

Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung und des Stoffwechsels der Keimpflanzen.

Zweite Mitteilung.

Von

E. Schulze und N. Castoro.

(Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. September 1904.)

Wie aus den in der ersten Abhandlung¹⁾ von uns gemachten Mitteilungen zu ersehen ist, haben bei der Erforschung des Stoffwechsels der Keimpflanzen Autodigestionsversuche nach dem Salkowskischen Verfahren gute Dienste geleistet. Infolge davon haben wir noch einige Versuche solcher Art zur Ausführung gebracht und zugleich auch Versuche zur Darstellung wirksamer Enzympräparate aus den Keimpflanzen gemacht. Der Hauptgegenstand unserer Arbeit war aber die Argininbildung in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus*. Welche Gründe uns veranlaßt haben, darüber eine Untersuchung anzustellen, ist aus dem zweiten Abschnitt dieser Abhandlung zu ersehen.

A. Autodigestionsversuche mit Keimpflanzen von *Lupinus albus*.

Durch die von uns früher ausgeführten Versuche ist bewiesen worden, daß bei der Autodigestion (Autolyse) 2—3-tägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus* neben Leucin und Tyrosin auch Arginin sich bildet. Doch war die Zunahme der Argininmenge während der Autolyse nicht groß. Die Schuld daran ist wohl zum Teil in der Abschwächung der Enzymwirkung durch die zugesetzten Antiseptika zu suchen. Von Einfluß war auch vielleicht der Umstand, daß die als

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 199—258.

Material für die Autolyse verwendeten getrockneten und zerriebenen Keimpflanzen nach dem Zerreiben mit Äther behandelt worden waren;¹⁾ denn auch Äther scheint die Wirksamkeit der Enzyme abzuschwächen. Wir hielten es daher für angezeigt, noch einige Versuche mit zweitägigen Keimpflanzen zu machen, die ebenso wie die früher verwendeten bei 35–40° getrocknet, aber nicht mit Äther behandelt worden waren. Diese Pflänzchen enthielten nur sehr wenig Arginin, wie aus folgenden Zahlen zu ersehen ist.²⁾

45,5 g der Pflanzentrockensubstanz lieferten 0,059 g Argininkupfernitrat
= 0,0349 oder 0,077% Arginin.

Von diesem Material brachten wir je 40 g = 37,13 g Trockensubstanz mit 200 ccm Chloroformwasser und ein wenig zerriebenen Thymols in geeignete, zuvor sterilisierte Glaskolben, die mit Wattepropfen versehen waren. In einem Versuche setzten wir 0,3 g Citronensäure, in einem zweiten soviel Blausäure zu, daß eine 0,2%ige Lösung entstand. Die beiden Versuche gaben folgende Resultate:

Versuch I: Angewendet 37,13 g Pflanzentrockensubstanz; Dauer der Autolyse (unter Zusatz von Citronensäure) 13 Tage; erhalten wurden: 0,219 g Argininkupfernitrat = 0,1294 g oder 0,350% Arginin.

Versuch II: Angewendet 37,13 g Trockensubstanz; Dauer der Autolyse (unter Zusatz von Blausäure) 10 Tage; erhalten wurden: 0,279 g Argininkupfernitrat = 0,164 g oder 0,444% Arginin.

Während der Autolyse ist demnach die Argininmenge im Mittel auf 0,39%, d. h. auf ungefähr das Fünffache der im Ausgangsmaterial enthaltenen Quantität, gestiegen. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der in unserer ersten

¹⁾ Dies geschah, um die Versuchsbedingungen denjenigen, unter welchen W. Butkewitsch (diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 1) seine Versuche ausführte, möglichst gleich zu machen.

²⁾ Die Darstellung des Arginins geschah nach dem in unserer ersten Abhandlung beschriebenen Verfahren. Das dabei erhaltene Argininnitrat wurde zur Reinigung in Argininkupfernitrat übergeführt, letzteres sodann getrocknet und gewogen. Daß die in solcher Weise für den Argininhalt der Keimpflanzen von *Lupinus albus* erhaltenen Resultate etwas zu niedrig sein müssen, ist aus den in unserer ersten Abhandlung gemachten Angaben zu ersehen.

Abhandlung beschriebenen Versuche. Doch war damals die absolute Zunahme der Argininmenge etwas größer als jetzt.¹⁾ Daß die Behandlung mit Äther (vgl. oben) einen ungünstigen Einfluß auf die Wirksamkeit des Enzyms ausübte, ließ sich also bei *Lupinus albus* nicht nachweisen. Anders war es, wie aus den weiter unten gemachten Mitteilungen zu ersehen ist, bei *Lupinus luteus*; hier wurde bei den nicht mit Äther behandelten Keimpflanzen stärkere Argininbildung während der Autolyse beobachtet.

In einem dritten Versuch wurden 40 g des gleichen luft-trockenen Materials (= 37,13 g Trockensubstanz) mit 200 ccm Wasser in einen Glaskolben gebracht und sodann längere Zeit auf ca. 100° erhitzt, um das Enzym unwirksam zu machen; dann setzten wir 0,3 g Citronensäure und etwas zerriebenes Thymol zu und erwärmten den Kolben sieben Tage lang auf 35—40°. Bei der darauffolgenden Verarbeitung des Kolbeninhalts erhielten wir 0,076 g Argininkupferniträt = 0,0449 g, oder 0,121% Arginin. Diese Zahl übersteigt um 0,044% die in dem Ausgangsmaterial gefundene Argininmenge. Die Differenz läßt sich vielleicht schon auf unvermeidliche Versuchsfehler, deren Betrag in diesem Falle nicht zu niedrig geschätzt werden darf, zurückführen, könnte aber andererseits auch dahin deuten, daß die zugesetzte Citronensäure schwach hydrolysierend wirkte. Daß diese Wirkung, wenn sie überhaupt vorhanden war, nur in sehr geringem Maße sich geltend machte, läßt sich, außer aus dem Resultat dieses Versuches, auch schon aus einem Vergleich der Zahlen ersehen, die wir in den in unserer ersten Abhandlung beschriebenen Versuchen bei der Autolyse mit und ohne Zitronensäurezusatz erhielten.

Wie schon in unserer ersten Abhandlung erwähnt worden ist, scheint während der Autolyse der Keimpflanzen von *Lupinus albus* die Argininbildung in relativ schwächerem Maße einzutreten, als die Bildung von Leucin, Tyrosin und anderen Monoaminosäuren. Eine solche Erscheinung kann nicht als unerklärlich

¹⁾ Die Argininmenge war damals bis auf 0,524% der Pflanzentrockensubstanz gestiegen; sie betrug aber auch damals ungefähr das Fünffache der ursprünglich vorhanden gewesenen Quantität.

bezeichnet werden. Man weiß, daß die Eiweißstoffe durch Trypsin nicht vollständig in Monoaminosäuren, Hexonbasen und andere kristallinische Spaltungsprodukte zerlegt werden; neben letzteren treten peptonartige Stoffe (Polypeptide) auf, die der Wirkung des Enzyms widerstehen, aber durch Säuren gespalten werden können. So erhielten z. B. E. Fischer und E. Abderhalden¹⁾ bei der Pankreasverdauung des Caseins ein Polypeptid, welches bei der Spaltung durch Salzsäure Pyrolidinkarbonsäure und Phenylalanin lieferte: diese beiden Stickstoffverbindungen blieben also bei der Spaltung des Caseinmoleküls durch das Trypsin zu einem Komplex vereinigt, der erst durch die Salzsäure zerlegt wurde. Wenn das Enzym, auf dessen Wirksamkeit die Bildung von Arginin und von Monoaminosäuren während der Autolyse der Keimpflanzen von *Lupinus albus* zurückzuführen ist, sich dem Trypsin ähnlich verhält, so kann man nicht erwarten, daß bei der Autolyse die verschiedenen Eiweißspaltungsprodukte in der gleichen Weise zum Vorschein kommen, wie bei der Zersetzung der gleichen Eiweißsubstanz durch eine Säure. Es ist z. B. denkbar, daß ein Teil des Arginins in Polypeptiden, die bei der Spaltung entstanden sind, sich vorfindet. Für die Keimpflanzen von *Lupinus luteus* ist allerdings ein solcher Verlauf der Eiweißspaltung nicht anzunehmen, wie aus den weiter unten gemachten Angaben sich ersehen läßt.

