

Ein Beitrag zur Kenntnis der Veränderungen, welche die stickstoffhaltigen Bestandteile grüner Pflanzen infolge von Lichtabschluß erleiden.

Von
A. Kiesel.

(Aus dem agritektur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 13. August 1906.)

Daß in grünen Pflanzen und Pflanzenteilen, denen das Licht entzogen wird, eine Anhäufung von Asparagin stattfindet, wurde schon im Jahre 1878 von Borodin¹⁾ gefunden. Später wiesen E. Schulze und E. Bosshard²⁾ nach, daß diese Asparaginanhäufung bei gleichzeitigem Eiweißzerfall sehr rasch erfolgt; sie wurde sowohl durch Bestimmungen nach Sachsse's Methode als auch durch Wägung der aus den Extrakten durch Fällung mit Mercurinitrat gewonnenen Asparaginnengen nachgewiesen. Aus jungen, dicht über dem Boden abgeschnittenen Rothklee-, Hafer- und Graspflanzen, die mit den unteren Enden in Wasser gesteckt und eine Woche lang in einem verdunkelten Zimmer gelassen worden waren, konnte auf dem angegebenen Wege leicht Asparagin in beträchtlicher Quantität dargestellt werden,³⁾ während die frischen, nicht verdunkelten Pflanzen bei gleicher Behandlung Asparagin entweder gar nicht, oder doch nur in ganz unbedeutender Menge lieferten.⁴⁾ Übereinstimmende Resultate erhielten später auch E. Schulze und

¹⁾ Botanische Zeitung, 1878, S. 802.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. IX (1885), S. 452.

³⁾ Aus 900 g frischen Haferpflanzen wurden 3,1 g, aus 800 g frischen Rotkleepflanzen 1,7 g Asparagin in Krystallen erhalten.

⁴⁾ 1 kg frischer Rotkleepflanzen lieferte nur 0,25 g Asparagin; aus dem Hafer und dem Gras ließ sich kein Asparagin gewinnen.

E. Kisser¹⁾ an nicht abgeschnittenen, noch im Boden wurzelnden Haferpflanzen, sogar bei kürzerer, nämlich nur 3tägiger Dauer der Verdunkelung.

In neuerer Zeit führte W. Butkewitsch²⁾ in der gleichen Weise an Leguminosenpflanzen Versuche aus, in denen auch eine Veränderung des Aminosäuregehalts der Pflanzen zu Tage trat. Butkewitsch konstatierte das stetige Anwachsen der Asparaginmenge während der Verdunkelung und fand zugleich, daß die Aminosäuremenge im Anfang der Verdunkelung anstieg, später aber sich wieder verringerte. Diese Veränderungen waren von stets fortschreitendem Eiweißzerfall begleitet: der Eiweißzerfall reichte aber für sich allein später nicht hin, um die neu gebildete Asparaginmenge zu decken, sodaß letztere teilweise auf Kosten anderer Produkte stattgefunden haben muß. Die von Butkewitsch gemachten Befunde bestätigen also die von E. Schulze zuerst ausgesprochene Ansicht über die sekundäre Asparaginbildung.

Was die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verbindungen anbelangt, so hat Butkewitsch nur in einem Versuche den Stickstoff in dieser Fällung quantitativ bestimmt, wobei er folgende Resultate erhielt:

Vor der Verdunkelung	Dauer der Verdunkelung		
	3 Tage	6 Tage	9 Tage
0,10%	0,13%	0,14%	0,12%

Aus diesen Zahlen ist zu schließen, daß die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffverbindungen sich ähnlich den Aminosäuren verhalten; ihre Menge nimmt anfangs zu, später aber wieder ab. Allerdings zeigen die bei den quantitativen Bestimmungen erhaltenen Zahlen nur relativ geringe Unterschiede.

Auf Vorschlag von Professor E. Schulze stellte ich einige Versuche an, deren Hauptzweck die Entscheidung der Frage war, ob die in verdunkelten Pflanzen vorgehenden Verände-

¹⁾ Landwirtschaftl. Versuchsstationen, 1889, Bd. XXXVI, S. 1.

²⁾ Die regressive Metamorphose der Eiweißstoffe in höheren Pflanzen und die Beteiligung eines proteolytischen Ferments bei derselben (Russisch), 1904, Moskau.

rungen der stickstoffhaltigen Bestandteile mit einer Bildung von Hexonbasen verbunden sind. Zum Vergleich mit den frischen Pflanzen untersuchte ich Pflanzen, die sich nur wenige Tage in einem verdunkelten Raume befunden hatten; denn man durfte annehmen, daß während der Verdunkelung anfangs eine Zunahme, dann aber wieder eine Abnahme der genannten Basen erfolgen werde. Zugleich untersuchte ich auch die Pflanzen vor und nach der Verdunkelung auf Aminosäuren. Die Methoden, die ich zur Abscheidung und Isolierung der genannten Stickstoffverbindungen anwendete, waren diejenigen, deren man sich bei ähnlichen Untersuchungen im oben genannten Laboratorium bedient hat. Endlich habe ich auch noch quantitativ zu bestimmen gesucht, wie groß die den verschiedenen Stoffgruppen angehörenden Stickstoffmengen waren.

