

38. J. Gr ü ß : Kapillaranalyse einiger Enzyme. II.

(Eingegangen am 18. Juni 1909.)

Mit Hilfe der Chromogramm-Methode ließ sich in den jungen Trieben von *Pteris aquilina* eine Oxydase nachweisen, die hauptsächlich in der Rinde ihren Sitz hat und hier auf ein Chromogen einwirkt, welches einen braunen Farbstoff liefert. Dieser findet sich dann teilweise im Zellsaft gelöst, teilweise in protoplasmatischen Körnchen. Die Färbung der Gefäße, der Schutzscheide und der braunen Härchen, mit denen die Haut bedeckt ist, kann auf die Wirkung dieser Oxydase zurückgeführt werden.

Nun kennt man ja seit BERTRAND viele derartige Fälle von oxydasischen Verfärbungen, daß es sich nicht lohnen würde, noch diesen Fall zur Kenntnis zu bringen. Ich möchte jedoch nur aus methodischen Gründen darüber berichten.

Die Oxydase wirkt beträchtlich stärker, wenn die Lösung alkalisch ist: man stellt sich daher die Versuchslösung her, indem man die zerschnittenen Endknospen der jungen Triebe mit einer verdünnten Natronlauge zerreibt.

An der Luft, nicht aber unter Wasserstoff wird dieser alkalische Extrakt bald braun. Einmaliges kurzes Aufkochen zerstört diese Oxydase nicht ganz, denn nach längerer Zeit bemerkt man gleichfalls an der Luft die Verfärbung.

Zunächst suchen wir in dem einfachen (nicht alkalisch gemachten) Preßsaft das Enzym zu bestimmen. Man bringt einige Tropfen des unter Druck filtrierten, mit Thymolwasser verdünnten Preßsaftes auf den Kapillarisator und behandelt das Feld mit Guajak + H_2O_2 : es wird blau mit einer stärker gefärbten Mittelfläche, umgeben von einer weißen Zone, die von einer intensiv blauen Randlinie begrenzt wird. Diese ungefärbte weißbleibende Randzone enthält eine Antioxydase, denn untersucht man ein Kapillarisationsfeld mit Ursoltartaratlösung + H_2O_2 , so erhält man eine weiße Kreisfläche mit schwach dunkler, schieferfarbiger Randlinie, während außerhalb derselben die gelbbraune Färbung der Autoxydation erscheint.

Verwendet man zur Kapillarisierung einen an der Luft dunkel gewordenen Extrakt, so ist nicht schwer zu sehen, daß der braune Farbstoff gleichfalls bis in die äußerste Randlinie vorgerückt ist,

woraus man schließen kann, daß sich die Oxydase durch Autoxydation selbst verfärbt oder aber, daß sich Oxydase und Farbstoff in solcher Bindung vorfinden, daß sie durch eine einfache Kapillarisation nicht getrennt werden.

Der anatomische Befund paßt für beide Schlußfolgerungen, denn z. B. die Gefäßwandungen sind braun gefärbt und enthalten gleichzeitig das oxydierende Enzym, ebenso die Schutzscheide: man legt zum Nachweis die betreffenden Schnitte auf Filtrierpapier, welches mit schwach alkalisch gemachter Violaminlösung¹⁾ getränkt worden war.

Das Leptom der Gefäßbündel bleibt bei der Einwirkung des Sauerstoffs ungefärbt, und die violette Färbung schwindet hier, während sie im Gefäßteil meist erhalten bleibt und intensiver wird; es ist also im Leptom eine Antioxydase mit reduzierenden Eigenschaften vorhanden.

Um die Frage zu entscheiden, bringen wir den schwach alkalisch gemachten Pflanzenextrakt, der mehrere Stunden an der Luft gestanden hat und braun geworden ist, auf den Kapillarisator und das sich bildende Feld, bevor es seine endgültige Ausdehnung erlangt hat, in Essigsäuredampf. Dadurch tritt eine Fällung des Farbstoffes ein, und die oxydierenden Enzyme kapillarisieren über die Farbstoffgrenze hinaus.

Nachdem die Bewegung zu Ende gekommen ist, muß man mit gasförmigem Ammoniak die Essigsäure fortnehmen und kann dann mit den entsprechenden Reagentien Oxydase resp. Peroxydase leicht nachweisen.

Es gelingt ferner, aus dem Extrakt mit Tierkohle den Farbstoff gänzlich herauszunehmen, wodurch eine völlig farblose Lösung hergestellt wird, in der mit Guajak und Wasserstoffsuperoxyd eine wenn auch schwache Bläuung eintritt.

Teilweise gehen die Enzyme in die Kohle über, und aus derselben lassen sie sich gleichzeitig mit dem Farbstoff durch verdünnte Natronlauge wieder ausziehen.

