

- 4) FELLERER, Beiträge zur Anat. u. System d. *Begon.* Diss. München 1892.
- 5) VESQUE, Gamopétales, in Ann. sc. nat. VII, 1, 1885, p. 317—326.
- HOVELACQUE, Caract. anat. gén. de la tige des B., in Bull. Soc. d'études scientif. de Paris, XI, 1888.
- 6) GOEBEL, Pflanzenbiol. Schilderg., II, 1881, Tafel XII.
- 7) HOOKER, Struct. and Aff. of Balan. in Transact. Linnean Soc. Vol. XXII, 1, 1855/56.
- 8) Ber. d. d. bot. Ges. XXIV, 1906, S. 361.
- 9) Biol. Centralblatt XXVII, 4 u. 5, 1907.
- 10) Ber. d. d. bot. Ges. XXV, 7, 1907.
- 11) Biol. Centralblatt XXVII, 10, 1907.
- 12) DE VRIES, Die Mutationstheorie. Bd. I. 1901

---

### 23. J. Grüss: Über den Nachweis mittelst Chromogramm-Methode, dass die Hydrogenase aktiv bei der Alkoholgärung beteiligt ist.

(Eingegangen am 25. Februar 1908.)

---

In der Enzymforschung ist es ein allgemein beliebtes Verfahren, die „Reindarstellung“ durch fortgesetzte Alkoholfällung durchzuführen, eine Methode, die am besten durch EFFRONT'S Versuch gekennzeichnet wird, welcher in einem Rohdextrin nach der 30. Fällung noch  $1\frac{1}{2}$  pCt. Maltose gefunden hatte. Dazu kommt noch, daß der Alkohol nach den verschiedensten Richtungen hin auf die gefällten Enzyme verändernd einwirkt. Nicht viel anders verhält es sich mit den anderen Fällungsmitteln.

Ein weiterer Übelstand besteht darin, daß sich Sekrete, zu denen die meisten Enzyme ihrer Herkunft nach gehören, schon in kurzer Zeit nach ihrer Absonderung von selbst verändern. Deswegen kann man leicht zu verschiedenen Ergebnissen gelangen, wenn man mit wässerigen oder Glyzerin-Auszügen arbeitet. Ein Beispiel hierfür bietet z. B. der Zellsaft der Parenchymzellen der ruhenden Kartoffelknolle, wenn man denselben mit Wasserstoff-superoxyd zusammenbringt. Die Spaltungen eines frisch hergestellten und eines 2 Stunden alten Parenchymzellsaftes verhielten sich wie 7,35 : 1,5.

Die Wirksamkeit der „Catalase“ hat also abgenommen. Dies ist das interessante Enzym, welches nur durch seine Wirkung auf  $H_2O_2$  erkannt wird, auf einen Körper, der in Berührung mit den verschiedensten Substanzen leicht zerfällt, und der nicht einmal in der Zelle vorkommt, sicher nicht in den Parenchymzellen der Kartoffel, wo die „Catalase“ in so großen Mengen vorhanden ist.

Daß man schließlich noch „Kampfenzyme“ konstruiert, kann danach nicht mehr überraschen. Zu diesen Ergebnissen muß man aber konsequenterweise gelangen, wenn man für jede derartige andauernde Wirkung ein Enzym zugrunde legt.

Zu welchen Verschiedenheiten man kommen kann, wenn man Pflanzensäfte mit Alkohol-Äther austrocknet, zeigt folgendes Beispiel: 4,300 g frische zerriebene Rindensubstanz (Kartoffel) nahmen in 24 Stunden mit 25 ccm einer 4prozentigen Pyrogallollösung 21,1 ccm O auf und gaben 4,9 ccm  $CO_2$  aus. Da nun 4,411 g Frischsubstanz = 0,947 g Trockensubstanz enthielt, würden 2 g der letzteren = 45,5 ccm Sauerstoff aufgenommen und 10,6  $CO_2$  ausgegeben haben. Wie fiel nun die direkte Bestimmung aus? Dünne Rindenstücke von denselben Objekten wurden in absolutem Alkohol möglichst schnell entwässert; der Alkohol wurde dann durch Äther ersetzt. Die Rindenstücke wurden im Vakuum schnell getrocknet und pulverisiert. 2 g Substanz nahmen unter gleichen Bedingungen 5 ccm O auf und gaben 5,1 ccm  $CO_2$  aus.