Für die geringe Zunahme der Argininmenge bei der Autolyse der Keimpflanzen von *Lupinus albus* würde man auch eine Erklärung haben, wenn man annehmen könnte, daß in diesen Keimpflanzen ein Enzym, durch welches das Arginin zerlegt wird, sich vorfindet. Ein solches Enzym, die Arginase, ist vor kurzem von A. Kossel und H. D. Dakin²⁾ beschrieben worden. Sie spaltet das Arginin in Ornithin und Harnstoff. Wenn dieses Enzym in den der Autolyse unterworfenen Keimpflanzen seine Wirksamkeit entfaltet, so könnte im Filtrat vom Argininsilberniederschlage Ornithin enthalten sein; dasselbe würde aus diesem Filtrat durch Phosphorwolframsäure

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 81.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 321.

gefällt werden können. Nun haben wir zwar früher schon nachgewiesen, daß die aus jenem Filtrate in den Phosphorwolframsäureniederschlag eingehende Stickstoffmenge während der Autolyse der Keimpflanzen sich vergrößert; doch war die Zunahme nur gering (sie betrug nur 0,06% der Pflanzentrockensubstanz). Eine so kleine Zunahme dieser Stickstoffmenge kann aber schon aus der Bildung von Lysin während der Autolyse erklärt und demnach nicht als ein Beweis für eine gleichzeitig erfolgte Zersetzung von Arginin angesehen werden. Daß aber aus diesem Befunde auch nicht auf völliges Fehlen von Arginase in den Keimpflanzen geschlossen werden kann, braucht kaum gesagt zu werden.

In unserer ersten Abhandlung haben wir mitgeteilt, daß während der Autodigestion der Keimpflanzen von *Lupinus albus* eine Bildung von Leucin und Tyrosin stattfand. Mit den von uns aus den bezüglichen Flüssigkeiten isolierten Präparaten dieser beiden Aminosäuren haben wir später noch einige Versuche angestellt. Wir zerlegten das Leucin durch fraktionierte Kristallisation aus einem heißen Gemisch von Weingeist und Ammoniakflüssigkeit in zwei Präparate und führten diese sodann in Kupferverbindungen über, indem wir sie in wässriger Lösung mit Kupferacetat erhitzten. Die Analyse dieser Kupferverbindungen gab folgende Resultate:

- a) 0,200 g Substanz, bei 100° getrocknet, gaben 0,0495 g CuO = 19,78% Cu
 b) 0,3330 „ „ „ 100° „ „ 0,0795 „ „ = 19,08% „

Das beim ersten Präparat erhaltene Resultat entspricht dem von der Formel des Leucinkupfers geforderten Wert (19,66% Cu). Das zweite Präparat gab eine etwas geringere Kupfermenge, woraus man wohl schließen darf, daß dieses Präparat aus einem Gemisch von Leucin und einer anderen Aminosäure (Phenylalanin?) bestand.¹⁾

Die beim Umkristallisieren des Leucins verbliebenen Mutterlaugen wurden eingedunstet, die Verdampfungsrückstände mit Kaliumbichromat und verdünnter Schwefelsäure einige Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Aus der dabei erhaltenen Lösung ließ sich durch Ausschütteln mit Äther in sehr kleiner

¹⁾ Phenylalaninkupfer enthält nur 16,2% Cu.

Menge eine Substanz gewinnen, welche wahrscheinlich Benzoesäure war; doch war ihre Quantität zu gering, um sie durch Umkristallisieren genügend reinigen und mit der genannten Säure sicher identifizieren zu können. Immerhin macht diese Beobachtung es wahrscheinlich, daß in jenen Mutterlaugen Phenylalanin enthalten war.

Das in den Autodigestionsversuchen neben Leucin erhaltene Tyrosin, dessen Identifizierung mit Hilfe der von Hoffmann, von Piria und von Mörner angegebenen Reaktionen erfolgte, wurde später, nach wiederholtem Umkristallisieren, noch auf sein spezifisches Drehungsvermögen untersucht. Letzteres war ebenso hoch, wie dasjenige zweier aus anderen pflanzlichen Objekten dargestellten Tyrosinpräparate.

Aus den teils in dieser Abhandlung, teils früher schon von uns gemachten Mitteilungen geht hervor, daß bei der Autolyse der Keimpflanzen von *Lupinus albus* eine Bildung von Arginin, Leucin und Tyrosin erfolgte; daß daneben noch andere Eiweißspaltungsprodukte, wie Histidin, Phenylalanin usw. entstanden, kann auf Grund unserer Beobachtungen für sehr wahrscheinlich erklärt werden. Wenn wir die Bildung dieser Produkte auf die Wirksamkeit eines in den Keimpflanzen sich findenden proteolytischen Enzyms zurückführen, so werden wir damit wohl kaum Widerspruch hervorrufen. Allerdings ist hinzuzusetzen, daß die Keimpflanzen vielleicht nicht nur ein proteolytisches Enzym, sondern mehrere Stoffe solcher Art enthielten; es ist denkbar, daß ein Enzym die Auflösung der Eiweißstoffe unter Bildung von Albumosen und Peptonen, ein anderes die Spaltung der letzteren Produkte bewirkte. Über die Beschaffenheit der in den genannten Keimpflanzen vorhandenen Enzyme hofften wir bei Inangriffnahme unserer Untersuchung Aufschluß gewinnen zu können: indessen sind wir über vorläufige Versuche nicht hinausgekommen. Indem wir über die dabei erhaltenen Resultate im folgenden einige Mitteilungen machen, erinnern wir zunächst daran, daß W. Butkewitsch¹⁾ aus Keimpflanzen von *Lupinus luteus* durch Extraktion mit Glyzerin und Versetzen des Extrakts mit Weingeist ein Enzympräparat darstellte, welches

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 1.

eine Eiweißsubstanz zu lösen und aus derselben zugleich Leucin und Tyrosin zu bilden vermochte; doch war die Ausbeute an diesen beiden Aminosäuren nur sehr klein. Da man mit Hilfe des Kosselschen Isolierungsverfahrens das Arginin aus den Extrakten leicht darstellen und sogar seine Quantität approximativ bestimmen kann, so schien es angezeigt, bei den Versuchen mit Enzympräparaten in erster Linie die Argininbildung zu berücksichtigen. Wir versuchten, aus den wässerigen Extrakten aus getrockneten 2—3tägigen Keimpflanzen von *Lupinus albus* durch Fällung mit Ammonsulfat ein proteolytisches Enzym zu gewinnen. Als wir die in solcher Weise erhaltenen Präparate auf den eiweißreichen Rückstand wirken ließen, der bei Extraktion fein geriebener Lupinensamen mit Wasser, Alkohol und Äther übrig geblieben war, fand aber nur eine sehr schwache Argininbildung statt: in einem Falle war das Resultat fast negativ. Auch aus einem Extrakt aus frischen, möglichst fein zerriebenen Keimpflanzen erhielten wir durch Fällung mit Kochsalz ein Präparat, welches nur eine äußerst geringe Argininmenge zu bilden vermochte (selbstverständlich wurden diese Versuche mit den erforderlichen Kautelen und unter Zusatz antiseptischer Mittel ausgeführt).

Wir hoffen, daß es uns möglich sein wird, demnächst diese Versuche zu wiederholen und noch weiter auszudehnen.

B. Über die Argininbildung in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus*.

Wie aus den von E. Schulze¹⁾ gemachten Angaben zu ersehen ist, besteht in bezug auf den Arginingehalt eine bedeutende Verschiedenheit zwischen den etiolierten Keimpflanzen von *Lupinus luteus* und denjenigen anderer Leguminosen, wie *Lupinus albus* und *angustifolius*, *Vicia sativa* und *Pisum sativum*. Während die ersteren nach 1½—2wöchentlicher Vegetationsdauer in der Trockensubstanz ungefähr 3% Arginin enthalten, tritt bei den anderen obengenannten Leguminosen das Arginin zwar in der ersten Periode der Keimung auf, nimmt aber später an Menge ab und verschwindet in manchen Fällen bis auf einen zum sicheren Nachweis kaum noch genügenden Rest. Man

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 18.

muß daraus schließen, daß bei diesen Gewächsen das bei Spaltung der Reserveproteinstoffe entstandene Arginin im Stoffwechsel der Pflänzchen eine Umwandlung erleidet; im Einklang damit steht der von uns erbrachte Nachweis, daß bei der Autolyse getrockneter und zerriebener zweitägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus* das Arginin an Menge zunimmt. Aus der Anhäufung des Arginins in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* scheint man dagegen schließen zu müssen, daß hier diese Base dem Verbräuche im Stoffwechsel mehr oder weniger entzogen ist. Allerdings ist es denkbar, daß in den obengenannten Keimpflanzen das Arginin nur zum Teil durch Eiweißspaltung, zum Teil aber durch einen synthetischen Prozeß entsteht. Doch lassen sich für die letztere Annahme Beweise nicht beibringen; für die Entstehung des Arginins durch Eiweißspaltung spricht dagegen außer dem Umstande, daß die genannte Base fast ausschließlich in den Cotyledonen enthalten ist, auch der von E. Schulze und E. Winterstein¹⁾ erbrachte Nachweis, daß die in den Keimpflanzen sich vorfindende Argininmenge diejenige Quantität nicht überstieg, die aus den während der Keimung zerfallenen Eiweißstoffen sich bilden konnte. Neue Stützen für die obige Annahme ergeben sich aus den weiter unten von uns mitgeteilten Beobachtungen.

