

Ueber das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in gekeimten Samen und über seine Wirkung.

Von

Wl. Butkewitsch.

(Aus dem agricultur-chemischen Laboratorium des eidgenössischen Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 14. December 1900.)

Die ersten Angaben über das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in den Samen finden wir in den Arbeiten von v. Gorup-Besanez und H. Will¹⁾ 1874 und 1875. Dieses Enzym wurde von den genannten Forschern aus den ungekeimten Wicken-, Hanf- und Leinsamen und den gekeimten Samen der Gerste, und zwar aus dem sogenannten gelben Darrmalz, nach der Wittich'schen Methode isolirt. Die aus dem Glycerinextract durch ätherhaltigen Alkohol ausgefällte und durch wiederholte Auflösung und Fällung gereinigte Substanz besass die Fähigkeit, ähnlich dem thierischen Pepsin, in Gegenwart von 0,2%iger Salzsäure Blutfibrin und geronnenes Eiereiweiss unter Bildung von Pepton zu verflüssigen. Die nach der gleichen Methode ausgeführten Versuche mit ungekeimter Gerste und Luftmalz, sowie mit Lupinensamen, *Secale cornutum*, Piniensamen, Zea-Mays, Mandeln und Bohnenkeimlingen ergaben negative Resultate.

Bald nach der Veröffentlichung der Arbeit von v. Gorup-

1) v. Gorup-Besanez, Ueber das Vorkommen eines diastatischen und peptonbildenden Fermentes in den Wickensamen. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. VII (1874), S. 1478; derselbe: Weitere Beobachtungen über diastatische und peptonbildende Fermente im Pflanzenreich ibidem, Bd. VIII (1875), S. 1510. — Ueber einige Angaben von Will, vergl. Krauch, landw. Versuchsstat., Bd. XXIII (1879), S. 78.

Besanez wurde von Van der Harst¹⁾ in den Cotyledonen gekeimter Phaseolussamen ein ähnliches Enzym gefunden. Ein Glycerinextract aus diesen Cotyledonen verdaute in Gegenwart von HCl Blutfibrin bis zur Peptonbildung, ein Extract aus den Axenorganen derselben Keimlinge zeigte diese Eigenschaft nicht.

Krauch²⁾ untersuchte genau nach der von v. Gorup-Besanez benützten Methode eine ganze Reihe von Pflanzenobjecten, unter anderen Wickensamen und Darmmalz, konnte aber in keinem einzigen Falle Spuren des proteolytischen Enzyms entdecken. Sich auf seine Untersuchungen stützend, kommt er zu dem Schlusse, dass die Beobachtungen von v. Gorup-Besanez irrthümlich seien. Die von diesem beobachtete Volumenverminderung der Fibrinflocken muss, nach Krauch's Meinung, ausschliesslich dem Einfluss des Glycerins, und die Biuretreaction den löslichen Eiweissstoffen, die sich in dem von v. Gorup-Besanez enthaltenen Enzym-Präparat befanden, zugeschrieben werden.

So stand es mit der Frage über das Vorkommen proteolytischer Enzyme in den Samen, als Green zur Lösung derselben schritt. Er benutzte eine Methode, die etwas verschieden von der von seinen Vorgängern angewandten war.

Als Object seiner ersten Untersuchung³⁾ dienten ihm die Cotyledonen gekeimter Lupinensamen (*Lup. hirsutus*). Die zerriebenen Cotyledonen wurden direkt mit Glycerin ausgezogen, ohne vorher mit Alkohol behandelt zu sein, wie es v. Gorup-Besanez that. Der erhaltene Extract wurde sorgfältig mittelst Dialyse von allen durch Pergamentpapier diffusibeln Körpern befreit, bis das Dialysat keine Biuretreaction mehr zeigte und keine Krystalle beim Eindampfen ausschied.

1) Van der Harst. Moondblad voor Naturwetensch., 1876, 20. Sept.

2) Krauch. Beiträge zur Kenntniss der ungeformten Fermente im Pflanzenreich. landw. Versuchsstat., Bd. XXIII (1879), S. 78; derselbe. Ueber peptonbildende Fermente in den Pflanzen. ibidem Bd. XXVII (1882), S. 383.

3) J. R. Green, On the Changes in the Proteids in the Seed which accompany Germination. Philos. Transactions of the Royal Soc. of London (B), 1887, Vol. 178, p. 39.

Die Wirkung des so gereinigten Extracts auf Blutfibrin wurde im Dialysator mit 0,2%iger Salzsäure bei einer Temperatur von 37—40° geprüft: im äussern Gefäss des Dialysators befand sich Salzsäure derselben Concentration. Unter diesen Bedingungen beobachtete Green Auflösung von Blutfibrin, und nach einiger Zeit gelang es ihm, eine klare Biuretreaction im Dialysat zu erhalten, die auf die Anwesenheit von Peptonen schliessen liess.

Bei vorsichtigem Eindampfen des Dialysats schieden aus demselben sich Krystalle aus, unter denen sich, wie Green angibt, Leucin und Tyrosin vorfanden. In der inneren Flüssigkeit des Dialysators wurden Parapepton und Albumosen nachgewiesen. Bei den Kontrollversuchen mit vorher aufgekochtem Samenextract und ohne Extract mit 0,2%iger Salzsäure allein konnte Green keine Verdauung des Fibrins und keine Bildung von ins Dialysat übergehenden Produkten constatiren: in der inneren Flüssigkeit des Dialysators wurden bei dem Versuche mit Salzsäure allein nur Spuren von Albumosen nachgewiesen.

Bei der Wiederholung dieses Versuchs mit aus Lupinensamen isolirten Eiweissstoffen bekam Green dasselbe Resultat: auch hier wurde im Dialysat die Anwesenheit von Peptonen constatirt, und beim Eindampfen des Dialysats ebenfalls die Abscheidung krystallinischer Produkte beobachtet. Bei allen diesen Versuchen konnte die Biuretreaction im Dialysat nicht erhalten werden, wenn im Dialysator Ferment fehlte.

Zur Beseitigung jeglichen Zweifels bezüglich des Ursprungs der krystallinischen Produkte wechselte Green in einer Reihe von Versuchen mit Eiweissstoffen aus Samen, nach bestimmten Zeitintervallen, die Aussenflüssigkeit des Dialysators und fand bei der Untersuchung jeder einzelnen Fraction des Dialysats in den letzten Fractionen eine grössere Quantität krystallinischer Produkte als in den ersten, was auf ihre Bildung bei der Verdauung schliessen lässt. In einzelnen Fällen beobachtete Green beim Eindampfen des Dialysats die Abscheidung von Krystallen, die, wie er sagt, dem Asparagin ähnlich waren: jedoch sind sie von ihm nicht näher untersucht worden.

Etwas später constatirte Green mit Hilfe derselben Methode die Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms im Endosperm der gekeimten Samen von *Ricinus communis*.¹⁾ Auch in diesem Falle wurden nach Green's Angaben unter den Produkten der Einwirkung des aus den Endospermen erhaltenen Extracts auf Fibrin nicht allein Pepton, sondern auch krystallinische Körper (Tyrosin) gefunden.

Etwas später hat Neumeister²⁾ über das Vorkommen proteolytischer Enzyme in den Samen und den Keimpflanzen Versuche angestellt, bei denen er die Absorbirbarkeit solcher Enzyme durch frisches Blutfibrin zur Abscheidung derselben aus den Extracten zu verwenden suchte. Frisch bereitetes Fibrin wurde eine Zeit lang im wässerigen Extracte des untersuchten Objectes liegen gelassen und darauf in eine 0,8%ige Oxalsäurelösung (0,2%ige HCl übt nach Neumeister's Beobachtungen, eine zerstörende Wirkung auf das Enzym der Samen) gebracht und sammt dieser Lösung in den Brütöfen gestellt. Auf diesem Wege wurde die Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms, auf die Neumeister aus der Fibrinauflösung und der Peptonbildung schloss, nur in einigen Keimlingen (Gerste, Mohn, Rüben, Mais und Weizen) constatirt, wobei der Gehalt dieses Enzyms in den späteren Entwicklungsstadien der Keimpflanzen bedeutend zunahm.

Bei andern, im gleichen Alter wie die vorhergenannten untersuchten Keimlingen und jungen Pflanzen (Lupinen, Wicken, Erbsen, Roggen und Hafer), ebenso wie bei allen untersuchten ungekeimten Samen, konnte Neumeister nach seiner Methode kein Enzym nachweisen.

Bei einigen Pflanzen der letzten Kategorie constatirte Neumeister bei der Keimung der Samen die Bildung von Peptonen oder eine Zunahme des Gehaltes derselben und

1) J. R. Green. On the Germination of the Seed of the Castor oil-Plant (*Ricinus communis*). Proceedings of the Royal Society of London. Vol. XLVIII (1890), S. 370.

2) R. Neumeister. Ueber das Vorkommen und die Bedeutung eines eiweisslösenden Enzyms in jugendlichen Pflanzen. Zeitschr. für Biologie. Bd. 30 (1894), S. 447.

spricht deshalb die Meinung aus, dass in diesen Fällen die Peptonisirung der Eiweissstoffe in der Pflanze durch die Wirkung des lebendigen Protoplasmas bedingt wird. Diese von Neumeister ausgesprochene Ansicht stützt sich auf die Annahme, dass die von ihm zum Nachweis des proteolytischen Enzyms angewandte Methode die Anwesenheit desselben in allen Fällen, in denen es vorkommt, nachweisen muss.

Die von Frankfurt¹⁾ ausgeführten Untersuchungen mit Weizenkeimen zeigten jedoch, dass in einigen Fällen, in welchen das peptonisirende Enzym nach dem Wittich'schen Verfahren isolirt werden konnte, es unmöglich war, dasselbe nach der von Neumeister angewandten Methode nachzuweisen: diese Untersuchungen konnten daher Zweifel daran erwecken, dass Neumeister's Methode allgemein brauchbar ist.²⁾

Auffallend ist auch die Thatsache, dass Neumeister kein proteolytisches Enzym in den Samen und Keimlingen der von ihm untersuchten Leguminosen nachgewiesen hat, während doch bekanntlich die Keimung dieser Samen von einem besonders energischen Eiweisszerfall begleitet wird. Ausserdem stehen seine negativen Resultate für die Lupinenkeimlinge im Widerspruch mit den Resultaten der Untersuchung Green's, dessen Versuche sehr sorgfältig ausgeführt sind.³⁾

1) S. Frankfurt, Landw. Versuchsstat. Bd. 47 (1896), S. 466.

2) Als Mangel der von Neumeister benutzten Methode kann man wohl auch den Umstand betrachten, dass er bei der Darstellung des Extracts aus den untersuchten Objecten letztere einer vorherigen Trocknung nicht unterwarf. Diese Operation spielt eine bedeutende Rolle beim Nachweis der Enzyme, wie es die Angaben anderer Autoren für andere Enzyme (Diastase, Invertin, Glycase), ebenso die von Frankfurt (l. c.) für die peptonisirenden Enzyme der Weizenkeime gezeigt haben. Dem Einfluss des Trocknens ist es wahrscheinlich zuzuschreiben, dass Gorup-Besanez ein peptonisirendes Enzym in Darmmalz fand, seine Anwesenheit im Luftmalz aber nicht nachweisen konnte.

3) In seiner oben citirten Arbeit unterwirft Neumeister Green's Versuche einer scharfen Kritik. « Die Experimente », sagt er, « auf welche Green seine Resultate stützt, scheinen mir nichts weniger als überzeugend ». Wie es scheint, war aber Neumeister mit den Originalabhandlungen Green's nicht bekannt. In seiner Kritik der Versuche des letztern erwähnt er einige wichtige Details der Versuche Green's

Einige Angaben über das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in Samen finden wir in der vor Kurzem erschienenen ausgedehnten Arbeit von Fermi und Buscaglioni.¹⁾ Diese Autoren* benutzten die von Fermi zur Untersuchung des proteolytischen Enzyms in den Bacterien zuerst angewandte Methode und wiesen in einer Reihe von gekeimten und von ruhenden Samen das Vorkommen eines Enzyms nach, welches die Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, besitzt. In einigen Fällen gaben die Versuche mit Samen, sogar mit gekeimten, negative Resultate. Aber die Autoren selber schreiben diesem Befund keine endgültig entscheidende Bedeutung zu, weil die Resultate der Versuche für eine und dieselbe Art in verschiedenen Fällen verschieden ausfielen. M. Soave²⁾ hat Eiweisspaltung in gekeimten Samen nachgewiesen, deren Entwicklung durch Einwirkung von anästhetischen Mitteln (Chloroform, Aether) vollständig aufgehoben wurde, und spricht

nicht, die von diesem in seiner ersten Arbeit (1887) beschrieben wurden; auch citirt er gar nicht diese Arbeit Green's, sondern nur eine spätere, im Jahre 1890 veröffentlichte über die Umwandlungen der Reservestoffe in den keimenden Ricinussamen, in welcher der Autor Versuche mit proteolytischem Enzym gar nicht näher beschreibt, und nur sagt, dass dieselben ebenso angestellt waren wie die Versuche mit Lupinensamen, und dass sie dieselben Resultate ergaben. Neumeister hält die von Green angewandte Methode zur Prüfung auf das Vorhandensein eines Enzyms mit Hilfe des Dialysators nicht für überzeugend, da 0.2% ige HCl schon an und für sich die Umwandlung von gequollenem Fibrin unter Bildung von diffusibeln Produkten (Albumosen und auch Peptonen) hervorruft, erwähnt aber nicht, dass Green in allen Fällen Kontrollversuche angestellt hatte, in welchen die Bildung solcher Produkte nicht beobachtet wurde. Ebenso erwähnt Neumeister nicht die krystallinischen Produkte, die von Green im Dialysat in denjenigen Fällen nachgewiesen wurden, in denen Fibrin oder Eiweissstoffe aus Samen der Einwirkung des Glycerinextracts unterworfen wurden.

1) G. Fermi und Buscaglioni, Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreiche. Centralbl. f. Bact., Parasitenk. etc. Abth. II, Bd. 5, 1899, S. 24.

2) Marco Soave, Contributo allo studio della funzione fisiologica dei fermenti chimici o enzimi nella vita della piante. Ricerche chimico-fisiol. sulla germinazione dei semi sotto l'azione degli anestetica. Le istituzioni sperimentali agrarie italiane. Vol. XXXII, Fasc. VI, 1899, S. 553.

danach auch die Vermuthung aus, dass in den Keimpflanzen ein eiweisspaltendes Enzym vorkommt.

