

Über den Tyrosingehalt der Keimpflanzen von *Lupinus albus*.

Von

E. Schulze und N. Castoro.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 29. Juni 1906.)

Über den Tyrosingehalt 2tägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus* hat R. Bertel¹⁾ Angaben gemacht, die mit unseren Beobachtungen nicht übereinstimmen. Dies ist schon in einer früher von uns publizierten Abhandlung²⁾ erwähnt worden; wir haben uns aber nicht mit den damals ausgeführten Versuchen begnügt, sondern später noch einige andere Keimpflanzenkulturen untersucht. Ehe wir die dabei erhaltenen Resultate mitteilen, müssen wir Bertels Angaben reproduzieren. Bertel fand bei der mikroskopischen Untersuchung 2tägiger Keimpflanzen der genannten *Lupinus*-Art in den Wurzeln Sphärite, die er nach ihrem Aussehen und Verhalten für Tyrosin erklärte; diese Sphärite vermehrten sich, wenn die Pflanzen mit Hilfe von Chloroform narkotisiert wurden. Bertel suchte nun die in dieser Form auftretende Substanz aus den Pflänzchen zur Abscheidung zu bringen. Dies gelang unter Anwendung eines einfachen Verfahrens; die von den Pflänzchen abgetrennten Wurzeln wurden zerrieben und mit Wasser gekocht,³⁾ der vom Ungelösten durch Filtration getrennte Auszug sodann bis auf $\frac{1}{4}$ seines Volumens eingeengt. Beim Erkalten schied sich ein aus Sphäriten bestehender weißer Niederschlag aus, der von Bertel für identisch mit der bei der mikroskopischen Unter-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. Botanischen Gesellschaft, 1902, Bd. XX, S. 454.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 226—227.

³⁾ Auf ca. 30 g frische Wurzeln wurden 200 ccm Wasser angewendet.

suchung der Würzelchen beobachteten Substanz und für Tyrosin erklärt wird. Dieses Produkt war stickstoffhaltig und gab mit Millonschem Reagens eine rote Lösung; es war löslich in kochendem Wasser und in Alkalien, löste sich aber nur schwierig in Säuren. Bertel bestimmte die Ausbeute an diesem Produkt, indem er ein abgewogenes Quantum der Wurzeln (ca. 30 g) in der beschriebenen Weise behandelte, den im Extrakt entstandenen Niederschlag sodann auf einem Asbestfilter sammelte und nach dem Trocknen wog. Er erhielt dabei folgende, auf das Frischgewicht der Wurzeln sich beziehende Zahlen:

Unchloroformierte Wurzeln lieferten	0,108%
Chloroformierte	0,132%
Chloroformierter Wurzelbrei lieferte	0,176%

Über den Trockensubstanzgehalt der von ihm untersuchten Wurzeln macht Bertel keine Angabe. Nach einer von uns ausgeführten Bestimmung enthalten die Wurzeln 2tägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus* nur 6,5% Trockensubstanz. Nehmen wir an, daß die von Bertel untersuchten Wurzeln den gleichen Trockensubstanzgehalt besaßen, so berechnet sich die von ihm erhaltene Ausbeute an dem beschriebenen Produkt für die unchloroformierten Wurzeln auf 1,67% der Trockensubstanz, für das chloroformierte Material auf 2,0—2,7%.

Wir haben unter Befolgung der von Bertel gegebenen Vorschrift zunächst mit den Wurzeln unchloroformierter 2tägiger Keimpflanzen Versuche angestellt. Die Ergebnisse der beiden ersten Versuche sind in der oben zitierten Abhandlung von uns schon mitgeteilt worden. Aus den nach Bertels Vorschrift hergestellten und bis auf $\frac{1}{4}$ des Volumens eingeeengten Extrakten schied sich beim Erkalten eine weiße Substanz aus, deren Quantität und deren Verhalten den von Bertel gemachten Angaben im wesentlichen entsprachen. Diese Substanz bestand aber in der Hauptsache nicht aus Tyrosin. Sie lieferte zwar beim Erhitzen mit Millonschem Reagens eine rote Lösung, aber sie gab weder die Piriasche noch die Mörnersche Tyrosinreaktion; auch verhielt sie sich beim Erhitzen mit Kupferhydroxyd ganz anders wie Tyrosin. Möglich ist, daß sie eine äußerst geringe Tyrosinmenge eingeschlossen hat, worauf

wir in unserer Abhandlung in der zweiten Anmerkung auf S. 227 schon hingewiesen haben.¹⁾