Bei *Lupinus albus* konnten wir durch Autolyse der Keimpflanzen die Argininmenge so steigern, daß sie 0,5% der für den Versuch verwendeten Pflanzentrockensubstanz betrug, während ein solcher Arginingehalt in den nicht der Autolyse unterworfenen Keimpflanzen dieser *Lupinus*art niemals gefunden wurde. Eine über jenen Betrag hinausgehende Zunahme der Argininmenge vermochten wir aber auch durch lange Zeit fortgesetzte Autolyse nicht zu bewirken. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, daß das proteolytische Enzym, auf dessen Wirksamkeit die Argininbildung zurückzuführen ist, sich in den zweitägigen Keimpflanzen nur in kleiner Menge vorfand und durch die zugesetzten Antiseptika abgeschwächt wurde. Ist nun die Annahme richtig, daß bei *Lupinus luteus* das bei der Spaltung

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 567.

der Eiweißstoffe entstandene Arginin im Stoffwechsel entweder gar nicht, oder nur zum kleinen Teil verbraucht wird, so war zu erwarten, daß hier ein anderes Resultat sich zeigte, als bei *Lupinus albus*; während bei letzterer *Lupinus*-art die in den lebenden Keimpflanzen sich findende Argininmenge stets hinter der bei der Autolyse getrockneter und zerriebener zweitägiger Pflänzchen entstehenden Quantität zurückblieb, mußte umgekehrt bei *Lupinus luteus* die größere Argininmenge in den lebenden Keimpflanzen sich finden, nachdem die letzteren einige Wochen lang sich unter Lichtabschluß entwickelt hatten. Denn es war anzunehmen, daß auch hier die Wirksamkeit des argininbildenden Enzyms während der Autolyse getrockneter und zerriebener Pflänzchen durch die oben erwähnten Umstände abgeschwächt wurde. Wie man aus den weiter unten folgenden Angaben ersehen kann, entsprach das Ergebnis in der Tat diese Erwartung.

Da es nun schon auf Grund der früher gemachten Beobachtungen für sehr wahrscheinlich erklärt werden konnte, daß in den unter Lichtabschluß sich entwickelnden Keimpflanzen von *Lupinus luteus* das bei der Eiweißspaltung entstehende Arginin entweder gar nicht, oder doch nur sehr langsam zum Verbrauch gelangt, so war es von Interesse, die Zunahme der Argininmenge während der fortschreitenden Entwicklung der Keimpflanzen durch quantitative Bestimmungen zu verfolgen und zugleich auch zu bestimmen, wie viel Eiweiß durch Zersetzung verloren gegangen war. Man durfte hoffen, auf solchem Wege einen Einblick in den Verlauf der Eiweißspaltung zu gewinnen — einen Einblick, der durch Bestimmung des Asparagingehaltes sich nicht in gleichem Grade erhalten läßt, weil das Asparagin ein sekundäres Produkt des Eiweißumsatzes ist.

Die Untersuchung, deren Resultate wir hier mitteilen, würde von uns nicht unternommen worden sein, wenn die Erfahrung uns nicht gezeigt hätte, daß es unter Verwendung des von Kossel angegebenen Fällungsverfahrens ohne Schwierigkeit gelingt, das Arginin aus den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* in fast reinem Zustande zur Abscheidung zu bringen. Die Art und Weise, in der wir die Extrakte darstellten und verarbeiteten, entsprach den vor kurzem von uns gemachten An-

gaben¹⁾. Aus letzteren ist zu ersehen, daß wir die Extrakte zunächst von den durch Tannin und durch Bleiacetat fällbaren Substanzen befreien, sie sodann mit Schwefelsäure stark ansäuerten und zur Ausfällung des Arginins mit Phosphorwolframsäure versetzten. Es ist aber notwendig, über die Details des Verfahrens hier noch einige Angaben zu machen. Die Darstellung der Extrakte geschah in der Weise, daß die fein zerriebenen Keimpflanzen mit Wasser von 90—95° C. übergossen wurden; nach Verlauf von 1—2 Stunden wurde die Masse aufs Filter gebracht, der Filterrückstand mit warmem Wasser gut ausgewaschen und schließlich noch abgepreßt. Das mit dem Waschwasser vereinigte Extrakt versetzten wir nun mit einer Lösung von reinem Tannin, ohne jedoch dieses Reagens im Überschuß zuzufügen (wir hörten in der Regel mit dem Zusatz auf, wenn das Reagens nur noch eine schwache Trübung hervorbrachte). Der Niederschlag wurde abfiltriert, gut ausgewaschen, schließlich abgepreßt, das Filtrat mit Bleiessig und Bleizucker versetzt²⁾. Den dadurch erzeugten Niederschlag beseitigten wir durch Filtration, brachten das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat, dessen Reaktion ganz schwach sauer war, durch Eindunsten bei gelinder Wärme auf ein kleineres Volumen, säuerten es hierauf mit Schwefelsäure stark an, entfernten das dabei entstandene Bleisulfat durch Filtration und fügten nun Phosphorwolframsäure zu, solange als dieses Reagens einen sofort oder nach ganz kurzer Zeit sich bildenden Niederschlag hervorbrachte³⁾. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, dann in bekannter Weise durch Zerreiben mit Wasser und Baryumhydroxyd zerlegt. Aus der dabei erhaltenen, mittels Kohlensäure vom Baryt befreiten Basenlösung fällten wir zuerst das Histidin, dann das Arginin nach der von Kossel

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 458.

²⁾ Um zu verhüten, daß die Flüssigkeit alkalisch wurde, setzten wir Bleiessig nur in beschränkter Quantität, dann Bleizucker zu.

³⁾ Die Filtrate gaben bei weiterem Zusatz von Phosphorwolframsäure in der Regel noch kleine Fällungen, die erst nach 5—10 Minuten sich bildeten; solche Fällungen bestehen aber, so weit unsere Erfahrungen reichen, nur aus anorganischen Substanzen.

und Kutscher gegebenen Vorschrift. Der Histidinsilberniederschlag wurde nicht untersucht. Den Niederschlag von Argininsilber behandelten wir in der von den genannten Forschern vorgeschriebenen Art und Weise. Die dabei erhaltene Argininlösung wurde mit Salpetersäure genau neutralisiert und hierauf zur Sirupkonsistenz eingedunstet. Der Sirup begann in der Regel einige Minuten nach dem Erkalten Kristalle abzuscheiden und verwandelte sich beim Stehen im Exsikkator in allen Fällen bald in eine fast farblose, leicht zerreibliche Kristallmasse, in der von Mutterlauge nichts zu bemerken war. Dieses Produkt schloß nur eine sehr geringe Menge (0,2—0,4%) von Asche ein und war nach seinem Verhalten für fast völlig reines Arginin-nitrat zu erklären. Als seine wässrige Lösung mit Kupferhydroxyd oder Kupferkarbonat erhitzt wurde, entstand eine tiefblaue Flüssigkeit, die bei genügender Konzentration gleich nach dem Erkalten die charakteristischen Kristallaggregate des Argininkupfernitrats in reichlicher Menge lieferte; diese Kristalle besaßen, ohne daß sie umkristallisiert worden waren, den richtigen Schmelzpunkt (112—114°). Bei Darstellung dieses Produktes sind wir in mehreren Fällen von einer abgewogenen Quantität des Arginin-nitrats ausgegangen. Die dabei erhaltene blaue Lösung wurde stark konzentriert und dann längere Zeit der Ruhe überlassen, damit das Argininkupfernitrat auskristallisieren konnte; dann wurde die nur in geringer Menge vorhandene Mutterlauge abgossen, die zurückbleibende Kristallmasse mehrmals mit kleinen Quantitäten kalten Wassers gewaschen, dann getrocknet und gewogen. Wir erhielten so 90% der Argininkupfernitratquantität, die aus der angewendeten Arginin-nitratmenge entstehen konnte. Die mit dem Waschwasser vereinigte Mutterlauge lieferte, als sie mit Hilfe von Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit und dann zum Sirup eingeengt wurde, noch Arginin-nitratkristalle in kleiner Menge; daß daneben noch eine andere organische Verbindung vorhanden war, vermochten wir nicht nachzuweisen.

