

gestreckter als *B. orbiculata* und stachellos, auch wurde Kettenbildung bei ihr nicht beobachtet. Die Zwischenbänder sehen bei ihr auch ganz anders aus als bei der angeführten verwandten Form. Da nur leere Schalen gefunden wurden, bleibt die Gestalt und die Anordnung der Chromatophoren, sowie die Lage des Kernes und seine Beschaffenheit noch unbekannt.

Fundort: Rovigno, Canal di Leme bei Orsera am 8. August 1897 und im Val di Bora am 28. November 1901, an beiden Orten selten. (Auch in dem von KÜKENTHAL und HARTMEYER gesammelten Plankton von Westindien bei St. Thomas in einer Probe vom Januar 1907 von mir beobachtet worden.)

Breslau, Oktober 1908.

74. J. Größ: Kapillaranalyse einiger Enzyme.

(Eingegangen am 24. Oktober 1908.)

Mit Hilfe der Kapillarattraktion lassen sich alle enzymatischen Wirkungen zur Darstellung bringen. Die größten Schwierigkeiten hat der Nachweis der Cytase verursacht; es gelang aber schließlich auch hier, die technischen Schwierigkeiten zu überwinden.

Die zellwandlösende Wirkung läßt sich, wie dies BROWN und MORRIS zuerst zeigten, am leichtesten im Gramineenendosperm verfolgen. Kapillaranalytisch kann man folgendermaßen verfahren: Die einzelnen herauspräparierten und sogleich in Wasserstoff aufbewahrten Endosperme werden mit einigen Tropfen Glycerin zerrieben (auf 10 Endosperme ca. 1—2 Tropfen Glycerin). Die Masse wird dann auf ausgespanntes Filtrierpapier (Munktellpapier) in einen Wasserring unter Wasserstoff gegeben.

Wenn sich das Kapillarisationsfeld nicht mehr ausbreitet, sucht man mittelst einer mit Guajak-Wasserstoffsperoxyd befeuchteten Rolle Filtrierpapier die blaue Randlinie zu markieren, die jedoch meistens ohne dies hervortritt. Man schneidet diese Randlinie in einer Breite von ca. 1 mm aus und schichtet Stücke derselben auf einem großen Deckglas spaltförmig zusammen. In den schmalen Zwischenraum bringt man die Testobjekte, also ausgewaschene dünne Schnitte aus den Kotyledonen der Lupine und Stärkekörner.

Man läßt nun von der äußeren Seite der Papierstreifen her je 1—2 Tropfen Thymolwasser hinzufließen und kittet dann das so beschickte Deckgläschen mittelst Vaseline auf den hohlen Glasklotz, der einige Tropfen Wasser mit Thymol oder Toluol enthält. Nach 48 Stunden kann man unter dem Mikroskop sowohl die Lösung der Hemicellulose als auch die Korrosion der Stärkekörner beobachten.

Ich bringe hier den objektiven Befund, aber es wird wohl nichtsdestoweniger ausgeschlossen sein, daß ich BROWN, der im Gerstenendosperm immer noch Cytase als selbständiges Enzym annimmt, zur Anerkennung meiner Meinung bewegen kann, daß nämlich die vom Schildchen sezernierte Peroxydiastase gleichzeitig Stärkekörner korrodiert und Hemicellulose zu lösen vermag.

Durch Vergrößerung des Widerstandes und durch Einschaltung von adsorbierenden Körpern wie Tonerde oder gelatinierenden Stoffen in den Weg, welchen die kapillarisierende Flüssigkeit zurücklegt, kann die Genauigkeit der Kapillarisationsmethode beliebig und zweckentsprechend vergrößert werden, ohne daß man nötig hat, mit zu verdünnten Lösungen arbeiten zu müssen.

Auf keine Weise ließ sich kapillaranalytisch die stärkelösende von der hemicelluloselösenden Wirkung im Endosperm trennen. In dem toten mehlhaltigen Endospermgewebe wird also, wenn man BROWNS Meinung beibehält, mindestens auch keine Trennung erfolgen.

Das Vorhandensein der Cytase als selbständiger Körper wird daraus abgeleitet, daß durch die Abschwächung des Enzyms infolge von Temperaturerhöhung die hemicelluloselösende Eigenschaft früher als die stärkelösende schwindet. Es ist aber zu bemerken, daß die Intensität dieser letzteren bei dem Versuch gleichfalls herabgesetzt wird, so daß man also nicht sagen kann, die stärkelösende bleibe unverändert.

Die stärkste katalytische und gleichzeitig diastatische Wirkung äußert das vom Schildchen abgesonderte Enzym, und hier liegen die Verhältnisse ähnlich: Durch fortgesetzte Behandlung mit siedendem Alkohol kann man die peroxydatische Wirkung herabsetzen.