Wir haben später in der gleichen Weise noch mehrere Versuche angestellt; für dieselben dienten Keimpflanzen, die unter Verwendung anderer Samenmuster von *Lupinus albus* (aus einem anderen Jahrgange) gewonnen waren. Das Resultat war das gleiche; aus den in der beschriebenen Weise hergestellten Extrakten schied sich eine Substanz aus, welche vielleicht eine äußerst geringe Tyrosinmenge einschloß, aber doch in der Hauptsache nicht aus Tyrosin bestand. Das in diesen späteren Versuchen erhaltene Produkt gab sogar beim Erwärmen mit Millonschem Reagens nur eine schwach rotgefärbte Lösung; die von diesem Produkt abfiltrierte Flüssigkeit färbte sich mit dem genannten Reagens gar nicht. Die Quantität, in der wir dieses Produkt erhielten, war eine wechselnde; sie war in einigen Fällen größer, in anderen Fällen kleiner als die in den beiden ersten Versuchen erhaltene Substanzmenge.

Daß zweitägige Keimpflanzen von *Lupinus albus*, in denen erst ein kleiner Teil der Reserveproteinstoffe gespalten ist, nur sehr wenig Tyrosin enthalten, geht schon aus den früher von uns gemachten Beobachtungen hervor;²⁾ wir haben aber die bezüglichen Versuche später noch wiederholt und ergänzt. Ehe

¹⁾ Es kommt zuweilen vor, daß eine schwerlösliche Substanz, die aus einer Flüssigkeit sich ausscheidet, ein wenig Tyrosin mit niederreißt, falls letzteres sich, wenn auch nur in geringer Menge, in dieser Flüssigkeit vorfindet. So geht z. B. Tyrosin in die in einer solchen Flüssigkeit durch Mercurinitrat erzeugten Niederschläge partiell ein, obgleich es in reiner Lösung durch dieses Reagens nicht gefällt wird. Noch ein anderes Beispiel können wir hier anführen: Das von E. Schulze und J. Barbieri aus jungen Pflänzchen von *Lupinus luteus* dargestellte Glukosid, welches zuerst Lupinin, später Lupinid genannt worden ist, gab vor dem Umkrystallisieren beim Erhitzen mit Millonschem Reagens eine schwach rotgefärbte Flüssigkeit, als ob es ein wenig Tyrosin enthielte (bei dem durch Umkrystallisieren gereinigten Glukosid trat dies nicht mehr ein). Es ist hier aber noch darauf aufmerksam zu machen, daß das Eintreten der Reaktion mit Millonschem Reagens für sich allein keinen sicheren Beweis für das Vorhandensein von Tyrosin liefert; denn bekanntlich gehen auch noch andere hydroxylierte Benzolderivate die gleiche Reaktion.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 225—226.

