

Ist die bei Luftzutritt eintretende Dunkelfärbung des Rübensaftes durch einen Tyrosin- und Homogentisinsäuregehalt dieses Saftes bedingt?

Von
E. Schulze.

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

(Der Redaktion zugegangen am 12. Januar 1907.)

Wenn man die Wurzeln einer Zuckerrübe oder Runkelrübe (*Beta vulgaris*) zerreibt und den Brei an der Luft stehen läßt, so färbt sich derselbe bekanntlich binnen kurzer Zeit rot; die Färbung wird nach und nach dunkler und geht schließlich in schwarz über. Ganz ähnlich verhält sich der durch Auspressen des Breies gewonnene Saft. Es ist leicht zu konstatieren, daß die Luft an diesem Vorgange sich beteiligt; wenn man einen mit dem frischen Saft gefüllten Zylinder mit einem Stöpsel luftdicht verschließt, so hält sich der Saft darin ohne Veränderung, oder färbt sich nur sehr schwach. Öffnet man den Zylinder, so färbt sich die oberste Schicht des Saftes bald dunkel. Die Färbung verbreitet sich nach und nach von oben her auf die tieferen Schichten, bis schließlich die ganze Flüssigkeit schwarz geworden ist.

Erhitzt man den frischen Saft bis zum Koagulieren der Eiweißstoffe, so nimmt man ihm dadurch die Fähigkeit, sich an der Luft zu färben. Das gleiche Ziel kann man erreichen, indem man eine Rübe in Stücke schneidet und letztere eine Zeitlang in kochendem Wasser liegen läßt; der durch Zerreiben dieser Stücke dargestellte Brei färbt sich dann nicht an der Luft. ¹⁾

¹⁾ Es ist bemerkenswert, daß eine durchschnittene Rübenwurzel sich auch bei längerem Liegen an der Luft auf der Schnittfläche nicht färbt. Man hat dies zu erklären versucht, indem man annimmt, daß entweder in den lebenden Zellen der Rübenwurzel die Substanz, durch

Diese Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß an der Dunkelfärbung des Rübensaftes ein Enzym beteiligt ist und daß dieses Enzym zu den Oxydasen gehört. Zu erwähnen ist noch, daß die Wurzeln und Knollen vieler anderer Gewächse sich den Rübenwurzeln ähnlich verhalten, so z. B. die Knollen der Kartoffel und der Dahlie; das gleiche Verhalten zeigen auch andere Pflanzenteile.

Im Jahre 1882 publizierte J. Reinke¹⁾ eine Untersuchung, deren Zweck es war, Aufschluß über die Natur der Substanzen zu erhalten, durch welche die Färbung der Pflanzensäfte an der Luft verursacht wird. Für seine Versuche verwendete er u. a. auch Rübensaft. Er versetzte denselben mit Bleiessig, trennte den dadurch hervorgebrachten Niederschlag von der Flüssigkeit und zersetzte ihn mittels Schwefelwasserstoff; die vom Schwefelblei abfiltrierte Lösung wurde sodann mit Äther geschüttelt. Der farblose, ätherische Extrakt hinterließ beim Verdunsten eine kleine Menge einer Substanz, die sich bei Luftzutritt zuerst kirschrot, später braun färbte. Eine Substanz von gleichem Verhalten erhielt Reinke auch, als er Rübensaft, der zuvor von den koagulierbaren Eiweißstoffen befreit worden war, mit Äther ausschüttelte. Er bezeichnet diese Substanz als Betarot. Nach seinen Beobachtungen zeigt das Betarot in seinem Verhalten große Ähnlichkeit mit dem Farbstoff von *Anchusa tinctoria*, dem Alkannarot; seine genauere Untersuchung wird aber dadurch erschwert, daß es eine leicht veränderliche Substanz ist. Das beim Luftzutritt in Betarot übergehende Chromogen, in welchem Reinke die Ursache für die Färbung des Rübensaftes an der Luft sieht, bezeichnet er als Rhodogen. Aus dem Kartoffelsaft vermochte Reinke auf dem gleichen Wege eine Substanz von gleichem Verhalten nicht zu isolieren; der zuvor mit Salzsäure erhitzte und dann filtrierte Kartoffelsaft gab aber

welche die Dunkelfärbung hervorgebracht wird, bis zur Bildung farbloser Produkte weiter oxydiert wird, oder daß in jenen Zellen auf die Oxydation, die zur Bildung gefärbter Produkte führt, sofort eine Reduktion folgt, durch welche wieder farblose Produkte erzeugt werden (ich verweise auf die weiter unten von mir zitierte Abhandlung Reinkes).

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 263.

an Äther eine auch in Wasser lösliche Substanz ab, die auf alkalische Silberlösung reduzierend wirkte (besonders beim Erwärmen) und mit Eisenchlorid eine smaragdgrüne Färbung gab. Diese Substanz zeigte Ähnlichkeit mit Brenzcatechin, konnte aber doch nicht für identisch mit letzterem erklärt werden.