Kaum weniger anders steht es mit der Empfindlichkeit der hydrolytischen Eigenschaften. Aus meinen Schriften greife ich auch hierfür ein Beispiel heraus: Eine kräftige Diastaselösung, aus Malz dargestellt, wurde in 2 Teile — A und B — geteilt. Die Lösung A wurde eine halbe Stunde auf  $60^\circ$  erhitzt. Von beiden Lösungen wurden je 2,5 ccm abgehoben und gleichzeitig zu 100 ccm eines 1–2prozentigen Stärkekleisters gegeben; nach 30 Minuten wurde durch gleichzeitiges Erhitzen die Saccharifikation unterbrochen.

|       |              |             |         |                     |
|-------|--------------|-------------|---------|---------------------|
| 5 ccm | der Lösung A | reduzierten | 0,3 ccm | Fehlingsche Lösung, |
| 5     | „ „ „        | B           | 3,1     | „ „ „               |

Nach dem JAKOBSONSchen Versuch kann man eine Diastase in dieser Weise so verändern, daß sie ihre spezifische Eigenschaft, Guajak in Verbindung mit  $H_2O_2$  zu bläuen, verliert. So lassen sich auch Globuline, die sich von den Albuminen dadurch unterscheiden, daß sie in Salzlösungen löslich sind und sich von diesen durch den Dialysator trennen, durch Erhitzen so verändern, daß sie ihre spezifische Eigenschaft verlieren: sie sind denaturiert.

Die Sekretionsdiastase gehört zu den Körpern, die der Forschung viele Schwierigkeiten bereitet haben. Die hydrolytische Eigenschaft wurde bekanntlich 1812 von KIRCHHOF entdeckt, während schon 1809 GÖTTLING die Beobachtung gemacht hatte, daß ein Gemenge von Guajakharz, arabischem Gummi und Minzenwasser allmählich eine blaue Färbung annahm. Erst viel später, 1868, wandte SCHÖNBEIN noch das Wasserstoffsperoxyd an und hielt die Reaktion charakteristisch für Malzdiastase.

Diese Reaktion (Guajak +  $H_2O_2$ ) habe ich 1895 für mikroskopische Untersuchungen benutzt und gezeigt, daß überall da, wo im Gewebe Stärkelösung eintritt, auch die Blaufärbung mit den genannten Reagenzien hervorgerufen werden kann.

Nach den erwähnten Versuchen von JAKOBSON, welcher zeigte, daß beim Erhitzen einer Diastaselösung die katalytische Eigenschaft eher schwindet als die hydrolytische, nahm man allgemein an, daß die Reaktion, Guajak +  $H_2O_2$ , durch ein besonderes Enzym hervorgerufen wird, welches man nach SPITZER's Vorgang 1897 Peroxydase nannte. Nachdem nun noch BACH und CHODAT beobachtet hatten, daß Peroxydasen den Sauerstoff der Oxydasen, die wie Peroxyde fungieren, stark zu aktivieren vermochten, galt die spezifische Enzymnatur der Peroxydase für gesichert, denn nun war ja für dieses Enzym das Substrat gefunden.

Es ist wohl anzunehmen, daß da, wo eine starke Oxydation stattfindet, wie z. B. in aufbrechenden Knospen usw., eine solche Aktivierung vor sich geht; aber sicherlich nicht kommt die Peroxydasefärbung nur einem Körper zu. Bei der Gramineenkeimung werden vom Embryo aus große Mengen „Peroxydase“ in das stärkehaltige Endosperm sezerniert, in welchem keine Neubildungen von Enzymen oder Reservematerial mehr vor sich gehen. Hier wird das letztere auch ohne Sauerstoff gelöst, und die Peroxydase hätte kein Substrat, da die Oxydase fehlt.

Meine jetzige Methode, die Enzyme zu untersuchen, kann man als Chromogramm-Methode bezeichnen. So weit ich augenblicklich urteilen kann, liegt der hauptsächlichste Vorteil derselben darin, daß man in den frisch sezernierten Säften die einzelnen Enzyme in ihren Wirkungen nebeneinander erkennen und vergleichen kann. Sie beruht darauf, daß durch gleichzeitige Kapillaritäts- und Diffusionswirkung eine Trennung der einzelnen Körper aus einem Säftegemisch vor sich geht.