wir die dabei erhaltenen Resultate mitteilen, wollen wir einige Angaben über den Weg machen, den man zur Abscheidung von Tyrosin aus den Keimpflanzen einschlagen kann. Man kann in zweierlei Weise verfahren. Wenn man die getrockneten, fein zerriebenen Keimpflanzen mit kochendem 90—92^o/_oigem Weingeist behandelt,¹⁾ so geht neben vielen anderen Bestandteilen der Pflänzchen auch das Tyrosin, vielleicht aber nicht vollständig, in Lösung. Bei Verarbeitung des weingeistigen Extrakts in der früher wiederholt beschriebenen Weise erhält man eine Flüssigkeit, aus welcher nach genügendem Einengen neben anderen Aminosäuren (Leucin, Phenylalanin etc.) das Tyrosin sich ausscheidet. Da letzteres bekanntlich in kaltem Wasser sehr schwer löslich ist und sich auch in einem heißen Gemisch von absolutem Alkohol mit etwas Ammoniakflüssigkeit nur schwierig auflöst, so läßt es sich von den anderen Aminosäuren ziemlich leicht, wenn auch nicht ohne Verlust trennen. Man kann aber auch behufs Abscheidung des Tyrosins ein mit heißem Wasser dargestelltes Extrakt aus frischen oder aus getrockneten Keimpflanzen mit Mercurinitrat versetzen, nachdem zuvor die durch Bleiessig fällbaren Stoffe entfernt sind; zerlegt man den mit Wasser gut ausgewaschenen Mercurinitratniederschlag durch Schwefelwasserstoff, neutralisiert die vom Schwefelquecksilber abfiltrirte Flüssigkeit mit Ammoniak und dunstet sie sodann im Wasserbade bis auf ein geringes Volumen ein, so krystallisiert beim Erkalten Tyrosin aus. Zu bemerken ist, daß man bei Anwendung dieser, in unserem Laboratorium sehr häufig benutzten Methode nur einen Teil des im Untersuchungsobjekt enthaltenen Tyrosins gewinnt, da eine vollständige Ausfällung des Tyrosins durch das Mercurinitrat nicht stattfindet; zweckmäßig ist es, nach dem Zusatz des Mercurinitrats die

¹⁾ Obwohl reines Tyrosin in Alkohol sehr wenig löslich ist, so kann man diese Aminosäure doch durch Kochen mit 90—92^o/_oigem Weingeist aus den fein zerriebenen Keimpflanzen ausziehen, wenn auch wohl nicht vollständig. Das gleiche gilt für Leucin und ähnliche Aminosäuren, die in reinem Zustande ebenfalls in Weingeist sehr schwer löslich sind. Auf die Leichtlöslichkeit von unreinem Leucin in heißem Weingeist hat Hoppe-Seyler schon vor langer Zeit in seinem Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse aufmerksam gemacht.

Acidität der Flüssigkeit durch Natronlauge oder Natriumcarbonat abzustumpfen und den Niederschlag erst nach mehrtägigem Stehen abzufiltrieren. Ob die bei Zerlegung dieses Niederschlags resultierende Lösung tyrosinhaltig ist oder nicht, läßt sich leicht feststellen, indem man eine Probe derselben mit Millonschem Reagens erhitzt. Zu beachten ist dabei, daß diese Lösung wegen ihres Asparagingehalts mit dem genannten Reagens einen Niederschlag gibt; dies hindert jedoch den Nachweis des Tyrosins nicht. Man kann jenen Niederschlag abfiltrieren und sodann das Filtrat erhitzen; letzteres färbt sich rot, falls Tyrosin vorhanden ist. Man kann aber auch die unfiltrierte Flüssigkeit erhitzen und sodann den Niederschlag sich absetzen lassen; die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit läßt dann an ihrer Färbung erkennen, ob Tyrosin vorhanden ist oder nicht.

Aus 2-tägigen Keimpflanzen von *Lupinus albus* vermochten wir weder nach dem ersten noch nach dem zweiten Verfahren Tyrosin zu isolieren. Dieses Ergebnis entspricht der Tatsache, daß in solchen Keimpflanzen erst ein sehr kleiner Teil der Reserveproteinstoffe zerfallen ist;¹⁾ es kann sich also in denselben erst eine sehr geringe Tyrosinmenge aus Proteinstoffen gebildet haben.²⁾ Aus 4-tägigen Keimpflanzen der gleichen *Lupinus*art konnten wir dagegen unter Anwendung des zuerst beschriebenen Verfahrens, ein wenig Tyrosin isolieren. Noch leichter gelang dies bei 6—7-tägigen Pflänzchen.³⁾ Das Tyrosin fand sich in den Kotyledonen solcher Pflänzchen vor; aus dem hypokotylen Glied und aus den Wurzeln haben wir diese Aminosäure niemals darstellen können. Dieser Befund entspricht der Annahme, daß das Tyrosin, während es den im Wachstum begriffenen Pflanzenteilen zuströmt, dem Abbau unterliegt.