Später erklärte M. Gonnermann¹⁾ die Homogentisinsäure für «die farbebedingende Substanz dunkler Rübensäfte». Nach seinen Annahmen wird das in den Rüben durch Einwirkung eines proteolytischen Enzyms auf Eiweißstoffe entstandene Tyrosin durch ein anderes, wahrscheinlich mit der Tyrosinase Bertrands identisches Enzym in Homogentisinsäure übergeführt; letztere liefert dann beim Zutritt von Luft zum Rübensaft ein dunkel gefärbtes Oxydationsprodukt. Gonnermann teilt mit, daß es ihm gelang, die Homogentisinsäure nach der von Huppert für die Darstellung dieser Säure gegebenen Vorschrift aus dem Rübensaft zu isolieren. Die Darstellungsmethode sei äußerst umständlich, zeitraubend und mit bedeutendem Verlust an Ausbeutematerial verbunden, doch sei es ihm schließlich gelungen, «eine äußerst geringe Menge der von Huppert charakterisierten weißen Krystalle von Homogentisinsäure mit ihren reaktionellen Eigenschaften zu erhalten». Über die Elementarzusammensetzung²⁾ und über den Schmelzpunkt dieses Produktes macht Gonnermann keine Angaben; man darf daher wohl annehmen, daß die Identifizierung sich nur auf das Verhalten desselben gegen Reagenzien gründete. Gibt nun auch die Homogentisinsäure mehrere zum Teil sehr empfindliche Reaktionen (ihre wässrige Lösung wird durch ammoniakalisches Silbernitrat geschwärzt, durch Eisenchlorid vorübergehend blau gefärbt, wird nach Zusatz von überschüssigem Alkali an der Luft rasch dunkel und gibt mit Millonschem Reagens beim Erhitzen Gelbfärbung, nach dem Erkalten einen ziegelroten Nieder-

¹⁾ Pflügers Archiv der Physiologie, Bd. LXXXII, S. 289. In dieser Abhandlung bespricht der Verfasser auch die von anderen Autoren gemachten Versuche zur Erklärung des Dunkelwerdens der Rübensäfte.

²⁾ Wahrscheinlich war die von Gonnermann erhaltene Ausbeute an jenem Produkt nicht groß genug, um eine Elementaranalyse dieses Produktes ausführen zu können.

schlag), so läßt sich doch auf diese Reaktionen allein ein sicherer Nachweis der genannten Säure in einem Pflanzensaft nicht gründen; denn es gibt Substanzen, welche sich gegen Reagenzien ganz ebenso, oder doch sehr ähnlich verhalten. So gibt z. B. die Uroleucinsäure,¹⁾ die im Alkaptonharn zuweilen neben Homogentisinsäure sich findet, die gleichen Reaktionen. Sehr ähnlich verhalten sich Brenzcatechin, Resorcin und Hydrochinon. Diese Substanzen reduzieren bekanntlich alkalische Silberlösung, färben sich in alkalischer Lösung an der Luft dunkel und geben mit Eisenchlorid blauviolette oder grüne Färbung. Um Homogentisinsäure in einem Pflanzensaft mit Sicherheit nachzuweisen — ein Nachweis, der für die Pflanzenphysiologie von bedeutendem Interesse sein würde —, müßte doch wohl das betreffende Produkt außer durch seine Reaktionen mindestens noch durch Bestimmung seines Schmelzpunktes identifiziert werden.

Gesetzt nun aber, daß im Rübensaft Homogentisinsäure in kleiner Menge sich findet, so folgt daraus noch nicht ohne weiteres, daß der Gehalt an dieser Säure die Ursache für die Dunkelfärbung des Rübensaftes an der Luft ist. Zur Begründung dieser Ansicht ist zunächst darauf hinzuweisen, daß die Dunkelfärbung des Saftes erfolgt, ohne daß seine saure Reaktion in eine alkalische übergeht (was ich bei Runkelrübensaft leicht beobachten konnte). Eine wässrige Homogentisinsäurelösung färbt sich aber an der Luft erst dunkel, wenn man sie zuvor alkalisch gemacht hat;²⁾ auch beim Alkaptonharn tritt starke Dunkelfärbung erst ein, nachdem seine Reaktion infolge der Harnstoffgärung alkalisch geworden ist. Man müßte also, um die Homogentisinsäure für die farbegebende Substanz dunkel gewordenen Rübensaftes erklären zu können, die Annahme machen, daß

¹⁾ Man glaubt, daß diese Säure eine Dioxyphenylmilchsäure ist. Ich verweise auf Hoppe-Seylers Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, bearbeitet von Thierfelder, S. 237.

²⁾ Eine reine wässrige Homogentisinsäurelösung färbt sich auch nicht beim Eindunsten; wenn während des Eindunstens durch Beimengungen eine Färbung der Lösung verursacht wird, so ist letztere doch jedenfalls nicht mit derjenigen zu vergleichen, die in einer alkalisch gemachten Lösung der genannten Säure eintritt.

diese Säure bei Einwirkung eines noch unbekanntes Saftbestandteiles auch in nicht alkalischer Lösung sich unter Sauerstoffaufnahme dunkel zu färben vermag. Eine solche Annahme entbehrt aber bis jetzt der Stütze. Ein Enzym, welches die Homogentisinsäure unter Bildung eines dunkel gefärbten Produktes zersetzt, ist meines Wissens bis jetzt nicht aufgefunden worden. Daß bei der Dunkelfärbung einer Tyrosinlösung durch Tyrosinase Homogentisinsäure als Zwischenprodukt auftritt, ist aus den in der Literatur sich findenden Angaben nicht zu schließen; auch wird dies von Bertrand, dem Entdecker des genannten Enzyms, nach einer mir bekannt gewordenen mündlichen Äußerung¹⁾ dieses Forschers in Abrede gestellt.

