© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

der Zelle unmittelbar an den physiologischen Prozessen teilnehmenden Stoffe bildet die Ursache davon, daß wir sie bis jetzt sehr mangelhaft oder gar nicht kennen. Dafür können die überall verbreiteten Atmungschromogene als Beispiel dienen. Dafür sind uns Reservestoffe wie Stärke, Öl, Glykoside u. a., schon lange wohlbekannt.

St. Petersburg, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität.

---

14. Oskar Walther: Zur Frage der Indigobildung.

(Eingegangen am 14. März 1909.)

Im Zusammenhang mit der von Prof. W. PALLADIN[1]) aufgestellten Theorie der Atmungschromogene und auf seine Veranlassung hin, wurden von mir im Herbst 1908 einige Versuche [2]) an Indigopflanzen angestellt.

Erwähnte Theorie geht von der Tatsache aus, daß die Produkte der, als primärer Atmungsprozeß anzusehenden, anaëroben Zerspaltung einer weiteren Oxydation zu Kohlensäure und Wasser unterliegen. Diese Oxydation kann nicht unmittelbar der Tätigkeit von Oxydasen zugeschrieben werden, da diese in ihrer Wirkung auf aromatische Verbindungen beschränkt sind[3]). W. PALLADIN nimmt an, daß die Oxydasen den Sauerstoff solchen aromatischen Verbindungen abgeben, die ihn weiter auf die aliphatischen Produkte der anaëroben Zerspaltung zu übertragen befähigt sind; als solche Vermittler kämen in erster Linie zahlreich in den Pflanzen vertretene Chromogene in Betracht, die frei oder gebunden, z. B. als Glykoside, die ja fast sämtlich ein Benzolderivat als Komponente enthalten[4]) vorkommen können.

Zur Beleuchtung der diesbezüglichen Verhältnisse in glykosidhaltigen Pflanzen wurden die in chemischer Beziehung recht gut

---

1) W. PALLADIN, diese Ber. B. XXVIa S. 125 ff., 378 ff., 389 ff.; Zeitschr. f. physiol. Ch. **55** S. 207 ff.

2) Mitgeteilt in d. Sitzung v. 19. Nov. 1908 d. bot. Sektion d. K. Naturforscherges. zu St. Petersburg.

3) BERTRAND, Comptes Rendus **122** S. 1132. 1896.

4) Cf. v. RIJN, Die Glykoside, Berlin 1900.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

erforschten Indigopflanzen gewählt, als deren Repräsentant mir, freilich in recht beschränkter Menge, *Polygonum tinctorium* zu Gebote stand.

Das von W. PALLADIN zum Nachweis von Chromogenen angewandte Verfahren, das darin besteht, daß in kochendes destilliertes Wasser nach und nach Teile der zu untersuchenden Pflanzen in nicht zu großer Menge geworfen, kurze Zeit über gekocht und das Filtrat davon nach dem Erkalten mit Meerettichperoxydase und schwacher (0,5 proz.) Wasserstoffsuperoxydlösung behandelt wird, ergab bei *Polygonum tinctorium* kein positives Resultat. Erst nach Einwirkung eines hydrolysierenden Enzyms oder einer verdünnten Säure zwecks Spaltung des im Filtrat enthaltenen Indikans, war das Eintreten einer hellblauen Färbung durch Indigo zu beobachten, das in feiner Verteilung suspendiert war. Wiederholte Versuche führten stets zu dem gleichen Resultate, daß ein freies Chromogen in *Polyg. tinct.* nicht nachzuweisen war. In diesem Falle käme also als Chromogen nur das durch Indikanspaltung entstandene, durch Oxydation Indigo liefernde Indoxyl in Betracht.

Es wurde deshalb die Verteilung des Indikans in *Polyg. tinct.* untersucht, wobei ich die schon vorhandenen Angaben (MOLISCH, BEIJERINCK u. a.) bestätigt fand. Am zweckmäßigsten erwiesen sich dabei zwei Verfahren, die beide allgemeines Interesse beanspruchen dürften und darauf beruhen, daß man die Pflanze der Autolyse unterwirft und so den Enzymen die Möglichkeit gibt, ihre Tätigkeit zu entfalten. Das eine, wohl zuerst von VAN ROMBURGH[1]) (1897), dann von MOLISCH[2]) und von PALLADIN[3]) angewandte besteht darin, daß man die Pflanze unter einer mit feuchtem Fließpapier ausgelegten Glasglocke der Einwirkung von Chloroformdämpfen aussetzt. Schon nach wenigen Minuten tritt deutliche Verfärbung durch Indigobildung ein. Beim anderen Verfahren werden die Pflanzen in der von PALLADIN beschriebenen Weise dem Einfluß niedriger (10°—20° unter Null) Temperaturen ausgesetzt. Unmittelbar nach dem Erfrieren waren keine Veränderungen an den *Polygonum*-Blättern wahrzunehmen, beim Liegen an der Luft trat aber im Laufe einer $^1/_2$ Stunde intensive Blaugrünfärbung ein. Denselben Prozeß konnte ich an im Freien wachsendem *Polygonum* im botanischen Garten der Universität beobachten:

---

1) V. ROMBURGH, K. Akad. te Amsterd. Wis-en Natuurk. Afd. VIII S. 378.
2) MOLISCH, diese Berichte **17** S. 229. 1899.
3) PALLADIN, Zeitschr. f. physiol. Ch. **55** S. 220—221.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

nach dem ersten Froste hatten die Blätter an der Pflanze blaue Flecken bekommen.

Im Zusammenhang mit diesen autolytischen Erscheinungen möchte ich darauf hinweisen, daß Indigopflanzen ein sehr geeignetes Objekt zum Studium der Wirkung giftiger Stoffe abgeben[1]). Wie meine diesbezüglichen vorläufigen Versuche zeigen, versetzen einige solche Stoffe (wie Chloroform, CCl_4 u. a.) die Pflanze in den Zustand typischer Autolyse mit voller Entfaltung der Enzymwirkung (reichliche Indigobildung); andere Gifte (wie Formaldehyd, Blausäure u. a.) hemmen die Enzymwirkung momentan (gar keine Indigobildung); zahlreiche Stoffe nehmen in ihrer Wirkung eine mittlere Stellung ein (mehr oder weniger verminderte Indigobildung). Die Schlüsse, die schon die natürliche Farbenreaktion zu ziehen gestattet, können unschwer durch genauere Untersuchung der Extrakte aus den entsprechenden Pflanzenteilen kontrolliert werden.

In welcher Weise vollzieht sich nun die in getöteten Indigopflanzen beobachtete Oxydation des Indoxyls zu Indigo? Lassen sich diesen Prozeß bewirkende Enzyme nachweisen? Bekanntlich ist diese Frage schon Gegenstand wiederholter Untersuchungen gewesen und von BRÉAUDAT[2]) (für *Isatis alpina*) in positivem, von BEIJERINCK[3]) und BERGTHEIL[4]) später in negativem Sinne beantwortet worden. Meine diesbezüglichen Versuche wurden in folgender Weise angestellt. Ein kräftig entwickeltes Reis von *Polyg. tinct.* wurde dicht über dem Boden abgeschnitten, mit Wasser abgespült, in einer Fleischhackmaschine zermahlen, mit einer 2—3 fachen Menge 40° Alkohols begossen und mehrere Tage über in einem Kolben stehen gelassen. Danach wurde die Flüssigkeit durch Leinen, dann durch ein Papierfilter filtriert und zu dem bräunlich gefärbten Filtrate 95° Alkohol bis zum Aufhören der Niederschlagsbildung zugesetzt. Der Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt und in wenig Wasser gelöst. Es zeigte sich, daß höchst unbedeutende Mengen dieser Lösung im Beisein von 0,5 proz. Wasserstoffsuperoxydlösung (einige Tropfen) mit Spuren von Guajakol enthaltendem Wasser, sowie mit Hydrochinon kräftige Peroxydasereaktionen ergaben. Es wurden ferner zwei gleiche

---

1) Vgl. auch BERGTHEIL, Journal Chem. Soc. **85** S. 889. 1904. Proceed. Chem. Soc. **20** S. 139—140. 1904.

2) BRÉAUDAT, Comptes Rendus **127** S. 769. 1898; **128** S. 1478. 1899.

3) BEIJERINCK, K. Akad. te Amsterd. Wis-en Natuurk. Afd. VIII S. 99.

4) BERGTHEIL, Journ. Chem. Soc. **85** 1904; Proceed. Chem. Soc. **20** 1904.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Quanta der zu untersuchenden Lösung genommen, das eine davon gekocht, und zu beiden gleiche Mengen 0,5proz. Wasserstoffsuperoxydlösung und Guajakolwasser gegeben. Während nun die gekochte Portion farblos blieb, nahm die andere momentan die charakteristische braune Färbung an und gab beim Stehen einen braunen Niederschlag. Der schroffe Unterschied zwischen den beiden Portionen nahm erst nach 2—3 Tagen insofern ab, als auch die gekochte Portion leicht gelbbraun wurde, welche Färbung auch bei langem Stehen nicht weiter verändert wurde; ein Niederschlag war in ihr nicht zu beobachten.