Ferner müssen wir einige in neuester Zeit erschienene Arbeiten über das proteolytische Enzym des Malzes erwähnen. Laszczynski¹⁾ untersuchte nach verschiedenen Methoden grüne Gerstenkeimlinge und getrocknetes Malz. Er gelangte dabei zu einander widersprechenden Resultaten, kommt aber schliesslich zu den Schlussfolgerungen, dass die gekeimte Gerste kein proteolytisches Enzym enthält und dass die verschiedene Löslichkeit der stickstoffhaltigen Substanzen des Malzes von den Extractionsbedingungen abhängig ist. Zu derselben Schlussfolgerung kommt auch Loé,²⁾ der die Wirkung der aus grünen Gerstenkeimlingen und aus Malz gewonnenen Extracte auf die in der Gerste vorhandenen Eiweissstoffe untersuchte.

Ganz vor Kurzem, als meine Arbeit schon zu Ende geführt war, erschienen beinahe gleichzeitig zwei Arbeiten, in denen, im Gegensatz zu den Schlussfolgerungen der eben genannten Autoren, die früheren Angaben von v. Gorup-Besanez und von Neumeister über das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in der gekeimten Gerste eine überzeugende Bestätigung finden. Ausserdem finden wir in diesen Arbeiten Angaben, wonach die Eiweisspaltung durch das Malzenzym sich über die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Peptone hinaus erstreckt.

Eine dieser Arbeiten ist von Fernbach und Hubert.³⁾ Zur Untersuchung wurde Malzextract, das durch Filtration mittelst des Chamberland'schen Filters bacterienfrei gemacht war, angewendet. Dieses Extract verflüssigte Gelatine. Bei einer Temperatur zwischen 20—70° der Verdauung unterworfen, verlor es eine erhebliche Menge der durch Erwärmen

1) B. de Verbno Laszczynski, Ueber das Vorkommen eines peptonisirenden Enzyms (Peptose) im Malz etc. Zeitschr. f. das gesammte Brauwesen. XXII, 1899, III. 6, 7, 10 und 11.

2) W. Loé, Enthält das Malz ein peptonisirendes Enzym? Der Bierbrauer. 1899, H. 6.

3) A. Fernbach et L. Hubert, Sur la diastase proteolytique du malt. Compt. rend. T. 130, No. 26, S. 1783.

coagulirbaren Eiweissstoffe, wobei die Menge der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren stickstoffhaltigen Körper stieg, eine Thatsache, aus der die Autoren schliessen, dass die spaltende Wirkung des Enzyms noch über die Bildung von Peptonen hinausging. Die bei verschiedenen Temperaturen angestellten Versuche zeigen dabei, dass die Erhöhung der Temperatur bis 60° die Eiweisspeptonisirung beschleunigt, aber die Bildung von durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Körpern hemmt (die relative Menge der letzten war grösser bei niedrigeren Temperaturen). Auch wurde aus dem Malzextract durch Fälln mittelst Weingeist eine Substanz erhalten, welche die Fähigkeit, durch Erhitzen coagulirte Eiweissstoffe des Malzextracts und unlösliche Stickstoffverbindungen der Gerste zu lösen, besass.

Eine Beschreibung derselben Erscheinungen in Bezug auf das Malzextract finden wir in einer anderen Arbeit von Windisch und Schellhorn.²⁾ Zur Beseitigung von Mikroorganismen wandten diese als antiseptische Mittel Chloroform und Thymol an. Was die Bedingungen der Wirkung des proteolytischen Malzenzyms anbetrifft, so fand die Verdauung von Eiweissstoffen in alkalischen, neutralen und sauren Lösungen statt, als das günstigste Medium erwiesen sich aber 0,2—0,4% ige Lösungen von organischen Säuren (Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure). Bezüglich des Einflusses der Temperatur stellten Windisch und Schellhorn ebenso wie Fernbach und Hubert fest, dass bei höheren Temperaturen die Eiweisspaltung schnell, aber nicht weitgehend ist, bei niedrigeren umgekehrt. Das durch Fällung mittelst Weingeist aus dem Glycerinextract isolirte Enzym wirkte auf ungelöstes Eiweiss und eiweissartige Stoffe thierischen Ursprungs, vermochte aber nicht die in ungelöstem Zustande vorhandenen Gersten, resp. Malzeiweissstoffe anzugreifen. Die letzte Beobachtung widerspricht den oben erwähnten Ergebnissen von Fernbach und Hubert. Ferner haben Windisch und Schellhorn mit Hülfe der Fermischen Methode (Verflüssigung

1) W. Windisch und B. Schellhorn, Ueber das eiweisspaltende Enzym der gekeimten Gerste. Wochenschr. f. Brauerei, 1900, II. 24—29.

der Gelatine) das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms auch in einigen anderen gekeimten Samen nachgewiesen.

Wie schon oben erwähnt, zerspaltete das von Green angewendete Glycerinextract aus Lupinen- und Ricinussamen, ähnlich dem thierischen Trypsin, die Eiweissstoffe bis zur Bildung krystallinischer Produkte. Diese interessante und auf diesem Gebiete einzige Beobachtung¹⁾ scheint gar keine Aufmerksamkeit auf sich gezogen zu haben, und fast bei keinem der Autoren, welche die Frage des Eiweisszerfalls bei der Keimung der Samen behandelt haben, finden wir irgend welchen Hinweis darauf, woran vielleicht neben der unvollständigen Identificirung jener Produkte durch Green (vgl. S. 32 u. 35) Neumeister's abfällige Kritik der Versuche Green's die Schuld trägt.²⁾

Um einen Beitrag zur Lösung der Frage über das Vorkommen des proteolytischen Enzyms in den Samen und über seine Wirkung zu geben, habe ich, bevor ich die Isolirung desselben unternahm, Versuche mit der Substanz der Samen selbst, ähnlich den Versuchen von Salkowski³⁾ über *Autodigestion* der thierischen Organe angestellt. Ich lasse hier zunächst die Beschreibung der in dieser Weise von mir angestellten Versuche folgen.

1) Allerdings hat v. Gorup-Besanez (Ber. d. deutsch. chem. Ges. VII. 1. c.) einen Versuch gemacht, solche Produkte bei der Verdauung von Fibrin durch ein proteolytisches Enzym aus Wickensamen nachzuweisen. Bei diesem Versuche ging er von der Voraussetzung aus, dass man in dem von ihm in den Wickenkeimlingen gefundenen Asparagin und Leucinprodukte einer enzymatischen Spaltung der Eiweisskörper zu sehen habe. Sein Versuch aber ergab negative Resultate, vielleicht aus dem Grunde, weil er nicht wie Green gekeimte, sondern ruhende Samen genommen hatte.

2) Vergl. die Abhandlung von E. Schulze *Ueber den Eiweissumsatz und die Bildungsweise des Asparagins und Glutamins in den Pflanzen*, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI (1898/99), S. 411, sowie auch W. Pfeffer's *Pflanzenphysiologie*, I. Bd., II. Aufl., 1897, S. 464 und 511. Die beiden genannten Autoren stützen sich nur auf die oben citirte Abhandlung von R. Neumeister.

3) E. Salkowski, *Ueber Autodigestion der Organe*, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. XVII, 1890, Suppl., S. 77.

I. Versuche über die Autolyse oder Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz.

Folgende Gedanken lagen diesen Versuchen zu Grunde: Wenn man die gekeimten Samen bei einer Temperatur von 35—40° C. trocknet, so wird das in denselben etwa vorhandene Enzym nicht verändert werden. Wenn man nun die getrockneten Substanzen fein zerreibt, das zuvor mit Aether behandelte Pulver mit Wasser übergießt und hierauf unter Bedingungen, welche die Mitwirkung von Spaltpilzen ausschliessen, eine Zeit lang auf 35—40° C. erwärmt, so können durch das Enzym die in der gepulverten Substanz vorhandenen Eiweissstoffe gelöst und vielleicht auch gespalten werden. Eine solche Wirkung des Enzyms kann dagegen nicht eintreten, wenn man bei im Uebrigen ganz gleicher Anordnung des Versuches das mit Wasser übergossene Keimpflanzenpulver kurze Zeit auf 100° erhitzt.

Ich habe solche Versuche sowohl mit gekeimten, als auch mit ungekeimten Samen angestellt. In allen Fällen wurden die Substanzen in der gleichen Weise vorbereitet. Nach dem Trocknen bei 35—40° C. wurden die Samen im Mörser zerkleinert, mit Hilfe der Dreef'schen Reibe in ein staubfeines Pulver verwandelt und darauf während zwei bis drei Tagen mit Aether extrahirt.

Nach Beendigung des Erhitzens im Thermostat wurde in der Regel der Inhalt eines jeden Kolbens nach Stutzer's Vorschrift mit Kupferoxydhydrat erhitzt, dann aufs Filter gebracht, der Filterinhalt mit Wasser gut ausgewaschen und sodann für die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl's Methode verwendet: die so erhaltene Stickstoffmenge wurde als Proteinstickstoff in Rechnung gestellt. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure angesäuert, sodann mit Phosphorwolframsäure versetzt, der dadurch erzeugte Niederschlag abfiltrirt, mit 5% iger Schwefelsäure ausgewaschen und gleichfalls zur Stickstoffbestimmung verwendet. Durch Subtraction des Proteinstickstoffs und der im Phosphorwolframsäureniederschlag gefundenen Stickstoffmenge vom Gesamtstickstoff ergab sich die Stickstoffquantität, welche den durch Phosphorwolframsäure nicht

fällbaren Verbindungen (Amidosäuren u. s. w.) angehörte. In einigen Fällen analysirte ich nicht den Gesamttinhalt des Kolbens, sondern nur die vom ungelösten Rückstand abfiltrirte Flüssigkeit; in abgemessenen Antheilen dieser Flüssigkeit wurden der Gesamtstickstoff, der Proteinstickstoff und die im Phosphorwolframsäureniederschlag enthaltene Stickstoffmenge bestimmt.

Es ist zuzugeben, dass diese in ihrer Ausführung sehr einfachen analytischen Verfahren unvollkommen sind. Dass man durch Stutzer's Methode in manchen Fällen keine scharfe Trennung der Proteinstoffe von den nichtproteinartigen Verbindungen erreichen kann, ist von verschiedenen Autoren¹⁾ hervorgehoben worden. In dem Niederschlag, welchen Phosphorwolframsäure in den nach Stutzer's Verfahren von den Eiweissstoffen befreiten Flüssigkeiten hervorbringt, können neben Peptonen Hexonbasen und andere Stoffe basischer Natur enthalten sein: dieser Niederschlag kann also Stickstoffverbindungen einschliessen, welche verschiedenen Stoffgruppen angehören. Wenn aber auch jene Methoden nur unvollkommenen Aufschluss über die Vertheilung des Gesamtstickstoffs auf die verschiedenen Stoffgruppen gewähren, so habe ich doch mit ihrer Hülfe mit Sicherheit nachweisen können, dass in meinen Versuchen die Eiweissstoffe eine starke Zersetzung erlitten und dass dabei auch Produkte, die nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar sind, entstanden: die Anwendung jener Methoden genügte also für den Zweck, den ich bei Ausführung meiner Analyse verfolgte.

Es erschien wünschenswerth, in den Versuchsflüssigkeiten auch noch das beim Kochen mit verdünnter Salzsäure²⁾ entstehende Ammoniak³⁾ zu bestimmen, weil sich daraus nach Sachsse's Verfahren der Asparagingehalt der Flüssigkeiten berechnen lässt, freilich nur unter der Voraussetzung, dass

1) Ich verweise auf die Abhandlungen E. Schulze's sowie auf die oben citirte Arbeit Laszczynski's.

2) Auf 100 cem. Flüssigkeit setzte ich 5 cem. concentrirte HCl zu.

3) Im Folgenden kurz als „leicht abspaltbares Ammoniak“ bezeichnet.

ausser Asparagin keine andere durch verdünnte Salzsäure unter Ammoniakbildung zersetzbare Substanz sich vorfand. Ich hielt es für zweckmässig, für diese Bestimmung das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag zu verwenden, weil durch die Fällung mit diesem Reagens die peptonartigen Stoffe und das ursprünglich vorhandene Ammoniak entfernt sein mussten. (Die in diesem Filtrat noch vorhandene Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure beseitigte ich mit Baryt.) In einigen Fällen wurde jedoch jene Bestimmung in Flüssigkeiten ausgeführt, die nur durch Fällung mit Bleiessig gereinigt worden waren.

A. Versuche mit zweitägigen Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius*.

Ungefähr gleiche Mengen der nach der oben beschriebenen Methode präparirten Keimpflanzensubstanz wurden in Erlenmeyer'sche Kolben gebracht, in jeden derselben eine bestimmte Quantität Thymolwasser gegossen und ausserdem noch festes, fein zerriebenes Thymol hineingethan, so dass letzteres also stets im Ueberschuss vorhanden war. Alle Kolben, deren es 10 gab, wurden darauf im Thermostat auf 35—40° erwärmt, nachdem die Kolben I und II zuvor 10 Minuten lang im Wasserbade auf fast 100° erhitzt worden waren. Nach Verlauf von 4 Tagen wurden zwei andere Kolben, III und IV, einem eben solchen Erwärmen wie die vorigen unterworfen und wieder in den Thermostat gestellt. Nach 4 Tagen wurde mit weiteren 2 Kolben ebenso verfahren u. s. w. Nach Verlauf von 16 Tagen wurde der Versuch beendigt. Der Inhalt der Kolben wurde nun den oben beschriebenen Bestimmungen unterworfen. Die gleichen Bestimmungen wurden auch in der ursprünglichen Substanz ausgeführt: ausserdem wurde in letzterer auch der Gesamtstickstoff bestimmt.

Ehe ich die bei diesen Bestimmungen erhaltenen Zahlen folgen lasse, sei noch erwähnt, dass bei Beendigung der Versuche die in den Kolben über dem Ungelösten stehenden Flüssigkeiten klar waren, sowie auch, dass die zu Beginn des Versuches nicht zum Kochen erhitzten Flüssigkeiten beim Erwärmen mit Kupferoxydhydrat nach Stutzer's Vorschrift stark blaue Färbung annahmen, während die zu Beginn des

Versuches gekochten Flüssigkeiten sich bei gleicher Behandlung nur hellgrün färbten. Diese Erscheinung deutet schon darauf hin, dass in den nicht gekochten Flüssigkeiten Amid- oder andere Stickstoffverbindungen, welche Kupferoxydhydrat lösen, sich vorfinden.

Von den bei den Analysen erhaltenen Zahlen führe ich nur die Durchschnittswerthe an: 1)

Tabelle a.