Es ist ferner darauf aufmerksam zu machen, daß die Homogentisinsäure, falls sie die Ursache für die Dunkelfärbung des Rübensaftes wäre, sich in diesem Saft doch wohl in recht ansehnlicher Quantität vorfinden müßte. Ich verglich die Färbung, die eine alkalisch gemachte Homogentisinsäurelösung bei längerem Stehen an der Luft annahm, mit derjenigen einiger der Luft ausgesetzten Rübensaftproben. Eine mit Ammoniak alkalisch gemachte Lösung, die in 5 ccm 0,01 g Homogentisinsäure enthielt, hatte sich nach mehrstündigem Stehen in einem Porzellanschälchen ungefähr ebenso stark gefärbt, wie drei daneben aufgestellte Rübensaftproben von gleichem Volumen (bei noch längerem Stehen färbten sich diese Proben dunkler als jene Lösung). Gesetzt nun, daß die Homogentisinsäure sich bei Einwirkung irgend eines noch unbekanntes Rübensaftbestandteiles ebenso stark zu färben vermöchte, wie nach Zusatz eines Alkalis, so müßte doch der Rübensaft, um die bei ihm beobachtete starke Dunkelfärbung auf Homogentisinsäure zurückführen zu können, im Liter ungefähr 2 g dieser Säure enthalten haben. Eine so beträchtliche Quantität würde sich aber ohne Zweifel im Rübensaft leicht nachweisen lassen. Denn die von N. Castoro und mir²⁾ ausgeführten Versuche haben gezeigt, daß man aus einem Keimpflanzenextrakt, dem man eine im Verhältnis hinter

¹⁾ Diese Äußerung wurde von Herrn G. Bertrand, gegenüber einem meiner Mitarbeiter bei Gelegenheit von dessen Anwesenheit in Paris, gemacht.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 396.

jenem Betrag weit zurückbleibende Quantität von Homogentisinsäure zugesetzt hat, diese Säure durch Ausschütteln mit Äther unter Zusatz von Schwefelsäure zum großen Teil wieder gewinnen und in dem beim Abdestillieren der ätherischen Lösung verbliebenen Rückstände an ihren Reaktionen erkennen kann. Daß für den Rübensaft das gleiche gelten werde, konnte von vornherein für sehr wahrscheinlich erklärt werden. (Dies ergibt sich auch aus den Versuchen, deren Ergebnisse weiter unten mitgeteilt werden.)

Meine Versuche, aus Runkelrüben- und Zuckerrübensaft durch Ausschütteln mit Äther unter Zusatz von Schwefelsäure Homogentisinsäure zu gewinnen, waren erfolglos. Ehe ich diese Versuche im einzelnen beschreibe, bedarf es einiger Bemerkungen über die Art und Weise, in welcher ich den für dieselben verwendeten Rübensaft behandelte. Es ist klar, daß man den für die Prüfung auf Homogentisinsäure bestimmten Saft nicht an der Luft stehen lassen darf, bis er schwarz geworden ist; denn nach Gonnermanns Annahme beruht ja das Schwarzwerden auf einer Zersetzung der genannten Säure. Es empfiehlt sich also, den Saft, aus dem man Homogentisinsäure gewinnen will, bis zum Koagulieren des Eiweißes zu erhitzen, um ihn dadurch haltbar zu machen. Allerdings sagt Gonnermann, daß Rübenbrei, der sich an der Luft rot zu färben begonnen hat, noch nicht viel Homogentisinsäure enthalte; aber er gibt nicht an, welchen Weg man einschlagen muß, um den Saft reicher an dieser Säure zu machen. Dieser Weg könnte aber doch nur darin bestehen, daß man den Saft in einem verschlossenen Gefäß, also geschützt vor dem Luftzutritt, eine Zeitlang stehen läßt. Wir haben daher, um jener Meinung Gonnermanns Rechnung zu tragen, 1 Liter Rübensaft vor der Untersuchung in einem gut verschlossenen Gefäß 10 Stunden lang aufbewahrt. Freilich mußten wir von vornherein diese Maßregel deshalb für erfolglos halten, weil dieser Saft, wie aus den weiter unten gemachten Mitteilungen hervorgeht, Tyrosin nur in äußerst geringer Quantität enthielt.

Vor Mitteilung der von uns erhaltenen Versuchsergebnisse sei noch bemerkt, daß für die Versuche I bis III Saftproben

verwendet wurden, die durch möglichst rasches Auspressen des Rübenbreies gewonnen und sodann sofort im Wasserbade bis zum Koagulieren der Eiweißstoffe erhitzt worden waren; für den Versuch IV verwendeten wir die 10 Stunden lang in einem verschlossenen Gefäße aufbewahrte und erst dann vom koagulierbaren Eiweiß befreite Saftprobe.