Da nach diesen Beobachtungen das in der beschriebenen Weise erhaltene Arginin-nitrat für ein nahezu reines Produkt zu erklären war, so konnte aus seinem Gewicht der Arginin-

gehalt der Keimpflanzen berechnet werden;¹⁾ vor dem Abwägen wurde das Nitrat im Exsikkator bis zur Konstanz des Gewichtes getrocknet. Die in diesem Produkt noch vorhandenen Beimengungen können kaum mehr als 3—4% vom Gewicht der Kristalle betragen haben. Der durch das Vorhandensein von Beimengungen bedingte Fehler wird aber kompensiert durch einen in der entgegengesetzten Richtung sich geltend machenden Fehler, dessen Ursache darin liegt, daß das Phosphorwolframat des Arginins in kaltem Wasser nicht ganz unlöslich ist. Infolge dieses Umstandes sind vermutlich die für den Arginingehalt unserer Untersuchungsobjekte angegebenen Zahlen immer noch etwas zu niedrig. Sind aber diese Zahlen auch nicht für ganz genaue zu erklären, so unterliegt es doch keinem Zweifel, daß sie miteinander vergleichbar sind, denn die ihnen anhaftenden Fehler sind bei allen Objekten die gleichen.²⁾ Für den bei Ausführung unserer Untersuchungen erfolgten Zweck kam es aber in erster Linie darauf an, mit einander vergleichbare Zahlen zu gewinnen.

Wie aus den weiter unten folgenden Angaben zu ersehen ist, zeigten die in solcher Weise in dem gleichen Material ausgeführten Doppelbestimmungen in ihren Resultaten eine Übereinstimmung, die als eine befriedigende bezeichnet werden kann.

Da früher schon nachgewiesen worden ist, daß der Eiweißzerfall während der Keimung bei *Lupinus luteus* sehr rasch verläuft, so konnten wir von vornherein erwarten, auch in ganz

¹⁾ Wir haben also in diesem Falle es unterlassen, das Arginin-nitrat zur Reinigung noch in Argininkupfernitrat überzuführen und letzteres zu wägen, während wir dies früher in der Regel getan haben (man vergleiche z. B. unsere erste Abhandlung). Zu den Beimengungen, die in dem in der beschriebenen Weise dargestellten Arginin-nitrat enthalten sein können, gehört nach einer vor kurzem von Kutscher und Otori (Zentralbl. für Physiologie, Bd. 18, Nr. 8) gemachten Angabe, die auch mit den in unserem Laboratorium gemachten Erfahrungen übereinstimmt, auch das Guanidin. Wir haben aber in den *Lupinuskeimpflanzen* Guanidin bis jetzt nicht nachzuweisen vermocht.

²⁾ Dies darf um so eher behauptet werden, als wir uns bemüht haben, bei Ausführung der Bestimmungen die Versuchsbedingungen (Volumen der Flüssigkeiten usw.) möglichst gleich zu machen.

jungen Keimpflanzen dieser *Lupinus*art schon eine beträchtliche Argininmenge vorzufinden. Aber es war für uns doch überraschend, zu finden, daß 2- bis 4tägige Keimpflanzen schon 1,17—1,74% Arginin enthielten. Dieser Befund veranlaßte uns, auch die ungekeimten Samen von *Lupinus luteus* auf Arginin zu untersuchen. Auch hier fand sich diese Base in einer nicht ganz unbeträchtlichen Quantität vor, wie schon in einer früher publizierten Abhandlung¹⁾ von uns mitgeteilt worden ist, und zwar erhielten wir aus drei verschiedenen Samenmustern folgende Ausbeute an Arginin:

$$\left. \begin{array}{l} \text{a) } 0,41 \% \\ \text{b) } 0,30 \% \\ \text{c) } 0,38 \% \end{array} \right\} \text{Mittel } 0,36 \%$$

Später haben wir noch ein viertes Samenmuster auf Arginin untersucht, und zwar dasjenige, dessen wir uns zur Darstellung der Keimpflanzen, auf welche die weiter unten folgenden Angaben sich beziehen, bedient haben. Diese Samen lieferten etwas weniger Arginin als die früher untersuchten, wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist:

$$\begin{aligned} 87,26 \text{ g der Samentrockensubstanz lieferten } 0,280 \text{ g Argininnitrat} \\ = 0,1988 \text{ g oder } 0,23 \% \text{ Arginin.} \end{aligned}$$

Die im vorigen angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die unentschälten Samen: unter der Annahme, daß die Samenschalen frei von Arginin gewesen sind, berechnet sich der Arginingehalt der schalenfreien Samentrockensubstanz auf 0,31—0,55%, im Mittel auf 0,45%.²⁾ Ist demnach auch fast $\frac{1}{3}$ der in 2—3tägigen Keimpflanzen sich findenden Argininmenge schon vor Beginn der Keimung in den Samen vorhanden gewesen, so zeigt sich doch, daß schon im ersten Keimungsstadium eine starke Argininbildung eingetreten ist. Wie wir weiter unten noch nachweisen werden, hält die Argininbildung gleichen Schritt mit dem Eiweißzerfall.

Im folgenden beschreiben wir nun zunächst die mit jungen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* von uns angestellten Auto-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 459.

²⁾ Bei Ausführung der Berechnung wurde angenommen, daß die Samen aus 26 Teilen Schalen und 74 Teilen Kerne bestanden.

digestionsversuche. Für den ersten dieser Versuche verwendeten wir 3–4tägige Pflänzchen, die bei 35–40° getrocknet, dann fein zerrieben und mit Äther behandelt worden waren. Bei Bestimmung der in diesem Material enthaltenen Argininmenge ergaben sich folgende Zahlen:

35,6 g der Pflanzentrockensubstanz (frei von Schalen)
gaben 0,8325 g Argininnitrat = 0,5909 g oder 1,66% Arginin.

Mit diesem Material stellten wir einen Autodigestionsversuch an, in welchem als Antiseptika Chloroform und etwas zerriebenes Thymol zugesetzt wurden. Der Versuch lieferte folgendes Resultat:

Angewendet wurden 35,6 g Trockensubstanz, 200 ccm Wasser und 0,5 g Citronensäure. Dauer der Autolyse: 10 Tage. Erhalten wurden: 0,992 g Argininnitrat = 0,7043 g Arginin. Diese Argininmenge beträgt 1,98% der angewendeten Pflanzentrockensubstanz.

Wie man sieht, ist die Zunahme der Argininmenge in diesem Versuche nicht groß gewesen; sie beträgt nur 0,30% der Pflanzentrockensubstanz. Größer war die Steigerung der Argininmenge in Autodigestionsversuchen, die mit 3–4tägigen Keimpflanzen einer anderen Kultur ausgeführt wurden. Diese Keimpflanzen waren ebenfalls bei 35–40° getrocknet und sodann zerrieben, aber nicht mit Äther behandelt worden. Bei Bestimmung ihres Arginingehaltes wurden folgende Zahlen erhalten:

a) 36,85 g Pflanzentrockensubstanz lieferten 0,950 g Argininnitrat
= 0,6745 g oder 1,83% Arginin.

b) 36,85 g Pflanzentrockensubstanz lieferten 0,863 g Argininnitrat
= 0,6127 g oder 1,67% Arginin.

c) 27,64 g Pflanzentrockensubstanz lieferten 0,674 g Argininnitrat
= 0,4785 g oder 1,73% Arginin.

Im Mittel lieferten 100 Teile der Pflanzentrockensubstanz demnach 1,74 Teile Arginin.

Mit diesem Material wurden drei Autodigestionsversuche unter Zusatz von Chloroform und etwas zerriebenem Thymol ausgeführt. In zwei Versuchen setzten wir je 0,5 g Citronensäure zu; in dem dritten Versuche wurde so viel Blausäure zugefügt, daß eine 0,2%ige Lösung dieser Säure entstand. Die Versuche lieferten folgende Resultate:

Versuch I: Angewendet wurden 26,79 g Pflanzentrockensubstanz und 200 ccm Wasser. Die Autolyse, unter Zusatz von Blausäure, dauerte

10 Tage. Erhalten wurden 0,842 g Argininnitrat = 0,599 g oder 2,24% Arginin.

Versuch II: Angewendet wurden 36,85 g Pflanzentrockensubstanz und 200 ccm Wasser. Die Autolyse, unter Zusatz von Citronensäure, dauerte 13 Tage. Erhalten wurden 1,168 g Argininnitrat = 0,9003 g oder 2,44% Arginin.

Versuch III: Angewendet wurden 36,85 g Pflanzentrockensubstanz und 200 ccm Wasser. Die Autolyse, unter Zusatz von Citronensäure, dauerte 13 Tage. Erhalten wurden 1,286 g Argininnitrat = 0,8421 g oder 2,29% Arginin.