Daß die Wurzeln 2-tägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus* sehr arm an Tyrosin sind, läßt sich in sehr einfacher Weise zeigen. Wenn man die frischen Wurzeln zerreibt, den Brei unter Zusatz von etwas Wasser und einiger Tropfen Essigsäure bis fast zum

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 226.

²⁾ Diese Schlußfolgerung läßt sich ziehen, obwohl aus Eiweißstoffen das Tyrosin durch Enzyme zuweilen früher abgespalten wird, als andere Komplexe.

³⁾ Wie früher von uns nachgewiesen.

Kochen erhitzt, die Masse sodann aufs Filter bringt und eine Probe des Filtrats mit Millonschem Reagens erhitzt, so sieht man, daß diese Flüssigkeit sich nur ganz schwach gelblich färbt;¹⁾ die Tyrosinreaktion tritt also nicht ein. Daß man aber auf diesem Wege etwa vorhandenes Tyrosin erkennen kann, läßt sich leicht nachweisen, indem man dem Wurzelbrei eine kleine Quantität von Tyrosin zusetzt. Als wir dem Wurzelbrei die Hälfte der Tyrosinmenge zusetzten, die nach Bertels Angaben in den Wurzeln solcher Keimpflanzen enthalten sein soll und denselben sodann in der angegebenen Weise behandelten, erhielten wir eine stark rot gefärbte Flüssigkeit.

Unsere Versuchsergebnisse stehen also im Widerspruch mit den Angaben, die von Bertel über den Tyrosingehalt der Wurzeln zweitägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus* gemacht worden sind. Wenn man nicht annehmen will, daß die von Bertel untersuchten Pflänzchen eine andere chemische Zusammensetzung gehabt haben als die unsrigen — eine Annahme, die doch von vornherein für unwahrscheinlich erklärt werden muß —, so müssen wir zu der Schlußfolgerung kommen, daß Bertel eine Substanz, die nicht Tyrosin war, aber vielleicht eine äußerst geringe Quantität dieser Aminosäure einschloß, für Tyrosin gehalten hat. Für die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung scheint auch die Angabe Bertels, daß diese Substanz sich nur schwierig in Säuren löste, zu sprechen. Denn bekanntlich löst sich Tyrosin sehr leicht in verdünnten Mineralsäuren (Salpeter-, Schwefel- oder Salzsäure). Das von Bertel erhaltene Produkt, welches sich nur schwierig in Säuren löste, kann also nicht Tyrosin gewesen sein — es müßte denn sein, daß Bertel irgend welche schwache organische Säuren für die bezüglichen Versuche verwendet hätte.

¹⁾ Einen durch das Millonsche Reagens hervorgebrachten Niederschlag kann man durch Filtration entfernen, ehe man die Flüssigkeit erhitzt; man kann aber auch die unfiltrierte Flüssigkeit erhitzen und sodann den Niederschlag sich absetzen lassen; dann läßt sich erkennen, ob die Flüssigkeit sich gefärbt hat. Wir haben bei Anstellung der Reaktion stets beide Verfahren nebeneinander angewendet. Ein geringer Eiweißgehalt der Extrakte bringt beim Anstellen dieser Proben keine wesentliche Störung hervor.