Versuch I: 800 ccm Zuckerrübensaft¹⁾ wurden mit 50 ccm 5%iger Schwefelsäure versetzt und sodann mit ca. 400 ccm Äther im Scheidetrichter wiederholt anhaltend durchgeschüttelt. Die Trennung der ätherischen von der wässerigen Schicht machte keine Schwierigkeiten.²⁾ Die wässerige Schicht wurde hierauf noch einmal mit ungefähr der gleichen Äthermenge geschüttelt. Die vereinigten Ätherextrakte wurden der Destillation unterworfen. Den im Destillationskolben verbliebenen Rückstand brachten wir nach Zusatz von etwas Wasser in ein Schälchen, erhitzen dasselbe gelinde im Wasserbade, um die letzten Ätherreste zu entfernen, und unterwarfen die dabei verbliebene Flüssigkeit, deren Volumen nur 4—5 ccm betrug, der Filtration. Das nahezu farblose Filtrat untersuchten wir auf Homogentisinsäure. Eine Probe dieses Filtrats färbte sich auf Zusatz von stark ammoniakalischer Silbernitratlösung³⁾ gelb, bei längerem Stehen bräunlichgelb; eine Schwärzung und eine Ausscheidung von Silber, wie sie eine Homogentisinsäurelösung auch bei sehr starker Verdünnung zeigt, trat aber nicht ein; durch das Hinzufügen einer äußerst geringen Homogentisinsäuremenge zu der Probeflüssigkeit wurden diese Erscheinungen aber sofort hervor-

¹⁾ Wir erhielten die Zuckerrüben von der Zuckerfabrik Aarberg im Kt. Bern. Dieselben waren von den Nebenwurzeln befreit, auch war der oberste Teil der Rübe (der sog. Kopf) abgeschnitten worden.

²⁾ Die ätherische Schicht trennte sich beim Stehen rasch von der wässerigen; zwischen beiden Schichten blieb aber in mehreren Fällen eine Emulsion, deren Volumen bald geringer, bald etwas größer war. Diese Emulsion wurde, nachdem sie von der wässerigen und ätherischen Schicht getrennt worden war, in einem Scheidetrichter mit Äther geschüttelt, wodurch sie leicht zerlegt werden konnte.

³⁾ Fehlte es an Ammoniak, so entstand ein weißer Niederschlag, der vielleicht aus oxalsaurem Silber bestand; dieser Niederschlag löste sich aber auf Zusatz von Ammoniakflüssigkeit wieder auf.

gerufen. Eine andere Probe jenes Filtrats wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und sodann in einem Schälchen der Luft ausgesetzt; sie färbte sich nach dem Ammoniakzusatz zwar gelb, wurde aber auch bei längerem Stehen an der Luft nicht braun. Eine dritte Probe jenes Filtrats wurde mit einigen Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung versetzt; von einer dadurch bedingten Blaufärbung war nichts zu bemerken. Ebenso wenig trat beim Erwärmen mit Millonschem Reagens eine Färbung ein. Die in der beschriebenen Weise erhaltene Lösung enthielt also zweifellos keine Homogentisinsäure.

Versuch II. 1,4 l Runkelrübensaft wurden ebenso behandelt, wie der für den vorigen Versuch verwendete Saft. Die Untersuchung des Ätherextrakts, ausgeführt in der bei Versuch I beschriebenen Weise, gab das gleiche Resultat; Homogentisinsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Versuch III. 500 ccm Runkelrübensaft, dargestellt aus einigen andern Rübenexemplaren, wurden in der gleichen Weise untersucht; das Resultat war auch hier negativ.

Versuch IV. Ein Liter Runkelrübensaft wurde in einem gut verschlossenen, mit dem Saft fast ganz gefüllten Gefäße 10 Stunden lang aufbewahrt; dann wurde der Saft, der sich nur an der Oberfläche etwas dunkel gefärbt hatte, unter Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure im Wasserbade bis zum Koagulieren der Eiweißstoffe erhitzt, hierauf filtriert. 750 ccm des Filtrats wurden nach Zusatz von 50 ccm 5%iger Schwefelsäure mit ca. 400 ccm Äther im Scheidetrichter sehr anhaltend geschüttelt. Die Trennung der ätherischen von der wässerigen Schicht bot auch in diesem Falle keine Schwierigkeit dar. Der bei Destillation des Ätherextrakts verbliebene Rückstand wurde mit Wasser behandelt, die filtrierte Lösung, deren Volumen 4—5 ccm betrug, auf Homogentisinsäure untersucht. Das Resultat war negativ. Eine Probe jener Lösung färbte sich nach Zusatz von stark ammoniakalischem Silbernitrat nur bräunlichgelb, ohne daß eine Ausscheidung erfolgte. Der Zusatz einer äußerst geringen Homogentisinsäuremenge zur Probeflüssigkeit bewirkte, daß letztere sich sofort unter Ausscheidung von Silber schwärzte.

Versuch V. 400 ccm Runkelrübensaft wurden unmittelbar nach der Darstellung, ohne zuvor bis zum Koagulieren der Eiweißstoffe erhitzt worden zu sein, mit Äther unter Zusatz von Schwefelsäure (in dem oben angegebenen Mengenverhältnis) im Scheidetrichter geschüttelt. Dabei entstand eine starke Emulsion. Nach längerem Stehen hatte sich unter dieser Emulsion eine ziemlich klare wässerige Schicht gebildet, welche aus dem Scheidetrichter abgelassen wurde. Zu der im Trichter verbliebenen Emulsion setzten wir ziemlich viel Äther hinzu. Nach längerem Stehen hatte sich dieselbe wenigstens partiell in eine ätherische und eine wässerige Schicht geschieden. Die ätherische Schicht wurde der Destillation unterworfen, der dabei verbliebene Rückstand auf Homogentisinsäure untersucht. Das Resultat war negativ.