Nach einem oxydierenden Enzym wurde auch in anderer Weise gesucht. Junge *Polygonum*-Blätter wurden in kleine Stücke gerissen, diese rasch in kleinen Quantitäten in 95° Alkohol gebracht und kräftig und andauernd umgeschüttelt; bevor das hydrolytische Enzym Zeit hatte, das Indikan zu spalten, mußte es durch den Alkohol samt allen übrigen in den Blättern enthaltenen Enzymen in den Zellen niedergeschlagen werden. Zur leichteren Entfernung des Chlorophylls wurde dann der Alkohol etwas mit Wasser verdünnt und die entfärbten Blattstücke in einem Mörser unter Alkohol zu einem fast weißen Pulver verrieben[1]). Dieses Pulver, das unbeschadet seiner Wirksamkeit, trocken aufbewahrt werden kann, eignet sich gut zum Nachweis der in der Pflanze vorhandenen Enzyme. In Wasser aufgeweicht, gab es mit Wasserstoffsuperoxyd und Guajakolwasser eine deutliche Peroxydasereaktion, indem sich hauptsächlich die Pulverteilchen intensiv braun färbten[2]). In einer gekochten Portion blieb diese Färbung unter sonst gleichen Bedingungen aus.

Durch diese Versuche scheint mir die Anwesenheit von Peroxydase in *Polyg. tinct.* erwiesen zu sein, so daß wohl beiden, die Bildung von Indigo aus Indikan bewirkenden Prozessen:

$$\underset{\text{(Indikan)}}{C_{14}H_{17}NO_6} + H_2O = \underset{\text{(d-Glukose)}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{(Indoxyl)}}{C_8H_7NO} \quad \text{und}$$

$$2\,C_8H_7NO + O_2 = 2\,H_2O + \underset{\text{(Indigblau)}}{C_{16}H_{10}N_2O_2}$$

enzymatischer Charakter zukommt.

Direkte Versuche über die Fähigkeit der Peroxydase, Indoxyl

---

1) Ähnlich verfährt BEIJERINCK l. c.

2) Da dabei das Wasserstoffsuperoxyd lebhaft zerlegt wurde, ist auch Katalase im Pulver anzunehmen.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

zu oxydieren, stehen noch aus, doch scheint sie mir nicht zweifelhaft. Dahingestellt bleibt auch, ob das Indoxyl im Atmungsgrozeß zu Indigotin oxydiert wird, welches nicht angesammelt, sondern gleich wieder reduziert wird und deshalb in der lebenden Pflanze nicht nachweisbar ist, oder ob die Oxydation nur zu einem Zwischenprodukt, etwa dem weißen Indigo $C_{16}H_{12}N_2O_2$, führt; jedenfalls müßten die Oxydationsprodukte wieder reduziert werden.

Das wie oben beschrieben gewonnene Pulver aus *Polygonum*-Blättern wurde deshalb auf sein Reduktionsvermögen untersucht. Der Versuch wurde in der von W. PALLADIN[1]) für Weizenkeime angewandten Weise angeordnet: es wurden hell gefärbte Lösungen von leicht reduzierbaren Farbstoffen (Methylenblau, Indigokarmin, indigschwefelsaures Natrium) in je 3 kleine Reagenzgläser gegeben, in eines davon eine geringe Menge des zu untersuchenden Pulvers, in ein zweites (zum Vergleich) Weizenkeime, in das dritte, als Kontrolle dienende, nichts zugesetzt. Alle wurden mit 1 Tropfen Chloroform versetzt und sorgfältig verschlossen, so daß keine Luftblasen vorhanden waren. Alle Kontrollportionen behielten ihre anfängliche Farbe. Die Weizenkeime reduzierten überall den Farbstoff stark, besonders das Methylenblau; die eigentlichen Versuchsportionen nahmen eine mittlere Stellung ein. Am stärksten war auch hier das Methylenblau entfärbt. Dem Pulver aus *Polygonum*-Blättern scheinen also reduzierende Eigenschaften zuzukommen.

Somit wären die Hauptbedingungen, die die anfangs angeführte Theorie voraussetzt, in unserem Falle vorhanden: ein oxydierendes Enzym, ein Chromogen (in gebundener Form) und, wahrscheinlich, ein reduzierendes Enzym. Ob zwischen ihnen tatsächlich ein Zusammenhang derart besteht, wie ihn die Lehre von den Atmungschromogenen voraussetzt, bleibt noch nachzuweisen.

St. Petersburg, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität.

---

1) W. PALLADIN, Zeitschr. f. phys. Chem. **55** S. 214.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft

Jahr/Year: 1909

Band/Volume: 27

Autor(en)/Author(s): Walther Oskar

Artikel/Article: Zur Frage der Indigobildung 106-110