Beispiel: Auf gespanntes schwedisches Filtrierpapier bringt man zunächst einen Wasserring, d. h. man feuchtet eine ringförmige

Zone gleichmäßig an (durch Aufdrücken von angefeuchtetem um eine Glasröhre gelegtem Filtrierpapier). In das Zentrum bringt man z. B. 2 Tropfen einer mit  $\text{HgCl}_2$  und  $\text{NiCl}_2$  gesättigten Lösung, die alsbald mit dem Wasserring in Berührung kommt und denselben nach außen drängt. Der Vorgang, welcher im dampfgesättigten Raume stattfinden muß und bei veränderlichen Körpern noch unter Wasserstoff, kommt schließlich zur Ruhe. Alsdann zerschneidet man das Kapillarisationfeld in Sektoren, die man auf Fließpapier bringt, welches man mit den verschiedenen Reagenzlösungen getränkt hat. Nach der Einwirkung fügt man die Sektoren zu dem Chromogramm wieder zusammen, auf welchem dann verschiedene Zonen sichtbar geworden sind.

In unserem vorliegenden Fall kann man die beiden Indikatoren  $\text{K}_4\text{FeCy}_6 + \text{KJ}$  in einer Lösung anwenden. Nach einigen Vorversuchen findet man leicht die Konzentration, und wir haben auf unserem Chromogramm zwei Zonen: die äußere ist blaugrün, enthält das Nickelsalz und hat eine Breite von 8 mm, die innere zentrale Zone ist rot, enthält (neben etwas Nickelsalz) das Quecksilbersalz und hat einen Durchmesser (2 r) von 7 bis 7,5 cm. Unter gleichen Bedingungen ohne Wasserring betrug die Breite der äußeren Zone nur 2 mm.

Nach dieser Methode hat die vom Scutellum sezernierte Diastase auch die Eigenschaft einer Peroxydase, und beim Erhitzen derselben findet eine Art Denaturierung statt; außerdem kommen in der Natur noch Peroxydasen ohne Nebenwirkung vor, welche sich aber durch eine andere Kapillaritätswirkung unterscheiden, worüber in der ausführlichen Mitteilung eingehende Angaben gemacht werden. Eigenartig ist z. B. eine Peroxylease.

Während die Oxydasen den Charakter eines Peroxydes (BACH und CHODAT) besitzen, vergleiche ich die Peroxydasen am besten mit  $\text{Cu}_2\text{O}$ , auf dessen katalytische Eigenschaften ich früher aufmerksam gemacht habe.

Von anderen interessanten Ergebnissen will ich hier eins besonders hervorheben. Bringt man einige Parenchymzellen der Kartoffelknolle und ebenso einige Hefezellen in  $\text{H}_2\text{O}_2$ , so erfolgt eine stürmische Gasentwicklung. Folglich enthalten beide Objekte das „Enzym Catalase“. Die Chromogramm-Methode zeigte unzweideutig an, daß nicht ein und derselbe Körper die Spaltungsursache ist. In der Parenchymzelle ist eine Antioxydase vorhanden — kein neues Enzym! Der Name bedeutet nur, daß ein Körper mit schwach reduzierenden Eigenschaften vorliegt, welcher die

Oxydasereaktion hemmen kann. In der Hefezelle ist eine Hydrogenase enthalten, welche die Spaltung verursacht und welche mit Schwefel  $H_2S$  entwickelt.

In einer früheren Schrift<sup>1)</sup> habe ich durch eingehende quantitative Untersuchungen zu zeigen versucht, daß die Hydrogenase eine gewisse Rolle bei der alkoholischen Gärung spielt. Beispielsweise erwähnte ich, daß die Entbindung von  $H_2S$  gleichzeitig mit der Gärung unterdrückt wird, wenn man der Gärflüssigkeit mehr und mehr  $NaCl$  zusetzt; ferner: nimmt man durch Schwefel der Gärflüssigkeit einen Teil des naszierenden Wasserstoffs durch Entbindung von  $H_2S$  fort, so entsteht etwas Alkohol weniger. Ich kam durch diese quantitative Messungen zu dem Ergebnis, daß der naszierende Wasserstoff auf Glukosezerfallgruppen (gespalten durch Zymase) einwirkt und Alkohol bilden kann.