Es war nun zu prüfen, ob eine geringe, dem Rübensaft zugesetzte Homogentisinsäurequantität beim Schütteln des Safts mit Äther in letzteren überging. Ich versetzte 100 ccm vom koagulierbaren Eiweiß befreiten Rübensafts mit 0,024 g Homogentisinsäure, gelöst in 5 ccm Wasser, und 15 ccm 5%iger Schwefelsäure. Diese Flüssigkeit, deren Homogentisinsäuregehalt nur 0,02% betrug, wurde sodann im Scheidetrichter mit 100 ccm Äther 8 mal je 2—3 Minuten lang durchgeschüttelt. Den beim Verdunsten des von der wässerigen Schicht getrennten Ätherextrakts verbliebenen Rückstand behandelten wir mit Wasser. Eine Probe der dabei erhaltenen Lösung schwärzte sich nach Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat sofort unter Abscheidung von Silber. Eine zweite Probe der Lösung gab auf Zusatz einiger Tropfen sehr stark verdünnter Eisenchloridsolution eine freilich nicht starke Blaufärbung, die rasch wieder verschwand. Eine dritte Probe der gleichen Lösung wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und sodann der Luft ausgesetzt. Sie färbte sich dabei bräunlich. Aus einer Vergleichung dieser Braunfärbung mit derjenigen, die eine alkalische Homogentisinsäurelösung bestimmter Konzentration beim Stehen an der Luft annahm, mußte geschlossen werden, daß bei dem ersten Ausschütteln mit Äther in letzteren nur ein Teil der dem Saft zugesetzten Homogentisinsäure übergegangen war.

Wir wiederholten daher das Ausschütteln mit Äther noch dreimal. Auch das letzte der dabei erhaltenen Ätherextrakte gab beim Verdunsten einen Rückstand, dessen wässrige Lösung auf Zusatz von ammoniakalischem Silbernitrat sich sofort schwarz färbte. Diese Beobachtungen zeigen, daß die dem Saft zugesetzte Homogentisinsäure sich nur langsam ausäthern ließ, was im Hinblick auf die Leichtlöslichkeit der genannten Säure in Wasser übrigens von vornherein zu erwarten war; jedes der in diesem Versuche erhaltenen Ätherextrakte gab aber beim Verdunsten einen Rückstand, der mit ammoniakalischem Silbernitrat die Homogentisinsäurereaktion gab.

Noch auf einem andern Wege versuchte ich, Homogentisinsäure aus dem Rübensaft zu isolieren. Da nach den darüber vorliegenden Angaben diese Säure auch in stark verdünnter Lösung durch Bleiessig gefällt wird, so versetzte ich ein Quantum von ca. 2 $\frac{1}{2}$ l Runkelrübensaft mit Bleiessig, bis dieses Reagens keine Fällung mehr hervorbrachte, trennte den Niederschlag von der Flüssigkeit, wusch ihn mit kaltem Wasser und preßte ihn sodann zwischen Filtrierpapier stark ab; der Niederschlag wurde nun in Wasser verteilt und mittels Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelblei abfiltrierte Lösung, welche nur wenig gefärbt und völlig klar war, wurde im Wasserbade eingengt und sodann im Scheidetrichter mit Äther unter Zusatz einer kleinen Menge verdünnter Schwefelsäure geschüttelt. Den beim Abdestillieren des Ätherextrakts verbliebenen Rückstand untersuchte ich auf Homogentisinsäure. Das Resultat war negativ. Ein Versuch, auf dem gleichen Wege aus Zuckerrübensaft Homogentisinsäure zu isolieren, war ebenfalls erfolglos.

Wie aus den im vorigen gemachten Mitteilungen zu ersehen ist, gelang es mir nicht, in dem Saft der von mir untersuchten Rüben Homogentisinsäure nachzuweisen; ich kann daher auch nicht annehmen, daß die Dunkelfärbung dieses Saftes an der Luft durch die genannte Säure verursacht wurde.

Wie schon oben erwähnt worden ist, liegt kein Beweis dafür vor, daß bei der Zersetzung des Tyrosins durch Tyrosinase Homogentisinsäure als Zwischenprodukt auftritt; aus den im vorigen mitgeteilten Versuchsergebnissen läßt sich daher noch

nicht schließen, daß bei der Dunkelfärbung des von mir untersuchten Rübensaftes das Tyrosin gar keine Rolle spielte. Die weitere Untersuchung dieses Saftes zeigte aber, daß derselbe nur eine äußerst geringe Quantität von Tyrosin enthielt. Die meisten Exemplare der von mir untersuchten Rübensorten enthielten ohne Zweifel nur Spuren der genannten Aminosäure.