Wie sich aber kapillaranalytisch demonstrieren läßt, sinkt gleichfalls auch das Verzuckerungsvermögen. Ein Maßunterschied für die Abnahme beider Kräfte ist vorläufig kaum zu finden, da in jedem Fall drei Körper aufeinanderwirken, und dazu kommen noch Zeit und Temperatur als komplizierende Bedingungen.

Es ist doch nicht gerade nötig, daß die Eigenschaften eines

Körpers, welcher von der Temperatur leicht in seiner Wirkungsweise beeinflußt wird, in gleichem Maßstabe abgeändert werden.

Ebenso wird durch langsames Austrocknen die Wirkung der Peroxydiastase herabgesetzt, wenn diese in wäßriger Lösung über eine größere Fläche verbreitet ist; in ähnlicher Weise wird eine Diastase durch fehlerhaftes langsames Eintrocknen der wäßrigen Lösung hornartig und ist dann schwachwirkend. Es darf daher nicht überraschen, daß die verschiedenen Handelspräparate von Diastase sehr verschieden wirken. Ich habe sehr viele Präparate in Händen gehabt, darunter einige, die von Spezialisten hergestellt worden waren. In wäßriger Lösung an der Luft dunkelten sie, einige recht erheblich, und diese zeichneten sich durch eine ausgiebige Peroxydasereaktion aus.

Kapillaranalytisch ließ sich kein Pigment oder gar ein Chromogen¹⁾ abtrennen: Die Peroxydiastase ist es selbst, die sich hier durch langsame Sauerstoffaufnahme dunkel färbt.

Nun beobachteten wir schon vor 10 Jahren im Laboratorium der Versuchsbrauerei, daß angeschnittenes Grünmalz beim Lagern im Thermostaten im Endosperm violett gefärbt wird; alle diese Fälle ließen sich auf die Wirkung eines Bakteriums zurückführen. Im Endosperm des keimenden Getreides entsteht kein Farbstoff oder Chromogen, auf welches die Peroxydiastase einwirken könnte¹⁾.

Vielmehr soll diese im Verlauf der Keimung durch eine von der Aleuronschicht abgesonderte Antioxydase gegen Autoxydation geschützt werden.

Diesen also gewissermaßen reduzierend wirkenden Körper kann ich noch nicht zu den Enzymen rechnen; denn während die Peroxydiastase (deswegen so genannt, weil sie gleichzeitig als Diastase und als Peroxydase wirken kann) durch siedenden Alkohol geschwächt wird, zeigt jene Antioxydase dadurch augenscheinlich keine Abnahme ihrer Wirkung.

Wozu ist nun aber die rätselhafte peroxydasische Wirkung der Diastase im toten Endosperm da?

Eine wenn auch noch nicht vollständige Aufklärung ergibt sich aus folgenden Beobachtungen: Im embryonalen lebenden Endosperm ist eine reine Peroxydase mit schwach oxydasischen Eigenschaften vorherrschend, während eine schwachwirkende Peroxydiastase, die wir nach BROWN und MORRIS auch Translokationsdiastase nennen können, in durchaus geringerer Menge zur Lösung

1) Nach J. RONDE wandert in die Kleberzellen einiger Gramineen ein Farbstoff ein, welcher einer Lichtwirkung seine Entstehung verdankt.

der transitorischen Stärke vorhanden ist. Gleichzeitig herrscht im embryonalen Endosperm ein hoher Gaswechsel, dessen Intensität mehr und mehr sinkt, je weiter der Reifungsprozeß vorschreitet.

Parallellaufend damit nimmt die Menge der erwähnten reinen Peroxydase ab, wogegen die Peroxydiastase erhalten bleibt. Diese letztere findet sich ausschließlich neben einer Antioxydase in dem Endosperm, welches in den Ruhezustand übergegangen ist.

Während des hohen Gaswechsels hat sich im embryonalen Endosperm jedoch kein Pigment gebildet. Wahrscheinlich ist, daß sich die Peroxydase bei der Autoxydation in die schwach wirkende Peroxydiastase umbildet.

Wenn die Keimung beginnt, so vermehrt sich im Keimling die Peroxydase (oder Oxygenperoxydase, da sie, wie erwähnt, schwach oxydatische Eigenschaften besitzt) und gleichzeitig ist der Gaswechsel wieder ein hoher. Im Schildchen findet die Umbildung dieses Enzyms in Peroxydiastase statt, die als Sekretionsdiastase an das tote Endosperm abgegeben wird.

Diese nun im Endosperm wirkende Peroxydiastase hat die bekannten hydrolytischen Eigenschaften, und durch Absonderung einer Antioxydase von seiten der Aleuronzellen, die besonders reich daran sind, wird sie gegen Autoxydation und damit gegen Abschwächung geschützt.