	Ursprüngliche Substanz	I u. II zu Anfang des Versuches gekocht	III u. IV nach 4 Tagen gekocht	V u. VI nach 8 Tagen gekocht	VII u. VIII nach 12 Tagen gekocht	IX u. X nach 16 Tagen gekocht
Abgewogene Substanz	—	2,1062 g	2,1637 g	2,0830 g	2,0205 g	2,0037 g
Gesamt-N	7,07 ‰	—	—	—	—	—
Protein-N	6,35 ‰	6,26 ‰	5,28 ‰	4,99 ‰	4,82 ‰	4,85 ‰
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . .	0,30 ‰	0,34 ‰	0,43 ‰	0,42 ‰	0,44 ‰	0,43 ‰
N im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag . .	0,42 ‰	0,47 ‰	1,36 ‰	1,66 ‰	1,81 ‰	1,79 ‰
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode) . .	0,12 ‰	—	—	—	0,28 ‰	0,37 ‰

Wie aus den angeführten Zahlen zu ersehen ist, erlitten die Eiweissstoffe in den nicht auf 100° erhitzten Kolben eine Veränderung, unter Bildung von Produkten, die nur zum Theil durch Phosphorwolframsäure fällbar waren, während die in den Kolben I und II befindliche Substanz ihre Zusammen-

1) Die analytischen Belege theile ich weder hier noch bei den später folgenden Versuchen mit. In Betreff dieser Belege verweise ich auf eine ausführlichere Publication, die in russischer Sprache erfolgen wird.

setzung nur ganz unbedeutend änderte. Ausserdem wurde in den erstgenannten Kolben die Bildung von Produkten konstatiert, die Ammoniak beim Kochen mit verdünnter HCl nach Sachsse abspalten. Zur Kontrolle dieser Beobachtung wurde noch ein Versuch angestellt, bei welchem nur der leicht abspaltbare Stickstoff nach Sachsse und der Ammoniakstickstoff nach Bosshard¹⁾ bestimmt wurden.

Tabelle b.

	I zu Anfang des Versuchs gekocht	II nach 8 Tagen gekocht	III nach 16 Tagen gekocht
Abgewogene Substanz	4,3242 g	4,3049 g	4,1625 g
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode)	0,17 %	0,26 %	0,31 %
Ammoniak-N im Phosphorwolframsäure- niederschlag (nach Bosshard)	0,009 %	0,009 %	0,019 %

Auch hier wurde die Bildung von Produkten constatirt, die beim Erhitzen mit verdünnter Salzsäure Ammoniak geben. Der Ammoniakgehalt in der untersuchten Substanz war in allen Fällen ein unbedeutlicher.

Die in meinen Versuchen beobachtete Eiweisszersetzung, welche durch kurzes Erhitzen des Kolbeninhalts auf ca. 100° verhindert werden konnte, kann wohl für sich allein, auch ohne dass die Resultate anderer Versuche noch berücksichtigt werden, als eine Bestätigung für Green's Annahme, dass in den Lupinus-Keimpflanzen ein proteolytisches Enzym sich findet, betrachtet werden: denn es ist nicht ersichtlich, welches andere Agens in diesen Versuchen die Eiweissstoffe zum Zerfall gebracht haben könnte. Dass es sich hier um die Wirkung des lebenden Protoplasmas der Keimpflanzen handelte, ist schon deshalb nicht anzunehmen, weil das Keimpflanzenpulver einige Tage unter Aether gewesen war. Ebenso wenig kann an die Mitwirkung von Spaltpilzen bei der Eiweisszersetzung gedacht werden, da Thymol im Ueberschuss zugesetzt war.

1) E. Bosshard, Ueber Ammoniakbestimmung in Pflanzensäften und Pflanzenextracten. Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. XXII (1883), S. 329.

Um aber die Nichtbetheiligung von Spaltpilzen an dem beschriebenen Process noch bestimmter beweisen zu können, habe ich noch folgenden Versuch angestellt. In einen sterilisirten Kolben wurden ca. 2 g des Keimpflanzenpulvers gebracht, dann wurde Aether daraufgegossen und der Kolben nur mit einem Baumwollepfropfen verschlossen. Nach 3 Tagen liess ich den Aether bei einer Temperatur von 35—40° verdunsten und brachte dann eine durch Erhitzen sterilisirte Thymollösung unter den nöthigen Vorsichtsmassregeln in den Kolben. Dann wurde der Kolben in einem Versuche 3 Tage, in einem zweiten 7 Tage lang auf 35—40° erhitzt. Zwei andere Kolben, von denen einer bei Beginn des Versuchs auf ca. 100° erhitzt wurde, wurden mit ihrem Inhalt ebenso behandelt, wie es im Versuche a geschehen ist. Die bei der Analyse des Kolbeninhalts erhaltenen Resultate theile ich im Folgenden mit.

	I. Zu Anfang des Versuches gekocht	II. Nicht gekocht, sterilisiert	III. Nicht gekocht, sterilisiert	IV. Nicht gekocht, nicht sterilisiert
Dauer des Versuchs	7 Tage	3 Tage	7 Tage	7 Tage
Abgewogene Substanz	2,028 g	2,057 g	2,014 g	2,025 g
Protein-N	6,29 %	5,27 %	4,99 %	4,94 %

Man sieht aus den Zahlen der Tabelle, dass in den Kolben II und III, in denen eine Mitwirkung von Spaltpilzen absolut ausgeschlossen war, trotzdem Spaltung von Eiweissstoffen stattgefunden hatte und dass diese Spaltung im Kolben III ebenso stark gewesen war, wie in dem ebenso lange im Thermostaten erhitzten Kolben IV, welcher nur in der gewöhnlichen Weise behandelt wurde.

Ich kehre nun noch einmal zu einer Betrachtung der Tabelle a zurück. Die Zahlen dieser Tabelle zeigen, dass der Eiweisszerfall in den ersten Tagen ziemlich energisch vor sich ging, dann langsamer wurde und nach 12 Tagen vollständig aufhörte. Die Menge der in diesem Zeitraum zerfallenen Proteinstoffe beträgt ca. 24% der ursprünglichen Menge derselben.

In der Annahme, dass die genannte Verzögerung und

Beendigung der Reaction durch den Einfluss der gebildeten Produkte bedingt wird, habe ich mit derselben Substanz einen anderen Versuch mit einer verhältnissmässig grösseren Menge Wasser angestellt. In diesem Falle wurde die Flüssigkeit nach Beendigung des Versuchs zuerst durch Flanell und dann durch ein Papierfilter filtrirt. Das Volumen des Filtrats wurde gemessen und in bestimmten Quantitäten desselben der Gesamt-N, der Protein-N u. s. w. bestimmt. Alle in den Tabellen angeführten Zahlen drücken den Stickstoffgehalt in Procenten der für den Versuch verwendeten Substanz aus.

Dauer der Versuche 12 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle c.

	I. Zu Anfang des Versuches gekocht	II. Nicht gekocht
Abgewogene Substanz	10.5063 g	10.9340 g
N im ungelösten Rückstand	4.96 %	3.40 %
Protein-N im Filtrat	1.24 %	1.50 %
Protein-N (zusammen)	6.20 %	4.90 %
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . .	0.31 %	0.45 %
N im Filtrat vom Phosphorwolframsäure- niederschlag	0.56 %	1.72 %
N des leicht abspaltbaren Ammo- (Bl.) ¹⁾ niaks (nach Sachsse's Methode) (Ph.W.) ²⁾	0.16 %	0.37 %
	0.12 %	0.27 %

Bei diesem Versuche ging der Eiweisszerfall nicht weiter, als bei dem vorhergehenden. Der nächste Versuch zeigte, dass im Filtrat vom II. Kolben kein actives Enzym vorhanden war. Aus diesem Filtrat wurden 50 ccm. (das gesammte Filtrat betrug 266 ccm.) genommen und wieder 7 Tage lang in den Thermostat gestellt. Die Analyse zeigte keine Veränderungen.

Protein-N 1,49% ; N im Phosphorwolframsäureniederschlag 0,47% ; N nach Sachsse (Flüss. durch Ph.-W.S. gereinigt) 0,27%.

Man darf wohl annehmen, dass in den Keimpflanzen die

1) Die Flüssigkeit wurde mittelst Bleiessig gereinigt.

2) Die Flüssigkeit wurde durch Phosphorwolframsäure gereinigt.

Bedingungen für die Wirkung des Enzyms noch günstiger liegen, als es in meinen Versuchen der Fall war. Denn erstens werden in den Keimpflanzen die durch das Enzym entstandenen Produkte aus den Cotyledonen, in denen das Enzym sich neben den seiner Wirkung unterliegenden Reserveproteinstoffen vorfindet, beständig weggeführt; zweitens ist das Enzym in concentrirter Lösung vorhanden und es ist bekannt, dass eine grosse Wassermenge schädlich auf die Enzyme wirkt. Endlich aber darf man auch annehmen, dass in den Keimpflanzen das Enzym immer wieder von Neuem sich bildet, wofür sowohl Angaben von Neumeister, von Green und von Windisch und Schellhorn, als auch die mit anderen Enzymen gemachten Erfahrungen sprechen.¹⁾

Ferner stellte ich im Hinblick auf die Angabe Green's, dass das proteolytische Enzym bei Gegenwart 0,2%iger Salzsäure am besten wirkte, einen Versuch mit der gleichen Substanz (von zweitägigen Lupinenkeimlingen) und unter denselben Versuchsbedingungen an, wobei ich jedoch statt Thymolwasser Salzsäure obiger Concentration zusetzte. Parallel damit wurde auch ein Versuch mit 0,1%iger Sodalösung angestellt. In beiden Fällen wurde, wie auch früher, festes Thymol im Ueberschusse zugesetzt.

Dauer der Versuche 12 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle d.

	I. 0.2% HCl	II. 0.1% Na ₂ CO ₃
Abgewogene Substanz	10.558 g	5.290 g
N im ungelösten Rückstand	3.92%	2.35%
Protein-N im Filtrat	1.86%	3.19%
Protein-N (zusammen)	5.78%	5.54%
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . .	0.65%	0.39%
N im Filtrat vom Phosphorwolframsäure- niederschlag	0.64%	1.14%

In der nächstfolgenden Tabelle werden die Resultate dieser Versuche mit denen der früheren Versuche zusammengestellt.

1) Vergl. die Arbeit Pfeffer's. Ueber die regulatorische Bildung der Diastase. Sitzungsber. d. Sächs. Ges. d. Wissenschaft. 1896. S. 513.

		Tab. a.	Tab. c.	Tab. d.	
				0.2% HCl	0.1% Na ₂ CO ₃
Abnahme	Protein-N	1.53	1.45	0.57	0.81
Zunahme	N im Phosphorwolframsäureniederschlag	0.14	0.15	0.35	0.09

Natriumcarbonat verzögerte also den Eiweisszerfallsprocess, veränderte aber nicht das Mengenverhältniss, in welchem die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffverbindungen zu den durch dieses Reagens nicht fällbaren stickstoffhaltigen Stoffen stehen. Salzsäure verzögerte diesen Process noch mehr, änderte aber auch das Verhältniss der Produkte zu einander. Die Hauptmenge der letzteren fand sich im Phosphorwolframsäureniederschlag vor, was darauf hindeutet, dass in diesem Falle hauptsächlich Albumosen und Peptone gebildet wurden.¹⁾

B. Versuche mit ungekeimten Samen von *Lupinus angustifolius*.

Dauer der Versuche 12 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle e.

	Ursprüngl. Substanz	I 0.2% HCl zu Anfang des Ver- suches gekocht	II 0.2% HCl	III Wasser nicht gekocht
Abgewogene Substanz	—	2.113 g	2.267 g	2.060 g
Protein-N	6.23%	6.28%	5.64%	5.66%
N im Phosphorwolframsäurenieder- schlag	0.28%	0.28%	0.59%	0.39%
Abnahme des Protein-N	—	—	0.59%	0.57%

1) Diese Angaben, die auf die prävalirende Bildung von Peptonen in Gegenwart von 0.2% iger HCl hindeuten, finden eine Bestätigung auch bei einem andern, später von mir angestellten Versuche mit der Substanz von Cotyledonen der 6tägigen Keimlinge von *Lupinus luteus*. Der Versuch wurde in 3 Dialysatoren ausgeführt. In zweien derselben befand sich die Substanz der Cotyledonen, mit Thymolwasser, wobei der Inhalt des einen vorher gekocht wurde. Im III. Dialysator war dieselbe Menge

		I 0,2% HCl Urprüngl. zu Anfang Substanz des Ver- suches gekocht		II 0,2% HCl	III Wasser nicht gekocht
Zunahme	N im Phosphorwolfram- säureniederschlag . . .	—	—	0,31%	0,11%
	N im Filtrat vom Phosphor- wolframsäurenieder- schlag	—	—	0,28%	0,46%

Nach Green befindet sich in den ungekeimten Lupinensamen Zymogen, das durch die Einwirkung von verdünnter HCl in das active Enzym umgewandelt wird. Aus diesem Grunde verwendete ich bei diesem Versuche HCl. Wie aber aus meinen Zahlen zu ersehen ist, beschleunigte dieselbe, ebenso wie im vorigen Versuch, den Zerfall der Eiweissstoffe nicht und verzögerte insbesondere die Bildung von Produkten, die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar sind.

Meine Beobachtungen über den Einfluss von HCl stimmen mit der Angabe von Neumeister überein, nach welcher das in den Pflanzen enthaltene Enzym mit 0,2% iger HCl nur Anfangs zu wirken schien, dann aber durch dieselbe allmählich zerstört wurde. ¹⁾

Daraus geht aber hervor, dass alle Versuche von Green (der 0,2% ige HCl anwandte) mit dem proteolytischen Enzym der Samen in einem für seine Wirkung ungünstigen Medium ausgeführt wurden. Wahrscheinlich erklärt sich daraus der Umstand, dass in den Versuchen von Green, wie er selbst angibt, das von ihm untersuchte proteolytische Enzym sehr langsam auf die Eiweissstoffe einwirkte und dass dabei Zwischenprodukte (Parapepton und Albumosen) in grosser Menge sich bildeten. ²⁾

Substanz enthalten, wobei das Wasser durch 0,2% ige HCl ersetzt war. Nach 3 tägigem Stehen im Thermostaten wurde das Dialysat mittelst der Biuretreaction geprüft. Die Dialysate I und II gaben keine irgendwie bemerkbare Reaction, in dem III. dagegen war dieselbe eine vollständig deutliche.

1) Neumeister l. c.

2) Green. Philos. Transact. l. c.

Was die Versuche anbetrifft, aus denen er den Schluss zieht, dass 0,2%ige HCl das günstigste Medium für das Enzym sei, so sind zum Vergleich nur Versuche mit 1, 1,5 und 5%igen Sodalösungen und 0,2, 0,4, 1%igen HCl-Lösungen von ihm ausgeführt worden.¹⁾ Weder ein neutrales Medium noch ein solches mit geringerem Säuregehalt als 0,2%iger HCl wurden von ihm untersucht. Bezüglich des neutralen Mediums finden wir Angaben bei Neumeister, welcher « das zur Absorption benutzte Fibrin in ein wenig Kochsalzhaltiges Wasser brachte und dabei die Auflösung des Fibrins nicht constatiren konnte.²⁾ Nach Green's Beobachtungen aber wird die Wirkung des Enzyms durch die Gegenwart von geringen Mengen von NaCl in der Flüssigkeit auch dann verhindert, wenn dieselbe mit HCl angesäuert wird (0,2% o).