Als Versuchsobjekte verwendete ich junge, dem Felde entnommene, dicht über dem Boden abgeschnittene Pflanzen von Rotklee (*Trifolium pratense*), die eine Länge von 30—35 cm besaßen. Sie wurden in 2 Portionen geteilt, von denen die eine (Portion I) sofort verarbeitet wurde. Die andere (Portion II) wurde mit den abgeschnittenen Stengeln in Wasser gesteckt und sodann 65 Stunden lang in einem verdunkelten Raume gelassen (das Wasser wurde an jedem Tage durch frisches ersetzt). Nach Beendigung des Versuches hatten die Pflanzen ein vollkommen frisches Aussehen.

Von jeder Portion wurde ein Teil frisch verarbeitet, der andere vor der Untersuchung im Trockenschranke entwässert. Von dem letzteren wurde der größere Teil auf Aminosäuren verarbeitet; der kleinere Teil diente zur Ausführung quantitativer Bestimmungen.

A. Untersuchung der Rotkleepflanzen auf Basen.

Zunächst teile ich die Resultate mit, die bei Untersuchung der frischen, nicht verdunkelten Pflanzen erhalten wurden. Von diesem Material wurden 5 kg¹⁾ mit heißem Wasser be-

¹⁾ 100 Teile der frischen Pflanzen lieferten 14,7% lufttrockene Substanz.

handelt, das Extrakt von den durch Bleiessig fällbaren Substanzen befreit, sodann mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure versetzt. Den durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschlag verarbeitete ich in bekannter Weise.¹⁾ Die bei Zerlegung des Niederschlages erhaltene, mit Salpetersäure neutralisierte Basenlösung gab mit Silbernitrat eine ziemlich starke Fällung, aus welcher Alloxurbasen erhalten wurden. Letztere gaben mit Salzsäure in Nadeln krystallisierende Verbindungen. Die Quantität derselben war nicht so groß, daß sich feststellen ließ, welche Glieder der vorhandenen Stoffgruppe vorhanden waren: ihre Lösung gab mit Silbernitrat eine in Ammoniakflüssigkeit unlösliche Fällung. Histidin, Arginin und Lysin konnten in der bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltenen Basenlösung nicht nachgewiesen werden: auch die Prüfung auf Guanidin gab ein negatives Resultat.

Von den Pflanzen, die während eines Zeitraumes von 65 Stunden sich in einem verdunkelten Raume befunden hatten, wurden 4 kg in der gleichen Weise auf Basen untersucht. Auch hier konnten in der bei Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltenen Lösung Alloxurbasen nachgewiesen werden: doch schien ihre Quantität geringer zu sein, als bei den nicht verdunkelten Pflanzen. Aus dem durch Silbernitrat und Barytwasser hervorgebrachten Niederschlage suchte ich Histidin und Arginin zu isolieren. Die Histidinfraktion des Niederschlages wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt: aus der dabei erhaltenen Lösung suchte ich das Histidin durch Fällung mit Quecksilbersulfat reiner zu gewinnen. Bei Verarbeitung des Niederschlages erhielt ich in kleiner Menge Krystalle, welche salzsaures Histidin zu sein schienen (die Base gab Fällung mit ammoniakalischem Silbernitrat): doch reichte die Quantität der Krystalle zur sicheren Identifizierung nicht hin. Dagegen gelang der Nachweis von Arginin. Letzteres wurde in das Nitrat übergeführt: das Gewicht des Rohproduktes betrug 1,5 g. Ich stellte daraus nach bekanntem Verfahren Argininkupferni-

¹⁾ Ich verweise auf die Angaben, die in der von E. Schulze in Bd. XLVIII dieser Zeitschrift veröffentlichten Abhandlung sich finden.

trat dar. Diese Verbindung krystallisierte in der charakteristischen Form; die Krystalle schmolzen bei 111—113°. Das daraus dargestellte Nitrat gab die Argininreaktionen.

Aus der vom Argininsilber abfiltrierten Flüssigkeit suchte ich Lysin darzustellen; doch gelang es nicht, diese Base in einer zu ihrer Identifizierung genügenden Quantität zu isolieren.