Diese langsame Autoxydation ist die Ursache, daß dieses Enzym eine peroxydatische Reaktion ausüben kann, im toten Endosperm aber nicht zur Ausübung bringt, da die Oxydase fehlt. Ich vergleiche diese Peroxydase, hier Peroxydiastase, mit Cu_2O „als Modell“ (Bredig), auf dessen katalytische Eigenschaften ich zuerst aufmerksam gemacht habe und das sich auch langsam an der Luft und etwas mehr in H_2O_2 oxydiert, und die langsame Oxydationsfähigkeit dieser Peroxydase und des Cu_2O ist auch die Ursache der Spaltungsfähigkeit für H_2O_2 . Bei der Abspaltung wird ein Teil der Atome O zu Molekülen O_2 vereinigt, während ein anderer Teil Guajak oder andere Chromogene oxydiert.

Da die Peroxydiastasen also eine geringe Autoxydation zeigen, so war vermutlich der Gaswechsel im ruhenden wie im angekeimten Endosperm im Gegensatz zu dem im Embryo ein relativ niedriger, und dies ließ sich auch durch die Gasanalyse bestätigen.

Diastaselösungen habe ich früher¹⁾ einmal auf Hemicellulosen einwirken lassen, und da sich der Versuch in die Länge zog, so dunkelten die Flüssigkeiten, und bei dieser Autoxydation zeigte

1) Wochenschr. f. Brauerei 1902, Nr. 17.

sich eine allmähliche Abschwächung, denn ein großer Teil befand sich nicht in Wirksamkeit (arbeitende Diastase hält sich viel länger als eine solche, die sich allein in wäßriger Lösung befindet).

Die Antioxydase würde nach diesen Ausführungen die Autoxydation herabsetzen und damit auch eine Schwächung des hydrolytischen Vermögens verhindern. Mit einer Pigmentbildung haben hier die Enzyme nichts zu tun.

Ähnliche Verhältnisse finden sich in der Kartoffelknolle. Das wirksame Enzym ist eine stark wirkende Oxygenperoxydase, die sehr leicht eine Autoxydation eingeht. Auch diese wird im Gewebe durch eine Antioxydase verhindert. Am Wundrand, wo der Sauerstoff leicht Zutritt hat, erscheint unter erhöhtem Gaswechsel eine Peroxydiastase. Das Ergebnis ist also auch hier wie im Schildchen: das Enzym verliert bei der Sauerstoffaufnahme die oxygene Wirkung und tauscht dafür die diastatische ein.

Es braucht kaum erwähnt zu werden, daß die Autoxydation, die an der Luft unter Verfärbung vor sich geht, nicht in gleicher Weise erfolgt wie diese Umwandlung, bei der keine Verfärbung eintritt.

Andererseits ist nicht zu leugnen, daß die Oxydasen bei der Pigmentbildung eine große Rolle spielen.

Zur Erkennung dieser Einwirkung kommt der Kapillaranalyse eine besondere Bedeutung zu. Man kann mittelst der Chromogramm-Methode ganz genau erkennen, ob eine Autoxydation oder eine Sauerstoffübertragung vorliegt.

Wie ich in meiner Schrift¹⁾ über das Sauerstoffenzym der Kartoffel auseinandergesetzt habe, kann dasselbe gleichzeitig als Oxydase und als Peroxydase (also Oxygenperoxydase) wirken. Durch die Kapillaranalyse läßt sich zunächst die Verfärbung infolge von Autoxydation zeigen.

Die Sauerstoffübertragung dieses Enzyms und die dadurch bewirkte Pigmentbildung läßt sich andererseits durch folgendes Beispiel demonstrieren: wir entfetten mit Äther Kakaobohnen, die noch keine Fermentation durchgemacht haben, sondern nur einfach getrocknet worden waren, übergießen das Pulver mit 75 prozentigem Alkohol und digerieren unter mäßigem Erwärmen.

Ein Kapillarisationsfeld wurde nun durch fortgesetzte einfache Kapillarisation mit einer Farbstoffschicht angereichert, wodurch ein rötliches Mittelfeld, umschlossen von einer breiten schieferblauen Randzone, erhalten wurde.

1) Zeitschrift f. Pflanzenkrankheiten XVII, H. 2 u. 4.

Daraus folgt zunächst, daß in der roten Lösung zwei Farbstoffe vorhanden sind, ein schieferblauer und ein bräunlichroter von schwacher Intensität. In das getrocknete Feld läßt man nun ein zweites Kapillarisationsfeld eindringen, welches in seiner Randzone die Oxygenperoxydase aus der Kartoffelknolle enthält. Das zur Verwendung kommende Enzym kann man ziemlich rein erhalten, wenn man die ausgeschnittene Randzone der zweiten Kapillarisation unterwirft.