Vergleicht man diese Zahlen mit dem bei Bestimmung des Arginingehaltes im Ausgangsmaterial erhaltenen Resultat, so findet man, daß die während der Autolyse erfolgte Zunahme der Argininmenge 0,50—0,70% der angewendeten Pflanzentrockensubstanz betrug. Diese Zunahme ist zwar größer als diejenige, die in den früher beschriebenen Autodigestionsversuchen von uns gefunden wurde; sie ist aber immerhin noch gering, wenn man sie mit der starken Steigerung des Arginingehalts vergleicht, die in den lebenden Keimpflanzen von *Lupinus luteus* während der ersten Entwicklungsperiode in kurzer Zeit erfolgte. Wie aus den weiter unten gemachten Angaben zu ersehen ist, fanden wir in 6tägigen Keimpflanzen der genannten *Lupinus*-art schon 2,35% Arginin, also ebensoviel, als in den 3tägigen Keimpflanzen auch nach lange fortgesetzter Autolyse gefunden wurde.

Wie früher schon mehrmals erwähnt worden ist, hat man anzunehmen, daß durch die bei der Autolyse zugesetzten Antiseptika die Wirksamkeit des proteolytischen Enzyms, auf dessen Vorhandensein die Argininbildung zurückzuführen ist, abgeschwächt wird. Doch ist es wohl nicht wahrscheinlich, daß durch diesen Umstand allein die relativ geringe Zunahme der Argininmenge während der Autolyse bedingt ist. Für wahrscheinlicher halten wir es, daß die jungen Keimpflanzen in der Zeiteinheit nur wenig von dem proteolytischen Enzym enthalten und daß sie während ihrer Entwicklung eine größere Menge dieses Enzyms in dem Maße, als dies für die Eiweißspaltung erforderlich ist, bilden. Dabei sei noch bemerkt, daß wir, wenn wir hier nur von einem Enzym reden, es doch keineswegs für

unmöglich oder auch nur unwahrscheinlich halten, daß an der Spaltung der Eiweißstoffe in den Keimpflanzen mehrere Enzyme von ungleicher Wirkung sich nebeneinander oder nacheinander beteiligen.

Wir gehen nun zur Mitteilung der Resultate über, die wir bei Bestimmung des Arginingehaltes der Keimpflanzen in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien erhielten. Diese Keimpflanzen waren unter Benutzung eines Samenmusters von vorzüglicher Qualität in Sandkultur in einem verdunkelten Zimmer erhalten worden und hatten sich sehr rasch entwickelt; entsprechend dieser raschen Entwicklung war auch, wie aus den weiter unten gemachten Angaben zu ersehen ist, der Eiweißzerfall in ihnen ein sehr schneller. Sie wurden nach 6tägiger, 11tägiger und 15—16tägiger Vegetationsdauer geerntet, sodann bei ca. 60° getrocknet und aufs feinste zerrieben. Um das Entwicklungsstadium zu kennzeichnen, sei noch erwähnt, daß bei den 6tägigen Keimpflanzen die Länge des hypokotylen Gliedes 40—60 mm, bei den 15tägigen Pflänzchen 100—110 mm betrug. Bei Bestimmung des Arginingehalts dieser Pflänzchen wurden folgende Resultate erhalten:

6tägige Keimpflanzen.

54,42 g Pflanzentrockensubstanz gaben 1,803 g Argininnitrat
= 1,280 g oder 2,35% Arginin.

11tägige Keimpflanzen.

- I. 27,21 g Pflanzentrockensubstanz gaben 1,273 g Argininnitrat
= 0,9038 g oder 3,32% Arginin.
 - II. 27,21 g Pflanzentrockensubstanz gaben 1,197 g Argininnitrat
= 0,8499 g oder 3,13% Arginin.
- Mittel: 3,23% Arginin.

15—16tägige Keimpflanzen.

- I. 26,84 g Pflanzentrockensubstanz gaben 1,442 g Argininnitrat
= 1,0238 g oder 3,81% Arginin.
 - II. 26,84 g Pflanzentrockensubstanz gaben 1,419 g Argininnitrat
= 1,0075 g oder 3,75% Arginin.
- Mittel: 3,78% Arginin.

Aus diesen Zahlen ergibt sich, daß die stärkste Argininbildung in den ersten 6 Tagen nach Beginn der Keimung stattfand — in derjenigen Periode, in welcher, wie aus den

später folgenden Angaben zu ersehen ist, auch der Eiweißzerfall am stärksten war.

Zur Kontrolle des für die 6tägigen Pflänzchen erhaltenen Resultates haben wir noch eine Kultur von 6tägigen normalen Keimpflanzen, gewachsen unter Lichtzutritt in einem Gewächshaus, auf ihren Arginingehalt untersucht. Dabei erhielten wir folgendes Resultat:

18,57 g Pflanzentrockensubstanz lieferten 0,598 g Argininnitrat
= 0,4050 g oder 2,18% Arginin.

Dieses Resultat weicht von dem für die unter Lichtabschluß gewachsenen 6tägigen Keimpflanzen erhaltenen Resultat nur sehr wenig ab. Die kleine Differenz übersteigt kaum die Fehlergrenze der Bestimmungen und kann schon daraus erklärt werden, daß die normalen Pflänzchen bei einer etwas niedrigeren Temperatur sich entwickelten als die etiolierten, und daß infolge davon wahrscheinlich auch der Eiweißzerfall in ihnen etwas langsamer erfolgte.

Es war von Interesse, auch noch Pflänzchen von größerem Alter auf ihren Arginingehalt zu untersuchen. Da nach früher gemachten Erfahrungen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* in der Regel bald zugrunde gehen, wenn man sie länger als 15—16 Tage im Dunkeln läßt, so ließen wir solche Keimpflanzen zuerst 11 Tage lang bei Lichtabschluß vegetieren und brachten sie dann ans Licht: sie entwickelten sich nun langsam und es dauerte geraume Zeit, bis das erste Blättchenpaar entfaltet war. Wie früher ausgeführte Untersuchungen gezeigt haben, findet in so behandelten Pflänzchen nur eine langsame Zunahme des Eiweißgehaltes statt, während ihr Asparagingehalt noch zunimmt. Bei Untersuchung von 19—20tägigen Pflänzchen, die in solcher Weise gezogen worden waren, erhielten wir folgendes Resultat:

18,0 g Pflanzentrockensubstanz gaben 0,975 g Argininnitrat
= 0,6922 g oder 3,84% Arginin.

Wie man sieht, war bei diesen Pflänzchen der Arginingehalt nur um einen ganz unwesentlichen Betrag höher, als bei den 15—16tägigen Pflänzchen.¹⁾

¹⁾ In Übereinstimmung mit diesem Befunde steht der früher erbrachte Nachweis, daß bei 24tägigen Pflänzchen von *Lupinus luteus*, die

Die Resultate der im vorigen aufgeführten Bestimmungen sind im folgenden mit dem bei Untersuchung der ungekeimten Samen erhaltenen Ergebnis zusammengestellt.

Die schalenfreie Trockensubstanz lieferte:

Ungekeimte Samen:	0,31% Arginin
6tägige Keimpflanzen:	2,35%
Desgl.; im Licht erwachsen:	2,18% „
11tägige Keimpflanzen:	3,23% „
15—16 „ „	3,78% „
19—20 „ „	3,84% „

Zur Ergänzung der im vorigen mitgeteilten Zahlen können noch die Resultate dienen, die wir bei Untersuchung einiger anderer Keimpflanzenkulturen erhielten. Diese Keimpflanzen waren, unter Benutzung von drei Samenmustern, im Dunkeln, unter den gleichen Verhältnissen gezogen, wie diejenigen, auf welche die oben gemachten Angaben sich beziehen; auch wurde die Bestimmung der von ihnen gelieferten Argininquantität in der gleichen Weise ausgeführt, wie bei den anderen Pflänzchen.¹⁾

Die schalenfreie Pflanzentrockensubstanz lieferte:

2—3tägige Pflänzchen:	1,17% Arginin
3—4 „ „	1,56% „
3—4 „ „	1,74% „ (Mittel aus 3 Bestimmungen)
11—12 „ „	3,01% „

Auch diese Zahlen zeigen, daß gerade in der ersten Keimungsperiode eine starke Argininbildung erfolgte. Die zur

gleichfalls zuerst im Dunkeln, dann im Licht sich entwickelt hatten, die aus eiweißfreiem Extrakt in den Phosphorwolframsäureniederschlag eingegangene Stickstoffmenge nicht größer, sondern sogar etwas geringer war, als bei 15tägigen Pflänzchen (diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 66).