Wie aus den im vorigen gemachten Angaben zu ersehen ist, konnte sicher nachgewiesen werden, daß in den Rotklee-pflanzen während der Verdunkelung Arginin sich bildete. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit der vor kurzem von E. Schulze¹⁾ veröffentlichten Beobachtung, daß eine Bildung von Arginin in Pflanzen von *Medicago sativa*, die 2 Tage lang der Verdunkelung ausgesetzt worden waren, sich nachweisen ließ.

Aus den weiter unten mitgeteilten Zahlen ist zu ersehen, daß während der Verdunkelung die Quantität der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffverbindungen in den Pflanzen zugenommen hatte.

B. Untersuchung der Rotkleepflanzen auf Aminosäuren.

Ich teile zuerst die Resultate mit, die ich bei Untersuchung der nicht verdunkelten Pflanzen erhielt. Von diesem Material wurden 5,9 kg getrocknet, die dabei erhaltene lufttrockene Masse, deren Gewicht 870 g betrug, fein zerrieben und sodann mit kochendem ca. 92%igem Alkohol extrahiert; das Extrakt verarbeitete ich in früher beschriebener Weise²⁾ auf Aminosäuren. Ich erhielt eine nicht bedeutende Quantität eines Produktes, welches das Aussehen und Verhalten von unreinem Leucin bzw. Aminovaleriansäure zeigte. Dieses Produkt wurde aus einem Gemisch von Alkohol und Ammoniakflüssigkeit umkrystallisiert; dann führte ich die Säuren in Kupferverbindungen über. Letztere lösten sich größtenteils in Methylalkohol; es schien also vorzugsweise Aminovaleriansäure vorhanden zu sein, doch kann neben letzterer auch Isoleucin sich vorgefunden haben. Der in Methylalkohol unlösliche Teil der Kupferverbindungen gab bei der

¹⁾ Landwirtschaftliche Jahrbücher, Bd. XXXV, S. 655.

²⁾ Ich verweise auf die Abhandlungen E. Schulzes.

Zerlegung durch Schwefelwasserstoff ein Produkt, das wahrscheinlich Leucin war. Doch gab seine wässrige Lösung beim Erhitzen mit Kupferacetat nur eine schwache Fällung. Der Gehalt der nicht verdunkelten Pflanzen an Leucin ist demnach jedenfalls nur ein geringer gewesen.

Von den Pflanzen, die der Verdunkelung ausgesetzt worden waren, verarbeitete ich in der gleichen Weise 525 g lufttrockenes Material, erhalten aus 3,75 kg frischer Pflanzen. Ich erhielt in diesem Falle trotz der Anwendung einer geringeren Materialmenge eine größere Quantität von Aminosäuren. Letztere wurden nach dem Umkrystallisieren in Kupferverbindungen übergeführt. Ein Teil dieser Kupferverbindungen löste sich in Methylalkohol; die daraus wiedergewonnene Aminosäure verhielt sich gegen Kupferacetat wie Aminovaleriansäure. Der in Methylalkohol unlösliche Teil der Kupferverbindungen gab bei der Zerlegung durch Schwefelwasserstoff ein Produkt, welches das Verhalten des Leucins zeigte. Beim Erhitzen im Glasröhrchen gab es ein weißes wolliges Sublimat: seine wässrige Lösung gab beim Erhitzen mit Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende Ausscheidung. Sodann wurde noch konstatiert, daß dieses Produkt sich in einer gesättigten wässrigen Leucinlösung nicht löste.

Diese Versuchsergebnisse führen zu der Schlußfolgerung, daß in den Rotkleepflanzen während der Verdunkelung die Aminosäuren an Menge zugenommen hatten und daß insbesondere eine Vermehrung des Leucins eingetreten war.

C. Quantitative Bestimmungen.

Bei Ausführung der Analyse wurden sowohl in den nicht der Verdunkelung ausgesetzten, wie in den verdunkelten Pflanzen (Portion I und Portion II) neben dem Gesamtstickstoff die den Eiweißstoffen angehörende Stickstoffmenge nach Stutzers Methode, der Asparaginstickstoff nach Sachsses Methode und die im Phosphorwolframsäureniederschlage enthaltene Stickstoffmenge bestimmt. Die dabei erhaltenen Zahlen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt, angegeben sowohl in Prozenten der lufttrockenen Pflanzensubstanz, als des Gesamtstickstoffs.