Nach Bertels Angabe tritt eine rasche Steigerung des Tyrosingehaltes der Keimpflanzen oder der von letzteren abgetrennten Wurzeln ein, wenn man dieselben mit Hilfe von Chloroform narkotisiert. Zu dieser Angabe ist zu bemerken, daß in den chloroformierten Pflänzchen eine Zunahme der Tyrosinmenge zu erwarten ist, weil die Wirksamkeit des in ihnen sich vorfindenden proteolytischen Enzyms durch das Chloroformieren nicht gehemmt wird; doch kann diese Zunahme nur eine langsame sein. Wenn der Tyrosingehalt, wie Bertel es angibt, infolge des Chloroformierens eine rasche Steigerung erfährt, so muß dies wohl auf eine andere Ursache, als auf die Spaltung der Eiweißstoffe durch ein proteolytisches Enzym, zurückgeführt werden.¹⁾

In den von uns ausgeführten Versuchen konnten wir aber von einer plötzlichen Steigerung der Tyrosinmenge in chloroformierten Pflänzchen nichts bemerken. Wir stellten zunächst folgenden Versuch an: ein größeres Quantum 2—2 $\frac{1}{2}$ tägiger Keimpflanzen von *Lupinus albus* wurde in Chloroformwasser eingetragen und 24 Stunden lang damit in Berührung gelassen. Dann nahmen wir die Pflänzchen heraus und schnitten von ihnen die Wurzeln ab, jedoch in solcher Weise, daß mit jeder Wurzel noch ein kleiner Teil des hypokotylen Gliedes verbunden blieb. Die Kotyledonen wurden bei 75° getrocknet und sodann sehr fein zerrieben. Wir extrahierten 187 g des lufttrocknen Pulvers mit kochendem 90%igem Weingeist; das Extrakt verarbeiteten wir in der früher oft schon beschriebenen Weise auf Aminosäuren. Wir erhielten von letzteren nur ein sehr kleines Quantum. Als dieses Produkt mit einem Gemisch von Alkohol und Ammoniakflüssigkeit kurze Zeit im Wasserbade mäßig erwärmt wurde, blieb ein Teil desselben ungelöst; dieser Rest gab mit Millonschem Reagens Tyrosinreaktion. Er wurde zur Entfernung von noch beigemengtem Leucin mit kaltem Wasser behandelt. Dabei blieb ein Rückstand, der das Verhalten des Tyrosins zeigte; seine Quantität betrug nur 1,5 mg oder ungefähr 0,001% des lufttrocknen Ausgangsmaterials. Gesetzt auch, daß die Abscheidung des Tyrosins mit beträchtlichem Ver-

¹⁾ Wie es auch Czapek (Ergebnisse der Physiologie, Bd. II, 1, S. 665) annimmt.

lust verbunden war, so läßt sich doch aus dem Versuchsergebnis schließen, daß die chloroformierten Kotyledonen nur eine äußerst geringe Tyrosinmenge enthielten.