¹⁾ Analytische Belege: a) 2—3tägige Keimpflanzen: 53,74 g fettfreie Trockensubstanz gaben 0,941 g Argininnitrat = 0,6681 g oder 1,24% Arginin. Für die fetthaltige Trockensubstanz berechnet sich daraus ein Gehalt von 1,17% Arginin.

b) 3—4tägige Keimpflanzen: 35,6 g fettfreie Trockensubstanz gaben 0,8325 g Argininnitrat = 0,5909 g oder 1,66% Arginin. Für die fetthaltige Trockensubstanz berechnet sich daraus ein Gehalt von 1,56% Arginin.

c) 3—4tägige Keimpflanzen, zweite Kultur: Die analytischen Belege für diese Bestimmungen sind oben schon mitgeteilt worden.

d) 11—12tägige Keimpflanzen: 39,62 g Trockensubstanz gaben 1,678 g Argininnitrat = 1,1914 g oder 3,01% Arginin.

Darstellung dieser Keimpflanzen verwendeten Samenmuster enthielten schon vor der Keimung mehr Arginin als diejenigen Samen, die bei den vorher beschriebenen Versuchen zur Verwendung kamen — was bei Vergleichung der betreffenden Zahlen zu beachten ist.

Neben dem Arginingehalt bestimmten wir in den 6tägigen, 11tägigen und 15—16tägigen Keimpflanzen, sowie in den zugehörigen Samen, auch die Verteilung des Gesamtstickstoffs auf Proteinstoffe und nichtproteinartige Verbindungen. Diese Bestimmungen wurden nach dem Stutzerschen Verfahren ausgeführt. Wenn man auch nicht sicher sein kann, mit Hilfe dieses Verfahrens in allen Fällen eine scharfe Trennung der Proteinstoffe von den nichtproteinartigen Verbindungen zu erreichen, so mußte doch seine Anwendung im vorliegenden Falle als zulässig erscheinen. Denn es ist zweifellos, daß die in den Keimpflanzen bis jetzt nachgewiesenen Produkte des Eiweißumsatzes, nämlich Asparagin, Glutamin, Hexonbasen, Monoaminosäuren usw., aus den Keimpflanzenextrakten durch Kupferhydroxyd nicht gefällt werden. Übrigens kam es ja hier vorzugsweise darauf an, für die verschiedenen Objekte mit einander vergleichbare Zahlen zu gewinnen. Die aus diesen Bestimmungen sich ableitenden Zahlen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.¹⁾

	Vom Gesamtstickstoff fallen	
	auf Proteinstoffe	auf nichtproteinartige Verbindungen
In den ungekeimten Samen:	91,92%	8,08%
„ „ 6tägigen Keimpflanzen:	41,26%	58,74%
„ „ 11 „ „	25,16%	74,84%
„ „ 15—16 „ „	19,74%	80,26%

Aus diesen Zahlen ist zu schließen, daß der Eiweißzerfall in den ersten 6 Tagen der Keimung ein sehr intensiver war, während er sich später verlangsamte. Die gleiche Erscheinung ist bei Versuchen, die früher in unserem Laboratorium mit Lupinussamen ausgeführt wurden, hervorgetreten.

¹⁾ Die analytischen Belege für die Stickstoffbestimmungen lassen wir am Schluß der Abhandlung folgen.

Allerdings war die Eiweißzersetzung in der ersten Periode der Keimung nicht immer so stark, wie im vorliegenden Falle.¹⁾ Die Keimpflanzen, mit denen wir hier experimentierten, hatten sich, wie früher schon erwähnt worden ist, besonders rasch entwickelt.

Um zu berechnen, wieviel Eiweißsubstanz den Pflänzchen verloren gegangen, und wieviel Arginin gleichzeitig in ihnen gebildet war, muß man selbstverständlich das Mengenverhältnis berücksichtigen, in welchem die 6tägigen, 11tägigen und 15—16tägigen Keimpflanzen zu den Samen, aus denen sie sich gebildet hatten, stehen. Dieses Mengenverhältnis haben wir aus ihrem Stickstoffgehalt abgeleitet, indem wir die durch Experimente genügend gestützte Annahme²⁾ machten, daß die in den Samen enthaltene absolute Stickstoffmenge während der Keimung eine Veränderung nicht erleidet. Die nach bekannten Regeln ausgeführte Berechnung, deren Einzelheiten wir hier nicht mitteilen, führte zu den in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Zahlen. Wir bemerken dazu, daß der Eiweißgehalt durch Multiplikation der nach Stutzers Verfahren für den «Proteinstickstoff» gefundenen Zahl mit dem Faktor 6 ermittelt wurde und daß alle Prozentzahlen sich auf die schalenfreie Trockensubstanz beziehen.

¹⁾ In 6tägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus*, die in unserem Laboratorium früher untersucht worden sind (man vergl. Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 77), fielen nach dem Ergebnis der Analysen auf Proteinstoffe 58,80%, auf nichtproteinartige Verbindungen 41,20% des Gesamtstickstoffs; der Gehalt an Proteinstoffen war also hier bedeutend größer als in den jetzt untersuchten 6tägigen Keimpflanzen. Dies erklärt sich wohl zum Teil aus den etwas ungleichen Vegetationsbedingungen; es ist aber denkbar, daß auch ein ungleicher Gehalt an proteolytischem Enzym von Einfluß war. Daß die Differenz obiger Resultate nicht auf Versuchsfehler zurückzuführen ist, dürfen wir behaupten, da die für den Proteingehalt der bezüglichen Keimpflanzen mitgeteilten Zahlen aus 3 bzw. 4 Bestimmungen abgeleitet worden sind.

²⁾ Wir verweisen auf die Abhandlung von N. Castoro, «Untersuchungen über die Frage, ob die Keimung der Pflanzensamen mit einer Entwicklung von freiem Stickstoff verbunden ist» (Landw. Versuchstationen, Bd. 60, S. 41).

Es waren enthalten in	Eiweißstoffe	Arginin
100 Teilen ungekeimtem Samen	51,84 Teile	0,31 Teile
87,7 6tägiger Keimpflanzen	23,94 »	2,07 »
83,33 » 11 » »	14,16 »	2,69 »
80,55 » 15—16 » »	11,10 »	3,04 »

Subtrahiert man von der in den ungekeimten Samen enthaltenen Eiweißquantität die in den 6tägigen, 11tägigen und 15—16tägigen Keimpflanzen noch enthaltenen Eiweißmengen, so ergibt sich, wieviel Eiweißsubstanz während der Entwicklung der Pflänzchen durch Zerfall verloren gegangen ist. Um die gleichzeitig entstandenen Argininquantitäten zu finden, muß man von den in den Pflänzchen verschiedener Entwicklung vorgefundenen Argininmengen diejenige Menge abziehen, die schon in den ungekeimten Samen enthalten war. Bei Ausführung dieser Berechnung gelangt man zu folgendem Ergebnis:

In den aus 100 Teilen schalenfreier Samentrockensubstanz entstandenen Keimpflanzen		
	waren verloren gegangen	hatten sich gebildet
	Eiweißsubstanz	Arginin
Während 6tägiger Vegetationsdauer	27,90 Teile	1,76 Teile
» 11 » »	37,68 »	2,38 »
» 15—16 » »	40,74 »	2,73 »

Bei Diskussion dieser Zahlen ist darauf aufmerksam zu machen, daß die in den Keimpflanzen im ganzen zum Zerfall gelangte Eiweißmenge nicht genau mit der nach unserer Rechnung verloren gegangenen Quantität übereinstimmen wird; denn in den im Wachstum begriffenen Teilen der Pflänzchen findet ja auch während der Entwicklung im Dunkeln Eiweißbildung auf Kosten von Eiweißzersetzungsprodukten statt; demnach muß die im ganzen zerfallene Eiweißmenge den Eiweißverlust übersteigen. Doch findet, soviel wir wissen, in den bei Lichtabschluß vegetierenden Pflänzchen die Neubildung von Eiweiß nur in geringem Maße statt. Der Eiweißverlust kann also doch einen Maßstab für den Eiweißzerfall geben, wenn auch die im ganzen zerfallene Eiweißmenge mit der verloren gegangenen nicht genau übereinstimmt. Legt man diese Annahme zugrunde, so ergibt sich aus unseren Zahlen die bemerkenswerte Schluß-

folgerung, daß die Argininbildung mit dem Eiweißzerfall gleichen Schritt hielt: sie war sehr stark während der ersten 6 Tage der Keimung, verlangsamte sich dann aber bedeutend. Eine starke Stütze für jene Schlußfolgerung liefert ferner noch der von uns erbrachte Nachweis, daß die Argininbildung, ebenso wie die Eiweißzersetzung, mit dem 15. oder 16. Tage der Keimung ihr Ende erreichte, oder doch später wenigstens nur noch in sehr geringem Maße stattfand.