	I. Portion		II. Portion	
	% der luft-trockenen Substanz	% des Gesamt-N's	% der luft-trockenen Substanz	% des Gesamt-N's
Gesamtstickstoff	2,97	100,0	3,06	100,0
Eiweißstickstoff	2,11	71,0	2,00	65,6
N im Phosphorwolframsäure-niederschlag	0,16	5,3	0,21	7,0
Asparaginstickstoff	0,31	10,3	0,41	13,4
N in anderen Verbindungen . (Diff.)	0,39	13,1	0,43	14,1

Subtrahiert man vom «Gesamtstickstoff» den «Eiweißstickstoff», so ergibt sich die im ganzen auf nicht eiweißartige Verbindungen fallende Stickstoffmenge; sie beträgt bei Portion I 0,86 % oder 29,0 % des Gesamtstickstoffs, bei Portion II 1,05 % oder 34,4 % des Gesamtstickstoffs. Während des Verweilens der Pflanzen in einem verdunkelten-Raum hat sich also ihr Gehalt an nicht eiweißartigen Stickstoffverbindungen vergrößert: daß die Zunahme keine sehr starke gewesen ist, erklärt sich daraus, daß die Verdunkelung nur 65 Stunden dauerte. Sodann ist aus den obigen Zahlen zu ersehen, daß sowohl das Asparagin, als auch die in die Phosphorwolframsäureniederschläge eingehende Stickstoffmenge während der Verdunkelung zugenommen haben. Eine Zunahme zeigt auch die aus der Differenz berechnete Stickstoffmenge, die den bei der Analyse nicht bestimm- baren Verbindungen angehörte; die betreffenden Zahlen schließen auch den Aminosäurenstickstoff ein.

Zum Schlusse spreche ich Herrn Professor E. Schulze für die Unterstützung, die er mir bei Ausführung dieser Arbeit gewährte, meinen verbindlichsten Dank aus.

Analytische Belege.

Beim Abdestillieren des Ammoniaks wurden in der Regel 10 ccm halbnormale Salzsäure, in einigen Fällen (bei den As-

paraginbestimmungen) 10 ccm halbnormale Schwefelsäure vorgelegt. Diesen 10 ccm Säure entsprachen 44,65 ccm der zum Titrieren verwendeten Natronlauge. In der zweiten Vertikalkolumne der nachfolgenden Tabelle gebe ich die Kubikzentimeter Natronlauge an, die den durch das überdestillierte Ammoniak gesättigten Säurequantitäten entsprechen. Die Stickstoffmengen, welche bei Ausführung der Asparaginbestimmungen in den mit Salzsäure gekochten Extrakten in Ammoniakform vorgefunden wurden, bezeichne ich in der Tabelle als «Amidostickstoff + Ammoniakstickstoff». Subtrahiert man davon den Ammoniakstickstoff, so bleibt die aus dem Asparagin in Ammoniakform abgespaltene Stickstoffmenge übrig: letztere muß bekanntlich verdoppelt werden, um den «Asparaginstickstoff» zu erhalten.

I. Portion.

	Angewendete luft-trockene Substanz g	Natron-lauge ccm	Stickstoff gefunden			
			in g	in ‰	Mittel ‰	in ‰ des N's
Gesamtstickstoff	1,7106	32,26	0,05072	2,965	2,976	100,0
	2,0997	39,88	0,06270	2,986		
Eiweißstickstoff	1,9107	25,70	0,04040	2,114	2,115	71,0
	1,9791	26,65	0,04190	2,117		
Stickstoff im Phosphor-wolframsäureniederschlage	5,0913	5,29	0,008317	0,163	0,158	5,3
	5,0913	4,99	0,007845	0,154		
Ammoniakstickstoff	4,2863	1,10	0,001729	0,040	0,042	1,4
	5,5628	1,55	0,002437	0,044		
+ Amidostickstoff + Ammoniakstickstoff	4,8332	5,85	0,009197	0,193	0,195	—
	4,8332	6,02	0,009465	0,196		
	4,9655	6,19	0,009732	0,196		
Amidostickstoff	—	—	—	—	0,153	—
Asparagin-N nach Sachsse	—	—	—	—	0,306	10,3

II. Portion.

	Luft- trockene Substanz in g	Natron- lauge ccm:	Stickstoff gefunden			
			in g	in ‰	Mittel ‰	in ‰ des N's
Gesamtstickstoff	1,6889	33,05	0,05196	3,077	3,058	100,0
	2,0595	39,87	0,06268	3,043		
	1,8169	35,29	0,0555	3,054		
Eiweißstickstoff	2,2167	28,13	0,04423	1,995	2,006	65,6
	2,0112	25,79	0,04055	2,016		
Stickstoff im Phosphor- wolframsäureniederschlage	5,1794	7,18	0,011289	0,218	0,213	7,0
	5,1794	6,81	0,010707	0,207		
Ammoniakstickstoff	5,3148	2,20	0,003459	0,065	0,066	2,1
	5,9019	2,51	0,003946	0,067		
+ Amidostickstoff Ammoniakstickstoff	5,1236	8,55	0,013442	0,262	0,271	—
	5,1236	8,64	0,013584	0,265		
	5,5533	10,02	0,015754	0,284		
Amidostickstoff	—	—	—	—	0,205	—
Asparagin-N nach Sachsse	—	—	—	—	0,410	13,4