Wenn das Sauerstoffenzym in die blaue Farbzone eingedrungen ist, so findet hier eine Sauerstoffübertragung statt: der blaue Farbstoff schlägt in gelbbraun um. Dieser Vorgang wird beschleunigt und die Intensität des gebildeten Farbstoffes wird eine höhere, wenn man das Kapillarisationsdoppelfeld mit verdünntem H_2O_2 behandelt. Die Reaktionszone ist dann eine halbmondförmige gelbbraune Fläche.

In der Kartoffelknolle selbst kommen derartige Farbstoffbildungen unter der Einwirkung der Enzyme nicht zustande. Es gibt eine Art „Negerkartoffel“ welche in den Parenchymzellen reichliche Mengen eines violetten Farbstoffes besitzt. Dieser läßt sich sehr leicht kapillaranalytisch von der Oxygenperoxydase trennen. Schon im Wasserring auf einfachem Filtrierpapier gelingt dies, weit besser aber auf Tonerdepapier. Gibt man auf letzteres einen Wasserring und darin die zerriebene Masse, so erhält man ein rotviolettes Mittelfeld, welches von einer farblosen Zone umschlossen ist.

Nach Behandlung mit Guajaklösung stellt sich auf angefeuchtetem Filtrierpapier in dieser Außenzone eine blaue Färbung ein, die bei Zusatz von H_2O_2 fast schwarzblau wird. Die Aminviolettreaktion¹⁾ fällt auf solchen Feldern sehr schwach aus oder kann sogar auch unterbleiben wegen der Anwesenheit von Tonerdehydrat.

Nach 24stündiger Kapillarisation unter Wasserstoff war jedoch das rote zentrale Feld braun geworden, wonach sich der Farbstoff also sehr leicht verändert.

Übergießt man das Gewebe mit absolutem Alkohol, so erhält man eine gelbliche, schwach rötliche Lösung, die auf Zusatz einer Säure schön rosenrot und auf Zusatz von Alkali blau wird; es liegt also eine Art Anthocyan vor.

Da diese beiden Farbenveränderungen in dem braunen Mittelfeld ausblieben, so scheint der Farbstoff völlig zerstört worden zu

1) Für Tetramethylparáphenylendiaminchlorid sei es gestattet, Aminviolett zu gebrauchen.

sein. Bei Anwendung von Doppelfeldern ließ sich zeigen, daß die Oxygenperoxydase der Kartoffel keine Einwirkung auf den aus der alkoholischen Lösung gewonnenen Farbstoff ausübte, weder in neutraler, noch in schwachsaurer oder alkalischer Lösung. Dies ist auch erklärlich, denn der Farbstoff besteht ja neben den Sauerstoffenzymen in der Zelle.

Bei Verwundungen der Knolle wird neben der Autoxydation der Sauerstoff auch auf Tyrosin übertragen, denn einerseits kann man am Gewebe die Millonsche Tyrosinreaktion hervorrufen und andererseits läßt sich am Rande eines Kapillarisationsfeldes, das von dem kräftig wirkenden Enzym der Rinde hergestellt ist, auch bei Tyrosinzusatz die charakteristische Verfärbung beobachten.

Im lebenden Gewebe kommt die Autoxydation wegen der Anwesenheit der Antioxydase nicht zustande, und es halten sich hier die Enzyme das Gleichgewicht, welches an den Orten höherer Sauerstoffaufnahme, im embryonalen Knospengewebe von der Oxydase überschritten wird, worauf wenigstens die hier auftretenden Verfärbungen hindeuten.

Diese in den Parenchymzellen der Kartoffelknolle sowie im Endosperm der Gerste sich bemerkbar machenden Antioxydasen rechne ich nicht zu den Enzymen, da sie bei Behandlung mit siedendem Alkohol kaum abgeschwächt werden; es sind schwach reduzierend wirkende Körper, durch welche die oxydatischen Reaktionen herabgesetzt oder auch aufgehoben werden können. Mit Schwefel entwickeln sie keinen H_2S .

Dadurch unterscheiden sich diese Antioxydasen von der in der Hefe vorkommenden, die ganz allgemein als Hydrogenase bezeichnet wird. Dieser Körper ist zu den Enzymen zu rechnen, da seine Reaktion fortdauernd nach der Zeit verläuft, ein Temperatur-optimum besitzt und durch siedenden Alkohol fast ganz zerstört wird. Nicht nur in der Hefe, sondern auch in anderen Pilzen kommt Hydrogenase vor; über die eigenartige Rolle, die sie in *Lactarius*-Arten spielt, habe ich vor einiger Zeit schon berichtet¹⁾.

1) Naturwissenschaftl. Wochenschr. 1908, Nr. 20.

ZOBODAT - 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: [Kapillaranalyse einiger Enzyme 620-626](#)