercurinitrat vermischt. Die so erhaltenen Niederschläge wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die vom Schwefelquecksilber abfiltrirten Lösungen mit Ammoniak neutralisirt und bei geringer Wärme zur Syrupconsistenz eingedunstet. Nachdem das Asparagin auskrystallisirt war, wurde es in geeigneter Weise von der Mutterlauge getrennt, über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. In der folgenden Tabelle stelle ich die so erhaltenen Zahlen mit den Resultaten zusammen, die für den Asparagingehalt der gleichen Flüssigkeiten nach SACHSSE's Methode sich berechneten:

| | Gekocht | | Nicht gekocht | |
|--------------------------------|-----------|-----------|---------------|--|
| | I | II | III | |
| Nach SACHSSE berechnet . . . | 7,02 pCt. | 9,00 pCt. | 11,80 pCt. | |
| In Krystallform erhalten . . . | 0,676 g | 0,660 g | 0,742 g | |
| | 3,38 pCt. | 3,30 pCt. | 3,71 pCt. | |

Aus den Flüssigkeiten, in denen das Enzym gewirkt hatte (II und III), konnte also durch Fällung mit Mercurinitrat nicht wesentlich

mehr Asparagin gewonnen werden als aus der im Beginn des Versuchs gekochten Flüssigkeit (I); also liess sich auf dem von mir eingeschlagenen Wege eine Zunahme der Asparaginmenge in Folge der Wirkung des Enzyms nicht oder wenigstens nicht sicher nachweisen. Zu bemerken ist noch, dass dem in den Versuchen II und III aus dem Mercurinitratniederschlag gewonnenen Asparagin etwas Tyrosin beigemischt war. Letzteres blieb grösstentheils zurück, als das Asparagin in schwach erwärmtem Wasser gelöst wurde. Es wurde mit Hilfe seiner Reactionen identificirt. In Uebereinstimmung damit stehen auch die Ergebnisse anderer in der gleichen Weise ausgeführter Versuche, sowie auch die Resultate der oben beschriebenen Versuche mit Conglutin. Lassen diese Versuche immerhin noch die Möglichkeit offen, dass bei Einwirkung des Enzyms eine geringe Asparaginmenge gebildet worden war, so schliessen sie doch vollständig die Annahme aus, dass die Spaltung der Eiweissstoffe durch das Enzym mit einer starken Asparaginbildung verbunden war.

Es ist nun noch darauf aufmerksam zu machen, dass die nach SACHSSE's Verfahren berechneten Asparaginmengen bedeutend grösser sind als diejenigen, welche aus den Mercurinitratniederschlägen sich abscheiden liessen. Dies macht es sehr wahrscheinlich, dass das beim Kochen der Flüssigkeiten mit Salzsäure nach SACHSSE's Vorschrift entstandene Ammoniak nicht ausschliesslich aus Asparagin abgespalten worden war. Sodann zeigt ein Blick auf die Tabelle, dass für die Flüssigkeiten, in denen das Enzym gewirkt hatte, nach SACHSSE's Methode sich ein höherer Asparagingehalt ergab als für die beim Beginn des Versuchs gekochte Flüssigkeit. Daraus ist zu schliessen, dass bei der Zersetzung der Eiweissstoffe in jenen Flüssigkeiten eine Substanz entstanden war, welche beim Kochen mit Salzsäure Ammoniak abspaltete. Höchst wahrscheinlich war aber diese Substanz kein Asparagin; andernfalls hätten doch wohl die Mercurinitratniederschläge aus jenen Flüssigkeiten mehr Asparagin liefern müssen, als der Niederschlag aus der gekochten Flüssigkeit.

Wie aus meinen Mittheilungen zu ersehen ist, habe ich nachweisen können, dass sowohl bei der Einwirkung des Enzyms auf Conglutin als auch bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz Leucin und Tyrosin entstanden, während ich dagegen eine gleichzeitige Bildung von Asparagin nicht nachzuweisen vermochte¹⁾.

1) GREEN (Philos. Transaction of the Royal Soc. of London (B), 1887, Vol. 178, p. 39) giebt an, dass unter den Producten, welche das von ihm aus Keimpflanzen dargestellte Enzym aus Eiweissstoffen erzeugte, auch Asparagin ähnliche Krystalle sich vorfanden. Doch giebt er keinen Beweis dafür, dass diese Krystalle wirklich Asparagin waren. Da das Asparagin nicht nur sehr leicht zu isoliren, sondern auch sehr leicht zu identificiren ist, so ist auf eine so unbestimmte Angabe, wie GREEN sie macht, kein Gewicht zu legen.

Diese Versuchsergebnisse stehen in Uebereinstimmung mit der von E. SCHULZE aus einer grossen Anzahl von Thatsachen abgeleiteten Schlussfolgerung, dass in den Keimpflanzen das Asparagin grösstentheils durch Umwandlung primärer Eiweisszersetzungsproducte entsteht und also ein secundäres Product des Eiweissumsatzes ist.

Was die übrigen Producte der Selbstverdauung der Keimpflanzen-substanz von *Lupinus luteus* anbetrifft, so konnte noch das Vorhandensein von Stickstoffverbindungen nachgewiesen werden, welche nicht durch Tannin und Bleizucker, dagegen durch Phosphorwolframsäure gefällt wurden. Die auf diese Stoffe entfallende Menge betrug ca. $\frac{1}{3}$ vom Stickstoff der zerspaltenen Eiweissstoffe. Man darf vermuthen, dass dies Hexonbasen oder auch andere basische Producte waren.

Zum Schluss erachte ich es als eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. E. SCHULZE an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank auszusprechen für das rege Interesse, welches er für diese Arbeit zeigte, sowie für seine liebenswürdige Bereitwilligkeit, mir stets mit Rath und That beizustehen.

Zürich, Agriculturchem. Laboratorium von Prof. E. SCHULZE.

46. F. G. Kohl: Dimorphismus der Plasmaverbindungen.

Mit Tafel XII.

Eingegangen am 18. October 1900. A

Alle bisher vorliegenden Untersuchungen über Plasmaverbindungen lassen letztere in zwei typischen Formen erscheinen. Entweder durchsetzen die Plasmabrücken ausschliesslich die Tüpfelmembranen, oder sie finden sich innerhalb der ungetüpfelten Membran, wie etwa im *Strychnos*-Endosperm oder zwischen Siebröhre und Geleitzelle bei *Viscum album*, oder in der Membran des Embryosackes dieser Pflanze. Diese beiden Erscheinungsformen kehren überall wieder und sind kaum durch Uebergangsformen mit einander vereinigt. Es dürfte sich empfehlen, sie auch nomenclatorisch aus einander zu halten, und ich werde sie als solitäre Plasmaverbindungen bezeichnen, wenn sie vereinzelt an beliebigen Stellen die Zellhaut durchsetzen, als aggregirte, wenn sie sich innerhalb der Tüpfelhaut gehäuft vorfinden. A priori mögliche, aber in Wirklichkeit, wie es scheint, relativ seltene Zwischenformen würde man vor sich haben, wenn die Tüpfelhaut

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1900

Band/Volume: [18](#)

Autor(en)/Author(s): Butkewitsch Wl.

Artikel/Article: [Ueber das Vorkommen proteolytischer Enzyme in gekeimten Samen und über ihre Wirkung 358-364](#)