Wird dieser letztere Extrakt im Wasserring kapillarisiert, so läßt sich ein Feld erhalten, in welchem das oxydierende Enzym aufgefunden werden kann. Das Chromogramm zeigt nun im Vergleich zu dem vorhergehenden mehr Farbstoff und weniger Enzym an. Daraus folgt, daß die Essigsäure nicht etwa spaltend auf eine chemische Verbindung, auf eine Oxydase, einwirkt. Das Enzym ist in diesem Falle mit seinem Substrat durch Adsorption so ver-

1) Tetramethylparaphenylendiaminchlorid.

bunden, daß beide durch einfache Kapillarisation nicht getrennt werden können.

Die Trennung gelingt schließlich durch wiederholte feuchte Kapillarisation; doch ist dieses Verfahren immerhin umständlich.

Mikroskopische Schnitte geben mit der Violamin- resp. mit der Guajakwasserstoffsuperoxydreaktion nicht immer das gleiche Bild. Das gebildete Violett resp. Blau wird teilweise wieder reduziert und dadurch mißfarbig. Diese Veränderung kann auch an dem braunen Farbstoff selbst beobachtet werden: sie hängt ab von dem Vorherrschen des oxydierenden Enzyms oder der erwähnten Antioxydase (ich vermeide den mir unsympathischen Ausdruck „Reduktase“).

Daß die im Gewebe vorhandenen Farbstoffe dieser Veränderung leicht unterliegen, kann auf folgende Weise demonstriert werden: Läßt man den alkalischen Pflanzenextrakt teilweise unter Wasserstoff und an der Luft stehen, so wird intermediär ein roter Farbstoff gebildet, welchen man kapillaranalytisch leicht von dem braunen trennen kann.

Fällt man dieses Farbstoffgemisch mit Essigsäure und löst den ausgewaschenen Niederschlag wieder mit Kalilauge auf, so erhält man eine rotbraune Lösung, in der man durch Sauerstoff in stat. nasc. — z. B. durch $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{BaO}_2$ — die Farbstoffe völlig oxydieren und in eine gelb gefärbte Verbindung überführen kann. Durch Wasserstoff in stat. nasc. werden die dunklen Farbstoffe gänzlich in die Leukoverbindung verwandelt; zu dieser Verwandlung kann man Natriumamalgam verwenden.

Das Chromogramm mit den diese Umwandlungen bewirkenden Enzymen läßt sich auch so ausführen, daß die violette Oxydasefärbung die Mitte einnimmt, welche dann von einer hellen Entfärbungszone umringt ist; die Grenzlinie wird von den Farbstoffen gebildet. Diese Darstellung beruht darauf, daß man die Versuchslösung fortgesetzt und mit Unterbrechungen auf die Mitte aufträufeln, und wenn das Feld genügend angereichert ist, Wassertropfen nachfolgen läßt, wodurch hauptsächlich Antioxydase nach außen gespült wird, während die Oxydase mehr zurückbleibt.

Aus den wechselnden mikroskopischen Bildern ist ersichtlich, daß sich die oxydierenden Enzyme und die Antioxydasen um einen Gleichgewichtszustand bewegen, der wohl durch äußere Einflüsse reguliert wird; — möglich, daß die Antioxydasen nur aus dem Leptom stammen.

Die Gleichgewichtstheorie läßt sich auch auf die hydroly-

sierenden Enzyme ausdehnen, deren Gegenenzyme die Revertasen und Koagulasen sind.

Mit der Malzdiastase hält sich die Amylokoagulase das Gleichgewicht, welche hauptsächlich durch die mühevollen Arbeiten von A. FERNBACH und J. WOLFF aufgedeckt wurde.

Durch Kombination der Resultate FERNBACHs mit meiner Arbeitsmethode konnte wieder ein kleiner Schritt vorwärts gemacht werden. FERNBACH hat in einer Malzlösung die Amylokoagulase dadurch nachweisen können und zum Vorherrschen gebracht, daß er die Lösung gegen Phenolphthalein neutralisierte. In einer solchen Lösung ist das lösende Enzym, die Diastase, außer Tätigkeit gesetzt, oder wenigstens doch in seiner Wirksamkeit stark gehemmt.

Berücksichtigt man nun das oben erwähnte allgemeine Prinzip, so muß im Grünmalz die Amylokoagulase in den Zellen des Schildchens teilweise das Übergewicht haben, wo, wie ich früher nachgewiesen habe, Glukose in Rohrzucker und dieser in Stärke übergeht. Letztere wird bei nachlassender Zuckerzufuhr durch Diastase völlig gelöst, so daß also die Anhäufung die beste Bedingung für die Wirksamkeit der Amylokoagulase sein wird.