Die unteren Teile der Pflänzchen (Wurzel und Teil des hypokotylen Gliedes) wurden zerrieben, der Brei unter Zusatz von dem gleichen Gewicht an Wasser bis auf ca. 90° erhitzt. Die vom Ungelösten abfiltrierte Flüssigkeit zeigte nach dem Erhitzen mit Millonschem Reagens keine deutliche Rötung und konnte also nur eine minimale Quantität von Tyrosin einschließen. Sie wurde nach Entfernung der durch Bleiessig fällbaren Substanzen mit Mercurinitrat versetzt; der dabei entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, ausgewaschen und sodann mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Flüssigkeit lieferte, als sie mit Ammoniak neutralisiert und sodann im Wasserbade stark eingeeengt worden war, auch bei längerem Stehen keine Ausscheidung von Tyrosin. Beim Erhitzen mit Millonschem Reagens färbte sich diese Flüssigkeit rot, woraus man wohl schließen darf, daß sie eine äußerst geringe Tyrosinmenge einschloß. Wir stellten ferner noch folgende Versuche an: a) 12 g Wurzeln von 2— $2\frac{1}{2}$ tägigen Keimpflanzen wurden zerrieben, der Brei unter Zusatz von 10 ccm Wasser und etwas Chloroform in ein kleines Becherglas gebracht, letzteres mit einem Uhrglase bedeckt. Nach 24 Stunden erhitzten wir das Becherglas mit seinem Inhalte im Wasserbade auf 90 — 95° unter Zusatz einiger Tropfen von Essigsäure, trennten die Flüssigkeit vom Ungelösten und erhitzten eine Probe derselben mit Millonschem Reagens. Die Flüssigkeit färbte sich dabei nur gelblich; eine auf das Vorhandensein von Tyrosin hindeutende Rotfärbung derselben war nicht zu bemerken. b) In einem zweiten Versuche, für welchen ebenfalls 12 g Wurzeln verwendet wurden, verfahren wir in der gleichen Weise, nur mit dem Unterschiede, daß wir den mit Chloroform versetzten Wurzelbrei 48 Stunden lang stehen ließen. Das Resultat war das gleiche wie im ersten Versuch. c) 12 g Wurzeln wurden unzerrieben mit etwas Chloroform in ein kleines Becherglas gebracht. Nach 30 stündigem Stehen wurden sie zerrieben; der Brei wurde so behandelt, wie bei Versuch a) angegeben worden ist.

Auch in diesem Falle gab die vom Ungelösten getrennte Flüssigkeit mit Millonschem Reagens keine deutliche Tyrosinreaktion. Dagegen trat diese Reaktion deutlich ein, wenn dem Wurzelbrei ein wenig Tyrosin zugesetzt wurde; schon ein Zusatz von 0,005 g Tyrosin zu 12 g Wurzeln genügte, um diesen Effekt hervorzubringen.

Wir vermochten also nicht nachzuweisen, daß infolge des Chloroformierens der Tyrosingehalt der Wurzeln zunahm. In den chloroformierten Kotyledonen schien die Quantität des Tyrosins zwar größer zu sein; doch war, wie aus den von uns gemachten Angaben zu ersehen ist, nur eine äußerst geringe Steigerung des Tyrosingehaltes nachzuweisen. Zu dem gleichen Resultat führten auch folgende Versuche: Ein Quantum von 12 g Kotyledonen 2—2½ tägiger Keimpflanzen wurde zerrieben, der Brei unter Zusatz von 10 ccm Wasser und etwas Chloroform in einem bedeckten Bechergläse 30 Stunden lang stehen gelassen; dann erhitzen wir den Brei im Wasserbade unter Zusatz einiger Tropfen Essigsäure, trennten die Flüssigkeit vom Ungelösten und erhitzen eine Probe derselben mit Millonschem Reagens. Die Flüssigkeit nahm nur eine sehr schwache rötliche Färbung an; letztere war kaum stärker als diejenige, die wir bei gleicher Behandlung nicht chloroformierter Kotyledonen erhielten. In einem zweiten Versuche wurden nicht zerriebene Kotyledonen mit Chloroform in einem Bechergläschen stehen gelassen; nach 30 Stunden wurden sie zerrieben und nun in der schon beschriebenen Weise behandelt. Das Resultat war das gleiche wie in dem ersten Versuche.

Eine rasche Steigerung des Tyrosingehaltes der Keimpflanzen infolge des Chloroformierens haben wir also nicht nachzuweisen vermocht. Unsere Beobachtungen geben keinerlei Anhaltspunkte für die Annahme, daß das in den Keimpflanzen auftretende Tyrosin eine andere Quelle hat, als den Eiweißabbau. Wir haben Tyrosin nur aus den Cotyledonen, niemals aber aus dem hypokotylen Glied und der Wurzel der Keimpflanzen isolieren können. Das Verfahren, dessen sich Bertel bediente, um den Tyrosingehalt der chloroformierten und nicht chloroformierten Wurzeln zu bestimmen, müssen wir auf Grund der von uns gemachten Beobachtungen für völlig unbrauchbar erklären.