Aus dem Gesagten ersieht man, dass die Frage nach dem günstigsten Medium für die Wirkung des proteolytischen Enzyms noch nicht als vollständig gelöst betrachtet werden kann. Jedenfalls haben meine Versuche gezeigt, dass der schwache Säuregehalt der Versuchslüssigkeit, der durch die Beschaffenheit der von mir verwendeten Keimpflanzensubstanz bedingt war, günstiger als 0,2%ige Salzsäure wirkt. Nach den Angaben von Neumeister tritt die Wirkung des Enzyms bei Gegenwart von 0,2%iger Salzsäure weniger hervor als bei Gegenwart von 0,4—0,8%iger Oxalsäure. Aus dieser Beobachtung, sowie aus den oben erwähnten Ergebnissen, zu denen Windisch und Schellhorn in ihrer Arbeit gelangten, darf man wohl schliessen, dass das proteolytische Enzym bei Gegenwart geringerer Menge von organischen Säuren am besten wirkt.

C. Versuche mit 4 tägigen Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius*.

Diese Versuche sowie auch die zunächst folgenden wurden ebenso ausgeführt, wie es oben für die zuerst beschriebenen Versuche angegeben worden ist.

Dauer der Versuche 12 Tage. Temperatur 35–40°.

1) Green, l. c.

2) Neumeister l. c.

Tabelle f.

	Ursprüngl. Substanz		Abnahme— resp. Zunahme(+)	
Abgewogene Substanz	—	20,271 g	—	
Gesamt N	7,38 ^o o	—	—	
N im ungelösten Rückstand	—	3,02 ^o o	—	
Protein-N im Filtrat	—	1,70 ^o o	—	
Protein-N (zusammen)	6,33 ^o o	4,72 ^o o	- 1,60	
N im Phosphorwolframsäurenieder- schlag	0,32 ^o o	0,38 ^o o	+ 0,06	
N im Filtrat vom Phosphorwolfram- säureniederschlag	0,73 ^o o	2,28 ^o o	- 1,55	
N des leicht abspaltbaren Am- moniak (nach Sachsse's Methode)	Bl. . Ph.-W.	0,30 ^o o	0,63 ^o o	0,33
		0,20 ^o o	0,47 ^o o	0,27

In diesem Versuche wurden ca. 25% der ursprünglich vorhandenen Eiweissstoffe, d. h. fast ebenso viel wie im entsprechenden Versuche mit 2tägigen Keimpflanzen gespalten.

D. Versuche mit 5tägigen Keimpflanzen von Ricinus major.

Dauer des Versuchs 12 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle g.

	Ursprüngl. Substanz		Abnahme— resp. Zunahme(+)	
Abgewogene Substanz	—	8,118 g	—	
Gesamt-N	10,12 ^o o	—	—	
N im ungelösten Rückstand	—	5,77 ^o o	—	
Protein-N im Filtrat	—	1,79 ^o o	—	
Protein-N (zusammen)	8,24 ^o o	7,56 ^o o	- 0,68	
N im Phosphorwolframsäureniederschlag	0,25 ^o o	0,48 ^o o	+ 0,23	
N im Filtrat von Phosphorwolframsäure- niederschlag	1,63 ^o o	2,08 ^o o	+ 0,45	
N des leicht abspaltbaren Am- moniak (nach Sachsse's Me- thode)	Bl. .	0,55 ^o o	0,66 ^o o	+ 0,11

E. Versuche mit den Cotyledonen 3tägiger Keimpflanzen von *Vicia Faba*.

Bei diesem Versuche wurden nur die Cotyledonen und nicht die ganzen Keimpflanzen wie bei den vorigen Versuchen angewendet:

Dauer des Versuchs: I. 6 Tage: II. 12 Tage.
Temperatur 35—40°.

Tabelle h.

	Ursprüngl. Substanz	I	Diff.	II	Diff.
Abgewogene Substanz . . .	—	6,7485 g	—	22,0525 g	—
Gesamt-N	5,28 ^o o	—	—	—	—
N im ungelösten Rückstand	—	2,10 ^o o	—	1,68 ^o o	—
Protein-N im Filtrat . . .	—	2,04 ^o o	—	2,07 ^o o	—
Protein-N (zusammen) . . .	4,61 ^o o	4,14 ^o o	— 0,47	3,75 ^o o	— 0,86
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . . .	0,06 ^o o	0,09 ^o o	+ 0,03	0,21 ^o o	— 0,15
N im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag . . .	0,61 ^o o	1,05 ^o o	+ 0,44	1,32 ^o o	+ 0,71
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (Bl.) . . .	0,19 ^o o	0,26 ^o o	+ 0,07	0,32 ^o o	+ 0,13
(nach Sachsse's Methode) (Ph. W.) . . .	0,17 ^o o	0,22 ^o o	+ 0,05	0,31 ^o o	+ 0,14
Ammoniak-N (nach Bossard)	—	—	—	0,009 ^o o	—

Bei der Vergleichung der Zahlen der I. und II. Reihe, die eine Abnahme des Protein-N ausdrücken, kann es scheinen, dass der Eiweisszerfall in den letzten 6 Tagen mit derselben Intensität wie in den ersten vor sich ging. In Wirklichkeit aber kann dieser Schluss aus unsern Resultaten nicht gezogen werden, da die Bedingungen der Versuche I und II nicht dieselben waren: bei II wurde verhältnissmässig mehr Substanz und weniger Wasser als bei I genommen. Es muss angenommen werden, dass auch hier wie beim Versuche mit *Lapinus angustifolius* der Process allmählich an Geschwindigkeit abnahm, dass die Bedingungen aber für die Wirkung des Enzyms bei Versuch II günstiger als bei I waren.

F. Versuche mit 6tägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus*.

In diesem Falle wurden sowohl die Cotyledonen als auch die Axenorgane untersucht.

Gesamt-N in den Cotyledonen 11,12%; in den Axenorganen 7,74%. Dauer des Versuchs mit Cotyledonen: I. 6 Tage, II. 12 Tage; mit Axenorganen: 8 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle i.

	Ur-sprüngl. Subst.	Cotyledonen			Axenorgane			
		im Thermostat			im Thermostat			
		12 Tage	6 Tage	12 Tage	8 Tage			
	Zu Anfang d. Vers. gekocht	nicht gekocht		Zu Anfang d. Vers. gekocht	nicht gekocht			
Abgewogene Substanz	—	7,00 g	7,00 g	7,00 g	5,00 g	5,00 g		
N im ungelösten Rückstand	—	4,51 %	3,08 %	2,80 %	1,74 %	1,30 %		
Protein-N im Filtrat	—	2,15 %	2,16 %	2,35 %	0,74 %	0,66 %		
Protein-N (zusammen)	6,77 %	6,66 %	5,24 %	5,15 %	2,48 %	1,96 %		
N im Phosphorwolframsäure-niederschlag	0,93 %	0,96 %	1,16 %	1,17 %	0,15 %	0,11 %		
N im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	3,42 %	3,50 %	4,72 %	4,80 %	5,11 %	5,67 %		
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode)	Bl. 1,06 %	1,09 %	—	1,39 %	2,33 %	2,47 %		
Abnahme des Protein-Ns	—	—	1,53 %	1,62 %	—	0,52 %		
Zunahme	N im Phosphorwolframsäureniederschlag	—	—	0,23 %	0,24 %	—	0,04 %	
		N im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	—	—	1,30 %	1,38 %	—	0,56 %
			N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode)	Bl. —	—	—	0,33 %	—

Bei diesem Versuche wurde die Zerspaltung der Eiweissstoffe sowohl bei den Cotyledonen als bei den Axenorganen constatirt. In beiden Fällen, wie auch in allen vorigen, wurde die Bildung von Substanzen beobachtet, welche beim Kochen mit verdünnter HCl nach Sachsse's Methode Ammoniak abspalten.

Weitere Versuche stellte ich zur Aufklärung der Frage an, welchen Einfluss andere antiseptische Mittel auf die Wirkung des proteolytischen Enzyms der Samen haben. Als solche Mittel wurden Chloroform und Blausäure angewendet. Das erstere ist neben Thymol das gewöhnlich bei solchen Versuchen mit Enzymen angewendete Antisepticum. Was die Blausäure anbetrifft, so ist durch die Versuche von Schönbein und in neuester Zeit von Schär¹⁾ festgestellt, dass sie die katalytische Wirkung der Enzyme schon in 0,1—0,2%iger Lösung stark schwächt. Von dieser Beobachtung geleitet, hat Schär die Meinung ausgesprochen, dass die letztere als diagnostisches Mittel für Enzyme Anwendung finden kann. Indem die Blausäure aber die katalytische Wirkung der Enzyme schwächt oder gänzlich hemmt, bleibt sie bekanntlich ohne bedeutenden Einfluss auf ihre spezifische Wirkung.²⁾

Ich will hier nur einige Beobachtungen anführen, die sich auf proteolytische Enzyme beziehen. Loew³⁾ hat gezeigt, dass Pancreastrypsin gegenüber Blausäure mehr als andere Enzyme widerstandsfähig ist. So fand er, dass eine 25%ige Blausäure in 5 Stunden das diastatische, aber nicht das proteolytische Enzym des Pancreas zerstört. Nach Vines⁴⁾ verdaut das proteolytische Enzym von *Nepentes* Fibrin in Gegenwart 1%iger Blausäure. Den Beobachtungen von Geret und Hahn⁵⁾

1) Festschrift Zürich, Alb. Müller, 1891.

2) Dass die von Schönbein entdeckte Eigenschaft der Enzyme, das Wasserstoffsperoxyd zu zerspallen, in keiner unmittelbaren Verbindung mit ihrer spezifischen Wirkung steht, ist schon von Jakobson (Untersuchungen über lösliche Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XVI. S. 340) festgestellt. Zu demselben Schlusse kommt auch O. Loew in seiner vor Kurzem erschienenen Arbeit: «A new enzyme of general occurrence, with special reference to the Tobacco plant.» U. S. Departement of Agriculture. Bullet. No. 3, Washington 1900.

3) Oscar Loew, Die chemische Energie der lebenden Zellen. München 1899, S. 149.

4) Vines, The proteolytic Enzyme of *Nepentes*. Annales of Botany II, 1897, S. 563.

5) L. Geret und Hahn, Weitere Mittheilungen über das im Hefepresssaft enthaltene proteolytische Enzym. Ber. der deutschen chemischen Gesellschaft 31, 1898, S. 2335.

zu Folge wird die Wirkung des im Hefepresssaft enthaltenen proteolytischen Enzyms in Gegenwart von 1%iger Blausäure etwas geschwächt, aber nicht gänzlich aufgehoben. Nach der Entfernung der Blausäure aus der Lösung mittelst Durchleiten von Luft war die Wirkung des Enzyms auf Eiweissstoffe dieselbe wie ohne Blausäure; die letztere zerstört folglich das Enzym nicht, sie hindert nur temporär seine Wirkung, was nach der Meinung der Autoren auf die Säurewirkung zurückzuführen ist.

In der weiter unten folgenden Tabelle führe ich die Resultate an, welche in den vergleichenden Versuchen der Wirkung des Enzyms bei Gegenwart von Blausäure, Thymol und Chloroform erhalten wurden, wobei die beiden letzteren im Ueberschusse (ein Theil des Chloroforms blieb während des Versuches auf dem Boden des Kolbens ungelöst) und die Blausäure in zwei Concentrationen: 0,1% und 1,0% angewendet wurden. Alle Kolben wurden gut verschlossen und 5 Tage im Thermostaten stehen gelassen.

Tabelle k.

	Ursprüngliche Substanz	Thymol nicht gekocht	Chloroform nicht gekocht	Blausäure		
				0,1% nicht gekocht	1,0% nicht gekocht	1,0% gekocht
Abgewogene Substanz	—	2,051 g	2,1593 g	2,178 g	2,1105 g	2,147 g
Vol. der Flüssigkeit	—	20 cem.	20 cem.	20 cem.	20 cem.	20 cem.
Gesammt-N	9,85 %	—	—	—	—	—
Protein-N	6,85 %	5,74 %	5,80 %	4,34 %	3,73 %	6,80 %
N im Phosphorwolframsäureniederschlag	0,50 %	0,84 %	0,80 %	1,29 %	2,31 %	—
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode) (Ph.-W.)	0,65 %	0,84 %	0,80 %	—	1,02 %	0,71 %

Aus den oben angeführten Zahlen ist ersichtlich, dass die Abnahme der Proteinstoffmenge bei Gegenwart von Chloroform und von Thymol fast die gleiche ist. Sie beträgt ca. 16% der ganzen Proteinmenge. Mit Blausäure ging die Eiweisspaltung viel weiter (bei Gegenwart von 0,1% iger Blausäure 36,6%, von 1% iger 45,5%). Die Zahlen der letzten Columne der Tabelle beweisen, dass eine 1% ige Blausäurelösung an und für sich in den Fällen, wo das Enzym durch Kochen zerstört wurde, keine Eiweisspaltung hervorruft.

Nachdem ich solche Resultate mit der Blausäure erhielt, wiederholte ich den Versuch unter denselben Bedingungen, wobei ich jedoch die Versuchsdauer bis auf 10 Tage verlängerte. Nach dem Verlaufe dieser Zeit ergab die Analyse folgende Resultate:

	Blausäure	
	0,1% o	1,0% o
Abgewogene Substanz	2,093 g	2,035 g
Vol. der Flüssigkeit	20 ccm.	20 ccm.
Protein-N	4,00 %	3,57 %
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . .	1,58 %	2,61 %
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode) (Ph.-W.)	1,11 %	1,09 %

In diesem Versuche erstreckte sich der Zerfall der Eiweissstoffe nicht viel weiter wie im vorherigen, der nur 5 Tage dauerte. (Bei Gegenwart von 0,1% iger Blausäure verminderte sich der Proteinstickstoffgehalt auf 37,9%, von 1% iger auf 48%.) Somit wurde hier dieselbe Erscheinung wie in den vorangegangenen Versuchen beobachtet: die Reaction verlief energisch nur im Anfang des Versuches.

Es seien hier Ergebnisse, die die Umwandlung von Proteinstoffen bei den soeben beschriebenen Versuchen charakterisiren, angeführt:

Tabelle m.