Ist es demgemäß zutreffend, daß die Amylokoagulase bei der Stärkebildung eine kondensierende Rolle spielt, so mußte sie im Scutellum aufzufinden sein. Dies gelang in der Tat.

Aus meinen früheren Mitteilungen, welche die Kapillaranalyse des Sekrets der Scutellarepithelzellen betreffen, ist ersichtlich, daß die Sekretdiastase gleichzeitig auch peroxydatische Eigenschaften besitzt. Findet man also im Chromogramm des Zellsaftes der Scutellarzellen ein Maximum der Peroxydasereaktion, so hat man hier das lösende Enzym, die Diastase zu suchen — im Minimum die Koagulase. Aus dem durch Kapillarisation erhaltenen Felde wurde die Randlinie und das Innenfeld ausgeschaltet, weil hier die maximale Bläuung eintrat; die dazwischen liegende Mittelzone blieb mehr oder weniger weiß.

Nach Verwendung von 500 Schildchen wurde eine Anzahl Zonen fein zerstückelt und die Fasern mit Wasser ausgeschüttelt. Durch Abpressung und Filtrieren wurden 10 ccm Flüssigkeit gewonnen, von denen 5 ccm aufgekocht wurden. Als Reagens diente eine etwa $\frac{3}{4}$ prozentige Lösung „löslicher Stärke“, welche durch einstündiges Erhitzen auf 120° hergestellt worden war.

Nach 24 Stunden war die wirksame Lösung deutlich ausgeflockt und somit die Trennung beider Enzyme bewirkt worden — oder man kann auch sagen: es ist das Gleichgewicht zugunsten der Koagulase verschoben worden, denn behandelt man in gleicher

Weise das Zentrum des Kapillarisationsfeldes, so erhält man nur eine hydrolytisch wirksame Lösung, in der die gelöste Stärke verzuckert wird.

Eine genügend starke Koagulaselösung kann wirksam sein, auch wenn noch Spuren von Diastase zugegen sind. Ursprünglich glaubten die Entdecker, daß eine Spur Diastase zur Koagulation notwendig sei.

Durch Kapillarisation des Milchsaftes der Wolfsmilch ließ sich mit Hilfe der äußeren Zone eines Feldes eine wirksame Koagulaselösung herstellen, die absolut frei von Diastase war, denn in 8 Tagen wurde auch nicht eine Spur von Stärkelösung (120°) verzuckert: es kann daher die Koagulase selbständig ausflocken.

Ich muß nun auf das anfangs erwähnte Material (*Pteris aquilina*) zurückkommen. Dies schien mir für eine Koagulaseuntersuchung ganz besonders günstig, denn die Vegetation war durch Trockenheit zurückgehalten worden, und nach einem warmen Regen war das Wachstum ein außerordentlich intensives.

Dementsprechend mußte die Zellwandbildung in dem Endteil der jungen Sprosse mit erhöhter Beschleunigung vor sich gehen. Verläuft also die Zellwandbildung unter dem Einfluß kondensierender Enzyme, so war das erwähnte Material wohl das allergeeignetste, das sich finden ließ, um eine Koagulase herzustellen.

Der abgepreßte, mit Thymolwasser etwas verdünnte Zellsaft aus den noch gekrümmten Knospen wurde mit Tierkohle ausgeschüttelt, welche vorher mit Natronlauge und Salzsäure ausgewaschen und noch einmal geglüht worden war.

2 ccm des Filtrats wurden zu 25 ccm Stärkelösung (bei 120° hergestellt) gegeben und entwickelten schon nach wenigen Minuten ein solches Koagulum, wie ich es vorher noch nie beobachtet hatte. Die Lösung verzuckerte außerdem keine Stärke.

Die starke Wirkung veranlaßte mich, die Versuche auch auf eine lösliche Hemizellulose auszudehnen. Die geeignetste fand sich im Kirschgummi, in welchem ich oft — aber durchaus nicht immer — eine Zytase habe beobachten können.

Durch mehrstündiges Erhitzen auf 120° wurde aus Kirschgummi eine Lösung¹⁾ hergestellt, welche die Konsistenz einer etwa einprozentigen Stärkelösung zeigte. Nach Entfärbung mittelst Tierkohle wurde die Koagulaselösung zugesetzt: die Wirkung war genau so wie bei der Stärkelösung, nur etwas langsamer.

Während die Lösung mit der aufgekochten Koagulase klar

1) 1 ccm Lösung enthielt 4,8 mg lufttrocknen Rückstand.

blieb, trübte sich die wirksame Lösung, und es schied sich ein sehr feinkörnig-flockiger Niederschlag aus, der sich mit der Zeit vermehrte.