Berechnet man, wie viel Arginin pro 100 Teile verloren gegangener Eiweißsubstanz in den Pflänzchen gebildet worden war, so gelangt man zu folgendem Resultat:

		Auf 100 Teile verloren gegangener Eiweißsubstanz kommen
In	6tägigen Keimpflanzen	6,31 Teile Arginin
»	11 »	6,32 »
»	15—16 »	6,70 »

Im Mittel kommen auf 100 Teile verloren gegangener Eiweißsubstanz 6,44 Teile Arginin.¹⁾ Die Differenzen der Einzelzahlen lassen sich auf unvermeidliche Versuchsfehler zurückführen; denn weder die zum Zerfall gelangte Eiweißmenge noch die in den Pflänzchen entstandene Argininquantität läßt sich ganz genau bestimmen.

Es ist von Interesse, mit dieser Mittelzahl (6,44 Teile) die Argininausbeute zu vergleichen, die man aus der Eiweißsubstanz der Samen von *Lupinus luteus* bei der Spaltung mit Säuren erhält. E. Schulze und E. Winterstein²⁾ erhielten aus dieser Eiweißsubstanz 6,9% Arginin. Da aber bei Ausführung der betreffenden Bestimmung Kossels älteres Verfahren zur Trennung des Arginins und des Histidins angewendet worden war, so haben wir eine neue Bestimmung ausgeführt. Für dieselbe verwendeten wir ein nach Ritthausens Methode

¹⁾ Vom Stickstoff der verloren gegangenen Eiweißsubstanzen fanden sich 12,5% in dem bei der Eiweißzersetzung entstandenen Arginin wieder. Eine ähnliche Zahl (11,8%) fanden E. Schulze und E. Winterstein (Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 572) bei einer fast in der gleichen Weise ausgeführten Bestimmung, für welche 11—12tägige Keimpflanzen von *Lupinus luteus* als Objekt dienten.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 556.

unter Anwendung möglichst schwacher Natronlauge dargestelltes Eiweißpräparat. Bei Darstellung dieses Präparates wurden die mit Äther und mit Alkohol extrahierten und sodann auf das feinste zerriebenen Samen der gelben Lupine wiederholt mit sehr schwacher Natronlauge behandelt, um die in den Samen enthaltenen Eiweißsubstanzen so vollständig wie möglich in Lösung zu bringen. Die alkalischen Extrakte wurden sodann mit Essigsäure angesäuert, die dabei sich ausscheidenden Eiweißsubstanzen zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther sorgfältig ausgewaschen und hierauf getrocknet; sie bildeten nun eine zerreibliche, schwach gelblich gefärbte Masse. Ein abgewogenes Quantum dieses Materials wurde mit der zehnfachen Quantität Salzsäure 10 Stunden lang gekocht. Aus der dabei entstandenen Lösung fällten wir die Basen durch Phosphorwolframsäure aus. Aus der bei Zerlegung des Niederschlages mittels Baryumhydroxyd erhaltenen Basenlösung isolierten wir dann das Arginin nach der Methode von Kossel und Kutscher. Wir erhielten dabei folgendes Resultat:

61,32 g der Eiweißsubstanz (wasserfrei in Rechnung gestellt) lieferten
6,774 g Argininnitrat = 4,81 g oder 7,84% Arginin.

Es ist anzunehmen, daß diese Zahl noch zu niedrig ist.¹⁾ Auch war das von uns verwendete Eiweißpräparat vermutlich nicht ganz rein. Wir haben daher auch noch berechnet, wieviel vom Stickstoffgehalt dieses Präparates sich in der von uns isolierten Argininquantität wiederfand. Es zeigte sich, daß die von uns erhaltene Argininmenge 15,5% des Eiweißstickstoffs einschloß.²⁾ Die Argininausbeute war in diesem Falle also etwas größer als die früher erhaltene. Der Grund kann zum Teil in der Anwendung des verbesserten Trennungsvorgangs für Arginin und Histidin liegen: außerdem kann auch von Einfluß gewesen sein, daß in dem früher ausgeführten Versuche das Argininnitrat nicht direkt gewogen, sondern zuvor in Ar-

¹⁾ Denn wir haben das Arginin aus der beim Kochen der Eiweißsubstanz mit Salzsäure erhaltenen Lösung durch Phosphorwolframsäure ausgefällt, wobei bekanntlich ein kleiner Verlust sich nicht vermeiden läßt.

²⁾ Das von uns verwendete Eiweißpräparat enthielt 16,33% N (bestimmt nach Kjeldahls Methode).

gininkupfernitrat übergeführt worden ist. Das letztere wurde zur Kristallisation gebracht und sodann von der in geringer Menge vorhandenen Mutterlauge befreit. Diese Operation bedingt aber einen geringen Substanzverlust.

Wie aus den im vorigen gemachten Mitteilungen sich ersehen läßt, übersteigt die pro 100 Teile verloren gegangener Eiweißsubstanz in den Keimpflanzen gebildete Argininmenge in keinem Falle diejenige Quantität, die bei der Spaltung der gleichen Eiweißsubstanz durch Salzsäure sich erhalten ließ, sie blieb aber auch nicht sehr weit hinter dieser Quantität zurück. Vollständige Übereinstimmung der in dem einen und in dem anderen Prozeß entstandenen Argininmengen war von vornherein kaum zu erwarten; denn, abgesehen von anderen Umständen, muß es ja für möglich erklärt werden, daß die Eiweißspaltung in den Keimpflanzen in ihrem Verlaufe nicht völlig mit derjenigen Spaltung übereinstimmt, welche die Eiweißsubstanzen beim Kochen mit Salzsäure oder Schwefelsäure erleiden.

Aus den im vorigen gemachten Mitteilungen ist zunächst mit Sicherheit zu schließen, daß das Arginin in den Keimpflanzen nicht durch einen synthetischen Prozeß, sondern ausschließlich durch Eiweißspaltung entsteht. Außer der Lokalisierung der genannten Base in den Kotyledonen spricht für diese Annahme mit aller Entschiedenheit die Tatsache, daß die Argininbildung mit dem Eiweißzerfall gleichen Schritt hält und daß sowohl nach kürzerer als nach längerer Dauer der Keimung die in den Pflänzchen entstandene Argininquantität nicht viel von derjenigen abweicht, die aus den zum Verfall gelangten Eiweißstoffen sich bilden konnte. Wäre eine synthetische Bildung des Arginins auf Kosten irgend welcher Produkte des Eiweißumsatzes die Ursache für die Anhäufung der genannten Base in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus*, so müßte der Befund ein ganz anderer sein. Das Asparagin, welches als ein sekundäres Produkt des Eiweißumsatzes zu betrachten ist und in den Keimpflanzen höchst wahrscheinlich durch Synthese sich bildet, findet sich im Gegensatz zum Arginin in den wachsenden Teilen der Keimpflanzen in größerer Menge vor, als in den Cotyledonen; auch findet noch starke Asparagin-

bildung statt, nachdem der Eiweißzerfall an Intensität stark abgenommen oder sogar sein Ende erreicht hat.

Ist nun die im vorigen ausgesprochene Annahme für berechtigt zu erklären, dann lassen sich aus den über die Bildung des Arginins in den Keimpflanzen gemachten Beobachtungen noch bemerkenswerte Schlußfolgerungen in bezug auf den Verlauf der Eiweißzersetzung ableiten. Wir gehen dabei von der den heutigen Anschauungen ohne Zweifel entsprechenden Annahme aus, daß die Eiweißstoffe in den Keimpflanzen durch proteolytische Enzyme (Proteasen) gespalten werden. Es ist denkbar, daß dabei durch ein trypsinartiges Enzym zunächst Albumosen und Peptone gebildet werden, die dann später langsam, aber nicht vollständig, in die kristallinen Endprodukte der Spaltung (Monoaminosäuren, Hexonbasen etc.) übergehen. Aus den von uns über die Argininbildung gemachten Beobachtungen muß man aber schließen, daß wenigstens in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* die Eiweißstoffe schon in der ersten Periode der Keimung einer energischen Zersetzung in kristallisierende Produkte unterliegen; denn schon in Keimpflänzchen, deren Vegetationsdauer nur wenige Tage betrug, fanden wir Arginin in beträchtlicher Menge vor; die Bildung dieser Base hielt überhaupt gleichen Schritt mit dem Eiweißzerfall. Daß aber neben Arginin auch Leucin, Tyrosin und andere kristallinische Spaltungsprodukte in ganz jungen Keimpflanzen auftreten, ist früher schon nachgewiesen worden. Daß ihre Quantität nicht sehr groß ist, läßt sich durch die Annahme erklären, daß sie im Stoffwechsel der Pflänzchen bald umgewandelt werden. Das Enzym aber, welches in den *Lupinus*keimpflanzen diese energische Eiweißspaltung bewirkt, kann vielleicht dem im Tierkörper vorkommenden Erepsin an die Seite gestellt werden.¹⁾ Daß daneben noch ein peptonisierendes Enzym sich vorfindet, welches die Eiweißstoffe auflöst und ihre Zersetzung einleitet, muß für möglich erklärt werden.