Ehe ich die Versuche beschreibe, die zu dieser Schlußfolgerung führten, muß ich einige Bemerkungen über das dabei angewandte Verfahren machen. Wenn man einen tyrosinhaltigen Pflanzensaft mit Bleiessig in schwachem Überschuß versetzt, den Bleiniederschlag durch Filtration entfernt und dem Filtrate Mercurinitrat zufügt, so entsteht ein Niederschlag, in den neben anderen Saftbestandteilen (Asparagin, Glutamin usw.) auch ein Teil des Tyrosins eingeht. Zerlegt man diesen Niederschlag nach dem Abfiltrieren und Auswaschen durch Schwefelwasserstoff, neutralisiert die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Flüssigkeit mit Ammoniak und engt sie im Wasserbade stark ein, so liefert sie nach dem Erkalten eine aus Tyrosin bestehende Ausscheidung. Von mir und meinen Mitarbeitern ist in dieser Weise z. B. aus den Knollen der Dahlie, der Stachys und der Steckrübe, sowie aus den Keimpflanzen des Kürbis und der Kapuzinerkresse Tyrosin dargestellt worden; bei keinem, auf anderem Wege als tyrosinhaltig erkannten Pflanzenextrakte hat diese Methode versagt. Wie oben schon erwähnt worden ist, bringt man aber, wenn man in der angegebenen Weise verfährt, das Tyrosin nur partiell zur Abscheidung. Die Ausbeute daran läßt sich erhöhen, indem man die Acidität der mit Mercurinitrat versetzten Flüssigkeit durch Zusatz von Natronlauge stark verringert. Man kann aber auch so verfahren, daß man nach dem Abfiltrieren des Mercurinitratniederschlages dem Filtrate noch etwas Mercurinitrat und sodann so viel Natronlauge zusetzt, daß die saure Reaktion der Flüssigkeit in eine alkalische übergeht; man erhält dann noch einen starken gelblich gefärbten Niederschlag, der bei der Zerlegung durch Schwefelwasserstoff noch Tyrosin liefert. Auf diesem Wege kann man ohne Zweifel auch aus Extrakten, die sehr wenig Tyrosin enthalten, diese Aminosäure zur Abscheidung bringen. Ist im Ex-

trakt auch Leucin vorhanden, so geht dasselbe neben dem Tyrosin in den Niederschlag ein.

Es gelang mir nicht, auf diesem Wege aus dem Saft der für meine Versuche verwendeten Zuckerrüben Tyrosin zu gewinnen. Der Niederschlag, welcher in dem zuvor durch Versetzen mit Bleiessig gereinigten Saft durch Mercurinitrat hervorgebracht wurde, lieferte bei der Zerlegung Glutamin, dem letzteren war aber kein Tyrosin beigemischt, wie sich aus dem Verhalten des Glutaminpräparates gegen das Millonsche Reagens mit Sicherheit erkennen ließ. Wir fügten nun der vom Mercurinitratniederschlage abfiltrierten Flüssigkeit, in der überschüssiges Mercurinitrat sich vorfand, Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion hinzu, wodurch ein starker gelblicher Niederschlag hervorgebracht wurde. Auch die bei Zerlegung dieses Niederschlages erhaltene Lösung lieferte kein Tyrosin, als sie mit Ammoniak neutralisiert und sodann im Wasserbade stark eingeeengt wurde; auch gab diese Flüssigkeit beim Erwärmen mit Millonschem Reagens keine deutliche Tyrosinreaktion und enthielt diese Aminosäure ohne Zweifel nur in Spuren. Ganz ähnlich waren die Resultate, die wir bei Anwendung der beschriebenen Methode auf den Runkelrübensaft erhielten. Mit diesem Material wurden 3 Versuche angestellt. Im ersten Versuche, für welchen $2\frac{1}{2}$ l Saft verwendet wurden, erhielten wir genau das gleiche Ergebnis, wie in dem Versuche mit Zuckerrübensaft; es gelang nicht, Tyrosin zu gewinnen. Etwas anders war das Resultat im zweiten Versuch, für den wir $2\frac{1}{2}$ l Saft, dargestellt aus anderen Runkelrübenexemplaren, verwendeten; aus dem zweiten, durch Zusatz von Natronlauge hervorgebrachten Mercurinitratniederschlage ließ sich eine sehr kleine Menge von Tyrosin (identifiziert durch sein Verhalten gegen das Millonsche und gegen das Mörnersche Reagens) gewinnen. Doch betrug das Gewicht der Tyrosinkrystalle nur ca. 0,025 g. Gesetzt nun, daß wir nur die Hälfte des im Saft vorhandenen Tyrosins zur Abscheidung bringen konnten, so würde der Tyrosingehalt des Saftes doch nur 0,002% betragen haben. Wir machten sodann noch einen dritten Versuch mit 4 l Saft, dargestellt aus anderen Exemplaren der gleichen Runkelrübensorte.

Dieser Versuch verlief wieder ganz negativ; auch aus dem zweiten, durch Zusatz von Natronlauge hervorgebrachten Mercurinitratniederschlage vermochten wir kein Tyrosin zu gewinnen. Die bei Zerlegung dieses zweiten Niederschlages erhaltene Lösung gab beim Erwärmen mit Millonschem Reagens nur ganz schwache Rötung. Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß die meisten Exemplare dieser Runkelrübensorte Tyrosin höchstens in Spuren enthielten; aus einigen Exemplaren ließ sich zwar Tyrosin darstellen, aber doch nur in äußerst geringer Quantität.

Es sei hier noch erwähnt, daß in meinem Laboratorium wiederholt aus dem zuvor durch Versetzen mit Bleiessig gereinigten Runkelrübensafte durch Fällung mit Mercurinitrat Glutamin dargestellt worden ist, daß aber die auf diesem Wege gewonnenen Glutaminpräparate fast immer frei von Tyrosin waren. Es ist mir nur ein Fall erinnerlich, in welchem aus der bei Zerlegung des Mercurinitratniederschlages erhaltenen Flüssigkeit Tyrosin auskrystallisierte; doch war seine Quantität nur sehr gering.