	Dauer des Versuchs					
	Thymol	Chloro- form	10 Tage			
			5 Tage		Blausäure	
		0,1%	1,0%	0,1%	1,0%	
Abnahme des Protein-N	1,11%	1,05%	2,51%	3,12%	2,85%	3,28%
Zunahme des N im Phosphorwolframsäureniederschlag	0,34%	0,30%	0,79%	1,81%	1,08%	2,41%
Zunahme des N im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	0,77%	0,75%	1,72%	1,31%	1,77%	1,17%

Wenden wir unsere Aufmerksamkeit auf das Mengenverhältniss der in diesem Versuche entstandenen Produkte, so bemerken wir, dass Blausäure und im Besonderen 1% ige eine bedeutende Erhöhung der relativen Menge der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Produkte hervorruft. Dieselbe Erscheinung wurde für 0,2% ige Salzsäure beobachtet. Wir haben es augenscheinlich hier mit der Wirkung eines sauren Mediums zu thun. Vielleicht ist die Steigerung der Energie des Eiweisszerfalls auch auf die Wirkung der Blausäure als Säure zurückzuführen. Diese Annahme über den günstigen Einfluss schwacher organischer Säuren auf die Wirkung proteolytischer Enzyme der Keimpflanzen findet Bestätigung in den Angaben anderer Autoren.

Es wurde schon früher bei den Versuchen mit den Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius* darauf hingewiesen, dass der Phosphorwolframsäureniederschlag nur geringe Mengen von Ammoniak enthält. Es taucht nun die Frage auf, ob sich letzteres bei der Verdauung von Eiweissstoffen bei Gegenwart von Blausäure in beträchtlicher Menge bildet, und ob sich nicht daraus der grössere Stickstoffgehalt des Phosphorwolframsäureniederschlags erklärt. Zur Lösung dieser Frage wurde von mir unter denselben Bedingungen wie früher ein Versuch

mit Blausäure angestellt, nach dessen Beendigung das im Phosphorwolframsäureniederschlag vorhandene Ammoniak durch Destillation mit Magnesia bestimmt wurde. Der Versuch dauerte 10 Tage.

0,1% Blausäure 1,0% Blausäure
Ammoniak-N im Phosphorwolframsäureniederschlag 0,14% 0,23%

Der Phosphorwolframsäureniederschlag enthielt somit bei den Versuchen mit Blausäure thatsächlich in ziemlich beträchtlicher Menge Ammoniak. Ziehen wir den Ammoniakstickstoff ab, so bleibt die relative Menge des für diesen Niederschlag noch verbleibenden Stickstoffs dennoch grösser, als bei den Versuchen mit Chloroform und Thymol. Für die letzteren beträgt dieser Werth ca. 30%; für 1%ige Blausäure mehr als 57% des Stickstoffs der zerspaltenen Eiweissstoffe; für 0,1%ige Blausäure ist jedoch der Unterschied beinahe verschwindend klein.

Aus diesen Beobachtungen scheint hervorzugehen, dass eine 1%ige Blausäure die durch das Enzym hervorgerufene Peptonisirung der Eiweissstoffe beschleunigt, aber ihre weitere Umwandlung in durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Produkte hemmt.

II. Versuche mit einem aus den Keimpflanzen dargestellten Enzympräparat.

Zur Abscheidung des Enzyms aus den Keimpflanzen bot sich als einfachster Weg das Wittich'sche Verfahren (Extraction mit Glycerin und Fällung mit Alkohol) dar. Vor Anwendung desselben suchte ich aber über die Wirkung des Alkohols auf das Enzym Aufschluss zu gewinnen; denn manche Enzyme, z. B. die Glycase,¹⁾ sind empfindlich gegen Alkohol.

Ich stellte daher einen Versuch mit der Substanz von zweitägigen Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius* an. Diese

1) Vergl. über thierische Glycase Rohmann, Zur Kenntniss der Glycase, Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. XXVII (1894), S. 3251; über Glycase der Hefe Rohmann, l. c. und E. Fischer, Einf. d. Configur. etc. Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. XVII (1894), S. 3479; über Glycase der Samen Angelo Pugliese, Arch. f. Physiol., Bd. LXIX (1897), S. 115.

Substanz wurde einer fünfstündigen Einwirkung von absolutem Alkohol ausgesetzt. Dann wurde sie ebenso behandelt, wie in den früher beschriebenen Versuchen geschah.

Nach siebentägiger Verdauung im Thermostaten wurden gefunden:

	Gekocht	Nicht gekocht
Proteinstickstoff	6.53 %	5.38 %
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag	0.38 %	0.72 %

In der nicht gekochten Probe verminderte sich der Gehalt an Proteinstickstoff um 17%. Ein unter denselben Bedingungen angestellter Versuch mit derselben Substanz, aber ohne vorhergegangene Behandlung mit Alkohol, ergab folgende Resultate:

	Ursprüngl. Substanz	7 Tage im Thermostaten
Proteinstickstoff	6.33 %	4.99 %

In diesem Versuche verminderte sich die Menge der Eiweissstoffe um 21,2%. Das Enzym wurde somit durch fünfstündige Behandlung mit absolutem Alkohol nur ganz unbedeutend in seiner Wirkung geschwächt.

Ich konnte nun zur Abscheidung des Enzyms schreiten.

Als Material für die Darstellung des Enzyms verwendete ich bei 35–40° getrocknete und gepulverte Cotyledonen sechstägiger Keimpflanzen von *Lupinus luteus*:

300,0 g dieses Materials wurden mit 800 cem. wässerigen Glycerins (500 cem. Glycerins + 300 cem. Wasser) durchgemischt und die Mischung 2 Tage stehen gelassen. Das Extract wurde darauf mit der Presse durch Filtrirtuch abgepresst und hierauf durch Papier filtrirt. Das vollständig klare, dunkelgefärbte Filtrat wurde unter stetigem Umrühren in ein grosses Volumen (3 Liter) Weingeist von 95% gegossen. Es bildete sich dabei ein leicht zu Boden sinkender flockiger

Niederschlag. Nach einer Stunde wurde die Flüssigkeit abgegossen, der Niederschlag auf einer Nutsche abgesogen, zuerst mit 95% ige, hierauf mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen und im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Die getrocknete Substanz wurde im Mörser zum feinen Pulver zerrieben und in diesem Zustande für die weiteren Versuche verwendet.

Ein beträchtlicher Theil des so gewonnenen Präparates war in Wasser unlöslich. Die Lösung wie auch der ungelöste Rückstand gaben stark die Eiweissreactionen. Da also das Präparat reich an Eiweissstoffen war, so konnten die ersten Versuche zur Lösung der Frage über die Anwesenheit eines Enzyms in demselben und über die vom letzteren hervorgerufene Eiweissumwandlung mit diesem Präparat selbst an gestellt werden.

Es wurden zwei gleiche Proben desselben im Gewicht von 2.5 g genommen: zu jeder wurden 50 ccm. Thymolwasser und 0.1% ige Blausäure hinzugesetzt. Eine Probe wurde dann aufgeköcht und beide in den Thermostaten gebracht. Nach Verlauf von 5 Tagen, wobei der bei der Extraction mit Wasser in der Kälte ungelöst gebliebene Rückstand beinahe ganz in Lösung gegangen war, wurden in beiden Proben Bestimmungen des Stickstoffs der beim Kochen coagulirenden Eiweissstoffe ausgeführt, in der von ihnen befreiten Flüssigkeit Stickstoff im Kupferhydroxydniederschlag und endlich im Filtrate des letzteren Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag bestimmt.

	Gekocht	Nicht gekocht
Stickstoff in den durch Kochen coagulirbaren Eiweissstoffen .	130,52 mg	76,07 mg
Stickstoff im Kupferhydroxydniederschlag	75,50 „	53,76 „
Summe	206,02 mg	129,83 mg — 76,19
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag	32,45 „	41,75 „ — 18,30

In den beiden ersten Rubriken finden wir für die nicht gekochte Flüssigkeit eine erhebliche Abnahme des Stickstoffs, die 37% desselben in der gekochten Flüssigkeit beträgt. Für den Phosphorwolframsäureniederschlag finden wir dagegen eine Stickstoffzunahme, die jedoch die oben angezeigte Abnahme nicht zu decken vermag und nur ca. 25% desselben betrug. Somit haben die Eiweissstoffe auch hier wie beim früheren Versuch mit der Substanz der Keimlinge eine Umwandlung erlitten, unter Bildung von Produkten, welche nur zum Theil durch Phosphorwolframsäure fällbar waren.

Bei einem anderen Versuche verwendete ich ein nach Ritthausen's Methode aus den Lupinensamen dargestelltes Conglutinpräparat und die vom ungelösten Theil abfiltrirte, wässrige Lösung des Enzympräparates. In 2 Kolben wurden je 10 ccm. dieser Lösung hineingethan; eine Probe wurde aufgeköcht und zu beiden je 0,1%ige Blausäure zugesetzt. Nach dem Eintragen von 0,4 g Conglutin in jedes derselben wurden beide in den Thermostat gestellt, darin 7 Tage stehen gelassen, hierauf eine Stickstoffbestimmung in den durch Kochen coagulirbaren Eiweissstoffen und im Filtrate von denselben eine gleiche Bestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag ausgeführt.

	Gekocht	Nicht gekocht
Stickstoff der beim Kochen coagulirbaren Eiweissstoffe . . .	66,07 mg	44,76 mg = 21,31
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag	20,59 >	35,67 > + 15,08

Bei diesem Versuche wandelte sich ca. 32% des Conglutins in durch Kochen nicht coagulirbare Substanzen um. Ein Theil derselben, wie aus der Zusammenstellung der Abnahme des Eiweissstickstoffs und der Zunahme des Stickstoffs im Phosphorwolframsäureniederschlag ersichtlich ist, ist in Produkte übergeführt, die nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar sind.

In meinen Versuchen bei der Spaltung von Eiweissstoffen durch das proteolytische Enzym bildeten sich Produkte, die durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden. Die Spaltung geht folglich über die Bildung von echten Peptonen hinaus. Daraus kann nicht ohne Weiteres geschlossen werden, dass sich hier, wie es bei der tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe der Fall ist, Amidosäuren bildeten. Die Untersuchungen der neuesten Zeit (Lawrow,¹⁾ Zunz²⁾ haben gezeigt, dass bei der energischen Verdauung thierischer Eiweissstoffe durch Pepsin sich eine beträchtliche Menge von Körpern bildet, die keine Biuretreaction zeigen, von Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden und nach Pfaundler³⁾ eine Zwischenstufe echter Peptone und Amidosäuren bilden. Somit ist die Anwesenheit von durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Produkten noch kein Beweis für die Anwesenheit von Amidosäuren.

Es wurde schon oben erwähnt, dass nach den Angaben von Green die Bildung von Leucin und Tyrosin aus Fibrin unter dem Einflusse des Extractes aus Lupinenkeimpflanzen stattfindet. Die Quantität, in welcher Green diese Körper erhielt, war jedoch so gering, dass seine Versuche nicht als ganz überzeugend betrachtet werden können. Bei dem Leucin stützte sich Green vorzugsweise auf die mikroskopische Untersuchung. Die gewonnenen Krystalle wurden, wie er angibt, unter dem Mikroskop mit der Abbildung des Leucins, die in Funke's Physiolog. Atlas sich findet, verglichen. Ausserdem stellte er nur noch die für Leucin wenig charakteristische Scherer'sche Reaction an. Zum Nachweis des Tyrosins bedient er sich allein der Probe mit Millon'schem Reagens, wobei er selbst bemerkt, dass der von ihm beobachteten

1) D. Lawrow, Zur Kenntniss des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. XXVI (1899), S. 513.

2) E. Zunz, Ueber den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweisspaltung. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVIII (1899), S. 132.

3) M. Pfaundler, Zur Kenntniss der Endprodukte der Pepsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIX (1900), S. 90.

Rothfärbung keine entscheidende Bedeutung zukommen kann, weil in der Versuchslüssigkeit ein wenig Pepton vorhanden sein konnte. Was die krystallinischen Produkte, welche der Autor bei der Verdauung der Eiweissstoffe aus den Lupinensamen erhalten hat, anbetrifft, so wurden dieselben von ihm nicht untersucht: wenigstens finden wir in seiner Arbeit eine solche Untersuchung nicht erwähnt.

Zur Entscheidung der Frage über die Bildung von Amidosäuren bei der Verdauung von Eiweissstoffen durch das Enzym der Samen wurden von mir einige Versuche, deren Beschreibung ich hier folgen lasse, angestellt.

Versuche mit Conglutin.

Für einen dieser Versuche wurden genommen 6 g Conglutin¹⁾ mit 5,42 g Trockensubstanz, eine beträchtliche Quantität der aus dem Glycerinextract in früher beschriebener Weise durch Alkohol gefällten enzymhaltigen Substanz und 150 cem. Thymolwasser: ausserdem wurden fein zerriebenes Thymol und Chloroform im Ueberschusse zugesetzt. Diese Mischung wurde in dem Thermostaten in einem lose verstopferten Kolben 3 Wochen lang auf 35—40° erwärmt. Im Verlaufe dieser Zeit hatte sich die Menge des Conglutins bedeutend vermindert: eine vollständige Auflösung erfolgte aber nicht.²⁾ Eine Gewichtsbestimmung des ungelösten Conglutins (nach Abrechnung des besonders bestimmten unlöslichen Rückstandes des Enzympräparates) zeigte, dass mehr als die Hälfte, nämlich 2,76 g, des angewandten Conglutins in Lösung gegangen waren.

Die vom ungelösten Rückstand abfiltrirte Flüssigkeit wurde unter Zusatz einiger Tropfen Essigsäure bis zum Kochen erhitzt. Die dabei entstandene Ausscheidung wurde abfiltrirt, das Filtrat durch Eindampfen im Wasserbade stark concentrirt

1) Ueber die Herkunft und Darstellung dieses Conglutinpräparates habe ich schon oben Angaben gemacht.

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.

und mit viel Weingeist versetzt, wobei eine starke Ausscheidung erfolgte, die sich beim längeren Stehen als syrupöse Masse am Boden und an den Wandungen des Gefässes ansammelte; die davon abgegossene klare, weingeistige Lösung wurde im Wasserbade zum Syrup eingedunstet. Es entstand bald an der Oberfläche des Syrup eine dem unreinen Leucin gleichende Ausscheidung, welche mittelst eines Zeugfilters von der Mutterlauge getrennt, mit etwas Weingeist gewaschen und dann noch auf eine Thonplatte gebracht wurde. Das so gewonnene Produkt bildete eine gelbliche, zerreibliche, dem unreinen Leucin gleichende Masse, im Gewicht von 0,15 g. Aus der Mutterlauge liess sich nach der auch von Gorup-Besanez benutzten Methode noch eine kleine Menge der gleichen Substanz gewinnen: Die Mutterlauge wurde mit Bleiessig versetzt, der dabei entstandene Niederschlag abfiltrirt und zum Filtrat Ammoniak und noch etwas Bleiessig hinzugefügt. Die so erhaltene Fällung wurde durch Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelblei auf dem Wasserbade zum Syrup eingedunstet. Im Ganzen wurden von diesem, dem rohen Leucin gleichenden Produkt fast 0,2 g gewonnen.