Die ausgeschiedenen Körnchen ordneten sich bisweilen dendritisch an. Da drei Versuche (und später nochmal drei) mit verschiedenem Material das gleiche Resultat ergeben haben, so kann die Erscheinung nur der Wirkung einer **Cytokoagulase** zuzuschreiben sein, welche also eine lösliche Hemizellulose zur Ausflockung bringt.

Wahrscheinlich dürfte der Vorgang wie bei der Amylokoagulase aus einer Verdichtung mit gleichzeitiger Wasserentziehung bestehen, und wir hätten damit das Gegenenzym der Cytase aufgefunden.

Gibt man zu, daß die Stärkebildung unter dem Einfluß der Amylokoagulase stattfindet, wie dies allen Anschein hat, so muß man auch zugeben, daß mindestens die Bildung sekundärer Zellhäute aus den im Zellsaft gelösten Gummischleimen durch die Einwirkung der Cytokoagulase erfolgen kann.

Ich halte es sogar für wahrscheinlich, daß die Bildung auch der primären Zellhaut auf diese Weise erfolgen kann, denn unsere Cytokoagulaselösung ist gerade aus einem embryonalen Gewebe gewonnen worden, in dem die Zellhautbildung lebhaft von statten ging. Das Experiment steht freilich noch aus, da wir noch nicht echte Zellulose in Lösung bringen können.

Auf eine Albuminlösung wirkt die Cytokoagulase nicht ein.

Die endgültige Überzeugung von der koagulierenden Wirkung brachte die mikroskopische Untersuchung: es fanden sich ganz vereinzelt kleine Thymolkrystalle, welche durch teilweise Lösung an den Enden und Kanten abgerundet waren, und von denen einer ganz und andere nur halb mit dem körnigflockigen Niederschlag umhüllt waren.

Als Phloxin zugesetzt wurde, wurde dieser auf die Krystalle abgesetzte Niederschlag rot gefärbt.

Daraus folgt, daß der Niederschlag sich erst nach Zusatz des Thymols gebildet haben muß und daß er wie auch eine Membran Farbstoff speichert.

Die günstigste Temperatur für die Cytokoagulasewirkung beträgt 28—30°.

Auch an Traganth zeigte sich die Wirkung, doch läßt sich selbst durch mehrstündiges Erhitzen auf 120° dieses Saccharokolloid nicht so gut in Lösung bringen wie Kirschgummi.

Nach 14 Tagen wurde die ganze Untersuchungsreihe noch

einmal durchgeführt. Es hatten sich inzwischen die *Pteris*-Triebe schon vollständig entwickelt und nur noch einzelne Nachzügler konnten aufgefunden werden, deren Sproßenden noch gekrümmt waren. Bei der kühleren Witterung waren sie wohl im Wachstum zurückgeblieben; aus ihnen ließ sich eine Lösung erhalten, die merklich schwächer koagulierte. Nach 24 Stunden war aber die Erscheinung deutlich eingetreten.

Ein ähnliches Verhalten beobachtete ich vor Jahren¹⁾ an einem Grünmalz, dessen diastatische Wirksamkeit ich zu bestimmen hatte: bei starker Abkühlung von 20° auf 5° war dieselbe auffallend zurückgegangen.

Mit der Temperaturerniedrigung mußte in diesem Fall die Wirksamkeit der Diastase und ihre Sekretion im Endosperm herabgesetzt werden, wodurch eine Verminderung in der Zufuhr löslichen Materials zum Embryo eintrat. Dies machte sich hier dadurch bemerkbar, daß in den embryonalen Blattzellen weniger Stärke gebildet wurde. Die Stärkebildung pro qmm Querschnitt sank im Verhältnis von 15 : 8.

Enzym und Gegenenzym können auch in einer Lösung wirken; so kann z. B. die Amylokoagulase in Gegenwart einer geringen Diastasemenge die Ausflockung hervorbringen. Ganz besonders scheint diese Doppelwirkung vor sich zu gehen, wenn der ausgeflockte Bestandteil schwerer hydrolysierbar ist als der, welcher leichter in Lösung überzuführen ist.

Wie auch bei anderen Enzymen beobachtet wurde, erreichte die Koagulasereaktion nie den Endzustand: die Wirksamkeit nahm mehr und mehr ab und hörte schließlich auf; es fehlte der für die Koagulation günstigste Zustand, die Anhäufung, vielleicht ist aber auch das Enzym selbst sehr labil und nicht beständig.

1) S. Wochenschrift f. Brauerei 1899, Nr. 40.

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): Grüss(Grüß) J.

Artikel/Article: [Kapillaranalyse einiger Enzyme. 313-319](#)