Um völlig sicher zu sein, daß aus dem Rübensafte das darin vorhandene Tyrosin durch Ausfällung mit Mercurinitrat sich gewinnen läßt, habe ich noch folgende Versuche angestellt: 1. Zu 2 l Runkelrübensaft, der von den durch Bleiessig fällbaren Stoffen befreit worden war, wurden 3 g Tyrosin gesetzt, gelöst in so viel Wasser, daß beim Erkalten der Lösung ein Auskrystallisieren von Tyrosin nicht stattfand; dann fügte ich Mercurinitrat in schwachem Überschuß zu. Der dadurch hervorgebrachte Niederschlag wurde, nach dem Abfiltrieren und Auswaschen durch Schwefelwasserstoff, zersetzt, die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte Lösung mit Ammoniak neutralisiert und im Wasserbade stark eingeengt. Nach dem Erkalten lieferte diese Lösung, noch ehe Glutamin auskrystallisierte, eine Ausscheidung von Tyrosin. Letzteres wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, dann getrocknet und gewogen. Sein Gewicht betrug 0,8 g. 2. Für einen zweiten Versuch verwendete ich 2 l Runkelrübensaft, welchem ebenfalls 0,3 g Tyrosin in der gleichen Weise zugesetzt worden waren. In diesem Falle wurde neben

dem ersten Mercurinitratniederschlag auch die zweite Fällung, die durch Zusatz von Natronlauge zum Filtrat vom ersten Niederschlage hervorgebracht wurde, auf Tyrosin verarbeitet. Die Ausbeute an dieser Aminosäure war nun größer, als im vorigen Versuch; sie betrug zwischen 0,1 und 0,2 g.¹⁾ Zur Identifizierung des Tyrosins diente sein Verhalten gegen das Millonsche und das Mörnersche Reagens sowie die Piriasche Reaktion. Daß nur etwa die Hälfte der dem Saft zugesetzten Tyrosinquantität wieder gewonnen werden konnte, ist eine leicht zu erklärende Erscheinung. Die Fällung, welche durch Mercurinitrat in dem Saft hervorgebracht wird, enthält auch Glutamin. Dunstet man die bei Zerlegung dieses Niederschlages erhaltene Lösung auf ein geringes Volumen ein, so krystallisiert aus derselben zuerst Tyrosin aus; selbstverständlich aber ist auch dem später auskrystallisierenden Glutamin noch Tyrosin beigemischt, welches sich zwar mit Hilfe des Millonschen Reagens leicht erkennen, aber doch nicht quantitativ vom Glutamin trennen läßt. Die Gewinnung des Tyrosins aus den Mercurinitratniederschlägen ist also mit Verlusten verbunden.

Aus den im vorigen mitgeteilten Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß die für meine Versuche verwendeten Rüben Tyrosin nur in äußerst geringer Quantität, meistens nur in Spuren enthielten; man kann daher nicht annehmen, daß die sehr starke Dunkelfärbung des Saftes dieser Rüben an der Luft auf einer Zersetzung von Tyrosin durch Tyrosinase oder durch ein der letzteren ähnliches Enzym beruhte. Für die Richtigkeit dieser Ansicht sprechen noch folgende Versuche: 1. 2 l Rübensaft, gewonnen durch Auspressen von frischem Rübenbrei, wurden mit einer Lösung von 3 g Tyrosin in Wasser vermischt. Ich ließ das Gemisch in einer offenen Schale unter häufigem Umrühren 5 Stunden lang an der Luft stehen, wobei es sich intensiv dunkel färbte. Der dunkel gefärbten Flüssigkeit fügte ich nun Bleiessig in schwachem Überschuß zu, beseitigte den dadurch erzeugten Niederschlag durch Filtration und versetzte das Filtrat mit Mercurinitrat, wodurch eine starke Fällung hervorgebracht wurde. Der davon abfiltrierten Flüssigkeit fügte ich noch etwas

¹⁾ Diesem Tyrosin war kein Glutamin beigemischt.

Mercurinitrat und sodann Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion zu. Die dadurch erzeugte Fällung lieferte, ebenso wie die erste, bei der Zerlegung Tyrosin, dessen Identifizierung mit Hilfe der oben angeführten Reaktionen geschah. Das Gewicht des zur Abscheidung gebrachten Tyrosins betrug ca. 0,15 g. 2. In einem zweiten Versuch ließ ich ein in der gleichen Weise vorbereitetes Gemisch von Runkelrübensaft mit einer wässrigen Tyrosinlösung 18 Stunden lang an der Luft stehen und behandelte die schwarz gewordene Flüssigkeit dann ganz ebenso, wie es im Versuch 1 geschah. Auch in diesem Falle konnte aus den Mercurinitratniederschlägen Tyrosin gewonnen werden; die Ausbeute daran war ungefähr eben so groß wie im ersten Versuch.

Diese Versuche führen zu der Schlußfolgerung, daß beim Schwarzwerden des Rübensaftes das dem letzteren zugesetzte Tyrosin nicht verbraucht worden war; denn aus dem schwarz gewordenen Saft konnte ungefähr ebenso viel Tyrosin wieder gewonnen werden, wie aus der Rübensaftprobe, die erst nach der Behandlung mit Bleiessig mit der gleichen Tyrosinmenge versetzt worden war. Auf die Übereinstimmung der bezüglichen Zahlen ist allerdings ein sehr großes Gewicht nicht zu legen; denn es handelt sich ja in diesen Versuchen nicht um eine genaue quantitative Bestimmung des Tyrosins, sondern um eine Ermittlung der Ausbeute, deren Größe durch verschiedene Umstände beeinflußt wird. Trotz jener Übereinstimmung ist also die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß beim Stehen des Rübensaftes an der Luft ein geringer Teil des demselben zugefügten Tyrosins zersetzt wurde.¹⁾

Aus den im vorigen gemachten Mitteilungen ist zu schließen, daß die Dunkelfärbung des für meine Versuche verwendeten Rübensaftes auf einen Gehalt dieses Saftes an Tyrosin und an Homogentisinsäure nicht zurückzuführen war. Denn im Saft fand sich Tyrosin nur in so geringer Menge vor, daß diese Aminosäure an der Dunkelfärbung des Saftes einen wesentlichen Anteil

¹⁾ Nach den Angaben Gonnermanns (loc. cit.) enthält der Zuckerrübensaft ein Enzym, durch welches das Tyrosin unter Braunfärbung zersetzt wird.

nicht haben konnte; Homogentisinsäure vermochte ich aber im Saft gar nicht nachzuweisen.