Dieses Produkt wurde mit heissem Weingeist unter Zusatz von etwas Ammoniakflüssigkeit behandelt. Der grösste Theil dieses Produktes löste sich auf bis auf einen kleinen Rückstand, der sich als Tyrosin erwies: er löste sich nämlich schwer in Wasser, leicht in Ammoniakflüssigkeit und gab die Hoffmann'sche und die Piria'sche Reaction.

Aus der weingeistigammoniakalischen Lösung des Produktes schied sich beim Stehen über Schwefelsäure eine weisse Substanz aus, welche noch mehrfach aus ammoniakalischem Weingeist umkrystallisirt wurde. Sie bildete nun kleine, glänzende Blättchen, verhielt sich beim Erhitzen im Röhrchen wie Leucin (weisses Sublimat und Geruch nach Amylamin) und löste sich nicht in einer gesättigten wässerigen Leucidlösung.¹ Endlich gab die heisse wässerige Lösung dieser Substanz auf Zusatz von Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende

¹ Zur Darstellung dieser Leucidlösung diente ein durch Erhitzen von Conglutin mit Salzsäure dargestelltes Leucinpräparat.

Ausscheidung. Somit konnte kein Zweifel mehr darüber obwalten, dass hier Leucin vorlag.

Das verwendete Enzympräparat enthielt, wie seine Untersuchung zeigte, weder Leucin noch Tyrosin: bei Behandlung desselben mit heissem Alkohol unter Zusatz von Ammoniakflüssigkeit entstand ein Extract, in welchem keine Spur von den genannten Amidosäuren aufgefunden werden konnte. Tyrosin und Leucin bildeten sich folglich bei der Wirkung des von mir aus den Lupinenkeimlingen dargestellten Enzyms auf das Conglutin.

Es entsteht nun die Frage, ob durch die Thätigkeit des Enzyms neben Leucin und Tyrosin auch Asparagin, das in den Keimpflanzen der Lupinen in so ausserordentlich grosser Menge auftritt, sich gebildet hatte. Dabei ist zunächst zu erwähnen, dass (Green¹) diese Frage bejahen zu können glaubt. Seiner Behauptung liegt aber mehr eine aprioristische Auffassung als ein experimenteller Nachweis zu Grunde. In seiner Arbeit finden wir eine Angabe, wonach beim Eindampfen des Dialysats von der in Verdauung begriffenen Mischung des Glycerinextracts mit der aus Lupinensamen dargestellten Eiweisssubstanz sich in einigen Fällen Krystalle ausschieden, die äusserlich dem Asparagin sehr ähnlich waren; über die Natur derselben macht der Autor keine weiteren Angaben. Man kann daher vermuthen, dass die Menge der Krystalle sehr gering war, denn sonst ist es unbegreiflich, warum es ihm nicht möglich war, ihre Natur durch die für Asparagin so charakteristischen Reactionen festzustellen. Green's Angabe über die Bildung von Asparagin durch das Enzym ist also so unbestimmt, dass auf sie kein Gewicht zu legen ist.

Unter den Produkten, die bei dem oben beschriebenen Versuche über die Einwirkung des Enzyms auf Conglutin erhalten wurden, liessen sich Asparaginkrystalle nicht auffinden. Da aber die in diesem Versuch erhaltene Lösung, nach der Concentration im Wasserbade, mit viel Alkohol vermischt worden ist, so wäre es möglich, dass etwa vorhandenes As-

¹ Green, Philos. Trans. L. c.

paragin durch den Alkohol niedergeschlagen und somit aus der Flüssigkeit entfernt wurde. Ich habe nicht versucht, aus der durch Alkohol gefällten Substanz Asparagin durch Kry- stallisation zu gewinnen, weil mein Enzympräparat nach der Art seiner Darstellung eine geringe Menge von Asparagin ent- halten konnte und auch wirklich zu enthalten schien.

Zur Entscheidung der obigen Frage musste also Enzym angewendet werden, welchem kein Asparagin beigemischt war. Um solches zu erhalten, behandelte ich das Enzympräparat mit kaltem Wasser und unterwarf die Lösung unter Zusatz von Chloroform 4 Tage lang unter häufiger Erneuerung der äussereren Flüssigkeit der Dialyse durch Pergamentpapier. Während das erste Dialysat beim Verdunsten asparaginähnliche Krystalle lieferte, konnten solche aus den später erhaltenen Dialysaten nicht mehr gewonnen werden; man kann also an- nehmen, dass das Asparagin vollständig entfernt war, was ja auch im Hinblick auf die Leichtigkeit, mit welcher das ge- nannte Amid durch Pergamentpapier diffundirt, a priori zu erwarten war.

Mit der in dieser Weise gereinigten Enzymlösung be- handelte ich nun wieder das Conglutin. Ich brachte in drei Kölbchen je 50 ccm. der chloroformhaltigen Enzymlösung, und nachdem Kölbchen I kurze Zeit im Wasserbade bis fast auf den Siedepunkt erhitzt worden war, fügte ich in jedes Kölbchen je 3,5 g Conglutin = 3,16 g wasserfrei hinzu. In das Kölbchen III brachte ich noch mehr Chloroform, in die Kölbchen I und II so viel Blausäure, dass der Gehalt an letzterer 0,5% betrug. Alle drei Kölbchen wurden darauf 7 Tage lang im Thermostat auf 35—40° erwärmt. Dann wurde der Inhalt eines jeden Kölbchens zum Kochen erhitzt und aufs Filter gebracht, der Filterinhalt mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen.

Ich erhielt folgende Zahlen:

aus Kölbchen I	3,75 g Rückstand
» » II	2,30 »
» » III	2,70 »

Also waren im Kölbchen II 1,45 g, im Kölbchen III 1,05 g

in Lösung gegangen. Aus dem zu Beginn des Versuches auf nahezu 100° erhitzten Kölbchen I, in welchem das Enzym nicht wirken konnte, erhielt ich 3,75 g Rückstand, also etwas mehr als das angewendete Conglutin betragen hatte. Dies erklärt sich daraus, dass aus der Enzymlösung beim Kochen eine Ausscheidung von Eiweisssubstanz entstand.

Die vom Rückstand abfiltrirten Flüssigkeiten wurden durch Versetzen mit Tannin und Bleiessig gereinigt, nach der Filtration durch Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei befreit, sodann mit Ammoniak neutralisirt und im Wasserbade bei gelinder Wärme zum Syrup eingedunstet.

Nach wochenlangem Stehen war in keiner der concentrirten Flüssigkeiten eine Ausscheidung von Asparaginkrystallen zu bemerken; an der Oberfläche der Flüssigkeiten II und III schied sich aber eine Substanz, die dem unreinen Leucin gleich war, aus. Die Ausscheidung der Flüssigkeit III wurde direkt auf eine Tonplatte gebracht, von der Mutterlauge befreit und in heissem ammoniakhaltigen Alkohol gelöst. Die aus der alkoholischen Lösung zur Ausscheidung gebrachte Substanz gab, wie Leucin, beim Erhitzen im Röhrchen ein weisses Sublimat, unter gleichzeitigem Auftreten eines Amylamingeruches. Beim Erwärmen der Substanz mit Millon'schem Reagens trat eine schwache Rothfärbung auf, was auf eine Beimengung von Tyrosin deutet.

Die zum Syrup eingedunsteten Flüssigkeiten I und II wurden im Exsiccator über concentrirter Schwefelsäure stehen gelassen und darauf gewogen.

I. Gekocht:

0,815 g

II. Nicht gekocht:

1,510 g.

Syrup II (mit Blausäure) wurde darauf mit etwas Wasser verdünnt und mit einem beträchtlichen Volumen Alkohol versetzt; die klare Flüssigkeit wurde von dem abgesetzten Niederschlage abgegossen und nochmals zum Syrup eingedampft. Aus diesem schied sich eine dem Leucin ähnliche Substanz aus, die gleichfalls auf einer Tonplatte von der Mutterlauge befreit und in heissem, ammoniakhaltigem Alkohol gelöst wurde. Beim Stehen über concentrirter Schwefelsäure schied sich aus

der Lösung eine weisse, dem Leucin ähnliche Substanz aus; beim Erhitzen im Röhrchen gab dieselbe ein weisses Sublimat und zeigte einen Geruch nach Amylamin. Auch hier machte die Rothfärbung mit Millon'schem Reagens eine Beimengung von Tyrosin wahrscheinlich.

Die gekochte Probe lieferte bei gleicher Behandlung keine leucinartige Ausscheidung.

Dieselbe durch Dialyse gereinigte Lösung des Enzyms wurde auch für einen Versuch mit Fibrin verwendet. Flocken desselben in die Lösung eingetragen (mit oder ohne Blausäure) lösten sich sehr energisch auf; die Flocken wurden zuerst flüssig, die Flüssigkeit trübte sich darauf und wurde nach längerem Stehen im Thermostaten wieder klar.

Nach zweitägiger Verdauung von einigen Fibrinflocken mit 30 ccm. der Enzymlösung in Gegenwart von Chloroform bei 35° wurde die Flüssigkeit vom ungelösten Fibrinrückstand abfiltrirt und auf dem Wasserbade zum Syrup eingedunstet. Aus dem letzten ist es gelungen, eine kleine Menge einer dem Leucin ähnlichen Substanz zu gewinnen. Dieselbe war schwer im Wasser, leicht in Ammoniakflüssigkeit löslich und gab beim Erhitzen im Röhrchen ein weisses Sublimat.

Dieser Versuch war mit einer so kleinen Menge Fibrin angestellt, dass über die dabei entstandenen Produkte vollständiger Aufschluss nicht zu gewinnen war; ich behalte mir daher vor, diesen Versuch unter Anwendung grösserer Substanzmenge zu wiederholen.

Ich habe somit nachgewiesen, dass bei der Einwirkung des aus den Keimpflanzen abgeschiedenen Enzyms auf Eiweissstoffe Leucin und Tyrosin entstehen; dass neben diesen Produkten auch Asparagin sich bildet, konnte ich dagegen nicht nachweisen.

III. Versuche über die Qualität der bei der Autolyse oder Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz sich bildenden Produkte.

Aus den oben mitgetheilten Resultaten meiner Analysen lassen sich bestimmte Schlussfolgerungen auf die Qualität der bei der Autolyse (Selbstverdauung) der Keimpflanzensubstanz

entstehenden Produkte noch nicht machen. Ist auch nachgewiesen worden, dass unter diesen Produkten durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoffverbindungen sich vorfinden, so lassen doch die im Abschnitt II erwähnten Beobachtungen einiger Autoren noch Zweifel daran übrig, ob dies Amidosäuren waren, obwohl andererseits die von mir in den Versuchen mit Conglutin nachgewiesene Bildung von Leucin und Tyrosin das Entstehen dieser beiden Amidosäuren auch bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz sehr wahrscheinlich macht.

Sodann ist aus der Thatsache, dass bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz eine Stickstoffverbindung entstand, welche beim Kochen mit verdünnter Salzsäure Ammoniak abspaltete, noch nicht zu schliessen, dass bei jenem Prozesse Asparagin sich bildet: denn jene Stickstoffverbindung kann ja eine vom Asparagin verschiedene Substanz sein, welche gegen verdünnte Salzsäure das gleiche Verhalten zeigt, wie Asparagin.

Um Aufschluss über die Qualität der bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz entstehenden Produkte zu erhalten, habe ich eine Reihe von Versuchen angestellt. Von denselben beschreibe ich zunächst zwei Versuche mit je 50 g der in früher beschriebener Weise präparirten Substanz von viertägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* stammend. Ich brachte die abgewogenen Substanzmengen unter Zusatz von Thymolwasser in zwei Kolben, von denen in einen jeden, nachdem der eine (A) im Wasserbade bis fast auf den Siedepunkt erhitzt worden war, so viel Blausäure zugesetzt wurde, dass der Inhalt der letzteren 0,2% betrug: beide Kolben wurden sodann 6 Tage lang im Thermostaten auf 35—40° erwärmt. Sodann wurde der Inhalt eines jeden Kolbens aufs Filter gebracht und die abfiltrirten Flüssigkeiten vollkommen gleich behandelt.

Jedes von den Filtraten wurde vorsichtig so lange mit Bleiessig versetzt, als sich noch ein Niederschlag bildete: die Niederschläge wurden abfiltrirt, die Filtrate mittelst Schwefelwasserstoff vom Blei befreit, darauf mit Ammoniak neutralisirt

und auf dem Wasserbade zum Syrup eingedunstet. In der Flüssigkeit der nicht gekochten Probe bildete sich schon beim Eindampfen an der Oberfläche eine Ausscheidung, die sich nach zweifägigem Stehen an einem kühlen Orte zu einer dicken Haut, gleich derjenigen, die gewöhnlich Leucin bildet, gestaltete. Die ausgeschiedene Masse wurde von der Mutterlauge mittelst eines Zeugfilters getrennt, mit Weingeist gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Es wurde auf diese Weise 0,5 g Rohprodukt erhalten. Die Mutterlauge sammt den Waschflüssigkeiten wurde wieder zum Syrup eingedampft und in den Exsiccator gestellt. Dorthin wurde auch der Syrup von der nicht gekochten Probe, in der beim längeren Stehen nach dem Eindampfen keine Ausscheidung zu bemerken war, gebracht. Nach längerem Stehen über concentrirter Schwefelsäure wurden beide Syrupe gewogen:

gekocht ca. 15 g, nicht gekocht ca. 25 g.

Hieraus ist ersichtlich, dass die Fraction, in der das Enzym durch Kochen nicht zerstört wurde, durch Bleiessig nicht-fällbare Substanzen in viel grösserer Menge enthielt, als die gekochte Fraction.

Nach dem Wägen wurden beide Syrupe mit Wasser verdünnt und mit viel Weingeist versetzt, wobei eine starke Ausscheidung entstand. Die von letzterer abgegossenen weingeistigen Lösungen wurden wieder zum Syrup eingedunstet. Auch diesmal gab der Syrup von der gekochten Probe nach längerem Stehen keine Ausscheidung. Der andere (von der gekochten Fraction) lieferte dagegen bald wieder eine dem rohen Leucin gleichende Ausscheidung, die wieder mit Hilfe eines Zeugfilters von der Mutterlauge getrennt und dann zur Entfernung der ihr von derselben anhaftenden Reste auf eine Thonplatte gestrichen wurde. Die von dieser Abscheidung abfiltrirte Mutterlauge lieferte, als sie wieder in der gleichen Weise behandelt wurde, noch einmal ein leucinartiges Produkt. In dieser Weise wurde ungefähr 1,4 g dieses Productes erhalten. Dasselbe wurde zerrieben und mit heissem Weingeist unter Zusatz von etwas Ammoniakflüssigkeit behandelt: der grösste Theil ging dabei in Lösung.

Der ungelöste Rückstand wurde mit wässerigem Ammoniak behandelt, wobei er grösstentheils sich löste. Die Lösung lieferte, beim Verdunsten über Schwefelsäure, eine weisse, in kaltem Wasser sehr schwer lösliche Substanz; welche sich als Tyrosin erwies. Sie gab sowohl die Hoffmann'sche wie die Piria'sche Reaction.