¹⁾ In seinen interessanten Abhandlungen über die pflanzlichen Proteasen nimmt auch S. H. Vines das Vorkommen von Enzymen, die dem tierischen Erepsin gleichen, in den Pflanzen an (*Annals of Botany*, Vol. XVIII, Nr. LXX, April 1904).

Warum das bei der Eiweißspaltung entstandene Arginin in den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* nicht zum Verbrauch gelangt, das ist eine zurzeit kaum zu beantwortende Frage. Wenn bei der Umwandlung der primären Eiweißspaltungsprodukte in den Keimpflanzen Enzyme mitwirken, so könnte man jene Erscheinung durch die Annahme erklären, daß bei *Lupinus luteus* eine Arginase, d. h. ein das Arginin spaltendes Enzym fehlte oder sich doch nur in sehr geringer Quantität vorfand (völliges Fehlen eines solchen Enzyms braucht man nicht anzunehmen, weil es im Bereich der Möglichkeit liegt, daß ein kleiner Teil des bei der Eiweißspaltung entstandenen Arginins auch in diesen Keimpflanzen zersetzt wurde).

Ob die große Verschiedenheit, die in bezug auf den Arginingehalt zwischen den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* und denjenigen anderer *Lupinus*-arten (*Lupinus albus* und *angustifolius*) hervorgetreten ist, lediglich auf die in ganz ungleichem Maße erfolgende Umwandlung des Arginins in den verschiedenen Keimpflanzen zurückzuführen ist, oder ob bei *Lupinus luteus* infolge der spezifischen Beschaffenheit des vorhandenen proteolytischen Enzyms stärkere Argininbildung erfolgte, als bei den anderen *Lupinus*-arten, ist eine gleichfalls zurzeit nicht mit Sicherheit zu beantwortende Frage.

Rückblick auf die Resultate.

Durch die von uns ausgeführten Autodigestionsversuche mit Keimpflanzen von *Lupinus albus* haben die Ergebnisse der in unserer ersten Abhandlung beschriebenen Versuche gleicher Art eine Bestätigung und eine Ergänzung erhalten. Auch in den neuen Versuchen war die Zunahme der Argininmenge während der Autolyse relativ gering. Dies läßt sich durch die Annahme erklären, daß die jungen Pflänzchen in der Zeiteinheit nur eine kleine Quantität von proteolytischem Enzym enthalten und daß die Wirksamkeit dieses Enzyms durch die in den Autodigestionsversuchen zugesetzten Antiseptika abgeschwächt wurde. Bei der Autolyse 3—4tägiger Keimpflanzen von *Lupinus luteus* war die Argininbildung in einem Falle ebenfalls nur schwach, in einem anderen etwas stärker; auch bei langer Dauer der

Autolyse blieb aber die Zunahme der Argininmenge doch hinter derjenigen zurück, die in den lebenden Keimpflanzen von *Lupinus luteus* binnen 4 bis 5 Tagen erfolgte. Die Anhäufung des Arginins in den Keimpflanzen dieser *Lupinus*-art ist darauf zurückzuführen, daß hier das beim Eiweißzerfall entstandene Arginin im Stoffwechsel der Pflänzchen entweder gar nicht oder doch nur sehr langsam verbraucht wird.

Als bemerkenswert dürfen wohl die Resultate gelten, die wir bei Bestimmung des Arginingehaltes der Keimpflanzen von *Lupinus luteus* in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien erhielten. Wir fanden, daß die Argininbildung mit dem Eiweißzerfall, dessen Größe nach dem Eiweißverlust der Keimpflanzen beurteilt wurde, gleichen Schritt hielt. Offenbar erfolgt der Eiweißzerfall in diesen Keimpflanzen nicht in der Weise, daß zunächst intermediäre Produkte (Albumosen und peptonartige Stoffe) sich bilden und daß diese dann später langsam in die kristallinen Endprodukte der Spaltung übergehen, sondern es werden die Eiweißstoffe, bzw. die aus ihnen zuerst entstandenen Albumosen und Peptone schon vom Beginn der Keimung an rasch in jene kristallinen Endprodukte zerlegt.

Diese Beobachtungen geben noch eine Stütze für die von E. Schulze aus einer großen Anzahl von Tatsachen abgeleitete Schlußfolgerung, daß in den Keimpflanzen das Asparagin als ein sekundäres Produkt des Eiweißumsatzes auftritt. Die Bildung des Arginins, eines primären Eiweißzersetzungsproduktes, hält gleichen Schritt mit dem Eiweißzerfall; sie hört auf, wenn kein Eiweiß mehr zersetzt wird. Anders ist es mit dem Asparagin. Daß dieses Amid in manchen Fällen noch in starkem Maße sich bildet, wenn der Eiweißverlust der betreffenden Pflänzchen schon sein Ende erreicht hat, ist von E. Schulze schon vor längerer Zeit nachgewiesen worden.¹⁾

Den von E. Schulze in bezug auf die Asparaginbildung ausgesprochenen Schlußfolgerungen, die schon durch die Arbeit von G. Balicka-Iwanowska²⁾ eine Bestätigung erhalten haben,

¹⁾ Wir verweisen auf die von E. Schulze in dieser Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 64—67, sowie S. 94, gemachten Angaben.

²⁾ Diese Arbeit ist schon in unserer ersten Abhandlung auf S. 256 von uns zitiert worden.

hat vor kurzem auch D. Prianschnikow¹⁾ zugestimmt. Er stützt sich dabei auf die von ihm an Keimpflanzen gemachten Beobachtungen, insbesondere auf die Wahrnehmung, daß in den Pflänzchen die Asparaginbildung einen anderen Verlauf nimmt, als der Eiweißzerfall. Auch einige von E. Godlewski²⁾ beim Studium der intramolekularen Atmung der Pflanze gemachte Beobachtungen stehen im Einklang mit jenen Schlußfolgerungen.

Analytische Belege.

Wir geben im folgenden die analytischen Belege für die nach der Methode von Kjeldahl ausgeführten Stickstoffbestimmungen. Für eine jede Bestimmung wurde in der Regel 1 g des luftgetrockneten Materials verwendet. Wir geben in der nachfolgenden Tabelle nur die diesem Quantum entsprechende Trockensubstanzmenge an (für 2 Bestimmungen wurden etwas größere Substanzmengen verwendet).

A. Bestimmung des Gesamtstickstoffs.

	Angewendet	Gefunden	
	g Trockensubstanz	g N	% N
Samen, entschält	{ 0,8803	0,08294	9,42
	{ 0,8803	0,08264	9,38
6tägige Keimpflanzen	{ 1,0335	0,1051	10,45
	{ 1,0521	0,11065	10,50
11 „ „	0,9352	0,1025	10,95
15—16 „ „	{ 0,9219	0,10464	11,33
	{ 0,9219	0,10464	11,35

B. Bestimmung des Proteinstickstoffs nach Stutzers Methode.

	Angewendet	Gefunden	
	g Trockensubstanz	g N	% N
Samen, entschält	{ 0,8803	0,07617	8,65
	{ 0,8803	0,07603	8,63
6tägige Keimpflanzen	{ 0,9286	0,04088	4,40
	{ 0,9286	0,04167	4,47
	{ 0,9286	0,04128	4,44
11 „ „	{ 0,9352	0,02578	2,76
	{ 0,9352	0,02564	2,74
15—16 „ „	{ 0,9219	0,02065	2,24
	{ 0,9219	0,02065	2,24

¹⁾ Berichte der Deutsch. Bot. Gesellschaft, 1904, Bd. 22, S. 35.

²⁾ Anzeiger d. Akad. d. Wiss. in Krakau, 1904, 115.

Den für die vorstehenden Bestimmungen verwendeten Keimpflanzen hafteten kleine Quantitäten von Sand an, da der letztere sich durch Abspülen mit Wasser nicht ganz vollständig von den Pflänzchen entfernen läßt. Wir bestimmten den Sandgehalt der Pflänzchen nach bekannter Methode und berechneten sodann den Stickstoffgehalt der sandfreien Keimpflanzen-trocken-substanz. Dabei ergaben sich folgende Zahlen:

6 tägige Pflänzchen				10,72 %	Gesamtstickstoff u. 4,55 %				Proteinstickstoff
11	•			11,28 %	•	•	2,83 %	•	
15—16	•	•		11,67 %	•	•	2,30 %	•	