Die Wahrnehmung, daß der von mir untersuchte Rübensaft nur Spuren von Tyrosin enthielt, steht selbstverständlich nicht in Widerspruch mit Gonnermanns Annahme, nach welcher die Zersetzung von Eiweißstoffen in den Rüben mit der Bildung der genannten Aminosäure verbunden ist; denn es ist möglich, daß letztere später dem Abbau unterlag. Wie von mir nachgewiesen worden ist, tritt Tyrosin auch in den Cotyledonen keimender Leguminosensamen auf, findet sich aber in den wachsenden Keimpflanzenteilen (hypocotyles Glied, Wurzel usw.) nur in Spuren vor — offenbar deshalb, weil es später dem Abbau unterliegt. Bertel¹⁾ hat behauptet, daß dieser Abbau in den Keimpflanzen von *Lupinus albus* durch Tyrosinase bewirkt werde und daß dabei Homogentisinsäure sich bilde; N. Castoro und ich²⁾ vermochten aber aus den genannten Keimpflanzen durch Schütteln der Extrakte mit Schwefelsäure und Äther keine Homogentisinsäure zu gewinnen. Die negativen Resultate, die wir bei der Prüfung auf diese Säure bei den Keimpflanzen sowie jetzt beim Rübensaft erhielten, lassen selbstverständlich noch die Möglichkeit offen, daß beim Abbau des Tyrosins in den Pflanzen Homogentisinsäure zwar entsteht, aber rasch wieder zersetzt wird und infolge davon nur in einzelnen Fällen, unter besonders günstigen Umständen, in einer für ihren Nachweis genügenden Quantität sich ansammelt. In einer Keimpflanze, die man untersucht, während in ihr die Bildung von Tyrosin aus Eiweißstoffen noch im Gange ist, müßten aber doch die Verhältnisse für den Nachweis der Homogentisinsäure günstig liegen. Wenn man nun diese Säure in der beim Ausschütteln des Safts mit Äther und Schwefelsäure erhaltenen Lösung trotz der Empfindlichkeit der bezüglichen Reaktionen nicht auffinden kann, so ist es höchst unwahrscheinlich, daß sie beim Abbau des Tyrosins in der Keimpflanze entsteht. Es ist denkbar, daß beim

¹⁾ Berichte der Deutsch. Botanischen Gesellschaft, 1902, Bd. XX, S. 454—463.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 396.

Rübensaft die Verhältnisse etwas anders liegen. Will man aber den sichern Beweis für das Vorhandensein von Homogentisinsäure in einer Pflanze liefern, so darf man sich nicht allein auf die Reaktionen dieser Säure stützen,¹⁾ da es, wie oben schon hervorgehoben wurde, noch andere Substanzen gibt, welche entweder die gleichen oder sehr ähnliche Reaktionen geben; man wird also mindestens noch nachzuweisen haben, daß die Substanz, die man für Homogentisinsäure erklärt, im Schmelzpunkte mit dieser Säure übereinstimmt.

Die aus unseren Beobachtungen sich ableitenden Schlußfolgerungen sind selbstverständlich nicht unvereinbar mit der Annahme, daß in einem Rübensafte, der reicher an Tyrosin ist, als der von uns untersuchte, diese Aminosäure und ihre Umwandlungsprodukte an dem Dunkelwerden des Saftes einen gewissen Anteil nehmen. Es ist ja möglich, daß die letztere Erscheinung nicht durch einen Saftbestandteil, sondern durch mehrere, im Saft neben einander vorhandene Stoffe verursacht wird.

Bei Ausführung eines Teiles der im vorigen beschriebenen Versuche wurde ich unterstützt von Herrn Dr. O. Hiestand, dem ich dafür an dieser Stelle meinen besten Dank ausspreche.

¹⁾ Wie kaum bemerkt zu werden braucht, steht diese Ansicht nicht im Widerspruch mit dem Umstande, daß wir in den Versuchen, in denen Pflanzensaft nach Zusatz von Homogentisinsäure mit Äther und Schwefelsäure geschüttelt wurde, den Nachweis der genannten Säure im Ätherextrakt nur auf ihre Reaktionen gründeten. Denn es handelte sich ja in diesen Fällen nur um den Nachweis der dem Saft zugesetzten Homogentisinsäure. Niemand wird behaupten wollen, daß wir bei dieser Sachlage, um den Übergang dieser Säure in den Äther zu beweisen, dieselbe aus den Ätherextrakten in Substanz abscheiden und durch Bestimmung ihres Schmelzpunktes identifizieren mußten. Letzteres wäre nur möglich gewesen, falls wir dem Saft eine viel größere Homogentisinsäuremenge zugesetzt hätten.