Aus der von jenem Rückstand abfiltrirten alkoholischen Lösung schied sich beim Stehen über Schwefelsäure eine weisse, dem unreinen Leucin gleichende Substanz aus. Dieselbe wurde mehrmals aus ammoniakhaltigem Alkohol umkrystallisirt, wodurch sie sich in glänzende weisse dem Leucin gleichende Krystallblättchen verwandelte. Dieses gereinigte Präparat löste sich ziemlich schwer in kaltem Wasser, zeigte beim Erhitzen im Röhrchen das Verhalten des Leucins (weisses Sublimat und Geruch nach Amylamin) und löste sich nicht in einer gesättigten wässerigen Leucinlösung. Aus der heissen Lösung schied sich beim Zusatz von Kupferacetat die für Leucin charakteristische Kupferverbindung ab. Die Substanz gab auch die Scherer'sche Reaction.

Es wurden auf diese Weise aus der im Anfang des Versuches nicht gekochten Flüssigkeit Leucin und Tyrosin erhalten, die offenbar Produkte der Wirkung des Enzyms sind, weil aus der gekochten Flüssigkeit sie mit Hülfe derselben Operationen nicht abgeschieden werden konnten.¹⁾

1) Das bei der gekochten Flüssigkeit erhaltene Resultat steht nur scheinbar in Gegensatz zu E. Schulze's (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXIV, 1898, S. 106 und Bd. XXX, 1900, S. 281) Angaben über das Vorkommen von Leucin und Tyrosin in 6—8tägigen 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 Keimpflanzenculturen von *Lupinus luteus*, Tyrosin dagegen nur aus einer solchen Cultur abzuschneiden vermocht.

Es war nun zu untersuchen, ob neben Leucin und Tyrosin auch Asparagin sich gebildet hatte. Um dies zu entscheiden, mussten, da die ursprüngliche Keimpflanzensubstanz schon Asparagin in beträchtlicher Menge enthielt, quantitative Bestimmungen ausgeführt werden. Ich konnte mich aber nicht allein auf die nach Sachsse's Methode ausgeführten Bestimmungen stützen: denn es ist ja möglich, dass das beim Kochen der Flüssigkeiten mit verdünnter Salzsäure entstandene Ammoniak nicht ausschliesslich aus Asparagin abgespalten worden war. Es war also auch festzustellen, wie gross die Asparagimenge war, die sich aus den Versuchsflüssigkeiten in Substanz abscheiden liess.

Man kann bekanntlich leicht Asparagin in Krystallen gewinnen, indem man die Extracte aus *Lupinus*-Keimpflanzen auf ein geringes Volumen eindunstet. Dies ist auch in diesem Falle versucht worden: doch blieben nach dem Auskrystallisiren des Asparagins so dickflüssige Mutterlaugen übrig, dass die Krystalle von denselben nur schwierig und jedenfalls nicht ohne Verlust getrennt werden konnten.¹⁾ Ich schlug daher einen anderen Weg ein. Die filtrirten Versuchsflüssigkeiten wurden mit Tannin und Bleizucker versetzt, die so erhaltenen Niederschläge abfiltrirt und ausgewaschen, die Filtrate mit Mercurinitratlösung in schwachem Ueberschuss vermischt, die so erzeugten Niederschläge nach dem Abfiltriren und Auswaschen, in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrirten Lösungen neutralisirte ich mit Ammoniak und dunstete sie sodann im Wasserbade bei gelinder Wärme zum Syrup ein, wobei ich durch Zutropfen von Ammoniumcarbonat die Reaction der Flüssigkeit möglichst neutral erhielt. Aus den concentrirten Flüssigkeiten krystallisirte bald Asparagin aus; die Krystalle wurden nach mehrtägigem Stehen von der Mutterlauge getrennt, über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Da man wegen der sauren Reaction der Mercurinitratlösung annehmen

¹⁾ Ungleich leichter lässt sich das Asparagin aus den Extracten aus älteren *Lupinus*-Keimpflanzen durch Krystallisation gewinnen.

musste, dass die Ausfällung des Asparagins keine vollständige war, so habe ich den Filtraten von den Mercurinitratniederschlägen Sodalösung zugesetzt, bis die Reaction nur noch schwach sauer war: die dabei entstandenen weissen Niederschläge lieferten, als sie in oben beschriebener Weise behandelt wurden, gleichfalls Asparaginkrystalle: letztere wurden mit den zuerst erhaltenen vereinigt.

Versuch I.

Im Folgenden theile ich nun zunächst die Resultate mit, die ich bei Versuchen mit 4-tägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* erhielt. Ich brachte je 20 g des in früher beschriebener Weise präparirten Keimpflanzenpulvers in 3 Kölbchen, setzte in zwei Kölbchen Thymol, im dritten 0,2% ige Blausäure zu und erwärmte alle Kölbchen 7 Tage lang auf 35—40°, nachdem Kölbchen I kurze Zeit bis nahe zu 100° erbitzt worden war. Bei den Asparaginbestimmungen erhielt ich folgende Zahlen:

		Gekocht I	Nicht gekocht	
		mit Thymol	mit Thymol	mit 0,2% HNC
		II	III	
nach Sachsse				
berechnet in %		7,02 %	9,00 %	11,80 %
in Krystallen erhalten	aus 20 g	0,676 g	0,660 g	0,742 g
	in %	3,38 %	3,30 %	3,71 %

Wie man sieht, erhielt ich aus den Kolben II und III nicht wesentlich mehr Asparaginkrystalle als aus Kolben I.

Alle auf diesem Wege gewonnenen Präparate besaßen das Aussehen des Asparagins und gaben die für dasselbe charakteristischen Reactionen (Bildung von Ammoniak beim Kochen mit Salzsäure und Natronlauge, Entstehen eines krystallinischen Niederschlages nach Sättigen der heissen wässerigen Lösung mit Kupferoxydhydrat). Vollkommen rein waren aber die aus Kolben II und III gewonnenen Krystalle nicht: es wurde durch Millon'sches Reagens eine Beimengung von Tyrosin nachgewiesen.

1) Die Daten für diese Berechnung sind aus einem vorher beschriebenen Versuche mit derselben Substanz und unter denselben Bedingungen erhalten worden.

Das aus Kolben III gewonnene Produkt wurde unkrystallisiert. Die Ausbeute betrug dabei 0,656 g (3,28%), und die Krystalle zeigten einen Wassergehalt von 12,09% (theoretisch 12%).

Versuch II.

Für den Versuch II wurden 3tägige Lupinenkeimlinge verwendet. Es wurden zwei Proben der Substanz genommen (sie wurde in diesem Falle nicht wie bei den vorangegangenen Versuchen vorher mit Aether behandelt) und zu jeder 100 ccm. Wasser hinzugefügt; eine derselben wurde aufgeköcht und beide hierauf mit so viel Blausäure versetzt, dass eine 0,2%ige Lösung entstand.

Der ganze Versuch wurde im Uebrigen genau so angestellt wie der zuerst beschriebene.

Das Resultat des Versuches war folgendes:

	Nach 7tägigem Stehen im Thermostaten	gekocht	nicht gekocht
Nach Sachsse berechnet		5,72%	—
in Krystallen (aus 20 g erhalten)	(in %)	0,492 g	0,658 g
		2,46%	3,29%

Beide Präparate gaben sämtliche früher erwähnte Reactionen des Asparagins. Ausserdem zeigte das Präparat aus der nicht gekochten Flüssigkeit eine Beimengung von Leucin und Tyrosin. Beim Behandeln desselben mit heissem Alkohol unter Zusatz von Ammoniak wurde eine alkoholische Lösung erhalten, aus der beim Stehen über Schwefelsäure eine kleine Menge einer Substanz sich ausschied; beim Erhitzen im Röhrchen gab dieselbe ein Sublimat unter gleichzeitigem Auftreten eines Amylamingeruches. Dieselbe Substanz gab mit Millon'schem Reagens eine rothgefärbte Lösung, was auf Anwesenheit von Tyrosin deutet. In dem Präparat aus der gekochten Flüssigkeit konnte eine Beimengung der genannten Amidosäuren nicht nachgewiesen werden.

Versuch III.

Versuch III wurde ähnlich dem Versuche II angestellt, mit dem einzigen Unterschiede, dass die Ausscheidung des Asparagins durch einfaches Fällern mit Mercurinitrat erfolgte.

und das Filtrat vom Mercurinitratniederschlag nicht wie bei den ersten Versuchen neutralisirt wurde. Von den vier zur Untersuchung herangezogenen Proben wurden zwei, bevor sie in den Thermostaten mit den beiden anderen gestellt wurden, aufgeköcht.

Asparagin erhalten:

	Gekocht	Nicht gekocht
Aus 20 g	0.623 g	0.293 g
a) in " "	3.14 " "	1.47 " "
Aus 20 g	0.675 g	0.324 g
b) in " "	3.38 " "	1.62 " "

Auch in diesem Falle enthielten die Krystalle aus der nicht gekochten Flüssigkeit eine kleine Beimengung von Tyrosin: dasselbe wurde im Rückstand, den die Krystalle nach vorsichtiger Behandlung mit schwach erwärmtem Wasser gaben, gefunden. Es war schwer in reinem, leicht in ammoniakhaltigem Wasser löslich und gab die Hoffmann'sche und die Piria'sche Reaction.

Wenden wir uns zu den Ergebnissen der eben beschriebenen Versuche, so finden wir in keinem einzigen Falle eine merkliche Erhöhung des Asparagingehältes in Folge der Wirkung des Enzyms. Die Schwankungen der Asparagimenge in den Versuchen I und II müssen als solche, die innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der angewendeten Methode liegen, angesehen werden. Die Menge des Asparagins aus den nicht gekochten Flüssigkeiten war beim letzten Versuche bedeutend kleiner als aus den gekochten. Wahrscheinlich ist dies dem Umstand zuzuschreiben, dass die Flüssigkeit beim Versetzen mit Mercurinitrat nicht neutralisirt wurde, wodurch die Fällung keine vollständige war. Der Einfluss der Acidität des Reagens musste sich dabei stärker in der nicht gekochten Flüssigkeit zeigen, da wegen ihres grösseren Gehaltes an Substanzen, die durch Mercurinitrat fällbar sind,¹⁾ vom letzteren zur Lösung mehr zugesetzt werden musste. Die beiden ersten

1) Beim dritten wie auch bei den beiden ersten Versuchen gaben die nicht gekochten Flüssigkeiten beim Versetzen mit Mercurinitrat bedeutend grössere Niederschläge als die gekochten.

Versuche zeigen jedenfalls, dass, wenn auch der Asparagin-gehalt der nicht gekochten Flüssigkeit sich etwas geändert hatte, dies doch nur in unbedeutendem Maasse geschehen war.

Ich muss nun noch darauf aufmerksam machen, dass im Versuch I die aus den Bestimmungen nach Sachsse's Methode berechneten Asparaginemengen bedeutend grösser sind, als die aus den Mercurinitratniederschlägen abgeschiedenen Quantitäten. Dies macht es sehr wahrscheinlich, dass das beim Kochen mit verdünnter Salzsäure entstandene Ammoniak nur zum Theil aus Asparagin, zum Theil aber aus einer anderen Stickstoffverbindung abgespalten worden war. Ferner hat Sachsse's Methode für die nicht gekochten Flüssigkeiten (Kolben II und III) einen höheren Asparagin-gehalt ergeben, als für die gekochte Flüssigkeit (Kolben I). Also scheint bei Einwirkung des Enzyms auf die Eiweissstoffe eine durch verdünnte Salzsäure unter Ammoniakbildung zersetzbare Verbindung, welche nicht Asparagin ist, zu entstehen.¹⁾ Denn, wenn diese Verbindung Asparagin wäre, so hätten doch wohl die Mercurinitratniederschläge aus den nicht gekochten Flüssigkeiten mehr Asparagin liefern müssen, als der Niederschlag aus der gekochten Flüssigkeit.

Wenn auch die von mir in diesen Versuchen und in den

1) Die oben in den Versuchen I und II angeführte Zusammenstellung der nach Sachsse berechneten Asparaginemengen mit den aus den Mercurinitratniederschlägen abgeschiedenen für die von mir untersuchten 3- und 4-tägigen Lupinuskeimlinge lässt annehmen, dass auch in denselben Asparagin nicht das einzige bei der Behandlung nach Sachsse's Methode ammoniakliefernde Produkt ist; denn die Unterschiede zwischen den nach der Sachsse'schen Methode gewonnenen Werthen und der Menge des von mir in Krystallen erhaltenen Asparagins sind kaum allein auf die Ungenauigkeit der Methode zurückzuführen. E. Schulze hat schon längst die Meinung ausgesprochen, dass in den Pflanzen ausser Asparagin (und Glutamin) noch andere Körper, die bei der Bearbeitung nach der Sachsse'schen Methode Ammoniak liefern, sich finden müssen. Vergl. E. Schulze und E. Kiesser, Landwirthschafft. Vers.-Stat., Bd. XXXVI, 1889, S. 1, und E. Schulze und E. Bosshardt, Zeitschrift für physiol. Chem., Bd. IX, 1885, S. 435; auch E. Schulze, Landwirthschafft. Jahrbuch, 1892, S. 105 und Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXX, 1900, S. 241.

oben beschriebenen Versuchen mit Coagulatin erhaltenen Resultate immer noch die Möglichkeit offen lassen, dass bei der Einwirkung des Enzyms auf die Eiweissstoffe Asparagin in kleiner Quantität entsteht, so schliessen sie doch vollständig die Annahme aus, dass die Spaltung der Eiweissstoffe durch das Enzym mit einer starken Asparaginbildung verbunden ist. Die Frage, ob bei diesem Process überhaupt Asparagin entsteht, wird sich entscheiden lassen, indem man Eiweissstoffe mit Hilfe einer durch Dialyse gut gereinigten Enzymlösung in etwas grösserer Quantität zersetzt und sodann die Produkte untersucht. Die Isolirung des Asparagins bietet schon deshalb sehr geringe Schwierigkeiten, weil dieses Amid leicht durch Pergamentpapier diffundirt und auch aus stark verunreinigten Lösungen leicht auskrystallisirt.