Mit Hilfe der Kapillaranalyse ließ sich gleichfalls zeigen, daß die Hydrogenase aktiv bei der Aufspaltung des Glukosemoleküls beteiligt ist.

Die mit ein wenig Toluolwasser verdünnte Masse einer obergärigen, mit Glas und Glyzerin zerriebenen Hefe wurde in der Weise in das Zentrum des Wasserrings gegeben, daß die einzelnen Tropfen nacheinander auffielen. Nachdem unter Wasserstoff sich ein Kapillarisationsfeld ausgebildet hatte, wurde auf demselben die Oxydasereaktion hervorgerufen, wodurch ein weißes Feld mit violetten Ringen entstand. Die Hefe enthielt danach Oxydase und Hydrogenase, welche  $H_2O_2$  spaltete. Die violetten Ringe entsprachen den einzelnen Tropfen. Ein ähnliches Feld, aber mit einfacher Ringbildung, wurde mit Schwefelblumen gleichmäßig bestäubt und dann halbiert. Die eine Hälfte wurde mit Toluolwasser, das ca. 10 pCt. Glukose enthielt, das andere ohne Glukose angefeuchtet. Beide wurden mit Bleizuckerpapier, das auf einer Glasplatte haftete, in 1 mm Entfernung zum Auffangen des  $H_2S$  überdeckt und kamen in Wasserstoff. Nach 24 Stunden zeigte die Schattierung der Bleizuckerpapiere die unterschiedliche Entwicklung von  $H_2S$  an. Die Glukosehälfte hat weit mehr  $H_2S$  geliefert, und es muß daher die Hydrogenase bei der Aufspaltung des Glukosemoleküls aktiv in Tätigkeit treten.

Die Chromogramm-Methode habe ich nach verschiedenen Richtungen hin weiter ausgebildet.

1) Untersuchungen über die Atmung und Atmungsenzyme der Hefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. XXVII. 1904.

Erwähnt sei nur noch folgendes: In dem Chromogramm des Hefezellsafts ließ sich neben einer nur auf Tetramethylparaphenylen-diaminchlorid wirkenden Oxydase noch eine Peroxydase nachweisen, zu deren Erkennung ich eine Lösung von Ursoltartarat mit etwas Wasserstoffsuperoxyd verwandte. Diese Tatsache erhält dadurch eine gewisse Bedeutung, daß es nach der gleichen Methode nicht gelang, in frischen Zellsäften, z. B. in denen von Knospen, Parenchymzellen u. a. die beiden Körper resp. Enzyme zu trennen, welche den molekularen Sauerstoff (Oxydasewirkung) und den aus  $H_2O_2$  abgespaltenen (Peroxydasewirkung) auf Chromogene übertragen.

Das vollständige Chromogramm, welches man von dem Zellsaft obergäriger Hefe erhalten kann, zeigt von außen nach innen in den einzelnen Zonen folgende Enzymwirkungen an:

Peroxydase — Hydrogenase — Oxydase — Invertase und Zymase, welche nach unserer Methode (soweit ich bis jetzt urteilen kann) auch eine stark reduzierende Eigenschaft besitzt.

Weiter ließ sich die Methode mit großem Vorteil in der Keimungsphysiologie verwenden; z. B. konnte im embryonalen Endosperm neben einer Peroxydase noch ein diastatisches Enzym aufgefunden werden, welches gleichfalls peroxydasische Eigenschaften besaß und auf Stärke schwach hydrolytisch wirksam war. Nach ROUX ist eine solche Diastase mit geringem Lösungsvermögen zur Mitwirkung der Koagulase nötig, welche auch in den embryonalen Endospermzellen besonders peripherisch um die Zellkerne nachgewiesen werden konnte. Weitere Angaben über alle diese Erscheinungen behalte ich mir für die ausführliche Mitteilung vor.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1908

Band/Volume: [26a](#)

Autor(en)/Author(s): Grüss(Grüß) J.

Artikel/Article: [Über den Nachweis mittelst Chromogramm-Methode, dass die Hydrogenase aktiv bei der Alkoholgärung beteiligt ist. 191-196](#)