Ich behalte mir vor, über diese Frage noch Versuche anzustellen.¹⁾

¹⁾ Was diejenigen Produkte der Einwirkung des Enzyms anbelangt, die nach Sachsse's Methode Ammoniak abspalten und die jedenfalls in ihrer Hauptmasse nicht aus Asparagin bestehen, so ist es wohl möglich, dass zu jenen Produkten ein anderes Amid, z. B. Glutamin, gehört. Es ist schon längst festgestellt, dass Glutaminsäure sich in beträchtlicher Menge bei Zerspaltung mehrerer Eiweissstoffe (besonders pflanzlichen Ursprungs) durch Säuren bildet. (Vergl. Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten etc., 1872, S. 213.) In neuester Zeit hat Kutscher (Ueber das Antipepton, III. Mittheil., Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, 1899, S. 88) die Anwesenheit der Glutaminsäure auch in den Produkten der tryptischen Verdauung nachgewiesen. Vielleicht bildet sich zuerst Glutamin, welches später in glutaminsaures Ammonium übergeht. Bekanntlich erleidet Glutamin diese Umwandlung sehr leicht. Ich möchte an dieser Stelle nur noch bemerken, dass unter den Produkten der Selbstverdauung von Lupinenkeimpflanzen eine Substanz, die leichter als Asparagin Ammoniak abzuspalten scheint, vorhanden ist. Eine beträchtliche Menge des Stickstoffs der Verdauungsprodukte (ausser Ammoniak) konnte durch unmittelbares Kochen mit Magnesia in Form von Ammoniak abdestillirt werden, während Asparagin nach Angaben Bosshard's (Zeitschr. f. analyt. Chem., Bd. XXII, l. c.) beinahe kein Ammoniak beim Kochen mit Magnesia abspaltet.

Hirschler (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. X, 1886, S. 302) und Stadelmann (Zeitschr. f. Biologie, Bd. 24, 1888) haben schon lange gezeigt, dass ein Theil des Stickstoffs der sich bei der Pancreasverdauung

Ueber andere Produkte der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz können wir vorläufig nur einige Beobachtungen mittheilen: wir hoffen aber dieselben durch weitere Untersuchungen vervollständigen zu können.

Was die Zwischenprodukte der Verdauung anbetrifft, so wurde schon früher erwähnt, dass bei dem im Dialysator angestellten Versuch mit der Substanz der Keimpflanzen von *Lupinus luteus* in der äusseren Flüssigkeit des Dialysators die Anwesenheit von echten Peptonen¹⁾ durch die Biuretreaction

von Fibrin bildenden Produkten beim Kochen mit Magnesia in Form von Ammoniak abspaltet. Ob dasselbe den leicht zerspaltbaren Amidien angehört, oder bei der Verdauung als solches entsteht, ist bis jetzt noch nicht erklärt. Zunz (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, 1899, S. 132) beobachtete die Bildung von bei der Destillation mit Magnesia abspaltbarem Stickstoff auch bei der peptischen Verdauung. Jakoby (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIX, 1900, S. 149) constatirte die Anwesenheit von leicht abspaltbarem Ammoniak auch in Produkten der Selbstverdauung des Leberbreis.

Wenn auch der sich leicht abspaltende Stickstoff der bei der Selbstverdauung der Lupinenkeimpflanzensubstanz entstehenden Produkte nicht dem Asparagin angehört, so kann man doch fragen, ob er wenigstens nicht diejenige Quelle bildet, aus der das letztere bei seiner Entstehung in den Keimpflanzen seinen Amidstickstoff entlehnt. Eine Zusammenstellung der Mengen, in welchen der nach Sachsse's Methode abspaltbare Stickstoff sich bei dem Eiweisszerfall in den Versuchen über die Selbstverdauung und in den Keimpflanzen bildet, zeigt aber, dass, wenn diese Beziehung auch stattfindet, so jedenfalls auf diese Quelle nur ein Theil des Amidstickstoffs des in den Lupinenkeimpflanzen vorhandenen Asparagins zurückzuführen ist. Die Mengen des oben genannten Stickstoffs betragen bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz von *Lupinus luteus* und von *Lupinus angustifolius* ca. 15% (die bei den verschiedenen Versuchen gefundenen Werthe schwanken zwischen 10 bis 20% des Stickstoffs der zerfallenen Eiweissstoffe, in den Keimpflanzen derselben Arten nach den von Merlis (Landw. Vers.-St. Bd. 48, 1897, S. 419) und von mir ausgeführten Versuchen ungefähr 40%). Die angeführte Zusammenstellung führt zur Annahme, dass in den Keimpflanzen zugleich mit der hydrolytischen Spaltung der Eiweissstoffe durch das Enzym ein secundärer Process einer Umwandlung von fest gebundenem Stickstoff in locker gebundenen stattfindet.

1) Die Bestimmungen des Stickstoffgehaltes der äusseren Flüssigkeiten der Dialysatoren mit gekochtem und nicht gekochtem Inhalt haben gezeigt, dass im letzteren in Wirklichkeit eine Verdauung von Eiweiss-

nicht nachgewiesen werden konnte (wenn zu der verdauenden Flüssigkeit keine Salzsäure zugesetzt wurde). Das in diesem Falle erhaltene Resultat stimmt mit den Beobachtungen von Puriewitsch²⁾ überein. Bei der Untersuchung der stickstoffhaltigen Produkte, die bei der Berührung der Lupinencotyledonen mit Wasser in dasselbe übergehen, fand er unter ihnen weder Eiweissstoffe noch Peptone, in Lösung befanden sich nur Amidverbindungen. Analoge Ergebnisse erhielten auch Geret und Hahn³⁾ bei der Untersuchung der Produkte der Verdauung von Eiweisskörpern durch das Enzym des Hefepresssaftes; unter diesen wurden Leucin, Tyrosin und kleine Mengen von Albumosen aufgefunden; kein einziges Mal aber konnte die Anwesenheit von echten Peptonen, auch im Anfangsstadium der Verdauung, nachgewiesen werden. Auch bei der Autodigestion des Leberbreies, nach Angaben Salkowski's⁴⁾ und Jakoby's,⁵⁾ lässt sich Leucin, Tyrosin und etwas Albumosen, aber kein echtes Pepton nachweisen.⁶⁾

stoffen unter Bildung von durch Pergamentpapier diffundierbaren Produkten stattfand.

Ich gebe hier die in den Dialysaten gefundenen Stickstoffmengen an:

gekocht	nicht gekocht
0,902 g	1,215 g

In einen wie im andern Dialysator waren je 20 g der Substanz von Lupinenkeimlingen.

2) Puriewitsch. Physiologische Untersuchungen über die Entleerung der Reservestoffbehälter. Pringsheims. Jahrbücher f. wissenschaftl. Botanik, Bd. 31, 1897, S. 1.

3) M. Hahn. Das proteolytische Enzym des Hefepresssaftes. Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 31, 1899, S. 200 und L. Geret und M. Hahn. Weitere Mittheilungen über das im Hefepresssaft enthaltene proteolytische Enzym. Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 31, S. 2335.

4) E. Salkowski loc. cit.

5) Ch. Jakoby. Ueber die fermentative Eiweisspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIX, 1900, S. 149.

6) W. Windisch und B. Schellhorn (l. c.) kommen auch zu dem Schlusse, dass bei der Verdauung der Eiweissstoffe der Gerste durch das Enzym des Malzes sich kein echtes Pepton bildet. Die genannten Autoren haben aber vor der Untersuchung der Lösung auf Pepton die-

Somit vollzieht sich die Spaltung von Eiweissstoffen bis zu den Amidosäuren in einigen Fällen ohne Bildung von echtem Pepton, oder, was wahrscheinlicher ist, geht die weitere Umwandlung der sich bildenden Peptone so rasch vor sich, dass ihre Anwesenheit nicht entdeckt werden kann. Es ist daher klar, dass das negative Resultat bei dem Versuche, Peptone bei der Verdauung von Eiweissstoffen nachzuweisen, noch kein genügender Grund ist, um auf die Abwesenheit des Enzyms in dem untersuchten Object zu schliessen, wie es oft gethan wird.

Was die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Produkte anbetrifft, deren Stickstoffgehalt bei den Versuchen mit den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* ca. 30% desjenigen der zerspaltenen Eiweissstoffe beträgt, so bleibt vorläufig die Frage über ihre Natur offen.

Ich führe hier nur die Resultate eines Versuches, der zur Aufklärung des Verhaltens dieser Produkte gegenüber Tannin und Bleiacetat angestellt wurde, an.

Genommen wurden 10 g der Substanz 4 tägiger Keimlinge von *Lupinus luteus* und 100 cem. 0,2% iger Blausäure.

Nach fünftägigem Stehen im Thermostaten gab die Analyse folgende Resultate:

N im ungelösten Rückstande	2,96 %
N in den Niederschlägen mit Tannin und Bleizucker	1,50 %
N im Phosphorwolframsäureniederschlag	1,35 %
N des Ammoniaks im Phosphorwolframsäureniederschlag (durch Destillation mit Magnesia)	0,12 %

Für die ursprüngliche Substanz wurde gefunden:

N der Proteinkörper (durch Tannin und Bleizucker gefällt)	6,88 %
N im Phosphorwolframsäureniederschlag	0,41 %

Aus den angeführten Angaben ist ersichtlich, dass der Zerfall der Eiweissstoffe von der Bildung von Substanzen begleitet ist, die nicht durch Tannin und Bleizucker, dagegen durch Phosphorwolframsäure fällbar sind. Der Stickstoff dieser

selbe zur Entfärbung mit Thierkohle gekocht; bekanntlich absorbiert aber die letztere Peptone aus der Lösung. Das angegebene Verfahren könnte folglich auch dann zu negativen Resultaten führen, wenn die zu untersuchende Lösung Peptone enthielte.

Substanzen nach Abzug des Ammoniakstickstoffs beträgt 0,82^o und im Verhältniss zum Stickstoff der zerfallenen Eiweisskörper (2,42^o o) ca. 34^o o.

Man kann vermuthen, dass diese Substanzen Hexonbasen waren. Das thierische Trypsin, dem das in den Keimpflanzen enthaltene Enzym sich zu nähern scheint, bildet nach den Untersuchungen von Hedin¹⁾ und von Kutscher²⁾ zugleich mit Amidosäuren auch Hexonbasen. Nach Jakoby³⁾ entstehen basische Produkte auch bei der Autodigestion des Leberbreis. E. Schulze⁴⁾ hat die Hexonbasen auch in den Cotyledonen der Keimpflanzen von *Lupinus luteus* gefunden, wo sie zugleich mit Monoaminosäuren vielleicht auch als Produkte der Wirkung des von mir aus denselben Keimpflanzen isolirten Enzyms auftreten.

Zusammenfassung der Resultate.

Die von mir ausgeführten Versuche über die Selbstverdauung oder Autolyse der Keimpflanzen-substanz führen zu der Schlussfolgerung, dass in den Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteus*, *Vicia Faba* und *Ricinus major* ein proteolytisches Enzym enthalten ist, welches Eiweissstoffe zu spalten vermag, unter Bildung von Produkten, die nur zum

1) Hedin, Du Bois Reymond's Archiv für Physiologie, 1891, S. 273. Hedin isolirte aus den Produkten der pancreatischen Verdauung Lysin.

2) Kutscher, Ueber das Antipepton. I. Mittheilung, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXV, 1898, S. 195. II. Mittheilung, ebenda, Bd. XXVI, 1898/99, S. 110. Dieser Autor fand im «Antipepton» von Kühne Histidin und Arginin.

3) Ch. Jakoby, loc. cit. Nach den Beobachtungen des Verfassers gab die Phosphorwolframsäure im Filtrat von der Selbstverdauung unterworfenem Leberbrei nach der Entfernung der Eiweissstoffe und Albumosen einen bedeutenden Niederschlag auch in demjenigen Falle, wo das Ammoniak durch Kochen mit Magnesia entfernt wurde.

4) Arginin wurde von E. Schulze in den Keimlingen von *Lupinus luteus* noch früher gefunden: in neuester Zeit wies er daneben auch Histidin und Lysin nach. E. Schulze, Ueber das Vorkommen von Histidin und Lysin in Keimpflanzen, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVIII, 1899, S. 465.

Theil durch Phosphorwolframsäure fällbar sind: eine Bestätigung für diese Schlussfolgerung liefern auch die Versuche, welche ich mit der durch Weingeist aus dem Glycerinextract aus Lupinuskeimpflanzen gefällten Substanz gemacht habe. Ein solches Enzym scheint nach meinen Versuchen auch in den Axenorganen der Keimpflanzen von *Lupinus luteus* sowie in den ungekeimten Samen von *Lupinus angustifolius*, hier vielleicht als Zymogen, enthalten zu sein. Meine Versuche haben also eine Bestätigung für Green's Angabe, dass in den Keimpflanzen von *Lupinus* und von *Ricinus* ein proteolytisches Enzym enthalten ist, geliefert. Bei den Versuchen über die Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz konnte ich in allen Fällen unter den durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Produkten des Eiweisszerfalls das Vorkommen von Substanzen nachweisen, welche beim Kochen mit verdünnter Salzsäure nach der Sachsse'schen Methode Ammoniak abspalten.

Das proteolytische Enzym der Lupinuskeimpflanzen wirkte schwächer in 0,1%iger Sodalösung und in 0,2%iger Salzsäure und bildete bei Gegenwart der letzteren hauptsächlich nur Produkte, die durch Phosphorwolframsäure fällbar waren. Die Wirksamkeit des Enzyms wurde erhöht durch Zusatz geringer Menge von Blausäure. Günstig wirkte z. B. 0,1%ige Blausäure: in 1,0%iger Blausäure war zwar die Wirksamkeit des Enzyms eine grössere, aber es bildete hier, ebenso wie in 0,2%iger Salzsäure, aus den Eiweissstoffen vorzugsweise Produkte, die durch Phosphorwolframsäure fällbar sind.

Ueber die Produkte, die bei der Spaltung der Eiweissstoffe durch das Enzym sich bilden, sind von Green nur wenige und zum Theil nicht einwandfreie Angaben gemacht worden. Aus meinen Versuchen geht mit Sicherheit hervor, dass bei Einwirkung des Enzyms auf die Eiweissstoffe Leucin und Tyrosin entstanden. Dass neben diesen Produkten auch Asparagin sich bildete, was von Green vermuthet worden ist, vermochte ich nicht nachzuweisen. Als wahrscheinlich kann ich es dagegen bezeichnen, dass durch das Enzym auch basische Produkte (Hexonbasen) aus den Eiweissstoffen gebildet werden.

Die Zersetzung der Eiweissstoffe durch das Enzym ist eine so starke, dass man wohl kein Bedenken tragen kann, die mit der Keimung der Samen verbundene Eiweisszersetzung auf die Wirkung eines solchen Enzyms zurückzuführen.

Die Resultate meiner Versuche stehen in vollständiger Uebereinstimmung mit den Schlussfolgerungen, zu denen E. Schulze¹⁾ in Bezug auf die Eiweisszersetzung in den Keimpflanzen auf ganz anderem Wege gelangt ist, insbesondere auch mit der Schlussfolgerung, dass das Asparagin grösstentheils durch Umwandlung primärer Eiweisszersetzungsprodukte entsteht und also ein secundäres Produkt des Eiweissumsatzes ist.

Zum Schlusse 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.

¹⁾ Vergl. E. Schulze, Ueber den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIV (1898), S. 18 und Bd. XXX (1900), S. 241.